(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 119193824 A
(43)申请公布日 2024.12.27

(21)申请号 202410745296.3

(22)申请日 2018.01.26

(30)优先权数据
62/451,327 2017.01.27 US
62/622,107 2018.01.25 US

(62)分案原申请数据
201880012946.6 2018.01.26

(71)申请人 精密科学公司
地址 美国威斯康星州
申请人 梅奥医疗教育与研究基金会

(72)发明人 H·T·阿拉维 M·W·凯瑟
G·P·利加德 W·R·泰勒
T·J·桑德 A·M·瓦卡罗

(74)专利代理机构 北京市柳沈律师事务所 11105
专利代理师 张文辉

(51)Int.Cl.
*C12Q 1/6886*(2018.01)

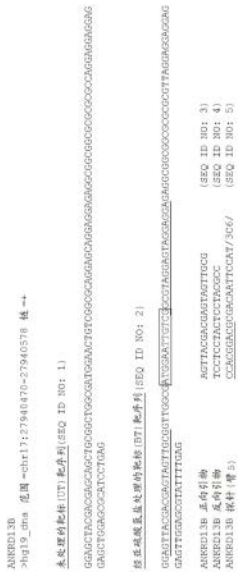
权利要求书1页 说明书80页
序列表（电子公布） 附图59页

(54)发明名称

通过分析甲基化DNA检测结肠瘤形成

(57)摘要

本文提供了用于瘤形成筛查的技术,并且特别地但非排他地涉及用于检测癌症,特别是结直肠癌的存在的方法、组合物和相关用途。



CN 119193824 A

1.一种表征来自受试者的样品的方法,其包括:

a)提供来自受试者的样品;

b)测定所述样品中至少一种甲基化标记DNA的量,所述甲基化标记DNA选自由以下组成的甲基化标记基因的组:ANKRD13B;CHST2;CNNM1;GRIN2D;JAM3;LRRC4;OPLAH;SEP9;SFMBT2;SLC12A8;TBX15;ZDHHC1;ZNF304;ZNF568;ZNF671;DOCK2;DTX1;FERMT3;OPLAH;PDGFD;PKIA;PPP2R5C;TBX15;TSPYL5;VAV3;FER1L4;和ZNF671;

b)测定所述样品以获得所述样品中参考核酸的量。

2.根据权利要求1所述的方法,其中来自受试者的所述样品包括血液或血浆样品。

3.根据权利要求1或权利要求2所述的方法,其中所述测定包括从受试者获得包含DNA的样品,并用这样的试剂处理从所述样品中获得的DNA,所述试剂选择性地修饰所述获得的DNA中未甲基化的胞嘧啶残基以产生经修饰的残基。

4.根据权利要求1所述的方法,其中所述至少一种甲基化标记DNA选自由以下组成的组:VAV3;ZNF671;CHST2;FLI1;JAM3;SFMBT2;PDGFD;DTX1;TSPYL5;ZNF568;GRIN2D和QKI。

5.根据权利要求1所述的方法,其中所述至少一种甲基化标记DNA包括至少两种甲基化标记DNA。

6.根据权利要求1所述的方法,其中所述至少一种甲基化标记DNA包括由以下组成的组:VAV3;ZNF671;CHST2;FLI1;JAM3;SFMBT2;PDGFD;DTX1;TSPYL5;ZNF568;GRIN2D和QKI。

7.根据权利要求1所述的方法,其中所述方法还包括测定所述样品中的癌胚抗原(CEA)蛋白。

8.根据权利要求3所述的方法,其中所述试剂包含亚硫酸氢盐试剂。

9.根据权利要求1所述的方法,其中测定所述样品中甲基化标记DNA的量包括确定所述甲基化标记基因中一个碱基的甲基化状态。

10.根据权利要求1所述的方法,其中测定所述样品中甲基化标记物的量包括确定甲基化标记基因中多个碱基处的甲基化程度。

# 通过分析甲基化DNA检测结肠瘤形成

[0001] 本申请是申请日为2018年1月26日,优先权日为2017年1月27日,申请号为201880012946.6,发明名称为“通过分析甲基化DNA检测结肠瘤形成”的中国发明专利申请的分案申请。

[0002] 相关申请的交叉引用

[0003] 本申请要求2017年1月27日提交的美国临时专利申请62/451,327和2018年1月25日提交的美国临时专利申请62/622,107的优先权益,其中每个临时专利申请均通过引用整体并入。

## 技术领域

[0004] 本文提供了涉及检测瘤形成的技术,并且特别地但非排他性地涉及用于检测诸如结肠癌的肿瘤的方法、组合物和相关用途。

## 背景技术

[0005] 结直肠癌仍然是美国男性和女性总和起来第二最常见的癌症(Siegel R等人,CA Cancer J Clin 2013;63:11-30)。从前期病变进展到癌症的潜在生物学特性有利于筛查(Vogelstein B等人,Science2013;339:1546-58)。有证据支持并且有指导原则支持几种测试和策略中的任一种(Levin B等人,Gastroenterology 2008;134:1570-95;Rex DK等人,Am J Gastroenterol 2009;104:739-50;Karl J等人,Clin Gastroenterol Hepatol 2008;6:1122-8)。从社会角度来看,认为筛查是有成本效益的(Karl J等人,Clin Gastroenterol Hepatol 2008;6:1122-8;Heitman SJ等人,PLoS Med 2010;7:e1000370;Parekh M等人,Aliment Pharmacol Ther 2008;27:697-712;Sharaf RN等人,Am J Gastroenterol2013;108:120-32)。

[0006] 结直肠癌起因于累积的遗传和表观遗传改变,为分析粪便中的肿瘤特异性变化提供了基础(Berger BM等人,Pathology 2012;44:80-8)。先前在筛选环境中对早期代粪便基DNA检测的大规模研究,仅表现出对结直肠癌有合理的灵敏度而对晚期腺瘤的灵敏度低(Ahlquist DA等人,Ann Intern Med 2008;149:441-50,W81;Imperiale TF等人,NEngl J Med 2004;351:2704-14)。从那时起已经取得了重要进展,包括稳定缓冲液(Boynton KA等人,Clin Chem 2003;49:1058-65;Zou H等人,Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2006;15:1115-9),更多鉴别性标记物(Ahlquist DA等人,Gastroenterology 2012;142:248-56;Bardan E等人,Israel journal of medical sciences 1997;33:777-80),具有较高分析灵敏度的平台(Ahlquist DA等人,Gastroenterology 2012;142:248-56;Aronchick CA等人,Gastrointestinal endoscopy 2000;52:346-52),使用逻辑回归分析而不是单独的标记值确定结果,以及自动化。

[0007] 尽管筛查降低了结直肠癌死亡率(Mandel JS等人,N Engl J Med.1993,328:1365-71;Hardcastle JD等人,Lancet.1996,348:1472-7;Kronborg O等人,Scand J Gastroenterol.2004,39:846-51;Winawer SJ等人,J Natl Cancer Inst.1993,85:1311-

8;Singh H等人,JAMA.2006,295:2366-73),但观察到的降低是不多的(Singh H等人,JAMA.2006;295,2366-73;Heresbach D等人,Eur J Gastroenterol Hepatol.2006,18:427-33)并且在美国一半以上的成人尚未接受筛查(Meissner HI,Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.2006,15:389-94)。

[0008] 一种新兴的癌症筛查方法涉及测定来自癌症患者的身体样品,诸如粪便、血清和尿液中的肿瘤特异性DNA改变(Osborn NK,AhlquistDA.Gastroenterology 2005;128:192-206;Ahlquist DA等人,Gastroenterology 2000;119:1219-27;Ahlquist DA等人,Gastroenterology 2002;122:增刊A40;Chen WD等人,J Natl Cancer Inst2005;97:1124-32;Zou H等人,Cancer Epidemiol Biomarkers Prev2006;15:1115-9;Zou HZ,Clin Cancer Res 2002;8:188-91;Hoque MO,J Clin Oncol 2005;23:6569-75;Belinsky SA等人,Cancer Res2006;66:3338-44;Itzkowitz SH等人,Clin Gastroenterol Hepatol2007;5:111-7'Kann L等人,Clin Chem 2006;52:2299-302)。如果要在癌症筛查应用中实现效率和有效性,则选择具有高精确度的标记物很重要。由于结直肠瘤形成的分子异质性,高检测率往往需要一组标记物。

[0009] 在来自结直肠癌患者的粪便和血清/血浆样品中已经检测到几种甲基化基因(Ahlquist DA,Gastroenterology 2002;122:增刊A40;Chen WD等人,J Natl Cancer Inst 2005;97:1124-32;Zou HZ等人,Clin Cancer Res 2002;8:188-91;Itzkowitz SH等人,Clin Gastroenterol Hepatol 2007;5:111-7;Petko Z等人,Clin Cancer Res 2005;11:1203-9;Muller HM等人,Lancet 2004;363:1283-5;Leung WK等人,Clin Chem2004;50:2179-82;Ebert MP等人,Gastroenterology 2006;131:1418-30;Grady WM等人,Cancer Res 2001;61:900-2)。尽管已经在大多数结直肠癌中发现了一些甲基化基因,但基于体液的测定的收率仍然处于次优水平(Ahlquist DA等人,Gastroenterology 2002;122:增刊A40;Chen WD等人,J Natl Cancer Inst 2005;97:1124-32;Zou H等人,Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2006;15:1115-9;Zou HZ,Clin Cancer Res2002;8:188-91;Belinsky SA等人,Cancer Res 2006;66:3338-44;Itzkowitz SH等人,Clin Gastroenterol Hepatol 2007;5:111-7;Kann L等人,Clin Chem 2006;52:2299-302;Petko Z等人,Clin Cancer Res2005;11:1203-9;Muller HM等人,Lancet 2004;363:1283-5;Leung WK等人,Clin Chem 2004;50:2179-82;Ebert MP等人,Gastroenterology2006;131:1418-30;Grady WM等人,Cancer Res 2001;61:900-2)。

[0010] 需要更精确、用户友好且可广泛分配的工具来提高筛查效率、可接受性和可访问性。

## 发明内容

[0011] 本文提供了涉及检测瘤形成的技术,并且特别地但非排他地,涉及通过分析来自受试者(例如,患者)的血液和/或血浆样品来检测恶化前和恶性结直肠癌的方法、组合物和相关用途。当本文描述所述技术时,所用的小节标题仅出于组织目的,而不应理解为以任何方式限制主题。

[0012] 本文提供了在组织上测定的一组甲基化DNA标记物,其对结直肠癌实现极高的鉴别力,同时在正常结直肠组织中保持阴性。该组可以应用于例如基于血液或体液的试验,并

应用于结直肠癌筛查。

[0013] 在研究中通过比较来自结直肠癌样品的DNA标记物与正常(非癌性)样品中的相应标记物的甲基化状态来鉴定标记物和/或标记物组(例如,具有选自以下的注解的染色体区域:ANKRD13B;CHST2;GRIN2D;JAM3;LRRC4;OPLAH;SEP9;SFMBT2;SLC12A8;TBX15;ZDHHC1;ZNF304;ZNF568;ZNF671;CNNM1;DOCK2;DTX1;FERMT3;OPLAH;PDGFD;PKIA;PPP2R5C;TBX15;TSPYL5;VAV3;FER1L4;和ZNF671)。

[0014] 如本文所述,所述技术提供了许多对结肠癌具有高鉴别力的甲基化DNA标记物及其子集(例如,2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12种或更多种标记物的集合)。实验将选择过滤器应用于候选标记物以鉴定提供高信噪比和低背景水平的标记物,以便为癌症筛查或诊断目的而提供高特异性和选择性。例如,如下文所述,12种标记物和癌胚抗原(CEA)蛋白的组合对测试的所有癌症血浆样品产生67.4%的灵敏度(60/89癌症),具有92.6%的特异性。

[0015] 因此,本文提供了与在从受试者获得的样品中筛查结肠癌的方法有关的技术,所述方法包括测定甲基化标记DNA的量,例如以评估从受试者获得的样品中的标记物的甲基化状态;当所述标记物的甲基化状态不同于在没有肿瘤的受试者中测定到的标记物的甲基化状态时,将所述受试者鉴定为患有结肠癌。在一些实施方案中,所述标记物包含具有选自以下的注解的染色体区域:ANKRD13B;CHST2;GRIN2D;JAM3;LRRC4;OPLAH;SEP9;SFMBT2;SLC12A8;TBX15;ZDHHC1;ZNF304;ZNF568;ZNF671;CNNM1;DOCK2;DTX1;FERMT3;OPLAH;PDGFD;PKIA;PPP2R5C;TBX15;TSPYL5;VAV3;FER1L4;和ZNF671。在一些实施方案中,所述技术包括测定多种标记物,例如包括测定2至20种,优选2至14种,更优选2至12种标记物。例如,在一些实施方案中,该方法包括分析选自以下的两种或更多种标记物的甲基化状况:VAV3;ZNF671;CHST2;FLI1;JAM3;SFMBT2;PDGFD;DTX1;TSPYL5;ZNF568;GRIN2D和QKI。在优选实施方案中,所述测定包括检测CEA蛋白。

[0016] 所述技术不限于评估甲基化状态。在一些实施方案中,评估样品中标记物的甲基化状态包括确定一个碱基的甲基化状态。在一些实施方案中,测定样品中标记物的甲基化状态包括确定多个碱基处的甲基化程度。而且,在一些实施方案中,标记物的甲基化状态包括相对于标记物的正常甲基化状态,即相对于来自没有瘤形成的受试者的DNA中标记物的甲基化状态,所述标记物的甲基化增加。在一些实施方案中,标记物的甲基化状态包括相对于标记物的正常甲基化状态,标记物的甲基化减少。在一些实施方案中,标记物的甲基化状态包括相对于标记物的正常甲基化状态,标记物的甲基化模式不同。

[0017] 在一些实施方案中,所述技术提供了生成报告从受试者获得的样品中的结肠肿瘤的记录的方法,其包括以下步骤:

[0018] a)测定来自受试者的样品以获得从受试者获得的样品中至少一种选自由以下组成的组的甲基化标记基因的量:ANKRD13B;CHST2;GRIN2D;JAM3;LRRC4;OPLAH;SEP9;SFMBT2;SLC12A8;TBX15;ZDHHC1;ZNF304;ZNF568;ZNF671;CNNM1;DOCK2;DTX1;FERMT3;OPLAH;PDGFD;PKIA;PPP2R5C;TBX15;TSPYL5;VAV3;FER1L4;和ZNF671;

[0019] b)测定所述样品以获得所述样品中参考标记物的量;

[0020] c)比较所述至少一种甲基化标记基因的量与所述样品中参考标记物(优选甲基化参考标记物)的量,以确定所述样品中所述至少一种标记基因的甲基化状态;以及

[0021] d)生成报告所述样品中所述至少一种标记基因的甲基化状态的记录。

[0022] 报告标记物的甲基化状态的记录不限于任何特定形式的报告,并且可以包括例如对电子病历、打印报告或电子消息的更新。在一些实施方案中,将测定期间产生的实验室数据包括在报告中,而在一些实施方案中,仅基于所确定的所述至少一种标记基因的甲基化状态的数据或诊断结果的汇总包括在记录中。

[0023] 在一些实施方案中,针对至少两种标记物测定样品,并且优选地,所述至少一种甲基化标记物基因选自由以下组成的组:VAV3;ZNF671;CHST2;FLI1;JAM3;SFMBT2;PDGFD;DTX1;TSPYL5;ZNF568;GRIN2D和QKI。在更优选的实施方案中,针对一组包含以下的标记物测定样品:VAV3;ZNF671;CHST2;FLI1;JAM3;SFMBT2;PDGFD;DTX1;TSPYL5;ZNF568;GRIN2D和QKI。在优选实施方案中,测定来自受试者的样品中CEA蛋白的存在。

[0024] 在一些实施方案中,用于测定的方法包括从受试者获取包含DNA的样品,以及用选择性修饰所获得的DNA中未甲基化的胞嘧啶残基的试剂处理从所述样品中获得的DNA以产生经修饰的残基。在优选实施方案中,所述试剂包含亚硫酸氢盐试剂。

[0025] 所述方法不限于分析特定大小的甲基化标记区域,或分析所述数量的核苷酸的甲基化状况。在一些实施方案中,测定样品中标记DNA的甲基化状态包括确定一个碱基的甲基化状态,而在其他实施方案中,所述测定包括确定多个碱基处的甲基化程度。在一些实施方案中,标记物的甲基化状态包括相对于标记物的正常甲基化状态,标记物的甲基化增加或减少,而在一些实施方案中,标记物的甲基化状态包括相对于标记物的正常甲基化状态甲基化模式不同,例如,标记物的甲基化区域中的甲基化核苷酸子集不同。

[0026] 所述技术不限于特定样品类型。例如,在一些实施方案中,所述样品是组织样品、血液样品、血清样品或痰液样品。在某些实施方案中,组织样品包含结肠组织。

[0027] 所述技术不限于测定DNA样品的任何特定方法。例如,在一些实施方案中,所述测定包括使用聚合酶链反应、核酸测序、质谱法、甲基化特异性核酸酶、基于质量的分离和/或靶标捕获。在某些优选实施方案中,所述测定包括使用活瓣核酸内切酶测定。在特别优选的实施方案中,将样品DNA和/或参考标记DNA进行亚硫酸氢盐转化,并且通过如下的技术实现用于确定DNA甲基化水平的测定,所述技术包括使用甲基化特异性PCR、定量甲基化特异性PCR、甲基化敏感性DNA限制酶分析、定量亚硫酸氢盐焦磷酸测序、PCR-活瓣测定、活瓣核酸内切酶测定和/或亚硫酸氢盐基因组测序PCR。

[0028] 在一些实施方案中,所述混合物中的寡核苷酸包含报告分子,并且在优选实施方案中,所述报告分子包含荧光团。在一些实施方案中,所述寡核苷酸包含活瓣序列。在一些实施方案中,所述混合物还包含FRET盒、FEN-1核酸内切酶和热稳定性DNA聚合酶(优选细菌DNA聚合酶)中的一种或多种。

[0029] 在一些实施方案中,所用技术包括使用如下的测定来检测多种标记物和/或单一标记物的多个区域,所述测定将对多种标记物和/或单一标记物的多个区域的检测报告给单个信号输出,例如单一荧光染料。例如,在一些实施方案中,将所述测定配置为通过单个FRET盒报告对多个不同靶位点有特异性的活瓣核酸内切酶探针的裂解。

[0030] 然后,在一些实施方案中,样品的测定包括制备反应混合物,所述反应混合物包含用于扩增至少两种甲基化标记DNA的扩增试剂,和用于对扩增的标记DNA进行活瓣核酸内切酶测定的活瓣裂解试剂,其中所述试剂包含:

[0031] i)第一引物对,其用于产生甲基化标记DNA的第一扩增区域;

[0032] ii)第一探针,其包含a)与甲基化标记DNA的所述第一扩增区域的至少一部分互补的序列;和b)具有第一活瓣序列的活瓣部分,所述第一活瓣序列与甲基化标记DNA的所述第一扩增区域基本上不互补;

[0033] iii)第二引物对,其用于产生甲基化标记DNA的第二扩增区域;

[0034] iv)第二探针,其包含a)与甲基化标记DNA的所述第二区域的至少一部分互补的序列;和b)具有所述第一活瓣序列的活瓣部分,其中所述第一活瓣序列与甲基化标记DNA的所述第二扩增区域基本上不互补;

[0035] v)DNA聚合酶;和

[0036] vi)活瓣核酸内切酶。

[0037] 在一些实施方案中,甲基化标记DNA的所述第一扩增区域和甲基化标记DNA的所述第二扩增区域是从同一甲基化标记基因的不同区域扩增出来的,而在其他实施方案中,甲基化标记DNA的所述第一扩增区域和甲基化标记DNA的所述第二扩增区域是从不同的甲基化标记基因扩增出来的。在一些优选实施方案中,扩增所述至少两种甲基化标记DNA包括扩增至少两种选自由以下组成的组的甲基化标记DNA:ANKRD13B;CHST2;CNNM1;GRIN2D;JAM3;LRRC4;OPLAH;SEP9;SFMBT2;SLC12A8;TBX15;ZDHHC1;ZNF304;ZNF568;ZNF671;DOCK2;DTX1;FERMT3;OPLAH;PDGFD;PKIA;PPP2R5C;TBX15;TSPYL5;VAV3;FER1L4;和ZNF671。

[0038] 在优选实施方案中,扩增所述至少两种甲基化标记DNA包括扩增至少三种甲基化标记DNA。在此类实施方案中,所述试剂可优选包含用于产生甲基化标记DNA的第三扩增区域的第三引物对;和第三探针,其包含a)与甲基化标记DNA的第三扩增区域的至少一部分互补的序列;和b)具有相同第一活瓣序列的活瓣部分,其中所述第一活瓣序列与甲基化DNA的第三扩增区域基本上不互补。

[0039] 在一些实施方案中,还测定参考核酸。在此类实施方案中,所述试剂还可包含用于产生参考核酸的扩增区域的参考引物对,和参考探针,其包含a)与参考核酸的扩增区域的至少一部分互补的序列;和b)具有第二活瓣序列的活瓣部分,其中所述第二活瓣序列与参考核酸的扩增区域或与所述第一FRET盒基本上不互补;以及第二FRET盒,其包含与第二活瓣序列互补的序列。

[0040] 利用将对多种标记物和/或单一标记物的多个区域的检测报告给单个信号输出(例如单一荧光染料)的测定法检测多个核酸序列(例如,多种标记物和/或单一标记物的多个区域)的技术,不限于分析以上讨论的样品类型或标记物的甲基化,或者检测或测定以上讨论的样品类型或标记物。例如,在一些实施方案中,该技术提供了表征任何样品(例如,来自受试者)的方法,其包括检测样品中的至少一种靶核酸,其中所述检测样品中的所述至少一种靶核酸包括制备反应混合物,所述反应混合物包含用于产生至少两种不同的扩增DNA的扩增试剂,和用于对所述至少两种不同的扩增DNA进行活瓣核酸内切酶测定的活瓣裂解试剂,其中所述试剂包含:

[0041] i)第一引物对,其用于产生第一扩增DNA;

[0042] ii)第一探针,其包含a)与所述第一扩增DNA的区域互补的序列;和b)具有第一活瓣序列的活瓣部分,所述第一活瓣序列与所述第一扩增DNA基本上不互补;

[0043] iii)第二引物对,其用于产生第二扩增DNA;

[0044] iv)第二探针,其包含a)与所述第二扩增DNA的区域互补的序列;和b)具有所述第

一活瓣序列的活瓣部分,其中所述第一活瓣序列与所述第二扩增DNA基本上不互补;

[0045] v)FRET盒,其包含与所述第一活瓣序列互补的序列;

[0046] vi)DNA聚合酶;和

[0047] vii)活瓣核酸内切酶。

[0048] 在一些实施方案中,所述至少两种不同的靶DNA可包含样品中的至少两种不同的标记基因或标记区域,而在一些实施方案中,所述至少两种不同的靶DNA包含样品中的单一标记基因的至少两个不同区域。可以使用本文所公开的方法分析的核酸不限于任何特定类型的核酸,并且可以包括可以用作体外扩增(例如通过PCR扩增)的靶标的任何核酸。在一些实施方案中,样品中的所述至少一种靶核酸中的一种或多种是RNA。如以上所讨论的,所述方法不限于分析两种标记物或区域,但是可以应用于,例如,向同一FRET盒报告的三个、四个、五个、六个、七个(等等)靶序列。进一步地,可以组合测定,使得测定中的多种不同靶核酸向第一FRET盒报告,同一测定中的多种不同靶标向第二FRET盒报告,同一测定中的多种不同靶标向第三FRET盒报告,等等。

[0049] 该技术还提供试剂盒。例如,在一些实施方案中,试剂盒包含第一引物对,用于产生第一扩增DNA;第一探针,其包含a)与所述第一扩增DNA的区域互补的序列;和b)具有第一活瓣序列的活瓣部分,所述第一活瓣序列与所述第一扩增DNA基本上不互补;第二引物对,用于产生第二扩增DNA;第二探针,其包含a)与所述第二扩增DNA的区域互补的序列;和b)具有所述第一活瓣序列的活瓣部分,其中所述第一活瓣序列与所述第二扩增DNA基本上不互补;FRET盒,其包含与所述第一活瓣序列互补的序列;DNA聚合酶;以及活瓣核酸内切酶。

[0050] 在某些优选实施方案中,该技术提供了一种试剂盒,其包含a)至少一种寡核苷酸,其中所述寡核苷酸的至少一部分与选自由以下组成的组的标记物特异性杂交:ANKRD13B;CHST2;GRIN2D;JAM3;LRRC4;OPLAH;SEP9;SFMBT2;SLC12A8;TBX15;ZDHHC1;ZNF304;ZNF568;ZNF671;CNNM1;DOCK2;DTX1;FERMT3;OPLAH;PDGFD;PKIA;PPP2R5C;TBX15;TSPYL5;VAV3;FER1L4;和ZNF671,和b)至少一种另外的寡核苷酸,其中所述另外的寡核苷酸的至少一部分与参考核酸特异性杂交。在优选实施方案中,所述试剂盒包含用于检测CEA蛋白的测定法。在一些实施方案中,所述试剂盒包含至少两种另外的寡核苷酸,并且在一些实施方案中,所述试剂盒还包含亚硫酸氢盐试剂。

[0051] 在某些实施方案中,所述寡核苷酸的至少一部分与选自下组的至少一种标记物特异性杂交:VAV3;ZNF671;CHST2;FLI1;JAM3;SFMBT2;PDGFD;DTX1;TSPYL5;ZNF568;GRIN2D和QKI。在优选实施方案中,所述试剂盒包含至少12种寡核苷酸,其中下组的所述标记物中的每一种与所述12种寡核苷酸中的至少一种特异性杂交:VAV3;ZNF671;CHST2;FLI1;JAM3;SFMBT2;PDGFD;DTX1;TSPYL5;ZNF568;GRIN2D和QKI。

[0052] 在优选实施方案中,试剂盒中提供的一种或多种寡核苷酸选自捕获寡核苷酸、一对核酸引物、核酸探针和侵入性寡核苷酸中的一种或多种。

[0053] 在一些实施方案中,上述任何一种试剂盒还包含固体支持物,诸如磁珠或颗粒。在优选实施方案中,固体支持物包含一种或多种捕获试剂,例如与所述一种或多种标记基因互补的寡核苷酸。

[0054] 该技术还提供了组合物。例如,在一些实施方案中,该技术提供了组合物,其包含混合物(例如,反应混合物)所述混合物包含第一引物对,用于产生第一扩增DNA;第一探针,

其包含a)与所述第一扩增DNA的区域互补的序列;和b)具有第一活瓣序列的活瓣部分,所述第一活瓣序列与所述第一扩增DNA基本上不互补;第二引物对,用于产生第二扩增DNA;第二探针,其包含a)与所述第二扩增DNA的区域互补的序列;和b)具有所述第一活瓣序列的活瓣部分,其中所述第一活瓣序列与所述第二扩增DNA基本上不互补;FRET盒,其包含与所述第一活瓣序列互补的序列;DNA聚合酶;以及活瓣核酸内切酶。在优选实施方案中,所述组合物还包含第一扩增DNA和第二扩增DNA,其中第一探针与第二扩增DNA基本上不互补,并且其中第二探针与第一扩增DNA基本上不互补。在一些实施方案中,所述组合物包含与DNA复合的引物或探针。

[0055] 在一些实施方案中,所述组合物包含选自由ANKRD13B;CHST2;GRIN2D;JAM3;LRRC4;OPLAH;SEP9;SFMBT2;SLC12A8;TBX15;ZDHHC1;ZNF304;ZNF568;ZNF671;CNNM1;DOCK2;DTX1;FERMT3;OPLAH;PDGFD;PKIA;PPP2R5C;TBX15;TSPYL5;VAV3;FER1L4;和ZNF671组成的组的靶核酸和与所述靶核酸特异性杂交的寡核苷酸的复合物。在优选实施方案中,所述混合物包含选自由VAV3;ZNF671;CHST2;FLI1;JAM3;SFMBT2;PDGFD;DTX1;TSPYL5;ZNF568;GRIN2D和QKI组成的组的靶核酸和与所述靶核酸特异性杂交的寡核苷酸的复合物。所述混合物中的寡核苷酸包括但不限于捕获寡核苷酸、一对核酸引物、杂交探针、水解探针、活瓣测定探针和侵入性寡核苷酸中的一种或多种。

[0056] 在一些实施方案中,所述混合物中的靶核酸包含选自由以下组成的组的核酸序列:SEQ ID NO:1、6、11、16、21、26、31、36、41、46、51、56、61、66、71、76、81、86、91、96、101、106、111、116、121、126、131和136。

[0057] 在一些实施方案中,所述混合物包含经亚硫酸氢盐转化的靶核酸,其包含选自由以下组成的组的核酸序列:SEQ ID NO:2、7、12、17、22、27、32、37、42、47、52、57、62、67、72、77、82、87、92、97、102、107、112、117、122、127、132和137。

[0058] 本申请进一步涉及以下实施方案:

[0059] 1.一种表征来自受试者的样品的方法,其包括:

[0060] a)提供来自受试者的样品;

[0061] b)测定所述样品中至少一种甲基化标记DNA的量,所述甲基化标记DNA选自由以下组成的甲基化标记基因的组:ANKRD13B;CHST2;CNNM1;GRIN2D;JAM3;LRRC4;OPLAH;SEP9;SFMBT2;SLC12A8;TBX15;ZDHHC1;ZNF304;ZNF568;ZNF671;DOCK2;DTX1;FERMT3;OPLAH;PDGFD;PKIA;PPP2R5C;TBX15;TSPYL5;VAV3;FER1L4;和ZNF671;

[0062] b)测定所述样品以获得所述样品中参考核酸的量。

[0063] 2.根据实施方案1所述的方法,其中来自受试者的所述样品包括血液或血浆样品。

[0064] 3.根据实施方案1或实施方案2所述的方法,其中所述测定包括从受试者获得包含DNA的样品,并用这样的试剂处理从所述样品中获得的DNA,所述试剂选择性地修饰所述获得的DNA中未甲基化的胞嘧啶残基以产生经修饰的残基。

[0065] 4.根据实施方案1所述的方法,其中所述至少一种甲基化标记DNA选自由以下组成的组:VAV3;ZNF671;CHST2;FLI1;JAM3;SFMBT2;PDGFD;DTX1;TSPYL5;ZNF568;GRIN2D和QKI。

[0066] 5.根据实施方案1所述的方法,其中所述至少一种甲基化标记DNA包括至少两种甲基化标记DNA。

[0067] 6.根据实施方案1所述的方法,其中所述至少一种甲基化标记DNA包括由以下组成

的组:VAV3;ZNF671;CHST2;FLI1;JAM3;SFMBT2;PDGFD;DTX1;TSPYL5;ZNF568;GRIN2D和QKI。

[0068] 7.根据实施方案1所述的方法,其中所述方法还包括测定所述样品中的癌胚抗原(CEA)蛋白。

[0069] 8.根据实施方案3所述的方法,其中所述试剂包含亚硫酸氢盐试剂。

[0070] 9.根据实施方案1所述的方法,其中测定所述样品中甲基化标记DNA的量包括确定所述甲基化标记基因中一个碱基的甲基化状态。

[0071] 10.根据实施方案1所述的方法,其中测定所述样品中甲基化标记物的量包括确定甲基化标记基因中多个碱基处的甲基化程度。

[0072] 11.根据实施方案1中任一项所述的方法,其中至少一种甲基化标记DNA的量指示甲基化标记基因的甲基化状态,其中所述甲基化标记基因的甲基化状态包括所述甲基化标记基因的量相对于正常样品中所述甲基化标记基因的量增加或减少。

[0073] 12.根据实施方案1所述的方法,其中至少一种甲基化标记DNA的量指示甲基化标记基因的甲基化状态,其中所述甲基化状态包括所述标记基因的甲基化模式相对于正常样品中所述甲基化标记基因的甲基化模式是不同的。

[0074] 13.根据实施方案1所述的方法,其中所述参考核酸是甲基化参考DNA。

[0075] 14.根据实施方案1所述的方法,其中所述样品是组织样品或血浆样品。

[0076] 15.根据实施方案14所述的方法,其中所述样品是包含结肠组织的组织样品。

[0077] 16.根据实施方案1所述的方法,其中所述测定包括使用聚合酶链反应、核酸测序、质谱法、甲基化特异性核酸酶、基于质量的分离和/或靶标捕获。

[0078] 17.根据实施方案16所述的方法,其中所述测定包括使用活瓣核酸内切酶测定。

[0079] 18.根据实施方案16所述的方法,其中所述测定包括多重扩增。

[0080] 19.根据实施方案1所述的方法,其中所述测定包括用亚硫酸氢盐转化所述至少一种甲基化标记DNA和所述参考核酸。

[0081] 20.根据实施方案1或实施方案19所述的方法,其中确定至少一种甲基化标记DNA的量包括使用选自由以下组成的组的一种或多种方法:甲基化特异性PCR、定量甲基化特异性PCR、甲基化敏感性DNA限制酶分析、定量亚硫酸氢盐焦磷酸测序、活瓣核酸内切酶测定、PCR-活瓣测定和亚硫酸氢盐基因组测序PCR。

[0082] 21.一种试剂盒,其包含:

[0083] a)至少一种寡核苷酸,其中所述寡核苷酸的至少一部分与选自由以下组成的组的标记物特异性杂交:ANKRD13B;CHST2;CNNM1;GRIN2D;JAM3;LRRC4;OPLAH;SEP9;SFMBT2;SLC12A8;TBX15;ZDHHC1;ZNF304;ZNF568;ZNF671;DOCK2;DTX1;FERMT3;OPLAH;PDGFD;PKIA;PPP2R5C;TBX15;TSPYL5;VAV3;FER1L4;和ZNF671,和

[0084] b)至少一种另外的寡核苷酸,其中所述另外的寡核苷酸的至少一部分与参考核酸特异性地杂交。

[0085] 22.根据实施方案21的试剂盒,其中所述试剂盒包含至少两种另外的寡核苷酸。

[0086] 23.根据实施方案21所述的试剂盒,其中所述试剂盒还包含亚硫酸氢盐。

[0087] 24.根据实施方案21所述的试剂盒,其中所述试剂盒还包含用于检测CEA蛋白的试剂。

[0088] 25.根据实施方案21所述的试剂盒,其中所述寡核苷酸的至少一部分与选自由以

下组成的组的至少一种标记物特异性杂交:VAV3;ZNF671;CHST2;FLI1;JAM3;SFMBT2;PDGFD;DTX1;TSPYL5;ZNF568;GRIN2D和QKI。

[0089] 26.根据实施方案21所述的试剂盒,其中所述试剂盒包含至少12种寡核苷酸,其中由以下组成的组中的每一种标记物均与所述12种寡核苷酸中的至少一种特异性杂交:VAV3;ZNF671;CHST2;FLI1;JAM3;SFMBT2;PDGFD;DTX1;TSPYL5;ZNF568;GRIN2D和QKI。

[0090] 27.根据实施方案21所述的试剂盒,其中所述至少一种寡核苷酸选自捕获寡核苷酸、一对核酸引物、核酸探针和侵入性寡核苷酸中的一种或多种。

[0091] 28.根据实施方案27所述的试剂盒,其中所述试剂盒还包含固体支持物。

[0092] 29.根据实施方案28所述的试剂盒,其中所述固体支持物是磁珠。

[0093] 30.根据实施方案29所述的试剂盒,其中所述固体支持物包含一种或多种捕获试剂。

[0094] 31.根据实施方案30所述的试剂盒,其中所述捕获试剂是与所述一种或多种标记基因互补的寡核苷酸。

[0095] 32.一种组合物,其包含反应混合物,所述反应混合物包含选自由ANKRD13B;CHST2;CNNM1;GRIN2D;JAM3;LRRC4;OPLAH;SEP9;SFMBT2;SLC12A8;TBX15;ZDHHC1;ZNF304;ZNF568;ZNF671;DOCK2;DTX1;FERMT3;OPLAH;PDGFD;PKIA;PPP2R5C;TBX15;TSPYL5;VAV3;FER1L4;和ZNF671组成的组的靶核酸和与所述靶核酸特异性杂交的寡核苷酸的复合物。

[0096] 33.根据实施方案32所述的组合物,其中所述反应混合物包含选自由VAV3;ZNF671;CHST2;FLI1;JAM3;SFMBT2;PDGFD;DTX1;TSPYL5;ZNF568;GRIN2D和QKI组成的组的靶核酸和与所述靶核酸特异性杂交的寡核苷酸的复合物。

[0097] 34.根据实施方案32所述的组合物,其中所述寡核苷酸选自捕获寡核苷酸、一对核酸引物、杂交探针、水解探针、活瓣测定探针和侵入性寡核苷酸中的一种或多种。

[0098] 35.根据实施方案32所述的组合物,其中所述靶核酸包含选自由以下组成的组的核酸序列:SEQ ID NO:1、6、11、16、21、26、31、36、41、46、51、56、61、66、71、76、81、86、91、96、101、106、111、116、121、126、131和136。

[0099] 36.根据实施方案32所述的组合物,其中所述靶核酸是经亚硫酸氢盐转化的靶核酸。

[0100] 37.根据实施方案36所述的组合物,其中所述经亚硫酸氢盐转化的靶核酸包含选自由以下组成的组的核酸序列:SEQ ID NO:2、7、12、17、22、27、32、37、42、47、52、57、62、67、72、77、82、87、92、97、102、107、112、117、122、127、132和137。

[0101] 38.根据实施方案32中任一项所述的组合物,其中所述寡核苷酸包含报告分子。

[0102] 39.根据实施方案38所述的组合物,其中所述报告分子包含荧光团。

[0103] 40.根据实施方案32中任一项所述的组合物,其中所述寡核苷酸包含活瓣序列。

[0104] 41.根据实施方案32所述的组合物,其还包含FRET盒、FEN-1核酸内切酶和/或热稳定性DNA聚合酶中的一种或多种。

[0105] 42.根据实施方案41所述的组合物,其中所述热稳定性DNA聚合酶是细菌DNA聚合酶。

[0106] 43.根据实施方案1所述的方法,其中所述测定包括制备反应混合物,所述反应混合物包含用于扩增至少两种甲基化标记DNA的扩增试剂,和用于对扩增的标记DNA进行活瓣

核酸内切酶测定的活瓣切割试剂,其中所述试剂包含:

[0107] 第一引物对,其用于产生甲基化标记DNA的第一扩增区域;

[0108] 第一探针,其包含a)与甲基化标记DNA的所述第一扩增区域的至少一部分互补的序列;和b)具有第一活瓣序列的活瓣部分,所述第一活瓣序列与甲基化标记DNA的所述第一扩增区域基本上不互补;

[0109] 第二引物对,其用于产生甲基化标记DNA的第二扩增区域;

[0110] 第二探针,其包含a)与甲基化标记DNA的所述第二区域的至少一部分互补的序列;和b)具有所述第一活瓣序列的活瓣部分,其中所述第一活瓣序列与甲基化标记DNA的所述第二扩增区域基本上不互补;

[0111] 第一FRET盒,其包含与所述第一活瓣序列互补的序列;

[0112] DNA聚合酶;和

[0113] 活瓣核酸内切酶。

[0114] 44.根据实施方案43所述的方法,其中甲基化标记DNA的所述第一扩增区域和甲基化标记DNA的所述第二扩增区域是从同一种甲基化标记基因的不同区域扩增的。

[0115] 45.根据实施方案43所述的方法,其中甲基化标记DNA的所述第一扩增区域和甲基化标记DNA的所述第二扩增区域是从不同的甲基化标记基因扩增的。

[0116] 46.根据实施方案43所述的方法,其中扩增所述至少两种甲基化标记DNA包括扩增至少两种选自由以下组成的组的甲基化标记基因的区域:ANKRD13B;CHST2;CNNM1;GRIN2D;JAM3;LRRC4;OPLAH;SEP9;SFMBT2;SLC12A8;TBX15;ZDHHC1;ZNF304;ZNF568;ZNF671;DOCK2;DTX1;FERMT3;OPLAH;PDGFD;PKIA;PPP2R5C;TBX15;TSPYL5;VAV3;FER1L4;和ZNF671。

[0117] 47.根据实施方案43所述的方法,其中扩增所述至少两种甲基化标记DNA包括扩增至少三种甲基化标记DNA。

[0118] 48.根据实施方案47所述的方法,其中所述试剂还包含:

[0119] 第三引物对,其用于产生甲基化标记DNA的第三扩增区域;和

[0120] 第三探针,其包含a)与甲基化标记DNA的所述第三扩增区域的至少一部分互补的序列;和b)具有所述第一活瓣序列的活瓣部分,其中所述第一活瓣序列与甲基化DNA的所述第三扩增区域基本上不互补。

[0121] 49.根据实施方案47所述的方法,其中所述试剂还包含:

[0122] 参考引物对,其用于产生参考核酸的扩增区域;和

[0123] 参考探针,其包含a)与参考核酸的所述扩增区域的至少一部分互补的序列;和b)具有第二活瓣序列的活瓣部分,其中所述第二活瓣序列与参考核酸的所述扩增区域或与所述第一FRET盒基本上不互补;和

[0124] 第二FRET盒,其包含与所述第二活瓣序列互补的序列。

[0125] 50.一种表征来自受试者的样品的方法,其包括检测所述样品中的至少一种靶核酸,其中所述检测所述样品中的所述至少一种靶核酸包括制备反应混合物,所述反应混合物包含用于产生至少两种不同的扩增DNA的扩增试剂,和用于对所述至少两种不同的扩增DNA进行活瓣核酸内切酶测定的活瓣切割试剂,其中所述试剂包含:

[0126] 第一引物对,其用于产生第一扩增DNA;

[0127] 第一探针,其包含a)与所述第一扩增DNA的区域互补的序列;和b)具有第一活瓣序

列的活瓣部分,所述第一活瓣序列与所述第一扩增DNA基本上不互补;

[0128] 第二引物对,其用于产生第二扩增DNA;

[0129] 第二探针,其包含a)与所述第二扩增DNA的区域互补的序列;和b)具有所述第一活瓣序列的活瓣部分,其中所述第一活瓣序列与所述第二扩增DNA基本上不互补;

[0130] FRET盒,其包含与所述第一活瓣序列互补的序列;

[0131] DNA聚合酶;和

[0132] 活瓣核酸内切酶。

[0133] 51.根据实施方案50所述的方法,其中所述至少两种不同的靶DNA包含所述样品中的至少两种不同的标记基因或标记区域。

[0134] 52.根据实施方案50或实施方案51所述的方法,其中所述至少两种不同的靶DNA包含所述样品中单一标记基因的至少两个不同区域。

[0135] 53.根据实施方案50所述的方法,其中所述样品中的所述至少一种靶核酸中的一种或多种是RNA。

[0136] 54.一种试剂盒,其包含:

[0137] 第一引物对,其用于产生第一扩增DNA;

[0138] 第一探针,其包含a)与所述第一扩增DNA的区域互补的序列;和b)具有第一活瓣序列的活瓣部分,所述第一活瓣序列与所述第一扩增DNA基本上不互补;

[0139] 第二引物对,其用于产生第二扩增DNA;

[0140] 第二探针,其包含a)与所述第二扩增DNA的区域互补的序列;和b)具有所述第一活瓣序列的活瓣部分,其中所述第一活瓣序列与所述第二扩增DNA基本上不互补;

[0141] FRET盒,其包含与所述第一活瓣序列互补的序列;

[0142] DNA聚合酶;和

[0143] 活瓣核酸内切酶。

[0144] 55.根据实施方案54所述的试剂盒,其中所述试剂盒还包含亚硫酸氢盐。

[0145] 56.一种筛查从受试者获得的样品中的结肠肿瘤的方法,所述方法包括:

[0146] a)测定来自受试者的样品中至少一种甲基化标记DNA的量,所述甲基化标记DNA选自由以下组成的甲基化标记基因的组:ANKRD13B;CHST2;CNNM1;GRIN2D;JAM3;LRRC4;OPLAH;SEP9;SFMBT2;SLC12A8;TBX15;ZDHHC1;ZNF304;ZNF568;ZNF671;DOCK2;DTX1;FERMT3;OPLAH;PDGFD;PKIA;PPP2R5C;TBX15;TSPYL5;VAV3;FER1L4;和ZNF671;

[0147] b)测定所述样品以获得所述样品中参考核酸的量;

[0148] c)比较所述至少一种甲基化标记DNA的量与所述样品中参考标记核酸的量,以确定所述样品中所述至少一种标记DNA的甲基化状态。

[0149] 57.根据实施方案56所述的方法,其中所述来自受试者的样品包括血液或血浆样品。

[0150] 58.根据实施方案56或实施方案57所述的方法,其中所述测定包括从受试者获得包含DNA的样品,并用这样的试剂处理从所述样品中获得的DNA,所述试剂选择性地修饰所述获得的DNA中未甲基化的胞嘧啶残基以产生经修饰的残基。

[0151] 59.根据实施方案1-3和56-58中任一项所述的方法,其中所述至少一种甲基化标记DNA选自由以下组成的组:VAV3;ZNF671;CHST2;FLI1;JAM3;SFMBT2;PDGFD;DTX1;TSPYL5;

ZNF568;GRIN2D和QKI。

[0152] 60.根据实施方案1-4和54-57中任一项所述的方法,其中所述至少一种甲基化标记DNA包括至少两种甲基化标记DNA。

[0153] 61.根据实施方案60所述的方法,其中所述至少一种甲基化标记DNA包括由以下组成的组:VAV3;ZNF671;CHST2;FLI1;JAM3;SFMBT2;PDGFD;DTX1;TSPYL5;ZNF568;GRIN2D和QKI。

[0154] 62.根据实施方案1-6和56-61中任一项所述的方法,其中所述方法还包括测定所述样品中的癌胚抗原(CEA)蛋白。

[0155] 63.根据实施方案58所述的方法,其中所述试剂包含亚硫酸氢盐试剂。

[0156] 64.根据实施方案1-8和56-63中任一项所述的方法,其中测定所述样品中甲基化标记DNA的量包括确定所述甲基化标记基因中一个碱基的甲基化状态。

[0157] 65.根据实施方案1-8和56-63中任一项所述的方法,其中测定所述样品中甲基化标记物的量包括确定甲基化标记基因中多个碱基处的甲基化程度。

[0158] 66.根据实施方案1-10和56-65中任一项所述的方法,其中至少一种甲基化标记DNA的量指示甲基化标记基因的甲基化状态,其中所述甲基化标记基因的甲基化状态包括所述甲基化标记基因的量相对于正常样品中所述甲基化标记基因的量增加或减少。

[0159] 67.根据实施方案1-11和56-66中任一项所述的方法,其中至少一种甲基化标记DNA的量指示甲基化标记基因的甲基化状态,其中所述甲基化状态包括所述标记基因的甲基化模式相对于正常样品中所述甲基化标记基因的甲基化模式是不同的。

[0160] 68.根据实施方案1-12和56-67中任一项所述的方法,其中所述参考核酸是甲基化参考DNA。

[0161] 69.根据实施方案1、3-13、56和58-68中任一项所述的方法,其中所述样品是组织样品。

[0162] 70.根据实施方案59所述的方法,其中所述组织样品包括结肠组织。

[0163] 71.根据实施方案1-15和56-70中任一项所述的方法,其中所述测定包括使用聚合酶链反应、核酸测序、质谱法、甲基化特异性核酸酶、基于质量的分离或靶标捕获。

[0164] 72.根据实施方案71所述的方法,其中所述测定包括使用活瓣核酸内切酶测定。

[0165] 73.根据实施方案71所述的方法,其中所述测定包括多重扩增。

[0166] 74.根据实施方案1-18和56-73中任一项所述的方法,其中所述测定包括用亚硫酸氢盐转化所述至少一种甲基化标记DNA和所述参考核酸。

[0167] 75.根据实施方案74所述的方法,其中确定至少一种甲基化标记DNA的量包括使用选自由以下组成的组的一种或多种方法:甲基化特异性PCR、定量甲基化特异性PCR、甲基化敏感性DNA限制酶分析、定量亚硫酸氢盐焦磷酸测序、活瓣核酸内切酶测定、PCR-活瓣测定和亚硫酸氢盐基因组测序PCR。

[0168] 76.根据实施方案21-27中任一项所述的试剂盒,其中所述试剂盒还包含固体支持物。

[0169] 77.根据实施方案76所述的试剂盒,其中所述固体支持物是磁珠。

[0170] 78.根据实施方案77所述的试剂盒,其中所述固体支持物包含一种或多种捕获试剂。

[0171] 79.根据实施方案78所述的试剂盒,其中所述捕获试剂是与所述一种或多种标记基因互补的寡核苷酸。

[0172] 80.根据实施方案32-37中任一项所述的组合物,其中所述寡核苷酸包含报告分子。

[0173] 81.根据实施方案80所述的组合物,其中所述报告分子包含荧光团。

[0174] 82.根据实施方案32-39和80-81中任一项所述的组合物,其中所述寡核苷酸包含活瓣序列。

[0175] 83.根据实施方案32-40和80-82中任一项所述的组合物,其还包含FRET盒、FEN-1核酸内切酶和热稳定性DNA聚合酶中的一种或多种。

[0176] 84.根据实施方案83所述的组合物,其中所述热稳定性DNA聚合酶是细菌DNA聚合酶。

[0177] 85.根据实施方案1-20和56-75中任一项所述的方法,其中所述测定包括制备反应混合物,所述反应混合物包含用于扩增至少两种甲基化标记DNA的扩增试剂,和用于对扩增的标记DNA进行活瓣核酸内切酶测定的活瓣切割试剂,其中所述试剂包含:

[0178] 第一引物对,其用于产生甲基化标记DNA的第一扩增区域;

[0179] 第一探针,其包含a)与甲基化标记DNA的所述第一扩增区域的至少一部分互补的序列;和b)具有第一活瓣序列的活瓣部分,所述第一活瓣序列与甲基化标记DNA的所述第一扩增区域基本上不互补;

[0180] 第二引物对,其用于产生甲基化标记DNA的第二扩增区域;

[0181] 第二探针,其包含a)与甲基化标记DNA的所述第二区域的至少一部分互补的序列;和b)具有所述第一活瓣序列的活瓣部分,其中所述第一活瓣序列与甲基化标记DNA的所述第二扩增区域基本上不互补;

[0182] 第一FRET盒,其包含与所述第一活瓣序列互补的序列;

[0183] DNA聚合酶;和

[0184] 活瓣核酸内切酶。

[0185] 86.根据实施方案85所述的方法,其中甲基化标记DNA的所述第一区域和甲基化标记DNA的所述第二区域是同一种甲基化标记DNA的不同区域。

[0186] 87.根据实施方案85所述的方法,其中甲基化标记DNA的所述第一区域和甲基化标记DNA的所述第二区域是不同甲基化标记DNA的区域。

[0187] 88.根据实施方案85-87中任一项所述的方法,其中扩增所述至少两种甲基化标记DNA包括扩增至少两种选自由以下组成的组的甲基化标记DNA:ANKRD13B;CHST2;CNNM1;GRIN2D;JAM3;LRRC4;OPLAH;SEP9;SFMBT2;SLC12A8;TBX15;ZDHHC1;ZNF304;ZNF568;ZNF671;DOCK2;DTX1;FERMT3;OPLAH;PDGFD;PKIA;PPP2R5C;TBX15;TSPYL5;VAV3;FER1L4;和ZNF671。

[0188] 89.根据实施方案85-88中任一项所述的方法,其中扩增所述至少两种甲基化标记DNA包括扩增至少三种甲基化标记DNA。

[0189] 90.根据实施方案89所述的方法,其中所述试剂还包含:

[0190] 第三引物对,其用于扩增甲基化标记DNA的第三区域;和

[0191] 第三探针,其包含a)与甲基化标记DNA的所述第三区域的至少一部分互补的序列;

和b)具有所述第一活瓣序列的活瓣部分,其中所述第一活瓣序列与甲基化DNA的所述第三区域基本上不互补。

[0192] 91.根据实施方案89或实施方案90所述的方法,其中所述试剂还包含:

[0193] 参考引物对,其用于扩增参考核酸;和

[0194] 参考探针,其包含a)与扩增的参考核酸的至少一部分互补的序列;和b)具有第二活瓣序列的活瓣部分,其中所述第二活瓣序列与所述扩增的参考核酸基本上不互补;和

[0195] 第二FRET盒,其包含与所述第二活瓣序列互补的序列。

[0196] 92.根据实施方案50-52中任一项所述的方法,其中所述样品中的所述至少一种靶核酸中的一种或多种是RNA。

[0197] 93.一种组合物,其包含:

[0198] 第一引物对,其用于产生第一扩增DNA;

[0199] 第一探针,其包含a)与所述第一扩增DNA的区域互补的序列;和b)具有第一活瓣序列的活瓣部分,所述第一活瓣序列与所述第一扩增DNA基本上不互补;

[0200] 第二引物对,其用于产生第二扩增DNA;

[0201] 第二探针,其包含a)与所述第二扩增DNA的区域互补的序列;和b)具有所述第一活瓣序列的活瓣部分,其中所述第一活瓣序列与所述第二扩增DNA基本上不互补;

[0202] FRET盒,其包含与所述第一活瓣序列互补的序列;

[0203] DNA聚合酶;和

[0204] 活瓣核酸内切酶。

[0205] 94.根据实施方案93所述的组合物,其包含所述第一扩增DNA和所述第二扩增DNA,其中所述第一探针与所述第二扩增DNA基本上不互补,并且其中所述第二探针与所述第一扩增DNA基本上不互补。

[0206] 95.根据实施方案93或实施方案94所述的组合物,其还包含从来自受试者的样品中分离的DNA。

[0207] 96.根据实施方案95所述的组合物,其中所述受试者是患有或怀疑患有肿瘤的患者。

[0208] 97.根据实施方案96所述的组合物,其中所述肿瘤是结直肠肿瘤。

[0209] 98.根据实施方案95-97中任一项所述的组合物,其中所述样品选自由粪便样品、组织样品和血液样品,以及血浆样品组成的组。

[0210] 定义

[0211] 为了便于本技术的理解,下面定义了许多术语和短语。在整个详细描述中阐述了另外的定义。

[0212] 在整个说明书和权利要求书中,除非上下文另有明确规定,否则以下术语采用本文明确相关的含义。如本文所用的短语“在一个实施方案中”不一定是指同一实施方案,但可以指同一实施方案。此外,如本文所用的短语“在另一个实施方案中”不一定是指不同的实施方案,但可以指不同的实施方案。因此,如下所述,在不脱离本发明的范围或精神的情况下,可以容易地组合本发明的各种实施方案。

[0213] 另外,如本文所用,除非上下文另有明确规定,否则术语“或”是包含性的“或”操作词并且等同于术语“和/或”。除非上下文另有明确规定,否则术语“基于”并非排他性的且允

许基于未描述的另外的因素。另外,在整个说明书中,“一”、“一个(种)”和“所述(该)”的含义包括复数引用。“在.....中”的含义包括“在.....中”和“在.....上”。

[0214] 如在本申请的权利要求书中使用的连接词“本质上由.....组成”将权利要求的范围限于所要求保护的发明的指定材料或步骤“以及不实质性影响所要求保护的发明的一个或多个基本和新颖特征的那些材料或步骤”,正如In re Herz,537F.2d 549,551-52,190USPQ 461,463(CCPA 1976)中所讨论的。例如,“本质上由所列举的要素组成”的组合物可以含有一定水平的未列举的污染物,使得尽管存在,但与纯组合物相比,即“由所列举的组分组成”的组合物相比,所述污染物不会改变所列举的组合物的功能。

[0215] 如本文所用,“甲基化”是指在胞嘧啶的位置C5或N4、腺嘌呤的N6位置处的胞嘧啶甲基化,或其他类型的核酸甲基化。体外扩增的DNA通常是未甲基化的,因为典型的体外DNA扩增方法不保留扩增模板的甲基化模式。然而,“未甲基化DNA”或“甲基化DNA”也可以分别指原始模板未甲基化或甲基化的扩增DNA。

[0216] 因此,如本文所用,“甲基化核苷酸”或“甲基化核苷酸碱基”是指在核苷酸碱基上存在甲基半族,而公认的典型核苷酸碱基中不存在甲基半族。例如,胞嘧啶在其嘧啶环上不含甲基半族,但5-甲基胞嘧啶在其嘧啶环的位置5处含有甲基半族。因此,胞嘧啶不是甲基化核苷酸而5-甲基胞嘧啶是甲基化核苷酸。在另一个实例中,胸腺嘧啶在其嘧啶环的位置5含有甲基半族;然而,出于本文的目的,胸腺嘧啶当存在于DNA中时不被认为是甲基化核苷酸,因为胸腺嘧啶是DNA的典型核苷酸碱基。

[0217] 如本文所用,“甲基化核酸分子”是指含有一个或多个甲基化核苷酸的核酸分子。

[0218] 如本文所用,核酸分子的“甲基化状态”、“甲基化型态”和“甲基化状况”是指核酸分子中存在或不存在一个或多个甲基化核苷酸碱基。例如,含有甲基化胞嘧啶的核酸分子被认为是甲基化的(例如,核酸分子的甲基化状态是甲基化的)。不含任何甲基化核苷酸的核酸分子被认为是未甲基化的。

[0219] 特定核酸序列(例如,如本文所述的基因标记物或DNA区域)的甲基化状态可以指示序列中每个碱基的甲基化状态,或者可以指示序列内碱基子集(例如,一个或多个胞嘧啶)的甲基化状态,或者可以指示关于序列内区域甲基化密度的信息,其中提供或没有提供序列内发生甲基化的位置的精确信息。

[0220] 核酸分子中核苷酸基因座的甲基化状态是指核酸分子中特定基因座处存在或不存在甲基化核苷酸。例如,当核酸分子中第7个核苷酸处存在的核苷酸是5-甲基胞嘧啶时,核酸分子中第7个核苷酸处的胞嘧啶的甲基化状态是甲基化的。类似地,当核酸分子中第7个核苷酸处存在的核苷酸是胞嘧啶(而不是5-甲基胞嘧啶)时,核酸分子中第7个核苷酸处的胞嘧啶的甲基化状态是未甲基化的。

[0221] 甲基化状况可任选地用“甲基化值”(例如,表示甲基化频率、分数、比率、百分比等)表示或指示。甲基化值例如可以通过如下方式产生:用甲基化依赖性限制酶对限制性消化后存在的完整核酸的量进行定量,或比较亚硫酸氢盐反应后的扩增型态,或比较经亚硫酸氢盐处理和未处理的核酸的序列。因此,值(例如,甲基化值)表示甲基化状况,因而可用作多个拷贝的基因座上的甲基化状况的定量指标。当需要将样品中序列的甲基化状况与阈值或参考值进行比较时,这尤其有用。

[0222] 如本文所用,“甲基化频率”或“甲基化百分比(%)”是指相对于分子或基因座未甲

基化的情况数量,分子或基因座甲基化的情况的数量。

[0223] 因此,甲基化状态描述了核酸(例如,基因组序列)的甲基化状态。另外,甲基化状态是指与甲基化相关的特定基因组基因座处的核酸区段的特征。此类特征包括但不限于,该DNA序列内的任何胞嘧啶(C)残基是否甲基化,甲基化C残基的位置,核酸任何特定区域中甲基化C的频率或百分比,以及由于例如等位基因起源的差异而引起的甲基化的等位基因差异。术语"甲基化状态"、"甲基化型态"和"甲基化状况"还指生物样品中核酸的任何特定区域中甲基化C或未甲基化C的相对浓度、绝对浓度或模式。例如,如果核酸序列内的一个或多个胞嘧啶(C)残基甲基化,则可以将其称为"高甲基化的"或具有"增加的甲基化",而如果DNA序列内的一个或多个胞嘧啶(C)残基未甲基化,则可以将其称为"低甲基化的"或具有"减少的甲基化"。同样,如果核酸序列内的一个或多个胞嘧啶(C)残基与另一核酸序列(例如,来自不同区域或来自不同个体等)相比是甲基化的,则该序列被认为是高甲基化的或具有与其他核酸序列相比增加的甲基化。可替代地,如果与另一核酸序列(例如,来自不同区域或来自不同个体等)相比,DNA序列内的一个或多个胞嘧啶(C)残基未甲基化,则该序列被认为是低甲基化的或具有与其他核酸序列相比减少的甲基化。另外,如本文所用的术语"甲基化模式"是指核酸区域上甲基化和未甲基化核苷酸的集中位点。当甲基化和未甲基化核苷酸的数量在整个区域上相同或相似但甲基化和未甲基化核苷酸的位置不同时,两种核酸可具有相同或相似的甲基化频率或甲基化百分比但具有不同的甲基化模式。当序列在甲基化的程度(例如,一个具有相对于另一个增加或减少的甲基化)、频率或模式上不同时,该序列被称为"差异性地甲基化"或具有"甲基化差异"。术语"差异性甲基化"是指癌症阳性样品中核酸甲基化的水平或模式与癌症阴性样品中核酸甲基化的水平或模式相比的差异。它也可以指手术后癌症复发的患者与没有复发的患者之间的水平或模式的差异。例如,一旦定义了正确的截止或预测特征,差异性甲基化和DNA甲基化的特定水平或模式就是预后和预测性生物标记物。

[0224] 甲基化状态频率可用于描述个体群体或来自单个个体的样品。例如,甲基化状态频率为50%的核苷酸基因座在50%的情况下甲基化且在50%的情况下未甲基化。例如,此类频率可用于描述在个体群体或核酸集合中核苷酸基因座或核酸区域甲基化的程度。因此,当第一核酸分子群体或库中的甲基化不同于第二核酸分子群体或库中的甲基化时,第一群体或库的甲基化状态频率将不同于第二群体或库的甲基化状态频率。此类频率也可用于例如,描述单个个体中核苷酸基因座或核酸区域甲基化的程度。例如,此类频率可用于描述来自组织样品的一组细胞在核苷酸基因座或核酸区域甲基化或未甲基化的程度。

[0225] 如本文所用,"核苷酸基因座"是指核酸分子中核苷酸的位置。甲基化核苷酸的核苷酸基因座是指核酸分子中甲基化核苷酸的位置。

[0226] 通常,人DNA的甲基化发生在包括相邻鸟嘌呤和胞嘧啶的二核苷酸序列(也称为CpG二核苷酸序列)上,其中胞嘧啶位于鸟嘌呤的5'。CpG二核苷酸内的大多数胞嘧啶在人基因组中是甲基化的,然而有些在特定的富含CpG二核苷酸的基因组区域(称为CpG岛)中仍未甲基化(参见,例如,Antequera等人(1990)Cell 62:503-514)。

[0227] 如本文所用,"CpG岛"是指相对于总基因组DNA含有增加数量的CpG二核苷酸的基因组DNA的G:C富含区域。CpG岛的长度可以是至少100个、200个或更多个碱基对,其中该区域的G:C含量为至少50%并且超过预期频率的CpG观测频率的比率为0.6;在一些情况下,

CpG岛的长度可以是至少500个碱基对,其中该区域的G:C含量为至少55%)并且超过预期频率的CpG观测频率的比率为0.65。可以根据Gardiner-Garden等人(1987)J.Mol.Biol.196:261-281中提供的方法计算超过预期频率的CpG观测频率。例如,可以根据公式R=(A×B)/(C×D)计算超过预期频率的CpG观测频率,其中R是超过预期频率的CpG观测频率的比率,A是所分析序列中CpG二核苷酸的数量,B是所分析序列中核苷酸的总数,C是所分析序列中C核苷酸的总数,且D是所分析序列中G核苷酸的总数。通常在CpG岛中,例如在启动子区域处确定甲基化状态。但是可以理解人类基因组中的其他序列容易发生DNA甲基化,诸如CpA和CpT(参见Ramsahoye(2000)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 97:5237-5242;Salmon和Kaye(1970)Biochim.Biophys.Acta.204:340-351;Grafstrom(1985)Nucleic Acids Res.13:2827-2842;Nyce(1986)Nucleic Acids Res.14:4353-4367;Woodcock(1987)Biochem.Biophys.Res.Commun.145:888-894)。

[0228] 如本文所用,“甲基化特异性试剂”是指随核酸分子的甲基化状态变化而修饰核酸分子的核苷酸的试剂,或甲基化特异性试剂,是指可以以反映核酸分子的甲基化状态的方式改变核酸分子的核苷酸序列的化合物或组合物或其他剂。用此类试剂处理核酸分子的方法可包括使核酸分子与该试剂接触,如果需要,加上另外的步骤,以实现核苷酸序列的期望变化。此类方法可以以将未甲基化的核苷酸(例如,每个未甲基化的胞嘧啶)修饰为不同核苷酸的方式应用。例如,在一些实施方案中,此类试剂可以使未甲基化的胞嘧啶核苷酸脱去氨基从而产生脱氧尿嘧啶残基。示例性试剂是亚硫酸氢盐试剂。

[0229] 术语“亚硫酸氢盐试剂”是指包含亚硫酸氢盐、重亚硫酸盐(disulfite)、酸式亚硫酸盐或其组合的试剂,其如本文公开那样可用于区分甲基化和未甲基化的CpG二核苷酸序列。所述治疗方法是本领域已知的(例如,PCT/EP2004/011715和WO 2013/116375,其中每一个均通过引用整体并入)。在一些实施方案中,亚硫酸氢盐处理在变性溶剂,例如但不限于正-亚烷基二醇或二乙二醇二甲醚(DME)的存在下进行,或在二噁烷或二噁烷衍生物的存在下进行。在一些实施方案中,变性溶剂以1%至35%(v/v)的浓度使用。在一些实施方案中,亚硫酸氢盐反应在清除剂的存在下进行,清除剂例如但不限于色满衍生物,例如6-羟基-2,5,7,8-四甲基色满-2-羧酸或三羟基苯甲酸(trihydroxybenzone acid)及其衍生物,例如没食子酸(参见:PCT/EP2004/011715,其通过引用整体并入)。在某些优选实施方案中,亚硫酸氢盐反应包括用亚硫酸氢铵处理,例如,如WO 2013/116375中所述。

[0230] 通过甲基化特异性试剂进行的核酸核苷酸序列的改变也可以产生其中每个甲基化核苷酸被修饰为不同核苷酸的核酸分子。

[0231] 术语“甲基化测定”是指用于确定核酸序列内的一个或多个CpG二核苷酸序列的甲基化状态的任何测定。

[0232] 如本文所用,给定标记(或一起使用的标记物集合)的“灵敏度”是指报告高于区分肿瘤和非肿瘤样品的阈值的DNA甲基化值的样品的百分比。在一些实施方案中,阳性定义为报告高于阈值的DNA甲基化值(例如,与疾病相关的范围)的组织学确认的瘤形成,而假阴性定义为报告低于阈值的DNA甲基化值(例如,与无疾病相关的范围)的组织学确认的瘤形成。因此,灵敏度值反映了从已知患病样品获得的给定标记物的DNA甲基化测量值在疾病相关测量值范围内的概率。如此处所定义的,计算的灵敏度值的临床相关性表示当应用于患有临床病状的受试者时给定标记物将检测出存在该病状的概率的估计。

[0233] 如本文所用,给定标记物(或一起使用的标记物集合)的“特异性”是指报告低于区分肿瘤和非肿瘤样品的阈值的DNA甲基化值的非肿瘤样品的百分比。在一些实施方案中,阴性定义为报告低于阈值的DNA甲基化值(例如,与无疾病相关的范围)的组织学确认的非肿瘤样品,而假阳性定义为报告高于阈值的DNA甲基化值(例如,与疾病相关的范围)的组织学确认的非肿瘤样品。因此,特异性值反映了从已知非肿瘤样品获得的给定标记物的DNA甲基化测量值在非疾病相关测量值范围内的概率。如此处所定义的,计算的特异性值的临床相关性表示当应用于没有临床病状的患者时指定标记物将检测出不存在该病状的概率的估计。

[0234] 如本文所用,“选定核苷酸”是指核酸分子中四种通常存在的核苷酸中(对于DNA而言为C、G、T和A以及对于RNA而言为C、G、U和A)的一种核苷酸,并且可以包括通常存在的核苷酸的甲基化衍生物(例如,当C是选定核苷酸时,甲基化和未甲基化C都包括在选定核苷酸的含义内),而甲基化的选定核苷酸具体是指通常甲基化的核苷酸并且未甲基化的选定核苷酸具体是指通常以未甲基化的形式存在的核苷酸。

[0235] 术语“甲基化特异性限制酶”或“甲基化敏感性限制酶”是指根据其识别位点的甲基化状态而选择性地消化核酸的酶。在如果识别位点未甲基化或半甲基化则特异性切割的限制酶的情况下,如果识别位点甲基化,则所述切割将不会发生或将以显著降低的效率进行。在如果识别位点甲基化则特异性切割的限制酶的情况下,如果识别位点未甲基化,则所述切割将不会发生或将以显著降低的效率进行。优选的是甲基化特异性限制酶,其识别序列含有CG二核苷酸(例如识别序列,诸如CGCG或CCCGGG)。对于一些实施方案,进一步优选的是如果该二核苷酸中的胞嘧啶在碳原子C5处甲基化则不切割的限制酶。

[0236] 术语“引物”是指当置于诱导与核酸模板链互补的引物延伸产物合成的条件下(例如,在核苷酸和诱导剂诸如DNA聚合酶的存在下,并且在合适的温度和pH下)时,能够充当合成起始点的寡核苷酸,无论是天然存在的,例如来自于限制性消化物的核酸片段,还是合成产生的。引物优选为单链,以获得最大扩增效率,但可以替代地为双链。如果是双链,则首先处理引物以将其链分离,然后用于制备延伸产物。优选地,引物是寡脱氧核苷酸。引物必须足够长以在诱导剂存在下引发延伸产物的合成。引物的确切长度取决于许多因素,包括温度、引物来源和方法的使用。

[0237] 术语“探针”是指能够与另一目标寡核苷酸杂交的寡核苷酸(例如,核苷酸序列),无论是天然存在的(如在纯化的限制性消化物中的),还是通过合成、重组或通过PCR扩增产生的。探针可以是单链或双链。探针可用于检测、鉴定和分离特定基因序列(例如,“捕获探针”)。考虑到在一些实施方案中,用于本发明的任何探针可以用任何“报告分子”标识,以便在任何检测系统中都可检测到,所述检测系统包括但不限于酶(例如,ELISA以及基于酶的组织化学测定)、荧光、放射性和发光系统。并非旨在将本发明限于任何特定的检测系统或标识物。

[0238] 如本文所用,术语“靶标”是指试图例如,通过探针结合、扩增、分离、捕获等方式从其他核酸中分选出的核酸。例如,当针对聚合酶链反应使用时,“靶标”是指被用于聚合酶链反应的引物结合的核酸区域,而当在其中靶DNA未扩增的测定中使用时,例如在侵入性裂解测定的一些实施方案中使用时,靶标包含这样的位点,在该位点处探针和侵入性寡核苷酸(例如,INVADER寡核苷酸)结合形成侵入性裂解结构,使得靶核酸的存在可被检测到。“区

段”定义为靶序列内的核酸区域。

[0239] 如本文所用,术语“标记物”是指一种物质(例如,核酸,或核酸区域,或蛋白质),其可用于例如基于标记物质的存在、不存在或状况(例如,甲基化状态)而区分非正常细胞(例如,癌细胞)与正常细胞。

[0240] 如本文所用的术语“肿瘤”是指组织的任何新的和异常的生长。因此,肿瘤可以是恶变前肿瘤或恶性肿瘤。

[0241] 如本文所用,术语“肿瘤特异性标记物”是指可用于指示肿瘤存在的任何生物材料或元素。生物材料的实例包括但不限于核酸、多肽、碳水化合物、脂肪酸、细胞组分(例如,细胞膜和线粒体)和全细胞。在一些情况下,标记物是特定的核酸区域(例如,基因、基因内区域、特定基因座等)。作为标记物的核酸区域可以称为,例如,“标记基因”、“标记区域”、“标记序列”、“标记基因座”等。

[0242] 术语“样品”以其最广泛的含义使用。在某种意义上,它可以指动物细胞或组织。在另一种意义上说,它是指获自任何来源的样本或培养物,以及生物和环境样品。生物样品可从植物或动物(包括人类)获得且涵盖流体、固体、组织和气体。环境样品包括环境材料,诸如地表物质、土壤、水和工业样品。不得将这些实例解释为限制可适用于本发明的样品类型。

[0243] 如本文所用,术语“患者”或“受试者”是指要经受由该技术提供的各种测试的生物体。术语“受试者”包括动物,优选哺乳动物,包括人。在优选实施方案中,受试者为灵长类动物。在甚至更优选的实施方案中,受试者为人。进一步地关于诊断方法,优选的受试者为脊椎动物受试者。优选的脊椎动物为温血动物;优选的温血脊椎动物为哺乳动物。优选的哺乳动物最优选为人。如本文所用,术语“受试者”包括人和动物受试者。因此,本文提供了兽医治疗用途。因而,本技术提供了对哺乳动物诸如人类,以及由于濒临灭绝而具有重要意义的哺乳动物,诸如东北虎;具有重要的经济意义,诸如在农场饲养以供人类食用的动物;和/或对人类具有重要的社会意义的动物,诸如作为宠物饲养或在动物园饲养的动物的诊断。此类动物的实例包括但不限于:食肉动物诸如猫和狗;猪,包括家猪(pig)、阉猪(hog)和野猪;反刍动物和/或有蹄类动物,诸如牛、公牛、绵羊、长颈鹿、鹿、山羊、野牛和骆驼;鳍足类动物;和马。因此,还提供了对家畜的诊断和治疗,所述家畜包括但不限于家养的猪、反刍动物、有蹄类动物、马(包括竞赛马)等。本发明公开的主题还包括用于诊断受试者中的结肠癌的系统。该系统可以例如作为商业试剂盒提供,所述试剂盒可以用于在已经从其身上采集了生物样品的受试者中筛查结肠癌的风险或诊断结肠癌。根据本技术提供的示例性系统包括评估本文所述的标记物的甲基化状态。

[0244] 在核酸的上下文中,术语“进行扩增”或“扩增”是指通常由少量多核苷酸(例如,单个多核苷酸分子)开始产生多个拷贝的多核苷酸或多核苷酸的一部分,其中扩增产物或扩增子一般是可检测的。多核苷酸的扩增涵盖多种化学和酶促过程。在聚合酶链反应(PCR)或连接酶链反应(LCR;参见例如,美国专利第5,494,810号;其通过引用整体并入本文)期间由几个拷贝的靶或模板DNA分子产生多个DNA拷贝是扩增的形式。另外的类型的扩增包括但不限于等位基因特异性PCR(参见,例如,美国专利第5,639,611号;通过引用整体并入本文)、装配PCR(参见,例如,美国专利第5,965,408号;通过引用整体并入本文)、解旋酶依赖性扩增(参见,例如,美国专利第7,662,594号;通过引用整体并入本文)、热启动PCR(参见,例如,

美国专利第5,773,258和5,338,671号;各自通过引用整体并入本文)、序列间特异性PCR、反向PCR(参见,例如,Triglia等人(1988)Nucleic Acids Res.,16:8186;通过引用整体并入本文)、连接介导的PCR(参见,例如,Guilfoyle,R.等人,Nucleic Acids Research,25:1854-1858(1997);美国专利第5,508,169号;其中每一个均通过引用整体并入)、甲基化特异性PCR(参见,例如,Herman等人,(1996)PNAS 93(13)9821-9826;通过引用整体并入本文)、小引物PCR、多重连接依赖性探针扩增(参见,例如,Schouten等人,(2002)Nucleic Acids Research 30(12):e57;通过引用整体并入本文)、多重PCR(参见,例如,Chamberlain等人,(1988)Nucleic Acids Research 16(23)11141-11156;Ballabio等人,(1990)Human Genetics 84(6)571-573;Hayden等人,(2008)BMC Genetics9:80;其中每一个均通过引用整体并入)、巢式PCR、重叠-延伸PCR(参见,例如,Higuchi等人,(1988)Nucleic Acids Research 16(15)7351-7367;通过引用整体并入本文)、实时PCR(参见,例如,Higuchi等人,(1992)Biotechnology 10:413-417;Higuchi等人,(1993)Biotechnology 11:1026-1030;其中每一个均通过引用整体并入本文)、逆转录PCR(参见,例如,Bustin,S.A.(2000)J.Molecular Endocrinology25:169-193;通过引用整体并入本文)、固相PCR、热不对称交错PCR,和触减(Touchdown)PCR(参见,例如,Don等人,Nucleic Acids Research(1991)19(14)4008;Roux,K.(1994)Biotechniques 16(5)812-814;Hecker等人,(1996)Biotechniques 20(3)478-485;其中每一个均通过引用整体并入本文)。多核苷酸扩增也可以使用数字PCR完成(参见,例如,Kalinina等人,Nucleic Acids Research.25;1999-2004,(1997);Vogelstein和Kinzler,Proc Natl Acad Sci USA.96;9236-41,(1999);国际专利公开号WO05023091A2;美国专利申请公开号20070202525;其中每一个均通过引用整体并入本文)。

[0245] 术语“聚合酶链反应”(“PCR”)是指K.B.Mullis的美国专利第4,683,195、4,683,202和4,965,188号的方法,这些美国专利描述了一种在不进行克隆或纯化的情况下增加基因组或其他DNA或RNA混合物中靶序列区段的浓度的方法。这个扩增靶序列的过程由以下组成:将大量过量的两种寡核苷酸引物引入到含有期望靶序列的DNA混合物中,然后在DNA聚合酶的存在下进行一系列精确的热循环。所述两种引物与它们的双链靶序列的相应链互补。为了实现扩增,使混合物变性,然后使引物退火至其靶分子内的互补序列。退火后,用聚合酶延伸引物以便形成一对新的互补链。变性、引物退火和聚合酶延伸的步骤可以重复多次(即,变性、退火和延伸构成一个“循环”;可以有许多“循环”)以获得高浓度的期望靶序列的扩增片段。期望靶序列的扩增片段的长度由引物相对于彼此的相对位置确定,因此该长度是可控参数。由于该过程的重复方面,将该方法称为“聚合酶链式反应”(“PCR”)。因为靶序列的期望扩增区段成为混合物中的主要序列(就浓度而言),所以将它们称为“PCR扩增的”并且是“PCR产物”或“扩增子”。本领域的技术人员将理解术语“PCR”涵盖最初描述的方法的许多变型,其使用例如实时PCR、巢式PCR、逆转录PCR(RT-PCR)、单引物和任意引物PCR等。

[0246] 如本文所用,术语“核酸检测测定”是指确定目标核酸的核苷酸组成的任何方法。核酸检测测定包括但不限于DNA测序方法、探针杂交方法、结构特异性切割测定(例如,INVADER测定(Hologic,Inc.)并且例如在美国专利第5,846,717、5,985,557、5,994,069、6,001,567、6,090,543和6,872,816号;Lyamichev等人,Nat.Biotech.,17:292(1999),Hall等

人,PNAS,USA,97:8272(2000)和US2009/0253142中有描述,其中每一个均通过引用整体并入本文用于所有目的);酶错配切割方法(例如,Variagenics,美国专利第6,110,684、5,958,692、5,851,770号,其通过引用整体并入本文);如上所述的聚合酶链反应(PCR);分支杂交方法(例如,Chiron,美国专利第5,849,481、5,710,264、5,124,246和5,624,802号,其通过引用整体并入本文);滚环复制(例如,美国专利第6,210,884、6,183,960和6,235,502号,通过引用整体并入本文);NASBA(例如,美国专利第5,409,818号,其通过引用整体并入本文);分子信标技术(例如,美国专利第6,150,097号,通过引用整体并入本文);电子传感器技术(Motorola,美国专利第6,248,229、6,221,583、6,013,170和6,063,573号,其通过引用整体并入本文);环状探针技术(例如,美国专利第5,403,711、5,011,769和5,660,988号,其通过引用整体并入本文);Dade Behring信号扩增方法(例如,美国专利第6,121,001,6,110,677,5,914,230,5,882,867,和5,792,614号,其通过引用整体并入本文);连接酶链反应(例如,Baranay Proc.Natl.Acad.Sci USA 88,189-93(1991));和夹心杂交方法(例如,美国专利第5,288,609号,其通过引用整体并入本文)。

[0247] 在一些实施方案中,扩增靶核酸(例如通过PCR),并使用侵入性切割测定同时检测扩增的核酸。经配置用于与扩增测定组合执行检测测定(例如侵入性切割测定)的测定在美国专利第9,096,893号中有描述,其通过引用整体并入本文用于所有目的。另外的扩增加上侵入性切割检测的配置(称为QuARTS方法)在例如美国专利第8,361,720、8,715,937、8,916,344和9,212,392号中有描述,其中每一个都通过引用并入本文用于所有目的。如本文所用的术语“侵入性切割结构”是指一种切割结构,其包含i)靶核酸,ii)上游核酸(例如,侵入性或“INVADER”寡核苷酸),和iii)下游核酸(例如,探针),其中上游核酸和下游核酸退火至靶核酸的连续区域,并且其中在上游核酸的3’部分与下游核酸和靶核酸之间形成的双链体之间形成重叠。当来自上游核酸和下游核酸的一个或多个碱基相对于靶核酸碱基占据同一位置的情况下发生重叠,无论上游核酸的一个或多个重叠碱基是否与靶核酸互补,以及无论那些碱基是否是天然碱基或是非天然碱基。在一些实施方案中,与下游双链体重叠的上游核酸的3’部分是非碱基化学半族,诸如芳环结构,例如,如通过引用整体并入本文的美国专利第6,090,543号中所公开的。在一些实施方案中,一种或多种核酸可以例如,通过共价连键诸如核酸茎-环,或通过非核酸化学连键(例如,多碳链)彼此附连。如本文所用,术语“活瓣核酸内切酶测定”包括如上所述的“INVADER”侵入性切割测定和QuARTS测定。

[0248] 当针对活瓣测定使用时,术语“探针寡核苷酸”或“活瓣寡核苷酸”是指在侵入性寡核苷酸的存在下与靶核酸相互作用以形成切割结构的寡核苷酸。

[0249] 术语“侵入性寡核苷酸”是指在与介于探针和靶核酸之间的杂交区域相邻的位置与靶核酸杂交的寡核苷酸,其中侵入性寡核苷酸的3’末端包含与介于探针和靶标之间的杂交区域重叠的部分(例如,化学半族或一个或多个核苷酸)。侵入性寡核苷酸的3’端核苷酸可以或可以不与靶标中的核苷酸碱基配对。在一些实施方案中,侵入性寡核苷酸在其3’末端含有这样的序列,该序列与位于退火至靶链的探针寡核苷酸部分的5’末端的序列基本上相同。

[0250] 如本文所用,术语“活瓣核酸内切酶”或“FEN”是指一类溶核酶,通常为5’核酸酶,其作为结构特异性核酸内切酶作用于具有双链体的DNA结构,所述双链体在其中一条链上含有单链5’突出端或活瓣,这条链被核酸的另一条链取代(例如,使得在介于单链和双链

DNA之间的接合处存在重叠核苷酸)。FEN催化单链和双链DNA接合处的磷酸二酯键的水解切割,释放突出端或活瓣。活瓣核酸内切酶由Ceska和Savers(Trends Biochem.Sci.1998 23:331-336)和Liu等人(Annu.Rev.Biochem.2004 73:589-615;其通过引用整体并入本文)综述。FEN可以是单独的酶、多亚基酶,或者可以作为另一种酶或蛋白质复合物(例如,DNA聚合酶)的活性存在。

[0251] 活瓣核酸内切酶可以是热稳定性的。例如,来自归档嗜热性微生物(archival thermophile)的FEN-1活瓣核酸内切酶是典型热稳定性的。如本文所用,术语“FEN-1”是指来自真核生物或古细菌生物的非聚合酶活瓣核酸内切酶。参见,例如WO 02/070755和Kaiser M.W.等人(1999)J.Biol.Chem.,274:21387,其通过引用整体并入本文用于所有目的。

[0252] 如本文所用,术语“切割的活瓣”是指作为活瓣测定的切割产物的单链寡核苷酸。

[0253] 当针对活瓣切割反应使用时,术语“盒”是指寡核苷酸或寡核苷酸的组合,其配置成响应于活瓣或探针寡核苷酸的切割(例如,在活瓣切割测定中形成的初级或第一切割结构中)产生可检测的信号。在优选实施方案中,所述盒与由活瓣寡核苷酸切割产生的非靶切割产物杂交从而形成第二重叠切割结构,使得所述盒然后可以被同一种酶例如FEN-1核酸内切酶切割。

[0254] 在一些实施方案中,所述盒是包含发夹部分(即,这样的区域,其中盒寡核苷酸的一部分在反应条件下与同一寡核苷酸的第二部分杂交,从而形成双链体)的单个寡核苷酸。在其他实施方案中,盒包含至少两种寡核苷酸,其包含可在反应条件下形成双链体的互补部分。在优选实施方案中,盒包含标识物,例如荧光团。在特别优选的实施方案中,盒包含产生FRET效应的经标识的半族。在此类实施方案中,可以将盒称为“FRET盒”。参见,例如,还参见2015年10月30日提交的美国专利申请序列号62/249,097,2016年10月26日提交的美国专利申请序列号15/335,096和2016年10月26日提交的国际申请序列号PCT/US16/58875,其中每一个均通过引用整体并入本文用于所有目的。

[0255] 如本文所用,如针对探针活瓣或臂使用的短语“基本上不互补”意指活瓣部分是充分非互补的,不能在指定退火条件或严格条件下与核酸序列,例如靶核酸或扩增的DNA选择性杂交,涵盖术语“基本上非互补”和“完全非互补”。

[0256] 术语“互补”在本文中用于意指引物或探针是充分互补的,能在指定退火条件或严格条件下,例如与靶核酸序列选择性杂交,涵盖术语“基本上互补”和“完全互补”。

[0257] 如本文所用,术语“FRET”是指荧光共振能量转移,这是半族(例如,荧光团)例如在其自身之间转移能量,或将能量从荧光团转移到非荧光团(例如,淬灭剂分子)的过程。在一些情形下,FRET涉及到激发的供体荧光团通过短程(例如,约10nM或更小)偶极-偶极相互作用将能量转移到低能量的受体荧光团。在其他情形下,FRET涉及到来自供体的荧光能量的损失和受体荧光团中荧光的增加。在另一些其他形式的FRET中,能量可以从激发的供体荧光团转换到非荧光分子(例如,“暗”淬灭分子)。FRET是本领域技术人员已知的并且已进行了描述(参见,例如Stryer等人,1978,Ann.Rev.Biochem.,47:819;Selvin,1995,Methods Enzymol.,246:300;Orpana,2004Biomol Eng 21,45-50;Olivier,2005Mutant Res 573,103-110,其中的每一个均通过引用整体并入本文)。

[0258] 在示例性活瓣检测测定中,侵入性寡核苷酸和活瓣寡核苷酸与靶核酸杂交以产生

具有如上所述的重叠的第一复合物。在活瓣寡核苷酸的5'末端包括未配对的“活瓣”。第一复合物是活瓣核酸内切酶,例如FEN-1核酸内切酶的底物,所述核酸内切酶切割活瓣寡核苷酸以释放5'活瓣部分。在二次反应中,释放的5'活瓣产物作为侵入性寡核苷酸作用于FRET盒,以再次产生由活瓣核酸内切酶识别的结构,从而使得FRET盒被切割。当荧光团和淬灭剂由于FRET盒的切割而分离时,产生高于背景荧光的可检测荧光信号。

[0259] 如本文针对核酸扩增或信号扩增的检测使用的术语“实时”是指在反应正在进行的同时,例如在温育或热循环期间,检测或测量反应中产物或信号的累积。此类检测或测量可以连续进行,或者可以在扩增反应进展的过程中的多个离散点进行,或者可以是组合。例如,在聚合酶链反应中,检测(例如,荧光检测)可以在整个或部分热循环期间连续进行,或者可以在一个或多个循环期间的一个或多个点瞬时进行。在一些实施方案中,通过在多个循环中的每一个中或在每个循环中的相同点(例如,循环中的时间点或循环中的温度步骤)测定荧光水平来实现PCR或QuARTS反应的实时检测。扩增的实时检测也可以称为“在扩增反应期间”的检测。

[0260] 如本文所用,术语“定量扩增数据集”是指在靶样品,例如靶DNA的定量扩增期间获得的数据。在定量PCR或QuARTS测定的情况下,定量扩增数据集是在扩增期间,例如在多个或所有热循环期间获得的荧光值的集合。定量扩增的数据不限于在反应中的任何特定点收集的数据,并且可以在每个循环中的离散点测量或在每个循环从头到尾连续不断地测量荧光。

[0261] 如本文针对实时PCR和PCR+INVADER测定期间收集的数据使用的缩写“Ct”和“Cp”是指信号(例如,荧光信号)超过指示正信号的预定阈值的循环。已经使用各种方法来计算用作信号与浓度的决定因素的阈值,并且该值一般表示为“交叉阈值”(Ct)或“交叉点”(Cp)。Cp值或Ct值可以在本文提供的方法的实施方案中使用,用于分析实时信号以确定测定或样品中变体和/或非变体成分的百分比。

[0262] 如本文所用,当针对核酸检测或分析使用时术语“对照”是指具有已知特征(例如,已知序列、已知每个细胞的拷贝数),用于与实验靶标(例如,未知浓度的核酸)进行比较的核酸。对照可以是内源的,优选可以针对其将测定中的测试或靶核酸标准化的不变基因。此类标准化对例如样品处理、测定效率等方面可能出现的样品间变化起控制作用,并允许准确的样品间数据比较。可用于对人类样品进行标准化核酸检测测定的基因包括:例如,β-肌动蛋白、ZDHHC1和B3GALT6(参见,例如美国专利申请序列号14/966,617和62/364,082,其中每一个均通过引用并入本文。

[0263] 对照也可以是外部的。例如,在诸如qPCR、QuARTS等定量测定中,“校准物”或“校准对照”是已知序列(例如具有与实验靶核酸的一部分相同的序列),和已知浓度或一系列浓度的核酸(例如,用于在定量PCR中生成校准曲线的连续稀释的对照靶标)。通常,使用与在实验DNA上使用的相同的试剂和反应条件来分析校准对照。在某些实施方案中,校准物的测量与实验测定同时进行,例如在同一热循环仪中进行。在优选实施方案中,多种校准物可以包括在单个质粒中,使得不同的校准物序列容易以等摩尔量提供。在特别优选的实施方案中,例如用一种或多种限制酶消化质粒校准物,以使校准物部分从质粒载体中释放。参见,例如WO 2015/066695,其通过引用包括在本文中。在一些实施方案中,校准物DNA是合成的,例如,如美国专利申请序列号15/105,178中所述,其通过引用并入本文。

[0264] 如本文所用,“ZDHHC1”是指编码表征为含DHHC型锌指蛋白1、位于Chr 16(16q22.1)上的人DNA中且属于DHHC棕榈酰转移酶家族的蛋白质的基因。

[0265] 如本文所用,术语“过程对照”是指外源分子,例如在提取靶DNA之前添加到样品中的外源核酸,其可以在提取后进行测量以评估该过程的效率并且能够确定成功或失败模式。所使用的过程对照核酸的性质通常取决于测定类型和正在测量的材料。例如,如果所使用的测定是用于检测和/或定量双链DNA或其中的突变,则双链DNA过程对照通常在提取前掺入到样品中。类似地,对于监测mRNA或微RNA的测定,所使用的过程对照通常是RNA转录物或合成RNA。参见,例如2016年7月19日提交的美国专利申请序列号62/364,049,其通过引用并入本文并且描述了斑马鱼DNA作为人样品的过程对照的用途。

[0266] 如本文所用,术语“斑马鱼DNA”不同于大体积(bulk)的“鱼DNA”)例如,纯化的鲑鱼DNA),并且是指从斑马鱼(Danio rerio)分离的或在体外产生的(例如,酶促、合成产生的)具有在来自斑马鱼的DNA中发现的核苷酸序列的DNA。在优选实施方案中,斑马鱼DNA是通过样品处理步骤作为可检测的对照DNA(例如用于验证DNA回收的过程对照)而添加的甲基化DNA。特别地,包含RASSF1基因的至少一部分的斑马鱼DNA可用作例如用于人样品的过程对照,如美国专利申请序列号62/364,049所述。

[0267] 如本文所用,术语“鱼DNA”不同于斑马鱼DNA并且是指从鱼类中分离的大体积的(例如,基因组)DNA,例如,如美国专利第9,212,392号中所述。大体积的纯化鱼DNA可商购获得,例如以鳕鱼和/或鲱鱼精DNA(Roche Applied Science,Mannheim,Germany)或鲑鱼DNA(USB/Affymetrix)的形式提供。

[0268] 如本文所用,术语“颗粒”和“珠粒”可互换使用,并且术语“磁性颗粒”和“磁珠”可互换使用并且是指对磁场有反应的颗粒或珠粒。通常,磁性颗粒包括没有磁场但在暴露于磁场中时形成磁偶极子的材料,例如,在磁场存在下能够被磁化但在没有磁场的情况下本身不具有磁性的材料。如在此上下文中使用的术语“磁性”包括具有顺磁性的材料或超顺磁性材料。如本文所用的术语“磁性”还涵盖暂时临性材料,诸如具有低居里温度(Curie temperature)的铁磁性或亚铁磁性材料,条件是此类临时磁性材料在根据本发明方法使用含有此类材料的二氧化硅磁性材料分离生物材料的温度范围内具有顺磁性。

[0269] 如本文所用,术语“试剂盒”是指用于递送材料的任何递送系统。在反应测定的上下文中,此类递送系统包括允许将反应试剂(例如,在适当容器中的寡核苷酸、酶等)和/或支持材料(例如,缓冲液、用于进行所述测定的书面说明,等)从一个位置储存、运输或递送到另一个位置的系统。例如,试剂盒包括一个或多个含有相关反应试剂和/或支持材料的外壳(例如,盒子)。如本文所用,术语“分割的试剂盒(fragmented kit)”是指包含两个或更多个独立容器的递送系统,每个容器含有总试剂盒组件的子部分。该容器可一起或单独地递送给预期接受者。例如,第一容器可含有用于测定的酶,而第二容器含有寡核苷酸。

[0270] 如本文所用,术语“系统”是指用于特定目的的物品的集合。在一些实施方案中,物品包括使用说明,如在例如物品上、纸上或可记录介质(例如,DVD、CD、闪存驱动器等)上提供的信息。在一些实施方案中,说明将用户引导至在线位置,例如,网站。

[0271] 如本文所用,术语“信息”是指任何事实或数据的集合。关于使用一个或多个计算机系统(包括但不限于互联网)存储或处理的信息,该术语是指以任何格式(例如,模拟、数字、光学格式等)存储的任何数据。如本文所用,术语“与受试者相关的信息”是指与受试者

(例如,人、植物或动物)有关的事实或数据。术语“基因组信息”是指与基因组有关的信息,包括但不限于核酸序列、基因、甲基化百分比、等位基因频率、RNA表达水平、蛋白质表达、与基因型相关的表型等。“等位基因频率信息”是指与等位基因频率有关的事实或数据,包括但不限于等位基因同一性、等位基因的存在与受试者(例如,人类受试者)的特征之间的统计相关性、个体或群体中等位基因的存在与否、等位基因存在于具有一种或多种特定特征的个体中的可能性百分比,等等。

## 附图说明

[0272] 图1示出了未转化形式和亚硫酸氢盐转化形式的标记物靶区的示意图。示出了用于检测经亚硫酸氢盐转化的靶DNA的活瓣测定引物和探针。

[0273] 图2提供了核酸序列和相应的SEQ ID NO的表格。

[0274] 图3提供了示出来自于实施例2的测定的数据和结果的表格。

[0275] 图4提供了示出来自于实施例2的测定的数据和结果的表格。

[0276] 图5提供了示出组合的PCR-侵入性切割测定(“PCR-活瓣测定”)(例如,QuARTS测定)的示意图,其中将靶核酸(例如,甲基化标记物)的三个不同区域通过对每个不同区域有特异性的引物对并且在不同活瓣探针的存在下扩增,每个活瓣探针对不同区域之一具有特异性,但每一个活瓣探针都具有相同的活瓣臂序列。在每个PCR-活瓣测定期间的活瓣释放均报告至同一个FRET盒以产生来自同一种荧光团的荧光信号。

## 具体实施方式

[0277] 本文提供了与核酸标记物的选择和使用有关的技术,所述核酸标记物用于检测和定量DNA(例如,甲基化DNA)的测定中。特别地,该技术涉及使用甲基化测定来检测结肠癌。

[0278] 在对各种实施方案的这种详细描述中,出于解释的目的,阐述了许多具体细节以提供对所公开的实施方案的透彻理解。然而,本领域的技术人员将理解,可以在有或没有这些具体细节的情况下实践这些各种实施方案。在其他情况下,结构和装置以框图形式示出。此外,本领域的技术人员可以容易地理解,呈现和执行方法的具体顺序是说明性的,并且考虑到该顺序可以变化并且仍然保持在本文公开的各种实施方案的精神和范围内。

[0279] 在一些实施方案中,靶DNA的分析包括在单个反应中分析多个不同的DNA。用于扩增反应的实时检测的典型仪器允许同时检测和定量仅3-5种荧光染料。这主要是因为当具有重叠激发和/或发射光谱的许多染料一起使用时,荧光团之间的光谱重叠使得难以将一种染料与另一种染料区分开。当从生物样本中检测特定疾病需要包含超过约5种不同标记物的组时,这提出了挑战,尤其是当样品的大小有限并且标记物以低水平存在时,这种情形往往需要在单次扩增运行中使用整个样品。

[0280] 在一些实施方案中,本文所述的方法允许通过使每个样品产生来自同一种染料的结果来检测同一种样品中的多种不同标记物。在本文详细描述的实施方案中,针对多种不同标记物的多重活瓣切割测定(例如,QuARTS活瓣核酸内切酶测定)产生初始切割产物,其使用同一个FRET盒产生荧光信号。

[0281] 在优选实施方案中,组合测定包括几种不同的探针寡核苷酸,每种探针寡核苷酸具有与不同靶核酸杂交的部分,但是所有探针寡核苷酸都具有实质上相同的5’臂序列。所

述探针在其各自的靶核酸的存在下的切割全部释放相同的5'臂,然后所有释放的臂与具有相同活瓣结合序列和相同染料的FRET盒组合以通过核酸内切酶切割FRET盒而产生荧光信号。在其他实施方案中,用于不同靶标的探针可具有向不同FRET盒报告的不同活瓣臂,其中不同FRET盒全部使用相同的报告荧光团。

[0282] 以这种方式组合测定具有多个优点。例如,如果在测定中检测到任何一个与病状(例如,疾病状态,诸如结直肠癌)相关的靶序列,则样品可以提供结果,而不需要将样品分成多个不同的测定,进一步地,如果不止一个靶序列提供此类结果,则将这些信号聚集成单个染料通道可以提供比背景更强的信号,为测定结果提供更多确定性。在本文所述方法的开发过程中,惊人地发现,在单个扩增加上活瓣裂解测定反应中将大量用于检测多个不同靶序列的引物和活瓣测定探针连同共用FRET盒组合在一起不会增加无靶对照或阴性样品中的背景信号。

[0283] 在一些实施方案中,向单个FRET盒和单个染料通道报告的不同靶序列可能不是来自于不同的标记基因或区域,但可能来自于单一标记物内(例如,单个甲基化标记基因)的不同区域。如实施例4中所述,配置测定以在所有区域例如通过单个FRET盒向单一染料报告的测定中检测单一标记基因的多个区域,提高了来自反应中存在的靶基因拷贝的可检测信号水平。

[0284] 在其他实施方案中,待检测的不同靶序列可以是一种标记物的多个区域连同一种或多种不同标记物的一个或多个区域的混合。不同靶序列可以包括甲基化标记物、突变标记物、缺失、插入或在测定(诸如QuARTS扩增/活瓣切割测定)中可检测的任何其他形式的核酸变体的任何组合。

[0285] 在一些实施方案中,标记物是具有100个或更少碱基的区域,标记物是具有500个或更少碱基的区域,标记物是具有1000个或更少碱基的区域,标记物是具有5000个或更少碱基的区域,或者,在一些实施方案中,标记物是一个碱基。在一些实施方案中,标记物处于高CpG密度启动子中。

[0286] 该技术不受样品类型的限制。例如,在一些实施方案中,样品是粪便样品、组织样品、痰液、血液样品(例如,血浆、血清、全血)、排泄物或尿液样品。

[0287] 此外,该技术不限于用于确定甲基化状态的方法。在一些实施方案中,所述测定包括使用甲基化特异性聚合酶链反应、核酸测序、质谱法、芯片或阵列杂交、甲基化特异性核酸酶、基于质量的分离或靶标捕获。在一些实施方案中,所述测定包括使用甲基化特异性寡核苷酸。在一些实施方案中,该技术使用大规模平行测序(例如,下一代测序)来确定甲基化状态,例如合成测序(sequencing-by-synthesis)、实时(例如,单分子)测序、珠粒乳液测序、纳米孔测序等。

[0288] 该技术提供了用于检测差异性地甲基化的区域(DMR)的试剂。在一些实施方案中,提供了包含与染色体区域互补的序列的寡核苷酸,提供了试剂盒实施方案,例如包含亚硫酸氢盐试剂和对照核酸的试剂盒,所述对照核酸包含具有选自以下的注解的染色体区域:VAV3;ZNF671;CHST2;FLI1;JAM3;SFMBT2;PDGFD;DTX1;TSPYL5;ZNF568;GRIN2D和QKI并且具有与未患癌症(例如,结肠癌)的受试者相关的甲基化状态。在一些实施方案中,试剂盒包含亚硫酸氢盐试剂和如本文所述的寡核苷酸。在一些实施方案中,试剂盒包含亚硫酸氢盐试剂和对照核酸,所述对照核酸包含来自此类染色体区域的序列并且具有与患有结肠癌的受

试者相关的甲基化状态。

[0289] 该技术与组合物(例如,反应混合物)的实施方案有关。在一些实施方案中,提供了包含核酸和亚硫酸氢盐试剂的组合物,所述核酸包含具有选自以下的注解的染色体区域:VAV3;ZNF671;CHST2;FLI1;JAM3;SFMBT2;PDGFD;DTX1;TSPYL5;ZNF568;GRIN2D和QKI。一些实施方案提供了包含核酸和如本文所述的寡核苷酸的组合物,所述核酸包含具有选自以下的注解的染色体区域:VAV3;ZNF671;CHST2;FLI1;JAM3;SFMBT2;PDGFD;DTX1;TSPYL5;ZNF568;GRIN2D和QKI。一些实施方案提供了包含核酸和甲基化敏感性限制酶的组合物,所述核酸包含具有选自以下的注解的染色体区域:VAV3;ZNF671;CHST2;FLI1;JAM3;SFMBT2;PDGFD;DTX1;TSPYL5;ZNF568;GRIN2D和QKI。一些实施方案提供了包含核酸和聚合酶的组合物,所述核酸包含具有选自以下的注解的染色体区域:VAV3;ZNF671;CHST2;FLI1;JAM3;SFMBT2;PDGFD;DTX1;TSPYL5;ZNF568;GRIN2D和QKI。

[0290] 提供了另外的相关方法实施方案用于筛查从受试者获得的样品中的肿瘤(例如,结肠癌),例如,包括以下步骤的方法:确定样品中标记物的甲基化状态,所述标记物包含在具有选自以下的注解的染色体区域中的碱基:VAV3;ZNF671;CHST2;FLI1;JAM3;SFMBT2;PDGFD;DTX1;TSPYL5;ZNF568;GRIN2D和QKI;比较来自所述受试者样品的标记物的甲基化状态与来自未患结肠癌的受试者的正常对照样品的标记物的甲基化状态;以及确定受试者样品和正常对照样品的甲基化状态差异的置信区间和/或p值。在一些实施方案中,置信区间为90%、95%、97.5%、98%、99%、99.5%、99.9%或99.99%,且p值为0.1、0.05、0.025、0.02、0.01、0.005、0.001或0.0001。方法的一些实施方案提供了以下步骤:使核酸与亚硫酸氢盐试剂反应以产生经亚硫酸氢盐反应的核酸,所述核酸包含具有选自以下的注解的染色体区域:VAV3;ZNF671;CHST2;FLI1;JAM3;SFMBT2;PDGFD;DTX1;TSPYL5;ZNF568;GRIN2D和QKI;对经亚硫酸氢盐反应的核酸进行测序,以提供经亚硫酸氢盐反应的核酸的核苷酸序列;比较经亚硫酸氢盐反应的核酸的核苷酸序列与包含来自未患结肠癌的受试者的染色体区域的核酸的核苷酸序列,以鉴定所述两个序列的差异;以及在存在差异时将受试者鉴定为患有肿瘤。

[0291] 通过该技术提供了用于筛查从受试者获得的样品中的结肠癌的系统。系统的示例性实施方案包括,例如,用于筛查从受试者获得的样品中的结肠癌的系统,该系统包括配置用于确定样品的甲基化状态的分析组件、配置用于比较所述样品的甲基化状态与数据库中记录的对照样品或参考样品甲基化状态的软件组件,以及配置用于向用户警报癌症相关的甲基化状态的警报组件。在一些实施方案中,通过接收来自多个测定的结果的软件组件确定警报(例如,确定多种标记物的甲基化状态,所述标记物例如,具有选自以下的注解的染色体区域:VAV3;ZNF671;CHST2;FLI1;JAM3;SFMBT2;PDGFD;DTX1;TSPYL5;ZNF568;GRIN2D和QKI并根据多个结果计算要报告的值或结果。一些实施方案提供了与具有选自以下的注解的每个染色体区域相关的加权参数的数据库:VAV3;ZNF671;CHST2;FLI1;JAM3;SFMBT2;PDGFD;DTX1;TSPYL5;ZNF568;GRIN2D和QKI,本文提供的所述数据库是用于计算用于报告给用户(例如,诸如医生、护士、临床医生等)的值或结果和/或警报。在一些实施方案中,报告来自多个测定的所有结果并且在一些实施方案中,利用一个或多个结果来提供基于来自多个测定的一个或多个结果的复合,指示受试者的结肠癌风险的得分、值或结果。

[0292] 在系统的一些实施方案中,样品包含核酸,所述核酸包含具有选自以下的注解的

染色体区域:VAV3;ZNF671;CHST2;FLI1;JAM3;SFMBT2;PDGFD;DTX1;TSPYL5;ZNF568;GRIN2D和QKI。在一些实施方案中,所述系统还包含用于分离核酸的组件、用于收集样品的组件,诸如用于收集粪便样品的组件。在一些实施方案中,所述系统包含核酸序列,所述核酸序列包含具有选自以下的注解的染色体区域:VAV3;ZNF671;CHST2;FLI1;JAM3;SFMBT2;PDGFD;DTX1;TSPYL5;ZNF568;GRIN2D和QKI。在一些实施方案中,数据库包含来自未患结肠癌的受试者的核酸序列。还提供了核酸,例如核酸集合,每个核酸具有包含下述染色体区域的序列,所述染色体区域具有选自以下的注解:VAV3;ZNF671;CHST2;FLI1;JAM3;SFMBT2;PDGFD;DTX1;TSPYL5;ZNF568;GRIN2D和QKI。

[0293] 相关的系统实施方案包括如所述的核酸集合以及与该核酸集合相关的核酸序列的数据库。一些实施方案还包含亚硫酸氢盐试剂。并且,一些实施方案还包含核酸测序仪。

[0294] 在某些实施方案中,提供了用于表征从人类受试者获得的样品的方法,其包括a)从人类受试者获得样品;b)测定样品中一种或多种标记物的甲基化状态,其中所述标记物包含具有选自以下标记物组的注解的染色体区域中的碱基:VAV3;ZNF671;CHST2;FLI1;JAM3;SFMBT2;PDGFD;DTX1;TSPYL5;ZNF568;GRIN2D和QKI;c)比较所测定的标记物的甲基化状态与在未患肿瘤的受试者中测定的标记物的甲基化状态。

[0295] 在一些实施方案中,该技术与评估本文在生物样品中鉴定的一种或多种标记物的存在和甲基化状态有关。这些标记物包含一个或多个如本文所讨论的差异性地甲基化的区域(DMR)。在该技术的实施方案中评估甲基化状态。因而,本文提供的技术不限于测量基因甲基化状态的方法。例如,在一些实施方案中,通过基因组扫描方法测量甲基化状态。例如,一种方法涉及限制性标记基因组扫描(Kawai等人(1994)Mol.Cell.Biol.14:7421-7427)且另一个实例涉及甲基化敏感的任意引物PCR(Gonzalgo等人(1997)Cancer Res.57:594-599)。在一些实施方案中,通过用甲基化敏感性限制酶消化基因组DNA,然后对目标区域进行Southern分析(消化-Southern方法),监测特定CpG位点处甲基化模式的变化。在一些实施方案中,分析甲基化模式的变化涉及基于PCR的过程,该过程涉及在PCR扩增之前用甲基化敏感性限制酶消化基因组DNA(Singer-Sam等人(1990)Nucl.Acids Res.18:687)。另外,已经报道了利用DNA的亚硫酸氢盐处理作为甲基化分析的起点的其他技术。这些技术包括甲基化特异性PCR(MSP)(Herman等人(1992)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 93:9821-9826)和由经亚硫酸氢盐转化的DNA扩增的PCR产物的限制酶消化(Sadri和Hornsby(1996)Nucl.Acids Res.24:5058-5059;及Xiong和Laird(1997)Nucl.Acids Res.25:2532-2534)。已经开发出用于检测基因突变(Kuppuswamy等人(1991)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 88:1143-1147)和定量等位基因特异性表达(Szabo和Mann(1995)Genes Dev.9:3097-3108;和Singer-Sam等人(1992)PCR Methods Appl.1:160-163)的PCR技术。此类技术使用内部引物,其与PCR产生的模板退火并使待测定的单个核苷酸的5'立即终止。使用如美国专利第7,037,650号中所述的"定量Ms-SNuPE测定"的方法用于一些实施方案中。

[0296] 在评价甲基化状态时,常常将甲基化状态表示为在特定位点处(例如,在单个核苷酸处、在特定区域或基因座处、在较长的目标序列,例如,DNA的长达～100-bp、200-bp、500-bp、1000-bp或更长子序列处)甲基化的单个DNA链相对于样品中包含该特定位点的总DNA群体的分数或百分比。传统上,使用校准物通过PCR确定未甲基化的核酸的量。然后,对已知量的DNA进行亚硫酸氢盐处理并使用实时PCR或其他指数扩增,例如QuARTS测定(例如,如美国

专利第8,361,720、8,715,937、8,916,344和9,212,392号所提供的)来确定所得甲基化特异性序列。

[0297] 例如,在一些实施方案中,方法包括通过使用外部标准来生成未甲基化靶标的标准曲线。标准曲线由至少两个点构成,并将未甲基化DNA的实时Ct值与已知的定量标准相关联。然后,由至少两个点和外部标准构建甲基化靶标的第二标准曲线。该第二标准曲线将甲基化DNA的Ct与已知的定量标准相关联。接下来,确定甲基化和未甲基化群体的测试样品Ct值,并且由前两个步骤产生的标准曲线计算DNA的基因组当量。根据甲基化DNA相对于群体中的DNA总量的量来计算目标位点处的甲基化百分比,例如(甲基化DNA的数量)/(甲基化DNA的数量+未甲基化DNA的数量)×100。

[0298] 本文还提供了用于实施所述方法的组合物和试剂盒。例如,在一些实施方案中,对一种或多种标记物有特异性的试剂(例如,引物,探针)单独提供或成套提供(例如,成套的用于扩增多种标记物的引物对)。还可以提供用于进行检测测定的另外的试剂(例如,用于进行QuARTS、PCR、测序、亚硫酸氢盐或其他测定的酶、缓冲液、阳性和阴性对照)。在一些实施方案中,提供了含有一种或多种对于执行方法而言必需、足够或有用的试剂的试剂盒。还提供了含有所述试剂的反应混合物。还提供了含有多种试剂的主混合试剂集合,所述试剂可以添加到彼此中和/或添加到测试样品中以使反应混合物完整。

[0299] 用于分离适于这些测定技术的DNA的方法是本领域已知的。具体而言,一些实施方案包括如美国专利9,000,146中所述的那样分离核酸,,该美国专利通过引用整体并入本文。

[0300] 可以通过任何方式分离基因组DNA,包括使用可商购的试剂盒。简言之,其中目标DNA被细胞膜包封,必须利用酶促、化学或机械方法来破坏和裂解生物样品。然后可以例如通过用蛋白酶K消化来清除DNA溶液中的蛋白质和其他污染物。然后从溶液中回收基因组DNA。这可以通过多种方法进行,包括盐析、有机提取,或使DNA结合到固相支持物上。方法的选择将受到包括时间、费用和所需DNA数量在内的若干因素的影响。包含肿瘤物质或肿瘤前期物质(pre-neoplastic matter)的所有临床样品类型都适合用于本方法中,例如细胞系、组织切片、活组织切片、石蜡包埋的组织、体液、粪便、结肠流出物、尿液、血浆、血清、全血、分离的血细胞、从血液中分离的细胞及其组合。

[0301] 该技术不限于用于制备样品并提供用于测试的核酸的方法。例如,在一些实施方案中,使用,例如,如美国专利第8,808,990或9,000,146号中详细描述的直接基因捕获,或通过相关方法从粪便样品或血液或血浆样品中分离出DNA。

[0302] 该技术涉及分析与结肠癌相关的任何样品。例如,在一些实施方案中,样品包含从患者获得的组织和/或生物流体。在一些实施方案中,样品包含分泌物。在一些实施方案中,样品包含痰液、血液、血清、血浆、胃分泌物、结肠组织样品、结肠细胞或从粪便中回收的结肠DNA。在一些实施方案中,受试者为人。此类样品可以通过本领域已知的,例如对于技术人员所显而易见的许多方法获得。

[0303] I.用于检测结肠癌的甲基化测定

[0304] 通过对选定结肠癌病例和结肠对照组织进行无偏性全甲基化谱组测序,鉴定候选甲基化DNA标记物。在89种癌症样品和95种正常血浆样品中进一步评价排名居前的候选标记物。对从患者组织样品中提取的DNA进行亚硫酸氢盐处理,然后通过定量等位基因特异性

实时靶标和信号扩增(QuARTS扩增)来测定候选标记物和作为标准化基因的参考基因(例如β-肌动蛋白或B3GALT6)。QuARTS测定化学法对于甲基化标记物选择和筛查产生高的鉴别力。

[0305] 在对单一标记候选物的接受者操作特征分析中,曲线下面积(AUC)范围为0.63至0.75。在92.6%特异性时,12个甲基化标记物(VAV3;ZNF671;CHST2;FLI1;JAM3;SFMBT2;PDGFD;DTX1;TSPYL5;ZNF568;GRIN2D和QKI)组合的组加上CEA蛋白的测定在结肠癌的所有阶段产生67.4%的灵敏度。

[0306] II.甲基化检测测定和试剂盒

[0307] 本文所述的标记物可用于多种甲基化检测测定中。用于分析核酸中5-甲基胞嘧啶的存在的最常用方法是基于Frommer等人描述的用于检测DNA中的5-甲基胞嘧啶的亚硫酸氢盐方法(Frommer等人(1992)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 89:1827-31,其明确地通过引用整体并入本文用于所有目的)或其变型。为5-甲基胞嘧啶绘图的亚硫酸氢盐方法基于观察到胞嘧啶而非5-甲基胞嘧啶与酸式亚硫酸根离子(也称为亚硫酸氢盐)反应。反应通常根据以下步骤进行:首先,胞嘧啶与亚硫酸氢盐反应形成磺化胞嘧啶。接下来,磺化反应中间体自发脱氨产生磺化尿嘧啶。最后,磺化尿嘧啶在碱性条件下去磺化以形成尿嘧啶。检测是可能的,因为尿嘧啶碱基与腺嘌呤配对(因此表现类似于胸腺嘧啶),而5-甲基胞嘧啶碱基与鸟嘌呤配对(因此表现类似于胞嘧啶)。这使得能够鉴别甲基化胞嘧啶与非甲基化胞嘧啶,通过例如亚硫酸氢盐基因组测序(Grigg G和Clark S,Bioessays(1994)16:431-36;Grigg G,DNA Seq.(1996)6:189-98),如例如在美国专利第5,786,146号中公开的甲基化特异性PCR(MSP),或使用包括序列特异性探针切割的测定,例如QuARTS活瓣核酸内切酶测定(参见,例如Zou等人(2010)“Sensitive quantification of methylated markers with anovel methylation specific technology”Clin Chem 56:A199;和美国专利第8,361,720、8,715,937、8,916,344和9,212,392号来进行。

[0308] 一些常规技术与这样的方法有关,该方法包括将待分析的DNA封闭在琼脂糖基质中,从而防止DNA扩散和复性(亚硫酸氢盐仅与单链DNA反应),并用快速透析代替沉淀和纯化步骤(Olek A等人(1996)“A modified and improved method for bisulfite based cytosine methylation analysis”Nucleic Acids Res.24:5064-6)。因此可以分析单个细胞中的甲基化状况,说明了该方法的实用性和灵敏度。Rein,T.等人(1998)Nucleic Acids Res.26:2255提供了用于检测5-甲基胞嘧啶的常规方法的概述。

[0309] 亚硫酸氢盐技术通常涉及在亚硫酸氢盐处理后扩增已知核酸的短、特异性片段,然后通过测序(Olek和Walter(1997)Nat.Genet.17:275-6)或引物延伸反应(Gonzalgo和Jones(1997)Nucleic Acids Res.25:2529-31;WO 95/00669;美国专利第6,251,594号)对产物进行测定以分析单个胞嘧啶位置。一些方法使用酶消化(Xiong和Laird(1997)Nucleic Acids Res.25:2532-4)。本领域中也已经描述了通过杂交进行的检测(Olek等人,WO 99/28498)。另外,已经描述了亚硫酸氢盐技术在针对单个基因的甲基化检测中的用途(Grigg和Clark(1994)Bioessays 16:431-6;Zeschnigk等人(1997)Hum Mol Genet.6:387-95;Feil等人(1994)Nucleic Acids Res.22:695;Martin等人(1995)Gene 157:261-4;WO 9746705;WO 9515373)。

[0310] 各种甲基化测定程序可与根据本技术的亚硫酸氢盐处理相结合使用。这些测定允

许确定核酸序列内一个或多个CpG二核苷酸(例如,CpG岛)的甲基化状态。除了其他技术之外,此类测定涉及到经亚硫酸氢盐处理的核酸的测序、PCR(用于序列特异性扩增)、Southern印迹分析和甲基化敏感性限制酶的使用。

[0311] 例如,已经通过使用亚硫酸氢盐处理简化了基因组测序以分析甲基化模式和5-甲基胞嘧啶分布(Frommer等人(1992)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 89:1827-1831)。另外,由经亚硫酸氢盐转化的DNA扩增的PCR产物的限制酶消化可用于评估甲基化状态,例如,如Sadri和Hornsby(1997)Nucl.Acids Res.24:5058-5059中所述或如在称为COBRA(联合亚硫酸氢盐限制分析)的方法中所体现的(Xiong和Laird(1997)Nucleic Acids Res.25:2532-2534)。

[0312] COBRA™分析是一种定量甲基化测定,可用于确定少量基因组DNA中特定基因座处的DNA甲基化水平(Xiong和Laird,Nucleic Acids Res.25:2532-2534,1997)。简言之,利用限制酶消化揭示经亚硫酸氢钠处理的DNA的PCR产物中的甲基化依赖性序列差异。根据Frommer等人描述的程序(Proc.Natl.Acad.Sci.USA 89:1827-1831,1992,首先通过标准亚硫酸氢盐处理将甲基化依赖性序列差异引入到基因组DNA中)。然后使用对目标CpG岛有特异性的引物对经亚硫酸氢盐转化的DNA进行PCR扩增,然后进行限制性核酸内切酶消化、凝胶电泳,并使用特异性的经标识的杂交探针进行检测。原始DNA样品中的甲基化水平由消化和未消化的PCR产物的相对量,以在大范围DNA甲基化水平上的线性定量方式表示。另外,该技术可以可靠地应用于从显微切割的石蜡包埋的组织样品中获得的DNA。

[0313] 用于COBRA™分析的典型试剂(例如,如可在典型的基于COBRA™的试剂盒中找到的)可包括但不限于:特定基因座(例如,特定基因、标记物、基因区域、标记物区域、经亚硫酸氢盐处理的DNA序列、CpG岛等)的PCR引物;限制酶和适当的缓冲液;基因杂交寡核苷酸;对照杂交寡核苷酸;用于寡核苷酸探针的激酶标识试剂盒;和经标识的核苷酸。另外,亚硫酸氢盐转化试剂可包括:DNA变性缓冲液;磺化缓冲液;DNA回收试剂或试剂盒(例如,沉淀、超滤、亲和柱);去磺化缓冲液;和DNA回收组分。

[0314] 诸如以下的测定单独使用或与这些方法中的一种或多种组合使用:“MethyLight™”(基于荧光的实时PCR技术)(Eads等人,Cancer Res.59:2302-2306,1999)、Ms-SNuPE™(甲基化敏感性单核苷酸引物延伸)反应(Gonzalgo和Jones,Nucleic Acids Res.25:2529-2531,1997)、甲基化特异性PCR(“MSP”;Herman等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 93:9821-9826,1996;美国专利第5,786,146号)和甲基化CpG岛扩增(“MCA”;Toyota等人,Cancer Res.59:2307-12,1999)。

[0315] “HeavyMethyl™”测定技术是基于经亚硫酸氢盐处理的DNA的甲基化特异性扩增来评估甲基化差异的定量方法。覆盖扩增引物之间的CpG位置或被扩增引物覆盖的CpG位置的甲基化特异性封阻探针(“封阻因子”)使得核酸样品的甲基化特异性选择性扩增成为可能。

[0316] 术语“HeavyMethyl™MethyLight™”测定是指HeavyMethyl™MethyLight™测定,其是MethyLight™测定的变型,其中MethyLight™测定与覆盖扩增引物之间的CpG位置的甲基化特异性封阻探针组合在一起。HeavyMethyl™测定也可以与甲基化特异性扩增引物组合使用。

[0317] 用于HeavyMethyl™分析的典型试剂(例如,如可在典型的基于MethyLight™的试剂盒中找到的)可包括但不限于:特定基因座(例如,特定基因、标记物、基因区域、标记物区

域、经亚硫酸氢盐处理的DNA序列、CpG岛,或经亚硫酸氢盐处理的DNA序列或CpG岛等)的PCR引物;封阻寡核苷酸;优化的PCR缓冲液和脱氧核苷酸;和Taq聚合酶。

[0318] MSP(甲基化特异性PCR)允许评估CpG岛内几乎任何一组CpG位点的甲基化状况,不依赖于甲基化敏感性限制酶的使用(Herman等人Proc.Natl.Acad.Sci.USA 93:9821-9826,1996;美国专利第5,786,146号)。简言之,DNA被亚硫酸氢钠修饰,亚硫酸氢钠将未甲基化的胞嘧啶转化为尿嘧啶而没有将甲基化的胞嘧啶转化为尿嘧啶,随后用相对于未甲基化的DNA对甲基化DNA有特异性的引物扩增产物。MSP仅需少量DNA,对给定CpG岛基因座的0.1%甲基化等位基因敏感,并且可以对从石蜡包埋的样品提取的DNA进行。用于MSP分析的典型试剂(例如,如可在典型的基于MSP的试剂盒中找到的)可包括但不限于:特定基因座(例如,特定基因、标记物、基因区域、标记物区域、经亚硫酸氢盐处理的DNA序列、CpG岛等)的甲基化和未甲基化的PCR引物;优化的PCR缓冲液和脱氧核苷酸;和特异性探针。

[0319] MethyLight™测定是一种高通量定量甲基化测定,其利用在PCR步骤后不需要进一步操作的基于荧光的实时PCR(例如,TaqMan®)(Eads等人,Cancer Res.59:2302-2306,1999)。简而言之,MethyLight™方法以基因组DNA的混合样品开始,所述基因组DNA的混合样品根据标准程序在亚硫酸氢钠反应中转化为甲基化依赖性序列差异的混合库(亚硫酸氢盐过程将未甲基化的胞嘧啶残基转化为尿嘧啶)。然后在“有偏”反应中,例如,用与已知CpG二核苷酸重叠的PCR引物,进行基于荧光的PCR。序列鉴别发生在扩增过程的水平上和荧光检测过程的水平上。

[0320] MethyLight™测定用作针对核酸,例如基因组DNA样品中甲基化模式的定量测试,其中序列鉴别发生在探针杂交水平上。在定量型式中,在与特定的推定甲基化位点重叠的荧光探针的存在下,PCR反应提供甲基化特异性扩增。通过其中引物和探针都不覆盖在任何CpG二核苷酸上的反应来提供针对输入DNA的量的无偏对照。可替代地,通过用未覆盖已知甲基化位点的对照寡核苷酸(例如,基于荧光的HeavyMethyl™和MSP技术型式)或用覆盖潜在甲基化位点的寡核苷酸探测有偏PCR库来实现针对基因组甲基化的定性测试。

[0321] MethyLight™方法与任何合适的探针(例如,“TaqMan®”探针、Lightcycler®探针等)一起使用。例如,在一些应用中,用亚硫酸氢钠处理双链基因组DNA,并使用TaqMan®探针(例如和MSP引物一起)和/或HeavyMethyl封阻寡核苷酸和TaqMan®探针对所述双链基因组DNA进行两组PCR反应中的一组。TaqMan®探针采用荧光“报告”和“淬灭”分子进行双重标识并且被设计成对GC含量相对高的区域有特异性,使得它在PCR循环中在比正向引物或反向引物高约10℃的温度下解链。这允许 TaqMan®探针在PCR退火/延伸步骤期间保持完全杂交。随着Taq聚合酶在PCR过程中酶促合成新链,它最终会到达退火的TaqMan®探针。然后Taq聚合酶5’至3’核酸内切酶活性将通过对TaqMan®探针进行消化而取代TaqMan®探针以释放荧光报告分子,以便使用实时荧光检测系统定量检测其此时未淬灭的信号。

[0322] 用于MethyLight™分析的典型试剂(例如,如可在典型的基于MethyLight™的试剂盒中找到的)可包括但不限于:特定基因座(例如,特定基因、标记物、基因区域、标记物区域、经亚硫酸氢盐处理的DNA序列、CpG岛等)的PCR引物;TaqMan®或Lightcycler®探针;

优化的PCR缓冲液和脱氧核苷酸;和Taq聚合酶。

[0323] QM™(定量甲基化)测定是针对基因组DNA样品中甲基化模式的替代性定量测试,其中序列鉴别发生在探针杂交水平上。在这种定量型式中,在与特定的推定甲基化位点重叠的荧光探针的存在下,PCR反应提供无偏扩增。通过其中引物和探针都不覆盖在任何CpG二核苷酸上的反应来提供针对输入DNA的量的无偏对照。可替代地,通过用未覆盖已知甲基化位点的对照寡核苷酸(基于荧光的HeavyMethyl™和MSP技术型式)或用覆盖潜在甲基化位点的寡核苷酸探测有偏PCR库来实现针对基因组甲基化的定性测试。

[0324] QM™方法可以与任何合适的探针,例如“TaqMan®”探针、Lightcycler®探针一起用于扩增过程中。例如,用亚硫酸氢钠处理双链基因组DNA,并使其经受无偏引物和TaqMan®探针。TaqMan®探针采用荧光“报告”和“淬灭”分子进行双重标识并且被设计成对GC含量相对高的区域有特异性,使得它在PCR循环中在比正向引物或反向引物高约10℃的温度下解链。这允许TaqMan®探针在PCR退火/延伸步骤期间保持完全杂交。随着Taq聚合酶在PCR过程中酶促合成新链,它最终会到达退火的TaqMan®探针。然后Taq聚合酶5'至3'核酸内切酶活性将通过对TaqMan®探针进行消化而取代TaqMan®探针以释放荧光报告分子,以便使用实时荧光检测系统定量检测其此时未淬灭的信号。用于QM™分析的典型试剂(例如,如可在典型的基于QM™的试剂盒中找到的)可包括但不限于:特定基因座(例如,特定基因、标记物、基因区域、标记物区域、经亚硫酸氢盐处理的DNA序列、CpG岛等)的PCR引物;TaqMan®或Lightcycler®探针;优化的PCR缓冲液和脱氧核苷酸;和Taq聚合酶。

[0325] Ms-SNuPE™技术是基于DNA的亚硫酸氢盐处理以及随后的单核苷酸引物延伸来评估特定CpG位点处的甲基化差异的定量方法(Gonzalgo和Jones,Nucleic Acids Res.25:2529-2531,1997)。简言之,使基因组DNA与亚硫酸氢钠反应以将未甲基化的胞嘧啶转化为尿嘧啶,同时保持5-甲基胞嘧啶不变。然后使用对经亚硫酸氢盐转化的DNA有特异性的PCR引物对期望靶序列进行扩增,将所得产物分离出来并用作用于目标CpG位点处甲基化分析的模板。可以分析少量DNA(例如,显微切割的病理学切片)并且它避免了使用限制酶来确定CpG位点处的甲基化状况。

[0326] 用于Ms-SNuPE™分析的典型试剂(例如,如可在典型的基于Ms-SNuPE™的试剂盒中找到的)可包括但不限于:特定基因座(例如,特定基因、标记物、基因区域、标记物区域、经亚硫酸氢盐处理的DNA序列、CpG岛等)的PCR引物;优化的PCR缓冲液和脱氧核苷酸;凝胶提取试剂盒;阳性对照引物;特定基因座的Ms-SNuPE™引物;反应缓冲液(用于Ms-SNuPE反应);和经标识的核苷酸。另外,亚硫酸氢盐转化试剂可包括:DNA变性缓冲液;磺化缓冲液;DNA回收试剂或试剂盒(例如,沉淀、超滤、亲和柱);去磺化缓冲液;和DNA回收组分。

[0327] 简化代表性亚硫酸氢盐测序(RRBS)以亚硫酸氢盐处理核酸开始以将所有未甲基化的胞嘧啶转化为尿嘧啶,然后进行限制酶消化(例如,用识别包含CG序列的位点的酶(诸如MspI))并且在偶联到适体配体后进行片段的完全测序。限制酶的选择针对CpG密集区域富集片段,减少了在分析期间可能映射到多个基因位置的冗余序列的数量。因此,RRBS通过选择用于测序的限制性片段的子集(例如,通过使用制备凝胶电泳进行大小选择)来降低核

酸样品的复杂性。与全基因组亚硫酸氢盐测序相反,通过限制酶消化产生的每个片段均含有至少一个CpG二核苷酸的DNA甲基化信息。因此,RRBS针对启动子、CpG岛和其他基因组特征富集样品,使该样品在这些区域中具有高频率的限制酶切位点,因此提供了用于评估一个或多个基因组基因座的甲基化状态的测定。

[0328] RRBS的典型方案包括以下步骤:用限制酶诸如MspI消化核酸样品,填充突出端和A-尾部,连接适配子,亚硫酸氢盐转化和PCR。参见,例如,等人(2005)"Genome-scale DNA methylation mapping of clinical samples at single-nucleotide resolution"Nat Methods 7:133-6;Meissner等人(2005)"Reduced representation bisulfite sequencing for comparative high-resolution DNA methylation analysis"Nucleic Acids Res.33:5868-77。

[0329] 在一些实施方案中,使用定量等位基因特异性实时靶标和信号扩增(QuARTS)测定来评价甲基化状态。在每个QuARTS测定中依次发生三个反应,包括在初级反应中的扩增(反应1)和靶探针切割(反应2);以及在次级反应中的FRET切割和荧光信号产生(反应3)。当用特异性引物扩增靶核酸时,具有活瓣序列的特异性检测探针松散地结合至扩增子。靶结合位点处存在的特异性侵入性寡核苷酸通过在检测探针和活瓣序列之间切割而使得5'核酸酶,例如FEN-1核酸内切酶释放出活瓣序列。活瓣序列与相应FRET盒的非发夹部分互补。因此,活瓣序列在FRET盒上起到侵入性寡核苷酸的作用,并在FRET盒荧光团和淬灭剂之间实现切割,从而产生荧光信号。切割反应可以切割每个靶标的多个探针,并因而释放每个活瓣的多个荧光团,从而提供指数信号扩增。通过使用具有不同染料的FRET盒,QuARTS可以在单个反应孔中检测多个靶标。参见,例如在Zou等人(2010)"Sensitive quantification of methylated markers with a novel methylation specific technology"Clin Chem 56:A199中)。在本文所述的实施方案中,QuARTS测定还可以被配置成使用同一FRET盒检测多个不同靶标或同一靶标的多个不同区域,从而从单一染料产生加和性荧光信号。

[0330] 在一些实施方案中,在定量之前纯化经亚硫酸氢盐处理的DNA。这可以通过本领域已知的任何方式进行,所述方式例如但不限于例如借助于Microcon™柱(由Millipore™制造)的超滤。根据修改的制造商方案进行纯化(参见,例如PCT/EP2004/011715,其通过引用整体并入本文)。在一些实施方案中,使经亚硫酸氢盐处理的DNA与固体支持物(例如磁珠)结合,并且在DNA与支持物结合时进行去磺化和洗涤。例如,在WO 2013/116375中提供了此类实施方案的实例。在某些优选实施方案中,支持物结合的DNA在载体上去磺化和洗涤后立即准备用于甲基化测定。在一些实施方案中,在测定之前将去磺化的DNA从支持物上洗脱。

[0331] 在一些实施方案中,使用根据本发明的引物寡核苷酸的集合(例如,参见图1)和扩增酶扩增经处理的DNA的片段。几个DNA区段的扩增可以在合为一体的(one and the same)反应容器中同时进行。通常,使用聚合酶链反应(PCR)进行扩增。

[0332] 分离适于这些测定技术的DNA的方法是本领域已知的。具体而言,一些实施方案包括如美国专利申请序列号13/470,251("Isolation of Nucleic Acids",作为US2012/0288868公布)中所描述的那样分离核酸,该专利申请通过引用整体并入本文。

[0333] 在一些实施方案中,本文所述的标记物可用于对粪便样品进行的QUARTS测定。在一些实施方案中,提供了用于产生DNA样品的方法,并且特别地,用于产生这样的DNA样品的方法,所述DNA样品包含小体积(例如,小于100微升、小于60微升)的高度纯化的低丰度核酸

并且基本上和/或有效地不含抑制用于测试DNA样品的测定(例如,PCR、INVADER、QuARTS测定等)的物质。此类DNA样品可用于诊断测定,其定性地检测取自患者的样品中存在的基因、基因变体(例如,等位基因)或基因修饰(例如甲基化)的存在,或者定量地测量所述的基因、基因变体或基因修饰的活性、表达或量。例如,一些癌症与特定突变等位基因或特定甲基化状态的存在相关,因此检测和/或定量此类突变体等位基因或甲基化状态在癌症的诊断和治疗中具有预测价值。

[0334] 许多有价值的遗传标记物在样品中以极低的量存在,并且产生此类标记物的许多事件很罕见。因此,即使是灵敏的检测方法诸如PCR也需要大量DNA来提供足够的低丰度靶标以满足或取代所述测定的检测阈值。而且,即使少量的抑制性物质的存在也会损害这些涉及检测此类少量靶标的测定的准确性和精确性。因此,本文提供的方法提供了产生此类DNA样品所必需的体积和浓度管理。

[0335] 在一些实施方案中,样品包括血液、血清、血浆或唾液。在一些实施方案中,受试者为人。此类样品可以通过本领域已知的,例如对于技术人员所显而易见的许多方法获得。通过使样品经受本领域技术人员已知的各种技术(包括但不限于离心和过滤)可以获得无细胞或基本上无细胞的样品。尽管一般优选不使用侵入性技术来获取样品,但仍可优选获取诸如组织匀浆、组织切片和活组织检查样本等样品。该技术不限于用于制备样品并提供用于测试的核酸的方法。例如,在一些实施方案中,使用,例如,如美国专利第8,808,990和9,169,511号以及WO 2012/155072中详述的直接基因捕获,或通过相关方法,从粪便样品或血液或血浆样品中分离出DNA。

[0336] 标记物的分析可以单独地进行或者与一个测试样品内的另外标记物同时进行。例如,可以将几种标记物组合到一个测试中,以高效处理多个样品并且可能提供更高的诊断和/或预后准确性。另外,本领域的技术人员将认识到对来自同一受试者的多个样品进行测试(例如,在连续时间点)的价值。此类对系列样品的测试可以允许鉴定标记物甲基化状态随时间的变化。甲基化状态的变化以及甲基化状态的变化的缺乏可以提供关于疾病状况的有用信息,所述有用信息包括但不限于鉴定事件发生的大致时间,可挽救组织的存在和量,药物疗法的适当性,各种疗法的有效性,以及对受试者结果(包括未来事件的风险)的鉴定。

[0337] 生物标记物的分析可以以各种物理格式进行。例如,可以使用微量滴定板或自动化,以方便处理大量测试样品。可替代地,可以开发单一样品格式以便于,例如,在门诊运输或急诊室环境中及时地立即治疗和诊断。

[0338] 考虑到本技术的实施方案以试剂盒的形式提供。试剂盒包括本文所述的组合物、装置、设备等的实施方案,及试剂盒的使用说明书。此类说明书描述了由样品制备分析物,例如,收集样品并由样品制备核酸的适当方法。将试剂盒的各个组件包装在适当的容器和包装(例如,小瓶、盒子、泡罩包装、安瓿、罐子、瓶子、管等)中并将该组件一起包装在适当的容器(例如,一个或多个盒子)中以方便储存、运输和/或试剂盒的使用者使用。应理解,液体组分(例如,缓冲液)可以以冻干形式提供,以供使用者重构。试剂盒可包括用于评估、验证和/或确保试剂盒性能的对照或参考。例如,用于测定样品中存在的核酸的量的试剂盒可以包括这样的对照,所述对照包含用于比较的已知浓度的同一种核酸或另一种核酸,并且在一些实施方案中,所述试剂盒包括对对照核酸有特异性的检测试剂(例如,引物)。该试剂盒适于在临床环境下使用,并且在一些实施方案中,适于在使用者家中使用。在一些实施方案

中,试剂盒的组件提供了用于由样品制备核酸溶液的系统的功能性。在一些实施方案中,系统的某些组件由使用者提供。

[0339] III.应用

[0340] 在一些实施方案中,诊断测定鉴定个体中疾病或病状的存在。在一些实施方案中,所述疾病是癌症(例如,结肠癌)。在一些实施方案中,使用其异常甲基化与结肠癌相关的标记物(例如,选自表1中列出的标记物的一种或多种标记物,或优选以下的一种或多种:VAV3;ZNF671;CHST2;FLI1;JAM3;SFMBT2;PDGFD;DTX1;TSPYL5;ZNF568;GRIN2D、QKI、FER1L4)。在一些实施方案中,测定还包括检测参考基因(例如,β-肌动蛋白、ZDHHC1、B3GALT6)。

[0341] 在一些实施方案中,该技术可应用于治疗患者(例如患有结肠癌,患有早期结肠癌或可能发展成结肠癌的患者),该方法包括确定如本文所提供的一种或多种标记物的甲基化状态,并基于确定甲基化状态的结果向患者施用治疗。所述治疗可以是施用药物化合物、疫苗,进行手术,对患者成像,进行另一种测试。优选地,所述用途是在临床筛查方法、预后评估方法、监测疗法结果的方法、鉴定最可能对特定治疗性治疗有反应的患者的方法、对患者或受试者成像的方法,以及药物筛查和开发的方法中。

[0342] 在一些实施方案中,该技术可应用于诊断受试者的结肠癌的方法中。如本文所用的术语“进行诊断”和“诊断”是指技术人员可以估计且甚至确定受试者是否患有指定疾病或病状或者是否可在将来发展成指定疾病或病状的方法。技术人员常常基于一种或多种诊断指标(例如其甲基化状态指示病状的存在、严重程度或不存在的生物标记物)进行诊断。

[0343] 随诊断一起,临床癌症预后涉及确定癌症的侵袭性和肿瘤复发的可能性以计划最有效的疗法。如果可以作出更准确的预后或甚至可以评估发展成癌症的潜在风险,则可以选择适当的疗法,并且在某些情况下可以选择对患者不太严格的疗法。对癌症生物标记物的评估(例如,确定其甲基化状态)可用于将预后良好和/或发展成癌症的风险低,将不需要疗法或需要有限疗法的受试者与那些更可能发展成癌症或遭受癌症复发,可受益于更强化的治疗的受试者分开。

[0344] 因而,如本文所用,“作出诊断”或“诊断”进一步包括确定发展成癌症的风险或确定预后,这可以为基于本文公开的诊断生物标记物的测量预测临床结果(有或没有医学治疗),选择适当的治疗(或治疗是否有效),或监测当前治疗并潜在地改变该治疗作准备。

[0345] 进一步地,在本技术的一些实施方案中,可以随时间的推移对生物标记物进行多次测定以方便诊断和/或预后。生物标记物的时间变化可用于预测临床结果,监测结肠癌的进展,和/或监测针对癌症的适当疗法的功效。在此类实施方案中,例如,人们可能期望在有效疗法的过程中随时间的推移看到在生物样品中本文公开的一种或多种生物标记物(以及可能的一种或多种另外的生物标记物(如果进行了监测))的甲基化状态的变化。

[0346] 该技术可进一步应用于确定是否开始或继续对受试者的癌症进行预防或治疗的方法中。在一些实施方案中,该方法包括提供在一段时间内来自受试者的一系列生物样品;分析该系列的生物样品以确定在每个生物样品中本文公开的至少一种生物标记物的甲基化状态;并对每个生物样品中一种或多种生物标记物的甲基化状态的任何可测量的变化进行比较。在该时间段内生物标记物的甲基化状态的任何变化均可用于预测发展成癌症的风险,预测临床结果,确定是否开始或继续癌症的预防或治疗,以及当前疗法是否能有效地治

疗癌症。例如,可以在开始治疗之前选择第一时间点,并且可以在开始治疗之后的某个时间选择第二时间点。可以在取自不同时间点的每个样品中测量甲基化状态,并记录定性和/或定量差异。来自不同样品的生物标记物水平的甲基化状态的变化可以与受试者发展成结肠癌的风险,受试者的预后,确定受试者的治疗功效和/或癌症进展相关。

[0347] 在优选实施方案中,本发明的方法和组合物用于在早期阶段,例如在疾病症状出现之前,治疗或诊断疾病。在一些实施方案中,本发明的方法和组合物用于在临床阶段治疗或诊断疾病。

[0348] 如上所述,在一些实施方案中,可以对一种或多种诊断或预后生物标记物进行多重测定,并且可以利用标记物的时间变化来确定诊断或预后。例如,可以在初始时间测定诊断标记物,并且在第二时间再次测定诊断标记物。在此类实施方案中,标记物从初始时间到第二时间的增加可以诊断癌症的特定类型或严重程度,或给定预后。同样,标记物从初始时间到第二时间的减少可以指示癌症的特定类型或严重程度,或给定预后。此外,一种或多种标记物的变化程度可与癌症的严重程度和未来的不良事件相关。技术人员将理解,虽然在某些实施方案中,可以在多个时间点对同一种生物标记物进行比较测量,但是也可以在一个时间点测量给定生物标记物,在第二时间点测量第二生物标记物,并且对这些标记物的比较可以提供诊断信息。

[0349] 如本文所用,短语“确定预后”是指技术人员可以预测受试者病状的过程或结果的方法。术语“预后”不是指以100%准确率预测病状的过程或结果的能力,或甚至不是指基于生物标记物的甲基化状态预测给定过程或结果或多或少会发生的能力。相反,技术人员将理解术语“预后”是指某一过程或结果将会发生的概率增加;即,与没有表现出给定病状的个体相比时,过程或结果更可能在表现出该病状的受试者中发生。例如,在没有表现出该病状的个体中,给定结果(例如,罹患结肠癌)的可能性可非常低。

[0350] 在一些实施方案中,统计分析将预后指标与不良结果的倾向相关联。例如,在一些实施方案中,如通过统计显著性水平所确定的,与从未患癌症的患者获取的正常对照样品中的甲基化状态不同的甲基化状态可以预示,受试者比具有与对照样品中的甲基化状态更相似的水平的受试者更可能患癌症。另外,甲基化状态从基线(例如,“正常”)水平的变化可以反映受试者预后,并且甲基化状态的变化程度可与不良事件的严重程度相关。常常通过比较两个或更多个群体并确定置信区间和/或p值来确定统计显著性。参见,例如,Dowdy和Wearden,Statistics for Research,John Wiley&Sons,纽约,1983,其通过引用整体并入本文。本主题的示例性置信区间为90%、95%、97.5%、98%、99%、99.5%、99.9%和99.99%,而示例性p值为0.1、0.05、0.025、0.02、0.01、0.005、0.001和0.0001。

[0351] 在其他实施方案中,可以确定本文公开的预后或诊断生物标记物的甲基化状态的阈值变化程度,并且简单地将生物样品中生物标记物的甲基化状态的变化程度与甲基化状态的阈值变化程度进行比较。本文提供的生物标记物的甲基化状态的优选阈值变化为约5%、约10%、约15%、约20%、约25%、约30%、约50%、约75%、约100%和约150%。在另一些其他实施方案中,可以建立“列线图”,通过其将预后或诊断指标(生物标记物或生物标记物的组合)的甲基化状态与针对给定结果的相关倾向直接相关。技术人员熟悉使用此类列线图关联两个数值,理解该测量中的不确定性与标记物浓度的不确定性相同,因为参考的是单个样品测量值,而不是群体平均值。

[0352] 在一些实施方案中,对照样品与生物样品并行地进行分析,使得可以将从生物样品获得的结果与从对照样品获得的结果进行比较。另外,考虑到可以提供标准曲线,利用该标准曲线可以比较生物样品的测定结果。如果使用荧光标识物,则此类标准曲线呈现出生物标记物的甲基化状态随测定单位(例如荧光信号强度)的变化。使用取自多个供体的样品,可以提供针对正常组织中所述一种或多种生物标记物的对照甲基化状态,以及取自患有结肠癌的供体的组织中所述一种或多种生物标记物的“有风险”水平的标准曲线。

[0353] 标记物的分析可以单独地进行或者与一个测试样品内的另外标记物同时进行。例如,可以将几种标记物组合到一个测试中,以高效地处理多个样品并且可能提供更高的诊断和/或预后准确性。另外,本领域的技术人员将认识到对来自同一受试者的多个样品进行测试(例如,在连续时间点)的价值。此类对系列样品的测试可以允许鉴定标记物甲基化状态随时间的变化。甲基化状态的变化以及甲基化状态的变化的缺乏可以提供关于疾病状况的有用信息,所述有用信息包括但不限于鉴定事件发生的大致时间,可挽救组织的存在和量,药物疗法的适当性,各种疗法的有效性,以及对受试者结果(包括未来事件的风险)的鉴定。

[0354] 生物标记物的分析可以以各种物理格式进行。例如,可以使用微量滴定板或自动化,以方便处理大量测试样品。可替代地,可以开发单一样品格式以便于,例如,在门诊运输或急诊室环境中及时地立即治疗和诊断。

[0355] 在一些实施方案中,如果与对照甲基化状态相比,样品中至少一种生物标记物的甲基化状态存在可测量的差异,则将受试者诊断为患有结肠癌。相反,当在生物样品中未鉴定出甲基化状态的变化时,可以将受试者鉴定为未患结肠癌,未处于癌症风险中,或具有低癌症风险。在这方面,可以将具有结肠癌或其风险的受试者与具有较低至基本上没有癌症或其风险的受试者区别开来。可以将具有发展成结肠癌的风险的那些受试者列入更密集的和/或定期的筛查计划中。另一方面,具有低至基本上没有风险的那些受试者可以避免接受筛查程序,直至将来的筛查(例如根据本技术进行的筛查)指示那些患者中已经出现结肠癌的风险为止。

[0356] 如上所述,根据本技术的方法的实施方案,检测所述一种或多种生物标记物的甲基化状态的变化可以是定性测定,或者可以是定量测定。因此,诊断受试者患有结肠癌或有发展成结肠癌的风险的步骤表明进行了某些阈值测量,例如,生物样品中所述一种或多种生物标记物的甲基化状态与预定的对照甲基化状态不同。在该方法的一些实施方案中,对照甲基化状态是生物标记物的任何可检测的甲基化状态。在该方法的其他实施方案中,其中对照样品与生物样品并行测试,预定甲基化状态是对照样品中的甲基化状态。在该方法的其他实施方案中,预定甲基化状态是基于标准曲线的和/或由标准曲线鉴定的。在该方法的其他实施方案中,预定甲基化状态是特定状态或状态范围。因而,可以在对于本领域技术人员将显而易见的可接受限度内,部分地基于所实践的方法的实施方案和期望的特异性等,选择预定甲基化状态。

[0357] 近年来,显而易见的是,可以在许多癌症患者的血液中检测到代表转移性肿瘤细胞的循环上皮细胞。稀有细胞的分子表达谱分析(Molecular profiling)在生物学和临床研究中很重要。应用范围包括表征癌症患者外周血中循环上皮细胞(CEpC)以进行疾病预后和个性化治疗(参见例如,Cristofanilli M等人(2004)N Engl J Med 351:781-791;Hayes

DF等人(2006)Clin Cancer Res 12:4218-4224;Budd GT等人,(2006)Clin Cancer Res 12:6403-6409;Moreno JG等人(2005)Urology65:713-718;Pantel等人,(2008)Nat Rev 8:329-340;和Cohen SJ等人(2008)J Clin Oncol 26:3213-3221)。因此,本公开的实施方案提供了用于通过鉴定血浆或全血中甲基化标记物的存在来检测受试者中转移性癌的存在的组合物和方法。

[0358] 实验实施例

[0359] 实施例1

[0360] 样品制备方法

[0361] 用于DNA分离和QUARTS测定的方法

[0362] 以下提供了用于在分析之前进行DNA分离的示例性方法,以及示例性QuARTS测定,例如可以根据本技术的实施方案使用的。在该实施例中描述了QuARTS技术在来自血液和各种组织样品的DNA中的应用,但该技术容易应用于如其他实施例中所示的其他核酸样品。

[0363] 从细胞和血浆中分离DNA

[0364] 对于细胞系,可以使用例如Maxwell®RSC ccfDNA血浆试剂盒(Promega Corp.,Madison,WI)从细胞条件培养基中分离基因组DNA。按照试剂盒方案,使用1mL细胞条件培养基(CCM)代替血浆,并根据试剂盒程序对该培养基进行处理。洗脱体积为100μL,其中70μL一般用于亚硫酸氢盐转化。还请参见2015年10月30日提交的美国专利申请序列号62/249,097;2016年10月26日提交的美国专利申请序列号15/335,111和15/335,096;和2016年10月26日提交的国际申请序列号PCT/US16/58875,其中每一个均通过引用整体并入本文用于所有目的。

[0365] 该实施例中提供了从血液样品中分离DNA以用于例如检测测定的完整过程的实例。还描述了任选的亚硫酸氢盐转化和检测方法。

[0366] I.血液处理

[0367] 将全血收集在抗凝血剂EDTA或Streck无细胞DNA BCT管中。示例性程序如下:

[0368] 1.将10mL全血抽吸到真空采血管(抗凝血剂EDTA或Streck BCT)中,收集全部体积以确保血液与抗凝血剂的正确比例。

[0369] 2.收集后,通过将管倒转8至10次轻轻混合血液以使血液和抗凝血剂混合并保持在室温下直至离心,这应该在采血后4小时内进行。

[0370] 3.将血样在室温下在水平转子(外摆式头)中以1500g(±100g)离心10分钟。请勿使用制动器来停止离心机。

[0371] 4.在室温下小心地抽吸上清液(血浆)并汇集在离心管中。确保不要破坏细胞层或转移任何细胞。

[0372] 5.小心地将4mL上清液等分试样转移到冷冻管中。

[0373] 6.每个等分试样一制成就将盖子紧紧盖住并置于冰上。该过程应在离心1小时内完成。

[0374] 7.确保冷冻管恰当地标识有相关信息,包括血液中存在的添加剂的详细信息。

[0375] 8.可以将样本保持在-20℃下冷冻最多48小时,之后转移到-80℃的冷冻机中。

[0376] II.合成过程对照DNA的制备

[0377] 使用标准DNA合成方法诸如添加亚磷酰胺,在所指示的位置处掺入5-甲基C碱基,

合成具有如下所示序列的甲基化斑马鱼DNA的互补链。将合成的链退火以产生用作过程对照的双链DNA片段。

[0378]

| 寡核苷酸名称 | SEQ ID NO: | 寡核苷酸序列 |
|---|---|---|
| 斑马鱼 *RASSF1* me 合成靶标有义链 | 177 | 5-TCCAC/iMe-dC/GTGGTGCCCACTCTGGACAGGTGGAGCAGAGGGAAGGTGGTG/iMe-dC/GCATGGTGGG/iMe-dC/GAG/iMe-dC/G/iMe-dC/GTG/iMe-dC/GC CTGGAGGACCC/iMe-dC/GATTGGCTGA/iMe-dC/GTGTAAACCAGGA/iMe-dC/GA GGACATGACTTTCAGCCCTGCAGCCAGACACAGCTGAGCTGGTGT GACCTGTGTGGAGAGTTCATCTGG-3 |
| 斑马鱼 *RASSF1* me 合成靶标反义链 | 178 | 5-CCAGATGAACTCTCCACACAGGTCACACCAGCTCAGCTGTGTCTGG CTGCAGGGCTGAAAGTCATGTCCT/iMe-dC/GTCCTGGTTTACA/iMe-dC/GTCAGCCAAT/iMe-dC/GGGGTCCTCCAGG/iMe-dC/GCA/iMe-dC/G/iMe-dC/GCT/iMe-dC/GC CCACCATG/iMe-dC/GCACCACCTTCCCTCTGCTCCACCTGTCCAGAGTGG GCACCA/iMe-dC/GGTGGA-3 |

[0379] A.浓缩斑马鱼(ZF-RASS F1 180mer)合成过程对照的退火和制备

[0380] 1.在10mM Tris(pH 8.0)、0.1mM EDTA中以1μM的浓度重构冻干的单链寡核苷酸。

[0381] 2.制备具有500mM NaCl、200mM Tris-HCl pH 8.0和20mM $MgCl_2$的10X退火缓冲液。

[0382] 3.使合成链退火:

[0383] 在100μL的总体积中,将等摩尔量的每种单链寡核苷酸组合在1X退火缓冲液中,例如,如下表所示:

[0384]

| 组分 | 原液浓度 | 最终浓度(1 ml 最终体积中的拷贝数/μl) | 添加的体积(μL) |
|---|---|---|---|
| 斑马鱼 *RASSF1* me 合成靶标有义链 | 1 μM | 1.0E+10 | 16.6 |
| 斑马鱼 *RASSF1* me 合成靶标反义链 | 1 μM | 1.0E+10 | 16.6 |
| 退火缓冲液 | 10X | NA | 10.0 |
| 水 | NA | NA | 56.8 |
| | | 总体积 | 100.0 μL |

[0385] 4.将退火混合物加热至98℃,保持11-15分钟。

[0386] 5.将反应管从热源上移开并短暂地减速离心以使凝聚物聚集到管的底部。

[0387] 6.将反应管在室温下温育10至25分钟。

[0388] 7.添加0.9mL鱼类DNA稀释剂(20ng/mL的在Te(10mM Tris-HCl pH8.0、0.1mM EDTA)中的大的鱼DNA),以将斑马鱼RASSF1 DNA片段在基因组鱼类DNA载体中的浓度调节为1.0x $10^{10}$个拷贝/μl的退火双链合成斑马鱼RASSF1 DNA。

[0389] 8.用10mM Tris(pH 8.0)、0.1mM EDTA将过程对照稀释至期望浓度,例如,如下表

所述,并且储存在-20℃或-80℃

[0390]

| 初始浓度 | 目标添加量 | Te | 总体积 | 最终浓度 |
|---|---|---|---|---|
| 1.00E+10 个拷贝/μL | 10 μL | 990 μL | 1000 μL | 1.00E+08 个拷贝/μL |
| 1.00E+08 个拷贝/μL | 10 μL | 990 μL | 1000 μL | 1.00E+06 个拷贝/μL |

[0391] B.100x原液过程对照(在200ng/μL大的鱼类DNA中的12,000个拷贝/μL的斑马鱼RASSF1 DNA)的制备

[0392] 1.将试剂解冻

[0393] 2.涡旋并减速离心解冻的试剂

[0394] 3.将以下试剂添加到50mL锥形管中

[0395]

| 试剂 | 初始浓度 | 最终浓度 | 添加的体积(mL) |
|---|---|---|---|
| 原液载体鱼类 DNA | 10 μg/μL | 200 ng/μL | 0.40 |
| 斑马鱼(ZF-RASS F1 180mer) | 1.00E+06 个拷贝/μL | 1.20E+04 个拷贝/μL | 0.24 |
| 10 mM Tris (pH 8.0)、0.1 mM EDTA | NA | NA | 19.36 |
| | | 总体积 | 20.00 |

[0396] 4.将等分试样加入到经标识的0.5mL管中并储存在-20℃下

[0397] C.1x过程对照原液(在2ng/μL鱼类DNA中的120个拷贝/μL的斑马鱼RASSF1 DNA)的制备

[0398] 1.将试剂解冻

[0399] 2.涡旋并减速离心解冻的试剂

[0400] 3.将以下试剂添加到50mL锥形管中:

[0401]

| 试剂 | 1mL | 5mL | 10mL |
|---|---|---|---|
| 100x斑马鱼过程对照 | 10μL | 50μL | 100μL |
| 10mM Tris(pH 8.0)、0.1mM EDTA | 990μL | 4950μL | 9900μL |

[0402] 4.将0.3mL等分试样加入到经标识的0.5mL管中并储存在-20℃下

[0403] III.从血浆中提取DNA

[0404] 1.将血浆解冻,准备试剂,在管上加以标识,并清洁和设置生物安全柜以进行提取

[0405] 2.对于每个样品向一根50mL锥形管中添加300μL蛋白酶K(20mg/mL)。

[0406] 3.向每根50mL锥形管中添加2-4mL血浆样品(请勿涡旋)。

[0407] 4.涡动(Swirl)或用移液器吹打混合并在室温下静置5分钟。

[0408] 5.添加4-6mL裂解缓冲液1(LB1)溶液,使体积达到约8mL。

[0409] LB1制剂:

[0410] • 如上所述,0.1mL的120个拷贝/μL的斑马鱼RASSF1 DNA过程对照;

[0411] • 0.9-2.9mL的10mM Tris(pH 8.0)、0.1mM EDTA(例如,对于2mL血浆样品而言使用2.9mL)

[0412] • 3mL的4.3M含有10%IGEPAL的硫氰酸胍(来自5.3g IGEPAL CA-630与45mL 4.8M

硫氰酸胍的组合的原液)

[0413] 6.将管倒转3次。

[0414] 7.将管置于台式振荡器上(室温),在室温下以500rpm振荡30分钟。

[0415] 8.添加200μL二氧化硅结合珠粒(16μg颗粒/μL)并通过涡动而混合。

[0416] 9.添加7mL裂解缓冲液2(LB2)溶液并通过涡动而混合。

[0417] LB2制剂:

[0418] • 与10%IGEPAL混合的4mL 4.3M硫氰酸胍

[0419] • 3mL 100%异丙醇

[0420] (裂解缓冲液2可以在二氧化硅结合珠粒之前、之后或并行地添加)

[0421] 10.将管倒转3次。

[0422] 11.将管置于台式振荡器上,在室温下以500rpm振荡30分钟。

[0423] 12.将管置于捕获抽吸器上并运行具有珠粒磁力聚集的程序10分钟,然后进行抽吸。这将使珠粒聚集10分钟,然后将所有液体从管中移出。

[0424] 13.添加0.9mL洗涤溶液1(3M盐酸胍或硫氰酸胍、56.8%EtOH)以使结合珠粒重新悬浮并通过涡动而混合。

[0425] 14.将管置于台式振荡器上,在室温下以400rpm振荡2分钟。

[0426] (所有后续步骤均可在STARlet自动化平台上完成。)

[0427] 15.通过重复地用移液器吹打进行混合,然后将包含的珠粒转移到96深孔板中。

[0428] 16.将板置于磁架上10分钟。

[0429] 17.将上清液抽吸到废弃物中。

[0430] 18.添加1mL洗涤溶液2(80%乙醇、10mM Tris pH 8.0)。

[0431] 19.混合3分钟。

[0432] 20.将管置于磁架上10分钟。

[0433] 21.将上清液抽吸到废弃物中。

[0434] 22.添加0.5mL洗涤溶液2。

[0435] 23.混合3分钟。

[0436] 24.将管置于磁架上5分钟。

[0437] 25.将上清液抽吸到废弃物中。

[0438] 26.添加0.25mL洗涤溶液2。

[0439] 27.混合3分钟。

[0440] 28.将管置于磁架上5分钟。

[0441] 29.将上清液抽吸到废弃物中。

[0442] 30.添加0.25mL洗涤溶液2。

[0443] 31.混合3分钟。

[0444] 32.将管置于磁架上5分钟。

[0445] 33.将上清液抽吸到废弃物中。

[0446] 34.将板置于70℃的加热块上15分钟,同时振荡。

[0447] 35.添加125μL洗脱缓冲液(10mM Tris-HCl(pH 8.0)、0.1mM EDTA)。

[0448] 36.边振荡边在65℃下温育25分钟。

[0449] 37.将板置于磁铁上,让珠粒聚集并冷却8分钟。

[0450] 38.将洗脱物转移至96孔板中并储存在-80℃下。可回收/可转移体积为约100μL。

[0451] IV.亚硫酸氢盐处理前的DNA定量

[0452] 为了使用ACTB基因测量样品中的DNA并评估斑马鱼过程对照回收率,可以在进一步处理之前测量DNA。使用以下方案,使用10μL提取的DNA建立QuARTS PCR-活瓣测定:

[0453] 1.制备10X寡核苷酸混合物,其含有各2μM的正向引物和反向引物、5μM的探针和FRET盒,以及各250μM的脱氧核苷三磷酸(dNTP)。(引物、探针和FRET序列,参见下文)

[0454]

| 寡核苷酸 | 序列(5'-3') | SEQ ID NO: | 浓度(μM) |
|---|---|---|---|
| ZF RASSF1 UT 正向引物 | CGCATGGTGGGCGAG | 179 | 2 |
| ZF RASSF1 UT 反向引物 | ACACGTCAGCCAATCGGG | 180 | 2 |
| ZF RASSF1 UT 探针(臂 3) | CCACGGACG GCGCGTGCGTTT/3C6/ | 181 | 5 |

[0455]

| | | | |
|---|---|---|---|
| 臂 5 FAM FRET | /FAM/TCT/BHQ-1/AGCCGGTTTTCCGGCTGAGACGTCCGTGG/3C6/ | 182 | 5 |
| ACTB 正向引物 3 | CCATGAGGCTGGTGTAAAG | 164 | 2 |
| ACTB 反向引物 3 | CTACTGTGCACCTACTTAATACAC | CTACT | 2 |
| 带臂 1 的 ACTB 探针 | CGCCGAGGGCGGCCTTGGAG/3C6/ | 166 | 5 |
| 臂 1 QUASAR670 FRET | /Q670/TCT/BHQ-2/AGCCGGTTTTCCGGCTGAGACCTCGGCG/3C6/ | 174 | 5 |
| dNTP 混合物 | | | 2500 |

[0456] 2.如下制备主混合物:

[0457]

| 组分 | 每个反应的体积(μL) |
|---|---|
| 水 | 15.50 |
| 10X寡核苷酸混合物 | 3.00 |
| 20X QuARTS酶混合物* | 1.50 |
| 总体积 | 20.0 |

[0458] *20X酶混合物含有1单位/μL的GoTaq热启动聚合酶(Promega)、292ng/μL Cleavase 2.0活瓣核酸内切酶(Hologic)。

[0459] 3.用移液器移取各10μL样品到96孔板的孔中。

[0460] 4.向板的每个孔中添加20μL主混合物。

[0461] 5.将板密封并以3000rpm离心1分钟。

[0462] 6.用以下反应条件使板在ABI7500或Light Cycler 480实时热循环仪上运行

[0463]

| QuARTS 测定反应循环: | | | | 信号采集 |
|---|---|---|---|---|
| 阶段 | 温度/时间 | 升温速率 (°C/秒) | 循环次数 | |
| 预温育 | 95°C/3 分钟 | 4.4 | 1 | 无 |
| 扩增 1 | 95°C/2 秒 | 4.4 | 5 | 无 |
| | 63°C/30 秒 | 2.2 | | 无 |
| | 70°C/30 秒 | 4.4 | | 无 |
| 扩增 2 | 95°C/20 秒 | 4.4 | 40 | 无 |

[0464]

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| | 53°C/1 分钟 | 2.2 | | 有 |
| | 70°C/30 秒 | 4.4 | | 无 |
| 冷却 | 40°C/30 秒 | 2.2 | 1 | 无 |

[0465] V.DNA的亚硫酸氢盐转化和纯化

[0466] 1.解冻来自于血浆步骤中DNA提取的所有提取的DNA样品并减速离心DNA。

[0467] 2.试剂制备:

[0468]

| 组分缩写 | 名称 | 制剂 |
|---|---|---|
| BIS SLN | 亚硫酸氢盐转化溶液 | 56.6%亚硫酸氢铵 |
| DES SLN | 去磺化溶液 | 70%异丙醇、0.1 N NaOH |
| BND BDS | 结合珠粒 | Maxwell RNA 珠粒(16 mg/mL), (Promega Corp.) |
| BND SLN | 结合溶液 | 7M 盐酸胍 |
| CNV WSH | 转换洗涤液 | 10 mM Tris-HCl、80%乙醇 |
| ELU BUF | 洗脱缓冲液 | 10mM Tris、0.1 mM EDTA，pH 8.0 |

[0469] 3.在深孔板(DWP)的每个孔中添加5μL的100ng/μL BSA DNA载体溶液。

[0470] 4.将各80μL样品添加到DWP中。

[0471] 5.向DWP中的每个孔中添加5μL新制备的1.6N NaOH。

[0472] 6.通过用设为30-40μL的移液器吹打小心地混合以避免气泡。

[0473] 7.在42℃下温育20分钟。

[0474] 8.向每个孔添加120μL的BIS SLN。

[0475] 9.在66℃下温育75分钟,同时在前3分钟内进行混合。

[0476] 10.添加750μL的BND SLN

[0477] 11.预混合二氧化硅珠粒(BND BDS)并将50μL二氧化硅珠粒(BND BDS)添加到DWP的孔中。

[0478] 12.在加热振荡器上在30℃下以1,200rpm混合30分钟。

[0479] 13.使珠粒在磁力板上聚集5分钟,然后将溶液抽吸到废弃物中。

[0480] 14.添加1mL洗涤缓冲液(CNV WSH),然后将板移至加热振荡器中并以1,200rpm混合3分钟。

[0481] 15.使珠粒在磁力板上聚集5分钟,然后将溶液抽吸到废弃物中。

[0482] 16.添加0.25mL洗涤缓冲液(CNV WSH),然后将板移至加热振荡器中并以1,200rpm

混合3分钟。

[0483] 17.使珠粒在磁力板上聚集,然后将溶液抽吸到废弃物中。

[0484] 18.添加0.2mL去磺化缓冲液(DES SLN)并在30℃下以1,200rpm混合7分钟。

[0485] 19.使珠粒在磁力板上聚集2分钟,然后将溶液抽吸到废弃物中。

[0486] 20.添加0.25mL洗涤缓冲液(CNV WSH),然后将板移至加热振荡器中并以1,200rpm混合3分钟。

[0487] 21.使珠粒在磁力板上聚集2分钟,然后将溶液抽吸到废弃物中。

[0488] 22.添加0.25mL洗涤缓冲液(CNV WSH),然后将板移至加热振荡器中并以1,200rpm混合3分钟。

[0489] 23.使珠粒在磁力板上聚集2分钟,然后将溶液抽吸到废弃物中。

[0490] 24.通过移至加热振荡器中并在70℃下温育15分钟使板干燥,同时以1,200rpm混合。

[0491] 25.在DWP中的所有样品中添加80μL洗脱缓冲液(ELU BFR)。

[0492] 26.在65℃下温育25分钟,同时以1,200rpm混合。

[0493] 27.手动将洗脱物转移至96孔板并储存在-80℃下

[0494] 28.可回收/可转移体积为约65μL。

[0495] VI.用于甲基化DNA检测和定量的QuARTS-X多重活瓣测定

[0496] A.多重PCR(mPCR)设置:

[0497] 1.制备10X引物混合物,其含有每种目标甲基化标记物的正向和反向引物,各自达到最终浓度为750nM。如以上实施例中所述,使用10mM Tris-HCl(pH 8)、0.1mM EDTA作为稀释剂。

[0498] 2.制备含有100mM MOPS(pH 7.5)、75mM MgCl2、0.08%Tween 20、0.08%IGEPAL CA-630、2.5mM dNTP的10X多重PCR缓冲液。

[0499] 3.如下制备多重PCR主混合物:

[0500]

| 组分 | 每个反应的体积 (μL) |
|---|---|
| 水 | 9.62 |
| 10X 引物混合物(各 0.75 μM) | 7.5 |
| mPCR 缓冲液 | 7.5 |
| 热启动 GoTaq(5 个单位/μl) | 0.38 |
| 总体积 | 25.0 |

[0501] 4.解冻DNA并将板减速离心。

[0502] 5.向96孔板中添加25μL主混合物。

[0503] 6.将各50μL样品添加到每个孔中。

[0504] 7.用铝箔密封件(请勿使用条形帽(strip cap))将板密封

[0505] 8.置于加热盖热循环仪中并使用以下曲线进行循环,持续约5至20个循环,优选约10至13个循环:

[0506]

| 阶段 | 温度/时间 | 循环次数 |
|---|---|---|
| 预温育 | 95℃/5 分钟 | 1 |
| 扩增 1 | 95℃/30 秒 | 12 |
| | 64℃/60 秒 | |
| 冷却 | 4℃/保持 | 1 |

[0507] 9.完成热循环后,按如下方式进行扩增子的1:10稀释:

[0508] a)将180μL的10mM Tris-HCl(pH 8)、0.1mM EDTA转移至深孔板的每个孔中。

[0509] b)向每个预填充孔中添加20μL扩增样品。

[0510] c)通过使用新的吸头和200μL移液器反复用移液器吹打来混合稀释的样品(小心不要产生气溶胶)。

[0511] d)用塑料密封件将经过稀释的板密封。

[0512] e)将经过稀释的板以1000rpm离心1分钟。

[0513] f)用新的铝箔密封件将任何剩余的尚未稀释的多重PCR产物密封。置于-80℃下。

[0514] B.多重扩增DNA的QuARTS测定:

[0515] 1.将鱼类DNA稀释剂(20ng/μL)解冻并用于稀释在测定中需要的质粒校准物(参见,例如,美国专利申请序列号15/033,803,其通过引用并入本文)。使用下表作为稀释指南:

[0516]

| 初始质粒浓度,拷贝/μL | 最终质粒浓度,拷贝/μL | 添加的质粒 μL | 添加的稀释剂 μL | 总体积,μL |
|---|---|---|---|---|
| 1.00E+05 | 1.00E+04 | 5 | 45 | 50 |
| 1.00E+04 | 1.00E+03 | 5 | 45 | 50 |
| 1.00E+03 | 1.00E+02 | 5 | 45 | 50 |
| 1.00E+02 | 1.00E+01 | 5 | 45 | 50 |

[0517] 2.使用下表针对标记物A、B和C(例如,目标标记物,加上运行对照和内部对照,诸如β-肌动蛋白或B3GALT6)制备10X三重QuARTS寡核苷酸混合物(参见,例如,美国专利申请序列号62/364,082,其通过引用并入本文)。

[0518]

| 寡核苷酸 | 序列(5'-3') | SEQ ID NO: | 浓度(μM) |
|---|---|---|---|
| 标记物A正向引物 | NA | | 2 |
| 标记物A反向引物 | NA | | 2 |
| 标记物A探针-臂1 | NA | | 5 |
| 标记物B正向引物 | NA | | 2 |
| 标记物B反向引物 | NA | | 2 |
| 标记物B探针-臂5 | NA | | 5 |
| 标记物C正向引物 | NA | | 2 |
| 标记物C反向引物 | NA | | 2 |
| 标记物C探针-臂3 | NA | | 5 |
| 臂1 HEX FRET | /HEX/ TCT/BHQ-1/AGCCGGTTTTCCGGCTGAGACCTCGGCG/3C6/ | 171 | 5 |
| 臂5 FAM FRET | /FAM/ TCT/BHQ-1/AGCCGGTTTTCCGGCTGAGACGTCCGTGG/3C6/ | 172 | 5 |
| 臂3 QUASAR-670 FRET | /Q670/TCT/BHQ-2/AGCCGGTTTTCCGGCTGAGACTCCGCGTC/3C6/ | 173 | 5 |
| dNTP混合物 | | | 250 |

[0519] 例如,以下可能用于检测经亚硫酸氢盐处理的β-肌动蛋白、B3GALT6和斑马鱼RASSF1标记物:

[0520]

| 寡核苷酸描述 | 序列(5'-3') | SEQ ID NO: | 浓度(μM) |
|---|---|---|---|
| ZF RASSF1 | TGCGTATGGTGGGCGAG | 160 | 2 |

[0521]

| | | | |
|---|---|---|---|
| BT 正向引物 | | | |
| ZF RASSF1 BT 反向引物 | CCTAATTTACACGTCAACCAATCGAA | 161 | 2 |
| ZF RASSF1 BT 探针-臂 5 | CCACGGACGGCGCGTGCGTTT/3C6/ | 162 | 5 |
| B3GALT6正向引物 | GGTTTATTTTGGTTTTTTGAGTTTTCGG | 8 | 2 |
| B3GALT6反向引物 | TCCAACCTACTATATTTACGCGAA | 9 | 2 |
| B3GALT6探针-臂 1 | CGCCGAGGGCGGATTTAGGG/3C6/ | 10 | 5 |
| BTACT 正向引物 | GTGTTTGTTTTTTTGATTAGGTGTTTAAGA | 168 | 2 |
| BTACT 反向引物 | CTTTACACCAACCTCATAACCTTATC | 169 | 2 |
| BTACT 探针-臂 3 | GACGCGGAGATAGTGTTGTGG/3C6/ | 170 | 5 |
| 臂 1 HEX FRET | /HEX/TCT/BHQ-1/AGCCGGTTTTCCGGCTGAGACCTCGGCG/3C6/ | 171 | 5 |
| 臂 5 FAM FRET | /FAM/TCT/BHQ-1/AGCCGGTTTTCCGGCTGAGACGTCCGTGG/3C6/ | 172 | 5 |
| 臂 3 QUASAR-670 FRET | /Q670/TCT/BHQ-2/AGCCGGTTTTCCGGCTGAGACTCCGCGTC/3C6/ | 173 | 5 |
| dNTP 混合物 | | | 2500 |

[0522] 3.使用下表制备QuARTS活瓣测定主混合物:

[0523]

| 组分 | 每个反应的体积(μL) |
|---|---|
| 水 | 15.5 |
| 10X三重寡核苷酸混合物 | 3.0 |
| 20X QuARTS酶混合物 | 1.5 |
| 总体积 | 20.0 |

[0524] *20X酶混合物含有1单位/μL的GoTaq热启动聚合酶(Promega)、292ng/μL的Cleavase 2.0活瓣核酸内切酶(Hologic)。

[0525] 4.使用96孔ABI板,用移液器向每个孔中移入20μL的QuARTS主混合物。

[0526] 5.添加10μL适当的校准物或稀释的mPCR样品。

[0527] 6.用ABI透明塑料密封件将板密封。

[0528] 7.使用3000rpm将板离心1分钟。

[0529] 8.将板置于编程为运行以下热方案的ABI热循环仪中,然后启动仪器

[0530]

| QuARTS 反应循环: | | | | 信号采集 |
|---|---|---|---|---|
| 阶段 | 温度/时间 | 升温速率 (°C/秒) | 循环次数 | |
| 预温育 | 95°C/3 分钟 | 4.4 | 1 | 无 |
| 扩增 1 | 95°C/2 秒 | 4.4 | 5 | 无 |
| | 63°C/30 秒 | 2.2 | | 无 |
| | 70°C/30 秒 | 4.4 | | 无 |
| 扩增 2 | 95°C/20 秒 | 4.4 | 40 | 无 |
| | 53°C/1 分钟 | 2.2 | | 有 |
| | 70°C/30 秒 | 4.4 | | 无 |
| 冷却 | 40°C/30 秒 | 2.2 | 1 | 无 |

[0531] 例如,如上所述的那样在QuARTS PCR-活瓣测定中使用稀释的预扩增DNA的等分试样(例如,10μL)。还请参见2015年10月30日提交的美国专利申请序列号62/249,097;2016年10月26日提交的美国专利申请序列号15/335,096,和2016年10月26日提交的美国专利申请序列号PCT/US16/58875,其中每一个通过引用整体并入本文用于所有目的。

[0532] 实施例2

[0533] 用于血浆中的结直肠癌检测的甲基化标记物的选择和测试

[0534] 在来自于19名结肠癌患者、19名息肉患者、19名健康患者的组织上和19名健康患者血沉棕黄层提取的DNA上获得简化代表性亚硫酸氢盐测序(RRBS)数据。

[0535] 与人类基因组序列的经计算机模拟的亚硫酸氢盐转化型式比对之后,针对每种样品类型(即,组织或血沉棕黄层)计算每个CpG岛处的平均甲基化,并且基于以下标准选择标记区域:

[0536] • 选择区域为50个碱基对或更长。

[0537] • 对于QuARTS活瓣测定设计,所选择的区域在以下的每个区域下具有最少1个甲基化CpG:a)探针区域,b)正向引物结合区域,和c)反向引物结合区域。对于正向和反向引物,优选甲基化CpG接近引物的3'末端,但不是在3'末端核苷酸处。示例性的活瓣核酸内切酶测定寡核苷酸示于图1中。

[0538] • 优选地,在目标区域中的任何CpG处的血沉棕黄层甲基化不超过>0.5%。

[0539] • 优选地,目标区域中的癌组织甲基化>10%。

[0540] • 对于设计用于组织分析的测定,目标区域中的正常组织甲基化优选<0.5%。

[0541] 基于上述标准,选择标记物ANKRD13B;CHST2;CNNM1;GRIN2D;JAM3;LRRC4;OPLAH;SEP9;SFMBT2;SLC12A8;TBX15;ZDHHC1;ZNF304;ZNF568;ZNF671;DOCK2;DTX1;FERMT3;OPLAH;PDGFD;PKIA;PPP2R5C;TBX15;TSPYL5;VAV3;和ZNF671并针对它们设计QuARTS活瓣测定,如图1所示。

[0542] 从组织筛查结果中选择的27种标记物经针对经亚硫酸氢盐转化的β-肌动蛋白的测定三重化,并用于测试如上所述从血浆样品中分离的DNA。根据制造商方案(Luminex Corp.),使用Luminex Magplex测定来测量血浆中的CEA蛋白质。提取来自2mL血浆样品(89个癌症和95个正常)的DNA并在125μL中洗脱。在QuARTS测定中使用所提取DNA的10μL等分试样检测β-肌动蛋白和斑马鱼合成靶标。如实施例1中所述的那样对所述DNA的80μL等分试样

进行亚硫酸氢盐转化,并在70μL中洗脱。

[0543] 如实施例1中所述的那样,使用针对图1中所示靶标的正向和反向引物,对经亚硫酸氢盐转化的DNA样品的50μL等分试样执行多重PCR反应,并且使用QuARTS活瓣测定来检测标记物。

[0544] 基于各种标记物灵敏度,选择以下12种甲基化标记物用于进一步分析:VAV3、ZNF671、CHST2、FLI1、JAM3、SFMBT2、PDGFD、DTX1、TSPYL5、ZNF568、GRIN2D、QKI

[0545] 所有12种标记物一起使用如图1中针对这些标记物所示的引物进行预扩增。使用图1中所示的引物和探针,如实施例1所述的那样在多重QuARTS测定中分析预扩增的材料。多重测定分组如下:

[0546]

| |
|---|
| *CHST2*<br>*FLI1*<br>*BTACT* |
| *VAV3*<br>*ZNF671*<br>*BTACT* |
| *TSPYL5*<br>*ZNF568*<br>*BTACT* |
| *JAM3*<br>*SFMBT2*<br>*BTACT* |
| *PDGFD*<br>*DTX1*<br>*BTACT* |
| *GRIN2D*<br>*QKI*<br>*BTACT* |
| *ZFRASSF1*<br>*B3GALT6*<br>*BTACT* |

[0547] 除上述之外,如上所述的那样,针对同一样品测量CEA蛋白。数据和结果示于图3和4中。各种标记物在90%特异性下的灵敏度如下:

[0548]

| 标记物 | 在90%特异性下的灵敏度 |
|---|---|
| ZNF671 | 49% |
| TSPYL5 | 46% |
| QKI | 41% |
| JAM3 | 40% |
| DTX1 | 40% |
| GRIN2D | 38% |

| | |
|---|---|
| ZNF568 | 37％ |
| CEA蛋白 | 36％ |
| FLI1 | 36％ |
| SFMBT2 | 35％ |
| PDGFD | 35％ |
| CHST2 | 33％ |
| VAV3 | 31％ |

[0549] 在各种标记物的95％单独截止值下,使用组合数据集获得以下最终灵敏度。

[0550]

| 癌症分期 | 阴性 | 阳性 | 样品总数 | | 灵敏度 |
|---|---|---|---|---|---|
| I | 14 | 7 | 21 | | 33％ |
| II | 7 | 18 | 25 | | 72％ |
| III | 7 | 17 | 24 | | 71％ |
| IV | 1 | 18 | 19 | | 95％ |
| 总计 | | 60 | 89 | | 67％ |

[0551] 该测定的组合特异性为(88/95＝92.6％)。

[0552] 因此,这12种标记物加上CEA蛋白的组合,对所有经测试的癌组织有67％的灵敏度(95种癌症中的88种),特异性为92.6％。在组织上测定的这组甲基化DNA标记物对所有类型的结肠癌实现极高鉴别性,同时在正常结肠组织中保持阴性。对这组标记物的测定也可应用于基于血液或体液的测试,并可应用于,例如,结肠癌筛查。

[0553] 向一种染料报告的多个靶序列

[0554] 以下实验涉及扩增活瓣切割测定,其被配置为使多个靶特异性初级切割反应向单个FRET盒报告,从而在单个染料通道中产生荧光信号。待检测的不同靶标可以是,例如,不同标记物或基因、不同突变,或单一标记物或基因的不同区域。实施例3涉及使用单个FRET盒和染料通道检测与癌症例如结直肠癌相关的多种不同标记物的甲基化,并且实施例4涉及使用单个FRET盒和染料通道检测单一标记物内的多个区域。

[0555] 以下实验中使用的试剂:

[0556]

| 试剂 | 序列(5'-3') |
|---|---|
| VAV3_877 正向引物 | TCGGAGTCGAGTTTAGCGC (SEQ ID NO: 108) |
| VAV3_877 反向引物 v2 | CGAAATCGAAAAAACAAAAACCGC (SEQ ID NO:109) |
| VAV3_877 探针(臂 5) | CCACGGACGCGGCGTTCGCGA/3C6/ (SEQ ID NO: 146) |
| VAV3_11878 正向引物 | GAGTCGAGTTTTAGGTTATTCGGT (SEQ ID NO: 150) |
| VAV3_11878 反向引物 | CGTCGAACATAAAACCGTAAAAACAA (SEQ ID NO: 151) |
| VAV3_11878 探针(臂 5) | CCACGGACGATACGCGCAATA/3C6/ (SEQ ID NO: 152) |
| SFMBT2_897 正向引物 v5 | GTCGTCGTTCGAGAGGGTA (SEQ ID NO: 88) |
| SFMBT2_897 正向引物 v4 | GAACAAAAACGAACGAACGAACA (SEQ ID NO: 89) |
| SFMBT2_897 探针(臂 5)v5 | CCACGGACGATCGGTTTCGTT/3C6/ (SEQ ID NO: 90) |
| SFMBT2_897 探针(臂 1) | CGCCGAGGATCGGTTTCGTT/3C6/ (SEQ ID NO: 141) |
| SFMBT2_895 正向引物 | GCGACGTAGTCGTCGTTGT (SEQ ID NO: 144) |
| SFMBT2_895 反向引物 | CCAACGCGAAAAAAACGCG (SEQ ID NO:145) |
| SFMBT2_895 探针(臂 1) | CGCCGAGGGAAAACGCGAAA/3C6/ (SEQ ID NO: 146) |
| CHST2_7890 正向引物 | GTATAGCGCGATTTCGTAGCG (SEQ ID NO: 13) |
| CHST2_7890 反向引物 | AATTACCTACGCTATCCGCCC (SEQ ID NO: 14) |
| CHST2_7890 探针(臂 5) | CCACGGACGCGAACATCCTCC/3C6/ (SEQ ID NO: 15) |
| CHST2_7890 探针(臂 1) | CGCCGAGGCGAACATCCTCC/3C6/ (SEQ ID NO: 175) |
| CHST2_7889 正向引物 | CGAGTTCGGTAGTTGTACGTAGA (SEQ ID NO: 138) |
| CHST2_7889 反向引物 | CGAAATACGAACGCGAAATCTAAAACT (SEQ ID NO: 139) |

| | |
|---|---|
| CHST2_7889 探针(臂 5) | CCACGGACGTCGTCGATACCG/3C6/ (SEQ ID NO: 140) |
| CHST2_7889 探针(臂 1) | CGCCGAGG-TCGTCGATACCG/3C6/ (SEQ ID NO: 176) |
| BTACT_FP65 正向引物 | GTGTTTGTTTTTTTGATTAGGTGTTTAAGA SEQ ID NO:139 |
| BTACT_RP65 反向引物 | CTTTACACCAACCTCATAACCTTATC SEQ ID NO:140 |
| BTACT 探针 A3 | GACGCGGAGATAGTGTTGTGG/3C6/ SEQ ID NO:141 |
| 臂 1 FRET 盒 HEX | SEQ ID NO:170 |
| 臂 5 FRET 盒 FAM | SEQ ID NO:171 |
| 臂 1 FRET 盒 QUASAR-670 | SEQ ID NO:174 |
| 臂 3 FRET 盒 QUASAR-670 | SEQ ID NO:173 |
| | |
| 经 ECOR1 消化的含有 SFMBT2_897 插入物的 pUC57 质粒(Genscript) | |
| 经 ECOR1 消化的含有 CHST2_7890 插入物的 pUC57 质粒(Genscript) | |
| 经 ECOR1 消化的含有 VAV3 插入物的 pUC57 质粒(Genscript) | |
| 经 ECOR1 消化的含有 BTACT 插入物的 pUC57 质粒(Genscript) | |
| 从 1e+04 个拷贝/μL 连续稀释的 VAV3/BTACT 双重质粒 | |
| 从 1e+04 个拷贝/μL 连续稀释的 SFMBT2_897/BTACT 双重质粒 | |
| 从 1e+04 个拷贝/μL 连续稀释的 CHST2_7890/BTACT 双重质粒 | |
| [0557] SFMBT2_897/VAV3/BTACT 双重质粒，1e+04 个拷贝/μL | |
| CHST2_7890/VAV3/BTACT 双重质粒，1e+04 个拷贝/μL | |
| CHST2_7890/SFMBT2_897/BTACT 双重质粒，1e+04 个拷贝/μL | |
| VAV3/CHST2_7890/SFMBT2_897/BTACT 三重质粒，1e+04 个拷贝/μL | |
| CHST2_7889+7890 校准曲线稀释集(1e4-1e0 个拷贝/ul) | |
| SFMBT2_895+897 校准曲线稀释集(1e4-1e0 个拷贝/ul) | |
| VAV3_877+11878 校准曲线稀释集(1e4-1e0 个拷贝/ul) | |
| VAV3/BTACT 10X 寡核苷酸混合物 | |
| SFMBT2_897/BTACT 10X 寡核苷酸混合物 | |
| CHST2_7890/BTACT 10X 寡核苷酸混合物 | |
| VAV3/SFMBT2_897/CHST2_7890/BTACT 10X 寡核苷酸混合物 | |
| VAV3/SFMBT2_897 (100 nM 正向引物)/CHST2_7890/BTACT 10X 寡核苷酸混合物 | |
| VAV3/SFMBT2_897 (50 nM 正向引物)/CHST2_7890/BTACT 10X 寡核苷酸混合物 | |
| VAV3/SFMBT2_897 (200 nM 探针)/CHST2_7890/BTACT 10X 寡核苷酸混合物 | |
| VAV3/SFMBT2_897 (250 nM 探针)/CHST2_7890/BTACT 10X 寡核苷酸混合物 | |
| VAV3/SFMBT2_897 (100 nM 探针)/CHST2_7890/BTACT 10X 寡核苷酸混合物 | |
| VAV3 (400 nM 引物)/SFMBT2_897 (200 nM 探针)/CHST2_7890/BTACT 10X | |

[0558]

| |
|---|
| 寡核苷酸混合物 |
| VAV3 (750 nM 探针)/SFMBT2_897 (200 nM 探针)/CHST2_7890/BTACT 10X 寡核苷酸混合物 |
| 20X 酶混合物，1U/μL Go Taq 热启动聚合酶(Promega)、292 ng/μL Cleavase 2.0 (Hologic) |
| fDNA 稀释剂，20 ng/μL 的在 10 mM Tris、0.1 mM EDTA 中的鱼类 DNA |
| fDNA 稀释剂，20 ng/μL 的在 10 mM Tris、0.1 mM EDTA 中的鱼类 DNA |
| 分子生物级水 |
| dNTP，25mM (每种 dNTP) |

[0559] 实施例3

[0560] 向一种染料报告的多种标记物

[0561] 如上所讨论,在一些实施方案中,期望在单个反应中使用单个FRET盒和单个染料通道,具有更多数量的标记物。在开发用于检测向单个FRET盒和单一染料报告的多种标记物的测试中,选择具有相似反应效率(即,每个靶标拷贝产生相同量的可检测信号)的标记物,以组合在向单个染料通道报告的多重反应中。组合具有相同或相似反应效率的检测测定的优点在于,用于其中一种测定的任何单个校准物都可用作任何和所有效率匹配的检测测定的校准标准。

[0562] 选择三种标记物用于在多种标记物/一种染料的系统(SFMBT2、VAV3和CHST2)中进行测试。将这些靶DNA混合在寡核苷酸混合物中,其中所有三种标记物的测定寡核苷酸都被配置为向同一FRET盒报告并因此向同一染料(FAM)报告。将向FAM染料报告的三种疾病相关标记物与用于检测作为对照的经亚硫酸氢盐转化的β-肌动蛋白DNA(使用QUASAR 670FRET盒)一起组合在同一反应中。

[0563] 当对质粒校准物进行测试时,数据显示使用向单一染料报告的多种标记物是一种高效的途径,其克服了使标记物在单独的孔中运行的需要。

[0564] 实施例3.1

[0565] 对于在向单个FRET盒报告的多重反应中运行的多种不同标记物的QuARTS活瓣核酸内切酶测定,首先分析每种单独标记物的反应效率,以便当以多重配置组合时可以使反应平衡。运行测定以确定选择的三种标记物(VAV3、SFMBT2_897和CHST2_7890)的测定性能,所选择的三种标记物向一种染料(FAM)报告,与经亚硫酸氢盐转化的β-肌动蛋白(BTACT)双重化,并被配置为产生向Quasar 670通道报告的信号。

[0566] 该测定还被配置用于确定当三种标记物向同一通道(FAM)报告时每种标记物是否会表现出类似的QuARTS测定性能(斜率/截距/Cp)。

[0567] 制备寡核苷酸混合物,其包含用于检测向FAM FRET盒报告的全部三种甲基化标记物的试剂。寡核苷酸混合物包含用于检测作为对照的向Quasar 670报告的BTACT试剂。针对含有包含标记物靶DNA和BTACT DNA的各种质粒的质粒靶标来对该寡核苷酸混合物进行测试。进行计算以了解是否可以使用一种标记物的校准曲线来准确地定量其他标记物。所有反应均重复进行4次。

[0568] 方案:

[0569] 如下,在20ng/μL的在10mM Tris,0.1mM EDTA中的鱼类DNA的稀释剂中制备包含一

种标记物质粒和一种BTACT对照质粒的原液质粒稀释液(参见上文试剂表)：

[0570]

| **SFMBT2_897/BTACT 质粒混合物** | **原液中的拷贝数，/μL** | **最终混合物中的拷贝数/μL** | **添加的体积 μL** |
|---|---|---|---|
| SFMBT2_897 质粒 | 1.00E+05 | 1.00E+04 | 50 |
| BTACT 质粒 | 1.00E+05 | 1.00E+04 | 50 |
| 鱼类 DNA 稀释剂 | NA | NA | 400 |
| 总体积 | NA | NA | 500 |

[0571]

| **CHST2_7890/BTACT 质粒混合物** | Ci，cp/μL | Cf，cp/μL | 添加的体积 μL |
|---|---|---|---|
| CHST2_7890 质粒 | 1.00E+05 | 1.00E+04 | 50 |
| BTACT 质粒 | 1.00E+05 | 1.00E+04 | 50 |
| fDNA 稀释剂 | NA | NA | 400 |
| 总体积 | NA | NA | 500 |

[0572]

| VAV3/BTACT质粒混合物 | Ci,cp/μL | Cf,cp/μL | 添加的体积μL |
|---|---|---|---|
| VAV3质粒 | 1.00E+05 | 1.00E+04 | 50 |
| BTACT质粒 | 1.00E+05 | 1.00E+04 | 50 |
| fDNA稀释剂 | NA | NA | 400 |
| 总体积 | NA | NA | 500 |

[0573] 由上面制备的3种质粒混合物,制备以下稀释液：

[0574]

| Cf,cp/μL | Ci,cp/μL | df | 添加的Ci,μL | 稀释剂,μL | 总体积 |
|---|---|---|---|---|---|
| 1.00E+05 | 1.00E+04 | 10 | 50 | 450 | 500 |
| 1.00E+04 | 1.00E+03 | 10 | 50 | 450 | 500 |
| 1.00E+03 | 1.00E+02 | 10 | 50 | 450 | 500 |
| 1.00E+02 | 1.00E+01 | 10 | 50 | 450 | 500 |
| 1.00E+01 | 1.00E+00 | 10 | 50 | 450 | 500 |

[0575] 如下制备包含测定寡核苷酸(引物、探针、FRET盒)和dNTP的10X寡核苷酸混合物：

[0576]

| 标记物 | 试剂 | 最终反应浓度(μM) | 10X 寡核苷酸混合物浓度(μM) |
|---|---|---|---|
| VAV3 | VAV3 正向引物 | 0.2 | 2 |
| VAV3 | VAV3 反向引物 v2 | 0.2 | 2 |
| VAV3 | VAV3 探针 A5 | 0.5 | 5 |
| SFMBT2_897 | SFMBT2_897 正向引物 v5 | 0.2 | 2 |
| SFMBT2_897 | SFMBT2_897 正向引物 v4 | 0.2 | 2 |
| SFMBT2_897 | SFMBT2_897 探针 A5 v5 | 0.5 | 5 |
| CHST2_7890 | CHST2_7890 正向引物 | 0.2 | 2 |
| CHST2_7890 | CHST2_7890 反向引物 | 0.2 | 2 |
| CHST2_7890 | CHST2_7890 探针 A5 | 0.5 | 5 |
| | 臂 5 FAM FRET 盒 | 0.5 | 5 |
| BTACT | ACTB_BT_FP65 正向引物 | 0.2 | 2 |
| BTACT | ACTB_BT_RP65 反向引物 | 0.2 | 2 |
| BTACT | ACTB BT 探针 A3 | 0.5 | 5 |
| | 臂 3 QUASAR FRET 盒 | 0.5 | 5 |
| | dNTP(每种 dNTP) | 250 | 2500 |

[0577] QuARTS活瓣核酸内切酶测定反应设置:

[0578] 如下制备用于QuARTS扩增反应的主混合物:

[0579] 主混合物制剂:96孔板-

[0580]

| 试剂 | 每次反应添加的原料体积 μL | 38 个反应的体积 μL |
|---|---|---|
| ddH2O | 15.50 | 589 |
| 10X 寡核苷酸混合物 | 3.00 | 114 |
| 20X 酶混合物 | 1.50 | 57 |
| **主混合物总体积** | **20.0** | 760 |
| 每孔使用 20ul 主混合物，并向 96 孔板添加 10ul 样品=最终反应体积 30μl | | |
| 样品* | 10 | **20.0** |

[0581] 反应设置如下:

[0582] 使用多通道移液器将20μl主混合物移到96孔QuARTS板中添加10μl样品

[0583] 将板密封并以3000rpm离心1分钟。

[0584] 使用以下条件使板在LightCycler480上运行,在FAM、HEX和Quasar 670通道:465-510、533-580和618-660nM上检测

[0585]

| QuARTS 测定反应循环: | | | | 信号采集 |
|---|---|---|---|---|
| 阶段 | 温度/时间 | 升温速率 (°C/秒) | 循环次数 | |
| 预温育 | 95°C/3 分钟 | 4.4 | 1 | 无 |
| 扩增 1 | 95°C/20 秒 | 4.4 | 5 | 无 |
| | 63°C/30 秒 | 2.2 | | 无 |
| | 70°C/30 秒 | 4.4 | | 无 |
| 扩增 2 | 95°C/20 秒 | 4.4 | 40 | 无 |
| | 53°C/1 分钟 | 2.2 | | 有 |
| | 70°C/30 秒 | 4.4 | | 无 |
| 冷却 | 40°C/30 秒 | 2.2 | 1 | 无 |

[0586] 结果：

[0587] 使用VAV3/BTACT质粒校准物标准曲线进行链数计数：

| VAV3/BTACT 质粒校准物标准曲线 | |
|---|---|
| 斜率 | -3.147684 |
| 截距 | 32.08568 |
| 效率 | 107.8% |

| VAV3/BTACT 质粒校准物 | | |
|---|---|---|
| 校准物链数/反应 | 平均 Cp | 计算的平均链数 |
| 200000 | 15.36 | 205,254 |
| 20000 | 18.66 | 18,432 |
| 2000 | 21.58 | 2,178 |
| 200 | 24.88 | 194 |

[0588]

| SFMBT2_897/BTACT 质粒校准物 | | |
|---|---|---|
| 校准物链数/反应 | 平均 Cp | 计算的平均链数 |
| 200000 | 13.87 | 612,036 |
| 20000 | 17.17 | 54,780 |
| 2000 | 19.64 | 9,021 |
| 200 | 22.12 | 1,470 |

| CHST2_7890/BTACT 质粒校准物 | | |
|---|---|---|
| 校准物链数/反应 | 平均 Cp | 计算的平均链数 |
| 200000 | 15.17 | 235,836 |
| 20000 | 18.05 | 28,813 |
| 2000 | 20.39 | 5,200 |
| 200 | 23.03 | 752 |

[0589] 使用SFMBT2_897/BTACT质粒校准物标准曲线进行链数计数：

| SFMBT2_897/BTACT 质粒校准物标准曲线 | |
|---|---|
| 斜率 | -2.720157 |
| 截距 | 28.53753 |
| 效率 | 133.1% |

[0590]

| VAV3/BTACT 质粒校准物 | | |
|---|---|---|
| 校准物链数/反应 | 平均 Cp | 计算的平均链数 |
| 200000 | 15.36 | 69,636 |
| 20000 | 18.66 | 4,282 |
| 2000 | 21.58 | 362 |
| 200 | 24.88 | 22 |

| SFMBT2_897/BTACT 质粒校准物 | | |
|---|---|---|
| 校准物链数/反应 | 平均 Cp | 计算的平均链数 |
| 200000 | 13.87 | 246,543 |
| 20000 | 17.17 | 15,101 |
| 2000 | 19.64 | 1,873 |
| 200 | 22.12 | 229 |

[0591]

| CHST2_7890/BTACT 质粒校准物 | | |
|---|---|---|
| 校准物链数/反应 | 平均 Cp | 计算的平均链数 |
| 200000 | 15.17 | 81,777 |
| 20000 | 18.05 | 7,180 |
| 2000 | 20.39 | 990 |
| 200 | 23.03 | 106 |

[0592] 使用CHST2_7890//BTACT质粒校准物标准曲线进行链数计数：

| CHST2_7890/BTACT 质粒校准物标准曲线 | |
|---|---|
| 斜率 | -2.59121 |
| 截距 | 29.01007 |
| 效率 | 143.2% |

| VAV3/BTACT 质粒校准物 | | |
|---|---|---|
| 校准物链数/反应 | 平均 Cp | 计算的平均链数 |
| 200000 | 15.36 | 184,582 |
| 20000 | 18.66 | 9,878 |
| 2000 | 21.58 | 738 |
| 200 | 24.88 | 39 |

| SFMBT2_897/BTACT 质粒校准物 | | |
|---|---|---|
| 校准物链数/反应 | 平均 Cp | 计算的平均链数 |
| 200000 | 13.87 | 695,942 |
| 20000 | 17.17 | 37,096 |
| 2000 | 19.64 | 4,147 |
| 200 | 22.12 | 458 |

| CHST2_7890/BTACT 质粒校准物 | | |
|---|---|---|
| 校准物链数/反应 | 平均 Cp | 计算的平均链数 |
| 200000 | 15.17 | 218,505 |
| 20000 | 18.05 | 16,997 |
| 2000 | 20.39 | 2,123 |
| 200 | 23.03 | 203 |

[0593] 这些数据显示:

[0594] • 当标记和对照一起扩增和检测时,没有产生交叉反应性信号或背景信号;

[0595] • CHST2_7890和VAV3的Cp值相似;

[0596] • SFMBT2_897的Cp值出现在比CHST2_7890和VAV3更早的循环中,表明这是更快的QuARTS测定反应;

[0597] • 由于SFMBT2_897反应更快,SFMBT2_897校准物和寡核苷酸混合物组合低估了VAV3和CHST2_7890的链数计数。

[0598] • CHST2_7890校准物提供了指示测定性能与CHST2_7890测定反应相当的VAV3计算结果,但过高估计了SFMBT2_897的量;

[0599] • VAV3校准物提供了指示测定性能与VAV3测定反应相当的CHST2_7890计算结果,但产生了SFMBT2_897量的过高估计;并且

[0600] • 为了使反应平衡,需要降低检测SFMBT2_897的QuARTS测定性能以与SFMBT2_897和CHST2_7890靶标的性能匹配。

[0601] 实验3.2

[0602] 以上数据显示SFMBT2_897测定反应产生更高的信号,表明反应更快。为了使这些标记物多重化,应对SFMBT2_897测定进行改进以与较慢测定的效率匹配(即,与VAV3和CHST2_7890测定的信号输出匹配)。以下实验测试了改变SFMBT2_897的正向引物的浓度是

否会实现这一点。

[0603] 方案：

[0604] 如以上实验3.1中所述的那样进行测定。组装10X寡核苷酸混合物,其包含以上所列的组分,但具有减少的用于产生200nM(如实验3.1中)、100nM或50nM的最终测定浓度的量的SFMBT2_897正向引物。在最终反应混合物中所有其他测定引物的浓度均为200nM,并且Light Cycler方案如实验3.1中所述。

[0605] 结果显示,降低SFMBT2_897正向引物浓度似乎对反映PCR效率的信号曲线的斜率或截距没有影响(数据未示出)。另外,Cp值没有变化,因此针对SFMBT2_897计算出的链数与所计算出的其他标记物靶标的链数不匹配。

[0606] 实验3.3：

[0607] 以下实验测试了改变SFMBT2_897探针的浓度是否会降低SFMBT2_897测定的效率,以匹配CHST2_7890和VAV3扩增反应的信号输出。

[0608] 如上文实验3.1中所述的那样进行测定。组装10X寡核苷酸混合物,其包含以上所列的组分,但具有用于产生250nM或100nM的最终测定浓度的量的SFMBT2_897探针寡核苷酸,而CHST2_7890和VAV3探针以500nM存在(如实验3.1中所述)。Light Cycler方案如实验3.1所述。

[0609] 结果：

[0610] 使用VAV3/BTACT质粒校准物标准曲线进行链数计数：

| VAV3/BTACT 质粒校准物标准曲线 | |
|---|---|
| 斜率 | -3.12175 |
| 截距 | 31.55241 |
| 效率 | 109.1% |

[0611]

| VAV3/BTACT 质粒校准物 | | |
|---|---|---|
| 校准物链数/反应 | 平均 Cp | 平均链数 |
| 200000 | 14.95 | 207,537 |
| 20000 | 18.24 | 18,377 |
| 2000 | 21.17 | 2,120 |
| 200 | 24.38 | 198 |

| SFMBT2_897/BTACT 质粒校准物 | | |
|---|---|---|
| 校准物链数/反应 | 平均 Cp | 平均链数 |
| 200000 | 15.30 | 161,043 |
| 20000 | 18.50 | 15,172 |
| 2000 | 21.20 | 2,065 |
| 200 | 24.01 | 260 |

| CHST2_7890/BTACT 质粒校准物 |
|---|

[0612]

| 校准物链数/反应 | 平均 Cp | 平均链数 |
|---|---|---|
| 200000 | 14.83 | 226,551 |
| 20000 | 18.08 | 20,670 |
| 2000 | 21.05 | 2,318 |
| 200 | 24.30 | 210 |

[0613] 使用SFMBT2_897/BTACT质粒校准物标准曲线进行链数计数：

| SFMBT2_897/BTACT 质粒校准物标准曲线 | |
|---|---|
| 斜率 | -2.885069564 |
| 截距 | 30.72006211 |
| 效率 | 122.1% |

| VAV3/BTACT 质粒校准物 | | |
|---|---|---|
| 校准物链数/反应 | 平均 Cp | 平均链数 |
| 200000 | 14.95 | 291,595 |
| 20000 | 18.24 | 21,164 |
| 2000 | 21.17 | 2,045 |
| 200 | 24.38 | 157 |

[0614]

| SFMBT2_897/BTACT 质粒校准物 | | |
|---|---|---|
| 校准物链数/反应 | 平均 Cp | 平均链数 |
| 200000 | 15.30 | 221,611 |
| 20000 | 18.50 | 17,200 |
| 2000 | 21.20 | 1,988 |
| 200 | 24.01 | 211 |

| CHST2_7890/BTACT 质粒校准物 | | |
|---|---|---|
| 校准物链数/反应 | 平均 Cp | 平均链数 |
| 200000 | 14.83 | 320,609 |
| 20000 | 18.08 | 24,036 |
| 2000 | 21.05 | 2,252 |
| 200 | 24.30 | 168 |

[0615] 使用CHST2_7890/BTACT质粒校准物标准曲线进行链数计数：

| CHST2_7890/BTACT 质粒校准物标准曲线 | |
|---|---|
| 斜率 | -3.136297934 |
| 截距 | 31.48713495 |
| 效率 | 108.4% |

[0616]

| VAV3/BTACT 质粒校准物 | | |
|---|---|---|
| 校准物链数/反应 | 平均 Cp | 平均链数 |
| 200000 | 14.95 | 186,901 |
| 20000 | 18.24 | 16,737 |

| | | |
|---|---|---|
| 2000 | 21.17 | 1,950 |
| 200 | 24.38 | 184 |

[0617]

| SFMBT2_897/BTACT 质粒校准物 | | |
|---|---|---|
| 校准物链数/反应 | 平均 Cp | 平均链数 |
| 200000 | 15.30 | 145,201 |
| 20000 | 18.50 | 13,830 |
| 2000 | 21.20 | 1,900 |
| 200 | 24.01 | 242 |

| CHST2_7890/BTACT 质粒校准物 | | |
|---|---|---|
| 校准物链数/反应 | 平均 Cp | 平均链数 |
| 200000 | 14.83 | 203,942 |
| 20000 | 18.08 | 18,815 |
| 2000 | 21.05 | 2,131 |
| 200 | 24.30 | 196 |

[0618] 结果：

[0619] 这些数据表明,将探针浓度调低导致截距略有增加且PCR%效率略有增加。Cp值也增加,因此对链数计数的计算得出的值与使用其他标记物作为校准标准计算出的结果相似。

[0620] 250nM的SFMBT2_897探针浓度使得三种标记物产生类似的链数计数计算值,其中SFMBT2_897链数计数值略高于其他标记物。50nM浓度的探针产生的计算结果略微低估了链数计数,但该探针得到了一些改善。因此,选择200nM的SFMBT2_897探针浓度用于进一步测试。

[0621] 实验3.4：

[0622] 该实验针对提供200nM SFMBT2_897探针和500nM其他探针的10X寡核苷酸混合物测试了实验3.1中描述的标准条件(所有标记物探针均以500nM使用)。该实验还将确定在单一反应中有多个靶标是否存在加和效应,所述靶标全部使用同一种FRET盒和染料报告信号。使用质粒靶标的单一、双重和三重组合,所有靶标组合都包括作为对照的BTACT靶标。

[0623] 一种标记物加上对照的质粒稀释液：

[0624] 对于利用单一标记物质粒加上BTACT对照质粒的反应,制备这样的混合物,其在20ng/μL的在10mM Tris、0.1mM EDTA中的鱼类DNA的稀释剂中含有1.00E+04个拷贝/μL的每种质粒。实验3.1中的试剂表中描述了标记物质粒。质粒混合物中的靶标如下：

[0625] -SFMBT2_897/BTACT

[0626] -CHST2_7890/BTACT

[0627] -VAV3/BTACT

[0628] 两种标记物加上对照的质粒稀释液：

[0629] 对于利用两种标记物质粒加上BTACT对照质粒的反应,制备这样的混合物,其在20ng/μL的在10mM Tris、0.1mM EDTA中的鱼类DNA的稀释剂中含有1.00E+04个拷贝/μL的每种质粒。质粒混合物中的靶标如下：

[0630] -SFMBT2_897/VAV3/BTACT

[0631] -CHST2_7890/VAV3/BTACT

[0632] -CHST2_7890/SFMBT2_897/BTACT

[0633] 三种标记物加上对照的质粒稀释液：

[0634] 对于利用三种标记物质粒加上BTACT对照质粒的反应,制备这样的混合物,其在20ng/μL的在10mM Tris、0.1mM EDTA中的鱼类DNA的稀释剂中含有1.00E+04个拷贝/μL的每种质粒。质粒混合物如下：

[0635] -VAV3/CHST2_7890/SFMBT2_897/BTACT

[0636] 使用每种质粒混合物制备在鱼类DNA稀释剂中具有1.00E+03个拷贝/μL和1.00E+02个拷贝/μL的每种质粒的溶液。

[0637] 10X寡核苷酸混合物,其含有针对所有3种标记物和BTACT对照质粒的引物和探针,并且具有用于在每个QuARTS测定反应中产生500nM探针的探针浓度,SFMBT2_897探针除外,其以用于在每个反应中提供200nM SFMBT2_897探针浓度的量提供。将QuARTS测定组分混合,并如实验3.1中所述的那样在光循环仪上进行测定。

[0638] 结果：

[0639] 使用VAV3/BTACT质粒校准物标准曲线进行链数计数：

[0640]

| VAV3/BTACT 质粒校准物标准曲线 | |
|---|---|
| 斜率 | -3.164 |
| 截距 | 31.977 |
| 效率% | 107% |

[0641] 针对单一标记物加上对照质粒的链数计数：

| VAV3/BTACT 质粒校准物 | | |
|---|---|---|
| 校准物链数/反应 | 平均 Cp | 平均链数 |
| 200000 | 15.23 | 195,918 |
| 20000 | 18.39 | 19,763 |
| 2000 | 21.42 | 2,179 |
| 200 | 24.77 | 190 |

[0642]

| SFMBT2_897/BTACT 质粒校准物 | | |
|---|---|---|
| 校准物链数/反应 | 平均 Cp | 平均链数 |
| 200000 | 15.08 | 219,449 |
| 20000 | 18.00 | 26,151 |
| 2000 | 20.51 | 4,223 |
| 200 | 23.27 | 564 |

| CHST2_7890/BTACT 质粒校准物 | | |
|---|---|---|
| 校准物链数/反应 | 平均 Cp | 平均链数 |
| 200000 | 15.05 | 224,915 |
| 20000 | 17.89 | 28,288 |
| 2000 | 20.41 | 4,532 |
| 200 | 23.02 | 680 |

[0643] 针对两种标记物加上对照质粒的链数计数：

[0644]

| VAV3/CHST2_7890/BTACT 质粒校准物 | | |
|---|---|---|
| 校准物链数/反应 | 平均 Cp | 平均链数 |
| 200000 | 14.19 | 417,946 |
| 20000 | 17.33 | 42,756 |
| 2000 | 20.09 | 5,716 |
| 200 | 22.89 | 743 |

[0645] 加和期望链数

[0646]

| | |
|---|---|
| VAV3/CHST2 链数 | 420833 |
| | 48,051 |
| | 6,711 |
| | 870 |

[0647]

| VAV3/SFMBT2_897/BTACT 质粒校准物 | | |
|---|---|---|
| 校准物链数/反应 | 平均 Cp | 平均链数 |
| 200000 | 14.16 | 429,911 |
| 20000 | 17.27 | 44,611 |
| 2000 | 20.08 | 5,744 |
| 200 | 22.75 | 823 |

[0648] 加和期望链数

[0649]

| | |
|---|---|
| VAV3/SFMBT2 链数 | 415367 |
| | 45,914 |
| | 6,401 |
| | 754 |

[0650]

| CHST2_7890/SFMBT2_897/BTACT 质粒校准物 | | |
|---|---|---|
| 校准物链数/反应 | 平均 Cp | 平均链数 |
| 200000 | 13.99 | 485,917 |
| 20000 | 17.17 | 47,863 |
| 2000 | 19.80 | 7,068 |
| 200 | 22.34 | 1,113 |

[0651] 加和期望链数

[0652]

| | |
|---|---|
| CHST2/SFMBT2 链数 | 444364 |
| | 54,439 |
| | 8,755 |
| | 1,244 |

[0653] 针对三种标记物加上对照质粒的链数计数：

[0654]

| VAV3/CHST2_7890/SFMBT2_897/BTACT 质粒校准物 | | |
|---|---|---|
| 校准物链数/反应 | 平均 Cp | 平均链数 |
| 200000 | 13.44 | 722,434 |
| 20000 | 16.54 | 76,045 |
| 2000 | 19.21 | 10,847 |
| 200 | 21.85 | 1,589 |

[0655] 加和期望链数

[0656]

| | |
|---|---|
| VAV3/CHST2/SFMBT2 链数 | 640282 |
| | 74,202 |
| | 10,934 |
| | 1,434 |

[0657] 使用SFMBT2_897/BTACT质粒校准物标准曲线进行链数计数：

[0658]

| SFMBT2_897/BTACT 质粒校准物标准曲线 | |
|---|---|
| 斜率 | -2.705 |
| 截距 | 29.369 |
| 效率% | 134% |

[0659] 针对单一标记物加上对照质粒的链数计数：

| VAV3/BTACT 质粒校准物 | | |
|---|---|---|
| 校准物链数/反应 | 平均 Cp | 平均链数 |
| 200000 | 15.12 | 185,009 |
| 20000 | 18.26 | 12,793 |
| 2000 | 21.28 | 980 |
| 200 | 24.57 | 60 |

[0660]

| SFMBT2_897/BTACT 质粒校准物 | | |
|---|---|---|
| 校准物链数/反应 | 平均 Cp | 平均链数 |
| 200000 | 14.98 | 209,356 |
| 20000 | 17.84 | 18,236 |
| 2000 | 20.38 | 2,097 |
| 200 | 23.15 | 200 |

| CHST2_7890/BTACT 质粒校准物 | | |
|---|---|---|
| 校准物链数/反应 | 平均 Cp | 平均链数 |
| 200000 | 14.89 | 225,658 |
| 20000 | 17.72 | 20,240 |
| 2000 | 20.29 | 2,275 |
| 200 | 22.86 | 256 |

[0661] 针对两种标记物加上对照质粒的链数计数：

[0662]

| VAV3/CHST2_7890/BTACT 质粒校准物 | | |
|---|---|---|
| 校准物链数/反应 | 平均 Cp | 平均链数 |
| 200000 | 14.09 | 446,402 |
| 20000 | 17.22 | 31,148 |
| 2000 | 19.99 | 2,926 |
| 200 | 22.72 | 288 |

[0663] 加和期望链数

[0664]

| | |
|---|---|
| VAV3/CHST2 链数 | 410,667 |
| | 33,033 |
| | 3,255 |
| | 315 |

[0665]

| VAV3/SFMBT2_897/BTACT 质粒校准物 | | |
|---|---|---|
| 校准物链数/反应 | 平均 Cp | 平均链数 |
| 200000 | 14.05 | 460,951 |
| 20000 | 17.17 | 32,470 |
| 2000 | 19.97 | 2,983 |
| 200 | 22.60 | 319 |

[0666] 加和期望链数

[0667]

| | |
|---|---|
| VAV3/SFMBT2 链数 | 394,365 |
| | 31,029 |
| | 3,077 |
| | 260 |

[0668]

| CHST2_7890/SFMBT2_897/BTACT 质粒校准物 | | |
|---|---|---|
| 校准物链数/反应 | 平均 Cp | 平均链数 |
| 200000 | 13.84 | 552,761 |
| 20000 | 17.08 | 34,990 |
| 2000 | 19.65 | 3,908 |
| 200 | 22.22 | 439 |

[0669] 加和期望链数

[0670]

| | |
|---|---|
| CHST2/SFMBT2 链数 | 435,015 |
| | 38,476 |
| | 4,372 |
| | 455 |

[0671] 针对三种标记物加上对照质粒的链数计数：

[0672]

| VAV3/CHST2_7890/SFMBT2_897/BTACT 质粒校准物 | | |
|---|---|---|
| 校准物链数/反应 | 平均 Cp | 平均链数 |
| 200000 | 13.31 | 863,327 |
| 20000 | 16.40 | 62,334 |
| 2000 | 19.12 | 6,171 |
| 200 | 21.69 | 692 |

[0673] 加和期望链数

[0674]

| | |
|---|---|
| VAV3/CHST2/SFMBT2 链数 | 620,024 |
| | 51,269 |
| | 5,353 |
| | 515 |

[0675] 使用CHST2_7890/BTACT质粒校准物标准曲线进行链数计数：

[0676]

| CHST2_7890/BTACT 质粒校准物标准曲线 |
|---|

[0677]

| | |
|---|---|
| 斜率 | -2.644 |
| 截距 | 29.02 |
| 效率% | 139% |

[0678] 针对单一标记物加上对照质粒的链数计数：

| VAV3/BTACT 质粒校准物 | | |
|---|---|---|
| 校准物链数/反应 | 平均 Cp | 平均链数 |
| 200000 | 15.14 | 177,035 |
| 20000 | 18.28 | 11,490 |
| 2000 | 21.30 | 828 |
| 200 | 24.60 | 47 |

[0679]

| SFMBT2_897/BTACT 质粒校准物 | | |
|---|---|---|
| 校准物链数/反应 | 平均 Cp | 平均链数 |
| 200000 | 15.01 | 199,391 |
| 20000 | 17.88 | 16,382 |
| 2000 | 20.41 | 1,808 |
| 200 | 23.17 | 162 |

| CHST2_7890/BTACT 质粒校准物 | | |
|---|---|---|
| 校准物链数/反应 | 平均 Cp | 平均链数 |
| 200000 | 14.93 | 213,922 |
| 20000 | 17.75 | 18,236 |
| 2000 | 20.31 | 1,966 |
| 200 | 22.89 | 209 |

[0680] 针对两种标记物加上对照质粒的链数计数：

[0681]

| VAV3/CHST2_7890/BTACT 质粒校准物 | | |
|---|---|---|
| 校准物链数/反应 | 平均 Cp | 平均链数 |
| 200000 | 14.11 | 436,308 |
| 20000 | 17.24 | 28,620 |
| 2000 | 20.02 | 2,542 |
| 200 | 22.75 | 235 |

[0682] 加和期望链数

[0683]

| | |
|---|---|
| VAV3/CHST2 链数 | 390,956 |
| | 29,726 |
| | 2,794 |
| | 255 |

[0684]

| VAV3/SFMBT2_897/BTACT 质粒校准物 | | |
|---|---|---|
| 校准物链数/反应 | 平均 Cp | 平均链数 |
| 200000 | 14.07 | 448,748 |
| 20000 | 17.18 | 29,908 |

[0685]

| | | |
|---|---|---|
| 2000 | 19.99 | 2,596 |
| 200 | 22.62 | 262 |

[0686] 加和期望链数

[0687]

| | |
|---|---|
| VAV3/SFMBT2 链数 | 376425 |
| | 27,872 |
| | 2,637 |
| | 209 |

[0688]

| CHST2_7890/SFMBT2_897/BTACT 质粒校准物 | | |
|---|---|---|
| 校准物链数/反应 | 平均 Cp | 平均链数 |
| 200000 | 13.87 | 535,611 |
| 20000 | 17.10 | 32,329 |
| 2000 | 19.68 | 3,405 |
| 200 | 22.24 | 365 |

[0689] 加和期望链数

[0690]

| | |
|---|---|
| CHST2/SFMBT2 链数 | 413,312 |
| | 34,618 |
| | 3,774 |
| | 371 |

[0691] 对三种标记物加上对照质粒的链数计数：

[0692]

| VAV3/CHST2_7890/SFMBT2_897/BTACT 质粒校准物 | | |
|---|---|---|
| 校准物链数/反应 | 平均 Cp | 平均链数 |
| 200000 | 13.34 | 853,557 |
| 20000 | 16.42 | 57,973 |
| 2000 | 19.13 | 5,479 |
| 200 | 21.72 | 578 |

[0693] 加和期望链数

[0694]

| | |
|---|---|
| VAV3/CHST2/SFMBT2 链数 | 590347 |
| | 46,108 |
| | 4,602 |
| | 418 |

[0695] 这些数据证实了实验3.2中显示的结果,表明将SFMBT2_897探针浓度调低至200nM使该测定反应的效率与检测VAV3和CHST2_7890的反应的效率一致。它们还表明,当反应中的多个靶标将信号报告给同一个FRET盒和染料通道时,结果显示出反应中产生的荧光信号量的加和效应。令人惊讶的是,未观察到背景或交叉反应性的增加。

[0696] 数据进一步显示,当使用VAV3稀释系列作为校准标准时,由曲线低端的数据计算出的SFMBT2_897和CHST2_7890DNA的链数计数是对添加到这些反应中的实际量的过高估计。VAV3扩增曲线在标准曲线的低端变化较大,导致对其他标记物的链数计数的过高估计。

[0697] 实验3.5：

[0698] 在该实验中,当VAV3校准曲线用作计算DNA浓度的参考曲线时,调节VAV3标记物的探针和引物浓度以减少对低水平靶标的过高估计。

[0699] 对于VAV3校准曲线,具有VAV3质粒与BTACT质粒的组合的稀释系列如实验3.4中所述。使用具有所有三种标记物加上BTACT对照的质粒稀释液。

[0700] 制备含有针对所有3种标记物和BTACT对照质粒的引物和探针的10X寡核苷酸混合物,其提供的引物和探针产生下面所示的浓度：

[0701] 1.VAV3(400nM引物)/SFMBT2_897(200nM探针)/CHST2_7890/BTACT

[0702] 2.VAV3(750nM探针)/SFMBT2_897(200nM探针)/CHST2_7890/BTACT

[0703] 3.VAV3/SFMBT2_897(200nM探针)/CHST2_7890/BTACT

[0704] 除了上面指示的引物和探针浓度的变化之外,所有其他引物的最终反应浓度都为每种引物200nM,并且所有其他探针的最终反应浓度都为每种探针500nM。将QuARTS测定反应混合,并如实验3.1中所述的那样在光循环仪上进行测定。

[0705] 两种条件修改都改善了VAV3测定中低校准物的斜率,但这些条件确实产生了与单一标记物寡核苷酸混合物相同的信号。数据显示单一标记物混合物不存在标准曲线下端的链数计数过高估计的问题。基于这些数据,选择400nM的每种VAV3引物和500nM探针用于对临床样品测试所述的调查研究。

[0706] 实验3.6

[0707] 该实验对人临床血浆样品测试了多种标记物/1种染料样品配置。先前使用标准的一种标记物:一种染料方法对血浆样品进行测试,如实施例2中所述。使用具有向一个荧光通道(FAM)报告的VAV3、SFMBT2897和CHST27890的寡核苷酸混合物对同一种样品进行重新测试。

[0708] 在实施例2中,由一系列血浆样品制备DNA,并对靶DNA进行扩增用于QuART测定。将实施例2中由样品105-120(参见图3)产生的扩增子材料1:10稀释,并使用以上在实验3.5中描述的3-靶标/1对照寡核苷酸混合物进行测试。

[0709] 单一标记物/BTACT质粒校准物稀释液如实验3.1中所述的那样制备。使用10X寡核苷酸混合物,其包含针对所有三种标记物和BTACT对照DNA的引物和探针,并被配置成产生具有400nM的每种VAV3引物和200nM SFMBT2897探针的反应,并且具有200nM的所有其他引物和500nM的所有其他探针,如实验3.5中所述。将QuARTS测定混合并如实验3.1中所述那样的在光循环仪上进行测定。每个反应一式两份进行。

[0710]

[0711] 使用三种不同标记物校准曲线中的每一种单独计算每个样品的目标链数计数的计数。无论使用哪种标准曲线,所得到的链数计数值都相似。另外,使用单一染料配置的每个样品的链数计数接近于在实施例2中使用单独的FRET盒和染料通道测得的该标记物集合的组合链数计数。进一步地,当使用向一种染料配置报告的多种标记物时,检测到链数为零,即在实施例2实验中未产生信号的样品,保持为零,这表明当多重反应向FRET盒/单个染料通道报告时背景信号没有增加。

[0712] 这些结果表明使用向一个FRET盒和同一种染料报告的多个不同的靶位点,例如多个不同的标记物基因,可以增加检测灵敏度,并且还表明多重组合不需要受到用于信号检测的可用染料通道的数量限制。另外,该途径的使用不限于每个反应孔具有单一染料。例如,测定可以被配置成具有三种(或更多种)向第一染料(例如,FAM)报告的标记物和三种(或更多种)向第二染料(例如,HEX)报告的标记物,使得在对单一核酸样品制剂的单个反应中可以测试的标记物的数量加倍。可针对另外的标记物集合和/或针对一个或多个内部对照靶标使用另外的染料通道。

[0713] 实施例4

[0714] 向一种染料报告的标记物的多个区域

[0715] 针对使用上文所述的方法在正常血浆中显示出低至零链数计数的三种甲基化标记物VAV3(877)、SFMBT2(897)和CHST2(7890),设计了靶向每种标记物内的其他区域的另外的QuARTS测定寡核苷酸集合,并进行测试以了解在同一种反应中检测标记物的另外的区域

并向同一个染料通道报告是否会增加每种标记物的信噪比,从而增加测定(例如,在癌症检测中)的灵敏度。

[0716] 针对这些标记物中的每一种,鉴定了通过RRBS确定在癌组织和正常组织之间具有差异性甲基化的两个不同区域。这些区域是:

[0717] -VAV3区域877:chr1:108507618-108507675

[0718] -VAV3区域11878:chr1:108507406-108507499

[0719] -SFMBT2区域895:chr10:7452337-7452406

[0720] -SFMBT2区域897:chr10:7452865-7452922

[0721] -CHST2区域7890:chr3:142838847-142839000

[0722] -CHST2区域7889:chr3:142838300-142838388

[0723] 实验4.1

[0724] 对向HEX染料报告的CHST2区域(7889和7890)单独地和在组合反应中进行测试,以评价组合时两个区域之间的任何协同作用。如实验3.1中所述的那样稀释含有CHST2插入物的校准物质粒,以产生每μL 1E4至1E0个拷贝的稀释系列。对于区域7889的单独检测,测定反应含有CHST2_7889的正向和反向引物及臂1探针,臂1HEX FRET盒,以及BTACT对照的引物和臂3探针,连同臂3Quasar 670FRET盒。对于区域7890的单独检测,测定反应含有CHST2_7890的正向和反向引物及臂1探针,臂1HEX FRET盒,以及BTACT对照的引物和臂3探针,连同臂3Quasar 670FRET盒。组合反应含有CHST2_7889和7890的臂1探针和引物的完整集合,连同用于检测BTACT的寡核苷酸以及两个相同的FRET盒。

[0725] 10X寡核苷酸混合物含有用于在每种QuARTS测定反应中产生500nM的每种探针和200nM的每种引物的浓度的引物和探针。将QuARTS测定组分混合,并如实验3.1中所述的那样在光循环仪上进行测定。

[0726] 发现在组合反应中,使用单个FRET盒使这两个区域向同一种染料报告不会导致信号的任何增加。CHST2_7889扩增显著更高效并且似乎主导所产生的信号,这表明应对不同反应加以修改,以使其具有更相似的效率,如上文实施例3中所讨论的。

[0727] 实验4.2

[0728] 进行实验以确定对于每种标记物中的每对区域{CHST2(7889和7890)、SFMBT2(895和897)和VAV3(877和11878)}而言应使用多少的探针浓度才能平衡不同区域之间的反应动力学。制备10X寡核苷酸混合物以提供所指示的最终浓度的以下测定寡核苷酸混合物:

| **CHST2_7890A (1x 探针)** | 标记物 | 寡核苷酸 | 最终 1X 条件 (μM) |
|---|---|---|---|
| | CHST2_7890 | CHST2_7890 FP | 0.2 |
| | CHST2_7890 | CHST2_7890 RP | 0.2 |
| | CHST2_7890 | 探针 A5 CHST2_7890 | 0.5 |
| | | A5 FAM FRET | 0.5 |
| | BTACT | ACTB_BT_FP65 | 0.2 |
| | BTACT | ACTB_BT_RP65 | 0.2 |
| | BTACT | ACTB BT Pb A3 | 0.5 |
| | | A3 Quasar670 FRET | 0.5 |
| | | dNTP | 250 |
| | | 水 | NA |

[0729]

| **CHST2_7889A (1x 探针)** | 标记物 | 寡核苷酸 | 最终 1X 条件 (μM) |
|---|---|---|---|
| | CHST2_7889 | 正向引物 CHST2_7889 | 0.2 |
| | CHST2_7889 | 反向引物 CHST2_7889 | 0.2 |
| | CHST2_7889 | 探针 A5 CHST2_7889 | 0.5 |
| | | A5 FAM FRET | 0.5 |
| | BTACT | ACTB_BT_FP65 | 0.2 |
| | BTACT | ACTB_BT_RP65 | 0.2 |
| | BTACT | ACTB BT Pb A3 | 0.5 |
| | | A3 Quasar670 FRET | 0.5 |
| | | dNTP | 250 |
| | | 水 | NA |

| **CHST2_7890A(3xProbe)** | 标记物 | 寡核苷酸 | 最终 1X 条件 (μM) |
|---|---|---|---|
| | CHST2_7890 | CHST2_7890 FP | 0.2 |
| | | CHST2_7890 RP | 0.2 |
| | | **探针 A5 CHST2_7890** | 1.5 |
| | | A5 FAM FRET | 0.5 |
| | ACTB | ACTB_BT_FP65 | 0.2 |
| | | ACTB_BT_RP65 | 0.2 |
| | | ACTB BT Pb A3 | 0.5 |
| | | A3 Quasar670 FRET | 0.5 |
| | | dNTP | 250 |
| | | 水 | NA |

| **CHST2_7890A (2x 探针)** | 标记物 | 寡核苷酸 | 最终 1X 条件 (μM) |
|---|---|---|---|
| | CHST2_7890 | CHST2_7890 FP | 0.2 |
| | | CHST2_7890 RP | 0.2 |

| | | |
|---|---|---|
| | **探针 A5 CHST2_7890** | 1 |
| | A5 FAM FRET | 0.5 |
| ACTB | ACTB_BT_FP65 | 0.2 |
| | ACTB_BT_RP65 | 0.2 |
| | ACTB BT Pb A3 | 0.5 |
| | A3 Quasar670 FRET | 0.5 |
| | dNTP | 250 |
| | 水 | NA |

| **CHST2_7889A (0.5x 探针)** | 标记物 | 寡核苷酸 | 最终 1X 条件 (μM) |
|---|---|---|---|
| | CHST2_7889 | 正向引物 CHST2_7889 | 0.2 |
| | | 反向引物 CHST2_7889 | 0.2 |
| | | 探针 A5 CHST2_7889 | 0.25 |
| | | A5 FAM FRET | 0.5 |
| | ACTB | ACTB_BT_FP65 | 0.2 |
| | | ACTB_BT_RP65 | 0.2 |
| | | ACTB BT Pb A3 | 0.5 |
| | | A3 Quasar670 FRET | 0.5 |
| | | dNTP | 250 |
| | | 水 | NA |

[0730]

| **SFMBT2_895A(1x 探针)** | 标记物 | 寡核苷酸 | 最终 1X 条件 (μM) |
|---|---|---|---|
| | SFMBT2_895 v2 | 正向引物 SFMBT2_895_v2 | 0.2 |
| | | 反向引物 SFMBT2_895_v2 | 0.2 |
| | | 探针 A1 SFMBT2_895 v2 | 0.5 |
| | | A1 HEX FRET | 0.5 |
| | ACTB | ACTB_BT_FP65 | 0.2 |
| | | ACTB_BT_RP65 | 0.2 |
| | | ACTB BT Pb A3 | 0.5 |
| | | A3 Quasar670 FRET | 0.5 |
| | | dNTP | 250 |
| | | 水 | NA |

**SFMBT2_897/BTACT**

| **SFMBT2_897A (1x 探针)** | 标记物 | 寡核苷酸 | 最终 1X 条件 (μM) |
|---|---|---|---|
| | SFMBT2_897 | 正向引物 SFMBT2_897v5 | 0.2 |
| | | 反向引物 | 0.2 |

| | | |
|---|---|---|
| | SFMBT2_897v4 | |
| | 探针 A1 SFMBT2_897v5 | 0.5 |
| | A1 HEX FRET | 0.5 |
| ACTB | ACTB_BT_FP65 | 0.2 |
| | ACTB_BT_RP65 | 0.2 |
| | ACTB BT Pb A3 | 0.5 |
| | A3 Quasar670 FRET | 0.5 |
| | dNTP | 250 |
| | 水 | NA |

[0731]

| **SFMBT2_897A (0.5x 探针)** | 标记物 | 寡核苷酸 | 最终 1X 条件 (μM) |
|---|---|---|---|
| | SFMBT2_897 | 正向引物 SFMBT2_897v5 | 0.2 |
| | | 反向引物 SFMBT2_897v4 | 0.2 |
| | | 探针 A1 SFMBT2_897v5 | 0.25 |
| | | A1 HEX FRET | 0.5 |
| | ACTB | ACTB_BT_FP65 | 0.2 |
| | | ACTB_BT_RP65 | 0.2 |
| | | ACTB BT Pb A3 | 0.5 |
| | | A3 Quasar670 FRET | 0.5 |
| | | dNTP | 250 |
| | | 水 | NA |

| **SFMBT2_895A (2x 探针)** | 标记物 | 寡核苷酸 | 最终 1X 条件 (μM) |
|---|---|---|---|
| | SFMBT2_895 v2 | 正向引物 SFMBT2_895_v2 | 0.2 |
| | | 反向引物 SFMBT2_895_v2 | 0.2 |
| | | 探针 A1 SFMBT2_895 v2 | 1 |
| | | A1 HEX FRET | 0.5 |
| | ACTB | ACTB_BT_FP65 | 0.2 |
| | | ACTB_BT_RP65 | 0.2 |
| | | ACTB BT Pb A3 | 0.5 |
| | | A3 Quasar670 FRET | 0.5 |
| | | dNTP | 250 |
| | | 水 | NA |

| **SFMBT2_897A (0.25x 探** | 标记物 | 寡核苷酸 | 最终 1X |
|---|---|---|---|

| 针) | | | 条件 (μM) |
|---|---|---|---|
| | SFMBT2_897 | 正向引物 SFMBT2_897v5 | 0.2 |
| | | 反向引物 SFMBT2_897v4 | 0.2 |
| | | 探针 A1 SFMBT2_897v5 | 0.125 |
| | | A1 HEX FRET | 0.5 |
| | ACTB | ACTB_BT_FP65 | 0.2 |
| | | ACTB_BT_RP65 | 0.2 |
| | | ACTB BT Pb A3 | 0.5 |
| | | A3 Quasar670 FRET | 0.5 |
| | | dNTP | 250 |
| | | 水 | NA |

[0732]

| VAV3_877A (1x 探针) | 标记物 | 寡核苷酸 | 最终 1X 条件 (μM) |
|---|---|---|---|
| | VAV3_877 | 正向引物 VAV3 | 0.2 |
| | VAV3_877 | 反向引物 VAV3 ver 2 | 0.2 |
| | VAV3_877 | 探针 A5 VAV3 | 0.5 |
| | | A5 FAM FRET | 0.5 |
| | BTACT | ACTB_BT_FP65 | 0.2 |
| | BTACT | ACTB_BT_RP65 | 0.2 |
| | BTACT | ACTB BT Pb A3 | 0.5 |
| | | A3 Quasar670 FRET | 0.5 |
| | | dNTP | 250 |
| | | 水 | NA |

| VAV3_878A (1x 探针) | 标记物 | 寡核苷酸 | 最终 1X 条件 (μM) |
|---|---|---|---|
| | VAV3_11878 | 正向引物 VAV3_11878 | 0.2 |
| | VAV3_11878 | 反向引物 VAV3_11878 | 0.2 |
| | VAV3_11878 | 探针 A5 VAV3_11878 | 0.5 |
| | | A5 FAM FRET | 0.5 |
| | BTACT | ACTB_BT_FP65 | 0.2 |
| | BTACT | ACTB_BT_RP65 | 0.2 |
| | BTACT | ACTB BT Pb A3 | 0.5 |
| | | A3 Quasar670 FRET | 0.5 |
| | | dNTP | 250 |
| | | 水 | NA |

| VAV3_877A (1.5x 探针) | 标记物 | 寡核苷酸 | 最终 1X |
|---|---|---|---|

| | | | 条件 (μM) |
|---|---|---|---|
| | VAV3_877 | 正向引物 VAV3 | 0.2 |
| | VAV3_877 | 反向引物 VAV3 ver 2 | 0.2 |
| | VAV3_877 | 探针 A5 VAV3 | 0.75 |
| | | A5 FAM FRET | 0.5 |
| | BTACT | ACTB_BT_FP65 | 0.2 |
| | BTACT | ACTB_BT_RP65 | 0.2 |
| | BTACT | ACTB BT Pb A3 | 0.5 |
| | | A3 Quasar670 FRET | 0.5 |
| | | dNTP | 250 |
| | | 水 | NA |

[0733]

| **VAV3_877A (2x 探针)** | 标记物 | 寡核苷酸 | 最终 1X 条件 (μM) |
|---|---|---|---|
| | VAV3_877 | 正向引物 VAV3 | 0.2 |
| | VAV3_877 | 反向引物 VAV3 ver 2 | 0.2 |
| | VAV3_877 | 探针 A5 VAV3 | 1 |
| | | A5 FAM FRET | 0.5 |
| | BTACT | ACTB_BT_FP65 | 0.2 |
| | BTACT | ACTB_BT_RP65 | 0.2 |
| | BTACT | ACTB BT Pb A3 | 0.5 |
| | | A3 Quasar670 FRET | 0.5 |
| | | dNTP | 250 |
| | | 水 | NA |

| **VAV3_878 (0.75x 探针)** | 标记物 | 寡核苷酸 | 最终 1X 条件 (μM) |
|---|---|---|---|
| | VAV3_11878 | 正向引物 VAV3_11878 | 0.2 |
| | VAV3_11878 | 反向引物 VAV3_11878 | 0.2 |
| | VAV3_11878 | 探针 A5 VAV3_11878 | 0.375 |
| | | A5 FAM FRET | 0.5 |
| | BTACT | ACTB_BT_FP65 | 0.2 |
| | BTACT | ACTB_BT_RP65 | 0.2 |
| | BTACT | ACTB BT Pb A3 | 0.5 |
| | | A3 Quasar670 FRET | 0.5 |
| | | dNTP | 250 |
| | | 水 | NA |

| **VAV3_878 (0.5x 探针)** | 标记物 | 寡核苷酸 | 最终 1X 条件 (μM) |
|---|---|---|---|
| | VAV3_11878 | 正向引物 VAV3_11878 | 0.2 |
| | VAV3_11878 | 反向引物 VAV3_11878 | 0.2 |

[0734]

| | | |
|---|---|---|
| VAV3_11878 | 探针 A5 VAV3_11878 | 0.25 |
| | A5 FAM FRET | 0.5 |
| BTACT | ACTB_BT_FP65 | 0.2 |
| BTACT | ACTB_BT_RP65 | 0.2 |
| BTACT | ACTB BT Pb A3 | 0.5 |
| | A3 Quasar670 FRET | 0.5 |
| | dNTP | 250 |
| | 水 | NA |

[0735] 将QuARTS测定组分混合并如实验3.1中所述的那样在光循环仪上进行测定。在不同反应条件下获得的平均Cp值如下：

| | 平均 Cp 值 | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | CHST2_7890 | CHST2_7890 | CHST2_7890 | CHST2_7889 | CHST2_7889 |
| 质粒校准物浓度 | 1X 探针浓度 | 2X 探针浓度 | 3X 探针浓度 | 1X 探针浓度 | 0.5X 探针浓度 |
| 200,000 | 15.4 | 14.8 | 14.2 | 13.9 | 14.7 |
| 20,000 | 18.6 | 18.0 | 17.4 | 17.1 | 18.1 |
| 2,000 | 22.1 | 21.4 | 21.0 | 20.6 | 21.2 |
| 200 | 25.2 | 24.9 | 24.2 | 24.0 | 24.7 |
| 20 | 28.7 | 27.8 | 27.0 | 27.2 | 28.1 |

[0736]

| | 平均 Cp 值 | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | SFMBT2_895 | SFMBT2_895 | SFMBT2_897 | SFMBT2_897 | SFMBT2_897 |
| 质粒校准物浓度 | 1X 探针浓度 | 2X 探针浓度 | 1X 探针浓度 | 0.25X 探针浓度 | 0.5X 探针浓度 |
| 200,000 | 16.5 | 15.2 | 14.5 | 16.7 | 16.0 |
| 20,000 | 20.1 | 19.1 | 18.0 | 20.1 | 19.3 |
| 2,000 | 23.4 | 22.6 | 21.3 | 23.3 | 22.5 |
| 200 | 27.1 | 26.1 | 24.4 | 26.5 | 25.8 |
| 20 | 30.2 | 29.4 | 27.4 | 30.6 | 29.3 |

| | 平均 CP 值 | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | VAV3_877 | VAV3_877 | VAV3_877 | VAV3_11878 | VAV3_11878 | VAV3_11878 |
| 质粒校准物浓度 | 1X 探针浓度 | 1.5X 探针浓度 | 2X 探针浓度 | 1X 探针浓度 | 0.75X 探针浓度 | 0.5X 探针浓度 |
| 200,000 | 15.0 | 14.5 | 14.2 | 13.4 | 13.8 | 14.3 |
| 20,000 | 18.2 | 17.9 | 17.6 | 16.9 | 17.0 | 17.8 |
| 2,000 | 21.6 | 21.3 | 21.0 | 20.3 | 20.3 | 21.1 |
| 200 | 25.2 | 24.4 | 24.2 | 23.4 | 23.8 | 24.2 |
| 20 | 27.9 | 28.1 | 27.3 | 26.7 | 27.5 | 27.5 |

[0737] 这些数据表明,通过改变探针浓度,可以将各个测定的Cp值调节到对于每种标记物的两个区域中的每一个而言,校准曲线的五个点中的每一个都<1Cp。对于测试的标记物,

在QuARTS测定反应中使用以下探针浓度,产生了对于靶区域的集合平衡的反应效率:

[0738]

| 标记物 | [探针]-A5-FAM | [探针]-A1-HEX |
|---|---|---|
| SFMBT2_895 | - | 0.5uM |
| SFMBT2_897 | - | 0.125uM |
| CHST2_7889 | 0.25uM | - |
| CHST2_7890 | 1uM | - |
| VAV3_877 | 1uM | - |
| VAV3_11878 | 0.25uM | - |

[0739] 实验4.3

[0740] 设计新的三重反应(参见实施例2的原始三重反应配置)以在多重反应中使用多个区域/一种染料的测定配置。下面的"库17"列出了与β-肌动蛋白对照共扩增,然后按以下所示的分组在三重QuARTS测定中进行分析的6种标记物的集合。库17+MR-OD适于包括针对SFMBT2、VAV3和CHST2标记物的多个区域/一种染料的测定配置。JAM3、ZNF671和ZNF568测定设计在图1和图2中示出。库中每个分组的3个或4个字母缩写是每个基因名称的第一个字母,A表示β-肌动蛋白对照。

[0741]

| 库 17 | | 库 17+MR-OD | |
|---|---|---|---|
| **JSA** | JAM3 | **JSSA** | JAM3 |
| | SFMBT2_897 | | SFMBT2_897 |
| | BTACT | | SFMBT2_895 |
| **VZA** | VAV3_877 | | BTACT |
| | ZNF671 | **VVZA** | VAV3_877 |
| | BTACT | | VAV3_11878 |
| **CZA1** | CHST2_7890 | | ZNF671 |
| | ZNF568 | | BTACT |
| | BTACT | **CCZA1** | CHST2_7890 |
| | | | CHST2_7889 |
| | | | ZNF568 |
| | | | BTACT |

[0742] 对质粒校准稀释系列测试新的三重制剂,所述质粒校准稀释系列包含库17多重物,所述库17多重物在为每个测定反应提供每个靶标的2e5至2e1链的一系列稀释液中包含以上所列的组中的所有靶区域。SFMBT2、VAV3和CHST2 MR-OD的探针的最终浓度如实验4.2的结果中所述。JAM3、ZNF671和ZNF568标记物以及BTACT对照的探针为1μM。所有FRET盒在最终反应混合物中均为500nM。将QuARTS测定组分混合,并如实验3.1中所述的那样在光循环仪上进行测定

[0743] 按预期进行的含有VAV3-877加上VAV-11878的三重物给出,与添加到反应中的靶标计数相比增加大约2-3倍的链数计数,而靶标仅具有一个区域被靶向。然而,含有CHST2-7889_CHST-7890和SFMBT2-895_SFMBT2-897的三重物未显示出预期的加和信号。使用不同浓度的CHST2-7889_CHST2-7890和SFMBT2-895_SFMBT2-897的探针进行进一步实验,以在如上所示的那样分组的多重QuARTS测定中对其进行测试。在三重格式中,可以改变CHST2_7889和CHST2_7890的探针浓度,以基于质粒校准曲线达到预期的MR_OD结果(即,具有各个反应的预期相加值的结果)。然而,SFMBT2_895和SFMBT2_897测定虽然使用改变的探针浓度

进行了改进,但是当以三重格式使用时,该测定仍然产生低于针对两个区域的检测所预期的预期200%水平的信号。尽管如此,选择以下修改的探针浓度用于在血浆样品上测试三重测定。

[0744]

| 用于 MR-OD 反应的经修正的最终探针浓度 | | |
|---|---|---|
| 标记物_区域 | [探针]-臂 5-FAM | [探测]-臂 1-HEX |
| SFMBT2_895 | - | 1uM |
| SFMBT2_897 | - | 0.25uM |
| CHST2_7889 | 0.5uM | - |
| CHST2_7890 | 1.5uM | - |
| VAV3_877 | 1uM | - |
| VAV3_11878 | 0.25uM | - |

[0745] 实验4.4

[0746] 该实验检查了使用多个区域-一个染料的测定设计对来自正常患者和癌症患者的人血浆样品进行测试而将多重预扩增和三重QuARTS测定检测组合的效果。该实验将对库17的13种甲基化标记物(加上过程对照,ZF_RASSF1)的检测与使用库17+MR_OD配置对63个正常血浆样品和12个结肠癌血浆样品进行的检测进行了比较。将库17的标记物在预扩增中一起共扩增,然后在上面所列列表的分组反应中并如实施例1中详细描述的那样,检测预扩增的DNA。

[0747]

| 库 17 | | 库 17+MR-OD | |
|---|---|---|---|
| JSA | JAM3 | JSSA | JAM3 |
| | SFMBT2 | | SFMBT2_897 |
| | BTACT | | SFMBT2_895 |
| PDA | PDGFD | | BTACT |
| | DTX1 | PDA | PDGFD |
| | BTACT | | DTX1 |
| GQA | GRIN2D | | BTACT |
| | QKI | GQA | GRIN2D |
| | BTACT | | QKI |
| VZA | VAV3 | | BTACT |
| | ZNF671 | VVZA | VAV3_877 |
| | BTACT | | VAV3_11878 |
| CZA1 | CHST2 | | ZNF671 |
| | ZNF568 | | BTACT |
| | BTACT | CCZA1 | CHST2_7890 |
| AFA | ANKRD13B | | CHST2_7889 |
| | FER1L4 | | ZNF568 |
| | BTACT | | BTACT |
| CZA2 | CNNM1 | AFA | ANKRD13B |
| | ZFRASSF1 | | FER1L4 |
| | BTACT | | BTACT |
| | | CZA2 | CNNM1 |
| | | | ZFRASSF1 |
| | | | BTACT |

[0748] 三重物名称包含每种所含标记物的首字母,加上β-肌动蛋白对照的‘A’。右边列中

三重物名称中的双字母(例如,“JSSA”)表示在两个不同区域测试的单一标记物。

[0749] 如实施例1中所述的那样从血浆样品中分离DNA。如实施例1中所述的那样进行亚硫酸氢盐转化、多重预扩增和对多重扩增的DNA的QuARTS测定。在亚硫酸氢盐转化之前,保存分离的DNA等分试样用于测试未转化的DNA上的KRAS 38A和35C突变。每种标记物所用的扩增引物和检测探针如图1和2所示。

[0750] 针对VAV3、SFMBT2、CHST2和ZNF671使用每次反应的链数进行的逻辑线性回归拟合显示,与标准QuARTs测定配置相比,当QuARTs与MR_OD(多个区域_一种染料)组合使用时具有相当大的优势,如下所示。在这些分析中,标记物ZNF671是检测结果的主要贡献者,并且包括在单独QuARTs和QuARTs+MR_OD的逻辑拟合中。如上所述,还测试了未转化DNA的KRAS 38A和35C突变。

[0751] 用标准三重测定,使用多重预扩增获得了以下灵敏度和特异性:

[0752] 用标准QuARTs测定进行多重分析

[0753]

| | | 预测 | | |
|---|---|---|---|---|
| 阶段 | 测试的数量 | 癌症 | 正常 | 灵敏度 |
| I | 4 | 2 | 2 | 50% |
| II | 3 | 2 | 1 | 67% |
| III | 3 | 2 | 1 | 67% |
| IV | 2 | 2 | 0 | 100% |
| | | 预测 | | |
| 病理 | 测试的数量 | 癌症 | 正常 | %灵敏度/特异性 |
| 癌症 | 12 | 8 | 4 | 67% |
| 正常 | 62 | 0 | 62 | 100% |

[0754] 当使用多个区域/一种染料的配置时,灵敏度和特异性如下:

[0755] 利用使用多个区域_一种染料(MR_OD)的QuARTs测定进行的多重分析

[0756]

| | | 预测 | | |
|---|---|---|---|---|
| 阶段 | 测试的数量 | 癌症 | 正常 | 灵敏度 |
| I | 4 | 4 | 0 | 100% |
| II | 3 | 3 | 0 | 100% |
| III | 3 | 2 | 1 | 67% |
| IV | 2 | 2 | 0 | 100% |
| | | 预测 | | |
| 病理 | 测试的数量 | 癌症 | 正常 | %灵敏度/特异性 |
| 癌症 | 12 | 11 | 1 | 92% |
| 正常 | 62 | 6 | 56 | 90% |

[0757] 虽然样品量小,但使用这种多个区域-一种染料(FRET盒)的配置显示出灵敏度的显著改善,但是液可导致一定特异性损失。

[0758] 应当注意,虽然该实施例检测从血浆样品中分离的DNA,但是该组标记物和如上所述进行修改的多重QuARTS测定的使用可以应用于基于粪便或其他血液或体液的测试,并且可以应用于,例如,结肠癌和其他癌症筛查。

[0759] 本申请中引用的所有文献和类似材料,包括但不限于专利、专利申请、文章、书籍、论文和互联网网页,均出于任何目的明确地通过引用整体并入。除非另有定义,否则本文所

用的所有技术和科学术语具有与本文所述各个实施方案所属领域中的普通技术人员通常所理解的相同的含义。当并入的参考文献中的术语的定义看起来与本教导中提供的定义不同时,应以本教导中提供的定义为准。

[0760] 所描述的组合物、方法和技术的用途的各种修改和变化在不脱离所述技术的范围和精神的情况下对于本领域技术人员来说将是显而易见的。尽管已结合具体示例性实施方案描述了本技术,但应理解,要求保护的本发明不应不适当地限于此类具体实施方案。事实上,对于药物学、生物化学、医学科学或相关领域的技术人员而言显而易见的用于执行本发明的所描述的模式的各种修改旨在落在所附权利要求书的范围内。

ANKRD13B
>hg19_dna 范围 =chr17:27940470-27940578 链 =+

未处理的靶标(UT)靶序列(SEQ ID NO: 1)

GGAGCTACGACGAGCAGCTGCGGCTGGCGATGGAACTGTCGGCGCAGGAGCAGGAGGAGAGGCGGCGGCGCGCCAGGAGGAGGAG
GAGCTGGAGCGCATCCTGAG

经亚硫酸氢盐处理的靶标(BT)靶序列(SEQ ID NO: 2)

GGAGTTACGACGAGTAGTTGCGGTTGGCGATGGAATTGTCGGCGTAGGAGTAGGAGGAGAGGCGGCGGCGCGCCGTTAGGAGGAGG
GAGTTGGAGCGTATTTTGAG

ANKRD13B 正向引物 AGTTACGACGAGTAGTTGCG (SEQ ID NO: 3)
ANKRD13B 反向引物 TCCTCCTACTCCCTACGCC (SEQ ID NO: 4)
ANKRD13B 探针(臂 5) CCACGGACGCGACAATTCCAT/3C6/ (SEQ ID NO: 5)

图1

B3GALT6
>hg19_dna 范围=chr1:1163595-1163733 链=+

未处理的靶标(UT)靶序列(SEQ ID NO: 6)

GGCCACACAGGCCCACTCTGGCCCTCTGAGCCCCCGGCGGACCCAGGGCATTCAAGGAGCGGCTCTGGGCTGCCAGCGCAGGCCTCCGC
GCAAACACAGCAGGCTGGAAGTGGCGCTCATCACCGGCACGTCTTCCCAG

经亚硫酸氢盐处理的靶标(BT)靶序列(SEQ ID NO: 7)

GGTTATATAGGTTTATTTTGGTTTTTTGAGTTTTCGGCGGATTTAGGGTATTTAAGGAGCGGTTTTGGGTTGTTAGCGTAGGTTTTCGC
GTAAATATAGTAGGTTGGAAGTGGCGTTTATTATCGGTACGTTTTTTTTAG

B3GALT6 正向引物 GGTTTATTTTGGTTTTTTGAGTTTTCGG (SEQ ID NO: 8)
B3GALT6 反向引物 TCCAACCTACTATATTTACGCGAA (SEQ ID NO: 9)
B3GALT6 探针(臂5) CCACGGACGGCGGATTTAGGG/3C6/ (SEQ ID NO: 10)

图1(续)

CHST2_7890
>hg19_dna 范围=chr3:142838847-142839000 链=-

未处理的靶标(UT)靶序列(SEQ ID NO: 11)

CGCTTTCGGCCTCCGTGCGGCGAATTTTCCCACCTCTCTGGCAGCGGTGGATGGGGCACAGCGCGACCCCGCAGCGGCGGCGGCGGCTG
CTTCCATCACCGGGAGGATGCCCGGGCGGACAGCGCAGGCAACCCCCGCCGCTCCGCAGCCTCCG

经亚硫酸氢盐处理的靶标(BT)靶序列(SEQ ID NO: 12)

GCGGTGGATGGGGTATAGCGCGATTTCGTAGCGGCGGCGGCGGTTGTTTTTATTATCGGGAGGATGTTCGGGCGGATAGCGTAGGTAAT
TTTCGTCG

| | | | |
|---|---|---|---|
| CHST2_7890 正向引物 | GTATAGCGCGATTTCGTAGCG | (SEQ ID NO: 13) |
| CHST2_7890 反向引物 | AATTACCTACGCTATCCGCCC | (SEQ ID NO: 14) |
| CHST2_7890 探针(臂5) | CCACGGACGCGAACATCCTCC/3C6/ | (SEQ ID NO: 15) |
| CHST2_7890 探针(臂1) | CGCCGAGGCGAACATCCTCC/3C6/ | (SEQ ID NO: 175) |

图1(续)

CHST2_7889
>hg19_dna 范围= chr 3: 142838300-142838388

未处理的靶标(UT)靶序列(SEQ ID NO: 136)

TCACCAACTCTTTCTGAGAGCAAAAACATGGGGCCGAGTCCGGCAGCTGCACGCAGAATCCAACTCTCTGGCAGCTCTCGGCACCGACG
AGCTCCAGATCCCCGCGTTCGCATCCCGGCGCTTTGCGCGCAGAGCTAAGCCTTCGGACCCGTGGA

经亚硫酸氢盐处理的靶标(BT)靶序列(SEQ ID NO: 137)

TATGGGGTCGAGTTCGGTAGTTGTACGTAGAATTTAATTTTTTGGTAGTTTTCGGTATCGACGAGTTTAGATTTCGCGTTCGTATTTC
GGCGTTTTGC

| | | |
|---|---|---|
| CHST2_7889 正向引物 | CGAGTTCGGTAGTTGTACGTAGA | (SEQ ID NO: 138) |
| CHST2_7889 反向引物 | CGAAATACGAACGCGAAATCTAAAACT | (SEQ ID NO: 139) |
| CHST2_7889 探针(臂5) | CCACGGACGTCGTCGATACCG/3C6/ | (SEQ ID NO: 140) |
| CHST2_7889 探针(臂1) | CGCCGAGGTCGTCGATACCG/3C6/ | (SEQ ID NO: 176) |

图1(续)

CNNM1(806)
>hg19_dna 范围=chr10:101089034-101089143 链=-

未处理的靶标(UT)靶序列(SEQ ID NO: 16)

CTGCACCCAGCGCAGCTGCACGTGATACTGCAGGAAGCCGAGCGAGAGCTGGAGGGAGGAGGAGCCGGAGCTGGGAACCCAGCCGCAGG
CAGGTCACCACGTGTACGCCC

经亚硫酸氢盐处理的靶标(BT)靶序列(SEQ ID NO: 17)

TTGTATTTAGCGTAGTTGTACGTGATATTGTAGGAAGTCGAGCGAGAGTTGGAGGGAGGAGGAGTCGGAGTTGGGAATTTAGTCGTAGG
TAGGTTATTACGTGTACGTTT

CNNM1(806) 正向引物 (SEQ ID NO: 18)
CGTAGTTGTACGTGATATTGTAGGAA
CNNM1(806) 反向引物 (SEQ ID NO: 19)
GACTAAATTCCCCAACTCCGACT
CNNM1(806) 探针(臂5) (SEQ ID NO: 20)
CCACGGACGAGTCGAGCGAGA/3C6/

图1(续)

DOCK2
>hg19_dna 范围=chr5:169064370- 169064454 链=-

未处理的靶标(UT)靶序列(SEQ ID NO: 21)

GCCGGCCCCGCAGCATCCTCCTGCTCGGCGGCTCTCCCGCCACCTGTCCCGCTCCCTGCCGCGCCCTGGGGCCCGCACCTACCCAC

经亚硫酸氢盐处理的靶标(BT)靶序列(SEQ ID NO: 22)

GTCGGTTTCGTAGTATTTTTTTGTTCGCGGTTTTTTCGTTATTTGTTTCGTTTTTTGTCGCGTTTTGGGGTTCGTATTTATTTAT

DOCK2 正向引物 CGGTTTCGTAGTATTTTTTTGTTCG (SEQ ID NO: 23)
DOCK2 反向引物 GAACCCCAAAACGCGAC (SEQ ID NO: 24)
DOCK2 探针(臂1) CGCCGAGGGCGGTTTTTTCG/3C6/ (SEQ ID NO: 25)

图1(续)

DTX1
>hg19_dna 范围=chr12:113494567-113494700 链=-

未处理的靶标(UT)靶序列(SEQ ID NO: 26)

CGCCTCCTGGGCTCCCCCCGGAGTGGGAGGGAGCCGCGGTCCCGCCTCCGCGCCCGTTCCCTCCCAGGCCCCTCGGCCGCCGCGCCGAG
CTTTCCGCGCGTGGACAGACTGCCCGGCCGACGGACGGACGCAGG

经亚硫酸氢盐处理的靶标(BT)靶序列(SEQ ID NO: 27)

CGTTTTTGGGTTTTTTTCGGAGTGGGAGGGAGTCGCGGTTTCGTTTTCGCGTTCGTTTTTTTTAGGTTTTTCGGTCGTCGCGTCGAG
TTTTTCGCGCGTGGATAGATTGTTCGGTCGACGGACGGACGTAGG

DTX1 正向引物Ver3 AGGGAGTCGCGGTTTCG (SEQ ID NO: 28)
DTX1 反向引物Ver3 GCGACGACCGAAAAACCT (SEQ ID NO: 29)
DTX1 探针(臂1)Ver3 CGCCGAGGGTTTTCGCGTTC/3C6/ (SEQ ID NO: 30)

图1(续)

FERMT3
>hg19_dna 范围=chr11:63974820-63974959 链=+

未处理的靶标(UT)靶序列(SEQ ID NO: 31)

TAGCAGCAGCCGCAGCCATGGCGGGGATGAAGACAGCCTCCGGGGACTACATCGACTCGTCATGGGAGCTGCGGGGTGTTTGTGGGAGAG
GAGGACCCAGAGGCCGAGTCGGTCACCCTGCGGGTCACTGGGGAGTCGCAC

经亚硫酸氢盐处理的靶标(BT)靶序列(SEQ ID NO: 32)

TAGTAGTAGTCGTAGTTATGGCGGGGATGAAGATAGTTTTCGGGGATTATATCGATTCGTTATGGGAGTTGCGGGGTGTTTGTGGGAGAG
GAGGATTTAGAGGTCGAGTCGGGTTATTTTGCGGGTTATTGGGGAGTCGTAT

FERMT3 正向引物 GTTTTCGGGGATTATATCGATTCG (SEQ ID NO: 33)
FERMT3 反向引物 CCCAATAACCCGCAAAATAACC (SEQ ID NO: 34)
FERMT3 探针(臂1) CGCCGAGGCGACTCGACCTC/3C6/ (SEQ ID NO: 35)

图1(续)

FLI1
>hg19_dna 范围=chr11:128564081-128564188 链=+

未处理的靶标(UT)靶序列(SEQ ID NO: 36)

AGGGGCTGcGAGGTCAGGCTGTAACCGGGTCAATGTGTGGAATATTGGGGGGCTCGGCTGCAGACTTGGCCAAATGGACGGGACTATTA
AGGTAAGcGGCGGGGGCAAC

经亚硫酸氢盐处理的靶标(BT)靶序列(SEQ ID NO: 37)

AGGGGTTGcGAGGTTAGGTTGTAATGTGTGGAATATTGGGGGGTTCGGTTGTAGATTTGGTTAAATGGACGGGATTATTA
AGGTAAGcGGCGGGGGTAAC

FLI1 正向引物 GGTTGCGAGGTTAGGTTGTAA (SEQ ID NO: 38)
FLI1 反向引物 TCCATTTAACCAAATCTACAACCGA (SEQ ID NO: 39)
FLI1 探针(臂1) CGCCGAGGATCGGGTTAATG/3C6/ (SEQ ID NO: 40)

图1(续)

GRIN2D
>hg19_dna 范围=chr19:48918160-48918300 链=-

未处理的靶标(UT)靶序列(SEQ ID NO: 41)

CGCCCCCTCACCTCCCCGATCATGCCGTTCCAGACGCCATCGATCTTCTTTCCGTGCTTGCCATTGGTGACCAGGTAGAGGTCGTAGCT
GAAGCCGATGGTATGCGCCAGCCGCTTCAGAATGTCGATGCAGAAACCCTTG

经亚硫酸氢盐处理的靶标(BT)靶序列(SEQ ID NO: 42)

CGTTTTTTATTTTTCGATTATGTCGTTTTAGACGTTATCGATTTTTTTTTCGTGTTTGTTATTGGTGATTAGGTAGAGGTCGTAGTT
GAAGTCGATGGTATGCGTTAGTCGTTTTAGAATGTCGATGTAGAAATTTTTG

GRIN2D 正向引物 TCGATTATGTCGTTTTAGACGTTATCG (SEQ ID NO: 43)
GRIN2D 反向引物 TCTACATCGACATTCTAAAACGACTAAC (SEQ ID NO: 44)
GRIN2D 探针(臂5) CCACGGACGCGCATACCATCG/3C6/ (SEQ ID NO: 45)

图1(续)

JAM3
>hg19_dna 范围=chr11:133938908-133939011 链=-

未处理的靶标(UT)靶序列(SEQ ID NO: 46)

GAGCCGGAGTCGCGGTGGCCGCCTCAGCGCCATGTCGAGGGTTGCTGAGGGGCCAGCGCGGCAGCGCGGCGGCTTGTAGTCCCCGCGCG
CATGCGCCCCAGCCTG

经亚硫酸氢盐处理的靶标(BT)靶序列(SEQ ID NO: 47)

GAGTCGGAGTCGCGGTGGTCGTTTTAGCGTTATGTCGAGGGTTGTTGAGGGGTTAGCGGTAGCGCGGCGCGGTTTGTAGTTTTCGCGCG
TATGCGTTTAGTTTG

JAM3 正向引物 TGGTCGTTTTAGCGTTATGTCG (SEQ ID NO: 48)
JAM3 反向引物 CGAAAACTACAAACCGCGC (SEQ ID NO: 49)
JAM3 探针(臂5) CCACGGACGCCGCGCTACCGC/3C6/ (SEQ ID NO: 50)

图1(续)

LRRC4
>hg19_dna 范围=chr7:127671974-127672282 5'pad=0 3'pad=0 链=-

未处理的靶标(UT)靶序列(SEQ ID NO: 51)

GGCGCGGCGCTGGAAGGCGCCGGCGTTAACCCCGCGAGGCAGGCGACGGAGGGGGAGCGGCGCTAATACATAAGAGCACTGCATCACGC
TAATCTTC

经亚硫酸氢盐处理的靶标(BT)靶序列(SEQ ID NO: 52)

GGCGCGGCGTTGGAAGGCGT**CGG**CGTTAATTTCGCGAGGTAGGCGACGGAGGGGGAGCGGCGTTAATATATAAGAGTATTGTATTACGT
TAATTTTT

LRRC4 正向引物 GCGTTAATTTCGCGAGGTA (SEQ ID NO: 53)
LRRC4 反向引物 ACAATACTCTTATATATTAACGCCGCTC (SEQ ID NO: 54)
LRRC4 探针(臂1) CGCCGAGGAGGCGACGGAGG/3C6/ (SEQ ID NO: 55)

图1(续)

OPLAH
>hg19_dna 范围 =chr8:145106777-145106865 链 =-

未处理的靶标(UT)靶序列(SEQ ID NO: 56)

CTGTCAGTGCTGACCGAGCGCCGCGCCTTCCGGCCATACGGGCTCCACGGTGCGCGGTTCCCCAGCCCTCGCGGCCCTCCCCGCCCCCG

经亚硫酸氢盐处理的靶标(BT)靶序列(SEQ ID NO: 57)

TTGTTAGTGTTGATCGAGCGTCGCGTTTTTCGGTTATACGGGTTTTACGGTGCGCGGTTTTTTAGTTTTCGCGGTTTTTTCGTTTTCG

| | | |
|---|---|---|
| OPLAH 正向引物 | CGTCGCGTTTTTCGGTTATACG | (SEQ ID NO: 58) |
| OPLAH 反向引物 | CGCGAAAACTAAAAAACCGCG | (SEQ ID NO: 59) |
| OPLAH 探针(臂 5) | CCACGGACGGCACCGTAAAAC/3C6/ | (SEQ ID NO: 60) |

图1(续)

PDGFD
>hg19_dna 范围=chr11:104034783-104034920 链=-

未处理的靶标(UT)靶序列(SEQ ID NO: 61)

CGGAGGGGGCGAACAAACAACGTCAACCTGTTGTTTGTCCCGTCACCATTTATCAGCTCAGCACCACACAAGGAAGTGCGGCACCCACAC
GCGCTCGGAAAGTTCAGCATGCAGGAAGTTTGGGGAGAGCTCGGCGATT

经亚硫酸氢盐处理的靶标(BT)靶序列(SEQ ID NO: 62)

AGGGGGCGAATAAATAAACGTTAATTTGTTGTTTCGTTATTTATTTAGTTTAGTATTATTAATAAGGAAGTGCGGTATTTATACGCG
TTCGGAAAGTTTAGTATGTAGG

PDGFD 正向引物 GCGAATAAATAAACGTTAATTTGTTGTTTGTTTCG (SEQ ID NO: 63)
PDGFD 反向引物 ACTTTCCGAACGCGTATAAATACC (SEQ ID NO: 64)
PDGFD 探针(臂5) CCACGGACGCGCACTTCCTTA/3C6/ (SEQ ID NO: 65)

图1(续)

PKIA
>hg19_dna 范围=chr8:79428611-79428695 链=+

未处理的靶标(UT)靶序列(SEQ ID NO: 66)

CCGGCGCGAGCTGACCGAGCACTCGGCGGGCGCGGGACTGCGGCCCGTGGCGGCGTGCGCGGGGACCTGCGCTGACTAGGTC

经亚硫酸氢盐处理的靶标(BT)靶序列(SEQ ID NO: 67)

TCGGCGCGAGTTGATCGAGTATTCGGCGGGCGCGGCGGGATTGCGGTTCGTGGCGGCGTGCGCGGGGATTTGCGTTGATTAGGTT

PKIA 正向引物 GCGAGTTGATCGAGTATTCGG (SEQ ID NO: 68)
PKIA 反向引物 CTAATCAACGCAAATCCCCCGC (SEQ ID NO: 69)
PKIA 探针(臂5) CCACGGACGCGCACGCCGCCA/3C6/ (SEQ ID NO: 70)

图1(续)

PPP2R5C
>hg19_dna 范围=chr14:102247749-102247852 链=+

未处理的靶标(UT)靶序列(SEQ ID NO: 71)

TGCGCGTGGGGCCAGGCTCGACCTCACTCCTGTTGTCGCTGCAGACCCGCGTGGGCTCCCGCCGGGCCCTCCTGCCGCCCCCCAGCCTC
CCCGCCCCCTGCCCTT

经亚硫酸氢盐处理的靶标(BT)靶序列(SEQ ID NO: 72)

TGCGCGTGGGGTTAGGTTCGATTTATTTGTTGTCGTTGTAGATTCGCGTGGGTTTCGTCGGGTTTTTTTGTCGTTTTTAGTTTT
TTCGTTTTTGTTTTT

PPP2R5C 正向引物 TTCGATTTTATTTTTGTTGTCGTTGTAGA (SEQ ID NO: 73)
PPP2R5C 反向引物 ACGACAAAAAAACCCGACG (SEQ ID NO: 74)
PPP2R5C 探针(臂1) CGCCGAGGATTCGCGTGGGT /3C6/ (SEQ ID NO: 75)

图1(续)

QKI
>hg19_dna 范围=chr6:163834737-163834821 链=+

未处理的靶标(UT)靶序列(SEQ ID NO: 76)

GCCGAGGGCGCCCGGCGCAGAGTCCCGCAGAGGCGGACGCCGCGGCACGCGCCTCGAAAAGCCTCAAACTCTTATCCTCGGCTCT

经亚硫酸氢盐处理的靶标(BT)靶序列(SEQ ID NO: 77)

GTCGAGGGCGTTCGGCGTAGAGTTTCGTAGAGGCGGACGTCGCGGTACGCGTTTCGAAAAGTTTAAATTTTATTTTCGGTTTT

QKI 正向引物 GTTCGGCGTAGAGTTTCGTAGA (SEQ ID NO: 78)
QKI 反向引物 GAAAATAAAAATTTAAAACTTTTCGAAACGCG (SEQ ID NO: 79)
QKI 探针(臂1) CGCCGAGGGTACCGCGACGT/3C6/ (SEQ ID NO: 80)

图1(续)

SEP9R092
>hg19_dna 范围=chr17:75370092-75370204 5'pad=0 3'pad=0 链=-

未处理的靶标(UT)靶序列(SEQ ID NO: 81)

TCGGTGCTCCCGGCCCACGGGCTGCACAACTTGGCGGCCCCGAAACTGGCGTGGGGGAGGGGAGGGCTGTCCACCCGAGCAGGACGCGG
CTGTCCACTCAGTCGGAGGTGAGG

经亚硫酸氢盐处理的靶标(BT)靶序列(SEQ ID NO: 82)

TCGGTGTTTTCGGTTTACGGGTTGTATAATTTGGCGGTTCGAAATTGGCGTGGGGGAGGGGAGGGTTGTTTATTCGAGTAGGACGCGG
TTGTTTATTTAGTCGGAGGTGAGG

SEP9_R092 正向引物 CGGGTTGTATAATTTGGCGG (SEQ ID NO: 83)
SEP9_R092 反向引物 AACCGCGTCCTACTCGA (SEQ ID NO: 84)
SEP9_R092 探针(臂1) CGCCGAGGGTTTCGAAATTG/3C6/ (SEQ ID NO: 85)

图1(续)

SFMBT2_897
>hg19_dna 范围=chr10:7452865-7452976 链=+

未处理的靶标(UT)靶序列(SEQ ID NO: 86)

GTCGCCGCCCCGGGAGGGCACCGGCCTCGCTCGCTTGCTCGCTCGCCCGCCCTTGCCCGCTCGCTCCCCGCCCGCCGCCTCCCTCGCGCG
CCCGCTCCGGTCCTCCGGCTCCC

经亚硫酸氢盐处理的靶标(BT)靶序列(SEQ ID NO: 87)

GTCGTCGTTCGGGAGGGTATCGGTTTCGTTCGTTCGTTTTTGTTCGTTTTTCGTTCGTTCGTCGT

SFMBT2_897v5 正向引物 GTCGTCGTTCGAGAGGGTA (SEQ ID NO: 88)
SFMBT2_897v4 反向引物 GAACAAAAACGAACGAACGAACA (SEQ ID NO: 89)
SFMBT2_897v5 探针(臂5) CCACGGACGATCGGTTTCGTT/3C6/ (SEQ ID NO: 90)

SFMBT2_897v5 探针(臂1) CGCCGAGGATCGGTTTCGTT/3C6/ (SEQ ID NO: 141)

图1(续)

SFMBT2_895
>hg19_dna 范围=chr10: 74523337-74524061

未处理的靶标(UT)靶序列(SEQ ID NO: 142)

CGGGCGCAGCCTGTCCCCTCCCGCCGCCCACCTTCCTCGTTTCTGCACTCATTTAGCGACGCAGCCAGCCGCCGCTGCTACCTACCCCGCGC
TCCCGCGTCTCCTCCGCGCTGGGGTCTCCCCTTTCTTTTGGTTTGGGTGGGAGAAAAAGATGGTG

经亚硫酸氢盐处理的靶标(BT)靶序列(SEQ ID NO: 143)

GTATTTATTTTAGCGACGTAGTCGTCGTTGTTATTTATTTCGCGTTTCGCGTTTTTTTCGCGTTGGGGTTTTTTTT

SFMBT2_895v2 正向引物 GCGACGTAGTCGTCGTTGT (SEQ ID NO: 144)
SFMBT2_895v2 反向引物 CCAACGCGAAAAAAACGCG (SEQ ID NO: 145)
SFMBT2_895v2 探针(臂1) CGCCGAGGGAAAACGCGAAA/3C6/ (SEQ ID NO: 146)

图1(续)

SLC12A8
>hg19_dna 范围=chr3:124860704-124860791 链=+

未处理的靶标(UT)靶序列(SEQ ID NO: 91)

CGGAGCTAGGAGGGTGGGGCTCGGAGGGCGCAGGAAGAGCGGCTCTGCGAGGAAAGGGAAAGGAGAGGCCGCTTCTGGGAAGGGACCC

经亚硫酸氢盐处理的靶标(BT)靶序列(SEQ ID NO: 92)

CGGAGTTAGGAGGGTGGGGTTCGGAGGGCGTAGGAAGAGCGGTTTGCGAGGAAAGGAAAGGAGAGGTCGTTTTTGGGAAGGGATTT

| | | | |
|---|---|---|---|
| SLC12A8 | 正向引物 | TTAGGAGGGTGGGGTTCG | (SEQ ID NO: 93) |
| SLC12A8 | 反向引物 | CTTTCCTCGCAAAACCGC | (SEQ ID NO: 94) |
| SLC12A8 | 探针(臂5) | CCACGGACGGGAGGGCGTAGG/3C6/ | (SEQ ID NO: 95) |

图1(续)

TBX15Reg2
>hg19_dna 范围=chr1:119532813-119532920 链=-

未处理的靶标(UT)靶序列(SEQ ID NO: 96)

GGAAGGAAATTGCGGGTTCCCGTCTGCCTTGTCTCCAGCTTCTCTGCTGAAGCCCGGTAGCAGTGAATGCGCGCTGACTTCAGCGACG
ACTCCTGGAAGCAACGCCA

经亚硫酸氢盐处理的靶标(BT)靶序列(SEQ ID NO: 97)

GGAAGGAAATTGCGGGTTTCGTTTGTTTTTAGTTTTTTGTTGAAGTTCGGTAGTAGTGAATGCGCGTTGATTTTTAGCGACG
ATTTTTGGAAGTAACGTTA

| | | |
|---|---|---|
| TBX15_Reg2 正向引物 | AGGAAATTGCGGGTTTTCG | (SEQ ID NO: 98) |
| TBX15_Reg2 反向引物 | CCAAAAATCGTCGCTAAAAATCAAC | (SEQ ID NO: 99) |
| TBX15_Reg2 探针(臂5) | CCACGGACGCGCGCATTCACT/3C6/ | (SEQ ID NO: 100) |

图1(续)

TSPYL5
>hg19_dna 范围=chr8:98290016-98290134 链=+

未处理的靶标(UT)靶序列(SEQ ID NO: 101)

GCCTTTGCCCCGGTTTTTGGCGCGGGAGGACTTTCGACCCCGACTTCGGCCGCTCATGGTGGCGGCGGAGGCAGCTTCAAAGACACGCT
GTGACCCTGCGGCTCCTGACGCCAGCTCTC

经亚硫酸氢盐处理的靶标(BT)靶序列(SEQ ID NO: 102)

GTTTTGTTTCGGTTTTTGGCGCGGGAGGATTTCGATTTCGATTTCGGTCGTTTATGGTGGCGGCGGAGGTAGTTTTAAAGATACGTT
GTGATTTTGCGGTTTTTTGACGTTAGTTTTT

TSPYL5 正向引物 TTTGTTTCGGTTTTTGGCG (SEQ ID NO: 103)
TSPYL5 反向引物 ACCATAAACGACCGAAATCGA (SEQ ID NO: 104)
TSPYL5 探针(臂5) CCACGGACGGCGGGAGGATTT (SEQ ID NO: 105)

图1(续)

VAV3_877
>hg19_dna 范围=chr1:108507608-108507679 链=-

未处理的靶标(UT)靶序列(SEQ ID NO: 106)

GGGACcGGAGCcGAGCCTAGCGCGGCGCCCGCGACCCGTCAGCCGCGGCTCCTGCTCCCTCGATCCCGCGCG

经亚硫酸氢盐处理的靶标(BT)靶序列(SEQ ID NO: 107)

GGGATCGGAGTCGAGTTTAGCGCGGCGTTCGCGATTCGTTAGTCGCGGTTTTTTTGTTTTTCGATTTCGCGCG

VAV3_877 正向引物 TCGGAGTCGAGTTTAGCGC (SEQ ID NO: 108)
VAV3_877 反向引物 CGAAATCGAAAAAACAAAAACCGC (SEQ ID NO: 109)
VAV3_877 探针(臂1) CGCCGAGGCGGCGTTCGCGA/3C6/ (SEQ ID NO: 110)

VAV3_877 探针(臂5) CCACGGACGCGGCGTTCGCGA/3C6/ (SEQ ID NO: 147)

图1(续)

VAV3_11878
> hg19_dna 范围=chr1: 108507406-108507499

未处理的靶标(UT)靶序列_(SEQ ID NO: 148)

CCGGAGGTTGTTAAGCAGCTGGCAGAGCAGGACTCCATCGCGGAGGGTCTGCGCAAGGTCGAACACCTGAGCCGAGTCCCAGGTCACCC
GGTGGTTGGGCAGCACCTTGCAATGGATGAGCCACTGCGCGCACTGCTTCCACGGCTCCATGCCCGACGGCTC

经亚硫酸氢盐处理的靶标(BT)靶序列_(SEQ ID NO: 149)

TCGGAGGTTGTTAAGTAGTTGGTAGAGTAGGATTTTATCGCGGAGGGTTTGCGTAAGGTCGAATATTTGAGTCGAGTTTTAGGTTATTC
GGTGGTTGGGTAGTATTTTTGTAATGGATGAGTTATTGCGCGTATTGTTTTTACGGTTTTATGTTCGACGGTTT

| | | | |
|---|---|---|---|
| VAV3_11878 | 正向引物 | GAGTCGAGTTTTAGGTTATTCGGT | (SEQ ID NO: 150) |
| VAV3_11878 | 反向引物 | CGTCGAACATAAAACCGTAAAAACAA | (SEQ ID NO: 151) |
| VAV3_11878 | 探针(臂5) | CCACGGACGATACGCGCAATA/3C6/ | (SEQ ID NO: 152) |

图1(续)

VIM
>hg19_dna 范围=chr10:17271438- 172715565 'pad=0 3'pad=0 链=+

未处理的靶标(UT)靶序列(SEQ ID NO: 111)

TGTCCTCGTCCTCCTACCGCAGGATGTTCGGCGGCCCGGGCACCGCGAGCCGGCCGAGCTCCAGCCGGAGCTACGTGACTACGTCCACC
CGCACCTACAGCCTGGGCAGCGCGCTGCGC

经亚硫酸氢盐处理的靶标(BT)靶序列(SEQ ID NO: 112)

TGTTTTCGTTTTTTATCGTAGGATGTTCGGCGGTTCGGGTATCGCGAGTCGGTCGAGTTTTAGTCGGAGTTACGTGATTACGTTTATT
CGTATTTATAGTTTGGGTAGCGCGTTGCGT

| | | |
|---|---|---|
| VIM_REG2 正向引物 | TTTTATCGTAGGATGTTCGGC | (SEQ ID NO: 113) |
| VIM_REG2 反向引物 | TCCGACTAAAACTCGACCGA | (SEQ ID NO: 114) |
| VIM_REG2 探针(臂5) | CCACGGACGCGGTTCGGGTAT/3C6/ | (SEQ ID NO: 115) |

图1(续)

ZDHHC1
>hg19_dna 范围=chr16:67428559-67428628 链=-

未处理的靶标（UT）靶序列（SEQ ID NO: 116）

GGGGCCGGGGCCGACAGCCCACGCTGGCGCGGCAGGCGCGTGCGCCCGCCGTTTTCGTGAGCCCGAGCAG

经亚硫酸氢盐处理的靶标（BT）靶序列（SEQ ID NO: 117）

GGGGTCGGGGTCGATAGTTTACGTTGGCGCGGTAGGCGCGTTCGTCGTTTTTCGTGAGTTCGAGTAG

ZDHHC1 正向引物 GTCGGGGTCGATAGTTTACG （SEQ ID NO: 118）
ZDHHC1 反向引物 ACTCGAACTCACGAAAACG （SEQ ID NO: 119）
ZDHHC1 探针（臂5） CCACGGACGGACGAACGCACG /3C6/ （SEQ ID NO: 120）

图1（续）

ZNF304
>hg19_dna 范围=chr19:57862592-57862691 链=+

未处理的靶标(UT)靶序列(SEQ ID NO: 121)

GCTGCTCTGGGCTGCAGGGGCGAGACTTCTGGCGTCGCCGTCGTGACGTATTTTTCCTATGCCCGGTCCGTGCATTCTGGTTGTGTGAAGG
CTGAGTTCTAG

经亚硫酸氢盐处理的靶标(BT)靶序列(SEQ ID NO: 122)

GTTGTTTTGGGTTGTAGGGGCGAGATTTTTGGCGTCGTCGTCGTGACGTATTTTTTTATGTTCGGTTCGTGTATTTTGGTTGTGAAGG
TTGAGTTTTAG

| | | |
|---|---|---|
| ZNF304 正向引物 | GAGATTTTTGGCGTCGTCG | (SEQ ID NO: 123) |
| ZNF304 反向引物 | CAACCAAAATACACGAACCGAAC | (SEQ ID NO: 124) |
| ZNF304 探针(臂5) | CCACGGACGGTCGTGACGTAT/3C6/ | (SEQ ID NO: 125) |

图1(续)

ZNF568
>hg19_dna 范围=chr19:37407263-37407375 链=-

未处理的靶标(UT)靶序列(SEQ ID NO: 126)

CGTCACCTGCCGGAAACACCCGAATGTTCATCCCGCGCGCAGTTTCTGAGATGCTGGGTGAAGGCGACCCGCAGATAGGTCTGTGACAG
ACGCCTAAGCGCCGAACCATCCC

经亚硫酸氢盐处理的靶标(BT)靶序列(SEQ ID NO: 127)

CGTTATTTGTCGGAAATATTCGAATGTTTATTTCGCGCGTAGTTTTTGAGATGTTGGGTGAAGGCGATTCGTAGATAGGTTTGTGATAG
ACGTTTAAGCGTCGAATTATTT

ZNF568 正向引物 CGGAAATATTCGAATGTTTATTTCGCG (SEQ ID NO: 128)
ZNF568 反向引物 TCACAAACCTATCTACGAATCGC (SEQ ID NO: 129)
ZNF568 探针(臂1) CGCCGAGGGCGTAGTTTTTG/3C6/ (SEQ ID NO: 130)

图1(续)

ZNF671
>hg19_dna 范围=chr19:58238790-58238906 链=+

未处理的靶标(UT)靶序列(SEQ ID NO: 131)

CCGTGGGCGCGGACAGCTGCCGGGAGCGGCAGGCGTCTCGATCGGGACGCAGGCACTTCCGTCCCTGCAGAGCATCAGACGCGTCTCG
GGACACTGGGGACAACATCTCCTCCGCG

经亚硫酸氢盐处理的靶标(BT)靶序列(SEQ ID NO: 132)

TCGTGGGCGCGGATAGTTGTCGGGAGCGGTAGGCGTTTCGATCGGGACGTAGGTATTTTCGTTTTTGTAGAGTATTAGACGCGTTTCG
GGATATTGGGGATAATATTTTTTTCGCG

ZNF671 正向引物 GTTGTCGGGAGCGGTAGG (SEQ ID NO: 133)
ZNF671 反向引物 CCAATATCCCGAAACGCGTCT (SEQ ID NO: 134)
ZNF671 探针(臂5) CCACGGACGGCGTTTCGATCG/3C6/ (SEQ ID NO: 135)

图1(续)

FER1L4
>hg19_dna 范围=chr20:34189490-34189607 链 = -

未处理的靶标(UT)靶序列(SEQ ID NO: 153)

CCCGAATGGAACGAGCAGCTGAGCTTCGTGGAGCTCTTCCCGCCGCTGACGCGCAGCCTCCGCCTGCAGCTGCGGGACGACGCGCCCCT
GGTCGACGCGGCACTCGCTACGCACGTGC

经亚硫酸氢盐处理的靶标(BT)靶序列(SEQ ID NO: 154)

TTCGAATGGAACGAGTAGTTGAGTTTCGTGGAGTTTTTTTCGTCGTTGACGCGTAGTTTCGTTTGTAGTTGCGGGACGACGCGTTTTT
GGTCGACGCGGTATTCGTTACGTACGTGT

FER1L4 正向引物 CGTTGACGCGTAGTTTCG (SEQ ID NO: 155)
FER1L4 反向引物 GTCGACCAAAAACGCGTC (SEQ ID NO: 156)
FER1L4 探针(臂1) CGCCGAGGCGTCCCGCAACT/3C6/ (SEQ ID NO: 157)

图1(续)

斑马鱼 _RASSF1

未处理的靶标(UT)靶序列(SEQ ID NO: 158)

TCTGGACAGGTGGAGCAGAGGAAGGTGGTGCGCATGGTGGGCGAGCGCGTGCGCCTGGAGGACCCCGATTGGCTGACGTGTAAACCAG
GACGAGGACATGACTTT

经亚硫酸氢盐处理的靶标(BT)靶序列(SEQ ID NO: 159)

GAATTCTTTGGATAGGTGGAGTAGAGGGAAGGTGGTGCGTATGGTGGGCGAGCGCGTGCGTTTGGAGGATTTCGATTGGTTGACGTGTA
AATTAGGACGAGGATATGATTTTTAGTTTTGGAATTC

| | | |
|---|---|---|
| ZF_RASSF1_ 正向引物 | TGCGTATGGTGGGCGAG | (SEQ ID NO: 160) |
| ZF_RASSF1_ 反向引物 | CCTAATTTACACGTCAACCAATCGAA | (SEQ ID NO: 161) |
| ZF_RASSF1 探针(臂1) | CGCCGAGGGCGCGTGCGTTT/3C6/ | (SEQ ID NO: 162) |

图1(续)

β-ACTIN
> hg19_dna 范围=chr 7:5568511-5568609 链=-

未处理的靶标(UT)靶序列(SEQ ID NO: 163)

CTCTGACCTGAGTCTCCTTTGGAACTCTGCAGGTTCTATTTGCTTTTTCCCAGATGAGCTCTTTTTCTGGTGTTTGTCTCTCTGACTAG
GTGTCTAAGACAGTGTTGTGGGTGTAGGTACTAACACTGGCTCGTGTGACAAGGCCATGAGGCTGGTGTAAAGCGGCCTTGGAGTGTGT
ATTAAGTAGGTGCACAGTAGGTCTGAACAGACTCCCCATCCCAAGA

| | | |
|---|---|---|
| ACTB_正向引物 | CCATGAGGCTGGTGTAAAG | (SEQ ID NO: 164) |
| ACTB_反向引物 | CTACTGTGCACCTACTTAATACAC | (SEQ ID NO: 165) |
| ACTB 探针(臂1) | CGCCGAGGGCGGCCTTGGAG/3C6/ | (SEQ ID NO: 166) |

经亚硫酸氢盐处理的靶标(BT)靶序列(SEQ ID NO: 167)

TGGTGTTTGTTTTTTTGATTAGGTGTTTAAGATAGTGTTGTGGGTGTAGGTATTAATATTGGTTTGTGTGATAAGGTTATGAGGTTGGT
GTAAAGCGGTTTTGG

| | | |
|---|---|---|
| BTACT_正向引物 65 | GTGTTTGTTTTTTTGATTAGGTGTTTAAGA | (SEQ ID NO: 168) |
| BTACT_反向引物 65 | CTTTACACCAACCTCATAACCTTATC | (SEQ ID NO: 169) |
| BTACT 探针(臂3) | GACGCGGAGATAGTGTTGTGG /3C6/ | (SEQ ID NO: 170) |

图1(续)

| SEQ ID NO. | 描述 | 序列(全部以5'至3'示出) |
|---|---|---|
| SEQ ID NO:1 | ANKRD13B 靶 DNA | GGAGCTACGACGAGCAGCTGCGGCTGGCGATGGAACTGTCGGCGCAGGAGCAGGAGGAGAGGCGGCGGCGCGCGCCA |
| SEQ ID NO:2 | ANKRD13B 经亚硫酸氢盐处理的靶DNA | GGAGGAGGAGGAGCTGGAGCGCATCCTGAG<br>GGAGTTACGACGAGTAGTTGCGGTTGGCGATGGAATTGTCGGCGTAGGAGTAGGAGGAGAGGCGGCGGCGCGCGTTA<br>GGAGGAGGAGGAGTTGGAGCGTATTTTGAG |
| SEQ ID NO:3 | ANKRD13B 正向引物 | AGTTACGACGAGTAGTTGCG |
| SEQ ID NO:4 | ANKRD13B 反向引物 | TCCTCCTACTCCTACGCC |
| SEQ ID NO:5 | ANKRD13B 探针(臂5) | CCACGGACGCGACAATTCCAT/3C6/ |
| SEQ ID NO:6 | B3GALT6 靶 DNA | GGCCACACAGGCCCACTCTGGCCCTCTGAGCCCCCGGCGGACCCAGGGCATTCAAGGAGCGGCTCTGGGCTGCCAGCGCAG<br>GCCTCCGCGCAAACACAGCAGGCTGGAAGTGGCGCTCATCACCGGCACGTCTTCCCAG |
| SEQ ID NO:7 | B3GALT6 经亚硫酸氢盐处理的靶 DNA | GGTTATATAGGTTTATTTTGGTTTTTTGAGTTTTCGGCGGATTTAGGGTATTTAAGGAGCGGTTTTGGGTTGTTAGCGTAGGT<br>TTTCGCGTAAATATAGTAGGTTGGAAGTGGCGTTTATTATCGGTACGTTTTTTTAG |
| SEQ ID NO:8 | B3GALT6 正向引物 | GGTTTATTTTGGTTTTTTGAGTTTTCGG |
| SEQ ID NO:9 | B3GALT6 反向引物 | TCCAACCTACTATATTTACGCGAA |
| SEQ ID NO:10 | B3GALT6 探针(臂5) | CCACGGACG GCGGATTTAGGG/3C6/ |
| SEQ ID NO:11 | CHST2_7890 靶 DNA | CGCTTTCGGCCTCCGTGCGGCGAATTTTCCCACCTCTCTGGCAGCGGTGGATGGGGCACAGCGCGACCCCGCAGCGGCGGC<br>GGCGGCTGCTTCCATCACCGGGAGGATGCCCGGGCGGACAGGCAGCAACCCCCGCCGCTCCGCAGCCTCCG |
| SEQ ID NO:12 | CHST2_7890 经亚硫酸氢盐处理的靶 DNA | GCGGTGGATGGGGTATAGCGCGATTTCGTAGCGGCGGCGGTTGTTTTTATTATCGGGAGGATGTTCGGGCGGATAGCG<br>TAGGTAATTTTCGTCG |
| SEQ ID NO:13 | CHST2_7890 正向引物 | GTATAGCGCGATTTCGTAGCG |
| SEQ ID NO:14 | CHST2_7890 反向引物 | AATTACCTACGCTATCCGCCC |
| SEQ ID NO:15 | CHST2_7890 探针(臂5) | CCACGGACGCGAACATCCTCC/3C6/ |
| SEQ ID NO:175 | CHST2_7890 探针(臂1) | CGCCGAGGCGAACATCCTCC/3C6/ |
| SEQ ID NO:136 | CHST2_7889 靶 DNA | TCACCAACTCTTTCTGAGAGCAAAAACATGGGGCCGAGTCCGGCAGCTGCACGCAGAATCCAACTCTCTGGCAGCTCTCGGC<br>ACCGACGAGCTCCAGATCCCGCGTTCGCATCCCGGCGCTTTGCGCGCAGAGCTAAGCCTTCGGACCCGTGGA |
| SEQ ID NO:137 | CHST2_7889 经亚硫酸氢盐处理的靶 DNA | TATGGGGTCGAGTTCGGTAGTTGTACGTAGAATTTAATTTTTTGGTAGTTTTCGGTATCGACGAGTTTTAGATTTCGCGTTCG<br>TATTTCGGCGTTTTGC |
| SEQ ID NO:138 | CHST2_7889 正向引物 | CGAGTTCGGTAGTTGTACGTAGA |
| SEQ ID NO:139 | CHST2_7889 反向引物 | CGAAATACGAACGCGAAATCTAAAACT |
| SEQ ID NO:140 | CHST2_7889 探针(臂5) | CCACGGACGTCGTCGATACCG/3C6/ |
| SEQ ID NO:176 | CHST2_7889 探针(臂1) | CGCCGAGGTCGTCGATACCG/3C6/ |

图2

| SEQ ID NO. | 描述 | 序列(全部以5'至3'示出) |
|---|---|---|
| SEQ ID NO:16 | CNNM1(806)靶DNA | CTGCACCCAGCGCAGCTGCACGTGATACTGCAGGAAGCCGAGCGAGAGCTGGAGGGAGGAGGAGCCGGAGCTGGGAACCC AGCCGCAGGCAGGTCACCACGTGTACGCCC |
| SEQ ID NO:17 | CNNM1(806)经亚硫酸氢盐处理的靶DNA | TTGTATTTAGCGTAGTTGTACGTGATATTGTAGGAAGTCGAGCGAGAGTTGGAGGGAGGAGGAAGTCGGAGTTGGGAATTTA GTCGTAGGTAGGTTATTACGTGTACGTTT |
| SEQ ID NO:18 | CNNM1(806)正向引物 | CGTAGTTGTACGTGATATTGTAGGAA |
| SEQ ID NO:19 | CNNM1(806)反向引物 | GACTAAATTCCCAACTCCGACT |
| SEQ ID NO:20 | CNNM1(806)探针(臂5) | CCACGGACGAGTCGAGCGAGA/3C6/ |
| SEQ ID NO:21 | DOCK2靶DNA | GCCGGCCCCGCAGCATCCTCCTGCTCGCGGCTCTCCCGCCACCTGTCCCGCTCCCTGCCGCGCCCTGGGGCCCGCACCTACCC AC |
| SEQ ID NO:22 | DOCK2经亚硫酸氢盐处理的靶DNA | GTCGGTTTCGTAGTATTTTTTTTGTTCGCGGTTTTTTCGTTATTTGTTTCGTTTTTTGTCGCGTTTTGGGGTTCGTATTTATTTTAT |
| SEQ ID NO:23 | DOCK2正向引物 | CGGTTTCGTAGTATTTTTTTGTTCG |
| SEQ ID NO:24 | DOCK2反向引物 | GAACCCCAAAACGCGAC |
| SEQ ID NO:25 | DOCK2探针(臂1) | CGCCGAGGGCGGTTTTTCG/3C6/ |
| SEQ ID NO:26 | DTX1靶DNA | CGCCTCCTGGGCTCCCCCCGGAGTGGGAGGGAGCCGCGGTCCGCCTCCGCGCCCGTTCCCTCCCAGGCCCCTCGGCCGCCG CGCCGAGCTTTCCGCCGCGTGGACAGACTGCCCGGCCGACGGAACGGACGCAGG |
| SEQ ID NO:27 | DTX1经亚硫酸氢盐处理的靶DNA | CGTTTTTGGGTTTTTTTCGGAGTGGGAGGGAGTCGCGGTTTCGTTTCGCGTTCGTTTTTTTTTTAGGTTTTTCGGTCGTCGCG TCGAGTTTTTCGCGCGTGGATAGATTGTTCGGTCGACGGACGGAACGTAGG |
| SEQ ID NO:28 | DTX1正向引物 | AGGGAGTCGCGGTTTCG |
| SEQ ID NO:29 | DTX1反向引物 | GCGACGACCGAAAAACCT |
| SEQ ID NO:30 | DTX1探针(臂1) | CGCCGAGGGTTTTCGCGTTC/3C6/ |
| SEQ ID NO:31 | FERMT3靶DNA | TAGCAGCAGCCGCAGCCATGGCGGGGATGAAGACAGCCTCCGGGGACTACATCGACTCGTCATGGGAGCTGCGGGTGTTTG TGGGAGAGGAGGACCCAGAGGCCGAGTCGGTCACCCTGCGGGTCACTGGGGAGTCGCAC |
| SEQ ID NO:32 | FERMT3经亚硫酸氢盐处理的靶DNA | TAGTAGTAGTCGTAGTTATGGCGGGGATGAAGATAGTTTTCGGGGATTATATCGATTCGTTATGGGAGTTGCGGGTGTTTGT GGGAGAGGAGGATTTAGAGGTCGAGTCGGTTATTTTGCGGGTTATTGGGGAGTCGTAT |
| SEQ ID NO:33 | FERMT3正向引物 | GTTTTCGGGGATTATATCGATTCG |
| SEQ ID NO:34 | FERMT3反向引物 | CCCAATAACCCGCAAAATAACC |
| SEQ ID NO:35 | FERMT3探针(臂1) | CGCCGAGGCGACTCGACCTC/3C6/ |

图2(续)

| SEQ ID NO. | 描述 | 序列 (全部以5'至3'示出) |
|---|---|---|
| SEQ ID NO:36 | FLI1 靶 DNA | AGGGGCTGcGAGGTCAGGCTGTAACCGGGTCAATGTGTGGAATATTGGGGGGCTCGGCTGCAGACTTGGCCAAATGGACG<br>GGACTATTAAGGTAAGcGGCGGGGCAAC |
| SEQ ID NO:37 | FLI1 经亚硫酸氢盐处理的靶 DNA | AGGGGTTGcGAGGTTAGGTTGTAATCGGGTTAATGTGTGGAATATTGGGGGGTTCGGTTGTAGATTTGGTTAAATGGACGG<br>GATTATTAAGGTAAGcGGCGGGGGTAAC |
| SEQ ID NO:38 | FLI1 正向引物 | GGTTGCGAGGTTAGGTTGTAA |
| SEQ ID NO:39 | FLI1 反向引物 | TCCATTTAACCAAATCTACAACCGA |
| SEQ ID NO:40 | FLI1 探针 (臂 1) | CGCCGAGGATCGGGTTAATG/3C6/ |
| SEQ ID NO:41 | GRIN2D 靶 DNA | CGCCCCCTCACCTCCCCGATCATGCCGTTCCAGACGCCATCGATCTTCTTTCCGTGCTTGCCATTGGTGACCAGGTAGAGGTC<br>GTAGCTGAAGCCGATGGTATGCGCCAGCCGCTTCAGAATGTCGATGCAGAAACCCTTG |
| SEQ ID NO:42 | GRIN2D 经亚硫酸氢盐处理的靶 DNA | CGTTTTTTATTTTTTCGATTATGTCGTTTTAGACGTTATCGATTTTTTTTTCGTGTTTGTTATTGGTGATTAGGTAGAGGTCGT<br>AGTTGAAGTCGATGGTATGCGTTAGTCGTTTTAGAATGTCGATGTAGAAATTTTTG |
| SEQ ID NO:43 | GRIN2D 正向引物 | TCGATTATGTCGTTTTAGACGTTATCG |
| SEQ ID NO:44 | GRIN2D 反向引物 | TCTACATCGACATTCTAAAACGACTAAC |
| SEQ ID NO:45 | GRIN2D 探针 (臂 5) | CCACGGACGCGCATACCATCG/3C6/ |
| SEQ ID NO:46 | JAM3 靶 DNA | GAGCCGGAGTCGCGGTGGCCGCCTCAGCGCCATGTCGAGGGTTGCTGAGGGGCCAGCGGCAGCGCGGCGGCTTGTAGT<br>CCCCGCGCGCATGCGCCCAGCCTG |
| SEQ ID NO:47 | JAM3 经亚硫酸氢盐处理的靶 DNA | GAGTCGGAGTCGCGGTGGTCGTTTTAGCGTTATGTCGAGGGTTGTTGAGGGGTTAGCGGTAGCGCGGCGCGGTTTGTAGTT<br>TTCGCGCGTATGCGTTTAGTTTG |
| SEQ ID NO:48 | JAM3 正向引物 | TGGTCGTTTTAGCGTTATGTCG |
| SEQ ID NO:49 | JAM3 反向引物 | CGAAAACTACAAACCGCGC |
| SEQ ID NO:50 | JAM3 探针 (臂 5) | CCACGGACGCCGCGCTACCGC/3C6/ |
| SEQ ID NO:51 | LRRC4 靶 DNA | GGCGCGGCGCTGGAAGGCGCCGGCGTTAACCCCGCGAGGCAGGCGACGGAGGGGGGAGCGGCGCTAATACATAAGAGCAC<br>TGCATCACGCTAATCTTC |
| SEQ ID NO:52 | LRRC4 经亚硫酸氢盐处理的靶 DNA | GGCGCGGCGTTGGAAGGCGTCGGCGTTAATTTCGCGAGGTAGGCGACGGAGGGGGAGCGGCGTTAATATATAAGAGTATT<br>GTATTACGTTAATTTTT |
| SEQ ID NO:53 | LRRC4 正向引物 | GCGTTAATTTCGCGAGGTA |
| SEQ ID NO:54 | LRRC4 反向引物 | ACAATACTCTTATATATTAACGCCGCTC |
| SEQ ID NO:55 | LRRC4 探针 (臂 1) | CGCCGAGGAGGCGACGGAGG/3C6/ |
| SEQ ID NO:56 | OPLAH 靶 DNA | CTGTCAGTGCTGACCGAGCGCCGCGCCTTCCGGCCATACGGGCTCCACGGTGCGCGGTTCCCCAGCCCTCGCGGCCCTCCCC<br>GCCCCCG |
| SEQ ID NO:57 | OPLAH 经亚硫酸氢盐处理的靶 DNA | TTGTTAGTGTTGATCGAGCGTCGCGTTTTTCGGTTATACGGGTTTTACGGTGCGCGGTTTTTTAGTTTTCGCGGTTTTTTTCGT<br>TTTCG |
| SEQ ID NO:58 | OPLAH 正向引物 | CGTCGCGTTTTTCGGTTATACG |
| SEQ ID NO:59 | OPLAH 反向引物 | CGCGAAAACTAAAAAACCGCG |
| SEQ ID NO:60 | OPLAH 探针 (臂 5) | CCACGGACGGCACCGTAAAAC/3C6/ |

图2(续)

| SEQ ID NO. | 描述 | 序列(全部以5'至3'示出) |
|---|---|---|
| SEQ ID NO:61 | PDGFD 靶 DNA | CGGAGGGGGCGAACAAACAAACGTCAACCTGTTGTTTGTCCGTCACCATTTATCAGCTCAGCACCACACAAGGAAGTGCGGCA |
| SEQ ID NO:62 | PDGFD 经亚硫酸氢盐处理的靶 DNA | CCCACACGCGCTCGGAAAGTTCAGCATGCAGGAAGTTTGGGGAGAGCTCGGCGATT |
| SEQ ID NO:63 | PDGFD 正向引物 | AGGGGGCGAATAAATAAACGTTAATTTGTTGTTTCGTTATTATTTATTTAGTTTAGTATTATAAGGAAGTGCGGTATTTTAT |
| SEQ ID NO:64 | PDGFD 反向引物 | ACGCGTTCGGAAAGTTTAGTATGTAGG |
| SEQ ID NO:65 | PDGFD 探针(臂 5) | GCGAATAAATAAACGTTAATTTGTTGTTTCG |
| SEQ ID NO:66 | PKIA 靶 DNA | ACTTTCCGAACGCGTATAAATACC |
| SEQ ID NO:67 | PKIA 经亚硫酸氢盐处理的靶 DNA | CCACGGACGCGCACTTCCTTA/3C6/ |
| SEQ ID NO:68 | PKIA 正向引物 | CCGGCGCGAGCTGACCGAGCACTCGGCGGGCGCGGCGGGACTGCGGCCCGTGGCGGCGTGCGCGGGGACCTGCGCTGACT |
| SEQ ID NO:69 | PKIA 反向引物 | AGGTC |
| SEQ ID NO:70 | PKIA 探针(臂 5) | TCGGCGCGAGTTGATCGAGTATTCGGCGGGCGCGGCGGGATTGCGGTTCGTGGCGGCGTGCGCGGGGATTTGCGTTGATT |
| SEQ ID NO:71 | PPP2R5C 靶 DNA | AGGTT |
| SEQ ID NO:72 | PPP2R5C 经亚硫酸氢盐处理的靶 DNA | GCGAGTTGATCGAGTATTCGG |
| SEQ ID NO:73 | PPP2R5C 正向引物 | CTAATCAACGCAAATCCCCGC |
| SEQ ID NO:74 | PPP2R5C 反向引物 | CCACGGACGCGCACGCCGCCA/3C6/ |
| SEQ ID NO:75 | PPP2R5C 探针(臂 1) | TGCGCGTGGGGCCAGGCTCGACCTCACTCCTGTTGTCGCTGCAGACCCGCGTGGGCTCCCGCCGGGCCCTCCTGCCGCCCCC |
| SEQ ID NO:76 | QKI 靶 DNA | CAGCCTCCCCGCCCCTGCCCTT |
| SEQ ID NO:77 | QKI 经亚硫酸氢盐处理的靶 DNA | TGCGCGTGGGGTTAGGTTCGATTTTATTTTTGTTGTCGTTGTAGATTCGCGTGGGTTTTCGTCGGGTTTTTTTGTCGTTTTTTA |
| SEQ ID NO:78 | QKI 正向引物 | GTTTTTTCGTTTTTGTTTTT |
| SEQ ID NO:79 | QKI 反向引物 | TTCGATTTTATTTTTGTTGTCGTTGTAGA |
| SEQ ID NO:80 | QKI 探针(臂 1) | ACGACAAAAAAACCCGACG |
| SEQ ID NO:81 | SEP9R092 靶 DNA | CGCCGAGGATTCGCGTGGGT/3C6/ |
| SEQ ID NO:82 | SEP9R092 经亚硫酸氢盐处理的靶 DNA | GCCGAGGGCGCCCGGCGCAGAGGCCCGCAGAGGCGGACGCCGCGGCACGCGCCTCGAAAAGCCTCAAACTCTTATCCTCGG |
| SEQ ID NO:83 | SEP9R092 正向引物 | CTCT |
| SEQ ID NO:84 | SEP9R092 反向引物 | GTCGAGGGCGTTCGGCGTAGAGTTTCGTAGAGGCGGACGTCGCGGTACGCGTTTCGAAAAGTTTTTAAATTTTTATTTTCGGT |
| SEQ ID NO:85 | SEP9R092 探针(臂 1) | TTT |
| | | GTTCGGCGTAGAGTTTCGTAGA |
| | | GAAAATAAAAATTTAAAACTTTTCGAAACGCG |
| | | CGCCGAGGGTACCGCGACGT/3C6/ |
| | | TCGGTGCTCCCGGCCCACGGGCTGCACAACTTGGCGGCCCCGAAACTGGCGTGGGGGAGGGGCGCTGTCCACCCGAGC |
| | | AGGACGCGGCTGTCCACTCAGTCGGAGGTGAGG |
| | | TCGGTGTTTTCGGTTTACGGGTTGTATAATTTGGCGGTTTCGAAATTGGCGTGGGGGAGGGGAGGGTTGTTTATTCGAGTAG |
| | | GACGCGGTTGTTTATTTAGTCGGAGGTGAGG |
| | | CGGGTTGTATAATTTGGCGG |
| | | AACCGCGTCCTACTCGA |
| | | CGCCGAGGGTTTCGAAATTG/3C6/ |

图2(续)

| SEQ ID NO. | 描述 | 序列 (全部以 5' 至 3' 示出) |
|---|---|---|
| SEQ ID NO:86 | SFMBT2_897 靶 DNA | GTCGCCGCCCGGGAGGGCACCGGCCTCGCTCGCTTGCTCGCTCGCCCGCCCTTGCCCGCTCGCTCCCCGCCCGGCCGCCTCCCT |
| SEQ ID NO:87 | SFMBT2_897 经亚硫酸氢盐处理的靶 DNA | CGCGCGCCCGCTCCGGTCCTCCGGCTCCC<br>GTCGTCGTTCGGGAGGGTATCGGTTTCGTTCGTTTGTTCGTTCGTTTTTCGTTTCGTTTTTCGTTCGTCGT |
| SEQ ID NO:88 | SFMBT2_897 正向引物 | GTCGTCGTTCGAGAGGGTA |
| SEQ ID NO:89 | SFMBT2_897 反向引物 | GAACAAAAACGAACGAACGAACA |
| SEQ ID NO:90 | SFMBT2_897 探针 (臂 5) | CCACGGACGATCGGTTTCGTT/3C6/ |
| SEQ ID NO:141 | SFMBT2_897 探针 (臂 1) | CGCCGAGGATCGGTTTCGTT/3C6/ |
| SEQ ID NO:142 | SFMBT2_895 靶 DNA | CGGGCGCAGCCTGTCCCCTCCCGCCGCCCACCTTCCTCGTTTCTGCACTCATTTTAGCGACGCAGCCGCCGCTGCTACCTACCC<br>CGCGCTCCCGCGTCTCCTCCGCGCTGGGGTCTCCCCTTTCTTTTGGTTTGGGTGGGGAGAAAAAAGATGGTG |
| SEQ ID NO:143 | SFMBT2_895 经亚硫酸氢盐处理的靶 DNA | GTATTTATTTTAGCGACGTAGTCGTCGTTGTTATTTATTTCGCGTTTTTCGCGTTTTTTTCGCGTTGGGGTTTTTTTT |
| SEQ ID NO:144 | SFMBT2_895 正向引物 | GCGACGTAGTCGTCGTTGT |
| SEQ ID NO:145 | SFMBT2_895 反向引物 | CCAACGCGAAAAAAACGCG |
| SEQ ID NO:146 | SFMBT2_895 探针 (臂 1) | CGCCGAGGGAAAACGCGAAA/3C6/ |
| SEQ ID NO:91 | SLC12A8 未处理的靶标 DNA | CGGAGCTAGGAGGGTGGGGCTCGGAGGGCGCAGGAAGAGCGGCTCTGCGAGGAAAGGGAAAGGGAAGAGGCGGCTTCTGC<br>GAAGGGACCC |
| SEQ ID NO:92 | SLC12A8 经亚硫酸氢盐处理的靶 DNA | CGGAGTTAGGAGGGTGGGGTTCGGAGGGCGTAGGAAGAGCGGTTTTGCGAGGAAAGGGAAAGGGAGAGGTCGTTTTTGGGC<br>AAGGGATTT |
| SEQ ID NO:93 | SLC12A8 正向引物 | TTAGGAGGGTGGGGTTCG |
| SEQ ID NO:94 | SLC12A8 反向引物 | CTTTCCTCGCAAAACCGC |
| SEQ ID NO:95 | SLC12A8 探针 (臂 5) | CCACGGACGGGAGGGCGTAGG/3C6/ |
| SEQ ID NO:96 | TBX15Reg2 靶 DNA | GGAAGGAAATTGCGGGTTCCCGTCTGCCTTGTCTCCAGCTTCTCTGCTGAAGCCCGGTAGCAGTGAATGCGCGCTGACTTTC<br>AGCGACGACTCCTGGAAGCAACGCCA |
| SEQ ID NO:97 | TBX15Reg2 经亚硫酸氢盐处理的靶 DNA | GGAAGGAAATTGCGGGTTTCGTTTGTTTTGTTTTTAGTTTTTTTGTTGAAGTTCGGTAGTAGTGAATGCGCGTTGATTTTTAG<br>CGACGATTTTTGGAAGTAACGTTA |
| SEQ ID NO:98 | TBX15Reg2 正向引物 | AGGAAATTGCGGGTTTTCG |
| SEQ ID NO:99 | TBX15Reg2 反向引物 | CCAAAAATCGTCGCTAAAAATCAAC |
| SEQ ID NO:100 | TBX15Reg2 探针 (臂 5) | CCACGGACGCGCGCATTCACT/3C6/ |
| SEQ ID NO:101 | TSPYL5 靶 DNA | GCCTTTGCCCCGGTTTTTGGCGCGGGAGGACTTTCGACCCGAGTTCGGCCGCTCATGGTGGCGGCGGAGGCAGCTTCAAAG<br>ACACGCTGTGACCCTGCGGCTCCTGACGCCAGCTCTC |
| SEQ ID NO:102 | TSPYL5 经亚硫酸氢盐处理的靶 DNA | GTTTTTGTTTCGGTTTTTGGCGCGGGAGGATTTTCGATTTCGATTTCGGTCGTTTATGGTGGCGGCGGAGGTAGTTTTAAAGA<br>TACGTTGTGATTTTGCGGTTTTTGACGTTAGTTTTT |
| SEQ ID NO:103 | TSPYL5 正向引物 | TTTGTTTCGGTTTTTGGCG |
| SEQ ID NO:104 | TSPYL5 反向引物 | ACCATAAACGACCGAAATCGA |

图2 (续)

| SEQ ID NO. | 描述 | 序列(全部以5'至3'示出) |
|---|---|---|
| SEQ ID NO:105 | TSPYL5 探针(臂5) | CCACGGACGGCGGGAGGATTT |
| SEQ ID NO:106 | VAV3_877 靶DNA | GGGACcGGAGCcGAGCCTAGCGCGGCGCCCGCGACCCGTCAGCCGCGGCTCCTGCTCCCTCGATCCCGCGCG |
| SEQ ID NO:107 | VAV3_877 经亚硫酸氢盐处理的靶DNA | GGGATCGGAGTCGAGTTTAGCGCGGCGTTCGCGATTCGTTAGTCGCGGTTTTTGTTTTTTCGATTTCGCGCG |
| SEQ ID NO:108 | VAV3_877 正向引物 | TCGGAGTCGAGTTTAGCGC |
| SEQ ID NO:109 | VAV3_877 反向引物 | CGAAATCGAAAAAACAAAAACCGC |
| SEQ ID NO:110 | VAV3_877 探针(臂1) | CGCCGAGGCGGCGGTTCGCGA/3C6/ |
| SEQ ID NO:147 | VAV3_877 探针(臂5) | CCACGGACGCGGCGTTCGCGA/3C6/ |
| SEQ ID NO:148 | VAV3_11878 靶DNA | CCGGAGGTTGTTAAGCAGCTGGCAGAGCAGGACTCCATCGCGGAGGGTCTGCGCAAGGTCGAACACCTGAGCCGAGTCCCA<br>GGTCACCCGGTGGTTGGTGGGCAGCACCTTGCAATGGATGAGCCACTGCGCGCACTGCTTCCACGGCTCCATGCCCGACGGC<br>TC |
| SEQ ID NO:149 | VAV3_11878 经亚硫酸氢盐处理的靶DNA | TCGGAGGTTGTTAAGTAGTTGGTAGAGTAGGGATTTTATCGCGGAGGGTTTGCGTAAGGTCGAATATTTGAGTCGAGTTTTAG<br>GTTATTCGGTGGTTGGTGGGTAGTATTTTGTAATGGATGAGTTATTGCGCGTATTGTTTTTACGGTTTTATGTTCGACGGTTT |
| SEQ ID NO:150 | VAV3_11878 正向引物 | GAGTCGAGTTTTAGGTTATTCGGT |
| SEQ ID NO:151 | VAV3_11878 反向引物 | CGTCGAACATAAAACCGTAAAAACAA |
| SEQ ID NO:152 | VAV3_11878 探针(臂5) | CCACGGACGATACGCGCAATA/3C6/ |
| SEQ ID NO:111 | VIM 靶DNA | TGTCCTCGTCCTCCTACCGCAGGATGTTCGGCGGCCCGGGCACCGCGAGCCGGCCGAGCTCCAGCCGGAGCTACGTGACTAC<br>GTCCACCCGCACCTACAGCCTGGGCAGCGCGCTGCGC |
| SEQ ID NO:112 | VIM 经亚硫酸氢盐处理的靶DNA | TGTTTTCGTTTTTTTATCGTAGGATGTTCGGCGGTTCGGGTATCGCGAGTCGGTCGAGTTTTAGTCGGAGTTACGTGATTACG<br>TTTATTCGTATTTATAGTTTGGGTAGCGCGTTGCGT |
| SEQ ID NO:113 | VIM 正向引物 | TTTTATCGTAGGATGTTCGGC |
| SEQ ID NO:114 | VIM 反向引物 | TCCGACTAAAACTCGACCGA |
| SEQ ID NO:115 | VIM 探针(臂5) | CCACGGACGCGGTTCGGGTAT/3C6/ |
| SEQ ID NO:116 | ZDHHC1 靶DNA | GGGGCCGGGGCCGACAGCCCACGCTGGCGCGGCAGGCGCGTGCGCCCGCCGTTTCGTGAGCCCGAGCAG |
| SEQ ID NO:117 | ZDHHC1 经亚硫酸氢盐处理的靶DNA | GGGGTCGGGGTCGATAGTTTACGTTGGCGCGGTAGGCGCGTGCGTTCGTCGTTTTCGTGAGTTCGAGTAG |
| SEQ ID NO:118 | ZDHHC1 正向引物 | GTCGGGGTCGATAGTTTACG |
| SEQ ID NO:119 | ZDHHC1 反向引物 | ACTCGAACTCACGAAAACG |
| SEQ ID NO:120 | ZDHHC1 探针(臂5) | CCACGGACGGACGAACGCACG /3C6/ |
| SEQ ID NO:121 | ZNF304 靶DNA | GCTGCTCTGGGCTGCAGGGGCGAGACTTCTGGCGTCGCCGTCGTGACGTATTTTTCCTATGCCCGGTCCGTGCATTCTGGTT<br>GTGAAGGCTGAGTTCTAG |
| SEQ ID NO:122 | ZNF304 经亚硫酸氢盐处理的靶DNA | GTTGTTTTGGGTTGTAGGGGCGAGATTTTTGGCGTCGTCGTCGTGACGTATTTTTTTTATGTTCGGTTCGTGTATTTTGGTTGT<br>GAAGGTTGAGTTTTAG |
| SEQ ID NO:123 | ZNF304 正向引物 | GAGATTTTTGGCGTCGTCG |
| SEQ ID NO:124 | ZNF304 反向引物 | CAACCAAAATACACGAACCGAAC |

图2(续)

| SEQ ID NO. | 描述 | 序列(全部以5'至3'示出) |
|---|---|---|
| SEQ ID NO:125 | ZNF304 探针(臂5) | CCACGGACGGTCGTGACGTAT/3C6/ |
| SEQ ID NO:126 | ZNF568靶DNA | CGTCACCTGCCGGAAACACCCGAATGTTCATCCCGCGCGCAGTTTCTGAGATGCTGGGTGAAGGCGACCCGCAGATAGGTCT<br>GTGACAGACGCCTAAAGCGCCGAACCATCCC |
| SEQ ID NO:127 | ZNF568经亚硫酸氢盐处理的靶DNA | CGTTATTTGTCGGAAATATTCGAATGTTTATTTCGCGCGTAGTTTTTGAGATGTTGGGTGAAGGCGATTCGTAGATAGGTTTG<br>TGATAGACGTTTAAAGCGTCGAATTATTTT |
| SEQ ID NO:128 | ZNF568正向引物 | CGGAAATATTCGAATGTTTATTTCGCG |
| SEQ ID NO:129 | ZNF568反向引物 | TCACAAACCTATCTACGAATCGC |
| SEQ ID NO:130 | ZNF568探针(臂1) | CGCCGAGGGCGTAGTTTTTG/3C6/ |
| SEQ ID NO:131 | ZNF671靶DNA | CCGTGGGCGCGGACAGCTGCCGGGAGCGGCAGGCGTCTCGATCGGGGACGCAGGCACTTCCGTCCCTGCAGAGCATCAGA<br>CGCGTCTCGGGACACTGGGGACAACATCTCCTCCGCG |
| SEQ ID NO:132 | ZNF671经亚硫酸氢盐处理的靶DNA | TCGTGGGCGCGGATAGTTGTCGGGAGCGGTAGGCGTTTCGATCGGGGACGTAGGTATTTTCGTTTTTGTAGAGTATTAGAC<br>GCGTTTCGGGATATTGGGGATAATATTTTTTTCGCG |
| SEQ ID NO:133 | ZNF671正向引物 | GTTGTCGGGAGCGGTAGG |
| SEQ ID NO:134 | ZNF671反向引物 | CCAATATCCCGAAACGCGTCT |
| SEQ ID NO:135 | ZNF671探针(臂5) | CCACGGACGGCGTTTCGATCG/3C6/ |
| SEQ ID NO:153 | FER1L4靶DNA | CCCGAATGGAACGAGCAGCTGAGCTTCGTGGAGCTCTTCCCGCCGCTGACGCGCAGCCTCCGCCTGCAGCTGCGGGACGAC<br>GCGCCCCTGGTCGACGCGGCACTCGCTACGCACGTGC |
| SEQ ID NO:154 | FER1L4经亚硫酸氢盐处理的靶DNA | TTCGAATGGAACGAGTAGTTGAGTTTCGTGGAGTTTTTTTCGTCGTTGACGCGTAGTTTTCGTTTGTAGTTGCGGGACGACGC<br>GTTTTTGGTCGACGCGGTATTCGTTACGTACGTGT |
| SEQ ID NO:155 | FER1L4正向引物 | CGTTGACGCGTAGTTTTCG |
| SEQ ID NO:156 | FER1L4反向引物 | GTCGACCAAAAACGCGTC |
| SEQ ID NO:157 | FER1L4探针(臂1) | CGCCGAGGCGTCCCGCAACT/3C6/ |
| SEQ ID NO:158 | 斑马鱼RASSF1靶DNA | TCTGGACAGGTGGAGCAGAGGGAAGGTGGTGCGCATGGTGGGCGAGCGCGTGCGCCTGGAGGACCCCGATTGGCTGACGT<br>GTAAACCAGGACGAGGACATGACTTT |
| SEQ ID NO:159 | 斑马鱼RASSF1经亚硫酸氢盐处理的靶DNA | GAATTCTTTGGATAGGTGGAGTAGAGGGAAGGTGGTGCGTATGGTGGGCGAGCGCGTGCGTTTGGAGGATTTCGATTGGT<br>TGACGTGTAAATTAGGACGAGGATATGATTTTTAGTTTTGGAATTC |
| SEQ ID NO:160 | 斑马鱼RASSF1正向引物 | TGCGTATGGTGGGCGAG |
| SEQ ID NO:161 | 斑马鱼RASSF1反向引物 | CCTAATTTACACGTCAACCAATCGAA |
| SEQ ID NO:162 | 斑马鱼RASSF1探针(臂1) | CGCCGAGGGCGCGTGCGTTT/3C6/ |
| SEQ ID NO:163 | β-肌动蛋白靶DNA (ACTB) | CTCTGACCTGAGTCTCCTTTGGAACTCTGCAGGTTCTATTTGCTTTTTCCCAGATGAGCTCTTTTTCTGGTGTTTGTCTCTCTGA<br>CTAGGTGTCTAAGACAGTGTTGTGGGTGTAGGTACTAACACTGGCTCGTGTGACAAGGCCATGAGGCTGGTGTAAAGCGGC<br>CTTGGAGTGTGTATTAAGTAGGTGCACAGTAGGTCTGAACAGACTCCCCATCCCAAGA |
| SEQ ID NO:164 | β-肌动蛋白(ACTB)正向引物 | CCATGAGGCTGGTGTAAAG |
| SEQ ID NO:165 | ACTB反向引物 | CTACTGTGCACCTACTTAATACAC |
| SEQ ID NO:166 | ACTB探针(臂1) | CGCCGAGGGCGGCCTTGGAG/3C6/ |

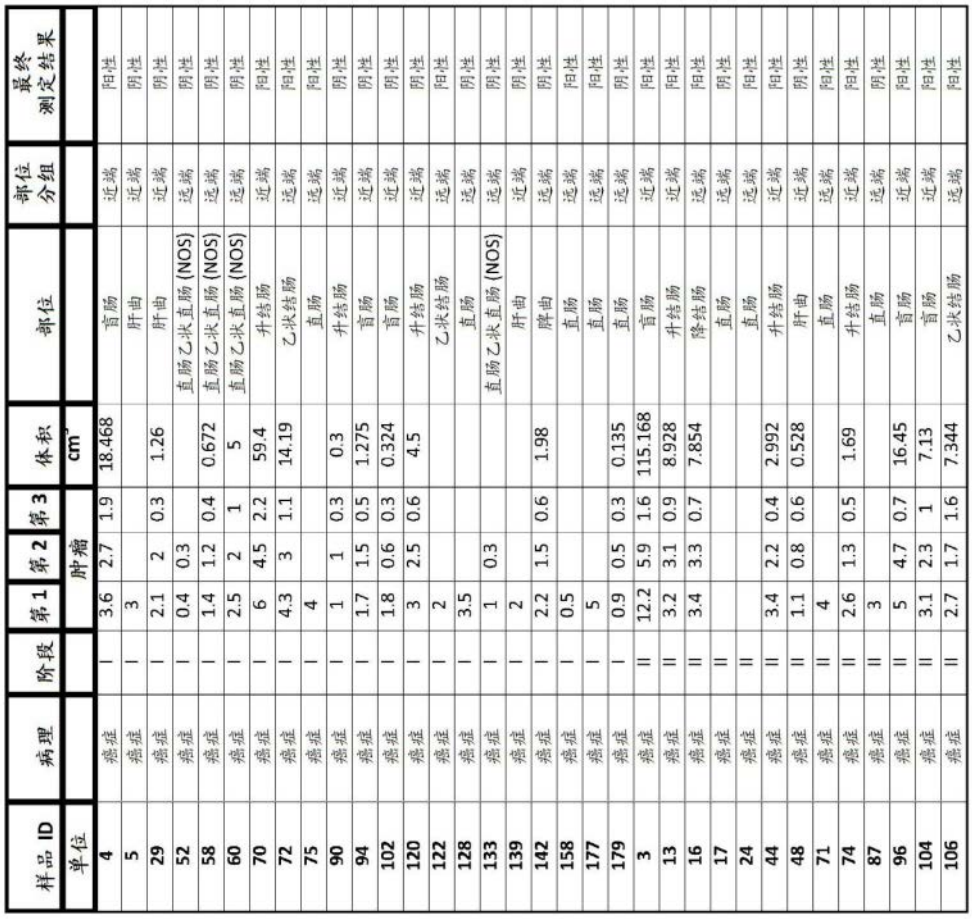
图2(续)

| SEQ ID NO. | 描述 | 序列 (全部以5'至3'示出) |
|---|---|---|
| SEQ ID NO:167 | β-肌动蛋白经亚硫酸氢盐处理的(BTACT)靶DNA | TGGTGTTTGTTTTTTTGATTAGGTGTTTAAGATAGTGTTGTGGGTGTAGGTATTAATATTGGTTTGTGTGATAAGGTTATGAG GTTGGTGTAAAGCGGTTTTGG |
| SEQ ID NO:168 | β-肌动蛋白经亚硫酸氢盐处理的(BTACT)正向引物 | GTGTTTGTTTTTTTTGATTAGGTGTTTTAAGA |
| SEQ ID NO:169 | BTACT反向引物 | CTTTACACCAACCTCATAACCTTATC |
| SEQ ID NO:170 | BTACT探针(臂3) | GACGCGGAGATAGTGTTGTGG/3C6/ |
| SEQ ID NO:171 | 臂1 FRET盒HEX | /HEX/TCT/BHQ-1/AGCCGGTTTTCCGGCTGAGACCTCGGCG/3C6/ |
| SEQ ID NO:172 | 臂5 FRET盒FAM | /FAM/TCT/BHQ-1/AGCCGGTTTTCCGGCTGAGACGTCCGTGG/3C6/ |
| SEQ ID NO:173 | 臂3 FRET盒QUASAR-670 | /Q670/TCT/BHQ-2/AGCCGGTTTTCCGGCTGAGACTCCGCGTC/3C6/ |
| SEQ ID NO:174 | 臂1 FRET盒QUASAR-670 | /Q670/TCT/BHQ-2/AGCCGGTTTTCCGGCTGAGACCTCGGCG/3C6/ |

图2(续)

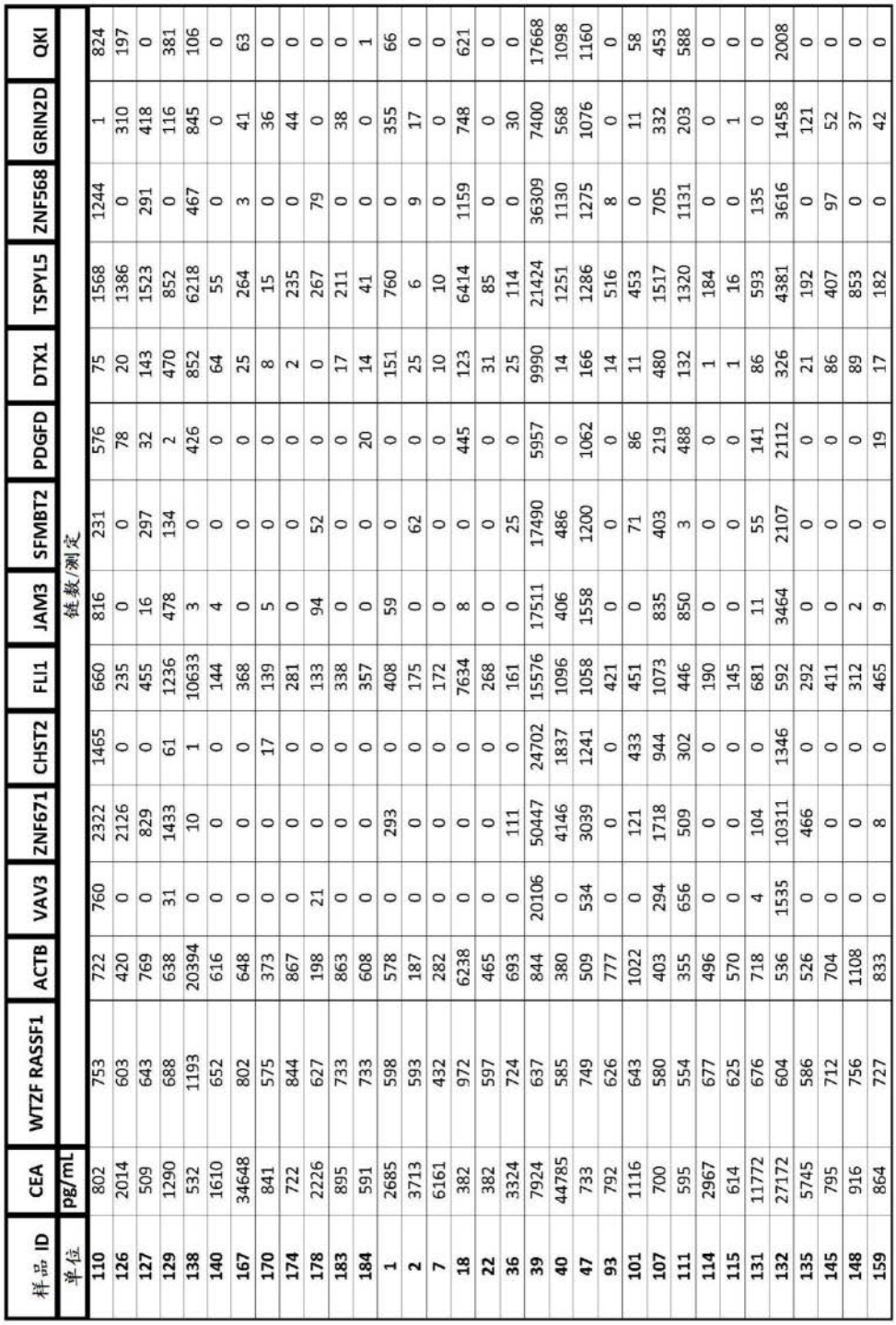
| 样品 ID | CEA | WTZF RASSF1 | ACTB | VAV3 | ZNF671 | CHST2 | FLI1 | JAM3 | SFMBT2 | PDGFD | DTX1 | TSPYL5 | ZNF568 | GRIN2D | QKI |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 单位 | pg/mL | 链数/测定 | | | | | | | | | | | | | |
| 4 | 2480 | 551 | 506 | 2 | 61 | 96 | 445 | 68 | 0 | 0 | 113 | 241 | 0 | 52 | 112 |
| 5 | 579 | 493 | 485 | 0 | 0 | 0 | 111 | 6 | 0 | 0 | 32 | 42 | 9 | 17 | 0 |
| 29 | 380 | 565 | 355 | 0 | 0 | 0 | 75 | 0 | 0 | 0 | 4 | 70 | 0 | 0 | 0 |
| 52 | 267 | 630 | 328 | 0 | 0 | 0 | 226 | 0 | 0 | 0 | 16 | 0 | 0 | 0 | 10 |
| 58 | 1288 | 672 | 393 | 0 | 0 | 0 | 120 | 0 | 0 | 0 | 11 | 72 | 0 | 0 | 0 |
| 60 | 399 | 761 | 790 | 0 | 0 | 0 | 461 | 0 | 0 | 0 | 40 | 183 | 0 | 112 | 0 |
| 70 | 1057 | 748 | 1293 | 0 | 14 | 0 | 691 | 0 | 11 | 0 | 136 | 504 | 0 | 10 | 0 |
| 72 | 1185 | 604 | 620 | 0 | 0 | 0 | 544 | 227 | 0 | 0 | 19 | 16 | 1 | 43 | 0 |
| 75 | 8390 | 584 | 377 | 295 | 586 | 279 | 402 | 435 | 76 | 0 | 456 | 855 | 228 | 299 | 285 |
| 90 | 1680 | 646 | 420 | 0 | 0 | 0 | 433 | 0 | 0 | 13 | 53 | 353 | 0 | 23 | 0 |
| 94 | 1131 | 652 | 620 | 0 | 0 | 0 | 208 | 0 | 0 | 0 | 3 | 0 | 4 | 25 | 0 |
| 102 | 640 | 600 | 248 | 0 | 0 | 0 | 182 | 0 | 0 | 0 | 1 | 940 | 16 | 0 | 0 |
| 120 | 536 | 696 | 743 | 0 | 0 | 0 | 142 | 0 | 0 | 0 | 0 | 49 | 8 | 16 | 0 |
| 122 | 3740 | 571 | 133 | 0 | 0 | 0 | 179 | 0 | 0 | 0 | 35 | 27 | 0 | 0 | 0 |
| 128 | 532 | 633 | 385 | 0 | 0 | 0 | 584 | 0 | 0 | 9 | 0 | 1341 | 1 | 18 | 0 |
| 133 | 1229 | 627 | 541 | 0 | 0 | 0 | 417 | 1 | 0 | 0 | 1 | 139 | 11 | 20 | 0 |
| 139 | 1399 | 599 | 320 | 0 | 0 | 0 | 153 | 0 | 0 | 8 | 10 | 382 | 0 | 51 | 76 |
| 142 | 347 | 642 | 423 | 0 | 0 | 0 | 226 | 0 | 0 | 0 | 0 | 9 | 0 | 41 | 4 |
| 158 | 1234 | 700 | 378 | 0 | 0 | 0 | 191 | 0 | 0 | 24 | 137 | 1794 | 0 | 74 | 0 |
| 177 | 442 | 609 | 290 | 0 | 0 | 0 | 205 | 0 | 0 | 0 | 5 | 266 | 130 | 0 | 0 |
| 179 | 430 | 562 | 406 | 0 | 0 | 0 | 114 | 0 | 0 | 0 | 2 | 7 | 0 | 0 | 0 |
| 3 | 1074 | 528 | 325 | 0 | 602 | 171 | 431 | 284 | 436 | 121 | 110 | 529 | 72 | 173 | 272 |
| 13 | 6656 | 526 | 787 | 0 | 0 | 0 | 354 | 0 | 0 | 359 | 0 | 690 | 0 | 185 | 0 |
| 16 | 263 | 547 | 514 | 0 | 186 | 0 | 316 | 136 | 0 | 0 | 4 | 73 | 48 | 0 | 0 |
| 17 | 478 | 714 | 895 | 0 | 0 | 0 | 1048 | 0 | 0 | 104 | 43 | 18 | 0 | 4 | 67 |
| 24 | 12001 | 663 | 1269 | 0 | 1410 | 0 | 708 | 165 | 125 | 0 | 46 | 1071 | 236 | 278 | 0 |
| 44 | 1100 | 599 | 510 | 0 | 0 | 0 | 348 | 1 | 0 | 128 | 13 | 414 | 0 | 33 | 0 |
| 48 | 661 | 714 | 833 | 0 | 0 | 0 | 477 | 0 | 0 | 0 | 24 | 143 | 0 | 0 | 0 |
| 71 | 6726 | 881 | 2571 | 0 | 0 | 76 | 1599 | 117 | 0 | 1 | 619 | 1245 | 1 | 55 | 31 |
| 74 | 1212 | 881 | 1257 | 0 | 0 | 0 | 1069 | 1 | 0 | 54 | 341 | 1187 | 9 | 299 | 0 |
| 87 | 685 | 548 | 401 | 0 | 0 | 0 | 149 | 0 | 0 | 0 | 5 | 119 | 0 | 0 | 0 |
| 96 | 2026 | 558 | 386 | 0 | 178 | 0 | 401 | 94 | 23 | 0 | 65 | 44 | 0 | 40 | 0 |
| 104 | 1829 | 619 | 715 | 0 | 4 | 0 | 903 | 0 | 0 | 36 | 36 | 3126 | 382 | 0 | 80 |
| 106 | 1401 | 614 | 446 | 6 | 154 | 0 | 159 | 19 | 0 | 5 | 3 | 351 | 0 | 0 | 0 |

图3



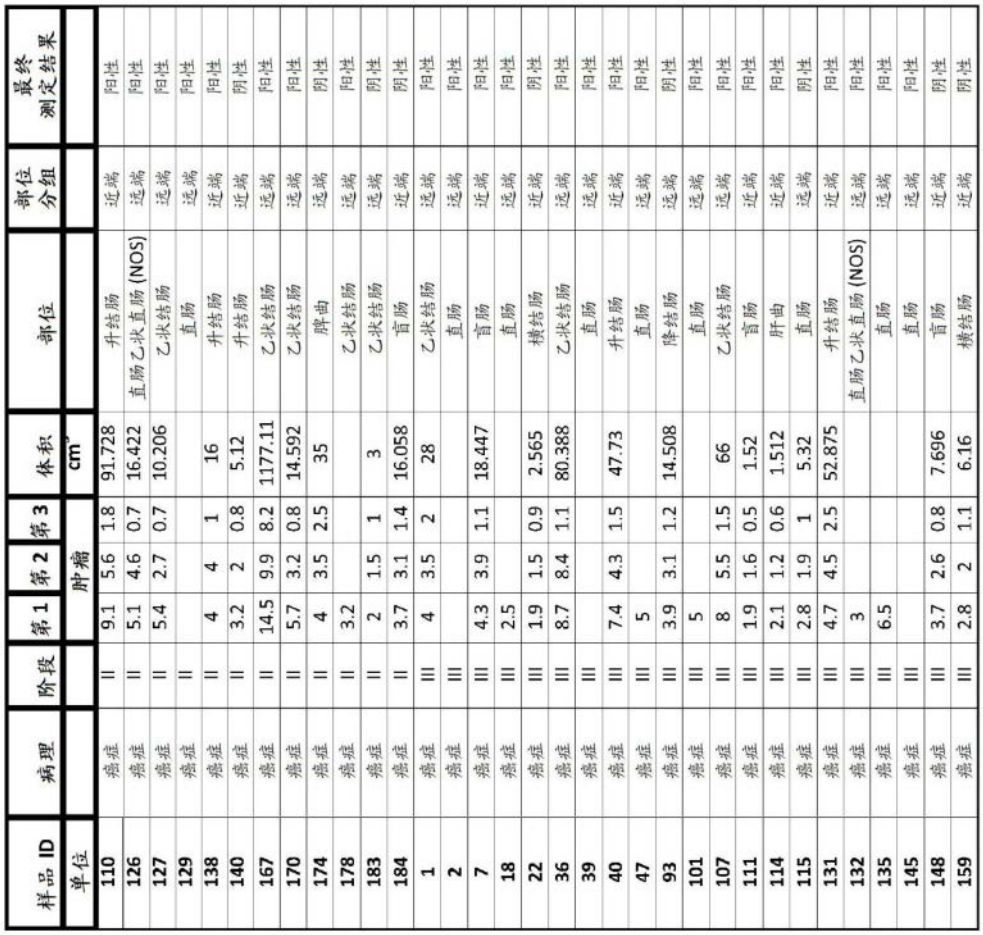
| 样品 ID | 病理 | 阶段 | 第 1 | 第 2 | 第 3 | 体积 | 部位 | 部位分组 | 最终测定结果 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 单位 | | | 肿瘤 | | | $cm^3$ | | | |
| **4** | 癌症 | I | 3.6 | 2.7 | 1.9 | 18.468 | 盲肠 | 远端 | 阳性 |
| **5** | 癌症 | I | 3 | | | | 肝曲 | 近端 | 阴性 |
| **29** | 癌症 | I | 2.1 | 2 | 0.3 | 1.26 | 肝曲 | 近端 | 阴性 |
| **52** | 癌症 | I | 0.4 | 0.3 | | | 直肠乙状直肠 (NOS) | 远端 | 阴性 |
| **58** | 癌症 | I | 1.4 | 1.2 | 0.4 | 0.672 | 直肠乙状直肠 (NOS) | 远端 | 阴性 |
| **60** | 癌症 | I | 2.5 | 2 | 1 | 5 | 直肠乙状直肠 (NOS) | 远端 | 阴性 |
| **70** | 癌症 | I | 6 | 4.5 | 2.2 | 59.4 | 升结肠 | 远端 | 阳性 |
| **72** | 癌症 | I | 4.3 | 3 | 1.1 | 14.19 | 乙状结肠 | 远端 | 阳性 |
| **75** | 癌症 | I | 4 | | | | 直肠 | 远端 | 阳性 |
| **90** | 癌症 | I | 1 | 1 | 0.3 | 0.3 | 升结肠 | 近端 | 阴性 |
| **94** | 癌症 | I | 1.7 | 1.5 | 0.5 | 1.275 | 盲肠 | 远端 | 阴性 |
| **102** | 癌症 | I | 1.8 | 0.6 | 0.3 | 0.324 | 盲肠 | 远端 | 阴性 |
| **120** | 癌症 | I | 3 | 2.5 | 0.6 | 4.5 | 升结肠 | 近端 | 阴性 |
| **122** | 癌症 | I | 2 | | | | 乙状结肠 | 远端 | 阳性 |
| **128** | 癌症 | I | 3.5 | | | | 直肠 | 远端 | 阴性 |
| **133** | 癌症 | I | 1 | 0.3 | | | 直肠乙状直肠 (NOS) | 远端 | 阴性 |
| **139** | 癌症 | I | 2 | | | | 肝曲 | 近端 | 阴性 |
| **142** | 癌症 | I | 2.2 | 1.5 | 0.6 | 1.98 | 脾曲 | 远端 | 阴性 |
| **158** | 癌症 | I | 0.5 | | | | 直肠 | 远端 | 阳性 |
| **177** | 癌症 | I | 5 | | | | 直肠 | 远端 | 阳性 |
| **179** | 癌症 | I | 0.9 | 0.5 | 0.3 | 0.135 | 直肠 | 远端 | 阴性 |
| **3** | 癌症 | II | 12.2 | 5.9 | 1.6 | 115.168 | 盲肠 | 近端 | 阳性 |
| **13** | 癌症 | II | 3.2 | 3.1 | 0.9 | 8.928 | 升结肠 | 近端 | 阳性 |
| **16** | 癌症 | II | 3.4 | 3.3 | 0.7 | 7.854 | 降结肠 | 远端 | 阳性 |
| **17** | 癌症 | II | | | | | 直肠 | 远端 | 阴性 |
| **24** | 癌症 | II | | | | | 直肠 | 远端 | 阴性 |
| **44** | 癌症 | II | 3.4 | 2.2 | 0.4 | 2.992 | 升结肠 | 近端 | 阳性 |
| **48** | 癌症 | II | 1.1 | 0.8 | 0.6 | 0.528 | 肝曲 | 近端 | 阴性 |
| **71** | 癌症 | II | 4 | | | | 直肠 | 远端 | 阳性 |
| **74** | 癌症 | II | 2.6 | 1.3 | 0.5 | 1.69 | 升结肠 | 近端 | 阳性 |
| **87** | 癌症 | II | 3 | | | | 直肠 | 远端 | 阴性 |
| **96** | 癌症 | II | 5 | 4.7 | 0.7 | 16.45 | 盲肠 | 近端 | 阳性 |
| **104** | 癌症 | II | 3.1 | 2.3 | 1 | 7.13 | 盲肠 | 近端 | 阳性 |
| **106** | 癌症 | II | 2.7 | 1.7 | 1.6 | 7.344 | 乙状结肠 | 远端 | 阳性 |

图3(续)



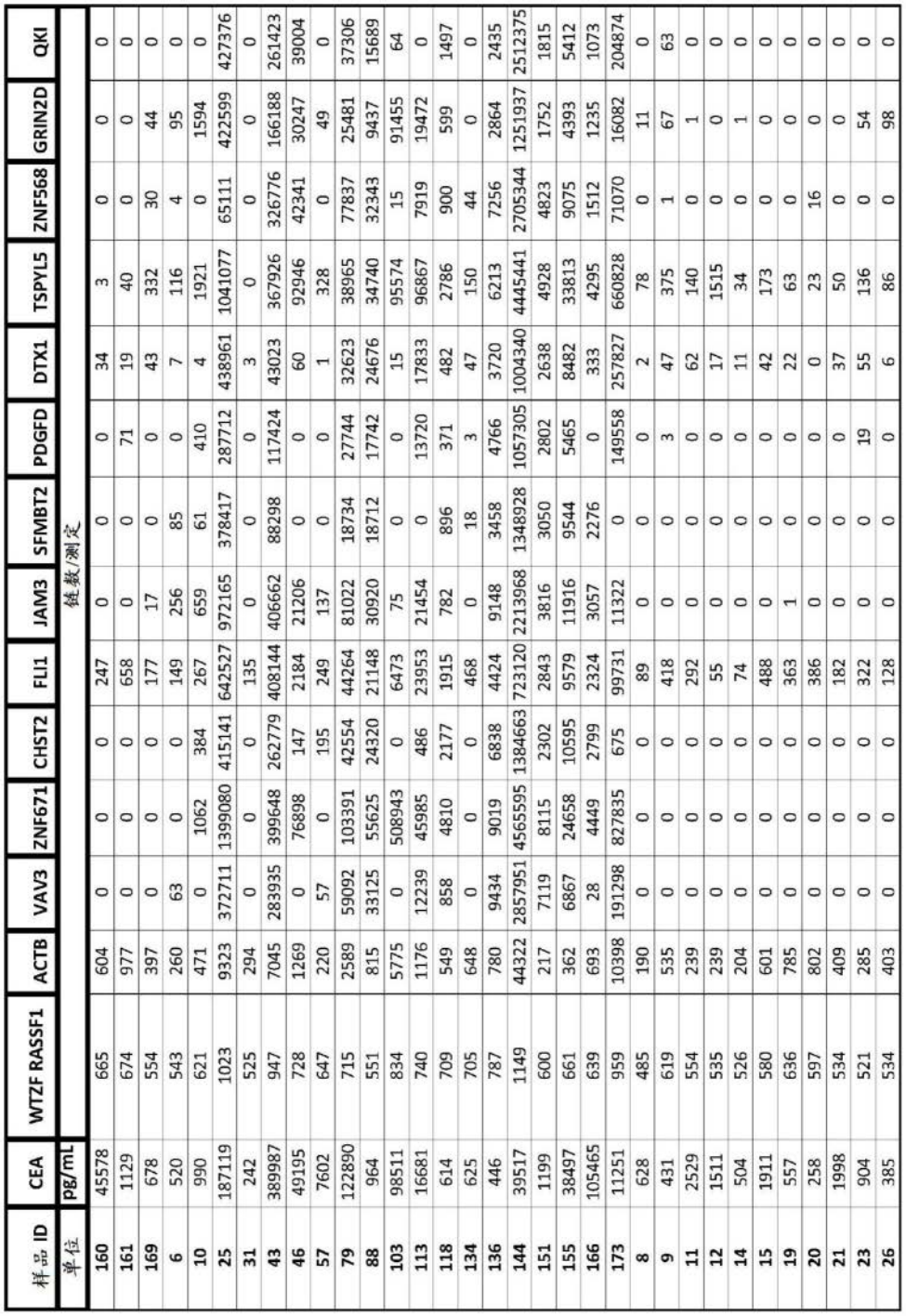
| 样品 ID | CEA | WTZF RASSF1 | ACTB | VAV3 | ZNF671 | CHST2 | FLI1 | JAM3 | SFMBT2 | PDGFD | DTX1 | TSPYL5 | ZNF568 | GRIN2D | QKI |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 单位 | pg/mL | 链数/测定 | | | | | | | | | | | | | |
| 110 | 802 | 753 | 722 | 760 | 2322 | 1465 | 660 | 816 | 231 | 576 | 75 | 1568 | 1244 | 1 | 824 |
| 126 | 2014 | 603 | 420 | 0 | 2126 | 0 | 235 | 0 | 0 | 78 | 20 | 1386 | 0 | 310 | 197 |
| 127 | 509 | 643 | 769 | 0 | 829 | 0 | 455 | 16 | 297 | 32 | 143 | 1523 | 291 | 418 | 0 |
| 129 | 1290 | 688 | 638 | 31 | 1433 | 61 | 1236 | 478 | 134 | 2 | 470 | 852 | 0 | 116 | 381 |
| 138 | 532 | 1193 | 20394 | 0 | 10 | 1 | 10633 | 3 | 0 | 426 | 852 | 6218 | 467 | 845 | 106 |
| 140 | 1610 | 652 | 616 | 0 | 0 | 0 | 144 | 4 | 0 | 0 | 64 | 55 | 0 | 0 | 0 |
| 167 | 34648 | 802 | 648 | 0 | 0 | 0 | 368 | 0 | 0 | 0 | 25 | 264 | 3 | 41 | 63 |
| 170 | 841 | 575 | 373 | 0 | 0 | 17 | 139 | 5 | 0 | 0 | 8 | 15 | 0 | 36 | 0 |
| 174 | 722 | 844 | 867 | 0 | 0 | 0 | 281 | 0 | 0 | 0 | 2 | 235 | 0 | 44 | 0 |
| 178 | 2226 | 627 | 198 | 21 | 0 | 0 | 133 | 94 | 52 | 0 | 0 | 267 | 79 | 0 | 0 |
| 183 | 895 | 733 | 863 | 0 | 0 | 0 | 338 | 0 | 0 | 0 | 17 | 211 | 0 | 38 | 0 |
| 184 | 591 | 733 | 608 | 0 | 0 | 0 | 357 | 0 | 0 | 20 | 14 | 41 | 0 | 0 | 1 |
| 1 | 2685 | 598 | 578 | 0 | 293 | 0 | 408 | 59 | 0 | 0 | 151 | 760 | 0 | 355 | 66 |
| 2 | 3713 | 593 | 187 | 0 | 0 | 0 | 175 | 0 | 62 | 0 | 25 | 6 | 9 | 17 | 0 |
| 7 | 6161 | 432 | 282 | 0 | 0 | 0 | 172 | 0 | 0 | 0 | 10 | 10 | 0 | 0 | 0 |
| 18 | 382 | 972 | 6238 | 0 | 0 | 0 | 7634 | 8 | 0 | 445 | 123 | 6414 | 1159 | 748 | 621 |
| 22 | 382 | 597 | 465 | 0 | 0 | 0 | 268 | 0 | 0 | 0 | 31 | 85 | 0 | 0 | 0 |
| 36 | 3324 | 724 | 693 | 0 | 111 | 0 | 161 | 0 | 25 | 0 | 25 | 114 | 0 | 30 | 0 |
| 39 | 7924 | 637 | 844 | 20106 | 50447 | 24702 | 15576 | 17511 | 17490 | 5957 | 9990 | 21424 | 36309 | 7400 | 17668 |
| 40 | 44785 | 585 | 380 | 0 | 4146 | 1837 | 1096 | 406 | 486 | 0 | 14 | 1251 | 1130 | 568 | 1098 |
| 47 | 733 | 749 | 509 | 534 | 3039 | 1241 | 1058 | 1558 | 1200 | 1062 | 166 | 1286 | 1275 | 1076 | 1160 |
| 93 | 792 | 626 | 777 | 0 | 0 | 0 | 421 | 0 | 0 | 0 | 14 | 516 | 8 | 0 | 0 |
| 101 | 1116 | 643 | 1022 | 0 | 121 | 433 | 451 | 0 | 71 | 86 | 11 | 453 | 0 | 11 | 58 |
| 107 | 700 | 580 | 403 | 294 | 1718 | 944 | 1073 | 835 | 403 | 219 | 480 | 1517 | 705 | 332 | 453 |
| 111 | 595 | 554 | 355 | 656 | 509 | 302 | 446 | 850 | 3 | 488 | 132 | 1320 | 1131 | 203 | 588 |
| 114 | 2967 | 677 | 496 | 0 | 0 | 0 | 190 | 0 | 0 | 0 | 1 | 184 | 0 | 0 | 0 |
| 115 | 614 | 625 | 570 | 0 | 0 | 0 | 145 | 0 | 0 | 0 | 1 | 16 | 0 | 1 | 0 |
| 131 | 11772 | 676 | 718 | 4 | 104 | 0 | 681 | 11 | 55 | 141 | 86 | 593 | 135 | 0 | 0 |
| 132 | 27172 | 604 | 536 | 1535 | 10311 | 1346 | 592 | 3464 | 2107 | 2112 | 326 | 4381 | 3616 | 1458 | 2008 |
| 135 | 5745 | 586 | 526 | 0 | 466 | 0 | 292 | 0 | 0 | 0 | 21 | 192 | 0 | 121 | 0 |
| 145 | 795 | 712 | 704 | 0 | 0 | 0 | 411 | 0 | 0 | 0 | 86 | 407 | 97 | 52 | 0 |
| 148 | 916 | 756 | 1108 | 0 | 0 | 0 | 312 | 2 | 0 | 0 | 89 | 853 | 0 | 37 | 0 |
| 159 | 864 | 727 | 833 | 0 | 8 | 0 | 465 | 9 | 0 | 19 | 17 | 182 | 0 | 42 | 0 |

图3(续)



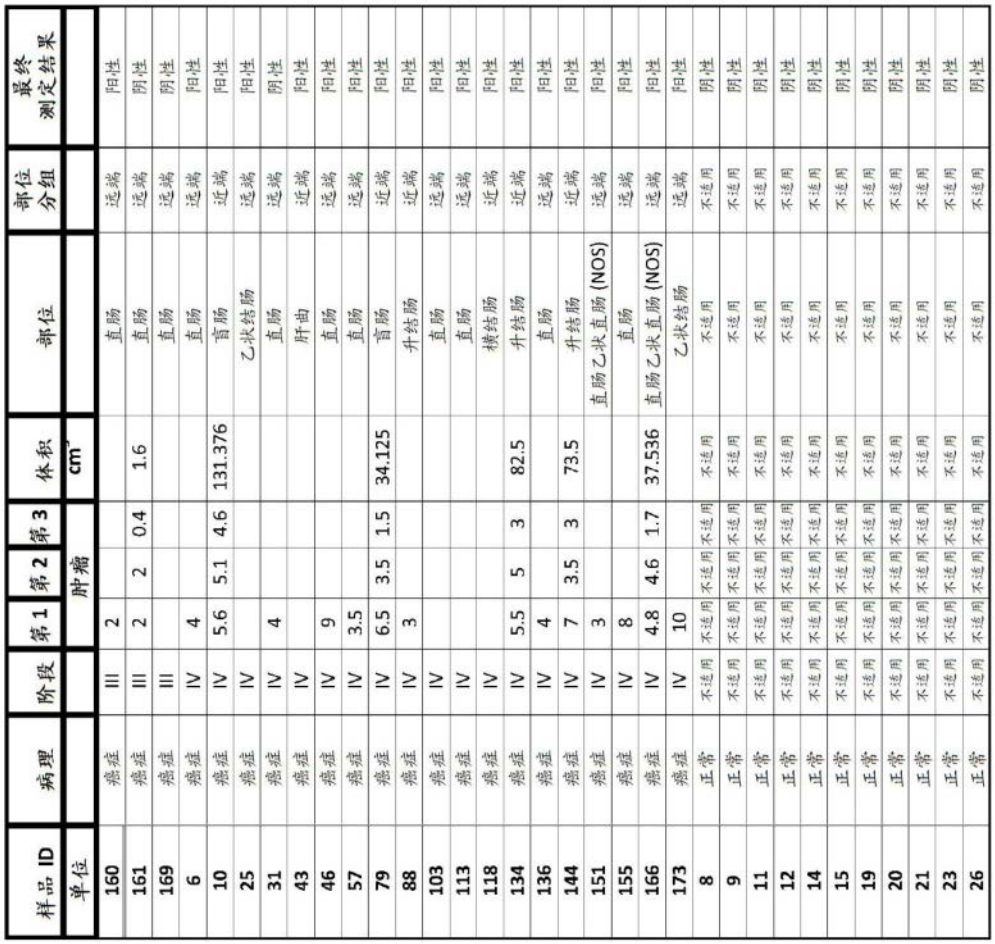
| 样品 ID | 病理 | 阶段 | 第 1 | 第 2 | 第 3 | 体积 | 部位 | 部位分组 | 最终测定结果 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 单位 | | | 肿瘤 | | | $cm^3$ | | | |
| 110 | 癌症 | II | 9.1 | 5.6 | 1.8 | 91.728 | 升结肠 | 近端 | 阳性 |
| 126 | 癌症 | II | 5.1 | 4.6 | 0.7 | 16.422 | 直肠乙状直肠 (NOS) | 远端 | 阳性 |
| 127 | 癌症 | II | 5.4 | 2.7 | 0.7 | 10.206 | 乙状结肠 | 远端 | 阳性 |
| 129 | 癌症 | II | | | | | 直肠 | 远端 | 阳性 |
| 138 | 癌症 | II | 4 | 4 | 1 | 16 | 升结肠 | 近端 | 阳性 |
| 140 | 癌症 | II | 3.2 | 2 | 0.8 | 5.12 | 升结肠 | 近端 | 阴性 |
| 167 | 癌症 | II | 14.5 | 9.9 | 8.2 | 1177.11 | 乙状结肠 | 远端 | 阳性 |
| 170 | 癌症 | II | 5.7 | 3.2 | 0.8 | 14.592 | 乙状结肠 | 远端 | 阳性 |
| 174 | 癌症 | II | 4 | 3.5 | 2.5 | 35 | 脾曲 | 远端 | 阴性 |
| 178 | 癌症 | II | 3.2 | | | | 乙状结肠 | 远端 | 阳性 |
| 183 | 癌症 | II | 2 | 1.5 | 1 | 3 | 乙状结肠 | 远端 | 阴性 |
| 184 | 癌症 | II | 3.7 | 3.1 | 1.4 | 16.058 | 盲肠 | 近端 | 阴性 |
| 1 | 癌症 | III | 4 | 3.5 | 2 | 28 | 乙状结肠 | 远端 | 阳性 |
| 2 | 癌症 | III | | | | | 直肠 | 远端 | 阳性 |
| 7 | 癌症 | III | 4.3 | 3.9 | 1.1 | 18.447 | 盲肠 | 近端 | 阳性 |
| 18 | 癌症 | III | 2.5 | | | | 直肠 | 远端 | 阳性 |
| 22 | 癌症 | III | 1.9 | 1.5 | 0.9 | 2.565 | 横结肠 | 近端 | 阴性 |
| 36 | 癌症 | III | 8.7 | 8.4 | 1.1 | 80.388 | 乙状结肠 | 远端 | 阳性 |
| 39 | 癌症 | III | | | | | 直肠 | 远端 | 阳性 |
| 40 | 癌症 | III | 7.4 | 4.3 | 1.5 | 47.73 | 升结肠 | 近端 | 阳性 |
| 47 | 癌症 | III | 5 | | | | 直肠 | 远端 | 阳性 |
| 93 | 癌症 | III | 3.9 | 3.1 | 1.2 | 14.508 | 降结肠 | 远端 | 阴性 |
| 101 | 癌症 | III | 5 | | | | 直肠 | 远端 | 阳性 |
| 107 | 癌症 | III | 8 | 5.5 | 1.5 | 66 | 乙状结肠 | 远端 | 阳性 |
| 111 | 癌症 | III | 1.9 | 1.6 | 0.5 | 1.52 | 盲肠 | 近端 | 阳性 |
| 114 | 癌症 | III | 2.1 | 1.2 | 0.6 | 1.512 | 肝曲 | 近端 | 阳性 |
| 115 | 癌症 | III | 2.8 | 1.9 | 1 | 5.32 | 直肠 | 远端 | 阴性 |
| 131 | 癌症 | III | 4.7 | 4.5 | 2.5 | 52.875 | 升结肠 | 近端 | 阳性 |
| 132 | 癌症 | III | 3 | | | | 直肠乙状直肠 (NOS) | 远端 | 阳性 |
| 135 | 癌症 | III | 6.5 | | | | 直肠 | 远端 | 阳性 |
| 145 | 癌症 | III | | | | | 直肠 | 远端 | 阳性 |
| 148 | 癌症 | III | 3.7 | 2.6 | 0.8 | 7.696 | 盲肠 | 近端 | 阴性 |
| 159 | 癌症 | III | 2.8 | 2 | 1.1 | 6.16 | 横结肠 | 近端 | 阴性 |

图3(续)



| 样品 ID | CEA | WTZF RASSF1 | ACTB | VAV3 | ZNF671 | CHST2 | FLI1 | JAM3 | SFMBT2 | PDGFD | DTX1 | TSPYL5 | ZNF568 | GRIN2D | QKI |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 单位 | pg/mL | 链载/测定 | | | | | | | | | | | | | |
| 160 | 45578 | 665 | 604 | 0 | 0 | 0 | 247 | 0 | 0 | 0 | 34 | 3 | 0 | 0 | 0 |
| 161 | 1129 | 674 | 977 | 0 | 0 | 0 | 658 | 0 | 0 | 71 | 19 | 40 | 0 | 0 | 0 |
| 169 | 678 | 554 | 397 | 0 | 0 | 0 | 177 | 17 | 0 | 0 | 43 | 332 | 30 | 44 | 0 |
| 6 | 520 | 543 | 260 | 63 | 0 | 0 | 149 | 256 | 85 | 0 | 7 | 116 | 4 | 95 | 0 |
| 10 | 990 | 621 | 471 | 0 | 1062 | 384 | 267 | 659 | 61 | 410 | 4 | 1921 | 0 | 1594 | 0 |
| 25 | 187119 | 1023 | 9323 | 372711 | 1399080 | 415141 | 642527 | 972165 | 378417 | 287712 | 438961 | 1041077 | 65111 | 422599 | 427376 |
| 31 | 242 | 525 | 294 | 0 | 0 | 0 | 135 | 0 | 0 | 0 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 43 | 389987 | 947 | 7045 | 283935 | 399648 | 262779 | 408144 | 406662 | 88298 | 117424 | 43023 | 367926 | 326776 | 166188 | 261423 |
| 46 | 49195 | 728 | 1269 | 0 | 76898 | 147 | 2184 | 21206 | 0 | 0 | 60 | 92946 | 42341 | 30247 | 39004 |
| 57 | 7602 | 647 | 220 | 57 | 0 | 195 | 249 | 137 | 0 | 0 | 1 | 328 | 0 | 49 | 0 |
| 79 | 122890 | 715 | 2589 | 59092 | 103391 | 42554 | 44264 | 81022 | 18734 | 27744 | 32623 | 38965 | 77837 | 25481 | 37306 |
| 88 | 964 | 551 | 815 | 33125 | 55625 | 24320 | 21148 | 30920 | 18712 | 17742 | 24676 | 34740 | 32343 | 9437 | 15689 |
| 103 | 98511 | 834 | 5775 | 0 | 508943 | 0 | 6473 | 75 | 0 | 0 | 15 | 95574 | 15 | 91455 | 64 |
| 113 | 16681 | 740 | 1176 | 12239 | 45985 | 486 | 23953 | 21454 | 0 | 13720 | 17833 | 96867 | 7919 | 19472 | 0 |
| 118 | 614 | 709 | 549 | 858 | 4810 | 2177 | 1915 | 782 | 896 | 371 | 482 | 2786 | 900 | 599 | 1497 |
| 134 | 625 | 705 | 648 | 0 | 0 | 0 | 468 | 0 | 18 | 3 | 47 | 150 | 44 | 0 | 0 |
| 136 | 446 | 787 | 780 | 9434 | 9019 | 6838 | 4424 | 9148 | 3458 | 4766 | 3720 | 6213 | 7256 | 2864 | 2435 |
| 144 | 39517 | 1149 | 44322 | 2857951 | 4565595 | 1384663 | 723120 | 2213968 | 1348928 | 1057305 | 1004340 | 4445441 | 2705344 | 1251937 | 2512375 |
| 151 | 1199 | 600 | 217 | 7119 | 8115 | 2302 | 2843 | 3816 | 3050 | 2802 | 2638 | 4928 | 4823 | 1752 | 1815 |
| 155 | 38497 | 661 | 362 | 6867 | 24658 | 10595 | 9579 | 11916 | 9544 | 5465 | 8482 | 33813 | 9075 | 4393 | 5412 |
| 166 | 105465 | 639 | 693 | 28 | 4449 | 2799 | 2324 | 3057 | 2276 | 0 | 333 | 4295 | 1512 | 1235 | 1073 |
| 173 | 11251 | 959 | 10398 | 191298 | 827835 | 675 | 99731 | 11322 | 0 | 149558 | 257827 | 660828 | 71070 | 16082 | 204874 |
| 8 | 628 | 485 | 190 | 0 | 0 | 0 | 89 | 0 | 0 | 0 | 2 | 78 | 0 | 11 | 0 |
| 9 | 431 | 619 | 535 | 0 | 0 | 0 | 418 | 0 | 0 | 3 | 47 | 375 | 1 | 67 | 63 |
| 11 | 2529 | 554 | 239 | 0 | 0 | 0 | 292 | 0 | 0 | 0 | 62 | 140 | 0 | 1 | 0 |
| 12 | 1511 | 535 | 239 | 0 | 0 | 0 | 55 | 0 | 0 | 0 | 17 | 1515 | 0 | 0 | 0 |
| 14 | 504 | 526 | 204 | 0 | 0 | 0 | 74 | 0 | 0 | 0 | 11 | 34 | 0 | 1 | 0 |
| 15 | 1911 | 580 | 601 | 0 | 0 | 0 | 488 | 0 | 0 | 0 | 42 | 173 | 0 | 0 | 0 |
| 19 | 557 | 636 | 785 | 0 | 0 | 0 | 363 | 1 | 0 | 0 | 22 | 63 | 0 | 0 | 0 |
| 20 | 258 | 597 | 802 | 0 | 0 | 0 | 386 | 0 | 0 | 0 | 0 | 23 | 16 | 0 | 0 |
| 21 | 1998 | 534 | 409 | 0 | 0 | 0 | 182 | 0 | 0 | 0 | 37 | 50 | 0 | 0 | 0 |
| 23 | 904 | 521 | 285 | 0 | 0 | 0 | 322 | 0 | 0 | 19 | 55 | 136 | 0 | 54 | 0 |
| 26 | 385 | 534 | 403 | 0 | 0 | 0 | 128 | 0 | 0 | 0 | 6 | 86 | 0 | 98 | 0 |

图3(续)

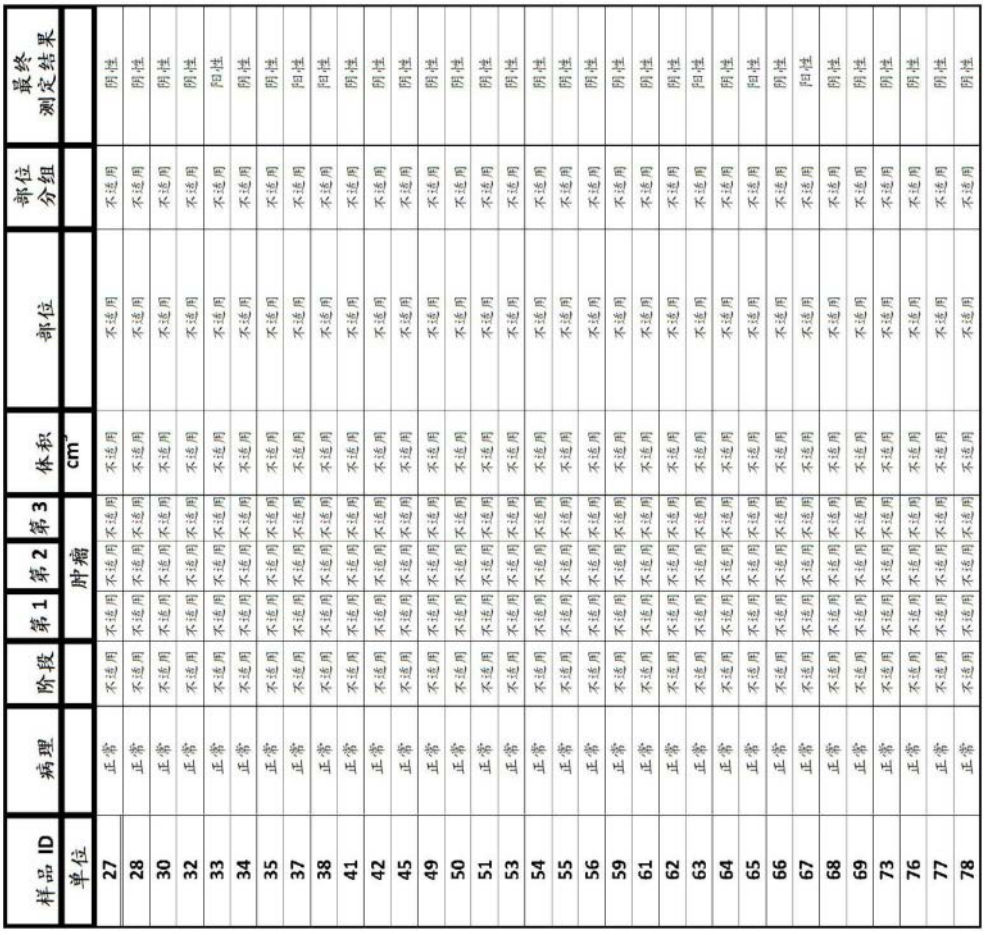


| 样品 ID | 病理 | 阶段 | 第 1 | 第 2 | 第 3 | 体积 | 部位 | 部位分组 | 最终测定结果 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 单位 | | | 肿瘤 | | | $cm^3$ | | | |
| 160 | 癌症 | III | 2 | | | | 直肠 | 适端 | 阳性 |
| 161 | 癌症 | III | 2 | 2 | 0.4 | 1.6 | 直肠 | 适端 | 阴性 |
| 169 | 癌症 | III | | | | | 直肠 | 适端 | 阴性 |
| 6 | 癌症 | IV | 4 | | | | 直肠 | 适端 | 阳性 |
| 10 | 癌症 | IV | 5.6 | 5.1 | 4.6 | 131.376 | 盲肠 | 近端 | 阳性 |
| 25 | 癌症 | IV | | | | | 乙状结肠 | 适端 | 阳性 |
| 31 | 癌症 | IV | 4 | | | | 直肠 | 适端 | 阴性 |
| 43 | 癌症 | IV | | | | | 肝曲 | 近端 | 阳性 |
| 46 | 癌症 | IV | 9 | | | | 直肠 | 适端 | 阳性 |
| 57 | 癌症 | IV | 3.5 | | | | 直肠 | 适端 | 阳性 |
| 79 | 癌症 | IV | 6.5 | 3.5 | 1.5 | 34.125 | 盲肠 | 近端 | 阳性 |
| 88 | 癌症 | IV | 3 | | | | 升结肠 | 近端 | 阳性 |
| 103 | 癌症 | IV | | | | | 直肠 | 适端 | 阳性 |
| 113 | 癌症 | IV | | | | | 直肠 | 适端 | 阳性 |
| 118 | 癌症 | IV | | | | | 横结肠 | 近端 | 阳性 |
| 134 | 癌症 | IV | 5.5 | 5 | 3 | 82.5 | 升结肠 | 近端 | 阳性 |
| 136 | 癌症 | IV | 4 | | | | 直肠 | 适端 | 阳性 |
| 144 | 癌症 | IV | 7 | 3.5 | 3 | 73.5 | 升结肠 | 近端 | 阳性 |
| 151 | 癌症 | IV | 3 | | | | 直肠乙状直肠 (NOS) | 适端 | 阳性 |
| 155 | 癌症 | IV | 8 | | | | 直肠 | 适端 | 阳性 |
| 166 | 癌症 | IV | 4.8 | 4.6 | 1.7 | 37.536 | 直肠乙状直肠 (NOS) | 适端 | 阳性 |
| 173 | 癌症 | IV | 10 | | | | 乙状结肠 | 适端 | 阳性 |
| 8 | 正常 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 阴性 |
| 9 | 正常 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 阴性 |
| 11 | 正常 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 阴性 |
| 12 | 正常 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 阴性 |
| 14 | 正常 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 阴性 |
| 15 | 正常 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 阴性 |
| 19 | 正常 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 阴性 |
| 20 | 正常 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 阴性 |
| 21 | 正常 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 阴性 |
| 23 | 正常 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 阴性 |
| 26 | 正常 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 阴性 |

图3(续)

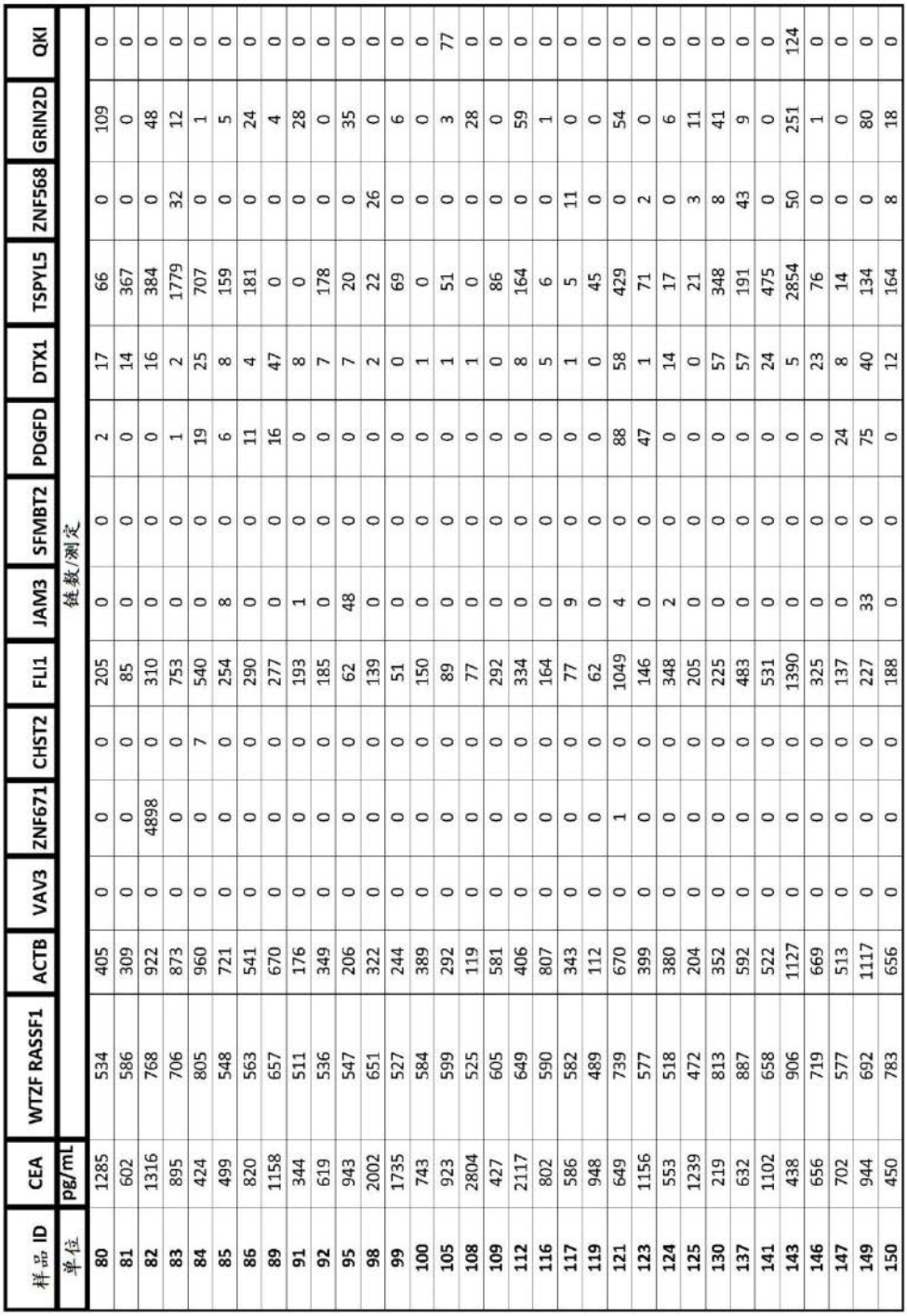
| 样品 ID | CEA | WTZF RASSF1 | ACTB | VAV3 | ZNF671 | CHST2 | FLI1 | JAM3 | SFMBT2 | PDGFD | DTX1 | TSPYL5 | ZNF568 | GRIN2D | QKI |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 单位 | pg/mL | 链数/测定 | | | | | | | | | | | | | |
| 27 | 860 | 530 | 246 | 0 | 0 | 0 | 128 | 0 | 0 | 0 | 21 | 12 | 0 | 25 | 0 |
| 28 | 1221 | 532 | 180 | 0 | 0 | 0 | 69 | 0 | 0 | 110 | 28 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 30 | 1761 | 767 | 806 | 0 | 0 | 0 | 299 | 0 | 0 | 0 | 31 | 97 | 28 | 0 | 0 |
| 32 | 712 | 550 | 371 | 0 | 0 | 0 | 173 | 0 | 0 | 0 | 18 | 178 | 0 | 70 | 0 |
| 33 | 5414 | 648 | 453 | 0 | 0 | 0 | 248 | 0 | 0 | 0 | 56 | 571 | 0 | 0 | 0 |
| 34 | 421 | 601 | 538 | 0 | 0 | 0 | 120 | 76 | 0 | 0 | 10 | 539 | 91 | 17 | 0 |
| 35 | 1992 | 573 | 266 | 0 | 0 | 0 | 27 | 0 | 0 | 0 | 1 | 64 | 57 | 0 | 0 |
| 37 | 951 | 963 | 6454 | 0 | 0 | 0 | 4844 | 10 | 0 | 151 | 523 | 16959 | 1310 | 399 | 221 |
| 38 | 751 | 582 | 434 | 0 | 230 | 0 | 108 | 0 | 0 | 0 | 10 | 32 | 7 | 0 | 0 |
| 41 | 1990 | 654 | 230 | 0 | 0 | 0 | 172 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 76 | 0 |
| 42 | 979 | 724 | 503 | 0 | 0 | 0 | 162 | 0 | 0 | 97 | 5 | 0 | 0 | 0 | 21 |
| 45 | 628 | 530 | 182 | 0 | 0 | 0 | 70 | 0 | 0 | 0 | 4 | 7 | 88 | 0 | 0 |
| 49 | 1310 | 615 | 428 | 0 | 0 | 0 | 224 | 0 | 0 | 54 | 56 | 131 | 13 | 0 | 0 |
| 50 | 671 | 808 | 836 | 0 | 0 | 0 | 608 | 44 | 0 | 0 | 118 | 96 | 0 | 0 | 0 |
| 51 | 459 | 745 | 514 | 0 | 0 | 0 | 99 | 0 | 0 | 0 | 22 | 39 | 0 | 0 | 0 |
| 53 | 842 | 610 | 363 | 0 | 0 | 0 | 157 | 45 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 54 | 545 | 679 | 508 | 0 | 0 | 0 | 161 | 0 | 0 | 0 | 75 | 57 | 0 | 17 | 0 |
| 55 | 790 | 597 | 458 | 0 | 0 | 0 | 152 | 0 | 0 | 0 | 7 | 214 | 0 | 15 | 0 |
| 56 | 1236 | 584 | 512 | 0 | 0 | 0 | 163 | 0 | 0 | 0 | 33 | 20 | 0 | 0 | 0 |
| 59 | 365 | 639 | 330 | 0 | 0 | 0 | 174 | 0 | 0 | 0 | 2 | 40 | 0 | 84 | 0 |
| 61 | 668 | 866 | 901 | 0 | 0 | 0 | 426 | 0 | 0 | 3 | 87 | 328 | 0 | 45 | 0 |
| 62 | 885 | 764 | 1147 | 0 | 0 | 0 | 380 | 9 | 0 | 0 | 9 | 179 | 0 | 0 | 0 |
| 63 | 3551 | 602 | 321 | 0 | 0 | 0 | 78 | 0 | 0 | 0 | 21 | 24 | 0 | 0 | 0 |
| 64 | 490 | 686 | 432 | 0 | 0 | 0 | 184 | 0 | 0 | 0 | 41 | 369 | 32 | 1 | 0 |
| 65 | 877 | 567 | 412 | 0 | 0 | 0 | 111 | 0 | 0 | 0 | 20 | 406 | 17 | 0 | 319 |
| 66 | 1250 | 734 | 447 | 0 | 0 | 0 | 131 | 0 | 0 | 9 | 14 | 25 | 0 | 0 | 0 |
| 67 | 719 | 738 | 1204 | 0 | 576 | 0 | 536 | 0 | 0 | 277 | 4 | 4 | 0 | 166 | 0 |
| 68 | 1715 | 625 | 699 | 0 | 0 | 0 | 262 | 0 | 0 | 0 | 26 | 173 | 0 | 0 | 0 |
| 69 | 1258 | 664 | 650 | 0 | 0 | 0 | 186 | 0 | 0 | 0 | 10 | 48 | 4 | 0 | 39 |
| 73 | 974 | 554 | 238 | 0 | 0 | 0 | 92 | 0 | 0 | 0 | 11 | 32 | 0 | 43 | 0 |
| 76 | 275 | 595 | 542 | 0 | 0 | 0 | 256 | 0 | 0 | 0 | 16 | 131 | 0 | 2 | 0 |
| 77 | 685 | 555 | 269 | 0 | 0 | 0 | 145 | 0 | 0 | 0 | 22 | 0 | 13 | 0 | 0 |
| 78 | 504 | 582 | 415 | 0 | 0 | 0 | 219 | 0 | 0 | 0 | 16 | 4 | 0 | 0 | 0 |

图3(续)



| 样品 ID | 病理 | 阶段 | 第1 | 第2 | 第3 | 体积 | 部位 | 部位分组 | 最终测定结果 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 单位 | | | 肿瘤 | | | $cm^3$ | | | |
| 27 | 正常 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 阴性 |
| 28 | 正常 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 阴性 |
| 30 | 正常 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 阴性 |
| 32 | 正常 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 阴性 |
| 33 | 正常 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 阳性 |
| 34 | 正常 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 阴性 |
| 35 | 正常 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 阴性 |
| 37 | 正常 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 阳性 |
| 38 | 正常 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 阳性 |
| 41 | 正常 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 阴性 |
| 42 | 正常 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 阴性 |
| 45 | 正常 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 阴性 |
| 49 | 正常 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 阴性 |
| 50 | 正常 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 阴性 |
| 51 | 正常 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 阴性 |
| 53 | 正常 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 阴性 |
| 54 | 正常 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 阴性 |
| 55 | 正常 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 阴性 |
| 56 | 正常 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 阴性 |
| 59 | 正常 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 阴性 |
| 61 | 正常 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 阴性 |
| 62 | 正常 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 阴性 |
| 63 | 正常 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 阳性 |
| 64 | 正常 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 阴性 |
| 65 | 正常 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 阳性 |
| 66 | 正常 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 阴性 |
| 67 | 正常 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 阳性 |
| 68 | 正常 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 阴性 |
| 69 | 正常 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 阴性 |
| 73 | 正常 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 阴性 |
| 76 | 正常 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 阴性 |
| 77 | 正常 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 阴性 |
| 78 | 正常 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 阴性 |

图3(续)



| 样品 ID | CEA | WTZF RASSF1 | ACTB | VAV3 | ZNF671 | CHST2 | FLI1 | JAM3 | SFMBT2 | PDGFD | DTX1 | TSPYL5 | ZNF568 | GRIN2D | QKI |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 单位 | pg/mL | 拷贝/测定 | | | | | | | | | | | | | |
| 80 | 1285 | 534 | 405 | 0 | 0 | 0 | 205 | 0 | 0 | 2 | 17 | 66 | 0 | 109 | 0 |
| 81 | 602 | 586 | 309 | 0 | 0 | 0 | 85 | 0 | 0 | 0 | 14 | 367 | 0 | 0 | 0 |
| 82 | 1316 | 768 | 922 | 0 | 4898 | 0 | 310 | 0 | 0 | 0 | 16 | 384 | 0 | 48 | 0 |
| 83 | 895 | 706 | 873 | 0 | 0 | 0 | 753 | 0 | 0 | 1 | 2 | 1779 | 32 | 12 | 0 |
| 84 | 424 | 805 | 960 | 0 | 0 | 7 | 540 | 0 | 0 | 19 | 25 | 707 | 0 | 1 | 0 |
| 85 | 499 | 548 | 721 | 0 | 0 | 0 | 254 | 8 | 0 | 6 | 8 | 159 | 0 | 5 | 0 |
| 86 | 820 | 563 | 541 | 0 | 0 | 0 | 290 | 0 | 0 | 11 | 4 | 181 | 0 | 24 | 0 |
| 89 | 1158 | 657 | 670 | 0 | 0 | 0 | 277 | 0 | 0 | 16 | 47 | 0 | 0 | 4 | 0 |
| 91 | 344 | 511 | 176 | 0 | 0 | 0 | 193 | 1 | 0 | 0 | 8 | 0 | 0 | 28 | 0 |
| 92 | 619 | 536 | 349 | 0 | 0 | 0 | 185 | 0 | 0 | 0 | 7 | 178 | 0 | 0 | 0 |
| 95 | 943 | 547 | 206 | 0 | 0 | 0 | 62 | 48 | 0 | 0 | 7 | 20 | 0 | 35 | 0 |
| 98 | 2002 | 651 | 322 | 0 | 0 | 0 | 139 | 0 | 0 | 0 | 2 | 22 | 26 | 0 | 0 |
| 99 | 1735 | 527 | 244 | 0 | 0 | 0 | 51 | 0 | 0 | 0 | 0 | 69 | 0 | 6 | 0 |
| 100 | 743 | 584 | 389 | 0 | 0 | 0 | 150 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 105 | 923 | 599 | 292 | 0 | 0 | 0 | 89 | 0 | 0 | 0 | 1 | 51 | 0 | 3 | 77 |
| 108 | 2804 | 525 | 119 | 0 | 0 | 0 | 77 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 28 | 0 |
| 109 | 427 | 605 | 581 | 0 | 0 | 0 | 292 | 0 | 0 | 0 | 0 | 86 | 0 | 0 | 0 |
| 112 | 2117 | 649 | 406 | 0 | 0 | 0 | 334 | 0 | 0 | 0 | 8 | 164 | 0 | 59 | 0 |
| 116 | 802 | 590 | 807 | 0 | 0 | 0 | 164 | 0 | 0 | 0 | 5 | 6 | 0 | 1 | 0 |
| 117 | 586 | 582 | 343 | 0 | 0 | 0 | 77 | 9 | 0 | 0 | 1 | 5 | 11 | 0 | 0 |
| 119 | 948 | 489 | 112 | 0 | 0 | 0 | 62 | 0 | 0 | 0 | 0 | 45 | 0 | 0 | 0 |
| 121 | 649 | 739 | 670 | 0 | 1 | 0 | 1049 | 4 | 0 | 88 | 58 | 429 | 0 | 54 | 0 |
| 123 | 1156 | 577 | 399 | 0 | 0 | 0 | 146 | 0 | 0 | 47 | 1 | 71 | 2 | 0 | 0 |
| 124 | 553 | 518 | 380 | 0 | 0 | 0 | 348 | 2 | 0 | 0 | 14 | 17 | 0 | 6 | 0 |
| 125 | 1239 | 472 | 204 | 0 | 0 | 0 | 205 | 0 | 0 | 0 | 0 | 21 | 3 | 11 | 0 |
| 130 | 219 | 813 | 352 | 0 | 0 | 0 | 225 | 0 | 0 | 0 | 57 | 348 | 8 | 41 | 0 |
| 137 | 632 | 887 | 592 | 0 | 0 | 0 | 483 | 0 | 0 | 0 | 57 | 191 | 43 | 9 | 0 |
| 141 | 1102 | 658 | 522 | 0 | 0 | 0 | 531 | 0 | 0 | 0 | 24 | 475 | 0 | 0 | 0 |
| 143 | 438 | 906 | 1127 | 0 | 0 | 0 | 1390 | 0 | 0 | 0 | 5 | 2854 | 50 | 251 | 124 |
| 146 | 656 | 719 | 669 | 0 | 0 | 0 | 325 | 0 | 0 | 0 | 23 | 76 | 0 | 1 | 0 |
| 147 | 702 | 577 | 513 | 0 | 0 | 0 | 137 | 0 | 0 | 24 | 8 | 14 | 0 | 0 | 0 |
| 149 | 944 | 692 | 1117 | 0 | 0 | 0 | 227 | 33 | 0 | 75 | 40 | 134 | 0 | 80 | 0 |
| 150 | 450 | 783 | 656 | 0 | 0 | 0 | 188 | 0 | 0 | 0 | 12 | 164 | 8 | 18 | 0 |

图3(续)

| 样品 ID | 病理 | 阶段 | 第 1 | 第 2 | 第 3 | 体积 | 部位 | 部位分组 | 最终测定结果 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 单位 | | | 肿瘤 | | | $cm^3$ | | | |
| 80 | 正常 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 阴性 |
| 81 | 正常 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 阴性 |
| 82 | 正常 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 阳性 |
| 83 | 正常 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 阴性 |
| 84 | 正常 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 阴性 |
| 85 | 正常 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 阴性 |
| 86 | 正常 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 阴性 |
| 89 | 正常 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 阴性 |
| 91 | 正常 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 阴性 |
| 92 | 正常 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 阴性 |
| 95 | 正常 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 阴性 |
| 98 | 正常 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 阴性 |
| 99 | 正常 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 阴性 |
| 100 | 正常 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 阴性 |
| 105 | 正常 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 阴性 |
| 108 | 正常 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 阴性 |
| 109 | 正常 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 阴性 |
| 112 | 正常 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 阴性 |
| 116 | 正常 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 阴性 |
| 117 | 正常 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 阴性 |
| 119 | 正常 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 阴性 |
| 121 | 正常 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 阴性 |
| 123 | 正常 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 阴性 |
| 124 | 正常 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 阴性 |
| 125 | 正常 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 阴性 |
| 130 | 正常 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 阴性 |
| 137 | 正常 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 阴性 |
| 141 | 正常 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 阴性 |
| 143 | 正常 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 阴性 |
| 146 | 正常 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 阴性 |
| 147 | 正常 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 阴性 |
| 149 | 正常 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 阴性 |
| 150 | 正常 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 阴性 |

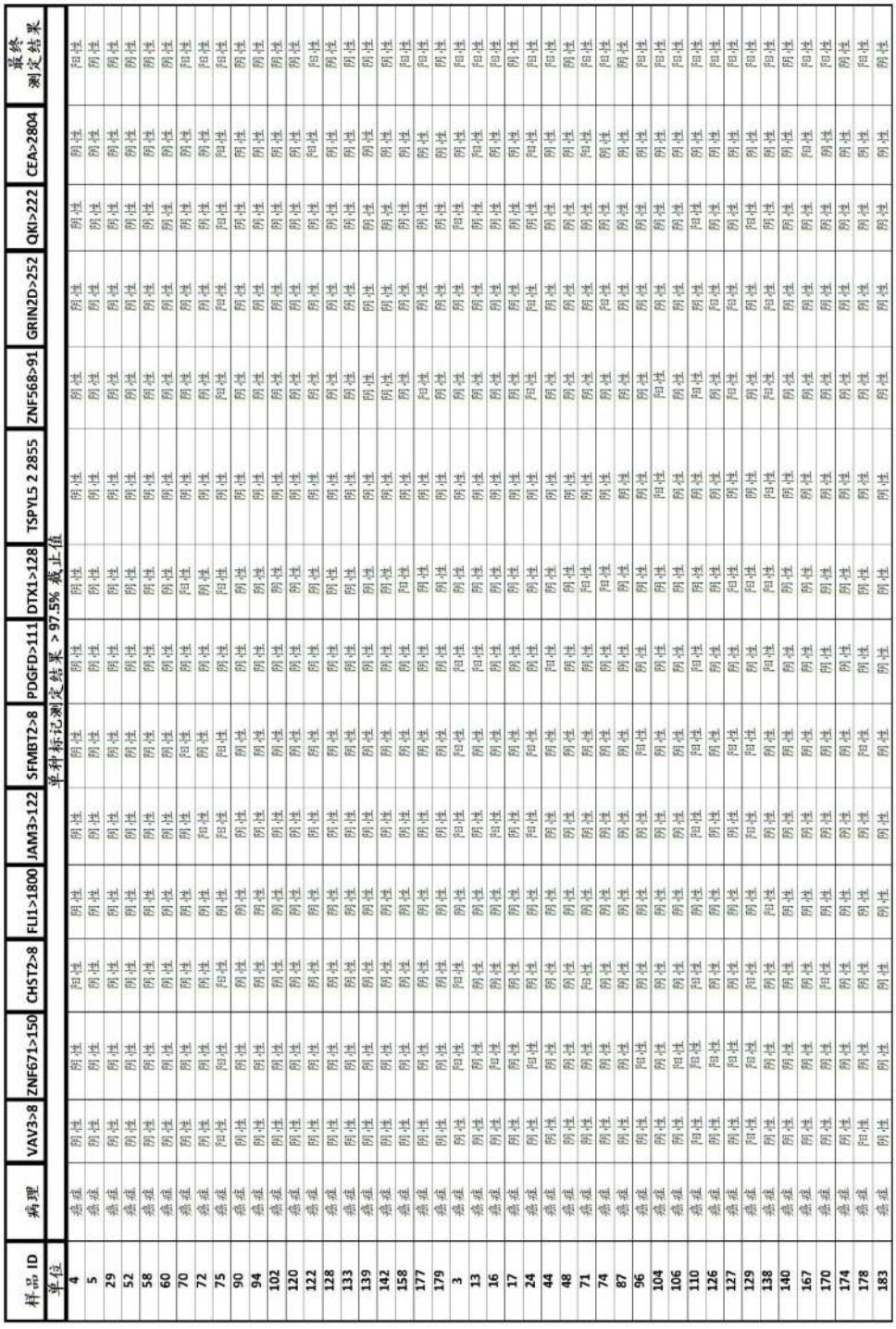
图3(续)

| 样品ID | CEA | WTZF RASSF1 | ACTB | VAV3 | ZNF671 | CHST2 | FLI1 | JAM3 | SFMBT2 | PDGFD | DTX1 | TSPYL5 | ZNF568 | GRIN2D | QKI |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 单位 | pg/mL | 链数/测定 | | | | | | | | | | | | | |
| 152 | 1851 | 975 | 1106 | 0 | 0 | 0 | 1799 | 24 | 0 | 1 | 943 | 1528 | 293 | 12 | 0 |
| 153 | 1600 | 730 | 643 | 0 | 0 | 0 | 295 | 0 | 0 | 15 | 127 | 986 | 16 | 222 | 0 |
| 154 | 1924 | 626 | 935 | 0 | 0 | 0 | 288 | 5 | 0 | 0 | 16 | 33 | 8 | 0 | 124 |
| 156 | 968 | 784 | 315 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 | 0 | 23 | 452 | 0 | 0 | 0 |
| 157 | 517 | 616 | 572 | 0 | 0 | 0 | 468 | 15 | 0 | 0 | 51 | 144 | 5 | 143 | 0 |
| 162 | 1401 | 686 | 929 | 0 | 0 | 0 | 297 | 0 | 0 | 0 | 7 | 432 | 0 | 0 | 0 |
| 163 | 641 | 578 | 554 | 0 | 0 | 0 | 153 | 0 | 0 | 0 | 1 | 329 | 0 | 67 | 0 |
| 164 | 1456 | 615 | 516 | 0 | 0 | 0 | 142 | 0 | 0 | 0 | 3 | 349 | 0 | 9 | 0 |
| 165 | 749 | 689 | 698 | 0 | 0 | 0 | 140 | 48 | 0 | 45 | 3 | 16 | 0 | 36 | 0 |
| 168 | 322 | 617 | 408 | 0 | 40 | 0 | 105 | 31 | 0 | 0 | 3 | 133 | 18 | 91 | 0 |
| 172 | 1159 | 547 | 362 | 0 | 0 | 0 | 141 | 0 | 0 | 15 | 2 | 0 | 0 | 32 | 0 |
| 175 | 360 | 544 | 328 | 0 | 0 | 0 | 277 | 0 | 0 | 0 | 8 | 0 | 0 | 20 | 0 |
| 176 | 639 | 586 | 551 | 0 | 0 | 0 | 233 | 0 | 0 | 0 | 8 | 82 | 0 | 0 | 0 |
| 180 | 2296 | 720 | 1247 | 0 | 0 | 0 | 289 | 118 | 0 | 0 | 3 | 70 | 0 | 42 | 0 |
| 182 | 883 | 665 | 371 | 0 | 0 | 0 | 127 | 0 | 0 | 0 | 1 | 15 | 0 | 22 | 0 |
| 185 | 758 | 663 | 911 | 0 | 0 | 0 | 93 | 121 | 0 | 0 | 5 | 75 | 0 | 17 | 0 |
| 186 | 422 | 647 | 387 | 0 | 0 | 0 | 90 | 5 | 0 | 0 | 1 | 97 | 12 | 0 | 0 |
| 187 | 740 | 785 | 559 | 0 | 0 | 0 | 182 | 0 | 0 | 2 | 6 | 454 | 0 | 80 | 0 |
| 188 | 634 | 814 | 1385 | 0 | 0 | 0 | 187 | 0 | 0 | 0 | 3 | 394 | 0 | 0 | 16 |

图3(续)

| 样品 ID | 病理 | 阶段 | 第 1 | 第 2 | 第 3 | 体积 | 部位 | 部位分组 | 最终测定结果 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 单位 | | | 肿瘤 | | | $cm^3$ | | | |
| 152 | 正常 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 阳性 |
| 153 | 正常 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 阴性 |
| 154 | 正常 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 阴性 |
| 156 | 正常 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 阴性 |
| 157 | 正常 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 阴性 |
| 162 | 正常 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 阴性 |
| 163 | 正常 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 阴性 |
| 164 | 正常 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 阴性 |
| 165 | 正常 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 阴性 |
| 168 | 正常 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 阴性 |
| 172 | 正常 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 阴性 |
| 175 | 正常 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 阴性 |
| 176 | 正常 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 阴性 |
| 180 | 正常 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 阴性 |
| 182 | 正常 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 阴性 |
| 185 | 正常 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 阴性 |
| 186 | 正常 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 阴性 |
| 187 | 正常 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 阴性 |
| 188 | 正常 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 不适用 | 阴性 |

图3(续)

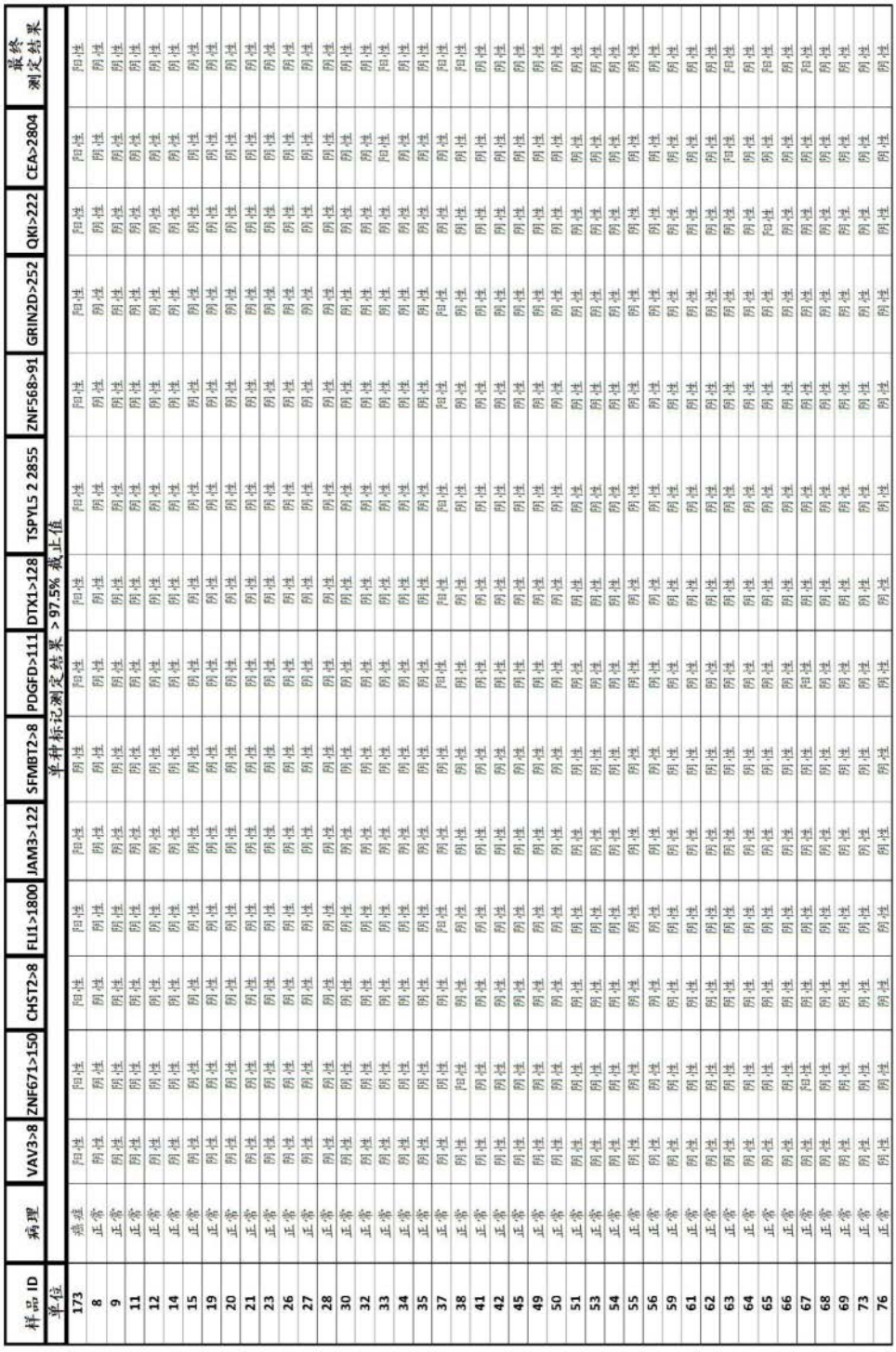


| 样品ID | 病理 | VAV3>8 | ZNF671>150 | CHST2>8 | FLI1>1800 | JAM3>122 | SFMBT2>8 | PDGFD>111 | DTX1>128 | TSPYL5 2 2855 | ZNF568>91 | GRIN2D>252 | QKI>222 | CEA>2804 | 最终测定结果 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 单位 | 单种标记测定结果 > 97.5% 截止值 | | | | | | | | | | | | | | |
| 4 | 癌症 | 阴性 | 阴性 | 阳性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阳性 |
| 5 | 癌症 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 |
| 29 | 癌症 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 |
| 52 | 癌症 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 |
| 58 | 癌症 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 |
| 60 | 癌症 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阳性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阳性 |
| 70 | 癌症 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阳性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阳性 |
| 72 | 癌症 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阳性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阳性 |
| 75 | 癌症 | 阳性 | 阳性 | 阳性 | 阴性 | 阳性 | 阳性 | 阴性 | 阳性 | 阴性 | 阳性 | 阳性 | 阳性 | 阳性 | 阳性 |
| 90 | 癌症 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 |
| 94 | 癌症 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 |
| 102 | 癌症 | 阴性 | 阴性 | 阳性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 |
| 120 | 癌症 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 |
| 122 | 癌症 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阳性 | 阳性 |
| 128 | 癌症 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 |
| 133 | 癌症 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 |
| 139 | 癌症 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 |
| 142 | 癌症 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 |
| 158 | 癌症 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阳性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阳性 |
| 177 | 癌症 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阳性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阳性 |
| 179 | 癌症 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 |
| 3 | 癌症 | 阴性 | 阳性 | 阳性 | 阴性 | 阳性 | 阳性 | 阳性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阳性 | 阴性 | 阳性 | 阳性 |
| 13 | 癌症 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阳性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阳性 | 阳性 | 阳性 |
| 16 | 癌症 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阳性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阳性 |
| 17 | 癌症 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 |
| 24 | 癌症 | 阴性 | 阳性 | 阴性 | 阴性 | 阳性 | 阳性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阳性 | 阳性 | 阳性 | 阳性 | 阳性 |
| 44 | 癌症 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阳性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阳性 |
| 48 | 癌症 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 |
| 71 | 癌症 | 阴性 | 阴性 | 阳性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阳性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阳性 | 阳性 |
| 74 | 癌症 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阳性 | 阴性 | 阴性 | 阳性 | 阴性 | 阴性 | 阳性 |
| 87 | 癌症 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 |
| 96 | 癌症 | 阴性 | 阳性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阳性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阳性 |
| 104 | 癌症 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阳性 | 阳性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阳性 |
| 106 | 癌症 | 阴性 | 阳性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阳性 |
| 110 | 癌症 | 阳性 | 阳性 | 阳性 | 阴性 | 阳性 | 阳性 | 阳性 | 阴性 | 阴性 | 阳性 | 阴性 | 阳性 | 阴性 | 阳性 |
| 126 | 癌症 | 阴性 | 阳性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阳性 | 阴性 | 阴性 | 阳性 |
| 127 | 癌症 | 阴性 | 阳性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阳性 | 阴性 | 阳性 | 阴性 | 阳性 | 阳性 | 阴性 | 阴性 | 阳性 |
| 129 | 癌症 | 阳性 | 阳性 | 阳性 | 阴性 | 阳性 | 阳性 | 阳性 | 阳性 | 阴性 | 阳性 | 阳性 | 阳性 | 阴性 | 阳性 |
| 138 | 癌症 | 阴性 | 阴性 | 阳性 | 阳性 | 阴性 | 阴性 | 阳性 | 阳性 | 阳性 | 阳性 | 阳性 | 阴性 | 阴性 | 阳性 |
| 140 | 癌症 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阳性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 |
| 167 | 癌症 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阳性 | 阳性 |
| 170 | 癌症 | 阴性 | 阴性 | 阳性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阳性 |
| 174 | 癌症 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 |
| 178 | 癌症 | 阳性 | 阳性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阳性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阳性 | 阳性 |
| 183 | 癌症 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 |

图4

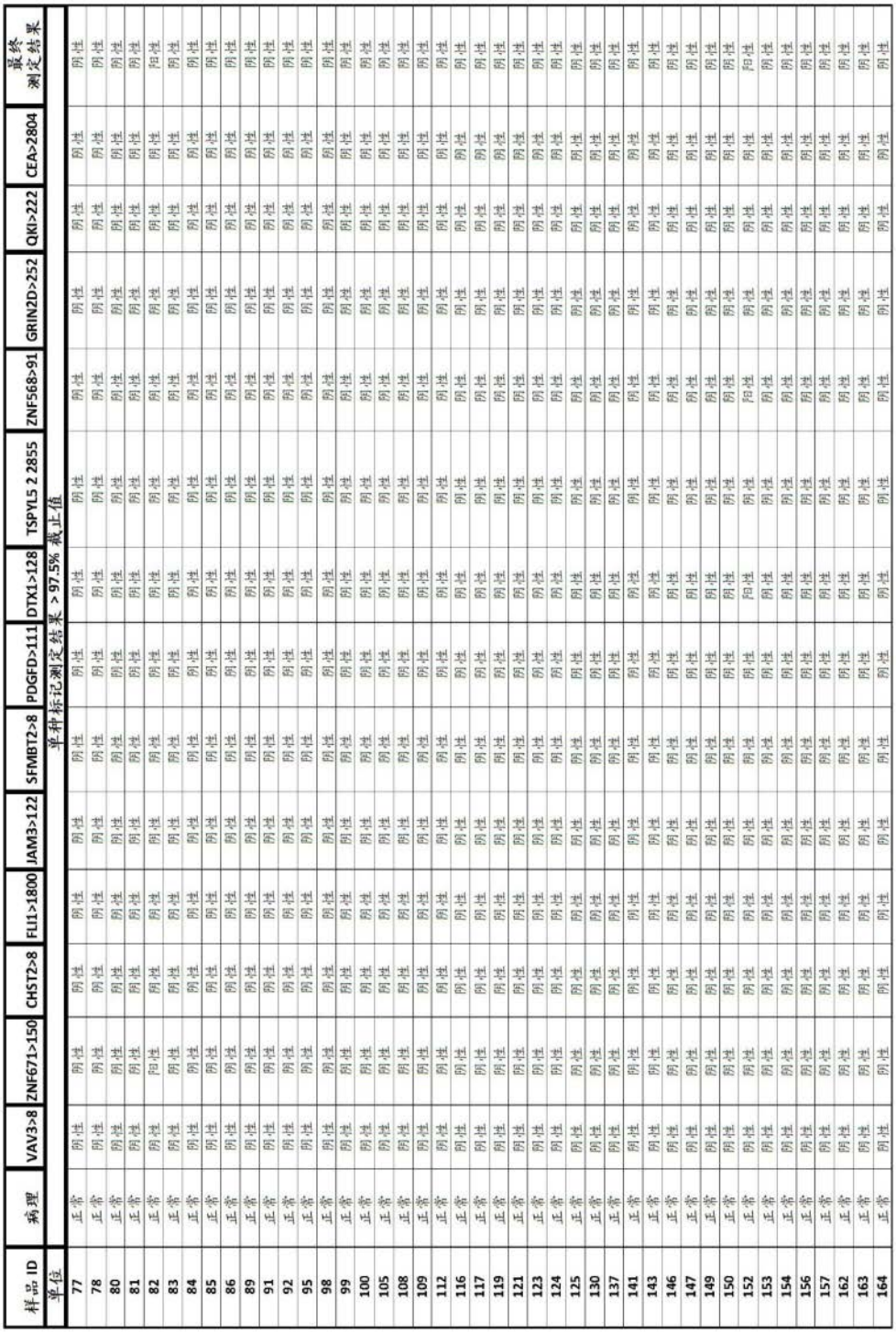
| 样品 ID | 病理 | VAV3>8 | ZNF671>150 | CHST2>8 | FLI1>1800 | JAM3>122 | SFMBT2>8 | PDGFD>111 | DTX1>128 | TSPYL5 2 2855 | ZNF568>91 | GRIN2D>252 | QKI>222 | CEA>2804 | 最终测定结果 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 单位 | | 单种标记测定结果 > 97.5% 截止值 | | | | | | | | | | | | | |
| 184 | 癌症 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 |
| 1 | 癌症 | 阴性 | 阳性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阳性 | 阴性 | 阴性 | 阳性 | 阴性 | 阴性 | 阳性 |
| 2 | 癌症 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阳性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阳性 |
| 7 | 癌症 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阳性 |
| 18 | 癌症 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阳性 | 阴性 | 阴性 | 阳性 | 阴性 | 阳性 | 阳性 | 阳性 | 阳性 | 阴性 | 阳性 |
| 22 | 癌症 | 阴性 | 阳性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 |
| 36 | 癌症 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阳性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阳性 | 阳性 |
| 39 | 癌症 | 阳性 | 阳性 | 阳性 | 阳性 | 阳性 | 阳性 | 阳性 | 阳性 | 阳性 | 阳性 | 阳性 | 阳性 | 阳性 | 阳性 |
| 40 | 癌症 | 阴性 | 阳性 | 阳性 | 阴性 | 阳性 | 阳性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阳性 | 阳性 | 阳性 | 阳性 | 阳性 |
| 47 | 癌症 | 阳性 | 阳性 | 阳性 | 阴性 | 阳性 | 阳性 | 阳性 | 阳性 | 阳性 | 阳性 | 阳性 | 阳性 | 阴性 | 阳性 |
| 93 | 癌症 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 |
| 101 | 癌症 | 阴性 | 阴性 | 阳性 | 阴性 | 阴性 | 阳性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 |
| 107 | 癌症 | 阳性 | 阳性 | 阳性 | 阴性 | 阳性 | 阳性 | 阳性 | 阳性 | 阴性 | 阳性 | 阳性 | 阳性 | 阴性 | 阳性 |
| 111 | 癌症 | 阳性 | 阳性 | 阳性 | 阴性 | 阳性 | 阴性 | 阳性 | 阳性 | 阴性 | 阳性 | 阳性 | 阳性 | 阴性 | 阳性 |
| 114 | 癌症 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阳性 | 阴性 |
| 115 | 癌症 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 |
| 131 | 癌症 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阳性 | 阳性 | 阴性 | 阴性 | 阳性 | 阴性 | 阴性 | 阳性 | 阳性 |
| 132 | 癌症 | 阳性 | 阳性 | 阳性 | 阴性 | 阳性 | 阳性 | 阳性 | 阳性 | 阳性 | 阳性 | 阳性 | 阳性 | 阳性 | 阳性 |
| 135 | 癌症 | 阴性 | 阳性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阳性 | 阳性 |
| 145 | 癌症 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阳性 |
| 148 | 癌症 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 |
| 159 | 癌症 | 阴性 | 阳性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 |
| 160 | 癌症 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阳性 | 阴性 |
| 161 | 癌症 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 |
| 169 | 癌症 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 |
| 6 | 癌症 | 阳性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阳性 | 阳性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阳性 | 阳性 |
| 10 | 癌症 | 阴性 | 阳性 | 阳性 | 阴性 | 阳性 | 阳性 | 阳性 | 阴性 | 阴性 | 阳性 | 阳性 | 阴性 | 阳性 | 阳性 |
| 25 | 癌症 | 阳性 | 阳性 | 阳性 | 阳性 | 阳性 | 阳性 | 阳性 | 阳性 | 阳性 | 阳性 | 阳性 | 阳性 | 阳性 | 阳性 |
| 31 | 癌症 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 |
| 43 | 癌症 | 阳性 | 阳性 | 阳性 | 阳性 | 阳性 | 阳性 | 阳性 | 阳性 | 阳性 | 阳性 | 阳性 | 阳性 | 阳性 | 阳性 |
| 46 | 癌症 | 阴性 | 阳性 | 阳性 | 阳性 | 阳性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阳性 | 阳性 | 阳性 | 阳性 | 阳性 | 阳性 |
| 57 | 癌症 | 阳性 | 阴性 | 阳性 | 阴性 | 阳性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阳性 | 阳性 |
| 79 | 癌症 | 阳性 | 阳性 | 阳性 | 阳性 | 阳性 | 阳性 | 阳性 | 阳性 | 阳性 | 阳性 | 阳性 | 阳性 | 阳性 | 阳性 |
| 88 | 癌症 | 阳性 | 阳性 | 阳性 | 阳性 | 阳性 | 阳性 | 阳性 | 阳性 | 阳性 | 阳性 | 阳性 | 阳性 | 阴性 | 阳性 |
| 103 | 癌症 | 阴性 | 阳性 | 阴性 | 阳性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阳性 | 阳性 | 阴性 | 阳性 | 阳性 |
| 113 | 癌症 | 阳性 | 阳性 | 阳性 | 阳性 | 阳性 | 阴性 | 阳性 | 阳性 | 阳性 | 阳性 | 阳性 | 阴性 | 阳性 | 阳性 |
| 118 | 癌症 | 阳性 | 阳性 | 阳性 | 阳性 | 阳性 | 阳性 | 阳性 | 阳性 | 阴性 | 阳性 | 阳性 | 阳性 | 阴性 | 阳性 |
| 134 | 癌症 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阳性 | 阳性 | 阳性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阳性 | 阳性 |
| 136 | 癌症 | 阳性 | 阳性 | 阳性 | 阳性 | 阳性 | 阳性 | 阳性 | 阳性 | 阳性 | 阳性 | 阳性 | 阳性 | 阴性 | 阳性 |
| 144 | 癌症 | 阳性 | 阳性 | 阳性 | 阳性 | 阳性 | 阳性 | 阳性 | 阳性 | 阳性 | 阳性 | 阳性 | 阳性 | 阳性 | 阳性 |
| 151 | 癌症 | 阳性 | 阳性 | 阳性 | 阳性 | 阳性 | 阳性 | 阳性 | 阳性 | 阳性 | 阳性 | 阳性 | 阳性 | 阴性 | 阳性 |
| 155 | 癌症 | 阳性 | 阳性 | 阳性 | 阳性 | 阳性 | 阳性 | 阳性 | 阳性 | 阳性 | 阳性 | 阳性 | 阳性 | 阳性 | 阳性 |
| 166 | 癌症 | 阳性 | 阳性 | 阳性 | 阳性 | 阳性 | 阳性 | 阴性 | 阳性 | 阳性 | 阳性 | 阳性 | 阳性 | 阳性 | 阳性 |

图4(续)



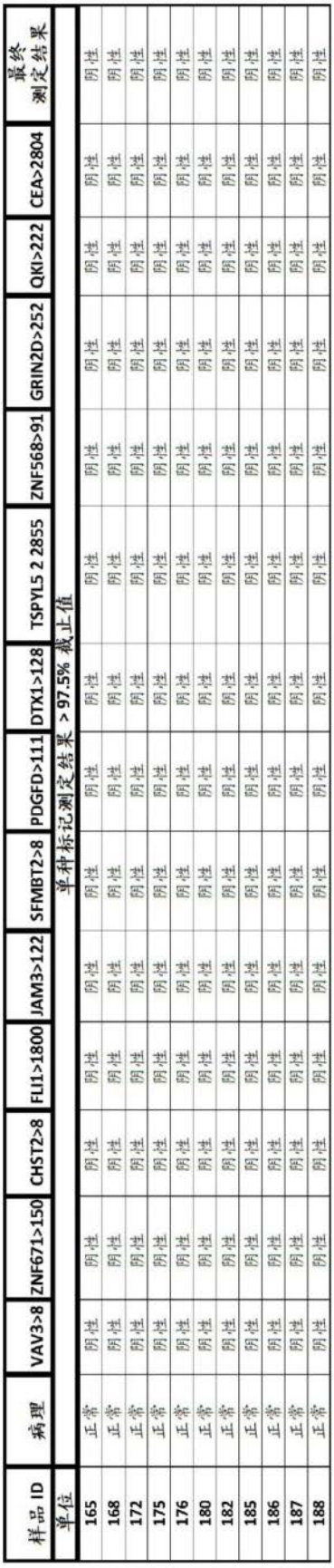
| 样品 ID | 病理 | VAV3>8 | ZNF671>150 | CHST2>8 | FLI1>1800 | JAM3>122 | SFMBT2>8 | PDGFD>111 | DTX1>128 | TSPYL5 2 2855 | ZNF568>91 | GRIN2D>252 | QKI>222 | CEA>2804 | 最终测定结果 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 单位 | 单种标记测定结果 > 97.5% 截止值 | | | | | | | | | | | | | | |
| 173 | 癌症 | 阳性 | 阳性 | 阳性 | 阳性 | 阳性 | 阴性 | 阳性 | 阳性 | 阳性 | 阳性 | 阳性 | 阳性 | 阳性 | 阳性 |
| 8 | 正常 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 |
| 9 | 正常 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 |
| 11 | 正常 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 |
| 12 | 正常 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 |
| 14 | 正常 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 |
| 15 | 正常 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 |
| 19 | 正常 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 |
| 20 | 正常 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 |
| 21 | 正常 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 |
| 23 | 正常 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 |
| 26 | 正常 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 |
| 27 | 正常 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 |
| 28 | 正常 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 |
| 30 | 正常 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 |
| 32 | 正常 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 |
| 33 | 正常 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阳性 | 阳性 |
| 34 | 正常 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 |
| 35 | 正常 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 |
| 37 | 正常 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阳性 | 阴性 | 阴性 | 阳性 | 阳性 | 阳性 | 阳性 | 阳性 | 阴性 | 阳性 | 阳性 |
| 38 | 正常 | 阴性 | 阳性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阳性 | 阳性 |
| 41 | 正常 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 |
| 42 | 正常 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 |
| 45 | 正常 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 |
| 49 | 正常 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 |
| 50 | 正常 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 |
| 51 | 正常 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 |
| 53 | 正常 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 |
| 54 | 正常 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 |
| 55 | 正常 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 |
| 56 | 正常 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 |
| 59 | 正常 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 |
| 61 | 正常 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 |
| 62 | 正常 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 |
| 63 | 正常 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阳性 | 阳性 |
| 64 | 正常 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 |
| 65 | 正常 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阳性 | 阴性 | 阳性 |
| 66 | 正常 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 |
| 67 | 正常 | 阴性 | 阳性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阳性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阳性 |
| 68 | 正常 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 |
| 69 | 正常 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 |
| 73 | 正常 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 |
| 76 | 正常 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 |

图4(续)



| 样品ID | 病理 | VAV3>8 | ZNF671>150 | CHST2>8 | FLI1>1800 | JAM3>122 | SFMBT2>8 | PDGFD>111 | DTX1>128 | TSPYL5 2 2855 | ZNF568>91 | GRIN2D>252 | QKI>222 | CEA>2804 | 最终测定结果 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 单位 | | | | | | | 单种标记测定结果 > 97.5% 截止值 | | | | | | | | |
| 77 | 正常 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 |
| 78 | 正常 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 |
| 80 | 正常 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 |
| 81 | 正常 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 |
| 82 | 正常 | 阴性 | 阳性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阳性 |
| 83 | 正常 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 |
| 84 | 正常 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 |
| 85 | 正常 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 |
| 86 | 正常 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 |
| 89 | 正常 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 |
| 91 | 正常 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 |
| 92 | 正常 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 |
| 95 | 正常 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 |
| 98 | 正常 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 |
| 99 | 正常 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 |
| 100 | 正常 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 |
| 105 | 正常 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 |
| 108 | 正常 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 |
| 109 | 正常 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 |
| 112 | 正常 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 |
| 116 | 正常 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 |
| 117 | 正常 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 |
| 119 | 正常 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 |
| 121 | 正常 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 |
| 123 | 正常 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 |
| 124 | 正常 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 |
| 125 | 正常 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 |
| 130 | 正常 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 |
| 137 | 正常 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 |
| 141 | 正常 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 |
| 143 | 正常 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 |
| 146 | 正常 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 |
| 147 | 正常 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 |
| 149 | 正常 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 |
| 150 | 正常 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 |
| 152 | 正常 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 |
| 153 | 正常 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 |
| 154 | 正常 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 |
| 156 | 正常 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 |
| 157 | 正常 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 |
| 162 | 正常 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 |
| 163 | 正常 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 |
| 164 | 正常 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 |

图4(续)



| 样品 ID | 病理 | VAV3>8 | ZNF671>150 | CHST2>8 | FLI1>1800 | JAM3>122 | SFMBT2>8 | PDGFD>111 | DTX1>128 | TSPYL5 2 2855 | ZNF568>91 | GRIN2D>252 | QKI>222 | CEA>2804 | 最终测定结果 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 单位 | 单种标记测定结果 > 97.5% 截止值 | | | | | | | | | | | | | | |
| 165 | 正常 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 |
| 168 | 正常 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 |
| 172 | 正常 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 |
| 175 | 正常 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 |
| 176 | 正常 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 |
| 180 | 正常 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 |
| 182 | 正常 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 |
| 185 | 正常 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 |
| 186 | 正常 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 |
| 187 | 正常 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 |
| 188 | 正常 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 | 阴性 |

图4(续)

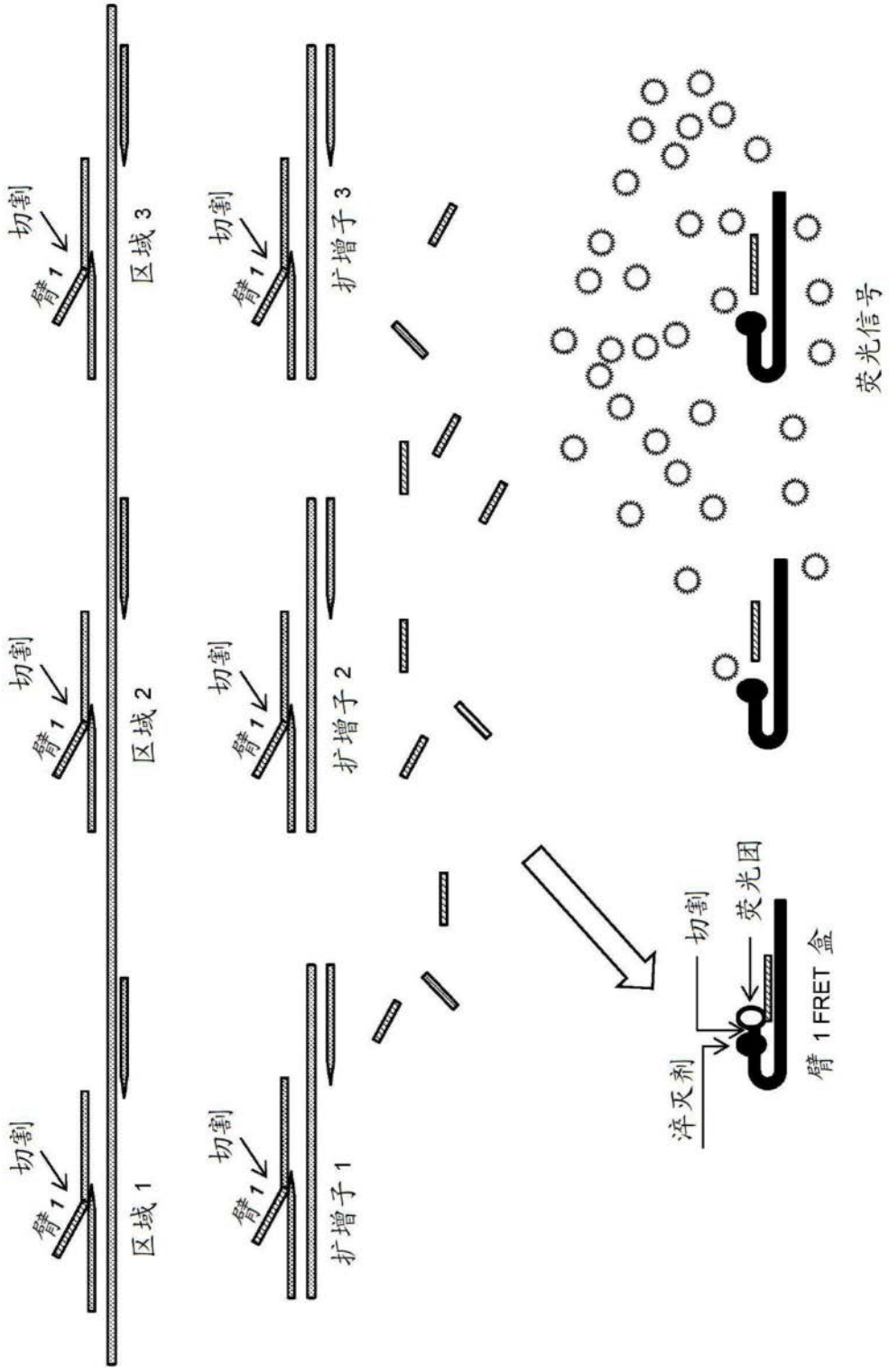



图5