(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国 际 局

(43) 国际公布日
2024 年 2 月 15 日 (15.02.2024)

WIPO | PCT

(10) 国际公布号
WO 2024/031860 A1

(51) 国际专利分类号:
C12Q 1/6886 (2018.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2022/132111

(22) 国际申请日: 2022 年 11 月 16 日 (16.11.2022)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
202210962887.7 2022年8月11日 (11.08.2022) CN

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

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

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

(81) 指定国(除另有指明，要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

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

(54) **Title:** MULTI-GENE DNA METHYLATION CO-DETECTION KIT FOR COLORECTAL CANCER DIAGNOSIS AND USE THEREOF

(54) 发明名称: 一种用于结直肠癌诊断的多基因DNA甲基化联合检测试剂盒及应用

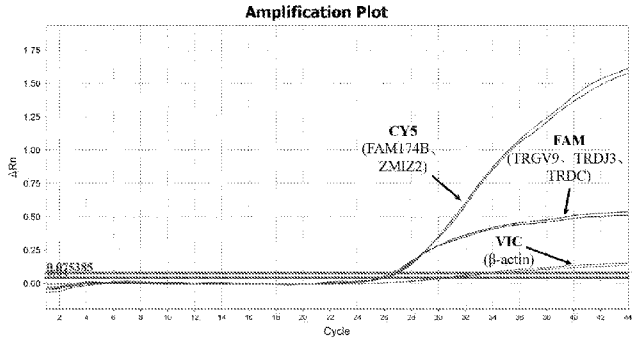


图 1

(57) **Abstract:** Provided are a multi-gene methylation co-detection kit for colorectal cancer based on fluorescent quantitative PCR technology and clinical use thereof. By means of the co-detection of the methylation levels in TRGV9, TRDJ3, TRDC, FAM174B, and ZMIZ2 genes in peripheral blood mononuclear cells, the development of colorectal cancer can be effectively determined.

(57) 摘要: 提供了基于荧光定量PCR技术的结直肠癌多基因甲基化联合检测试剂盒及其临床应用。通过联合检测外周血单个核细胞中TRGV9、TRDJ3、TRDC、FAM174B、ZMIZ2基因甲基化水平，能够有效判断结直肠癌的发生情况。

[见续页]

WO 2024/031860 A1

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

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

一种用于结直肠癌诊断的多基因 DNA 甲基化联合检测试剂盒及应用

技术领域

本发明属于基因工程技术技术领域，涉及一种基于结直肠癌 TRGV9、TRDJ3、TRDC、FAM174B、ZMIZ2 多基因 DNA 甲基化检测的诊断试剂盒、检测方法及其临床应用。

背景技术

2018 年全球癌症统计数据显示，结直肠癌（CRC）在全球发病率排名第三，死亡率排名第二，估计新发病例约 200 万/年，死亡人数超过 88 万/年。研究人员普遍认为，提高 CRC 的诊断水平是进一步降低 CRC 发病率和死亡率的最有效策略。目前，根据 CRC 筛查指南，结肠镜检查和粪便免疫化学试验（FIT）已被推荐为 CRC 筛查的一线选择。然而，结肠镜检查的是侵入性操作、肠道准备繁琐、并发症较难避免且费用昂贵，患者依从性较差。FIT 是一种非侵入性测试，可以提高参与率，但检测的敏感性较低。定期检测癌胚抗原 (CEA) 能够为 CRC 提供可靠的指征，特异性和敏感性仍不满足临床需求。因此，仍然亟需开发一种基于血液的用于 CRC 诊断的无创、准确的检测方法。

越来越多的证据表明，在表观遗传改变中，DNA 甲基化的异常改变被认为是包括 CRC 在内的许多癌症类型发生和发展过程中的最主要现象，并且它们可以在早期肿瘤中癌症患者非侵入性基质中（如血清、血浆或外周血单个核细胞(PBMC)被检测到。而 PBMC 可从常规采集的血液中轻松获取，且能够提供与癌症进展相关的潜在生物分子（如 DNA、RNA 和蛋白质等），从而识别肿瘤的存在。学者能够从 PBMCs 基因表达模式中进一步检测到这种信号，使得差异 DNA 甲基化位点的检测可作为癌症诊断的标志物也成为一个新的研究方向。

近年来已有文献报道包括 CRC 在内的不同类型癌症中鉴定癌症

特异性 DNA 甲基化生物标志物的研究，但多停留在初期研究阶段，因此，进一步深入探索和开发便捷、特异有效、能够在临床推广应用的甲基化诊断试剂盒具有重要的临床意义。

发明内容

本发明针对早期结直肠癌诊断技术存在的侵入性、价格昂贵、准确性低等技术问题提出一种无创的技术方案，该方案基于 TRGV9、TRDJ3、TRDC、FAM174B、ZMIZ2 多基因 DNA 甲基化水平的结直肠癌诊断试剂盒，该试剂盒具有较高的检测灵敏度和特异度，以期实现准确、快捷的诊断早期结直肠癌。

为了达到上述目的，本发明是采用下述的技术方案实现的：

一种基于外周血单个核细胞DNA的结直肠癌诊断检测的引物和探针，所述检测引物和探针用于检测结直肠癌特异性DNA甲基化标志物，所述结直肠癌特异性标志物包括：TRGV9、TRDJ3、TRDC、FAM174B、ZMIZ2 基因。检测引物用于扩增所述结直肠癌特异性标志物的一段序列。

TRGV9 扩增区域序列：

5’-GAATGAAAGTTTCCTCCTGTATGGCCTCTGTCCTTCTCACACAAGTTGGAAGGCCTTAGCCGTGAACTGAGCCTTCAGTAGAGGTTAGAGACGCTGGGCTGTTTCAGAAGCAAGGCGTAGCGTTTTTTTTTTTTATTTCTTGTTGCTCAGACTGGAGTGCAATGGCACGATCTCGGCTCACCACAACCCCTGCCTCCTGG-3’。

TRDJ3 扩增区域序列：

5’-TCTGGTTTTCTTCTCCTGCAGTGGTGAAATGTAATATGATGATGTGAAGCTCAGGTAGGGGATGTGAAAATTTTCAAATCAAACCCCAAGTCCTTAAAGCTTTGACAGTGAATAATGGCCCTACACAACTGTCATTCTCTTTTGCCTGGCTCTAGCCCAACGATCTTGATTTTTTGGTGATGAGGCAGAGTAATTCACATGGTCTTTATGTTACATTGCACATGATGACTATATACTCCTGAAACTTATATCTGGATCCAGAGTCAGGAGAAATTATAAAACAAAAAT

AAGCAATGCAAAG-3’。

TRDC扩增区域序列：

5’-GAATGAGTATTCACCTAAAGGCAGAAACATGTACCACCTACCTTCAGCAGA
TCCCTTTCCACCCTTTCCAGCAGATCTGGAAGGGATGGCACCCTTCCGGGACCCCAACA
CTGCCATCCTCAGAACCTCTGAGCCAGTTATGCAGTCCTTCTCAGACCCTCGATTCTTT
AAGTGACAGAATGCATAGCATGAGCACCTGCCCTGATCTACCATCCAAGGGCCCATGCA
TTTACAAAAAACCAACTGGTGCAGAGAGATATTCAGCCTGACCTAGATTGTCCAGAGGA
TTGATTAATAAAA-3’

FAM174B扩增区域序列：

5’-TGCCTGTGTTTTGGTTTTTGTTGTTTTTGCCAGATAAAGTAACATTCAGTT
TCCACATATTGGGATATCACTGGGAGACCATTATTCAGCCCACCACACACATCCCCAAA
TCTACCAGGTTAAATGGAGGTAGATTTTTAAGCTTCCCAAGTAGCTGGGACTACAGGCA
TGCACCACTATGTCTGGCTAATTATTTTTATTTTTTATACAGTTGGGGTCTTGCTACAT
TGCCCAGGCTGGTCTTGAACTTCTAGGCTCAAGCAAACCTCCTGCCTCTGCCTTCCAAA
GTGCTGGGATTACCGGTATGAGTCACCACACTGAGCAAGGGAGAAGAATTTTAAGAGTC
CCTATAATAACTCCACACCTCTCTAAAAACCGCACTGCTCGCCCCTCCCCACTCCCACA
GGTTTTGGAGTTTCTGACTCCTGAAAGAGAATGAGTCACAGACAGTTCCCGTCAGAAAA
GACTATGTCCCTCCCACCTCTCATTTAGTTCCCGTTTGTTTAGGATTCAAGTGTCTTGG
GCAGTTAGATAGCTCCCCAGCCTACCCAGTTTCCCTCTTGCCTCCCCTCTACTACCCCC
AGAAATGCTTGTGCAATAT-3’。

ZMIZ2扩增区域序列：

5’-AGAAAGAAAGAGAGAGAAAGGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAG
AAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAATTCTGACACATGCCACAACATGGATGGAAGTGAGGA
CACTGTGCTAACTAAAGTAAGACTGTCACAAAAAGACATATAATGTATGATTCCACTTA
TACGATGTCCTTAGAGTAGTCTAATTTAGAGACGAATAGTGAATGCCAAAGGCTAGGAG
GAGGAAAGAATGGGGAGCTAGTGTTTACTGGGTATGGAGTTTCCATTTGAGAAGATGAA

AAAGTCCTGGAGACGGTTGGTGGTTGCACAAGAATGTGAATGTACTTGGTGCCACAGAA
CTACACTTGGAAACAGTTAAGATGGTAAGTTTTACGTTATGTGTATTTTACCACAATTA
AGAAAAATTAATTATGGGTAGTTGAGAGAATGTGGTCTTCCTCAACTTACGGTAGGAAA
AGTCAAGAATAACTTAAAGGCTGATAATAGCATTTCAAAGATCGAAACTGATCAGAGAG
GCTATTCCATCAGGCTAGACTAGCTCAATAGTGACTTTTTCCAGAAGGAGAACCACTGG
GAAGAGAGAACTGAGCAGT-3’。

TRGV9基因检测引物包括正向引物和反向引物，所述正向引物的核苷酸序列如SEQ ID NO.1所示，所述反向引物的核苷酸序列如SEQ ID NO.2所示。所述探针的核苷酸序列如SEQ ID NO.3所示，所述探针的两端分别标记有荧光报告基团和荧光淬灭基团。

TRDJ3基因检测引物包括正向引物和反向引物，所述正向引物的核苷酸序列如SEQ ID NO.4所示，所述反向引物的核苷酸序列如SEQ ID NO.5所示。所述探针的核苷酸序列如SEQ ID NO.6所示，所述探针的两端分别标记有荧光报告基团和荧光淬灭基团。

TRDC基因检测引物包括正向引物和反向引物，所述正向引物的核苷酸序列如SEQ ID NO.7所示，所述反向引物的核苷酸序列如SEQ ID NO.8所示。所述探针的核苷酸序列如SEQ ID NO.9所示，所述探针的两端分别标记有荧光报告基团和荧光淬灭基团。

FAM174B基因检测引物包括正向引物和反向引物，所述正向引物的核苷酸序列如SEQ ID NO.10所示，所述反向引物的核苷酸序列如SEQ ID NO.11所示。所述探针的核苷酸序列如SEQ ID NO.12所示，所述探针的两端分别标记有荧光报告基团和荧光淬灭基团。

ZMIZ2基因检测引物包括正向引物和反向引物，所述正向引物的核苷酸序列如SEQ ID NO.13所示，所述反向引物的核苷酸序列如SEQ ID NO.14所示。所述探针的核苷酸序列如SEQ ID NO.15所示，所述探针的两端分别标记有荧光报告基团和荧光淬灭基团。

进一步地，所述荧光报告基团/荧光淬灭基团选自 FAM、VIC、HEX、ROX、NED、CY3、CY5 等荧光报告基团/BHQ1、BHQ2、BHQ3、Dabyc1、Tamra 等荧光淬灭基团，且试剂盒中 TRGV9、TRDJ3、TRDC 基因探针上的荧光报告基团和 FAM174B、ZMIZ2 基因探针上的荧光报告基团互不相同。

作为优选，TRGV9、TRDJ3、TRDC 基因 5'端荧光报告基团为 FAM；FAM174B、ZMIZ2 基因 5'端荧光报告基团为 CY5，β-actin5'端荧光报告基团为 VIC，淬灭基团为 BHQ1；

诊断模型如下：

$\triangle CT_1 = CT_{VIC} - CT_{FAM}$，

$\triangle CT_2 = CT_{VIC} - CT_{CY5}$，

Multi-PCR Score=1/[1+exp (10.73266 + 11.57596*$\triangle CT_1$ - 15.31471*$\triangle CT_2$)]。

以 VIC 达到设定阈值表示 DNA 上样量在允许范围内，FAM、CY5 结果可信。根据以上公式对检测结果进行判读，即 Multi-PCR Score 大于 0.5，表明结果阴性；Multi-PCR Score 小于 0.5，表明结果阳性。

若 VIC 荧光通道的 Ct 值>35 或无扩增，ΔCt 为任何结果皆为无效，需要重新提取转化样本后检测。

本发明还提出一种结直肠癌诊断试剂盒，至少包括特异性识别 TRGV9、TRDJ3、TRDC、FAM174B、ZMIZ2 基因的检测试剂。

需要说明的是，所述结直肠癌检测试剂并不限定为液体形式。

所述试剂盒还包括 β-actin 基因的 PCR 扩增特异性引物和探针，所述 β-actin 基因检测引物包括正向引物和反向引物，所述正向引物的核苷酸序列如 SEQ ID NO.16 所示，所述反向引物的核苷酸序列如 SEQ ID NO.17 所示。所述探针的核苷酸序列如 SEQ ID NO.18 所示，所述探针的两端分别标记有荧光报告基团和荧光淬灭基团。

所述荧光报告基团/荧光淬灭基团选自 FAM、VIC、HEX、ROX、NED、CY3、CY5 等荧光报告基团/BHQ1、BHQ2、BHQ3、Dabycl、Tamra 等荧光淬灭基团，且试剂盒中 TRGV9、TRDJ3、TRDC 基因探针上的荧光报告基团和 FAM174B、ZMIZ2 基因探针上的荧光报告基团以及 β-actin 基因探针上的荧光报告基团互不相同。

进一步地，所述试剂盒还包括一下组分中的一种或几种：PCR 反应液、引物、探针、ROX、阳性质控品、阴性质控品。所述 PCR 反应液包括热启动 Taq 酶、PCR 缓冲液、$MgCl_2$、dUTP、dNTPs，此类甲基化定量 PCR 常用试剂可经市场途径单独购买或自行配置。

进一步地，所述阳性质控品由 β-actin 基因甲基化的人基因组 DNA 配制而成。

进一步地，所述阴性质控品由 β-actin 基因非甲基化的人基因组 DNA 配制而成。

前述结直肠癌检测试剂盒的使用方法，包括如下步骤：

（1）分离并提取外周血单个核细胞；

（2）提取外周血单个核细胞基因组 DNA；

（3）将所提取单个核细胞基因组 DNA 进行亚硫酸盐转化；

（4）采用前述结直肠癌检测试剂盒中的试剂对亚硫酸盐转化后的待测样本进行甲基化定量 PCR 检测；

（5）对检测结果进行分析。

本发明提供一种结直肠癌诊断方法，包括对样本中高甲基化基因（TRGV9、ZMIZ2、TRDC）及低甲基化基因（FAM174B、TRDJ3）的相对定量，并通过 Multi-PCR Score 判断结直肠癌的发生情况。

作为优选，外周血单个核细胞作为检测样本。

用于特异性识别 TRGV9 基因 DNA 甲基化的 PCR 探针引物预混液包括：0.1-1uM 的探针、0.1-1uM 的正向引物和 0.1-1uM 的反向引物；

用于特异性识别TRDJ3基因DNA甲基化的PCR探针引物预混液包括：0.1-1uM的探针、0.1-1uM的正向引物和0.1-1uM的反向引物；

用于特异性识别TRDC基因DNA甲基化的PCR探针引物预混液包括：0.1-1uM的探针、0.1-1uM的正向引物和0.1-1uM的反向引物；

用于特异性识别FAM174B基因DNA甲基化的PCR探针引物预混液包括：0.1-1uM的探针、0.1-1uM的正向引物和0.1-1uM的反向引物；

用于特异性识别ZMIZ2基因DNA甲基化的PCR探针引物预混液包括：0.1-1uM的探针、0.1-1uM的正向引物和0.1-1uM的反向引物。

与现有技术相比，本发明的优点和积极效果在于：

1.本发明所提供的检测试剂盒，检测标本类型为外周血，样本较易获得、无创，且患者依从性较好。

2.本发明所提供的检测试剂盒针对TRGV9、TRDJ3、TRDC、FAM174B、ZMIZ2基因设计特异性引物和探针，并选用β-actin作为内参基因，保证检测结果的灵敏度高、特异性好，所提供的检测试剂盒包含阴性质控品和阳性质控品，能够较大程度防止假阴性结果和假阳性结果的产生，在结直肠癌外周血PBMC甲基化的体外诊断领域具有较为广阔的应用前景。

3.与焦磷酸测序等技术相比，本发明所提供的检测试剂盒操作简便，大大降低检测成本，提高检测效率。PCR荧光检测是全封闭式操作，无需进行电泳、杂交等操作，能够有效防止污染。

4.本发明所提供的检测试剂盒适用于多种荧光定量PCR仪，能够在临床推广应用。

5.肿瘤早期进展过程中多存在甲基化的异常改变，利用本发明所提供的甲基化检测方法可实现结直肠癌的早期诊断，有效提高结直肠癌患者的五年生存率。

附图说明

图 1 为实施例 1 中 TRGV9、TRDJ3、TRDC 基因，FAM174B、ZMIZ2 基因以及 β-actin 基因荧光定量检测结果示意图：其中，纵坐标表示荧光强度，横坐标表示荧光定量 PCR 扩增的循环数，FAM 表示受试标本中 TRGV9、TRDJ3、TRDC 三个基因多重甲基化检测结果，CY5 表示受试标本中 FAM174B、TRDJ3 两个基因多重甲基化检测结果，VIC 表示受试标本中 β-actin 基因检测结果，

图 2 为实施例 2 中 TRGV9、TRDJ3、TRDC、FAM174B、ZMIZ2 基因联合诊断结直肠癌的 ROC 曲线。

图 3 为实施例 2 中 TRGV9、TRDJ3、TRDC、FAM174B、ZMIZ2 基因联合诊断早期结直肠癌的 ROC 曲线。

具体实施方式

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

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

实施例 1

1.试剂盒的制备及其使用方法

试剂盒包括以下组分：

PCR 反应液、引物、探针、ROX、阳性质控品、阴性质控品。

（1）PCR 反应液包括热启动 Taq 酶、PCR 缓冲液、$MgCl_2$、dUTP、dNTPs；

（2）引物包括甲基化基因 TRGV9、TRDJ3、TRDC、FAM174B、ZMIZ2 及内参基因 β-actin 的正向引物和反向引物；

（3）探针包括甲基化基因 TRGV9、TRDJ3、TRDC、FAM174B、ZMIZ2

及内参基因β-actin的检测探针。

本实施例中使用的结直肠癌外周血单个核细胞甲基化基因TRGV9、TRDJ3、TRDC、FAM174B、ZMIZ2以及内参基因β-actin的引物和探针的核苷酸序列可参见表1。

表1引物和探针的核苷酸序列表

检测对象	引物及探针	5'~3'	编号
TRGV9基因	正向引物	TATATAAGTTGGAAGGTTTTAGTCGTG	SEQ ID NO.1
	反向引物	AAAAACGCTACGCCTTACTTCTA	SEQ ID NO.2
	探针	X1-AACCCAACGTCTCTAACCTCTACTAAAAACTC-Y	SEQ ID NO.3
TRDJ3基因	正向引物	TTTTTTGTTTGGTTTTAGTTTAACGAT	SEQ ID NO.4
	反向引物	ATATACAATATAACATAAAAACCATATAAATTACTC	SEQ ID NO.5
	探针	X1-CTCATCACCAAAAATCAAAATCGTTAAACT-Y	SEQ ID NO.6
TRDC基因	正向引物	GGAAGGGATGGTATTTTTTCG	SEQ ID NO.7
	反向引物	CCCTTAAATAATAAATCAAAACAAATACT	SEQ ID NO.8
	探针	X1-CTATACATTCTATCACTTAAAAAATCGAAAATCTAAA-Y	SEQ ID NO.9
FAM174B基因	正向引物	GGTTTTGTTATATTGTTTAGGTTGGTT	SEQ ID NO.10
	反向引物	CCCTTACTCAATATAATAACTCATACCG	SEQ ID NO.11
	探针	X2-TCCCAACACTTTAAAAAACAAAAACAAAAAAT-Y	SEQ ID NO.12
ZMIZ2基因	正向引物	GATGTTTTTAGAGTAGTTTAATTTAGAGACG	SEQ ID NO.13
	反向引物	ACATTCTTATACAACCACCAACCG	SEQ ID NO.14
	探针	X2-TTTCATCTTCTCAAATAAAAACTCCATACCC-Y	SEQ ID NO.15
β-actin	正向引物	ACCACCACCCAACACACAATAACAAACACA	SEQ ID NO.16

	反向引物	TGGTGATGGAGGAGGTTTAGTAAGT	SEQ ID NO.17
	探针	X3- AACCAATAAAACCTACTCCTCCCTTAAA-Y	SEQ ID NO.18

注：X1、X2、X3 为荧光报告基团，Y 为荧光淬灭基团。在本发明的一种优选方式中，X1 为 FAM，X2 为 CY5，X3 为 VIC，Y 为 BHQ1。

（4）阴性质控品：由 β-actin 基因非甲基化的人基因组 DNA 配制而成。

（5）阳性质控品：由 β-actin 基因甲基化的人基因组 DNA 配制而成。

2.实验过程

2.1 外周血单个核细胞的分离

采血前一晚空腹，采血当天使用 EDTA-K2 抗凝管采集受试者外周静脉血 3ml，室温静置 30min 后进行如下操作：取一支 15ml 无菌离心管，加入 3ml 淋巴细胞分离液 Histopaque-1077 (Sigma)；用塑料吸管轻轻混匀外周血后，沿管壁呈 45° 将外周血轻柔、缓慢的加入淋巴细胞分离液上层；将离心管小心置于水平离心机中，室温 450 x g 离心 30 分钟；小心吸取中间云雾状的白膜层细胞，置于另一离心管中，并加入 10 ml 的 PBS，450 x g 离心 10 分钟，以洗掉多余的 Ficoll；弃上清，用 1ml PBS 吹打混匀后加入 10ml 的 PBS，250 x g 离心 10 分钟；重复上述步骤再次洗涤细胞，弃上清后获得细胞沉淀。

2.2 外周血单个核细胞 DNA 提取

按照天根血液/细胞/组织基因组 DNA 提取试剂盒(DP304)标准操作流程：向上述细胞沉淀中加入 200 ul 缓冲液 GA，振荡至彻底悬浮，加入 20 ul Proteinase K 溶液，混匀；加入 200 ul 缓冲液 GB，充分颠倒混匀，70℃放置 10 min；加人 200 ul 无水乙醇，充分振荡混匀 15 sec；将上一步所得溶液和絮状沉淀都加入一个吸附柱 CB3 中（吸

附柱放入收集管中），离心（12,000 rpm，30s），弃废液；向吸附柱CB3中加入500 ul缓冲液GD，离心（12,000 rpm，30s），弃废液；向吸附柱CB3中加入600 ul漂洗液PW，离心（12,000 rpm，30s），弃废液;重复上述操作步骤;将吸附柱CB3放回收集管中,离心(12,000 rpm，2 min），弃废液；CB3置于室温放置数分钟，以彻底晾干吸附材料中残余的漂洗液；将吸附柱CB3转入一个干净的离心管中，向吸附膜的中间部位悬空滴加50-200 ul洗脱缓冲液TE,室温放置2-5 min，离心(12,000 rpm，2 min)，将溶液收集到离心管中。并通过 NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific) 分光光度计测量浓度。

2.3 亚硫酸氢盐转化

按制造商说明书要求使用Zymo Research的要求对上述提取获得的DNA 样品进行亚硫酸氢盐转化。具体操作步骤可参考如下说明：向上述提取好的1000ng DNA样本中加入130μL CT Conversion Reagent（现用现配，操作过程注意避光），涡旋混匀，根据98℃，10min；64℃，2.5h；4℃，∞的反应条件进行转化；向吸附柱中加入600μL M-Binding Buffer，随后加入转化后的样本，混匀，离心（10000rpm，30s),弃废液;向吸附柱中加入100μL M-Wash Buffer,离心(10000rpm，30s），弃废液；向吸附柱中加入200μL M-DesμLphonation Buffer，室温静置20min，离心（10000rpm，1min），弃废液；向吸附柱中加入200μL M-Wash Buffer，离心（10000rpm，1min），弃废液；向吸附柱中加入200μL M-Wash Buffer，离心（10000rpm，1min），弃废液；将吸附柱转移至新的收集管中，，加入20μL M-Elution Buffer,室温静置5min，离心（10000rpm，1min），获得亚硫酸盐转化后的DNA样本。

样本处理后应尽快进行检测，-20℃保存时间一般不超过4个月，如需更长时间的保存请将样本置于-70℃，避免反复冻融。

2.4 PCR 反应的体系和反应条件

所述 PCR 扩增反应体系的终浓度组成为：1xPCR 反应液；0.1-1uM TRGV9 基因甲基化引物、0.1-1uM TRDJ3 基因甲基化引物、0.1-1uM TRDC 基因甲基化引物、0.1-1uM FAM174B 基因甲基化引物、0.1-1uM ZMIZ2 基因甲基化引物、0.1-1uM β-actin 引物；0.1-1uM TRGV9 Taqman 水解探针、0.1-1uM TRDJ3 Taqman 水解探针、0.1-1uM TRDC Taqman 水解探针、0.1-1uM FAM174B Taqman 水解探针、0.1-1uM ZMIZ2 Taqman 水解探针、0.1-1uM β-actin Taqman 水解探针；ROX Low Reference Dye（50X）。

2.4.1 试剂准备

按照表 2 中提供的试剂配制待用。

表 2 反应液配置（样本检测/阴性质控/阳性质控）

反应液组分	体积
PCR 反应液	5μL
TRGV9 基因甲基化前向引物	0.25μL
TRGV9 基因甲基化后向引物	0.25μL
TRGV9 基因水解探针	0.1μL
TRDJ3 基因甲基化前向引物	0.25μL
TRDJ3 基因甲基化后向引物	0.25μL
TRDJ3 基因水解探针	0.1μL
TRDC 基因甲基化前向引物	0.25μL
TRDC 基因甲基化后向引物	0.25μL
TRDC 基因水解探针	0.1μL
FAM174B 基因甲基化前向引物	0.25μL
FAM174B 基因甲基化后向引物	0.25μL
FAM174B 基因水解探针	0.1μL

ZMIZ2 基因甲基化前向引物	0.25μL
ZMIZ2 基因甲基化后向引物	0.25μL
ZMIZ2 基因水解探针	0.1μL
β-actin 前向引物	0.06μL
β-actin 后向引物	0.06μL
β-actin Taqman 水解探针	0.05μL
ROX Low Reference Dye（50X）	0.02μL
无菌无酶水	补足体积至 9μL

2.4.2 加样

向 PCR 扩增管中加入 1μL 待测核酸样品/阴性质控品/阳性质控品/无模板对照，终体积为 10μL/管，盖紧管盖，瞬时低速离心，等待上机。

注：待测样本、阴性质控品、阳性质控品、无模板对照均设置三个复孔进行检测。

2.4.3 PCR 扩增

PCR 扩增的程序如表 3 所示。

表 3 荧光通道选择及扩增循环参数设定

步骤		温度	时间	循环数
1	预变性	95 ℃	3min	1
2	变性	95 ℃	3 s	45
	退火、延伸及荧光采集	58 ℃	30 s	
步骤 2 中 58℃时荧光检测，检测通道为 FAM（TRGV9、TRDJ3、TRDC 基因）、CY5（FAM174B、ZMIZ2 基因）、VIC（β-actin 基因）。				

注：选 ROX 校正，淬灭基团选 None.

设置完毕，保存文件，运行反应程序。

2.4.4 PCR 结果分析

反应结束后自动保存结果,使用仪器配套软件自动分析结果,

首先进行无模板对照的扩增曲线分析，FAM、CY5、VIC通道无明显扩增信号，表明实验无污染，可以继续分析。

阴性质控品应无明显扩增曲线变化或Ct值应≥35,阳性质控品的Ct值应≤10。质控品满足上述条件时，表明实验有效，可继续分析。

2.4.5 检测结果判读

以VIC达到设定阈值（即CT值<35),表示DNA上样量在允许范围内，FAM、CY5结果可信。根据如下公式对检测结果进行判读，即Multi-PCR Score大于0.5,表明结果阴性;Multi-PCR Score小于0.5,表明结果阳性。

$\triangle CT_1 = CT_{VIC} - CT_{FAM}$,

$\triangle CT_2 = CT_{VIC} - CT_{CY5}$

Multi-PCR Score=1/[1+exp (10.73266 + 11.57596* $\triangle CT_1$ - 15.31471*$\triangle CT_2$)]。

3.准确性检验

本实施例提供试剂盒的检测准确性的检验，通过实施例1提供的试剂盒和实验方法对94例临床样本进行实验检测,检测结果如表4所示。

表4 94例临床样本检测结果

样本编号	受试者状态	Multi-PCR Score	样本编号	受试者状态	Multi-PCR Score
1	早期CRC	1.57E-05	47	健康	0.883289
2	早期CRC	2.78E-06	48	健康	0.944356
3	早期CRC	2.47E-05	49	健康	0.991225
4	早期CRC	0.333299	50	健康	0.99614
5	早期CRC	0.002425	51	健康	0.630866
6	早期CRC	0.031267	52	健康	0.977301

7	早期 CRC	2.52E-05	53	健康	0.994035
8	早期 CRC	6.54E-08	54	健康	0.995521
9	早期 CRC	2.8E-07	55	健康	0.869957
10	早期 CRC	0.257228	56	健康	0.954061
11	早期 CRC	5.72E-06	57	健康	0.852082
12	早期 CRC	1.62E-06	58	健康	0.964646
13	早期 CRC	0.00037	59	健康	0.995652
14	早期 CRC	1.42E-08	60	健康	0.733168
15	早期 CRC	0.003364	61	健康	0.961455
16	早期 CRC	6.08E-07	62	健康	0.801524
17	早期 CRC	1.16E-12	63	健康	0.897845
18	早期 CRC	1.11E-10	64	健康	0.986917
19	早期 CRC	0.003135	65	健康	0.850187
20	早期 CRC	1.68E-05	66	健康	0.826404
21	早期 CRC	4.97E-16	67	健康	0.953235
22	早期 CRC	8.19E-06	68	健康	0.950319
23	早期 CRC	0.003578	69	健康	0.998647
24	早期 CRC	0.799237	70	健康	0.982045
25	早期 CRC	0.001224	71	健康	0.952225
26	早期 CRC	0.117156	72	健康	0.985387
27	早期 CRC	0.53579	73	健康	0.519007
28	早期 CRC	0.001505	74	健康	0.997321
29	晚期 CRC	0.060163	75	健康	0.982241
30	晚期 CRC	0.17261	76	健康	0.98467
31	晚期 CRC	7.12E-07	77	健康	0.981373
32	晚期 CRC	0.001327	78	健康	0.858559
33	晚期 CRC	0.000112	79	健康	0.939661
34	晚期 CRC	0.000702	80	健康	0.999825
35	晚期 CRC	2.12E-06	81	健康	0.977466
36	晚期 CRC	0.000298	82	健康	0.953732

37	晚期 CRC	4.14E-10	83	健康	0.991322
38	晚期 CRC	2.82E-08	84	健康	0.937942
39	晚期 CRC	7.06E-06	85	健康	0.468585
40	晚期 CRC	0.017178	86	健康	0.9203
41	晚期 CRC	6.4E-06	87	健康	0.8933
42	晚期 CRC	0.95592	88	健康	0.997361
43	晚期 CRC	4.18E-08	89	健康	0.71753
44	晚期 CRC	0.039078	90	健康	0.793678
45	晚期 CRC	1.6E-06	91	健康	0.974115
46	晚期 CRC	0.975911	92	健康	0.947603
			93	健康	0.940712
			94	健康	0.982241

将检测的 94 例临床样本与结直肠癌检测金标准方法（结直肠镜联合病理检测）的检测结果进行对比分析，病理诊断正常的样本 48 例，结直肠癌样本 46 例。采用实施例 1 提供的实施方法进行检测，具体比较结果见表 5。

表 5 结直肠癌甲基化检测技术对结直肠癌患者及健康对照者样本的检测结果对比

		受试者状态		
		健康	结直肠癌患者	早期结直肠癌患者
Multi-PCR Score	阴性	47	4	2
	阳性	1	42	26
病理结果	合计	48	46	28
	符合率	97.91%	91.30%	92.86%

4. 健康对照者与结直肠癌患者的受试者工作特征曲线

本实施例提供健康对照者与结直肠癌患者的受试者工作特征曲线（ROC 曲线）。通过实施例 1 提供的试剂盒和实验方法对健康对照者和结直肠癌患者进行实验检测。结果如图 2 所示，本实验例提供结直

肠癌 DNA 甲基化检测技术可以明显区分健康对照者和结直肠癌患者，曲线下面积（AUC）为 0.971。

5. 健康对照者与早期结直肠癌患者的受试者工作特征曲线

通过实施例 1 提供的试剂盒和实验方法对健康对照者和早期结直肠癌患者进行实验检测。

如图 3 所示，本实验例提供结直肠癌 DNA 甲基化检测技术可以明显区分健康对照者和早期结直肠癌患者，曲线下面积（AUC）为 0.994。

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

权 利 要 求 书

1. 外周血单个核细胞中 TRGV9、TRDJ3、TRDC、FAM174B、ZMIZ2 基因在制备结直肠癌诊断试剂盒中的应用。

2. 一种用于结直肠癌诊断的多基因 DNA 甲基化联合检测试剂盒，其特征在于，所述试剂盒包括用于检测 TRGV9、TRDJ3、TRDC、FAM174B、ZMIZ2 基因甲基化的引物对和基因特异的水解探针，

所述 TRGV9 基因检测正向引物的核苷酸序列如 SEQ ID NO.1 所示，反向引物的核苷酸序列如 SEQ ID NO.2 所示，探针的核苷酸序列如 SEQ ID NO.3 所示；

TRDJ3 基因检测正向引物的核苷酸序列如 SEQ ID NO.4 所示，反向引物的核苷酸序列如 SEQ ID NO.5 所示，探针的核苷酸序列如 SEQ ID NO.6 所示；

TRDC 基因检测正向引物的核苷酸序列如 SEQ ID NO.7 所示，反向引物的核苷酸序列如 SEQ ID NO.8 所示；探针的核苷酸序列如 SEQ ID NO.9 所示；

FAM174B 基因检测正向引物的核苷酸序列如 SEQ ID NO.10 所示，反向引物的核苷酸序列如 SEQ ID NO.11 所示，探针的核苷酸序列如 SEQ ID NO.12 所示；

ZMIZ2 基因检测正向引物的核苷酸序列如 SEQ ID NO.13 所示，反向引物的核苷酸序列如 SEQ ID NO.14 所示；探针的核苷酸序列如 SEQ ID NO.15 所示。

3. 根据权利要求 2 所述用于结直肠癌诊断的多基因 DNA 甲基化联合检测试剂盒，其特征在于，所述试剂盒还包括 β-actin 基因的 PCR 扩增特异性引物和探针，所述 β-actin 基因检测正向引物的核苷酸序列如 SEQ ID NO.16 所示，反向引物的核苷酸序列如 SEQ ID NO.17 所示，探针的核苷酸序列如 SEQ ID NO.18 所示。

4. 根据权利要求 2 所述用于结直肠癌诊断的多基因 DNA 甲基化联合检测试剂盒，其特征在于，所述特异性识别 TRGV9、TRDJ3、TRDC、FAM174B、ZMIZ2 基因甲基化的探针 5’端标记有荧光报告基团，3’端标记有荧光淬灭基团；TRGV9、TRDJ3、TRDC 基因探针 5’端的荧光报告基团为 FAM，FAM174B、ZMIZ2 基因探针 5’端的荧光报告基团为 CY5，β-actin 基因探针 5’端的荧光报告基团为 VIC，TRGV9、TRDJ3、TRDC、FAM174B、ZMIZ2 及 β-actin 基因 3’端荧光淬灭基团均为 BHQ1。

5. 根据权利要求 2 所述用于结直肠癌诊断的多基因 DNA 甲基化联合检测试剂盒，其特征在于，

试剂盒中的阴性质控品由 β-actin 基因非甲基化的人基因组 DNA 配制而成；阳性质控品由 β-actin 基因甲基化的人基因组 DNA 配制而成；阴性质控品无明显扩增曲线变化或 Ct 值≥35，阳性质控品的 Ct 值≤10，为有效实验；

还包括一个诊断模型，诊断模型公式如下：

$\triangle CT_1 = CT_{VIC} - CT_{FAM}$，

$\triangle CT_2 = CT_{VIC} - CT_{CY5}$，

$Multi\text{-}PCR\ Score = 1/[1+\exp(10.73266+11.57596*\triangle CT_1 - 15.31471*\triangle CT_2)]$；

Multi-PCR Score 大于 0.5，结果为阴性；

Multi-PCR Score 小于 0.5，结果为阳性；

若 VIC 荧光通道的 Ct 值>35 或无扩增，ΔCt 为任何结果皆为无效，需要重新提取转化样本后检测。

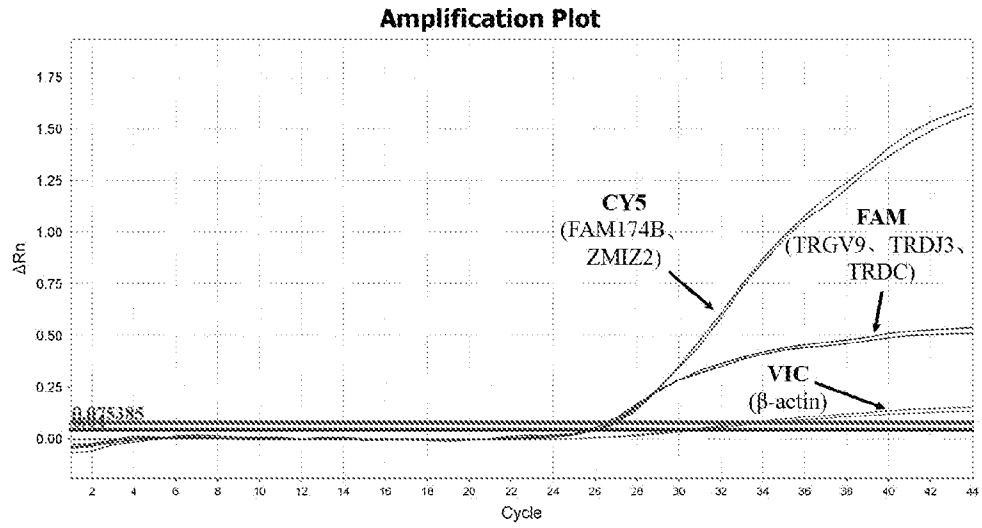

Amplification Plot
ΔRn
Cycle
CY5
(FAM174B、
ZMIZ2)
FAM
(TRGV9、TRDJ3、
TRDC)
VIC
(β-actin)
0.075385

图 1

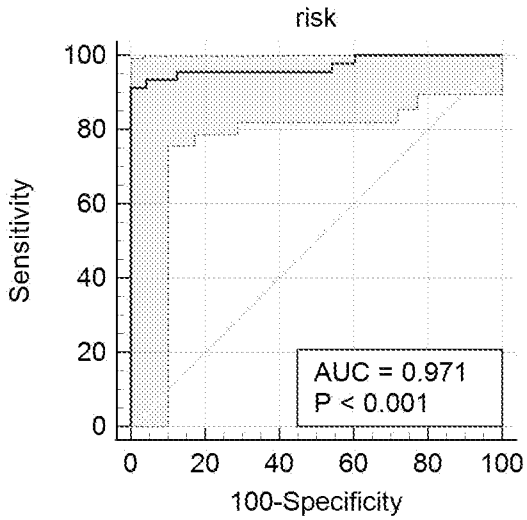

risk
Sensitivity
100-Specificity
AUC = 0.971
P < 0.001

图 2

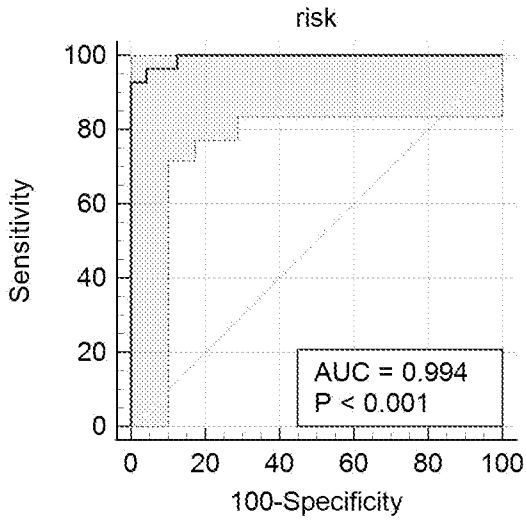

risk
Sensitivity
100
80
60
40
20
0
0
20
40
60
80
100
100-Specificity
AUC = 0.994
P < 0.001

图 3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2022/132111

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12Q 1/6886(2018.01)i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12Q

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

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

CNMED, CNABS, DWPI, WPABS, WPABSC, CJFD, AUABS, TWMED, ILABS, HKABS, MOABS, CNTXT, ENTXT, ENTXTC, WOTXT, USTXT, VCN, VEN, GBTXT, EPTXT, CATXT, CNKI, PubMed, EMBL, Web of Science, GoogleScholar: 结直肠癌, colorectal cancer, 腺癌, adenocarcinoma, TRGV9, TRDJ3, TRDC, FAM174B, ZMIZ2, 外周血单个核细胞, PCR, DNA, 甲基化, methylation; PBMC 中国专利生物序列检索系统, PBMC China Patents Biological Sequence Search System, NCBI, EMBL, STN: 基于SEQ ID NO: 1-15的序列检索, sequence search based on SEQ ID NOs: 1-15

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 109402255 A (WU SHIXIU) 01 March 2019 (2019-03-01) description, paragraphs 8-16	1-5
A	WO 2015172249 A1 (VASTCON) 19 November 2015 (2015-11-19) abstract	1-5
A	CN 111118159 A (THE ACADEMY OF MILITARY MEDICAL SCIENCES OF THE PLA ACADEMY OF MILITARY SCIENCE) 08 May 2020 (2020-05-08) claims 1-7	1-5
A	CN 109975547 A (SUN YAT-SEN UNIVERSITY; THE SIXTH AFFILIATED HOSPITAL, SUN YAT-SEN UNIVERSITY) 05 July 2019 (2019-07-05) description, paragraphs 8-17	1-5
A	US 2010068731 A1 (UNIVERSITY OF SASKATCHEWAN) 18 March 2010 (2010-03-18) abstract	1-5

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☑ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"D" document cited by the applicant in the international application
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
17 April 2023	**28 April 2023**

Name and mailing address of the ISA/CN	Authorized officer
China National Intellectual Property Administration (ISA/CN) **China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088**	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2022/132111

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

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
   a. ☑ forming part of the international application as filed.
   b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13*ter*.1(a)),
      ☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.

2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2022/132111

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	109402255	A	01 March 2019	None			
WO	2015172249	A1	19 November 2015	ES	2709056	T3	15 April 2019
				EP	3143406	A1	22 March 2017
				EP	3143406	A4	20 September 2017
				EP	3143406	B1	31 October 2018
				CA	2948548	A1	19 November 2015
				CA	2948548	C	28 June 2022
				US	2017242013	A1	24 August 2017
				US	11506663	B2	22 November 2022
CN	111118159	A	08 May 2020	None			
CN	109975547	A	05 July 2019	None			
US	2010068731	A1	18 March 2010	EP	1937831	A1	02 July 2008
				EP	1937831	A4	18 March 2009
				EP	1937831	B1	01 August 2012
				CA	2623653	A1	05 April 2007
				CA	2623653	C	28 August 2012
				AU	2006297033	A1	05 April 2007
				AU	2006297033	B2	08 September 2011
				WO	2007036025	A1	05 April 2007
				US	7892758	B2	22 February 2011
				ES	2394925	T3	06 February 2013

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2022/132111

A. 主题的分类

C12Q 1/6886(2018.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

C12Q

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称，和使用的检索词（如使用））

CNMED, CNABS, DWPI, WPABS, WPABSC, CJFD, AUABS, TWMED, ILABS, HKABS, MOABS, CNTXT, ENTXT, ENTXTC, WOTXT, USTXT, VCN, VEN, GBTXT, EPTXT, CATXT, CNKI, PubMed, EMBL, Web of Science, GoogleScholar:结直肠癌, colorectal cancer, 腺癌, adenocarcinoma, TRGV9, TRDJ3, TRDC, FAM174B, ZMIZ2, 外周血单个核细胞, PCR, DNA, 甲基化, methylation, PBMC 中国专利生物序列检索系统, NCBI, EMBL, STN: 基于SEQ ID NO: 1-15的序列检索

C. 相关文件

类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
A	CN 109402255 A (吴式琇) 2019年3月1日 (2019-03-01) 说明书第8-16段	1-5
A	WO 2015172249 A1 (VASTCON) 2015年11月19日 (2015-11-19) 摘要	1-5
A	CN 111118159 A (中国人民解放军军事科学院军事医学研究院) 2020年5月8日 (2020-05-08) 权利要求1-7	1-5
A	CN 109975547 A (中山大学 中山大学附属第六医院) 2019年7月5日 (2019-07-05) 说明书第8-17段	1-5
A	US 2010068731 A1 (UNIV SASKATCHEWAN) 2010年3月18日 (2010-03-18) 摘要	1-5

☐ 其余文件在C栏的续页中列出。

☑ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型：

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“D” 申请人在国际申请中引证的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

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

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

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

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

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

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期	国际检索报告邮寄日期
2023年4月17日	2023年4月28日
ISA/CN的名称和邮寄地址 中国国家知识产权局 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088	受权官员 张艳霞 电话号码 (+86) 010-62089438

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2022/132111

第I栏　核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1.c项)

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

a. ☑ 作为国际申请的一部分提交的：

b. ☐ 为国际检索的目的在国际申请日之后提交（细则13之三.1(a)），

☐ 附有说明序列表不超出所提交国际申请公开范围的声明。

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

3. 补充意见：

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2022/132111

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	109402255	A	2019年3月1日	无			
WO	2015172249	A1	2015年11月19日	ES	2709056	T3	2019年4月15日
				EP	3143406	A1	2017年3月22日
				EP	3143406	A4	2017年9月20日
				EP	3143406	B1	2018年10月31日
				CA	2948548	A1	2015年11月19日
				CA	2948548	C	2022年6月28日
				US	2017242013	A1	2017年8月24日
				US	11506663	B2	2022年11月22日
CN	111118159	A	2020年5月8日	无			
CN	109975547	A	2019年7月5日	无			
US	2010068731	A1	2010年3月18日	EP	1937831	A1	2008年7月2日
				EP	1937831	A4	2009年3月18日
				EP	1937831	B1	2012年8月1日
				CA	2623653	A1	2007年4月5日
				CA	2623653	C	2012年8月28日
				AU	2006297033	A1	2007年4月5日
				AU	2006297033	B2	2011年9月8日
				WO	2007036025	A1	2007年4月5日
				US	7892758	B2	2011年2月22日
				ES	2394925	T3	2013年2月6日