



(10) 授权公告号 CN 111655869 B

(45) 授权公告日 2024.06.28

(21) 申请号 201880086996.9

(22) 申请日 2018.11.28

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 111655869 A

(43) 申请公布日 2020.09.11

(30) 优先权数据
62/592,828 2017.11.30 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2020.07.17

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/US2018/062809 2018.11.28

(87) PCT国际申请的公布数据
W02019/108626 EN 2019.06.06

(73) 专利权人 梅约医学教育与研究基金会
地址 美国明尼苏达州
专利权人 精密科学公司

(72) 发明人 大卫·A·阿尔奎斯特
威廉·R·泰勒
道格拉斯·W·马奥尼

特蕾西·C·亚卜
约翰·B·基谢尔
哈特姆·T·阿拉维
格雷厄姆·P·利德加德
迈克尔·W·凯泽

(74) 专利代理机构 成都超凡明远知识产权代理
有限公司 51258
专利代理师 王晖 刘书芝

(51) Int.Cl.
G12Q 1/6886 (2018.01)

(56) 对比文件
Karthik V. Girdhar et al..Plasma
assay of methylated DNA markers (MDM)
detects patients with metastatic breast
cancer (MBC) compared to healthy controls
and treated breast cancer patients with
no evidence of disease.《Cancer research》
.2023,第83卷(第5期),Abstract P2-11-06.

审查员 柳一夫

权利要求书1页 说明书138页
序列表96页

(54) 发明名称

检测乳腺癌

(57) 摘要

本文提供了用于乳腺癌筛查,并且特别地但不排他地涉及用于检测乳腺癌的存在性的方法、组合物和相关用途的技术。

1. 以甲基化特异性方式修饰DNA的试剂和对一种或多种基因具有特异性的引物在制备用于通过确定所述一种或多种基因的甲基化水平在从受试者获得的样品中筛查乳腺癌的试剂盒的用途；

其中所述一种或多种基因选自FAM59B、ITPRIPL1、C10orf125、TRIM67、SPHK2、CALN1、CHST2、MPZ、ODC1、OSR2、TRH、OTX1、BANK1和C17orf64,并且其中所述一种或多种基因包括FAM59B。

2. 如权利要求1所述的用途,其中所述以甲基化特异性方式修饰DNA的试剂包括甲基化敏感性限制酶、甲基化依赖性限制酶和亚硫酸氢盐试剂中的一者或多者。

3. 如权利要求1所述的用途,其中确定所述一种或多种基因的甲基化水平包括使用多路扩增、甲基化特异性PCR、定量甲基化特异性PCR、甲基化特异性DNA限制酶分析、定量亚硫酸氢盐焦磷酸测序、瓣状核酸内切酶测定、PCR-瓣状物测定或亚硫酸氢盐基因组测序PCR。

4. 如权利要求1所述的用途,其中对FAM59B具有特异性的引物包括SEQ ID NOs:427和428。

5. 如权利要求4所述的用途,其中:

对TRH具有特异性的一组引物包括SEQ ID NO:245和246,

对MPZ具有特异性的一组引物包括SEQ ID NO:175和176,或SEQ ID NO:439和440,

对ITPRIPL1具有特异性的一组引物包括SEQ ID NO:97和98、SEQ ID NO:99和100,或SEQ ID NO:425和426,

对OSR2具有特异性的一组引物包括SEQ ID NO:187和188,

对CHST2具有特异性的一组引物包括SEQ ID NO:39和40,

对C17orf64具有特异性的一组引物包括SEQ ID NO:269和270,或SEQ ID NO:449和450,

对OTX1具有特异性的一组引物包括SEQ ID NO:289和290,或SEQ ID NO:441和442,

对ODC1具有特异性的一组引物包括SEQ ID NO:341和342,或SEQ ID NO:443和444,

对BANK1具有特异性的一组引物包括SEQ ID NO:423和424,

对C10orf125具有特异性的一组引物包括SEQ ID NO:429和430,

对TRIM67具有特异性的一组引物包括SEQ ID NO:431和432,

对SPHK2具有特异性的一组引物包括SEQ ID NO:433和434;以及

对CALN1具有特异性的一组引物包括SEQ ID NO:273和274。

6. 如权利要求1所述的用途,其中所述样品是组织样品。

7. 如权利要求6所述的用途,其中所述样品是乳腺组织样品。

8. 如权利要求1所述的用途,其中所述样品是血液样品、血清样品或血浆样品。

9. 如权利要求1所述的用途,其中使用所述试剂盒的方法包括:

用以甲基化特异性方式修饰DNA的试剂处理所述样品中的基因组DNA;

使用对选自FAM59B、ITPRIPL1、C10orf125、TRIM67、SPHK2、CALN1、CHST2、MPZ、ODC1、OSR2、TRH、OTX1、BANK1和C17orf64的一种或多种基因具有特异性的引物扩增经处理基因组DNA,其中所述一种或多种基因包括FAM59B;以及

使用聚合酶链式反应、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集来确定所述一种或多种基因的甲基化水平。

检测乳腺癌

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2017年11月30日提交的美国临时申请号62/592,828的优先权和权益,所述美国临时申请的内容据此以引用的方式整体并入本文。

发明领域

[0003] 本文提供了用于乳腺癌筛查,并且特别地但不排他地涉及用于检测乳腺癌的存在性的方法、组合物和相关用途的技术。

背景技术

[0004] 乳腺癌每年影响约230,000名美国妇女,并且每年夺走约40,000条生命。尽管已知的是BRCA1和BRCA2基因中的种系突变的携带者处于乳腺癌的高风险下,但大多数患得乳腺癌的妇女在这些基因中的一者中不具有突变,并且准确鉴定处于增加的乳腺癌风险下的妇女的能力是有限的。存在有效的预防疗法,但当前风险预测模型不能准确鉴定出大多数处于增加的乳腺癌风险下的妇女(参见例如Pankratz VS等,J Clin Oncol 2008年11月20日;26(33):5374-9)。

[0005] 需要用于检测乳腺癌的改进方法。

[0006] 本发明解决这些需要。

发明内容

[0007] 甲基化DNA已作为大多数肿瘤类型的组织中的一类潜在生物标志物加以研究。在许多情况下,DNA甲基转移酶在胞嘧啶-磷酸-鸟嘌呤(CpG)岛位点处将甲基添加至DNA中作为对基因表达的表观遗传控制。在一种在生物学上具有吸引力的机理中,肿瘤抑制基因的启动子区域中的获得性甲基化事件被认为会使表达沉默,由此促进肿瘤发生。相比于RNA或蛋白质表达,DNA甲基化可为一种更具化学和生物稳定性的诊断工具(Laird(2010)Nat Rev Genet 11:191-203)。此外,在其他癌症如散发性结肠癌中,甲基化标志物提供卓越特异性,并且相比于单个DNA突变,提供更加广泛信息并更加灵敏(Zou等(2007)Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 16:2686-96)。

[0008] 当应用于动物模型和人类细胞系时,对CpG岛的分析已产生重要研究结果。举例来说,Zhang和同事发现来自同一CpG岛的不同部分的扩增子可具有不同甲基化水平(Zhang等(2009)PLoS Genet 5:e1000438)。此外,在高度甲基化序列与未甲基化序列之间,甲基化水平呈双峰分布,从而进一步支持DNA甲基转移酶活性的双向开关样样式(Zhang等(2009)PLoS Genet 5:e1000438)。在体内对鼠组织以及在体外对细胞系的分析证明仅约0.3%的高CpG密度启动子(HCP,定义为在含300个碱基对的区域内具有>7% CpG序列)被甲基化,而低CpG密度的区域(LCP,定义为在含300个碱基对的区域内具有<5% CpG序列)倾向于以动态组织特异性样式被频繁地甲基化(Meissner等(2008)Nature 454:766-70)。HCP包括普遍存在的持家基因和受高度调控的发育基因的启动子。在甲基化程度>50%的HCP位点之中的是

若干确定标志物诸如Wnt 2、NDRG2、SFRP2和BMP3 (Meissner等 (2008) Nature 454:766-70)。

[0009] 由DNA甲基转移酶在胞嘧啶-磷酸-鸟嘌呤 (CpG) 岛位点处对DNA的表观遗传甲基化已作为大多数肿瘤类型的组织中的一类潜在生物标志物加以研究。在一种在生物学上具有吸引力的机理中,肿瘤抑制基因的启动子区域中的获得性甲基化事件被认为会使表达沉默,从而促进肿瘤发生。相比于RNA或蛋白质表达,DNA甲基化可为一种更具化学和生物稳定性的诊断工具。此外,在其他癌症如散发性结肠癌中,相比于单个DNA突变,异常甲基化标志物提供更加广泛信息并更加灵敏,并且提供卓越特异性。

[0010] 若干方法可用于搜索新型甲基化标志物。尽管基于微阵列的CpG甲基化探询是一种合理的高通量方法,但这个策略偏向已知目标区域,主要是确定的肿瘤抑制基因启动子。在过去十年中已开发用于对DNA甲基化进行全基因组分析的替代性方法。存在三种基本方法。第一方法采用通过识别特定甲基化位点的限制酶对DNA进行消化,随后采用提供甲基化数据的若干可能的分析技术,所述甲基化数据限于酶识别位点或用于在定量步骤(诸如甲基化特异性PCR;MSP)中扩增DNA的引物。第二方法使用针对甲基胞嘧啶的抗体或其他甲基化特异性结合结构域来富集基因组DNA的甲基化部分,随后进行微阵列分析或测序以相对于参考基因组来定位片段。这个方法不提供片段内所有甲基化位点的单核苷酸分辨率。第三方法以用亚硫酸氢盐处理DNA以使所有未甲基化胞嘧啶转化成尿嘧啶开始,随后进行限制酶消化,以及在偶联于衔接配体之后对所有片段进行完全测序。限制酶的选择可使CpG密集区域的片段富集,从而降低在分析期间可定位于多个基因位置的冗余序列的数目。

[0011] RRBS在中度至高度读段覆盖度下产生所有CpG岛中的80-90%以及肿瘤抑制基因启动子中的大多数的在单核苷酸分辨率下的CpG甲基化状态数据。在癌症病例对照研究中,对这些读段的分析导致鉴定差异性甲基化区域(DMR)。在对胰腺癌试样的先前RRBS分析中,揭示了数百个DMR,其中许多从未与癌发生相关联,并且其中许多是未注释的。对独立组织样品集合进行的进一步验证研究确认了在性能方面具有100%灵敏性和特异性的标志CpG。

[0012] 本文提供了用于乳腺癌筛查,并且特别地但不排他地涉及用于检测乳腺癌的存在性的方法、组合物和相关用途的技术。

[0013] 实际上,如实施例I、II和III中所述,在用于鉴定本发明的实施方案的过程期间进行的实验鉴定了用于辨别乳腺癌源性DNA与非赘生性对照DNA的一组新型差异性甲基化区域(DMR)。

[0014] 所述实验列出和描述区分乳腺癌组织与良性乳腺组织的375种新型DNA甲基化标志物(参见表2和表18、实施例I、II和III)。

[0015] 从这375种新型DNA甲基化标志物,进一步实验鉴定了能够区分乳腺癌组织与良性乳腺组织的以下标志物和/或标志物组:

[0016] • ATP6V1B1、LMX1B_A、BANK1、OTX1、MAX.chr11.14926602-14927148、UBTF、PRKCB、TRH_A、MPZ、DNM3_A、TRIM67、MAX.chr12.4273906-4274012、CALN1_A、ITPRIPL1、MAX.chr12.4273906-4274012、GYPC_B、MAX.chr5.42994866-42994936、OSR2_A、SCRT2_B、MAX.chr5.145725410-145725459、MAX.chr11.68622869-68622968、MAX.chr8.124173030-124173395、MAX.chr20.1784209-1784461、LOC100132891、BHLHE23_D、MAX.chr19.46379903-46380197、CHST2_B、MAX.chr5.77268672-77268725、C17orf64、EMX1_A、DSCR6、ITPRIPL1、IGF2BP3_B、DLX4和ABLIM1(参见表16E、实施例II);和

[0017] • ABLIM1_B、AJAP1_C、ALOX5_B、ASCL2_B、BANK1_B、BHLHE23_E、C10orf125_B、C17orf64_B、CALN1_1520、CALN_1B、CD1D_1058、CDH4_7890、CHST2_8128、CHST2_8384、CHST2_9316、CHST2_9470、CLIC6_B、CXCL12_B、DLX4_B、DNM3_D、EMX1_A、ESPN_B、FAM59B_7764、FOXP4_B、GP5、HOXA1_C、IGF2BP3_C、IPTRIPL1_1138、IPTRIPL1_1200、KCNK9_B、KCNK17_C、LAYN_B、LIME1_B、LMX1B_D、LOC100132891_B、MAST1_B、MAX.chr12.427.br、MAX.chr20.4422、MPZ_5742、MPZ_5554、MSX2P1_B、ODC1_B、OSR2_A、OTX1_B、PLXNC1_B、PRKCB_7570、SCRT2_C、SLC30A10、SPHK2_B、ST8SIA4_B、STX16_C、TRH_A和TRIM67_B(参见表22、实施例III)。

[0018] 从这375种新型DNA甲基化标志物,进一步实验鉴定了用于在血液样品(例如血浆样品、全血样品、血清样品)中检测乳腺癌的以下标志物和/或标志物组:

[0019] • CD1D、ITPRIPL1、FAM59B、C10orf125、TRIM67、SPHK2、CALN1_B、CHST2_B、MPZ、CXCL12_B、ODC1_B、OSR2_A、TRH_A和C17orf64_B(参见表27、实施例III)。

[0020] 从这375种新型DNA甲基化标志物,进一步实验鉴定了能够区分三阴性乳腺癌组织与良性乳腺组织的以下标志物和/或标志物组:

[0021] • ABLIM1、AJAP1_B、ASCL2、ATP6V1B1、BANK1、CALN1_A、CALN1_B、CLIC6、DSCR6、FOXP4、GAD2、GCGR、GP5、GRASP、HBM、HNF1B_B、KLF16、MAGI2、MAX.chr11.14926602-14927148、MAX.chr12.4273906-4274012、MAX.chr17.73073682-73073814、MAX.chr18.76734362-76734370、MAX.chr2.97193478-97193562、MAX.chr22.42679578-42679917、MAX.chr4.8859253-8859329、MAX.chr4.8859602-8859669、MAX.chr4.8860002-8860038、MAX.chr5.145725410-145725459、MAX.chr6.157557371-157557657、MPZ、NKX2-6、PDX1、PLXNC1_A、PPARG、PRKCB、PTPRN2、RBFox_A、SCRT2_A、SLC7A4、STAC2_B、STX16_A、STX16_B、TBX1、TRH_A、VSTM2B_A、ZBTB16、ZNF132和ZSCAN23(参见表3、实施例I)；

[0022] • CALN1_A、LOC100132891、NACAD、TRIM67、ATP6V1B1、DLX4、GP5、ITPRIPL1、MAX.chr11.14926602-14927148、MAX.chr5.42994866-42994936、MAX.chr8.124173030-124173395、MPZ、PRKCB、ST8SIA4、STX16_B、ITPRIPL1、KLF16、MAX.chr12.4273906-4274012、KCNK9、SCRT2_B、CDH4_E、HNF1B_B、TRH_A、MAX.chr20.1784209-1784461、MAX.chr12.4273906-4274012、MAX.chr5.145725410-145725459、MAX.chr5.77268672-77268725和DSCR6(参见表11、实施例I)；

[0023] • ATP6V1B1、MAX.chr11.14926602-14927148、PRKCB、TRH_A、MPZ、GP5、TRIM67、MAX.chr12.4273906-4274012、CALN1_A、MAX.chr12.4273906-4274012、MAX.chr5.42994866-42994936、SCRT2_B、MAX.chr5.145725410-145725459、BHLHE23_D、MAX.chr5.77268672-77268725、EMX1_A、DSCR6和DLX4(参见表16A、实施例II)。

[0024] 从这375种新型DNA甲基化标志物,进一步实验鉴定了能够区分HER2⁺乳腺癌组织与良性乳腺组织的以下标志物和/或标志物组:

[0025] • ABLIM1、AFAP1L1、AKR1B1、ALOX5、AMN、ARL5C、BANK1、BCAT1、BEGAIN、BEST4、BHLHE23_B、BHLHE23_C、C17orf64、C1QL2、C7orf52、CALN1_B、CAV2、CD8A、CDH4_A、CDH4_B、CDH4_C、CDH4_D、CDH4_E、CDH4_F、CHST2_B、CLIP4、CR1、DLK1、DNAJC6、DNM3_A、EMX1_A、ESPN、FABP5、FAM150A、FLJ42875、GLP1R、GNG4、GYPC_A、HAND2、HES5、HNF1B_A、HNF1B_B、HOXA1_A、HOXA1_B、HOXA7_A、HOXA7_B、HOXA7_C、HOXD9、IGF2BP3_A、IGF2BP3_B、IGSF9B_A、IL15RA、

INSM1、ITPKA_B、ITPRIPL1、KCNE3、KCNK17_B、LIME1、LOC100132891、LOC283999、LY6H、MAST1、MAX.chr1.158083198-158083476、MAX.chr1.228074764-228074977、MAX.chr1.46913931-46913950、MAX.chr10.130085265-130085312、MAX.chr11.68622869-68622968、MAX.chr14.101176106-101176260、MAX.chr15.96889069-96889128、MAX.chr17.8230197-8230314、MAX.chr19.46379903-46380197、MAX.chr2.97193163-97193287、MAX.chr2.97193478-97193562、MAX.chr20.1784209-1784461、MAX.chr21.44782441-44782498、MAX.chr22.23908718-23908782、MAX.chr5.145725410-145725459、MAX.chr5.178957564-178957598、MAX.chr5.180101084-180101094、MAX.chr5.42952185-42952280、MAX.chr5.42994866-42994936、MAX.chr6.27064703-27064783、MAX.chr7.152622607-152622638、MAX.chr8.145104132-145104218、MAX.chr9.136474504-136474527、MCF2L2、MSX2P1、NACAD、NID2_B、NID2_C、ODC1、OSR2_B、PAQR6、PCDH8、PIF1、PPARA、PPP2R5C、PRDM13_A、PRHOXNB、PRKCB、RBFOX3_A、RBFOX3_B、RFX8、SNCA、STAC2_A、STAC2_B、STX16_B、SYT5、TIMP2、TMEFF2、TNFRSF10D、TRH_B、TRIM67、TRIM71_C、USP44_A、USP44_B、UTF1、UTS2R、VSTM2B_A、VSTM2B_B、ZFP64和ZNF132(参见表4、实施例I)；

[0026] • BHLHE23_C、CALN1_A、CD1D、CHST2_A、FMN2、HOXA1_A、HOXA7_A、KCNH8、LOC100132891、MAX.chr15.96889013-96889128、NACAD、TRIM67、ATP6V1B1、C17orf64、CHST2_B、DLX4、DNM3_A、EMX1_A、IGF2BP3_A、IGF2BP3_B、ITPRIPL1、LMX1B_A、MAX.chr11.14926602-14927148、MAX.chr5.42994866-42994936、MAX.chr8.124173030-124173395、MPZ、ODC1、PLXNC1_A、PRKCB、LOC100132891、ITPRIPL1、ABLIM1、MAX.chr12.4273906-4274012、MAX.chr19.46379903-46380197、ZSCAN12、BHLHE23_D、COL23A1、KCNK9、LAYN、PLXNC1_A、RIC3、SCRT2_B、ALOX5、CDH4_E、HNF1B_B、TRH_A、MAST1、ASCL2、MAX.chr20.1784209-1784461、RBFOX_A、MAX.chr12.4273906-4274012、GAS7、MAX.chr5.145725410-145725459、MAX.chr5.77268672-77268725、GYPC_B、DLX6、FBN1、OSR2_A、BEST4、AJAP1_B、DSCR6和MAX.chr11.68622869-68622968(参见表11、实施例I)；

[0027] • ATP6V1B1、LMX1B_A、BANK1、OTX1、MAX.chr11.14926602-14927148、UBTF、PRKCB、TRH_A、MPZ、GP5、DNM3_A、TRIM67、PLXNC1_A、MAX.chr12.4273906-4274012、CALN1_A、ITPRIPL1、MAX.chr12.4273906-4274012、GYPC_B、MAX.chr5.42994866-42994936、OSR2_A、SCRT2_B、MAX.chr5.145725410-145725459、MAX.chr11.68622869-68622968、MAX.chr8.124173030-124173395、MAX.chr20.1784209-1784461、LOC100132891、BHLHE23_C、ALOX5、MAX.chr19.46379903-46380197、ODC1、CHST2_A、MAX.chr5.77268672-77268725、C17orf64、EMX1_A、CHST2_B、DSCR6、ITPRIPL1、IGF2BP3_B、DLX4、ABLIM1、BHLHE23_D、ZSCAN12、GRASP、C10orf125(参见表16B、实施例II)。

[0028] 从这375种新型DNA甲基化标志物,进一步实验鉴定了能够区分管腔A型乳腺癌组织与良性乳腺组织的以下标志物和/或标志物组:

[0029] • ARL5C、BHLHE23_C、BMP6、C10orf125、C17orf64、C19orf66、CAMKV、CD1D、CDH4_E、CDH4_F、CHST2_A、CRHBP、DLX6、DNM3_A、DNM3_B、DNM3_C、ESYT3、ETS1_A、ETS1_B、FAM126A、FAM189A1、FAM20A、FAM59B、FBN1、FLRT2、FMN2、FOXP4、GAS7、GYPC_A、GYPC_B、HAND2、HES5、HMGA2、HNF1B_B、IGF2BP3_A、IGF2BP3_B、KCNH8、KCNK17_A、KCNQ2、KLHDC7B、LOC100132891、

MAX.chr1.46913931-46913950、MAX.chr11.68622869-68622968、MAX.chr12.4273906-4274012、MAX.chr12.59990591-59990895、MAX.chr17.73073682-73073814、MAX.chr20.1783841-1784054、MAX.chr21.47063802-47063851、MAX.chr4.8860002-8860038、MAX.chr5.172234248-172234494、MAX.chr5.178957564-178957598、MAX.chr6.130686865-130686985、MAX.chr8.687688-687736、MAX.chr8.688863-688924、MAX.chr9.114010-114207、MPZ、NID2_A、NKX2-6、ODC1、OSR2_A、POU4F1、PRDM13_B、PRKCB、RASGRF2、RIPPLY2、SLC30A10、ST8SIA4、SYN2、TRIM71_A、TRIM71_B、TRIM71_C、UBTF、ULBP1、USP44_B和VSTM2B_A(参见表5、实施例I)；

[0030] • BHLHE23_C、CD1D、CHST2_A、FAM126A、FMN2、HOXA1_A、HOXA7_A、KCNH8、LOC100132891、MAX.chr15.96889013-96889128、SLC30A10、TRIM67、ATP6V1B1、BANK1、C10orf125、C17orf64、CHST2_B、DNM3_A、EMX1_A、GP5、IGF2BP3_A、IGF2BP3_B、ITPRIPL1、LMX1B_A、MAX.chr11.14926602-14927148、MAX.chr5.42994866-42994936、MAX.chr8.124173030-124173395、MPZ、ODC1、PLXNC1_A、PRKCB、ST8SIA4、STX16_BUBTF、LOC100132891、ITPRIPL1、MAX.chr12.4273906-4274012、MAX.chr12.59990671-59990859、BHLHE23_D、COL23A1、KCNK9、OTX1、PLXNC1_A、HNF1B_B、MAST1、ASCL2、MAX.chr20.1784209-1784461、RBFOX_A、MAX.chr12.4273906-4274012、GAS7、MAX.chr5.145725410-145725459、MAX.chr5.77268672-77268725、GYPC_B、DLX6、FBN1、OSR2_A、BEST4、DSCR6、MAX.chr11.68622869-68622968(参见表11、实施例I)；

[0031] • ATP6V1B1、LMX1B_A、BANK1、OTX1、ST8SIA4、MAX.chr11.14926602-14927148、UBTF、PRKCB、TRH_A、MPZ、DNM3_A、TRIM67、PLXNC1_A、MAX.chr12.4273906-4274012、CALN1_A、ITPRIPL1、MAX.chr12.4273906-4274012、GYPC_B、MAX.chr5.42994866-42994936、OSR2_A、SCRT2_B、MAX.chr5.145725410-145725459、MAX.chr11.68622869-68622968、MAX.chr8.124173030-124173395、MAX.chr20.1784209-1784461、LOC100132891、BHLHE23_D、ALOX5、MAX.chr19.46379903-46380197、ODC1、CHST2_A、MAX.chr5.77268672-77268725、C17orf64、EMX1_A、CHST2_B、ITPRIPL1、IGF2BP3_B、CDH4_E、ABLIM1、SLC30A10、C10orf125(参见表16C、实施例II)。

[0032] 从这375种新型DNA甲基化标志物,进一步实验鉴定了能够区分管腔B型乳腺癌组织与良性乳腺组织的以下标志物和/或标志物组:

[0033] • ACCN1、AJAP1_A、AJAP1_B、BEST4、CALN1_B、CBLN1_B、CDH4_E、DLX4、FOXP4、IGSF9B_B、ITPRIPL1、KCNA1、KLF16、LMX1B_A、MAST1、MAX.chr11.14926602-14927148、MAX.chr17.73073682-73073814、MAX.chr18.76734362-76734370、MAX.chr18.76734423-76734476、MAX.chr19.30719261-30719354、MAX.chr22.42679578-42679917、MAX.chr4.8860002-8860038、MAX.chr5.145725410-145725459、MAX.chr5.178957564-178957598、MAX.chr5.77268672-77268725、MAX.chr8.124173128-124173268、MPZ、PPARA、PRMT1、RBFOX3_B、RZR2_A、SALL3、SCRT2_A、SPHK2、STX16_B、SYNJ2、TMEM176A、TSHZ3和VIPR2(参见表6、实施例I)；

[0034] • CALN1_A、LOC100132891、MAX.chr15.96889013-96889128、ATP6V1B1、C17orf64、DLX4、ITPRIPL1、MAX.chr11.14926602-14927148、MAX.chr5.42994866-42994936、MAX.chr8.124173030-124173395、MPZ、PRKCB、ITPRIPL1、KLF16、MAX.chr12.4273906-

4274012、MAX.chr19.46379903-46380197、BHLHE23_D、HNF1B_B、TRH_A、ASCL2、MAX.chr20.1784209-1784461、MAX.chr12.4273906-4274012、MAX.chr5.145725410-145725459、MAX.chr5.77268672-77268725、BEST4、AJAP1_B和DSCR6(参见表11、实施例I)；

[0035] • ATP6V1B1、LMX1B_A、BANK1、OTX1、MAX.chr11.14926602-14927148、UBTF、PRKCB、TRH_A、MPZ、DNM3_A、TRIM67、PLXNC1_A、MAX.chr12.4273906-4274012、CALN1_A、ITPRIPL1、MAX.chr12.4273906-4274012、GYPC_B、MAX.chr5.42994866-42994936、OSR2_A、SCRT2_B、MAX.chr5.145725410-145725459、MAX.chr11.68622869-68622968、MAX.chr8.124173030-124173395、MAX.chr20.1784209-1784461、LOC100132891、BHLHE23_C、ALOX5、MAX.chr19.46379903-46380197、CHST2_B、MAX.chr5.77268672-77268725、C17orf64、EMX1_A、DSCR6、ITPRIPL1、IGF2BP3_B、CDH4_E、DLX4、ABLIM1、BHLHE23_D(参见表16D、实施例II)。

[0036] 从这375种新型DNA甲基化标志物,进一步实验鉴定了能够区分BRCA1乳腺癌组织与良性乳腺组织的以下标志物和/或标志物组:

[0037] • C10orf93、C20orf195_A、C20orf195_B、CALN1_B、CBLN1_A、CBLN1_B、CCDC61、CCND2_A、CCND2_B、CCND2_C、EMX1_B、FAM150B、GRASP、HBM、ITPRIPL1、KCNK17_A、KIAA1949、LOC100131176、MAST1、MAX.chr1.8277285-8277316、MAX.chr1.8277479-8277527、MAX.chr11.14926602-14926729、MAX.chr11.14926860-14927148、MAX.chr15.96889013-96889128、MAX.chr18.5629721-5629791、MAX.chr19.30719261-30719354、MAX.chr22.42679767-42679917、MAX.chr5.178957564-178957598、MAX.chr5.77268672-77268725、MAX.chr6.157556793-157556856、MAX.chr8.124173030-124173395、MN1、MPZ、NR2F6、PDXK_A、PDXK_B、PTPRM、RYR2_B、SERPINB9_A、SERPINB9_B、SLC8A3、STX16_B TEPP、TOX、VIPR2、VSTM2B_A、ZNF486、ZNF626和ZNF671(参见表7、实施例I)；

[0038] • BHLHE23_C、CALN1_A、CD1D、HOXA7_A、LOC100132891、MAX.chr1.8277479-8277527、MAX.chr15.96889013-96889128、NACAD、ATP6V1B1、BANK1、C17orf64、DLX4、EMX1_A、FOXP4、GP5、ITPRIPL1、LMX1B_A、MAX.chr11.14926602-14927148、MAX.chr5.42994866-42994936、MAX.chr8.124173030-124173395、MPZ、PRKCB、STX16_B UBTF、LOC100132891、ITPRIPL1、ABLIM1、MAX.chr19.46379903-46380197、ZSCAN12、BHLHE23_D、CXCL12、KCNK9、OTX1、RIC3、SCRT2_B、MAX.chr17.73073682-73073814、CDH4_E、HNF1B_B、TRH_A、MAX.chr20.1784209-1784461、MAX.chr5.145725410-145725459、MAX.chr5.77268672-77268725、BEST4和DSCR6(参见表11、实施例I)。

[0039] 从这375种新型DNA甲基化标志物,进一步实验鉴定了能够区分BRCA2乳腺癌组织与良性乳腺组织的以下标志物和/或标志物组:

[0040] • ANTXR2、B3GNT5、BHLHE23_C、BMP4、CHRNA7、EPHA4、FAM171A1、FAM20A、FMNL2、FSCN1、GSTP1、HBM、IGFBP5、IL17REL、ITGA9、ITPRIPL1、KIRREL2、LRRC34、MAX.chr1.239549742-239549886、MAX.chr1.8277479-8277527、MAX.chr11.14926602-14926729、MAX.chr11.14926860-14927148、MAX.chr15.96889013-96889128、MAX.chr2.238864674-238864735、MAX.chr5.81148300-81148332、MAX.chr7.151145632-151145743、MAX.chr8.124173030-124173395、MAX.chr8.143533298-143533558、MERTK、MPZ、NID2_C、NTRK3、OLIG3_A、OLIG3_B、OSR2_C、PROM1、RGS17、SBN02、STX16_B TBKBP1、TLX1NB、VIPR2、VN1R2、VSNL1和ZFP64(参见表8、实施例I)；

[0041] • MAX.chr15.96889013-96889128、ATP6V1B1、C17orf64、ITPRIPL1、MAX.chr11.14926602-14927148、MAX.chr5.42994866-42994936、LOC100132891、ITPRIPL1、ABLIM1、MAX.chr19.46379903-46380197、COL23A1、LAYN、OTX1、TRH_A、MAX.chr5.145725410-145725459、MAX.chr11.68622869-68622968(参见表11、实施例I)。

[0042] 从这375种新型DNA甲基化标志物,进一步实验鉴定了能够区分侵袭性乳腺癌组织与良性乳腺组织的以下标志物和/或标志物组:

[0043] • CDH4_E、FLJ42875、GAD2、GRASP、ITPRIPL1、KCNA1、MAX.chr12.4273906-4274012、MAX.chr18.76734362-76734370、MAX.chr18.76734423-76734476、MAX.chr19.30719261-30719354、MAX.chr4.8859602-8859669、MAX.chr4.8860002-8860038、MAX.chr5.145725410-145725459、MAX.chr5.178957564-178957598、MAX.chr5.77268672-77268725、MPZ、NKX2-6、PRKCB、RBF3X3_B、SALL3和VSTM2B_A(参见表2、实施例I)。

[0044] 从这375种新型DNA甲基化标志物,进一步实验鉴定了能够区分高等级乳腺导管原位癌(DCIS-HG)乳腺癌组织与低等级乳腺导管原位癌(DCIS-LG)乳腺组织的以下标志物和/或标志物组:

[0045] • SCRT2_B、MPZ、MAX.chr8.124173030-124173395、ITPRIPL1、ITPRIPL1、DLX4、CALN1_A和IGF2BP3_B(参见表15、实施例I);

[0046] • SCRT2_B、ITPRIPL1和MAX.chr8.124173030-12417339(在91%特异性下具有100%灵敏性)(参见表15、实施例I),

[0047] • DSCR6、SCRT2_B、MPZ、MAX.chr8.124173030-124173395、OSR2_A、MAX.chr11.68622869-68622968、ITPRIPL1、MAX.chr5.145725410-145725459、BHLHE23_C和ITPRIPL1(参见表17、实施例II)。

[0048] 如本文所述,技术提供对于总体乳腺癌和各种类型的乳腺癌(例如三阴性乳腺癌、HER2⁺乳腺癌、管腔A型乳腺癌、管腔B型乳腺癌、BRCA1乳腺癌、BRCA2乳腺癌)具有高辨别力的许多甲基化DNA标志物以及它们的子集(例如具有2、3、4、5、6、7或8种标志物的集合)。实验对候选标志物施加选择过滤程序以鉴定提供高信噪比和低背景水平的标志物来为达成乳腺癌筛查或诊断目的提供高特异性。

[0049] 在一些实施方案中,技术与评估本文鉴定的标志物中的一者或多者在生物样品(例如乳腺组织、血浆样品)中的存在性和甲基化状态相关。这些标志物包含一个或多个如本文讨论的差异性甲基化区域(DMR),例如如表2和表18中所提供。在技术的实施方案中评估甲基化状态。因此,本文提供的技术在测量基因的甲基化状态所采用的方法方面不受限制。举例来说,在一些实施方案中,甲基化状态通过基因组扫描方法测量。举例来说,一种方法涉及限制性标记基因组扫描(Kawai等(1994)Mol.Cell.Biol.14:7421-7427),而另一实例涉及甲基化敏感性随机引物PCR(Gonzalogo等(1997)Cancer Res.57:594-599)。在一些实施方案中,在特定CpG位点处的甲基化样式变化通过用甲基化敏感性限制酶消化基因组DNA,随后对目标区域进行Southern分析来监测(消化-Southern方法)。在一些实施方案中,分析甲基化样式变化涉及基于PCR的方法,所述方法涉及在PCR扩增之前用甲基化敏感性限制酶或甲基化依赖性限制酶消化基因组DNA(Singer-Sam等(1990)Nucl.Acids Res.18:687)。此外,已报道利用亚硫酸氢盐处理DNA作为甲基化分析的起始点的其他技术。这些技

术包括甲基化特异性PCR (MSP) (Herman等(1992) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 93:9821-9826), 以及限制酶消化从经亚硫酸氢盐转化DNA扩增的PCR产物 (Sadri和Hornsby (1996) Nucl.Acids Res.24:5058-5059; 以及Xiong和Laird(1997) Nucl.Acids Res.25:2532-2534)。已开发用于检测基因突变 (Kuppuswamy等(1991) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 88:1143-1147) 以及定量等位基因特异性表达 (Szabo和Mann(1995) Genes Dev.9:3097-3108; 以及Singer-Sam等(1992) PCR Methods Appl.1:160-163) 的PCR技术。所述技术使用退火于PCR产生的模板, 并且紧靠待测定的单一核苷酸的5'终止的内部引物。使用如美国专利号7,037,650中所述的“定量Ms-SNuPE测定”的方法用于一些实施方案中。

[0050] 在评估甲基化状态时, 常常将所述甲基化状态表示为在特定位点处 (例如在单一核苷酸处, 在特定区域或位置处, 在较长目标序列例如DNA的多达约100bp、200bp、500bp、1000bp的子序列或更长序列处) 被甲基化的单个DNA链相对于样品中包含那个特定位点的DNA总群体的分数或百分比。在传统上, 未甲基化核酸的量通过使用校正物进行PCR来测定。接着, 将已知量的DNA用亚硫酸氢盐处理, 并且所得甲基化特异性序列使用实时PCR或其他指数扩增例如QuARTS测定 (例如如由以引用的方式并入本文的美国专利号8,361,720; 以及美国专利申请公布号2012/0122088和2012/0122106所提供) 来测定。

[0051] 举例来说, 在一些实施方案中, 方法包括通过使用外部标准物产生未甲基化靶标的标准曲线。标准曲线由至少两个点构建, 并且使未甲基化DNA的实时Ct值与已知定量标准物相关联。接着, 由至少两个点和外部标准物构建甲基化靶标的第二标准曲线。这个第二标准曲线使甲基化DNA的Ct与已知定量标准物相关联。接着, 确定甲基化和未甲基化群体的测试样品Ct值, 并且由通过前两步产生的标准曲线计算DNA的基因组当量。在目标位点处的甲基化百分比由甲基化DNA的量相对于群体中DNA的总量来计算, 例如 (甲基化DNA的数目) / (甲基化DNA的数目+未甲基化DNA的数目) × 100。

[0052] 本文还提供了用于实施方法的组合物和试剂盒。举例来说, 在一些实施方案中, 单独地或以集合 (例如用于扩增多种标志物的引物对的集合) 形式提供了对一种或多种标志物具有特异性的试剂 (例如引物、探针)。还可提供用于进行检测测定的额外试剂 (例如用于进行QuARTS、PCR、测序、亚硫酸氢盐测定或其他测定的酶、缓冲剂、阳性和阴性对照)。在一些实施方案中, 试剂盒含有能够以甲基化特异性方式修饰DNA的试剂 (例如甲基化敏感性限制酶、甲基化依赖性限制酶和亚硫酸氢盐试剂)。在一些实施方案中, 提供了含有一种或多种为进行方法所必需, 足以用于或可用于进行方法的试剂的试剂盒。还提供了含有试剂的反应混合物。还提供了含有可被添加至彼此中和/或测试样品中以使反应混合物齐全的多种试剂的主混合物试剂集合。

[0053] 在一些实施方案中, 本文所述的技术与被设计来执行如由本文所述的方法提供的一连串算术或逻辑运算的可编程机器相关。举例来说, 技术的一些实施方案与计算机软件和/或计算机硬件相关 (例如以计算机软件和/或计算机硬件实施)。在一个方面, 技术涉及一种计算机, 所述计算机包括某一形式的存储器、用于执行算术和逻辑运算的元件、以及用于执行一系列指令 (例如如本文提供的方法) 以读取、操作和存储数据的处理元件 (例如微处理器)。在一些实施方案中, 微处理器是系统的用于达成以下的部分: 确定甲基化状态 (例如一个或多个DMR例如如表2和表18中提供的DMR 1-375的甲基化状态); 比较甲基化状态 (例如一个或多个DMR例如如表2和表18中提供的DMR 1-375的甲基化状态); 产生标准曲线;

确定Ct值;计算甲基化(例如一个或多个DMR例如如表2和表18中提供的DMR 1-375的甲基化)的分数、频率或百分比;鉴定CpG岛;确定测定或标志物的特异性和/或灵敏性;计算ROC曲线和相关AUC;序列分析;所有都如本文所述或在本领域中是已知的。

[0054] 在一些实施方案中,微处理器或计算机在算法中使用甲基化状态数据来预测癌症的位点。

[0055] 在一些实施方案中,软件或硬件组件接收多个测定的结果,并且基于多个测定(例如确定例如如表2和表18中提供的多个DMR的甲基化状态的测定)的结果来确定用以向使用者报告的指示癌症风险的单值结果。相关实施方案基于来自例如确定多种标志物(诸如例如如表2和表18中提供的多个DMR)的甲基化状态的多个测定的结果的数学组合(例如加权组合、线性组合)计算风险因数。在一些实施方案中,DMR的甲基化状态确定维度并可在多维空间中具有数值,并且由多个DMR的甲基化状态确定的坐标是例如用以向使用者报告的例如与癌症风险相关的结果。

[0056] 一些实施方案包括存储介质和存储器组件。存储器组件(例如易失性和/或非易失性存储器)可用于存储指令(例如如本文提供的方法的实施方案)和/或数据(例如工作事项诸如甲基化测量结果、序列以及与之相关的统计描述)。一些实施方案涉及还包括CPU、图形卡和用户界面中的一者或多者(例如包括输出装置诸如显示器和输入装置诸如键盘)的系统。

[0057] 与技术相关的可编程机器包括常规现存技术性机器和处于开发中或尚有待于开发的技术性机器(例如量子计算机、化学计算机、DNA计算机、光学计算机、基于自旋电子学的计算机等)。

[0058] 在一些实施方案中,技术包括用于传输数据的有线(例如金属电缆、光纤)或无线传输介质。举例来说,一些实施方案涉及经网络(例如局域网(LAN)、广域网(WAN)、自组网络、因特网等)进行的数据传输。在一些实施方案中,可编程机器作为对等机存在于这种网络上,并且在一些实施方案中,可编程机器具有客户机/服务器关系。

[0059] 在一些实施方案中,数据存储于计算机可读存储介质诸如硬盘、闪存存储器、光学介质、软盘等上。

[0060] 在一些实施方案中,本文提供的技术与多个协力运行以进行如本文所述的方法的可编程装置相关。举例来说,在一些实施方案中,多个计算机(例如由网络连接)可并行工作以收集和处理数据,例如以实施集群计算或网格计算的方式,或采用依赖于通过常规网络接口诸如以太网、光纤或通过无线网络技术连接于网络(私有、公共或因特网)的完整计算机(具有板载CPU、存储器、电源、网络接口等)的某一其他分布式计算机体系结构。

[0061] 举例来说,一些实施方案提供了一种包括计算机可读介质的计算机。实施方案包括耦合于处理器的随机存取存储器(RAM)。处理器执行存储在存储器中的计算机可执行程序指令。所述处理器可包括微处理器、ASIC、状态机或其他处理器,并且可为许多计算机处理器中的任一者,所述计算机处理器诸如来自加利福尼亚州圣克拉拉的英特尔公司(Intel Corporation of Santa Clara, California)和伊利诺伊州绍姆堡的摩托罗拉公司(Motorola Corporation of Schaumburg, Illinois)的处理器。所述处理器包括存储指令的介质例如计算机可读介质或可与所述介质通信,所述指令在由处理器执行时导致处理器进行本文所述的步骤。

[0062] 计算机可读介质的实施方案包括但不限于能够对处理器提供计算机可读指令的电子、光学、磁性或其他存储或传输装置。适合介质的其他实例包括但不限于软盘、CD-ROM、DVD、磁盘、存储器芯片、ROM、RAM、ASIC、经配置处理器、所有光学介质、所有磁带或其他磁性介质、或计算机处理器可从其读取指令的任何其他介质。此外,各种其他形式的计算机可读介质可将指令传输或传送至计算机,包括路由器、私有或公共网络、或其他有线和无线传输装置或通道。指令可包含来自任何适合计算机编程语言包括例如C、C++、C#、Visual Basic、Java、Python、Perl和JavaScript的代码。

[0063] 在一些实施方案中,计算机连接于网络。计算机还可包括许多外部或内部装置,诸如鼠标、CD-ROM、DVD、键盘、显示器或其他输入或输出装置。计算机的实例是个人计算机、数字助理、个人数字助理、蜂窝式电话、移动式电话、智能电话、寻呼机、数字平板、膝上型计算机、因特网设备和其他基于处理器的装置。一般来说,与本文提供的技术的方面相关的计算机可为在能够支持一种或多种包含本文提供的技术的程序的任何操作系统上运行的任何类型的基于处理器的平台,所述操作系统诸如Microsoft Windows、Linux、UNIX、Mac OS X等。一些实施方案包括执行其他应用程序(例如应用软件)的个人计算机。应用软件可含于存储器中,并且可包括例如字处理应用软件、电子表格应用软件、电子邮件应用软件、即时通讯应用软件、演示应用软件、因特网浏览器应用软件、日历/备忘录应用应用软件、以及能够通过客户端装置执行的任何其他应用软件。

[0064] 本文描述为与技术相关的所有所述组件、计算机和系统都可为逻辑的或虚拟的。

[0065] 因此,本文提供了与在从受试者获得的样品中筛查乳腺癌和/或各种形式的乳腺癌(例如三阴性乳腺癌、HER2⁺乳腺癌、管腔A型乳腺癌、管腔B型乳腺癌、BRCA1乳腺癌、BRCA2乳腺癌)的方法相关的技术,所述方法包括测定从受试者获得的样品(例如乳腺组织)(例如血浆样品)中的标志物的甲基化状态,以及当所述标志物的所述甲基化状态不同于所述标志物的在不患有乳腺癌的受试者中测定的甲基化状态时,将所述受试者鉴定为患有乳腺癌和/或特定形式的乳腺癌,其中所述标志物包含选自由如表2和表18中提供的DMR 1-375组成的组的差异性甲基化区域(DMR)中的碱基。

[0066] 在一些实施方案中,其中从受试者获得的样品是乳腺组织,并且以下标志物中的一者或多者的甲基化状态不同于所述一种或多种标志物的在不患有乳腺癌的受试者中测定的甲基化状态指示受试者患有乳腺癌:ATP6V1B1、LMX1B_A、BANK1、OTX1、MAX.chr11.14926602-14927148、UBTF、PRKCB、TRH_A、MPZ、DNM3_A、TRIM67、MAX.chr12.4273906-4274012、CALN1_A、ITPRIPL1、MAX.chr12.4273906-4274012、GYPC_B、MAX.chr5.42994866-42994936、OSR2_A、SCRT2_B、MAX.chr5.145725410-145725459、MAX.chr11.68622869-68622968、MAX.chr8.124173030-124173395、MAX.chr20.1784209-1784461、LOC100132891、BHLHE23_D、MAX.chr19.46379903-46380197、CHST2_B、MAX.chr5.77268672-77268725、C17orf64、EMX1_A、DSCR6、ITPRIPL1、IGF2BP3_B、DLX4和ABLIM1(参见表16E、实施例II)。

[0067] 在一些实施方案中,其中从受试者获得的样品是乳腺组织,并且以下标志物中的一者或多者的甲基化状态不同于所述一种或多种标志物的在不患有乳腺癌的受试者中测定的甲基化状态指示受试者患有乳腺癌:ABLIM1_B、AJAP1_C、ALOX5_B、ASCL2_B、BANK1_B、BHLHE23_E、C10orf125_B、C17orf64_B、CALN1_1520、CALN_1B、CD1D_1058、CDH4_7890、

CHST2_8128、CHST2_8384、CHST2_9316、CHST2_9470、CLIC6_B、CXCL12_B、DLX4_B、DNM3_D、EMX1_A、ESPN_B、FAM59B_7764、FOXP4_B、GP5、HOXA1_C、IGF2BP3_C、IPTRIPL1_1138、IPTRIPL1_1200、KCNK9_B、KCNK17_C、LAYN_B、LIME1_B、LMX1B_D、LOC100132891_B、MAST1_B、MAX.chr12.427.br、MAX.chr20.4422、MPZ_5742、MPZ_5554、MSX2P1_B、ODC1_B、OSR2_A、OTX1_B、PLXNC1_B、PRKCB_7570、SCRT2_C、SLC30A10、SPHK2_B、ST8SIA4_B、STX16_C、TRH_A和TRIM67_B(参见表22、实施例III)。

[0068] 在一些实施方案中,其中从受试者获得的样品是血液样品(例如血浆、血清、全血),并且以下标志物中的一者或多者的甲基化状态不同于所述一种或多种标志物的在不患有乳腺癌的受试者中测定的甲基化状态指示受试者患有乳腺癌:CD1D、ITPRIPL1、FAM59B、C10orf125、TRIM67、SPHK2、CALN1_B、CHST2_B、MPZ、CXCL12_B、ODC1_B、OSR2_A、TRH_A和C17orf64_B(参见表27、实施例III)。

[0069] 在一些实施方案中,其中从受试者获得的样品是乳腺组织,并且以下标志物中的一者或多者的甲基化状态不同于所述一种或多种标志物的在不患有乳腺癌的受试者中测定的甲基化状态指示受试者患有三阴性乳腺癌:ABLM1、AJAP1_B、ASCL2、ATP6V1B1、BANK1、CALN1_A、CALN1_B、CLIC6、DSCR6、FOXP4、GAD2、GCGR、GP5、GRASP、HBM、HNF1B_B、KLF16、MAGI2、MAX.chr11.14926602-14927148、MAX.chr12.4273906-4274012、MAX.chr17.73073682-73073814、MAX.chr18.76734362-76734370、MAX.chr2.97193478-97193562、MAX.chr22.42679578-42679917、MAX.chr4.8859253-8859329、MAX.chr4.8859602-8859669、MAX.chr4.8860002-8860038、MAX.chr5.145725410-145725459、MAX.chr6.157557371-157557657、MPZ、NKX2-6、PDX1、PLXNC1_A、PPARG、PRKCB、PTPRN2、RBFOX_A、SCRT2_A、SLC7A4、STAC2_B、STX16_A、STX16_B、TBX1、TRH_A、VSTM2B_A、ZBTB16、ZNF132和ZSCAN23(参见表3、实施例I)。

[0070] 在一些实施方案中,其中从受试者获得的样品是乳腺组织,并且以下标志物中的一者或多者的甲基化状态不同于所述一种或多种标志物的在不患有乳腺癌的受试者中测定的甲基化状态指示受试者患有三阴性乳腺癌:CALN1_A、LOC100132891、NACAD、TRIM67、ATP6V1B1、DLX4、GP5、ITPRIPL1、MAX.chr11.14926602-14927148、MAX.chr5.42994866-42994936、MAX.chr8.124173030-124173395、MPZ、PRKCB、ST8SIA4、STX16_B、ITPRIPL1、KLF16、MAX.chr12.4273906-4274012、KCNK9、SCRT2_B、CDH4_E、HNF1B_B、TRH_A、MAX.chr20.1784209-1784461、MAX.chr12.4273906-4274012、MAX.chr5.145725410-145725459、MAX.chr5.77268672-77268725和DSCR6(参见表11、实施例I)。

[0071] 在一些实施方案中,其中从受试者获得的样品是乳腺组织,并且以下标志物中的一者或多者的甲基化状态不同于所述一种或多种标志物的在不患有乳腺癌的受试者中测定的甲基化状态指示受试者患有三阴性乳腺癌:ATP6V1B1、MAX.chr11.14926602-14927148、PRKCB、TRH_A、MPZ、GP5、TRIM67、MAX.chr12.4273906-4274012、CALN1_A、MAX.chr12.4273906-4274012、MAX.chr5.42994866-42994936、SCRT2_B、MAX.chr5.145725410-145725459、BHLHE23_D、MAX.chr5.77268672-77268725、EMX1_A、DSCR6和DLX4(参见表16A、实施例II)。

[0072] 在一些实施方案中,其中从受试者获得的样品是乳腺组织,并且以下标志物中的一者或多者的甲基化状态不同于所述一种或多种标志物的在不患有乳腺癌的受试者中测

定的甲基化状态指示受试者患有HER2⁺乳腺癌: ABLIM1、AFAP1L1、AKR1B1、ALOX5、AMN、ARL5C、BANK1、BCAT1、BEGAIN、BEST4、BHLHE23_B、BHLHE23_C、C17orf64、C1QL2、C7orf52、CALN1_B、CAV2、CD8A、CDH4_A、CDH4_B、CDH4_C、CDH4_D、CDH4_E、CDH4_F、CHST2_B、CLIP4、CR1、DLK1、DNAJC6、DNM3_A、EMX1_A、ESPN、FABP5、FAM150A、FLJ42875、GLP1R、GNG4、GYPC_A、HAND2、HES5、HNF1B_A、HNF1B_B、HOXA1_A、HOXA1_B、HOXA7_A、HOXA7_B、HOXA7_C、HOXD9、IGF2BP3_A、IGF2BP3_B、IGSF9B_A、IL15RA、INSM1、ITPKA_B、ITPRIPL1、KCNE3、KCNK17_B、LIME1、LOC100132891、LOC283999、LY6H、MAST1、MAX.chr1.158083198-158083476、MAX.chr1.228074764-228074977、MAX.chr1.46913931-46913950、MAX.chr10.130085265-130085312、MAX.chr11.68622869-68622968、MAX.chr14.101176106-101176260、MAX.chr15.96889069-96889128、MAX.chr17.8230197-8230314、MAX.chr19.46379903-46380197、MAX.chr2.97193163-97193287、MAX.chr2.97193478-97193562、MAX.chr20.1784209-1784461、MAX.chr21.44782441-44782498、MAX.chr22.23908718-23908782、MAX.chr5.145725410-145725459、MAX.chr5.178957564-178957598、MAX.chr5.180101084-180101094、MAX.chr5.42952185-42952280、MAX.chr5.42994866-42994936、MAX.chr6.27064703-27064783、MAX.chr7.152622607-152622638、MAX.chr8.145104132-145104218、MAX.chr9.136474504-136474527、MCF2L2、MSX2P1、NACAD、NID2_B、NID2_C、ODC1、OSR2_B、PAQR6、PCDH8、PIF1、PPARA、PPP2R5C、PRDM13_A、PRHOXNB、PRKCB、RBF0X3_A、RBF0X3_B、RFX8、SNCA、STAC2_A、STAC2_B、STX16_B、SYT5、TIMP2、TMEFF2、TNFRSF10D、TRH_B、TRIM67、TRIM71_C、USP44_A、USP44_B、UTF1、UTS2R、VSTM2B_A、VSTM2B_B、ZFP64和ZNF132(参见表4、实施例I)。

[0073] 在一些实施方案中,其中从受试者获得的样品是乳腺组织,并且以下标志物中的一者或多者的甲基化状态不同于所述一种或多种标志物的在不患有乳腺癌的受试者中测定的甲基化状态指示受试者患有HER2⁺乳腺癌: BHLHE23_C、CALN1_A、CD1D、CHST2_A、FMN2、HOXA1_A、HOXA7_A、KCNH8、LOC100132891、MAX.chr15.96889013-96889128、NACAD、TRIM67、ATP6V1B1、C17orf64、CHST2_B、DLX4、DNM3_A、EMX1_A、IGF2BP3_A、IGF2BP3_B、ITPRIPL1、LMX1B_A、MAX.chr11.14926602-14927148、MAX.chr5.42994866-42994936、MAX.chr8.124173030-124173395、MPZ、ODC1、PLXNC1_A、PRKCB、LOC100132891、ITPRIPL1、ABLIM1、MAX.chr12.4273906-4274012、MAX.chr19.46379903-46380197、ZSCAN12、BHLHE23_D、COL23A1、KCNK9、LAYN、PLXNC1_A、RIC3、SCRT2_B、ALOX5、CDH4_E、HNF1B_B、TRH_A、MAST1、ASCL2、MAX.chr20.1784209-1784461、RBF0X_A、MAX.chr12.4273906-4274012、GAS7、MAX.chr5.145725410-145725459、MAX.chr5.77268672-77268725、GYPC_B、DLX6、FBN1、OSR2_A、BEST4、AJAP1_B、DSCR6和MAX.chr11.68622869-68622968(参见表11、实施例I)。

[0074] 在一些实施方案中,其中从受试者获得的样品是乳腺组织,并且以下标志物中的一者或多者的甲基化状态不同于所述一种或多种标志物的在不患有乳腺癌的受试者中测定的甲基化状态指示受试者患有HER2⁺乳腺癌: ATP6V1B1、LMX1B_A、BANK1、OTX1、MAX.chr11.14926602-14927148、UBTF、PRKCB、TRH_A、MPZ、GP5、DNM3_A、TRIM67、PLXNC1_A、MAX.chr12.4273906-4274012、CALN1_A、ITPRIPL1、MAX.chr12.4273906-4274012、GYPC_B、MAX.chr5.42994866-42994936、OSR2_A、SCRT2_B、MAX.chr5.145725410-145725459、MAX.chr11.68622869-68622968、MAX.chr8.124173030-124173395、MAX.chr20.1784209-

1784461、LOC100132891、BHLHE23_C、ALOX5、MAX.chr19.46379903-46380197、ODC1、CHST2_A、MAX.chr5.77268672-77268725、C17orf64、EMX1_A、CHST2_B、DSCR6、ITPRIPL1、IGF2BP3_B、DLX4、ABLIM1、BHLHE23_D、ZSCAN12、GRASP、C10orf125 (参见表16B、实施例II)。

[0075] 在一些实施方案中,其中从受试者获得的样品是乳腺组织,并且以下标志物中的一者或多者的甲基化状态不同于所述一种或多种标志物的在不患有乳腺癌的受试者中测定的甲基化状态指示受试者患有管腔A型乳腺癌:ARL5C、BHLHE23_C、BMP6、C10orf125、C17orf64、C19orf66、CAMKV、CD1D、CDH4_E、CDH4_F、CHST2_A、CRHBP、DLX6、DNM3_A、DNM3_B、DNM3_C、ESYT3、ETS1_A、ETS1_B、FAM126A、FAM189A1、FAM20A、FAM59B、FBN1、FLRT2、FMN2、FOXP4、GAS7、GYPC_A、GYPC_B、HAND2、HES5、HMGA2、HNF1B_B、IGF2BP3_A、IGF2BP3_B、KCNH8、KCNK17_A、KCNQ2、KLHDC7B、LOC100132891、MAX.chr1.46913931-46913950、MAX.chr11.68622869-68622968、MAX.chr12.4273906-4274012、MAX.chr12.59990591-59990895、MAX.chr17.73073682-73073814、MAX.chr20.1783841-1784054、MAX.chr21.47063802-47063851、MAX.chr4.8860002-8860038、MAX.chr5.172234248-172234494、MAX.chr5.178957564-178957598、MAX.chr6.130686865-130686985、MAX.chr8.687688-687736、MAX.chr8.688863-688924、MAX.chr9.114010-114207、MPZ、NID2_A、NKX2-6、ODC1、OSR2_A、POU4F1、PRDM13_B、PRKCB、RASGRF2、RIPPLY2、SLC30A10、ST8SIA4、SYN2、TRIM71_A、TRIM71_B、TRIM71_C、UBTF、ULBP1、USP44_B和VSTM2B_A (参见表5、实施例I)。

[0076] 在一些实施方案中,其中从受试者获得的样品是乳腺组织,并且以下标志物中的一者或多者的甲基化状态不同于所述一种或多种标志物的在不患有乳腺癌的受试者中测定的甲基化状态指示受试者患有管腔A型乳腺癌:BHLHE23_C、CD1D、CHST2_A、FAM126A、FMN2、HOXA1_A、HOXA7_A、KCNH8、LOC100132891、MAX.chr15.96889013-96889128、SLC30A10、TRIM67、ATP6V1B1、BANK1、C10orf125、C17orf64、CHST2_B、DNM3_A、EMX1_A、GP5、IGF2BP3_A、IGF2BP3_B、ITPRIPL1、LMX1B_A、MAX.chr11.14926602-14927148、MAX.chr5.42994866-42994936、MAX.chr8.124173030-124173395、MPZ、ODC1、PLXNC1_A、PRKCB、ST8SIA4、STX16_B、UBTF、LOC100132891、ITPRIPL1、MAX.chr12.4273906-4274012、MAX.chr12.59990671-59990859、BHLHE23_D、COL23A1、KCNK9、OTX1、PLXNC1_A、HNF1B_B、MAST1、ASCL2、MAX.chr20.1784209-1784461、RBFox_A、MAX.chr12.4273906-4274012、GAS7、MAX.chr5.145725410-145725459、MAX.chr5.77268672-77268725、GYPC_B、DLX6、FBN1、OSR2_A、BEST4、DSCR6、MAX.chr11.68622869-68622968 (参见表11、实施例I)。

[0077] 在一些实施方案中,其中从受试者获得的样品是乳腺组织,并且以下标志物中的一者或多者的甲基化状态不同于所述一种或多种标志物的在不患有乳腺癌的受试者中测定的甲基化状态指示受试者患有管腔A型乳腺癌:ATP6V1B1、LMX1B_A、BANK1、OTX1、ST8SIA4、MAX.chr11.14926602-14927148、UBTF、PRKCB、TRH_A、MPZ、DNM3_A、TRIM67、PLXNC1_A、MAX.chr12.4273906-4274012、CALN1_A、ITPRIPL1、MAX.chr12.4273906-4274012、GYPC_B、MAX.chr5.42994866-42994936、OSR2_A、SCRT2_B、MAX.chr5.145725410-145725459、MAX.chr11.68622869-68622968、MAX.chr8.124173030-124173395、MAX.chr20.1784209-1784461、LOC100132891、BHLHE23_D、ALOX5、MAX.chr19.46379903-46380197、ODC1、CHST2_A、MAX.chr5.77268672-77268725、C17orf64、EMX1_A、CHST2_B、

ITPRIPL1、IGF2BP3_B、CDH4_E、ABLIM1、SLC30A10、C10orf125(参见表16C、实施例II)。

[0078] 在一些实施方案中,其中从受试者获得的样品是乳腺组织,并且以下标志物中的一者或多者的甲基化状态不同于所述一种或多种标志物的在不患有乳腺癌的受试者中测定的甲基化状态指示受试者患有管腔B型乳腺癌:ACCN1、AJAP1_A、AJAP1_B、BEST4、CALN1_B、CBLN1_B、CDH4_E、DLX4、FOXP4、IGSF9B_B、ITPRIPL1、KCNA1、KLF16、LMX1B_A、MAST1、MAX.chr11.14926602-14927148、MAX.chr17.73073682-73073814、MAX.chr18.76734362-76734370、MAX.chr18.76734423-76734476、MAX.chr19.30719261-30719354、MAX.chr22.42679578-42679917、MAX.chr4.8860002-8860038、MAX.chr5.145725410-145725459、MAX.chr5.178957564-178957598、MAX.chr5.77268672-77268725、MAX.chr8.124173128-124173268、MPZ、PPARA、PRMT1、RBF3_B、RYSR2_A、SALL3、SCRT2_A、SPHK2、STX16_BSYNJ2、TMEM176A、TSHZ3和VIPR2(参见表6、实施例I)。

[0079] 在一些实施方案中,其中从受试者获得的样品是乳腺组织,并且以下标志物中的一者或多者的甲基化状态不同于所述一种或多种标志物的在不患有乳腺癌的受试者中测定的甲基化状态指示受试者患有管腔B型乳腺癌:CALN1_A、LOC100132891、MAX.chr15.96889013-96889128、ATP6V1B1、C17orf64、DLX4、ITPRIPL1、MAX.chr11.14926602-14927148、MAX.chr5.42994866-42994936、MAX.chr8.124173030-124173395、MPZ、PRKCB、ITPRIPL1、KLF16、MAX.chr12.4273906-4274012、MAX.chr19.46379903-46380197、BHLHE23_D、HNF1B_B、TRH_A、ASCL2、MAX.chr20.1784209-1784461、MAX.chr12.4273906-4274012、MAX.chr5.145725410-145725459、MAX.chr5.77268672-77268725、BEST4、AJAP1_B和DSCR6(参见表11、实施例I)。

[0080] 在一些实施方案中,其中从受试者获得的样品是乳腺组织,并且以下标志物中的一者或多者的甲基化状态不同于所述一种或多种标志物的在不患有乳腺癌的受试者中测定的甲基化状态指示受试者患有管腔B型乳腺癌:ATP6V1B1、LMX1B_A、BANK1、OTX1、MAX.chr11.14926602-14927148、UBTF、PRKCB、TRH_A、MPZ、DNM3_A、TRIM67、PLXNC1_A、MAX.chr12.4273906-4274012、CALN1_A、ITPRIPL1、MAX.chr12.4273906-4274012、GYPC_B、MAX.chr5.42994866-42994936、OSR2_A、SCRT2_B、MAX.chr5.145725410-145725459、MAX.chr11.68622869-68622968、MAX.chr8.124173030-124173395、MAX.chr20.1784209-1784461、LOC100132891、BHLHE23_C、ALOX5、MAX.chr19.46379903-46380197、CHST2_B、MAX.chr5.77268672-77268725、C17orf64、EMX1_A、DSCR6、ITPRIPL1、IGF2BP3_B、CDH4_E、DLX4、ABLIM1、BHLHE23_D(参见表16D、实施例II)。

[0081] 在一些实施方案中,其中从受试者获得的样品是乳腺组织,并且以下标志物中的一者或多者的甲基化状态不同于所述一种或多种标志物的在不患有乳腺癌的受试者中测定的甲基化状态指示受试者患有BRCA1乳腺癌:C10orf93、C20orf195_A、C20orf195_B、CALN1_B、CBLN1_A、CBLN1_B、CCDC61、CCND2_A、CCND2_B、CCND2_C、EMX1_B、FAM150B、GRASP、HBM、ITPRIPL1、KCNK17_A、KIAA1949、LOC100131176、MAST1、MAX.chr1.8277285-8277316、MAX.chr1.8277479-8277527、MAX.chr11.14926602-14926729、MAX.chr11.14926860-14927148、MAX.chr15.96889013-96889128、MAX.chr18.5629721-5629791、MAX.chr19.30719261-30719354、MAX.chr22.42679767-42679917、MAX.chr5.178957564-178957598、MAX.chr5.77268672-77268725、MAX.chr6.157556793-157556856、

MAX.chr8.124173030-124173395、MN1、MPZ、NR2F6、PDXK_A、PDXK_B、PTPRM、RZR2_B、SERPINB9_A、SERPINB9_B、SLC8A3、STX16_B TEPP、TOX、VIPR2、VSTM2B_A、ZNF486、ZNF626和ZNF671(参见表7、实施例I)。

[0082] 在一些实施方案中,其中从受试者获得的样品是乳腺组织,并且以下标志物中的一者或多者的甲基化状态不同于所述一种或多种标志物的在不患有乳腺癌的受试者中测定的甲基化状态指示受试者患有BRCA1乳腺癌:BHLHE23_C、CALN1_A、CD1D、HOXA7_A、LOC100132891、MAX.chr1.8277479-8277527、MAX.chr15.96889013-96889128、NACAD、ATP6V1B1、BANK1、C17orf64、DLX4、EMX1_A、FOXP4、GP5、ITPRIPL1、LMX1B_A、MAX.chr11.14926602-14927148、MAX.chr5.42994866-42994936、MAX.chr8.124173030-124173395、MPZ、PRKCB、STX16_B UBTF、LOC100132891、ITPRIPL1、ABLIM1、MAX.chr19.46379903-46380197、ZSCAN12、BHLHE23_D、CXCL12、KCNK9、OTX1、RIC3、SCRT2_B、MAX.chr17.73073682-73073814、CDH4_E、HNF1B_B、TRH_A、MAX.chr20.1784209-1784461、MAX.chr5.145725410-145725459、MAX.chr5.77268672-77268725、BEST4和DSCR6(参见表11、实施例I)。

[0083] 在一些实施方案中,其中从受试者获得的样品是乳腺组织,并且以下标志物中的一者或多者的甲基化状态不同于所述一种或多种标志物的在不患有乳腺癌的受试者中测定的甲基化状态指示受试者患有BRCA2乳腺癌:ANTXR2、B3GNT5、BHLHE23_C、BMP4、CHRNA7、EPHA4、FAM171A1、FAM20A、FMNL2、FSCN1、GSTP1、HBM、IGFBP5、IL17REL、ITGA9、ITPRIPL1、KIRREL2、LRRC34、MAX.chr1.239549742-239549886、MAX.chr1.8277479-8277527、MAX.chr11.14926602-14926729、MAX.chr11.14926860-14927148、MAX.chr15.96889013-96889128、MAX.chr2.238864674-238864735、MAX.chr5.81148300-81148332、MAX.chr7.151145632-151145743、MAX.chr8.124173030-124173395、MAX.chr8.143533298-143533558、MERTK、MPZ、NID2_C、NTRK3、OLIG3_A、OLIG3_B、OSR2_C、PROM1、RGS17、SBN02、STX16_B TBKBP1、TLX1NB、VIPR2、VN1R2、VSNL1和ZFP64(参见表8、实施例I)。

[0084] 在一些实施方案中,其中从受试者获得的样品是乳腺组织,并且以下标志物中的一者或多者的甲基化状态不同于所述一种或多种标志物的在不患有乳腺癌的受试者中测定的甲基化状态指示受试者患有BRCA2乳腺癌:MAX.chr15.96889013-96889128、ATP6V1B1、C17orf64、ITPRIPL1、MAX.chr11.14926602-14927148、MAX.chr5.42994866-42994936、LOC100132891、ITPRIPL1、ABLIM1、MAX.chr19.46379903-46380197、COL23A1、LAYN、OTX1、TRH_A、MAX.chr5.145725410-145725459、MAX.chr11.68622869-68622968(参见表11、实施例I)。

[0085] 在一些实施方案中,其中从受试者获得的样品是乳腺组织,并且以下标志物中的一者或多者的甲基化状态不同于所述一种或多种标志物的在不患有乳腺癌的受试者中测定的甲基化状态指示受试者患有侵袭性乳腺癌:CDH4_E、FLJ42875、GAD2、GRASP、ITPRIPL1、KCNA1、MAX.chr12.4273906-4274012、MAX.chr18.76734362-76734370、MAX.chr18.76734423-76734476、MAX.chr19.30719261-30719354、MAX.chr4.8859602-8859669、MAX.chr4.8860002-8860038、MAX.chr5.145725410-145725459、MAX.chr5.178957564-178957598、MAX.chr5.77268672-77268725、MPZ、NKX2-6、PRKCB、RBF0X3_B、SALL3和VSTM2B_A(参见表9、实施例I)。

[0086] 在一些实施方案中,其中从受试者获得的样品是乳腺组织,并且以下标志物中的一者或多者的甲基化状态不同于所述一种或多种标志物的在不患有乳腺癌的受试者中测定的甲基化状态区分高等级乳腺导管原位癌(DCIS-HG)乳腺癌组织与低等级乳腺导管原位癌(DCIS-LG)乳腺组织:SCRT2_B、MPZ、MAX.chr8.124173030-124173395、ITPRIPL1、ITPRIPL1、DLX4、CALN1_A和IGF2BP3_B(参见表15、实施例I)。

[0087] 在一些实施方案中,其中从受试者获得的样品是乳腺组织,并且以下标志物中的一者或多者的甲基化状态不同于所述一种或多种标志物的在不患有乳腺癌的受试者中测定的甲基化状态区分高等级乳腺导管原位癌(DCIS-HG)乳腺癌组织与低等级乳腺导管原位癌(DCIS-LG)乳腺组织:SCRT2_B、ITPRIPL1和MAX.chr8.124173030-12417339(在91%特异性下具有100%灵敏性)(参见表15、实施例I)。

[0088] 在一些实施方案中,其中从受试者获得的样品是乳腺组织,并且以下标志物中的一者或多者的甲基化状态不同于所述一种或多种标志物的在不患有乳腺癌的受试者中测定的甲基化状态区分高等级乳腺导管原位癌(DCIS-HG)乳腺癌组织与低等级乳腺导管原位癌(DCIS-LG)乳腺组织:DSCR6、SCRT2_B、MPZ、MAX.chr8.124173030-124173395、OSR2_A、MAX.chr11.68622869-68622968、ITPRIPL1、MAX.chr5.145725410-145725459、BHLHE23_C和ITPRIPL1(参见表17、实施例II)。

[0089] 技术与鉴定和辨别乳腺癌和/或各种形式的乳腺癌(例如三阴性乳腺癌、HER2⁺乳腺癌、管腔A型乳腺癌、管腔B型乳腺癌、BRCA1乳腺癌、BRCA2乳腺癌)相关。一些实施方案提供了包括测定多种标志物,例如包括测定2至11至100或120或375种标志物的方法。

[0090] 技术在评估的甲基化状态方面不受限制。在一些实施方案中,评估样品中的标志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,测定样品中的标志物的甲基化状态包括确定在多个碱基处的甲基化程度。此外,在一些实施方案中,标志物的甲基化状态包括相对于标志物的正常甲基化状态,标志物的甲基化增加。在一些实施方案中,标志物的甲基化状态包括相对于标志物的正常甲基化状态,标志物的甲基化降低。在一些实施方案中,标志物的甲基化状态包括相对于标志物的正常甲基化状态,标志物的甲基化的样式不同。

[0091] 此外,在一些实施方案中,标志物是具有100或更少个碱基的区域,标志物是具有500或更少个碱基的区域,标志物是具有1000或更少个碱基的区域,标志物是具有5000或更少个碱基的区域,或在一些实施方案中,标志物是一个碱基。在一些实施方案中,标志物在高CpG密度启动子中。

[0092] 技术不局限于样品类型。举例来说,在一些实施方案中,样品是粪便样品、组织样品(例如乳腺组织样品)、血液样品(例如血浆、血清、全血)、排泄物或尿样品。

[0093] 此外,技术在用于确定甲基化状态的方法方面不受限制。在一些实施方案中,测定包括使用甲基化特异性聚合酶链式反应、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集。在一些实施方案中,测定包括使用甲基化特异性寡核苷酸。在一些实施方案中,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、实时(例如单分子)测序、珠粒乳液测序、纳米孔测序等。

[0094] 技术提供用于检测DMR的试剂,例如在一些实施方案中,提供了包含以SEQ ID NO: 1-422(参见表10、表19和表20)提供的序列的一组寡核苷酸。在一些实施方案中,提供了一

种包含互补于具有DMR中的碱基的染色体区域的序列的寡核苷酸,例如对DMR的甲基化状态敏感的寡核苷酸。

[0095] 技术提供用于鉴定乳腺癌的各种标志物组,例如在一些实施方案中,标志物包含具有注释的染色体区域,所述注释是ATP6V1B1、LMX1B_A、BANK1、OTX1、MAX.chr11.14926602-14927148、UBTF、PRKCB、TRH_A、MPZ、DNM3_A、TRIM67、MAX.chr12.4273906-4274012、CALN1_A、ITPRIPL1、MAX.chr12.4273906-4274012、GYPC_B、MAX.chr5.42994866-42994936、OSR2_A、SCRT2_B、MAX.chr5.145725410-145725459、MAX.chr11.68622869-68622968、MAX.chr8.124173030-124173395、MAX.chr20.1784209-1784461、LOC100132891、BHLHE23_D、MAX.chr19.46379903-46380197、CHST2_B、MAX.chr5.77268672-77268725、C17orf64、EMX1_A、DSCR6、ITPRIPL1、IGF2BP3_B、DLX4和ABLIM1(参见表16E、实施例II)。

[0096] 技术提供用于鉴定乳腺癌的各种标志物组,例如在一些实施方案中,标志物包含具有注释的染色体区域,所述注释是ABLIM1_B、AJAP1_C、ALOX5_B、ASCL2_B、BANK1_B、BHLHE23_E、C10orf125_B、C17orf64_B、CALN1_1520、CALN1_B、CD1D_1058、CDH4_7890、CHST2_8128、CHST2_8384、CHST2_9316、CHST2_9470、CLIC6_B、CXCL12_B、DLX4_B、DNM3_D、EMX1_A、ESPN_B、FAM59B_7764、FOXP4_B、GP5、HOXA1_C、IGF2BP3_C、IPTRIP1_1138、IPTRIP1_1200、KCNK9_B、KCNK17_C、LAYN_B、LIME1_B、LMX1B_D、LOC100132891_B、MAST1_B、MAX.chr12.427.br、MAX.chr20.4422、MPZ_5742、MPZ_5554、MSX2P1_B、ODC1_B、OSR2_A、OTX1_B、PLXNC1_B、PRKCB_7570、SCRT2_C、SLC30A10、SPHK2_B、ST8SIA4_B、STX16_C、TRH_A和TRIM67_B(参见表22、实施例III)。

[0097] 技术提供用于鉴定乳腺癌的各种标志物组,例如在一些实施方案中,标志物包含具有注释的染色体区域,所述注释是CD1D、ITPRIPL1、FAM59B、C10orf125、TRIM67、SPHK2、CALN1_B、CHST2_B、MPZ、CXCL12_B、ODC1_B、OSR2_A、TRH_A和C17orf64_B(参见表27、实施例III)。

[0098] 技术提供用于鉴定三阴性乳腺癌的各种标志物组,例如在一些实施方案中,标志物包含具有注释的染色体区域,所述注释是ABLIM1、AJAP1_B、ASCL2、ATP6V1B1、BANK1、CALN1_A、CALN1_B、CLIC6、DSCR6、FOXP4、GAD2、GCGR、GP5、GRASP、HBM、HNF1B_B、KLF16、MAGI2、MAX.chr11.14926602-14927148、MAX.chr12.4273906-4274012、MAX.chr17.73073682-73073814、MAX.chr18.76734362-76734370、MAX.chr2.97193478-97193562、MAX.chr22.42679578-42679917、MAX.chr4.8859253-8859329、MAX.chr4.8859602-8859669、MAX.chr4.8860002-8860038、MAX.chr5.145725410-145725459、MAX.chr6.157557371-157557657、MPZ、NKX2-6、PDX1、PLXNC1_A、PPARG、PRKCB、PTPRN2、RBFOX_A、SCRT2_A、SLC7A4、STAC2_B、STX16_A、STX16_B、TBX1、TRH_A、VSTM2B_A、ZBTB16、ZNF132和ZSCAN23(参见表3、实施例I)。

[0099] 技术提供用于鉴定三阴性乳腺癌的各种标志物组,例如在一些实施方案中,标志物包含具有注释的染色体区域,所述注释是CALN1_A、LOC100132891、NACAD、TRIM67、ATP6V1B1、DLX4、GP5、ITPRIPL1、MAX.chr11.14926602-14927148、MAX.chr5.42994866-42994936、MAX.chr8.124173030-124173395、MPZ、PRKCB、ST8SIA4、STX16_B、ITPRIPL1、KLF16、MAX.chr12.4273906-4274012、KCNK9、SCRT2_B、CDH4_E、HNF1B_B、TRH_A、

MAX.chr20.1784209-1784461、MAX.chr12.4273906-4274012、MAX.chr5.145725410-145725459、MAX.chr5.77268672-77268725和DSCR6(参见表11、实施例I)。

[0100] 技术提供用于鉴定三阴性乳腺癌的各种标志物组,例如在一些实施方案中,标志物包含具有注释的染色体区域,所述注释是ATP6V1B1、MAX.chr11.14926602-14927148、PRKCB、TRH_A、MPZ、GP5、TRIM67、MAX.chr12.4273906-4274012、CALN1_A、MAX.chr12.4273906-4274012、MAX.chr5.42994866-42994936、SCRT2_B、MAX.chr5.145725410-145725459、BHLHE23_D、MAX.chr5.77268672-77268725、EMX1_A、DSCR6和DLX4(参见表16A、实施例II)。

[0101] 技术提供用于鉴定HER2⁺乳腺癌的各种标志物组,例如在一些实施方案中,标志物包含具有注释的染色体区域,所述注释是ABLIM1、AFAP1L1、AKR1B1、ALOX5、AMN、ARL5C、BANK1、BCAT1、BEGAIN、BEST4、BHLHE23_B、BHLHE23_C、C17orf64、C1QL2、C7orf52、CALN1_B、CAV2、CD8A、CDH4_A、CDH4_B、CDH4_C、CDH4_D、CDH4_E、CDH4_F、CHST2_B、CLIP4、CR1、DLK1、DNAJC6、DNM3_A、EMX1_A、ESPN、FABP5、FAM150A、FLJ42875、GLP1R、GNG4、GYPC_A、HAND2、HES5、HNF1B_A、HNF1B_B、HOXA1_A、HOXA1_B、HOXA7_A、HOXA7_B、HOXA7_C、HOXD9、IGF2BP3_A、IGF2BP3_B、IGSF9B_A、IL15RA、INSM1、ITPKA_B、ITPRIPL1、KCNE3、KCNK17_B、LIME1、LOC100132891、LOC283999、LY6H、MAST1、MAX.chr1.158083198-158083476、MAX.chr1.228074764-228074977、MAX.chr1.46913931-46913950、MAX.chr10.130085265-130085312、MAX.chr11.68622869-68622968、MAX.chr14.101176106-101176260、MAX.chr15.96889069-96889128、MAX.chr17.8230197-8230314、MAX.chr19.46379903-46380197、MAX.chr2.97193163-97193287、MAX.chr2.97193478-97193562、MAX.chr20.1784209-1784461、MAX.chr21.44782441-44782498、MAX.chr22.23908718-23908782、MAX.chr5.145725410-145725459、MAX.chr5.178957564-178957598、MAX.chr5.180101084-180101094、MAX.chr5.42952185-42952280、MAX.chr5.42994866-42994936、MAX.chr6.27064703-27064783、MAX.chr7.152622607-152622638、MAX.chr8.145104132-145104218、MAX.chr9.136474504-136474527、MCF2L2、MSX2P1、NACAD、NID2_B、NID2_C、ODC1、OSR2_B、PAQR6、PCDH8、PIF1、PPARA、PPP2R5C、PRDM13_A、PRHOXNB、PRKCB、RBF0X3_A、RBF0X3_B、RFX8、SNCA、STAC2_A、STAC2_B、STX16_B、SYT5、TIMP2、TMEFF2、TNFRSF10D、TRH_B、TRIM67、TRIM71_C、USP44_A、USP44_B、UTF1、UTS2R、VSTM2B_A、VSTM2B_B、ZFP64和ZNF132(参见表4、实施例I)。

[0102] 技术提供用于鉴定HER2⁺乳腺癌的各种标志物组,例如在一些实施方案中,标志物包含具有注释的染色体区域,所述注释是BHLHE23_C、CALN1_A、CD1D、CHST2_A、FMN2、HOXA1_A、HOXA7_A、KCNH8、LOC100132891、MAX.chr15.96889013-96889128、NACAD、TRIM67、ATP6V1B1、C17orf64、CHST2_B、DLX4、DNM3_A、EMX1_A、IGF2BP3_A、IGF2BP3_B、ITPRIPL1、LMX1B_A、MAX.chr11.14926602-14927148、MAX.chr5.42994866-42994936、MAX.chr8.124173030-124173395、MPZ、ODC1、PLXNC1_A、PRKCB、LOC100132891、ITPRIPL1、ABLIM1、MAX.chr12.4273906-4274012、MAX.chr19.46379903-46380197、ZSCAN12、BHLHE23_D、COL23A1、KCNK9、LAYN、PLXNC1_A、RIC3、SCRT2_B、ALOX5、CDH4_E、HNF1B_B、TRH_A、MAST1、ASCL2、MAX.chr20.1784209-1784461、RBF0X3_A、MAX.chr12.4273906-4274012、GAS7、MAX.chr5.145725410-145725459、MAX.chr5.77268672-77268725、GYPC_B、DLX6、FBN1、

OSR2_A、BEST4、AJAP1_B、DSCR6和MAX.chr11.68622869-68622968(参见表11、实施例I)。

[0103] 技术提供用于鉴定HER2⁺乳腺癌的各种标志物组,例如在一些实施方案中,标志物包含具有注释的染色体区域,所述注释是ATP6V1B1、LMX1B_A、BANK1、OTX1、MAX.chr11.14926602-14927148、UBTF、PRKCB、TRH_A、MPZ、GP5、DNM3_A、TRIM67、PLXNC1_A、MAX.chr12.4273906-4274012、CALN1_A、ITPRIPL1、MAX.chr12.4273906-4274012、GYPC_B、MAX.chr5.42994866-42994936、OSR2_A、SCRT2_B、MAX.chr5.145725410-145725459、MAX.chr11.68622869-68622968、MAX.chr8.124173030-124173395、MAX.chr20.1784209-1784461、LOC100132891、BHLHE23_C、ALOX5、MAX.chr19.46379903-46380197、ODC1、CHST2_A、MAX.chr5.77268672-77268725、C17orf64、EMX1_A、CHST2_B、DSCR6、ITPRIPL1、IGF2BP3_B、DLX4、ABLM1、BHLHE23_D、ZSCAN12、GRASP、C10orf125(参见表16B、实施例II)。

[0104] 技术提供用于鉴定管腔A型乳腺癌的各种标志物组,例如在一些实施方案中,标志物包含具有注释的染色体区域,所述注释是ARL5C、BHLHE23_C、BMP6、C10orf125、C17orf64、C19orf66、CAMKV、CD1D、CDH4_E、CDH4_F、CHST2_A、CRHBP、DLX6、DNM3_A、DNM3_B、DNM3_C、ESYT3、ETS1_A、ETS1_B、FAM126A、FAM189A1、FAM20A、FAM59B、FBN1、FLRT2、FMN2、FOXP4、GAS7、GYPC_A、GYPC_B、HAND2、HES5、HMGA2、HNF1B_B、IGF2BP3_A、IGF2BP3_B、KCNH8、KCNK17_A、KCNQ2、KLHDC7B、LOC100132891、MAX.chr1.46913931-46913950、MAX.chr11.68622869-68622968、MAX.chr12.4273906-4274012、MAX.chr12.59990591-59990895、MAX.chr17.73073682-73073814、MAX.chr20.1783841-1784054、MAX.chr21.47063802-47063851、MAX.chr4.8860002-8860038、MAX.chr5.172234248-172234494、MAX.chr5.178957564-178957598、MAX.chr6.130686865-130686985、MAX.chr8.687688-687736、MAX.chr8.688863-688924、MAX.chr9.114010-114207、MPZ、NID2_A、NKX2-6、ODC1、OSR2_A、POU4F1、PRDM13_B、PRKCB、RASGRF2、RIPPLY2、SLC30A10、ST8SIA4、SYN2、TRIM71_A、TRIM71_B、TRIM71_C、UBTF、ULBP1、USP44_B和VSTM2B_A(参见表5、实施例I)。

[0105] 技术提供用于鉴定管腔A型乳腺癌的各种标志物组,例如在一些实施方案中,标志物包含具有注释的染色体区域,所述注释是BHLHE23_C、CD1D、CHST2_A、FAM126A、FMN2、HOXA1_A、HOXA7_A、KCNH8、LOC100132891、MAX.chr15.96889013-96889128、SLC30A10、TRIM67、ATP6V1B1、BANK1、C10orf125、C17orf64、CHST2_B、DNM3_A、EMX1_A、GP5、IGF2BP3_A、IGF2BP3_B、ITPRIPL1、LMX1B_A、MAX.chr11.14926602-14927148、MAX.chr5.42994866-42994936、MAX.chr8.124173030-124173395、MPZ、ODC1、PLXNC1_A、PRKCB、ST8SIA4、STX16_B、UBTF、LOC100132891、ITPRIPL1、MAX.chr12.4273906-4274012、MAX.chr12.59990671-59990859、BHLHE23_D、COL23A1、KCNK9、OTX1、PLXNC1_A、HNF1B_B、MAST1、ASCL2、MAX.chr20.1784209-1784461、RBFox_A、MAX.chr12.4273906-4274012、GAS7、MAX.chr5.145725410-145725459、MAX.chr5.77268672-77268725、GYPC_B、DLX6、FBN1、OSR2_A、BEST4、DSCR6、MAX.chr11.68622869-68622968(参见表11、实施例I)。

[0106] 技术提供用于鉴定管腔A型乳腺癌的各种标志物组,例如在一些实施方案中,标志物包含具有注释的染色体区域,所述注释是ATP6V1B1、LMX1B_A、BANK1、OTX1、ST8SIA4、MAX.chr11.14926602-14927148、UBTF、PRKCB、TRH_A、MPZ、DNM3_A、TRIM67、PLXNC1_A、MAX.chr12.4273906-4274012、CALN1_A、ITPRIPL1、MAX.chr12.4273906-4274012、GYPC_B、MAX.chr5.42994866-42994936、OSR2_A、SCRT2_B、MAX.chr5.145725410-145725459、

MAX.chr11.68622869-68622968、MAX.chr8.124173030-124173395、MAX.chr20.1784209-1784461、LOC100132891、BHLHE23_D、ALOX5、MAX.chr19.46379903-46380197、ODC1、CHST2_A、MAX.chr5.77268672-77268725、C17orf64、EMX1_A、CHST2_B、ITPRIPL1、IGF2BP3_B、CDH4_E、ABLIM1、SLC30A10、C10orf125(参见表16C、实施例II)。

[0107] 技术提供用于鉴定管腔B型乳腺癌的各种标志物组,例如在一些实施方案中,标志物包含具有注释的染色体区域,所述注释是ACCN1、AJAP1_A、AJAP1_B、BEST4、CALN1_B、CBLN1_B、CDH4_E、DLX4、FOXP4、IGSF9B_B、ITPRIPL1、KCNA1、KLF16、LMX1B_A、MAST1、MAX.chr11.14926602-14927148、MAX.chr17.73073682-73073814、MAX.chr18.76734362-76734370、MAX.chr18.76734423-76734476、MAX.chr19.30719261-30719354、MAX.chr22.42679578-42679917、MAX.chr4.8860002-8860038、MAX.chr5.145725410-145725459、MAX.chr5.178957564-178957598、MAX.chr5.77268672-77268725、MAX.chr8.124173128-124173268、MPZ、PPARA、PRMT1、RBF3X_B、RYS2_A、SALL3、SCRT2_A、SPHK2、STX16_B、SYNJ2、TMEM176A、TSHZ3和VIPR2(参见表6、实施例I)。

[0108] 技术提供用于鉴定管腔B型乳腺癌的各种标志物组,例如在一些实施方案中,标志物包含具有注释的染色体区域,所述注释是CALN1_A、LOC100132891、MAX.chr15.96889013-96889128、ATP6V1B1、C17orf64、DLX4、ITPRIPL1、MAX.chr11.14926602-14927148、MAX.chr5.42994866-42994936、MAX.chr8.124173030-124173395、MPZ、PRKCB、ITPRIPL1、KLF16、MAX.chr12.4273906-4274012、MAX.chr19.46379903-46380197、BHLHE23_D、HNF1B_B、TRH_A、ASCL2、MAX.chr20.1784209-1784461、MAX.chr12.4273906-4274012、MAX.chr5.145725410-145725459、MAX.chr5.77268672-77268725、BEST4、AJAP1_B和DSCR6(参见表11、实施例I)。

[0109] 技术提供用于鉴定管腔B型乳腺癌的各种标志物组,例如在一些实施方案中,标志物包含具有注释的染色体区域,所述注释是ATP6V1B1、LMX1B_A、BANK1、OTX1、MAX.chr11.14926602-14927148、UBTF、PRKCB、TRH_A、MPZ、DNM3_A、TRIM67、PLXNC1_A、MAX.chr12.4273906-4274012、CALN1_A、ITPRIPL1、MAX.chr12.4273906-4274012、GYPC_B、MAX.chr5.42994866-42994936、OSR2_A、SCRT2_B、MAX.chr5.145725410-145725459、MAX.chr11.68622869-68622968、MAX.chr8.124173030-124173395、MAX.chr20.1784209-1784461、LOC100132891、BHLHE23_C、ALOX5、MAX.chr19.46379903-46380197、CHST2_B、MAX.chr5.77268672-77268725、C17orf64、EMX1_A、DSCR6、ITPRIPL1、IGF2BP3_B、CDH4_E、DLX4、ABLIM1、BHLHE23_D(参见表16D、实施例II)。

[0110] 技术提供用于鉴定BRCA1乳腺癌的各种标志物组,例如在一些实施方案中,标志物包含具有注释的染色体区域,所述注释是C10orf93、C20orf195_A、C20orf195_B、CALN1_B、CBLN1_A、CBLN1_B、CCDC61、CCND2_A、CCND2_B、CCND2_C、EMX1_B、FAM150B、GRASP、HBM、ITPRIPL1、KCNK17_A、KIAA1949、LOC100131176、MAST1、MAX.chr1.8277285-8277316、MAX.chr1.8277479-8277527、MAX.chr11.14926602-14926729、MAX.chr11.14926860-14927148、MAX.chr15.96889013-96889128、MAX.chr18.5629721-5629791、MAX.chr19.30719261-30719354、MAX.chr22.42679767-42679917、MAX.chr5.178957564-178957598、MAX.chr5.77268672-77268725、MAX.chr6.157556793-157556856、MAX.chr8.124173030-124173395、MN1、MPZ、NR2F6、PDXK_A、PDXK_B、PTPRM、RYS2_B、

SERPINB9_A、SERPINB9_B、SLC8A3、STX16_B TEPP、TOX、VIPR2、VSTM2B_A、ZNF486、ZNF626和ZNF671(参见表7、实施例I)。

[0111] 技术提供用于鉴定BRCA1乳腺癌的各种标志物组,例如在一些实施方案中,标志物包含具有注释的染色体区域,所述注释是BHLHE23_C、CALN1_A、CD1D、HOXA7_A、LOC100132891、MAX.chr1.8277479-8277527、MAX.chr15.96889013-96889128、NACAD、ATP6V1B1、BANK1、C17orf64、DLX4、EMX1_A、FOXP4、GP5、ITPRIPL1、LMX1B_A、MAX.chr11.14926602-14927148、MAX.chr5.42994866-42994936、MAX.chr8.124173030-124173395、MPZ、PRKCB、STX16_B UBTF、LOC100132891、ITPRIPL1、ABLIM1、MAX.chr19.46379903-46380197、ZSCAN12、BHLHE23_D、CXCL12、KCNK9、OTX1、RIC3、SCRT2_B、MAX.chr17.73073682-73073814、CDH4_E、HNF1B_B、TRH_A、MAX.chr20.1784209-1784461、MAX.chr5.145725410-145725459、MAX.chr5.77268672-77268725、BEST4和DSCR6(参见表11、实施例I)。

[0112] 技术提供用于鉴定BRCA2乳腺癌的各种标志物组,例如在一些实施方案中,标志物包含具有注释的染色体区域,所述注释是ANTXR2、B3GNT5、BHLHE23_C、BMP4、CHRNA7、EPHA4、FAM171A1、FAM20A、FMNL2、FSCN1、GSTP1、HBM、IGFBP5、IL17REL、ITGA9、ITPRIPL1、KIRREL2、LRRC34、MAX.chr1.239549742-239549886、MAX.chr1.8277479-8277527、MAX.chr11.14926602-14926729、MAX.chr11.14926860-14927148、MAX.chr15.96889013-96889128、MAX.chr2.238864674-238864735、MAX.chr5.81148300-81148332、MAX.chr7.151145632-151145743、MAX.chr8.124173030-124173395、MAX.chr8.143533298-143533558、MERTK、MPZ、NID2_C、NTRK3、OLIG3_A、OLIG3_B、OSR2_C、PROM1、RGS17、SBN02、STX16_B TBKBP1、TLX1NB、VIPR2、VN1R2、VSNL1和ZFP64(参见表8、实施例I)。

[0113] 技术提供用于鉴定BRCA2乳腺癌的各种标志物组,例如在一些实施方案中,标志物包含具有注释的染色体区域,所述注释是MAX.chr15.96889013-96889128、ATP6V1B1、C17orf64、ITPRIPL1、MAX.chr11.14926602-14927148、MAX.chr5.42994866-42994936、LOC100132891、ITPRIPL1、ABLIM1、MAX.chr19.46379903-46380197、COL23A1、LAYN、OTX1、TRH_A、MAX.chr5.145725410-145725459、MAX.chr11.68622869-68622968(参见表11、实施例I)。

[0114] 技术提供用于鉴定侵袭性乳腺癌的各种标志物组,例如在一些实施方案中,标志物包含具有注释的染色体区域,所述注释是CDH4_E、FLJ42875、GAD2、GRASP、ITPRIPL1、KCNA1、MAX.chr12.4273906-4274012、MAX.chr18.76734362-76734370、MAX.chr18.76734423-76734476、MAX.chr19.30719261-30719354、MAX.chr4.8859602-8859669、MAX.chr4.8860002-8860038、MAX.chr5.145725410-145725459、MAX.chr5.178957564-178957598、MAX.chr5.77268672-77268725、MPZ、NKX2-6、PRKCB、RBF0X3_B、SALL3和VSTM2B_A(参见表9、实施例I)。

[0115] 技术提供用于区分高等级乳腺导管原位癌(DCIS-HG)乳腺癌组织与低等级乳腺导管原位癌(DCIS-LG)乳腺组织的各种标志物组,例如在一些实施方案中,标志物包含具有注释的染色体区域,所述注释是SCRT2_B、MPZ、MAX.chr8.124173030-124173395、ITPRIPL1、ITPRIPL1、DLX4、CALN1_A和IGF2BP3_B(参见表15、实施例I)。

[0116] 技术提供用于区分高等级乳腺导管原位癌(DCIS-HG)乳腺癌组织与低等级乳腺导

管原位癌 (DCIS-LG) 乳腺组织的各种标志物组,例如在一些实施方案中,标志物包含具有注释的染色体区域,所述注释是SCRT2_B、ITPRIPL1和MAX.chr8.124173030-12417339(在91%特异性下具有100%灵敏性)(参见表15、实施例I)。

[0117] 技术提供用于区分高等级乳腺导管原位癌 (DCIS-HG) 乳腺癌组织与低等级乳腺导管原位癌 (DCIS-LG) 乳腺组织的各种标志物组,例如在一些实施方案中,标志物包含具有注释的染色体区域,所述注释是DSCR6、SCRT2_B、MPZ、MAX.chr8.124173030-124173395、OSR2_A、MAX.chr11.68622869-68622968、ITPRIPL1、MAX.chr5.145725410-145725459、BHLHE23_C和ITPRIPL1(参见表17、实施例II)。

[0118] 提供了试剂盒实施方案,例如包括能够以甲基化特异性方式修饰DNA的试剂(例如甲基化敏感性限制酶、甲基化依赖性限制酶和亚硫酸氢盐试剂);以及包含来自选自由DMR 1-375(来自表2和表18)组成的组的DMR的序列,并且具有与不患有乳腺癌的受试者相关的甲基化状态的对照核酸的试剂盒。在一些实施方案中,试剂盒包括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,试剂盒包括能够以甲基化特异性方式修饰DNA的试剂(例如甲基化敏感性限制酶、甲基化依赖性限制酶和亚硫酸氢盐试剂);以及包含来自选自由DMR 1-375(来自表2和表18)组成的组的DMR的序列,并且具有与患有乳腺癌的受试者相关的甲基化状态的对照核酸。一些试剂盒实施方案包括用于从受试者获得样品(例如粪便样品;乳腺组织样品;血浆样品、血清样品、全血样品)的样品收集器;能够以甲基化特异性方式修饰DNA的试剂(例如甲基化敏感性限制酶、甲基化依赖性限制酶和亚硫酸氢盐试剂);以及如本文所述的寡核苷酸。

[0119] 技术与组合物(例如反应混合物)的实施方案相关。在一些实施方案中,提供了一种包含含有DMR的核酸和能够以甲基化特异性方式修饰DNA的试剂(例如甲基化敏感性限制酶、甲基化依赖性限制酶和亚硫酸氢盐试剂)的组合物。一些实施方案提供了一种包含含有DMR的核酸和如本文所述的寡核苷酸的组合物。一些实施方案提供了一种包含含有DMR的核酸和甲基化敏感性限制酶的组合物。一些实施方案提供了一种包含含有DMR的核酸和聚合酶的组合物。

[0120] 提供了用于在从受试者获得的样品(例如乳腺组织样品;血浆样品;粪便样品)中筛查乳腺癌和/或各种形式的乳腺癌(例如三阴性乳腺癌、HER2⁺乳腺癌、管腔A型乳腺癌、管腔B型乳腺癌、BRCA1乳腺癌、BRCA2乳腺癌)的额外相关方法实施方案,例如包括以下的方法:确定所述样品中的包含DMR中的碱基的标志物的甲基化状态,所述DMR是DMR 1-375(来自表2和表18)中的一者或多者;将来自所述受试者样品的所述标志物的所述甲基化状态与来自正常对照样品的所述标志物的甲基化状态进行比较,所述正常对照样品来自不患有乳腺癌(例如乳腺癌和/或某一形式的乳腺癌:三阴性乳腺癌、HER2⁺乳腺癌、管腔A型乳腺癌、管腔B型乳腺癌、BRCA1乳腺癌、BRCA2乳腺癌)的受试者;以及确定所述受试者样品和所述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,置信区间是90%、95%、97.5%、98%、99%、99.5%、99.9%或99.99%,并且p值是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:使包含DMR的核酸与能够以甲基化特异性方式修饰核酸的试剂(例如甲基化敏感性限制酶、甲基化依赖性限制酶和亚硫酸氢盐试剂)反应以产生例如以甲基化特异性方式修饰的核酸;对以甲基化特异性方式修饰的所述核酸测序以提供以甲基化特异性方式修饰的所述核酸的核苷酸序列;将以

甲基化特异性方式修饰的所述核酸的所述核苷酸序列与来自不患有乳腺癌和/或某一形式的乳腺癌的受试者的包含所述DMR的核酸的核苷酸序列进行比较以鉴定两个序列的差异；以及当存在差异时，将所述受试者鉴定为患有乳腺癌（例如乳腺癌和/或某一形式的乳腺癌：三阴性乳腺癌、HER2⁺乳腺癌、管腔A型乳腺癌、管腔B型乳腺癌、BRCA1乳腺癌、BRCA2乳腺癌）。

[0121] 用于在从受试者获得的样品中筛查乳腺癌的系统由技术提供。系统的示例性实施方案包括例如用于在从受试者获得的样品（例如乳腺组织样品；血浆样品；粪便样品）中筛查乳腺癌和/或各种类型的乳腺癌（例如三阴性乳腺癌、HER2⁺乳腺癌、管腔A型乳腺癌、管腔B型乳腺癌、BRCA1乳腺癌、BRCA2乳腺癌）的系统，所述系统包括被配置来确定样品的甲基化状态的分析组件、被配置来将所述样品的所述甲基化状态与记录在数据库中的对照样品或参考样品甲基化状态进行比较的软件组件、以及被配置来向使用者发出乳腺癌相关甲基化状态的警报的警报组件。在一些实施方案中，警报由接收来自多个测定（例如确定多种标志物例如DMR（例如如表2和表18中提供的DMR）的甲基化状态的测定）的结果，并且基于多个结果来计算用以报告的数值或结果的软件组件确定。一些实施方案提供了与本文提供的每个DMR相关的加权参数的数据库，所述数据库用于计算用以向使用者（例如像医师、护士、临床医师等）报告的数值或结果和/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，一个或多个结果用于提供基于来自多个测定的一个或多个结果的复合的指示受试者中的癌症风险的评分、数值或结果。

[0122] 在系统的一些实施方案中，样品包含含有DMR的核酸。在一些实施方案中，系统还包括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，系统包括包含DMR的核酸序列。在一些实施方案中，数据库包含来自不患有乳腺癌和/或特定类型的乳腺癌（例如三阴性乳腺癌、HER2⁺乳腺癌、管腔A型乳腺癌、管腔B型乳腺癌、BRCA1乳腺癌、BRCA2乳腺癌）的受试者的核酸序列。还提供了核酸，例如一组核酸，每个核酸具有包含DMR的序列。在一些实施方案中，所述一组核酸中的每个核酸具有来自不患有乳腺癌和/或特定类型的乳腺癌的受试者的序列。相关系统实施方案包括如所描述的一组核酸以及与所述一组核酸相关的核酸序列的数据库。一些实施方案还包括能够以甲基化特异性方式修饰DNA的试剂（例如甲基化敏感性限制酶、甲基化依赖性限制酶和亚硫酸氢盐试剂）。并且，一些实施方案还包括核酸测序仪。

[0123] 在某些实施方案中，提供了用于表征来自人类患者的样品（例如乳腺组织样品；血浆样品；全血样品；血清样品；粪便样品）的方法。举例来说，在一些实施方案中，所述实施方案包括从人类患者的样品获得DNA；测定包含差异性甲基化区域（DMR）中的碱基的DNA甲基化标志物的甲基化状态，所述差异性甲基化区域选自由来自表2和表18的DMR 1-375组成的组；以及将一种或多种DNA甲基化标志物的所测定甲基化状态与不患有乳腺癌和/或特定类型的乳腺癌（例如三阴性乳腺癌、HER2⁺乳腺癌、管腔A型乳腺癌、管腔B型乳腺癌、BRCA1乳腺癌、BRCA2乳腺癌）的人类患者的所述一种或多种DNA甲基化标志物的甲基化水平参考值进行比较。

[0124] 所述方法不限于特定类型的来自人类患者的样品。在一些实施方案中，样品是乳腺组织样品。在一些实施方案中，样品是血浆样品。在一些实施方案中，样品是粪便样品、组织样品、乳腺组织样品、血液样品（例如血浆样品、全血样品、血清样品）或尿样品。

[0125] 在一些实施方案中,所述方法包括测定多种DNA甲基化标志物。在一些实施方案中,所述方法包括测定2至11种DNA甲基化标志物。在一些实施方案中,所述方法包括测定12至120种DNA甲基化标志物。在一些实施方案中,所述方法包括测定2至375种DNA甲基化标志物。在一些实施方案中,所述方法包括测定样品中的一种或多种DNA甲基化标志物的甲基化状态,包括确定一个碱基的甲基化状态。在一些实施方案中,所述方法包括测定样品中的一种或多种DNA甲基化标志物的甲基化状态,包括确定在多个碱基处的甲基化程度。在一些实施方案中,所述方法包括测定正向链的甲基化状态,或测定反向链的甲基化状态。

[0126] 在一些实施方案中,DNA甲基化标志物是具有100或更少个碱基的区域。在一些实施方案中,DNA甲基化标志物是具有500或更少个碱基的区域。在一些实施方案中,DNA甲基化标志物是具有1000或更少个碱基的区域。在一些实施方案中,DNA甲基化标志物是具有5000或更少个碱基的区域。在一些实施方案中,DNA甲基化标志物是一个碱基。在一些实施方案中,DNA甲基化标志物在高CpG密度启动子中。

[0127] 在一些实施方案中,测定包括使用甲基化特异性聚合酶链式反应、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集。

[0128] 在一些实施方案中,测定包括使用甲基化特异性寡核苷酸。在一些实施方案中,甲基化特异性寡核苷酸选自自由SEQ ID NO:1-422(表10、表19和表20)组成的组。

[0129] 在一些实施方案中,具有选自由以下组成的组的注释的染色体区域构成DNA甲基化标志物:ATP6V1B1、LMX1B_A、BANK1、OTX1、MAX.chr11.14926602-14927148、UBTF、PRKCB、TRH_A、MPZ、DNM3_A、TRIM67、MAX.chr12.4273906-4274012、CALN1_A、ITPRIPL1、MAX.chr12.4273906-4274012、GYPC_B、MAX.chr5.42994866-42994936、OSR2_A、SCRT2_B、MAX.chr5.145725410-145725459、MAX.chr11.68622869-68622968、MAX.chr8.124173030-124173395、MAX.chr20.1784209-1784461、LOC100132891、BHLHE23_D、MAX.chr19.46379903-46380197、CHST2_B、MAX.chr5.77268672-77268725、C17orf64、EMX1_A、DSCR6、ITPRIPL1、IGF2BP3_B、DLX4和ABLIM1(参见表16E、实施例II)。

[0130] 在一些实施方案中,具有选自由以下组成的组的注释的染色体区域构成DNA甲基化标志物:ABLIM1_B、AJAP1_C、ALOX5_B、ASCL2_B、BANK1_B、BHLHE23_E、C10orf125_B、C17orf64_B、CALN1_1520、CALN1_B、CD1D_1058、CDH4_7890、CHST2_8128、CHST2_8384、CHST2_9316、CHST2_9470、CLIC6_B、CXCL12_B、DLX4_B、DNM3_D、EMX1_A、ESPN_B、FAM59B_7764、FOXP4_B、GP5、HOXA1_C、IGF2BP3_C、IPTRIP1_1138、IPTRIP1_1200、KCNK9_B、KCNK17_C、LAYN_B、LIME1_B、LMX1B_D、LOC100132891_B、MAST1_B、MAX.chr12.427.br、MAX.chr20.4422、MPZ_5742、MPZ_5554、MSX2P1_B、ODC1_B、OSR2_A、OTX1_B、PLXNC1_B、PRKCB_7570、SCRT2_C、SLC30A10、SPHK2_B、ST8SIA4_B、STX16_C、TRH_A和TRIM67_B(参见表22、实施例III)。

[0131] 在一些实施方案中,具有选自由以下组成的组的注释的染色体区域构成DNA甲基化标志物:CD1D、ITPRIPL1、FAM59B、C10orf125、TRIM67、SPHK2、CALN1_B、CHST2_B、MPZ、CXCL12_B、ODC1_B、OSR2_A、TRH_A和C17orf64_B(参见表27、实施例III)。

[0132] 在一些实施方案中,具有选自由以下组成的组的注释的染色体区域构成DNA甲基化标志物:ABLIM1、AJAP1_B、ASCL2、ATP6V1B1、BANK1、CALN1_A、CALN1_B、CLIC6、DSCR6、FOXP4、GAD2、GCGR、GP5、GRASP、HBM、HNF1B_B、KLF16、MAGI2、MAX.chr11.14926602-

14927148、MAX.chr12.4273906-4274012、MAX.chr17.73073682-73073814、MAX.chr18.76734362-76734370、MAX.chr2.97193478-97193562、MAX.chr22.42679578-42679917、MAX.chr4.8859253-8859329、MAX.chr4.8859602-8859669、MAX.chr4.8860002-8860038、MAX.chr5.145725410-145725459、MAX.chr6.157557371-157557657、MPZ、NKX2-6、PDX1、PLXNC1_A、PPARG、PRKCB、PTPRN2、RBF0X_A、SCRT2_A、SLC7A4、STAC2_B、STX16_A、STX16_B、TBX1、TRH_A、VSTM2B_A、ZBTB16、ZNF132和ZSCAN23(参见表3、实施例I)。

[0133] 在一些实施方案中,具有选自由以下组成的组的注释的染色体区域构成DNA甲基化标志物:CALN1_A、LOC100132891、NACAD、TRIM67、ATP6V1B1、DLX4、GP5、ITPRIPL1、MAX.chr11.14926602-14927148、MAX.chr5.42994866-42994936、MAX.chr8.124173030-124173395、MPZ、PRKCB、ST8SIA4、STX16_BITPRIPL1、KLF16、MAX.chr12.4273906-4274012、KCNK9、SCRT2_B、CDH4_E、HNF1B_B、TRH_A、MAX.chr20.1784209-1784461、MAX.chr12.4273906-4274012、MAX.chr5.145725410-145725459、MAX.chr5.77268672-77268725和DSCR6(参见表11、实施例I)。

[0134] 在一些实施方案中,具有选自由以下组成的组的注释的染色体区域构成DNA甲基化标志物:ATP6V1B1、MAX.chr11.14926602-14927148、PRKCB、TRH_A、MPZ、GP5、TRIM67、MAX.chr12.4273906-4274012、CALN1_A、MAX.chr12.4273906-4274012、MAX.chr5.42994866-42994936、SCRT2_B、MAX.chr5.145725410-145725459、BHLHE23_D、MAX.chr5.77268672-77268725、EMX1_A、DSCR6和DLX4(参见表16A、实施例II)。

[0135] 在一些实施方案中,具有选自由以下组成的组的注释的染色体区域构成DNA甲基化标志物:ABLIM1、AFAP1L1、AKR1B1、ALOX5、AMN、ARL5C、BANK1、BCAT1、BEGAIN、BEST4、BHLHE23_B、BHLHE23_C、C17orf64、C1QL2、C7orf52、CALN1_B、CAV2、CD8A、CDH4_A、CDH4_B、CDH4_C、CDH4_D、CDH4_E、CDH4_F、CHST2_B、CLIP4、CR1、DLK1、DNAJC6、DNM3_A、EMX1_A、ESPN、FABP5、FAM150A、FLJ42875、GLP1R、GNG4、GYPC_A、HAND2、HES5、HNF1B_A、HNF1B_B、HOXA1_A、HOXA1_B、HOXA7_A、HOXA7_B、HOXA7_C、HOXD9、IGF2BP3_A、IGF2BP3_B、IGSF9B_A、IL15RA、INSM1、ITPKA_B、ITPRIPL1、KCNE3、KCNK17_B、LIME1、LOC100132891、LOC283999、LY6H、MAST1、MAX.chr1.158083198-158083476、MAX.chr1.228074764-228074977、MAX.chr1.46913931-46913950、MAX.chr10.130085265-130085312、MAX.chr11.68622869-68622968、MAX.chr14.101176106-101176260、MAX.chr15.96889069-96889128、MAX.chr17.8230197-8230314、MAX.chr19.46379903-46380197、MAX.chr2.97193163-97193287、MAX.chr2.97193478-97193562、MAX.chr20.1784209-1784461、MAX.chr21.44782441-44782498、MAX.chr22.23908718-23908782、MAX.chr5.145725410-145725459、MAX.chr5.178957564-178957598、MAX.chr5.180101084-180101094、MAX.chr5.42952185-42952280、MAX.chr5.42994866-42994936、MAX.chr6.27064703-27064783、MAX.chr7.152622607-152622638、MAX.chr8.145104132-145104218、MAX.chr9.136474504-136474527、MCF2L2、MSX2P1、NACAD、NID2_B、NID2_C、ODC1、OSR2_B、PAQR6、PCDH8、PIF1、PPARA、PPP2R5C、PRDM13_A、PRHOXNB、PRKCB、RBF0X3_A、RBF0X3_B、RFX8、SNCA、STAC2_A、STAC2_B、STX16_B、SYT5、TIMP2、TMEFF2、TNFRSF10D、TRH_B、TRIM67、TRIM71_C、USP44_A、USP44_B、UTF1、UTS2R、VSTM2B_A、VSTM2B_B、ZFP64和ZNF132(参见表4、实施例I)。

[0136] 在一些实施方案中,具有选自由以下组成的组的注释的染色体区域构成DNA甲基化标志物:BHLHE23_C、CALN1_A、CD1D、CHST2_A、FMN2、HOXA1_A、HOXA7_A、KCNH8、LOC100132891、MAX.chr15.96889013-96889128、NACAD、TRIM67、ATP6V1B1、C17orf64、CHST2_B、DLX4、DNM3_A、EMX1_A、IGF2BP3_A、IGF2BP3_B、ITPRIPL1、LMX1B_A、MAX.chr11.14926602-14927148、MAX.chr5.42994866-42994936、MAX.chr8.124173030-124173395、MPZ、ODC1、PLXNC1_A、PRKCB、LOC100132891、ITPRIPL1、ABLIM1、MAX.chr12.4273906-4274012、MAX.chr19.46379903-46380197、ZSCAN12、BHLHE23_D、COL23A1、KCNK9、LAYN、PLXNC1_A、RIC3、SCRT2_B、ALOX5、CDH4_E、HNF1B_B、TRH_A、MAST1、ASCL2、MAX.chr20.1784209-1784461、RBF0X_A、MAX.chr12.4273906-4274012、GAS7、MAX.chr5.145725410-145725459、MAX.chr5.77268672-77268725、GYPC_B、DLX6、FBN1、OSR2_A、BEST4、AJAP1_B、DSCR6和MAX.chr11.68622869-68622968(参见表11、实施例I)。

[0137] 在一些实施方案中,具有选自由以下组成的组的注释的染色体区域构成DNA甲基化标志物:ATP6V1B1、LMX1B_A、BANK1、OTX1、MAX.chr11.14926602-14927148、UBTF、PRKCB、TRH_A、MPZ、GP5、DNM3_A、TRIM67、PLXNC1_A、MAX.chr12.4273906-4274012、CALN1_A、ITPRIPL1、MAX.chr12.4273906-4274012、GYPC_B、MAX.chr5.42994866-42994936、OSR2_A、SCRT2_B、MAX.chr5.145725410-145725459、MAX.chr11.68622869-68622968、MAX.chr8.124173030-124173395、MAX.chr20.1784209-1784461、LOC100132891、BHLHE23_C、ALOX5、MAX.chr19.46379903-46380197、ODC1、CHST2_A、MAX.chr5.77268672-77268725、C17orf64、EMX1_A、CHST2_B、DSCR6、ITPRIPL1、IGF2BP3_B、DLX4、ABLIM1、BHLHE23_D、ZSCAN12、GRASP、C10orf125(参见表16B、实施例II)。

[0138] 在一些实施方案中,具有选自由以下组成的组的注释的染色体区域构成DNA甲基化标志物:ARL5C、BHLHE23_C、BMP6、C10orf125、C17orf64、C19orf66、CAMKV、CD1D、CDH4_E、CDH4_F、CHST2_A、CRHBP、DLX6、DNM3_A、DNM3_B、DNM3_C、ESYT3、ETS1_A、ETS1_B、FAM126A、FAM189A1、FAM20A、FAM59B、FBN1、FLRT2、FMN2、FOXP4、GAS7、GYPC_A、GYPC_B、HAND2、HES5、HMGA2、HNF1B_B、IGF2BP3_A、IGF2BP3_B、KCNH8、KCNK17_A、KCNQ2、KLHDC7B、LOC100132891、MAX.chr1.46913931-46913950、MAX.chr11.68622869-68622968、MAX.chr12.4273906-4274012、MAX.chr12.59990591-59990895、MAX.chr17.73073682-73073814、MAX.chr20.1783841-1784054、MAX.chr21.47063802-47063851、MAX.chr4.8860002-8860038、MAX.chr5.172234248-172234494、MAX.chr5.178957564-178957598、MAX.chr6.130686865-130686985、MAX.chr8.687688-687736、MAX.chr8.688863-688924、MAX.chr9.114010-114207、MPZ、NID2_A、NKX2-6、ODC1、OSR2_A、POU4F1、PRDM13_B、PRKCB、RASGRF2、RIPPLY2、SLC30A10、ST8SIA4、SYN2、TRIM71_A、TRIM71_B、TRIM71_C、UBTF、ULBP1、USP44_B和VSTM2B_A(参见表5、实施例I)。

[0139] 在一些实施方案中,具有选自由以下组成的组的注释的染色体区域构成DNA甲基化标志物:BHLHE23_C、CD1D、CHST2_A、FAM126A、FMN2、HOXA1_A、HOXA7_A、KCNH8、LOC100132891、MAX.chr15.96889013-96889128、SLC30A10、TRIM67、ATP6V1B1、BANK1、C10orf125、C17orf64、CHST2_B、DNM3_A、EMX1_A、GP5、IGF2BP3_A、IGF2BP3_B、ITPRIPL1、LMX1B_A、MAX.chr11.14926602-14927148、MAX.chr5.42994866-42994936、MAX.chr8.124173030-124173395、MPZ、ODC1、PLXNC1_A、PRKCB、ST8SIA4、STX16_B、UBTF、

LOC100132891、ITPRIPL1、MAX.chr12.4273906-4274012、MAX.chr12.59990671-59990859、BHLHE23_D、COL23A1、KCNK9、OTX1、PLXNC1_A、HNF1B_B、MAST1、ASCL2、MAX.chr20.1784209-1784461、RBFOX_A、MAX.chr12.4273906-4274012、GAS7、MAX.chr5.145725410-145725459、MAX.chr5.77268672-77268725、GYPC_B、DLX6、FBN1、OSR2_A、BEST4、DSCR6、MAX.chr11.68622869-68622968(参见表11、实施例I)。

[0140] 在一些实施方案中,具有选自由以下组成的组的注释的染色体区域构成DNA甲基化标志物:ATP6V1B1、LMX1B_A、BANK1、OTX1、ST8SIA4、MAX.chr11.14926602-14927148、UBTF、PRKCB、TRH_A、MPZ、DNM3_A、TRIM67、PLXNC1_A、MAX.chr12.4273906-4274012、CALN1_A、ITPRIPL1、MAX.chr12.4273906-4274012、GYPC_B、MAX.chr5.42994866-42994936、OSR2_A、SCRT2_B、MAX.chr5.145725410-145725459、MAX.chr11.68622869-68622968、MAX.chr8.124173030-124173395、MAX.chr20.1784209-1784461、LOC100132891、BHLHE23_D、ALOX5、MAX.chr19.46379903-46380197、ODC1、CHST2_A、MAX.chr5.77268672-77268725、C17orf64、EMX1_A、CHST2_B、ITPRIPL1、IGF2BP3_B、CDH4_E、ABLIM1、SLC30A10、C10orf125(参见表16C、实施例II)。

[0141] 在一些实施方案中,具有选自由以下组成的组的注释的染色体区域构成DNA甲基化标志物:ACCN1、AJAP1_A、AJAP1_B、BEST4、CALN1_B、CBLN1_B、CDH4_E、DLX4、FOXP4、IGSF9B_B、ITPRIPL1、KCNA1、KLF16、LMX1B_A、MAST1、MAX.chr11.14926602-14927148、MAX.chr17.73073682-73073814、MAX.chr18.76734362-76734370、MAX.chr18.76734423-76734476、MAX.chr19.30719261-30719354、MAX.chr22.42679578-42679917、MAX.chr4.8860002-8860038、MAX.chr5.145725410-145725459、MAX.chr5.178957564-178957598、MAX.chr5.77268672-77268725、MAX.chr8.124173128-124173268、MPZ、PPARA、PRMT1、RBFOX3_B、RYR2_A、SALL3、SCRT2_A、SPHK2、STX16_B、SYNJ2、TMEM176A、TSHZ3和VIPR2(参见表6、实施例I)。

[0142] 在一些实施方案中,具有选自由以下组成的组的注释的染色体区域构成DNA甲基化标志物:CALN1_A、LOC100132891、MAX.chr15.96889013-96889128、ATP6V1B1、C17orf64、DLX4、ITPRIPL1、MAX.chr11.14926602-14927148、MAX.chr5.42994866-42994936、MAX.chr8.124173030-124173395、MPZ、PRKCB、ITPRIPL1、KLF16、MAX.chr12.4273906-4274012、MAX.chr19.46379903-46380197、BHLHE23_D、HNF1B_B、TRH_A、ASCL2、MAX.chr20.1784209-1784461、MAX.chr12.4273906-4274012、MAX.chr5.145725410-145725459、MAX.chr5.77268672-77268725、BEST4、AJAP1_B和DSCR6(参见表11、实施例I)。

[0143] 在一些实施方案中,具有选自由以下组成的组的注释的染色体区域构成DNA甲基化标志物:ATP6V1B1、LMX1B_A、BANK1、OTX1、MAX.chr11.14926602-14927148、UBTF、PRKCB、TRH_A、MPZ、DNM3_A、TRIM67、PLXNC1_A、MAX.chr12.4273906-4274012、CALN1_A、ITPRIPL1、MAX.chr12.4273906-4274012、GYPC_B、MAX.chr5.42994866-42994936、OSR2_A、SCRT2_B、MAX.chr5.145725410-145725459、MAX.chr11.68622869-68622968、MAX.chr8.124173030-124173395、MAX.chr20.1784209-1784461、LOC100132891、BHLHE23_C、ALOX5、MAX.chr19.46379903-46380197、CHST2_B、MAX.chr5.77268672-77268725、C17orf64、EMX1_A、DSCR6、ITPRIPL1、IGF2BP3_B、CDH4_E、DLX4、ABLIM1、BHLHE23_D(参见表16D、实施例II)。

[0144] 在一些实施方案中,具有选自由以下组成的组的注释的染色体区域构成DNA甲基

化标志物: C10orf93、C20orf195_A、C20orf195_B、CALN1_B、CBLN1_A、CBLN1_B、CCDC61、CCND2_A、CCND2_B、CCND2_C、EMX1_B、FAM150B、GRASP、HBM、ITPRIPL1、KCNK17_A、KIAA1949、LOC100131176、MAST1、MAX.chr1.8277285-8277316、MAX.chr1.8277479-8277527、MAX.chr11.14926602-14926729、MAX.chr11.14926860-14927148、MAX.chr15.96889013-96889128、MAX.chr18.5629721-5629791、MAX.chr19.30719261-30719354、MAX.chr22.42679767-42679917、MAX.chr5.178957564-178957598、MAX.chr5.77268672-77268725、MAX.chr6.157556793-157556856、MAX.chr8.124173030-124173395、MN1、MPZ、NR2F6、PDXK_A、PDXK_B、PTPRM、RYR2_B、SERPINB9_A、SERPINB9_B、SLC8A3、STX16_B TEPP、TOX、VIPR2、VSTM2B_A、ZNF486、ZNF626和ZNF671(参见表7、实施例I)。

[0145] 在一些实施方案中,具有选自由以下组成的组的注释的染色体区域构成DNA甲基化标志物: BHLHE23_C、CALN1_A、CD1D、HOXA7_A、LOC100132891、MAX.chr1.8277479-8277527、MAX.chr15.96889013-96889128、NACAD、ATP6V1B1、BANK1、C17orf64、DLX4、EMX1_A、FOXP4、GP5、ITPRIPL1、LMX1B_A、MAX.chr11.14926602-14927148、MAX.chr5.42994866-42994936、MAX.chr8.124173030-124173395、MPZ、PRKCB、STX16_B UBTF、LOC100132891、ITPRIPL1、ABLIM1、MAX.chr19.46379903-46380197、ZSCAN12、BHLHE23_D、CXCL12、KCNK9、OTX1、RIC3、SCRT2_B、MAX.chr17.73073682-73073814、CDH4_E、HNF1B_B、TRH_A、MAX.chr20.1784209-1784461、MAX.chr5.145725410-145725459、MAX.chr5.77268672-77268725、BEST4和DSCR6(参见表11、实施例I)。

[0146] 在一些实施方案中,具有选自由以下组成的组的注释的染色体区域构成DNA甲基化标志物: ANXR2、B3GNT5、BHLHE23_C、BMP4、CHRNA7、EPHA4、FAM171A1、FAM20A、FMNL2、FSCN1、GSTP1、HBM、IGFBP5、IL17REL、ITGA9、ITPRIPL1、KIRREL2、LRRC34、MAX.chr1.239549742-239549886、MAX.chr1.8277479-8277527、MAX.chr11.14926602-14926729、MAX.chr11.14926860-14927148、MAX.chr15.96889013-96889128、MAX.chr2.238864674-238864735、MAX.chr5.81148300-81148332、MAX.chr7.151145632-151145743、MAX.chr8.124173030-124173395、MAX.chr8.143533298-143533558、MERTK、MPZ、NID2_C、NTRK3、OLIG3_A、OLIG3_B、OSR2_C、PROM1、RGS17、SBN02、STX16_B TBKBP1、TLX1NB、VIPR2、VN1R2、VSNL1和ZFP64(参见表8、实施例I)。

[0147] 在一些实施方案中,具有选自由以下组成的组的注释的染色体区域构成DNA甲基化标志物: MAX.chr15.96889013-96889128、ATP6V1B1、C17orf64、ITPRIPL1、MAX.chr11.14926602-14927148、MAX.chr5.42994866-42994936、LOC100132891、ITPRIPL1、ABLIM1、MAX.chr19.46379903-46380197、COL23A1、LAYN、OTX1、TRH_A、MAX.chr5.145725410-145725459、MAX.chr11.68622869-68622968(参见表11、实施例I)。

[0148] 在一些实施方案中,具有选自由以下组成的组的注释的染色体区域构成DNA甲基化标志物: CDH4_E、FLJ42875、GAD2、GRASP、ITPRIPL1、KCNA1、MAX.chr12.4273906-4274012、MAX.chr18.76734362-76734370、MAX.chr18.76734423-76734476、MAX.chr19.30719261-30719354、MAX.chr4.8859602-8859669、MAX.chr4.8860002-8860038、MAX.chr5.145725410-145725459、MAX.chr5.178957564-178957598、MAX.chr5.77268672-77268725、MPZ、NKX2-6、PRKCB、RBF0X3_B、SALL3和VSTM2B_A(参见表9、实施例I)。

[0149] 在一些实施方案中,具有选自由以下组成的组的注释的染色体区域构成DNA甲基

化标志物: SCRT2_B、MPZ、MAX.chr8.124173030-124173395、ITPRIPL1、ITPRIPL1、DLX4、CALN1_A和IGF2BP3_B(参见表15、实施例I)。

[0150] 在一些实施方案中,具有选自由以下组成的组的注释的染色体区域构成DNA甲基化标志物: DSCR6、SCRT2_B、MPZ、MAX.chr8.124173030-124173395、OSR2_A、MAX.chr11.68622869-68622968、ITPRIPL1、MAX.chr5.145725410-145725459、BHLHE23_C和ITPRIPL1(参见表17、实施例II)。

[0151] 在一些实施方案中,所述方法包括确定两种DNA甲基化标志物的甲基化状态。在一些实施方案中,所述方法包括确定表2和/或表18的横行中提供的一对DNA甲基化标志物的甲基化状态。

[0152] 在某些实施方案中,技术提供用于表征从人类患者获得的样品(例如乳腺组织样品;血浆样品;全血样品;血清样品;粪便样品)的方法。在一些实施方案中,所述方法包括确定样品中的包含DMR中的碱基的DNA甲基化标志物的甲基化状态,所述DMR选自由来自表2和表18的DMR 1-375组成的组;将来自患者样品的所述DNA甲基化标志物的所述甲基化状态与来自正常对照样品的所述DNA甲基化标志物的甲基化状态进行比较,所述正常对照样品来自不患有乳腺癌和/或特定形式的乳腺癌(例如三阴性乳腺癌、HER2⁺乳腺癌、管腔A型乳腺癌、管腔B型乳腺癌、BRCA1乳腺癌、BRCA2乳腺癌)的人类受试者;以及确定人类患者和所述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,置信区间是90%、95%、97.5%、98%、99%、99.5%、99.9%或99.99%,并且p值是0.1、0.05、0.025、0.02、0.01、0.005、0.001或0.0001。

[0153] 在某些实施方案中,技术提供用于表征从人类受试者获得的样品(例如乳腺组织样品;血浆样品;全血样品;血清样品;粪便样品)的方法,所述方法包括使包含DMR的核酸与能够以甲基化特异性方式修饰DNA的试剂(例如甲基化敏感性限制酶、甲基化依赖性限制酶和亚硫酸氢盐试剂)反应以产生以甲基化特异性方式修饰的核酸;对以甲基化特异性方式修饰的所述核酸测序以提供以甲基化特异性方式修饰的所述核酸的核苷酸序列;将以甲基化特异性方式修饰的所述核酸的所述核苷酸序列与来自不患有乳腺癌的受试者的包含所述DMR的核酸的核苷酸序列进行比较以鉴定两个序列的差异。

[0154] 在某些实施方案中,技术提供用于表征从人类受试者获得的样品(例如乳腺组织样品;血浆样品;粪便样品)的系统,所述系统包括被配置来确定样品的甲基化状态的分析组件、被配置来将所述样品的所述甲基化状态与记录在数据库中的对照样品或参考样品甲基化状态进行比较的软件组件、以及被配置来基于甲基化状态的组合确定单值,并且向使用者发出乳腺癌相关甲基化状态的警报的警报组件。在一些实施方案中,样品包含含有DMR的核酸。

[0155] 在一些实施方案中,所述系统还包括用于分离核酸的组件。在一些实施方案中,所述系统还包括用于收集样品的组件。

[0156] 在一些实施方案中,样品是粪便样品、组织样品、乳腺组织样品、血液样品(例如血浆样品、全血样品、血清样品)或尿样品。

[0157] 在一些实施方案中,数据库包含含有DMR的核酸序列。在一些实施方案中,数据库包含来自不患有乳腺癌的受试者的核酸序列。

[0158] 基于本文含有的教导,额外实施方案将为相关领域技术人员显而易见。

[0159] 定义

[0160] 为有助于理解本技术,以下定义许多术语和短语。额外定义遍及具体实施方式加以阐述。

[0161] 除非上下文另外明确规定,否则遍及说明书和权利要求,以下术语采用本文明确关联的含义。如本文所用的短语“在一个实施方案中”未必是指同一实施方案,但这可能是指同一实施方案。此外,如本文所用的短语“在另一实施方案中”未必是指不同实施方案,但这可能是指不同实施方案。因此,如下所述,在不脱离本发明的范围或精神下,可易于组合本发明的各种实施方案。

[0162] 此外,除非上下文另外明确规定,否则如本文所用,术语“或”是包括性“或”运算符,并且等同于术语“和/或”。除非上下文另外明确规定,否则术语“基于”不具有排他性,并且允许基于未描述的额外因素。此外,遍及说明书,“一个(种)(a/an)”和“这个(种)(the)”的含义包括复数个(种)指示物。“在……中”的含义包括“在……中”和“在……上”。

[0163] 如在本申请中的权利要求中所用的过渡短语“基本上由……组成”将权利要求的范围限于指定材料或步骤以及不实质上影响所要求保护的发明的一种或多种基本和新型特征的那些材料或步骤,如In re Herz, 537 F.2d 549, 551-52, 190USPQ 461, 463 (CCPA 1976)中所讨论。举例来说,“基本上由所叙述要素组成的”组合物可在某一水平下含有未叙述污染物,所述水平使得尽管存在,但污染物不使所叙述组合物的功能相较于纯净组合物即“由所叙述组分组成的”组合物而改变。

[0164] 如本文所用,“核酸”或“核酸分子”通常是指可为未修饰或经修饰DNA或RNA的任何核糖核酸或脱氧核糖核酸。“核酸”包括不限于单链和双链核酸。如本文所用,术语“核酸”还包括含有一个或多个经修饰碱基的如上所述的DNA。因此,具有为达成稳定性或出于其他原因而修饰的骨架的DNA是“核酸”。术语“核酸”,如它在本文中所示,包括所述经化学、酶促或代谢修饰形式的核酸,以及为病毒和细胞所特有的化学形式的DNA,所述细胞包括例如简单和复杂细胞。

[0165] 术语“寡核苷酸”或“多核苷酸”或“核苷酸”或“核酸”是指具有两个或更多个脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸,优选地具有超过三个脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸,并且通常具有超过十个脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸的分子。确切大小将取决于许多因素,所述因素转而取决于寡核苷酸的最终功能或用途。寡核苷酸可以任何方式产生,包括化学合成、DNA复制、逆转录或它们的组合。DNA的典型脱氧核糖核苷酸是胸腺嘧啶、腺嘌呤、胞嘧啶和鸟嘌呤。RNA的典型核糖核苷酸是尿嘧啶、腺嘌呤、胞嘧啶和鸟嘌呤。

[0166] 如本文所用,术语核酸的“位置”或“区域”是指核酸的子区域,例如染色体上的基因、单一核苷酸、CpG岛等。

[0167] 术语“互补”和“互补性”是指核苷酸(例如1个核苷酸)或多核苷酸(例如核苷酸序列)通过碱基配对规则而相关。举例来说,序列5'-A-G-T-3'互补于序列3'-T-C-A-5'。互补性可为“部分的”,其中根据碱基配对规则,仅一些核酸碱基是匹配的。或者,在核酸之间可存在“完全”或“全体”互补性。在核酸链之间的互补性程度影响核酸链之间的杂交效率和强度。这在取决于核酸之间的结合的扩增反应和检测方法中具有特别重要性。

[0168] 术语“基因”是指包含为产生RNA或多肽或它的前体所必需的编码序列的核酸(例如DNA或RNA)序列。功能性多肽可由全长编码序列或由编码序列的任何部分编码,只要多肽

的所需活性或功能性质(例如酶活性、配体结合、信号转导等)得以保留即可。术语“部分”在关于基因使用时是指那个基因的片段。片段的大小可在少许核苷酸至整个基因序列减去一个核苷酸的范围内。因此,“包含基因的至少一部分的核苷酸”可包含所述基因的片段或整个基因。

[0169] 术语“基因”还涵盖结构基因的编码区,并且包括在5'末端与3'末端两者上邻近于编码区定位的序列,例如在任一末端上持续约1kb的距离,以致基因对应于全长mRNA(例如包含编码序列、调控序列、结构序列和其他序列)的长度。位于编码区的5',并且存在于mRNA上的序列被称为5'不翻译或非翻译序列。位于编码区的3'或下游,并且存在于mRNA上的序列被称为3'不翻译或3'非翻译序列。术语“基因”涵盖基因的cDNA形式与基因组形式两者。在一些生物体(例如真核生物)中,基因的基因组形式或克隆含有被非编码序列中断的编码区,所述非编码序列被称为“内含子”或“间插区”或“间插序列”。内含子是基因的被转录成核RNA(hnRNA)的区段;内含子可含有调控元件诸如增强子。内含子被从核转录物或初级转录物移除或“剪除”;因此,内含子不存在于信使RNA(mRNA)转录物中。mRNA在翻译期间起对初生多肽中的氨基酸序列或顺序进行指定的作用。

[0170] 除含有内含子之外,基因的基因组形式还可包括位于存在于RNA转录物上的序列的5'末端与3'末端两者上的序列。这些序列被称为“侧接”序列或区域(这些侧接序列位于存在于mRNA转录物上的非翻译序列的5'或3')。5'侧接区域可含有控制或影响基因转录的调控序列,诸如启动子和增强子。3'侧接区域可含有指导转录终止、转录后裂解和多腺苷酸化的序列。

[0171] 术语“野生型”在关于基因采用时是指基因具有从天然存在的来源分离的基因的特征。术语“野生型”在关于基因产物采用时是指基因产物具有从天然存在的来源分离的基因产物的特征。如应用于对象的术语“天然存在”是指对象可见于自然界中的事实。举例来说,可从自然界中的来源分离,并且尚未在实验室中以人工方式进行故意修饰的存在于生物体(包括病毒)中的多肽或多核苷酸序列是天然存在的。野生型基因常常是最频繁地在群体中观察到,因此被任意地指定为基因的“正常”或“野生型”形式的那个基因或等位基因。相比之下,术语“经修饰”或“突变”在关于基因或基因产物采用时分别是指当相较于野生型基因或基因产物时,在序列和/或功能性质方面显示改变(例如改变的特征)的基因或基因产物。应注意可分离天然存在的突变体;这些突变体根据它们在相较于野生型基因或基因产物时具有改变的特征的事实来鉴定。

[0172] 术语“等位基因”是指基因的变化形式;变化形式包括但不限于变体和突变体、多态性基因座和单核苷酸多态性基因座、框移和剪接突变。等位基因可天然地存在于群体中,或它可能在群体的任何特定个体的生存时间期间出现。

[0173] 因此,术语“变体”和“突变体”在关于核苷酸序列使用时是指与另一核酸序列,通常是相关核苷酸序列相差一个或多个核苷酸的核酸序列。“变异”是两个不同核苷酸序列之间的差异;通常,一个序列是参考序列。

[0174] “扩增”是核酸复制的涉及模板特异性的特殊情况。这与非特异性模板复制(例如依赖于模板,但不依赖于特定模板的复制)截然不同。在此处,模板特异性与复制保真度(例如合成适当的多核苷酸序列)和核苷酸(核糖核苷酸或脱氧核糖核苷酸)特异性不同。模板特异性经常以“靶标”特异性描述。靶标序列是在设法将它们从其他核酸分选出来的意义上

的“靶标”。扩增技术已主要被设计来达成这个分选。

[0175] 术语“扩增(amplifying/amplification)”在核酸的情形下是指通常从少量多核苷酸(例如单一多核苷酸分子)起始来产生所述多核苷酸或所述多核苷酸的一部分的多个拷贝,其中扩增产物或扩增子通常是可检测的。多核苷酸的扩增涵盖多种化学和酶促过程。在聚合酶链式反应(PCR)或连接酶链式反应(LCR;参见例如美国专利号5,494,810;以引用的方式整体并入本文)期间从靶标或模板DNA分子的一个或少许拷贝产生多个DNA拷贝是扩增的形式。额外类型的扩增包括但不限于等位基因特异性PCR(参见例如美国专利号5,639,611;以引用的方式整体并入本文)、组装PCR(参见例如美国专利号5,965,408;以引用的方式整体并入本文)、解旋酶依赖性扩增(参见例如美国专利号7,662,594;以引用的方式整体并入本文)、热启动PCR(参见例如美国专利号5,773,258和5,338,671;各自以引用的方式整体并入本文)、序列间特异性PCR、反向PCR(参见例如Triglia等(1988) *Nucleic Acids Res.*, 16:8186;以引用的方式整体并入本文)、连接介导的PCR(参见例如Guilfoyle, R.等, *Nucleic Acids Research*, 25:1854-1858(1997);美国专利号5,508,169;所述文献和专利中的每一者以引用的方式整体并入本文)、甲基化特异性PCR(参见例如Herman等, (1996) *PNAS* 93(13) 9821-9826;以引用的方式整体并入本文)、小型引物PCR、多路连接依赖性探针扩增(参见例如Schouten等, (2002) *Nucleic Acids Research* 30(12):e57;以引用的方式整体并入本文)、多路PCR(参见例如Chamberlain等, (1988) *Nucleic Acids Research* 16(23) 11141-11156;Ballabio等, (1990) *Human Genetics* 84(6) 571-573;Hayden等, (2008) *BMC Genetics* 9:80;所述文献中的每一者以引用的方式整体并入本文)、巢式PCR、重叠-延伸PCR(参见例如Higuchi等, (1988) *Nucleic Acids Research* 16(15) 7351-7367;以引用的方式整体并入本文)、实时PCR(参见例如Higuchi等, (1992) *Biotechnology* 10:413-417;Higuchi等, (1993) *Biotechnology* 11:1026-1030;所述文献中的每一者以引用的方式整体并入本文)、逆转录PCR(参见例如Bustin, S.A. (2000) *J. Molecular Endocrinology* 25:169-193;以引用的方式整体并入本文)、固相PCR、热不对称交错PCR以及降落PCR(参见例如Don等, *Nucleic Acids Research* (1991) 19(14) 4008;Roux, K. (1994) *Biotechniques* 16(5) 812-814;Hecker等, (1996) *Biotechniques* 20(3) 478-485;所述文献中的每一者以引用的方式整体并入本文)。多核苷酸扩增还可使用数字PCR实现(参见例如Kalinina等, *Nucleic Acids Research*. 25;1999-2004, (1997);Vogelstein和Kinzler, *Proc Natl Acad Sci USA*. 96;9236-41, (1999);国际专利公布号W005023091A2;美国专利申请公布号20070202525;所述文献和专利中的每一者以引用的方式整体并入本文)。

[0176] 术语“聚合酶链式反应”(“PCR”)是指K.B.Mullis美国专利号4,683,195、4,683,202和4,965,188的方法,所述美国专利描述一种用于在不进行克隆或纯化的情况下使基因组DNA或RNA或其他DNA或RNA的混合物中的靶标序列的区段的浓度增加的方法。用于扩增靶标序列的这个过程由以下组成:将大大过量的两种寡核苷酸引物引入含有所需靶标序列的DNA混合物中,随后在DNA聚合酶存在下进行精确顺序的热循环。两种引物互补于它们的于双链靶标序列中的相应链。为实现扩增,使混合物变性,并且接着使引物退火于它们的在靶标分子内的互补序列。在退火之后,用聚合酶使引物延伸以便形成一对新互补链。变性、引物退火和聚合酶延伸的步骤可被重复许多次(即变性、退火和延伸构成一个“循环”;可存在众多“循环”)以获得所需靶标序列的高浓度的扩增区段。所需靶标序列的扩增区段的长度

由引物相对于彼此的相对位置决定,因此,这个长度是可控制参数。由于所述过程的重复方面,方法被称为“聚合酶链式反应”(“PCR”)。因为靶标序列的所需扩增区段变为混合物中的主要序列(就浓度而言),所以它们被称为“经PCR扩增”,并且是“PCR产物”或“扩增子”。本领域技术人员将了解,术语“PCR”涵盖最初描述的方法的使用例如实时PCR、巢式PCR、逆转录PCR(RT-PCR)、单引物和随机引物PCR等的许多变化形式。

[0177] 在大多数扩增技术中,模板特异性通过选择酶来实现。扩增酶是在它们被使用的条件下将仅处理异质核酸混合物中的特定核酸序列的酶。举例来说,在Q-β复制酶的情况下,MDV-1RNA是所述复制酶的特定模板(Kacian等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,69:3038[1972])。其他核酸将不由这个扩增酶复制。类似地,在T7 RNA聚合酶的情况下,这个扩增酶对它的自身启动子具有严格特异性(Chamberlin等,Nature,228:227[1970])。在T4 DNA连接酶的情况下,酶将不使其中在寡核苷酸或多核苷酸底物与模板之间在连接接合部处存在不匹配的两个寡核苷酸或多核苷酸连接(Wu和Wallace(1989)Genomics 4:560)。最后,热稳定模板依赖性DNA聚合酶(例如Taq和Pfu DNA聚合酶),由于它们能够在高温下起作用,被发现对由引物界定,并且因此由引物限定的序列显示高特异性;高温导致有利于引物与靶标序列杂交而非与非靶标序列杂交的热力学条件(H.A.Erlich(编),PCR Technology, Stockton Press[1989])。

[0178] 如本文所用,术语“核酸检测测定”是指测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、结构特异性裂解测定(例如INVADER测定(Hologic, Inc.),并且例如描述于美国专利号5,846,717、5,985,557、5,994,069、6,001,567、6,090,543和6,872,816;Lyamichev等,Nat.Biotech.,17:292(1999),Hall等,PNAS,USA,97:8272(2000)以及美国专利号9,096,893中,所述专利和文献中的每一者出于所有目的以引用的方式整体并入本文);酶不匹配裂解方法(例如Variagenics,美国专利号6,110,684、5,958,692、5,851,770,以引用的方式整体并入本文);以上所述的聚合酶链式反应(PCR);分支杂交方法(例如Chiron,美国专利号5,849,481、5,710,264、5,124,246和5,624,802,以引用的方式整体并入本文);滚环复制(例如美国专利号6,210,884、6,183,960和6,235,502,以引用的方式整体并入本文);NASBA(例如美国专利号5,409,818,以引用的方式整体并入本文);分子信标技术(例如美国专利号6,150,097,以引用的方式整体并入本文);E-传感器技术(Motorola,美国专利号6,248,229、6,221,583、6,013,170和6,063,573,以引用的方式整体并入本文);循环探针技术(例如美国专利号5,403,711、5,011,769和5,660,988,以引用的方式整体并入本文);Dade Behring信号扩增方法(例如美国专利号6,121,001、6,110,677、5,914,230、5,882,867和5,792,614,以引用的方式整体并入本文);连接酶链式反应(例如Baranay Proc.Natl.Acad.Sci USA 88,189-93(1991));以及夹心式杂交方法(例如美国专利号5,288,609,以引用的方式整体并入本文)。

[0179] 术语“可扩增核酸”是指可通过任何扩增方法扩增的核酸。预期“可扩增核酸”将通常包括“样品模板”。

[0180] 术语“样品模板”是指来源于关于“靶标”(以下定义)的存在性加以分析的样品的核酸。相比之下,“背景模板”关于除样品模板以外的可或可不存在于样品中的核酸加以使用。背景模板最经常是无意的。它可为携带的结果,或它可归因于存在设法从样品纯化去除的核酸污染物。举例来说,来自生物体的除待检测的那些核酸以外的核酸可作为背景存在

于测试样品中。

[0181] 术语“引物”是指以例如由限制消化所致的核酸片段形式天然存在或以合成方式产生的寡核苷酸,所述寡核苷酸在放置在互补于核酸模板链的引物延伸产物的合成被诱导所处的条件下(例如在核苷酸和诱导剂诸如DNA聚合酶存在下,以及在适合温度和pH下)时能够充当合成的起始点。为在扩增中达成最大效率,引物优选地是单链,但可替代地是双链。如果是双链,那么在用于制备延伸产物之前首先处理引物以使它的链分开。优选地,引物是寡脱氧核糖核苷酸。引物必须足够长以引发在诱导剂存在下合成延伸产物。引物的确切长度将取决于许多因素,包括温度、引物来源以及方法的使用。

[0182] 术语“探针”是指如在经纯化限制消化物的情况下天然存在或以合成方式、重组方式或通过PCR扩增产生的寡核苷酸(例如核苷酸序列),所述寡核苷酸能够杂交于另一目标寡核苷酸。探针可为单链或双链。探针可用于检测、鉴定和分离特定基因序列(例如“捕集探针”)。预期在一些实施方案中,用于本发明中的任何探针可用任何“报告体分子”标记以致可在任何检测系统中检测,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。不意图本发明限于任何特定检测系统或标记。

[0183] 如本文所用的术语“靶标”是指例如通过探针结合、扩增、分离、捕集等来设法从其他核酸分选出来的核酸。举例来说,在关于聚合酶链式反应使用时,“靶标”是指由用于聚合酶链式反应的引物界定的核酸区域,而当用于其中不扩增靶标DNA的测定中时,例如在侵袭性裂解测定的一些实施方案中,靶标包含探针和侵袭性寡核苷酸(例如INVADER寡核苷酸)结合以形成侵袭性裂解结构,以使可检测靶标核酸的存在性所处的位点。“区段”定义为靶标序列内的核酸区域。

[0184] 如本文所用,“甲基化”是指在胞嘧啶的位置C5或N4处的胞嘧啶甲基化、腺嘌呤的N6位置甲基化、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,因为典型体外DNA扩增方法不保留扩增模板的甲基化样式。然而,“未甲基化DNA”或“甲基化DNA”还可分别指代原始模板是未甲基化的或甲基化的所扩增DNA。

[0185] 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部分,其中所述甲基部分不存在于公认的典型核苷酸碱基中。举例来说,胞嘧啶在它的嘧啶环上不含甲基部分,但5-甲基胞嘧啶在它的嘧啶环的5位含有甲基部分。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。在另一实例中,胸腺嘧啶在它的嘧啶环的5位含有甲基部分;然而,出于本文目的,当存在于DNA中时,胸腺嘧啶不被视为甲基化核苷酸,因为胸腺嘧啶是DNA的典型核苷酸碱基。

[0186] 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。

[0187] 如本文所用,核酸分子的“甲基化状态”、“甲基化概况”和“甲基化状况”是指在所述核酸分子中存在或不存在一个或多个甲基化核苷酸碱基。举例来说,含有甲基化胞嘧啶的核酸分子被视为是甲基化的(例如核酸分子的甲基化状态是甲基化)。不含任何甲基化核苷酸的核酸分子被视为是未甲基化的。

[0188] 特定核酸序列(例如如本文所述的基因标志物或DNA区域)的甲基化状态可指示所述序列中的每个碱基的甲基化状态,或可指示所述序列内的碱基子集(例如一个或多个胞嘧啶的子集)的甲基化状态,或可指示关于所述序列内的区域性甲基化密度的信息,同时提供或不提供所述序列内存在甲基化的位置的精确信息。

[0189] 核酸分子中的核苷酸位置的甲基化状态是指在所述核酸分子的特定位置处存在或不存在甲基化核苷酸。举例来说,当存在于核酸分子中的第7核苷酸处的核苷酸是5-甲基胞嘧啶时,所述核酸分子中在第7核苷酸处的胞嘧啶的甲基化状态是甲基化。类似地,当存在于核酸分子中的第7核苷酸处的核苷酸是胞嘧啶(而非5-甲基胞嘧啶)时,所述核酸分子中在第7核苷酸处的胞嘧啶的甲基化状态是未甲基化。

[0190] 甲基化状况可任选地由“甲基化值”(例如代表甲基化频率、分数、比率、百分比等)代表或指示。甲基化值可例如通过对在用甲基化依赖性限制酶限制消化之后存在的完整核酸的量进行定量,或通过比较在亚硫酸氢盐反应之后的扩增概况,或通过比较经亚硫酸氢盐处理核酸和未处理核酸的序列来产生。因此,例如甲基化值的值代表甲基化状况,并且可因此用作某一位置的多个拷贝之间的定量甲基化状况指标。这在可合乎需要的是将样品中的序列的甲基化状况与阈值或参考值进行比较时是特别有用的。

[0191] 如本文所用,“甲基化频率”或“甲基化百分比(%)”是指分子或位置被甲基化所处的情况的数目相对于所述分子或位置未甲基化的情况的数目。

[0192] 因此,甲基化状态描述核酸(例如基因组序列)的甲基化状态。此外,甲基化状态是指在特定基因组基因座处的核酸区段的与甲基化相关的特征。所述特征包括但不限于这个DNA序列内的胞嘧啶(C)残基中的任一者是否被甲基化,一个或多个甲基化C残基的位置,遍及核酸的任何特定区域的甲基化C的频率或百分比,以及归因于例如等位基因的来源的不同的等位基因甲基化差异。术语“甲基化状态”、“甲基化概况”和“甲基化状况”还指生物样品中,遍及核酸的任何特定区域的甲基化C或未甲基化C的相对浓度、绝对浓度或样式。举例来说,如果核酸序列内的一个或多个胞嘧啶(C)残基是甲基化的,那么它可被称为“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)残基不是甲基化的,那么它可被称为“低甲基化的”或具有“降低的甲基化”。同样,如果相较于另一核酸序列(例如来自不同区域或来自不同个体等),核酸序列内的一个或多个胞嘧啶(C)残基是甲基化的,那么那个序列被视为相较于另一核酸序列是高甲基化的或具有增加的甲基化。或者,如果相较于另一核酸序列(例如来自不同区域或来自不同个体等),DNA序列内的一个或多个胞嘧啶(C)残基不是甲基化的,那么那个序列被视为相较于另一核酸序列是低甲基化的或具有降低的甲基化。另外,如本文所用的术语“甲基化样式”是指历经核酸的某一区域,甲基化核苷酸和未甲基化核苷酸的集合位点。当遍及区域,甲基化核苷酸和未甲基化核苷酸的数目是相同的或类似的,但甲基化核苷酸和未甲基化核苷酸的位置是不同的时,两种核酸可具有相同或类似甲基化频率或甲基化百分比,但具有不同甲基化样式。当序列在甲基化的程度(例如一个序列相对于另一序列具有增加或降低的甲基化)、频率或样式方面不同时,它们被称为是“差异性甲基化的”,或具有“甲基化差异”或具有“不同甲基化状态”。术语“差异性甲基化”是指相较于癌症阴性样品中的核酸甲基化的水平或样式,癌症阳性样品中的核酸甲基化的水平或样式具有差异。它还可指在手术之后遭受癌症复发的患者相对于未遭受复发的患者之间,在水平或样式方面具有差异。差异性甲基化以及DNA甲基化的特定水平或样式是预后和预测生物标志,例如一旦已确定正确截断或预测特征。

[0193] 甲基化状态频率可用于描述个体群体或来自单一个体的样品。举例来说,具有50%的甲基化状态频率的核苷酸位置在50%的情况下是甲基化的,并且在50%的情况下是未甲基化的。这种频率可例如用于描述个体群体或核酸集合中核苷酸位置或核酸区域被甲

甲基化所处的程度。因此,当核酸分子的第一群体或池中的甲基化不同于核酸分子的第二群体或池中的甲基化时,所述第一群体或池的甲基化状态频率将不同于所述第二群体或池的甲基化状态频率。这种频率还可例如用于描述单一个体中核苷酸位置或核酸区域被甲基化所处的程度。举例来说,这种频率可用于描述来自组织样品的一组细胞在核苷酸位置或核酸区域处被甲基化或未被甲基化所处的程度。

[0194] 如本文所用,“核苷酸位置”是指核酸分子中的核苷酸的位置。甲基化核苷酸的核苷酸位置是指核酸分子中的甲基化核苷酸的位置。

[0195] 通常,人类DNA的甲基化存在于包括邻近鸟嘌呤和胞嘧啶的二核苷酸序列上,其中胞嘧啶位于鸟嘌呤的5' (也被称为CpG二核苷酸序列)。在人类基因组中,CpG二核苷酸内的大多数胞嘧啶是甲基化的,然而,在被称为CpG岛的富含CpG二核苷酸的特定基因组区域中,一些胞嘧啶保持未甲基化(参见例如Antequera等(1990) *Cell* 62:503-514)。

[0196] 如本文所用,“CpG岛”是指基因组DNA的富含G:C的区域,所述区域相对于总基因组DNA含有增加数目的CpG二核苷酸。CpG岛在长度方面可为至少100、200个或更多个碱基对,其中区域的G:C含量是至少50%,并且观察到的CpG频率相比于预期频率的比率是0.6;在一些情况下,CpG岛在长度方面可为至少500个碱基对,其中区域的G:C含量是至少55%,并且观察到的CpG频率相比于预期频率的比率是0.65。观察到的CpG频率相比于预期频率可根据Gardiner-Garden等(1987) *J. Mol. Biol.* 196:261-281中提供的方法计算。举例来说,观察到的CpG频率相比于预期频率可根据式 $R = (A \times B) / (C \times D)$ 计算,其中R是观察到的CpG频率相比于预期频率的比率,A是所分析序列中的CpG二核苷酸的数目,B是所分析序列中的核苷酸的总数,C是所分析序列中的C核苷酸的总数,并且D是所分析序列中的G核苷酸的总数。通常确定例如在启动子区域处的CpG岛中的甲基化状态。然而,应了解人类基因组中的其他序列倾向于达成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)。

[0197] 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而变化对核酸分子的核苷酸进行修饰的试剂,或甲基化特异性试剂是指可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试剂。用这种试剂处理核酸分子的方法可包括使所述核酸分子与所述试剂接触,需要时与额外步骤联用,以实现核苷酸序列的所需变化。所述方法可以未甲基化核苷酸(例如每个未甲基化胞嘧啶)被修饰成不同核苷酸所采用的方式加以应用。举例来说,在一些实施方案中,这种试剂可使未甲基化胞嘧啶核苷酸脱氨基以产生脱氧尿嘧啶残基。所述试剂的实例包括但不限于甲基化敏感性限制酶、甲基化依赖性限制酶和亚硫酸氢盐试剂。

[0198] 由甲基化特异性试剂达成的核酸核苷酸序列变化还可产生其中每个甲基化核苷酸被修饰成不同核苷酸的核酸分子。

[0199] 术语“甲基化测定”是指用于确定核酸的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。

[0200] 术语“MS AP-PCR”(甲基化敏感性随机引物聚合酶链式反应)是指本领域公知的允许使用富含CG的引物对基因组进行总体扫描以聚焦最可能含有CpG二核苷酸的区域,并且

由Gonzalgo等(1997)Cancer Research 57:594-599描述的技术。

[0201] 术语“MethyLight™”是指本领域公知的由Eads等(1999)Cancer Res.59:2302-2306描述的基于荧光的实时PCR技术。

[0202] 术语“HeavyMethyl™”是指其中涵盖在扩增引物之间或由扩增引物涵盖的CpG位置的甲基化特异性阻断探针(在本文中也称为阻断剂)使得能够达成核酸样品的甲基化特异性选择性扩增的测定。

[0203] 术语“HeavyMethyl™ MethyLight™”测定是指作为MethyLight™测定的变化形式的HeavyMethyl™ MethyLight™测定,其中MethyLight™测定与涵盖在扩增引物之间的CpG位置的甲基化特异性阻断探针组合。

[0204] 术语“Ms-SNuPE”(甲基化敏感性单核苷酸引物延伸)是指本领域公知的由Gonzalgo和Jones(1997)Nucleic Acids Res.25:2529-2531描述的测定。

[0205] 术语“MSP”(甲基化特异性PCR)是指本领域公知的由Herman等(1996)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 93:9821-9826以及由美国专利号5,786,146描述的甲基化测定。

[0206] 术语“COBRA”(组合亚硫酸氢盐限制分析)是指本领域公知的由Xiong和Laird(1997)Nucleic Acids Res.25:2532-2534描述的甲基化测定。

[0207] 术语“MCA”(甲基化CpG岛扩增)是指由Toyota等(1999)Cancer Res.59:2307-12以及在WO 00/26401A1中描述的甲基化测定。

[0208] 如本文所用,“所选核苷酸”是指核酸分子中四种通常存在的核苷酸(对于DNA是C、G、T和A,并且对于RNA是C、G、U和A)中的一种核苷酸,并且可包括通常存在的核苷酸的甲基化衍生物(例如当C是所选核苷酸时,甲基化C与未甲基化C两者均包括在所选核苷酸的含义内),而甲基化所选核苷酸特别地指代甲基化的通常存在的核苷酸,并且未甲基化所选核苷酸特别地指代未甲基化的通常存在的核苷酸。

[0209] 术语“甲基化特异性限制酶”是指依赖于它的识别位点的甲基化状态对核酸进行选择消化的限制酶。在如果识别位点未被甲基化或被半甲基化,那么进行特异性切割的限制酶(甲基化敏感性酶)的情况下,如果在一个或两个链上的识别位点被甲基化,那么切割将不发生(或将以显著降低的效率发生)。在仅当识别位点被甲基化时才进行特异性切割的限制酶(甲基化依赖性酶)的情况下,如果识别位点未被甲基化,那么切割将不发生(或将以显著降低的效率发生)。优选的是识别序列含有CG二核苷酸(例如诸如CGCG或CCCGGG的识别序列)的甲基化特异性限制酶。对于一些实施方案,更优选的是如果这个二核苷酸中的胞嘧啶在碳原子C5处被甲基化,那么不进行切割的限制酶。

[0210] 如本文所用,“不同核苷酸”是指在化学上不同于所选核苷酸的核苷酸,通常以致所述不同核苷酸具有不同于所述所选核苷酸的沃森-克里克(Watson-Crick)碱基配对性质,借此,通常存在的互补于所述所选核苷酸的核苷酸不与通常存在的互补于所述不同核苷酸的核苷酸相同。举例来说,当C是所选核苷酸时,U或T可为不同核苷酸,此由C与G的互补性以及U或T与A的互补性例示。如本文所用,互补于所选核苷酸或互补于不同核苷酸的核苷酸是指在高度严格性条件下,相比于互补性核苷酸与四种通常存在的核苷酸中的三者的碱基配对,以更高亲和力与所选核苷酸或不同核苷酸进行碱基配对的核苷酸。互补性的一实例是DNA(例如A-T和C-G)和RNA(例如A-U和C-G)中的沃森-克里克碱基配对。因此,举例来说,在高度严格性条件下,相比于G与G、A或T进行碱基配对,G以更高亲和力与C进行碱基配

对,因此,当C是所选核苷酸时,G是互补于所选核苷酸的核苷酸。

[0211] 如本文所用,给定标志物(或一起使用的标志物的集合)的“灵敏性”是指报告DNA甲基化值高于区分赘生性样品与非赘生性样品的阈值的样品的百分比。在一些实施方案中,阳性定义为报告DNA甲基化值高于阈值(例如与疾病相关的范围)的经组织学确认的赘瘤形成,并且假阴性定义为报告DNA甲基化值低于阈值(例如与无疾病相关的范围)的经组织学确认的赘瘤形成。因此,灵敏性值反映从已知患病样品获得的给定标志物的DNA甲基化测量结果将在疾病相关的测量结果的范围内的概率。如此处所定义,计算灵敏性值的临床相关性代表对给定标志物在应用于患有临床疾患的受试者时将检测出那种疾患的存在性的概率的估计。

[0212] 如本文所用,给定标志物(或一起使用的标志物的集合)的“特异性”是指报告DNA甲基化值低于区分赘生性样品与非赘生性样品的阈值的非赘生性样品的百分比。在一些实施方案中,阴性定义为报告DNA甲基化值低于阈值(例如与无疾病相关的范围)的经组织学确认的非赘生性样品,并且假阳性定义为报告DNA甲基化值高于阈值(例如与疾病相关的范围)的经组织学确认的非赘生性样品。因此,特异性值反映从已知非赘生性样品获得的给定标志物的DNA甲基化测量结果将在非疾病相关的测量结果的范围内的概率。如此处所定义,计算特异性值的临床相关性代表对给定标志物在应用于不患有临床疾患的患者时将检测出那种疾患的不存在性的概率的估计。

[0213] 如本文所用的术语“AUC”是“曲线下面积”的缩写。特别地,它是指接收器操作特征(ROC)曲线下面积。ROC曲线是诊断测试的不同的可能分割点的真阳性率相对于假阳性率的图。它显示灵敏性与特异性之间的取决于所选分割点的权衡(灵敏性的任何增加都将伴有特异性的降低)。ROC曲线下面积(AUC)是诊断测试的准确性的量度(面积越大越好;最优值是1;随机测试将具有位于对角线上的具有0.5的面积)的ROC曲线;参考:J.P.Egan.(1975) Signal Detection Theory and ROC Analysis,Academic Press,New York)。

[0214] 如本文所用的术语“赘瘤”是指组织的任何新的和异常的生长物。因此,赘瘤可为恶变前赘瘤或恶性赘瘤。

[0215] 如本文所用的术语“赘瘤特异性标志物”是指可用于指示赘瘤的存在性的任何生物材料或要素。生物材料的实例包括不限于核酸、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,标志物是特定核酸区域(例如基因、基因内区域、特定基因座等)。作为标志物的核酸区域可被称为例如“标志基因”、“标志区域”、“标志序列”、“标志基因座”等。

[0216] 如本文所用,术语“腺瘤”是指腺性来源的良性肿瘤。尽管这些生长物是良性的,但随着时间的推移,它们可能进展以变为恶性的。

[0217] 术语“癌前”或“赘生前”以及它们的等同术语是指正经受恶性转化的任何细胞增生性病征。

[0218] 赘瘤、腺瘤、癌症等的“部位”是受试者的身体中的其中赘瘤、腺瘤、癌症等所位于的组织、器官、细胞类型、解剖区域、身体部分等。

[0219] 如本文所用,“诊断”测试应用包括检测或鉴定受试者的疾病状态或状况,确定受试者将染上给定疾病或疾患的可能性,确定患有疾病或疾患的受试者将对疗法起响应的可能性,确定患有疾病或疾患的受试者的预后(或疾病或疾患的可能进展或消退),以及确定

治疗对患有疾病或疾患的受试者的作用。举例来说,诊断可用于检测受试者染上赘瘤的存在性或可能性,或这种受试者将有利地对化合物(例如药品,例如药物)或其他治疗起响应的可能性。

[0220] 术语“经分离”在如在“经分离寡核苷酸”的情况下关于核酸使用时是指核酸序列被从它通常在它的天然来源中与其相伴的至少一种污染核酸鉴定并分离。经分离核酸以与它在自然界中得见所采用的形式或设置不同的形式或设置存在。相比之下,非经分离核酸诸如DNA和RNA以它们在自然界中存在的状态得见。非经分离核酸的实例包括:见于宿主细胞染色体上的邻近于相邻基因的给定DNA序列(例如基因);RNA序列,诸如以与编码许多蛋白质的众多其他mRNA的混合物形式见于细胞中的编码特定蛋白质的特定mRNA序列。然而,编码特定蛋白质的经分离核酸包括例如通常表达所述蛋白质的细胞中的所述核酸,其中所述核酸在与天然细胞的染色体位置不同的染色体位置中,或另外由不同于在自然界中所见的核酸序列的核酸序列侧接。经分离核酸或寡核苷酸可以单链或双链形式存在。当经分离核酸或寡核苷酸将用于表达蛋白质时,寡核苷酸将含有至少有义链或编码链(即寡核苷酸可为单链),但可含有有义链与反义链两者(即寡核苷酸可为双链)。经分离核酸在从它的天然或典型环境分离之后可与其他核酸或分子组合。举例来说,经分离核酸可存在于它已被放置于其中例如以达成异源性表达的宿主细胞中。

[0221] 术语“经纯化”是指作为核酸或氨基酸序列的分子被从它们的天然环境移除,分离或分开。因此,“经分离核酸序列”可为经纯化核酸序列。“大致上经纯化”分子至少60%不含,优选地,至少75%不含,并且更优选地,至少90%不含它们天然地与其相伴的其他组分。如本文所用,术语“被纯化”或“以纯化”还指从样品移除污染物。污染性蛋白质的移除导致样品中的目标多肽或核酸的百分比增加。在另一实例中,重组多肽在植物、细菌、酵母或哺乳动物宿主细胞中表达,并且多肽通过移除宿主细胞蛋白质纯化;重组多肽在样品中的百分比由此增加。

[0222] 术语“包含给定多核苷酸序列或多肽的组合物”广泛指代含有所述给定多核苷酸序列或多肽的任何组合物。组合物可包含含有盐(例如NaCl)、清洁剂(例如SDS)和其他组分(例如登哈特氏溶液(Denhardt's solution)、奶粉、鲑鱼精DNA等)的水溶液。

[0223] 术语“样品”以它的最广泛意义使用。在一种意义上,它可指动物细胞或组织。在另一意义上,它是指从任何来源获得的试样或培养物,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,并且涵盖流体、固体、组织和气体。环境样品包括环境材料诸如表面物质、土壤、水和工业样品。这些实例不应解释为限制可适用于本发明的样品类型。

[0224] 如本文所用,如在一些情形下所用的“远程样品”涉及间接地从不是样品的细胞、组织或器官来源的部位收集的样品。举例来说,当在粪便样品(例如不来自直接地从乳腺获取的样品)中评估来源于胰腺的样品材料时,样品是远程样品。

[0225] 如本文所用,术语“患者”或“受试者”是指待经受由技术提供的各种测试的生物体。术语“受试者”包括动物,优选地包括哺乳动物,包括人类。在一优选实施方案中,受试者是灵长类动物。在一甚至更优选实施方案中,受试者是人类。此外,关于诊断方法,优选受试者是脊椎动物受试者。一优选脊椎动物是温血的;一优选温血脊椎动物是哺乳动物。一优选哺乳动物最优选地是人类。如本文所用,术语“受试者”包括人类受试者与动物受试者两者。因此,本文提供了兽医学治疗用途。因此,本技术提供对诸如人类的哺乳动物以及由于濒危

而具有重要性的那些哺乳动物诸如西伯利亚虎；具有经济重要性的动物诸如在农场被饲养以供人类食用的动物；和/或对人类具有社会重要性的动物诸如作为宠物或在动物园中饲养的动物的诊断。所述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、肉猪和野猪；反刍动物和/或有蹄动物，诸如牛、公牛、绵羊、长颈鹿、鹿、山羊、野牛和骆驼；鳍足动物；以及马。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驯化猪、反刍动物、有蹄动物、马（包括赛马）等。当前公开的主题还包括一种用于诊断受试者的肺癌的系统。所述系统可例如以商业试剂盒形式提供，所述商业试剂盒可用于筛查已从其收集生物样品的受试者中的肺癌风险或诊断所述受试者的肺癌。根据本技术提供的一示例性系统包括评估本文所述的标志物的甲基化状态。

[0226] 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。在反应测定的情形下，所述递送系统包括允许从一个位置向另一位置进行反应试剂（例如于适当容器中的寡核苷酸、酶等）和/或支持材料（例如缓冲剂、关于进行测定的书面说明等）的储存、运输或递送的系统。举例来说，试剂盒包括一个或多个含有相关反应试剂和/或支持材料的壳套（例如盒子）。如本文所用，术语“分段试剂盒”是指包括两个或更多个各自含有总体试剂盒组分的子部分的单独容器的递送系统。容器可一起或分开向预定接受者递送。举例来说，第一容器可含有用于测定中的酶，而第二容器含有寡核苷酸。术语“分段试剂盒”意图涵盖含有根据联邦食品、药品和化妆品法案（Federal Food, Drug, and Cosmetic Act）的章节520（e）加以管制的分析物特异性试剂（ASR）的试剂盒，但不限于此。实际上，包括两个或更多个各自含有总体试剂盒组分的子部分的单独容器的任何递送系统都被包括在术语“分段试剂盒”中。相比之下，“组合试剂盒”是指在单一容器中（例如在容纳所需组分中的每一者的单一盒子中）含有反应测定的所有组分的递送系统。术语“试剂盒”包括分段试剂盒与组合试剂盒两者。

[0227] 如本文所用，术语“乳腺癌”通常是指乳腺组织的不受控制的生长物，并且更特别地，是指特征在于在受试者的一个或两个乳腺中异常细胞反常快速增殖的疾患。异常细胞经常被称为恶性或“赘生性细胞”，其是可形成实体肿瘤的经转化细胞。术语“肿瘤”是指由过度或异常细胞分裂产生的异常细胞团块或群体（即两个或更多个细胞），无论是恶性的还是良性的，并且是指癌前细胞和癌性细胞。恶性肿瘤与良性生长物或肿瘤不同，因为除不受控制的细胞增殖之外，它们还可侵袭周围组织，并且可转移。

[0228] 如本文所用，术语“HER2⁺乳腺癌”是指其中癌细胞中的至少一部分表达升高水平的促进细胞快速生长的HER2蛋白（HER2（来自人表皮生长因子受体2）或HER2/neu）的乳腺癌。

[0229] 如本文所用，术语“管腔A型乳腺癌”是指其中癌细胞中的至少一部分是雌激素受体（ER）阳性和孕酮受体（PR）阳性，但呈HER2阴性的乳腺癌。

[0230] 如本文所用，术语“管腔B型乳腺癌”是指其中癌细胞中的至少一部分是ER阳性、HER2阳性，并且呈PR阴性的乳腺癌。

[0231] 如本文所用，术语“三阴性乳腺癌”是指其中癌细胞中的至少一部分呈ER、HER2和PR阴性的乳腺癌。

[0232] 如本文所用，术语“HER2⁺乳腺癌”是指其中癌细胞中的至少一部分呈ER和PR阴性，但呈HER2阳性的乳腺癌。

[0233] 如本文所用,术语“BRCA1乳腺癌”是指其中癌细胞中的至少一部分的特征在于在BRCA1基因中具有突变和/或野生型BRCA1表达降低的乳腺癌。

[0234] 如本文所用,术语“BRCA2乳腺癌”是指其中癌细胞中的至少一部分的特征在于在BRCA2基因中具有突变和/或野生型BRCA2表达降低的乳腺癌。

[0235] 如本文所用,术语“乳腺导管原位癌”(DCIS)是指其中异常细胞见于乳腺乳导管的内衬中的非侵袭性癌症。“低等级”DCIS是指处于核等级1或具有低有丝分裂率的DCIS。“高等级”DCIS是指处于核等级3或具有高有丝分裂率的DCIS。“侵袭性”DCIS是指已扩散至非乳腺导管组织的乳腺导管癌。

[0236] 如本文所用,术语“信息”是指事实或数据的任何集合。关于使用一个或多个包括但不限于因特网的计算机系统存储或处理的信息,所述术语是指以任何格式(例如模拟、数字、光学等)存储的任何数据。如本文所用,术语“与受试者相关的信息”是指涉及受试者(例如人类、植物或动物)的事实或数据。术语“基因组信息”是指涉及基因组的信息,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、与基因型相关联的表型等。“等位基因频率信息”是指涉及等位基因频率的事实或数据,包括但不限于等位基因属性、等位基因的存在性与受试者(例如人类受试者)的特征之间的统计关联、等位基因在个体或群体中的存在性或不存在性、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。

具体实施方式

[0237] 在对各种实施方案的这个详细描述中,出于解释的目的,阐述众多特定细节以提供对所公开实施方案的彻底理解。然而,本领域技术人员将了解,这些各种实施方案可在有或无这些特定细节下实施。在其他情况下,结构和装置以框图形式显示。此外,本领域技术人员可易于了解呈现和进行方法所采用的特定顺序是说明性的,并且预期顺序可变化,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。

[0238] 本文提供了用于乳腺癌筛查,并且特别地但不排他地涉及用于检测乳腺癌和/或特定形式的乳腺癌(例如三阴性乳腺癌、HER2⁺乳腺癌、管腔A型乳腺癌、管腔B型乳腺癌、BRCA1乳腺癌、BRCA2乳腺癌)的存在性的方法、组合物和相关用途的技术。当技术在本文中加以描述时,所用章节标题仅出于组织目的,并且不应解释为以任何方式限制主题。

[0239] 实际上,如实施例I、II和III中所述,在用于鉴定本发明的实施方案的过程期间进行的实验鉴定了用于辨别乳腺癌源性DNA与非赘生性对照DNA的一组375个新型差异性甲基化区域(DMR)。从这375种新型DNA甲基化标志物,进一步实验鉴定了能够区分不同类型的乳腺癌与正常乳腺组织的标志物。举例来说,鉴定了能够区分1)三阴性乳腺癌组织与正常乳腺组织,2)HER2⁺乳腺癌组织与正常乳腺组织,3)管腔A型乳腺癌组织与正常乳腺组织,4)管腔B型乳腺癌组织与正常乳腺组织,5)BRCA1乳腺癌组织与正常乳腺组织,6)BRCA2乳腺癌组织与正常乳腺组织,以及7)侵袭性乳腺癌组织与正常乳腺组织的单独DMR集合。此外,鉴定了能够区分高等级乳腺导管原位癌(DCIS-HG)乳腺癌组织与低等级乳腺导管原位癌(DCIS-LG)乳腺组织的DMR。此外,鉴定了能够区分来自患有乳腺癌的受试者的血浆与来自不患有乳腺癌的受试者的血浆的DMR。

[0240] 尽管本文公开内容涉及某些说明的实施方案,但应了解这些实施方案通过举例的

方式而非通过限制的方式来呈现。

[0241] 在特定方面,本技术提供用于对癌症诸如乳腺癌进行鉴定、确定和/或分类的组合物和方法。方法包括确定从受试者分离的生物样品(例如粪便样品、乳腺组织样品、血浆样品)中的至少一种甲基化标志物的甲基化状况,其中标志物的甲基化状态的变化指示乳腺癌的存在性、类别或部位。特定实施方案涉及用于诊断(例如筛查)乳腺癌和各种类型的乳腺癌(例如三阴性乳腺癌、HER2⁺乳腺癌、管腔A型乳腺癌、管腔B型乳腺癌、BRCA1乳腺癌、BRCA2乳腺癌)的包含差异性甲基化区域(DMR,例如DMR 1-375,参见表2和表18)的标志物。

[0242] 除其中分析对包含本文提供以及表2和表18中所列的DMR(例如DMR,例如DMR 1-375)的至少一种标志物、标志物的区域、或标志物的碱基的甲基化分析的实施方案之外,技术还提供具有用于检测癌症特别是乳腺癌的效用的包含含有DMR的至少一种标志物、标志物的区域、或标志物的碱基的标志物组。

[0243] 技术的一些实施方案基于对包含DMR的至少一种标志物、标志物的区域、或标志物的碱基的CpG甲基化状况的分析。

[0244] 在一些实施方案中,本技术提供以甲基化特异性方式修饰DNA的试剂(例如甲基化敏感性限制酶、甲基化依赖性限制酶和亚硫酸氢盐试剂)与一种或多种甲基化测定组合以确定至少一种包含DMR(例如DMR 1-375,参见表2和表18)的标志物内的CpG二核苷酸序列的甲基化状况的用途。基因组CpG二核苷酸可为甲基化的或未甲基化的(或者分别被称为甲基化上调和甲基化下调)。然而,本发明方法适于在远程样品(例如血液、器官流出物或粪便)的背景内分析具有异质性质的生物样品,例如低浓度的肿瘤细胞,或来自所述生物样品的生物材料。因此,当分析这种样品内的CpG位置的甲基化状况时,可使用用于确定在特定CpG位置处的甲基化水平(例如百分比、分数、比率、比例或程度)的定量测定。

[0245] 根据本技术,对包含DMR的标志物中的CpG二核苷酸序列的甲基化状况的确定在癌症诸如乳腺癌的诊断与表征两个方面均具有效用。

[0246] 标志物的组合

[0247] 在一些实施方案中,技术涉及评估包含来自表2和表18的DMR(例如DMR编号1-375)的标志物的组合的甲基化状态。在一些实施方案中,评估超过一种标志物的甲基化状态使得用于鉴定受试者的赘瘤(例如乳腺癌)的筛查或诊断的特异性和/或灵敏性增加。

[0248] 各种癌症通过标志物的各种组合预测,所述各种组合例如如通过与预测的特异性和灵敏性相关的统计技术所鉴定。技术提供用于鉴定针对一些癌症的预测组合和经验证预测组合的方法。

[0249] 用于测定甲基化状态的方法

[0250] 在某些实施方案中,用于分析核酸中5-甲基胞嘧啶的存在性的方法涉及用以甲基化特异性方式修饰DNA的试剂处理DNA。所述试剂的实例包括但不限于甲基化敏感性限制酶、甲基化依赖性限制酶和亚硫酸氢盐试剂。

[0251] 常常使用的用于分析核酸中5-甲基胞嘧啶的存在性的方法基于由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(1992) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 89:1827-31,出于所有目的以引用的方式整体明确并入本文)或其变化形式。对5-甲基胞嘧啶进行定位的亚硫酸氢盐方法基于胞嘧啶而非5-甲基胞嘧啶与酸式亚硫酸根离子(也被称为亚硫酸氢根)反应的观察结果。反应通常根据以下步骤进行:

首先,胞嘧啶与酸式亚硫酸盐反应以形成磺化胞嘧啶。接着,磺化反应中间体的自发性脱氨产生磺化尿嘧啶。最后,磺化尿嘧啶在碱性条件下脱磺酸基以形成尿嘧啶。检测是可能的,因为尿嘧啶与腺嘌呤进行碱基配对(由此表现得像胸腺嘧啶),而5-甲基胞嘧啶与鸟嘌呤进行碱基配对(由此表现得像胞嘧啶)。这使得有可能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),如例如在美国专利号5,786,146中公开的甲基化特异性PCR (MSP),或使用包括序列特异性探针裂解的测定例如QuARTS瓣状核酸内切酶测定(参见例如Zou等(2010)“Sensitive quantification of methylated markers with a novel methylation specific technology” *Clin Chem* 56:A199;以及在美国专利号8,361,720;8,715,937;8,916,344;和9,212,392中)来辨别甲基化胞嘧啶与非甲基化胞嘧啶。

[0252] 一些常规技术与包括将待分析的DNA封闭在琼脂糖基质中,由此防止DNA的扩散和复性(亚硫酸氢盐仅与单链DNA反应),以及用快速透析替代沉淀和纯化步骤的方法相关(Olek A等(1996)“A modified and improved method for bisulfite based cytosine methylation analysis” *Nucleic Acids Res.* 24:5064-6)。因此,有可能分析单个细胞的甲基化状况,从而说明方法的效用和灵敏性。对用于检测5-甲基胞嘧啶的常规方法的概述由Rein, T.等(1998) *Nucleic Acids Res.* 26:2255提供。

[0253] 亚硫酸氢盐技术通常涉及在亚硫酸氢盐处理之后扩增已知核酸的短的特定片段,接着通过测序(Olek和Walter (1997) *Nat. Genet.* 17:275-6)或引物延伸反应(Gonzalco和Jones (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:2529-31; WO 95/00669; 美国专利号6,251,594)测定产物以分析单个胞嘧啶位置。一些方法使用酶促消化(Xiong和Laird (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:2532-4)。本领域中还已描述通过杂交进行的检测(Olek等, WO 99/28498)。另外,已描述亚硫酸氢盐技术关于单个基因进行甲基化检测的用途(Grigg和Clark (1994) *Bioessays* 16:431-6; Zeschning等(1997) *Hum Mol Genet.* 6:387-95; Feil等(1994) *Nucleic Acids Res.* 22:695; Martin等(1995) *Gene* 157:261-4; WO 9746705; WO 9515373)。

[0254] 各种甲基化测定程序可与根据本技术的亚硫酸氢盐处理联合使用。这些测定允许确定核酸序列内的一个或多个CpG二核苷酸(例如CpG岛)的甲基化状态。除其他技术之外,所述测定还涉及对经亚硫酸氢盐处理核酸的测序、PCR(用于序列特异性扩增)、Southern印迹分析、以及使用甲基化特异性限制酶例如甲基化敏感性或甲基化依赖性酶。

[0255] 举例来说,通过使用亚硫酸氢盐处理,用于分析甲基化样式和5-甲基胞嘧啶分布的基因组测序已得以简化(Frommer等(1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:1827-1831)。另外,用限制酶消化从经亚硫酸氢盐转化DNA扩增的PCR产物可用于评估甲基化状态,例如如由Sadri和Hornsby (1997) *Nucl. Acids Res.* 24:5058-5059描述,或如在被称为COBRA(组合亚硫酸氢盐限制分析)(Xiong和Laird (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:2532-2534)的方法中所体现。

[0256] COBRA™分析是一种可用于确定少量基因组DNA中在特定基因座处的DNA甲基化水平的定量甲基化测定(Xiong和Laird, *Nucleic Acids Res.* 25:2532-2534, 1997)。简而言之,限制酶消化用于揭示经亚硫酸氢钠处理DNA的PCR产物中的甲基化依赖性序列差异。根据由Frommer等人(*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:1827-1831, 1992)描述的程序,甲基化依赖性序列差异首先通过标准亚硫酸氢盐处理引入基因组DNA中。接着使用对目标CpG岛具有

特异性的引物对经亚硫酸氢盐转化DNA进行PCR扩增,随后进行限制核酸内切酶消化、凝胶电泳,以及使用特异性经标记杂交探针进行检测。原始DNA样品中的甲基化水平由经消化PCR产物和未消化PCR产物的相对量表示,所述相对量跨越广泛范围的DNA甲基化水平呈线性定量式样。此外,这个技术可以可靠地应用于从显微解剖的石蜡包埋组织样品获得的DNA。

[0257] 用于COBRA™分析的典型试剂(例如如可见于典型的基于COBRA™的试剂盒中)可包括但不限于:针对特定基因座(例如特定基因、标志物、DMR、基因的区域、标志物的区域、经亚硫酸氢盐处理DNA序列、CpG岛等)的PCR引物;限制酶和适当缓冲剂;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记试剂盒;以及经标记核苷酸。另外,亚硫酸氢盐转化试剂可包括:DNA变性缓冲剂;磺化缓冲剂;DNA回收试剂或试剂盒(例如沉淀、超滤、亲和管柱);脱磺酸基缓冲剂;以及DNA回收组分。

[0258] 诸如“MethyLight™”(一种基于荧光的实时PCR技术)(Eads等,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,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 93:9821-9826,1996;美国专利号5,786,146)以及甲基化CpG岛扩增(“MCA”;Toyota等,Cancer Res.59:2307-12,1999)的测定单独或与这些方法中的一者或多者组合使用。

[0259] “HeavyMethyl™”测定技术是一种用于基于对经亚硫酸氢盐处理DNA的甲基化特异性扩增来评估甲基化差异的定量方法。涵盖在扩增引物之间或由扩增引物涵盖的CpG位置的甲基化特异性阻断探针(“阻断剂”)使得能够达成核酸样品的甲基化特异性选择性扩增。

[0260] 术语“HeavyMethyl™ MethyLight™”测定是指作为MethyLight™测定的变化形式的HeavyMethyl™ MethyLight™测定,其中MethyLight™测定与涵盖在扩增引物之间的CpG位置的甲基化特异性阻断探针组合。HeavyMethyl™测定还可与甲基化特异性扩增引物组合使用。

[0261] 用于HeavyMethyl™分析的典型试剂(例如如可见于典型的基于MethyLight™的试剂盒中)可包括但不限于:针对特定基因座(例如特定基因、标志物、基因的区域、标志物的区域、经亚硫酸氢盐处理DNA序列、CpG岛、或经亚硫酸氢盐处理DNA序列或CpG岛等)的PCR引物;阻断寡核苷酸;优化PCR缓冲剂和脱氧核苷酸;以及Taq聚合酶。

[0262] MSP(甲基化特异性PCR)允许不依赖于使用甲基化敏感性限制酶来评估CpG岛内的实际上任何CpG位点群组的甲基化状况(Herman等Proc.Natl.Acad.Sci.USA 93:9821-9826,1996;美国专利号5,786,146)。简要说,DNA通过使未甲基化胞嘧啶而非甲基化胞嘧啶转化成尿嘧啶的亚硫酸氢钠加以修饰,并且随后用相对于未甲基化DNA,对甲基化DNA具有特异性的引物扩增产物。MSP仅需要少量DNA,对给定CpG岛基因座的0.1%甲基化等位基因灵敏,并且可对从石蜡包埋样品提取的DNA进行。用于MSP分析的典型试剂(例如如可见于典型的基于MSP的试剂盒中)可包括但不限于:针对特定基因座(例如特定基因、标志物、基因的区域、标志物的区域、经亚硫酸氢盐处理DNA序列、CpG岛等)的甲基化和未甲基化PCR引物;优化PCR缓冲剂和脱氧核苷酸、以及特异性探针。

[0263] MethyLight™测定是一种利用基于荧光的实时PCR(例如TaqMan®),在PCR步骤之后不需要进一步操作的高通量定量甲基化测定(Eads等,Cancer Res.59:2302-2306,

1999)。简要来说,MethyLight™方法以根据标准程序(亚硫酸氢盐方法使未甲基化胞嘧啶残基转化成尿嘧啶)在亚硫酸氢钠反应中转化以获得甲基化依赖性序列差异的混合池的基因组DNA的混合样品开始。接着在“偏倚”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。序列辨别发生在扩增过程的水平上以及在荧光检测过程的水平上。

[0264] MethyLight™测定用作对核酸例如基因组DNA样品中的甲基化样式的定量测试,其中序列辨别发生在探针杂交的水平上。在一定量形式中,PCR反应提供在与特定推定甲基化位点重叠的荧光探针存在下进行的甲基化特异性扩增。关于输入DNA的量的无偏对照由其中引物和探针均不叠加于任何CpG二核苷酸的反应提供。或者,对基因组甲基化的定性测试通过用不涵盖已知甲基化位点的对照寡核苷酸(例如HeavyMethyl™和MSP技术的基于荧光的形式)或用涵盖潜在甲基化位点的寡核苷酸探测偏倚PCR池来实现。

[0265] MethyLight™方法与任何适合探针(例如“TaqMan®”探针、Lightcycler®探针等)一起使用。举例来说,在一些应用中,将双链基因组DNA用亚硫酸氢钠处理,并且经受两组PCR反应中的一组,使用TaqMan®探针,例如与MSP引物一起,和/或HeavyMethyl阻断寡核苷酸和TaqMan®探针。TaqMan®探针用荧光“报告体”和“淬灭剂”分子加以双重标记,并且被设计来对相对较高GC含量区域具有特异性,以致相比于正向或反向引物,它在PCR循环中在大约高10°C的温度下溶解。这允许TaqMan®探针在PCR退火/延伸步骤期间保持完全杂交。当Taq聚合酶在PCR期间酶促合成新链时,它将最终到达退火的TaqMan®探针。Taq聚合酶5'至3'核酸内切酶活性将接着通过消化TaqMan®探针以释放荧光报告体分子来移置所述TaqMan®探针,所述荧光报告体分子用于使用实时荧光检测系统定量检测它的现时未淬灭信号。

[0266] 用于MethyLight™分析的典型试剂(例如如可见于典型的基于MethyLight™的试剂盒中)可包括但不限于:针对特定基因座(例如特定基因、标志物、基因的区域、标志物的区域、经亚硫酸氢盐处理DNA序列、CpG岛等)的PCR引物;TaqMan®或Lightcycler®探针;优化PCR缓冲剂和脱氧核苷酸;以及Taq聚合酶。

[0267] QM™(定量甲基化)测定是一种对基因组DNA样品中的甲基化样式的替代性定量测试,其中序列辨别发生在探针杂交的水平上。在这个定量形式中,PCR反应提供在与特定推定甲基化位点重叠的荧光探针存在下进行的无偏扩增。关于输入DNA的量的无偏对照由其中引物和探针均不叠加于任何CpG二核苷酸的反应提供。或者,对基因组甲基化的定性测试通过用不涵盖已知甲基化位点的对照寡核苷酸(HeavyMethyl™和MSP技术的基于荧光的形式)或用涵盖潜在甲基化位点的寡核苷酸探测偏倚PCR池来实现。

[0268] QM™方法可与任何适合探针例如“TaqMan®”探针、Lightcycler®探针一起用于扩增过程中。举例来说,将双链基因组DNA用亚硫酸氢钠处理,并且经受无偏引物和TaqMan®探针。TaqMan®探针用荧光“报告体”和“淬灭剂”分子加以双重标记,并且被设计来对相对较高GC含量区域具有特异性,以致相比于正向或反向引物,它在PCR循环中在大约高10°C的温度下溶解。这允许TaqMan®探针在PCR退火/延伸步骤期间保持完全杂交。当Taq聚合酶在PCR期间酶促合成新链时,它将最终到达退火的TaqMan®探针。Taq聚

合酶5'至3'核酸内切酶活性将接着通过消化TaqMan®探针以释放荧光报告体分子来移置所述TaqMan®探针,所述荧光报告体分子用于使用实时荧光检测系统定量检测它的现时未淬灭信号。用于QM™分析的典型试剂(例如如可见于典型的基于QM™的试剂盒中)可包括但不限于:针对特定基因座(例如特定基因、标志物、基因的区域、标志物的区域、经亚硫酸氢盐处理DNA序列、CpG岛等)的PCR引物;TaqMan®或Lightcycler®探针;优化PCR缓冲剂和脱氧核苷酸;以及Taq聚合酶。

[0269] Ms-SNuPE™技术是一种用于基于用亚硫酸氢盐处理DNA,随后进行单核苷酸引物延伸来评估在特定CpG位点处的甲基化差异的定量方法(Gonzalzo和Jones, *Nucleic Acids Res.* 25:2529-2531, 1997)。简而言之,使基因组DNA与亚硫酸氢钠反应以使未甲基化胞嘧啶转化成尿嘧啶,同时保留5-甲基胞嘧啶不变。接着使用对经亚硫酸氢盐转化DNA具有特异性的PCR引物对所需靶标序列进行扩增,并且所得产物被分离并作为模板用于分析在目标CpG位点处的甲基化。可分析少量DNA(例如显微解剖的病变切片),并且它避免利用限制酶来确定在CpG位点处的甲基化状况。

[0270] 用于Ms-SNuPE™分析的典型试剂(例如如可见于典型的基于Ms-SNuPE™的试剂盒中)可包括但不限于:针对特定基因座(例如特定基因、标志物、基因的区域、标志物的区域、经亚硫酸氢盐处理DNA序列、CpG岛等)的PCR引物;优化PCR缓冲剂和脱氧核苷酸;凝胶提取试剂盒;阳性对照引物;针对特定基因座的Ms-SNuPE™引物;反应缓冲剂(用于Ms-SNuPE反应);以及经标记核苷酸。另外,亚硫酸氢盐转化试剂可包括:DNA变性缓冲剂;磺化缓冲剂;DNA回收试剂或试剂盒(例如沉淀、超滤、亲和管柱);脱磺基缓冲剂;以及DNA回收组分。

[0271] 简化代表性亚硫酸氢盐测序(RRBS)以用亚硫酸氢盐处理核酸以使所有未甲基化胞嘧啶转化成尿嘧啶开始,随后进行限制酶消化(例如通过识别包括CG序列的位点的酶诸如MspI),以及在偶联于衔接配体之后对片段进行完全测序。限制酶的选择使CpG密集区域的片段富集,从而降低在分析期间可定位于多个基因位置的冗余序列的数目。因此,通过选择用于测序的限制片段的子集(例如通过使用制备性凝胶电泳进行尺寸选择),RRBS使核酸样品的复杂性降低。与全基因组亚硫酸氢盐测序相对比,通过限制酶消化产生的每个片段都含有至少一个CpG二核苷酸的DNA甲基化信息。因此,RRBS使样品中的启动子、CpG岛和其他基因组特征富集,其中在这些区域中具有高频率的限制酶切割位点,因此,提供一种用以评估一个或多个基因组基因座的甲基化状态的测定。

[0272] 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,填充突出部分和用A加尾,连接衔接子,亚硫酸氢盐转化,以及PCR。参见例如等(2005)“Genome-scale DNA methylation mapping of clinical samples at single-nucleotide resolution”*Nat Methods*7:133-6;Meissner等(2005)“Reduced representation bisulfite sequencing for comparative high-resolution DNA methylation analysis”*Nucleic Acids Res.* 33:5868-77。

[0273] 在一些实施方案中,定量等位基因特异性实时靶标和信号扩增(QuARTS)测定用于评估甲基化状态。在每个QuARTS测定中,依序发生三个反应,包括初级反应中的扩增(反应1)和靶标探针裂解(反应2);以及次级反应中的FRET裂解和荧光信号产生(反应3)。当靶标核酸用特异性引物扩增时,具有瓣状序列的特异性检测探针松散结合扩增子。在靶标结合

位点处存在特定侵袭性寡核苷酸导致5'核酸酶例如FEN-1核酸内切酶通过在检测探针与瓣状序列之间切割来释放瓣状序列。瓣状序列互补于相应FRET盒的非发夹部分。因此,瓣状序列充当FRET盒上的侵袭性寡核苷酸,并且实现在FRET盒荧光团与淬灭剂之间的产生荧光信号的裂解。裂解反应可切割每个靶标多个探针,因此,释放每个瓣状物多个荧光团,从而提供指数信号扩增。通过使用具有不同染料的FRET盒,QuARTS可在单一反应孔中检测多种靶标。参见例如Zou等(2010)“Sensitive quantification of methylated markers with a novel methylation specific technology”Clin Chem 56:A199)以及美国专利号8,361,720;8,715,937;8,916,344;和9,212,392,所述文献和专利中的每一者出于所有目的以引用的方式并入本文。

[0274] 术语“亚硫酸氢盐试剂”是指如本文所公开可用于区分甲基化CpG二核苷酸序列与未甲基化CpG二核苷酸序列的包括亚硫酸氢盐、焦亚硫酸盐、酸式亚硫酸盐或它们的组合的试剂。所述处理的方法在本领域中是已知的(例如PCT/EP2004/011715和WO 2013/116375,所述专利中的每一者以引用的方式整体并入本文)。在一些实施方案中,亚硫酸氢盐处理在变性溶剂诸如但不限于正亚烷基二醇或二乙二醇二甲醚(DME)存在下,或在二噁烷或二噁烷衍生物存在下进行。在一些实施方案中,变性溶剂以在1%与35%(v/v)之间的浓度使用。在一些实施方案中,亚硫酸氢盐反应在清除剂诸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-甲酸或三羟基苯甲酸及其衍生物例如没食子酸存在下进行(参见:PCT/EP2004/011715,其以引用的方式整体并入本文)。在某些优选实施方案中,亚硫酸氢盐反应包括用酸式亚硫酸铵处理,例如如WO 2013/116375中所述。

[0275] 在一些实施方案中,经处理DNA的片段使用本发明的引物寡核苷酸的集合(例如参见表10、表19和表20)和扩增酶来扩增。若干DNA区段的扩增可在同一个反应容器中同时进行。通常,扩增使用聚合酶链式反应(PCR)进行。扩增子在长度方面通常是100至2000个碱基对。

[0276] 在方法的另一实施方案中,在包含DMR(例如DMR 1-375,表2和表18)的标志物内或附近的CpG位置的甲基化状况可通过使用甲基化特异性引物寡核苷酸来检测。这个技术(MSP)已描述于属于Herman的美国专利号6,265,171中。使用甲基化状况特异性引物来扩增经亚硫酸氢盐处理DNA允许在甲基化核酸与未甲基化核酸之间进行分辨。MSP引物对含有至少一个杂交于经亚硫酸氢盐处理CpG二核苷酸的引物。因此,所述引物的序列包含至少一个CpG二核苷酸。对非甲基化DNA具有特异性的MSP引物在CpG中的C位置处含有“T”。

[0277] 借助于扩增获得的片段可携带可直接或间接检测的标记。在一些实施方案中,标记是荧光标记、放射性核素、或具有可在质谱仪中检测的典型质量的可分离分子片段。当所述标记是质量标记时,一些实施方案提供经标记扩增子具有单一正性或负性净电荷,从而允许在质谱仪中达成更好可检测性。检测可借助于例如基质辅助激光解吸/离子化质谱法(MALDI)或使用电子喷雾质谱法(ESI)来进行和显现。

[0278] 适于这些测定技术的用于分离DNA的方法在本领域中是已知的。特别地,一些实施方案包括如以引用的方式整体并入本文的美国专利申请序列号13/470,251(“Isolation of Nucleic Acids”)中所述来分离核酸。

[0279] 在一些实施方案中,本文所述的标志物可用于对粪便样品进行的QUARTS测定中。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,用于产生在小体积(例如

小于100微升,小于60微升)中包含高度纯化的低丰度核酸,并且大致上和/或事实上不含抑制用于测试DNA样品的测定(例如PCR、INVADER、QuARTS测定等)的物质的DNA样品的方法。所述DNA样品可用于定性检测存在于从患者获取的样品中的基因、基因变体(例如等位基因)或基因修饰(例如甲基化)的存在性,或定量测量所述基因、基因变体(例如等位基因)或基因修饰(例如甲基化)的活性、表达或量的诊断测定中。举例来说,一些癌症与特定突变等位基因或特定甲基化状态的存在性相关联,因此,检测和/或定量所述突变等位基因或甲基化状态在癌症的诊断和治疗方面具有预测价值。

[0280] 许多有价值的遗传标志物以极其低量存在于样品中,并且产生所述标志物的事件中的许多是罕见的。因此,即使灵敏性检测方法诸如PCR也需要大量DNA以提供足够的低丰度靶标来满足或替代测定的检测阈值。此外,即使低量的抑制物质的存在也会损害这些测定关于检测所述低量的靶标的准确性和精确度。因此,本文提供了提供为产生所述DNA样品所必要的体积和浓度管理的方法。

[0281] 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,受试者是人类。所述样品可通过本领域中已知的许多手段诸如将为熟练人士显而易见的手段获得。无细胞或大致上无细胞样品可通过使样品经受为本领域技术人员所知的各种技术获得,所述技术包括但不限于离心和过滤。尽管通常优选的是不使用侵袭性技术来获得样品,但仍然可为优选的是获得诸如组织匀浆、组织切片和活检试样的样品。技术在用于制备样品以及提供用于测试的核酸的方法方面不受限制。举例来说,在一些实施方案中,使用例如如美国专利号8,808,990和9,169,511中以及WO 2012/155072中详述的直接基因捕集,或通过相关方法来从粪便样品或从血液或从血浆样品分离DNA。

[0282] 对标志物的分析可单独进行,或与在一个测试样品内的额外标志物同时进行。举例来说,若干标志物可被组合至一个测试中以有效处理多个样品,以及潜在提供更大诊断和/或预后准确性。此外,本领域技术人员将认识到测试来自同一受试者的多个样品(例如在相继时间点)的价值。对连续样品的所述测试可允许鉴定标志物甲基化状态随时间的变化。甲基化状态变化以及不存在甲基化状态变化可提供关于疾病状况的有用信息,包括但不限于鉴定从事件发生开始的大约时间、可挽救组织的存在性和量、药物疗法的适当性、各种疗法的有效性,以及鉴定受试者的结果,包括未来事件的风险。

[0283] 对生物标志物的分析可以多种物理形式进行。举例来说,微量滴定板或自动化的使用可用于促进对大量测试样品的处理。或者,可开发单样品形式以促进例如在流动运输或急救室环境中以及时方式进行即刻处理和诊断。

[0284] 预期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,以及关于使用试剂盒的说明。所述说明描述用于从样品制备分析物,例如用于收集样品以及从所述样品制备核酸的适当方法。试剂盒的单个组分包装在适当容器和包装(例如小瓶、盒子、泡罩包装、安瓿、罐子、瓶、管等)中,并且组分一起包装在适当容器(例如一个或多个盒子)中以达成便利的储存、运送和/或由试剂盒的使用者使用。应了解液体组分(例如缓冲液)可以待由使用者加以复原的冻干形式提供。试剂盒可包括用于评估、验证和/或确保试剂盒的性能的对照或参考。举例来说,用于测定存在于样品中的核酸的量的试剂盒可包括包含已知浓度的同一或另一核酸的对照以进行比较,并且在一些实施方案中,包括对对照核酸具有特异性的检测试剂(例如引物)。试剂盒适于在临床环境中使用,并

且在一些实施方案中,适于在使用者的家中使用。在一些实施方案中,试剂盒的组分提供系统的用于从样品制备核酸溶液的功能性。在一些实施方案中,系统的某些组分由使用者提供。

[0285] 方法

[0286] 在技术的一些实施方案中,提供了包括以下步骤的方法:

[0287] 1) 使从受试者获得的核酸(例如基因组DNA,例如从体液诸如血液或血浆或乳腺组织分离)与区分至少一种包含DMR(例如DMR1-375,例如如表2和表18中所提供)的标志物内的甲基化CpG二核苷酸与非甲基化CpG二核苷酸的至少一种试剂或一系列试剂接触,和

[0288] 2) 检测乳腺癌(例如提供大于或等于80%的灵敏性和大于或等于80%的特异性)。

[0289] 在技术的一些实施方案中,提供了包括以下步骤的方法:

[0290] 1) 使从受试者获得的核酸(例如基因组DNA,例如从体液诸如血液或血浆或乳腺组织分离)与区分至少一种选自具有选自由以下组成的组的注释的染色体区域的标志物内的甲基化CpG二核苷酸与非甲基化CpG二核苷酸的至少一种试剂或一系列试剂接触:

ATP6V1B1、LMX1B_A、BANK1、OTX1、MAX.chr11.14926602-14927148、UBTF、PRKCB、TRH_A、MPZ、DNM3_A、TRIM67、MAX.chr12.4273906-4274012、CALN1_A、ITPRIPL1、MAX.chr12.4273906-4274012、GYPC_B、MAX.chr5.42994866-42994936、OSR2_A、SCRT2_B、MAX.chr5.145725410-145725459、MAX.chr11.68622869-68622968、MAX.chr8.124173030-124173395、MAX.chr20.1784209-1784461、LOC100132891、BHLHE23_D、MAX.chr19.46379903-46380197、CHST2_B、MAX.chr5.77268672-77268725、C17orf64、EMX1_A、DSCR6、ITPRIPL1、IGF2BP3_B、DLX4和ABLIM1,和

[0291] 2) 检测乳腺癌(例如提供大于或等于80%的灵敏性和大于或等于80%的特异性)。

[0292] 在技术的一些实施方案中,提供了包括以下步骤的方法:

[0293] 1) 使从受试者获得的核酸(例如基因组DNA,例如从体液诸如血液或血浆或乳腺组织分离)与区分至少一种选自具有选自由以下组成的组的注释的染色体区域的标志物内的甲基化CpG二核苷酸与非甲基化CpG二核苷酸的至少一种试剂或一系列试剂接触:

ABLIM1_B、AJAP1_C、ALOX5_B、ASCL2_B、BANK1_B、BHLHE23_E、C10orf125_B、C17orf64_B、CALN1_1520、CALN1_B、CD1D_1058、CDH4_7890、CHST2_8128、CHST2_8384、CHST2_9316、CHST2_9470、CLIC6_B、CXCL12_B、DLX4_B、DNM3_D、EMX1_A、ESPN_B、FAM59B_7764、FOXP4_B、GP5、HOXA1_C、IGF2BP3_C、IPTRIP1_1138、IPTRIP1_1200、KCNK9_B、KCNK17_C、KLHDC7B_B、LAYN_B、LIME1_B、LMX1B_D、LOC100132891_B、MAST1_B、MAX.chr12.427.br、MAX.chr17.73073682-73073814、MAX.chr20.4422、MPZ_5742、MPZ_5554、MSX2P1_B、ODC1_B、OSR2_A、OTX1_B、PLXNC1_B、PRKCB_7570、SCRT2_C、SLC30A10、SPHK2_B、ST8SIA4_B、STX16_C、TBX1_B、TRH_A和TRIM67_B,和

[0294] 2) 检测乳腺癌(例如提供大于或等于80%的灵敏性和大于或等于80%的特异性)。

[0295] 在技术的一些实施方案中,提供了包括以下步骤的方法:

[0296] 1) 使从受试者获得的核酸(例如基因组DNA,例如从体液诸如血液或血浆或乳腺组织分离)与区分至少一种选自具有选自由以下组成的组的注释的染色体区域的标志物内的甲基化CpG二核苷酸与非甲基化CpG二核苷酸的至少一种试剂或一系列试剂接触:

CD1D、ITPRIPL1、FAM59B、C10orf125、TRIM67、SPHK2、CALN1_B、CHST2_B、MPZ、CXCL12_B、ODC1_B、

OSR2_A、TRH_A和C17orf64_B,和

[0297] 2) 检测乳腺癌(例如提供大于或等于80%的灵敏性和大于或等于80%的特异性)。

[0298] 在技术的一些实施方案中,提供了包括以下步骤的方法:

[0299] 1) 使从受试者获得的核酸(例如基因组DNA,例如从体液诸如血液或血浆或乳腺组织分离)与区分至少一种选自具有选自由以下组成的组的注释的染色体区域的标志物内的甲基化CpG二核苷酸与非甲基化CpG二核苷酸的至少一种试剂或一系列试剂接触:ABLIM1、AJAP1_B、ASCL2、ATP6V1B1、BANK1、CALN1_A、CALN1_B、CLIC6、DSCR6、FOXP4、GAD2、GCGR、GP5、GRASP、HBM、HNF1B_B、KLF16、MAGI2、MAX.chr11.14926602-14927148、MAX.chr12.4273906-4274012、MAX.chr17.73073682-73073814、MAX.chr18.76734362-76734370、MAX.chr2.97193478-97193562、MAX.chr22.42679578-42679917、MAX.chr4.8859253-8859329、MAX.chr4.8859602-8859669、MAX.chr4.8860002-8860038、MAX.chr5.145725410-145725459、MAX.chr6.157557371-157557657、MPZ、NKX2-6、PDX1、PLXNC1_A、PPARG、PRKCB、PTPRN2、RBF0X_A、SCRT2_A、SLC7A4、STAC2_B、STX16_A、STX16_B、TBX1、TRH_A、VSTM2B_A、ZBTB16、ZNF132和ZSCAN23,和

[0300] 2) 检测三阴性乳腺癌(例如提供大于或等于80%的灵敏性和大于或等于80%的特异性)。

[0301] 在技术的一些实施方案中,提供了包括以下步骤的方法:

[0302] 1) 使从受试者获得的核酸(例如基因组DNA,例如从体液诸如血液或血浆或乳腺组织分离)与区分至少一种选自具有选自由以下组成的组的注释的染色体区域的标志物内的甲基化CpG二核苷酸与非甲基化CpG二核苷酸的至少一种试剂或一系列试剂接触:CALN1_A、LOC100132891、NACAD、TRIM67、ATP6V1B1、DLX4、GP5、ITPRIPL1、MAX.chr11.14926602-14927148、MAX.chr5.42994866-42994936、MAX.chr8.124173030-124173395、MPZ、PRKCB、ST8SIA4、STX16_B、ITPRIPL1、KLF16、MAX.chr12.4273906-4274012、KCNK9、SCRT2_B、CDH4_E、HNF1B_B、TRH_A、MAX.chr20.1784209-1784461、MAX.chr12.4273906-4274012、MAX.chr5.145725410-145725459、MAX.chr5.77268672-77268725和DSCR6,和

[0303] 2) 检测三阴性乳腺癌(例如提供大于或等于80%的灵敏性和大于或等于80%的特异性)。

[0304] 在技术的一些实施方案中,提供了包括以下步骤的方法:

[0305] 1) 使从受试者获得的核酸(例如基因组DNA,例如从体液诸如血液或血浆或乳腺组织分离)与区分至少一种选自具有选自由以下组成的组的注释的染色体区域的标志物内的甲基化CpG二核苷酸与非甲基化CpG二核苷酸的至少一种试剂或一系列试剂接触:ATP6V1B1、MAX.chr11.14926602-14927148、PRKCB、TRH_A、MPZ、GP5、TRIM67、MAX.chr12.4273906-4274012、CALN1_A、MAX.chr12.4273906-4274012、MAX.chr5.42994866-42994936、SCRT2_B、MAX.chr5.145725410-145725459、BHLHE23_D、MAX.chr5.77268672-77268725、EMX1_A、DSCR6和DLX4,和

[0306] 2) 检测三阴性乳腺癌(例如提供大于或等于80%的灵敏性和大于或等于80%的特异性)。

[0307] 在技术的一些实施方案中,提供了包括以下步骤的方法:

[0308] 1) 使从受试者获得的核酸(例如基因组DNA,例如从体液诸如血液或血浆或乳腺组

织分离)与区分至少一种选自具有选自由以下组成的组的注释的染色体区域的标志物内的甲基化CpG二核苷酸与非甲基化CpG二核苷酸的至少一种试剂或一系列试剂接触: ABLIM1、AFAP1L1、AKR1B1、ALOX5、AMN、ARL5C、BANK1、BCAT1、BEGAIN、BEST4、BHLHE23_B、BHLHE23_C、C17orf64、C1QL2、C7orf52、CALN1_B、CAV2、CD8A、CDH4_A、CDH4_B、CDH4_C、CDH4_D、CDH4_E、CDH4_F、CHST2_B、CLIP4、CR1、DLK1、DNAJC6、DNM3_A、EMX1_A、ESPN、FABP5、FAM150A、FLJ42875、GLP1R、GNG4、GYPC_A、HAND2、HES5、HNF1B_A、HNF1B_B、HOXA1_A、HOXA1_B、HOXA7_A、HOXA7_B、HOXA7_C、HOXD9、IGF2BP3_A、IGF2BP3_B、IGSF9B_A、IL15RA、INSM1、ITPKA_B、ITPRIPL1、KCNE3、KCNK17_B、LIME1、LOC100132891、LOC283999、LY6H、MAST1、MAX.chr1.158083198-158083476、MAX.chr1.228074764-228074977、MAX.chr1.46913931-46913950、MAX.chr10.130085265-130085312、MAX.chr11.68622869-68622968、MAX.chr14.101176106-101176260、MAX.chr15.96889069-96889128、MAX.chr17.8230197-8230314、MAX.chr19.46379903-46380197、MAX.chr2.97193163-97193287、MAX.chr2.97193478-97193562、MAX.chr20.1784209-1784461、MAX.chr21.44782441-44782498、MAX.chr22.23908718-23908782、MAX.chr5.145725410-145725459、MAX.chr5.178957564-178957598、MAX.chr5.180101084-180101094、MAX.chr5.42952185-42952280、MAX.chr5.42994866-42994936、MAX.chr6.27064703-27064783、MAX.chr7.152622607-152622638、MAX.chr8.145104132-145104218、MAX.chr9.136474504-136474527、MCF2L2、MSX2P1、NACAD、NID2_B、NID2_C、ODC1、OSR2_B、PAQR6、PCDH8、PIF1、PPARA、PPP2R5C、PRDM13_A、PRHOXNB、PRKCB、RBFOX3_A、RBFOX3_B、RFX8、SNCA、STAC2_A、STAC2_B、STX16_B、SYT5、TIMP2、TMEFF2、TNFRSF10D、TRH_B、TRIM67、TRIM71_C、USP44_A、USP44_B、UTF1、UTS2R、VSTM2B_A、VSTM2B_B、ZFP64和ZNF132,和

[0309] 2) 检测HER2⁺乳腺癌(例如提供大于或等于80%的灵敏性和大于或等于80%的特异性)。

[0310] 在技术的一些实施方案中,提供了包括以下步骤的方法:

[0311] 1) 使从受试者获得的核酸(例如基因组DNA,例如从体液诸如血液或血浆或乳腺组织分离)与区分至少一种选自具有选自由以下组成的组的注释的染色体区域的标志物内的甲基化CpG二核苷酸与非甲基化CpG二核苷酸的至少一种试剂或一系列试剂接触: BHLHE23_C、CALN1_A、CD1D、CHST2_A、FMN2、HOXA1_A、HOXA7_A、KCNH8、LOC100132891、MAX.chr15.96889013-96889128、NACAD、TRIM67、ATP6V1B1、C17orf64、CHST2_B、DLX4、DNM3_A、EMX1_A、IGF2BP3_A、IGF2BP3_B、ITPRIPL1、LMX1B_A、MAX.chr11.14926602-14927148、MAX.chr5.42994866-42994936、MAX.chr8.124173030-124173395、MPZ、ODC1、PLXNC1_A、PRKCB、LOC100132891、ITPRIPL1、ABLIM1、MAX.chr12.4273906-4274012、MAX.chr19.46379903-46380197、ZSCAN12、BHLHE23_D、COL23A1、KCNK9、LAYN、PLXNC1_A、RIC3、SCRT2_B、ALOX5、CDH4_E、HNF1B_B、TRH_A、MAST1、ASCL2、MAX.chr20.1784209-1784461、RBFOX_A、MAX.chr12.4273906-4274012、GAS7、MAX.chr5.145725410-145725459、MAX.chr5.77268672-77268725、GYPC_B、DLX6、FBN1、OSR2_A、BEST4、AJAP1_B、DSCR6和MAX.chr11.68622869-68622968,和

[0312] 2) 检测HER2⁺乳腺癌(例如提供大于或等于80%的灵敏性和大于或等于80%的特异性)。

[0313] 在技术的一些实施方案中,提供了包括以下步骤的方法:

[0314] 1) 使从受试者获得的核酸(例如基因组DNA,例如从体液诸如血液或血浆或乳腺组织分离)与区分至少一种选自具有选自由以下组成的组的注释的染色体区域的标志物内的甲基化CpG二核苷酸与非甲基化CpG二核苷酸的至少一种试剂或一系列试剂接触: ATP6V1B1、LMX1B_A、BANK1、OTX1、MAX.chr11.14926602-14927148、UBTF、PRKCB、TRH_A、MPZ、GP5、DNM3_A、TRIM67、PLXNC1_A、MAX.chr12.4273906-4274012、CALN1_A、ITPRIPL1、MAX.chr12.4273906-4274012、GYPC_B、MAX.chr5.42994866-42994936、OSR2_A、SCRT2_B、MAX.chr5.145725410-145725459、MAX.chr11.68622869-68622968、MAX.chr8.124173030-124173395、MAX.chr20.1784209-1784461、LOC100132891、BHLHE23_C、ALOX5、MAX.chr19.46379903-46380197、ODC1、CHST2_A、MAX.chr5.77268672-77268725、C17orf64、EMX1_A、CHST2_B、DSCR6、ITPRIPL1、IGF2BP3_B、DLX4、ABLIM1、BHLHE23_D、ZSCAN12、GRASP、C10orf125,和

[0315] 2) 检测HER2⁺乳腺癌(例如提供大于或等于80%的灵敏性和大于或等于80%的特异性)。

[0316] 在技术的一些实施方案中,提供了包括以下步骤的方法:

[0317] 1) 使从受试者获得的核酸(例如基因组DNA,例如从体液诸如血液或血浆或乳腺组织分离)与区分至少一种选自具有选自由以下组成的组的注释的染色体区域的标志物内的甲基化CpG二核苷酸与非甲基化CpG二核苷酸的至少一种试剂或一系列试剂接触: ARL5C、BHLHE23_C、BMP6、C10orf125、C17orf64、C19orf66、CAMKV、CD1D、CDH4_E、CDH4_F、CHST2_A、CRHBP、DLX6、DNM3_A、DNM3_B、DNM3_C、ESYT3、ETS1_A、ETS1_B、FAM126A、FAM189A1、FAM20A、FAM59B、FBN1、FLRT2、FMN2、FOXP4、GAS7、GYPC_A、GYPC_B、HAND2、HES5、HMGA2、HNF1B_B、IGF2BP3_A、IGF2BP3_B、KCNH8、KCNK17_A、KCNQ2、KLHDC7B、LOC100132891、MAX.chr1.46913931-46913950、MAX.chr11.68622869-68622968、MAX.chr12.4273906-4274012、MAX.chr12.59990591-59990895、MAX.chr17.73073682-73073814、MAX.chr20.1783841-1784054、MAX.chr21.47063802-47063851、MAX.chr4.8860002-8860038、MAX.chr5.172234248-172234494、MAX.chr5.178957564-178957598、MAX.chr6.130686865-130686985、MAX.chr8.687688-687736、MAX.chr8.688863-688924、MAX.chr9.114010-114207、MPZ、NID2_A、NKX2-6、ODC1、OSR2_A、POU4F1、PRDM13_B、PRKCB、RASGRF2、RIPPLY2、SLC30A10、ST8SIA4、SYN2、TRIM71_A、TRIM71_B、TRIM71_C、UBTF、ULBP1、USP44_B和VSTM2B_A,和

[0318] 2) 检测管腔A型乳腺癌(例如提供大于或等于80%的灵敏性和大于或等于80%的特异性)。

[0319] 在技术的一些实施方案中,提供了包括以下步骤的方法:

[0320] 1) 使从受试者获得的核酸(例如基因组DNA,例如从体液诸如血液或血浆或乳腺组织分离)与区分至少一种选自具有选自由以下组成的组的注释的染色体区域的标志物内的甲基化CpG二核苷酸与非甲基化CpG二核苷酸的至少一种试剂或一系列试剂接触: BHLHE23_C、CD1D、CHST2_A、FAM126A、FMN2、HOXA1_A、HOXA7_A、KCNH8、LOC100132891、MAX.chr15.96889013-96889128、SLC30A10、TRIM67、ATP6V1B1、BANK1、C10orf125、C17orf64、CHST2_B、DNM3_A、EMX1_A、GP5、IGF2BP3_A、IGF2BP3_B、ITPRIPL1、LMX1B_A、

MAX.chr11.14926602-14927148、MAX.chr5.42994866-42994936、MAX.chr8.124173030-124173395、MPZ、ODC1、PLXNC1_A、PRKCB、ST8SIA4、STX16_B UBTF、LOC100132891、ITPRIPL1、MAX.chr12.4273906-4274012、MAX.chr12.59990671-59990859、BHLHE23_D、COL23A1、KCNK9、OTX1、PLXNC1_A、HNF1B_B、MAST1、ASCL2、MAX.chr20.1784209-1784461、RBFOX_A、MAX.chr12.4273906-4274012、GAS7、MAX.chr5.145725410-145725459、MAX.chr5.77268672-77268725、GYPC_B、DLX6、FBN1、OSR2_A、BEST4、DSCR6、MAX.chr11.68622869-68622968,和

[0321] 2) 检测管腔A型乳腺癌 (例如提供大于或等于80%的灵敏性和大于或等于80%的特异性)。

[0322] 在技术的一些实施方案中,提供了包括以下步骤的方法:

[0323] 1) 使从受试者获得的核酸 (例如基因组DNA,例如从体液诸如血液或血浆或乳腺组织分离) 与区分至少一种选自具有选自由以下组成的组的注释的染色体区域的标志物内的甲基化CpG二核苷酸与非甲基化CpG二核苷酸的至少一种试剂或一系列试剂接触: ATP6V1B1、LMX1B_A、BANK1、OTX1、ST8SIA4、MAX.chr11.14926602-14927148、UBTF、PRKCB、TRH_A、MPZ、DNM3_A、TRIM67、PLXNC1_A、MAX.chr12.4273906-4274012、CALN1_A、ITPRIPL1、MAX.chr12.4273906-4274012、GYPC_B、MAX.chr5.42994866-42994936、OSR2_A、SCRT2_B、MAX.chr5.145725410-145725459、MAX.chr11.68622869-68622968、MAX.chr8.124173030-124173395、MAX.chr20.1784209-1784461、LOC100132891、BHLHE23_D、ALOX5、MAX.chr19.46379903-46380197、ODC1、CHST2_A、MAX.chr5.77268672-77268725、C17orf64、EMX1_A、CHST2_B、ITPRIPL1、IGF2BP3_B、CDH4_E、ABLIM1、SLC30A10、C10orf125,和

[0324] 2) 检测管腔A型乳腺癌 (例如提供大于或等于80%的灵敏性和大于或等于80%的特异性)。

[0325] 在技术的一些实施方案中,提供了包括以下步骤的方法:

[0326] 1) 使从受试者获得的核酸 (例如基因组DNA,例如从体液诸如血液或血浆或乳腺组织分离) 与区分至少一种选自具有选自由以下组成的组的注释的染色体区域的标志物内的甲基化CpG二核苷酸与非甲基化CpG二核苷酸的至少一种试剂或一系列试剂接触: ACCN1、AJAP1_A、AJAP1_B、BEST4、CALN1_B、CBLN1_B、CDH4_E、DLX4、FOXP4、IGSF9B_B、ITPRIPL1、KCN1、KLF16、LMX1B_A、MAST1、MAX.chr11.14926602-14927148、MAX.chr17.73073682-73073814、MAX.chr18.76734362-76734370、MAX.chr18.76734423-76734476、MAX.chr19.30719261-30719354、MAX.chr22.42679578-42679917、MAX.chr4.8860002-8860038、MAX.chr5.145725410-145725459、MAX.chr5.178957564-178957598、MAX.chr5.77268672-77268725、MAX.chr8.124173128-124173268、MPZ、PPARA、PRMT1、RBFOX3_B、RYR2_A、SALL3、SCRT2_A、SPHK2、STX16_B SYNJ2、TMEM176A、TSHZ3和VIPR2,和

[0327] 2) 检测管腔B型乳腺癌 (例如提供大于或等于80%的灵敏性和大于或等于80%的特异性)。

[0328] 在技术的一些实施方案中,提供了包括以下步骤的方法:

[0329] 1) 使从受试者获得的核酸 (例如基因组DNA,例如从体液诸如血液或血浆或乳腺组织分离) 与区分至少一种选自具有选自由以下组成的组的注释的染色体区域的标志物内的甲基化CpG二核苷酸与非甲基化CpG二核苷酸的至少一种试剂或一系列试剂接触: CALN1_A、

LOC100132891、MAX.chr15.96889013-96889128、ATP6V1B1、C17orf64、DLX4、ITPRIPL1、MAX.chr11.14926602-14927148、MAX.chr5.42994866-42994936、MAX.chr8.124173030-124173395、MPZ、PRKCB、ITPRIPL1、KLF16、MAX.chr12.4273906-4274012、MAX.chr19.46379903-46380197、BHLHE23_D、HNF1B_B、TRH_A、ASCL2、MAX.chr20.1784209-1784461、MAX.chr12.4273906-4274012、MAX.chr5.145725410-145725459、MAX.chr5.77268672-77268725、BEST4、AJAP1_B和DSCR6,和

[0330] 2) 检测管腔B型乳腺癌(例如提供大于或等于80%的灵敏性和大于或等于80%的特异性)。

[0331] 在技术的一些实施方案中,提供了包括以下步骤的方法:

[0332] 1) 使从受试者获得的核酸(例如基因组DNA,例如从体液诸如血液或血浆或乳腺组织分离)与区分至少一种选自具有选自由以下组成的组的注释的染色体区域的标志物内的甲基化CpG二核苷酸与非甲基化CpG二核苷酸的至少一种试剂或一系列试剂接触: ATP6V1B1、LMX1B_A、BANK1、OTX1、MAX.chr11.14926602-14927148、UBTF、PRKCB、TRH_A、MPZ、DNM3_A、TRIM67、PLXNC1_A、MAX.chr12.4273906-4274012、CALN1_A、ITPRIPL1、MAX.chr12.4273906-4274012、GYPC_B、MAX.chr5.42994866-42994936、OSR2_A、SCRT2_B、MAX.chr5.145725410-145725459、MAX.chr11.68622869-68622968、MAX.chr8.124173030-124173395、MAX.chr20.1784209-1784461、LOC100132891、BHLHE23_C、ALOX5、MAX.chr19.46379903-46380197、CHST2_B、MAX.chr5.77268672-77268725、C17orf64、EMX1_A、DSCR6、ITPRIPL1、IGF2BP3_B、CDH4_E、DLX4、ABLIM1、BHLHE23_D,和

[0333] 2) 检测管腔B型乳腺癌(例如提供大于或等于80%的灵敏性和大于或等于80%的特异性)。

[0334] 在技术的一些实施方案中,提供了包括以下步骤的方法:

[0335] 1) 使从受试者获得的核酸(例如基因组DNA,例如从体液诸如血液或血浆或乳腺组织分离)与区分至少一种选自具有选自由以下组成的组的注释的染色体区域的标志物内的甲基化CpG二核苷酸与非甲基化CpG二核苷酸的至少一种试剂或一系列试剂接触: C10orf93、C20orf195_A、C20orf195_B、CALN1_B、CBLN1_A、CBLN1_B、CCDC61、CCND2_A、CCND2_B、CCND2_C、EMX1_B、FAM150B、GRASP、HBM、ITPRIPL1、KCNK17_A、KIAA1949、LOC100131176、MAST1、MAX.chr1.8277285-8277316、MAX.chr1.8277479-8277527、MAX.chr11.14926602-14926729、MAX.chr11.14926860-14927148、MAX.chr15.96889013-96889128、MAX.chr18.5629721-5629791、MAX.chr19.30719261-30719354、MAX.chr22.42679767-42679917、MAX.chr5.178957564-178957598、MAX.chr5.77268672-77268725、MAX.chr6.157556793-157556856、MAX.chr8.124173030-124173395、MN1、MPZ、NR2F6、PDXK_A、PDXK_B、PTPRM、RYR2_B、SERPINB9_A、SERPINB9_B、SLC8A3、STX16_B、TEPP、TOX、VIPR2、VSTM2B_A、ZNF486、ZNF626和ZNF671,和

[0336] 2) 检测BRCA1乳腺癌(例如提供大于或等于80%的灵敏性和大于或等于80%的特异性)。

[0337] 在技术的一些实施方案中,提供了包括以下步骤的方法:

[0338] 1) 使从受试者获得的核酸(例如基因组DNA,例如从体液诸如血液或血浆或乳腺组织分离)与区分至少一种选自具有选自由以下组成的组的注释的染色体区域的标志物内的

甲基化CpG二核苷酸与非甲基化CpG二核苷酸的至少一种试剂或一系列试剂接触：BHLHE23_C、CALN1_A、CD1D、HOXA7_A、LOC100132891、MAX.chr1.8277479-8277527、MAX.chr15.96889013-96889128、NACAD、ATP6V1B1、BANK1、C17orf64、DLX4、EMX1_A、FOXP4、GP5、ITPRIPL1、LMX1B_A、MAX.chr11.14926602-14927148、MAX.chr5.42994866-42994936、MAX.chr8.124173030-124173395、MPZ、PRKCB、STX16_B、UBTF、LOC100132891、ITPRIPL1、ABLIM1、MAX.chr19.46379903-46380197、ZSCAN12、BHLHE23_D、CXCL12、KCNK9、OTX1、RIC3、SCRT2_B、MAX.chr17.73073682-73073814、CDH4_E、HNF1B_B、TRH_A、MAX.chr20.1784209-1784461、MAX.chr5.145725410-145725459、MAX.chr5.77268672-77268725、BEST4和DSCR6，和

[0339] 2) 检测BRCA1乳腺癌(例如提供大于或等于80%的灵敏性和大于或等于80%的特异性)。

[0340] 在技术的一些实施方案中，提供了包括以下步骤的方法：

[0341] 1) 使从受试者获得的核酸(例如基因组DNA，例如从体液诸如血液或血浆或乳腺组织分离)与区分至少一种选自具有选自由以下组成的组的注释的染色体区域的标志物内的甲基化CpG二核苷酸与非甲基化CpG二核苷酸的至少一种试剂或一系列试剂接触：ANTXR2、B3GNT5、BHLHE23_C、BMP4、CHRNA7、EPHA4、FAM171A1、FAM20A、FMNL2、FSCN1、GSTP1、HBM、IGFBP5、IL17REL、ITGA9、ITPRIPL1、KIRREL2、LRRC34、MAX.chr1.239549742-239549886、MAX.chr1.8277479-8277527、MAX.chr11.14926602-14926729、MAX.chr11.14926860-14927148、MAX.chr15.96889013-96889128、MAX.chr2.238864674-238864735、MAX.chr5.81148300-81148332、MAX.chr7.151145632-151145743、MAX.chr8.124173030-124173395、MAX.chr8.143533298-143533558、MERTK、MPZ、NID2_C、NTRK3、OLIG3_A、OLIG3_B、OSR2_C、PROM1、RGS17、SBN02、STX16_B、TBKBP1、TLX1NB、VIPR2、VN1R2、VSNL1和ZFP64，和

[0342] 2) 检测BRCA2乳腺癌(例如提供大于或等于80%的灵敏性和大于或等于80%的特异性)。

[0343] 在技术的一些实施方案中，提供了包括以下步骤的方法：

[0344] 1) 使从受试者获得的核酸(例如基因组DNA，例如从体液诸如血液或血浆或乳腺组织分离)与区分至少一种选自具有选自由以下组成的组的注释的染色体区域的标志物内的甲基化CpG二核苷酸与非甲基化CpG二核苷酸的至少一种试剂或一系列试剂接触：MAX.chr15.96889013-96889128、ATP6V1B1、C17orf64、ITPRIPL1、MAX.chr11.14926602-14927148、MAX.chr5.42994866-42994936、LOC100132891、ITPRIPL1、ABLIM1、MAX.chr19.46379903-46380197、COL23A1、LAYN、OTX1、TRH_A、MAX.chr5.145725410-145725459、MAX.chr11.68622869-68622968，和

[0345] 2) 检测BRCA2乳腺癌(例如提供大于或等于80%的灵敏性和大于或等于80%的特异性)。

[0346] 在技术的一些实施方案中，提供了包括以下步骤的方法：

[0347] 1) 使从受试者获得的核酸(例如基因组DNA，例如从体液诸如血液或血浆或乳腺组织分离)与区分至少一种选自具有选自由以下组成的组的注释的染色体区域的标志物内的甲基化CpG二核苷酸与非甲基化CpG二核苷酸的至少一种试剂或一系列试剂接触：CDH4_E、FLJ42875、GAD2、GRASP、ITPRIPL1、KCNA1、MAX.chr12.4273906-4274012、

MAX.chr18.76734362-76734370、MAX.chr18.76734423-76734476、MAX.chr19.30719261-30719354、MAX.chr4.8859602-8859669、MAX.chr4.8860002-8860038、MAX.chr5.145725410-145725459、MAX.chr5.178957564-178957598、MAX.chr5.77268672-77268725、MPZ、NKX2-6、PRKCB、RBF3X3_B、SALL3和VSTM2B_A,和

[0348] 2) 检测侵袭性乳腺癌(例如提供大于或等于80%的灵敏性和大于或等于80%的特异性)。

[0349] 在技术的一些实施方案中,提供了包括以下步骤的方法:

[0350] 1) 使从受试者获得的核酸(例如基因组DNA,例如从体液诸如血液或血浆或乳腺组织分离)与区分至少一种选自具有选自由以下组成的组的注释的染色体区域的标志物内的甲基化CpG二核苷酸与非甲基化CpG二核苷酸的至少一种试剂或一系列试剂接触:SCRT2_B、MPZ、MAX.chr8.124173030-124173395、ITPRIPL1、ITPRIPL1、DLX4、CALN1_A和IGF2BP3_B,和

[0351] 2) 区分高等级乳腺导管原位癌(DCIS-HG)乳腺癌组织与低等级乳腺导管原位癌(DCIS-LG)乳腺组织(例如提供大于或等于80%的灵敏性和大于或等于80%的特异性)。

[0352] 在技术的一些实施方案中,提供了包括以下步骤的方法:

[0353] 1) 使从受试者获得的核酸(例如基因组DNA,例如从体液诸如血液或血浆或乳腺组织分离)与区分至少一种选自具有选自由以下组成的组的注释的染色体区域的标志物内的甲基化CpG二核苷酸与非甲基化CpG二核苷酸的至少一种试剂或一系列试剂接触:SCRT2_B, ITPRIPL1和MAX.chr8.124173030-12417339,和

[0354] 2) 区分高等级乳腺导管原位癌(DCIS-HG)乳腺癌组织与低等级乳腺导管原位癌(DCIS-LG)乳腺组织(例如提供大于或等于100%的灵敏性和大于或等于91%的特异性)。

[0355] 在技术的一些实施方案中,提供了包括以下步骤的方法:

[0356] 1) 使从受试者获得的核酸(例如基因组DNA,例如从体液诸如血液或血浆或乳腺组织分离)与区分至少一种选自具有选自由以下组成的组的注释的染色体区域的标志物内的甲基化CpG二核苷酸与非甲基化CpG二核苷酸的至少一种试剂或一系列试剂接触:DSCR6、SCRT2_B、MPZ、MAX.chr8.124173030-124173395、OSR2_A、MAX.chr11.68622869-68622968、ITPRIPL1、MAX.chr5.145725410-145725459、BHLHE23_C和ITPRIPL1,和

[0357] 2) 区分高等级乳腺导管原位癌(DCIS-HG)乳腺癌组织与低等级乳腺导管原位癌(DCIS-LG)乳腺组织(例如提供大于或等于80%的灵敏性和大于或等于80%的特异性)。

[0358] 在技术的一些实施方案中,提供了包括以下步骤的方法:

[0359] 1) 通过以下方式来测量人类个体的生物样品中的一种或多种基因的甲基化水平:用以甲基化特异性方式修饰DNA的试剂(例如其中所述试剂是亚硫酸氢盐试剂、甲基化敏感性限制酶或甲基化依赖性限制酶)处理所述生物样品中的基因组DNA,其中所述一种或多种基因选自以下群组中的一者:

[0360] (i) ATP6V1B1、LMX1B_A、BANK1、OTX1、MAX.chr11.14926602-14927148、UBTF、PRKCB、TRH_A、MPZ、DNM3_A、TRIM67、MAX.chr12.4273906-4274012、CALN1_A、ITPRIPL1、MAX.chr12.4273906-4274012、GYPC_B、MAX.chr5.42994866-42994936、OSR2_A、SCRT2_B、MAX.chr5.145725410-145725459、MAX.chr11.68622869-68622968、MAX.chr8.124173030-124173395、MAX.chr20.1784209-1784461、LOC100132891、BHLHE23_D、MAX.chr19.46379903-46380197、CHST2_B、MAX.chr5.77268672-77268725、C17orf64、EMX1_

A、DSCR6、ITPRIPL1、IGF2BP3_B、DLX4和ABLIM1；

[0361] (ii) ABLIM1_B、AJAP1_C、ALOX5_B、ASCL2_B、BANK1_B、BHLHE23_E、C10orf125_B、C17orf64_B、CALN1_1520、CALN_1B、CD1D_1058、CDH4_7890、CHST2_8128、CHST2_8384、CHST2_9316、CHST2_9470、CLIC6_B、CXCL12_B、DLX4_B、DNM3_D、EMX1_A、ESPN_B、FAM59B_7764、FOXP4_B、GP5、HOXA1_C、IGF2BP3_C、IPTRIP1_1138、IPTRIP1_1200、KCNK9_B、KCNK17_C、LAYN_B、LIME1_B、LMX1B_D、LOC100132891_B、MAST1_B、MAX.chr12.427.br、MAX.chr20.4422、MPZ_5742、MPZ_5554、MSX2P1_B、ODC1_B、OSR2_A、OTX1_B、PLXNC1_B、PRKCB_7570、SCRT2_C、SLC30A10、SPHK2_B、ST8SIA4_B、STX16_C、TRH_A和TRIM67_B；和

[0362] (iii) CD1D、ITPRIPL1、FAM59B、C10orf125、TRIM67、SPHK2、CALN1_B、CHST2_B、MPZ、CXCL12_B、ODC1_B、OSR2_A、TRH_A和C17orf64_B；

[0363] 2) 使用针对所选一种或多种基因的一组引物扩增经处理基因组DNA；和

[0364] 3) 通过聚合酶链式反应、核酸测序、质谱法、甲基化特异性核酸酶、基于质量的分离和靶标捕集确定所述一种或多种基因的所述甲基化水平。

[0365] 在技术的一些实施方案中，提供了包括以下步骤的方法：

[0366] 1) 测量来自样品的DNA中的至少一种甲基化标志基因的量，其中一种或多种基因选自以下群组中的一者：

[0367] (i) ATP6V1B1、LMX1B_A、BANK1、OTX1、MAX.chr11.14926602-14927148、UBTF、PRKCB、TRH_A、MPZ、DNM3_A、TRIM67、MAX.chr12.4273906-4274012、CALN1_A、ITPRIPL1、MAX.chr12.4273906-4274012、GYPC_B、MAX.chr5.42994866-42994936、OSR2_A、SCRT2_B、MAX.chr5.145725410-145725459、MAX.chr11.68622869-68622968、MAX.chr8.124173030-124173395、MAX.chr20.1784209-1784461、LOC100132891、BHLHE23_D、MAX.chr19.46379903-46380197、CHST2_B、MAX.chr5.77268672-77268725、C17orf64、EMX1_A、DSCR6、ITPRIPL1、IGF2BP3_B、DLX4和ABLIM1；

[0368] (ii) ABLIM1_B、AJAP1_C、ALOX5_B、ASCL2_B、BANK1_B、BHLHE23_E、C10orf125_B、C17orf64_B、CALN1_1520、CALN_1B、CD1D_1058、CDH4_7890、CHST2_8128、CHST2_8384、CHST2_9316、CHST2_9470、CLIC6_B、CXCL12_B、DLX4_B、DNM3_D、EMX1_A、ESPN_B、FAM59B_7764、FOXP4_B、GP5、HOXA1_C、IGF2BP3_C、IPTRIP1_1138、IPTRIP1_1200、KCNK9_B、KCNK17_C、LAYN_B、LIME1_B、LMX1B_D、LOC100132891_B、MAST1_B、MAX.chr12.427.br、MAX.chr20.4422、MPZ_5742、MPZ_5554、MSX2P1_B、ODC1_B、OSR2_A、OTX1_B、PLXNC1_B、PRKCB_7570、SCRT2_C、SLC30A10、SPHK2_B、ST8SIA4_B、STX16_C、TRH_A和TRIM67_B；和

[0369] (iii) CD1D、ITPRIPL1、FAM59B、C10orf125、TRIM67、SPHK2、CALN1_B、CHST2_B、MPZ、CXCL12_B、ODC1_B、OSR2_A、TRH_A和C17orf64_B；

[0370] 2) 测量所述DNA中的至少一种参考标志物的量；和

[0371] 3) 将所述至少一种甲基化标志基因的在所述DNA中测量的所述量的值计算为所述参考标志基因的在所述DNA中测量的所述量的百分比，其中所述值指示所述至少一种甲基化标志DNA的在所述样品中测量的量。

[0372] 在技术的一些实施方案中，提供了包括以下步骤的方法：

[0373] 1) 通过以下方式来测量人类个体的生物样品中的一种或多种基因的CpG位点的甲基化水平：用能够以甲基化特异性方式修饰DNA的试剂亚硫酸氢盐（例如甲基化敏感性限制

酶、甲基化依赖性限制酶和亚硫酸氢盐试剂)处理所述生物样品中的基因组DNA;

[0374] 2) 使用针对所选一种或多种基因的一组引物扩增经修饰基因组DNA;和

[0375] 3) 通过甲基化特异性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或亚硫酸氢盐基因组测序PCR确定所述CpG位点的所述甲基化水平;

[0376] 其中所述一种或多种基因选自以下群组中的一者:

[0377] (i) ATP6V1B1、LMX1B_A、BANK1、OTX1、MAX.chr11.14926602-14927148、UBTF、PRKCB、TRH_A、MPZ、DNM3_A、TRIM67、MAX.chr12.4273906-4274012、CALN1_A、ITPRIPL1、MAX.chr12.4273906-4274012、GYPC_B、MAX.chr5.42994866-42994936、OSR2_A、SCRT2_B、MAX.chr5.145725410-145725459、MAX.chr11.68622869-68622968、MAX.chr8.124173030-124173395、MAX.chr20.1784209-1784461、LOC100132891、BHLHE23_D、MAX.chr19.46379903-46380197、CHST2_B、MAX.chr5.77268672-77268725、C17orf64、EMX1_A、DSCR6、ITPRIPL1、IGF2BP3_B、DLX4和ABLIM1;

[0378] (ii) ABLIM1_B、AJAP1_C、ALOX5_B、ASCL2_B、BANK1_B、BHLHE23_E、C10orf125_B、C17orf64_B、CALN1_1520、CALN1_B、CD1D_1058、CDH4_7890、CHST2_8128、CHST2_8384、CHST2_9316、CHST2_9470、CLIC6_B、CXCL12_B、DLX4_B、DNM3_D、EMX1_A、ESPN_B、FAM59B_7764、FOXP4_B、GP5、HOXA1_C、IGF2BP3_C、IPTRIPL1_1138、IPTRIPL1_1200、KCNK9_B、KCNK17_C、LAYN_B、LIME1_B、LMX1B_D、LOC100132891_B、MAST1_B、MAX.chr12.427.br、MAX.chr20.4422、MPZ_5742、MPZ_5554、MSX2P1_B、ODC1_B、OSR2_A、OTX1_B、PLXNC1_B、PRKCB_7570、SCRT2_C、SLC30A10、SPHK2_B、ST8SIA4_B、STX16_C、TRH_A和TRIM67_B;和

[0379] (iii) CD1D、ITPRIPL1、FAM59B、C10orf125、TRIM67、SPHK2、CALN1_B、CHST2_B、MPZ、CXCL12_B、ODC1_B、OSR2_A、TRH_A和C17orf64_B。

[0380] 在技术的一些实施方案中,提供了包括以下步骤的方法:

[0381] 1) 通过以下方式来测量人类个体的生物样品中的一种或多种基因的甲基化水平:用以甲基化特异性方式修饰DNA的试剂(例如其中所述试剂是亚硫酸氢盐试剂、甲基化敏感性限制酶或甲基化依赖性限制酶)处理所述生物样品中的基因组DNA,其中所述一种或多种基因选自以下群组中的一者:

[0382] (i) BHLHE23_C、CALN1_A、CD1D、HOXA7_A、LOC100132891、MAX.chr1.8277479-8277527、MAX.chr15.96889013-96889128、NACAD、ATP6V1B1、BANK1、C17orf64、DLX4、EMX1_A、FOXP4、GP5、ITPRIPL1、LMX1B_A、MAX.chr11.14926602-14927148、MAX.chr5.42994866-42994936、MAX.chr8.124173030-124173395、MPZ、PRKCB、STX16_B、UBTF、LOC100132891、ITPRIPL1、ABLIM1、MAX.chr19.46379903-46380197、ZSCAN12、BHLHE23_D、CXCL12、KCNK9、OTX1、RIC3、SCRT2_B、MAX.chr17.73073682-73073814、CDH4_E、HNF1B_B、TRH_A、MAX.chr20.1784209-1784461、MAX.chr5.145725410-145725459、MAX.chr5.77268672-77268725、BEST4和DSCR6;

[0383] (ii) MAX.chr15.96889013-96889128、ATP6V1B1、C17orf64、ITPRIPL1、MAX.chr11.14926602-14927148、MAX.chr5.42994866-42994936、LOC100132891、ITPRIPL1、ABLIM1、MAX.chr19.46379903-46380197、COL23A1、LAYN、OTX1、TRH_A、MAX.chr5.145725410-145725459和MAX.chr11.68622869-68622968;

[0384] (iii) ATP6V1B1、MAX.chr11.14926602-14927148、PRKCB、TRH_A、MPZ、GP5、TRIM67、MAX.chr12.4273906-4274012、CALN1_A、MAX.chr12.4273906-4274012、MAX.chr5.42994866-42994936、SCRT2_B、MAX.chr5.145725410-145725459、BHLHE23_D、MAX.chr5.77268672-77268725、EMX1_A、DSCR6和DLX4;

[0385] (iv) ATP6V1B1、LMX1B_A、BANK1、OTX1、MAX.chr11.14926602-14927148、UBTF、PRKCB、TRH_A、MPZ、GP5、DNM3_A、TRIM67、PLXNC1_A、MAX.chr12.4273906-4274012、CALN1_A、ITPRIPL1、MAX.chr12.4273906-4274012、GYPC_B、MAX.chr5.42994866-42994936、OSR2_A、SCRT2_B、MAX.chr5.145725410-145725459、MAX.chr11.68622869-68622968、MAX.chr8.124173030-124173395、MAX.chr20.1784209-1784461、LOC100132891、BHLHE23_C、ALOX5、MAX.chr19.46379903-46380197、ODC1、CHST2_A、MAX.chr5.77268672-77268725、C17orf64、EMX1_A、CHST2_B、DSCR6、ITPRIPL1、IGF2BP3_B、DLX4、ABLIM1、BHLHE23_D、ZSCAN12、GRASP和C10orf125;

[0386] (v) ATP6V1B1、LMX1B_A、BANK1、OTX1、ST8SIA4、MAX.chr11.14926602-14927148、UBTF、PRKCB、TRH_A、MPZ、DNM3_A、TRIM67、PLXNC1_A、MAX.chr12.4273906-4274012、CALN1_A、ITPRIPL1、MAX.chr12.4273906-4274012、GYPC_B、MAX.chr5.42994866-42994936、OSR2_A、SCRT2_B、MAX.chr5.145725410-145725459、MAX.chr11.68622869-68622968、MAX.chr8.124173030-124173395、MAX.chr20.1784209-1784461、LOC100132891、BHLHE23_D、ALOX5、MAX.chr19.46379903-46380197、ODC1、CHST2_A、MAX.chr5.77268672-77268725、C17orf64、EMX1_A、CHST2_B、ITPRIPL1、IGF2BP3_B、CDH4_E、ABLIM1、SLC30A10、C10orf125;

[0387] (vi) ATP6V1B1、LMX1B_A、BANK1、OTX1、MAX.chr11.14926602-14927148、UBTF、PRKCB、TRH_A、MPZ、DNM3_A、TRIM67、PLXNC1_A、MAX.chr12.4273906-4274012、CALN1_A、ITPRIPL1、MAX.chr12.4273906-4274012、GYPC_B、MAX.chr5.42994866-42994936、OSR2_A、SCRT2_B、MAX.chr5.145725410-145725459、MAX.chr11.68622869-68622968、MAX.chr8.124173030-124173395、MAX.chr20.1784209-1784461、LOC100132891、BHLHE23_C、ALOX5、MAX.chr19.46379903-46380197、CHST2_B、MAX.chr5.77268672-77268725、C17orf64、EMX1_A、DSCR6、ITPRIPL1、IGF2BP3_B、CDH4_E、DLX4、ABLIM1、BHLHE23_D;和

[0388] (vii) DSCR6、SCRT2_B、MPZ、MAX.chr8.124173030-124173395、OSR2_A、MAX.chr11.68622869-68622968、ITPRIPL1、MAX.chr5.145725410-145725459、BHLHE23_C、ITPRIPL1;

[0389] 2) 使用针对所选一种或多种基因的一组引物扩增经处理基因组DNA;和

[0390] 3) 通过聚合酶链式反应、核酸测序、质谱法、甲基化特异性核酸酶、基于质量的分离和靶标捕集确定所述一种或多种基因的所述甲基化水平。

[0391] 在技术的一些实施方案中,提供了包括以下步骤的方法:

[0392] 1) 测量来自样品的DNA中的至少一种甲基化标志基因的量,其中一种或多种基因选自以下群组中的一者:

[0393] (i) BHLHE23_C、CALN1_A、CD1D、HOXA7_A、LOC100132891、MAX.chr1.8277479-8277527、MAX.chr15.96889013-96889128、NACAD、ATP6V1B1、BANK1、C17orf64、DLX4、EMX1_A、FOXP4、GP5、ITPRIPL1、LMX1B_A、MAX.chr11.14926602-14927148、MAX.chr5.42994866-42994936、MAX.chr8.124173030-124173395、MPZ、PRKCB、STX16_B、UBTF、LOC100132891、

ITPRIPL1、ABLIM1、MAX.chr19.46379903-46380197、ZSCAN12、BHLHE23_D、CXCL12、KCNK9、OTX1、RIC3、SCRT2_B、MAX.chr17.73073682-73073814、CDH4_E、HNF1B_B、TRH_A、MAX.chr20.1784209-1784461、MAX.chr5.145725410-145725459、MAX.chr5.77268672-77268725、BEST4和DSCR6;

[0394] (ii) MAX.chr15.96889013-96889128、ATP6V1B1、C17orf64、ITPRIPL1、MAX.chr11.14926602-14927148、MAX.chr5.42994866-42994936、LOC100132891、ITPRIPL1、ABLIM1、MAX.chr19.46379903-46380197、COL23A1、LAYN、OTX1、TRH_A、MAX.chr5.145725410-145725459和MAX.chr11.68622869-68622968;

[0395] (iii) ATP6V1B1、MAX.chr11.14926602-14927148、PRKCB、TRH_A、MPZ、GP5、TRIM67、MAX.chr12.4273906-4274012、CALN1_A、MAX.chr12.4273906-4274012、MAX.chr5.42994866-42994936、SCRT2_B、MAX.chr5.145725410-145725459、BHLHE23_D、MAX.chr5.77268672-77268725、EMX1_A、DSCR6和DLX4;

[0396] (iv) ATP6V1B1、LMX1B_A、BANK1、OTX1、MAX.chr11.14926602-14927148、UBTF、PRKCB、TRH_A、MPZ、GP5、DNM3_A、TRIM67、PLXNC1_A、MAX.chr12.4273906-4274012、CALN1_A、ITPRIPL1、MAX.chr12.4273906-4274012、GYPC_B、MAX.chr5.42994866-42994936、OSR2_A、SCRT2_B、MAX.chr5.145725410-145725459、MAX.chr11.68622869-68622968、MAX.chr8.124173030-124173395、MAX.chr20.1784209-1784461、LOC100132891、BHLHE23_C、ALOX5、MAX.chr19.46379903-46380197、ODC1、CHST2_A、MAX.chr5.77268672-77268725、C17orf64、EMX1_A、CHST2_B、DSCR6、ITPRIPL1、IGF2BP3_B、DLX4、ABLIM1、BHLHE23_D、ZSCAN12、GRASP和C10orf125;

[0397] (v) ATP6V1B1、LMX1B_A、BANK1、OTX1、ST8SIA4、MAX.chr11.14926602-14927148、UBTF、PRKCB、TRH_A、MPZ、DNM3_A、TRIM67、PLXNC1_A、MAX.chr12.4273906-4274012、CALN1_A、ITPRIPL1、MAX.chr12.4273906-4274012、GYPC_B、MAX.chr5.42994866-42994936、OSR2_A、SCRT2_B、MAX.chr5.145725410-145725459、MAX.chr11.68622869-68622968、MAX.chr8.124173030-124173395、MAX.chr20.1784209-1784461、LOC100132891、BHLHE23_D、ALOX5、MAX.chr19.46379903-46380197、ODC1、CHST2_A、MAX.chr5.77268672-77268725、C17orf64、EMX1_A、CHST2_B、ITPRIPL1、IGF2BP3_B、CDH4_E、ABLIM1、SLC30A10、C10orf125;

[0398] (vi) ATP6V1B1、LMX1B_A、BANK1、OTX1、MAX.chr11.14926602-14927148、UBTF、PRKCB、TRH_A、MPZ、DNM3_A、TRIM67、PLXNC1_A、MAX.chr12.4273906-4274012、CALN1_A、ITPRIPL1、MAX.chr12.4273906-4274012、GYPC_B、MAX.chr5.42994866-42994936、OSR2_A、SCRT2_B、MAX.chr5.145725410-145725459、MAX.chr11.68622869-68622968、MAX.chr8.124173030-124173395、MAX.chr20.1784209-1784461、LOC100132891、BHLHE23_C、ALOX5、MAX.chr19.46379903-46380197、CHST2_B、MAX.chr5.77268672-77268725、C17orf64、EMX1_A、DSCR6、ITPRIPL1、IGF2BP3_B、CDH4_E、DLX4、ABLIM1、BHLHE23_D;和

[0399] (vii) DSCR6、SCRT2_B、MPZ、MAX.chr8.124173030-124173395、OSR2_A、MAX.chr11.68622869-68622968、ITPRIPL1、MAX.chr5.145725410-145725459、BHLHE23_C、ITPRIPL1;

[0400] 2) 测量所述DNA中的至少一种参考标志物的量;和

[0401] 3) 将所述至少一种甲基化标志基因的在所述DNA中测量的所述量的值计算为所述

参考标志基因的在所述DNA中测量的所述量的百分比,其中所述值指示所述至少一种甲基化标志DNA的在所述样品中测量的量。

[0402] 在技术的一些实施方案中,提供了包括以下步骤的方法:

[0403] 1) 通过以下方式来测量人类个体的生物样品中的一种或多种基因的CpG位点的甲基化水平:用能够以甲基化特异性方式修饰DNA的试剂亚硫酸氢盐(例如甲基化敏感性限制酶、甲基化依赖性限制酶和亚硫酸氢盐试剂)处理所述生物样品中的基因组DNA;

[0404] 2) 使用针对所选一种或多种基因的一组引物扩增经修饰基因组DNA;和

[0405] 3) 通过甲基化特异性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或亚硫酸氢盐基因组测序PCR确定所述CpG位点的所述甲基化水平;

[0406] 其中所述一种或多种基因选自以下群组中的一者:

[0407] (i) BHLHE23_C、CALN1_A、CD1D、HOXA7_A、LOC100132891、MAX.chr1.8277479-8277527、MAX.chr15.96889013-96889128、NACAD、ATP6V1B1、BANK1、C17orf64、DLX4、EMX1_A、FOXP4、GP5、ITPRIPL1、LMX1B_A、MAX.chr11.14926602-14927148、MAX.chr5.42994866-42994936、MAX.chr8.124173030-124173395、MPZ、PRKCB、STX16_B、UBTF、LOC100132891、ITPRIPL1、ABLIM1、MAX.chr19.46379903-46380197、ZSCAN12、BHLHE23_D、CXCL12、KCNK9、OTX1、RIC3、SCRT2_B、MAX.chr17.73073682-73073814、CDH4_E、HNF1B_B、TRH_A、MAX.chr20.1784209-1784461、MAX.chr5.145725410-145725459、MAX.chr5.77268672-77268725、BEST4和DSCR6;

[0408] (ii) MAX.chr15.96889013-96889128、ATP6V1B1、C17orf64、ITPRIPL1、MAX.chr11.14926602-14927148、MAX.chr5.42994866-42994936、LOC100132891、ITPRIPL1、ABLIM1、MAX.chr19.46379903-46380197、COL23A1、LAYN、OTX1、TRH_A、MAX.chr5.145725410-145725459和MAX.chr11.68622869-68622968;

[0409] (iii) ATP6V1B1、MAX.chr11.14926602-14927148、PRKCB、TRH_A、MPZ、GP5、TRIM67、MAX.chr12.4273906-4274012、CALN1_A、MAX.chr12.4273906-4274012、MAX.chr5.42994866-42994936、SCRT2_B、MAX.chr5.145725410-145725459、BHLHE23_D、MAX.chr5.77268672-77268725、EMX1_A、DSCR6和DLX4;

[0410] (iv) ATP6V1B1、LMX1B_A、BANK1、OTX1、MAX.chr11.14926602-14927148、UBTF、PRKCB、TRH_A、MPZ、GP5、DNM3_A、TRIM67、PLXNC1_A、MAX.chr12.4273906-4274012、CALN1_A、ITPRIPL1、MAX.chr12.4273906-4274012、GYPC_B、MAX.chr5.42994866-42994936、OSR2_A、SCRT2_B、MAX.chr5.145725410-145725459、MAX.chr11.68622869-68622968、MAX.chr8.124173030-124173395、MAX.chr20.1784209-1784461、LOC100132891、BHLHE23_C、ALOX5、MAX.chr19.46379903-46380197、ODC1、CHST2_A、MAX.chr5.77268672-77268725、C17orf64、EMX1_A、CHST2_B、DSCR6、ITPRIPL1、IGF2BP3_B、DLX4、ABLIM1、BHLHE23_D、ZSCAN12、GRASP和C10orf125;

[0411] (v) ATP6V1B1、LMX1B_A、BANK1、OTX1、ST8SIA4、MAX.chr11.14926602-14927148、UBTF、PRKCB、TRH_A、MPZ、DNM3_A、TRIM67、PLXNC1_A、MAX.chr12.4273906-4274012、CALN1_A、ITPRIPL1、MAX.chr12.4273906-4274012、GYPC_B、MAX.chr5.42994866-42994936、OSR2_A、SCRT2_B、MAX.chr5.145725410-145725459、MAX.chr11.68622869-68622968、

MAX.chr8.124173030-124173395、MAX.chr20.1784209-1784461、LOC100132891、BHLHE23_D、ALOX5、MAX.chr19.46379903-46380197、ODC1、CHST2_A、MAX.chr5.77268672-77268725、C17orf64、EMX1_A、CHST2_B、ITPRIPL1、IGF2BP3_B、CDH4_E、ABLIM1、SLC30A10、C10orf125；

[0412] (vi) ATP6V1B1、LMX1B_A、BANK1、OTX1、MAX.chr11.14926602-14927148、UBTF、PRKCB、TRH_A、MPZ、DNM3_A、TRIM67、PLXNC1_A、MAX.chr12.4273906-4274012、CALN1_A、ITPRIPL1、MAX.chr12.4273906-4274012、GYPC_B、MAX.chr5.42994866-42994936、OSR2_A、SCRT2_B、MAX.chr5.145725410-145725459、MAX.chr11.68622869-68622968、MAX.chr8.124173030-124173395、MAX.chr20.1784209-1784461、LOC100132891、BHLHE23_C、ALOX5、MAX.chr19.46379903-46380197、CHST2_B、MAX.chr5.77268672-77268725、C17orf64、EMX1_A、DSCR6、ITPRIPL1、IGF2BP3_B、CDH4_E、DLX4、ABLIM1、BHLHE23_D；和

[0413] (vii) DSCR6、SCRT2_B、MPZ、MAX.chr8.124173030-124173395、OSR2_A、MAX.chr11.68622869-68622968、ITPRIPL1、MAX.chr5.145725410-145725459、BHLHE23_C、ITPRIPL1。

[0414] 优选地，所述方法的灵敏性是约70%至约100%、或约80%至约90%、或约80%至约85%。优选地，特异性是约70%至约100%、或约80%至约90%、或约80%至约85%。

[0415] 基因组DNA可通过任何手段分离，包括使用可商购获得的试剂盒。简要说来，其中目标DNA由细胞膜所囊封，生物样品必须通过酶促、化学或机械手段加以破坏和溶解。DNA溶液可接着例如通过用蛋白酶K消化来清除蛋白质和其他污染物。接着从溶液回收基因组DNA。这可借助于多种方法进行，包括盐析、有机萃取或使DNA结合于固相载体。对方法的选择将受若干因素影响，包括时间、花费以及所需DNA量。包含赘生性物质或赘生前物质的所有临床样品类型都适于在本方法中使用，例如细胞系、组织学载片、活检体、石蜡包埋组织、体液、粪便、乳腺组织、结肠流出物、尿、血浆、血清、全血、经分离血细胞、从血液分离的细胞以及它们的组合。

[0416] 技术在用于制备样品以及提供用于测试的核酸的方法方面不受限制。举例来说，在一些实施方案中，使用例如如美国专利申请序列号61/485386中详述的直接基因捕集，或通过相关方法来从粪便样品或从血液或从血浆样品分离DNA。

[0417] 接着用区分至少一种包含DMR（例如DMR 1-375，例如如由表2和表18所提供）的标志物内的甲基化CpG二核苷酸与非甲基化CpG二核苷酸的至少一种试剂或一系列试剂处理基因组DNA样品。

[0418] 在一些实施方案中，试剂使在5'位置处未被甲基化的胞嘧啶碱基转化成尿嘧啶、胸腺嘧啶或就杂交特性而言与胞嘧啶不同的另一碱基。然而，在一些实施方案中，试剂可为甲基化敏感性限制酶。

[0419] 在一些实施方案中，以使得在5'位置处未被甲基化的胞嘧啶碱基转化成尿嘧啶、胸腺嘧啶或就杂交特性而言与胞嘧啶不同的另一碱基的方式处理基因组DNA样品。在一些实施方案中，这个处理用亚硫酸氢盐（酸式亚硫酸盐、焦亚硫酸盐）进行，随后进行碱性水解。

[0420] 接着分析经处理核酸以确定靶标基因序列（来自包含DMR（例如至少一个选自例如如表2和表18中提供的DMR 1-375的DMR）的标志物的至少一种基因、基因组序列或核苷酸）的甲基化状态。分析方法可选自本领域中已知的那些，包括本文所列的那些，例如如本文所

述的QuARTS和MSP。

[0421] 包含DMR (例如DMR 1-375, 例如如由表2和表18所提供) 的标志物的异常甲基化, 更特别地, 高甲基化, 与乳腺癌相关联。

[0422] 技术涉及分析与乳腺癌相关的任何样品。举例来说, 在一些实施方案中, 样品包括从患者获得的组织和/或生物流体。在一些实施方案中, 样品包括分泌物。在一些实施方案中, 样品包括血液、血清、血浆、胃分泌物、胰液、胃肠活检样品、来自乳腺活检体的显微解剖细胞、和/或从粪便回收的细胞。在一些实施方案中, 样品包括乳腺组织。在一些实施方案中, 受试者是人类。样品可包括来自乳腺、肝、胆管、胰腺、胃、结肠、直肠、食道、小肠、阑尾、十二指肠、息肉、胆囊、肛门和/或腹膜的细胞、分泌物或组织。在一些实施方案中, 样品包括细胞液、腹水、尿、粪便、胰液、在内窥镜检查期间获得的流体、血液、粘液或唾液。在一些实施方案中, 样品是粪便样品。在一些实施方案中, 样品是乳腺组织样品。

[0423] 所述样品可通过本领域中已知的许多手段诸如将为熟练人士显而易见的手段获得。举例来说, 尿和粪便样品是可易于得到的, 而血液、腹水、血清或胰液样品可通过使用例如针和注射器以胃肠外方式获得。无细胞或大致上无细胞样品可通过使样品经受为本领域技术人员所知的各种技术获得, 所述技术包括但不限于离心和过滤。尽管通常优选的是不使用侵袭性技术来获得样品, 但仍然可为优选的是获得诸如组织匀浆、组织切片和活检试样的样品。

[0424] 在一些实施方案中, 技术涉及一种用于治疗患者 (例如患有乳腺癌, 患有早期乳腺癌, 或可能显现乳腺癌的患者) (例如患有三阴性乳腺癌、HER2⁺乳腺癌、管腔A型乳腺癌、管腔B型乳腺癌、BRCA1乳腺癌、BRCA2乳腺癌中的一者或多者的患者) 的方法, 所述方法包括确定一种或多种如本文提供的DMR的甲基化状态, 以及基于确定所述甲基化状态的结果来向所述患者施用治疗。治疗可为施用药物化合物、疫苗、进行手术、对患者成像、进行另一测试。优选地, 所述用途在临床筛查的方法、预后评估的方法、监测疗法的结果的方法、用以鉴定最可能对特定治疗性治疗起响应的患者的方法、对患者或受试者成像的方法、以及用于药物筛选和开发的方法中。

[0425] 在技术的一些实施方案中, 提供了一种用于诊断受试者的乳腺癌的方法。如本文所用的术语“诊断 (diagnosing/diagnosis)”是指熟练技术人员可估计乃至确定受试者是否正罹患给定疾病或疾患或可能在未来显现给定疾病或疾患所采用的方法。熟练技术人员经常基于一种或多种诊断指标作出诊断, 所述诊断指标诸如像其甲基化状态指示疾患的存在性、严重性或不存在性的生物标志物 (例如如本文公开的DMR)。

[0426] 连同诊断一起, 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。如果可作出更准确的预后, 或甚至可评估显现癌症的潜在风险, 那么可选择用于患者的适当疗法, 并且在一些情况下, 可选择用于患者的具有较小剧烈性的疗法。对癌症生物标志物的评估 (例如确定甲基化状态) 可用于区分具有良好预后和/或显现癌症的低风险的将不需要治疗或需要有限治疗的受试者与更可能显现癌症或遭受癌症复发的可能受益于更加强化治疗的那些受试者。

[0427] 因此, 如本文所用的“作出诊断”或“诊断”还包括确定显现癌症的风险或确定预后, 此可基于对本文公开的诊断生物标志物 (例如DMR) 的测量来提供预测临床结果 (采用或不采用医学治疗), 选择适当治疗 (或治疗是否将有效), 或监测当前治疗以及潜在改变所述

治疗。此外,在当前公开的主题的一些实施方案中,可随时间对生物标志物进行多次测定以有助于诊断和/或预后。生物标志物的时间变化可用于预测临床结果,监测乳腺癌的进展,和/或监测针对癌症的适当疗法的功效。在这种实施方案中,举例来说,可预期会观察到生物样品中的一种或多种本文公开的生物标志物(例如DMR)(以及潜在地,一种或多种额外生物标志物(如果监测))的甲基化状态在有效疗法的过程期间随时间的变化。

[0428] 在一些实施方案中,当前公开的主题还提供一种用于确定是否启动或继续对受试者的癌症的防治或治疗的方法。在一些实施方案中,方法包括历经一段时期提供来自受试者的一系列生物样品;分析所述一系列生物样品以确定所述生物样品中的每一者中的至少一种本文公开的生物标志物的甲基化状态;以及比较所述生物样品中的每一者中的所述生物标志物中的一者或多者的甲基化状态的任何可测量变化。生物标志物的甲基化状态历经所述时期的任何变化都可用于预测显现癌症的风险,预测临床结果,确定是否启动或继续对癌症的防治或治疗,以及当前疗法是否有效治疗癌症。举例来说,第一时间点可选择在启动治疗之前,并且第二时间点可选择在启动所述治疗之后的某一时间。可测量从不同时间点获取的样品中的每一者中的甲基化状态,并且记录定性和/或定量差异。来自不同样品的生物标志物甲基化状态水平的变化可与乳腺癌风险、预后、确定治疗功效和/或癌症在受试者中的进展相关联。

[0429] 在优选实施方案中,本发明的方法和组合物用于治疗或诊断处于早期,例如在疾病的症状出现之前的疾病。在一些实施方案中,本发明的方法和组合物用于治疗或诊断处于某一临床期的疾病。

[0430] 如所指示,在一些实施方案中,可对一种或多种诊断或预后生物标志物进行多次测定,并且标志物的时间变化可用于确定诊断或预后。举例来说,可在初始时间,以及在第二时间再次测定诊断标志物。在所述实施方案中,从初始时间至第二时间,标志物增加可诊断癌症的特定类型或严重性,或给定预后。同样,从初始时间至第二时间,标志物降低可指示癌症的特定类型或严重性,或给定预后。此外,一种或多种标志物的变化程度可与癌症的严重性以及未来不利事件相关联。熟练技术人员将了解,尽管在某些实施方案中,可对在多个时间点的同一生物标志物进行比较测量,但也可测量在一个时间点的给定生物标志物,并且测量在第二时间点的第二生物标志物,并且这些标志物的比较可提供诊断信息。

[0431] 如本文所用,短语“确定预后”是指熟练技术人员可预测受试者的疾患的过程或结果所采用的方法。术语“预后”不指基于生物标志物(例如DMR)的甲基化状态能够以100%准确性预测疾患的过程或结果,或甚至不指给定过程或结果可预测地或多或少可能发生。作为替代,熟练技术人员将了解,术语“预后”是指某一过程或结果将发生的概率增加;也就是说,当相较于不展现给定状况的那些个体时,过程或结果更可能发生在展现所述状况的受试者中。举例来说,在不展现状况(例如具有一个或多个DMR的正常甲基化状态)的个体中,给定结果(例如罹患乳腺癌)的机会可为极低的。

[0432] 在一些实施方案中,统计分析使预后指标与不利结果倾向相关联。举例来说,在一些实施方案中,甲基化状态不同于从不患有癌症的患者获得的正常对照样品中的甲基化状态可表示相比于水平更类似于对照样品中的甲基化状态的受试者,受试者更可能罹患癌症,如通过统计显著性水平所确定。另外,从基线(例如“正常”)水平开始的甲基化状态变化可反映受试者预后,并且甲基化状态变化的程度可与不利事件的严重性相关联。经常通过

比较两个或更多群体,以及确定置信区间和/或p值来确定统计显著性。参见例如Dowdy和Wearden, *Statistics for Research*, John Wiley&Sons, New York, 1983, 其以引用的方式整体并入本文。本主题的示例性置信区间是90%、95%、97.5%、98%、99%、99.5%、99.9%和99.99%, 而示例性p值是0.1、0.05、0.025、0.02、0.01、0.005、0.001和0.0001。

[0433] 在其他实施方案中,可确定本文公开的预后或诊断生物标志物(例如DMR)的甲基化状态变化的阈值程度,并且简单地将生物样品中的所述生物标志物的甲基化状态变化的程度与甲基化状态变化的所述阈值程度进行比较。本文提供的生物标志物的甲基化状态的优选阈值变化是约5%、约10%、约15%、约20%、约25%、约30%、约50%、约75%、约100%和约150%。在其他实施方案中,可建立“列线图”,通过所述列线图,预后或诊断指标(生物标志物或生物标志物的组合)的甲基化状态与给定结果相关倾向直接相关联。熟练技术人员熟悉使用所述列线图来使两个数值相关联,同时了解这个测量的不确定性与标志物浓度的不确定性相同,因为参考的是单个样品测量结果,而非群体平均值。

[0434] 在一些实施方案中,对照样品与生物样品并行分析,以使从所述生物样品获得的结果可与从所述对照样品获得的结果进行比较。另外,预期可提供标准曲线,利用所述标准曲线,生物样品的测定结果可进行比较。所述标准曲线呈现随测定单位例如荧光信号强度(如果使用荧光标记)而变化的生物标志物甲基化状态。使用从多个供体获取的样品,可提供正常组织中的一种或多种生物标志物的对照甲基化状态以及从具有化生的供体或从患有乳腺癌的供体获取的组织中的一种或多种生物标志物的“处于风险下”水平的标准曲线。在方法的某些实施方案中,在鉴定从受试者获得的生物样品中的一个或多个本文提供的DMR的异常甲基化状态后,将所述受试者鉴定为具有化生。在方法的其他实施方案中,检测到从受试者获得的生物样品中的所述生物标志物中的一者或多者的异常甲基化状态导致所述受试者被鉴定为患有癌症。

[0435] 对标志物的分析可单独进行,或与在一个测试样品内的额外标志物同时进行。举例来说,若干标志物可被组合至一个测试中以有效处理多个样品,以及潜在提供更大诊断和/或预后准确性。此外,本领域技术人员将认识到测试来自同一受试者的多个样品(例如在相继时间点)的价值。对连续样品的所述测试可允许鉴定标志物甲基化状态随时间的变化。甲基化状态变化以及不存在甲基化状态变化可提供关于疾病状况的有用信息,包括但不限于鉴定从事件发生开始的大约时间、可挽救组织的存在性和量、药物疗法的适当性、各种疗法的有效性,以及鉴定受试者的结果,包括未来事件的风险。

[0436] 对生物标志物的分析可以多种物理形式进行。举例来说,微量滴定板或自动化的使用可用于促进对大量测试样品的处理。或者,可开发单样品形式以促进例如在流动运输或急救室环境中以及及时方式进行即刻处理和诊断。

[0437] 在一些实施方案中,如果当相较于对照甲基化状态时,在样品中的至少一种生物标志物的甲基化状态方面存在可测量差异,那么将受试者诊断为患有乳腺癌。相反,当在生物样品中未鉴定到甲基化状态变化时,受试者可被鉴定为不患有乳腺癌,不处于癌症的风险下,或具有癌症的低风险。就此而言,具有癌症或其风险的受试者可与具有低下直至大致上无癌症或其风险的受试者区分。具有显现乳腺癌的风险的那些受试者可被放置在更加强化和/或定期筛查时程上,包括内窥镜监视。在另一方面,具有低下直至大致上无风险的那些受试者可避免经受额外乳腺癌测试(例如侵袭性程序),直至诸如未来筛查例如根据本技

术进行的筛查指示乳腺癌的风险已出现在那些受试者中的时间。

[0438] 如上所提及,视本技术的方法的实施方案而定,检测一种或多种生物标志物的甲基化状态变化可为定性测定,或它可为定量测定。因此,将受试者诊断为患有乳腺癌或处于显现乳腺癌的风险下的步骤指示进行某些阈值测量,例如生物样品中的一种或多种生物标志物的甲基化状态不同于预定对照甲基化状态。在方法的一些实施方案中,对照甲基化状态是生物标志物的任何可检测甲基化状态。在方法的其中对照样品与生物样品并行测试的其他实施方案中,预定甲基化状态是对照样品中的甲基化状态。在方法的其他实施方案中,预定甲基化状态基于标准曲线和/或通过标准曲线来鉴定。在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。因此,预定甲基化状态可部分地基于所实施的方法的实施方案以及所需特异性等,在将为本领域技术人员显而易知的可接受限度内加以选择。

[0439] 此外,关于诊断方法,优选受试者是脊椎动物受试者。一优选脊椎动物是温血的;一优选温血脊椎动物是哺乳动物。一优选哺乳动物最优选地是人类。如本文所用,术语“受试者”包括人类受试者与动物受试者两者。因此,本文提供了兽医学治疗用途。因此,本技术提供对诸如人类的哺乳动物以及由于濒危而具有重要性的那些哺乳动物诸如西伯利亚虎;具有经济重要性的动物诸如在农场被饲养以供人类食用的动物;和/或对人类具有社会重要性的动物诸如作为宠物或在动物园中饲养的动物的诊断。所述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、肉猪和野猪;反刍动物和/或有蹄动物,诸如牛、公牛、绵羊、长颈鹿、鹿、山羊、野牛和骆驼;以及马。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驯化猪、反刍动物、有蹄动物、马(包括赛马)等。

[0440] 当前公开的主题还包括一种用于诊断受试者的乳腺癌和/或特定形式的乳腺癌(例如三阴性乳腺癌、HER2⁺乳腺癌、管腔A型乳腺癌、管腔B型乳腺癌、BRCA1乳腺癌、BRCA2乳腺癌)的系统。所述系统可例如以商业试剂盒形式提供,所述商业试剂盒可用于筛查已从其收集生物样品的受试者中的乳腺癌风险或诊断所述受试者的乳腺癌。根据本技术提供的一示例性系统包括评估如表2和表18中提供的DMR的甲基化状态。

[0441] 实施例

[0442] 实施例I.

[0443] 这个实施例描述对乳腺癌特异性标志物的发现和组织验证。

[0444] 表1显示用于对乳腺癌特异性标志物的发现中的每个乳腺癌亚型的组织样品的数目。

[0445] 表1.

| | 乳腺癌亚型 | 受试者的数目 | 总计 |
|--------|-------------------|--------|----|
| [0446] | 基底样/三阴性 | 18 | 18 |
| | HER2 ⁺ | 18 | 18 |
| | 管腔 A 型 | 18 | 18 |
| | 管腔 B 型 | 18 | 18 |
| | BRCA 1 | 6 | 15 |
| | BRCA 2 | 9 | |
| | 正常乳腺 | 18 | 45 |
| | 正常乳腺 + BRCA | 9 | |
| | 正常血沉棕黄层 | 18 | |

[0447] 对于通过RRBS发现甲基化标志物,冷冻组织样品从72个侵袭性乳腺癌病例(18个管腔A型、18个管腔B型、18个基底样/三阴性和18个HER2+)、15个来自BRCA种系突变患者的侵袭性乳腺癌(6个BRCA1、9个BRCA2)以及45个对照(18个正常乳腺(缩小乳房成形术或防治性乳房切除术)、种系BRCA携带者中的9个组织学正常乳腺(防治性乳房切除术)和18个正常血沉棕黄层)获得。肿瘤和乳腺组织切片由有经验的胃肠病理学家复审以确认诊断以及估计异常细胞性。接着将切片进行宏观解剖。使用QiaAmp小型试剂盒(Qiagen, Valencia CA)纯化基因组DNA。通过用10单位的MspI进行消化来使DNA(300ng)片段化。经消化片段用5单位的克林诺片段(Klenow fragment)(3'-5'外切)进行末端修复以及用A加尾,并且过夜连接至含有条形码序列(用以使每个片段与它的样品标识符相关联)的甲基化TruSeq衔接子(Illumina, San Diego CA)。使用AMPure XP SPRI珠粒/缓冲液(Beckman Coulter, Brea CA)纯化反应。

[0448] 组织样品接着经使用经修改EpiTect方案(Qiagen)进行的亚硫酸氢盐转化(两次)。qPCR(LightCycler 480-Roche, Mannheim Germany)用于确定最优富集Ct。以下条件用于最终富集PCR:每个50uL反应含有5uL的10X缓冲液、1.25uL的10mM每种三磷酸脱氧核糖核苷酸(dNTP)、5uL引物混合物(约5uM)、15uL模板(样品)、1uL PfuTurbo Cx hotstart(Agilent, Santa Clara CA)和22.75水;温度和时间分别是95°C-5分钟;98°C-30秒;16个循环的98°C-10秒、65°C-30秒、72°C-30秒,72°C-5分钟和4°C保持。样品用SPRI珠粒加以纯化,接着在生物分析仪2100(Agilent)上测试以评估富集的DNA尺寸分布。使用AMPure XP SPRI珠粒/缓冲液(Beckman Coulter, Brea CA)进行160-520bp(40-400bp插入物)片段的尺寸选择。缓冲液截断值是0.7倍-1.1倍样品体积。样品基于随机化流程组合(等摩尔)至4路文库中,并且用为进行最终尺寸和浓度验证的生物分析仪,以及用qPCR(KAPA文库定量试剂盒-KAPA Biosystems, Cape Town South Africa)加以测试。

[0449] 根据随机化泳道分配将组织样品上样于单一读段流动池上,并且由在梅奥诊所医学基因组研究室(Mayo Clinic Medical Genome Facility)的下一代测序核心部门(Next Generation Sequencing Core)在Illumina HiSeq 2000平台上进行测序。对于101个循环,读段是单向的。运行标准Illumina管道以进行初级分析。SAAP-RRBS(用于简化代表性亚硫酸氢盐测序的精简分析和注释管道)用于进行品质评分、序列比对、注释和甲基化提取。

[0450] 乳腺癌组织产生大量辨别DMR,其中许多之前尚未被鉴定。将乳腺癌组织样品的甲

基化与正常乳腺组织进行比较,鉴定了327个区分乳腺癌组织与正常乳腺组织的甲基化区域(参见表2)(表2中所示的区域的基因组坐标基于人类2009年2月(GRCh37/hg19)集合)。表3显示48个区分三阴性乳腺癌组织与正常乳腺组织的甲基化区域。表4显示122个区分HER2⁺乳腺癌组织与正常乳腺组织的甲基化区域。表5显示75个区分管腔A型乳腺癌组织与正常乳腺组织的甲基化区域。表6显示39个区分管腔B型乳腺癌组织与正常乳腺组织的甲基化区域。表7显示49个区分BRCA1乳腺癌组织与正常乳腺组织的甲基化区域。表8显示45个区分BRCA2乳腺癌组织与正常乳腺组织的甲基化区域。表9显示21个区分侵袭性乳腺癌组织与正常乳腺组织的甲基化区域。

[0451] 表2. 区分乳腺癌组织与正常乳腺组织的所鉴定甲基化区域。

[0452]

| DMR 编号 | 基因注释 | 在染色体上的区域(起始碱基-结束碱基) |
|--------|---------|---------------------------|
| 1 | ZSCAN23 | chr6:28411152-28411272 |
| 2 | AADAT.R | chr4:171010951-171010991 |
| 3 | ABLIM1 | chr10:116391588-116391793 |
| 4 | ACCN1 | chr17:31620207-31620314 |
| 5 | AFAP1L1 | chr5:148651161-148651242 |
| 6 | AJAP1_A | chr1:4715535-4715646 |
| 7 | AJAP1_B | chr1:4715931-4716021 |
| 8 | AKR1B1 | chr7:134143171-134143684 |
| 9 | ALOX5 | chr10:45914840-45914949 |
| 10 | AMN | chr14:103394920-103395019 |

[0453]

| | | |
|----|-------------|---------------------------|
| 11 | ANPEP | chr15:90358420-90358514 |
| 12 | ANTXR2 | chr4:80993475-80993634 |
| 13 | ARL5C | chr17:37321515-37321626 |
| 14 | ASCL2 | chr11:2292240-2292361 |
| 15 | ATP6V1B1 | chr2:71192354-71192453 |
| 16 | B3GNT5 | chr3:182971589-182971825 |
| 17 | BANK1 | chr4:102711871-102712076 |
| 18 | BCAT1 | chr12:25055906-25055975 |
| 19 | BEGAIN | chr14:101033665-101033813 |
| 20 | BEST4 | chr1:45251853-45252029 |
| 21 | BHLHE23_A | chr20:61637950-61637986 |
| 22 | BHLHE23_B | chr20:61638020-61638083 |
| 23 | BHLHE23_C | chr20:61638088-61638565 |
| 24 | BHLHE23_D | chr20:61638244-61638301 |
| 25 | BMP4 | chr14:54421578-54421916 |
| 26 | BMP6 | chr6:7727566-7727907 |
| 27 | C10orf125 | chr10:135171410-135171504 |
| 28 | C10orf93 | chr10:134756078-134756167 |
| 29 | C17orf64 | chr17:58499095-58499190 |
| 30 | C19orf35 | chr19:2282568-2282640 |
| 31 | C19orf66 | chr19:10197688-10197823 |
| 32 | C1QL2 | chr2:119916511-119916572 |
| 33 | C20orf195_A | chr20:62185293-62185364 |
| 34 | C20orf195_B | chr20:62185418-62185546 |
| 35 | C7orf52 | chr7:100823483-100823514 |
| 36 | CALN1_A | chr7:71801486-71801594 |
| 37 | CALN1_B | chr7:71801741-71801800 |
| 38 | CAMKV | chr3:49907259-49907298 |
| 39 | CAPN2.FR | chr1:223900347-223900405 |
| 40 | CAV2 | chr7:116140205-116140342 |
| 41 | CBLN1_A | chr16:49315588-49315691 |
| 42 | CBLN1_B | chr16:49316198-49316258 |
| 43 | CCDC61 | chr19:46519467-46519536 |
| 44 | CCND2_A | chr12:4378317-4378375 |
| 45 | CCND2_B | chr12:4380560-4380681 |
| 46 | CCND2_C | chr12:4384096-4384146 |
| 47 | CD1D | chr1:158150864-158151129 |
| 48 | CD8A | chr2:87017780-87017917 |
| 49 | CDH4_A | chr20:59827230-59827285 |
| 50 | CDH4_B | chr20:59827762-59827776 |
| 51 | CDH4_C | chr20:59827794-59827868 |
| 52 | CDH4_D | chr20:59828193-59828258 |

[0454]

| | | |
|----|-----------|---------------------------|
| 53 | CDH4_E | chr20:59828479-59828729 |
| 54 | CDH4_F | chr20:59828778-59828814 |
| 55 | CHRNA7 | chr15:32322830-32322897 |
| 56 | CHST2_A | chr3:142838025-142838494 |
| 57 | CHST2_B | chr3:142839223-142839568 |
| 58 | CLIC6 | chr21:36042025-36042131 |
| 59 | CLIP4 | chr2:29338109-29338339 |
| 60 | COL23A1.R | chr5:178017669-178017854 |
| 61 | CR1 | chr1:207669481-207669639 |
| 62 | CRHBP | chr5:76249939-76249997 |
| 63 | CXCL12.F | chr10:44881210-44881300 |
| 64 | DBNDD1.FR | chr16:90085625-90085681 |
| 65 | DLK1 | chr14:101193295-101193318 |
| 66 | DLX4 | chr17:48042562-48042606 |
| 67 | DLX6 | chr7:96635255-96635475 |
| 68 | DNAJC6 | chr1:65731412-65731507 |
| 69 | DNM3_A | chr1:171810393-171810575 |
| 70 | DNM3_B | chr1:171810648-171810702 |
| 71 | DNM3_C | chr1:171810806-171810920 |
| 72 | DSCR6 | chr21:38378540-38378601 |
| 73 | DTX1 | chr12:113515535-113515637 |
| 74 | EMX1_A | chr2:73151498-73151578 |
| 75 | EMX1_B | chr2:73151663-73151756 |
| 76 | EPHA4 | chr2:222436217-222436320 |
| 77 | ESPN | chr1:6508784-6509175 |
| 78 | ESYT3 | chr3:138153979-138154071 |
| 79 | ETS1_A | chr11:128391809-128391908 |
| 80 | ETS1_B | chr11:128392062-128392309 |
| 81 | FABP5 | chr8:82192605-82192921 |
| 82 | FAIM2 | chr12:50297863-50297988 |
| 83 | FAM126A | chr7:23053941-23054066 |
| 84 | FAM129C.F | chr19:17650551-17650610 |
| 85 | FAM150A | chr8:53478266-53478416 |
| 86 | FAM150B | chr2:287868-287919 |
| 87 | FAM171A1 | chr10:15412558-15412652 |
| 88 | FAM189A1 | chr15:29862130-29862169 |
| 89 | FAM20A | chr17:66597237-66597326 |
| 90 | FAM59B | chr2:26407713-26407972 |
| 91 | FBN1 | chr15:48937412-48937541 |
| 92 | FLJ42875 | chr1:2987037-2987116 |
| 93 | FLRT2 | chr14:85998469-85998535 |
| 94 | FMN2 | chr1:240255171-240255253 |

[0455]

| | | |
|-----|-----------|---------------------------|
| 95 | FMNL2 | chr2:153192734-153192836 |
| 96 | FOXP4 | chr6:41528816-41528958 |
| 97 | FSCN1 | chr7:5633506-5633615 |
| 98 | GAD2 | chr10:26505066-26505385 |
| 99 | GAS7 | chr17:10101325-10101397 |
| 100 | GCGR | chr17:79761970-79762088 |
| 101 | GLI3 | chr7:42267808-42267899 |
| 102 | GLP1R | chr6:39016381-39016421 |
| 103 | GNG4 | chr1:235813658-235813798 |
| 104 | GP5 | chr3:194118738-194118924 |
| 105 | GRASP | chr12:52400919-52401166 |
| 106 | GRM7 | chr3:6902873-6902931 |
| 107 | GSTP1 | chr11:67350986-67351055 |
| 108 | GYPC_A | chr2:127413505-127413678 |
| 109 | GYPC_B | chr2:127414096-127414189 |
| 110 | HAND2 | chr4:174450452-174450478 |
| 111 | HBM | chr16:216426-216451 |
| 112 | HES5 | chr1:2461823-2461915 |
| 113 | HHEX.F | chr10:94449486-94449597 |
| 114 | HMGA2 | chr12:66219385-66219487 |
| 115 | HNF1B_A | chr17:36103713-36103793 |
| 116 | HNF1B_B | chr17:36105390-36105448 |
| 117 | HOXA1_A | chr7:27135603-27135889 |
| 118 | HOXA1_B | chr7:27136191-27136244 |
| 119 | HOXA7_A | chr7:27195742-27195895 |
| 120 | HOXA7_B | chr7:27196032-27196190 |
| 121 | HOXA7_C | chr7:27196441-27196531 |
| 122 | HOXD9 | chr2:176987716-176987739 |
| 123 | IGF2BP3_A | chr7:23508901-23509225 |
| 124 | IGF2BP3_B | chr7:23513817-23514114 |
| 125 | IGFBP5 | chr2:217559103-217559244 |
| 126 | IGSF9B_A | chr11:133825409-133825476 |
| 127 | IGSF9B_B | chr11:133825491-133825530 |
| 128 | IL15RA | chr10:6018610-6018848 |
| 129 | IL17REL | chr22:50453462-50453555 |
| 130 | INSM1 | chr20:20348140-20348182 |
| 131 | ITGA9 | chr3:37493895-37493994 |
| 132 | ITPKA_A | chr15:41787438-41787784 |
| 133 | ITPKA_B | chr15:41793928-41794003 |
| 134 | ITPRIPL1 | chr2:96990968-96991328 |
| 135 | JSRP1 | chr19:2253163-2253376 |

[0456]

| | | |
|-----|-------------------------------|---------------------------|
| 136 | KCNA1 | chr12:5019401-5019633 |
| 137 | KCNE3 | chr11:74178260-74178346 |
| 138 | KCNH8 | chr3:19189837-19189897 |
| 139 | KCNK17_A | chr6:39281195-39281282 |
| 140 | KCNK17_B | chr6:39281408-39281478 |
| 141 | KCNK9.FR | chr8:140715096-140715164 |
| 142 | KCNQ2 | chr20:62103558-62103625 |
| 143 | KIAA1949 | chr6:30646976-30647084 |
| 144 | KIRREL2 | chr19:36347825-36347863 |
| 145 | KLF16 | chr19:1857330-1857476 |
| 146 | KLHDC7B | chr22:50987219-50987304 |
| 147 | LAYN.R | chr11:111412023-111412074 |
| 148 | LIME1 | chr20:62369116-62369393 |
| 149 | LMX1B_A | chr9:129388175-129388223 |
| 150 | LMX1B_B | chr9:129388231-129388495 |
| 151 | LMX1B_C | chr9:129445588-129445603 |
| 152 | LOC100131176 | chr7:151106986-151107060 |
| 153 | LOC100132891 | chr8:72755897-72756295 |
| 154 | LOC100302401.R | chr1:178063509-178063567 |
| 155 | LOC283999 | chr17:76227905-76227960 |
| 156 | LRRC34 | chr3:169530006-169530139 |
| 157 | LSS.F | chr21:47649525-47649615 |
| 158 | LY6H | chr8:144241547-144241557 |
| 159 | MAGI2 | chr7:79083359-79083600 |
| 160 | MAST1 | chr19:12978399-12978642 |
| 161 | MAX.chr1.158083198-158083476 | chr1:158083198-158083476 |
| 162 | MAX.chr1.228074764-228074977 | chr1:228074764-228074977 |
| 163 | MAX.chr1.239549742-239549886 | chr1:239549742-239549886 |
| 164 | MAX.chr1.46913931-46913950 | chr1:46913931-46913950 |
| 165 | MAX.chr1.8277285-8277316 | chr1:8277285-8277316 |
| 166 | MAX.chr1.8277479-8277527 | chr1:8277479-8277527 |
| 167 | MAX.chr10.130085265-130085312 | chr10:130085265-130085312 |
| 168 | MAX.chr11.14926602-14927148 | chr11:14926602-14927148 |
| 169 | MAX.chr11.68622869 | chr11:68622869-68622968 |

[0457]

| | | |
|-----|---------------------------------|---------------------------|
| | -68622968 | |
| 170 | MAX.chr12.4273906-4274012 | chr12:4273906-4274012 |
| 171 | MAX.chr12.59990591-59990895 | chr12:59990591-59990895 |
| 172 | MAX.chr14.101176106-101176260 | chr14:101176106-101176260 |
| 173 | MAX.chr15.96889013-96889128 | chr15:96889013-96889128 |
| 174 | MAX.chr17.73073682-73073814 | chr17:73073682-73073814 |
| 175 | MAX.chr17.8230197-8230314 | chr17:8230197-8230314 |
| 176 | MAX.chr18.5629721-5629791 | chr18:5629721-5629791 |
| 177 | MAX.chr18.76734362-76734476 | chr18:76734362-76734476 |
| 178 | MAX.chr19.30719261-30719354 | chr19:30719261-30719354 |
| 179 | MAX.chr19.46379903-46380197 | chr19:46379903-46380197 |
| 180 | MAX.chr2.223183057-223183114.FR | chr2:223183057-223183114 |
| 181 | MAX.chr2.238864674-238864735 | chr2:238864674-238864735 |
| 182 | MAX.chr2.97193163-97193287 | chr2:97193163-97193287 |
| 183 | MAX.chr2.97193478-97193562 | chr2:97193478-97193562 |
| 184 | MAX.chr20.1783841-1784054 | chr20:1783841-1784054 |
| 185 | MAX.chr20.1784209-1784461 | chr20:1784209-1784461 |
| 186 | MAX.chr21.44782441-44782498 | chr21:44782441-44782498 |
| 187 | MAX.chr21.47063802-47063851 | chr21:47063802-47063851 |
| 188 | MAX.chr22.23908718-23908782 | chr22:23908718-23908782 |
| 189 | MAX.chr22.42679578-42679917 | chr22:42679578-42679917 |
| 190 | MAX.chr4.8859253-8 | chr4:8859253-8859329 |

[0458]

| | | |
|-----|------------------------------|--------------------------|
| | 859329 | |
| 191 | MAX.chr4.8859602-8859669 | chr4:8859602-8859669 |
| 192 | MAX.chr4.8860002-8860038 | chr4:8860002-8860038 |
| 193 | MAX.chr5.145725410-145725459 | chr5:145725410-145725459 |
| 194 | MAX.chr5.172234248-172234494 | chr5:172234248-172234494 |
| 195 | MAX.chr5.178957564-178957598 | chr5:178957564-178957598 |
| 196 | MAX.chr5.180101084-180101094 | chr5:180101084-180101094 |
| 197 | MAX.chr5.42952185-42952280 | chr5:42952185-42952280 |
| 198 | MAX.chr5.42994866-42994936 | chr5:42994866-42994936 |
| 199 | MAX.chr5.77268672-77268725 | chr5:77268672-77268725 |
| 200 | MAX.chr5.81148300-81148332 | chr5:81148300-81148332 |
| 201 | MAX.chr6.108440684-108440788 | chr6:108440684-108440788 |
| 202 | MAX.chr6.130686865-130686985 | chr6:130686865-130686985 |
| 203 | MAX.chr6.157556793-157556856 | chr6:157556793-157556856 |
| 204 | MAX.chr6.157557371-157557657 | chr6:157557371-157557657 |
| 205 | MAX.chr6.27064703-27064783 | chr6:27064703-27064783 |
| 206 | MAX.chr7.151145632-151145743 | chr7:151145632-151145743 |
| 207 | MAX.chr7.152622607-152622638 | chr7:152622607-152622638 |
| 208 | MAX.chr8.124173030-124173395 | chr8:124173030-124173395 |
| 209 | MAX.chr8.124173128-124173268 | chr8:124173128-124173268 |
| 210 | MAX.chr8.143533298-143533558 | chr8:143533298-143533558 |
| 211 | MAX.chr8.145104132-145104218 | chr8:145104132-145104218 |

[0459]

| | | |
|-----|------------------------------|--------------------------|
| | -145104218 | |
| 212 | MAX.chr8.687688-687736 | chr8:687688-687736 |
| 213 | MAX.chr8.688863-688924 | chr8:688863-688924 |
| 214 | MAX.chr9.114010-114207 | chr9:114010-114207 |
| 215 | MAX.chr9.136474504-136474527 | chr9:136474504-136474527 |
| 216 | MCF2L2 | chr3:182896930-182897245 |
| 217 | MERTK | chr2:112656676-112656744 |
| 218 | MGAT1 | chr5:180230434-180230767 |
| 219 | MIB2 | chr1:1565891-1565987 |
| 220 | MN1 | chr22:28197962-28198388 |
| 221 | MPZ | chr1:161275561-161275996 |
| 222 | MSX2P1 | chr17:56234436-56234516 |
| 223 | NACAD | chr7:45128502-45128717 |
| 224 | NID2_A | chr14:52535260-52535353 |
| 225 | NID2_B | chr14:52535974-52536161 |
| 226 | NID2_C | chr14:52536192-52536328 |
| 227 | NKX2-6 | chr8:23564115-23564146 |
| 228 | NR2F6 | chr19:17346428-17346459 |
| 229 | NTRK3 | chr15:88800287-88800414 |
| 230 | NXPH4 | chr12:57618904-57618944 |
| 231 | ODC1 | chr2:10589075-10589243 |
| 232 | OLIG3_A | chr6:137818896-137818917 |
| 233 | OLIG3_B | chr6:137818978-137818988 |
| 234 | OSR2_A | chr8:99952233-99952366 |
| 235 | OSR2_B | chr8:99952801-99952919 |
| 236 | OSR2_C | chr8:99960580-99960630 |
| 237 | OTX1.R | chr2:63281481-63281599 |
| 238 | PAQR6 | chr1:156215470-156215739 |
| 239 | PCDH8 | chr13:53421299-53421322 |
| 240 | PDX1 | chr13:28498503-28498544 |
| 241 | PDXK_A | chr21:45148429-45148556 |
| 242 | PDXK_B | chr21:45148575-45148681 |
| 243 | PEAR1 | chr1:156863318-156863493 |
| 244 | PIF1 | chr15:65116285-65116597 |
| 245 | PLXNC1_A | chr12:94544327-94544503 |
| 246 | PLXNC1_B | chr12:94544333-94544426 |
| 247 | POU4F1 | chr13:79177505-79177532 |
| 248 | PPARA | chr22:46545328-46545457 |

[0460]

| | | |
|-----|-------------|---------------------------|
| 249 | PPARG | chr3:12330042-12330152 |
| 250 | PPP1R16B_A | chr20:37435507-37435716 |
| 251 | PPP1R16B_B | chr20:37435738-37435836 |
| 252 | PPP2R5C | chr14:102247681-102247929 |
| 253 | PRDM13_A | chr6:100061616-100061742 |
| 254 | PRDM13_B | chr6:100061748-100061792 |
| 255 | PRHOXNB | chr13:28552424-28552562 |
| 256 | PRKCB | chr16:23847575-23847699 |
| 257 | PRMT1 | chr19:50179501-50179635 |
| 258 | PROM1 | chr4:16084793-16085112 |
| 259 | PTPRM | chr18:7568565-7568808 |
| 260 | PTPRN2 | chr7:157483341-157483429 |
| 261 | RASGRF2 | chr5:80256117-80256162 |
| 262 | RBFOX3_A | chr17:77179579-77179752 |
| 263 | RBFOX3_B | chr17:77179778-77180064 |
| 264 | RFX8 | chr2:102090934-102091130 |
| 265 | RGS17 | chr6:153452120-153452393 |
| 266 | RIC3.F | chr11:8190622-8190711 |
| 267 | RIPPLY2 | chr6:84563228-84563287 |
| 268 | RYR2_A | chr1:237205369-237205428 |
| 269 | RYR2_B | chr1:237205619-237205640 |
| 270 | SALL3 | chr18:76739321-76739404 |
| 271 | SBNO2 | chr19:1131795-1131992 |
| 272 | SCRT2_A | chr20:644533-644618 |
| 273 | SCRT2_B | chr20:644573-644618 |
| 274 | SERPINB9_A | chr6:2902941-2902998 |
| 275 | SERPINB9_B | chr6:2903031-2903143 |
| 276 | SLC16A3.F | chr17:80189895-80189962 |
| 277 | SLC22A20.FR | chr11:64993239-64993292 |
| 278 | SLC2A2 | chr3:170746149-170746208 |
| 279 | SLC30A10 | chr1:220101458-220101634 |
| 280 | SLC7A4 | chr22:21386780-21386831 |
| 281 | SLC8A3 | chr14:70654596-70654640 |
| 282 | SLITRK5.R | chr13:88329960-88330076 |
| 283 | SNCA | chr4:90758071-90758118 |
| 284 | SPHK2 | chr19:49127580-49127683 |
| 285 | ST8SIA4 | chr5:100240059-100240276 |
| 286 | STAC2_A | chr17:37381217-37381303 |
| 287 | STAC2_B | chr17:37381689-37381795 |
| 288 | STX16_A | chr20:57224798-57224975 |
| 289 | STX16_B | chr20:57225077-57225227 |

| | | |
|-----|-----------|---------------------------|
| 290 | SYN2 | chr3:12045894-12045967 |
| 291 | SYNJ2 | chr6:158402213-158402536 |
| 292 | SYT5 | chr19:55690401-55690496 |
| 293 | TAL1 | chr1:47697702-47697882 |
| 294 | TBKBP1 | chr17:45772630-45772726 |
| 295 | TBX1 | chr22:19754257-19754550 |
| 296 | TEPP | chr16:58018790-58018831 |
| 297 | TIMP2 | chr17:76921762-76921779 |
| 298 | TLX1NB | chr10:102881178-102881198 |
| 299 | TMEFF2 | chr2:193060012-193060126 |
| 300 | TMEM176A | chr7:150497411-150497535 |
| 301 | TNFRSF10D | chr8:23020896-23021114 |
| 302 | TOX | chr8:60030723-60030754 |
| 303 | TRH_A | chr3:129693484-129693575 |
| 304 | TRH_B | chr3:129694457-129694501 |
| 305 | TRIM67 | chr1:231297047-231297159 |
| 306 | TRIM71_A | chr3:32858861-32858897 |
| 307 | TRIM71_B | chr3:32859445-32859559 |
| 308 | TRIM71_C | chr3:32860020-32860090 |
| 309 | TSHZ3 | chr19:31839809-31840038 |
| 310 | UBTF | chr17:42287924-42288018 |
| 311 | ULBP1 | chr6:150285563-150285661 |
| 312 | USP44_A | chr12:95942148-95942178 |
| 313 | USP44_B | chr12:95942519-95942558 |
| 314 | UTF1 | chr10:135044125-135044171 |
| 315 | UTS2R | chr17:80329497-80329534 |
| 316 | VIPR2 | chr7:158937370-158937481 |
| 317 | VN1R2 | chr19:53758121-53758147 |
| 318 | VSNL1 | chr2:17720216-17720257 |
| 319 | VSTM2B_A | chr19:30016283-30016357 |
| 320 | VSTM2B_B | chr19:30017789-30018165 |
| 321 | ZBTB16 | chr11:113929882-113930166 |
| 322 | ZFP64 | chr20:50721057-50721235 |
| 323 | ZNF132 | chr19:58951402-58951775 |
| 324 | ZNF486 | chr19:20278004-20278145 |
| 325 | ZNF626 | chr19:20844070-20844199 |
| 326 | ZNF671 | chr19:58238810-58238955 |
| 327 | ZSCAN12 | chr6:28367128-28367509 |

[0461]

[0462] 表3.表3显示1)区分三阴性乳腺癌组织与正常乳腺组织的所鉴定甲基化区域的曲线下面积,2)三阴性乳腺癌组织相对于正常乳腺组织的倍数变化(FC),和3)三阴性乳腺癌组织相对于血沉棕黄层(正常)的倍数变化(FC)。

[0463]

| 基因注释 | 在染色体上的区域(起始碱基-结束碱基) | AUC | 相对于组织的倍数变化 | 相对于血清棕黄层的倍数变化 | DMR |
|------------------------------|---------------------------|--------|------------|--------------------|-----|
| ABLIM1 | chr10:116391588-116391793 | 0.821 | 9.187127 | 6.095762 | 3 |
| AJAP1_B | chr1:4715931-4716021 | 0.9358 | 33.64347 | 55.12195 | 7 |
| ASCL2 | chr11:2292240-2292361 | 0.9479 | 21.93763 | 13.66322 | 14 |
| ATP6V1B1 | chr2:71192354-71192453 | 1 | 2.711325 | 92.96954 | 15 |
| BANK1 | chr4:102711871-102712076 | 1 | 1.43525 | 61.96732 | 17 |
| CALN1_A | chr7:71801486-71801594 | 0.9346 | 17.12541 | 17.09291 | 36 |
| CALN1_B | chr7:71801741-71801800 | 0.8742 | 19.87087 | 36.73595 | 37 |
| CLIC6 | chr21:36042025-36042131 | 1 | 3.059621 | 93.40228 | 58 |
| DSCR6 | chr21:38378540-38378601 | 0.9641 | 16.80192 | 23.82779 | 72 |
| FOXP4 | chr6:41528816-41528958 | 1 | 1.645757 | >1x10 ⁶ | 96 |
| GAD2 | chr10:26505066-26505385 | 0.9134 | 29.30865 | 44.14014 | 98 |
| GCGR | chr17:79761970-79762088 | 0.9506 | 15.57835 | 9.860312 | 100 |
| GP5 | chr3:194118738-194118924 | 0.9961 | 1.942734 | 122.3962 | 104 |
| GRASP | chr12:52400919-52401166 | 0.9506 | 34.60851 | 58.57791 | 105 |
| HBM | chr16:216426-216451 | 0.9389 | 28.44886 | 28.4872 | 111 |
| HNF1B_B | chr17:36105390-36105448 | 1 | 2.492725 | 20.57995 | 116 |
| KLF16 | chr19:1857330-1857476 | 0.8785 | 19.65243 | 148.6852 | 145 |
| MAGI2 | chr7:79083359-79083600 | 0.9306 | 16.79564 | 5.734084 | 159 |
| MAX.chr11.14926602-14927148 | chr11:14926602-14927148 | 1 | 3.891519 | 87.49446 | 168 |
| MAX.chr12.4273906-4274012 | chr12:4273906-4274012 | 0.9815 | 20.08783 | 149.5817 | 170 |
| MAX.chr17.73073682-73073814 | chr17:73073682-73073814 | 0.9883 | 1.679173 | 72.85714 | 174 |
| MAX.chr18.76734362-76734370 | chr18:76734362-76734370 | 0.9641 | 24.69328 | 77.26996 | 177 |
| MAX.chr2.97193478-97193562 | chr2:97193478-97193562 | 0.9167 | 22.01754 | 119.8408 | 183 |
| MAX.chr22.42679578-42679917 | chr22:42679578-42679917 | 0.9375 | 27.34823 | 20.78761 | 189 |
| MAX.chr4.8859253-8859329 | chr4:8859253-8859329 | 0.9346 | 13.7246 | 93.86646 | 190 |
| MAX.chr4.8859602-8859669 | chr4:8859602-8859669 | 0.9632 | 11.5 | 27.44798 | 191 |
| MAX.chr4.8860002-8860038 | chr4:8860002-8860038 | 0.9491 | 20.16179 | 84.79759 | 192 |
| MAX.chr5.145725410-145725459 | chr5:145725410-145725459 | 0.933 | 12.88169 | 25.65149 | 193 |
| MAX.chr6.157557371-157557657 | chr6:157557371-157557657 | 1 | 6.19614 | 35.10826 | 204 |
| MPZ | chr1:161275561-161275996 | 0.9504 | 20.73901 | 191.2216 | 221 |
| NKX2-6 | chr8:23564115-23564146 | 0.9583 | 18.63167 | 38.06928 | 227 |
| PDX1 | chr13:28498503-28498544 | 0.9657 | 18.77193 | 64.6598 | 240 |
| PLXNC1_A | chr12:94544327-94544503 | 0.9449 | 4.617089 | 38.86521 | 245 |

| | | | | | | |
|--------|----------|---------------------------|--------|----------|----------|-----|
| [0464] | PPARG | chr3:12330042-12330152 | 0.9259 | 30.22681 | 10.42603 | 249 |
| | PRKCB | chr16:23847575-23847699 | 0.9281 | 20.45208 | 295.1076 | 256 |
| | PTPRN2 | chr7:157483341-157483429 | 0.9281 | 12.35294 | 32.67167 | 260 |
| | RBFOX3_A | chr17:77179579-77179752 | 0.9074 | 19.19924 | 18.24275 | 262 |
| | SCRT2_A | chr20:644533-644618 | 0.9321 | 18.30644 | 7.92126 | 272 |
| | SLC7A4 | chr22:21386780-21386831 | 0.9792 | 17.60673 | 23.649 | 280 |
| | STAC2_B | chr17:37381689-37381795 | 0.9074 | 26.95157 | 73.07841 | 287 |
| | STX16_A | chr20:57224798-57224975 | 1 | 1.36278 | 106.6599 | 288 |
| | STX16_B | chr20:57225077-57225227 | 1 | 1.593456 | 198.3707 | 289 |
| | TBX1 | chr22:19754257-19754550 | 0.8676 | 1.385844 | 35.45752 | 295 |
| | TRH_A | chr3:129693484-129693575 | 1 | 3.188452 | 67.015 | 303 |
| | VSTM2B_A | chr19:30016283-30016357 | 0.9246 | 27.51997 | 28.83311 | 319 |
| | ZBTB16 | chr11:113929882-113930166 | 0.9003 | 18.82877 | 26.23126 | 321 |
| | ZNF132 | chr19:58951402-58951775 | 0.9062 | 33.99015 | 85.56548 | 323 |
| | ZSCAN23 | chr6:28411152-28411272 | 0.9163 | 20.33657 | 59.21927 | 1 |

[0465] 表4.表4显示1) 区分HER2⁺乳腺癌组织与正常乳腺组织的所鉴定甲基化区域的曲线下面积, 2) HER2⁺乳腺癌组织相对于正常乳腺组织的倍数变化(FC), 和3) HER2⁺乳腺癌组织相对于血沉棕黄层(正常)的倍数变化(FC)。

| 基因注释 | 在染色体上的区域 (起始碱基-结束碱基) | AUC | 相对于组织的 倍数变化 | 相对于血沉 棕黄层的倍 数变化 | D M R | |
|--------|-------------------------|---------------------------|----------------|-----------------------|-------------|----|
| [0466] | ABLIM1 | chr10:116391588-116391793 | 0.9846 | 20.96881 | 13.91304 | 3 |
| | AFAP1L1 | chr5:148651161-148651242 | 0.9902 | 19.53202 | 21.58802 | 5 |
| | AKR1B1 | chr7:134143171-134143684 | 0.9537 | 31.02981 | 91.43744 | 8 |
| | ALOX5 | chr10:45914840-45914949 | 0.9522 | 30.50987 | 110.198 | 9 |
| | AMN | chr14:103394920-103395019 | 0.951 | 23.99824 | 172.1942 | 10 |
| | ARL5C | chr17:37321515-37321626 | 0.9526 | 23.90438 | 76.38447 | 13 |
| | BANK1 | chr4:102711871-102712076 | 1 | 1.178479 | 50.88113 | 17 |
| | BCAT1 | chr12:25055906-25055975 | 0.9641 | 17.75806 | 73.18046 | 18 |
| | BEGAIN | chr14:101033665-101033813 | 1 | 25.33593 | 29.59147 | 19 |
| | BEST4 | chr1:45251853-45252029 | 0.9753 | 40.07491 | 76.68804 | 20 |
| | BHLHE23_B | chr20:61638020-61638083 | 0.9765 | 33.01942 | 26.19353 | 22 |
| | BHLHE23_C | chr20:61638088-61638565 | 0.9938 | 37.3359 | 51.54664 | 23 |
| | C17orf64 | chr17:58499095-5849 | 0.9583 | 19.9771 | 281.2989 | 29 |

[0467]

| | | | | | |
|----------|---------------------------|--------|----------|----------|-----|
| | 9190 | | | | |
| C1QL2 | chr2:119916511-119916572 | 1 | 20.92054 | 20.81967 | 32 |
| C7orf52 | chr7:100823483-100823514 | 0.9967 | 34.66759 | 20.82363 | 35 |
| CALN1_B | chr7:71801741-71801800 | 0.9444 | 17.5999 | 32.5375 | 37 |
| CAV2 | chr7:116140205-116140342 | 0.9506 | 21.22966 | 20.87111 | 40 |
| CD8A | chr2:87017780-87017917 | 0.9907 | 20 | 21.32184 | 48 |
| CDH4_A | chr20:59827230-59827285 | 1 | 37.02782 | 42.86441 | 49 |
| CDH4_B | chr20:59827762-59827776 | 0.9907 | 22.76012 | 30.46422 | 50 |
| CDH4_C | chr20:59827794-59827868 | 1 | 24.72984 | 23.55503 | 51 |
| CDH4_D | chr20:59828193-59828258 | 0.9958 | 25.09787 | 28.16619 | 52 |
| CDH4_E | chr20:59828479-59828729 | 1 | 28.97206 | 36.79341 | 53 |
| CDH4_F | chr20:59828778-59828814 | 0.9969 | 36.81109 | 34.35411 | 54 |
| CHST2_B | chr3:142839223-142839568 | 1 | 34.72482 | 117.3308 | 57 |
| CLIP4 | chr2:29338109-29338339 | 0.9739 | 20.94282 | 46.96947 | 59 |
| CR1 | chr1:207669481-207669639 | 0.9691 | 28.25359 | 42.1256 | 61 |
| DLK1 | chr14:101193295-101193318 | 0.9692 | 31.7083 | 30.33924 | 65 |
| DNAJC6 | chr1:65731412-65731507 | 0.9691 | 35.40474 | 85.64082 | 68 |
| DNM3_A | chr1:171810393-171810575 | 0.9506 | 16.78657 | 101.8429 | 69 |
| EMX1_A | chr2:73151498-73151578 | 0.9923 | 14.73071 | 31.60031 | 74 |
| ESPN | chr1:6508784-6509175 | 1 | 7.096692 | 53.37799 | 77 |
| FABP5 | chr8:82192605-82192921 | 0.9475 | 18.49851 | 297.5222 | 81 |
| FAM150A | chr8:53478266-53478416 | 1 | 26.83744 | 30.32598 | 85 |
| FLJ42875 | chr1:2987037-2987116 | 0.9667 | 40.47655 | 36.2069 | 92 |
| GLP1R | chr6:39016381-39016421 | 0.9725 | 22.49606 | 24.93019 | 102 |
| GNG4 | chr1:235813658-235813798 | 0.9771 | 30.92768 | 28.97404 | 103 |
| GYPC_A | chr2:127413505-127413678 | 0.9568 | 20.44592 | 91.04351 | 108 |
| HAND2 | chr4:174450452-174450478 | 0.9804 | 15.73026 | 23.81474 | 110 |
| HES5 | chr1:2461823-246191 | 0.9383 | 31.91815 | 23.13591 | 112 |

[0468]

| | | | | | |
|------------------------------|---------------------------|--------|----------|----------|-----|
| | 5 | | | | |
| HNF1B_A | chr17:36103713-36103793 | 0.963 | 29.18949 | 39.45301 | 115 |
| HNF1B_B | chr17:36105390-36105448 | 1 | 3.593578 | 29.6686 | 116 |
| HOXA1_A | chr7:27135603-27135889 | 0.966 | 38.04738 | 137.2168 | 117 |
| HOXA1_B | chr7:27136191-27136244 | 0.9522 | 33.78035 | 144.6796 | 118 |
| HOXA7_A | chr7:27195742-27195895 | 0.9784 | 22.8203 | 34.64696 | 119 |
| HOXA7_B | chr7:27196032-27196190 | 1 | 27.92413 | 23.54393 | 120 |
| HOXA7_C | chr7:27196441-27196531 | 0.9896 | 20.14606 | 27.05282 | 121 |
| HOXD9 | chr2:176987716-176987739 | 0.9926 | 21.14973 | 31.76069 | 122 |
| IGF2BP3_A | chr7:23508901-23509225 | 0.9599 | 22.75591 | 108.9025 | 123 |
| IGF2BP3_B | chr7:23513817-23514114 | 0.9853 | 8.970018 | 75.12555 | 124 |
| IGSF9B_A | chr11:133825409-133825476 | 0.9691 | 13.84201 | 22.99205 | 126 |
| IL15RA | chr10:6018610-6018848 | 0.941 | 6.854012 | 58.47407 | 128 |
| INSM1 | chr20:20348140-20348182 | 0.9542 | 25.90248 | 26.65219 | 130 |
| ITPKA_B | chr15:41793928-41794003 | 0.9686 | 21.34743 | 23.96879 | 133 |
| ITPRIPL1 | chr2:96990968-96991328 | 0.963 | 31.10465 | 280.3382 | 134 |
| KCNE3 | chr11:74178260-74178346 | 0.9529 | 37.65937 | 30.48685 | 137 |
| KCNK17_B | chr6:39281408-39281478 | 0.966 | 31.5971 | 104.6458 | 140 |
| LIME1 | chr20:62369116-62369393 | 1 | 3.213465 | 75.53068 | 148 |
| LOC100132891 | chr8:72755897-72756295 | 0.9691 | 33.07259 | 53.92857 | 153 |
| LOC283999 | chr17:76227905-76227960 | 0.9837 | 14.82154 | 37.5134 | 155 |
| LY6H | chr8:144241547-144241557 | 0.9722 | 14.69706 | 28.21535 | 158 |
| MAST1 | chr19:12978399-12978642 | 0.9654 | 26.7166 | 37.34729 | 160 |
| MAX.chr1.158083198-158083476 | chr1:158083198-158083476 | 0.9907 | 35.99869 | 32.08705 | 161 |
| MAX.chr1.228074764-228074977 | chr1:228074764-228074977 | 0.9846 | 33.58852 | 37.24138 | 162 |
| MAX.chr1.46913931-46913950 | chr1:46913931-46913950 | 0.9784 | 27.23106 | 24.5654 | 164 |
| MAX.chr10.130 | chr10:130085265-130 | 1 | 23.65531 | 23.42432 | 167 |

[0469]

| | | | | | |
|---------------------------------------|-------------------------------|--------|----------|----------|-----|
| 085265-130085 312 | 085312 | | | | |
| MAX.chr11.686 22869-6862296 8 | chr11:68622869-6862 2968 | 1 | 72.19153 | 99.26843 | 169 |
| MAX.chr14.101 176106-101176 260 | chr14:101176106-1011 76260 | 0.9771 | 19.13125 | 42.66797 | 172 |
| MAX.chr15.968 89013-9688912 8 | chr15:96889069-9688 9128 | 0.9882 | 16.95179 | 32.0494 | 173 |
| MAX.chr17.823 0197-8230314 | chr17:8230197-82303 14 | 0.966 | 17.19388 | 40.39153 | 175 |
| MAX.chr19.463 79903-4638019 7 | chr19:46379903-4638 0197 | 0.9902 | 32.1749 | 31.74585 | 179 |
| MAX.chr2.9719 3163-97193287 | chr2:97193163-97193 287 | 0.9522 | 25.05757 | 666.7396 | 182 |
| MAX.chr2.9719 3478-97193562 | chr2:97193478-97193 562 | 0.9549 | 29.12281 | 158.5146 | 183 |
| MAX.chr20.178 4209-1784461 | chr20:1784209-17844 61 | 0.9784 | 60.31305 | 39.01045 | 185 |
| MAX.chr21.447 82441-4478249 8 | chr21:44782441-4478 2498 | 0.9688 | 16.58956 | 71.97633 | 186 |
| MAX.chr22.239 08718-2390878 2 | chr22:23908718-2390 8782 | 1 | 25.82947 | 20.84453 | 188 |
| MAX.chr5.1457 25410-1457254 59 | chr5:145725410-1457 25459 | 0.9969 | 14.69927 | 29.27086 | 193 |
| MAX.chr5.1789 57564-1789575 98 | chr5:178957564-1789 57598 | 0.9614 | 16.46627 | 42.22336 | 195 |
| MAX.chr5.1801 01084-1801010 94 | chr5:180101084-1801 01094 | 1 | 23.37255 | 25.00699 | 196 |
| MAX.chr5.4295 2185-42952280 | chr5:42952185-42952 280 | 0.966 | 16.77837 | 67.63893 | 197 |
| MAX.chr5.4299 4866-42994936 | chr5:42994866-42994 936 | 0.9112 | 4.703287 | 161.8831 | 198 |
| MAX.chr6.2706 4703-27064783 | chr6:27064703-27064 783 | 0.9537 | 20.54983 | 23.77734 | 205 |
| MAX.chr7.1526 22607-1526226 38 | chr7:152622607-1526 22638 | 0.9522 | 24.6674 | 20.98723 | 207 |
| MAX.chr8.1451 04132-1451042 18 | chr8:145104132-1451 04218 | 0.9641 | 23.94389 | 106.2614 | 211 |
| MAX.chr9.1364 74504-1364745 27 | chr9:136474504-1364 74527 | 0.951 | 20.88926 | 25.01507 | 215 |
| MCF2L2 | chr3:182896930-1828 97245 | 0.9753 | 20.09711 | 22.94148 | 216 |

[0470]

| | | | | | |
|-----------|---------------------------|--------|----------|----------|-----|
| MSX2P1 | chr17:56234436-56234516 | 0.9105 | 20.25101 | 185.2593 | 222 |
| NACAD | chr7:45128502-45128717 | 0.9583 | 24.13599 | 24.56509 | 223 |
| NID2_B | chr14:52535974-52536161 | 0.966 | 21.89118 | 30.61013 | 225 |
| NID2_C | chr14:52536192-52536328 | 0.9846 | 21.19688 | 35.70811 | 226 |
| ODC1 | chr2:10589075-10589243 | 0.9896 | 5.239957 | 199.2568 | 231 |
| OSR2_B | chr8:99952801-99952919 | 0.9599 | 24.39913 | 21.91589 | 235 |
| PAQR6 | chr1:156215470-156215739 | 0.9965 | 1.875785 | 35.09138 | 238 |
| PCDH8 | chr13:53421299-53421322 | 0.9907 | 14.32 | 28.05643 | 239 |
| PIF1 | chr15:65116285-65116597 | 0.9537 | 43.87855 | 44.78209 | 244 |
| PPARA | chr22:46545328-46545457 | 0.9896 | 1.934821 | 27.81555 | 248 |
| PPP2R5C | chr14:102247681-102247929 | 0.9969 | 40.41616 | 21.95545 | 252 |
| PRDM13_A | chr6:100061616-100061742 | 0.9537 | 24.24062 | 61.61066 | 253 |
| PRHOXNB | chr13:28552424-28552562 | 1 | 32.97143 | 25.41024 | 255 |
| PRKCB | chr16:23847575-23847699 | 0.9537 | 30.71429 | 443.1833 | 256 |
| RBFOX3_A | chr17:77179579-77179752 | 0.9846 | 21.15348 | 20.09964 | 262 |
| RBFOX3_B | chr17:77179778-77180064 | 0.9784 | 22.97297 | 38.87734 | 263 |
| RFX8 | chr2:102090934-102091130 | 0.9475 | 14.08461 | 61.73279 | 264 |
| SNCA | chr4:90758071-90758118 | 0.9622 | 14.42541 | 42.52051 | 283 |
| STAC2_A | chr17:37381217-37381303 | 0.9815 | 43.97999 | 23.61791 | 286 |
| STAC2_B | chr17:37381689-37381795 | 0.9938 | 59.47293 | 161.2592 | 287 |
| STX16_B | chr20:57225077-57225227 | 0.989 | 1.467485 | 182.6884 | 289 |
| SYT5 | chr19:55690401-55690496 | 0.9938 | 16.49149 | 33.17451 | 292 |
| TIMP2 | chr17:76921762-76921779 | 0.9568 | 17.75848 | 42.58231 | 297 |
| TMEFF2 | chr2:193060012-193060126 | 0.9753 | 17.97114 | 35.24222 | 299 |
| TNFRSF10D | chr8:23020896-23021114 | 0.9475 | 22.13556 | 107.3874 | 301 |
| TRH_B | chr3:129694457-129694501 | 1 | 18.95629 | 21.0275 | 304 |
| TRIM67 | chr1:231297047-231297159 | 1 | 23.47643 | 15.57769 | 305 |

| | | | | | | |
|--------|----------|---------------------------|--------|----------|----------|-----|
| [0471] | TRIM71_C | chr3:32860020-32860090 | 0.9826 | 28.31276 | 43.84559 | 308 |
| | USP44_A | chr12:95942148-95942178 | 0.9722 | 25.33383 | 22.23173 | 312 |
| | USP44_B | chr12:95942519-95942558 | 0.9688 | 29.71223 | 20.72773 | 313 |
| | UTF1 | chr10:135044125-135044171 | 0.9935 | 24.15274 | 23.83046 | 314 |
| | UTS2R | chr17:80329497-80329534 | 0.9896 | 37.98289 | 25.32411 | 315 |
| | VSTM2B_A | chr19:30016283-30016357 | 0.9654 | 57.09044 | 59.81456 | 319 |
| | VSTM2B_B | chr19:30017789-30018165 | 0.9673 | 32.07169 | 27.33698 | 320 |
| | ZFP64 | chr20:50721057-50721235 | 0.9506 | 27.53052 | 22.5886 | 322 |
| | ZNF132 | chr19:58951402-58951775 | 0.9804 | 39.76355 | 100.0992 | 323 |

[0472] 表5.表5显示1) 区分管腔A型乳腺癌组织与正常乳腺组织的所鉴定甲基化区域的曲线下面积,2) 管腔A型乳腺癌组织相对于正常乳腺组织的倍数变化 (FC), 和3) 管腔A型乳腺癌组织相对于血沉棕黄层 (正常) 的倍数变化 (FC)。

| 基因注释 | 在染色体上的区域 (起始碱基-结束碱基) | AUC | 相对于组织的倍数变化 | 相对于血沉棕黄层的倍数变化 | DMR | |
|--------|-------------------------|---------------------------|------------|---------------|----------|----|
| [0473] | ARL5C | chr17:37321515-37321626 | 0.9083 | 10.00664 | 31.97539 | 13 |
| | BHLHE23_C | chr20:61638088-61638565 | 0.9184 | 31.17451 | 43.04012 | 23 |
| | BMP6 | chr6:7727566-7727907 | 0.9248 | 33.44248 | 32.18487 | 26 |
| | C10orf125 | chr10:135171410-135171661 | 0.9816 | 5.951195 | 52.52747 | 27 |
| | C17orf64 | chr17:58499095-58499190 | 0.9414 | 9.129866 | 128.5583 | 29 |
| | C19orf66 | chr19:10197688-10197823 | 0.9288 | 3.629997 | 23.26103 | 31 |
| | CAMKV | chr3:49907259-49907298 | 0.9265 | 31.61795 | 34.87738 | 38 |
| | CD1D | chr1:158150864-158151129 | 0.9575 | 26.85386 | 35.71281 | 47 |
| | CDH4_E | chr20:59828479-59828729 | 0.9575 | 19.38124 | 24.61343 | 53 |
| | CDH4_F | chr20:59828778-59828814 | 0.9167 | 27.70653 | 25.85724 | 54 |

[0474]

| | | | | | |
|-----------|---------------------------|--------|----------|----------|-----|
| CHST2_A | chr3:142838025-142838494 | 0.9167 | 47.12016 | 106.0335 | 56 |
| CRHBP | chr5:76249939-76249997 | 0.9294 | 14.22073 | 22.1281 | 62 |
| DLX6 | chr7:96635255-96635475 | 0.9622 | 13.78623 | 28.53928 | 67 |
| DNM3_B | chr1:171810648-171810702 | 0.9087 | 29.14931 | 295.5986 | 70 |
| DNM3_C | chr1:171810806-171810920 | 0.9753 | 23.67912 | 99.77376 | 71 |
| DNM3_A | chr1:171810393-171810575 | 0.9134 | 21.31894 | 129.3404 | 69 |
| ESYT3 | chr3:138153979-138154071 | 0.9479 | 39.19083 | 37.19512 | 78 |
| ETS1_A | chr11:128391809-128391908 | 0.9089 | 40.45139 | 159.0444 | 79 |
| ETS1_B | chr11:128392062-128392309 | 0.8872 | 34.63309 | 188.3098 | 80 |
| FAM126A | chr7:23053941-23054066 | 0.9706 | 57.86891 | 65.82935 | 83 |
| FAM189A1 | chr15:29862130-29862169 | 0.9757 | 18.04237 | 28.53505 | 88 |
| FAM20A | chr17:66597237-66597326 | 0.9019 | 35.24514 | 24.36451 | 89 |
| FAM59B | chr2:26407713-26407972 | 0.9479 | 1.945513 | 103.9384 | 90 |
| FBN1 | chr15:48937412-48937541 | 0.9599 | 31.33933 | 27.92071 | 91 |
| FLRT2 | chr14:85998469-85998535 | 0.9428 | 15.80425 | 20.40157 | 93 |
| FMN2 | chr1:240255171-240255253 | 0.9294 | 27.79887 | 61.08723 | 94 |
| FOXP4 | chr6:41528816-41528958 | 1 | 1.388687 | #DIV/0! | 96 |
| GAS7 | chr17:10101325-10101397 | 0.9282 | 39.97585 | 23.28643 | 99 |
| GYPC_A | chr2:127413505-127413678 | 0.9379 | 16.91651 | 75.32742 | 108 |
| GYPC_B | chr2:127414096-127414189 | 0.9727 | 15.16704 | 832.1792 | 109 |
| HAND2 | chr4:174450452-174450478 | 0.9583 | 13.64474 | 20.65737 | 110 |
| HES5 | chr1:2461823-2461915 | 0.9111 | 21.96548 | 15.9217 | 112 |
| HMGA2 | chr12:66219385-66219487 | 0.9314 | 46.53533 | 21.43751 | 114 |
| HNF1B_B | chr17:36105390-36105448 | 0.9926 | 2.464626 | 20.34797 | 116 |
| IGF2BP3_B | chr7:23513817-2351 | 0.969 | 15.15625 | 99.58003 | 124 |

[0475]

| | | | | | |
|------------------------------|--------------------------|--------|----------|----------|-----|
| | 411 | | | | |
| IGF2BP3_A | chr7:23508901-23509225 | 0.9167 | 18.96654 | 90.76778 | 123 |
| KCNH8 | chr3:19189837-19189897 | 0.9821 | 26.86423 | 11.12219 | 138 |
| KCNK17_A | chr6:39281195-39281282 | 0.9111 | 64.74638 | 44.94467 | 139 |
| KCNQ2 | chr20:62103558-62103625 | 0.9379 | 15.9322 | 58.35214 | 142 |
| KLHDC7B | chr22:50987219-50987304 | 1 | 1.458785 | 126.5684 | 146 |
| LOC100132891 | chr8:72755897-72756295 | 0.9477 | 21.07843 | 34.37075 | 153 |
| MAX.chr1.46913931-46913950 | chr1:46913931-46913950 | 0.9074 | 23.06829 | 20.81013 | 164 |
| MAX.chr11.68622869-68622968 | chr11:68622869-68622968 | 0.9395 | 46.67485 | 64.1812 | 169 |
| MAX.chr12.4273906-4274012 | chr12:4273906-4274012 | 0.9379 | 20.87418 | 155.4373 | 170 |
| MAX.chr12.59990591-59990895 | chr12:59990591-59990895 | 0.8807 | 14.01947 | 21.10553 | 171 |
| MAX.chr17.73073682-73073814 | chr17:73073682-73073814 | 0.9449 | 1.052067 | 45.64784 | 174 |
| MAX.chr20.1783841-1784054 | chr20:1783841-1784054 | 0.9074 | 27.09573 | 22.06724 | 184 |
| MAX.chr21.47063802-47063851 | chr21:47063802-47063851 | 0.9757 | 16.51515 | 79.7561 | 187 |
| MAX.chr4.8860002-8860038 | chr4:8860002-8860038 | 0.9363 | 16.17858 | 68.04479 | 192 |
| MAX.chr5.172234248-172234494 | chr5:172234248-172234494 | 0.9201 | 1.531023 | 83.07827 | 194 |
| MAX.chr5.178957564-178957598 | chr5:178957564-178957598 | 0.9392 | 11.40949 | 29.25659 | 195 |
| MAX.chr6.130686865-130686985 | chr6:130686865-130686985 | 0.9583 | 39.03866 | 37.31522 | 202 |
| MAX.chr8.687688-687736 | chr8:687688-687736 | 0.9286 | 24.48762 | 22.46817 | 212 |

[0476]

| | | | | | |
|--------------------------------|------------------------------|--------|----------|----------|-----|
| MAX.chr8. 688863-688 924 | chr8:688863-688924 | 0.9303 | 15.25862 | 30.30423 | 213 |
| MAX.chr9. 114010-114 207 | chr9:114010-114207 | 0.9085 | 25.1809 | 34.53142 | 214 |
| MPZ | chr1:161275561-161 275996 | 0.933 | 36.3026 | 503.8832 | 221 |
| NID2_A | chr14:52535260-525 35353 | 0.9316 | 29.32631 | 35.83691 | 224 |
| NKX2-6 | chr8:23564115-2356 4146 | 0.908 | 15.67986 | 32.03798 | 227 |
| ODC1 | chr2:10589075-1058 9243 | 1 | 5.298588 | 201.4864 | 231 |
| OSR2_A | chr8:99952233-9995 2366 | 0.951 | 17.65456 | 23.40924 | 234 |
| POU4F1 | chr13:79177505-791 77532 | 0.9241 | 14.6281 | 25.83187 | 247 |
| PRDM13_B | chr6:100061748-100 061792 | 0.9549 | 22.67697 | 52.7912 | 254 |
| PRKCB | chr16:23847575-238 47699 | 0.9248 | 26.98915 | 389.4325 | 256 |
| RASGRF2 | chr5:80256117-8025 6162 | 0.9327 | 24.29321 | 45.671 | 261 |
| RIPPLY2 | chr6:84563228-8456 3287 | 0.9216 | 20.4497 | 24 | 267 |
| SLC30A10 | chr1:220101458-220 101634 | 0.9346 | 21.20187 | 19.7307 | 279 |
| ST8SIA4 | chr5:100240059-100 240276 | 1 | 1.754394 | 257.6766 | 285 |
| SYN2 | chr3:12045894-1204 5967 | 0.9232 | 22.95533 | 31.86263 | 290 |
| TRIM71_A | chr3:32858861-3285 8897 | 0.9184 | 15.38071 | 50.65283 | 306 |
| TRIM71_B | chr3:32859445-3285 9559 | 0.9375 | 15.41597 | 43.92036 | 307 |
| TRIM71_C | chr3:32860020-3286 0090 | 0.9115 | 25.64374 | 39.71231 | 308 |
| UBTF | chr17:42287924-422 88018 | 1 | 2.648869 | 421.8795 | 310 |
| ULBP1 | chr6:150285563-150 285661 | 0.902 | 16.53425 | 26.75089 | 311 |
| USP44_B | chr12:95942519-959 42558 | 0.975 | 29.4964 | 20.57716 | 313 |
| VSTM2B_A | chr19:30016283-300 16357 | 0.9283 | 34.40535 | 36.04704 | 319 |

[0477] 表6.表6显示1) 区分管腔B型乳腺癌组织与正常乳腺组织的所鉴定甲基化区域的曲线下面积,2) 管腔B型乳腺癌组织相对于正常乳腺组织的倍数变化(FC),和3) 管腔B型乳腺癌组织相对于血沉棕黄层(正常)的倍数变化(FC)。

[0478]

| 基因注释 | 在染色体上的区域(起始碱基-结束碱基) | AUC | 相对于组织的倍数变化 | 相对于血沉棕黄层的倍数变化 | DM R |
|-----------------------------|---------------------------|--------|------------|---------------|------|
| ACCN1 | chr17:31620207-31620314 | 0.9198 | 23.85808 | 9.167347 | 4 |
| AJAP1_A | chr1:4715535-4715646 | 0.9815 | 24.85037 | 23.66546 | 6 |
| AJAP1_B | chr1:4715931-4716021 | 0.9491 | 33.32713 | 54.60366 | 7 |
| BEST4 | chr1:45251853-45252029 | 0.9059 | 32.89966 | 62.95737 | 20 |
| CALN1_B | chr7:71801741-71801800 | 0.9059 | 16.99878 | 31.42622 | 37 |
| CBLN1_B | chr16:49316198-49316258 | 0.933 | 15.66904 | 39.58407 | 42 |
| CDH4_E | chr20:59828479-59828729 | 0.9259 | 17.19561 | 21.83777 | 53 |
| DLX4 | chr17:48042562-48042606 | 1 | 3.346919 | 60.11236 | 66 |
| FOXP4 | chr6:41528816-41528958 | 1 | 1.056007 | #DIV/0! | 96 |
| IGSF9B_B | chr11:133825491-133825530 | 0.9815 | 21.1913 | 21.56637 | 127 |
| ITPRIPL1 | chr2:96990968-96991328 | 0.9074 | 21.92125 | 197.5706 | 134 |
| KCNA1 | chr12:5019401-5019633 | 0.9414 | 53.02013 | 39.91732 | 136 |
| KLF16 | chr19:1857330-1857476 | 0.8791 | 12.18471 | 92.18633 | 145 |
| LMX1B_A | chr9:129388175-129388223 | 0.9965 | 2.639923 | 62.01749 | 149 |
| MAST1 | chr19:12978399-12978642 | 0.9706 | 16.13892 | 22.56069 | 160 |
| MAX.chr11.14926602-14927148 | chr11:14926602-14927148 | 1 | 3.646943 | 81.99557 | 168 |
| MAX.chr17.73073682-73073814 | chr17:73073682-73073814 | 0.9514 | 1.236217 | 53.63787 | 174 |
| MAX.chr18.76734362-76734476 | chr18:76734362-76734476 | 0.9414 | 15.62804 | 48.90311 | 177 |

[0479]

| | | | | | |
|--------------------------------------|------------------------------|--------|----------|----------|-----|
| MAX.chr19.30 719261-307193 54 | chr19:30719261 -30719354 | 0.9101 | 23.15574 | 21.34761 | 178 |
| MAX.chr22.42 679578-426799 17 | chr22:42679578 -42679917 | 0.963 | 28.63358 | 21.76462 | 189 |
| MAX.chr4.886 0002-8860038 | chr4:8860002-8 860038 | 0.9259 | 17.90907 | 75.323 | 192 |
| MAX.chr5.145 725410-145725 459 | chr5:145725410 -145725459 | 0.9012 | 10.81956 | 21.54514 | 193 |
| MAX.chr5.178 957564-178957 598 | chr5:178957564 -178957598 | 0.9028 | 14.08818 | 36.12539 | 195 |
| MAX.chr5.772 68672-7726872 5 | chr5:77268672- 77268725 | 0.9228 | 16.4233 | 39.91228 | 199 |
| MAX.chr8.124 173128-124173 268 | chr8:124173128 -124173268 | 0.9105 | 12.93676 | 45.59879 | 209 |
| MPZ | chr1:161275561 -161275996 | 0.9653 | 19.98003 | 184.2234 | 221 |
| PPARA | chr22:46545328 -46545457 | 0.9931 | 1.592475 | 22.89388 | 248 |
| PRMT1 | chr19:50179501 -50179635 | 0.8837 | 11.53981 | 25.86275 | 257 |
| RBFOX3_B | chr17:77179778 -77180064 | 0.9012 | 18.327 | 31.01493 | 263 |
| RYR2_A | chr1:237205369 -237205428 | 0.9392 | 21.32044 | 25 | 268 |
| SALL3 | chr18:76739321 -76739404 | 0.96 | 58.85028 | 60.07958 | 270 |
| SCRT2_A | chr20:644533-6 44618 | 0.9871 | 19.11925 | 8.272966 | 272 |
| SPHK2 | chr19:49127580 -49127683 | 0.9753 | 38.67547 | 42.87091 | 284 |
| STX16_B | chr20:57225077 -57225227 | 1 | 1.503476 | 187.169 | 289 |
| SYNJ2 | chr6:158402213 -158402536 | 1 | 1.81213 | 79.15141 | 291 |
| TMEM176A | chr7:150497411 -150497535 | 0.8719 | 18.02734 | 13.07736 | 300 |
| TSHZ3 | chr19:31839809 -31840038 | 0.9475 | 19.63569 | 29.13422 | 309 |
| VIPR2 | chr7:158937370 -158937481 | 0.9537 | 28.49829 | 22.56321 | 316 |

[0480] 表7.表7显示1)区分BRCA1乳腺癌组织与正常乳腺组织的所鉴定甲基化区域的曲线下面积,2)BRCA1乳腺癌组织相对于正常乳腺组织的倍数变化(FC),和3)BRCA1乳腺癌组

织相对于血沉棕黄层(正常)的倍数变化(FC)。

[0481]

| 基因注释 | 在染色体上的区域 (起始碱基-结束碱基) | AUC | 相对于组织的 倍数变化 | 相对于血沉 棕黄层的倍 数变化 | DMR 编号 |
|-----------------------------|---------------------------|------------|----------------|-----------------------|-----------|
| C10orf93 | chr10:134756078-134756167 | 1 | 35.64082278 | 21.3938 | 28 |
| C20orf195_A | chr20:62185293-62185364 | 0.953 7 | 25.6624628 | 88.34146 | 33 |
| C20orf195_B | chr20:62185418-62185546 | 0.953 7 | 31.08894431 | 47.34177 | 34 |
| CALN1_B | chr7:71801741-71801800 | 1 | 22.4757876 | 41.55176 | 37 |
| CBLN1_A | chr16:49315588-49315691 | 1 | 23.38948327 | 22.60229 | 41 |
| CBLN1_B | chr16:49316198-49316258 | 0.981 5 | 27.353707 | 71.4388 | 42 |
| CCDC61 | chr19:46519467-46519536 | 0.966 7 | 48.80498092 | 67.25713 | 43 |
| CCND2 | chr12:4378317-4378375 | 0.933 3 | 16.28123545 | 100.7685 | 44 |
| CCND2 | chr12:4380560-4380681 | 0.951 | 10.56487202 | 70.74468 | 45 |
| CCND2 | chr12:4384096-4384146 | 0.990 7 | 25.60667341 | 76.22272 | 46 |
| EMX1_B | chr2:73151663-73151756 | 0.983 3 | 13.75989446 | 30.57754 | 75 |
| FAM150B | chr2:287868-287919 | 0.930 6 | 32.67264761 | 21.96353 | 86 |
| GRASP | chr12:52400919-52401166 | 0.925 9 | 28.3875581 | 48.04841 | 105 |
| HBM | chr16:216426-216451 | 0.970 6 | 35.04374159 | 35.09097 | 111 |
| ITPRIPL1 | chr2:96990968-96991328 | 1 | 17.39816032 | 163.0944 | 134 |
| KCNK17_A | chr6:39281195-39281282 | 0.958 3 | 36.55797101 | 25.37726 | 139 |
| KIAA1949 | chr6:30646976-30647084 | 0.955 6 | 30.04064322 | 173.3102 | 143 |
| LOC100131176 | chr7:151106986-151107060 | 1 | 16.94187139 | 29.40354 | 152 |
| MAST1 | chr19:12978399-12978642 | 1 | 19.30541369 | 26.98715 | 160 |
| MAX.chr1.8277285-8277316 | chr1:8277285-8277316 | 0.981 5 | 31.30790191 | 52.33035 | 165 |
| MAX.chr1.8277479-8277527 | chr1:8277479-8277527 | 1 | 18.61607143 | 45.48146 | 166 |
| MAX.chr11.14926602-14927148 | chr11:14926602-14927148 | 1 | 4.590639238 | 107.8495 | 168 |

[0482]

| | | | | | |
|------------------------------|--------------------------|--------|-------------|----------|-----|
| MAX.chr15.96889013-96889128 | chr15:96889013-96889128 | 0.9778 | 18.09917355 | 35.80772 | 173 |
| MAX.chr18.5629721-5629791 | chr18:5629721-5629791 | 0.9375 | 17.83216783 | 20.53691 | 177 |
| MAX.chr19.30719261-30719354 | chr19:30719261-30719354 | 1 | 33.50409836 | 30.88791 | 178 |
| MAX.chr22.42679578-42679917 | chr22:42679578-42679917 | 0.9778 | 37.74834437 | 39.34049 | 189 |
| MAX.chr5.178957564-178957598 | chr5:178957564-178957598 | 1 | 22.21108884 | 56.95444 | 195 |
| MAX.chr5.77268672-77268725 | chr5:77268672-77268725 | 0.9074 | 15.49630845 | 37.65949 | 199 |
| MAX.chr6.157556793-157556856 | chr6:157556793-157556856 | 0.9778 | 33.75787815 | 33.87352 | 203 |
| MAX.chr8.124173030-124173395 | chr8:124173030-124173395 | 1 | 23.47893058 | 63.5876 | 208 |
| MN1 | chr22:28197962-28198388 | 0.9352 | 23.36568394 | 26.69456 | 220 |
| MPZ | chr1:161275561-161275996 | 0.8519 | 49.15590864 | 856.6978 | 221 |
| NR2F6 | chr19:17346428-17346459 | 1 | 13.02466029 | 353.7936 | 228 |
| PDXK_A | chr21:45148429-45148556 | 0.9722 | 75.55254849 | 229.9245 | 241 |
| PDXK_B | chr21:45148575-45148681 | 0.9778 | 24.6031746 | 68.40522 | 242 |
| PTPRM | chr18:7568565-7568808 | 1 | 27.52463054 | 20.36446 | 259 |
| RYR2_B | chr1:237205619-237205640 | 0.95 | 21.12877583 | 25.85603 | 269 |
| SERPINB9_A | chr6:2902941-2902998 | 0.9907 | 28.33433917 | 27.88833 | 274 |
| SERPINB9_B | chr6:2903031-2903143 | 0.9769 | 25.91687042 | 40.06479 | 275 |
| SLC8A3 | chr14:70654596-70654640 | 0.9706 | 16.90022757 | 46.84595 | 281 |
| STX16_B | chr20:57225077-57225227 | 1 | 1.678527607 | 208.9613 | 289 |
| TEPP | chr16:58018790-58018831 | 0.9222 | 14.38988095 | 44.1351 | 296 |
| TOX | chr8:60030723-60030754 | 0.9537 | 13.484375 | 86.64659 | 302 |
| VIPR2 | chr7:158937370-158937481 | 0.9074 | 30.22915651 | 23.9336 | 316 |
| VSTM2B_A | chr19:30016283-30016357 | 0.9853 | 42.3267861 | 44.34645 | 319 |
| ZNF486 | chr19:20278004-20278145 | 1 | 28.7755102 | 40.02498 | 324 |
| ZNF626 | chr19:20844070-20844199 | 1 | 72.64705882 | 47.34274 | 325 |
| ZNF671 | chr19:58238810-58238955 | 1 | 30.69748581 | 235.6787 | 326 |

[0483] 表8. 表8显示1) 区分BRCA2乳腺癌组织与正常乳腺组织的所鉴定甲基化区域的曲线下面积, 2) BRCA2乳腺癌组织相对于正常乳腺组织的倍数变化 (FC), 和3) BRCA2乳腺癌组

织相对于血沉棕黄层(正常)的倍数变化(FC)。

[0484]

| 基因注释 | 在染色体上的区域 (起始碱基-结束碱基) | AUC | 相对于组织的倍数变化 | 相对于血沉棕黄层的倍数变化 | DMR 编号 |
|-----------|--------------------------|--------|------------------|------------------|--------|
| ANTXR2 | chr4:80993475-8093634 | 0.9074 | 28.18115 | 48.41438 | 12 |
| B3GNT5 | chr3:182971589-182971825 | 0.9136 | 118.1266 | 122.9242 | 16 |
| BHLHE23_A | chr20:61637950-61637986 | 0.9948 | 21.22272 | 21.07755 | 21 |
| BMP4 | chr14:54421578-54421916 | 0.9815 | 45.77028 | 21.74194 | 25 |
| CHRNA7 | chr15:32322830-32322897 | 1 | 349.4748 | 29.49189 | 55 |
| EPHA4 | chr2:222436217-222436320 | 0.9236 | 58.94207 | 21.52714 | 76 |
| FAM171A1 | chr10:15412558-15412652 | 0.9087 | 51.57005 | 26.28231 | 87 |
| FAM20A | chr17:66597237-66597326 | 0.996 | 30.89732 | 21.35891 | 89 |
| FMNL2 | chr2:153192734-153192836 | 0.9028 | 53.3376 | 24.66469 | 95 |
| FSCN1 | chr7:5633506-5633615 | 0.9028 | 25.15063 | 30.87569 | 97 |
| GSTP1 | chr11:67350986-67351055 | 0.9 | $>1 \times 10^6$ | $>1 \times 10^6$ | 107 |
| HBM | chr16:216426-216451 | 0.9 | 22.7961 | 22.82682 | 111 |
| IGFBP5 | chr2:217559103-217559244 | 0.9722 | 59.11994 | 22.99517 | 125 |
| IL17REL | chr22:50453462-50453555 | 1 | 28.30452 | 28.99172 | 129 |
| ITGA9 | chr3:37493895-37493994 | 0.9706 | 43.32188 | 35.86874 | 131 |
| ITPRIPL1 | chr2:96990968-96991328 | 0.9583 | 14.7331 | 147.0693 | 134 |
| KIRREL2 | chr19:36347825-36347863 | 0.9853 | 45.39026 | 35.4729 | 144 |
| LRRC34 | chr3:169530006-169530139 | 0.9306 | 22.69192 | 30.27401 | 156 |
| MAX.chr1. | chr1:239549742-23 | 0.916 | 20.67734 | 21.47568 | 163 |

[0485]

| | | | | | |
|------------------------------|--------------------------|--------|----------|----------|-----|
| 239549742-239549886 | 9549886 | | | | |
| MAX.chr1.8277479-8277527 | chr1:8277479-8277527 | 0.8333 | 13.25255 | 32.37769 | 166 |
| MAX.chr11.14926602-14927148 | chr11:14926602-14927148 | 0.9922 | 3.97073 | 93.28576 | 168 |
| MAX.chr15.96889013-96889128 | chr15:96889013-96889128 | 0.9514 | 8.454545 | 16.72662 | 173 |
| MAX.chr2.238864674-238864735 | chr2:238864674-238864735 | 0.9762 | 27.89736 | 28.99259 | 181 |
| MAX.chr5.81148300-81148332 | chr5:81148300-81148332 | 0.9583 | 12.50391 | 24.59992 | 200 |
| MAX.chr7.151145632-151145743 | chr7:151145632-151145743 | 0.9444 | 8.972603 | 58.5148 | 206 |
| MAX.chr8.124173030-124173395 | chr8:124173030-124173395 | 0.9306 | 7.530176 | 56.77946 | 208 |
| MAX.chr8.143533298-143533558 | chr8:143533298-143533558 | 0.9097 | 32.741 | 20.5064 | 210 |
| MERTK | chr2:112656676-112656744 | 0.9222 | 27.51721 | 62.09376 | 217 |
| MPZ | chr1:161275561-161275996 | 0.9236 | 33.56504 | 584.9775 | 221 |
| NID2_C | chr14:52536192-52536328 | 0.9236 | 13.44693 | 22.6526 | 226 |
| NTRK3 | chr15:88800287-88800414 | 0.9167 | 20.89983 | 28.86352 | 229 |
| OLIG3_A | chr6:137818896-137818917 | 0.9198 | 15.98856 | 20.54162 | 232 |
| OLIG3_B | chr6:137818978-137818988 | 0.9012 | 11.04806 | 20.26448 | 233 |
| OSR2_C | chr8:99960580-99960630 | 0.9136 | 19.58805 | 32.89474 | 236 |
| PROM1 | chr4:16084793-16085112 | 0.9583 | 32.17623 | 41.64147 | 258 |
| RGS17 | chr6:153452120-153452393 | 0.9028 | 24.55645 | 20.63008 | 265 |
| SBNO2 | chr19:1131795-1131992 | 0.9012 | 58.01495 | 69.1242 | 271 |
| STX16_B | chr20:57225077-57225227 | 1 | 1.597137 | 98.8289 | 289 |
| TBKBP1 | chr17:45772630-45 | 0.9559 | 21.05769 | 41.61125 | 294 |

| | | | | | | |
|--------|--------|---------------------------|--------|----------|----------|-----|
| | 772726 | | | | | |
| [0486] | TLX1NB | chr10:102881178-102881198 | 0.9074 | 22.34146 | 128.8689 | 298 |
| | VIPR2 | chr7:158937370-158937481 | 0.9074 | 26.0117 | 20.59448 | 316 |
| | VN1R2 | chr19:53758121-53758147 | 0.9583 | 17.79366 | 22.4549 | 317 |
| | VSNL1 | chr2:17720216-17720257 | 0.9485 | 59.26645 | 43.69099 | 318 |
| | ZFP64 | chr20:50721057-50721235 | 0.9167 | 25.93427 | 21.27889 | 322 |

[0487] 表9.表9显示1) 区分侵袭性乳腺癌组织与正常乳腺组织的所鉴定甲基化区域的曲线下面积, 2) 侵袭性乳腺癌组织相对于正常乳腺组织的倍数变化 (FC), 和3) 侵袭性乳腺癌组织相对于血沉棕黄层 (正常) 的倍数变化 (FC)。

| 基因 | 在染色体上的区域 (起始碱基-结束碱基) | AUC | 相对于组织的倍数变化 | 相对于血沉棕黄层的倍数变化 | DMR 编号 | |
|--------|------------------------------|--------------------------|------------|---------------|----------|-----|
| [0488] | CDH4_E | chr20:59828479-59828729 | 0.9319 | 24.19 | 24.91762 | 53 |
| | FLJ42875 | chr1:2987037-2987116 | 0.9012 | 36.28 | 26.33723 | 92 |
| | GAD2 | chr10:26505066-26505385 | 0.9016 | 25.3 | 33.18529 | 98 |
| | GRASP | chr12:52400919-52401166 | 0.9311 | 40.47 | 56.12708 | 105 |
| | ITPRIPL1 | chr2:96990968-96991328 | 0.91 | 32.57 | 236.8703 | 134 |
| | KCNA1 | chr12:5019401-5019633 | 0.9147 | 55.3 | 35.34681 | 136 |
| | MAX.chr12.4273906-4274012 | chr12:4273906-4274012 | 0.939 | 25.47 | 153.0038 | 170 |
| | MAX.chr18.76734362-76734476 | chr18:76734362-76734476 | 0.9304 | 21.29 | 55.1493 | 177 |
| | MAX.chr19.30719261-30719354 | chr19:30719261-30719354 | 0.9174 | 28.37 | 22.54408 | 178 |
| | MAX.chr4.8859602-8859669 | chr4:8859602-8859669 | 0.9211 | 11.78 | 24.06671 | 191 |
| | MAX.chr4.8860002-8860038 | chr4:8860002-8860038 | 0.9401 | 24.35 | 83.41947 | 192 |
| | MAX.chr5.145725410-145725459 | chr5:145725410-145725459 | 0.9266 | 14.46 | 23.92735 | 193 |
| | MAX.chr5.178957564-178957598 | chr5:178957564-178957598 | 0.9022 | 17.01 | 35.18328 | 195 |
| | MAX.chr5.77268672-77268725 | chr5:77268672-77268725 | 0.9044 | 16.79 | 34.23046 | 199 |

| | | | | | | |
|--------|----------|--------------------------|--------|-------|----------|-----|
| [0489] | MPZ | chr1:161275561-161275996 | 0.9007 | 56.97 | 527.027 | 221 |
| | NKX2-6 | chr8:23564115-23564146 | 0.9056 | 19.22 | 32.40724 | 227 |
| | PRKCB | chr16:23847575-23847699 | 0.9032 | 35.63 | 371.6895 | 256 |
| | RBFOX3_B | chr17:77179778-77180064 | 0.9241 | 22.81 | 32.30013 | 263 |
| | SALL3 | chr18:76739321-76739404 | 0.9136 | 66.21 | 56.29973 | 270 |
| | VSTM2B_A | chr19:30016283-30016357 | 0.9278 | 43.07 | 37.76572 | 319 |

[0490] 接着,对发现样品进行SYBR Green甲基化特异性PCR (qMSP) 以确认表2中所示的候选DMR的准确性和可重现性。此外,对冷冻低等级和高等级DCIS样品操作具有16种标志物的子集以测试适用性(22个高等级/CIS/P3 DCIS (乳腺导管原位癌);11个低等级/P1DCIS)。

[0491] 使用Methprimer软件(Li LC和Dahiya R.Bioinformatics.2002年11月;18(11):1427-31)设计针对标志区域中的每一者的qMSP引物。它们由IDT(Integrated DNA Technologies)合成。采用以下各物的稀释液对测定进行测试和优化(使用Roche LightCycler 480):经亚硫酸氢盐转化的普遍甲基化DNA以及经转化未甲基化DNA和经转化以及未转化白细胞DNA阴性对照(每种10ng)。向前推进的测定需要显示线性回归曲线,以及阴性对照值在最低标准(1.6个基因组拷贝)以下小于5倍。重新设计了遭受测定或对照失败的一些更具前景的DMR。在127个总设计之中(表10显示127个总设计的正向和反向引物序列信息),80个高性能MSP测定满足QC准则,并且被应用于样品。各自包括2-8个CpG的MSP引物序列被设计来提供一种评估样品中的甲基化的快速手段,因此,相比于试图靶向大多数辨别CpG的方式而具有扩增效率偏倚,靶向大多数辨别CpG将需要冗长的优化时间段。

[0492] 如发现RRBS章节中所述来纯化DNA,并且使用picogreen吸光度(Tecan/Invitrogen)加以定量。接着使用Zymo EZ-96甲基化试剂盒(Zymo Research),用亚硫酸氢钠处理2ug的样品DNA,并且加以纯化。使用384孔块体,在Roche 480 LightCyclers上扩增洗脱物质。每个板能够容纳2种标志物(以及标准物和对照),总计40个板。80个MSP测定具有不同最优扩增概况($T_m = 60、65$ 或 70°C),并且相应地加以分组。对于50个循环,使用LightCycler 480 SYBR I主混合物(Roche)和 $0.5\mu\text{mol}$ 的引物来操作20uL反应,并且通常通过拟合点18%绝对定量方法来分析。所有参数(噪声频带、阈值等)都在自动化宏指令中预先指定以避免使用者主观性。以基因组拷贝数表示的原始数据相对于输入DNA(β -肌动蛋白(β -actin))的量加以归一化。使用JMP对结果进行逻辑分析,并且显示为AUC值。运行十二种比较:每个乳腺癌亚型相对于正常乳腺,以及每个亚型相对于血沉棕黄层。此外,使用平均甲基化分数与中值甲基化分数两者计算每种比较的甲基化倍数变化比率(mFCR)(FCR = 癌症(甲基化拷贝数/ β -肌动蛋白拷贝数)/正常(甲基化拷贝数/ β -肌动蛋白拷贝数))。对于在基于血液的临床测试中评估标志物的潜力,这两种性能量度均是至关重要的。

[0493] >90%的测试标志物在AUC与FCR两个种类方面均产生优越性能,其中众多AUC超过0.90,癌症相对于正常组织FCR>10,并且癌症相对于血沉棕黄层FCR>50。

[0494] 表11显示相较于正常乳腺组织,区分基底/三阴性乳腺组织、HER2+乳腺组织、管腔A型乳腺组织、管腔B型乳腺组织、BRCA1乳腺组织和BRCA2乳腺组织的所鉴定80个甲基化区

域的曲线下面积。

[0495] 表12显示相较于正常血沉棕黄层,区分基底/三阴性乳腺组织、HER2+乳腺组织、管腔A型乳腺组织、管腔B型乳腺组织、BRCA1乳腺组织和BRCA2乳腺组织的所鉴定80个甲基化区域的曲线下面积。

[0496] 表13显示相较于正常乳腺组织,区分基底/三阴性乳腺组织、HER2+乳腺组织、管腔A型乳腺组织、管腔B型乳腺组织、BRCA1乳腺组织和BRCA2乳腺组织的所鉴定80个甲基化区域的甲基化倍数变化。

[0497] 表14显示相较于正常血沉棕黄层,区分基底/三阴性乳腺组织、HER2+乳腺组织、管腔A型乳腺组织、管腔B型乳腺组织、BRCA1乳腺组织和BRCA2乳腺组织的所鉴定80个甲基化区域的甲基化倍数变化。

[0498] 在高等级DCIS相对于低等级DCIS的比较中,16种测试标志物的AUC在0.57至0.92的范围内。两种标志物的若干组合在91%特异性下实现95%灵敏性(仅1个假阳性)(表15)。3种标志物的组合(SCRT2_B、ITPRIPL1、MAX.chr8.124173030-124173395)在91%特异性下具有100%灵敏性。

[0499] 表10.

[0500]

| 基因注释 | DMR 编号 | 正向引物5'-3' | SEQ ID NO: | 反向引物5'-3' | SEQ ID NO: |
|--------------|-----------|---|---------------|---|------------------|
| AADAT-RS | 2 | GAG TTT CGG CGG CGT TTT TCG | 1 | CGC TAC GTC TAA CTT CCC GCG C | 2 |
| ABLIM1-FS | 3 | TTT TCG ACG AGT AGG ATT GAA GAA GGA AC | 3 | GCG AAT CTA TCT ACC GAA ACG CGC T | 4 |
| AJAP1_A | 6 | TTT TGA TTT GTA ATA TAG AGG AAA GCG TCG T | 5 | GTA TAA ACG CGT AAA TAC CAA ACT AAA CGA A | 6 |
| AJAP1_B | 7 | GTT TCG AGA AAG GAG AAG GGG GAG C | 7 | ACT CCC AAC GAA AAC TTC GCA AAC G | 8 |
| ALOX5-RS | 9 | GTT TTT TGT CGG GAG TTA TTC GT | 9 | CCA AAA ATT AAA TTA AAA ACG CTA CGC A | 10 |
| ASCL2-RS | 14 | GTT TTA GGA GGG TGG GGC GT | 11 | AAC ACG ACT ATT CGA AAA ACG CGC A | 12 |
| ATP6V1B1-RS | 15 | TTC GTA GTA TCG GGA GTC GA | 13 | GAA ATA ATA AAA ACG CCG CAC GCT | 14 |
| BANK1-FS | 17 | GTC GTA GTT TTC GCG GGT GGT AAG C | 15 | CGA ACG CTA CCT AAA CTC TCC CGA C | 16 |
| BEST4-RS | 20 | GGA ATC GCG AGT TTT GGG ATA GTC G | 17 | AAA TAC AAT TAC ACC CTC TAC CGC C | 18 |
| BHLHE23_C | 23 | GAG GCG TTC GGT GGG ATT TC | 19 | CCC CGA CCT ATA AAC CTA CGA CGC T | 20 |
| BHLHE23_D | 24 | GAG GAG GTA GCG GGC GTC GA | 21 | CGC GTC GAT CTA ACT TAC CTA CGA A | 22 |
| C10orf125-FS | 27 | TTG CGT TTA TCG ATT TCG TTT TCG T | 23 | GCA CTA CTA TCC CCC GAA CTA CTC TAC GC | 24 |
| C17orf64-RS | 29 | TTA TTA GGC GGG GAG TCG GGT GTC | 25 | CTC GAA TCC CTA AAA AAC TCG CGA A | 26 |
| C19orf66-FS | 31 | AGG AAA TTC GGT AGC GAT TAT ACG G | 27 | AAA CCC CTA CAA CCT CAC CGT ACA CGA T | 28 |
| CALN1_A | 36 | CGG AGT TAA TAG GTA CGG GAG GCG T | 29 | CAA ACC CCC GAA CTA TCG CGA A | 30 |
| CAPN2-FS | 39 | CGG GTA TCG CGG TTA AGT TGG C | 31 | TAT CGT AAA AAC CCA ACC CCT CGA C | 32 |
| CD1D-FS | 47 | GGG ATT GGT GAG ATT CGG GAC GT | 33 | CTC CCC GAA ACC AAA AAA CAA CGA | 34 |

[0501]

| | | | | | |
|------------|----|---|----|---|----|
| | | | | A | |
| CDH4_E | 53 | GTT TTA AAT CGT ATT CGT AGT TCG G | 35 | ACG AAC GAA AAC TTT CCT AAA CGA A | 36 |
| CHST2_A | 56 | GCG TTT TTT TAT CGT TTT AGG GCG T | 37 | ACC GAC ACT ACC AAC CTC TCC GAA | 38 |
| CHST2_B | 57 | TGC GGG GAT TTT TAG CGG AAG C | 39 | CCG ACG AAC TAT CCG ACT ATC ACT CGT T | 40 |
| CLIC6-FS | 58 | GTA GTA GGT GGA GGG GGC GAG TTC | 41 | CTC TCG AAA ACC GCA AAA TCC TCG | 42 |
| CLIP4-FS | 59 | GGT AAT ATT GCG ATA TTT CGT AGA CGT | 43 | AAC AAT CAA ATA ATC GAA CGC ACG C | 44 |
| COL23A1-RS | 60 | GTC GTT TTT CGT TAC GAA GCG GC | 45 | AAA ACT AAA TAA ATC TAT CCT CGA T | 46 |
| CXCL12-FS | 63 | GCG TCG GCG GTT TTT AGT AAA AGC | 47 | AAC GAA TCT CAT TAA ATC TCC CGT C | 48 |
| DBNDD1R-FS | 64 | GAT TTT CGG GAG CGG CGA | 49 | CTT CCC CGC AAC GAA CCG | 50 |
| DLX4-FS | 66 | TTC GTT GGT ATA TTC GCG TAG GTG C | 51 | CGA ATA CCG AAA TCT ATA ACC CCG AA | 52 |
| DLX6-FS | 67 | ATT ATG ATT ACG ATG GTT GAC GG | 53 | CTC CAT AAA AAC GAA TTT AAA CGA A | 54 |
| DNM3_A | 69 | TTT GGT TAT AGA ACG TAG AGG TCG T | 55 | ATC GAA CCA CCA AAC CAA ACG C | 56 |
| DSCR6-FS | 72 | GGG AAG TTT AGT AGG TGA GCG T | 57 | ACT AAA AAC GTT TCC GTC GAA CGC A | 58 |
| DTX1-RS | 73 | GTT GGT AGG AGT AGG GTT GGT TCG A | 59 | ATC GCA ATC GTA ACC CGT AAA CGC | 60 |
| EMX1_A | 74 | ATT CGT ACG GTT TTT TCG TTT TCG T | 61 | GAC CAA CTA CTT CCG CTC GAC GC | 62 |
| ETS1_B | 80 | CGG ATT TAG CGG TCG AGA CG | 63 | TTT AAA ACG TTT CTC GCG ACG CC | 64 |
| FAM126A-FS | 83 | TCG TTA GGC GAT GAT AAT TAG CGA | 65 | TAA AAA AAC CAT AAA CCC TAA CGA C | 66 |
| FAM129C-FS | 84 | GTT GGA GAA GAC GAT TCG TTC GGA C | 67 | CCA AAA CCT CAC TCC TCA ACC GC | 68 |
| FBN1-FS | 91 | CGC GAT GCG CGT TTT GAA C | 69 | GAC GCG ACT AAC TTC CAA CCT AAC GAA | 70 |
| FMN2-RS | 94 | TTT TCG TGG TTG TCG TCG TTG C | 71 | GCC GCG CTC TAC ACT AAA CAT ATT CGC | 72 |
| FOXP4-FS | 96 | CGG GGA AGT GGG AGT TTT TAG CG | 73 | AAA AAA ACT AAA TCA AAA CCG CGA C | 74 |
| GAS7-FS | 99 | GCG AGT TCG CGT TGT TTA CGT TTC | 75 | ACC GAC GCT ACC TAT AAC TCC ACG CT | 76 |

| | | | | | |
|-----------------|-----|--|-----|---|-----|
| GP5-RS | 104 | TTA GGT TTG TTT ATT AAT TTT ACG T | 77 | TCT ACA AAA CGC CGC GAC | 78 |
| GRM7-FS | 106 | GTT AAT TCG AGA GCG CGA GGC GT | 79 | GAC CAA AAA AAA TAA AAA ATC CCG CGA C | 80 |
| GYPB_B | 109 | TAA AGA AAT AGA AAG CGG GCG ATA CGT | 81 | CGA ACT AAA AAA ACC GCC AAC CCG | 82 |
| HHEX-RS | 113 | GGG TTT TGC GGT TAA TGG CG | 83 | AAT AAC AAA CGC GTC CCG AAA ACG A | 84 |
| HNF1B_B | 116 | TTA GTT TTT TTT GGT TTT TAT TTG AAT TTC GA | 85 | AAC TTT TCC ACC GAT TCT CAA TTC CG | 86 |
| HOXA1_A | 117 | ATT TAA ATT TTC GGC GTT TCG TCG T | 87 | ACA CTC CAA ATC GAC CTT TAC AAT CGC | 88 |
| HOXA7_A | 119 | AGT TTG GTT CGT TTA GCG ATT GCG T | 89 | AAC GCG ACT AAA ACC AAT TTC CGC A | 90 |
| IGF2BP3_A | 123 | TTT ATT TGT TTT TAT CGT TCG TCG G | 91 | AAA TAT ATA CCC GAT TTC CCC GTT | 92 |
| IGF2BP3_B | 124 | TAA TCG GCG TCG AGA GAG ATA TCG T | 93 | CCG TCA ACC AAT CGA AAA CGA A | 94 |
| IL15RA-FS | 128 | TCG TTT ATT TCG TTT TTT TTG TCG A | 95 | AAC CAA CCT AAA ATC TAC ACT CGC A | 96 |
| ITPRIPL1-FS | 134 | GGG TCG TAG GGG TTT ATC GC | 97 | CAT ACT TAT CCG AAC GTC TAA ACG TC | 98 |
| ITPRIPL1-FS | 134 | GGT TTT AGC GAT GAA TCG GAC GT | 99 | CAC GAT CTT AAA AAA ACA ACG CGA C | 100 |
| KCNH8-RS | 138 | CGT ATT TTT AGG TTT AGT TCG GCG T | 101 | ACA CTA TTA CCC GCG AAA AAA CGA T | 102 |
| KCNK17_B | 140 | GAG TTT GTT TGG GGG TTG GTC GTA TTC | 103 | CCA AAT ATA ACG TTT AAC TCT TTA CCA CGA A | 104 |
| KCNK9-FS | 141 | TTT TTT TTG ATT CGG ATT TTT TCG G | 105 | CTA ATA AAC GCC GCC GTA TTC GAC G | 106 |
| KLF16-FS | 145 | TTT TCG CGT TGT TTT TAT TTA TCG T | 107 | TAC ACA ACC ACC CAA CTA CTC CGC G | 108 |
| KLHDC7B-RS | 146 | TGT TGT TGG GTA AAG GTT AGT ACG T | 109 | CGA AAA CCC AAC TCC CGA A | 110 |
| LAYN-RS | 147 | TTT TTG CGG TCG TTT TTC GGA GC | 111 | CTT ACC AAC TAA CCC CCG CCT ACC G | 112 |
| LIME1-RS | 148 | CGT TTT AGT AGG GAT TGG GGG CGA | 113 | CCC GAA AAC CAA AAT AAA ATC CGC A | 114 |
| LMX1B_A | 149 | CGG AAT AGC GCG GTC GTT TTT TC | 115 | TTT AAC CGT AAC GCT CGC CTC GAC | 116 |
| LOC100132891-FS | 153 | GTC GGT TGT GTT TAG AGC GTA GCG T | 117 | AAA AAA AAC CCC GAC GAC GAA | 118 |

[0502]

[0503]

| | | | | | |
|-------------------------------------|-----|---|-----|---|-----|
| LOC100132891-FS | 153 | GTT GCG ATT GTT TGT ATT TTG CGG | 119 | ATA ATA ACA AAA AAC CCC TCC CGA C | 120 |
| LSS-FS | 157 | AGT TTC GTT AGG GAA GGG TTG CGT C | 121 | CAA CTA AAA CTC TAC CGC GCT CGA T | 122 |
| MAGI2-RS | 159 | AGG AAG GGT TTC GAG TTT AGT GCG G | 123 | AAA AAA ATC AAC GCG TCC TCC TCG C | 124 |
| MAST1-RS | 160 | TTT CGA TTT CGT TTT TAA ATT TCG T | 125 | AAA CTA AAC GAC CTA ACC CTA CGT A | 126 |
| MAX.chr1.8277479- 8277527-RS | 166 | AAG TTT ACG CGC GAG TTT GAT CGT C | 127 | CGA AAC GAC TTC TCT CCC CGC A | 128 |
| MAX.chr11.14926602- 14927148-FS | 168 | TTT AGT TCG CGG AAG TTA GGT TCG G | 129 | GAA AAC ACA ATA AAC CCC GCC GTC | 130 |
| MAX.chr11.68622869- 68622968-FS | 169 | GTT AGA TTG TAG GAG GGA TTA GCG G | 131 | AAA AAA CGA CTA AAA AAT TCA CGC C | 132 |
| MAX.chr12.4273906- 4274012-FS | 170 | TTT GGA GTT TGG GGG ATC GAT AGT C | 133 | CGA CGA AAC TAA AAC CGC GTA CGT A | 134 |
| MAX.chr12.4273906- 4274012-FS | 170 | TTT GGA GTT TGG GGG ATC GAT AGT C | 135 | CGA CGA AAC TAA AAC CGC GTA CGT A | 136 |
| MAX.chr12.59990671- 59990859-FS | 171 | ATT ATA TTG GGG GCG TTA GGT TCG G | 137 | AAC AAA CAA TTC GCA CGT AAA CGA A | 138 |
| MAX.chr15.96889013- 96889128-FS | 173 | GGG CGG TTT ACG TGG ATT TTT ATA GAT TTT C | 139 | GCG TCT CGA ACC GTA CCC TAA CGT A | 140 |
| MAX.chr17.73073682- 73073814-RS | 174 | CGT CGT TGT TGA TTA TGA TCG CGG | 141 | CGC TTC CTA ACA ACC TTC CTC GAA | 142 |
| MAX.chr18.76734362- 76734476-RS | 177 | TTA ACG GTA TTT TTT GTT TTT TCG T | 143 | AAA AAA AAC TCG TCC CCG CGC T | 144 |
| MAX.chr19.46379903- 46380197-FS | 179 | TCG GTT AGT TCG AGG TAG GAA GTT TTG C | 145 | TAT TAA CCG AAA AAC GAA AAC CAA ATC CGA | 146 |
| MAX.chr19.46379903- 46380197-FS | 179 | AGT TTT GTT GTT TTG GGT AGG TCG G | 147 | AAA AAC TAA AAA CCT TTC TCT CGA C | 148 |
| MAX.chr2.223183057- 223183114-RS | 180 | GCG TTG AGA GTG ACG GAT ATT TTT CGT C | 149 | ACT ACC TAA ACT CCG AAC ACG CCC G | 150 |
| MAX.chr20.1784209- 1784461-FS | 185 | TTA GCG TAT CGG GAA TTA GGG GGA C | 151 | GAA AAC GAA AAA ACG ACG CGC A | 152 |
| MAX.chr20.1784209- 1784461-RS | 185 | TCG TTT TTT AGG TGG GGA AGA AGC G | 153 | GAA CCG TAT TTA AAA CCA ATC CCC GC | 154 |
| MAX.chr4.8859602- 8859669-RS | 191 | AAT TGG GGT TCG GGG TTC GGT AC | 155 | TTA CCC CTA CCC AAA AAA ATA CGC T | 156 |
| MAX.chr5.145725410- 145725459-RS | 193 | GGG GTT AGA GTT TCG CGT TCG C | 157 | CGC GTC TCC CGT CCT ATC TAT ATA CGT C | 158 |
| MAX.chr5.42994866- 42994936-FS | 198 | TAG GAA TTT TTT AAA TTC GTT TTA | 159 | CAC AAA AAC TCG ATA CAA TTA CCG | 160 |

[0504]

| | | CGG | | TT | |
|---------------------------------|-----|---|-----|---|-----|
| MAX.chr5.77268672-77268725-FS | 199 | TAT TTT ATA GTC GCG TTA AAA GCG T | 161 | GTC GAT AAA AAA CCT ACG CGA CGA A | 162 |
| MAX.chr6.157557371-157557657-FS | 204 | GAT TTA GTT TTT CGG GTT TAT AGC GG | 163 | TAT TAA AAA CGA CCA AAC CTC CGC A | 164 |
| MAX.chr8.124173030-124173395-FS | 208 | TGG TTG TAG GCG TTT TGT TGG AGT TC | 165 | AAA AAC GAC CCT AAC CAC CCT CGT T | 166 |
| MCF2L2-FS | 216 | TTT TGC GTA GTT GGG TAG GGT TCG G | 167 | CCC GCA TTC CCG AAA AAA ACG AT | 168 |
| MCF2L2-RS | 216 | TTA GGG TTT TTT TCG AGG AGT TCG A | 169 | ATC CCC CGT ACG AAA CTA AAC GCG | 170 |
| MCF2L2-RS | 216 | GCG TTC GTA TTT TCG GGA GAG GC | 171 | TCT ACG TAA CTA AAC AAA ACC CGA A | 172 |
| MIB2-FS | 219 | CGT TTT GTG TTT TAT AAA AAG AAA GAT TTT CGG | 173 | AAA ACC CCA AAA ACG CCC GAT | 174 |
| MPZ-FS | 221 | GGG GCG TAT ATA TTA GTT ATC GAG CGA | 175 | AAA AAA AAC CCT AAA AAC CGC CGA A | 176 |
| MSX2P1-FS | 222 | TTC GTT TAA TGA GAA GGG GTT AGC GG | 177 | TAA AAC AAA CTA AAA ACC TTA ACG CGA CGC T | 178 |
| NACAD-RS | 223 | GGG GAG GGA GTT TTT TTT AC | 179 | GTA CGC GAA CTC GCC AAA CAC TAC G | 180 |
| ODC1-FS | 231 | GTA GGG TTG GTA GTC GTT TTT ACG T | 181 | AAC CCA TCT AAT TAC AAA ATA CCT CGA T | 182 |
| ODC1-RS | 231 | GGT TTT ATA GGG GAA ATT ATT TTC GT | 183 | AAA ACC TCG TCT TTA TAA CAT CGA A | 184 |
| ODC1-RS | 231 | TAG GAT ATT TCG ATG TTA TAA AGA CGA | 185 | AAC AAA ACT AAC AAC CGC CTC CAC G | 186 |
| OSR2_A | 234 | TTT GGA GTT ATC GGA AGG CGA AAG TAC | 187 | GCA CGC CGA AAA AAT AAA AAC GAA | 188 |
| OTX1-RS | 237 | TTT TCG ATA TCG ATA TCG AAG GCG T | 189 | ATA ACT TAA AAC CCT AAA TTC CGC C | 190 |
| PAQR6-FS | 238 | GCG GGT AGT AGG AAG ATT AGT AGC GG | 191 | CCG ACT TCC GTA CGA AAC CGT A | 192 |
| PLXNC1_A | 245 | TAA TAG AGG TTT GCG TTG GAA TCG A | 193 | AAC GCA CCC TAA ACA AAA CCA CGA C | 194 |
| PLXNC1_B | 246 | TGA AGA GTT GTT AGT TCG TTT AGC GT | 195 | GCC AAA AAT TCG ATT CCA ACG CA | 196 |
| PPARA-FS | 248 | TAG TGG TAG GTA TAG TTG GTA GCG G | 197 | ATC AAA ACT CCC CTC CTC GAA AAC G | 198 |

[0505]

| | | | | | |
|-------------|-----|---|-----|---|-----|
| PPARG-RS | 249 | GTT TTT AAG CGG CGG TCG T | 199 | AAA AAA AAT CCC GTT CGC T | 200 |
| PRKCB-RS | 256 | GCG CGC GTT TAT TAG ATG AAG TCG | 201 | AAA ATC AAA AAC CAC AAA TTC ACC GCC | 202 |
| PRMT1-FS | 257 | CGG GGA GAG GAG GGG TAG GAT TTA C | 203 | CAA CTT AAA CAC CAC TTC CTC CGA A | 204 |
| RBFOX3_A | 262 | TGT TTT TTT TGT TCG GGC GG | 205 | AAA TAA CTA ACT CCT ACT CTC GCC CGC T | 206 |
| RFX8-FS | 264 | ATA GTT TTT TAA TTT TCG CGT TTC GTC GA | 207 | AAA AAC AAC TCC AAC CCA CAC CGC | 208 |
| RIC3-RS | 266 | GCG GGA GGA GTA GGT TAA TTT TCG A | 209 | AAA AAC AAA ATA CGC GAA ACG CAC G | 210 |
| SCRT2_B | 273 | CGA GAA GGT TTT GTC GTA GAC GTC GT | 211 | TAC GTA TCC ATA CCC GCG CTC G | 212 |
| SLC16A3-FS | 276 | TTT GTT TGT ATA ATA GGG GTT GCG G | 213 | CGC CTA ACT ACC GAA AAA TAC CGA A | 214 |
| SLC22A20-FS | 277 | GGT GGG GTT ATT TTT TTA TGG AGT CGA TTC | 215 | CGA ACC AAA CCT ACG ATT CCC GAA | 216 |
| SLC2A2-RS | 278 | GGG AGA AGA GAA TGG TTT TTT GTC GTC | 217 | TCT TAT ACT CAA CCC CGA CCT ACC GAC | 218 |
| SLC30A10-FS | 279 | GTT TTA TTC GGG GTT TTA GCG TTA TTT ACG G | 219 | AAA AAA CCG CGT TAC TCA ACG CGC | 220 |
| SLC7A4-RS | 280 | GTT TAG AGC GGA GGT AGC GGT TGC | 221 | CGC CTA TTC TTA AAC CTA AAC CCG TC | 222 |
| SLITRK5-FS | 282 | CGT AGA GGA TTA TAA AGA TTT GTA CGA | 223 | TAC TAT AAC TAC TAC GAT AAC GAC GAC GAC | 224 |
| SPHK2-RS | 284 | AGA TTT CGG TTT TTG TTT CGA TTT TCG T | 225 | ATT AAT ACT AAC TTA CGA AAC CGC C | 226 |
| ST8SIA4-RS | 285 | ATT ATT TTT GAG CGT GAA AAA TCG T | 227 | AAA TTT CTC TCC AAT TAA ATT CCG TA | 228 |
| STAC2_B | 287 | GTG GGT TTG TCG TCG GAT TTC G | 229 | AAA TAA CCG CGT CAT CCG ATT CGT T | 230 |
| STX16_A | 288 | TGG ATG TTT TAT ATT AAT TTT TAG TTG TAT AAC G | 231 | GTA CTT TTT CTC TCA CGA AAA ATA TTC CCG C | 232 |
| STX16_B | 289 | TGC GTG GAA TAA ATT TTA TAT ACG T | 233 | GCT CAA CAC ACG AAA AAC CCT CGA A | 234 |
| STX16_B | 289 | CGG TGC GGG GTT TTA ATA AAG GAT C | 235 | TCC ACG CAA AAA CAA AAA ACG CGT A | 236 |
| SYNJ2-FS | 291 | GGC GTA GTT ATG ATT TCG TTT TTT | 237 | ATC CTT TCG ACC CTA CGT ACC TCG | 238 |

[0506]

| | | CGT | | AT | |
|--------------|-----|---|-----|---|-----|
| TBX1-FS | 295 | TTT ACG ATT ATT GTT TTA GAT AAT ACG G | 239 | GAA CCC GAC GAA CTT CGA A | 240 |
| TMEM176A-FS | 300 | GGG AAA TCG CGT AGT TTG GGC | 241 | AAA ACG ACG AAA AAA CGA AAA CGA C | 242 |
| TNFRSF10D-FS | 301 | AGT TAT CGC GAT CGG TTT GGG TTA AC | 243 | AAA CGA TTA CCT CTT TCG TTC GTT CGT T | 244 |
| TRH_A | 303 | CGG CGG TTT ATT TGA AGA GGG TTC | 245 | CGA CAA ATC AAA AAT CTA CAA CGC T | 246 |
| TRIM67-RS | 305 | TTT TAA CGT TAG TTA CGA GTT GCG G | 247 | CGA ACA AAC CAA ACA ACC GAA | 248 |
| UBTF-RS | 310 | GTA GAT TAG GCG GGG GCG A | 249 | GAA CAA AAA CAT AAA CTA ATA CAA ATA TCT CCC G | 250 |
| ZSCAN12-FS | 327 | GGA GGG AGA GTT TTT CGC GGA TTC | 251 | CTA AAC CCC TCA AAC CCT AAC CGA T | 252 |
| GRASP | 105 | TGT TTT CGG ATA CGG CGA GC | 253 | ACG AAC GAA CTA TAC GCG ACG CT | 254 |

[0507] 表11.表11显示相较于正常乳腺组织,区分基底/三阴性乳腺组织、HER2+乳腺组织、管腔A型乳腺组织、管腔B型乳腺组织、BRCA1乳腺组织和BRCA2乳腺组织的所鉴定80个甲基化区域的曲线下面积。

[0508]

| 基因注释 | 基底样/ 三阴性 | HER2+ | 管腔 A 型 | 管腔 B 型 | BRCA1 | BRCA2 | DM R 编 号 |
|---------------------------------|-------------|---------|-----------|-----------|---------|---------|----------------|
| BHLHE23_C | 0.75 | 0.93567 | 0.80392 | 0.74728 | 0.82716 | 0.70782 | 23 |
| CALN1_A | 0.89699 | 0.86842 | 0.73638 | 0.98039 | 0.95679 | 0.68724 | 36 |
| CD1D | 0.66204 | 0.82066 | 0.91503 | 0.78431 | 0.83951 | 0.66667 | 47 |
| CHST2_A | 0.65972 | 0.8655 | 0.94118 | 0.66231 | 0.69753 | 0.63374 | 56 |
| FAM126A | 0.36806 | 0.64717 | 0.86928 | 0.53377 | 0.59877 | 0.72428 | 83 |
| FMN2 | 0.55324 | 0.93762 | 0.8976 | 0.7037 | 0.75926 | 0.65432 | 94 |
| HOXA1_A | 0.60417 | 0.94152 | 0.81264 | 0.57734 | 0.56173 | 0.58848 | 117 |
| HOXA7_A | 0.52315 | 0.95906 | 0.84423 | 0.76144 | 0.82716 | 0.73251 | 119 |
| KCNH8 | 0.5463 | 0.96881 | 0.85839 | 0.72985 | 0.73457 | 0.78189 | 138 |
| LOC100132891 | 0.81019 | 0.9883 | 0.94771 | 0.80174 | 0.8642 | 0.75309 | 153 |
| MAX.chr1.8277 479-8277527 | 0.68981 | 0.66569 | 0.73203 | 0.69172 | 0.99383 | 0.607 | 166 |
| MAX.chr15.968 89013-96889128 | 0.68287 | 0.93372 | 0.82353 | 0.88235 | 0.98765 | 0.80247 | 173 |
| NACAD | 0.86111 | 0.8577 | 0.7146 | 0.70806 | 0.84568 | 0.7284 | 223 |
| SLC30A10 | 0.64352 | 0.77388 | 0.94989 | 0.57516 | 0.58333 | 0.77366 | 279 |
| TRIM67 | 0.81134 | 0.97856 | 0.88126 | 0.77015 | 0.73457 | 0.71811 | 305 |
| ATP6V1B1 | 0.8912 | 0.8616 | 0.83007 | 0.82789 | 1 | 0.81893 | 15 |
| BANK1 | 0.75231 | 0.70175 | 0.83878 | 0.66231 | 0.91975 | 0.79835 | 17 |
| C10orf125 | 0.39352 | 0.76706 | 0.94444 | 0.70806 | 0.73765 | 0.7037 | 27 |
| C17orf64 | 0.58333 | 0.97856 | 0.85185 | 0.81699 | 0.81173 | 0.86831 | 29 |

[0509]

| | | | | | | | |
|--------------------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|-----|
| CHST2_B | 0.59722 | 0.91228 | 0.89325 | 0.68192 | 0.64506 | 0.69547 | 57 |
| DLX4 | 0.86574 | 0.85965 | 0.61547 | 0.83333 | 0.84877 | 0.79424 | 66 |
| DNM3_A | 0.35185 | 0.92203 | 0.92375 | 0.58388 | 0.62346 | 0.65021 | 69 |
| EMX1_A | 0.74537 | 0.91813 | 0.86275 | 0.68627 | 0.94444 | 0.67901 | 74 |
| FOXP4 | 0.7037 | 0.61209 | 0.64488 | 0.58388 | 0.91358 | 0.53086 | 96 |
| GP5 | 0.87731 | 0.77388 | 0.82353 | 0.72113 | 1 | 0.65844 | 104 |
| IGF2BP3_A | 0.64583 | 0.92008 | 0.87364 | 0.75599 | 0.69753 | 0.74897 | 123 |
| ITPRIPL1 | 0.94676 | 1 | 0.91285 | 0.94336 | 1 | 0.95473 | 134 |
| KLHDC7B | 0.63194 | 0.5614 | 0.58606 | 0.66449 | 0.42593 | 0.55144 | 146 |
| LMX1B_A | 0.77083 | 0.81871 | 0.878 | 0.76253 | 0.80864 | 0.79012 | 149 |
| MAX.chr11.149 26602-14927148 | 0.98611 | 0.93567 | 0.94553 | 0.94553 | 1 | 0.98354 | 168 |
| MAX.chr5.4299 4866-42994936 | 0.84259 | 0.91618 | 0.90196 | 0.93682 | 0.93827 | 0.95885 | 198 |
| MAX.chr8.1241 73030-12417339 5 | 0.87963 | 0.8577 | 0.87146 | 0.89542 | 0.96914 | 0.77778 | 208 |
| MPZ | 0.9294 | 0.98246 | 0.93682 | 0.88344 | 0.86111 | 0.79835 | 221 |
| ODC1 | 0.3588 | 0.89474 | 0.83442 | 0.60349 | 0.46914 | 0.55967 | 231 |
| PLXNC1_A | 0.61806 | 0.83626 | 0.8976 | 0.57952 | 0.67901 | 0.65844 | 245 |
| PRKCB | 0.91204 | 0.96491 | 0.99782 | 0.97603 | 0.88272 | 0.78189 | 256 |
| ST8SIA4 | 0.84722 | 0.47173 | 0.80392 | 0.66885 | 0.57407 | 0.56379 | 285 |
| STX16_B | 0.84259 | 0.7115 | 0.80174 | 0.71895 | 0.98765 | 0.59259 | 289 |
| UBTF | 0.69676 | 0.67836 | 0.91939 | 0.68192 | 0.83333 | 0.76132 | 310 |
| LOC100132891 | 0.66898 | 0.94542 | 0.93682 | 0.79303 | 0.96914 | 0.83951 | 153 |
| ITPRIPL1 | 0.88657 | 0.98051 | 0.90741 | 0.87364 | 0.99383 | 0.86008 | 134 |
| ABLIM1 | 0.7662 | 0.91618 | 0.79303 | 0.67756 | 0.83951 | 0.83128 | 3 |
| KLF16 | 0.91898 | 0.75049 | 0.64924 | 0.9085 | 0.76543 | 0.66255 | 145 |
| MAX.chr12.427 3906-4274012 | 0.83796 | 0.88499 | 0.86928 | 0.94336 | 0.72222 | 0.74074 | 170 |
| MAX.chr12.599 90671-59990859 | 0.68056 | 0.89084 | 0.77342 | 0.53595 | 0.54938 | 0.60494 | 171 |
| MAX.chr19.463 79903-46380197 | 0.72801 | 0.96296 | 0.79085 | 0.83987 | 0.91975 | 0.82099 | 179 |
| ZSCAN12 | 0.76852 | 0.88694 | 0.74946 | 0.78214 | 0.82099 | 0.70782 | 327 |
| AADAT | 0.49537 | 0.7193 | 0.58606 | 0.56427 | 0.69136 | 0.61317 | 2 |
| BHLHE23_D | 0.65972 | 0.85185 | 0.86492 | 0.84314 | 0.85802 | 0.70782 | 24 |
| COL23A1 | 0.66898 | 0.89669 | 0.82353 | 0.68954 | 0.49074 | 0.92181 | 60 |
| CXCL12 | 0.56019 | 0.70565 | 0.66231 | 0.59695 | 0.85802 | 0.72428 | 63 |
| KCNK9 | 0.80556 | 0.88499 | 0.82789 | 0.67756 | 0.84568 | 0.70782 | 141 |
| LAYN | 0.55787 | 0.96686 | 0.76471 | 0.63834 | 0.62963 | 0.84774 | 147 |
| OTX1 | 0.60648 | 0.78363 | 0.84749 | 0.69717 | 0.98765 | 0.81481 | 237 |
| PLXNC1_A | 0.70718 | 0.85673 | 0.91068 | 0.62854 | 0.67284 | 0.68519 | 245 |
| RIC3 | 0.78009 | 0.90643 | 0.74292 | 0.7756 | 0.83951 | 0.69136 | 266 |
| SCRT2_B | 0.91319 | 0.95517 | 0.73638 | 0.7658 | 0.91975 | 0.47119 | 273 |
| IGF2BP3_B | 0.62037 | 0.96296 | 0.87582 | 0.66885 | 0.73457 | 0.7572 | 124 |
| MAX.chr17.730 73682-73073814 | 0.78009 | 0.67836 | 0.59913 | 0.52505 | 0.88889 | 0.73251 | 174 |
| TBX1 | 0.45139 | 0.49708 | 0.75163 | 0.69499 | 0.48765 | 0.46914 | 295 |
| ALOX5 | 0.44676 | 0.91618 | 0.76688 | 0.60784 | 0.47531 | 0.74486 | 9 |
| ASCL2 | 0.82899 | 0.92271 | 0.77101 | 0.48913 | 0.82609 | 0.6087 | 14 |
| CDH4_E | 0.81597 | 0.94639 | 0.84205 | 0.82789 | 0.80556 | 0.70782 | 53 |
| MAST1 | 0.91304 | 0.95411 | 0.7971 | 0.84511 | 0.87681 | 0.82298 | 160 |
| MAX.chr20.178 | 0.57101 | 0.9686 | 0.90145 | 0.6481 | 0.49275 | 0.65839 | 185 |

[0510]

| | | | | | | | |
|------------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|-----|
| 4209-1784461 | | | | | | | |
| RBFOX3_A | 0.75652 | 0.92271 | 0.86957 | 0.83967 | 0.7029 | 0.58385 | 262 |
| TRH_A | 0.97222 | 0.94347 | 0.97168 | 0.86275 | 1 | 0.79012 | 303 |
| HNF1B_B | 0.78472 | 0.88109 | 0.83007 | 0.71895 | 0.65432 | 0.73663 | 116 |
| MAX.chr12.4273906-4274012 | 0.89855 | 0.92271 | 0.90725 | 0.89258 | 0.69565 | 0.63354 | 170 |
| GAS7 | 0.77391 | 0.89614 | 0.82319 | 0.74936 | 0.58696 | 0.46584 | 99 |
| MAX.chr5.145725410-145725459 | 0.90725 | 0.99758 | 0.92319 | 0.85166 | 0.85145 | 0.85714 | 193 |
| MAX.chr5.77268672-77268725 | 0.85797 | 0.98551 | 0.91304 | 0.90537 | 0.86232 | 0.73292 | 199 |
| GYPC_B | 0.68986 | 0.93478 | 0.96232 | 0.72379 | 0.32609 | 0.50932 | 109 |
| DLX6 | 0.56667 | 0.91063 | 0.87246 | 0.58951 | 0.70652 | 0.76708 | 67 |
| FBN1 | 0.61739 | 0.87077 | 0.94058 | 0.65473 | 0.58333 | 0.79814 | 91 |
| OSR2_A | 0.71304 | 0.89614 | 0.90145 | 0.75703 | 0.63043 | 0.74534 | 234 |
| BEST4 | 0.69275 | 0.96377 | 0.84058 | 0.91049 | 0.81884 | 0.69565 | 20 |
| AJAP1_B | 0.76232 | 0.84058 | 0.76232 | 0.91816 | 0.73188 | 0.73913 | 7 |
| DSCR6 | 0.98261 | 0.92512 | 0.87246 | 0.86445 | 0.85507 | 0.76398 | 72 |
| MAX.chr11.68622869-68622968 | 0.50145 | 0.98792 | 0.95362 | 0.7289 | 0.53623 | 0.81366 | 169 |

[0511] 表12.表12显示相较于正常血沉棕黄层,区分基底/三阴性乳腺组织、HER2+乳腺组织、管腔A型乳腺组织、管腔B型乳腺组织、BRCA1乳腺组织和BRCA2乳腺组织的所鉴定80个甲基化区域的曲线下面积。

[0512]

| 基因注释 | 基底样 | HER2+ | 管腔 A 型 | 管腔 B 型 | BRCA1 | BRCA2 | DMR 编号 |
|-----------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|--------|
| BHLHE23_C | 0.83594 | 0.98026 | 0.89338 | 0.82721 | 0.875 | 0.80556 | 23 |
| CALN1_A | 0.93555 | 0.92599 | 0.84926 | 1 | 1 | 0.88194 | 36 |
| CD1D | 0.74609 | 0.86184 | 0.93015 | 0.86397 | 0.92708 | 0.76389 | 47 |
| CHST2_A | 0.73828 | 0.88651 | 0.95772 | 0.73162 | 0.76563 | 0.68056 | 56 |
| FAM126A | 0.75781 | 0.89474 | 0.93199 | 0.84743 | 0.91667 | 0.86458 | 83 |
| FMN2 | 0.77344 | 0.96053 | 0.95221 | 0.78676 | 0.9375 | 0.79861 | 94 |
| HOXA1_A | 0.74609 | 0.97039 | 0.93015 | 0.64706 | 0.64583 | 0.66667 | 117 |
| HOXA7_A | 0.54297 | 0.98684 | 0.87868 | 0.79044 | 0.91667 | 0.84028 | 119 |
| KCNH8 | 0.57031 | 0.98684 | 0.87132 | 0.76287 | 0.77083 | 0.77778 | 138 |
| LOC100132891 | 0.80859 | 0.99342 | 0.95221 | 0.77941 | 0.875 | 0.70139 | 153 |
| MAX.chr1.8277479-8277527 | 0.82031 | 0.80592 | 0.86397 | 0.87132 | 1 | 0.83333 | 166 |
| MAX.chr15.96889013-96889128 | 0.87109 | 0.99013 | 0.95956 | 0.95588 | 1 | 0.97917 | 173 |
| NACAD | 0.89453 | 0.91118 | 0.80147 | 0.73529 | 0.90625 | 0.75 | 223 |
| SLC30A10 | 0.75391 | 0.91118 | 0.98897 | 0.65074 | 0.59375 | 0.91667 | 279 |
| TRIM67 | 0.80664 | 1 | 0.8989 | 0.76654 | 0.69792 | 0.78125 | 305 |
| ATP6V1B1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 15 |
| BANK1 | 0.99609 | 0.99671 | 1 | 0.98529 | 1 | 1 | 17 |
| C10orf125 | 0.70313 | 0.88816 | 0.95588 | 0.81618 | 0.875 | 0.81944 | 27 |
| C17orf64 | 0.78906 | 0.99671 | 0.94853 | 0.93015 | 0.84375 | 0.95833 | 29 |
| CHST2_B | 0.64453 | 0.92105 | 0.91176 | 0.72426 | 0.67188 | 0.70833 | 57 |

[0513]

| | | | | | | | |
|--------------------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|-----|
| DLX4 | 0.93945 | 0.9227 | 0.79596 | 0.94853 | 0.92188 | 0.90278 | 66 |
| DNM3_A | 0.71875 | 0.98684 | 0.96324 | 0.79779 | 0.79167 | 0.85417 | 69 |
| EMX1_A | 0.80469 | 0.92763 | 0.90441 | 0.75735 | 0.98958 | 0.72917 | 74 |
| FOXP4 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 96 |
| GP5 | 1 | 1 | 1 | 0.99265 | 1 | 1 | 104 |
| IGF2BP3_A | 0.65625 | 0.92105 | 0.86949 | 0.75919 | 0.71354 | 0.75694 | 123 |
| ITPRIPL1 | 0.94922 | 1 | 0.90809 | 0.95956 | 1 | 0.95833 | 134 |
| KLHDC7B | 1 | 1 | 1 | 0.98897 | 1 | 0.98611 | 146 |
| LMX1B_A | 1 | 0.99671 | 1 | 1 | 1 | 1 | 149 |
| MAX.chr11.149 26602-14927148 | 1 | 0.99342 | 1 | 0.99632 | 1 | 1 | 168 |
| MAX.chr5.4299 4866-42994936 | 0.94922 | 0.98026 | 0.98529 | 0.99265 | 1 | 1 | 198 |
| MAX.chr8.1241 73030-12417339 5 | 0.98438 | 0.91118 | 0.98162 | 0.98897 | 1 | 0.98611 | 208 |
| MPZ | 0.94922 | 0.99342 | 0.96691 | 0.94485 | 0.90625 | 0.86111 | 221 |
| ODC1 | 0.89453 | 0.99013 | 0.97794 | 0.90074 | 0.84375 | 0.875 | 231 |
| PLXNC1_A | 0.94531 | 0.94408 | 0.97794 | 0.88235 | 0.89583 | 0.92361 | 245 |
| PRKCB | 0.97266 | 0.98684 | 1 | 1 | 0.9375 | 0.86806 | 256 |
| ST8SIA4 | 0.99219 | 1 | 1 | 0.98162 | 1 | 0.99306 | 285 |
| STX16_B | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 289 |
| UBTF | 0.99609 | 0.99671 | 1 | 0.99632 | 1 | 0.92361 | 310 |
| LOC100132891 | 0.8125 | 0.97697 | 1 | 0.84926 | 1 | 0.90278 | 153 |
| ITPRIPL1 | 0.90234 | 1 | 0.95404 | 0.95221 | 1 | 0.9375 | 134 |
| ABLIM1 | 0.83398 | 0.9523 | 0.8511 | 0.75919 | 0.92708 | 0.88542 | 3 |
| KLF16 | 1 | 0.87171 | 0.83456 | 1 | 0.84375 | 0.8125 | 145 |
| MAX.chr12.427 3906-4274012 | 0.90625 | 0.94737 | 0.97059 | 0.97059 | 0.83333 | 0.94444 | 170 |
| MAX.chr12.599 90671-59990859 | 0.78516 | 0.92434 | 0.85662 | 0.63235 | 0.69792 | 0.6875 | 171 |
| MAX.chr19.463 79903-46380197 | 0.78125 | 0.97697 | 0.82353 | 0.88603 | 0.94792 | 0.86111 | 179 |
| ZSCAN12 | 0.76758 | 0.88487 | 0.75 | 0.78125 | 0.82292 | 0.70486 | 327 |
| AADAT | 0.76172 | 0.85855 | 0.80147 | 0.71691 | 0.89583 | 0.81944 | 2 |
| BHLHE23_D | 0.71875 | 0.86184 | 0.89706 | 0.87868 | 0.85417 | 0.77778 | 24 |
| COL23A1 | 0.67969 | 0.90461 | 0.8125 | 0.69118 | 0.47917 | 0.93056 | 60 |
| CXCL12 | 0.96875 | 0.97697 | 0.95221 | 0.87132 | 0.98958 | 0.99306 | 63 |
| KCNK9 | 0.92188 | 0.92434 | 0.91912 | 0.71691 | 0.9375 | 0.70833 | 141 |
| LAYN | 0.56641 | 0.97039 | 0.75735 | 0.65441 | 0.625 | 0.84722 | 147 |
| OTX1 | 0.99219 | 1 | 1 | 0.99632 | 1 | 1 | 237 |
| PLXNC1_A | 0.81445 | 0.90625 | 0.95956 | 0.76287 | 0.71875 | 0.80208 | 245 |
| RIC3 | 0.85352 | 0.96711 | 0.82353 | 0.83824 | 0.89583 | 0.77778 | 266 |
| SCRT2_B | 0.93359 | 0.98684 | 0.83088 | 0.8364 | 0.97917 | 0.61806 | 273 |
| IGF2BP3_B | 0.72656 | 0.97204 | 0.90257 | 0.74632 | 0.8125 | 0.81597 | 124 |
| MAX.chr17.730 73682-73073814 | 1 | 1 | 0.93934 | 0.98529 | 1 | 1 | 174 |
| TBX1 | 0.99609 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 295 |
| ALOX5 | 0.77539 | 0.99671 | 0.87316 | 0.7739 | 0.73958 | 0.81944 | 9 |
| ASCL2 | 0.85778 | 0.92593 | 0.79556 | 0.575 | 0.82222 | 0.65714 | 14 |
| CDH4_E | 0.87891 | 0.95724 | 0.85294 | 0.85294 | 0.84375 | 0.75694 | 53 |
| MAST1 | 0.90667 | 0.96296 | 0.76444 | 0.85833 | 0.86667 | 0.83333 | 160 |
| MAX.chr20.178 4209-1784461 | 0.71556 | 0.98889 | 0.96 | 0.73125 | 0.63333 | 0.74286 | 185 |

| | | | | | | | | |
|--------|------------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|-----|
| | RBFOX3_A | 0.72 | 0.90741 | 0.8 | 0.7625 | 0.64444 | 0.51429 | 262 |
| | TRH_A | 1 | 0.99342 | 1 | 0.90809 | 1 | 0.97222 | 303 |
| | HNF1B_B | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0.95139 | 116 |
| | MAX.chr12.4273906-4274012 | 0.9875 | 0.98611 | 0.95 | 0.92647 | 0.79167 | 0.88393 | 170 |
| | GAS7 | 0.93333 | 0.97917 | 0.91458 | 0.86213 | 0.75 | 0.79911 | 99 |
| | MAX.chr5.145725410-145725459 | 0.94583 | 0.98264 | 0.92708 | 0.87868 | 0.86979 | 0.91071 | 193 |
| [0514] | MAX.chr5.77268672-77268725 | 0.95417 | 0.99306 | 0.96667 | 0.95588 | 0.92708 | 0.875 | 199 |
| | GYPC_B | 0.90833 | 0.99306 | 1 | 0.87132 | 0.76042 | 0.85714 | 109 |
| | DLX6 | 0.70208 | 0.96528 | 0.95 | 0.7261 | 0.83854 | 0.85268 | 67 |
| | FBN1 | 0.41667 | 0.85417 | 0.94583 | 0.65074 | 0.5625 | 0.79464 | 91 |
| | OSR2_A | 0.90417 | 1 | 1 | 0.96507 | 0.95833 | 0.91518 | 234 |
| | BEST4 | 0.69167 | 0.93403 | 0.825 | 0.87132 | 0.80208 | 0.74107 | 20 |
| | AJAP1_B | 0.675 | 0.71875 | 0.675 | 0.82353 | 0.65625 | 0.39286 | 7 |
| | DSCR6 | 0.97917 | 0.93056 | 0.8625 | 0.89706 | 0.875 | 0.80357 | 72 |
| | MAX.chr11.68622869-68622968 | 0.71458 | 0.99653 | 0.97917 | 0.88603 | 0.70313 | 0.88393 | 169 |

[0515] 表13.表13显示相较于正常乳腺组织,区分基底/三阴性乳腺组织、HER2+乳腺组织、管腔A型乳腺组织、管腔B型乳腺组织、BRCA1乳腺组织和BRCA2乳腺组织的所鉴定80个甲基化区域的甲基化倍数变化。

| 基因注释 | 基底样 | HER2+ | 管腔 A 型 | 管腔 B 型 | BRCA1 | BRCA2 | DM R 编号 |
|-----------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|---------|
| BHLHE23_C | 17.39 | 28.60 | 15.89 | 8.07 | 21.97 | 5.13 | 23 |
| CALN1_A | 28.82 | 16.81 | 15.57 | 15.63 | 22.24 | 9.44 | 36 |
| CD1D | 10.77 | 16.99 | 21.18 | 9.33 | 13.48 | 10.65 | 47 |
| CHST2_A | 15.19 | 82.95 | 80.41 | 28.63 | 13.89 | 57.16 | 56 |
| FAM126A | 4.45 | 10.43 | 31.13 | 10.07 | 14.02 | 30.56 | 83 |
| FMN2 | 2.71 | 27.06 | 22.58 | 16.21 | 24.59 | 7.57 | 94 |
| HOXA1_A | 20.01 | 42.46 | 26.87 | 14.45 | 12.63 | 18.71 | 117 |
| HOXA7_A | 9.72 | 23.28 | 15.61 | 8.19 | 6.23 | 7.65 | 119 |
| KCNH8 | 1.78 | 39.32 | 35.88 | 14.75 | 14.13 | 45.90 | 138 |
| LOC100132891 | 185.19 | 312.06 | 194.65 | 143.63 | 186.82 | 180.80 | 153 |
| MAX.chr1.8277479-8277527 | 9.79 | 5.38 | 9.20 | 7.31 | 18.72 | 6.42 | 166 |
| MAX.chr15.96889013-96889128 | 6.87 | 7.87 | 5.80 | 5.54 | 9.78 | 5.97 | 173 |
| NACAD | 59.72 | 97.55 | 3.38 | 20.96 | 21.53 | 22.18 | 223 |
| SLC30A10 | 6.66 | 87.99 | 105.28 | 31.45 | 49.17 | 88.74 | 279 |
| TRIM67 | 86.70 | 69.09 | 53.28 | 43.64 | 83.52 | 32.16 | 305 |
| ATP6V1B1 | 3.95 | 2.43 | 2.52 | 2.18 | 3.75 | 2.52 | 15 |
| BANK1 | 2.21 | 1.49 | 1.81 | 1.48 | 2.17 | 2.14 | 17 |
| C10orf125 | 3.79 | 18.09 | 19.60 | 13.34 | 16.57 | 12.82 | 27 |
| C17orf64 | 9.30 | 42.58 | 15.72 | 11.05 | 11.18 | 24.94 | 29 |

[0517]

| | | | | | | | |
|----------------------------------|--------------|---------|--------|---------|---------|--------|-----|
| CHST2_B | 48.81 | 281.00 | 298.32 | 116.70 | 135.51 | 191.68 | 57 |
| DLX4 | 45.64 | 60.68 | 16.25 | 29.97 | 41.18 | 29.75 | 66 |
| DNM3_A | 8.86 | 23.78 | 30.08 | 11.49 | 18.30 | 21.56 | 69 |
| EMX1_A | 43.60 | 122.29 | 82.84 | 25.57 | 49.07 | 59.72 | 74 |
| FOXP4 | 1.88 | 0.87 | 1.24 | 0.91 | 1.66 | 1.15 | 96 |
| GP5 | 4.39 | 2.30 | 2.78 | 2.43 | 6.32 | 2.58 | 104 |
| IGF2BP3_A | 20.99 | 38.55 | 29.02 | 33.09 | 12.02 | 26.13 | 123 |
| ITPRIPL1 | 68.12 | 53.72 | 43.47 | 51.51 | 63.79 | 47.41 | 134 |
| KLHDC7B | 1.31 | 0.91 | 1.09 | 0.79 | 1.00 | 0.91 | 146 |
| LMX1B_A | 2.06 | 2.17 | 2.14 | 1.44 | 2.08 | 2.32 | 149 |
| MAX.chr11.1492 6602-14927148 | 36.24 | 22.85 | 19.10 | 23.87 | 28.89 | 17.02 | 168 |
| MAX.chr5.42994 866-42994936 | 19.79 | 13.50 | 9.94 | 11.94 | 21.43 | 12.21 | 198 |
| MAX.chr8.12417 3030-124173395 | 21.90 | 24.50 | 10.92 | 14.77 | 28.87 | 24.86 | 208 |
| MPZ | 123.49 | 79.48 | 48.93 | 74.77 | 131.51 | 63.10 | 221 |
| ODC1 | 1.78 | 8.69 | 8.19 | 4.66 | 1.97 | 7.56 | 231 |
| PLXNC1_A | 7.89 | 13.76 | 9.63 | 8.37 | 12.31 | 18.75 | 245 |
| PRKCB | 26.21 | 38.24 | 34.42 | 25.44 | 26.52 | 11.10 | 256 |
| ST8SIA4 | 0.48 | 1.05 | 1.65 | 0.65 | 1.13 | 1.44 | 285 |
| STX16_B | 3.01 | 1.93 | 1.96 | 2.16 | 3.90 | 2.88 | 289 |
| UBTF | 1.79 | 1.77 | 2.71 | 1.50 | 1.93 | 2.92 | 310 |
| LOC100132891 | 9.99 | 14.86 | 9.71 | 8.33 | 11.87 | 10.56 | 153 |
| ITPRIPL1 | 61.84 | 47.86 | 33.92 | 39.52 | 46.55 | 32.55 | 134 |
| ABLIM1 | 126.47 | 140.31 | 63.32 | 44.29 | 132.06 | 117.33 | 3 |
| KLF16 | 25.67 | 7.34 | 4.47 | 7.38 | 10.97 | 6.36 | 145 |
| MAX.chr12.4273 906-4274012 | 301.23 | 105.51 | 111.39 | 153.60 | 171.56 | 6.10 | 170 |
| MAX.chr12.5999 0671-59990859 | 28.29 | 52.80 | 32.14 | 14.31 | 24.76 | 57.36 | 171 |
| MAX.chr19.4637 9903-46380197 | 22.21 | 55.50 | 38.80 | 19.14 | 43.26 | 63.39 | 179 |
| ZSCAN12 | 10284. 41 | 4154.53 | 78.06 | 4637.92 | 2760.20 | 188.89 | 327 |
| AADAT | 1.31 | 6.34 | 21.38 | 14.40 | 1.47 | 1.94 | 2 |
| BHLHE23_D | 158.47 | 264.51 | 122.98 | 34.78 | 124.83 | 48.69 | 24 |
| COL23A1 | 3.98 | 24.50 | 27.84 | 17.76 | 1.63 | 29.07 | 60 |
| CXCL12 | 2.86 | 10.36 | 6.15 | 6.61 | 11.71 | 26.51 | 63 |
| KCNK9 | 48.27 | 85.89 | 94.77 | 21.69 | 46.39 | 130.44 | 141 |
| LAYN | 16.27 | 55.56 | 25.44 | 23.04 | 21.03 | 38.03 | 147 |
| OTX1 | 2.80 | 2.55 | 2.75 | 2.26 | 6.13 | 4.22 | 237 |
| PLXNC1_A | 22.95 | 41.20 | 28.28 | 29.16 | 37.81 | 53.43 | 245 |
| RIC3 | 75.70 | 47.95 | 37.52 | 32.73 | 77.58 | 16.49 | 266 |
| SCRT2_B | 164.74 | 109.65 | 63.97 | 81.04 | 101.97 | 5.69 | 273 |
| IGF2BP3_B | 185.90 | 412.90 | 282.64 | 212.43 | 385.38 | 225.97 | 124 |
| MAX.chr17.7307 3682-73073814 | 1.73 | 0.83 | 0.85 | 1.08 | 1.60 | 1.84 | 174 |
| TBX1 | 1.84 | 1.42 | 0.69 | 0.79 | 1.41 | 2.45 | 295 |
| ALOX5 | 5.56 | 22.45 | 13.11 | 12.76 | 8.52 | 23.22 | 9 |
| ASCL2 | 36.06 | 18.95 | 24.95 | 8.63 | 3.72 | 22.63 | 14 |
| CDH4_E | 85.74 | 88.80 | 89.15 | 55.48 | 180.60 | 66.56 | 53 |
| MAST1 | 143.54 | 82.72 | 21.57 | 16.93 | 93.73 | 52.01 | 160 |

| | | | | | | | | |
|--------|----------------------------------|--------|--------|--------|-------|--------|--------|-----|
| [0518] | MAX.chr20.1784 209-1784461 | 34.65 | 76.68 | 61.27 | 31.39 | 29.19 | 34.67 | 185 |
| | RBFOX3_A | 83.13 | 51.12 | 56.20 | 30.74 | 29.32 | 41.81 | 262 |
| | TRH_A | 13.50 | 11.59 | 8.32 | 9.56 | 17.69 | 9.88 | 303 |
| | HNF1B_B | 3.02 | 4.34 | 2.55 | 2.40 | 2.62 | 4.08 | 116 |
| | MAX.chr12.4273 906-4274012 | 114.75 | 55.89 | 51.99 | 73.21 | 59.98 | 9.32 | 170 |
| | GAS7 | 60.65 | 32.36 | 32.26 | 48.04 | 33.41 | 9.47 | 99 |
| | MAX.chr5.14572 5410-145725459 | 90.31 | 118.51 | 79.19 | 78.52 | 136.00 | 88.88 | 193 |
| | MAX.chr5.77268 672-77268725 | 41.72 | 50.96 | 29.95 | 37.74 | 65.41 | 40.86 | 199 |
| | GYPC_B | 16.66 | 22.32 | 18.77 | 17.73 | 4.48 | 5.49 | 109 |
| | DLX6 | 91.12 | 105.35 | 81.17 | 31.54 | 38.38 | 24.90 | 67 |
| | FBN1 | 1.41 | 92.19 | 132.70 | 56.35 | 26.88 | 122.22 | 91 |
| | OSR2_A | 42.34 | 72.55 | 32.82 | 45.53 | 77.54 | 58.19 | 234 |
| | BEST4 | 71.08 | 73.96 | 61.71 | 99.72 | 85.57 | 64.51 | 20 |
| | AJAP1_B | 28.08 | 13.72 | 10.00 | 20.22 | 16.87 | 1.71 | 7 |
| | DSCR6 | 53.05 | 52.43 | 20.76 | 33.33 | 36.39 | 35.57 | 72 |
| | MAX.chr11.6862 2869-68622968 | 20.35 | 111.34 | 116.50 | 58.10 | 30.52 | 70.46 | 169 |

[0519] 表14.表14显示相较于正常血沉棕黄层,区分基底/三阴性乳腺组织、HER2+乳腺组织、管腔A型乳腺组织、管腔B型乳腺组织、BRCA1乳腺组织和BRCA2乳腺组织的所鉴定80个甲基化区域的甲基化倍数变化。

| 基因注释 | 基 底 样 | HER2 + | 管腔 A 型 | 管腔 B 型 | BRCA1 | BRCA2 | DM R 编 号 |
|-------------------------------------|-------------|--------------|-----------|-----------|---------|---------|----------------|
| | | | | | | | |
| BHLHE23_C | 128.20 | 210.78 | 117.13 | 59.52 | 161.94 | 37.79 | 23 |
| CALN1_A | 106.73 | 62.24 | 57.65 | 57.89 | 82.38 | 34.97 | 36 |
| CD1D | 20.42 | 32.22 | 40.18 | 17.70 | 25.57 | 20.20 | 47 |
| CHST2_A | 39.29 | 214.65 | 208.06 | 74.08 | 35.94 | 147.92 | 56 |
| FAM126A | 55.82 | 131.03 | 391.00 | 126.44 | 176.02 | 383.76 | 83 |
| FMN2 | 7.46 | 74.48 | 62.15 | 44.63 | 67.68 | 20.83 | 94 |
| HOXA1_A | 65.29 | 138.57 | 87.67 | 47.15 | 41.21 | 61.06 | 117 |
| HOXA7_A | 33.10 | 79.29 | 53.17 | 27.90 | 21.23 | 26.06 | 119 |
| KCNH8 | 2.80 | 61.92 | 56.51 | 23.23 | 22.25 | 72.29 | 138 |
| LOC100132891 | 315.30 | 531.29 | 331.39 | 244.53 | 318.07 | 307.81 | 153 |
| MAX.chr1.827 7479-8277527 | 54.62 | 30.04 | 51.31 | 40.77 | 104.42 | 35.83 | 166 |
| MAX.chr15.96 889013-968891 28 | 31.27 | 35.82 | 26.39 | 25.21 | 44.51 | 27.19 | 173 |
| NACAD | 7734.4 3 | 12633. 27 | 437.58 | 2714.09 | 2788.77 | 2872.49 | 223 |
| SLC30A10 | 35.40 | 467.99 | 559.93 | 167.25 | 261.52 | 471.97 | 279 |
| TRIM67 | 184.28 | 146.87 | 113.25 | 92.76 | 177.52 | 68.37 | 305 |

[0521]

| | | | | | | | |
|--------------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|-----|
| ATP6V1B1 | 135.04 | 83.03 | 86.23 | 74.40 | 128.07 | 86.05 | 15 |
| BANK1 | 104.87 | 70.72 | 85.77 | 70.16 | 102.93 | 101.27 | 17 |
| C10orf125 | 18.08 | 86.39 | 93.58 | 63.71 | 79.10 | 61.20 | 27 |
| C17orf64 | 44.89 | 205.57 | 75.89 | 53.34 | 53.97 | 120.40 | 29 |
| CHST2_B | 188.62 | 1085.94 | 1152.89 | 451.00 | 523.69 | 740.74 | 57 |
| DLX4 | 3920.54 | 5213.08 | 1395.77 | 2574.90 | 3537.32 | 2556.10 | 66 |
| DNM3_A | 61.22 | 164.42 | 207.92 | 79.42 | 126.48 | 149.04 | 69 |
| EMX1_A | 144.48 | 405.29 | 274.54 | 84.73 | 162.63 | 197.93 | 74 |
| FOXP4 | 381.51 | 176.16 | 251.88 | 183.64 | 336.40 | 232.30 | 96 |
| GP5 | 280.65 | 146.74 | 178.00 | 155.65 | 404.01 | 164.80 | 104 |
| IGF2BP3_A | 24.63 | 45.23 | 34.05 | 38.83 | 14.10 | 30.66 | 123 |
| ITPRIPL1 | 84.73 | 66.82 | 54.07 | 64.07 | 79.34 | 58.97 | 134 |
| KLHDC7B | 186.31 | 129.54 | 154.64 | 111.99 | 142.69 | 129.65 | 146 |
| LMX1B_A | 203.26 | 213.63 | 211.34 | 142.05 | 204.63 | 229.02 | 149 |
| MAX.chr11.14 926602-149271 48 | 497.03 | 313.40 | 261.90 | 327.34 | 396.19 | 233.42 | 168 |
| MAX.chr5.429 94866-4299493 6 | 73.59 | 50.18 | 36.95 | 44.37 | 79.69 | 45.39 | 198 |
| MAX.chr8.124 173030-124173 395 | 64.77 | 72.44 | 32.29 | 43.69 | 85.38 | 73.51 | 208 |
| MPZ | 249.93 | 160.87 | 99.03 | 151.32 | 266.15 | 127.71 | 221 |
| ODC1 | 30.64 | 149.64 | 141.00 | 80.25 | 33.86 | 130.18 | 231 |
| PLXNC1_A | 106.94 | 186.43 | 130.47 | 113.37 | 166.70 | 253.90 | 245 |
| PRKCB | 75.54 | 110.24 | 99.23 | 73.32 | 76.45 | 31.99 | 256 |
| ST8SIA4 | 38.54 | 83.88 | 132.23 | 51.67 | 90.22 | 115.10 | 285 |
| STX16_B | 475.75 | 305.35 | 309.74 | 340.45 | 615.98 | 455.10 | 289 |
| UBTF | 125.97 | 125.03 | 190.93 | 105.76 | 136.15 | 205.77 | 310 |
| LOC100132891 | 25.07 | 37.29 | 24.36 | 20.90 | 29.79 | 26.49 | 153 |
| ITPRIPL1 | 234.04 | 181.13 | 128.39 | 149.56 | 176.16 | 123.19 | 134 |
| ABLIM1 | 1223.97 | 1357.94 | 612.81 | 428.63 | 1278.01 | 1135.46 | 3 |
| KLF16 | 75.80 | 21.67 | 13.19 | 21.78 | 32.40 | 18.78 | 145 |
| MAX.chr12.42 73906-4274012 | >1x10 ⁶ | 170 |
| MAX.chr12.59 990671-599908 59 | 82.48 | 153.92 | 93.68 | 41.71 | 72.17 | 167.20 | 171 |
| MAX.chr19.46 379903-463801 97 | 52.82 | 132.00 | 92.28 | 45.54 | 102.88 | 150.76 | 179 |
| ZSCAN12 | 2693238 | 1087971 | 20443.01 | 1214559 | 722829 | 49466.69 | 327 |
| AADAT | 2.91 | 14.15 | 47.72 | 32.13 | 3.28 | 4.33 | 2 |
| BHLHE23_D | 272.07 | 454.11 | 211.13 | 59.71 | 214.31 | 83.59 | 24 |
| COL23A1 | 4.68 | 28.80 | 32.73 | 20.87 | 1.91 | 34.18 | 60 |
| CXCL12 | 73.68 | 266.57 | 158.26 | 170.11 | 301.27 | 681.91 | 63 |
| KCNK9 | 88.62 | 157.70 | 174.01 | 39.83 | 85.17 | 239.50 | 141 |

| | | | | | | | |
|--------------------------------------|-------------|-------------|---------|---------|----------|---------|-----|
| LAYN | 17.15 | 58.55 | 26.81 | 24.28 | 22.17 | 40.08 | 147 |
| OTX1 | 118.61 | 107.72 | 116.27 | 95.75 | 259.48 | 178.56 | 237 |
| PLXNC1_A | 52.27 | 93.86 | 64.43 | 66.42 | 86.12 | 121.71 | 245 |
| RIC3 | 187.45 | 118.73 | 92.91 | 81.04 | 192.10 | 40.83 | 266 |
| SCRT2_B | 617.81 | 411.22 | 239.92 | 303.91 | 382.41 | 21.34 | 273 |
| IGF2BP3_B | 137.82 | 306.10 | 209.53 | 157.48 | 285.70 | 167.52 | 124 |
| MAX.chr17.73 073682-730738 14 | 150.82 | 72.51 | 74.12 | 93.99 | 139.52 | 159.80 | 174 |
| TBX1 | 715.28 | 553.15 | 266.62 | 307.86 | 548.03 | 950.84 | 295 |
| ALOX5 | 71.55 | 288.98 | 168.70 | 164.22 | 109.6464 | 298.90 | 9 |
| ASCL2 | 40.30 | 21.18 | 27.89 | 9.65 | 4.1572 | 25.29 | 14 |
| CDH4_E | 314.87 | 326.08 | 327.36 | 203.74 | 663.182 | 244.42 | 53 |
| MAST1 | 232.79 | 134.16 | 34.98 | 27.45 | 152.0212 | 84.36 | 160 |
| MAX.chr20.17 84209-1784461 | 88.90 | 196.72 | 157.17 | 80.52 | 74.88755 | 88.94 | 185 |
| RBFOX3_A | 52.90 | 32.53 | 35.76 | 19.56 | 18.6575 | 26.60 | 262 |
| TRH_A | 175.90 | 151.01 | 108.45 | 124.56 | 230.4582 | 128.70 | 303 |
| HNF1B_B | 31.72 | 45.52 | 26.74 | 25.24 | 27.46255 | 42.86 | 116 |
| [0522] MAX.chr12.42 73906-4274012 | 487.31 | 237.37 | 220.79 | 310.90 | 254.73 | 39.59 | 170 |
| GAS7 | 235.17 | 125.48 | 125.07 | 186.25 | 129.54 | 36.70 | 99 |
| MAX.chr5.145 725410-145725 459 | 96.45 | 126.57 | 84.58 | 83.86 | 145.26 | 94.93 | 193 |
| MAX.chr5.772 68672-7726872 5 | 96.32 | 117.66 | 69.15 | 87.14 | 151.02 | 94.34 | 199 |
| GYPC_B | 371.40 | 497.60 | 418.40 | 395.42 | 99.91 | 122.49 | 109 |
| DLX6 | 364.67 | 421.64 | 324.85 | 126.23 | 153.59 | 99.67 | 67 |
| FBN1 | 0.76 | 49.47 | 71.20 | 30.24 | 14.42 | 65.58 | 91 |
| OSR2_A | 2655.2 2 | 4549.9 9 | 2058.28 | 2855.38 | 4862.64 | 3648.91 | 234 |
| BEST4 | 13.74 | 14.29 | 11.93 | 19.27 | 16.54 | 12.47 | 20 |
| AJAP1_B | 3.21 | 1.57 | 1.14 | 2.31 | 1.93 | 0.20 | 7 |
| DSCR6 | 51.96 | 51.35 | 20.34 | 32.65 | 35.65 | 34.84 | 72 |
| MAX.chr11.68 622869-686229 68 | 99.98 | 547.01 | 572.37 | 285.43 | 149.92 | 346.17 | 169 |

[0523] 表15. 表15显示区分高等级DCIS与低等级DCIS的AUC、平均FC、中值FC和p值。

| 基因注释 | AUC | 平均 FC | 中值 FC | p 值 | DMR 编号 |
|----------------------------------|---------|-------|-------|--------|--------|
| [0524] SCRT2_B | 0.92149 | 43.36 | 49.89 | <.0001 | 273 |
| MPZ | 0.90083 | 11.89 | 23.24 | 0.0001 | 221 |
| MAX.chr8.124173030-1241 73395 | 0.90083 | 5.62 | 8.24 | 0.0102 | 208 |
| ITPRIPL1 | 0.88017 | 2.47 | 25.81 | 0.0903 | 134 |

| | | | | | | |
|--------|--------------------------------|---------|------|-------|--------|-----|
| | ITPRIPL1 | 0.87603 | 3.04 | 26.71 | 0.036 | 134 |
| | DLX4 | 0.85124 | 5.03 | 3.99 | 0.0017 | 66 |
| | CALN1_A | 0.82231 | 5.90 | 26.11 | 0.0105 | 36 |
| | IGF2BP3_B | 0.81405 | 5.69 | 48.23 | 0.0127 | 124 |
| | LOC100132891 | 0.78512 | 2.95 | 4.82 | 0.0495 | 153 |
| [0525] | MAX.chr5.42994866-42994936 | 0.7562 | 4.85 | 2.10 | 0.0051 | 198 |
| | MAX.chr11.14926602-14927148 fp | 0.73554 | 1.57 | 2.51 | 0.1458 | 168 |
| | PRKCB | 0.72314 | 1.83 | 2.83 | 0.1702 | 256 |
| | EMX1_A | 0.66529 | 1.23 | 21.26 | 0.7382 | 74 |
| | DNM3_A | 0.66116 | 1.77 | 2.43 | 0.1205 | 69 |
| | CHST2_B | 0.64876 | 3.84 | 5.48 | 0.0531 | 57 |
| | C10orf125 | 0.57025 | 1.24 | 1.77 | 0.7431 | 27 |

[0526] 实施例II.

[0527] 这个实施例描述对乳腺癌特异性标志物的组织验证。

[0528] 独立组织样品(新鲜冷冻)选自在罗彻斯特梅奥诊所(Mayo Clinic Rochester)的机构癌症登记名册,并且由有经验的病理学家复审以确认正确分类以及指导宏观解剖。病例包括29个三阴性/基底样侵袭性乳腺癌、34个HER2型侵袭性乳腺癌、36个管腔A型侵袭性乳腺癌和25个管腔B型侵袭性乳腺癌。还包括5个BRCA1癌症和6个BRCA2癌症、21个HGD DCIS和12个LGD DCIS。对照包括来自正常女性的27个年龄匹配的正常乳腺组织和18个血沉棕黄层样品。

[0529] 55个甲基化DNA标志物(MDM)选自采用发现样品测试的80个MDM的清单(参见实施例I以及表11-表15)。

[0530] 使用QIAamp DNA小型试剂盒(Qiagen,Valencia CA)制备基因组DNA,并且使用EZ-96DNA甲基化试剂盒(Zymo Research,Irvine CA)加以亚硫酸氢盐转化。使用Methprimer软件(University of California,San Francisco CA)根据标志物序列设计扩增引物,并且加以商业合成(IDT,Coralville IA)。采用经亚硫酸氢盐转化(甲基化和未甲基化基因组DNA)和未转化对照,通过SYBR Green qPCR(Roche)对测定进行严格测试和优化。重新设计或排除与阴性对照交叉反应的测定。溶解曲线分析用于确保正发生特异性扩增。

[0531] 使用LightCycler 480仪器以25uL的总反应体积对2uL经转化DNA进行qMSP。标准物源于连续稀释的完全甲基化DNA(Zymo Research)。原始标志物拷贝数相对于CpG不可知的作为总基因组DNA的标志物的 β -肌动蛋白加以标准化。

[0532] 使用JMP10(SAS,Cary NC)对结果进行逻辑分析。将病例分别与正常乳腺对照和正常血沉棕黄层样品进行比较。计算MDM中的每一者的甲基化比率和绝对差异。

[0533] 独立样品中的MDM性能是卓越的,其中许多AUC和甲基化倍数变化比率(FC)分别大于0.90和50。结果提供于表16A(三阴性)、表16B(HER2⁺)、表16C(管腔A型)、表16D(管腔D型)和表16E(总体)中。在此处,MDM根据AUC(将总体病例与血沉棕黄层样品进行比较)来分级。对于在血浆的情况下的潜在应用来说,这是一种关键量度,因为大多数的无细胞DNA(cfDNA)源于白细胞。不高度辨别上皮源性癌症与白细胞DNA的任何MDM都将在血液测试形式中失败,无论它在组织的情况下的性能如何。55种MDM中的41种具有的癌症相对于血沉棕

黄层的AUC超过0.9,其中3种实现完全辨别(AUC=1)。表16A、表16B、表16C、表16D和表16E还列出AUC、FC、p值和癌症甲基化%作为评估和证明这些MDM的卓越性的其他关键量度。

[0534] 表17强调用于辨别DCIS HGD与DCIS LGD的最佳10种MDM。

[0535] 表16A.

[0536]

| 基因注释 | 三阴性 AUC | p 值 | 甲基 化% | FC | DM R 编 号 |
|----------|------------|--------|----------|------|----------------|
| ATP6V1B1 | 0.91799 | <.0001 | 27.64 | 3.27 | 15 |
| FOXP4 | 0.63653 | 0.0061 | 52.73 | 1.53 | 96 |
| LMX1B_A | 0.77446 | <.0001 | 26.28 | 3.32 | 149 |

[0537]

| | | | | | |
|----------------------------------|---------|--------|-------|--------|-----|
| BANK1 | 0.72693 | 0.0007 | 23.39 | 1.84 | 17 |
| OTX1 | 0.7987 | <.0001 | 25.43 | 3.46 | 237 |
| ST8SIA4 | 0.69711 | 0.075 | 8.34 | 0.68 | 285 |
| MAX.chr11.1492660 2-14927148 | 0.99441 | <.0001 | 25.03 | 44.82 | 168 |
| UBTF | 0.64026 | 0.0065 | 25.66 | 1.87 | 310 |
| STX16_B | 0.59459 | 0.0021 | 37.06 | 2.48 | 289 |
| KLHDC7B | 0.58155 | 0.1761 | 23.62 | 1.25 | 146 |
| PRKCB | 0.88816 | <.0001 | 14.86 | 32.90 | 256 |
| TBX1 | 0.44548 | 0.7784 | 14.24 | 1.06 | 295 |
| TRH_A | 0.95433 | <.0001 | 25.50 | 9.67 | 303 |
| MPZ | 0.96319 | <.0001 | 21.79 | 75.65 | 221 |
| GP5 | 0.81081 | <.0001 | 26.05 | 3.53 | 104 |
| DNM3_A | 0.53588 | 0.0003 | 9.43 | 11.61 | 69 |
| MAX.chr17.7307368 2-73073814 | 0.61696 | 0.0223 | 26.25 | 1.58 | 174 |
| TRIM67 | 0.88164 | <.0001 | 11.53 | 44.19 | 305 |
| PLXNC1_A | 0.56757 | <.0001 | 6.94 | 10.77 | 245 |
| MAX.chr12.4273906 -4274012 | 0.95433 | <.0001 | 14.01 | 64.62 | 170 |
| CALN1_A | 0.92637 | <.0001 | 14.36 | 34.56 | 36 |
| ITPRIPL1 | 0.73066 | <.0001 | 12.14 | 26.28 | 134 |
| MAX.chr12.4273906 -4274012 | 0.91053 | <.0001 | 10.16 | 299.72 | 170 |
| GYPC_B | 0.69152 | <.0001 | 9.77 | 10.05 | 109 |
| MAX.chr5.42994866 -42994936 | 0.86952 | <.0001 | 12.97 | 18.90 | 198 |
| OSR2_A | 0.65284 | <.0001 | 14.65 | 35.06 | 234 |
| SCRT2 | 0.85927 | <.0001 | 10.26 | 78.29 | 273 |
| MAX.chr5.14572541 0-145725459 | 0.87372 | <.0001 | 8.50 | 43.77 | 193 |
| MAX.chr11.6862286 9-68622968 | 0.67102 | 0.0003 | 9.03 | 10.44 | 169 |
| MAX.chr8.12417303 0-124173395 | 0.79776 | <.0001 | 20.24 | 2.84 | 208 |
| CXCL12 | 0.47717 | 0.0347 | 22.81 | 3.67 | 63 |
| MAX.chr20.1784209 -1784461 | 0.64865 | <.0001 | 7.57 | 23.22 | 185 |
| LOC100132891 | 0.77074 | <.0001 | 10.31 | 33.46 | 153 |
| BHLHE23_D | 0.80429 | <.0001 | 6.09 | 94.32 | 24 |
| ALOX5 | 0.60951 | 0.0006 | 8.79 | 8.24 | 9 |
| MAX.chr19.4637990 | 0.72693 | <.0001 | 7.50 | 18.54 | 179 |

[0538]

| | | | | | |
|--------------------------------|---------|--------|-------|--------|-----|
| 3-46380197 | | | | | |
| ODC1 | 0.50326 | 0.0009 | 5.35 | 11.28 | 231 |
| CHST2_B | 0.59226 | 0.0003 | 6.21 | 115.56 | 57 |
| MAX.chr5.77268672 -77268725 | 0.87698 | <.0001 | 11.21 | 43.30 | 199 |
| C17orf64 | 0.64678 | <.0001 | 19.80 | 21.95 | 29 |
| EMX1_A | 0.81454 | <.0001 | 8.05 | 61.16 | 74 |
| CHST2_A | 0.4986 | 0.0014 | 4.33 | 52.73 | 56 |
| DSCR6 | 0.83504 | <.0001 | 8.99 | 92.33 | 72 |
| ITPRIPL1 | 0.75676 | <.0001 | 11.13 | 26.84 | 134 |
| IGF2BP3_B | 0.62302 | 0.0099 | 11.34 | 28.74 | 124 |
| CDH4_E | 0.71016 | <.0001 | 4.40 | 8.46 | 53 |
| NACAD | 0.77213 | <.0001 | 4.51 | 40.68 | 223 |
| DLX4 | 0.94874 | <.0001 | 26.56 | 11.40 | 66 |
| ABLIM1 | 0.7931 | <.0001 | 6.12 | 309.82 | 3 |
| BHLHE23_C | 0.71109 | <.0001 | 7.21 | 64.86 | 23 |
| MAST1 | 0.66356 | <.0001 | 11.84 | 39.32 | 160 |
| ZSCAN12 | 0.7754 | <.0001 | 7.32 | 130.97 | 327 |
| SLC30A10 | 0.64585 | 0.003 | 4.45 | 28.19 | 279 |
| GRASP | 0.75862 | <.0001 | 7.85 | 48.03 | 105 |
| C10orf125 | 0.59972 | 0.0007 | 7.38 | 6.46 | 27 |

[0539] 表16B.

[0540]

| 基因注释 | HER2+ AUC | p 值 | 甲 基 化% | FC | DMR 编号 |
|---------------------------------|--------------|--------|-----------|-------|-----------|
| ATP6V1B1 | 0.90143 | <.0001 | 29.30 | 3.47 | 15 |
| FOXP4 | 0.55008 | 0.1059 | 43.50 | 1.26 | 96 |
| LMX1B_A | 0.86725 | <.0001 | 26.35 | 3.33 | 149 |
| BANK1 | 0.80843 | <.0001 | 29.09 | 2.29 | 17 |
| OTX1 | 0.84261 | <.0001 | 27.67 | 3.76 | 237 |
| ST8SIA4 | 0.63275 | 0.0135 | 18.88 | 1.54 | 285 |
| MAX.chr11.1492660 2-14927148 | 0.94913 | <.0001 | 20.82 | 37.28 | 168 |
| UBTF | 0.82989 | <.0001 | 45.57 | 3.32 | 310 |
| STX16_B | 0.62401 | 0.0042 | 36.51 | 2.45 | 289 |
| KLHDC7B | 0.61447 | 0.0227 | 28.31 | 1.50 | 146 |
| PRKCB | 0.9221 | <.0001 | 17.64 | 39.07 | 256 |
| TBX1 | 0.36486 | 0.8886 | 14.01 | 1.04 | 295 |
| TRH_A | 0.95946 | <.0001 | 32.64 | 12.38 | 303 |
| MPZ | 0.95588 | <.0001 | 26.60 | 92.35 | 221 |

[0541]

| | | | | | |
|----------------------------------|---------|--------|-------|--------|-----|
| GP5 | 0.86169 | <.0001 | 40.00 | 5.43 | 104 |
| DNM3_A | 0.96502 | <.0001 | 29.87 | 36.79 | 69 |
| MAX.chr17.7307368 2-73073814 | 0.42687 | 0.7884 | 17.65 | 1.06 | 174 |
| TRIM67 | 0.91335 | <.0001 | 10.00 | 38.35 | 305 |
| PLXNC1_A | 0.86963 | <.0001 | 11.11 | 17.25 | 245 |
| MAX.chr12.4273906 -4274012 | 0.84976 | <.0001 | 10.53 | 48.55 | 170 |
| CALN1_A | 0.87917 | <.0001 | 12.21 | 29.38 | 36 |
| ITPRIPL1 | 0.95866 | <.0001 | 23.28 | 50.38 | 134 |
| MAX.chr12.4273906 -4274012 | 0.8752 | <.0001 | 5.88 | 173.48 | 170 |
| GYPC_B | 0.98569 | <.0001 | 20.00 | 20.57 | 109 |
| MAX.chr5.42994866 -42994936 | 0.94436 | <.0001 | 12.87 | 18.76 | 198 |
| OSR2_A | 0.8283 | <.0001 | 22.48 | 53.78 | 234 |
| SCRT2 | 0.88116 | <.0001 | 7.61 | 58.12 | 273 |
| MAX.chr5.14572541 0-145725459 | 0.96343 | <.0001 | 13.01 | 67.01 | 193 |
| MAX.chr11.6862286 9-68622968 | 0.95151 | <.0001 | 21.77 | 25.18 | 169 |
| MAX.chr8.12417303 0-124173395 | 0.81558 | <.0001 | 22.14 | 3.10 | 208 |
| CXCL12 | 0.60413 | 0.0012 | 34.62 | 5.57 | 63 |
| MAX.chr20.1784209 -1784461 | 0.96105 | <.0001 | 13.80 | 42.33 | 185 |
| LOC100132891 | 0.91773 | <.0001 | 22.35 | 72.51 | 153 |
| BHLHE23_D | 0.84499 | <.0001 | 5.47 | 84.74 | 24 |
| ALOX5 | 0.89587 | <.0001 | 20.49 | 19.21 | 9 |
| MAX.chr19.4637990 3-46380197 | 0.88394 | <.0001 | 15.20 | 37.60 | 179 |
| ODC1 | 0.86248 | <.0001 | 10.09 | 21.29 | 231 |
| CHST2_B | 0.92806 | <.0001 | 15.73 | 292.49 | 57 |
| MAX.chr5.77268672 -77268725 | 0.93084 | <.0001 | 12.93 | 49.95 | 199 |
| C17orf64 | 0.95469 | <.0001 | 32.32 | 35.82 | 29 |
| EMX1_A | 0.88474 | <.0001 | 11.68 | 88.73 | 74 |
| CHST2_A | 0.83863 | <.0001 | 8.85 | 107.82 | 56 |
| DSCR6 | 0.94118 | <.0001 | 7.61 | 78.17 | 72 |
| ITPRIPL1 | 0.9531 | <.0001 | 23.40 | 56.42 | 134 |
| IGF2BP3_B | 0.86606 | <.0001 | 27.94 | 70.85 | 124 |
| CDH4_E | 0.77424 | <.0001 | 6.06 | 11.65 | 53 |

| | | | | | | |
|--------|-----------|---------|--------|-------|--------|-----|
| [0542] | NACAD | 0.78219 | <.0001 | 4.02 | 36.27 | 223 |
| | DLX4 | 0.83227 | <.0001 | 32.28 | 13.86 | 66 |
| | ABLIM1 | 0.83148 | <.0001 | 6.60 | 333.82 | 3 |
| | BHLHE23_C | 0.84579 | <.0001 | 7.29 | 65.61 | 23 |
| | MAST1 | 0.79571 | <.0001 | 14.23 | 47.24 | 160 |
| | ZSCAN12 | 0.86248 | <.0001 | 8.11 | 145.16 | 327 |
| | SLC30A10 | 0.79849 | <.0001 | 9.87 | 62.56 | 279 |
| | GRASP | 0.8124 | <.0001 | 9.75 | 59.63 | 105 |
| | C10orf125 | 0.82273 | <.0001 | 10.54 | 9.22 | 27 |

[0543] 表16C.

| 基因注释 | 管腔 A 型 AUC | p 值 | 甲基 化% | FC | DM R 编 号 | |
|--------|---------------------------------|---------|----------|-------|----------------|-----|
| [0544] | ATP6V1B1 | 0.86937 | <.0001 | 22.81 | 2.70 | 15 |
| | FOXP4 | 0.72222 | 0.0004 | 47.80 | 1.39 | 96 |
| | LMX1B_A | 0.89489 | <.0001 | 26.33 | 3.32 | 149 |
| | BANK1 | 0.88363 | <.0001 | 30.59 | 2.41 | 17 |
| | OTX1 | 0.85736 | <.0001 | 28.06 | 3.81 | 237 |
| | ST8SIA4 | 0.82583 | <.0001 | 29.43 | 2.40 | 285 |
| | MAX.chr11.1492660 2-14927148 | 0.84159 | <.0001 | 9.80 | 17.54 | 168 |
| | UBTF | 0.89865 | <.0001 | 45.16 | 3.29 | 310 |
| | STX16_B | 0.72523 | <.0001 | 42.32 | 2.84 | 289 |
| | KLHDC7B | 0.76426 | <.0001 | 33.45 | 1.77 | 146 |
| | PRKCB | 0.9542 | <.0001 | 24.47 | 54.19 | 256 |
| | TBX1 | 0.72297 | 0.0688 | 9.74 | 0.72 | 295 |
| | TRH_A | 0.93168 | <.0001 | 27.00 | 10.24 | 303 |
| | MPZ | 0.87725 | <.0001 | 9.40 | 32.62 | 221 |
| | GP5 | 0.72823 | <.0001 | 20.40 | 2.77 | 104 |
| | DNM3_A | 0.97748 | <.0001 | 31.67 | 39.00 | 69 |
| | MAX.chr17.7307368 2-73073814 | 0.52177 | 0.3713 | 19.47 | 1.17 | 174 |
| | TRIM67 | 0.93619 | <.0001 | 10.08 | 38.66 | 305 |
| | PLXNC1_A | 0.81081 | <.0001 | 14.22 | 22.09 | 245 |
| | MAX.chr12.4273906 -4274012 | 0.91216 | <.0001 | 11.65 | 53.72 | 170 |
| | CALN1_A | 0.87012 | <.0001 | 9.36 | 22.52 | 36 |
| | ITPRIPL1 | 0.90841 | <.0001 | 12.19 | 26.37 | 134 |
| | MAX.chr12.4273906 | 0.94482 | <.0001 | 5.19 | 153.20 | 170 |

| | | | | | |
|------------------------------|---------|--------|-------|--------|-----|
| -4274012 | | | | | |
| GYPC_B | 0.91742 | <.0001 | 16.59 | 17.06 | 109 |
| MAX.chr5.42994866-42994936 | 0.83859 | <.0001 | 7.69 | 11.21 | 198 |
| OSR2_A | 0.82995 | <.0001 | 13.90 | 33.26 | 234 |
| SCRT2 | 0.80143 | <.0001 | 4.15 | 31.68 | 273 |
| MAX.chr5.145725410-145725459 | 0.91066 | <.0001 | 7.10 | 36.56 | 193 |
| MAX.chr11.68622869-68622968 | 0.94219 | <.0001 | 14.20 | 16.42 | 169 |
| MAX.chr8.124173030-124173395 | 0.88589 | <.0001 | 19.02 | 2.66 | 208 |
| CXCL12 | 0.76201 | <.0001 | 46.83 | 7.54 | 63 |
| MAX.chr20.1784209-1784461 | 0.89189 | <.0001 | 9.92 | 30.44 | 185 |
| LOC100132891 | 0.93956 | <.0001 | 15.50 | 50.30 | 153 |
| BHLHE23_D | 0.82808 | <.0001 | 4.39 | 67.94 | 24 |
| ALOX5 | 0.83033 | <.0001 | 14.53 | 13.62 | 9 |
| MAX.chr19.46379903-46380197 | 0.83408 | <.0001 | 11.15 | 27.58 | 179 |
| ODC1 | 0.91967 | <.0001 | 9.20 | 19.40 | 231 |
| CHST2_B | 0.94557 | <.0001 | 15.06 | 280.03 | 57 |
| MAX.chr5.77268672-77268725 | 0.86186 | <.0001 | 9.93 | 38.36 | 199 |
| C17orf64 | 0.95495 | <.0001 | 27.43 | 30.41 | 29 |
| EMX1_A | 0.91366 | <.0001 | 9.89 | 75.12 | 74 |
| CHST2_A | 0.95646 | <.0001 | 11.32 | 137.95 | 56 |
| DSCR6 | 0.77928 | <.0001 | 3.50 | 35.98 | 72 |
| ITPRIPL1 | 0.89414 | <.0001 | 7.98 | 19.25 | 134 |
| IGF2BP3_B | 0.9223 | <.0001 | 27.68 | 70.19 | 124 |
| CDH4_E | 0.81757 | <.0001 | 7.40 | 14.23 | 53 |
| NACAD | 0.70833 | 0.0006 | 2.88 | 25.92 | 223 |
| DLX4 | 0.76877 | <.0001 | 9.95 | 4.27 | 66 |
| ABLIM1 | 0.8217 | <.0001 | 3.92 | 198.44 | 3 |
| BHLHE23_C | 0.79992 | <.0001 | 5.53 | 49.76 | 23 |
| MAST1 | 0.71096 | 0.0006 | 5.15 | 17.10 | 160 |
| ZSCAN12 | 0.67042 | 0.0114 | 2.65 | 47.50 | 327 |
| SLC30A10 | 0.90053 | <.0001 | 11.36 | 71.97 | 279 |
| GRASP | 0.72598 | <.0001 | 4.84 | 29.64 | 105 |
| C10orf125 | 0.88964 | <.0001 | 18.44 | 16.13 | 27 |

[0545]

[0546] 表16D.

[0547]

| 基因注释 | 管腔 B 型 AUC | p 值 | 甲 基 化% | FC | DMR 编号 |
|----------------------------------|---------------|--------|-----------|--------|-----------|
| ATP6V1B1 | 0.85838 | <.0001 | 27.93 | 3.31 | 15 |
| FOXP4 | 0.59676 | 0.023 | 48.67 | 1.41 | 96 |
| LMX1B_A | 0.90811 | <.0001 | 27.31 | 3.45 | 149 |
| BANK1 | 0.80865 | <.0001 | 31.07 | 2.45 | 17 |
| OTX1 | 0.89838 | <.0001 | 32.49 | 4.42 | 237 |
| ST8SIA4 | 0.62811 | 0.0286 | 19.04 | 1.55 | 285 |
| MAX.chr11.149266 02-14927148 | 0.99351 | <.0001 | 21.39 | 38.30 | 168 |
| UBTF | 0.87784 | <.0001 | 52.44 | 3.82 | 310 |
| STX16_B | 0.71892 | 0.0002 | 39.48 | 2.65 | 289 |
| KLHDC7B | 0.72432 | 0.001 | 34.42 | 1.82 | 146 |
| PRKCB | 0.91243 | <.0001 | 20.33 | 45.01 | 256 |
| TBX1 | 0.38054 | 0.372 | 18.89 | 1.40 | 295 |
| TRH_A | 0.92649 | <.0001 | 31.24 | 11.85 | 303 |
| MPZ | 0.95189 | <.0001 | 18.90 | 65.63 | 221 |
| GP5 | 0.77189 | <.0001 | 35.26 | 4.78 | 104 |
| DNM3_A | 0.89514 | <.0001 | 25.61 | 31.54 | 69 |
| MAX.chr17.730736 82-73073814 | 0.58595 | 0.0507 | 25.18 | 1.51 | 174 |
| TRIM67 | 0.92 | <.0001 | 12.08 | 46.32 | 305 |
| PLXNC1_A | 0.80973 | <.0001 | 8.38 | 13.02 | 245 |
| MAX.chr12.427390 6-4274012 | 0.89622 | <.0001 | 12.62 | 58.22 | 170 |
| CALN1_A | 0.80541 | <.0001 | 10.14 | 24.39 | 36 |
| ITPRIPL1 | 0.95135 | <.0001 | 21.99 | 47.60 | 134 |
| MAX.chr12.427390 6-4274012 | 0.87135 | <.0001 | 5.91 | 174.39 | 170 |
| GYPC_B | 0.8973 | <.0001 | 15.82 | 16.27 | 109 |
| MAX.chr5.4299486 6-42994936 | 0.92973 | <.0001 | 11.46 | 16.71 | 198 |
| OSR2_A | 0.92216 | <.0001 | 24.46 | 58.54 | 234 |
| SCRT2 | 0.82216 | <.0001 | 10.65 | 81.27 | 273 |
| MAX.chr5.1457254 10-145725459 | 0.89351 | <.0001 | 12.41 | 63.94 | 193 |
| MAX.chr11.686228 69-68622968 | 0.93297 | <.0001 | 39.01 | 45.12 | 169 |
| MAX.chr8.1241730 | 0.9373 | <.0001 | 27.88 | 3.91 | 208 |

| | | | | | | |
|--------|---------------------------------|---------|--------|-------|--------|-----|
| | 30-124173395 | | | | | |
| | CXCL12 | 0.53405 | 0.0003 | 64.30 | 10.35 | 63 |
| | MAX.chr20.178420 9-1784461 | 0.87784 | <.0001 | 17.84 | 54.72 | 185 |
| | LOC100132891 | 0.92541 | <.0001 | 34.07 | 110.53 | 153 |
| | BHLHE23_D | 0.8 | <.0001 | 6.95 | 107.58 | 24 |
| | ALOX5 | 0.84432 | <.0001 | 20.19 | 18.93 | 9 |
| | MAX.chr19.463799 03-46380197 | 0.94054 | <.0001 | 18.28 | 45.21 | 179 |
| | ODC1 | 0.68973 | <.0001 | 5.35 | 11.29 | 231 |
| | CHST2_B | 0.86324 | <.0001 | 10.01 | 186.17 | 57 |
| | MAX.chr5.7726867 2-77268725 | 0.96541 | <.0001 | 15.27 | 58.97 | 199 |
| | C17orf64 | 0.90595 | <.0001 | 32.60 | 36.14 | 29 |
| [0548] | EMX1_A | 0.8973 | <.0001 | 15.12 | 114.84 | 74 |
| | CHST2_A | 0.72865 | <.0001 | 6.30 | 76.74 | 56 |
| | DSCR6 | 0.92432 | <.0001 | 9.59 | 98.53 | 72 |
| | ITPRIPL1 | 0.91135 | <.0001 | 19.45 | 46.90 | 134 |
| | IGF2BP3_B | 0.82973 | <.0001 | 45.42 | 115.16 | 124 |
| | CDH4_E | 0.81838 | <.0001 | 9.05 | 17.39 | 53 |
| | NACAD | 0.75081 | 0.0002 | 6.43 | 57.97 | 223 |
| | DLX4 | 0.94595 | <.0001 | 21.61 | 9.28 | 66 |
| | ABLIM1 | 0.88541 | <.0001 | 4.31 | 217.96 | 3 |
| | BHLHE23_C | 0.8 | <.0001 | 10.48 | 94.28 | 23 |
| | MAST1 | 0.77622 | <.0001 | 7.76 | 25.77 | 160 |
| | ZSCAN12 | 0.72054 | 0.0002 | 15.29 | 273.71 | 327 |
| | SLC30A10 | 0.74595 | <.0001 | 8.48 | 53.74 | 279 |
| | GRASP | 0.79459 | <.0001 | 5.88 | 35.98 | 105 |
| | C10orf125 | 0.50757 | 0.0006 | 6.91 | 6.04 | 27 |

[0549] 表16E.

| 基因注释 | 总体 AUC | p 值 | 甲基 化% | FC | DMR 编号 |
|-----------------|-----------|--------|----------|-------|-----------|
| ATP6V1B1 | 0.88731 | <.0001 | 26.75 | 3.17 | 15 |
| FOXP4 | 0.62969 | 0.0032 | 47.95 | 1.39 | 96 |
| [0550] LMX1B_A | 0.86181 | <.0001 | 26.52 | 3.35 | 149 |
| BANK1 | 0.81125 | <.0001 | 28.59 | 2.25 | 17 |
| OTX1 | 0.84786 | <.0001 | 28.23 | 3.84 | 237 |
| ST8SIA4 | 0.61072 | 0.0054 | 19.51 | 1.59 | 285 |
| MAX.chr11.14926 | 0.93745 | <.0001 | 18.72 | 33.52 | 168 |

[0551]

| | | | | | |
|----------------------------------|---------|--------|-------|--------|-----|
| 602-14927148 | | | | | |
| UBTF | 0.81517 | <.0001 | 42.18 | 3.07 | 310 |
| STX16_B | 0.66565 | <.0001 | 38.93 | 2.61 | 289 |
| KLHDC7B | 0.67241 | 0.0005 | 29.94 | 1.58 | 146 |
| PRKCB | 0.92153 | <.0001 | 19.52 | 43.21 | 256 |
| TBX1 | 0.36127 | 0.9266 | 13.81 | 1.02 | 295 |
| TRH_A | 0.94355 | <.0001 | 29.05 | 11.02 | 303 |
| MPZ | 0.93396 | <.0001 | 18.93 | 65.72 | 221 |
| GP5 | 0.79294 | <.0001 | 30.09 | 4.08 | 104 |
| DNM3_A | 0.85418 | <.0001 | 24.75 | 30.48 | 69 |
| MAX.chr17.73073 682-73073814 | 0.53095 | 0.1372 | 21.71 | 1.31 | 174 |
| TRIM67 | 0.91391 | <.0001 | 10.80 | 41.41 | 305 |
| PLXNC1_A | 0.76983 | <.0001 | 10.49 | 16.29 | 245 |
| MAX.chr12.42739 06-4274012 | 0.9017 | <.0001 | 12.09 | 55.76 | 170 |
| CALN1_A | 0.87271 | <.0001 | 11.47 | 27.59 | 36 |
| ITPRIPL1 | 0.88928 | <.0001 | 17.19 | 37.21 | 134 |
| MAX.chr12.42739 06-4274012 | 0.9029 | <.0001 | 6.69 | 197.30 | 170 |
| GYPC_B | 0.87925 | <.0001 | 15.78 | 16.22 | 109 |
| MAX.chr5.429948 66-42994936 | 0.8932 | <.0001 | 11.11 | 16.19 | 198 |
| OSR2_A | 0.80667 | <.0001 | 18.56 | 44.40 | 234 |
| SCRT2 | 0.841 | <.0001 | 7.84 | 59.82 | 273 |
| MAX.chr5.145725 410-145725459 | 0.91303 | <.0001 | 10.12 | 52.12 | 193 |
| MAX.chr11.68622 869-68622968 | 0.87947 | <.0001 | 20.07 | 23.21 | 169 |
| MAX.chr8.124173 030-124173395 | 0.85636 | <.0001 | 21.94 | 3.08 | 208 |
| CXCL12 | 0.60615 | <.0001 | 41.39 | 6.66 | 63 |
| MAX.chr20.17842 09-1784461 | 0.85113 | <.0001 | 12.03 | 36.91 | 185 |
| LOC100132891 | 0.89124 | <.0001 | 19.91 | 64.60 | 153 |
| BHLHE23_D | 0.82149 | <.0001 | 5.60 | 86.71 | 24 |
| ALOX5 | 0.79948 | <.0001 | 15.96 | 14.97 | 9 |
| MAX.chr19.46379 903-46380197 | 0.84416 | <.0001 | 12.85 | 31.77 | 179 |
| ODC1 | 0.76024 | <.0001 | 7.77 | 16.38 | 231 |
| CHST2_B | 0.84154 | <.0001 | 12.15 | 226.06 | 57 |
| MAX.chr5.772686 | 0.90519 | <.0001 | 12.13 | 46.85 | 199 |

| | | | | | |
|--------|-------------|---------|--------|-------|--------|
| | 72-77268725 | | | | |
| | C17orf64 | 0.87293 | <.0001 | 28.03 | 31.07 |
| | EMX1_A | 0.88056 | <.0001 | 11.01 | 83.60 |
| | CHST2_A | 0.77114 | <.0001 | 8.00 | 97.42 |
| | DSCR6 | 0.86595 | <.0001 | 7.14 | 73.34 |
| | ITPRIPL1 | 0.88165 | <.0001 | 15.26 | 36.79 |
| | IGF2BP3_B | 0.81822 | <.0001 | 27.51 | 69.74 |
| [0552] | CDH4_E | 0.78073 | <.0001 | 6.67 | 12.81 |
| | NACAD | 0.75207 | <.0001 | 4.29 | 38.67 |
| | DLX4 | 0.86399 | <.0001 | 22.31 | 9.58 |
| | ABLIM1 | 0.83054 | <.0001 | 5.25 | 265.54 |
| | BHLHE23_C | 0.79174 | <.0001 | 7.40 | 66.61 |
| | MAST1 | 0.73627 | <.0001 | 9.73 | 32.31 |
| | ZSCAN12 | 0.75774 | <.0001 | 7.79 | 139.40 |
| | SLC30A10 | 0.78182 | <.0001 | 8.75 | 55.48 |
| | GRASP | 0.77114 | <.0001 | 7.10 | 43.44 |
| | C10orf125 | 0.72646 | <.0001 | 11.36 | 9.94 |

[0553] 表17.表17强调用于辨别DCIS HGD与DCIS LGD的最佳10种MDM。

| 基因注释 | AUC | p 值 | DMR 编号 |
|------------------------------|---------|--------|--------|
| DSCR6 | 0.9127 | <.0001 | 72 |
| SCRT2 | 0.86905 | 0.0314 | 273 |
| MPZ | 0.85714 | 0.0275 | 221 |
| MAX.chr8.124173030-124173395 | 0.84127 | 0.0122 | 208 |
| OSR2_A | 0.84127 | 0.0067 | 234 |
| MAX.chr11.68622869-68622968 | 0.82143 | 0.0067 | 169 |
| ITPRIPL1 | 0.81746 | 0.0851 | 134 |
| MAX.chr5.145725410-145725459 | 0.81349 | 0.0037 | 193 |
| BHLHE23_C | 0.80952 | 0.004 | 23 |
| ITPRIPL1 | 0.80556 | 0.0658 | 134 |

[0555] 实施例III.

[0556] 这个实施例描述对用于检测乳腺癌的乳腺组织标志物和血浆标志物的鉴定。

[0557] 用于检测乳腺癌的候选甲基化标志物通过对乳腺癌和正常乳腺组织样品的RRBS来鉴定。最初鉴定了58种标志物,并且设计以及订购靶标富集长探针定量扩增信号测定(对于一般性技术,参见例如W02017/075061和美国专利申请序列号15,841,006)(表18显示区分乳腺癌组织与正常乳腺组织的甲基化区域)(表19和表20显示针对表18中所示的标志物的引物和探针序列)。在设计筛选和重新设计之后,选择56种标志物(参见表21)并进行测定,加以三路化并采用组织进行测试。测定在FAM报告与HEX报告之间等分,并且用对Quasar670进行报告的参考测定B3GALT6加以三路化。

[0558] 表18.区分乳腺癌组织与正常乳腺组织的甲基化区域

[0559]

| DMR 编号 | 基因注释 | 在染色体上的区域(起始碱基-结束 碱基) |
|-----------|-------------|---------------------------|
| 329 | ABLIM1_B | chr10:116391634-116391781 |
| 330 | AJAP1_C | chr1:4715533-4715652 |
| 331 | ALOX5_B | chr10:45914740-45914889 |
| 332 | ASCL2_B | chr11:2292232-2292371 |
| 333 | BANK1_B | chr4:102711861-102712082 |
| 334 | BHLHE23_E | chr20:61638334-61638574 |
| 335 | C10orf125_B | chr10:135171404-135171514 |
| 336 | C17orf64_B | chr17:58499085-58499196 |
| 337 | CALN1_1520 | chr7:71801485-71801604 |
| 37 | CALN1_B | Chr7:71801741-71801800 |
| 339 | CD1D_1058 | chr1:158150861-158151139 |
| 340 | CDH4_7890 | chr20:59827763-59828158 |
| 341 | CHST2_8128 | chr3:142838015-142838501 |
| 342 | CHST2_8384 | chr3:142838015-142838501 |
| 343 | CHST2_9316 | chr3:142839218-142839575 |
| 344 | CHST2_9470 | chr3:142839218-142839575 |
| 345 | CLIC6_B | chr21:36042020-36042140 |
| 346 | CXCL12_B | chr10:44881200-44881315 |
| 347 | DLX4_B | chr17:48042552-48042616 |
| 348 | DNM3_D | chr1:171810425-171810575 |
| 74 | EMX1_A | chr2:73151498-73151578 |
| 349 | ESPN_B | chr1:6507924-6508087 |
| 350 | FAM59B_7764 | chr2:26407703-26407976 |
| 351 | FOXP4_B | chr6:41528816-41528912 |
| 104 | GP5 | chr3:194118738-194118924 |

| | | | |
|--------|-----|-----------------------------|---------------------------|
| | 352 | HOXA1_C | chr7:27135593-27135895 |
| | 353 | IGF2BP3_C | chr7: 23513861-23514064 |
| | 354 | IPTRIPL1_1138 | chr2:96990958-96991338 |
| | 355 | IPTRIPL1_1200 | chr2:96990958-96991338 |
| | 356 | KCNK9_B | chr8:140715096-140715177 |
| | 357 | KCNK17_C | chr6:39281887-39281994 |
| | 358 | KLHDC7B_B | chr22:50987209-50987311 |
| | 359 | LAYN_B | chr11:111412023-111412090 |
| | 360 | LIME1_B | chr20:62369173-62369342 |
| | 361 | LMX1B_D | chr9:129388170-129388223 |
| | 362 | LOC100132891_B | chr8:72755986-72756299 |
| | 375 | MAST1_B | chr19:12978496-12978642 |
| | 338 | MAX.chr12.427.br | chr12:4273906-4274012 |
| | 174 | MAX.chr17.73073682-73073814 | chr17:73073682-73073814 |
| | 363 | MAX.chr20.4422 | chr20:1784207-1784471 |
| [0560] | 364 | MPZ_5742 | chr1:161275554-161276006 |
| | 365 | MPZ_5554 | chr1:161275554-161276006 |
| | 366 | MSX2P1_B | chr17:56234426-56234520 |
| | 367 | ODC1_B | chr2:10589075-10589225 |
| | 234 | OSR2_A | chr8:99952233-99952366 |
| | 368 | OTX1_B | chr2:63281460-63281599 |
| | 246 | PLXNC1_B | chr12:94544333-94544426 |
| | 369 | PRKCB_7570 | chr16:23847569-23847705 |
| | 370 | SCRT2_C | chr20:644563-644631 |
| | 279 | SLC30A10 | chr1:220101458-220101634 |
| | 371 | SPHK2_B | chr19:49127571-49127685 |
| | 372 | ST8SIA4_B | chr5:100240049-100240286 |
| | 373 | STX16_C | chr20:57225077-57225237 |
| | 374 | TBX1_B | chr22:19754226-19754419 |
| | 303 | TRH_A | chr3:129693484-129693575 |
| | 328 | TRIM67_B | chr1:231297039-231297163 |

[0561] 表19.

| 基因注释 | DMR 编号 | 正向引物 5'-3' | SEQ ID NO: | 反向引物 5'-3' | SEQ ID NO: |
|----------|-----------|------------------------------|------------------|----------------------------------|------------------|
| ABLIM1_B | 329 | TGGTAATCGGGT TTTTCGACG | 255 | CCGCGAATCTATCT ACCGAAAC | 256 |
| AJAP1_C | 330 | GTGTTAGGTTGG GCGGAAG | 257 | GTTACCCGCTTACG AAAAACGA | 258 |
| ALOX5_B | 331 | TTCGTTTTTTGT CGGGAGTTATTC | 259 | TCCAAAAATTAAAT TAAAAACGCTACGC | 260 |
| ASCL2_B | 332 | ATAATACGGTTG TTCGGGAGG | 261 | GTAAATATAAACTA CGCGACGCGTA | 262 |
| BANK1_B | 333 | GAGAGTTTAGGT | 263 | CCTAACGCTACTAA | 264 |

[0563]

| | | | | | |
|---------------|-----|-------------------------------------|-----|--|-----|
| | | AGCGTTCGG | | CAACATTATAACGA | |
| BHLHE23_E | 334 | CGCGGTTTTGGA GCGTTAG | 265 | CCGAAACGACCGA AAACGAC | 266 |
| C10orf125_B | 335 | CGGTTTCGTTGCG TTATCGA | 267 | CCCCCGAACTACTC TACGCG | 268 |
| C17orf64_B | 336 | GATTATATTCGG ATTTGTTTATCG CGT | 269 | GACTCTTCCTACCC GCGA | 270 |
| CALN1_1520 | 337 | GCGGTTTTTAGT TCGCGGG | 271 | AACAAATAATTAAC AAACAACGCCTCC | 272 |
| CALN1_B | 37 | TCGTTTCGGCGTA TTATTTTCGTAT | 273 | CGCGAAAAACTTC CTCCGA | 274 |
| CD1D_1058 | 339 | GGATTGGTGAGA TTCGGGAC | 275 | CCCGAAACCAAAA ACAACGA | 276 |
| CDH4_7890 | 340 | CGGGGAGTTTC GTTTGTATCG | 277 | CGAATAACGACTAC GAACTTTAAACG | 278 |
| CHST2_8128 | 341 | CGTAGTTATAGA TTATTAGAGAG GGCG | 279 | CTAAAACGATAAAA AAACGCGAAACG | 280 |
| CHST2_8384 | 342 | TGGTAGTTTTTCG GTATCGACGAG | 281 | TAACTCTACGCGCA AAACGC | 282 |
| CHST2_9316 | 343 | GGGATTTTTAGC GGAAGCGA | 283 | CGACGAACTATCCG ACTATCACT | 284 |
| CHST2_9470 | 344 | CGGAGGAATCG GGTAGAATCG | 285 | ACTCTCCATAACA ACGACTCC | 286 |
| CLIC6_B | 345 | CGCGTAGGGCG AGTTTC | 287 | GCCTCCTCCTACCT CTCG | 288 |
| CXCL12_B | 346 | TCGGCGGTTTTT AGTAAAAGCG | 289 | AAATCTCCCGTCCC ACTCC | 290 |
| DLX4_B | 347 | GGTATATTCGCG TAGGTGCG | 291 | AACCGAATACCGAA ATCTATAACCC | 292 |
| DNM3_D | 348 | GTAGTTGGGTTG TAGTGCGTG | 293 | CCCGAACTTCCCAT CGAAC | 294 |
| EMX1_A | 74 | TTCGTACGGTTT TTTCGTTTTTCG | 295 | CCACCACGTAATAA TTCTTCTCGAAA | 296 |
| ESPN_B | 349 | CGGTTTGATATTA TTCGGGGTTCG | 297 | AATTAACGCCCCCT ATAACATCC | 298 |
| FAM59B_7764 | 350 | CGCGATAGCGTT TTTTATTGTCGC G | 299 | CGCACGACCGTAA AATACTCG | 300 |
| FOXP4_B | 351 | CGGTTTCGTAGAT TGTTTTAGAGCG | 301 | CAAATACCGTCGAA AAAAAACTAAATCA AAAC | 302 |
| GP5 | 104 | CGTTGTAGGACG GTTATGTCG | 303 | CATCCTACTCTTCG AAATAAACCGC | 304 |
| HOXA1_C | 352 | AGTCGTTTTTTT AGGTAGTTTAGG CG | 305 | CGACCTTTACAATC GCCGC | 306 |
| IGF2BP3_C | 353 | AGATTGGCGCGT AAAAGCG | 307 | ACCGACCCCGAAA AACG | 308 |
| IPTR1PL1_1138 | 354 | CGTTTTTCGGAGT CGCGTG | 309 | AACCATACTTATCC GAACGTCTAAAC | 310 |
| IPTR1PL1_1200 | 355 | GAGTAGGGTTAT TTTCGCGGG | 311 | CTACTTTTTTCCCG ACAAAATAAAAAC | 312 |

[0564]

| | | | | | |
|-------------------------------------|-----|---|-----|--|-----|
| | | | | GT | |
| KCNK9_B | 356 | TTTTCGCGTATT TCGTGGTTC | 313 | AACGCCGCCGTATT CG | 314 |
| KCNK17_C | 357 | TCGCGTTGGAA GTTGCG | 315 | CGTATTCTAAACGC TAAAAACCGC | 316 |
| KLHDC7B_B | 358 | CGGCGGTAGTTT TGCGG | 317 | CTACTAAACAAAA CCAACACGTCC | 318 |
| LAYN_B | 359 | GGTAGGTTTGTT AGTTGGTTTTCG | 319 | CGCTATCTCTACGA CCGCCT | 320 |
| LIME1_B | 360 | CGGAGGTAGCG GGCGAG | 321 | CACTCACCGCTTCC GCC | 322 |
| LMX1B_D | 361 | GGCGTTCGTTTC GGCG | 323 | CGCTTCTCCGACGC CC | 324 |
| LOC100132 891_B | 362 | GCGGTTGAGTTT TTGGTCGG | 325 | CCCCGTATAACTAA AAACGACGAC | 326 |
| MAST1_B | 375 | CGTTTTTTTTATG TAGTAAGCGATT TTTCGC | 327 | AAACGACGACGAA CGCC | 328 |
| MAX.chr12. 427.br | 338 | GCGTTTTGGTTT TTTCGTTTCGAG | 329 | GAACGACGAAACT AAAACCGC | 330 |
| MAX.chr17. 73073682-73 073814 | 174 | CGTTTTTTGGTA GTTTTTTTCGAG TCG | 331 | GCTTAAACGTAACC GAAACGCC | 332 |
| MAX.chr20. 4422 | 363 | GGTTGCGCGTCC TTTTTTC | 333 | CCCGACGCGTTTAA ATCGT | 334 |
| MPZ_5742 | 364 | GGATGGGAATAG TTAAGTTTTAGT CGTT | 335 | TCCAACATTACATA CAACACTAACGTC | 336 |
| MPZ_5554 | 365 | GGTTAGGGGTG GAGTTCGTTA | 337 | ACTCCGAACTCTAC TCATCCTTTC | 338 |
| MSX2P1_B | 366 | TAGGTTGGAGAT TTTGACGCG | 339 | CGAAACCTAAAAA CGCCGAAAC | 340 |
| ODC1_B | 367 | GGTTGGTAGTCG TTTTTACGTTTT C | 341 | CAAAACCCATCTAA TTACAAAATACCTC GA | 342 |
| OSR2_A | 234 | TGGAGTTATCGG AAGGCGA | 343 | CGAACTCCCGAAA CGACG | 344 |
| OTX1_B | 368 | GGAAATGGTTTA GAGTTTTGGATT TCG | 345 | TTCTAAAAAATACT TTCGATACCGACA | 346 |
| PLXNC1_B | 246 | GTGGTTTGAAG AGTTGTTAGTTC GTTTAG | 347 | GCCAAAAATTCGAT TCCAACGCA | 348 |
| PRKCB_757 0 | 369 | AAGGTGGGTTG TTTGAAGAAGC | 349 | ACCCTCCGACAAA AAAACGTAC | 350 |
| SCRT2_C | 370 | GCGAGAAGGTT TTGTCGTAGA | 351 | ACCTACTCACGCAC AACCT | 352 |
| SLC30A10 | 279 | CGCGGTGAGGA AGATCG | 353 | ACGCCACCTACGAC TACG | 354 |
| SPHK2_B | 371 | GTACGGTTATTG GTTGAGCGG | 355 | CCGAATCCTCCTCC AAACG | 356 |
| ST8SIA4_B | 372 | GGAATTTAATTG GAGAGAAATTTT GGCG | 357 | CCAAAATTTCCCTC ATCTATATACGCC | 358 |

| | | | | | | |
|--------|----------|-----|-------------------------------------|-----|-------------------------------|-----|
| [0566] | STX16_C | 373 | GTTGCGGGTCG GGTTGC | 359 | GCAAAAACAAAA ACGCGTAAAAACC | 360 |
| | TBX1_B | 374 | GTCGTCGTTGTC GTAGTTGTC | 361 | CGTAAAAACCGAA CGACGCG | 362 |
| | TRH_A | 303 | TTTTTCGTTGATT TTATTCGAGTCG TC | 363 | GAACCTCTTCAAA TAAACCGC | 364 |
| | TRIM67_B | 328 | GATTAAATAGTC GGGGTCGCG | 365 | ATTCTCCAACGCCA ACCAC | 366 |

[0566] 表20.

| 基因 注释 | DMR 编号 | 探针序列 | SEQ ID NO: |
|----------|---------------------|--|------------------|
| [0567] | ABL IM1_ B | 329 CGCGCCGAGG CGCGCTTCCACTCC/3C6/ | 367 |
| | AJA P1_C | 330 AGGCCACGGACG GCGGCGTTTTTTTTTATGTTG/3C6/ | 368 |
| | ALO X5_ B | 331 AGGCCACGGACG CAACCGAACTAAAAAAAAAACTA ACG/3C6/ | 369 |
| | ASC L2_ B | 332 CGCGCCGAGG GCGCGTAAGATTTTCGG/3C6/ | 370 |
| | BAN K1_ B | 333 CGCGCCGAGG GCGGGTAGTAGTGCG/3C6/ | 371 |
| | BHL HE2 3_E | 334 CGCGCCGAGG CGACCGAAAAATCGAAAAACA/3C6/ | 372 |
| | C10o rf125 _B | 335 CGCGCCGAGG GCTAACGCGAATAAAACACG/3C6/ | 373 |
| | C17o rf64_ B | 336 CGCGCCGAGG TTTTTCGTTTTTCGGTTTCGG/3C6/ | 374 |
| | CAL N1_1 520 | 337 CGCGCCGAGG CCGTACCTATTAACCTCCG/3C6/ | 375 |
| | CAL N1_ | 37 AGGCCACGGACG TCGTTTTTTTTTGCGGGT/3C6/ | 376 |

[0568]

| | | | |
|---------------------|-----|---|-----|
| B | | | |
| CD1 D_10 58 | 339 | AGGCCACGGACG CGTATTGGCGCGATTTAG/3C6/ | 377 |
| CDH 4_78 90 | 340 | AGGCCACGGACG GTTTCGAAAAAACTCGACGAA/3C6/ | 378 |
| CHS T2_8 128 | 341 | AGGCCACGGACG GCCGTTCTCTAACTTCCG/3C6/ | 379 |
| CHS T2_8 384 | 342 | AGGCCACGGACG CCGAAATACGAACGCGA/3C6/ | 380 |
| CHS T2_9 316 | 343 | AGGCCACGGACG TCGTTCTCGATTTTCGC/3C6/ | 381 |
| CHS T2_9 470 | 344 | AGGCCACGGACG CGAATAAAACCTACGAAAAAAAC G/3C6/ | 382 |
| CLI C6_ B | 345 | AGGCCACGGACG GAAAACCGCAAATCCTCG/3C6/ | 383 |
| CXC L12_ B | 346 | AGGCCACGGACG CGCGAAATAAACCTATAATTA ACTC A/3C6/ | 384 |
| DLX 4_B | 347 | CGCGCCGAGG CCGAACCAACACTCAAAC/3C6/ | 385 |
| DN M3_ D | 348 | CGCGCCGAGG GCGCGTTTGGTTTGGT/3C6/ | 386 |
| EMX 1_A | 74 | AGGCCACGGACG AACGCGCTCCAACC/3C6/ | 387 |
| ESP N_B | 349 | CGCGCCGAGG CGCGACGACTAAAAAATTCA/3C6/ | 388 |
| FAM 59B_ 7764 | 350 | AGGCCACGGACG GTCGAAATCGAAACGCTC/3C6/ | 389 |
| FOX P4_B | 351 | CGCGCCGAGG CCGCGACTACCTCTTC/3C6/ | 390 |
| GP5 | 104 | AGGCCACGGACG CGACGTCCTACAAAACCA/3C6/ | 391 |
| HOX | 352 | CGCGCCGAGG | 392 |

[0569]

| | | | |
|------------------------------|-----|---|-----|
| A1_ C | | GGCGGTAGTTGTTGC/3C6/ | |
| IGF2 BP3_ C | 353 | CGCGCCGAGG GCGAAAACCCCGCC/3C6/ | 393 |
| IPTR IPL1 _113 8 | 354 | CGCGCCGAGG CGTCTAACTAAACGCGATAAAC/3C6 / | 394 |
| IPTR IPL1 _120 0 | 355 | CGCGCCGAGG GCGGTTTTAGCGATGAATC/3C6/ | 395 |
| KCN K9_ B | 356 | CGCGCCGAGG CGATTTCGAGGGCGT/3C6/ | 396 |
| KCN K17_ C | 357 | AGGCCACGGACG CGCGACGCAAACACTC/3C6/ | 397 |
| KLH DC7 B_B | 358 | AGGCCACGGACG GCGGCGGTTGGATT/3C6/ | 398 |
| LAY N_B | 359 | AGGCCACGGACG TCCCGAAACGAACGATAAA/3C6/ | 399 |
| LIM E1_ B | 360 | CGCGCCGAGG CGCCGTCGCACTAC/3C6/ | 400 |
| LMX 1B_ D | 361 | AGGCCACGGACG CGCGACTCCCCACT/3C6/ | 401 |
| LOC 1001 3289 1_B | 362 | AGGCCACGGACG CGCAAATAATAACGCGAACG/3C6/ | 402 |
| MAS T1_ B | 375 | AGGCCACGGACG CGTTCGAGGTTAGTTTTTTGG/3C6/ | 403 |
| MA X.chr 12.42 7.br | 338 | AGGCCACGGACG CGTACGTAACCCGCG/3C6/ | 404 |
| MA | 174 | CGCGCCGAGG | 405 |

[0570]

| | | | |
|---|-----|--|-----|
| X.chr 17.73 0736 82-7 3073 814 | | CGCTACTAACCATAACCGC/3C6/ | |
| MA X.chr 20.44 22 | 363 | CGCGCCGAGG CGTTTTCGTTTGATTCGGTT/3C6/ | 406 |
| MPZ _574 2 | 364 | CGCGCCGAGG TCGGTGATTGATGTGTGCG/3C6/ | 407 |
| MPZ _555 4 | 365 | CGCGCCGAGG CGTAACTCCATCTCGATAACC/3C6/ | 408 |
| MSX 2P1_ B | 366 | CGCGCCGAGG CGACCGCGAAAAACG/3C6/ | 409 |
| ODC 1_B | 367 | AGGCCACGGACG CGCGTTGGAAGTTTCG/3C6/ | 410 |
| OSR 2_A | 234 | CGCGCCGAGG GCGCGAACACAAAACG/3C6/ | 411 |
| OTX 1_B | 368 | CGCGCCGAGG ACCGAAAACGCCCTAAA/3C6/ | 412 |
| PLX NC1 _B | 246 | CGCGCCGAGG GCGTGGAGAAATGTTAGTTTG/3C6/ | 413 |
| PRK CB_ 7570 | 369 | AGGCCACGGACG CGGGCGGTGAATTTGT/3C6/ | 414 |
| SCR T2_ C | 370 | AGGCCACGGACG ACGTCGTATTTGTGGCG/3C6/ | 415 |
| SLC 30A1 0 | 279 | AGGCCACGGACG GCGTTGTTTAGCGCG/3C6/ | 416 |
| SPH K2_ B | 371 | AGGCCACGGACG GATCCCGCAAATCAACAC/3C6/ | 417 |
| ST8S IA4_ | 372 | CGCGCCGAGG CGATCCCCAACTCCC/3C6/ | 418 |

| | | | | |
|--------|-----------------|-----|---|-----|
| [0571] | B | | | |
| | STX 16_C | 373 | CGCGCCGAGG CGCTTCTAAAACCTCGATCC/3C6/ | 419 |
| | TBX 1_B | 374 | CGCGCCGAGG CGCGGTCGTTAATATGTATTC/3C6/ | 420 |
| | TRH A | 303 | AGGCCACGGACG CGTTTGGCGTAGATATAAGC/3C6/ | 421 |
| | TRI M67 B | 328 | AGGCCACGGACG CGAACTACGAAAACAACCTC/3C6/ | 422 |

[0572] 表21

| | 标志物 | DMR | 标志物 | DMR |
|--------|----------------|-----|-----------------------------|-----|
| | AJAP1_C | 330 | CHST2_9316 | 343 |
| | C10orf125_B | 335 | ASCL2_B | 332 |
| | CALN1_B | 37 | ESPN_B | 349 |
| | BHLHE23_E | 334 | DLX4_B | 347 |
| | CD1D_1058 | 339 | KCNK17_C | 357 |
| | HOXA1_C | 352 | EMX1_A | 74 |
| | LOC100132891_B | 362 | MPZ_5742 | 364 |
| | MSX2P1_B | 366 | LAYN_B | 359 |
| | PRKCB_7570 | 369 | KCNK9_B | 356 |
| | ITPRIPL1_1200 | 355 | ABLIM1_B | 329 |
| | SPHK2_B | 371 | MAX.chr12.427.br | 338 |
| | C17orf64_B | 336 | SCRT2_C | 370 |
| [0573] | TRIM67_B | 328 | IGF2BP3_C | 353 |
| | MAX.chr20.4422 | 363 | MAST1_B | 375 |
| | DNM3_D | 348 | MAX.chr17.73073682-73073814 | 174 |
| | ODC1_B | 367 | OTX1_B | 368 |
| | OSR2_A | 234 | ST8SIA4_B | 372 |
| | SLC30A10 | 279 | CXCL12_B | 346 |
| | TRH_A | 303 | LIME1_B | 360 |
| | ALOX5_B | 331 | TBX1_B | 374 |
| | PLXNC1_B | 246 | STX16_C | 373 |
| | CDH4_7890 | 340 | FOXP4_B | 351 |
| | CLIC6_B | 345 | CALN1_1520 | 337 |
| | LMX1B_D | 361 | ITPRIPL1_1138 | 354 |
| | FAM59B_7764 | 350 | CHST2_8128 | 341 |
| | GP5 | 104 | CHST2_8384 | 342 |

| | | | | |
|--------|-----------|-----|------------|-----|
| [0574] | BANK1_B | 333 | CHST2_9470 | 344 |
| | KLHDC7B_B | 358 | MPZ_5554 | 365 |

[0575] 测试包括6个BRCA携带者的38个正常乳腺癌样品以及包括管腔A型和管腔B型、HER2+、BRCA1+、BRCA2+、三阴性和DCIS种类的113个乳腺癌组织样品的集合的56种甲基化标志物的存在性。56种标志物在95%特异性下显示约15%至92%的灵敏性范围。表22显示在95%特异性下显示处于或高于25%的灵敏性的标志物。5标志物组 (SPHK2、c17orf64_B、DLX4_B、MPZ_5742、ITPRIPL1_1138) 在100%特异性下显示96%灵敏性。所得ROC曲线具有0.995的AUC。

[0576] 表22.

| 标志物 | DMR 编号 | 灵敏性 |
|----------------|-----------|--------|
| AJAP1_C | 330 | 66.30% |
| C10orf125_B | 335 | 58.40% |
| CALN1_B | 37 | 69.70% |
| BHLHE23_E | 334 | 43.80% |
| CD1D_1058 | 339 | 68.50% |
| HOXA1_C | 352 | 62.90% |
| LOC100132891_B | 362 | 79.80% |
| MSX2P1_B | 366 | 79.80% |
| PRKCB_7570 | 369 | 86.50% |
| ITPRIPL1_1200 | 355 | 79.80% |
| SPHK2_B | 371 | 65.20% |
| C17orf64_B | 336 | 77.50% |
| TRIM67_B | 328 | 79.80% |
| MAX.chr20.4422 | 363 | 71.90% |
| CHST2_9316 | 343 | 73.00% |
| ASCL2_B | 332 | 53.90% |
| ESPN_B | 349 | 67.40% |
| DLX4_B | 347 | 83.10% |
| KCNK17_C | 357 | 55.10% |
| EMX1_A | 74 | 77.50% |

| | | | |
|--------|------------------|-----|--------|
| | MPZ_5742 | 364 | 91.00% |
| | LAYN_B | 359 | 57.30% |
| | KCNK9_B | 356 | 62.90% |
| | ABLIM1_B | 329 | 44.90% |
| | | 338 | |
| | MAX.chr12.427.br | | 79.80% |
| | SCRT2_C | 370 | 78.70% |
| | IGF2BP3_C | 353 | 70.80% |
| | MAST1_B | 375 | 77.50% |
| | DNM3_D | 348 | 74.20% |
| | ODC1_B | 367 | 65.20% |
| | OSR2_A | 234 | 70.80% |
| | SLC30A10 | 279 | 60.70% |
| | TRH_A | 303 | 85.40% |
| | ALOX5_B | 331 | 59.60% |
| | PLXNC1_B | 246 | 61.80% |
| [0578] | CDH4_7890 | 340 | 71.90% |
| | CLIC6_B | 345 | 48.30% |
| | LMX1B_D | 361 | 56.20% |
| | FAM59B_7764 | 350 | 66.30% |
| | GP5 | 104 | 61.80% |
| | BANK1_B | 333 | 43.80% |
| | OTX1_B | 368 | 70.80% |
| | ST8SIA4_B | 372 | 40.40% |
| | CXCL12_B | 346 | 56.20% |
| | LIME1_B | 360 | 47.20% |
| | STX16_C | 373 | 52.80% |
| | FOXP4_B | 351 | 36.00% |
| | CALN1_1520 | 337 | 66.30% |
| | ITPRIPL1_1138 | 354 | 83.10% |
| | CHST2_8128 | 341 | 62.90% |
| | CHST2_8384 | 342 | 60.70% |
| | CHST2_9470 | 344 | 66.30% |
| | MPZ_5554 | 365 | 92.10% |

[0579] 基于组织测试的结果,选择一组28种标志物来采用一组从乳腺癌患者和正常对照收集的血浆样品进行测试。由于待测试的标志物的数目较多,所以将28种标志物分成两个

池,每个池具有14种标志物。两个池中的标志物显示于以下表23和表24中。

| | |
|-------------------|-----------|
| AJAP1 | C10orf125 |
| CALN1_B | BHLHE23 |
| LOC100132891 | MSX2P1 |
| SPHK2 | C17orf64 |
| MAST1 | DNM3 |
| MAX.chr.12.427.br | OTX1 |
| SCRT2 | ALOX5 |

| | |
|------------|----------------|
| FAM59B | ITPRIPL1_B |
| ODC1_B | OSR2_A |
| CD1D_B | DLX4_2591 |
| PRKCB_7570 | MAX.chr20.4422 |
| TRIM67 | MPZ |
| TRH_A | CXCL12_B |
| EMX1_br | CHST2_B |

[0582] 对EDTA血浆样品的集合进行池7标志物的测试,所述集合包含85个乳腺癌样品(33个I期、33个II期、18个III期和1个IV期)和100个健康正常对照。对EDTA血浆样品的类似集合进行池8标志物的测试,所述集合包含85个乳腺癌样品(34个I期、32个II期、18个III期和1个IV期)和100个健康正常对照。基于池7和池8测试的结果,选择14个测定的集合进行进一步测试(显示于表25中)。

| | |
|---------|------------|
| SPHK2 | C17orf64 |
| FAM59B | ITPRIPL1_B |
| ODC1_B | OSR2_A |
| TRIM67 | MPZ |
| TRH_A | CXCL12_B |
| CD1D_B | C10orf125 |
| CALN1_B | CHST2_B |

[0584] 对LBgard (Biomatrix, San Diego, CA) 血浆样品的集合进行池9标志物的测试,所述集合包含42个乳腺癌样品(1个I期、16个II期、14个III期和11个IV期)和84个健康正常对照。表26显示对于池9标志物鉴定的甲基化区域。表27显示池9标志物的展现灵敏性和90%特异性。表28和表29显示关于池9标志物的引物信息和探针信息。4种标志物(FAM59B、ITPRIPL1、TRH_A和C17orf64_B)的集合在90%特异性下展现74%的灵敏性。所得ROC曲线展现0.884的AUC。

[0585] 表26.

| DMR 编号 | 基因注释 | 在染色体上的区域(起始碱基-结束碱基) |
|--------|------------|---------------------------|
| 47 | CD1D | chr1:158150864-158151129 |
| 134 | ITPRIPL1 | chr2:96990968-96991328 |
| 90 | FAM59B | chr2:26407713-26407972 |
| 27 | C10orf125 | chr10:135171410-135171504 |
| 305 | TRIM67 | chr1:231297047-231297159 |
| 284 | SPHK2 | chr19:49127580-49127683 |
| 37 | CALN1_B | chr7:71801741-71801800 |
| 57 | CHST2_B | chr3:142839223-142839568 |
| 221 | MPZ | chr1:161275561-161275996 |
| 346 | CXCL12_B | chr10:44881200-44881315 |
| 367 | ODC1_B | chr2:10589075-10589225 |
| 234 | OSR2_A | chr8:99952233-99952366 |
| 303 | TRH_A | chr3:129693484-129693575 |
| 336 | C17orf64_B | chr17:58499085-58499196 |

[0587] 表27.

| 标志物名称 | AUC | 在 90% 特异性下的 灵敏性 | DMR 编号 |
|------------|-------|--------------------|--------|
| FAM59B | 0.814 | 50.0% | 90 |
| ITPRIPL1 | 0.804 | 61.9% | 134 |
| ODC1_B | 0.809 | 59.5% | 367 |
| OSR2_A | 0.749 | 42.9% | 234 |
| TRIM67 | 0.669 | 30.9% | 305 |
| MPZ | 0.698 | 47.6% | 221 |
| TRH_A | 0.83 | 50.0% | 303 |
| CXCL12_B | 0.71 | 28.6% | 346 |
| SPHK2 | 0.585 | 31.0% | 284 |
| C17orf64_B | 0.763 | 59.5% | 336 |
| CD1D | 0.613 | 33.3% | 47 |
| C10orf125 | 0.775 | 45.2% | 27 |
| CALN1_B | 0.622 | 26.2% | 37 |
| CHST2_B | 0.687 | 38.1% | 57 |

[0590] 表28.

[0591]

| 基因注释 | DM R编 号 | 正向引物 5'-3' | SEQ ID NO: | 反向引物 5'-3' | SEQ ID NO: |
|-----------|---------------|----------------------------------|------------------|---|------------------|
| CD1D | 47 | GGATTGGTGA GATTCGGGAC | 423 | CCCGAAAC CAAAAAAC AACGA | 424 |
| ITPRIPL1 | 134 | GAGTAGGGTT ATTTTCGCGG G | 425 | CTACTTTTT TCCCGACA AAATAAAA ACGT | 426 |
| FAM59B | 90 | CGCGATAGCG TTTTTATTGT CGCG | 427 | CGCACGAC CGTAAAAT ACTCG | 428 |
| C10orf125 | 27 | CGGTTCGTTG CGTTTATCGA | 429 | CCCCCGAA CTACTCTAC GCG | 430 |
| TRIM67 | 305 | GATTAAATAG TCGGGGTTCG G | 431 | ATTCTCCAA CGCCAACC AC | 432 |
| SPHK2 | 284 | GTACGGTTATT GGTTGAGCGG | 433 | CCGAATCC TCCTCCAA ACG | 434 |
| CALN1_B | 37 | TCGTTCGGCG TATTTATTCG TAT | 273 | CGCGAAAA ACTTCCTCC GA | 274 |
| CHST2_B | 57 | GGGATTTTAA GCGGAAGCG A | 437 | CGACGAAC TATCCGACT ATCACT | 438 |
| MPZ | 221 | GGTTAGGGGT GGAGTTCGTT A | 439 | ACTCCGAA CTCTACTCA TCCTTTC | 440 |

[0592]

| | | | | | |
|------------|-----|------------------------------------|-----|--|-----|
| CXCL12_B | 346 | TCGGCGGTTT TTAGTAAAAG CG | 441 | AAATCTCC CGTCCCAC TCC | 442 |
| ODC1_B | 367 | GGTTGGTAGT CGTTTTTACGT TTTC | 443 | CAAACCC ATCTAATTA CAAATAC CTCGA | 444 |
| OSR2_A | 234 | TGGAGTTATC GGAAGGCGA | 445 | CGAACTCC CGAAACGA CG | 446 |
| TRH_A | 303 | TTTTCGTTGAT TTTATTCGAGT CGTC | 447 | GAACCCTC TTCAAATA AACCGC | 448 |
| C17orf64_B | 336 | GATTATATTCG GATTTTGT TCGCGT | 449 | GACTCTTC CTACCCGC GA | 450 |

[0593] 表29.

[0594]

| 基因注释 | DMR 编号 | 探针序列 | SEQ ID NO: |
|-----------|--------|--|------------|
| CD1D | 47 | AGGCCACGGACGCGTATTGG CGCGATTTAG/3C6/ | 451 |
| ITPRIPL1 | 134 | CGCGCCGAGGGCGGTTTTAG CGATGAATC/3C6/ | 452 |
| FAM59B | 90 | AGGCCACGGACGGTCGAAA TCGAAACGCTC/3C6/ | 453 |
| C10orf125 | 27 | CGCGCCGAGGGCTAACGCG AATAAACACG/3C6/ | 454 |
| TRIM67 | 305 | AGGCCACGGACGCGAACTA CGAAAACAACCTC/3C6/ | 455 |
| SPHK2 | 284 | AGGCCACGGACGGATCCCG CAAATCAACAC/3C6/ | 456 |
| CALN1_B | 37 | AGGCCACGGACGTCGTTTTT TTTTTGCGGGT/3C6/ | 376 |
| CHST2_B | 57 | CGCGCCGAGGTCGTTCCCTCG ATTCGC/3C6/ | 458 |
| MPZ | 221 | CGCGCCGAGGCGTAACTCCA TCTCGATAACC/3C6/ | 459 |
| CXCL12_B | 346 | CGCGCCGAGGCGGAAATA AACCTATAATTA ACTCA/3C6/ | 460 |

| | | | | |
|--------|------------|-----|---|-----|
| [0595] | ODC1_B | 367 | AGGCCACGGACGCGCGTTG GAAGTTTCG/3C6/ | 461 |
| | OSR2_A | 234 | CGCGCCGAGGGCGCGAACA CAAACG/3C6/ | 462 |
| | TRH_A | 303 | AGGCCACGGACGCGTTTGG CGTAGATATAAGC/3C6/ | 463 |
| | C17orf64_B | 336 | CGCGCCGAGGTTTTCGTTTT CGGTTTCGG/3C6/ | 464 |

[0596] 以上说明书中提及的所有出版物和专利都出于所有目的以引用的方式整体并入本文。技术的所描述组合物、方法和用途的各种修改和变化将在不脱离如所描述的技术的范围和精神下为本领域技术人员显而易见。尽管技术已与特定示例性实施方案关联加以描述,但应了解如所要求保护的本发明不应不当地限于所述特定实施方案。实际上,用于执行本发明的所描述模式的对于药理学、生物化学、医学科学或相关领域技术人员显而易见的各种修改意图在以下权利要求的范围内。

- [0001] 序列表
- [0002] <110> 梅约医学教育与研究基金会 (MAYO FOUNDATION FOR MEDICAL EDUCATION AND RESEARCH)
- [0003] 精密科学发展有限责任公司 (EXACT SCIENCES DEVELOPMENT COMPANY, LLC)
- [0004] <120> 检测乳腺癌
- [0005] <130> PPI20012547US
- [0006] <140> PCT/US2018/062809
- [0007] <141> 2018-11-28
- [0008] <150> US 62/592,828
- [0009] <151> 2017-11-30
- [0010] <160> 464
- [0011] <170> PatentIn version 3.5
- [0012] <210> 1
- [0013] <211> 21
- [0014] <212> DNA
- [0015] <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
- [0016] <220>
- [0017] <223> 合成的
- [0018] <400> 1
- [0019] gagtttcggc ggcgtttttc g 21
- [0020] <210> 2
- [0021] <211> 22
- [0022] <212> DNA
- [0023] <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
- [0024] <220>
- [0025] <223> 合成的
- [0026] <400> 2
- [0027] cgctacgtct aacttcccgc gc 22
- [0028] <210> 3
- [0029] <211> 29
- [0030] <212> DNA
- [0031] <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
- [0032] <220>
- [0033] <223> 合成的
- [0034] <400> 3
- [0035] ttttcgacga gtaggattga agaaggaac 29
- [0036] <210> 4
- [0037] <211> 25

- [0038] <212> DNA
[0039] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0040] <220>
[0041] <223> 合成的
[0042] <400> 4
[0043] gcgaatctat ctaccgaaac gcgct 25
[0044] <210> 5
[0045] <211> 31
[0046] <212> DNA
[0047] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0048] <220>
[0049] <223> 合成的
[0050] <400> 5
[0051] ttttgatttg taatatagag gaaagcgtcg t 31
[0052] <210> 6
[0053] <211> 31
[0054] <212> DNA
[0055] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0056] <220>
[0057] <223> 合成的
[0058] <400> 6
[0059] gtataaacgc gtaaatacca aactaacga a 31
[0060] <210> 7
[0061] <211> 25
[0062] <212> DNA
[0063] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0064] <220>
[0065] <223> 合成的
[0066] <400> 7
[0067] gtttcgagaa aggagaaggg ggagc 25
[0068] <210> 8
[0069] <211> 25
[0070] <212> DNA
[0071] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0072] <220>
[0073] <223> 合成的
[0074] <400> 8
[0075] actccaacg aaaacttcgc aaacg 25
[0076] <210> 9

- [0077] <211> 23
[0078] <212> DNA
[0079] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0080] <220>
[0081] <223> 合成的
[0082] <400> 9
[0083] gttttttgtc gggagttatt cgt 23
[0084] <210> 10
[0085] <211> 28
[0086] <212> DNA
[0087] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0088] <220>
[0089] <223> 合成的
[0090] <400> 10
[0091] ccaaaaatta aattaaaac gctacgca 28
[0092] <210> 11
[0093] <211> 20
[0094] <212> DNA
[0095] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0096] <220>
[0097] <223> 合成的
[0098] <400> 11
[0099] gttttaggag ggtggggcgt 20
[0100] <210> 12
[0101] <211> 25
[0102] <212> DNA
[0103] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0104] <220>
[0105] <223> 合成的
[0106] <400> 12
[0107] aacacgacta ttcgaaaaac gcgca 25
[0108] <210> 13
[0109] <211> 20
[0110] <212> DNA
[0111] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0112] <220>
[0113] <223> 合成的
[0114] <400> 13
[0115] ttcgtagtat cgggagtcga 20

- [0116] <210> 14
[0117] <211> 24
[0118] <212> DNA
[0119] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0120] <220>
[0121] <223> 合成的
[0122] <400> 14
[0123] gaaataataa aaacgccgca cgct 24
[0124] <210> 15
[0125] <211> 25
[0126] <212> DNA
[0127] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0128] <220>
[0129] <223> 合成的
[0130] <400> 15
[0131] gtcgtagttt tcgcggtgg taagc 25
[0132] <210> 16
[0133] <211> 25
[0134] <212> DNA
[0135] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0136] <220>
[0137] <223> 合成的
[0138] <400> 16
[0139] cgaacgctac ctaaactctc cgcac 25
[0140] <210> 17
[0141] <211> 25
[0142] <212> DNA
[0143] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0144] <220>
[0145] <223> 合成的
[0146] <400> 17
[0147] ggaatcgcga gttttgggat agtcg 25
[0148] <210> 18
[0149] <211> 25
[0150] <212> DNA
[0151] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0152] <220>
[0153] <223> 合成的
[0154] <400> 18

- [0155] aaatacaatt acaccctcta ccgcc 25
[0156] <210> 19
[0157] <211> 20
[0158] <212> DNA
[0159] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0160] <220>
[0161] <223> 合成的
[0162] <400> 19
[0163] gaggcgttcg gtgggatttc 20
[0164] <210> 20
[0165] <211> 25
[0166] <212> DNA
[0167] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0168] <220>
[0169] <223> 合成的
[0170] <400> 20
[0171] ccccgaccta taaacctacg acgct 25
[0172] <210> 21
[0173] <211> 20
[0174] <212> DNA
[0175] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0176] <220>
[0177] <223> 合成的
[0178] <400> 21
[0179] gaggaggtag cgggcgtcga 20
[0180] <210> 22
[0181] <211> 25
[0182] <212> DNA
[0183] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0184] <220>
[0185] <223> 合成的
[0186] <400> 22
[0187] cgcgtcgatc taacttacct acgaa 25
[0188] <210> 23
[0189] <211> 25
[0190] <212> DNA
[0191] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0192] <220>
[0193] <223> 合成的

- [0194] <400> 23
[0195] ttgcgtttat cgatttcggtt ttcgt 25
[0196] <210> 24
[0197] <211> 29
[0198] <212> DNA
[0199] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0200] <220>
[0201] <223> 合成的
[0202] <400> 24
[0203] gcactactat cccccgaact actctacgc 29
[0204] <210> 25
[0205] <211> 24
[0206] <212> DNA
[0207] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0208] <220>
[0209] <223> 合成的
[0210] <400> 25
[0211] ttattaggcg gggagtcggg tgtc 24
[0212] <210> 26
[0213] <211> 25
[0214] <212> DNA
[0215] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0216] <220>
[0217] <223> 合成的
[0218] <400> 26
[0219] ctcgaatccc taaaaaactc gcgaa 25
[0220] <210> 27
[0221] <211> 25
[0222] <212> DNA
[0223] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0224] <220>
[0225] <223> 合成的
[0226] <400> 27
[0227] aggaaattcg gtagcgatta tacgg 25
[0228] <210> 28
[0229] <211> 28
[0230] <212> DNA
[0231] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0232] <220>

- [0233] <223> 合成的
[0234] <400> 28
[0235] aaaccctac aacctcaccg tacacgat 28
[0236] <210> 29
[0237] <211> 25
[0238] <212> DNA
[0239] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0240] <220>
[0241] <223> 合成的
[0242] <400> 29
[0243] cggagttaat aggtacggga ggcgt 25
[0244] <210> 30
[0245] <211> 22
[0246] <212> DNA
[0247] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0248] <220>
[0249] <223> 合成的
[0250] <400> 30
[0251] caaacccccg aactatcgcg aa 22
[0252] <210> 31
[0253] <211> 22
[0254] <212> DNA
[0255] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0256] <220>
[0257] <223> 合成的
[0258] <400> 31
[0259] cgggtatcgc ggttaagttg gc 22
[0260] <210> 32
[0261] <211> 25
[0262] <212> DNA
[0263] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0264] <220>
[0265] <223> 合成的
[0266] <400> 32
[0267] tatcgtaaaa acccaacccc tcgac 25
[0268] <210> 33
[0269] <211> 23
[0270] <212> DNA
[0271] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

- [0272] <220>
[0273] <223> 合成的
[0274] <400> 33
[0275] gggattggtg agattcggga cgt 23
[0276] <210> 34
[0277] <211> 25
[0278] <212> DNA
[0279] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0280] <220>
[0281] <223> 合成的
[0282] <400> 34
[0283] ctccccgaaa ccaaaaaaca acgaa 25
[0284] <210> 35
[0285] <211> 25
[0286] <212> DNA
[0287] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0288] <220>
[0289] <223> 合成的
[0290] <400> 35
[0291] gttttaaatc gtattcgtag ttcgg 25
[0292] <210> 36
[0293] <211> 25
[0294] <212> DNA
[0295] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0296] <220>
[0297] <223> 合成的
[0298] <400> 36
[0299] acgaacgaaa actttcctaa acgaa 25
[0300] <210> 37
[0301] <211> 25
[0302] <212> DNA
[0303] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0304] <220>
[0305] <223> 合成的
[0306] <400> 37
[0307] gcgttttttt atcgtttttag ggcgt 25
[0308] <210> 38
[0309] <211> 24
[0310] <212> DNA

- [0311] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0312] <220>
[0313] <223> 合成的
[0314] <400> 38
[0315] accgacacta ccaacctctc cgaa 24
[0316] <210> 39
[0317] <211> 22
[0318] <212> DNA
[0319] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0320] <220>
[0321] <223> 合成的
[0322] <400> 39
[0323] tgcggggatt tttagcggaa gc 22
[0324] <210> 40
[0325] <211> 28
[0326] <212> DNA
[0327] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0328] <220>
[0329] <223> 合成的
[0330] <400> 40
[0331] ccgacgaact atccgactat cactcggt 28
[0332] <210> 41
[0333] <211> 24
[0334] <212> DNA
[0335] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0336] <220>
[0337] <223> 合成的
[0338] <400> 41
[0339] gtagtaggtg gagggggcga gttc 24
[0340] <210> 42
[0341] <211> 24
[0342] <212> DNA
[0343] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0344] <220>
[0345] <223> 合成的
[0346] <400> 42
[0347] ctctcgaaaa ccgcaaaatc ctcg 24
[0348] <210> 43
[0349] <211> 27

- [0350] <212> DNA
[0351] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0352] <220>
[0353] <223> 合成的
[0354] <400> 43
[0355] ggtaatattg cgatatttcg tagacgt 27
[0356] <210> 44
[0357] <211> 25
[0358] <212> DNA
[0359] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0360] <220>
[0361] <223> 合成的
[0362] <400> 44
[0363] aacaatcaaa taatcgaacg cacgc 25
[0364] <210> 45
[0365] <211> 23
[0366] <212> DNA
[0367] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0368] <220>
[0369] <223> 合成的
[0370] <400> 45
[0371] gtcgtttttc gttacgaagc ggc 23
[0372] <210> 46
[0373] <211> 25
[0374] <212> DNA
[0375] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0376] <220>
[0377] <223> 合成的
[0378] <400> 46
[0379] aaaactaaat aaatctatcc tcgat 25
[0380] <210> 47
[0381] <211> 24
[0382] <212> DNA
[0383] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0384] <220>
[0385] <223> 合成的
[0386] <400> 47
[0387] gcgtcggcgg tttttagtaa aagc 24
[0388] <210> 48

- [0389] <211> 25
[0390] <212> DNA
[0391] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0392] <220>
[0393] <223> 合成的
[0394] <400> 48
[0395] aacgaatctc attaaatctc ccgtc 25
[0396] <210> 49
[0397] <211> 18
[0398] <212> DNA
[0399] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0400] <220>
[0401] <223> 合成的
[0402] <400> 49
[0403] gattttcggg agcggcga 18
[0404] <210> 50
[0405] <211> 18
[0406] <212> DNA
[0407] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0408] <220>
[0409] <223> 合成的
[0410] <400> 50
[0411] cttccccgca acgaaccg 18
[0412] <210> 51
[0413] <211> 25
[0414] <212> DNA
[0415] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0416] <220>
[0417] <223> 合成的
[0418] <400> 51
[0419] ttcggttgta tattcgcgta ggtgc 25
[0420] <210> 52
[0421] <211> 26
[0422] <212> DNA
[0423] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0424] <220>
[0425] <223> 合成的
[0426] <400> 52
[0427] cgaataccga aatctataac cccgaa 26

- [0428] <210> 53
[0429] <211> 23
[0430] <212> DNA
[0431] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0432] <220>
[0433] <223> 合成的
[0434] <400> 53
[0435] attatgatta cgatggttga cgg 23
[0436] <210> 54
[0437] <211> 25
[0438] <212> DNA
[0439] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0440] <220>
[0441] <223> 合成的
[0442] <400> 54
[0443] ctccataaaa acgaatttaa acgaa 25
[0444] <210> 55
[0445] <211> 25
[0446] <212> DNA
[0447] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0448] <220>
[0449] <223> 合成的
[0450] <400> 55
[0451] tttggttata gaacgtagag gtcgt 25
[0452] <210> 56
[0453] <211> 22
[0454] <212> DNA
[0455] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0456] <220>
[0457] <223> 合成的
[0458] <400> 56
[0459] atcgaaccac caaaccaaac gc 22
[0460] <210> 57
[0461] <211> 22
[0462] <212> DNA
[0463] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0464] <220>
[0465] <223> 合成的
[0466] <400> 57

- [0467] gggaagttta gtaggtgagc gt 22
[0468] <210> 58
[0469] <211> 25
[0470] <212> DNA
[0471] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0472] <220>
[0473] <223> 合成的
[0474] <400> 58
[0475] actaaaaacg tttccgtcga acgca 25
[0476] <210> 59
[0477] <211> 25
[0478] <212> DNA
[0479] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0480] <220>
[0481] <223> 合成的
[0482] <400> 59
[0483] gttgtagga gtagggttgg ttcga 25
[0484] <210> 60
[0485] <211> 24
[0486] <212> DNA
[0487] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0488] <220>
[0489] <223> 合成的
[0490] <400> 60
[0491] atcgcaatcg taaccgtaa acgc 24
[0492] <210> 61
[0493] <211> 25
[0494] <212> DNA
[0495] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0496] <220>
[0497] <223> 合成的
[0498] <400> 61
[0499] attcgtacgg ttttttcggtt ttcgt 25
[0500] <210> 62
[0501] <211> 23
[0502] <212> DNA
[0503] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0504] <220>
[0505] <223> 合成的

- [0506] <400> 62
[0507] gaccaactac ttccgctcga cgc 23
[0508] <210> 63
[0509] <211> 20
[0510] <212> DNA
[0511] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0512] <220>
[0513] <223> 合成的
[0514] <400> 63
[0515] cggatttagc ggtcgagacg 20
[0516] <210> 64
[0517] <211> 23
[0518] <212> DNA
[0519] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0520] <220>
[0521] <223> 合成的
[0522] <400> 64
[0523] tttaaacgt ttctcgcgac gcc 23
[0524] <210> 65
[0525] <211> 24
[0526] <212> DNA
[0527] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0528] <220>
[0529] <223> 合成的
[0530] <400> 65
[0531] tcgttaggcg atgataatta gcga 24
[0532] <210> 66
[0533] <211> 25
[0534] <212> DNA
[0535] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0536] <220>
[0537] <223> 合成的
[0538] <400> 66
[0539] taaaaaaaccc ataaacccta acgac 25
[0540] <210> 67
[0541] <211> 25
[0542] <212> DNA
[0543] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0544] <220>

- [0545] <223> 合成的
[0546] <400> 67
[0547] gttggagaag acgattcggt cggac 25
[0548] <210> 68
[0549] <211> 23
[0550] <212> DNA
[0551] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0552] <220>
[0553] <223> 合成的
[0554] <400> 68
[0555] ccaaaacctc actcctcaac cgc 23
[0556] <210> 69
[0557] <211> 19
[0558] <212> DNA
[0559] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0560] <220>
[0561] <223> 合成的
[0562] <400> 69
[0563] cgcgatgcgc gttttgaac 19
[0564] <210> 70
[0565] <211> 27
[0566] <212> DNA
[0567] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0568] <220>
[0569] <223> 合成的
[0570] <400> 70
[0571] gacgcgacta acttccaacc taacgaa 27
[0572] <210> 71
[0573] <211> 22
[0574] <212> DNA
[0575] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0576] <220>
[0577] <223> 合成的
[0578] <400> 71
[0579] ttttcgtggt tgtcgtcggt gc 22
[0580] <210> 72
[0581] <211> 27
[0582] <212> DNA
[0583] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

- [0584] <220>
[0585] <223> 合成的
[0586] <400> 72
[0587] gccgcgctct acactaaaca tattcgc 27
[0588] <210> 73
[0589] <211> 23
[0590] <212> DNA
[0591] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0592] <220>
[0593] <223> 合成的
[0594] <400> 73
[0595] cggggaagtg ggagttttta gcg 23
[0596] <210> 74
[0597] <211> 25
[0598] <212> DNA
[0599] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0600] <220>
[0601] <223> 合成的
[0602] <400> 74
[0603] aaaaaacta aatcaaaacc gcgac 25
[0604] <210> 75
[0605] <211> 24
[0606] <212> DNA
[0607] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0608] <220>
[0609] <223> 合成的
[0610] <400> 75
[0611] gcgagttcgc gttgtttacg tttc 24
[0612] <210> 76
[0613] <211> 26
[0614] <212> DNA
[0615] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0616] <220>
[0617] <223> 合成的
[0618] <400> 76
[0619] accgacgcta cctataactc cacgct 26
[0620] <210> 77
[0621] <211> 25
[0622] <212> DNA

- [0623] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0624] <220>
[0625] <223> 合成的
[0626] <400> 77
[0627] ttaggtttgt ttattaattt tacgt 25
[0628] <210> 78
[0629] <211> 18
[0630] <212> DNA
[0631] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0632] <220>
[0633] <223> 合成的
[0634] <400> 78
[0635] tctacaaaac gccgcgac 18
[0636] <210> 79
[0637] <211> 23
[0638] <212> DNA
[0639] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0640] <220>
[0641] <223> 合成的
[0642] <400> 79
[0643] gttaattcga gagcgcgagg cgt 23
[0644] <210> 80
[0645] <211> 28
[0646] <212> DNA
[0647] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0648] <220>
[0649] <223> 合成的
[0650] <400> 80
[0651] gacaaaaaa aataaaaaat cccgcgac 28
[0652] <210> 81
[0653] <211> 27
[0654] <212> DNA
[0655] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0656] <220>
[0657] <223> 合成的
[0658] <400> 81
[0659] taaagaata gaaagcgggc gatacgt 27
[0660] <210> 82
[0661] <211> 24

- [0662] <212> DNA
[0663] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0664] <220>
[0665] <223> 合成的
[0666] <400> 82
[0667] cgaactaaaa aaaccgcca cccg 24
[0668] <210> 83
[0669] <211> 20
[0670] <212> DNA
[0671] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0672] <220>
[0673] <223> 合成的
[0674] <400> 83
[0675] gggttttgcg gttaatggcg 20
[0676] <210> 84
[0677] <211> 25
[0678] <212> DNA
[0679] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0680] <220>
[0681] <223> 合成的
[0682] <400> 84
[0683] aataacaaac gcgtcccgaa aacga 25
[0684] <210> 85
[0685] <211> 32
[0686] <212> DNA
[0687] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0688] <220>
[0689] <223> 合成的
[0690] <400> 85
[0691] ttagtTTTTT ttgTTTTTA tttgaatttc ga 32
[0692] <210> 86
[0693] <211> 26
[0694] <212> DNA
[0695] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0696] <220>
[0697] <223> 合成的
[0698] <400> 86
[0699] aacttttcca ccgattctca attccg 26
[0700] <210> 87

- [0701] <211> 25
[0702] <212> DNA
[0703] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0704] <220>
[0705] <223> 合成的
[0706] <400> 87
[0707] atttaaattt tcggcgtttc gtcgt 25
[0708] <210> 88
[0709] <211> 27
[0710] <212> DNA
[0711] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0712] <220>
[0713] <223> 合成的
[0714] <400> 88
[0715] acactccaaa tcgaccttta caatcgc 27
[0716] <210> 89
[0717] <211> 25
[0718] <212> DNA
[0719] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0720] <220>
[0721] <223> 合成的
[0722] <400> 89
[0723] agtttggttc gtttagcgat tgcgt 25
[0724] <210> 90
[0725] <211> 25
[0726] <212> DNA
[0727] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0728] <220>
[0729] <223> 合成的
[0730] <400> 90
[0731] aacgcgacta aaaccaattt ccgca 25
[0732] <210> 91
[0733] <211> 25
[0734] <212> DNA
[0735] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0736] <220>
[0737] <223> 合成的
[0738] <400> 91
[0739] tttatttggtt tttatcgttc gtcgg 25

- [0740] <210> 92
[0741] <211> 24
[0742] <212> DNA
[0743] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0744] <220>
[0745] <223> 合成的
[0746] <400> 92
[0747] aaatatatac cggatttccc cggt 24
[0748] <210> 93
[0749] <211> 25
[0750] <212> DNA
[0751] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0752] <220>
[0753] <223> 合成的
[0754] <400> 93
[0755] taatcggcgt cgagagat atcgt 25
[0756] <210> 94
[0757] <211> 22
[0758] <212> DNA
[0759] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0760] <220>
[0761] <223> 合成的
[0762] <400> 94
[0763] ccgtcaacca atcgaaaacg aa 22
[0764] <210> 95
[0765] <211> 25
[0766] <212> DNA
[0767] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0768] <220>
[0769] <223> 合成的
[0770] <400> 95
[0771] tcgtttatatt cgtttttttt gtcga 25
[0772] <210> 96
[0773] <211> 25
[0774] <212> DNA
[0775] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0776] <220>
[0777] <223> 合成的
[0778] <400> 96

- [0779] aaccaaccta aaatctacac tcgca 25
[0780] <210> 97
[0781] <211> 20
[0782] <212> DNA
[0783] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0784] <220>
[0785] <223> 合成的
[0786] <400> 97
[0787] gggtcgtagg ggtttatcgc 20
[0788] <210> 98
[0789] <211> 26
[0790] <212> DNA
[0791] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0792] <220>
[0793] <223> 合成的
[0794] <400> 98
[0795] catacttatac cgaacgtcta aacgtc 26
[0796] <210> 99
[0797] <211> 23
[0798] <212> DNA
[0799] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0800] <220>
[0801] <223> 合成的
[0802] <400> 99
[0803] ggttttagcg atgaatcgga cgt 23
[0804] <210> 100
[0805] <211> 25
[0806] <212> DNA
[0807] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0808] <220>
[0809] <223> 合成的
[0810] <400> 100
[0811] cacgatctta aaaaaacaac gcgac 25
[0812] <210> 101
[0813] <211> 25
[0814] <212> DNA
[0815] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0816] <220>
[0817] <223> 合成的

- [0818] <400> 101
[0819] cgtattttta ggttttagttc ggcgt 25
[0820] <210> 102
[0821] <211> 25
[0822] <212> DNA
[0823] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0824] <220>
[0825] <223> 合成的
[0826] <400> 102
[0827] aactattac ccgcgaaaaa acgat 25
[0828] <210> 103
[0829] <211> 27
[0830] <212> DNA
[0831] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0832] <220>
[0833] <223> 合成的
[0834] <400> 103
[0835] gagtttgttt gggggttggt cgtattc 27
[0836] <210> 104
[0837] <211> 31
[0838] <212> DNA
[0839] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0840] <220>
[0841] <223> 合成的
[0842] <400> 104
[0843] ccaaataaa cgtttaactc ttaccacga a 31
[0844] <210> 105
[0845] <211> 25
[0846] <212> DNA
[0847] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0848] <220>
[0849] <223> 合成的
[0850] <400> 105
[0851] ttttttttga ttcggatttt ttcgg 25
[0852] <210> 106
[0853] <211> 25
[0854] <212> DNA
[0855] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0856] <220>

- [0857] <223> 合成的
[0858] <400> 106
[0859] ctaataaacg cgcgcgtatt cgacg 25
[0860] <210> 107
[0861] <211> 25
[0862] <212> DNA
[0863] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0864] <220>
[0865] <223> 合成的
[0866] <400> 107
[0867] ttttcgcggtt gtttttattt atcgt 25
[0868] <210> 108
[0869] <211> 25
[0870] <212> DNA
[0871] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0872] <220>
[0873] <223> 合成的
[0874] <400> 108
[0875] tacacaacca cccaactact ccgcg 25
[0876] <210> 109
[0877] <211> 25
[0878] <212> DNA
[0879] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0880] <220>
[0881] <223> 合成的
[0882] <400> 109
[0883] tgttggtggg taaaggttag tacgt 25
[0884] <210> 110
[0885] <211> 19
[0886] <212> DNA
[0887] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0888] <220>
[0889] <223> 合成的
[0890] <400> 110
[0891] cgaaaacca actcccga 19
[0892] <210> 111
[0893] <211> 23
[0894] <212> DNA
[0895] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

- [0896] <220>
[0897] <223> 合成的
[0898] <400> 111
[0899] tttttgcggt cgtttttcgg agc 23
[0900] <210> 112
[0901] <211> 25
[0902] <212> DNA
[0903] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0904] <220>
[0905] <223> 合成的
[0906] <400> 112
[0907] cttaccaact aacccccgcc taccg 25
[0908] <210> 113
[0909] <211> 24
[0910] <212> DNA
[0911] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0912] <220>
[0913] <223> 合成的
[0914] <400> 113
[0915] cgtttttagta gggattgggg gcga 24
[0916] <210> 114
[0917] <211> 25
[0918] <212> DNA
[0919] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0920] <220>
[0921] <223> 合成的
[0922] <400> 114
[0923] cccgaaaacc aaaataaaat ccgca 25
[0924] <210> 115
[0925] <211> 23
[0926] <212> DNA
[0927] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0928] <220>
[0929] <223> 合成的
[0930] <400> 115
[0931] cggaatagcg cggtcgtttt ttc 23
[0932] <210> 116
[0933] <211> 24
[0934] <212> DNA

- [0935] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0936] <220>
[0937] <223> 合成的
[0938] <400> 116
[0939] tttaaccgta acgctcgcct cgac 24
[0940] <210> 117
[0941] <211> 25
[0942] <212> DNA
[0943] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0944] <220>
[0945] <223> 合成的
[0946] <400> 117
[0947] gtcggttgtg tttagagcgt agcgt 25
[0948] <210> 118
[0949] <211> 21
[0950] <212> DNA
[0951] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0952] <220>
[0953] <223> 合成的
[0954] <400> 118
[0955] aaaaaaaccc cgcacgacga a 21
[0956] <210> 119
[0957] <211> 24
[0958] <212> DNA
[0959] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0960] <220>
[0961] <223> 合成的
[0962] <400> 119
[0963] gttgcgattg tttgtatddd gcgg 24
[0964] <210> 120
[0965] <211> 25
[0966] <212> DNA
[0967] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0968] <220>
[0969] <223> 合成的
[0970] <400> 120
[0971] ataataacaa aaaaccctc cgcac 25
[0972] <210> 121
[0973] <211> 25

- [0974] <212> DNA
[0975] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0976] <220>
[0977] <223> 合成的
[0978] <400> 121
[0979] agtttcgtta gggaagggtt gcgtc 25
[0980] <210> 122
[0981] <211> 25
[0982] <212> DNA
[0983] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0984] <220>
[0985] <223> 合成的
[0986] <400> 122
[0987] caactaaaac tctaccgcgc tcgat 25
[0988] <210> 123
[0989] <211> 25
[0990] <212> DNA
[0991] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0992] <220>
[0993] <223> 合成的
[0994] <400> 123
[0995] aggaagggtt tcgagtttag tgcgg 25
[0996] <210> 124
[0997] <211> 25
[0998] <212> DNA
[0999] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1000] <220>
[1001] <223> 合成的
[1002] <400> 124
[1003] aaaaaaatca acgcgtcctc ctcgc 25
[1004] <210> 125
[1005] <211> 25
[1006] <212> DNA
[1007] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1008] <220>
[1009] <223> 合成的
[1010] <400> 125
[1011] tttcgatttc gtttttaaatt ttcgt 25
[1012] <210> 126

- [1013] <211> 25
[1014] <212> DNA
[1015] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1016] <220>
[1017] <223> 合成的
[1018] <400> 126
[1019] aaactaaacg acctaaccct acgta 25
[1020] <210> 127
[1021] <211> 25
[1022] <212> DNA
[1023] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1024] <220>
[1025] <223> 合成的
[1026] <400> 127
[1027] aagtttacgc gcgagtttga tcgtc 25
[1028] <210> 128
[1029] <211> 22
[1030] <212> DNA
[1031] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1032] <220>
[1033] <223> 合成的
[1034] <400> 128
[1035] cgaaacgact tctctccccg ca 22
[1036] <210> 129
[1037] <211> 25
[1038] <212> DNA
[1039] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1040] <220>
[1041] <223> 合成的
[1042] <400> 129
[1043] tttagttcgc ggaagttagg ttcgg 25
[1044] <210> 130
[1045] <211> 24
[1046] <212> DNA
[1047] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1048] <220>
[1049] <223> 合成的
[1050] <400> 130
[1051] gaaaacacaa taaacccccg cgtc 24

- [1052] <210> 131
[1053] <211> 25
[1054] <212> DNA
[1055] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1056] <220>
[1057] <223> 合成的
[1058] <400> 131
[1059] gttagattgt aggaggatt agcgg 25
[1060] <210> 132
[1061] <211> 25
[1062] <212> DNA
[1063] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1064] <220>
[1065] <223> 合成的
[1066] <400> 132
[1067] aaaaaacgac taaaaattc acgcc 25
[1068] <210> 133
[1069] <211> 25
[1070] <212> DNA
[1071] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1072] <220>
[1073] <223> 合成的
[1074] <400> 133
[1075] tttggagttt ggggatcga tagtc 25
[1076] <210> 134
[1077] <211> 25
[1078] <212> DNA
[1079] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1080] <220>
[1081] <223> 合成的
[1082] <400> 134
[1083] cgacgaaact aaaaccgct acgta 25
[1084] <210> 135
[1085] <211> 25
[1086] <212> DNA
[1087] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1088] <220>
[1089] <223> 合成的
[1090] <400> 135

- [1091] tttggagttt ggggatcga tagtc 25
[1092] <210> 136
[1093] <211> 25
[1094] <212> DNA
[1095] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1096] <220>
[1097] <223> 合成的
[1098] <400> 136
[1099] cgacgaaact aaaaccgcgt acgta 25
[1100] <210> 137
[1101] <211> 25
[1102] <212> DNA
[1103] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1104] <220>
[1105] <223> 合成的
[1106] <400> 137
[1107] attatattgg gggcgtagg ttcgg 25
[1108] <210> 138
[1109] <211> 25
[1110] <212> DNA
[1111] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1112] <220>
[1113] <223> 合成的
[1114] <400> 138
[1115] aacaaacaat tcgcacgtaa acgaa 25
[1116] <210> 139
[1117] <211> 31
[1118] <212> DNA
[1119] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1120] <220>
[1121] <223> 合成的
[1122] <400> 139
[1123] gggcggttta cgtggatttt tatagatttt c 31
[1124] <210> 140
[1125] <211> 25
[1126] <212> DNA
[1127] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1128] <220>
[1129] <223> 合成的

- [1130] <400> 140
[1131] gcgtctcgaa ccgtacccta acgta 25
[1132] <210> 141
[1133] <211> 24
[1134] <212> DNA
[1135] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1136] <220>
[1137] <223> 合成的
[1138] <400> 141
[1139] cgtcgttggtt gattatgata gcgg 24
[1140] <210> 142
[1141] <211> 24
[1142] <212> DNA
[1143] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1144] <220>
[1145] <223> 合成的
[1146] <400> 142
[1147] cgcttcctaa caaccttctt cgaa 24
[1148] <210> 143
[1149] <211> 25
[1150] <212> DNA
[1151] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1152] <220>
[1153] <223> 合成的
[1154] <400> 143
[1155] ttaacggtat tttttgtttt ttcgt 25
[1156] <210> 144
[1157] <211> 22
[1158] <212> DNA
[1159] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1160] <220>
[1161] <223> 合成的
[1162] <400> 144
[1163] aaaaaaaact cgtccccgag ct 22
[1164] <210> 145
[1165] <211> 28
[1166] <212> DNA
[1167] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1168] <220>

- [1169] <223> 合成的
[1170] <400> 145
[1171] tcggttagtt cgaggttagga agttttgc 28
[1172] <210> 146
[1173] <211> 30
[1174] <212> DNA
[1175] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1176] <220>
[1177] <223> 合成的
[1178] <400> 146
[1179] tattaaccga aaaacgaaaa ccaaattccga 30
[1180] <210> 147
[1181] <211> 25
[1182] <212> DNA
[1183] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1184] <220>
[1185] <223> 合成的
[1186] <400> 147
[1187] agttttgttg ttttggttag gtcgg 25
[1188] <210> 148
[1189] <211> 25
[1190] <212> DNA
[1191] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1192] <220>
[1193] <223> 合成的
[1194] <400> 148
[1195] aaaaactaaa aacctttctc tcgac 25
[1196] <210> 149
[1197] <211> 28
[1198] <212> DNA
[1199] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1200] <220>
[1201] <223> 合成的
[1202] <400> 149
[1203] gcgttgagag tgacggatat ttttcgtc 28
[1204] <210> 150
[1205] <211> 25
[1206] <212> DNA
[1207] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

- [1208] <220>
[1209] <223> 合成的
[1210] <400> 150
[1211] actacctaaa ctccgaacac gcccg 25
[1212] <210> 151
[1213] <211> 25
[1214] <212> DNA
[1215] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1216] <220>
[1217] <223> 合成的
[1218] <400> 151
[1219] ttagcgtatc gggaattagg gggac 25
[1220] <210> 152
[1221] <211> 22
[1222] <212> DNA
[1223] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1224] <220>
[1225] <223> 合成的
[1226] <400> 152
[1227] gaaaacgaaa aaacgacgcg ca 22
[1228] <210> 153
[1229] <211> 25
[1230] <212> DNA
[1231] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1232] <220>
[1233] <223> 合成的
[1234] <400> 153
[1235] tcgtttttta ggtggggaag aagcg 25
[1236] <210> 154
[1237] <211> 26
[1238] <212> DNA
[1239] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1240] <220>
[1241] <223> 合成的
[1242] <400> 154
[1243] gaaccgtatt taaaaccaat cccgc 26
[1244] <210> 155
[1245] <211> 23
[1246] <212> DNA

- [1247] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1248] <220>
[1249] <223> 合成的
[1250] <400> 155
[1251] aattgggggtt cggggttcgg tac 23
[1252] <210> 156
[1253] <211> 25
[1254] <212> DNA
[1255] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1256] <220>
[1257] <223> 合成的
[1258] <400> 156
[1259] ttaccctac ccaaaaaaat acgct 25
[1260] <210> 157
[1261] <211> 22
[1262] <212> DNA
[1263] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1264] <220>
[1265] <223> 合成的
[1266] <400> 157
[1267] ggggttagag tttcgcgttc gc 22
[1268] <210> 158
[1269] <211> 28
[1270] <212> DNA
[1271] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1272] <220>
[1273] <223> 合成的
[1274] <400> 158
[1275] cgcgtctccc gtcctatcta tatacgtc 28
[1276] <210> 159
[1277] <211> 27
[1278] <212> DNA
[1279] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1280] <220>
[1281] <223> 合成的
[1282] <400> 159
[1283] taggaatttt ttaaattcgt tttacgg 27
[1284] <210> 160
[1285] <211> 26

- [1286] <212> DNA
[1287] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1288] <220>
[1289] <223> 合成的
[1290] <400> 160
[1291] cacaaaaact cgatacaatt accgtt 26
[1292] <210> 161
[1293] <211> 25
[1294] <212> DNA
[1295] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1296] <220>
[1297] <223> 合成的
[1298] <400> 161
[1299] tattttatag tcgcgttaaa agcgt 25
[1300] <210> 162
[1301] <211> 25
[1302] <212> DNA
[1303] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1304] <220>
[1305] <223> 合成的
[1306] <400> 162
[1307] gtcgataaaa aacctacgcg acgaa 25
[1308] <210> 163
[1309] <211> 26
[1310] <212> DNA
[1311] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1312] <220>
[1313] <223> 合成的
[1314] <400> 163
[1315] gatttagttt ttcgggttta tagcgg 26
[1316] <210> 164
[1317] <211> 25
[1318] <212> DNA
[1319] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1320] <220>
[1321] <223> 合成的
[1322] <400> 164
[1323] tattaaaaac gaccaaacct ccgca 25
[1324] <210> 165

- [1325] <211> 26
[1326] <212> DNA
[1327] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1328] <220>
[1329] <223> 合成的
[1330] <400> 165
[1331] tggtttagg cgttttggtg gagttc 26
[1332] <210> 166
[1333] <211> 25
[1334] <212> DNA
[1335] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1336] <220>
[1337] <223> 合成的
[1338] <400> 166
[1339] aaaaacgacc ctaaccaccc tcggtt 25
[1340] <210> 167
[1341] <211> 25
[1342] <212> DNA
[1343] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1344] <220>
[1345] <223> 合成的
[1346] <400> 167
[1347] ttttgcgtag ttgggtaggg ttcgg 25
[1348] <210> 168
[1349] <211> 23
[1350] <212> DNA
[1351] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1352] <220>
[1353] <223> 合成的
[1354] <400> 168
[1355] cccgcattcc cgaaaaaac gat 23
[1356] <210> 169
[1357] <211> 25
[1358] <212> DNA
[1359] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1360] <220>
[1361] <223> 合成的
[1362] <400> 169
[1363] ttagggtttt tttcgaggag ttcga 25

- [1364] <210> 170
[1365] <211> 24
[1366] <212> DNA
[1367] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1368] <220>
[1369] <223> 合成的
[1370] <400> 170
[1371] atcccccgta cgaaactaaa cgcg 24
[1372] <210> 171
[1373] <211> 23
[1374] <212> DNA
[1375] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1376] <220>
[1377] <223> 合成的
[1378] <400> 171
[1379] gcgttcgtat ttctcgggaga ggc 23
[1380] <210> 172
[1381] <211> 25
[1382] <212> DNA
[1383] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1384] <220>
[1385] <223> 合成的
[1386] <400> 172
[1387] tctacgtaac taaacaaaac ccgaa 25
[1388] <210> 173
[1389] <211> 33
[1390] <212> DNA
[1391] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1392] <220>
[1393] <223> 合成的
[1394] <400> 173
[1395] cgttttgtgt ttataaaaa gaaagatttt cgg 33
[1396] <210> 174
[1397] <211> 21
[1398] <212> DNA
[1399] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1400] <220>
[1401] <223> 合成的
[1402] <400> 174

- [1403] aaaaccccaa aaacgcccga t 21
[1404] <210> 175
[1405] <211> 27
[1406] <212> DNA
[1407] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1408] <220>
[1409] <223> 合成的
[1410] <400> 175
[1411] ggggcgtata tattagttat cgagcga 27
[1412] <210> 176
[1413] <211> 25
[1414] <212> DNA
[1415] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1416] <220>
[1417] <223> 合成的
[1418] <400> 176
[1419] aaaaaaaccc ctaaaaaccg ccgaa 25
[1420] <210> 177
[1421] <211> 26
[1422] <212> DNA
[1423] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1424] <220>
[1425] <223> 合成的
[1426] <400> 177
[1427] ttcgtttaat gagaaggggt tagcgg 26
[1428] <210> 178
[1429] <211> 31
[1430] <212> DNA
[1431] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1432] <220>
[1433] <223> 合成的
[1434] <400> 178
[1435] taaaacaaac taaaacctt aacgcgacgc t 31
[1436] <210> 179
[1437] <211> 20
[1438] <212> DNA
[1439] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1440] <220>
[1441] <223> 合成的

- [1442] <400> 179
[1443] ggggagggag ttttttttac 20
[1444] <210> 180
[1445] <211> 25
[1446] <212> DNA
[1447] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1448] <220>
[1449] <223> 合成的
[1450] <400> 180
[1451] gtacgcgaac tcgccaaca ctacg 25
[1452] <210> 181
[1453] <211> 25
[1454] <212> DNA
[1455] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1456] <220>
[1457] <223> 合成的
[1458] <400> 181
[1459] gtagggttg tagtcgtttt tacgt 25
[1460] <210> 182
[1461] <211> 28
[1462] <212> DNA
[1463] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1464] <220>
[1465] <223> 合成的
[1466] <400> 182
[1467] aaccatcta attacaaaat acctcgat 28
[1468] <210> 183
[1469] <211> 26
[1470] <212> DNA
[1471] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1472] <220>
[1473] <223> 合成的
[1474] <400> 183
[1475] ggttttatag gggaaattat tttcgt 26
[1476] <210> 184
[1477] <211> 25
[1478] <212> DNA
[1479] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1480] <220>

- [1481] <223> 合成的
[1482] <400> 184
[1483] aaaacctcgt ctttataaca tcgaa 25
[1484] <210> 185
[1485] <211> 27
[1486] <212> DNA
[1487] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1488] <220>
[1489] <223> 合成的
[1490] <400> 185
[1491] taggatattt cgatgttata aagacga 27
[1492] <210> 186
[1493] <211> 25
[1494] <212> DNA
[1495] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1496] <220>
[1497] <223> 合成的
[1498] <400> 186
[1499] aacaaaacta acaaccgcct ccacg 25
[1500] <210> 187
[1501] <211> 27
[1502] <212> DNA
[1503] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1504] <220>
[1505] <223> 合成的
[1506] <400> 187
[1507] tttggagtta tcggaaggcg aaagtac 27
[1508] <210> 188
[1509] <211> 24
[1510] <212> DNA
[1511] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1512] <220>
[1513] <223> 合成的
[1514] <400> 188
[1515] gcacgccgaa aaaataaaaa cgaa 24
[1516] <210> 189
[1517] <211> 25
[1518] <212> DNA
[1519] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

- [1520] <220>
[1521] <223> 合成的
[1522] <400> 189
[1523] ttttcgatat cgatatcgaa ggcgt 25
[1524] <210> 190
[1525] <211> 25
[1526] <212> DNA
[1527] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1528] <220>
[1529] <223> 合成的
[1530] <400> 190
[1531] ataacttaaa accctaaatt ccgcc 25
[1532] <210> 191
[1533] <211> 26
[1534] <212> DNA
[1535] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1536] <220>
[1537] <223> 合成的
[1538] <400> 191
[1539] gcgggtagta ggaagattag tagcgg 26
[1540] <210> 192
[1541] <211> 22
[1542] <212> DNA
[1543] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1544] <220>
[1545] <223> 合成的
[1546] <400> 192
[1547] ccgacttccg tacgaaaccg ta 22
[1548] <210> 193
[1549] <211> 25
[1550] <212> DNA
[1551] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1552] <220>
[1553] <223> 合成的
[1554] <400> 193
[1555] taatagaggt ttgcgttggga atcga 25
[1556] <210> 194
[1557] <211> 25
[1558] <212> DNA

- [1559] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1560] <220>
[1561] <223> 合成的
[1562] <400> 194
[1563] aacgcaccct aaacaaaacc acgac 25
[1564] <210> 195
[1565] <211> 26
[1566] <212> DNA
[1567] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1568] <220>
[1569] <223> 合成的
[1570] <400> 195
[1571] tgaagagttg ttagttcggt tagcgt 26
[1572] <210> 196
[1573] <211> 23
[1574] <212> DNA
[1575] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1576] <220>
[1577] <223> 合成的
[1578] <400> 196
[1579] gccaaaaatt cgattccaac gca 23
[1580] <210> 197
[1581] <211> 25
[1582] <212> DNA
[1583] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1584] <220>
[1585] <223> 合成的
[1586] <400> 197
[1587] tagtgtagg tatagttggt agcgg 25
[1588] <210> 198
[1589] <211> 25
[1590] <212> DNA
[1591] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1592] <220>
[1593] <223> 合成的
[1594] <400> 198
[1595] atcaaaactc ccctcctcga aaacg 25
[1596] <210> 199
[1597] <211> 19

- [1598] <212> DNA
[1599] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1600] <220>
[1601] <223> 合成的
[1602] <400> 199
[1603] gtttttaagc ggcggtcgt 19
[1604] <210> 200
[1605] <211> 19
[1606] <212> DNA
[1607] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1608] <220>
[1609] <223> 合成的
[1610] <400> 200
[1611] aaaaaaatc ccgttcgct 19
[1612] <210> 201
[1613] <211> 24
[1614] <212> DNA
[1615] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1616] <220>
[1617] <223> 合成的
[1618] <400> 201
[1619] gcgcgcgttt attagatgaa gtcg 24
[1620] <210> 202
[1621] <211> 27
[1622] <212> DNA
[1623] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1624] <220>
[1625] <223> 合成的
[1626] <400> 202
[1627] aaaatcaaaa accacaaatt caccgcc 27
[1628] <210> 203
[1629] <211> 25
[1630] <212> DNA
[1631] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1632] <220>
[1633] <223> 合成的
[1634] <400> 203
[1635] cggggagagg aggggtagga tttac 25
[1636] <210> 204

- [1637] <211> 25
[1638] <212> DNA
[1639] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1640] <220>
[1641] <223> 合成的
[1642] <400> 204
[1643] caacttaaacc accacttcct ccgaa 25
[1644] <210> 205
[1645] <211> 20
[1646] <212> DNA
[1647] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1648] <220>
[1649] <223> 合成的
[1650] <400> 205
[1651] tgtttttttt gttcgggcgg 20
[1652] <210> 206
[1653] <211> 28
[1654] <212> DNA
[1655] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1656] <220>
[1657] <223> 合成的
[1658] <400> 206
[1659] aaataactaa ctctactct cgcccgt 28
[1660] <210> 207
[1661] <211> 29
[1662] <212> DNA
[1663] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1664] <220>
[1665] <223> 合成的
[1666] <400> 207
[1667] atagtttttt aattttcgcg tttcgtcga 29
[1668] <210> 208
[1669] <211> 24
[1670] <212> DNA
[1671] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1672] <220>
[1673] <223> 合成的
[1674] <400> 208
[1675] aaaaacaact ccaaccaca ccgc 24

- [1676] <210> 209
[1677] <211> 25
[1678] <212> DNA
[1679] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1680] <220>
[1681] <223> 合成的
[1682] <400> 209
[1683] gcgggaggag taggttaatt ttcga 25
[1684] <210> 210
[1685] <211> 25
[1686] <212> DNA
[1687] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1688] <220>
[1689] <223> 合成的
[1690] <400> 210
[1691] aaaaacaaaa tacgcgaaac gcacg 25
[1692] <210> 211
[1693] <211> 26
[1694] <212> DNA
[1695] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1696] <220>
[1697] <223> 合成的
[1698] <400> 211
[1699] cgagaaggtt ttgtcgtaga cgtcgt 26
[1700] <210> 212
[1701] <211> 22
[1702] <212> DNA
[1703] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1704] <220>
[1705] <223> 合成的
[1706] <400> 212
[1707] tacgtatcca taccgcgct cg 22
[1708] <210> 213
[1709] <211> 25
[1710] <212> DNA
[1711] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1712] <220>
[1713] <223> 合成的
[1714] <400> 213

- [1715] tttgtttgta taataggggt tgcgg 25
[1716] <210> 214
[1717] <211> 25
[1718] <212> DNA
[1719] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1720] <220>
[1721] <223> 合成的
[1722] <400> 214
[1723] cgcctaacta ccgaaaaata ccgaa 25
[1724] <210> 215
[1725] <211> 30
[1726] <212> DNA
[1727] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1728] <220>
[1729] <223> 合成的
[1730] <400> 215
[1731] ggtggggtta tttttttatg gagtcgattc 30
[1732] <210> 216
[1733] <211> 24
[1734] <212> DNA
[1735] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1736] <220>
[1737] <223> 合成的
[1738] <400> 216
[1739] cgaaccaaac ctacgattcc cgaa 24
[1740] <210> 217
[1741] <211> 27
[1742] <212> DNA
[1743] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1744] <220>
[1745] <223> 合成的
[1746] <400> 217
[1747] gggagaagag aatggttttt tgtcgtc 27
[1748] <210> 218
[1749] <211> 27
[1750] <212> DNA
[1751] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1752] <220>
[1753] <223> 合成的

- [1754] <400> 218
[1755] tcttatactc aacccccgacc taccgac 27
[1756] <210> 219
[1757] <211> 31
[1758] <212> DNA
[1759] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1760] <220>
[1761] <223> 合成的
[1762] <400> 219
[1763] gttttattcg gggtttttagc gttatttacg g 31
[1764] <210> 220
[1765] <211> 24
[1766] <212> DNA
[1767] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1768] <220>
[1769] <223> 合成的
[1770] <400> 220
[1771] aaaaaaccgc gttactcaac gcgc 24
[1772] <210> 221
[1773] <211> 24
[1774] <212> DNA
[1775] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1776] <220>
[1777] <223> 合成的
[1778] <400> 221
[1779] gtttagagcg gaggtagcgg ttgc 24
[1780] <210> 222
[1781] <211> 26
[1782] <212> DNA
[1783] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1784] <220>
[1785] <223> 合成的
[1786] <400> 222
[1787] cgcctattct taaacctaaa cccgtc 26
[1788] <210> 223
[1789] <211> 27
[1790] <212> DNA
[1791] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1792] <220>

- [1793] <223> 合成的
- [1794] <400> 223
- [1795] cgtagaggat tataaagatt tgtacga 27
- [1796] <210> 224
- [1797] <211> 30
- [1798] <212> DNA
- [1799] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [1800] <220>
- [1801] <223> 合成的
- [1802] <400> 224
- [1803] tactataact actacgataa cgacgacgac 30
- [1804] <210> 225
- [1805] <211> 28
- [1806] <212> DNA
- [1807] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [1808] <220>
- [1809] <223> 合成的
- [1810] <400> 225
- [1811] agatttcggt ttttgtttcg attttcgt 28
- [1812] <210> 226
- [1813] <211> 25
- [1814] <212> DNA
- [1815] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [1816] <220>
- [1817] <223> 合成的
- [1818] <400> 226
- [1819] attaatacta acttacgaaa cgcgc 25
- [1820] <210> 227
- [1821] <211> 25
- [1822] <212> DNA
- [1823] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [1824] <220>
- [1825] <223> 合成的
- [1826] <400> 227
- [1827] attatttttg agcgtgaaaa atcgt 25
- [1828] <210> 228
- [1829] <211> 26
- [1830] <212> DNA
- [1831] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

- [1832] <220>
[1833] <223> 合成的
[1834] <400> 228
[1835] aaatttctct ccaattaaat tccgta 26
[1836] <210> 229
[1837] <211> 22
[1838] <212> DNA
[1839] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1840] <220>
[1841] <223> 合成的
[1842] <400> 229
[1843] gtgggtttgt cgtcggattt cg 22
[1844] <210> 230
[1845] <211> 25
[1846] <212> DNA
[1847] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1848] <220>
[1849] <223> 合成的
[1850] <400> 230
[1851] aaataaccgc gtcacccgat tcggt 25
[1852] <210> 231
[1853] <211> 34
[1854] <212> DNA
[1855] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1856] <220>
[1857] <223> 合成的
[1858] <400> 231
[1859] tggatgtttt atattaattt ttagttgtat aacg 34
[1860] <210> 232
[1861] <211> 31
[1862] <212> DNA
[1863] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1864] <220>
[1865] <223> 合成的
[1866] <400> 232
[1867] gtactttttc tctcagaaa aatattcccg c 31
[1868] <210> 233
[1869] <211> 25
[1870] <212> DNA

- [1871] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1872] <220>
[1873] <223> 合成的
[1874] <400> 233
[1875] tgcgtggaat aaatTTTata tacgt 25
[1876] <210> 234
[1877] <211> 25
[1878] <212> DNA
[1879] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1880] <220>
[1881] <223> 合成的
[1882] <400> 234
[1883] gctcaacaca cgaaaaaccc tcgaa 25
[1884] <210> 235
[1885] <211> 25
[1886] <212> DNA
[1887] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1888] <220>
[1889] <223> 合成的
[1890] <400> 235
[1891] cggtgcgggg tTTtaataaa ggatc 25
[1892] <210> 236
[1893] <211> 25
[1894] <212> DNA
[1895] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1896] <220>
[1897] <223> 合成的
[1898] <400> 236
[1899] tccacgcaaa aacaaaaaac gcgta 25
[1900] <210> 237
[1901] <211> 27
[1902] <212> DNA
[1903] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1904] <220>
[1905] <223> 合成的
[1906] <400> 237
[1907] ggcgtagtta tgatttcgTT tTTtcgt 27
[1908] <210> 238
[1909] <211> 26

- [1910] <212> DNA
[1911] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1912] <220>
[1913] <223> 合成的
[1914] <400> 238
[1915] atcctttcga ccctacgtac ctcgat 26
[1916] <210> 239
[1917] <211> 28
[1918] <212> DNA
[1919] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1920] <220>
[1921] <223> 合成的
[1922] <400> 239
[1923] tttacgatta ttgttttaga taatacgg 28
[1924] <210> 240
[1925] <211> 19
[1926] <212> DNA
[1927] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1928] <220>
[1929] <223> 合成的
[1930] <400> 240
[1931] gaacccgacg aacttcgaa 19
[1932] <210> 241
[1933] <211> 21
[1934] <212> DNA
[1935] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1936] <220>
[1937] <223> 合成的
[1938] <400> 241
[1939] gggaaatcgc gtagtttggg c 21
[1940] <210> 242
[1941] <211> 25
[1942] <212> DNA
[1943] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1944] <220>
[1945] <223> 合成的
[1946] <400> 242
[1947] aaaacgacga aaaaacgaaa acgac 25
[1948] <210> 243

- [1949] <211> 26
- [1950] <212> DNA
- [1951] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [1952] <220>
- [1953] <223> 合成的
- [1954] <400> 243
- [1955] agttatcgcg atcggtttgg gttaac 26
- [1956] <210> 244
- [1957] <211> 28
- [1958] <212> DNA
- [1959] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [1960] <220>
- [1961] <223> 合成的
- [1962] <400> 244
- [1963] aaacgattac ctctttcggtt cgttcggtt 28
- [1964] <210> 245
- [1965] <211> 24
- [1966] <212> DNA
- [1967] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [1968] <220>
- [1969] <223> 合成的
- [1970] <400> 245
- [1971] cggcggttta tttgaagagg gttc 24
- [1972] <210> 246
- [1973] <211> 25
- [1974] <212> DNA
- [1975] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [1976] <220>
- [1977] <223> 合成的
- [1978] <400> 246
- [1979] cgacaaatca aaaatctaca acgct 25
- [1980] <210> 247
- [1981] <211> 25
- [1982] <212> DNA
- [1983] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [1984] <220>
- [1985] <223> 合成的
- [1986] <400> 247
- [1987] ttttaacggtt agttacgagt tgcgg 25

- [1988] <210> 248
[1989] <211> 21
[1990] <212> DNA
[1991] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1992] <220>
[1993] <223> 合成的
[1994] <400> 248
[1995] cgaacaaacc aaacaaccga a 21
[1996] <210> 249
[1997] <211> 19
[1998] <212> DNA
[1999] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2000] <220>
[2001] <223> 合成的
[2002] <400> 249
[2003] gtagattagg cgggggcga 19
[2004] <210> 250
[2005] <211> 34
[2006] <212> DNA
[2007] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2008] <220>
[2009] <223> 合成的
[2010] <400> 250
[2011] gaacaaaaac ataaactaat acaaatatct cccg 34
[2012] <210> 251
[2013] <211> 24
[2014] <212> DNA
[2015] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2016] <220>
[2017] <223> 合成的
[2018] <400> 251
[2019] ggaggagag tttttcgcg attc 24
[2020] <210> 252
[2021] <211> 25
[2022] <212> DNA
[2023] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2024] <220>
[2025] <223> 合成的
[2026] <400> 252

- [2027] ctaaaccct caaacctaa ccgat 25
[2028] <210> 253
[2029] <211> 20
[2030] <212> DNA
[2031] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2032] <220>
[2033] <223> 合成的
[2034] <400> 253
[2035] tgttttcgga tacggcgagc 20
[2036] <210> 254
[2037] <211> 23
[2038] <212> DNA
[2039] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2040] <220>
[2041] <223> 合成的
[2042] <400> 254
[2043] acgaacgaac tatacgcgac gct 23
[2044] <210> 255
[2045] <211> 21
[2046] <212> DNA
[2047] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2048] <220>
[2049] <223> 合成的
[2050] <400> 255
[2051] tggtaatcgg gtttttcgac g 21
[2052] <210> 256
[2053] <211> 22
[2054] <212> DNA
[2055] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2056] <220>
[2057] <223> 合成的
[2058] <400> 256
[2059] ccgcgaatct atctaccgaa ac 22
[2060] <210> 257
[2061] <211> 19
[2062] <212> DNA
[2063] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2064] <220>
[2065] <223> 合成的

- [2066] <400> 257
[2067] gtgtaggtt gggcggaag 19
[2068] <210> 258
[2069] <211> 22
[2070] <212> DNA
[2071] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2072] <220>
[2073] <223> 合成的
[2074] <400> 258
[2075] gttaccgct tacgaaaaac ga 22
[2076] <210> 259
[2077] <211> 24
[2078] <212> DNA
[2079] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2080] <220>
[2081] <223> 合成的
[2082] <400> 259
[2083] ttcgtttttt gtcgggagtt attc 24
[2084] <210> 260
[2085] <211> 28
[2086] <212> DNA
[2087] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2088] <220>
[2089] <223> 合成的
[2090] <400> 260
[2091] tccaaaaatt aaattaaac cgctacgc 28
[2092] <210> 261
[2093] <211> 21
[2094] <212> DNA
[2095] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2096] <220>
[2097] <223> 合成的
[2098] <400> 261
[2099] ataatacgtt tgttcgggag g 21
[2100] <210> 262
[2101] <211> 25
[2102] <212> DNA
[2103] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2104] <220>

- [2105] <223> 合成的
- [2106] <400> 262
- [2107] gtaaataaa actacgacgac gcgta 25
- [2108] <210> 263
- [2109] <211> 21
- [2110] <212> DNA
- [2111] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [2112] <220>
- [2113] <223> 合成的
- [2114] <400> 263
- [2115] gagagtttag gtagcgttcg g 21
- [2116] <210> 264
- [2117] <211> 28
- [2118] <212> DNA
- [2119] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [2120] <220>
- [2121] <223> 合成的
- [2122] <400> 264
- [2123] cctaacgcta ctaacaacat tataacga 28
- [2124] <210> 265
- [2125] <211> 19
- [2126] <212> DNA
- [2127] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [2128] <220>
- [2129] <223> 合成的
- [2130] <400> 265
- [2131] cgcggttttg gagcgtag 19
- [2132] <210> 266
- [2133] <211> 20
- [2134] <212> DNA
- [2135] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [2136] <220>
- [2137] <223> 合成的
- [2138] <400> 266
- [2139] ccgaaacgac cgaaaacgac 20
- [2140] <210> 267
- [2141] <211> 20
- [2142] <212> DNA
- [2143] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

- [2144] <220>
[2145] <223> 合成的
[2146] <400> 267
[2147] cggttcgttg cgtttatcga 20
[2148] <210> 268
[2149] <211> 20
[2150] <212> DNA
[2151] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2152] <220>
[2153] <223> 合成的
[2154] <400> 268
[2155] cccccgaact actctacgcg 20
[2156] <210> 269
[2157] <211> 28
[2158] <212> DNA
[2159] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2160] <220>
[2161] <223> 合成的
[2162] <400> 269
[2163] gattatattc ggattttggtt tatcgcgt 28
[2164] <210> 270
[2165] <211> 18
[2166] <212> DNA
[2167] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2168] <220>
[2169] <223> 合成的
[2170] <400> 270
[2171] gactcttcct acccgcga 18
[2172] <210> 271
[2173] <211> 19
[2174] <212> DNA
[2175] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2176] <220>
[2177] <223> 合成的
[2178] <400> 271
[2179] gcggttttta gttcgcggg 19
[2180] <210> 272
[2181] <211> 27
[2182] <212> DNA

- [2183] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2184] <220>
[2185] <223> 合成的
[2186] <400> 272
[2187] aacaaataat taacaaacaa cgcctcc 27
[2188] <210> 273
[2189] <211> 24
[2190] <212> DNA
[2191] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2192] <220>
[2193] <223> 合成的
[2194] <400> 273
[2195] tcgttcggcg tatttatttc gtat 24
[2196] <210> 274
[2197] <211> 19
[2198] <212> DNA
[2199] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2200] <220>
[2201] <223> 合成的
[2202] <400> 274
[2203] cgcgaaaaac ttcctccga 19
[2204] <210> 275
[2205] <211> 20
[2206] <212> DNA
[2207] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2208] <220>
[2209] <223> 合成的
[2210] <400> 275
[2211] ggattggtga gattcgggac 20
[2212] <210> 276
[2213] <211> 21
[2214] <212> DNA
[2215] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2216] <220>
[2217] <223> 合成的
[2218] <400> 276
[2219] cccgaaacca aaaaacaacg a 21
[2220] <210> 277
[2221] <211> 21

- [2222] <212> DNA
[2223] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2224] <220>
[2225] <223> 合成的
[2226] <400> 277
[2227] cggggagttt cgtttgtatc g 21
[2228] <210> 278
[2229] <211> 26
[2230] <212> DNA
[2231] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2232] <220>
[2233] <223> 合成的
[2234] <400> 278
[2235] cgaataacga ctacgaactt taaacg 26
[2236] <210> 279
[2237] <211> 28
[2238] <212> DNA
[2239] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2240] <220>
[2241] <223> 合成的
[2242] <400> 279
[2243] cgtagttata gatttattag agagggcg 28
[2244] <210> 280
[2245] <211> 26
[2246] <212> DNA
[2247] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2248] <220>
[2249] <223> 合成的
[2250] <400> 280
[2251] ctaaaacgat aaaaaaacgc gaaacg 26
[2252] <210> 281
[2253] <211> 23
[2254] <212> DNA
[2255] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2256] <220>
[2257] <223> 合成的
[2258] <400> 281
[2259] tggtagtttt cggtatcgac gag 23
[2260] <210> 282

- [2261] <211> 20
[2262] <212> DNA
[2263] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2264] <220>
[2265] <223> 合成的
[2266] <400> 282
[2267] taactctacg cgcaaaacgc 20
[2268] <210> 283
[2269] <211> 20
[2270] <212> DNA
[2271] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2272] <220>
[2273] <223> 合成的
[2274] <400> 283
[2275] gggattttta gcggaagcga 20
[2276] <210> 284
[2277] <211> 23
[2278] <212> DNA
[2279] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2280] <220>
[2281] <223> 合成的
[2282] <400> 284
[2283] cgacgaacta tccgactatc act 23
[2284] <210> 285
[2285] <211> 21
[2286] <212> DNA
[2287] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2288] <220>
[2289] <223> 合成的
[2290] <400> 285
[2291] cggaggaatc gggtagaatc g 21
[2292] <210> 286
[2293] <211> 22
[2294] <212> DNA
[2295] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2296] <220>
[2297] <223> 合成的
[2298] <400> 286
[2299] actctcccat aacaacgact cc 22

- [2300] <210> 287
[2301] <211> 17
[2302] <212> DNA
[2303] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2304] <220>
[2305] <223> 合成的
[2306] <400> 287
[2307] cgcgtagggc gagtttc 17
[2308] <210> 288
[2309] <211> 18
[2310] <212> DNA
[2311] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2312] <220>
[2313] <223> 合成的
[2314] <400> 288
[2315] gcctcctcct acctctcg 18
[2316] <210> 289
[2317] <211> 22
[2318] <212> DNA
[2319] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2320] <220>
[2321] <223> 合成的
[2322] <400> 289
[2323] tcggcggttt ttagtaaaag cg 22
[2324] <210> 290
[2325] <211> 19
[2326] <212> DNA
[2327] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2328] <220>
[2329] <223> 合成的
[2330] <400> 290
[2331] aaatctcccg tcccactcc 19
[2332] <210> 291
[2333] <211> 20
[2334] <212> DNA
[2335] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2336] <220>
[2337] <223> 合成的
[2338] <400> 291

- [2339] ggtatattcg cgtaggtgcg 20
[2340] <210> 292
[2341] <211> 25
[2342] <212> DNA
[2343] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2344] <220>
[2345] <223> 合成的
[2346] <400> 292
[2347] aaccgaatac cgaaatctat aacc 25
[2348] <210> 293
[2349] <211> 21
[2350] <212> DNA
[2351] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2352] <220>
[2353] <223> 合成的
[2354] <400> 293
[2355] gtagttgggt tgtagtgcgt g 21
[2356] <210> 294
[2357] <211> 19
[2358] <212> DNA
[2359] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2360] <220>
[2361] <223> 合成的
[2362] <400> 294
[2363] cccgaacttc ccatcgaac 19
[2364] <210> 295
[2365] <211> 23
[2366] <212> DNA
[2367] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2368] <220>
[2369] <223> 合成的
[2370] <400> 295
[2371] ttcgtacggt tttttcgttt tcg 23
[2372] <210> 296
[2373] <211> 26
[2374] <212> DNA
[2375] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2376] <220>
[2377] <223> 合成的

- [2378] <400> 296
- [2379] ccaccacgta ataattcttc tcgaaa 26
- [2380] <210> 297
- [2381] <211> 24
- [2382] <212> DNA
- [2383] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [2384] <220>
- [2385] <223> 合成的
- [2386] <400> 297
- [2387] cggtttgata ttattcgggg ttcg 24
- [2388] <210> 298
- [2389] <211> 23
- [2390] <212> DNA
- [2391] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [2392] <220>
- [2393] <223> 合成的
- [2394] <400> 298
- [2395] aattaacgcc ccctataaca tcc 23
- [2396] <210> 299
- [2397] <211> 25
- [2398] <212> DNA
- [2399] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [2400] <220>
- [2401] <223> 合成的
- [2402] <400> 299
- [2403] cgcgatagcg ttttttattg tcgcg 25
- [2404] <210> 300
- [2405] <211> 21
- [2406] <212> DNA
- [2407] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [2408] <220>
- [2409] <223> 合成的
- [2410] <400> 300
- [2411] cgcacgaccg taaaatactc g 21
- [2412] <210> 301
- [2413] <211> 24
- [2414] <212> DNA
- [2415] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [2416] <220>

- [2417] <223> 合成的
[2418] <400> 301
[2419] cggttcgtag attgttttag agcg 24
[2420] <210> 302
[2421] <211> 32
[2422] <212> DNA
[2423] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2424] <220>
[2425] <223> 合成的
[2426] <400> 302
[2427] caaataccgt cgaaaaaaaa ctaatcaaa ac 32
[2428] <210> 303
[2429] <211> 21
[2430] <212> DNA
[2431] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2432] <220>
[2433] <223> 合成的
[2434] <400> 303
[2435] cgttgtagga cggttatgtc g 21
[2436] <210> 304
[2437] <211> 25
[2438] <212> DNA
[2439] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2440] <220>
[2441] <223> 合成的
[2442] <400> 304
[2443] catcctactc ttcgaaataa accgc 25
[2444] <210> 305
[2445] <211> 26
[2446] <212> DNA
[2447] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2448] <220>
[2449] <223> 合成的
[2450] <400> 305
[2451] agtcgttttt ttaggtagtt taggcg 26
[2452] <210> 306
[2453] <211> 19
[2454] <212> DNA
[2455] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

- [2456] <220>
[2457] <223> 合成的
[2458] <400> 306
[2459] cgacctttac aatcgccgc 19
[2460] <210> 307
[2461] <211> 19
[2462] <212> DNA
[2463] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2464] <220>
[2465] <223> 合成的
[2466] <400> 307
[2467] agattggcgc gtaaaagcg 19
[2468] <210> 308
[2469] <211> 17
[2470] <212> DNA
[2471] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2472] <220>
[2473] <223> 合成的
[2474] <400> 308
[2475] accgaccccg aaaaacg 17
[2476] <210> 309
[2477] <211> 18
[2478] <212> DNA
[2479] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2480] <220>
[2481] <223> 合成的
[2482] <400> 309
[2483] cgttttcgga gtcgcgtg 18
[2484] <210> 310
[2485] <211> 26
[2486] <212> DNA
[2487] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2488] <220>
[2489] <223> 合成的
[2490] <400> 310
[2491] aaccatactt atccgaacgt ctaaac 26
[2492] <210> 311
[2493] <211> 21
[2494] <212> DNA

- [2495] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2496] <220>
[2497] <223> 合成的
[2498] <400> 311
[2499] gagtaggggtt attttcgcgg g 21
[2500] <210> 312
[2501] <211> 29
[2502] <212> DNA
[2503] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2504] <220>
[2505] <223> 合成的
[2506] <400> 312
[2507] ctactttttt cccgacaaaa taaaaacgt 29
[2508] <210> 313
[2509] <211> 21
[2510] <212> DNA
[2511] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2512] <220>
[2513] <223> 合成的
[2514] <400> 313
[2515] ttttcgcgta tttcgtggtt c 21
[2516] <210> 314
[2517] <211> 16
[2518] <212> DNA
[2519] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2520] <220>
[2521] <223> 合成的
[2522] <400> 314
[2523] aacgccgccg tattcg 16
[2524] <210> 315
[2525] <211> 17
[2526] <212> DNA
[2527] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2528] <220>
[2529] <223> 合成的
[2530] <400> 315
[2531] tcgcgttgga agttgcg 17
[2532] <210> 316
[2533] <211> 25

- [2534] <212> DNA
[2535] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2536] <220>
[2537] <223> 合成的
[2538] <400> 316
[2539] cgtattctaa acgctaaaaa accgc 25
[2540] <210> 317
[2541] <211> 17
[2542] <212> DNA
[2543] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2544] <220>
[2545] <223> 合成的
[2546] <400> 317
[2547] cggcggtagt tttgcgg 17
[2548] <210> 318
[2549] <211> 25
[2550] <212> DNA
[2551] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2552] <220>
[2553] <223> 合成的
[2554] <400> 318
[2555] ctactaaaca aaaaccaaca cgtcc 25
[2556] <210> 319
[2557] <211> 24
[2558] <212> DNA
[2559] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2560] <220>
[2561] <223> 合成的
[2562] <400> 319
[2563] ggtaggtttg ttagttggtt ttcg 24
[2564] <210> 320
[2565] <211> 20
[2566] <212> DNA
[2567] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2568] <220>
[2569] <223> 合成的
[2570] <400> 320
[2571] cgctatctct acgaccgcct 20
[2572] <210> 321

- [2573] <211> 17
[2574] <212> DNA
[2575] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2576] <220>
[2577] <223> 合成的
[2578] <400> 321
[2579] cggaggtagc gggcgag 17
[2580] <210> 322
[2581] <211> 17
[2582] <212> DNA
[2583] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2584] <220>
[2585] <223> 合成的
[2586] <400> 322
[2587] cactcaccgc ttccgcc 17
[2588] <210> 323
[2589] <211> 16
[2590] <212> DNA
[2591] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2592] <220>
[2593] <223> 合成的
[2594] <400> 323
[2595] ggcgttcggt tccggc 16
[2596] <210> 324
[2597] <211> 16
[2598] <212> DNA
[2599] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2600] <220>
[2601] <223> 合成的
[2602] <400> 324
[2603] cgcttctccg acgcc 16
[2604] <210> 325
[2605] <211> 20
[2606] <212> DNA
[2607] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2608] <220>
[2609] <223> 合成的
[2610] <400> 325
[2611] gcggttgagt ttttggtcgg 20

- [2612] <210> 326
[2613] <211> 24
[2614] <212> DNA
[2615] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2616] <220>
[2617] <223> 合成的
[2618] <400> 326
[2619] ccccgataa ctaaaaacga cgac 24
[2620] <210> 327
[2621] <211> 31
[2622] <212> DNA
[2623] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2624] <220>
[2625] <223> 合成的
[2626] <400> 327
[2627] cgtttttttt atgtagtaag cgatttttcg c 31
[2628] <210> 328
[2629] <211> 17
[2630] <212> DNA
[2631] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2632] <220>
[2633] <223> 合成的
[2634] <400> 328
[2635] aaacgacgac gaacgcc 17
[2636] <210> 329
[2637] <211> 24
[2638] <212> DNA
[2639] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2640] <220>
[2641] <223> 合成的
[2642] <400> 329
[2643] gcgttttggt tttttcgttt cgag 24
[2644] <210> 330
[2645] <211> 21
[2646] <212> DNA
[2647] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2648] <220>
[2649] <223> 合成的
[2650] <400> 330

- [2651] gaacgacgaa actaaaaccg c 21
[2652] <210> 331
[2653] <211> 27
[2654] <212> DNA
[2655] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2656] <220>
[2657] <223> 合成的
[2658] <400> 331
[2659] cgttttttgg tagttttttt cgagtcg 27
[2660] <210> 332
[2661] <211> 22
[2662] <212> DNA
[2663] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2664] <220>
[2665] <223> 合成的
[2666] <400> 332
[2667] gcttaaactgt aaccgaaacg cc 22
[2668] <210> 333
[2669] <211> 19
[2670] <212> DNA
[2671] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2672] <220>
[2673] <223> 合成的
[2674] <400> 333
[2675] ggttgccgct cgttttttc 19
[2676] <210> 334
[2677] <211> 19
[2678] <212> DNA
[2679] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2680] <220>
[2681] <223> 合成的
[2682] <400> 334
[2683] cccgacgcgt ttaaactgt 19
[2684] <210> 335
[2685] <211> 28
[2686] <212> DNA
[2687] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2688] <220>
[2689] <223> 合成的

- [2690] <400> 335
[2691] ggatgggaat agttaagttt tagtcgtt 28
[2692] <210> 336
[2693] <211> 27
[2694] <212> DNA
[2695] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2696] <220>
[2697] <223> 合成的
[2698] <400> 336
[2699] tccaacatta catacaacac taacgtc 27
[2700] <210> 337
[2701] <211> 21
[2702] <212> DNA
[2703] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2704] <220>
[2705] <223> 合成的
[2706] <400> 337
[2707] ggtaggggt ggagttcgtt a 21
[2708] <210> 338
[2709] <211> 24
[2710] <212> DNA
[2711] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2712] <220>
[2713] <223> 合成的
[2714] <400> 338
[2715] actccgaact ctactcatcc tttc 24
[2716] <210> 339
[2717] <211> 21
[2718] <212> DNA
[2719] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2720] <220>
[2721] <223> 合成的
[2722] <400> 339
[2723] taggttgag attttgacgc g 21
[2724] <210> 340
[2725] <211> 22
[2726] <212> DNA
[2727] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2728] <220>

- [2729] <223> 合成的
[2730] <400> 340
[2731] cgaaacctaa aaacgccgaa ac 22
[2732] <210> 341
[2733] <211> 25
[2734] <212> DNA
[2735] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2736] <220>
[2737] <223> 合成的
[2738] <400> 341
[2739] ggttgtagt cgtttttacg ttttc 25
[2740] <210> 342
[2741] <211> 30
[2742] <212> DNA
[2743] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2744] <220>
[2745] <223> 合成的
[2746] <400> 342
[2747] caaaacccat ctaattacaa aatacctcga 30
[2748] <210> 343
[2749] <211> 19
[2750] <212> DNA
[2751] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2752] <220>
[2753] <223> 合成的
[2754] <400> 343
[2755] tggagttatc ggaaggcga 19
[2756] <210> 344
[2757] <211> 18
[2758] <212> DNA
[2759] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2760] <220>
[2761] <223> 合成的
[2762] <400> 344
[2763] cgaactcccg aaacgacg 18
[2764] <210> 345
[2765] <211> 27
[2766] <212> DNA
[2767] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

- [2768] <220>
[2769] <223> 合成的
[2770] <400> 345
[2771] ggaaatggtt tagagttttg gatttcg 27
[2772] <210> 346
[2773] <211> 27
[2774] <212> DNA
[2775] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2776] <220>
[2777] <223> 合成的
[2778] <400> 346
[2779] ttctaaaaaa tactttcgat accgaca 27
[2780] <210> 347
[2781] <211> 29
[2782] <212> DNA
[2783] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2784] <220>
[2785] <223> 合成的
[2786] <400> 347
[2787] gtggtttgaa gagttgtag ttcgtag 29
[2788] <210> 348
[2789] <211> 23
[2790] <212> DNA
[2791] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2792] <220>
[2793] <223> 合成的
[2794] <400> 348
[2795] gccaaaaatt cgattccaac gca 23
[2796] <210> 349
[2797] <211> 22
[2798] <212> DNA
[2799] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2800] <220>
[2801] <223> 合成的
[2802] <400> 349
[2803] aaggtgggtt gtttgaagaa gc 22
[2804] <210> 350
[2805] <211> 22
[2806] <212> DNA

- [2807] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2808] <220>
[2809] <223> 合成的
[2810] <400> 350
[2811] accctccgac aaaaaaacgt ac 22
[2812] <210> 351
[2813] <211> 21
[2814] <212> DNA
[2815] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2816] <220>
[2817] <223> 合成的
[2818] <400> 351
[2819] gcgagaaggt tttgtcgtag a 21
[2820] <210> 352
[2821] <211> 19
[2822] <212> DNA
[2823] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2824] <220>
[2825] <223> 合成的
[2826] <400> 352
[2827] acctactcac gcacaacct 19
[2828] <210> 353
[2829] <211> 17
[2830] <212> DNA
[2831] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2832] <220>
[2833] <223> 合成的
[2834] <400> 353
[2835] cgcggtgagg aagatcg 17
[2836] <210> 354
[2837] <211> 18
[2838] <212> DNA
[2839] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2840] <220>
[2841] <223> 合成的
[2842] <400> 354
[2843] acgccaccta cgactacg 18
[2844] <210> 355
[2845] <211> 21

- [2846] <212> DNA
- [2847] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [2848] <220>
- [2849] <223> 合成的
- [2850] <400> 355
- [2851] gtacggttat tggttgagcg g 21
- [2852] <210> 356
- [2853] <211> 19
- [2854] <212> DNA
- [2855] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [2856] <220>
- [2857] <223> 合成的
- [2858] <400> 356
- [2859] ccgaatcctc ctccaaacg 19
- [2860] <210> 357
- [2861] <211> 28
- [2862] <212> DNA
- [2863] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [2864] <220>
- [2865] <223> 合成的
- [2866] <400> 357
- [2867] ggaatttaat tggagagaaa ttttggcg 28
- [2868] <210> 358
- [2869] <211> 27
- [2870] <212> DNA
- [2871] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [2872] <220>
- [2873] <223> 合成的
- [2874] <400> 358
- [2875] ccaaaatttc cctcatctat atacgcc 27
- [2876] <210> 359
- [2877] <211> 17
- [2878] <212> DNA
- [2879] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [2880] <220>
- [2881] <223> 合成的
- [2882] <400> 359
- [2883] gttgcgggctc gggttgc 17
- [2884] <210> 360

- [2885] <211> 26
[2886] <212> DNA
[2887] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2888] <220>
[2889] <223> 合成的
[2890] <400> 360
[2891] gcaaaaacaa aaaacgcgta aaaacc 26
[2892] <210> 361
[2893] <211> 21
[2894] <212> DNA
[2895] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2896] <220>
[2897] <223> 合成的
[2898] <400> 361
[2899] gtcgctcgttg tcgtagttgt c 21
[2900] <210> 362
[2901] <211> 20
[2902] <212> DNA
[2903] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2904] <220>
[2905] <223> 合成的
[2906] <400> 362
[2907] cgtaaaaacc gaacgacgcg 20
[2908] <210> 363
[2909] <211> 26
[2910] <212> DNA
[2911] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2912] <220>
[2913] <223> 合成的
[2914] <400> 363
[2915] ttttcgattga ttttattcga gtcgtc 26
[2916] <210> 364
[2917] <211> 22
[2918] <212> DNA
[2919] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2920] <220>
[2921] <223> 合成的
[2922] <400> 364
[2923] gaaccctctt caaataaacc gc 22

- [2924] <210> 365
[2925] <211> 21
[2926] <212> DNA
[2927] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2928] <220>
[2929] <223> 合成的
[2930] <400> 365
[2931] gattaaatag tcggggtcgc g 21
[2932] <210> 366
[2933] <211> 19
[2934] <212> DNA
[2935] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2936] <220>
[2937] <223> 合成的
[2938] <400> 366
[2939] attctccaac gccaaccac 19
[2940] <210> 367
[2941] <211> 24
[2942] <212> DNA
[2943] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2944] <220>
[2945] <223> 合成的
[2946] <400> 367
[2947] cgcgccgagg cgcgcttcca ctcc 24
[2948] <210> 368
[2949] <211> 33
[2950] <212> DNA
[2951] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2952] <220>
[2953] <223> 合成的
[2954] <400> 368
[2955] aggccacgga cggcggcggtt tttttttatg ttg 33
[2956] <210> 369
[2957] <211> 39
[2958] <212> DNA
[2959] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2960] <220>
[2961] <223> 合成的
[2962] <400> 369

- [2963] aggccacgga cgcaaccgaa ctaaaaaaaaa aaactaacg 39
[2964] <210> 370
[2965] <211> 27
[2966] <212> DNA
[2967] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2968] <220>
[2969] <223> 合成的
[2970] <400> 370
[2971] cgcgccgagg gcgcgtaaga ttttcgg 27
[2972] <210> 371
[2973] <211> 25
[2974] <212> DNA
[2975] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2976] <220>
[2977] <223> 合成的
[2978] <400> 371
[2979] cgcgccgagg gcgggtagta gtgcg 25
[2980] <210> 372
[2981] <211> 31
[2982] <212> DNA
[2983] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2984] <220>
[2985] <223> 合成的
[2986] <400> 372
[2987] cgcgccgagg cgaccgaaaa atcgaaaaac a 31
[2988] <210> 373
[2989] <211> 30
[2990] <212> DNA
[2991] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2992] <220>
[2993] <223> 合成的
[2994] <400> 373
[2995] cgcgccgagg gctaacgcga ataaaacacg 30
[2996] <210> 374
[2997] <211> 29
[2998] <212> DNA
[2999] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[3000] <220>
[3001] <223> 合成的

- [3002] <400> 374
- [3003] cgcgccgagg ttttcgtttt cggtttcgg 29
- [3004] <210> 375
- [3005] <211> 28
- [3006] <212> DNA
- [3007] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [3008] <220>
- [3009] <223> 合成的
- [3010] <400> 375
- [3011] cgcgccgagg ccgtacctat taactccg 28
- [3012] <210> 376
- [3013] <211> 31
- [3014] <212> DNA
- [3015] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [3016] <220>
- [3017] <223> 合成的
- [3018] <400> 376
- [3019] aggccacgga cgtcgttttt tttttgcggg t 31
- [3020] <210> 377
- [3021] <211> 30
- [3022] <212> DNA
- [3023] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [3024] <220>
- [3025] <223> 合成的
- [3026] <400> 377
- [3027] aggccacgga cgcgtattgg cgcgatttag 30
- [3028] <210> 378
- [3029] <211> 33
- [3030] <212> DNA
- [3031] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [3032] <220>
- [3033] <223> 合成的
- [3034] <400> 378
- [3035] aggccacgga cggttcgaaa aaaactcgac gaa 33
- [3036] <210> 379
- [3037] <211> 30
- [3038] <212> DNA
- [3039] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [3040] <220>

- [3041] <223> 合成的
[3042] <400> 379
[3043] aggccacgga cggccgttct ctaacttccg 30
[3044] <210> 380
[3045] <211> 29
[3046] <212> DNA
[3047] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[3048] <220>
[3049] <223> 合成的
[3050] <400> 380
[3051] aggccacgga cgccgaaata cgaacgcga 29
[3052] <210> 381
[3053] <211> 29
[3054] <212> DNA
[3055] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[3056] <220>
[3057] <223> 合成的
[3058] <400> 381
[3059] aggccacgga cgtcgttcct cgatttcgc 29
[3060] <210> 382
[3061] <211> 37
[3062] <212> DNA
[3063] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[3064] <220>
[3065] <223> 合成的
[3066] <400> 382
[3067] aggccacgga cgcaataaaa acctacgaaa aaaaacg 37
[3068] <210> 383
[3069] <211> 31
[3070] <212> DNA
[3071] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[3072] <220>
[3073] <223> 合成的
[3074] <400> 383
[3075] aggccacgga cggaaaaccg caaaatcctc g 31
[3076] <210> 384
[3077] <211> 38
[3078] <212> DNA
[3079] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

- [3080] <220>
[3081] <223> 合成的
[3082] <400> 384
[3083] aggccacgga cgcgcgaaat aaacctataa ttaactca 38
[3084] <210> 385
[3085] <211> 29
[3086] <212> DNA
[3087] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[3088] <220>
[3089] <223> 合成的
[3090] <400> 385
[3091] cgcgccgagg ccgaaccaac actcaaac 29
[3092] <210> 386
[3093] <211> 26
[3094] <212> DNA
[3095] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[3096] <220>
[3097] <223> 合成的
[3098] <400> 386
[3099] cgcgccgagg gcgcgtttgg tttggt 26
[3100] <210> 387
[3101] <211> 26
[3102] <212> DNA
[3103] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[3104] <220>
[3105] <223> 合成的
[3106] <400> 387
[3107] aggccacgga cgaacgcgct ccaacc 26
[3108] <210> 388
[3109] <211> 31
[3110] <212> DNA
[3111] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[3112] <220>
[3113] <223> 合成的
[3114] <400> 388
[3115] cgcgccgagg cgcgacgact aaaaaattc a 31
[3116] <210> 389
[3117] <211> 30
[3118] <212> DNA

- [3119] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[3120] <220>
[3121] <223> 合成的
[3122] <400> 389
[3123] aggccacgga cggtcgaaat cgaaacgctc 30
[3124] <210> 390
[3125] <211> 26
[3126] <212> DNA
[3127] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[3128] <220>
[3129] <223> 合成的
[3130] <400> 390
[3131] cgcgccgagg ccgcgactac ctcttc 26
[3132] <210> 391
[3133] <211> 30
[3134] <212> DNA
[3135] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[3136] <220>
[3137] <223> 合成的
[3138] <400> 391
[3139] aggccacgga cgcgacgtcc tacaaaacca 30
[3140] <210> 392
[3141] <211> 25
[3142] <212> DNA
[3143] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[3144] <220>
[3145] <223> 合成的
[3146] <400> 392
[3147] cgcgccgagg ggcggtagttgttgc 25
[3148] <210> 393
[3149] <211> 24
[3150] <212> DNA
[3151] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[3152] <220>
[3153] <223> 合成的
[3154] <400> 393
[3155] cgcgccgagg gcgaaaaccc cgcc 24
[3156] <210> 394
[3157] <211> 32

- [3158] <212> DNA
[3159] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[3160] <220>
[3161] <223> 合成的
[3162] <400> 394
[3163] cgcgccgagg cgtctaacta aacgcgataa ac 32
[3164] <210> 395
[3165] <211> 29
[3166] <212> DNA
[3167] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[3168] <220>
[3169] <223> 合成的
[3170] <400> 395
[3171] cgcgccgagg gcggttttag cgatgaatc 29
[3172] <210> 396
[3173] <211> 24
[3174] <212> DNA
[3175] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[3176] <220>
[3177] <223> 合成的
[3178] <400> 396
[3179] cgcgccgagg cgattcgagg gcgt 24
[3180] <210> 397
[3181] <211> 27
[3182] <212> DNA
[3183] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[3184] <220>
[3185] <223> 合成的
[3186] <400> 397
[3187] aggccacgga cgcgcgacgc aaaactc 27
[3188] <210> 398
[3189] <211> 26
[3190] <212> DNA
[3191] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[3192] <220>
[3193] <223> 合成的
[3194] <400> 398
[3195] aggccacgga cggcggcggt tggatt 26
[3196] <210> 399

- [3197] <211> 31
[3198] <212> DNA
[3199] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[3200] <220>
[3201] <223> 合成的
[3202] <400> 399
[3203] aggccacgga cgtcccgaaa cgaacgataa a 31
[3204] <210> 400
[3205] <211> 24
[3206] <212> DNA
[3207] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[3208] <220>
[3209] <223> 合成的
[3210] <400> 400
[3211] cgcgccgagg cgccgtcgca ctac 24
[3212] <210> 401
[3213] <211> 26
[3214] <212> DNA
[3215] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[3216] <220>
[3217] <223> 合成的
[3218] <400> 401
[3219] aggccacgga cgcgcgactc cccact 26
[3220] <210> 402
[3221] <211> 32
[3222] <212> DNA
[3223] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[3224] <220>
[3225] <223> 合成的
[3226] <400> 402
[3227] aggccacgga cgcgcaaata ataacgcgaa cg 32
[3228] <210> 403
[3229] <211> 33
[3230] <212> DNA
[3231] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[3232] <220>
[3233] <223> 合成的
[3234] <400> 403
[3235] aggccacgga cgcgttcgag gttagttttt tgg 33

- [3236] <210> 404
[3237] <211> 27
[3238] <212> DNA
[3239] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[3240] <220>
[3241] <223> 合成的
[3242] <400> 404
[3243] aggccacgga cgcgtacgta acccgcg 27
[3244] <210> 405
[3245] <211> 29
[3246] <212> DNA
[3247] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[3248] <220>
[3249] <223> 合成的
[3250] <400> 405
[3251] cgcgccgagg cgctactaac cataaccgc 29
[3252] <210> 406
[3253] <211> 30
[3254] <212> DNA
[3255] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[3256] <220>
[3257] <223> 合成的
[3258] <400> 406
[3259] cgcgccgagg cgttttcggt tgattcgggt 30
[3260] <210> 407
[3261] <211> 29
[3262] <212> DNA
[3263] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[3264] <220>
[3265] <223> 合成的
[3266] <400> 407
[3267] cgcgccgagg tcggtgattg atgtgtgcg 29
[3268] <210> 408
[3269] <211> 31
[3270] <212> DNA
[3271] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[3272] <220>
[3273] <223> 合成的
[3274] <400> 408

- [3275] cgcgccgagg cgtaactcca tctcgataac c 31
[3276] <210> 409
[3277] <211> 26
[3278] <212> DNA
[3279] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[3280] <220>
[3281] <223> 合成的
[3282] <400> 409
[3283] cgcgccgagg cgaccgcaa aaaacg 26
[3284] <210> 410
[3285] <211> 28
[3286] <212> DNA
[3287] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[3288] <220>
[3289] <223> 合成的
[3290] <400> 410
[3291] aggccacgga cgcgcggttg aagtttcg 28
[3292] <210> 411
[3293] <211> 26
[3294] <212> DNA
[3295] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[3296] <220>
[3297] <223> 合成的
[3298] <400> 411
[3299] cgcgccgagg ggcggaacac aaaacg 26
[3300] <210> 412
[3301] <211> 27
[3302] <212> DNA
[3303] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[3304] <220>
[3305] <223> 合成的
[3306] <400> 412
[3307] cgcgccgagg accgaaaacg ccctaaa 27
[3308] <210> 413
[3309] <211> 31
[3310] <212> DNA
[3311] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[3312] <220>
[3313] <223> 合成的

- [3314] <400> 413
- [3315] cgcgccgagg gcgtggagaa atgttagttt g 31
- [3316] <210> 414
- [3317] <211> 28
- [3318] <212> DNA
- [3319] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [3320] <220>
- [3321] <223> 合成的
- [3322] <400> 414
- [3323] aggccacgga cgcgggcggt gaatttgt 28
- [3324] <210> 415
- [3325] <211> 29
- [3326] <212> DNA
- [3327] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [3328] <220>
- [3329] <223> 合成的
- [3330] <400> 415
- [3331] aggccacgga cgacgtcgta tttgtggcg 29
- [3332] <210> 416
- [3333] <211> 27
- [3334] <212> DNA
- [3335] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [3336] <220>
- [3337] <223> 合成的
- [3338] <400> 416
- [3339] aggccacgga cggcgttggt tagcgcg 27
- [3340] <210> 417
- [3341] <211> 30
- [3342] <212> DNA
- [3343] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [3344] <220>
- [3345] <223> 合成的
- [3346] <400> 417
- [3347] aggccacgga cggatcccgc aatcaacac 30
- [3348] <210> 418
- [3349] <211> 25
- [3350] <212> DNA
- [3351] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [3352] <220>

- [3353] <223> 合成的
[3354] <400> 418
[3355] cgcgccgagg cgatccccaa ctccc 25
[3356] <210> 419
[3357] <211> 30
[3358] <212> DNA
[3359] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[3360] <220>
[3361] <223> 合成的
[3362] <400> 419
[3363] cgcgccgagg cgcttctaaa acctcgatcc 30
[3364] <210> 420
[3365] <211> 31
[3366] <212> DNA
[3367] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[3368] <220>
[3369] <223> 合成的
[3370] <400> 420
[3371] cgcgccgagg cgcggtcgtt aatatgtatt c 31
[3372] <210> 421
[3373] <211> 32
[3374] <212> DNA
[3375] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[3376] <220>
[3377] <223> 合成的
[3378] <400> 421
[3379] aggccacgga cgcgtttggc gtagatataa gc 32
[3380] <210> 422
[3381] <211> 32
[3382] <212> DNA
[3383] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[3384] <220>
[3385] <223> 合成的
[3386] <400> 422
[3387] aggccacgga cgcgactac gaaaacaacc tc 32
[3388] <210> 423
[3389] <211> 20
[3390] <212> DNA
[3391] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

- [3392] <220>
[3393] <223> 合成的
[3394] <400> 423
[3395] ggattggtga gattcgggac 20
[3396] <210> 424
[3397] <211> 21
[3398] <212> DNA
[3399] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[3400] <220>
[3401] <223> 合成的
[3402] <400> 424
[3403] cccgaaacca aaaaacaacg a 21
[3404] <210> 425
[3405] <211> 21
[3406] <212> DNA
[3407] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[3408] <220>
[3409] <223> 合成的
[3410] <400> 425
[3411] gagtagggtt attttcgcg g 21
[3412] <210> 426
[3413] <211> 29
[3414] <212> DNA
[3415] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[3416] <220>
[3417] <223> 合成的
[3418] <400> 426
[3419] ctactttttt cccgacaaaa taaaaacgt 29
[3420] <210> 427
[3421] <211> 25
[3422] <212> DNA
[3423] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[3424] <220>
[3425] <223> 合成的
[3426] <400> 427
[3427] cgcgatagcg ttttttattg tcgcg 25
[3428] <210> 428
[3429] <211> 21
[3430] <212> DNA

- [3431] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[3432] <220>
[3433] <223> 合成的
[3434] <400> 428
[3435] cgcacgaccg taaaatactc g 21
[3436] <210> 429
[3437] <211> 20
[3438] <212> DNA
[3439] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[3440] <220>
[3441] <223> 合成的
[3442] <400> 429
[3443] cggttcgttg cgtttatcga 20
[3444] <210> 430
[3445] <211> 20
[3446] <212> DNA
[3447] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[3448] <220>
[3449] <223> 合成的
[3450] <400> 430
[3451] cccccgaact actctacgcg 20
[3452] <210> 431
[3453] <211> 21
[3454] <212> DNA
[3455] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[3456] <220>
[3457] <223> 合成的
[3458] <400> 431
[3459] gattaaatag tcggggtcgc g 21
[3460] <210> 432
[3461] <211> 19
[3462] <212> DNA
[3463] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[3464] <220>
[3465] <223> 合成的
[3466] <400> 432
[3467] attctccaac gcccaaccac 19
[3468] <210> 433
[3469] <211> 21

- [3470] <212> DNA
[3471] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[3472] <220>
[3473] <223> 合成的
[3474] <400> 433
[3475] gtacggttat tggttgagcg g 21
[3476] <210> 434
[3477] <211> 19
[3478] <212> DNA
[3479] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[3480] <220>
[3481] <223> 合成的
[3482] <400> 434
[3483] ccgaatcctc ctccaaacg 19
[3484] <210> 435
[3485] <400> 435
[3486] 000
[3487] <210> 436
[3488] <400> 436
[3489] 000
[3490] <210> 437
[3491] <211> 20
[3492] <212> DNA
[3493] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[3494] <220>
[3495] <223> 合成的
[3496] <400> 437
[3497] gggattttta gcggaagcga 20
[3498] <210> 438
[3499] <211> 23
[3500] <212> DNA
[3501] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[3502] <220>
[3503] <223> 合成的
[3504] <400> 438
[3505] cgacgaacta tccgactatc act 23
[3506] <210> 439
[3507] <211> 21
[3508] <212> DNA

- [3509] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[3510] <220>
[3511] <223> 合成的
[3512] <400> 439
[3513] ggtaggggt ggagttcgtt a 21
[3514] <210> 440
[3515] <211> 24
[3516] <212> DNA
[3517] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[3518] <220>
[3519] <223> 合成的
[3520] <400> 440
[3521] actccgaact ctactcatcc ttcc 24
[3522] <210> 441
[3523] <211> 22
[3524] <212> DNA
[3525] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[3526] <220>
[3527] <223> 合成的
[3528] <400> 441
[3529] tcggcggttt ttagtaaaag cg 22
[3530] <210> 442
[3531] <211> 19
[3532] <212> DNA
[3533] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[3534] <220>
[3535] <223> 合成的
[3536] <400> 442
[3537] aaatctcccg tcccactcc 19
[3538] <210> 443
[3539] <211> 25
[3540] <212> DNA
[3541] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[3542] <220>
[3543] <223> 合成的
[3544] <400> 443
[3545] ggttgtagt cgtttttacg ttttc 25
[3546] <210> 444
[3547] <211> 30

- [3548] <212> DNA
[3549] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[3550] <220>
[3551] <223> 合成的
[3552] <400> 444
[3553] caaaacccat ctaattacaa aatacctcga 30
[3554] <210> 445
[3555] <211> 19
[3556] <212> DNA
[3557] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[3558] <220>
[3559] <223> 合成的
[3560] <400> 445
[3561] tggagttatc ggaaggcga 19
[3562] <210> 446
[3563] <211> 18
[3564] <212> DNA
[3565] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[3566] <220>
[3567] <223> 合成的
[3568] <400> 446
[3569] cgaactcccg aaacgacg 18
[3570] <210> 447
[3571] <211> 26
[3572] <212> DNA
[3573] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[3574] <220>
[3575] <223> 合成的
[3576] <400> 447
[3577] ttttcggtga ttttattcga gtcgtc 26
[3578] <210> 448
[3579] <211> 22
[3580] <212> DNA
[3581] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[3582] <220>
[3583] <223> 合成的
[3584] <400> 448
[3585] gaaccctctt caataaacc gc 22
[3586] <210> 449

- [3587] <211> 28
[3588] <212> DNA
[3589] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[3590] <220>
[3591] <223> 合成的
[3592] <400> 449
[3593] gattatattc ggattttggt t atcgcgt 28
[3594] <210> 450
[3595] <211> 18
[3596] <212> DNA
[3597] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[3598] <220>
[3599] <223> 合成的
[3600] <400> 450
[3601] gactcttctt acccgca 18
[3602] <210> 451
[3603] <211> 30
[3604] <212> DNA
[3605] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[3606] <220>
[3607] <223> 合成的
[3608] <400> 451
[3609] aggccacgga cgcgtattgg cgcgatttag 30
[3610] <210> 452
[3611] <211> 29
[3612] <212> DNA
[3613] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[3614] <220>
[3615] <223> 合成的
[3616] <400> 452
[3617] cgcgccgagg gcggttttag cgatgaatc 29
[3618] <210> 453
[3619] <211> 30
[3620] <212> DNA
[3621] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[3622] <220>
[3623] <223> 合成的
[3624] <400> 453
[3625] aggccacgga cgttcgaaat cgaaacgctc 30

- [3626] <210> 454
[3627] <211> 30
[3628] <212> DNA
[3629] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[3630] <220>
[3631] <223> 合成的
[3632] <400> 454
[3633] cgcgccgagg gctaacgcga ataaaacacg 30
[3634] <210> 455
[3635] <211> 32
[3636] <212> DNA
[3637] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[3638] <220>
[3639] <223> 合成的
[3640] <400> 455
[3641] aggccacgga cgcgaaactac gaaaacaacc tc 32
[3642] <210> 456
[3643] <211> 30
[3644] <212> DNA
[3645] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[3646] <220>
[3647] <223> 合成的
[3648] <400> 456
[3649] aggccacgga cggatcccgc aaatcaacac 30
[3650] <210> 457
[3651] <400> 457
[3652] 000
[3653] <210> 458
[3654] <211> 27
[3655] <212> DNA
[3656] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[3657] <220>
[3658] <223> 合成的
[3659] <400> 458
[3660] cgcgccgagg tcgttctctcg atttctgc 27
[3661] <210> 459
[3662] <211> 31
[3663] <212> DNA
[3664] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

- [3665] <220>
[3666] <223> 合成的
[3667] <400> 459
[3668] cgcgccgagg cgtaactcca tctcgataac c 31
[3669] <210> 460
[3670] <211> 36
[3671] <212> DNA
[3672] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[3673] <220>
[3674] <223> 合成的
[3675] <400> 460
[3676] cgcgccgagg cgcgaaataa acctataatt aactca 36
[3677] <210> 461
[3678] <211> 28
[3679] <212> DNA
[3680] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[3681] <220>
[3682] <223> 合成的
[3683] <400> 461
[3684] aggccacgga cgcgcgttgg aagtttcg 28
[3685] <210> 462
[3686] <211> 26
[3687] <212> DNA
[3688] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[3689] <220>
[3690] <223> 合成的
[3691] <400> 462
[3692] cgcgccgagg gcgcgaaacac aaaacg 26
[3693] <210> 463
[3694] <211> 32
[3695] <212> DNA
[3696] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[3697] <220>
[3698] <223> 合成的
[3699] <400> 463
[3700] aggccacgga cgcgtttggc gtagatataa gc 32
[3701] <210> 464
[3702] <211> 29
[3703] <212> DNA

-
- [3704] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[3705] <220>
[3706] <223> 合成的
[3707] <400> 464
[3708] cgcgccgagg ttttcgtttt cggtttcgg 29