(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
2014 年 12 月 4 日 (04.12.2014)

WIPO | PCT

(10) 国际公布号
WO 2014/190927 A1

(51) 国际专利分类号:
C12Q 1/68 (2006.01) *C12N 15/11* (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2014/078833

(22) 国际申请日: 2014 年 5 月 29 日 (29.05.2014)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
201310207796.3 2013 年 5 月 29 日 (29.05.2013) CN

(71) 申请人: **中国科学院上海生命科学研究院 (SHANGHAI INSTITUTES FOR BIOLOGICAL SCIENCES, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES)** [CN/CN]; 中国上海市徐汇区岳阳路 319 号, Shanghai 200031 (CN)。 **上海交通大学医学院附属瑞金医院 (RUIJIN HOSPITAL AFFILIATED TO THE SHANGHAI JIAO TONG UNIVERSITY MEDICAL SCHOOL)** [CN/CN]; 中国上海市黄浦区瑞金二路 197 号, Shanghai 200025 (CN)。 **深圳华大基因研究院 (BGI SHENZHEN)** [CN/CN]; 中国广东省深圳市盐田区北山工业园区综合楼, Guangdong 518083 (CN)。

(72) 发明人: **宁光 (NING, Guang)**; 中国上海市徐汇区岳阳路 319 号, Shanghai 200031 (CN)。 **曹亚南 (CAO, Yanan)**; 中国上海市黄浦区瑞金二路 197 号, Shanghai 200025 (CN)。 **王卫庆 (WANG, Weiqing)**; 中国上海市黄浦区瑞金二路 197 号, Shanghai 200025 (CN)。 **王俊 (WANG, Jun)**; 中国广东省深圳市盐田区北山工业区综合楼, Guangdong 518083 (CN)。 **高志博 (GAO, Zhibo)**; 中国广东省深圳市盐田区北山工业区综合楼, Guangdong 518083 (CN)。 **李林 (LI, Lin)**; 中国广东省深圳市盐田区北山工业区综合楼, Guangdong 518083 (CN)。

(74) 代理人: **上海一平知识产权代理有限公司 (XU & PARTNERS, LLC.)**; 中国上海市普陀区真北路 958 号天地科技广场 1 号楼 106 室, Shanghai 200333 (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, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, 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, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, 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, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, 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, 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)。

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))。

WO 2014/190927 A1

(54) Title: PANCREATIC NEUROENDOCRINE TUMOUR SUSCEPTIBILITY GENE LOCI AND DETECTION METHODS AND KITS

(54) 发明名称 : 胰腺神经内分泌肿瘤易感基因位点及检测方法和试剂盒

(57) Abstract: Disclosed in the invention are a pancreatic neuroendocrine tumour susceptibility gene loci and detection methods and kits. In particular, disclosed in the invention is a pancreatic neuroendocrine tumour susceptibility gene loci based on whole genome sequencing findings, the loci is a high frequency T372R somatic mutation of a YY1 (Yin Yang1) gene. Also disclosed in the invention are methods for the detection of pancreatic neuroendocrine tumour susceptibility and pancreatic neuroendocrine tumour subtype classification, and corresponding detection kits.

(57) 摘要: 本发明公开了一种胰腺神经内分泌肿瘤易感基因位点及检测方法和试剂盒。具体地，本发明公开了基于全基因测序研究发现的胰腺神经内分泌肿瘤易感基因位点，该位点是 YY1（Yin Yang1）基因的高频 T372R 体细胞突变。本发明还公开了一种检测胰腺神经内分泌肿瘤易感性和胰腺神经内分泌肿瘤亚型分类的方法和相应的检测试剂盒。

胰腺神经内分泌肿瘤易感基因位点及检测方法和试剂盒

技术领域

本发明涉及分子生物学和医学领域。更具体地涉及 YY1 基因及其突变位点与胰腺神经内分泌肿瘤的相关性，它们可在胰腺神经内分泌肿瘤中用于分型诊断和作为药物靶标的致病基因位点。本发明还涉及检测这些突变位点的方法和试剂盒。

背景技术

功能性胰腺神经内分泌肿瘤的主要类型为胰岛细胞瘤。胰岛细胞瘤不依赖葡萄糖刺激持续过量分泌胰岛素，可引起严重低血糖等临床症状。

虽然已开展了一些胰腺神经内分泌肿瘤相关基因的遗传学研究，过去几年对胰腺神经内分泌肿瘤的相关风险位点已经有了一些研究发现，但是对于导致散发功能性胰腺神经内分泌肿瘤的遗传背景尚缺乏了解。

近年来，全基因组测序和全外显子测序技术在多基因疾病研究中的广泛运用，为在分子水平上研究胰腺神经内分泌肿瘤的发生和发展的机制开辟了全新的途径。同时，高通量、低成本的突变测序检测技术的不断出现和成熟也为快速对重要疾病相关基因的序列和位点分析提供了可能。

重要疾病易感基因突变位点的存在与否以及在疾病人群中的发生及地域的差异对多基因疾病的诊断、分型、预后半段和治疗方案选择具有重大意义。这些技术和方法是未来实现疾病个体化治疗的基础。

虽然已有一些基因突变和多态性位点与胰腺神经内分泌肿瘤相关性的研究，但没有证实 YY1 基因与功能性胰腺神经内分泌肿瘤相关性的报道，更没有证实本发明所述的 YY1 基因突变位点与胰腺神经内分泌肿瘤相关性的报道。

综上所述，为了尽早诊断、分型和治疗胰腺神经内分泌肿瘤，本领域迫切需要寻找胰腺神经内分泌肿瘤易感基因，并开发检测胰腺神经内分泌肿瘤易感基因的方法、试剂盒，或相关的治疗药物和方案。

发明内容

本发明的目的就是提供一种辅助诊断(尤其是早期辅助诊断)胰腺神经内分泌肿瘤的方法及检测试剂盒。

本发明的另一目的是提供一种新的治疗胰腺神经内分泌肿瘤的方法。

在本发明的第一方面，提供了一种体外非诊断性检测样品是否存在 YY1 基因的体细胞位点突变的方法，包括步骤：

(a)用特异性引物扩增样品的 YY1 基因，得到扩增产物；和

(b)检测扩增产物中是否存在以下突变位点：

YY1 基因的核苷酸序列即 SEQ ID NO.: 1 中第 1115 位 C→G。

在另一优选例中，所述的 YY1 基因的核苷酸序列对应于人第 14 号染色体的第 100,743,807 位(NCBI36/hg18)。

在另一优选例中，所述的基因特异性引物具有 SEQ ID NO:3 和 4 所示序列。

在另一优选例中，所述的扩增产物的长度为 80-2000bp 且含有 SEQ ID NO:1 中第 1115 位。

在另一优选例中，所述的检测是对胰腺神经内分泌肿瘤细胞进行检测。

在本发明的第二方面,提供了一种检测胰腺神经内分泌肿瘤的试剂盒，它包括特异性扩增 YY1 基因或转录本的引物,所述的引物扩增出长度为 80-2000bp 且含有 SEQ ID NO:1 中第 1115 位的扩增产物。

在另一优选例中，所述试剂盒还含有选自下组的试剂：

(a)与 SEQ ID NO:1 中第 1115 位的突变结合的探针；

(b)识别 SEQ ID NO:1 中第 1115 位的突变限制性内切酶。

在另一优选例中，所述的突变是以下单核苷酸突变(SNV)：

YY1 基因的核苷酸序列：即 SEQ ID NO.: 1 中第 1115 位 C→G。

在另一优选例中，所述的引物具有 SEQ ID NO:3 和 4 所示序列。

在本发明的第三方面,提供了一种 YY1 基因的用途，用于制备对胰腺神经内分泌肿瘤进行诊断分型的试剂或试剂盒。

在另一优选例中，所述的试剂或试剂盒用于检测以下单核苷酸突变(SNV)：

YY1 基因的核苷酸序列即 SEQ ID NO.: 1 中第 1115 位 C→G。

在另一优选例中，所述的试剂包括特异性扩增 YY1 基因或转录本的引物、含有所述突变位点的扩增产物、与所述突变位点特异性结合的探针、特异性检测所述突变位点的核酸芯片。

在另一优选例中，所述的试剂盒包括使用说明书以及一种或多种以下试剂：

容器(a)以及位于所述容器内的特异性扩增 YY1 基因或转录本的引物；

容器(b)以及位于所述容器内的与所述突变位点特异性结合的探针；

容器(c)以及位于所述容器内的特异性检测所述突变位点的核酸芯片。

在另一优选例中，所述的核酸芯片还包括用于检测额外的胰腺神经内分泌

肿瘤易感位点的检测点。

在另一优选例中，所述的额外的胰岛细胞瘤体细胞突变位点选自下组：

MLL3 基因的错义突变：第 7 号染色体，第 151,874,400 位 A→G;

H3F3A 基因的错义突变：第 1 号染色体，第 226,252,135 位 A→G;

LMO2 基因的移码突变：第 11 号染色体，第 33,886,330 位插入 C(*/+C)

在本发明的第四方面,提供了一种多核苷酸分子的用途，所述的分子包括特异性扩增含突变位点的扩增产物的引物和/或与所述 SNV 位点特异性结合的探针，其特征在于，所述的核苷酸分子用于制备对胰腺神经内分泌肿瘤进行诊断分型的试剂盒，并且所述的突变位点选自下组：

YY1 基因的核苷酸序列即 SEQ ID NO.: 1 中第 1115 位 C→G。

在另一优选例中，所述的突变位点是 YY1 基因的核苷酸序列，并且所述的试剂盒用于判断胰腺神经内分泌肿瘤病人是否适合采用依维莫司治疗。

在另一优选例中，当胰腺神经内分泌肿瘤病人具有该突变位点，则提示该病人适合依维莫司(Everolimus)治疗。

在另一优选例中，所述试剂盒用于检测东亚人群(尤其是中国人群)的胰腺神经内分泌肿瘤分型。

在本发明的第五方面,提供了一种对个体的胰腺神经内分泌肿瘤进行诊断分型的方法，其特征在于，它包括步骤：

检测该个体的 YY1 基因、转录本和/或蛋白，并与正常的 YY1 基因、转录本和/或蛋白相比较，

其中，存在差异就表明该个体患胰腺神经内分泌肿瘤属于 YY1 突变亚型，具有特定临床特征，预后判断和治疗手段。

在另一优选例中，检测的是 YY1 基因或转录本，并与正常细胞 DNA 核苷酸序列比较差异。

在另一优选例中，所述的 YY1 突变基因会造成下游基因的表达量上调。

在另一优选例中，所述的下游基因包括 IDH3A、UCP2、COL1A1、COX5A、PGC-1α、或 PGC-1β，优选地，所述的下游基因包括 IDH3A、UCP2、或 COL1A1。

在另一优选例中，所述的差异是以下突变位点：

YY1 基因的核苷酸序列即 SEQ ID NO.: 1 中第 1115 位 C→G。

在本发明的第六方面，提供了一种 YY1 基因的用途，它被用于制备判断胰腺神经内分泌肿瘤病人是否适合采用依维莫司治疗的试剂或试剂盒。

在本发明第七方面，提供了一种多核苷酸分子的用途，所述的分子包括特异性突变位点的扩增产物的引物和/或与所述突变位点特异性结合的探针，所

述的核苷酸分子用于制备判断胰腺神经内分泌肿瘤病人是否适合采用依维莫司治疗的试剂盒，并且所述的突变位点选自下组：

YY1 基因的核苷酸序列即 SEQ ID NO.: 1 中第 1115 位 C→G。

在另一优选例中，当胰腺神经内分泌肿瘤病人具有该突变位点，则提示该病人适合依维莫司(Everolimus)治疗。

应理解，在本发明范围内中，本发明的上述各技术特征和在下文(如实施例)中具体描述的各技术特征可以互相组合，从而构成新的或优选的技术方案。限于篇幅，在此不再一一累述。

附图说明

图 1 显示了散发功能性胰腺神经内分泌肿瘤中的 YY1 基因 T372R 热点突变。

(a) 人类 YY1 蛋白功能域和外显子示意图。T372R 突变位于 YY1 基因编码蛋白的第三个锌指结构功能域中。

(b) Sanger 测序和焦磷酸测序验证 T372R 体细胞突变。

(c) T372 位点及其所在的锌指结构功能域在各物种之间非常保守。

(d) 基于 YY1 蛋白锌指结构功能域的蛋白晶体结构所进行的 T372R 突变位置分析。T372R 突变位于第三个锌指结构功能域中，并处于和 DNA 结合的表面，提示其与转录调控和 DNA 修饰有关。

图 2 显示了散发胰岛细胞瘤中的 YY1 基因 T372R 热点突变的检测结果。通过 Sanger 测序(a)和焦磷酸测序(b)技术检测和确定了胰岛细胞瘤细胞中 YY1 基因的 T372R 热点突变。

图 3 显示了散发胰岛细胞瘤中的 YY1 基因表达的定量检测结果。突变型和野生型 YY1 基因在胰岛细胞瘤细胞中均有较高水平的表达。

图 4 显示了散发胰岛细胞瘤中的 YY1 基因发生 T372R 突变后，对下游基因表达的影响。

图 5 显示了转基因小鼠模型构建策略。

图 6 的细胞增殖检测显示野生型和突变型 YY1 基因过表达均能诱导胰岛细胞瘤细胞显著增殖，T372R 突变型 YY1 基因促进胰岛细胞瘤细胞增殖的作用更强。

图 7 显示了 YY1 转基因小鼠胰岛细胞增殖标志物 Ki67 表达显著增高，而给予 mTOR 抑制剂后 Ki67 的升高受到可被显著抑制。

具体实施方式

本发明人经过广泛而深入的研究，对大量候选基因进行了测定和分析。首次发现和证明了 YY1 基因组序列与胰腺神经内分泌肿瘤(即胰岛细胞瘤)的发生密切相关。关联研究结果显示，在 SEQ ID NO:1 中第 1115 位 (第 14 号染色体第 100,743,807 位 C→G)的突变位点(命名为 T372R 突变)在对照组和病例组中的分布存在显著性差异($P<0.05$)，因此可作为辅助性诊断检测的特异性基因位点(SNV)。在此基础上完成了本发明。

具体地，通过对 10 对散发的功能性胰腺神经内分泌肿瘤进行全外显子测序，本发明人发现了在 YY1 (Yin Yang 1) 基因中高频率的 T372R 突变，并在 113 例的功能性胰腺神经内分泌肿瘤中通过测序发现此位点在所有的肿瘤中突变频率非常高，为 30% (34/113)。该基因的热点突变首次揭示了 YY1 基因的 T372R 位点对于胰腺神经内分泌肿瘤发生的重要作用，并可用于胰腺神经内分泌肿瘤的分型诊断标志物和药物靶点，即具有该位点的 YY1 基因突变更适合采用 mTOR(例如依维莫司)进行治疗。

YY1 基因

YY1 基因的序列是已知，其详细序列和一些相关信息可参见网址 http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genebank/。为了方便起见，在 SEQ ID NO: 1 给出 YY1 基因与本发明相关的核苷酸序列。

YY1 基因位于 14 号染色体，编码 YY1 蛋白，YY1 蛋白为广泛表达且保守的转录因子，在代谢调控，多种肿瘤发生以及表观遗传调控等过程中起重要作用。

胰腺神经内分泌肿瘤相关突变

本发明人通过全基因组关联和验证研究，研究结果表明，SEQ ID NO:1 中第 1115 位的突变是与胰腺神经内分泌肿瘤发生关联性非常高的位点。该高频率的 T372R 突变在所有的散发胰岛细胞瘤中突变频率非常高，为约 30%(34/113)。

具体而言，本发明揭示了 YY1 基因的 T372R 位点突变与胰腺神经内分泌肿瘤发生的相关性。

如本文所用，术语“本发明的基因突变位点”或“本发明 SNV”指 YY1 基因的核苷酸序列（如 SEQ ID NO.: 1 所示）中第 1115 位 C/G 突变, 等位基因型 G 在胰腺神经内分泌肿瘤中的发生频率，要显著高于在正常对照人群中的频率。在正常对照 DNA 序列中无该突变位点存在。

基于本发明的新发现，YY1 基因或相应的核酸分子或多肽分子有多方面的

新用途。这些用途包括(但不限于)：

用于辅助性诊断胰腺神经内分泌肿瘤；

用于辅助性判断胰腺神经内分泌肿瘤治疗方案（如是否适合依维莫司治疗方案)；

用于制备用于辅助性诊断胰腺神经内分泌肿瘤的试剂或试剂盒；

用于制备判断胰腺神经内分泌肿瘤病人是否适合采用依维莫司治疗的试剂盒。

检测方法、检测试剂及试剂盒

与 YY1 基因相关的突变位点可用于胰腺神经内分泌肿瘤的辅助诊断分型，尤其是早期辅助性诊断。另一方面，本发明的检测方法可用于评估胰腺神经内分泌肿瘤患者个体的疾病预后和治疗方案。

本领域的技术人员知道，有大量的分析技术可用于检测基因中所述位点是否存在突变。这些技术包括(但并不限于)：DNA 测序、杂交测序；酶促错配切割、异源双链分析、点杂交、寡核苷酸阵列(芯片)、焦磷酸测序、Taqman 探针检测技术、分子信标等。

用于本发明的测试样品没有特别限制，对于检测突变位点而言，可以是从细胞或组织等样品中抽提出的 DNA 或 mRNA。由于本发明的 T372R 突变是体细胞突变，因此该在突变存在于胰岛细胞或胰岛肿瘤细胞中，通常而不存在于外周血细胞中。因此，优选的测试样品是胰岛组织或胰岛肿瘤细胞。

本发明的基因序列检测的一部分或全部可作为探针固定在微阵列(microarray)或 DNA 芯片(又称为“基因芯片”或“核酸芯片”)上，用于分析组织中基因的序列和差异表达分析，以及基因诊断。用 YY1 基因特异的引物进行 RNA-聚合酶链反应(RT-PCR)体外扩增也可检测相应的转录产物。

检测可以针对 cDNA，也可针对基因组 DNA。YY1 基因的突变的形式包括与正常野生型 DNA 序列相比的点突变、易位、缺失、重组和其它任何异常等。可用已有的技术如 Southern 印迹法、DNA 序列分析、PCR 和原位杂交检测突变。另外，突变有可能影响相关蛋白的表达，因此用 Northern 印迹法、Western 印迹法可间接判断基因有无突变。

最方便的检测本发明突变位点的方法，是通过用 YY1 基因特异性引物扩增样品的 YY1 基因，得到扩增产物；然后检测扩增产物中是否存本发明的单核苷酸突变(SNV)。

应理解，在本发明首次揭示了 YY1 基因的突变位点与胰腺神经内分泌肿瘤的相关性之后，本领域技术人员可以方便地设计出可特异性扩增出含该突变位

点位置的扩增产物，然后通过测序等方法确定是否存在本发明的突变。通常，引物的长度为 15-50bp，较佳地为 20-30bp。虽然引物与模板序列完全互补是优选的，但是本领域技术人员知道，在引物与模板存在一定的不互补(尤其是引物的 5'端)的情况下，也能够特异性地扩增(即仅扩增出所需的片段)。含有这些引物的试剂盒和使用这些引物的方法都在本发明范围之内，只要该引物扩增出的扩增产物含有本发明基因突变位点的对应位置。一种优选的引物对具有 SEQ ID NO:1 中第 1115 位的序列。

虽然扩增产物的长度没有特别限制，但是通常扩增产物的长度为 100-2000bp，较佳地为 150-1500bp，更佳地为 200-1000bp。这些扩增产物都应含有 SEQ ID NO:1 中第 1115 位。

本发明的主要优点包括：

首次用实验证实了 1 种新体细胞突变与胰腺神经内分泌肿瘤的密切相关性，进而提供了辅助性诊断分型胰腺神经内分泌肿瘤的方法和试剂盒。本发明可以为临床诊断(尤其是早期诊断) 胰腺神经内分泌肿瘤提供极为有价值的辅助性参考指标，从而有利于实现胰腺神经内分泌肿瘤的早诊断、分型诊断和早期预防。

由于本发明的突变位点与胰腺神经内分泌肿瘤具有非常高的关联性，因此不仅可用于早期辅助性诊断胰腺神经内分泌肿瘤，而且可以未雨绸缪地使一些携带者在未发病前就采取合理的预防措施，从而提高携带者的生存期和生存质量，因此具有极其重大的应用价值和社会效益。当然，最终诊断还应当用常规检测方法进行确诊。

下面结合具体实施例，进一步阐述本发明。应理解，这些实施例仅用于说明本发明而不用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法，通常按照常规条件如 Sambrook 等人， 分子克隆：实验室手册(New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)中所述的条件，或按照制造厂商所建议的条件。

在本发明中，关于各基因的序列，蛋白质结构及其他一些有用信息，可在如下电子数据库信息中找到：

Cancer Gene Census (http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/Census/)

Picard (http://picard.sourceforge.net/)

PyMOL (http://www.pymol.org)

实施例 1

1.1 临床标本

功能性胰腺神经内分泌肿瘤诊断的标准：出现低血糖等相关临床症状，评估血胰岛素和血糖水平(延长口服葡萄糖耐量试验)，CT/PET-CT 影响诊断，手术切除肿瘤的病理诊断。基因组 DNA 抽提自液氮保存的胰岛细胞肿瘤和匹配的外周血液样本，以及福尔马林固定的石蜡包埋(FFPE)的胰岛素瘤组织样本。DNA 的制备使用 QIAGEN 公司的 DNeasy 试剂盒以及 QIAamp DNA FFPE 组织试剂盒。

对 FFPE 组织使用标准技术进行脱蜡。对样本进行免疫荧光染色，根据标准的实验步骤。使用了以下的主要抗体：多克隆兔抗 YY1 抗体(1:100; OriGene，克隆 EPR4651）和多克隆豚鼠抗胰岛素（1:400，Dako 公司）。用于免疫荧光染色的二抗购自 Invitrogen 和 Dako 公司。使用奥林巴斯显微镜系统拍摄图像。

1.2 外显子组捕获，文库制备和测序

使用 Covaris 技术，构建片段 200 至 300 bp 的基因组文库。基因组 DNA 来源于胰岛细胞瘤肿瘤组织及其匹配的外周血。然后使用适配器连接的片段的两端。然后，对提取的 DNA 通过 PCR(LM-PCR)扩增并纯化，在 NimbleGenEZ44M 人外显子组测序芯片上进行杂交，然后洗涤去掉非杂交的片段。非捕获和捕获的 LM-PCR 产物通过进行定量 PCR 来评估富集程度。捕获的每个文库在 Hiseq2000 平台进行高通量测序，并确保每个样品满足所需要的平均测序覆盖深度。测序的图像文件通过 Illumina 的软件(默认参数)进行读取。

1.3 测序序列比对和变异检测

使用默认参数的 BWA 软件(v0.5.9)，参照 NCBI 人类参考基因组(hg19)对高质量的测序结果序列进行比对。使用 Picard 软件(v1.54)和基因组分析工具(v1.0.6076，GATK IndelRealigner)，提高分析准确度。体细胞的点突变检测使用 VarScan2.2.5 软件，程序参数如下：samtools (v0.1.18)[3] mpileup -Q 0 && VarScan2.2.5 somatic --min-coverage 10 --min-coverage-normal 10 --min-coverage-tumor 10 --min-var-freq 0.1 --min-avg-qual 0。使用默认参数 GATK SomaticIndelDetector 软件对 InDel 进行了分析。高可置信突变位点，全部进行人工检查，然后使用 ANNOVAR 进行注释。

1.4 PCR 和 Sanger 测序

使用双96孔的GeneAmp PCR系统9700(Applied Biosystems公司)进行PCR，每个样品中每个反应使用 20 ng 模板 DNA。使用 3730xl DNA 分析仪(Applied Biosystems 公司)进行测序。所有序列由序列分析软件(Applied Biosystems 公司，版本 5.2)进行分析。使用以下引物：5'-CACCCAGGGCAGGAATG-3'人 YY1-F1(SEQ ID NO.：3)；5'-CCTGTCTCCGGTATGGA-3'人 YY1-R1(SEQ ID NO.：4)。

1.5 突变的焦磷酸测序验证

使用 QIAGEN PyroMark Q96 ID 系统，与 PyroMark Q96 真空工作站和 PyroMark 黄金 Q96 试剂，按照用户手册中的说明进行焦磷酸测序 。

使用以下引物：

5'-GGGAAACGCTTTTCACTGGAC-3'人 YY1-F2 (SEQ ID NO.： 5)；

5'-TAGGGCCTGTCTCCGGTATG-3'人 YY1 R2(SEQ ID NO.： 6)。

引物：5'-GGTATGGATTCGCACA-3'(SEQ ID NO.： 7)用于测序。

1.6 实时逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)

用 Qiagen miRNeasy mini 试剂盒提取总 RNA。使用反转录试剂盒按照制造商的说明，用20μl反应体积 对1微克的总RNA进行逆转录，转换成DNA(cDNA)。然后使用的 LightCycler480 实时定量 PCR 仪(罗氏应用科学公司)进行实时定量 PCR。 比较的循环阈值的方法被用来确定 YY1 基因 mRNA 的相对表达。使用以下引物：

5'-CCTGGCATTGACCTCTCAGATCCCA-3'人 YY1-F3(SEQ ID NO.： 8)和

5'-GGGCAAGCTATTGTTCTTGGAGCA-3'人 YY1-R3(SEQ ID NO.： 9)。

1.6 T372R 突变在 YY1 蛋白结构中的计算分析模型

人 YY1 蛋白的 293 至 414 氨基酸片段的晶体与 DNA 复合物分析由以往文献和数据库发表(PDB：1UBD)。此蛋白质晶体结构被确定作为突变三维结构分析模版。使用 PyMOL 软件生成了 YY1 C2H2 锌指结构域与 DNA 及 T372R 突变的三维模型。

1.7 统计分析方法

YY1 突变显著性的鉴定方法如参考文献所述(26)。显着差异的分析，采用 t 检验或 Fisher 精确检验。在图表中的误差线表示标准偏差(SD)。差异为显著判定标准为 P <0.05。

结果和讨论

为了发现在胰岛细胞瘤中关键的驱动基因和重要基因改变，对 10 对胰岛细胞瘤 DNA 样本(肿瘤 DNA 和匹配的外周血 DNA 对照)进行了全部外显子的测序。测序使用 NimbleGen 44M human exome array 芯片在 Hiseq2000 平台上进行。测序数据显示，测序平均深度为 157X，97.96%的测序区域覆盖深度在 10X 以上。测序相关质控参数表明外显子测序数据可靠。

本发明人确定了 78 个肿瘤中的体细胞突变，包括 21 个无义突变，49 错义突变，1 终止突变，3 个剪接位点和 4 个移码突变，在每个肿瘤中平均有 8 个(2-18)体细胞突变 。

本发明人发现了重复出现的 YY1 基因 c.C1115G/p.T372R 位点突变。通过 PCR 和桑格测序，以及焦磷酸测序，证实了发现在约 30%的肿瘤中(34 例/113 例)存在 T372R 位点的突变。

免疫荧光检测发现突变型和野生型的 YY1 蛋白在胰岛细胞瘤的细胞核中高表达(见图 6)。定量 PCR 检测显示野生型和突变型 YY1 基因均在胰岛肿瘤细胞和正常胰岛细胞中高表达(见图 3)。临床表型-基因型形管分析证实，YY1 基因突变型与野生型的发病年龄存在显著差异(P=0.00027)。这些数据证实 YY1 突变位点与肿瘤发生相关，且可作为分型诊断和疾病预后的标志物。

实验证明，YY1 是 mTOR 抑制剂的靶点。近期的病例报道，2 期和 3 期临床试验表明，一种新型的 mTOR 抑制剂依维莫司 Everolimus (RAD001)可以对部分的胰腺神经内分泌肿瘤患者有效。然而，依维莫司 Everolimus 的药物作用靶点尚不完全清楚。本发明的发现提供了依维莫司 Everolimus 在胰岛细胞瘤中的药物作用靶点，因此基于本发明，YY1 突变在胰岛细胞瘤中的基因诊断分型对此类肿瘤的临床治疗策略，药物治疗方案和反应率判断都有重要意义。

各阶段的数据汇总于表 1、表 2 和图 1-3。

表 1.胰岛细胞瘤中发现的重要基因突变

基因	突变类	突变位置	突变类	氨基酸变	突变频率	P 值	肿瘤

	型		型	改变	例数	(%)		基因
YY1	错义	Chr14: 100,743,807	C >G	T372R	3/1 0	34/113 (30)	5.4 E-10	No
MLL3	错义	Chr7: 151,874,400	A >G	D2713G	1/1 0	NA	NA	Yes
H3F3A	错义	Chr1: 226,252,135	A >G	K28R	1/1 0	NA	NA	Yes
LMO2	移码	Chr11: 33,886,330	* /+C	P25fs	1/1 0	NA	NA	Yes

表 2 胰岛细胞瘤根据 YY1 基因分为 2 类亚型的临床特征分析

	所有病例 (n=113)
平均手术年龄 (年龄范围)	49 (7-90)
男性	45 (7-90)
女性	55 (22-81)
性别比例：病例数 (%)	
男性	36 (32%)
女性	77 (68%)
病理类型：病例数 (%)	
良性肿瘤	106 (94%)
恶性肿瘤	7 (6%)

	野生型 (n=79)	T372R 突变型 (n=34)	P 值
平均手术年龄(年龄范围)	46 (7-90)	56 (36-81)	0.00027[a]
男性	42 (7-90)	53 (44-62)	0.024[a]
女性	48 (22-74)	58 (36-81)	0.0043[a]
性别比例：病例数 (%)			

男性	27 (75%)	9 (25%)	
女性	52 (68%)	25 (32%)	0.13[b]
病理类型：病例数 (%)			
良性肿瘤	73 (69%)	33 (31%)	
恶性肿瘤	6 (86%)	1 (14%)	0.24[b]

a: T 检验；b: Fisher's exact 检验

表 2 结果表明，在男性和女性患者中，YY1 基因 T372R 突变亚型的患者肿瘤发生年龄均显著大于 YY1 基因野生型的患者，在总人群中具有显著差异(P = 0.00027)。

实施例 2

胰腺神经内分泌肿瘤基因突变检测试剂盒

如实施例 1 所述，存在 YY1 基因的核苷酸序列：即 SEQ ID NO.：1 中第 1115 位 C→G 的突变与胰腺神经内分泌肿瘤疾病密切相关。因此，可基于这个突变设计 YY1 基因特异性引物在以病人的 DNA 为模板进行扩增进行检测。

制备一试剂盒(100 人次)，它含有：

名称	序列	浓度
有义引物	SEQ ID NO：3	100 pmol
反义引物	SEQ ID NO：4	100 pmol
PCR 反应液	含 Taq 酶 dNTP 镁离子 PCR 反应缓冲液	

随机挑选 100 个人构成的测试组，其中包括未知是否患胰腺神经内分泌肿瘤的对象、已知患胰腺神经内分泌肿瘤病人和经检测无胰腺神经内分泌肿瘤的正常人。

获取测试组中待检测对象的少量胰岛组织样品，使用常规方法提取 DNA。将胰岛肿瘤细胞检测试剂盒中的 PCR 引物稀释到 1μmol/μl，以所提取的 DNA 为模板与所提供的引物进行 PCR 反应。PCR 产物纯化后，用 ABI 3730 DNA 测序仪进行测序，用 Polyphred 软件进行序列的判读和 SNV 确认。

或者，将扩增产物与正常对照用焦磷酸测序或质谱分析，也可检测出第 14 号染色体第 100,743,807 位 C→G 突变。

检测结果：

对于第 14 号染色体第 100,743,807 位 C→G 突变的对象，进一步通过常规方法检测以确认是否患有胰腺神经内分泌肿瘤情况。检测结果表明，含 SEQ ID NO.：1 中第 1115 位 G 位点检测对象占胰腺神经内分泌肿瘤比例约 30%，在含 C 的正常人群中不存在。

因此，这表明通过检测第 14 号染色体第 100,743,807 位 C→G 突变，可进行胰岛细胞瘤的辅助性检测。

实施例 3

胰腺神经内分泌肿瘤辅助性检测

重复实施例 2 的检测，不同点在于随机选取了 80 个人(检测前不知道是否有胰岛细胞瘤症状)进行检测。

制备一试剂盒(100 人次)，它含有：

名称	序列	浓度
有义引物	SEQ ID NO：3	100pmol
反义引物	SEQ ID NO：4	100pmol
PCR 反应液	含 Taq 酶 dNTP 镁离子 PCR 反应缓冲液	

抽取待检测对象的胰岛细胞组织样品，使用常规方法(或使用特定的试剂盒)从提取 DNA。将检测试剂盒中的 PCR 引物稀释到 1μmol/μl，以所提取的 DNA 为模板与所提供的引物进行 PCR 反应。PCR 产物纯化后，用 ABI 3730 DNA 测序仪进行测序，用 Polyphred 软件进行序列的判读和 SNV 确认。

结果同样证实了，含第 14 号染色体第 100,743,807 位 C→G 突变(SEQ ID NO.：1 中第 1115 位 C 位点)的检测对象的胰岛细胞瘤比例明显高于该位点为不含 C 的检测对象(高至少 300%)。

实施例 4

YY1 基因的 T372R 突变对下游基因的影响

将胰腺神经内分泌肿瘤样本分为 YY1 基因突变组和 YY1 基因野生型组，用试剂盒抽提肿瘤细胞总 RNA 并逆转录为 cDNA（Qiagen 试剂盒），使用实时定量 PCR 方法（Invitrogen 公司）检测 YY1 部分下游基因的表达。

5’-CCTGGCATTGACCTCTCAGATCCCA-3’，人 YY1-F3(SEQ ID NO.: 8)，

5’-GGGCAAGCTATTGTTCTTGGAGCA-3’ 人 YY1-R3(SEQ ID NO.: 9)；

5’-TTTGCCATGAAGTTCAATGCA-3’ 人 PGC1a-F(SEQ ID NO.: 10),
5’-AGCAGCCACAAAAAGGGAGAT-3’ 人 PGC1a-R(SEQ ID NO.: 11);
5’-GGTTCCTGGAACGTGGTGAT-3’ 人 Ucp2-F(SEQ ID NO.: 12),
5’-AGCCATGAGGGCTCGTTTC-3’ 人 Ucp2-R(SEQ ID NO.: 13);
5’-TGCTGCCAAAGCACCTATTCA-3’ 人 idh3a-F(SEQ ID NO.: 14),
5’-GTGACCGGCTGCTATTGGG-3’ 人 idh3a-R(SEQ ID NO.: 15);
5’-TCGCCGTCATGCTGGG-3’ 人 COX5a-F(SEQ ID NO.: 16),
5’-CAATAAATCCTTGGGGAAGCC-3’ 人 COX5a-R(SEQ ID NO.: 17);
5’-GGAGGGGATCAGTATATACA-3’ 人 CXCR4-F(SEQ ID NO.: 18),
5’-GAAGATGATGGAGTAGATGG-3’ 人 CXCR4-R(SEQ ID NO.: 19);
5’-CACCAATCACCTGCGGTACAGAA-3’ 人 Col1a1-F(SEQ ID NO.: 20),
5’-CAGATCACGTCATCGCACAAC-3’ 人 Col1a1-R(SEQ ID NO.: 21)。

如图 4 所示。YY 基因发生第 1115 位 C→G 突变(即 T372R 突变)后，会对下游基因的表达产生一定影响。其中，T372R 突变后，对 IDH3A、UCP2 和 COL1A1 的表达有明显的上调作用。

该试验结果证实了：T372R 突变是一种对转录激活有影响的突变。

实施例 5　　YY1 转基因模型小鼠构建

构建策略见图 5，构建方法： 在小鼠 YY1 启动子的调控下表达 GFP 荧光蛋白。当与 Cre 小鼠交配去除 loxp 中间的 stop 元件后，将在小鼠 YY1 启动子的调控下表达突变 Yy1 蛋白。由于 GC 含量较高，小鼠 YY1 启动子需要用同源重组的 方法从 BAC 上套取。小鼠的 YY1 基因 cDNA 序列如 SEQ ID NO.: 22 所示

(atggcctcgggcgacaccctctacatcgccacggacggctcggagatgccggccgagatcgtggagctgc
atgagatcgaggtggagaccatcccggtggagaccatcgagaccacggtggtgggcgaggaggaggagga
ggacgacgacgacgaggacggcggcggcggcgaccacggcggcggcgggggcggccacgggcacgccggc
caccaccatcaccaccaccaccaccaccaccaccaccgcccatgatcgcgctgcagccgctggtgacgg
acgacccgacccaagtgcaccaccaccaggaggtgatcctggtgcagacgcgcgaggaggtggtcggcgg
ggacgactcggacgggctgcgcgccgaggacggcttcgaggaccagatcctcatcccggtgcccgccg

gccggcggcgacgacgactacatagagcagacgctggtcaccgtggcggcggccggcaagagcggcg
gcg
gggcctcgtcgggcggcggtcgcgtgaagaagggcggcggcaagaagagcggcaagaagagttacct
ggg
cggcggggccggcgcggcgggcggcggcggcgccgacccggggaataagaagtgggagcagaagcag
gtg
cagatcaagaccctggagggcgagttctcggtcaccatgtggtcctcggatgaaaaaaaagatattg
acc
atgaaacagtggttgaagagcagatcattggagagaactcacctcctgattattctgaatatatgac
agg
caagaaactccctcctggagggatacctggcattgacctctcagaccctaagcaactggcagaattt
gcc
agaatgaagccaagaaaaattaaagaagatgatgctccaagaacaatagcttgccctcataaaggct
gca
caaagatgttcagggataactctgctatgagaaagcatctgcacacccacggtcccagagtccacgt
ctg
tgcagagtgtggcaaagcgttcgttgagagctcaaagctaaaacgacaccagctggttcatactgga
gaa
aagcccttcagtgcacattcgaaggctgcgggaagcgcttttcactggacttcaatttgcgcagac
atg
tgcgaatccataccggagacaggccctatgtgtgcccttcgacggttgtaataagaagtttgctca
gtc aactaacctgaaatctcacatcttaacacacgctaaagccaaaaacaaccagtga)。

实施例 6 突变型和野生型 YY1 对小鼠胰岛细胞增殖的影响

6.1 细胞通过流式细胞仪对突变型和野生型 YY1 对小鼠胰岛细胞增殖影响进行分析。 转染后的细胞用 EdU 测定试剂盒进行细胞增殖测定（Eud 流式细胞术检测试剂盒，Invitrogen 公司）；阳性细胞通过流式细胞仪进行分析。

细胞增殖检测显示野生型和突变型 YY1 基因过表达均能诱导胰岛细胞瘤细胞显著增殖，T372R 突变型 YY1 基因促进胰岛细胞瘤细胞增殖的作用更强(图 6)。

6.2 对实施例 5 中转基因小鼠获得的原代细胞和细胞株使用常规方法进行培养。 MIN6 细胞转染质粒。使用脂质体 2000（Invitrogen 公司）。人类全长 YY1 基因 cDNA 插入 pCMV6 载体构建表达质粒。 T372R 突变引入质粒用 QuikChange II 位点定向诱变试剂盒（Stratagene 公司 ）。mTOR 抑制剂雷帕

霉素(rapamycin)按照不同实验浓度加入细胞培养液。雷帕霉素(rapamycin)和依维莫斯为结构类似物。

YY1 转基因小鼠胰岛细胞增殖标志物 Ki67 表达显著增高，而给予 mTOR 抑制剂后 Ki67 的升高受到可被显著抑制(见图 7)。

结论：突变型和野生型的 YY1 基因表达显著促进胰岛细胞增殖，其作用可被 mTOR 抑制剂所抑制。

在本发明提及的所有文献都在本申请中引用作为参考，就如同每一篇文献被单独引用作为参考那样。此外应理解，在阅读了本发明的上述讲授内容之后，本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改，这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

权 利 要 求

1.一种体外非诊断性检测样品是否存在 YY1 基因的体细胞位点突变的方法，其特征在于，包括步骤：

(a)用特异性引物扩增样品的 YY1 基因，得到扩增产物；和

(b)检测扩增产物中是否存在以下突变位点：

YY1 基因的核苷酸序列即 SEQ ID NO.: 1 中第 1115 位 C→G。

2.如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述的基因特异性引物具有 SEQ ID NO:3 和 4 所示序列。

3.如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述的扩增产物的长度为 100-2000bp 且含有 SEQ ID NO:1 中第 1115 位。

4.一种检测胰腺神经内分泌肿瘤的试剂盒，其特征在于，它包括特异性扩增 YY1 基因或转录本的引物，所述的引物用于扩增出长度为 80-2000bp 且含有 SEQ ID NO:1 中第 1115 位的扩增产物。

5.如权利要求 4 所述的试剂盒，其特征在于，它还含有选自下组的试剂：

(a)与 SEQ ID NO:1 中第 1115 位的突变结合的探针；

(b)识别 SEQ ID NO:1 中第 1115 位的突变限制性内切酶。

6.如权利要求 5 所述的试剂盒，其特征在于，所述的突变是以下单核苷酸突变(SNV)：

YY1 基因的核苷酸序列：即 SEQ ID NO.: 1 中第 1115 位 C→G。

7. 一种 YY1 基因的用途，其特征在于，用于制备对胰腺神经内分泌肿瘤亚型进行诊断(或判断)的试剂或试剂盒。

8. 如权利要求 7 所述的用途，其特征在于，所述的试剂或试剂盒用于检测以下单核苷酸突变(SNV)：

YY1 基因的核苷酸序列：即 SEQ ID NO.: 1 中第 1115 位 C→G。

9.一种多核苷酸分子的用途，所述的分子包括特异性扩增含单核苷酸突变位点(SNV 位点)的扩增产物的引物和/或与所述 SNV 位点特异性结合的探针，其特征在于，所述的核苷酸分子用于制备对胰腺神经内分泌肿瘤亚型进行诊断的试剂盒，并且所述的突变位点选自下组：

YY1 基因的核苷酸序列：即 SEQ ID NO.: 1 中第 1115 位 C→G。

10. 一种 YY1 基因的用途，其特征在于，用于制备判断胰腺神经内分泌肿瘤

病人是否适合采用依维莫司治疗的试剂或试剂盒。

11.一种多核苷酸分子的用途，所述的分子包括特异性扩增含突变位点的扩增产物的引物和/或与所述突变位点特异性结合的探针，其特征在于，所述的多核苷酸分子用于制备判断胰腺神经内分泌肿瘤病人是否适合采用依维莫司治疗的试剂盒，并且所述的突变位点选自下组：

YY1基因的核苷酸序列：即SEQ ID NO.：1中第1115位C→G。

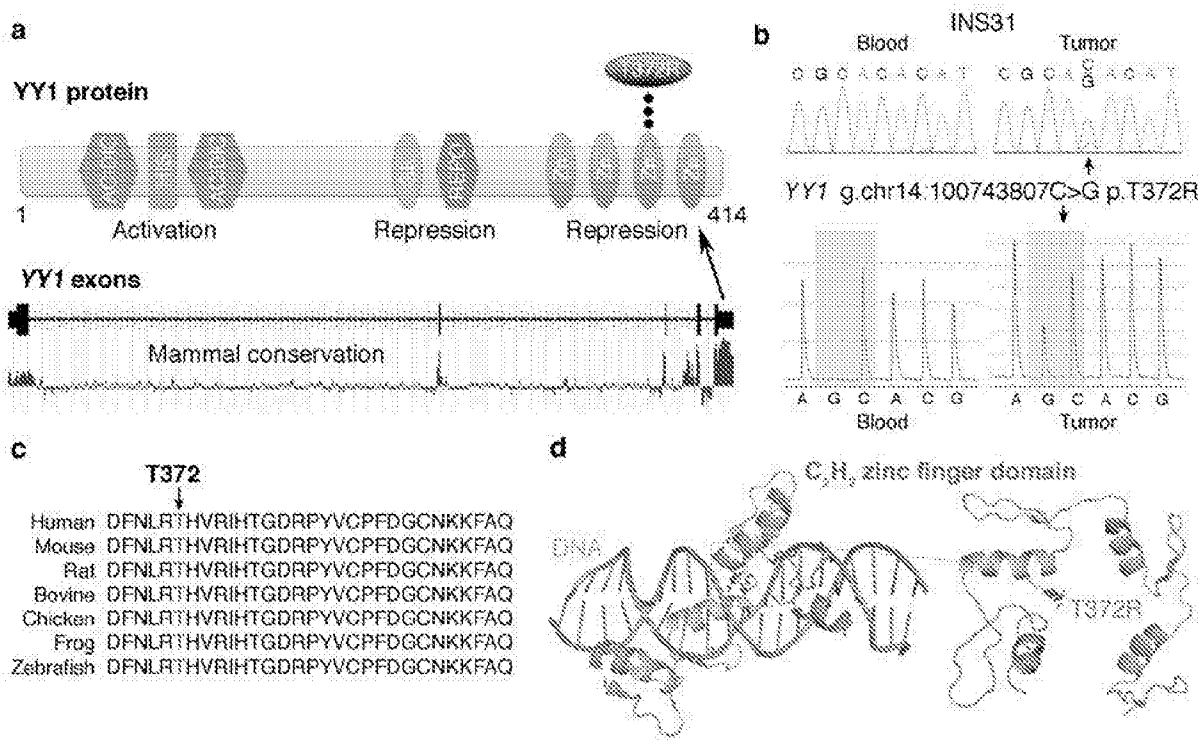
a
YY1 protein
1
Activation
Repression
Repression
414
YY1 exons
Mammal conservation
b
INS31
Blood
Tumor
YY1 g.chr14:100743807C>G p.T372R
A G C A C G
Blood
A G C A C G
Tumor
c
T372
Human DFNLRTHVRIHTGDRPYVCPFDGCNKKFAQ
Mouse DFNLRTHVRIHTGDRPYVCPFDGCNKKFAQ
Rat DFNLRTHVRIHTGDRPYVCPFDGCNKKFAQ
Bovine DFNLRTHVRIHTGDRPYVCPFDGCNKKFAQ
Chicken DFNLRTHVRIHTGDRPYVCPFDGCNKKFAQ
Frog DFNLRTHVRIHTGDRPYVCPFDGCNKKFAQ
Zebrafish DFNLRTHVRIHTGDRPYVCPFDGCNKKFAQ
d
C2H2 zinc finger domain
DNA
T372R

图 1

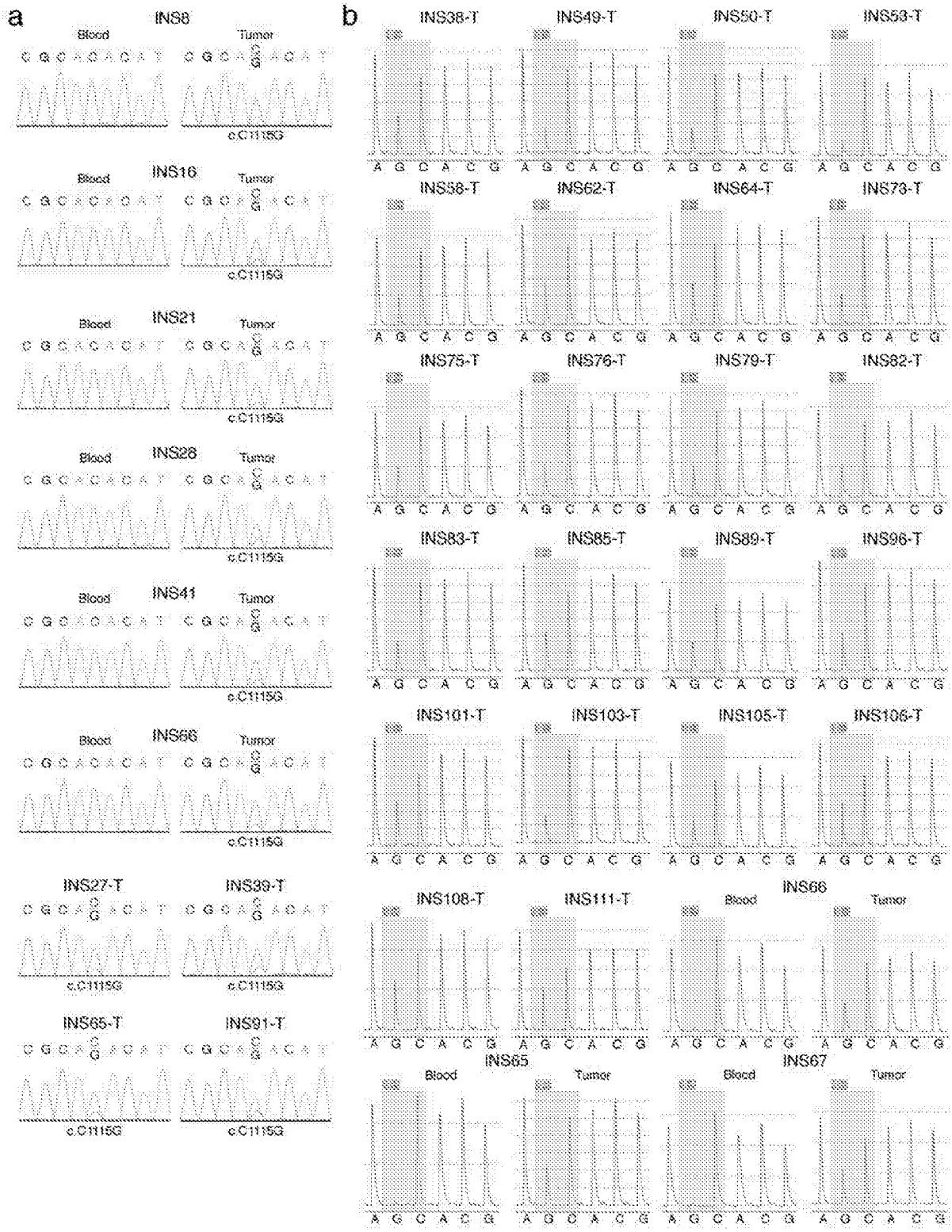
a
INS8
Blood
Tumor
c.C1115G
INS16
INS21
INS28
INS41
INS66
INS27-T
INS39-T
INS65-T
INS91-T
b
INS38-T
INS49-T
INS50-T
INS53-T
INS58-T
INS62-T
INS64-T
INS73-T
INS75-T
INS76-T
INS79-T
INS82-T
INS83-T
INS85-T
INS89-T
INS96-T
INS101-T
INS103-T
INS105-T
INS106-T
INS108-T
INS111-T
INS66
INS65
INS67

图 2

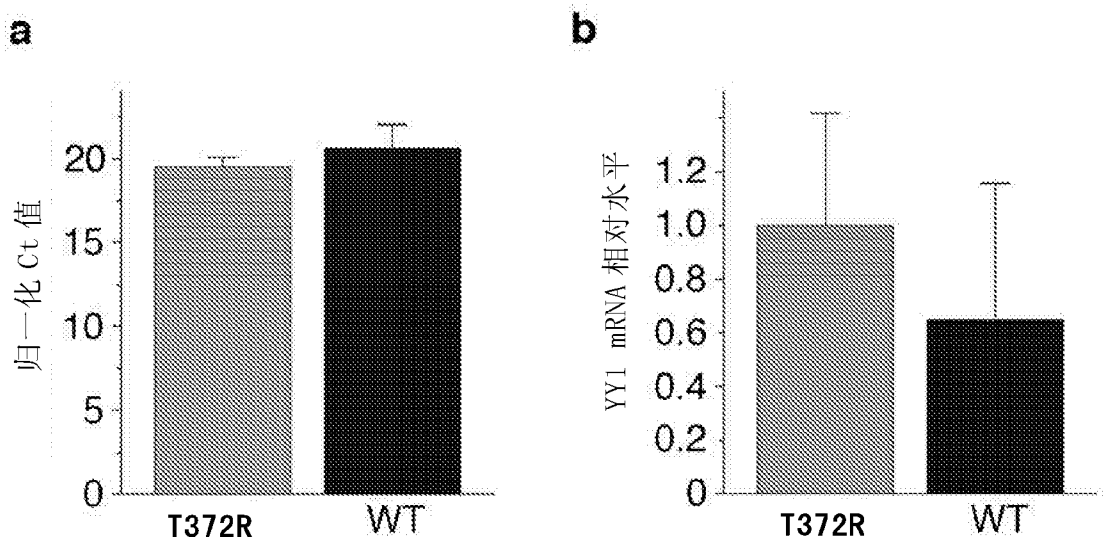
a
归一化Ct值
20
15
10
5
0
T372R
WT
b
YY1 mRNA 相对水平
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0
T372R
WT

图 3

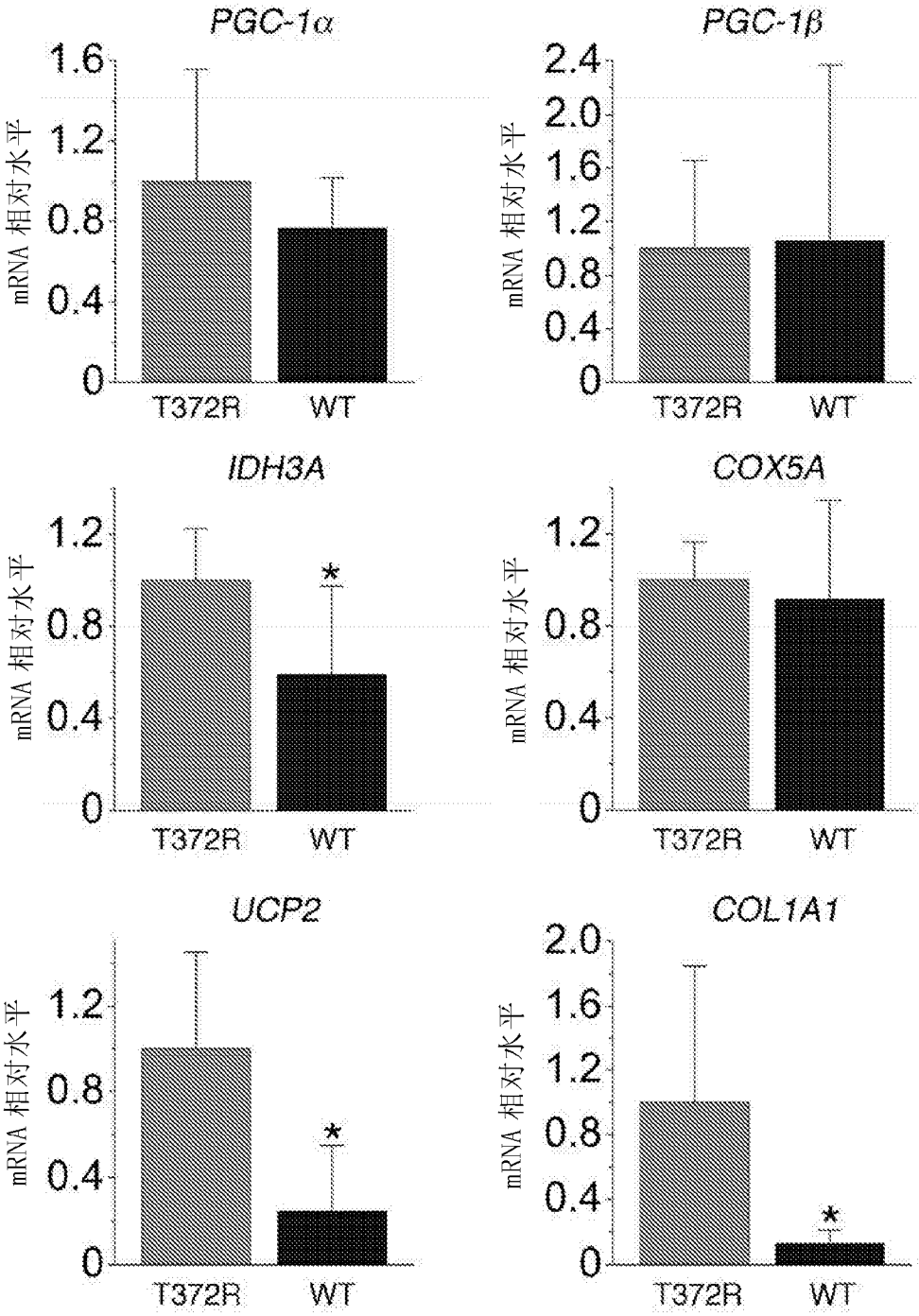

图 4

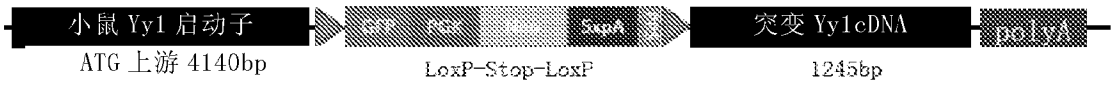
小鼠 Yy1 启动子
ATG 上游 4140bp
GFP
PGK
SpnA
突变 Yy1cDNA
polyA
LoxP-Stop-LoxP
1245bp

图 5

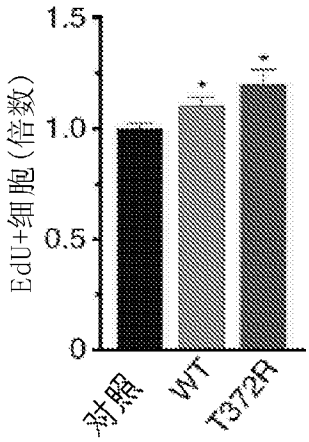
EdU+细胞（倍数）
1.5
1.0
0.5
0
对照
WT
T372R

图 6

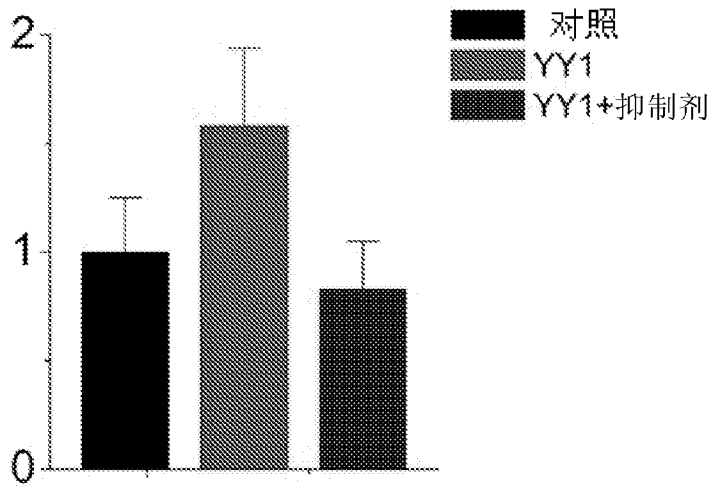
2
1
0
对照
YY1
YY1+抑制剂

图 7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2014/078833

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12Q 1/68 (2006.01) i; C12N 15/11 (2006.01) i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12Q, C12N

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

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

CNPAT, CNTXT, CPRSABS, CNABS, DWPI, SIPOABS, VEN, CJFD, CNKI, ISI Web of Knowledge, PUBMED: p-NEN, YY1, 1115, pancreatic NEN, T372R, PCR, pancreatic neuroendocrine tumors

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WANG, Zhuoqun et al., "Expression of Polycomb-Group Gene during Rat Spermatogenesis" ACTA LABORATORIUM ANIMALIS SCIENTIA SINICA, vol.17, no.03, 30 June 2009 (30.06.2009), ISSN: pages 172-175, see abstract	1-11
A	LIU, Guanghui et al., "Expressions of BMP-2 and YY1 In Human Brain Gliomas and Their Significance" CHINESE JOURNAL OF CLINICAL NEUROSURGERY, vol. 15, no. 02, 28 February 2010 (28.02.2010), ISSN: pages 98-100, see abstract	1-11
A	WO 2013006619 A1 (THE GENERAL HOSPITAL CORPORATION), 10 January 2013 (10.01.2013), see abstract	1-11

☐ 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

"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
23 August 2014 (23.08.2014)	**11 September 2014 (11.09.2014)**
Name and mailing address of the ISA/CN: State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No.: (86-10) 62019451	Authorized officer **ZHANG, Yanxia** Telephone No.: (86-10) **62411049**

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2014/078833

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
WO 2013006619 A1	10 January 2013	EP 2729605 A1	14 May 2014
		US 2014213460 A1	31 July 2014
		AU 2012279114 A1	20 February 2014
		CA 2844144 A1	10 January 2013
		WO 2013006619 A9	17 April 2014

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2014/078833

A. 主题的分类

C12Q 1/68(2006.01)i；C12N 15/11(2006.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

C12Q，C12N

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称，和使用的检索词（如使用））

CNPAT，CNTXT，CPRSABS，CNABS，DWPI，SIPOABS，VEN，CJFD，CNKI，ISI Web of Knowledge，PUBMED:p-NEN，YY1，1115，pancreatic NEN，T372R，PCR，胰腺神经内分泌肿瘤

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	汪卓群等. "Polycomb基因家族在大鼠精子发生过程中的表达" 中国实验动物学报，第第17卷卷，第第03期期，2009年 6月 30日 (2009-06-30)，ISSN：第172-175页， 参见摘要	1-11
A	刘光辉等. "脑胶质瘤组织中BMP-7与YY1 mRNA表达的相关性研究" 中国临床神经外科杂志， 第第15卷卷，第第02期期，2010年 2月 28日 (2010-02-28)，ISSN：第98-100页， 参见摘要	1-11
A	WO 2013006619 A1 (THE GENERAL HOSPITAL CORPORATION) 2013年 1月 10日 (2013-01-10) 参见摘要	1-11

☐ 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

"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
2014年 8月 23日	2014年 9月 11日

ISA/CN的名称和邮寄地址	受权官员
中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN) 北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 中国 传真号 (86-10)62019451	张艳霞 电话号码 (86-10)62411049

表 PCT/ISA/210 (第2页) (2009年7月)

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2014/078833

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）
WO	2013006619	A1	2013年 1月 10日	EP	2729605	A1	2014年 5月 14日
				US	2014213460	A1	2014年 7月 31日
				AU	2012279114	A1	2014年 2月 20日
				CA	2844144	A1	2013年 1月 10日
				WO	2013006619	A9	2014年 4月 17日