(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 106255877 B
(45)授权公告日 2018.06.05

(21)申请号 201480075291.9

(22)申请日 2014.12.10

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 106255877 A

(43)申请公布日 2016.12.21

(30)优先权数据
2013-255145 2013.12.10 JP
61/982,341 2014.04.22 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2016.08.10

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/JP2014/083320 2014.12.10

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2015/088039 JA 2015.06.18

(73)专利权人 国立大学法人九州大学
地址 日本福冈县

(72)发明人 广津崇亮 园田英人

(74)专利代理机构 北京林达刘知识产权代理事务所(普通合伙) 11277
代理人 刘新宇 李茂家

(51)Int.Cl.
G01N 33/00(2006.01)
G01N 33/493(2006.01)

(56)对比文件
JP 2010164505 A,2010.07.29,
Cornelia I.Bargmann等.《Odorant-selective genes and neurons mediate olfaction in C. elegans》.《cell》.1993,第74卷全文.
HIROTSU Takaaki.《Analysis of the molecular mechanism of signal transduction and identification of novel molecules in neural circuit-dependent odor adaptation in C.elegans》.《科学研究费补助金研究成果报告书》.2010,3(2)和4(2).
Emily R.Troemel等.《Divergent seven transmembrane receptors are candidate chemosensory receptors in C.elegans》.《cell》.1995,第83卷全文.

审查员 王丽华

权利要求书1页 说明书42页
序列表5页 附图35页

(54)发明名称

使用线虫的嗅觉的癌检测法

(57)摘要

一种癌的检测方法,其特征在于,在来自测试对象的生物体相关物质或其处理物的存在下饲养线虫,以基于线虫的嗅觉的趋化性作为指标来检测癌。

CN 106255877 B

1.线虫在癌的检测用试剂盒的制造中的应用，所述试剂盒用于以线虫对来自测试对象的生物体相关物质或其处理物的气味的反应作为指标来检测癌的方法中。

2.根据权利要求1所述的应用，其中，线虫为秀丽隐杆线虫(Caenorhabditis elegans)。

3.根据权利要求1所述的应用，其中，线虫为野生型线虫、突变型线虫或转基因线虫。

4.根据权利要求1～3中任一项所述的应用，其中，对于来自测试对象的生物体相关物质或其处理物的气味，线虫显示正向应答时，判定测试对象为癌、或有癌的风险。

5.根据权利要求1～3中任一项所述的应用，其中，对于来自测试对象的生物体相关物质或其处理物的气味，线虫的嗅觉神经的应答大时，判定测试对象为癌、或有癌的风险。

6.根据权利要求1～3中任一项所述的应用，其中，生物体相关物质或其处理物为体液、细胞、组织、或者细胞或组织的培养物或保存液。

7.根据权利要求6所述的应用，其中，体液为尿。

8.根据权利要求6所述的应用，其中，保存液为生理盐水。

9.一种线虫的气味受体的鉴定方法，其特征在于，使用线虫来进行气味受体的鉴定，其中，气味为癌种类的气味。

10.根据权利要求9所述的方法，其中，抑制编码所述受体的基因的表达或功能，检查该被抑制的线虫对气味的反应。

11.根据权利要求10所述的方法，其中，受体基因的表达或功能抑制利用RNAi。

12.根据权利要求9～11中任一项所述的方法，其中，所鉴定的受体的种类根据癌种类、或依赖于气味物质的浓度而不同。

13.根据权利要求9～11中任一项所述的方法，其中，线虫为秀丽隐杆线虫。

14.线虫在癌的鉴定用试剂盒的制造中的应用，所述试剂盒用于以线虫对来自测试对象的生物体相关物质或其处理物的气味的反应作为指标来鉴定癌种类的方法中。

15.根据权利要求14所述的应用，其中，所述方法包括以下工序：

(a)通过权利要求1～8中任一项所述的应用来检测癌；

(b)对于所述工序(a)中检测为癌的试样，使用对通过权利要求9～13中任一项所述的方法鉴定到的受体进行了变异的变异体线虫，检查对气味的反应；

(c)所述变异体线虫与所述工序(a)中使用的线虫之间对气味的反应不同时，将与鉴定到的受体对应的癌种类判定为鉴定的对象癌种类。

16.根据权利要求15所述的应用，其中，受体的变异为选自由受体的缺失、受体的表达或功能的抑制和受体的高表达或高功能化组成的组中的至少1种。

17.一种癌的检测或鉴定用试剂盒，其包含线虫。

18.根据权利要求17所述的试剂盒，其中，线虫为秀丽隐杆线虫。

19.根据权利要求17或18所述的试剂盒，其中，线虫为野生型线虫、突变型线虫或转基因线虫。

20.一种癌的检测系统，其具备：

线虫；

收纳部，其收纳生物体相关物质或其处理物和所述线虫；和，

探知部，其探知所述收纳部的线虫对气味的反应。

使用线虫的嗅觉的癌检测法

技术领域

[0001] 本发明涉及使用线虫的嗅觉的癌检测方法。

背景技术

[0002] 包括癌的恶性肿瘤从1981年起占日本人的死因首位。根据世界保健机构，2005年的世界的恶性肿瘤所导致的死亡率占13％(760万人)，预测今后还将持续增加。

[0003] 癌越早期发现诊疗所耗费的精神负担·身体负担·经济负担·社会负担越轻，根治的可能性也高。越进展根治的可能性越低，导致无法切除的晚期复发癌，现实是除了很大的负担和损失之外变为延长寿命治疗。癌是以细胞基因的异常为原因而产生的，因此，大部分癌中，10万人口中各年龄的发生频率以4-6次方成比例地增加(Cancer Patterns in Canada,1982)。因此显而易见的是，在任意年龄、社会方面，如果能够早期发现·早期治疗癌，则各种情况下，负担和损失均能够变小。

[0004] 然而，对于早期癌，一般没有症状，现实是受诊者缺乏为了接受癌诊查的动机。实际上，日本的癌诊查受诊率均为10-35％左右，远远低于至2017年为止以癌诊查受诊率50％以上为目标的日本的癌对策基本计划的目标。在内窥镜、手术技术等对早期癌的治疗技术中占世界首位的日本，如果能够新开发·应用痛苦少、简单、廉价、能够以较多人为对象施行且高精度的癌诊查法，则可以毫不夸张地说对世界的癌诊疗带来革命。

[0005] 包括本发明人等的组中，使用经过训练的犬(癌探知犬)，报道了癌有特有的气味，对包括早期癌的样品，能够以灵敏度·特异性均超过90％的高精度进行检测(非专利文献1:Sonoda,H.et al.,Colorectal cancer screening with odour material by canine scent detection.Gut,60,814-819,2011)。

[0006] 由此认为，如果检测癌特有的气味，则可以构筑高精度的癌探知系统。

[0007] 然而，癌探知犬的能力存在个体差异，气温上升的夏季集中力下降。另外，关于探知犬的训练方法，也不存在一定的方法论。进而，即使在癌探知犬的状态好的情况下，1天内进行5次试验也为极限。特别是，持续进行正确答案完全不清楚的诊查目的的样品的试验的行为，即使癌探知犬采取错误的行动，对探知犬也提供“以球娱乐”这样的报酬，因此导致降低精度的结果。因此，无法将使用了探知犬的癌诊查作为业务进行。

[0008] 另外，报道了使用GC/MS(gas chromatography/mass spectroscopy)分析等分析装置确定挥发性物质，进行癌的诊断的方法(非专利文献2:Y.Hanai,et al.,Urinary volatile compounds as biomarkers for lung cancer.Biosci.Biotechnol.Biochem.76,679-84,2012)(非专利文献3:Khalid et al.,A pilot study combining a GC-sensor device with a statistical model for the identification of bladder cancer from urine headspace.PLoS ONE,8,e69602,2013)。然而，日常存在的挥发性物质成为干扰的可能性高，用于检测的仪器的开发和制作需要大量的资金和分析技术。

[0009] 现有技术文献

[0010] 非专利文献

[0011] 非专利文献1:Sonoda,H.et al.,Colorectal cancer screening with odour material by canine scent detection.Gut,60,814-819,2011

[0012] 非专利文献2:Y.Hanai,et al.Urinary volatile compounds as biomarkers for lung cancer.Biosci.Biotechnol.Biochem.76,679-84,2012

[0013] 非专利文献3:Khalid et al.,A pilot study combining a GC-sensor device with a statistical model for the identification of bladder cancer from urine headspace.PLoS ONE,8,e69602,2013

发明内容

[0014] 发明要解决的问题

[0015] 本发明的目的在于,提供利用线虫的嗅觉的癌的检测方法。

[0016] 用于解决问题的方案

[0017] 本发明人为了解决上述课题进行了深入研究,结果发现:通过基于线虫的嗅觉的趋化性或嗅觉神经的应答能够检测癌,从而完成了本发明。

[0018] 即,本发明如以下所述。

[0019] (1)一种癌的检测方法,其特征在于,以线虫对来自测试对象的生物体相关物质或其处理物的气味的反应作为指标来检测癌。

[0020] (2)根据(1)所述的方法,其中,线虫为秀丽隐杆线虫(Caenorhabditis elegans)。

[0021] (3)根据(1)或(2)所述的方法,其中,线虫为野生型线虫、突变型线虫或转基因线虫。

[0022] (4)根据(1)～(3)中任一项所述的方法,其中,对于来自测试对象的生物体相关物质或其处理物的气味,线虫显示正向应答时,判定测试对象为癌、或有癌的风险。

[0023] (5)根据(1)～(4)中任一项所述的方法,其中,对于来自测试对象的生物体相关物质或其处理物的气味,线虫的嗅觉神经的应答大时,判定测试对象为癌、或有癌的风险。

[0024] (6)根据(1)～(5)中任一项所述的方法,其中,生物体相关物质或其处理物为体液、细胞、组织、或者细胞或组织的培养物或保存液。

[0025] (7)根据(6)所述的方法,其中,体液为尿。

[0026] (8)根据(6)所述的方法,其中,保存液为生理盐水。

[0027] (9)一种线虫的气味受体的鉴定方法,其特征在于,使用线虫来进行气味受体的鉴定。

[0028] (10)根据(9)所述的方法,其中,抑制编码前述受体的基因的表达或功能,检查该被抑制的线虫对气味的反应。

[0029] (11)根据(10)所述的方法,其中,受体基因的表达或功能抑制利用RNAi。

[0030] (12)根据(9)～(11)中任一项所述的方法,其中,气味为癌种类的气味。

[0031] (13)根据(9)～(12)中任一项所述的方法,其中,所鉴定的受体的种类根据癌种类、或依赖于气味物质的浓度而不同。

[0032] (14)根据(9)～(13)中任一项所述的方法,其中,线虫为秀丽隐杆线虫(Caenorhabditis elegans)。

[0033] (15)一种癌种类的鉴定方法，其特征在于，以线虫对来自测试对象的生物体相关物质或其处理物的气味的反应作为指标来鉴定癌种类。

[0034] (16)根据(15)所述的方法，包括以下工序：

[0035] (a)通过前述(1)～(8)中任一项所述的方法检测癌；

[0036] (b)对于前述工序(a)中检测为癌的试样，使用将通过前述(9)～(14)中任一项所述的方法鉴定到的受体进行变异而得到的变异体线虫，检查对气味的反应；

[0037] (c)前述变异体线虫与前述工序(a)中使用的线虫之间对气味的反应不同时，判定与鉴定到的受体对应的癌种类为鉴定的对象癌种类。

[0038] (17)根据(16)所述的方法，其中，受体的变异为选自由受体的缺失、受体的表达或功能的抑制和受体的高表达或高功能化组成的组中的至少1种。

[0039] (18)一种癌的检测或鉴定用试剂盒，其包含线虫。

[0040] (19)根据(18)所述的试剂盒，其中，线虫为秀丽隐杆线虫(Caenorhabditis elegans)。

[0041] (20)根据(18)或(19)所述的试剂盒，其中，线虫为野生型线虫、突变型线虫或转基因线虫。

[0042] (21)一种癌的检测系统，其具备：

[0043] 线虫；

[0044] 收纳部，其收纳生物体相关物质或其处理物和前述线虫；和，

[0045] 探知部，其探知前述收纳部的线虫对气味的反应。

[0046] 发明的效果

[0047] 根据本发明，可以提供使用线虫的癌的检测方法。根据本发明的方法，可以以高灵敏度且低成本检测癌。进而，本发明的方法的样品的采集和解析容易，费用也廉价。进而，本发明的方法能够检测早期癌。因此，本发明的方法对癌的临床检查等极有用。

附图说明

[0048] 图1为示出线虫对健康人和癌患者的尿的反应试验结果的图。

[0049] 图2为示出本发明的方法中使用的培养皿的形式的图。

[0050] 图3为示出使用Yellow Cameleon基因作为指示基因时的测定原理的图。

[0051] 图4为示出使用GCaMP基因作为指示基因时的测定原理的图。

[0052] 图5为示出具有用于配置线虫的微流路的芯片的图。

[0053] 图6为示出具有微流路的芯片内的流路的切换的图。

[0054] 图7为示出试验线虫的AWC嗅觉神经对来自癌患者的尿的反应的结果的图。

[0055] 图8为示出试验线虫的AWC嗅觉神经对来自癌患者的尿的反应的结果的图。

[0056] 图9为示出使用去除了沉淀物和固体物的尿样品测试线虫的趋化性的结果的图。

[0057] 图10为示出测试线虫的AWA嗅觉神经对来自癌患者的尿的反应的结果的图。

[0058] 图11为示出测试线虫的AWA嗅觉神经对来自癌患者的尿的反应的结果的图。

[0059] 图12为示出试验板(Assay plate)的图。

[0060] 图13为示出对癌细胞的培养基的线虫的引诱行为的图。

[0061] 图14为示出本发明的方法的中规模试验结果的图。

[0062] 图15为示出使用本发明的方法和其他肿瘤标记物进行中规模试验、对灵敏度进行比较所得的结果的图。

[0063] 图16A为本发明的系统的方框图。

[0064] 图16B为本发明的系统的处理部的构成图。

[0065] 图17为示出线虫对各种浓度的纤维原细胞培养基的趋性的图。

[0066] 图18为示出线虫对各种浓度的癌细胞培养基的趋性的图。

[0067] colo205＝大肠癌、MKN1＝胃癌

[0068] 图19为示出线虫对S状结肠癌患者的癌组织和健康组织的趋性的图。

[0069] 图20为示出线虫对将人的癌组织切片加入到生理盐水中并保存后的该生理盐水的稀释液的趋性的图。

[0070] 图21为示出改变尿的浓度测试线虫的趋性的结果的图。

[0071] 图22为示出对于参与对特定的气味物质的应答的嗅觉受体的RNAi筛选的图。

[0072] (A)确认RNAi筛选策略是有效的。示出对于二乙酰的10-3稀释或吡嗪的10-3稀释的趋化性应答中以eri-1突变体中的odr-10作为靶的RNAi的效果。示出与对照的显著性差异(P<0.001、Student t检验)。(B)与对气味物质的趋化性建立联系的、第三次筛选后得到的嗅觉受体候补基因的数量。(C)由srx-47或sra-17启动子进行表达诱导的荧光报告子(reporter)的表达模式。绿色表示由这些基因的启动子诱导的荧光蛋白质维纳斯(Venus)的表达。洋红色表示AWA、AWB和AWC嗅觉神经元中的mCherry的表达。srx-47的表达在AWA和ASH神经元中被观察到。sra-17的表达在AWA神经元中被检测到。比例尺为10μm。

[0073] 图23为示出嗅觉受体候补基因的表达模式的图。

[0074] (左)绿色表示由嗅觉受体候补基因的启动子进行表达诱导的Venus的表达。(中央)洋红色表示AWA、AWB和AWC神经元中的mCherry的表达(A)或经过染料(dye)染色的感觉神经元(ASH、ASJ、AWB、ASK、ADL、ASI、PHA和PHB神经元)(B-M)。(右)重叠的图。全部图像为不包括尾部区域(C、下部)的线虫的头部区域的左侧面图像。箭形和箭头表示受体候补基因表达的神经元的细胞体。比例尺＝10μm。

[0075] 图24为示出SRI-14在ASH神经元中对高浓度的二乙酰的应答发挥功能的图。

[0076] (A)野生型(WT)、odr-10和sri-14突变体对低浓度和高浓度的二乙酰的趋化性。下部表示二乙酰浓度(n＝5)。(B)对高浓度的二乙酰(5μl未稀释)的驱避应答中以sri-14作为靶的RNAi的效果(n＝8)。(C)sri-14突变体对高浓度的二乙酰(5μl未稀释、Da)、异戊醇(5μl未稀释、Iaa)、和苯甲醛(1μl未稀释、Bz)、以及驱避物质辛醇(1μl未稀释、Oct)和壬酮(1μl未稀释、Nona)的趋化性(n＝6)。(D)由sri-14启动子进行表达诱导的荧光报告子(绿色)的表达模式。箭头分别表示由mCherry或荧光染料进行鉴定的AWC或ASH的细胞体(洋红)。(E)对高浓度的二乙酰(5μl未稀释)的趋化性中,野生型线虫中对ASH或AWC特异地将sri-14进行RNAi时的效果(n＝5)。(F)关于对高浓度的二乙酰(5μl未稀释)的sri-14突变体的应答缺陷,sri-14cDNA的神经元特异性表达的效果(n＝5)。(G)ASH的感觉纤毛中的SRI-14::GFP的局部存在。比例尺为10μm(D和G)。误差棒表示SEM。*P<0.05、**P<0.01、***P<0.001、Student t检验(B和C)或Dunnett's检验(A、E、和F)。

[0077] 图25为示出针对经过RNAi处理的线虫对高浓度二乙酰浓度的趋化性进行重复测定的结果的图。

[0078] 除了sri-14之外，第三次筛选后得到的与对高浓度二乙酰(5μl的未稀释)的应答相关的受体候补基因中、srh-25、srh-79、srh-216或srh-281的RNAi引起来自二乙酰的驱避行为上显著地有重现性的缺陷。误差棒表示SEM。表示与对照比较的显著性差异(*P<0.05、**P<0.01；包含Bonferroni校正的Student t检验)。

[0079] 图26为示出sri-14的结构的图。

[0080] sri-14编码7次跨膜型蛋白质。(A)sri-14的结构。表示ok2685株的缺失区域。(B)SRI-14的被预测的氨基酸序列。表示由隐马尔可夫模型预测到的7次跨膜型结构域。(C)SRI-14的疏水性曲线图。曲线图来自由Kyte&Doolittle定义的亲水性参数。(D)sri-14突变体对高的渗透压刺激(4M NaCl)显示正常的驱避行为。误差棒表示SEM。表示与对照比较的显著性差异(**P<0.01、Dunnett's检验)。

[0081] 图27为示出参与对高浓度二乙酰的应答的神经元的图。(A)感觉神经元特异性地被破坏的野生型线虫对高浓度二乙酰(5μl未稀释)的趋化性(n≥8)。(B)去除了AWA的线虫对10-3稀释的二乙酰的趋化性。(C)AWA、ASH感觉神经元与4个第一层中间神经元之间的神经线路的示意图。(D)中间神经元特异性地被抑制的野生型线虫对高浓度二乙酰(5μl未稀释)的趋化性(n≥5)。(E)中间神经元特异性地被抑制的野生型线虫对10-3稀释的二乙酰的趋化性(n≥5)。误差棒表示SEM。**P<0.01、***P<0.001、Dunnett's检验；†††P<0.001；Student t检验。(A)中，星号表示与任意神经元均没有被去除、抑制的野生型对照株比较的、统计学上的显著性差异。

[0082] 图28为示出AWA神经元对各种二乙酰浓度的应答的图。(A)被指示的基因型的线虫的由低浓度的二乙酰(10-5稀释)引起的刺激后的AWA神经元的钙应答。曲线周围的阴影区域表示SEM(对于全部基因型，n≥8)。黑色棒表示二乙酰刺激存在的情况。(B)添加低浓度的二乙酰(10-5稀释)后10秒后的平均荧光变化。误差棒表示SEM。**P<0.01、Dunnett's检验(对于各基因型，n≥8)。黑色为WT，红色为sri-14突变体，蓝色为odr-10突变体。(C)被指示的基因型的线虫的由高浓度的二乙酰(10-3稀释)引起的刺激后的AWA神经元的钙应答。数据与(A)同样地显示(对于全部基因型，n≥8)。(D)添加高浓度的二乙酰(10-3稀释)10秒后的平均荧光变化。误差棒表示SEM(对于全部基因型，n≥8)。

[0083] 图29为示出ASH神经元对各种二乙酰浓度的应答的图。(A)野生型线虫的低浓度(10-5稀释)和高浓度(10-3稀释)的二乙酰刺激后的ASH神经元的钙应答(n≥11)。(B)sri-14突变体(n＝26)、odr-10突变体(n＝28)、伴随着sri-14cDNA的ASH特异性表达的sri-14突变体(sri-14拯救、n＝9)和对sri-14进行ASH特异性地RNAi的野生型线虫(n＝20)中的ASH神经元的钙应答。曲线周围的阴影区域表示SEM。黑色棒表示存在二乙酰刺激的情况。(C)添加高浓度二乙酰(10-3稀释)10秒后的平均荧光变化。误差棒表示SEM。*P<0.05、Dunnett's检验(n≥11)。

[0084] 图30为unc-13突变体和破坏了AWA的线虫中的ASH神经元的钙成像的图。野生型(A,N＝14)、unc-13突变体(B,N＝14)和破坏了AWA的线虫(C,N＝11)中的高浓度的二乙酰(10-3稀释)刺激后的ASH神经元的钙应答。unc-13突变体和破坏了AWA的线虫中，与野生型线虫神经元相比，观察到长时间持续的钙应答。曲线周围的阴影区域表示SEM。黑色棒表示存在二乙酰刺激的情况。(D)添加高浓度二乙酰10秒后的平均荧光变化。误差棒表示SEM。来自对照的显著性差异由(*P<0.05、Dunnett's检验)表示。

[0085] 图31为示出AWC神经元对高浓度二乙酰的去除的应答的图。野生型中的高浓度二乙酰(10-3稀释)去除后的AWC神经元的钙应答(N＝10)。曲线周围的阴影区域表示SEM。黑色棒表示存在二乙酰的情况。

[0086] 图32为示出AWB神经元对高浓度或低浓度的二乙酰去除的应答的图。(A)野生型线虫(茶色、n＝10)或AWB神经元中使sri-14异位表达的线虫(橙色、n＝11)中的、低浓度(10-5稀释、左)或高浓度(10-3稀释、右)的二乙酰去除后的AWB神经元的钙应答。曲线周围的阴影区域表示SEM。黑色棒表示二乙酰存在的情况。(B)去除二乙酰10秒后的平均荧光变化。白色棒、野生型;橙色棒、AWB中使sri-14异位性表达的株。误差棒表示SEM。***P<0.001、Student t检验(n≥10)。

[0087] 图33为依赖于气味的浓度的嗅觉受体的开关的模型图。对于低浓度二乙酰,AWA神经元中的ODR-10而不是ASH神经元中的SRI-14作为二乙酰受体发挥功能,引起AWA的活化和引诱行为。作为对照,高浓度二乙酰由ASH神经元中的SRI-14感知,但不由AWA神经元中的ODR-10感知。ASH神经元仅由高浓度二乙酰活化,诱导驱避行为。AWA也对高浓度二乙酰应答,但其示出ODR-10以外的嗅觉受体在AWA神经元中产生应答。

[0088] 图34为示出N2株和基因突变株对各种癌患者的尿的趋性的图。

[0089] 图35为示出N2株和基因突变株对各种化学物质的趋性的图。

[0090] 图36为示出嗅觉受体敲除株对乳腺癌患者的尿的趋性的图。

[0091] 图37为通过线虫的趋性试验确定癌种类的方法的示意图。

具体实施方式

[0092] 以下,详细说明本发明。

[0093] 1.概要

[0094] (1)癌的检测

[0095] 本发明为一种癌的检测方法,其特征在于,在来自测试对象的生物体相关物质或其处理物的存在下饲养线虫,例如以基于线虫的嗅觉的趋化性等作为指标来检测癌。

[0096] 本发明人关注于,检查测试对象是否患癌时,作为一个方案的基于线虫C.elegans对来自测试对象的样品的嗅觉的趋化性。

[0097] 作为线虫的秀丽隐杆线虫(Caenorhabditis elegans、以下,也称为“C.elegans”)作为生物研究的模型生物,是在全世界研究室中被广泛饲养、研究的普及的生物,具有容易饲养、且嗅觉优异的特征。

[0098] 线虫对于气味物质显示出靠近、逃避之类的趋化性,因此,本发明中,以该行动作为指标,考察线虫对癌的气味的反应。

[0099] 考察线虫对健康人和癌患者的尿的反应,结果对于健康人的尿显示出驱避行为,对癌患者的尿显示出引诱行为,考察了30个样品,其精度为100%(图1)。

[0100] 另外,对包括早期癌的、胃癌、结肠·直肠癌、胰腺癌全部有反应,因此表明,与癌探知犬的行为同样地,对于各种癌共通的、癌特有的气味有反应。

[0101] 因此,本发明中,可以将胃癌、结肠·直肠癌、食道癌、胰腺癌、前列腺癌、胆管癌、乳腺癌、恶性淋巴瘤、消化道间充质性肿瘤、盲肠癌、肺癌等癌种类作为检测的对象。

[0102] 使用该线虫的癌诊断系统如以下所述可以解决以往的大部分问题。

[0103] (i)能够检测早期癌。

[0104] 对于0期、1期的早期癌，也能够以高精度进行检测。对于在采集尿的时刻(2011年)用现有的肿瘤标记物判断为阴性的样品，在该试验中显示阳性。该患者在病程观察中的2年内癌发病。即，可以通过本发明检测用现有的肿瘤标记物无法检出的癌。

[0105] (ii)能够以单一检查诊断多种癌的存在。即，能够在一次诊查中对于多种癌进行诊断。至此，确认对于胃癌、结肠·直肠癌、食道癌、胰腺癌、前列腺癌、胆管癌、乳腺癌、恶性淋巴瘤、消化道间充质性肿瘤、盲肠癌、肺癌能够检测。

[0106] (iii)为高灵敏度。

[0107] 30个样品的试验中，能够以100％的灵敏度·特异性进行检测。进而，即使进行中规模试验(242个样品)，对于癌患者也能够以100％的灵敏度·95％的特异性进行检测。

[0108] (iv)样品的采集容易。

[0109] 尿样品的采集中，不规定饮食限制等特别的条件，可以使用通常的定期诊查中采集的尿样品进行解析。因此，测试对象能够在不伴随痛苦的情况下与其他尿检查同时地采集样品。所需的尿的量为数μl即可。

[0110] (v)解析廉价且能够容易进行。

[0111] (v-1)快

[0112] 能够在短时间内进行解析。线虫的趋化性的解析可以在1个半小时左右进行。使用转基因线虫的嗅觉神经的应答的解析可以在30分钟左右进行。

[0113] (v-2)廉价

[0114] 例如，每1个样品，线虫饲养用培养皿2个(1个约10日元)、趋性解析用培养皿3～5个(1个约10日元)。对于琼脂，每1个培养皿各为2.5日元、10日元。加上其他试剂每1个样品也为100日元左右。加上人工费也能够非常廉价地进行解析。

[0115] (v-3)解析容易，无需专门的技术。

[0116] 线虫的趋性解析非常容易，谁都可以进行。线虫的饲养也容易。对线虫无需特别的训练，可以使用通常饲养的线虫进行解析。

[0117] (v-4)能够进行多样品的解析

[0118] 每1人实验者1天内可以以150次左右的次数进行趋性解析。每1个样品解析3次趋性时，1天内可以解析50个样品。也可以将该作业自动化。

[0119] (vi)实用化容易、能够在全世界导入

[0120] (vi-1)系统整体廉价且容易导入

[0121] 线虫的饲养无需特别的房间。所需的仪器仅为20℃培养箱和实体显微镜，能够以廉价且短时间构筑系统。

[0122] (vi-2)可以在全世界导入

[0123] 无需昂贵的测定仪器，因此，不仅可以导入发达国家还可以导入全部国家。

[0124] (vii)能够应用于癌治疗后的复发诊断

[0125] 能够检测所有部位的癌，因此，能够应用于术后复发的可能性判断。

[0126] 由以上可知，本发明作为测试对象的痛苦少、能够简单且廉价地进行操作、能够以多个人为对象实施的、高精度的新的癌诊查法是有用的。

[0127] (2)嗅觉受体的鉴定

[0128] 气味由嗅觉神经上的嗅觉受体接收。人存在约350种的嗅觉受体，据说能识别约1万种的气味。相对于气味的种类绝对地少的受体，如何能够识别庞大种类的气味尚不清楚，但为了阐明其原因，必须明确气味与受体的对应关系。然而，这样的尝试仅部分进行，特别是生物体内的对应关系基本不清楚。

[0129] 对于线虫C.elegans，生物体内的解析优异，嗅觉神经仅为10个左右(人约为500万个)，神经回路全部被鉴定，进而感到气味的构造与哺乳类基本相同，因此，考虑为嗅觉研究的模型生物。线虫的嗅觉受体与哺乳类同为7次跨膜型G蛋白共轭型，预测基因组上有1200个以上。然而，清楚与气味的对应关系的受体仅有1个(二乙酰受体的ODR-10)，如何接受气味信号尚不清楚。

[0130] 于是，本发明人进行了如下网罗性筛选：通过RNAi在线虫体内抑制嗅觉受体基因的功能、考察该个体对11种气味显示出何种反应。选取对气味的反应带来变化的基因，重复解析。其结果，对于所考察的气味，全部成功地得到了候补基因(图22B)。

[0131] 接着，为了阐明所得候补基因是否真正在生物体内作为嗅觉受体发挥功能，本发明人关注于，对即使是同一气味的嗜好性(好恶)也因浓度而发生变化的现象，进行了解析。对于人，经验上已知的是，嗜好性因气味的浓度而发生变化，例如吲哚为低浓度时，发出茉莉的香味，高浓度时，发出粪尿气味。线虫也观察到同样的现象，本发明人通过以往研究阐明了活化的嗅觉神经的种类因气味的浓度而发生变化，由此，嗜好性发生变化(Yoshida,K.et al.:Nature Communications 3,739(2012))。那样的话，对于同一气味，根据浓度不同而反应的受体可能发生变化。为了对该颇有意思的疑问进行解析，本发明人着眼于，作为参与高浓度二乙酰的接受的物质而得到的sri-14基因。sri-14功能降低型突变体对低浓度二乙酰的反应为正常，而仅对高浓度二乙酰的反应显示出异常。另一方面，已知的二乙酰受体ODR-10的突变体仅对低浓度的二乙酰的反应降低(图24A)。已经报道了，ODR-10在接受喜欢的气味的AWA嗅觉神经中发挥功能(Sengupta,P.et al.:Cell 84,899-909(1996))，通过sri-14的表达解析、表现型回复实验、神经特异的基因表达抑制实验，可知，SRI-14在接受厌恶的气味的ASH感觉神经中发挥功能(图24)。另外，观察到SRI-14局部存在于嗅觉受体存在的感觉纤毛中(图24G)。

[0132] 此处，基因表达抑制实验例如可以举出：利用RNAi的抑制、利用反义核酸的抑制、基于显性失活型突变基因的表达的抑制等，优选利用RNAi的抑制。

[0133] 接着，使用钙成像来观察AWA、ASH感觉神经对二乙酰的应答。AWA神经对低浓度、高浓度的二乙酰均应答，但odr-10突变体中，未见对低浓度二乙酰的应答(图28)。sri-14突变体中为正常。另一方面，ASH感觉神经仅对高浓度二乙酰显示应答，该应答在sri-14突变体中显著降低。odr-10突变体中为正常(图29)。进而，使sri-14在对二乙酰不应答的其他感觉神经AWB中异位表达时，AWB对高浓度二乙酰变为强应答(图32)，因此，强烈暗示了，SRI-14作为二乙酰受体在生物体内发挥功能。由以上的结果可知，对于同一气味根据浓度不同而分开使用受体，低浓度二乙酰由位于AWA神经的ODR-10接受而感到喜欢，高浓度二乙酰由位于ASH神经的SRI-14接受感到厌恶(Taniguchi,G.et al.:Science Signaling 7,ra39(2014))(图33)。

[0134] 线虫为与犬具有基本同等数量的嗅觉受体的嗅觉优异的生物，因此，如毒品探知犬那样，有灵敏度良好地识别有害的物质、有益的物质的气味的可能性。上述情况下，根据

本研究的成果，能够鉴定这些气味的受体。如果明确气味与受体的对应关系，则预测能够开发以其结合作为模型的人工气味感受器，将来使用线虫的嗅觉解析作为广泛对社会有贡献的解析是有用的。

[0135] 2.检测方法

[0136] (1)线虫

[0137] 本发明的方法中使用的线虫为土壤独立生活线虫的一种，作为生物研究的模型生物被广泛用于研究。本发明的方法中使用的线虫无论雌雄均可，在能够通过自体受精进行增殖的方面，优选雌雄同体的线虫。另外，本发明中使用的线虫可以在培养皿中以大肠杆菌作为饵进行饲养，饲养容易。如果将母体事先移至培养皿，则4天后产子而生长至成虫，个体数增加至50～100倍。其间，可以事先放入培养箱中放置，无需特别的操作。使用雌雄同体时，也无需交配等操作。饲养所需的设备为20℃培养箱和实体显微镜，系统的启动可以在短时间内廉价地进行。

[0138] 作为本发明中使用的线虫，例如野生型线虫的情况下，可以举出秀丽隐杆线虫(Caenorhabditis elegans)，优选使用C.elegans Briostol N2株的雌雄同体，也可以使用缺失了各种基因的基因突变株。这些线虫例如可以由Caenorhabditis Genetic Center(CGC)获得。

[0139] 本发明中，除了上述线虫(野生型线虫)之外，可以使用突变型线虫、转基因线虫。转基因线虫可以举出在线虫的嗅觉神经AWC、AWA中导入了指示基因的线虫、抑制了参与癌的气味的接受的基因(受体基因)的表达或功能的线虫、使参与癌的气味的接受的基因(受体基因)高表达或高功能化的线虫、为了使线虫的行为解析容易进行而使荧光蛋白质在各细胞中表达的线虫等作为例子，但不限定于这些，以导入了外来基因的全部转基因株作为对象。

[0140] 本发明中，构筑在线虫的规定的启动子的紧接下方连接有目标基因的DNA，将其微量注射至线虫的野生株、基因突变株(例如生殖腺)。由此，可以制作能够使外来基因稳定地传代的转基因线虫。钙浓度上升表示，神经活化，因此，例如使用能够测定神经内钙浓度的指示基因，可以以钙浓度的变化作为指标检测癌。

[0141] 作为用于在AWC中使表达而使用的启动子，例如可以举出：odr-1启动子(Yu,S.,Avery,L.,Baude,E.&Garbers,D.L.Guanylyl cyclase expression in specific sensory neurons:a new family of chemosensory receptors.Proc Natl Acad Sci U S A 94,3384-3387(1997).)等。odr-1在AWC和AWB(与AWC不同的嗅觉神经)中表达诱导。

[0142] 另外，作为用于在AWA中使其表达而使用的启动子，例如可以举出：odr-10启动子(Sengupta,P.,Chou,J.H.&Bargmann,C.I.odr-10encodes a seven transmembrane domain olfactory receptor required for responses to the odorant diacetyl.Cell 84,899-909(1996).)。已知odr-10仅在AWA中表达诱导。

[0143] 这些启动子的碱基序列信息例如可以由登记编号Z68118、FO080931获得。另外，启动子也可以如下获得：将线虫基因组DNA纯化，以其作为模板，通过PCR进行扩增而获得。

[0144] 作为钙指示基因，可以举出：Yellow Cameleon(YC)基因(Nagai,T.,Yamada,S.,Tominaga,T.,Ichikawa,M.&Miyawaki,A.Expanded dynamic range of fluorescent indicators for Ca(2+)by circularly permuted yellow fluorescent proteins.Proc

Natl Acad Sci U S A 101,10554-10559(2004).)、GCaMP基因(Nakai,J.,Ohkura,M.&Imoto,K.A high signal-to-noise Ca2+probe composed of a single green fluorescent protein.Nat.Biotechnol.19,137-141(2001).)等,这些基因例如可以由登记编号AB178712、HM143847获得碱基序列信息。另外,这些基因也可以由addgene获得。

[0145] 在启动子紧接下方连接指示基因的方法、显微注射法等在本领域是公知的,例如可以参照"Molecular Cloning:A Laboratory Manual(4th Edition)"(Cold Spring Harbor Laboratory Press(2012))等。或者,在线虫的生殖腺中注入DNA溶液可以通过公知手法进行(Mello,C.C.,Kramer,J.M.,Stinchcomb,D.&Ambros,V.Efficient gene transfer in C.elegans:extrachromosomal maintenance and integration of transforming sequences.EMBO J 10,3959-3970(1991).)。

[0146] 突变型线虫是指,例如野生型线虫的基因组中产生多型的线虫、对癌种类各自的气味缺失了嗅觉受体的突变体等(后述的实施例中说明)。

[0147] (2)来自测试对象的生物体相关物质或其处理物

[0148] 本发明中使用的试样为来自测试对象(健康人、癌患者、疑似癌的患者等、动物)的生物体相关物质。"生物体相关物质"是指,从测试对象采集的生物体试样,例如可以举出:体液(尿、汗、唾液、便汁)、细胞(活检细胞等)、癌组织(活检组织、组织切片等)血液、呼气等。本发明中,可以使用这些生物体试样本身,优选使用生物体相关物质的处理物。"处理物"是指,对生物体相关物质以物理的方式和/或化学的方式进行了处理的样品。

[0149] 尿等体液样品中包含固体物、沉淀物。例如尿也可以直接使用采集了的样品,但必须通过细的管供于线虫,因此,优选进行过滤器去除处理(例如pore size 0.22μm,MillexGP,Merck Millipore)。通过这样的过滤器实施了固体物的去除处理的尿样品包含于上述"处理物"。需要说明的是,本发明人通过预实验确认了通过过滤器处理,线虫的反应(对尿的引诱行为)没有发生变化(图9)。

[0150] 与上述同样地,使用细胞(例如利用活检的癌细胞)作为生物体相关物质时,通过离心分离、过滤等从细胞培养后的培养物中去除细胞破碎物等固体物,得到固体物去除后的培养上清液作为处理物。

[0151] 另外,本发明中,除了上述试样之外,还可以使用癌细胞或癌组织(活检组织、组织切片等)的保存液。作为保存液,例如可以举出:生理盐水、缓冲液、福尔马林、DMSO等,但不限定于这些。保存液包括冷冻保存中一般使用的冷冻保存用保存液,冷冻保存后进行融解从而可以使用。

[0152] (3)利用了线虫的嗅觉的检测

[0153] 首先,为了得到检测所需的线虫而使其增殖。

[0154] 将数只线虫(成虫)放置于培养皿(接种有大肠杆菌的NGM培养基),以15～25℃、优选20℃饲养3～6天、优选4天。由此,以下一代的线虫为300～500只左右培育至成虫。

[0155] 接着,制作实际用于进行检查的培养皿。将培养皿制成图2那样的形式,在4个点放置(添加)叠氮化钠(NaN_3)。叠氮化钠是为了将线虫麻醉而无法移动的物质,添加量在1M浓度下为0.2～3μl、优选为0.5μl。

[0156] 将培养皿中接种的大肠杆菌通过清洗缓冲剂去除,在培养皿中放置(添加)生物体相关物质或其处理物的样品。使用尿作为样品时,尿样品也可以使用原液,也可以将所采集

的尿例如通过灭菌水、缓冲液等稀释至1.5～1000倍。稀释倍率优选为10倍。培养皿中添加的尿样品为0.5～10μl，优选为1μl。

[0157] 在如此准备的培养皿的中心放置线虫。

[0158] 将线虫饲养(任其自由行为)规定时间(1小时左右)。室温为23℃±1℃。

[0159] 经过规定时间后，计数+侧的个体数、-侧的个体数，计算趋化指数(chemotaxis index)(下述式)。将+侧的个体数设为N(+)、-侧的个体数设为N(-)时，变为

[0160] 趋化指数＝N(+)-N(-)/全部个体数。

[0161] 之后，以正向应答或负向应答作为指标来检测癌。

[0162] “正向应答”是指，线虫对于样品为“喜欢”或“有兴趣”，“负向应答”是指，线虫对于样品为“厌恶”或“没有兴趣”。

[0163] 以趋化性作为指标时，正值(+)表示正向应答(正的趋化性、喜欢)，负值(-)表示负向应答(负的趋化性、厌恶)。

[0164] 趋化指数取+1～-1的值，被引诱时取正值，驱避时取负值。

[0165] 每1个样品可以进行1次解析，但可以通过进行多次解析来计算趋化指数值的平均值，从而提高值的精度。通过解析得到的值(进行多次时为其平均值)为正值时，可以预先或确定地判断为癌或有癌的风险(可能性)。判断“为癌”时，例如可以作为癌的确定诊断或预先诊断的辅助资料使用，判断“有癌的风险”时，例如可以作为健康诊断、癌的初诊等中用于怀疑有癌的辅助资料使用。

[0166] 线虫对气味的反应也可以以趋化性以外的行为、生物体反应作为指标来检测。例如可以举出：线虫朝向气味的浓度变高的方向改变方向的风向标行为(Iino&Yoshida,The Journal of Neuroscience,2009)；气味的浓度变低时引起的回转行为(Pierce-Shimomura et al.,The Journal of Neuroscience,1999)；身体的弯曲度(Luo et al.,Journal of Neurophysiology,2008)；神经的应答等。

[0167] 风向标行为中，“正向应答”是指，线虫向样品的方向改变方向。另外，回转行为中，如果在样品从高浓度改变为低浓度时回转，则可以说线虫进行了“负向应答”。身体的弯曲度的情况下，头部和尾部之间的距离长时，可以说采取了“正向应答”。

[0168] (4)利用了基因重组线虫的检测

[0169] (i)对于利用基因重组线虫的检测，也可以如上述那样进行，使用在线虫的嗅觉神经AWC、AWA中使能够测定神经内钙浓度的指示基因表达的转基因线虫，以钙浓度的变化(神经的应答)作为指标进行检测。该方法可以以线虫数个个体进行解析，因此，有培养线虫所耗费的成本低、可以在短时间内进行的优点。

[0170] 将使用Yellow Cameleon基因作为指示基因时的测定原理示于图3。

[0171] 测定中使用的指示蛋白质为如下融合蛋白：将钙结合蛋白质CaM和CaM结合的靶的M13连接，在其两端连接有CFP、YFP的融合蛋白(被基因编码，能够以遗传学的方式在生物体内使其表达)。钙浓度低时，CaM与M13分离，CFP和YFP也位于被分离的位置(左图)。因此，提供激发CFP的光时，自CFP发出蓝色的光。另一方面，钙浓度变高而CaM与M13结合时，CFP和YFP靠近，在两者之间产生荧光共振能量转移(或Forster共振能量转移)(FRET)。如此，即使提供激发CFP的光，也自YFP发出黄色的光(右图)。因此，如果同时测量蓝色光、黄色的光，计算其比，则可知钙浓度变化。

[0172] 将使用GCaMP基因作为指示基因时的测定原理示于图4。

[0173] 指示蛋白质为如下融合蛋白质:形成将CaM和M13与GFP连接而成的结构的融合蛋白。该蛋白质也通过基因被编码,能够以遗传学的方式在生物体内使其表达。钙浓度变高而与CaM结合时,GFP的荧光强度上升。因此,如果测定GFP的荧光,则可知钙浓度的变化。

[0174] 本发明中,线虫的嗅觉神经对于来自测试对象的生物体相关物质或其处理物的应答大时,即钙浓度变化大时,判定测试对象为癌、或有癌的风险。此处,“嗅觉神经的应答大时”和“钙浓度变化大时”中的“大时”是指,与对照(来自健康人的生物体相关物质或其处理物)相比,给予来自测试对象的生物体相关物质或其处理物作为刺激时的、荧光强度比(ratio=YFP/CFP)的变化、或GFP的荧光强度变化显著大。

[0175] (ii)将在嗅觉神经中使钙指示子表达的线虫个体放入树脂制(例如二甲基聚硅氧烷(PDMS)树脂制)的芯片中(图5)。图5中,PDMS树脂制的芯片中形成有:夹持线虫的部分和4个流路。

[0176] 灌流装置(WPI公司。Multi Channel Perfusion System MPS-2等)中通过切换1～4的流路(图6),进行尿刺激的ON、OFF(Chalasani,S.H.et al.Dissecting a circuit for olfactory behaviour in Caenorhabditis elegans.Nature 450,63-70(2007);Chronis,N.,Zimmer,M.&Bargmann,C.I.Microfluidics for in vivo imaging of neuronal and behavioral activity in Caenorhabditis elegans.Nat Methods 4,727-731(2007).)。

[0177] 图6为示出芯片内的流路的切换的图。在流路1、2和4中预先放入缓冲剂,在流路3中预先放入尿。流路2和3通常预先设为ON。流路1为ON、且流路4为OFF时,对线虫不给予尿刺激。将流路1设为OFF、流路4设为ON时,对线虫给予尿刺激。

[0178] AWC嗅觉神经为对“有气味”→“无”反应的神经(嗅觉-OFF反应),因此,观察从有尿的状态变为无尿的状态时的反应。与其相反地,AWA神经为对“无气味”→“有”反应的神经(嗅觉-ON反应),因此观察从无尿的状态变为有尿的状态时的反应。

[0179] 然而,即使为健康人的尿,线虫的嗅觉神经也弱地反应,因此,优选准备对照的尿(健康人的尿),对相同的线虫个体依次给予对照尿、检体尿,根据其反应的强弱的差异来进行癌的检测。

[0180] (iii)使用荧光显微镜(Leica DMI3000B等),以物镜(40倍)取得荧光图像。例如每200ms进行图像的取得,可以通过显微镜、透镜等而适当变更。Yellow Cameleon的情况下,必须分成2个波长的图像而取得,因此,照相机为能够同时取得2个波长的图像的照相机,例如优选为ORCA-D2digital camera(Hamamatsu Photonics K.K.)(此外具有同样的功能的照相机已经被销售)。GCaMP的情况下,只要能够取得1个波长的图像即可,因此,为能够取得GFP图像的一般的显微镜用照相机即可。

[0181] (iv)对于取得图像,将嗅觉神经的细胞体(最容易观察到变化的部位)作为ROI(注目区域)包围,使用软件(例如Molecular devices公司的Metamorph software)对各像素的荧光强度进行全部计算和图像制作。需要说明的是,也可以使用由各公司销售的其他软件。Yellow Cameleon的情况下,计算各像素的YFP/CFP比,计算ROI内的平均值。另外,GCaMP的情况下,计算ROI内的荧光强度的平均值。

[0182] 3.受体的鉴定

[0183] 本发明中,提供线虫的气味的受体的鉴定方法,其特征在于,使用线虫进行气味的

受体的鉴定。

[0184] 本发明的鉴定方法包括如下工序：抑制编码受体的基因的表达或功能的工序，检查该被抑制的线虫对气味的反应的工序。

[0185] 抑制嗅觉受体基因的表达或功能如前述那样可以举出：利用RNAi的抑制、利用反义核酸的抑制、利用显性失活型突变基因的表达的抑制等，优选利用RNAi的抑制。

[0186] 使用抑制了受体基因的表达的线虫，检查对来自各种癌的试样的气味的反应。由于某种癌种类而对气味没有反应时，可以判断受体为针对该癌种类的气味的受体。

[0187] 另外，所鉴定的受体的种类或者依赖于气味物质的浓度而不同。因此，检查对何种浓度的试样反应，可以鉴定针对高浓度的试样的受体和针对低浓度的试样的受体。

[0188] 嗅觉系统感知各种气味物质并应答。嗅觉受体在大部分的生物中为G蛋白(异三聚体鸟嘌呤核苷酸结合蛋白)结合型受体，与挥发性或可溶性气味物质直接结合。与哺乳动物的基因组相比，秀丽隐杆线虫(Caenorhabditis elegans)的基因组包括更多的推定上的嗅觉受体基因，这暗示了，线虫中对于受体-气味的关系，可能存在组合的复杂性。本发明人为了鉴定对特定的气味物质的应答所需的线虫的嗅觉受体，使用了RNA干扰(RNAi)筛选。通过该筛选，鉴定了与11个气味物质建立联系的194个候补嗅觉受体基因。进而，本发明人鉴定了SRI-14作为参与高浓度的二乙酰的感知的物质。通过拯救和神经元特异性的RNAi实验，证实了，SRI-14在特定的化学感觉神经元即ASH神经元(接受厌恶的气味、化学物质的线虫的感觉神经)中发挥功能，引起驱避应答。通过钙成像，示出ASH神经元仅对高浓度二乙酰应答，另一方面，其他种类的化学感觉神经元即AWA神经元(主要为接受喜欢的气味的线虫的嗅觉感觉神经)对低浓度和高浓度这两者有反应。SRI-14的功能的丧失妨碍ASH对高浓度二乙酰的应答，另一方面，ODR-10的功能的丧失减少AWA对低浓度二乙酰的应答。异位表达SPI-14的化学感觉神经元对高浓度的二乙酰应答。因此，线虫具有按嗅觉受体水平和感觉神经元水平区分的、浓度依赖性的气味感受性机制。

[0189] 一般来说，动物通过它们的嗅觉系统感知各种气味物质并应答。气味物质其大部分为挥发性化合物，通过嗅觉受体神经元(ORN)感知。ORN中，气味分子与嗅觉受体直接结合，接着，介由细胞内信号传递路径传递信息(1)。哺乳动物中，嗅觉受体为7次跨膜型G蛋白(异三聚体鸟嘌呤核苷酸结合蛋白)结合型受体(GPCR)家族的一员(2)，仅1个嗅觉受体型就存在于任意各个ORN中(3)。然而，尽管进行了以气味与受体的对应关系的鉴定为目的的各种研究，但是各个气味与受体的关系基本为未知的状态(4、5)。味(味觉(gestation))为类似的过程，参与可溶性化学物质的检测。

[0190] 秀丽隐杆线虫(Caenorhabditis elegans)为与气味(smell)和味道相关的化学感觉过程的分析(嗅觉、挥发性信号的检测、以及味觉、可溶性信号的检测)中使用的模型生物，通过已知对化学物质应答的、约13个感觉神经元来感知大量化学刺激(chemical cue)并应答(6、7)。简便起见，本发明人提及该化学感觉过程作为嗅觉，提及化学物质作为气味物质。预测线虫(C.elegans)基因组包括编码GPCR的超过1200个推定上的嗅觉受体基因，GPCR在化学感觉神经元中11个上可见表达(8)。这些观察结果表明，存在虽与嗅觉不同(3)但与哺乳动物的味道识别(10)类似的、各个ORN中多种类型的嗅觉受体(9)表达的可能性。然而，受体与气味物质或其他化学物质的关系仅针对对于二乙酰特异性的受体即ODR-10(11)和信息素受体(也为GPCR(12～14))进行了鉴定，尚不清楚通过线虫(C.elegans)的ORN

中的受体的它们的组合如何感知气味物质。

[0191] 与大部分动物同样地，线虫(C.elegans)还对特定的气味物质显示出嗜好性，通过AWA或AWC嗅觉神经元感知气味物质时，显示出对气味物质的引诱行为(attraction behavior)，通过AWB、ASH或ADL感觉神经元感知物质时，显示出驱避行为(6、15、16)。然而，一些神经元参与驱避行为和引诱行为这两者，例如，AWB神经元即如此(16)。本发明人等至此表明，线虫(C.elegans)中的、对同一气味物质的引诱应答或驱避应答依赖于气味物质的浓度(17)。这带来即使为同一气味物质也根据浓度不同而不同的嗅觉受体发挥功能的可能性。

[0192] 此处，本发明人表明，不同的嗅觉受体介导二乙酰的不同浓度，由此嗜好性变化。通过筛选气味-受体对，本发明人对11个气味物质鉴定了194个候补嗅觉受体基因。其中，本发明人鉴定了SRI-14作为对高浓度的二乙酰特异性应答的物质。本发明人的结果表明，对于二乙酰的接受，AWA神经元中的ODR-10对低浓度介导引诱应答，ASH神经元中的SRI-14对高浓度介导驱避应答。

[0193] 4.癌种类的确定

[0194] 本发明中，通过线虫趋性试验，可以确定癌种类。因此，本发明中，提供癌种类的鉴定方法，其特征在于，以线虫对来自测试对象的生物体相关物质或其处理物的气味的反应作为指标鉴定癌种类。

[0195] 由癌探知犬的研究，预测根据癌种类而气味不同。因此，线虫中，鉴定对癌种类各自的气味的嗅觉受体，制作使该受体变异的变异体。变异体可以举出：受体基因缺失了的株(缺失突变体)、抑制了受体基因的表达或功能的株、使受体基因高表达或高功能化了的株等。

[0196] 作为缺失突变体的制作法，可以举出：CRISPR/Cas9法(Friedland et al, Heritable genome editing in C.elegans via a CRISPR-Cas9system,Nature Methods, 2013)等。另外，制作：抑制了受体基因的表达或功能的株、使受体基因高表达或高功能化了的变异线虫。为了抑制表达或功能，可以举出：利用RNAi的抑制、利用反义核酸的抑制、利用显性失活型突变基因的表达的抑制等。为了使受体基因高表达或高功能化，有如下方法：将受体基因的启动子串联连接的方法；导入增强子的方法；多拷贝导入受体基因的方法；对受体的与气味、G蛋白的结合部位加入变异的方法；在控制受体的活化、局部存在、与气味的亲和性的部位加入变异的方法等。

[0197] 本发明的鉴定方法例如包括以下工序。

[0198] (a)首先，作为STEP 1，通过前述本发明的检测方法检测癌。例如，使用N2株，检查癌种类的有无。

[0199] (b)接着，作为STEP 2，使用各癌种类的受体的突变体、改变了受体基因的表达、功能的株，确定癌种类。

[0200] 前述工序(a)中，对于检测为癌的试样，使用缺失了前述所鉴定的嗅觉受体的突变体线虫、改变了受体基因的表达、功能的株，检查对气味的反应。

[0201] (c)前述变异体线虫与前述工序(a)中使用的线虫之间对气味的反应不同时，判定与所鉴定的受体对应的癌种类为鉴定的对象癌种类。

[0202] 例如，前述突变体线虫、抑制了受体基因的表达或功能的线虫中，判定不显示对气

味的反应的线虫中与所鉴定的受体对应的癌种类为鉴定的对象癌种类。或者，使受体基因高表达或高功能化了的线虫中，判定对气味的反应亢进的线虫中与所鉴定的受体对应的癌种类为鉴定的对象癌种类。

[0203] 例如，大肠癌的气味的受体突变体不显示引诱行为时，可以判断(诊断)为大肠癌(图37)。

[0204] 5.试剂盒和系统

[0205] 本发明提供包含线虫的癌的检测用试剂盒。本发明的试剂盒中包含线虫，可以包含为了实施本发明的检测方法所需的1种以上的成分。作为这样的成分，例如可以举出：缓冲液、培养液、叠氮化钠、大肠杆菌、培养皿、琼脂等。另外，本发明的试剂盒可以为仅包含所需成分中的一部分的部分试剂盒，上述情况下，使用者可以准备其他成分。另外，本发明的试剂盒中可以包括说明检测法或鉴定法的使用说明书。

[0206] 另外，本发明提供癌的检测系统，其具备：线虫；收纳生物体相关物质或其处理物和前述线虫的收纳部；和，探知前述收纳部的线虫的行为的探知部。

[0207] 图16A为本发明的系统的方框图。图16A中，本发明的系统具备：收纳生物体相关物质或其处理物和前述线虫的收纳部30；探知前述收纳部30的线虫对气味的反应的探知部10；和，对所探知的信息进行处理的处理部20。进而，本发明的系统可以具备：保存用前述处理部20处理的数据的保存部40。保存部40中具备用于癌检测的程序、数据库。

[0208] 收纳部30可以举出：培养皿、培养皿、具有微流路的芯片等，只要能够收纳线虫和试样就没有限定。

[0209] 本发明的系统包括：能够实时拍摄至少1只线虫的运动图像的至少1个探知部10。探知部10是取得线虫的图像、个体数、活动的轨迹等的数据的设备，具备：显微镜或照相机、例如荧光显微镜、数字显微镜、数字摄像机等。显微镜和照相机中可以具备能够追随线虫的活动的自动追尾(追踪)系统，追踪每1只或同时追踪多只线虫。然后，由其轨迹测定线虫的移动距离。或者，拍摄集合于规定的区域的线虫，计数个体数。另外，显微镜和照相机中也可以具备：能够检测荧光强度的传感器。

[0210] 本发明的系统中，可以根据实时的图像测定线虫的活动，也可以使用静止图像(照片)测定线虫的活动。实时拍摄线虫的图像时，可以动态探求线虫的位置。

[0211] 图16B为本发明的系统的处理部20的构成图。处理部20由计算单元110和数据库120构成，计算单元110具备：(i)检查条件设定单元111、(ii)线虫的反应检查单元112、(iii)癌的判定单元113和(iv)检查结果显示单元114。

[0212] (i)检查条件设定单元111

[0213] 检查条件设定单元111为通过GUI(图形用户界面(Graphical User Interface))用于由鼠标、键盘输入计算所需的条件的单元，所输入的信息可以通过图进行确认。

[0214] 通过检查条件设定单元，可以根据检查目的在本发明的系统中预先存储规定的条件。作为条件，例如有：线虫的个体数、线虫的特征、趋化指数的采用与否、测定时间等。

[0215] 线虫的特征包括：为缺失突变体；为抑制了基因表达等的株；为了测定而导入编码荧光蛋白质的基因(例如GFP基因、RFP基因等)等。但是，条件不限定于这些，可以根据检查目的而适当设定。

[0216] (ii)线虫的反应检查单元112

[0217] 线虫的反应检查单元112为如下单元：从检查条件设定单元111或数据库120选择用于检测或鉴定癌的计算式(例如趋化指数)，并且基于各个计算式，计算线虫的反应。该单元中，进行规定区域内的线虫的个体数的测定、1只线虫活动的总距离的测定、1只线虫发出的荧光强度的检测等，记录对测试样品反应的线虫的行为。例如，着眼于1只线虫，测定被样品引诱而移动时的距离，将各线虫的移动距离合计并求出总和。或者，向线虫中导入荧光蛋白基因时，测定对样品反应的线虫的荧光强度。也可以测定每1只线虫的荧光强度求出线虫的总和，可以在区域单位内测定由集中于一定区域的线虫整体发出的荧光强度。

[0218] (iii)癌的判定单元113

[0219] 癌的判定单元113为以线虫对气味的反应为基础检测癌的有无、或鉴定癌的种类的单元。

[0220] 采用个体数作为检查条件时，求出向检查对象区域移动的线虫的个体相对于向对照区域移动的线虫的个体数之比或之差等。采用移动距离作为检查条件时，求出与对照线虫的移动距离相比多几％则发生了反应，或者其差或比。如果预先将该差或比的一定值作为边界值进行设定，则该边界值可以作为癌的判定的判断基准使用。另外，采用荧光强度作为检查条件时，可以说与对照线虫的荧光强度相比多几％则发生了反应等，可以与上述移动距离同样地设定边界值。

[0221] 对比测定的数据、边界值和样品信息(癌种类的信息等)，判定是否为规定的癌。

[0222] (iv)判定结果输出单元114

[0223] 判定结果输出单元114为基于所检测或鉴定的癌种类或癌的有无、输出该信息的单元，显示癌种类和其概率(风险)。显示可以为图也可以为表。也可以显示通过上述(ii)计算得到的线虫的行为动画。

[0224] (v)数据存储单元

[0225] 将所输入的检查条件和检查结果建立联系并保存于作为数据存储单元的数据库120。

[0226] 所保存的检查条件和计算结果可以再次由数据库120、或由检查条件设定单元111和判定结果显示单元114读取。

[0227] 以下，根据实施例进一步具体地说明本发明。但是，本发明不限定于这些实施例。

[0228] [实施例1]

[0229] 癌的检测

[0230] (i)线虫的饲养

[0231] 将野生型线虫N2的成虫5～6只放置在6cm培养皿(接种了大肠杆菌的NGM培养基)中以20℃培养4天。以下一代的线虫为300～500只左右培育至成虫。

[0232] (ii)趋性解析

[0233] 在9cm培养皿中制成图2所示的形式，在4个点各放置0.5μl叠氮化钠(NaN_3)。

[0234] 在线虫饲养板中加入1ml清洗缓冲液(wash buffer)，将浮起的线虫与缓冲液(buffer)一起回收至试管。预先放置片刻，线虫向下沉降，因此，在沉降了的时候废弃上清。进而，在试管中加入1ml清洗缓冲液，在线虫沉降到下面的时候废弃上清。重复该清洗3次，去除大肠杆菌。

[0235] 在9cm培养皿的“+”位置，放置通过灭菌水稀释至10倍的尿样品各1μl。

[0236] 接着，在培养皿的中心放置线虫100只左右，饲养(任其自由行动)线虫1小时。在室温23℃±1℃进行。

[0237] 1小时后，计数+侧的个体数、-侧的个体数，计算趋化指数。

[0238] 每1个样品进行5次解析，计算5次量的趋化指数的值的平均值。

[0239] (iii)结果

[0240] 将结果示于图1。根据图1，来自健康人的对照尿(c1～c10)均显示出负(-)的趋化指数(驱避反应)，而来自癌患者的尿(p1～p20)均显示出正(+)的趋化指数(引诱)，可以以100％的精度检测癌。

[0241] 需要说明的是，图1中，误差棒表示SEM。

[0242] [实施例2]

[0243] 钙成像

[0244] 使用微流路的成像实验中，尿样品必须在薄的试管中流动，因此，通过离心和过滤去除尿中的沉淀物和固体物(孔径0.22μm，MillexGP，Merck Millipore)。为了监控AWC和AWA神经元，分别通过odr-1和odr-10启动子使Yellow Cameleon基因(YC3.60)在神经细胞中表达。钙成像利用公知方法进行(Uozumi，T.et al.Temporally-regulated quick activation and inactivation of Ras is important for olfactory behaviour.Sci Rep 2，500(2012)；Shinkai，Y.et al.Behavioral choice between conflicting alternatives is regulated by a receptor guanylyl cyclase，GCY-28，and a receptor tyrosine kinase，SCD-2，in AIA interneurons of Caenorhabditis elegans.J Neurosci 31，3007-3015(2011))。

[0245] 以可以将线虫的头部向微通道外露出的方式，将线虫固定于微通道(图5)。对于对照尿和来自癌患者的尿，分别使用同一线虫试验反应。

[0246] YC3.60的荧光图像使用Leica DMI3000B显微镜(40倍物镜)和ORCA-D2数码相机(Hamamatsu)取得。全部图像以曝光时间200ms取得。取得AWC或AWA神经的CFP和YFP的荧光强度，对于YFP的荧光强度相对于CFP的荧光强度之比，通过Metamorph软件(Molecular devices)进行解析。该荧光强度比以YFP强度/CFP强度(＝R)的形式计算，将10-s窗口的比的平均(-10-0s)设置为R0。

[0247] 对于来自癌患者的尿试验线虫的AWC和AWA嗅觉神经的反应，将结果示于图7、8。

[0248] 图7中，左边2个面板为使用对照尿进行了试验的结果，右边2个面板为使用来自胃癌患者的尿进行了试验的结果。图7为示出AWC嗅觉神经对尿刺激(有尿→无尿)的钙浓度变化(Yellow Cameleon的YFP/CFP比变化)的图。与健康人的尿(对照)相比，对癌患者的尿显著较强地反应。图8示出平均的荧光强度比(YFP/CFP比)的变化量。***为$p<0.001$表示有显著性差异。

[0249] 需要说明的是，本实施例中，尿中的沉淀物和固体物通过离心分离和过滤进行了去除，但通过该处理不会对线虫的趋化性造成影响(图9)。

[0250] 对于AWA嗅觉神经，也通过添加尿观察了应答(图10、11)。

[0251] 这些结果表明，为了识别对照尿和来自癌患者的尿，线虫的嗅觉神经发挥了重要的作用，由图7～11表明，可以利用线虫的嗅觉神经检测癌。需要说明的是，图8、9和11中，误差棒表示SEM。

[0252] [实施例3]

[0253] 本实施例中，作为来自测试对象的生物体相关物质的模型，使用建立的癌细胞株、和培养基或保存液，进行癌的检测实验。

[0254] (1)使用癌细胞株的癌的检测

[0255] 为了使用人癌细胞的培养上清进行癌的检测，使用SW480、COLO201和COLO205作为大肠癌(结肠直肠癌)细胞，使用MCF7作为乳腺癌细胞，使用NUGC4、MKN1和MKN7作为胃癌细胞。

[0256] SW480、COLO201和COLO205由独立行政法人医药基础研究所JCRB细胞库(Japanese Collection of Research Bioresources Cell Bank(Tokyo,http://cellbank.nibio.go.jp))获得，除此之外的细胞由东北大学老年医学研究所医用细胞资源中心(Cell Resource Center for Biomedical Research,Institute of Development,Aging and Cancer(Tohoku University,Sendai,Japan))获得。全部细胞株使用添加有10％FBS的RPMI 1640培养基、在37℃、在5％CO_2通风下以不融合的状态维持。将培养基上部的澄清层的培养液用于试验。培养细胞后的培养基点涂于试验板(图12)的“+”的位置。为了消除培养基本身的气味所产生的影响，在与培养了细胞的培养基的点涂位置处于相对侧的位置点涂以相同浓度稀释的对照的培养液(图12)。

[0257] 与实施例1同样地，在试验板上试验了线虫的趋化性，结果野生型线虫(C.elegans)对癌细胞的培养基(稀释至$1/10^6$～$1/10^7$)显示出引诱行为(图13)。

[0258] 图13中，各细胞中的左侧的棒为使用$1/10^6$稀释的癌细胞培养基的结果，右侧的棒为使用$1/10^7$稀释的癌细胞培养基的结果。另外，*为$p<0.05$，**为$p<0.01$，***为$p<0.001$表示有显著性差异(Dunnett's test)。另外，图13中，误差棒表示SEM。

[0259] 对于成纤维细胞(未被癌化的细胞)的培养液或保存液也与上述同样地进行试验，结果表明，线虫不显示引诱行为(弱的驱避)(图13)。这意味着，线虫对“人的细胞的分泌物”不显示引诱行为而对“癌细胞的分泌物”显示引诱行为。

[0260] MEM、EMEM、RPMI仅为培养基。KMST-6、CCD-112CoN为成纤维细胞(获得地分别为RBC、ATCC)。

[0261] (2)对成纤维细胞培养基和癌细胞培养基的趋性

[0262] 另外，研究了线虫对各种浓度的成纤维细胞培养基和癌细胞培养基的趋性、以及线虫对人的癌组织的趋性。手法如以下所述。

[0263] 将成纤维细胞培养基和癌细胞培养基用水稀释成各种浓度(原液～10-9)，观察野生型线虫对于其的趋化性。对于人的癌组织、健康组织，得到知情同意，在此基础上，从癌患者切除，将其细分为直径0.1～0.8mm并使用。

[0264] 其结果，对于成纤维细胞，对于任意浓度均不显示引诱行为，而对于癌细胞，在10-6、10-7的浓度下观察到显著的引诱行为(图17、18)。

[0265] 对于线虫对人的癌组织的趋性，对癌组织片显示出引诱行为，而对于相同患者的健康组织(距离癌组织最远的组织)显示出驱避行为(图19)。还可知，在单侧放置癌组织、在相对侧放置健康组织时，线虫向癌组织靠近。

[0266] (3)对于癌组织切片的生理盐水保存液的趋性

[0267] 将人的癌组织片放入生理盐水中，于-20℃保存(保存时间:3个月)。研究了线虫对

该生理盐水的稀释液的趋性。

[0268] 从癌患者得到知情同意，在此基础上将癌组织以直径0.5cm切除，加入至20ml的生理盐水中。将该生理盐水用水稀释至10-2～10-4的浓度，观察野生型线虫对其的趋化性。

[0269] 其结果，对于放入了癌组织的生理盐水显示引诱行为，而对于放入了健康组织的生理盐水显示驱避行为(图20)。

[0270] odr-3突变体对癌组织的食盐水不显示引诱行为，因此可以说线虫感到气味。

[0271] [实施例4]

[0272] 中规模试验

[0273] 为了确认本发明的方法为高精度，使用242个尿样品(218个对照样品、24个来自癌患者的样品)进行了试验(表1)。表1示出测试对象的背景。

[0274] 表1

[0275] 最终试验的参与者的背景特征

[0276]

	NSOT(+)						
	患癌2年前	患癌2年内	未发现癌	NSOT(+)	NSOT(-)	p-值 阳性相对于阴性	
n	19	5	11	35	207		
性别（男性）	12	3	2	17	87	0.68	NS
年龄（年）（中位数）	47.89(63)	53.70(60)	41.73(53)	41.86(66)	28.78(48)	1.3E-08	P<0.001
患癌史	0	0	0	0	6	0.07	NS
投诉							
咳嗽或痰	0	1	1	2	7	0.85	NS
食欲丧失	1	1	0	2	0	0.02	P<0.05
腹部不适	0	0	1	1	6	0.60	NS
不舒服	1	1	2	4	15	0.61	NS
胸闷	1	1	1	3	4	0.11	NS
肠紊乱	3	1	0	4	9	0.19	NS
头痛	0	1	3	4	12	0.36	NS
血性排出物	1	0	0	1	1	0.67	NS
怀孕	0	0	0	0	3	0.91	NS
饮酒习惯	6	1	1	8	81	0.07	NS
抽烟习惯	3	2	1	6	40	0.79	NS
除了癌以外的疾病							
高血压	11	4	1	16	32	3.3E-05	P<0.001
高血脂	6	0	0	6	17	0.16	NS
糖尿病	3	0	0	3	12	0.80	NS
高尿酸血症	1	0	1	2	6	0.73	NS
局部缺血性心脏病	0	1	0	1	3	0.91	NS
脑梗死	2	0	0	2	0	0.02	P<0.05
胶原病	0	0	0	0	1	0.31	NS
甲状腺病	0	0	0	0	2	0.67	NS
支气管哮喘	0	0	0	0	3	0.91	NS
胃十二指肠溃疡	0	0	0	0	1	0.31	NS
慢性胰腺炎	0	0	0	0	1	0.31	NS
慢性肝炎	0	0	1	1	4	0.77	NS
骨关节炎	0	1	1	2	4	0.46	NS
子宫肌瘤	0	0	0	0	2	0.67	NS
精神病	0	0	0	0	1	0.31	NS
眼科疾病	0	0	0	0	7	0.58	NS
实验数据							
WBC (×10³/μL) （中位数）	47-110 (65)	50-91 (57)	44-80 (56)	44-110 (56)	34-141 (60)	0.91	NS
Hgb (g/dl) (median)	5.1-17.2 (13.0)	13.2-16.7 (14.6)	9.3-15.3 (12.1)	5.1-17.2 (13.4)	8.4-17.6 (14.1)	0.02	P<0.05
Plt (X10⁴/μL) （中位数）	13.6-41.1 (28.5)	15.6-31.1 (18.5)	19.9-41.8 (24.2)	13.6-41.8 (21.4)	10.7-46.1 (23.2)	0.41	NS
尿肌酐 (mg/dl)（中位数）	0.32-1.63 (0.85)	0.25-0.77 (0.54)	0.10-1.28 (0.84)	0.10-1.63 (0.73)	0.12-2.56 (0.69)	0.04	P<0.05
CRP (>0.3 mg/dl)	5	0	1	6	17	0.16	NS
CEA (>5.0ng/ml)	5	1	0	6	8	0.002	P<0.01
抗p53 Ab(>1.30U/ml)	4	0	2	6	16	0.12	NS
DiAcSpm/ 男性 >243，女性 >354 (nmol/g·Cre)	4	0	0	4	10	0.12	NS
一些肿瘤标记物的阳性	10	1	2	13	34	0.004	P<0.01

[0277] 全部尿样品稀释至10倍，使用线虫的趋化性试验对各样品实施3次。

[0278] 其结果，线虫对来自癌患者的全部尿(24/24)显示出引诱反应，检测灵敏度为100％(图14)。另一方面，线虫对于大部分对照尿样品(207/218)显示出驱避行为(图14)。图14中，橙色棒(1、2、41、44、54、56、90、157、196、202、208、213、220、226、232-239和241-242

号)表示来自癌患者的样品,蓝色棒(上述以外的编号)表示对照样品。另外,图14中,误差棒表示SEM。

[0279] 本发明人还对于相同测试对象、对于其他肿瘤标记物也进行了解析。

[0280] 对于作为解析对象的肿瘤标记物,使用血清CEA、血清抗p53抗体(Anti-p53Ab)和尿N^1,N^{12}-二乙酰基精胺(DiAcSpm)。与这些肿瘤标记物相比,本发明的方法(NSDT)的灵敏度极高(图15、表2)。需要说明的是,灵敏度(%)为相对于来自癌患者的样品的阳性的比率。

[0281] 表2

[0282] 扩展数据表3最终试验中的肿瘤标记物的精确度

[0283]

	阶段	n	CEA	抗p53 Ab	DiAcSpm	某些TMs	NSDT
食道癌	0	1	0	0	0	0	1
	总计	1	0	0	0	0	1
胃癌	I	4	0	1	0	1	4
	IV	1	1	0	0	1	1
	总计	5	1	1	0	2	5
大肠癌	0	2	1	0	0	1	2
	I	1	0	0	0	0	1
	II	2	0	1	0	1	2
	III	4	1	0	1	2	4
	IV	1	1	1	1	1	1
	总计	10	3	2	2	5	10
乳腺癌	I	2	0	1	0	1	2
	II	3	1	0	0	1	3
	总计	5	1	1	0	2	5
胰腺癌	IV	1	1	0	1	1	1
	总计	1	1	0	1	1	1
胆管癌	I	1	0	0	1	1	1
	总计	1	0	0	1	1	1
前列腺癌	I	1	0	0	0	0	1
	总计	1	0	0	0	0	1
全部癌症	0	3	1	0	0	1	3
	I	9	0	2	1	3	9
	II	5	1	1	0	2	5
	III	4	1	0	1	2	4
	IV	3	3	1	2	3	3
	总计	24	6	4	4	11	24

灵敏度	阶段	CEA	抗-p53 Ab	DiAcSpm	某些TMs	NSDT
	0	33.3%	0.0%	0.0%	33.3%	100%
	I	0.0%	22.2%	11.1%	33.3%	100%
	II	20.0%	20.0%	0.0%	40.0%	100%
	III	25.0%	0.0%	25.0%	50.0%	100%
	IV	100%	33.3%	66.7%	100%	100%
	总计	25.0%	16.7%	16.7%	45.8%	100%
特异性		96.3%	86.2%	96.4%	83.9%	95.0%
阳性预测值		42.9%	17.4%	28.6%	23.9%	68.6%
效率		89.3%	83.9%	87.6%	80.2%	95.5%

[0284] 表2中,包括0期和1期的癌患者。这表明,本发明的方法对于早期癌的检测也是有用的。

[0285] [实施例5]

[0286] 尿的最适浓度的研究

[0287] 方法：

[0288] 对于健康人的尿样品3个样品(c1、c2、c3)、癌患者的尿样品5个样品(p2、p5、p8、p17、p18)，用水稀释至各种浓度(原液～10-5)，考察了野生型线虫对它们的趋化性。

[0289] 结果：

[0290] 根据图21表明，优选10倍稀释。图21中，对于各浓度所述的棒图，左侧3根柱表明使用来自健康人的尿时的结果，右侧5根柱表明使用来自癌患者的尿时的结果。

[0291] [实施例6]

[0292] 受体的鉴定

[0293] (1)材料和方法

[0294] 线虫培养和线虫株

[0295] 除与大肠杆菌(E.coli)OP50一起培养的eri-1突变体之外、在包含大肠杆菌(Escherichia coli)NA22作为食物源的线虫增殖培养基(NGM)板(36)上，在标准条件下以20℃培养线虫(C.elegans)。使用的野生型线虫为Bristol N2株。作为其他线虫株，使用GR1373:eri-1(mg366)、VC2123:sri-14(ok2865)、CX3410:odr-10(ky225)和MT7929:unc-13(e51)。

[0296] RNA干扰和趋化性分析

[0297] RNAi分析使用Ahringer文库(37)对eri-1(mg366)(19)通过利用饵的RNAi法(feeding RNAi法)进行。

[0298] 将9个个体的eri-1突变体的成虫放置于包含异丙基β-D-1-硫代半乳糖吡喃糖苷(0.19g/L)、氨苄西林(60mg/L)和大肠杆菌(E.coli)的NGM板上，培养4天。接着，将成虫用于趋化性分析。趋化性分析如以前所报道那样进行(6、17)。对于趋化性分析，本发明人使用分别1μl的经过10^{-3}或10^{-4}稀释的气味物质(低浓度)、或分别1μl和5μl的未稀释的气味物质(高浓度)的各实验中使用30～50个个体。

[0299] RNAi筛选结果的统计分析如以下那样进行。

[0300] 计算全部天数(表3)或每天的、来自2SD的各个单一试验的z分数和对照值。对于作为大的差的阈值，使用z分数(-1.96和1.96、$P<0.05$)。然而，1个受体的抑制不会引起显著的效果。因此，本发明人使用作为更弱阈值的z分数±1(-0.96和0.96、$P<0.33$)。

[0301] 渗透压驱避

[0302] 本发明人为了进行渗透压刺激而使用4M NaCl，对于渗透压驱避行为，如以前所报道那样进行分析(38)。

[0303] sri-14的功能的细胞特异的敲除

[0304] 用于敲除特异的神经元中的sri-14的功能的导入基因的构筑如以前所报道那样进行(24)。使用以下2个引物扩增sri-14的靶区域(1.6kb的基因组序列)。

[0305] Tf、5'-ggcgccgatataattgctaa-3'(序列号1)、和

[0306] Tr、5'-ctgctgcgtttttcgtatca-3'(序列号2)

[0307] 基因表达对于ASH通过sra-6(20)启动子进行，和对于AWC通过ceh-36(39)和srd-17启动子进行。

[0308] 神经元的遗传性去除和抑制

[0309] 本发明人为了去除AWA、AWB、AWC和ASH神经元的而使用小鼠的胱天蛋白酶-1(mCasp1)。它们分别通过odr-10(11)、str-1(15)、ceh-36(39)和sra-6(20)启动子表达。另外,为了抑制中间神经元,使用unc-103(gf)。unc-103(gf)的AIA-、AIB-、AIY-或AIZ-特异性表达分别通过gcy-28.d(29)、npr-9(40)、ttx-3(41、42)或lin-11(43、44)启动子进行。

[0310] sri-14cDNA的制备和扩增

[0311] 使用PureLink RNA迷你试剂盒(Ambion)分离的总量RNA按照制造商的说明书,通过使用gDNA Remover(Toyobo)的ReverTra Ace qPCR Master Mix转化为cDNA。使用下述2个引物扩增sri-14cDNA,用Nhe I和Kpn I消化,插入至pPD-DEST载体(Invitrogen)。

[0312] 5'-gagaGCTAGCaaaaaatgcctgcaggtccac-3'(序列号3)

[0313] 5'-gagaGGTACCttattgaattctcggttg-3'(序列号4)

[0314] 钙成像

[0315] 为了监控AWA、AWB、AWC和ASH神经元的应答,本发明人分别使用odr-10、str-1、odr-3和sra-6启动子(11、15、20、45),制作表达YC3.60的株。钙成像如以前所报道那样(33、46、47)使用微流体设备进行。对于使用微流体设备的实验,以线虫的鼻曝露于包含二乙酰[10^{-5}稀释(低浓度)和10^{-3}稀释(高浓度)]或没有气味的溶液的流水中的方式,在微通道中捕捉线虫,从而将各线虫固定。室温设定为20℃至23℃。YC3.60的荧光图像使用具备40×物镜和3CCD数码相机(C7780、Hamamatsu Photonics)的Zeiss Axioplan 2得到。全部图像将曝光时间设为200ms进行回收。捕捉AWA、AWB、AWC和ASH细胞体的时间堆叠,使用AquaCosmos软件(ver.2.6、Hamamatsu Photonics),对黄色荧光蛋白质(YFP)与青色荧光蛋白质(CFP)的发光比进行分析。其比以YEP强度/CFP强度(R)的形式计算,将10秒窗口(-10～0秒)内的平均比设定为R0。

[0316] (2)结果

[0317] 气味-受体对的RNA干扰筛选

[0318] 为了网罗性地鉴定对特定的气味物质的应答所需的嗅觉受体,本发明人进行了系统的RNA干扰(RNAi)筛选。对于线虫(C.elegans)中的神经元的RNAi,线虫(C.elegans)神经元对RNAi为低感受性(18),因此,在野生型线虫中不是有效的,因此使用RNAi增强型线虫株eri-1(mg366)(19)。

[0319] 本发明人确认了,通过eri-1突变体中的RNAi进行odr-10的敲除,显示出引起对低浓度(10-3稀释)的二乙酰的应答的特定的缺陷,该线虫株能够有效地用于嗅觉受体基因的RNAi筛选(图22)。筛选了编码包含SRH家族的、822个推定上的嗅觉受体的基因(全部基因编码GPCR)。并且,试验了经过RNAi处理的线虫对11个气味物质的应答。线虫(C.elegans)由于依赖于气味物质的浓度而嗜好性可能变化(17),因此进而还试验了对高浓度(未稀释的气味物质的各1μl和5μl)的气味物质(在低浓度下引起引诱行为)的应答。气味物质包括低浓度的6个引诱物质(6)、以高浓度诱导驱避的3个高浓度引诱物质(17)和高浓度的2个驱避物质(6、20)(图22)。

[0320] 针对对气味物质的化学感觉诱导性的运动应答显示出异常的RNAi处理线虫株,重复进行了试验(参照材料和方法)(表3)。第三次筛选的结果,以编码194个推定上的嗅觉受体的基因作为靶的RNAi对1个或多个气味物质引起比对照还弱的应答,因此,认为是编码嗅觉受体候补的基因(图22和表4)。

[0321] 感觉神经元中表达的基因有作为嗅觉受体发挥作用的可能性，因此考察了这些基因的表达模式。

[0322] 本发明人使用与编码各嗅觉受体的基因的启动子连接的荧光报告子，分析了进行敲除时在化学感觉诱导性的运动中显示出重大缺陷的、编码16个推定上的嗅觉受体的基因的表达模式(图22C和图23、A～L)。进而，19个嗅觉受体基因的表达模式使用WormBase(http://www.wormbase.org)中所记载的信息。这些35个基因中，30个在神经元中表达。通过报告子表达进行了分析的16个基因中的15个在参与气味感觉的感觉神经元中表达(表5)。

[0323] 对高浓度的二乙酰应答的嗅觉受体SRI-14的鉴定

[0324] ODR-10为二乙酰受体，odr-10突变体的对低二乙酰浓度的趋化性存在缺陷(11)。如以往所报道那样(11)，本发明人确认了odr-10突变体对高浓度二乙酰显示出正常的趋化性(图24A)。这暗示了，针对二乙酰存在其他受体，有ODR-10ui为低浓度特异性的可能性(21)。通过RNAi筛选，得到5个嗅觉受体候补基因(srh-25、srh-79、srh-216、srh-281和sri-14)作为涉及高浓度二乙酰的物质(表3和图25)。因此，本发明人使用上游启动子进行了表达解析，结果无法检测到srh-79和srh-216的表达，srh-25和srh-281的表达在不参与对高浓度的二乙酰的驱避行为的ADL感觉神经元中被观察到(表5)。因此，为了理解各种受体如何对单一气味物质产生浓度依赖性的反应，本发明人关注于sri-14。这是由于，以该基因为靶的RNAi在来自高浓度二乙酰的驱避中显著引起大的缺陷(图24B)。

[0325] SRI-14被具有7个外显子的基因所编码，根据WormBase，ok2685是预测为功能缺失的缺失突变体(图26A)。根据SRI-14的预测氨基酸序列(序列号5)可知，蛋白质具有推定上的7次跨膜结构域(图26、B和C)。高渗透压条件下的sri-14(ok2865)突变体的行为分析表明，线虫显示出正常的高渗透压驱避行为。然而，sri-14突变体与经过sri-14RNAi处理的线虫相同，对高浓度的二乙酰显示出驱避应答的缺陷(图24A)。进而，与odr-10突变体相比，sri-14突变体对高浓度二乙酰显示出特异性的趋化性的缺陷(图24A)。sri-14突变体对其他驱避物质和高浓度的其他引诱物质显示出正常的应答(图24C)。这表明，所考察的气味物质中，SRI-14仅参与高浓度二乙酰的感知。

[0326] 根据报告子表达解析可知，sri-14在AWC和ASH化学感觉神经元中进行表达(图24D)。在包含经过10倍稀释的二乙酰的大量引诱物质的感知中需要AWC神经元(22、23)，ASH神经元参与驱避物质(9)和高浓度的异戊醇(17)的驱避。为了阐明SRI-14是否对高浓度的二乙酰应答从而在AWC或ASH神经元中发挥功能，本发明人进行了在AWC和ASH神经元中sri-14的神经元特异性的敲除(24)。sri-14的ASH特异性的敲除在来自二乙酰的驱避中引起缺陷，但在AWC特异性的敲除中未见异常(图24E)。

[0327] 进而，来自高浓度二乙酰的驱避中的sri-14突变体的缺陷被sri-14cDNA的ASH特异性表达拯救，但通过AWA、AWB或AWC嗅觉神经元中的特异性表达，部分地拯救或未拯救(图24F)。这些结果表明，ASH感觉神经元中的SRI-14的功能为了介导来自高浓度二乙酰的驱避是必要且充分的。表明，对高渗透压条件的驱避应答通过ASH神经元介导(25、26)，该应答在sri-14突变体中是正常的(图26D)，ASH神经元的其他驱避刺激的感知和应答是正常的。此外，SRI-14-绿色荧光蛋白质(GFP)融合蛋白质局部存在于ASH神经元的感觉纤毛(图24G)。这表明，SRI-14作为ASH中的感觉纤毛中的嗅觉信号的因子发挥功能。

[0328] 参与依赖于气味物质的浓度的嗜好性变化的感觉神经元和中间神经元的鉴定

[0329] 低浓度的二乙酰(10^{-4}稀释溶液)由AWA神经元被感知(6),中间浓度(10^{-1}稀释溶液)由AWC神经元被感知(22、23)。它们均介导引诱。然而,尚未知何种感觉神经元感知高浓度的二乙酰(未稀释)而参与驱避应答。以前的研究中表明,ASH和AWB感觉神经元检测高浓度异戊醇(17)来介导驱避。进而,AWC和AWB神经元参与引诱和驱避两者(17、27)。

[0330] 因此,本发明人考察了对高浓度二乙酰的驱避应答中的ASH、AWB和AWC感觉神经元的参与。AWB或AWC以遗传的方式被去除的线虫不显示对高浓度二乙酰应答的趋化性的缺陷(图27A)。然而,去除ASH神经元时,该驱避行为被抑制(图27A)。这些结果表明,ASH神经元主要感知高浓度二乙酰浓度,这与表明SRI-14在ASH神经元中发挥功能的结果一致。

[0331] 为了考察AWA神经元是否介导二乙酰的驱避和对二乙酰的引诱,本发明人分析了AWA神经元特异性地被去除的线虫的行为应答。去除了AWA的线虫显示出来自高浓度二乙酰的驱避的降低(图24A)和对低浓度的引诱的降低(图27B)。其与对引诱和驱避这两者发挥功能的AWC和AWB神经元的能力类似(17、27)。AWA和ASH这两者的双重去除与单一去除相比,引起重大的缺陷,这表明,AWA和ASH对高浓度二乙酰的应答,并行地发挥作用(图27A)。

[0332] 为了阐明中间神经元对依赖于气味的浓度的嗜好性变化的贡献,本发明人考察了与AWA或ASH感觉神经元或两者的感觉神经元有直接的突触结合或间隙结合的AIA、AIB、AIY和AIZ中间神经元的参与(图27C)。通过带来超极化的unc-103(gf)的神经元特异性表达个别地抑制这些中间神经元(28、29)。对于AIA、AIY或AIZ中间神经元的功能性抑制,在曝露于高浓度二乙酰的线虫中将应答从驱避向引诱改变(图27D),AIB的抑制减弱驱避应答。其结果表明,这些中间神经元在气味的浓度依赖性的嗜好性变化中发挥重要的作用,与AIB、AIY和AIZ在对高浓度和低浓度的异戊醇的不同行为应答方面是重要这样以前的报道一致(17)。作为对照,对低浓度的二乙酰的引诱不受除了AIY之外的这些中间神经元的抑制的影响(图27E)。这暗示了,介导对低浓度二乙酰的引诱的神经回路与介导来自高浓度二乙酰的驱避的神经回路不同。

[0333] 依赖于气味浓度的嗅觉受体的分别使用

[0334] 由本发明人进行的线虫的行为实验的结果和以往的研究结果(11)暗示了,对二乙酰的浓度依赖性的嗜好性变化受2个类型的受体、AWA神经元中的ODR-10和ASH神经元中的SRI-14介导。因此,本发明人在野生型株、odr-10突变体和sri-14突变体中,通过使用以遗传的方式编码的钙指示剂即Yellow Cameleon(YC)3.60(30)的钙成像,监控了AWA和ASH神经元对各种浓度的二乙酰的的应答。

[0335] 对于野生型线虫或sri-14突变体中的AWA神经元,细胞内钙在曝露于低浓度的二乙酰后增加(29)(图28、A和B)。然而,odr-10突变体对低浓度二乙酰不显示应答(图28、A和B)。这与ODR-10在AWA神经元中作为对低浓度二乙酰特异性的受体发挥功能的发现一致(21)。作为对照,odr-10突变体和野生型线虫中,AWA神经元对高浓度的二乙酰正常地应答(图28、C和D)。这些结果与odr-10突变体对高浓度二乙酰显示出正常的趋化性的发现一致(图24A)。这些神经元的去除使引诱和驱避应答这两者减少(图27、A和B),因此,与这些结果组合时,暗示了,除了ODR-10以外的受体存在于AWA神经元,感知高浓度二乙酰。

[0336] 本发明人监控了ASH神经元中的一过性Ca2+应答。野生型线虫的ASH神经元中,仅对高浓度的二乙酰检测到Ca2+应答(图29A)。为了阐明ASH对高浓度二乙酰的应答是否受其

他神经元的影响，本发明人解析了突触小胞的胞外分泌中有缺失的、unc-13(e51)突变体的ASH中的Ca2+应答(31)。unc-13突变体的ASH神经元中的对高浓度的二乙酰的钙应答与野生型线虫的ASH神经元相比显著大，较长地持续(图30、A、B和D)。这表明，来自其他神经元的信号抑制ASH对二乙酰的活性。

[0337] 在AWA去除线虫中，观察到对二乙酰的应答变化(图27、A和B)，因此进而，本发明人试验了ASH神经元中的对高浓度的二乙酰的钙应答中的AWA去除的效果，发现AWA神经元的去除使ASH神经元的钙应答增强(图30、A、C和D)。这表明，AWA参与ASH的应答的抑制性回路。

[0338] 接着，本发明人监控了突变线虫的ASH神经元中的对高浓度二乙酰的Ca2+应答。对于Ca2+应答，在odr-10突变体的ASH神经元中正常引起，但在sri-14突变体的ASH神经元中，应答显著减少(图29、B和C)。sri-14突变体的ASH中的对高浓度二乙酰的应答的缺陷被野生型sri-14基因的ASH特异性表达拯救(图29、B和C)。进而，野生型线虫中，ASH特异性地敲除sri-14时，ASH对高浓度的二乙酰的Ca2+应答减少(图29、B和C)。这些结果表明，SRI-14在ASH神经元中作为用于接受高浓度二乙酰的主要的成分发挥功能。

[0339] sri-14的表达在AWC神经元以及ASH神经元中被观察到(图24D)，因此，本发明人监控了对高浓度的二乙酰的AWC应答。AWC中的Ca2+浓度的增加通过气味去除产生(32)。因此，本发明人在高浓度的二乙酰去除后试验了AWC神经元的应答，发现AWC神经元中引起Ca2+应答(图31)。该结果与二乙酰由AWC和AWA感知这样以前的报道一致(22,23)。然而，AWC的去除对来自高浓度二乙酰的驱避不产生影响(图27A)。这表明，AWC神经元的应答对二乙酰的驱避不重要。对高浓度的二乙酰的行为应答不受sri-14的AWC特异性表达或sri-14的AWC特异性敲除中任一者的影响(图24、E和F)，因此，认为存在介导AWC对高浓度二乙酰的应答的SRI-14以外的受体。

[0340] AWB神经元一般与驱避行为建立联系(15)。以前的研究中报道了，在壬酮或高异戊醇浓度去除后产生AWB神经元中的Ca2+应答(17、33)，因此，本发明人进行了AWB神经元中sri-14 cDNA的异位表达、监控了对各种浓度的二乙酰的Ca2+应答。

[0341] 野生型AWB神经元中，本发明人在低浓度或高浓度的二乙酰任一者中观察到在气味去除后微弱的Ca2+应答。与野生型AWB神经元中的该弱的应答相比，对高浓度二乙酰去除的AWB神经元中的Ca2+应答通过SRI-14的异位表达而显著增强。SRI-14异位表达不改变对低浓度的二乙酰去除的应答(图32、A和B)。该结果支持了SRI-14有助于高浓度的二乙酰的感知这样的我们的结论。同时，这些发现暗示了，AWA神经元中的ODR-10和ASH神经元中的SRI-14分别对低浓度和高浓度二乙酰应答，作为介导引诱和驱避行为的受体发挥功能(图33)。

[0342] (3)考察

[0343] 本发明人为了对特定的气味物质网罗性鉴定嗅觉受体使用了RNAi筛选。线虫(C.elegans)的嗅觉受体和嗅觉信号与哺乳动物的情况类似(23、34)，因此考虑为用于嗅觉解析的模型生物。进而，记载了能够追踪嗅觉信号在神经回路中传递的路径的全神经网络(35)。然而，未知大部分气味物质与特定的受体或受体低聚物的对应关系，也未知气味物质与嗅觉受体之间的相互作用的机制。作为结论，对于如何输入气味信号、嗅觉信号如何在神经回路上传递、线虫(C.elegans)中的少量ORN如何能够识别非常多的气味物质，尚不理解。通过RNAi筛选得到的受体候补的进一步的解析是为了鉴定与特定的气味物质相关的嗅觉

受体，从而有助于这些机制的理解而起作用。

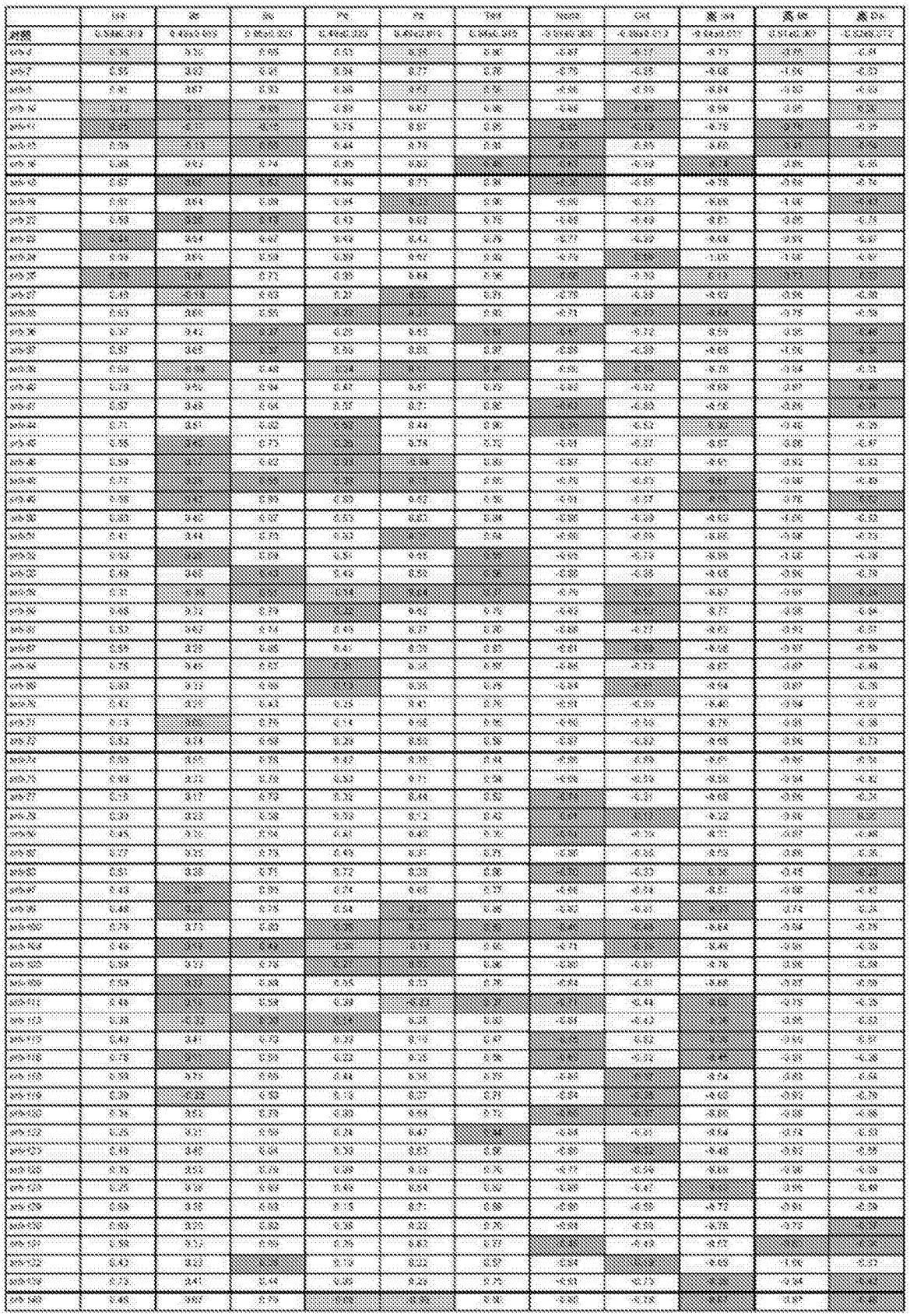
[0344] 本发明人以前报道了不同的感觉神经元依赖于气味浓度而发挥功能(17)。该研究中，本发明人发现，对于二乙酰的接受，ODR-10和SRI-14作为特定的ORN内的对低浓度或高浓度特异性的受体分别发挥功能(图33)。推测SRI-14与ODR-10相比可能对二乙酰具有低亲和性。然而，这些受体在气味物质识别部位内不具有相同序列性，作为区别不同浓度的相同化学物质的这些受体的能力的基础的机制尚未知。

[0345] 钙成像实验显示AWA感觉神经元对低浓度和高浓度的二乙酰这两者应答。AWA神经元的遗传性去除在来自高浓度二乙酰的驱避和对低浓度二乙酰的引诱这两者中引起缺陷。这些结果暗示了，AWA神经元对宽范围的浓度检测二乙酰、对不同浓度引起相反的行为有帮助。关于这些发现以及AWB神经元(16)和AWC神经元(26)，以前报道的发现表明，线虫(C.elegans)的这些ORN能够介导引诱行为和驱避行为这两者。ODR-10在AWA神经元中存在(11)，odr-10突变体对低浓度的二乙酰的引诱降低，但对高浓度的二乙酰的驱避正常，因此暗示了，AWA神经元特别对高二乙酰浓度具有多种二乙酰受体。

[0346] 本发明人发现：RNAi筛选中得到的、除了SRI-14以外的对高浓度二乙酰的受体候补存在。这些其他候补的解析可以带来其他二乙酰受体的鉴定、响应气味的浓度而不同受体起作用的策略的追加。

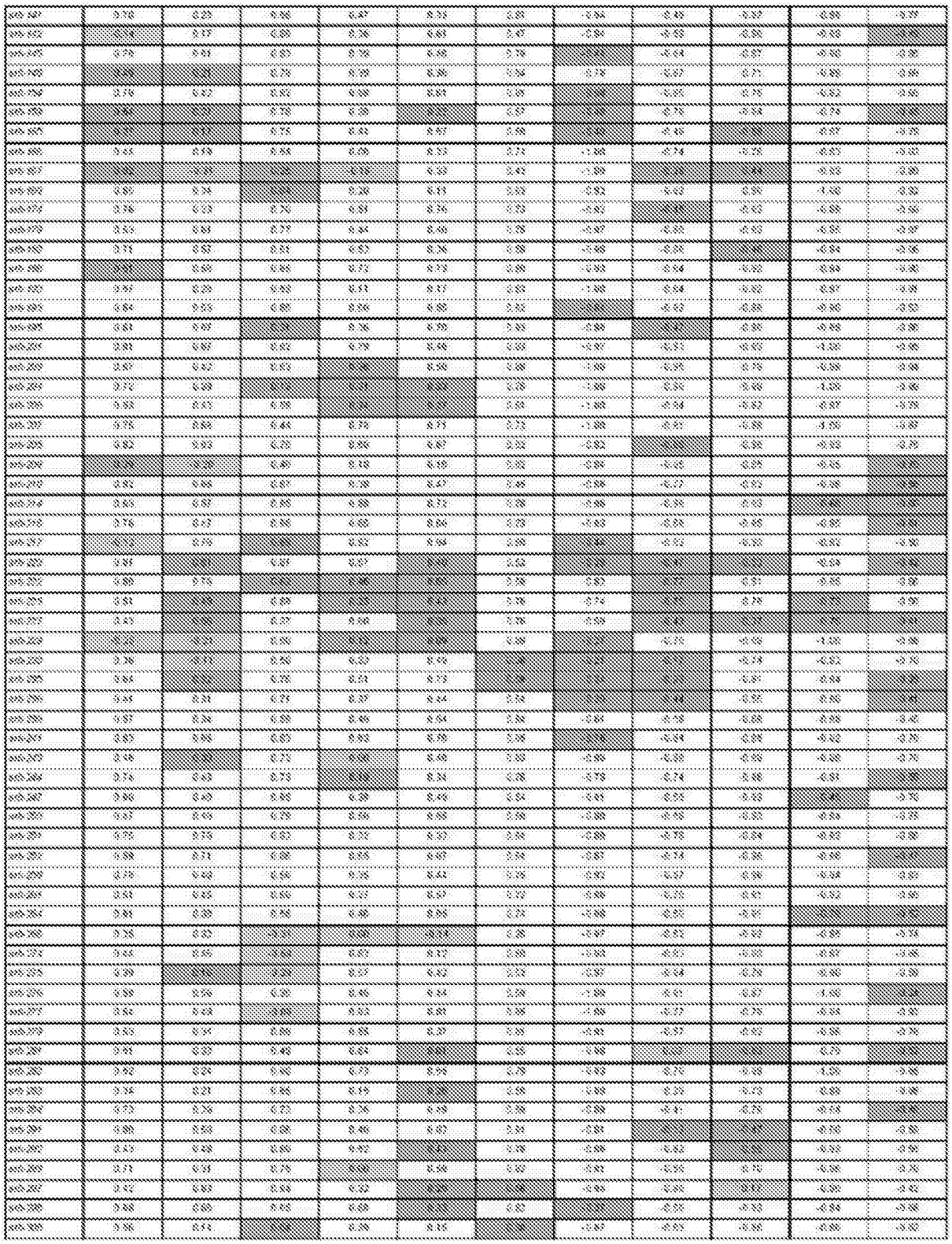
[0347] 表3

[0348]



[0349] 表3续

[0350]



[0351] 表3.srh嗅觉受体家族基因的RNAi筛选的原始数据。对于第一次(A)、第二次(B)和第三次(C)的筛选中的srh家族基因，经过RNAi处理的线虫对11个气味物质的趋化性指数。11个气味物质包括：低浓度的6个引诱物质[异戊醇(Iaa)、苯甲醛(Bz)、丁酮(Bu)、戊二酮(Pd)、吡嗪(Pz)和三甲基噻唑(Tmt)]、2个驱避物质[壬酮(Nona)和辛醇(Oct)]以及高浓度的3个引诱物质[异戊醇(高Iaa)、苯甲醛(高Bz)和二乙酰(高Da)]。蓝色、橙色和绿色的阴影

分别表示同日的对照值、全部天的对照值的平均和与它们两者比较的统计差(参照材料和方法)。

[0352] 表4

[0353]

基因	气味物质	第一次	第二次	第三次
sra-1	离 Da	-0.22	-0.09	-0.71
sra-2	离 Da	-0.56	-0.31	-0.63
sra-6	Bu	-0.73	-0.15	0.44
sra-7	离 Da	0.46	-0.47	-0.29
sra-8	离 Da	-0.12	-0.32	-0.62
sra-9	离 Da	-0.43	-0.59	-0.67
sra-12	Pz	0.45	-0.37	0.52
sra-17	Iaa	0.33	-0.26	0.08
sra-18	Bz	0.24	-0.14	0.29
	Tmt	0.19	0.18	0.44
sra-20	Bz	0.28	-0.19	0.12
	Pz	-0.16	0.10	0.36
	Nona	-0.52	-0.90	-0.84
sra-24	Iaa	0.34	0.29	0.38
	Pz	-0.02	0.14	0.76
	Tmt	-0.27	0.35	0.64
sra-26	Pz	0.21	0.47	0.72
sra-27	Pz	0.26	0.32	0.57
sra-38	离 Bz	-0.87	-0.65	-0.19
srd-5	Bu	-0.36	-0.45	0.29
srd-15	Tmt	0.60	0.14	0.63
srd-17	Iaa	0.71	0.43	0.48
	Pz	0.53	0.19	0.13
	Tmt	0.59	-0.27	0.49
srd-18	Bz	0.30	0.02	-0.17
srd-19	Pz	0.39	0.09	0.23
srd-21	离 Da	-0.49	-0.45	-0.71
srd-23	Pz	0.31	0.22	0.50
	Oct	0.03	-0.51	-0.36
srb-1	Pd	0.55	0.12	0.22
srb-2	Pz	0.49	0.15	0.45
srv-11	Pd	0.38	0.14	0.21
srv-12	离 Bz	-0.91	-0.56	0.53
srxa-3	Pz	0.54	0.47	0.45
srxa-9	Pd	0.24	0.46	0.14
srxa-14	Pd	0.70	0.37	0.37
srz-1	Pz	0.51	0.36	0.39
srz-2	Pz	0.63	-0.09	0.40
	Tmt	0.66	-0.40	0.51
srz-6	Pd	0.30	0.57	-0.30
srz-10	Bz	0.61	-0.06	0.16
srz-47	离 Da	-0.44	-0.57	-0.71
srz-48	Bz	0.42	0.02	-0.07
	Pd	0.68	0.21	0.08
	离 Bz	-0.87	-0.41	-0.90
srz-66	离 Da	-0.14	-0.58	-0.76
srz-94	Pz	0.49	0.38	0.25
srz-95	Pz	0.34	0.17	0.37
	Tmt	0.52	-0.11	0.47

[0354] 表4续

[0355]

srbc-3	Pd	0.10	0.24	-0.04
srbc-11	Pd	0.17	0.17	0.04
srbc-29	Oct	-0.29	-0.29	-0.48
srbc-61	Bz	0.30	0.21	0.11
srbc-66	Bz	0.47	0.29	0.04
srbc-75	Pd	0.56	0.13	0.36
srbc-82	Bz	0.29	0.13	0.45
srsx-11	Pd	0.76	-0.55	-0.83
srsx-26	Bu	-0.44	-0.54	-0.32
srsx-32	Pz	0.30	0.09	0.46
srsx-33	Pd	0.57	0.06	0.28
	Pz	0.52	0.30	0.42
srsx-34	Bz	0.04	0.07	0.43
srsx-37	Pd	0.52	0.49	0.27
srr-1	Pz	0.39	0.56	0.39
srr-8	Pd	0.28	0.49	0.19
srr-9	Pz	0.26	0.54	-0.01
srw-22	Bu	-0.32	-0.42	-0.32
srw-24	Pd	0.28	0.56	0.45
	Oct	-0.51	-0.30	-0.28
srw-26	Pd	0.25	-0.31	0.36
srw-29	Bz	0.33	-0.41	0.50
	Bu	-0.24	-0.46	-0.31
srw-31	Bu	-0.15	-0.61	-0.48
srw-33	Pz	-0.51	0.49	0.37
srw-58	Oct	-0.39	-0.33	-0.43
srw-117	Bz	0.26	-0.25	0.26
srw-121	Bu	-0.26	-0.54	-0.38
srw-132	Bu	-0.23	-0.64	-0.36
srw-142	Pz	0.27	0.38	0.31
sru-4	Iaa	0.13	0.23	0.74
sru-12	Iaa	0.42	0.06	0.64
sru-31	Pd	0.17	-0.05	0.23
sru-37	Bu	-0.51	-0.23	-0.53
sru-38	Bu	-0.57	-0.12	-0.33
srh-7	Bz	0.92	0.33	0.33
srh-10	Iaa	-0.12	0.44	0.19
	Bz	0.12	0.26	0.13
	Pd	0.68	0.06	-0.07
	Pz	0.67	0.50	0.25
srh-18	Tmt	0.91	0.52	-0.07
srh-25	炔 Da	-0.22	-0.49	0.32
srh-27	Bz	-0.16	-0.08	0.20
	Pz	0.32	-0.07	0.21
srh-28	Iaa	0.63	-0.10	0.41
	Pd	0.22	-0.31	0.14
	Tmt	0.92	0.26	0.49
srh-39	Bz	-0.08	-0.33	-0.09
srh-40	Iaa	0.79	0.07	0.51
	Bz	0.50	-0.28	-0.02

[0356] 表4续

srh-59	Tmt	0.37	0.69	0.69
srh-68	Pd	0.21	0.39	0.08
srh-79	离 Da	0.35	-0.63	-0.68
srh-111	Bz	0.10	0.13	0.20
srh-119	Bz	-0.22	-0.63	0.18
	Oct	-0.35	-0.60	-0.39
srh-139	Pd	0.06	0.41	0.09
srh-140	Bz	0.07	-0.25	0.45
srh-214	离 Da	-0.60	-0.63	-0.63
srh-216	离 Da	-0.61	-0.78	-0.77
srh-236	离 Da	-0.41	-0.67	-0.67
srh-276	Pz	0.44	-0.24	0.44
srh-281	Pz	0.01	0.42	0.74
	离 Da	-0.52	-0.42	-0.60
srh-283	Oct	-0.29	-0.78	-0.54
srh-292	Pz	0.43	0.12	0.68
srh-293	Pd	0.00	0.21	-0.21
srh-297	Pz	0.29	-0.12	0.46
srh-298	Oct	-0.50	-0.81	0.81
srh-308	Pz	0.15	0.29	0.36
sri-6	Pd	0.42	-0.20	0.13
	Pz	0.33	0.07	0.56
sri-13	Bz	0.23	0.28	0.26
sri-14	离 Da	-0.36	-0.46	-0.62
sri-17	Pz	0.36	0.30	0.30
sri-21	离 Da	-0.76	-0.59	-0.68
sri-36	Pz	-0.05	0.18	0.50
sri-38	Bz	0.19	-0.33	0.15
sri-43	Pd	0.27	-0.20	0.23
sri-47	Pz	0.50	-0.54	0.47
	Tmt	0.96	0.13	0.45
sri-51	Bz	0.21	0.05	-0.01
	Pz	0.14	-0.39	0.43
sri-69	Tmt	0.32	0.20	0.74
srj-14	Bz	0.06	-0.17	0.12
	Bu	0.54	0.57	0.06
srj-22	Bz	-0.21	0.25	0.27
	Bu	0.31	0.47	-0.06
	Pd	0.11	0.17	0.46
srj-23	Tmt	0.30	0.24	0.25
srj-26	Tmt	0.18	0.54	0.65
srj-27	Bu	0.58	0.60	-0.42
	Pd	0.29	0.17	0.37
srj-39	Oct	-0.38	-0.43	-0.42
srj-57	Bu	0.15	0.46	-0.39
sre-13	离 Da	-0.32	-0.56	-0.65
sre-23	Pz	0.38	-0.05	0.09
sre-26	Tmt	0.42	0.50	0.58
sre-37	Bz	0.00	0.15	0.26
sre-38	Bz	0.12	0.19	0.27

[0357]

[0358] 表4续

[0359]

sre-54	离 Da	-0.36	-0.35	-0.72
sre-56	Pd	-0.18	-0.58	0.28
	离 Da	-0.38	-0.29	-0.77
srab-4	Pd	0.00	-0.56	0.12
srab-7	Bz	0.16	-0.18	-0.48
	Pd	0.00	0.13	-0.43
	Pz	0.11	0.17	-0.15
srab-13	Bz	0.16	-0.21	-0.30
srab-18	Pd	0.17	0.00	0.15
srab-20	Pd	-0.01	0.07	0.22
srx-2	Pd	-0.29	-0.14	-0.39
srx-13	Iaa	0.10	-0.31	0.43
	Pz	-0.15	0.18	0.43
srx-46	Pz	0.08	0.21	0.48
srx-47	离 Da	-0.60	-0.19	-0.69
srx-118	离 Da	-0.62	-0.29	-0.53
srt-18	离 Da	-0.38	-0.09	-0.57
srt-25	离 Da	-0.42	-0.36	-0.37
srt-35	Pz	0.07	0.22	0.46
srg-10	Pz	0.13	0.46	0.25
srg-13	Pz	0.22	0.06	0.44
srg-20	Pz	0.31	0.44	-0.05
srg-37	Pz	0.43	-0.10	0.40
srg-46	Pz	0.03	0.25	0.45
srg-51	Pz	-0.07	0.37	0.46
srg-56	Bu	0.52	0.40	-0.31
srg-64	Iaa	0.22	-0.09	0.30
	Bz	-0.14	-0.03	0.41
str-1	Pz	-0.32	0.28	0.46
str-2	Iaa	0.84	0.46	0.63
	Bz	0.68	0.23	0.19
	离 Da	-0.63	-0.62	-0.63
str-5	Bz	0.55	0.12	0.48
str-10	Oct	0.35	-0.61	-0.48
str-18	Bz	0.14	0.20	0.13
str-19	Bz	-0.11	-0.25	0.01
str-20	Pz	0.35	0.14	0.47
str-23	Pd	0.36	0.35	-0.07
str-30	Bz	-0.10	-0.03	0.22
	Pz	0.43	-0.03	0.49
str-31	Bz	-0.19	0.13	-0.17
	Pd	0.37	0.29	0.13
	Pz	0.22	0.21	0.44
str-32	Iaa	0.68	0.10	0.20
	Bz	-0.49	0.39	0.18
	Pz	-0.19	0.32	0.31
str-37	Bz	0.41	0.38	-0.39
str-38	Bz	-0.54	0.44	-0.63
str-40	Iaa	0.73	0.16	-0.08
	Pz	0.40	-0.06	0.36

[0360] 表4续

[0361]

str-55	离 Da	-0.30	-0.20	-0.70
str-63	Pz	0.56	0.15	0.57
str-71	离 Bz	0.22	-0.87	-0.76
str-74	Pz	0.40	0.04	0.21
str-78	离 Bz	-0.89	-0.87	-0.74
str-82	Pz	0.48	0.43	0.30
str-92	Nona	-0.82	-0.88	-0.77
str-94	Pd	0.46	0.30	0.09
str-96	离 Da	-0.55	-0.43	-0.76
str-106	Bz	0.09	0.00	0.02
	Pd	0.15	-0.40	-0.35
	Tmt	-0.20	0.38	0.18
str-112	Pd	0.44	0.25	-0.13
str-113	Iaa	0.58	0.43	-0.67
str-115	Pz	0.09	0.56	0.41
	Tmt	0.04	0.49	0.47
str-116	Iaa	0.19	0.27	0.30
	Tmt	0.15	0.54	0.58
str-118	Iaa	0.00	0.41	0.41
str-122	Tmt	0.25	0.66	0.53
str-123	Bz	0.10	0.02	0.24
	Pd	0.18	0.22	0.12
	Tmt	0.22	0.30	0.52
str-129	Bz	0.33	0.07	-0.21
	Pd	0.02	0.21	-0.15
	Tmt	0.21	0.32	0.51
str-130	Iaa	0.83	0.30	0.35
str-136	Pd	0.11	0.37	0.09
str-139	Pd	-0.27	0.21	0.29
str-144	Iaa	0.47	0.30	0.41
str-146	Iaa	0.48	0.67	0.45
str-148	Bz	0.30	-0.17	0.26
str-149	Bz	0.27	0.23	0.11
	Bu	-0.93	-0.10	-0.56
str-150	Bu	-0.50	-0.23	-0.93
str-151	Oct	-0.14	-0.33	-0.03
str-165	Bz	0.45	0.14	0.24
str-196	离 Da	-0.29	-0.12	-0.72
str-199	离 Da	-0.74	-0.20	-0.88
str-209	Bz	0.00	0.37	-0.09
	离 Da	-0.42	-0.32	-0.79

[0362] 表4续

[0363]

str-211	Nona	-1.00	-0.81	-0.59
	酒 laa	-0.87	-0.80	-0.82
str-217	Bz	-0.14	0.25	0.41
	Pz	0.53	0.29	0.37
	Tmt	0.76	-0.24	0.21
str-220	laa	0.52	0.02	-0.22
	Bz	0.75	-0.35	0.12
	Pz	0.56	-0.53	-0.08
	Tmt	0.33	-0.33	0.39
str-223	Bz	0.10	0.22	-0.61
str-225	Bz	0.34	-0.38	0.43
str-231	Oct	-0.80	-0.69	0.03
str-256	Pz	0.30	0.38	0.61
str-264	Bz	0.46	0.13	0.50

[0364] 表4.194个候补嗅觉受体基因的RNAi筛选的原始数据。第三次筛选后得到全部194个嗅觉受体候补基因。该表示出第一次、第二次和第三次筛选中的对这些基因经过RNAi处理的线虫的趋化性指数。示出几种基因参与多种气味物质的感知。

[0365] 表5

[0366]

基因	气味物质	细胞
	报告基因分析 - 该研究	
sra-17	laa	AWA, 几种神经元
sru-4	laa	ADL
srd-17	laa, Tmt	AWC
srh-10	laa, Bz, Pd, Pz	ASH, ASJ
srh-68	Pd	ADL, 几种神经元
srh-139	Pd	ADL, 几种神经元
srsx-37	Pd	ADL
srv-11	Pd	ASH
srz-6	Pd	ADL
srz-1	Pz	ASH, ADL
srh-18	Tmt	ASH, PHA, PHB
srx-47	高 Da	ASH, AWA
sri-14	高 Da	ASH, AWC
srh-25	高 Da	ADL
srh-281	高 Da	ADL
srw-29	Bu	鞘细胞
	来自线虫数据库的表达	
srh-28	laa, Pd, Pz,	头神经元
	Tmt, Oct, Da	
srab-13	Bz	头神经元、发育中的外阴、皮下组织
sra-38	Bz	头神经元、咽、未鉴别的头细胞
srab-7	Bz, Pd, Pz,	头感器、头神经元、肠道、下降肌、外阴肌肉
sra-20	Bz, Pz, Nona	头神经元
sra-6	Bu	头神经元、机械感觉神经元、未鉴别的头细胞、未鉴别的尾细胞
sru-38	Bu	头感器、尾感器、头神经元、尾神经元、肠细胞
srxa-14	Pd	头神经元、咽、肠道、直肠腺细胞、皮下组织
srxa-3	Pz	头神经元、尾神经元、肠道细胞
srg-13	Pz	身体神经元、尾神经元
srh-281	Pz, Da	头神经元
srd-15	Tmt	尾感器、头神经元、尾神经元、咽、肠道、受精囊 - 子宫瓣膜
srh-79	Da	头感器、尾感器、头神经元、尾神经元
sra-7	Da	头神经元、未鉴别的头细胞、未鉴别的尾细胞
srx-47	Da	头感器、头神经元、肠道、未鉴别的尾细胞
srj-57	Bu	肠道细胞
srz-94	Pz	肠道细胞、皮下组织、缝线细胞
str-115	Pz, Tmt	肠道细胞
sra-2	Da	肠道肌肉、肛门下降肌、皮下组织、未鉴别的头细胞

[0367] 表5.35个受体候补基因的表达模式和相关的气味物质。通过名称仅列举感觉神经元。其他神经元作为一组的几种神经元列举。对于解析基因的表达照片，参照图23。粗体的基因去除了的情况下在引起对于二乙酰的化学感觉应答性的神经元中(基于报告基因表

达)可见表达。Bu、丁酮;Bz、苯甲醛;Da、二乙酰;Iaa、异戊醇;Nona、壬酮;Oct、辛醇;Pd、戊二酮;Pz、吡嗪;Tmt、三甲基噻唑。

[0368] [实施例7]

[0369] 本发明人在各地采集的C.elegans株中进行了上述实施例,结果发现了对来自各种癌患者的尿不显示引诱行为的株。考察该株的基因组序列,结果判明基因组上具有大量的1个碱基置换。

[0370] 因此,本实施例中,与野生株一起使用上述基因突变株,研究了癌检测的精度。

[0371] 方法:

[0372] 对乳腺癌、食道癌、胆管癌、直肠癌、盲肠癌、前列腺癌、胰腺癌、肺癌、胃肠道间质瘤的癌患者的尿样品、健康人的尿样品、中规模实验中显示出假阳性的健康人的尿样品,考察了野生株、基因突变株的趋化性。

[0373] 结果:

[0374] 基因突变株对几乎全部的癌种类的尿不显示引诱行为(图34)。

[0375] 基因突变株对其他气味显示出正常的趋性,因此可以说基本的嗅觉发挥作用。因此,可以预测基因突变株中接受癌种类的气味的受体中有缺失(图35)。

[0376] 另外,基因突变株在假阳性样品中正常显示出引诱行为。因此,对野生株(N2株)中显示阳性的样品,用基因突变株进行解析,基因突变株中变为阴性时可以诊断为癌,基因突变株中变为阳性时可以诊断为假阳性。因此,使用基因突变株时,可以提高癌检测的精度(图35)。

[0377] [实施例8]

[0378] 与各癌种类的气味的接受相关的受体候补的鉴定

[0379] 使用下一代测序器(Illumina株式会社),解读实施例7中得到的基因突变株的全基因组,与N2的基因组序列相比,探索了有突变的受体基因。

[0380] 其结果,在受体基因中加入了强的突变(表6)。

[0381] 表6

[0382]

嗅觉受体基因	胃癌	结肠癌	乳腺癌	胰腺癌	直肠癌	肺癌	前列腺癌	GIST	胆管癌	盲肠癌
srh家族基因	○	○			○	○	○	○	○	○
srz家族基因				○		○	○	○	○	
srg家族基因		○	○	○						

[0383] 对于这些基因,通过嗅觉神经AWC特异性的RNAi(Esposito et al,Efficient and cell specific knock-down of gene function in targeted C.elegans neurons.Gene 395,170-176,2007)进行敲除,测定对各癌种类的尿的趋性。

[0384] 其结果可知,根据癌种类而反应的受体不同。

[0385] 由此,通过线虫趋性试验能够确定癌种类。

[0386] 将考察了受体敲除株中对乳腺癌患者的尿的趋性的结果示于图36。

[0387] 根据癌探知犬的研究,可以预测根据癌种类而气味不同。因此,线虫中,鉴定针对癌种类各自的气味的嗅觉受体,制作缺失了该受体的突变体。作为突变体的制作法,可以举出:CRISPR/Cas9法(Friedland et al,Heritable genome editing in C.elegans via a CRISPR-Cas9 system,Nature Methods,2013)等。

[0388] 首先,作为STEP 1,使用N2株,检查癌种类的有无。

[0389] 接着,作为STEP 2,使用各癌种类的受体的突变体,确定癌种类。例如,大肠癌的气味的受体突变体不显示引诱行为时,可以诊断为大肠癌(图37)。

[0390] 参考文献

[0391] 1.A.Menini,Ed.,The Neurobiology of Olfaction(CRC Press,Boca Raton,FL,2010).

[0392] 2.L.Buck,R.Axel,A novel multigene family may encode odorant receptors:a molecular basis for odor recognition.Cell 65,175-187(1991).

[0393] 3.S.Serizawa,K.Miyamichi,H.Sakano,One neuron-one receptor rule in the mouse olfactory system.Trends Genet.20,648-653(2004).

[0394] 4.P.Mombaerts,Genes and ligands for odorant,vomeronasal and taste receptors.Nat.Rev.Neurosci.5,263-278(2004).

[0395] 5.H.Saito,Q.Chi,H.Zhuang,H.Matsunami,J.D.Mainland,Odor coding by a Mammalian receptor repertoire.Sci.Signal.2,ra9(2009).

[0396] 6.C.I.Bargmann,E.Hartwieg,H.R.Horvitz,Odorant-selective genes and neurons mediate olfaction in C.elegans.Cell 74,515-527(1993).

[0397] 7.B.M.de,A.V.Maricq,Neuronal substrates of complex behaviors in C.elegans.Annu.Rev.Neurosci.28,451-501(2005).

[0398] 8.H.M.Robertson,J.H.Thomas,The putative chemoreceptor families of C.elegans.WormBook,1-12(2006).

[0399] 9.C.I.Bargmann,Chemosensation in C.elegans.WormBook,1-29(2006).

[0400] 10.E.R.Liman,Y.V.Zhang,C.Montell,Peripheral Coding of Taste.Neuron 81,984-1000(2014).

[0401] 11.P.Sengupta,J.H.Chou,C.I.Bargmann,odr-10 encodes a seven transmembrane domain olfactory receptor required for responses to the odorant diacetyl.Cell 84,899-909(1996).

[0402] 12.K.Kim,K.Sato,M.Shibuya,D.M.Zeiger,R.A.Butcher,J.R.Ragains,J.Clardy,K.Touhara,P.Sengupta,Two chemoreceptors mediate developmental effects of dauer pheromone in C.elegans.Science 326,994-998(2009).

[0403] 13.P.T.McGrath,Y.Xu,M.Ailion,J.L.Garrison,R.A.Butcher,C.I.Bargmann,Parallel evolution of domesticated Caenorhabditis species targets pheromone receptor genes.Nature 477,321-325(2011).

[0404] 14.D.Park,I.O'Doherty,R.K.Somvanshi,A.Bethke,F.C.Schroeder,U.Kumar,D.L.Riddle,Interaction of structure-specific and promiscuous G-protein-coupled receptors mediates small-molecule signaling in Caenorhabditis elegans.Proc Natl Acad Sci U S A 109,9917-9922(2012).

[0405] 15.E.R.Troemel,B.E.Kimmel,C.I.Bargmann,Reprogramming chemotaxis responses:sensory neurons define olfactory preferences in C.elegans.Cell 91,161-169(1997).

[0406] 16.M.Y.Chao,H.Komatsu,H.S.Fukuto,H.M.Dionne,A.C.Hart,Feeding status and serotonin rapidly and reversibly modulate a Caenorhabditis elegans chemosensory circuit.Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.101,15512-15517(2004).

[0407] 17.K.Yoshida,T.Hirotsu,T.Tagawa,S.Oda,T.Wakabayashi,Y.Iino,T.Ishihara,Odour concentration-dependent olfactory preference change in C.elegans.Nat.Commun.3,739(2012).

[0408] 18.R.S.Kamath,A.G.Fraser,Y.Dong,G.Poulin,R.Durbin,M.Gotta,A.Kanapin,B.N.Le,S.Moreno,M.Sohrmann,D.P.Welchman,P.Zipperlen,J.Ahringer,Systematic functional analysis of the Caenorhabditis elegans genome using RNAi.Nature 421,231-237(2003).

[0409] 19.S.Kennedy,D.Wang,G.Ruvkun,A conserved siRNA-degrading RNase negatively regulates RNA interference in C.elegans.Nature 427,645-649(2004).

[0410] 20.E.R.Troemel,J.H.Chou,N.D.Dwyer,H.A.Colbert,C.I.Bargmann,Divergent seven transmembrane receptors are candidate chemosensory receptors in C.elegans.Cell 83,207-218(1995).

[0411] 21.J.Larsch,D.Ventimiglia,C.I.Bargmann,D.R.Albrecht,High-throughput imaging of neuronal activity in Caenorhabditis elegans.Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.110,E4266-4273(2013).

[0412] 22.J.H.Chou,C.I.Bargmann,P.Sengupta,The Caenorhabditis elegans odr-2 gene encodes a novel Ly-6-related protein required for olfaction.Genetics 157,211-224(2001).

[0413] 23.P.Sengupta,Generation and modulation of chemosensory behaviors in C.elegans.Pflugers Arch.454,721-734(2007).

[0414] 24.G.Esposito,S.E.Di,C.Bergamasco,P.Bazzicalupo,Efficient and cell specific knock-down of gene function in targeted C.elegans neurons.Gene 395,170-176(2007).

[0415] 25.J.G.Culotti,R.L.Russell,Osmotic avoidance defective mutants of the nematode Caenorhabditis elegans.Genetics 90,243-256(1978).

[0416] 26.C.I.Bargmann,J.H.Thomas,H.R.Horvitz,Chemosensory cell function in the behavior and development of Caenorhabditis elegans.Cold Spring Harb.Symp.Quant.Biol.55,529-538(1990).

[0417] 27.M.Tsunozaki,S.H.Chalasani,C.I.Bargmann,A behavioral switch:cGMP and PKC signaling in olfactory neurons reverses odor preference in C.elegans.Neuron 59,959-971(2008).

[0418] 28.D.J.Reiner,D.Weinshenker,H.Tian,J.H.Thomas,K.Nishiwaki,J.Miwa,T.Gruninger,B.Leboeuf,L.R.Garcia,Behavioral genetics of caenorhabditis elegans unc-103-encoded erg-like K(+)channel.J.Neurogenet.20,41-66(2006).

[0419] 29.Y.Shinkai,Y.Yamamoto,M.Fujiwara,T.Tabata,T.Murayama,T.Hirotsu,D.D.Ikeda,M.Tsunozaki,Y.Iino,C.I.Bargmann,I.Katsura,T.Ishihara,Behavioral

choice between conflicting alternatives is regulated by a receptor guanylyl cyclase,GCY-28,and a receptor tyrosine kinase,SCD-2,in AIA interneurons of Caenorhabditis elegans.J.Neurosci.31,3007-3015(2011).

[0420] 30.T.Nagai,S.Yamada,T.Tominaga,M.Ichikawa,A.Miyawaki,Expanded dynamic range of fluorescent indicators for Ca(2+)by circularly permuted yellow fluorescent proteins.Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.101,10554-10559(2004).

[0421] 31.J.E.Richmond,W.S.Davis,E.M.Jorgensen,UNC-13 is required for synaptic vesicle fusion in C.elegans.Nat.Neurosci.2,959-964(1999).

[0422] 32.S.H.Chalasani,N.Chronis,M.Tsunozaki,J.M.Gray,D.Ramot,M.B.Goodman,C.I.Bargmann,Dissecting a circuit for olfactory behaviour in Caenorhabditis elegans.Nature 450,63-70(2007).

[0423] 33.H.I.Ha,M.Hendricks,Y.Shen,C.V.Gabel,C.Fang-Yen,Y.Qin,D.Colon-Ramos,K.Shen,A.D.Samuel,Y.Zhang,Functional organization of a neural network for aversive olfactory learning in Caenorhabditis elegans.Neuron 68,1173-1186(2010).

[0424] 34.C.I.Bargmann,Comparative chemosensation from receptors to ecology.Nature 444,295-301(2006).

[0425] 35.J.G.White,E.Southgate,J.N.Thomson,S.Brenner,The structure of the nervous system of the nematode Caenorhabditis elegans.Philos.Trans.R.Soc.Lond.B Biol.Sci.314,1-340(1986).

[0426] 36.S.Brenner,The genetics of Caenorhabditis elegans.Genetics 77,71-94(1974).

[0427] 37.A.G.Fraser,R.S.Kamath,P.Zipperlen,M.Martinez-Campos,M.Sohrmann,J.Ahringer,Functional genomic analysis of C.elegans chromosome I by systematic RNA interference.Nature 408,325-330(2000).

[0428] 38.A.Solomon,S.Bandhakavi,S.Jabbar,R.Shah,G.J.Beitel,R.I.Morimoto,Caenorhabditis elegans OSR-1 regulates behavioral and physiological responses to hyperosmotic environments.Genetics 167,161-170(2004).

[0429] 39.A.Lanjuin,M.K.VanHoven,C.I.Bargmann,J.K.Thompson,P.Sengupta,Otx/otd homeobox genes specify distinct sensory neuron identities in C.elegans.Dev.Cell 5,621-633(2003).

[0430] 40.W.G.Bendena,J.R.Boudreau,T.Papanicolaou,M.Maltby,S.S.Tobe,I.D.Chin-Sang,A Caenorhabditis elegans allatostatin/galanin-like receptor NPR-9 inhibits local search behavior in response to feeding cues.Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.105,1339-1342(2008).

[0431] 41.O.Hobert,I.Mori,Y.Yamashita,H.Honda,Y.Ohshima,Y.Liu,G.Ruvkun,Regulation of interneuron function in the C.elegans thermoregulatory pathway by the ttx-3 LIM homeobox gene.Neuron 19,345-357(1997).

[0432] 42.E.L.Tsalik,T.Niacaris,A.S.Wenick,K.Pau,L.Avery,O.Hobert,LIM

homeobox gene-dependent expression of biogenic amine receptors in restricted regions of the C.elegans nervous system.Dev.Biol.263,81-102(2003).

[0433] 43.O.Hobert,T.D'Alberti,Y.Liu,G.Ruvkun,Control of neural development and function in a thermoregulatory network by the LIM homeobox gene lin-11.J.Neurosci.18,2084-2096(1998).

[0434] 44.Z.Altun-Gultekin,Y.Andachi,E.L.Tsalik,D.Pilgrim,Y.Kohara,O.Hobert, A regulatory cascade of three homeobox genes,ceh-10,ttx-3 and ceh-23,controls cell fate specification of a defined interneuron class in C.elegans.Development 128,1951-1969(2001).

[0435] 45.K.Roayaie,J.G.Crump,A.Sagasti,C.I.Bargmann,The G alpha protein ODR-3 mediates olfactory and nociceptive function and controls cilium morphogenesis in C.elegans olfactory neurons.Neuron 20,55-67(1998).

[0436] 46.N.Chronis,M.Zimmer,C.I.Bargmann,Microfluidics for in vivo imaging of neuronal and behavioral activity in Caenorhabditis elegans.Nat.Methods 4, 727-731(2007).

[0437] 47.T.Uozumi,T.Hirotsu,K.Yoshida,R.Yamada,A.Suzuki,G.Taniguchi,Y.Iino, T.Ishihara,Temporally-regulated quick activation and inactivation of Ras is important for olfactory behaviour.Sci.Rep.2,500(2012).

[0438] 附图标记说明

[0439] 10:探知部、20:处理部、30:收纳部、40:保存部

[0440] 110:计算单元、120:数据库

[0441] [序列表自由文本]

[0442] 序列号1:合成DNA

[0443] 序列号2:合成DNA

[0444] 序列号3:合成DNA

[0445] 序列号4:合成DNA

[0446] 需要说明的是,本说明书中引用的文献和公开公报、专利公报以及其他专利文献作为参照引入至本说明书。另外,本说明书包含作为本申请优先权主张的基础的日本特愿2013-255145号(2013年12月10日申请)和US61/982,341号(2014年4月22日申请)的说明书的内容。

序列表

<110> 国立大学法人九州大学（Kyushu University）

<120> 使用线虫的嗅觉的癌检测法

<130> G1264WO

<150> JP2013-255145
<151> 2013-12-10

<150> US61/982,341
<151> 2014-04-22

<160> 5

<170> PatentIn version 3.5

[0001] <210> 1
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的DNA

<400> 1
ggcgccgata taatigctaa 20

<210> 2
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的 DNA

<400> 2
ctgctgcgtt tttcgtatca 20

<210> 3
<211> 31
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的 DNA

<400> 3
gagagctagc aaaaaatgcc tgcaggtcca c 31

[0002]

<210> 4
<211> 28
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的 DNA

<400> 4
gagaggtacc ttattgaatt ctcggttg 28

<210> 5
<211> 341
<212> PRT
<213> 秀丽隐杆线虫 (Caenorhabditis elegans)

<400> 5

Met Pro Ala Gly Pro Pro Cys Pro Ser Ser Ile Pro Thr Tyr Tyr Leu

1 5 10 15

Leu Thr Leu His Ile Ile Gly Gly Ile Ser Ile Pro Ile Asn Leu Ile
20 25 30

Gly Phe Tyr Leu Val Trp Phe Gln Ser Pro Lys Met Gln Gly Tyr Lys
35 40 45

Tyr Cys Leu Cys Tyr Leu Gln Leu Val Ser Phe Ile Ala Glu Ile Glu
50 55 60

Met Ile Phe Ile Cys Pro Ala Phe Tyr Phe Phe Pro Leu Ile Gly Gly
65 70 75 80

[0003]

Phe Asn Val Gly Ala Asp Ile Ile Ala Asn Asn Ile Ser Ser His His
85 90 95

Thr Met Thr Leu Tyr Val Phe Val Phe Thr Phe Glu Leu Pro Ser Thr
100 105 110

Leu Leu Cys Phe Ile Phe Arg His Asn Ala Ala Gly Lys Val Asp Gln
115 120 125

Lys Cys Phe Ser Ser Lys Tyr Leu Lys Lys Phe Ser Leu Val Leu Ala
130 135 140

His Phe Leu Pro Phe Val Thr Ala Phe Cys Phe Trp Asn Ser Arg Leu
145 150 155 160

Thr Ala Lys Glu Arg Met Asp Leu Val Met Asn Asn Trp Pro Gln Cys
165 170 175

Ala His Trp Leu Lys Phe Pro Ala Phe Glu Val Tyr Asp Tyr His Leu
180 185 190

Asn Pro Trp Leu Ala Val Val Gly Ile Gly Ala Phe Phe Val Leu Phe
195 200 205

Met Val Phe Ser Tyr Cys Ile Phe Leu Gly Val Gln Thr Leu Leu Ile
210 215 220

[0004]

Leu Gln Gln His Arg Lys Ser Met Ser Arg Gln Thr Tyr Gln Ala His
225 230 235 240

Lys Asn Ala Leu Phe Arg Leu Val Met Gln Ile Val Leu Pro Gly Val
245 250 255

Phe Ile Val Val Pro Leu Cys Ile Cys Met Phe Val Val Val Gln Gly
260 265 270

Asp Val His Leu Gln Glu Phe Ala Thr Asp Thr Met Phe Phe Val Ser
275 280 285

Ser His Ser Met Cys Ser Cys Ile Ile Met Ile Ile Ser Asn Pro Lys
290 295 300

Tyr Arg Ser Val Leu Arg Lys Lys Ile Leu Arg Ile Leu Gly Ile Ser
305 310 315 320

[0005]

Ala Lys Ser Lys Ser Asn Arg Arg Arg Gly Asn Thr Val Leu Pro Ser
325 330 335

Gln Pro Arg Ile Gln
340

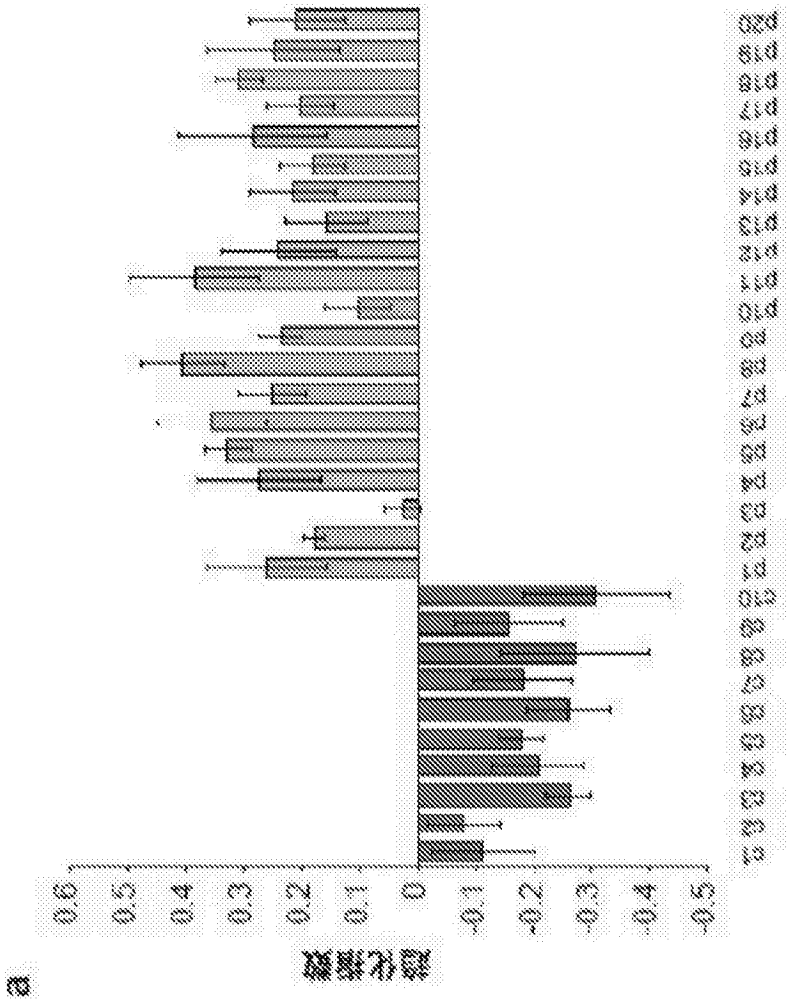


图1

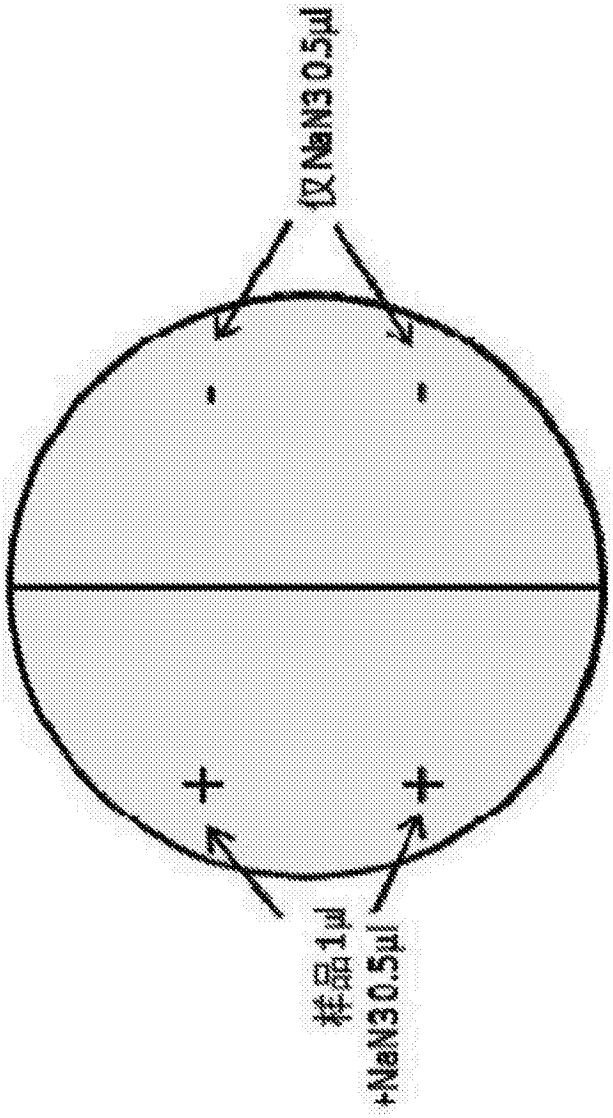


图2

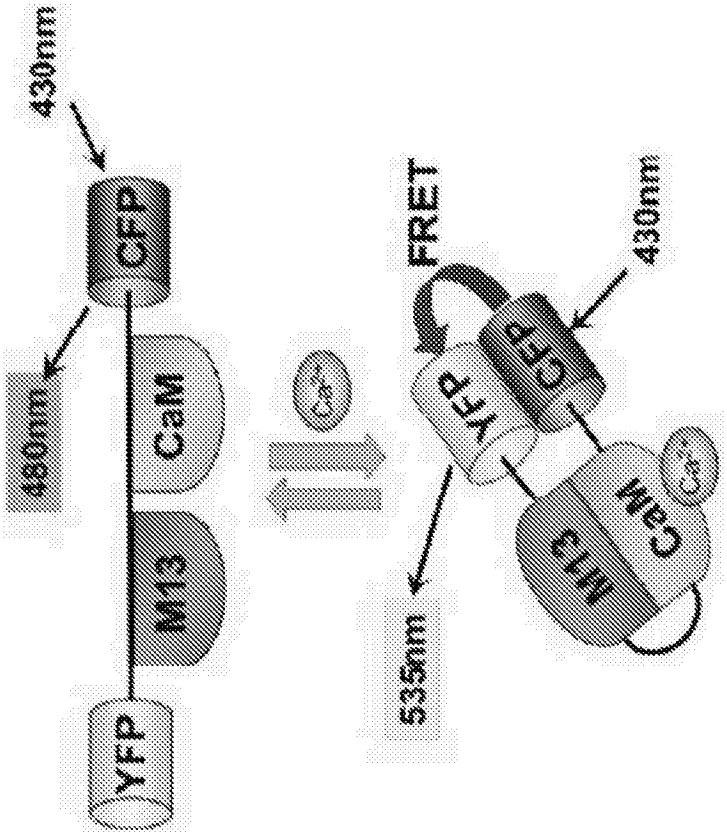


图3

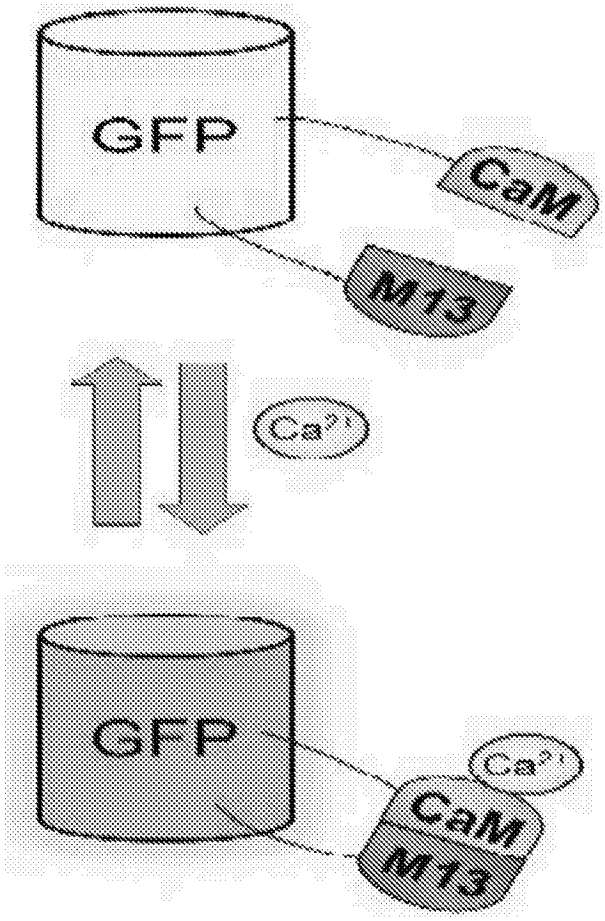


图4

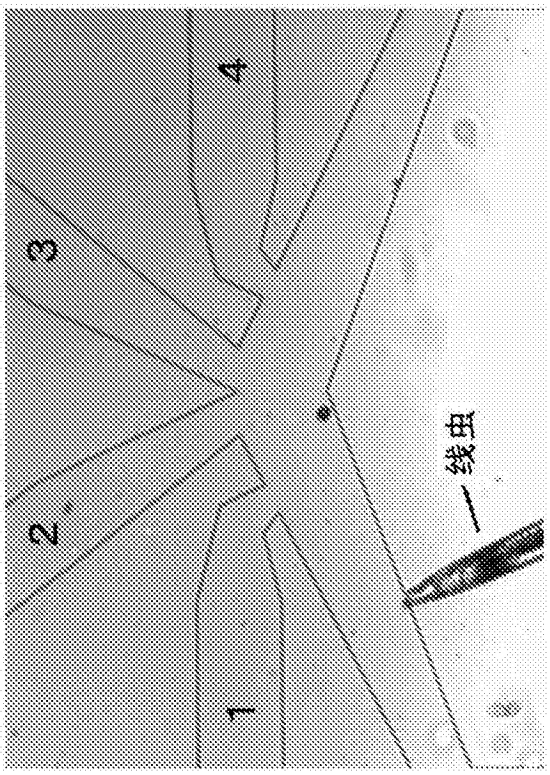


图5

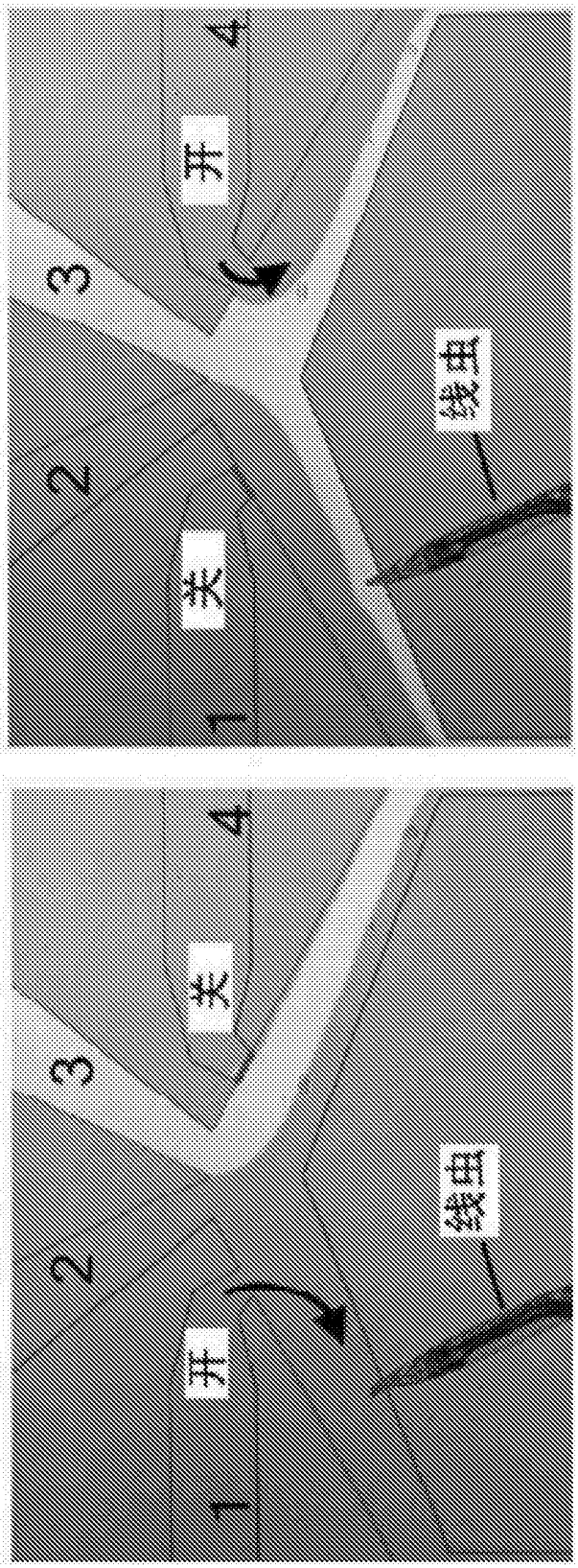


图6

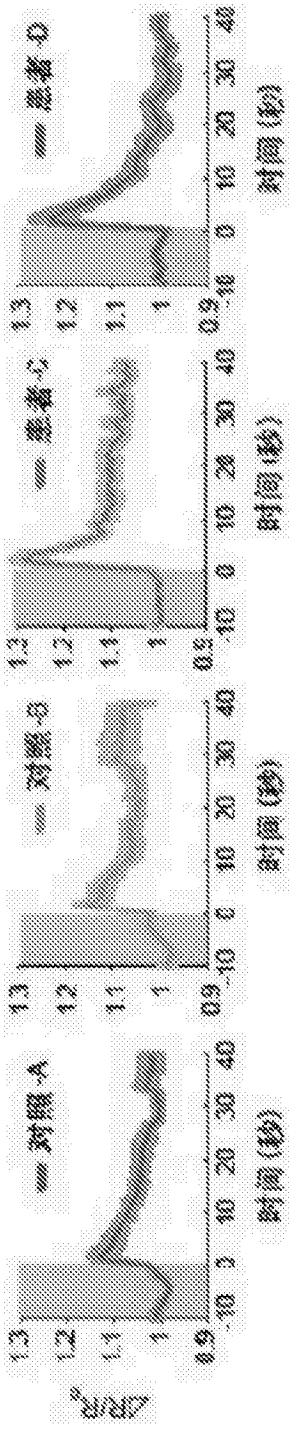


图7

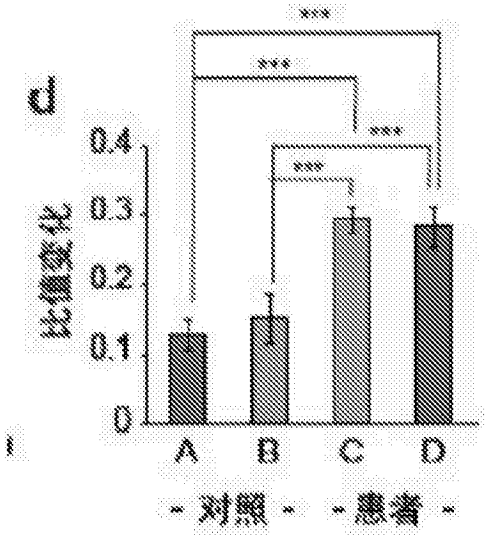

d
比值变化
0.4
0.3
0.2
0.1
0
***
***
***
***
A
B
C
D
- 对照 -
- 患者 -

图8

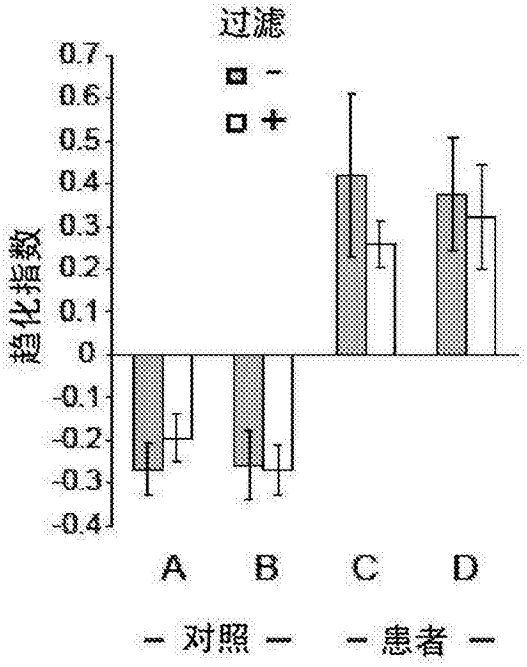

过滤
-
+
趋化指数
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
-0.1
-0.2
-0.3
-0.4
A
B
C
D
- 对照 -
- 患者 -

图9

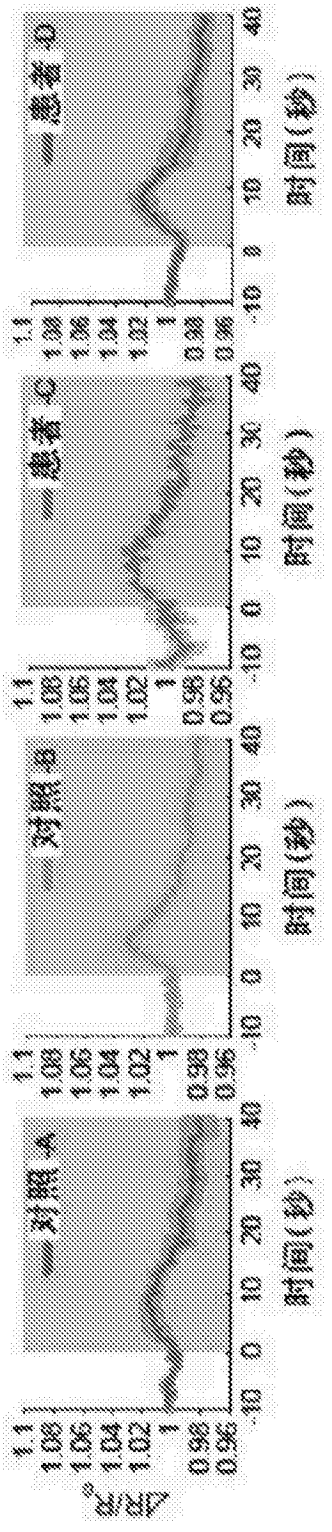

患者 D
患者 C
对照 B
对照 A
ΔR/R0
时间(秒)
1.1
1.08
1.06
1.04
1.02
1
0.98
0.96
-10
0
10
20
30
40

图10

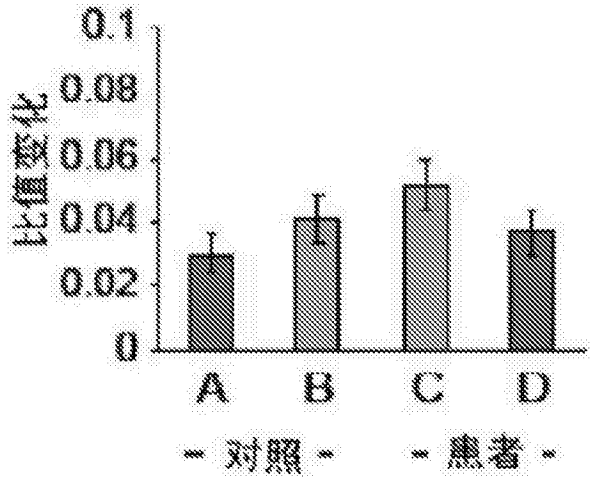

0.1
0.08
0.06
0.04
0.02
0
A
B
C
D
- 对照 -
- 患者 -

图11

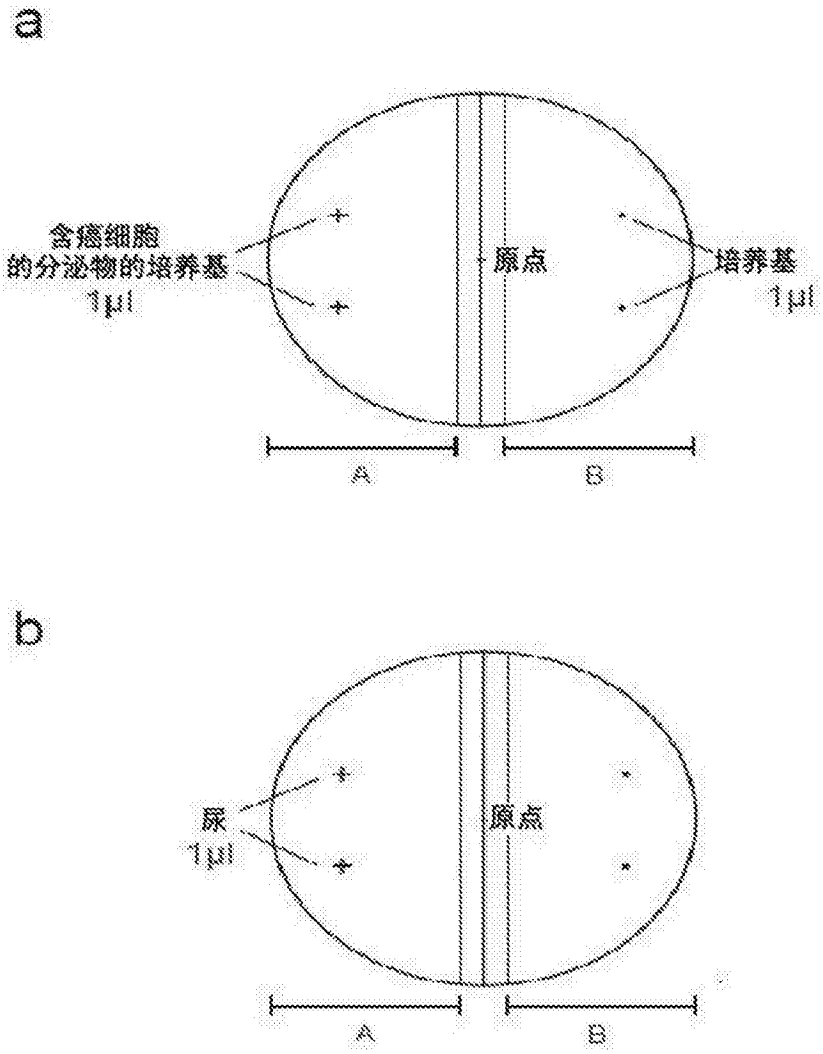

a
含癌细胞
的分泌物的培养基
1μl
原点
培养基
1μl
A
B
b
尿
1μl
原点
A
B

图12

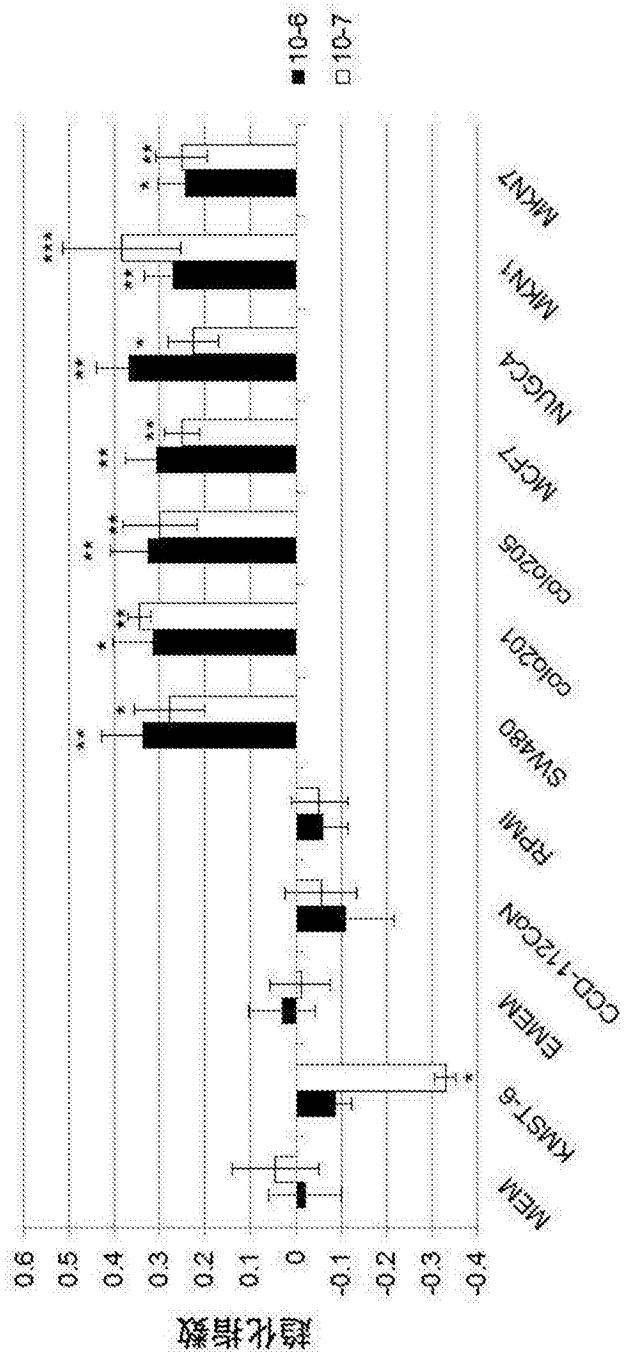

10-6
10-7
MDAMB435
KMS12BM
EMEXH
CCD-112CoN
RPMI
SW480
COLO201
COLO205
MCF7
NUGC4
NUGC3
MDAMB231
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
-0.1
-0.2
-0.3
-0.4
趋化指数

图13

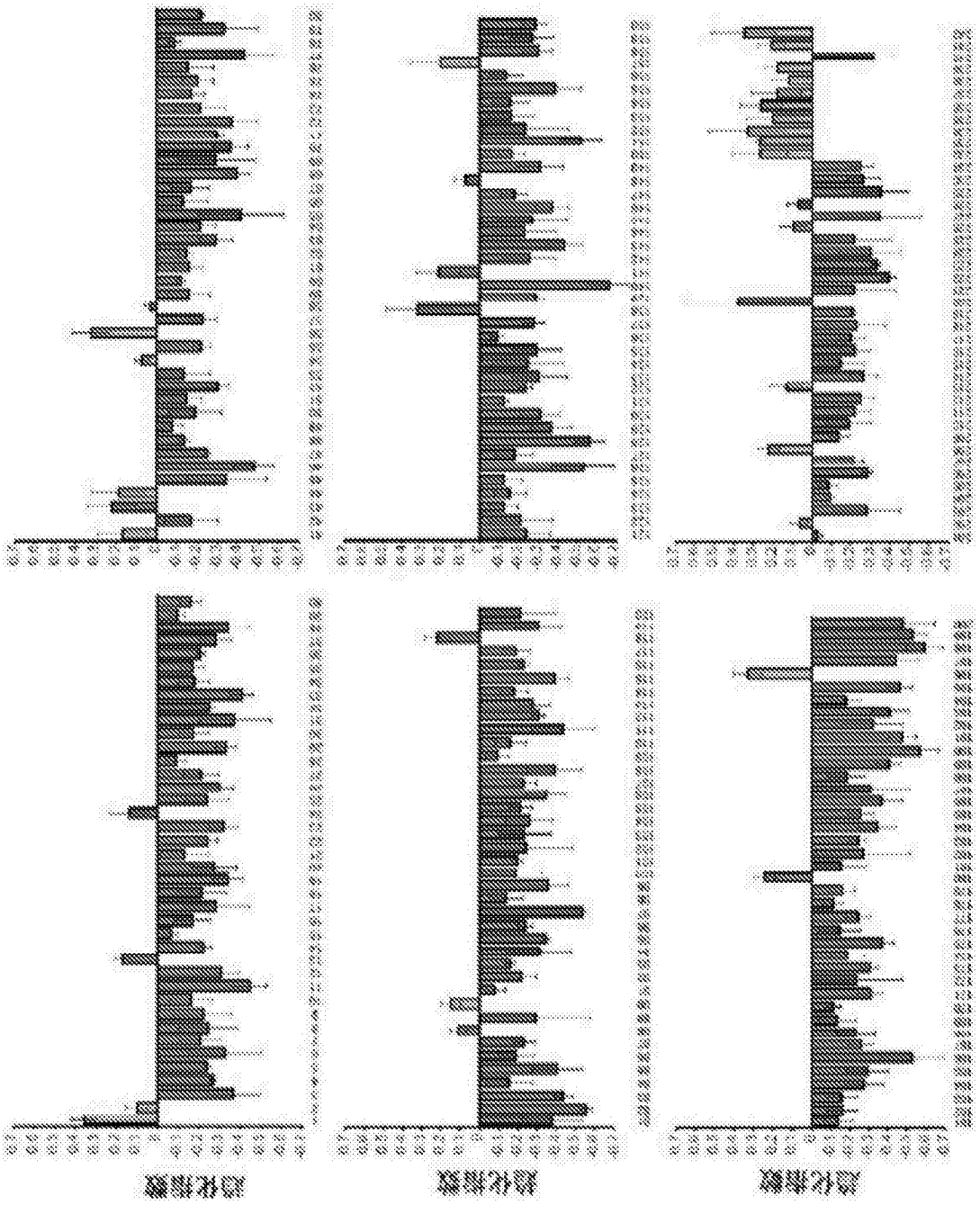


图14

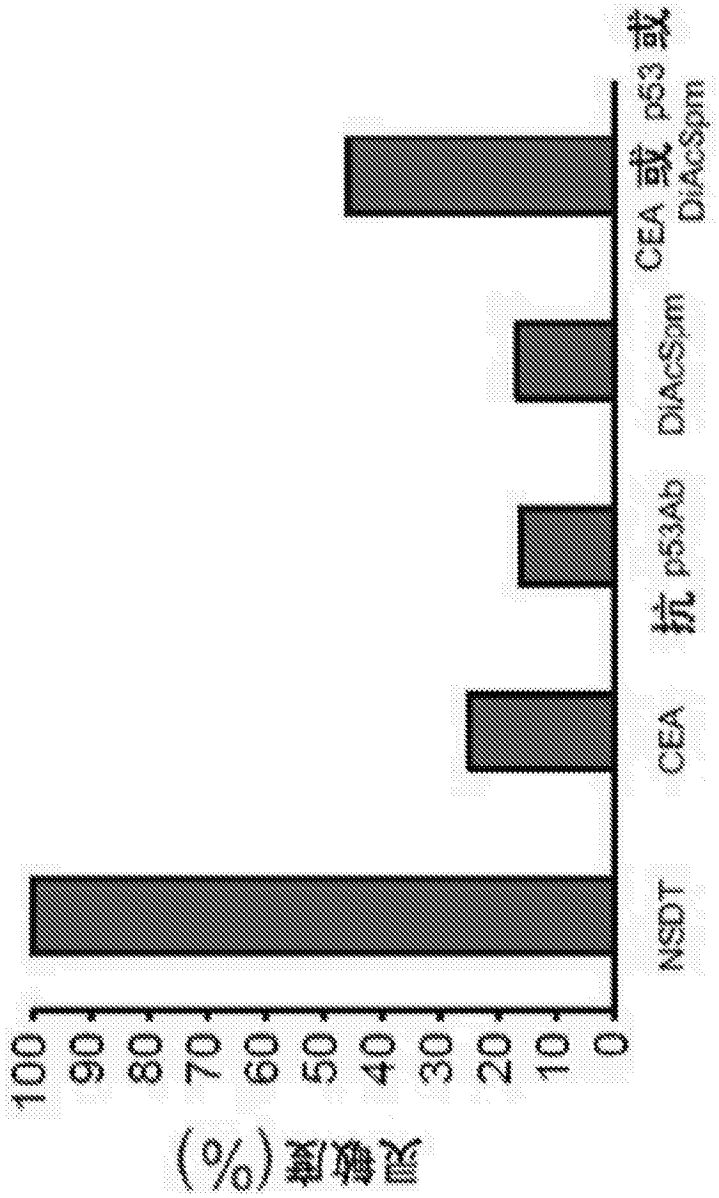

试 CEA 试 p53 DiAcSpm
DiAcSpm
抗 p53Ab
CEA
NSDT
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
灵敏度(%)

图15

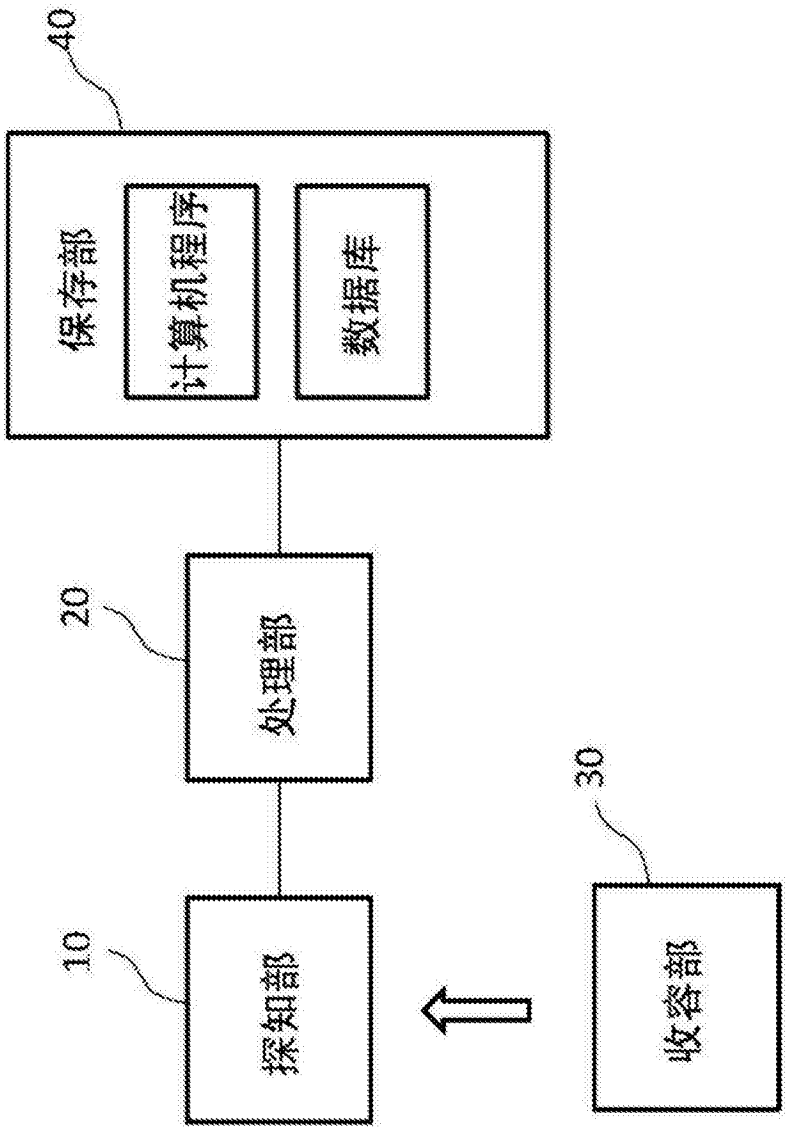


图16A

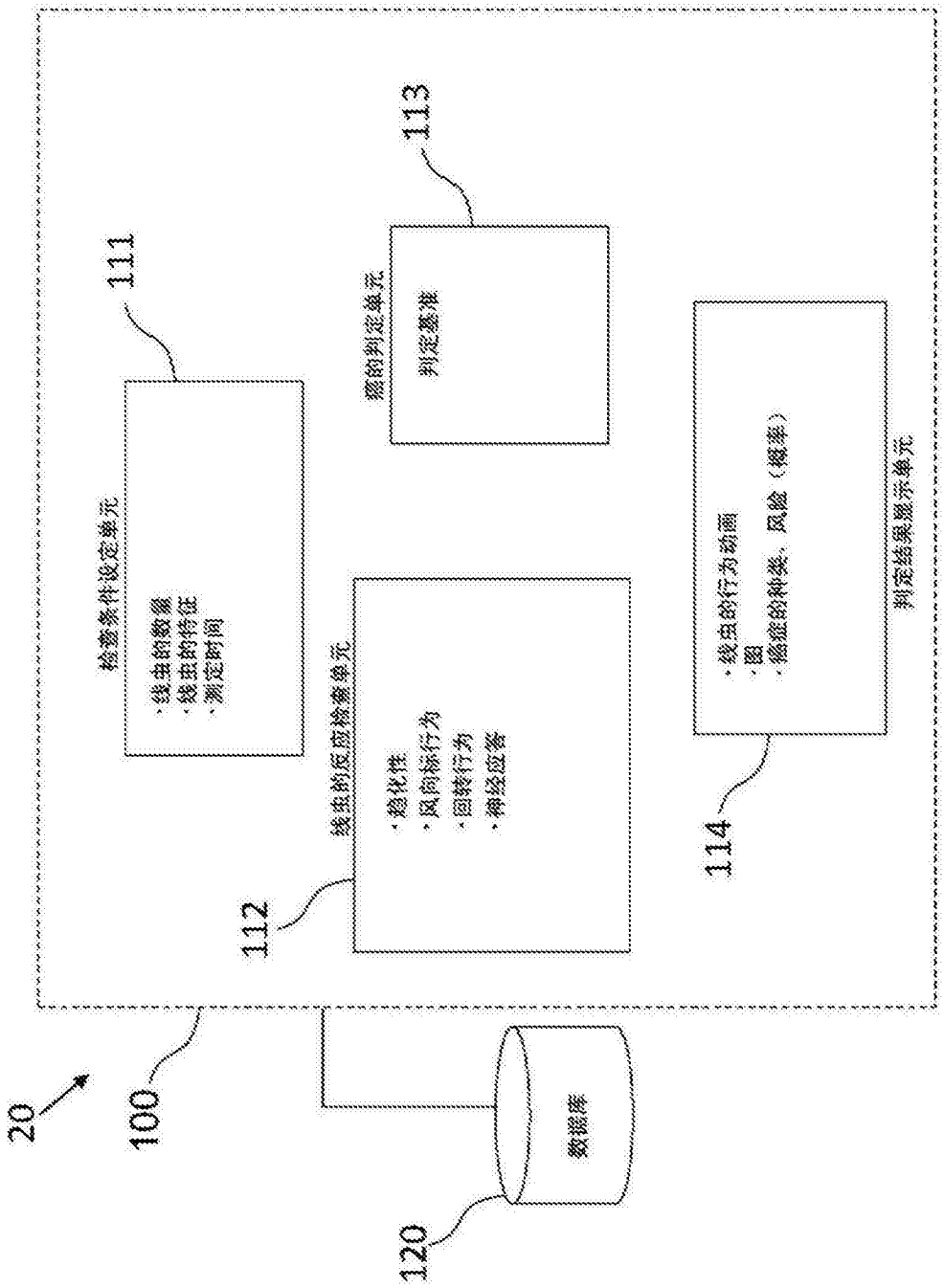

20
100
111
检查条件设定单元
·线虫的数量
·线虫的特征
·测定时间
112
线虫的反应检查单元
·趋化性
·风向标行为
·回转行为
·神经应答
113
病的判定单元
判定基准
114
·线虫的行为动画
·图
·病症的种类、风险（概率）
判定结果显示单元
120
数据库

图16B

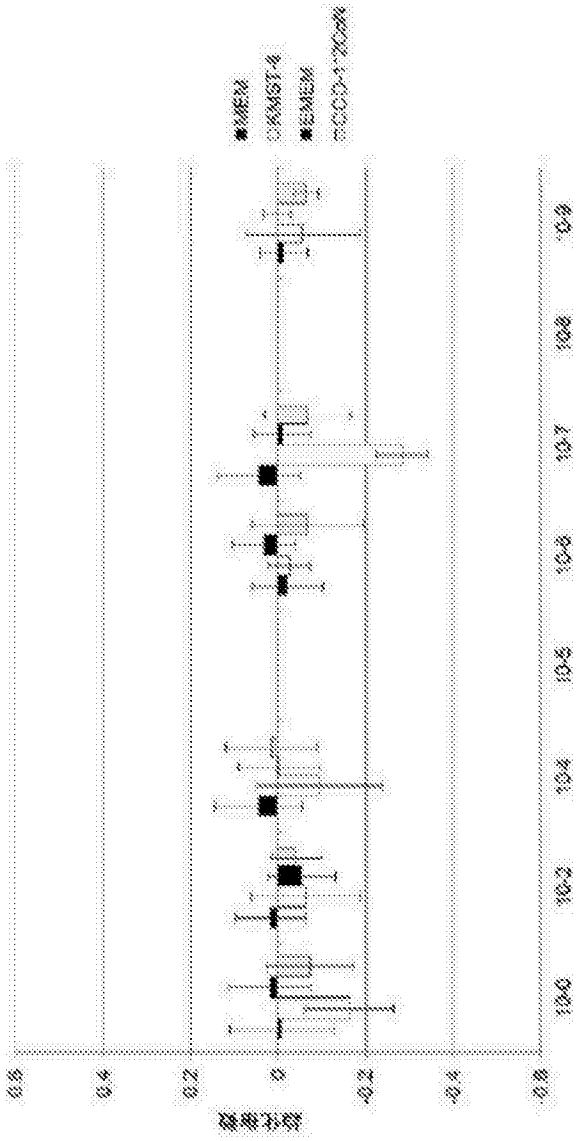


图17

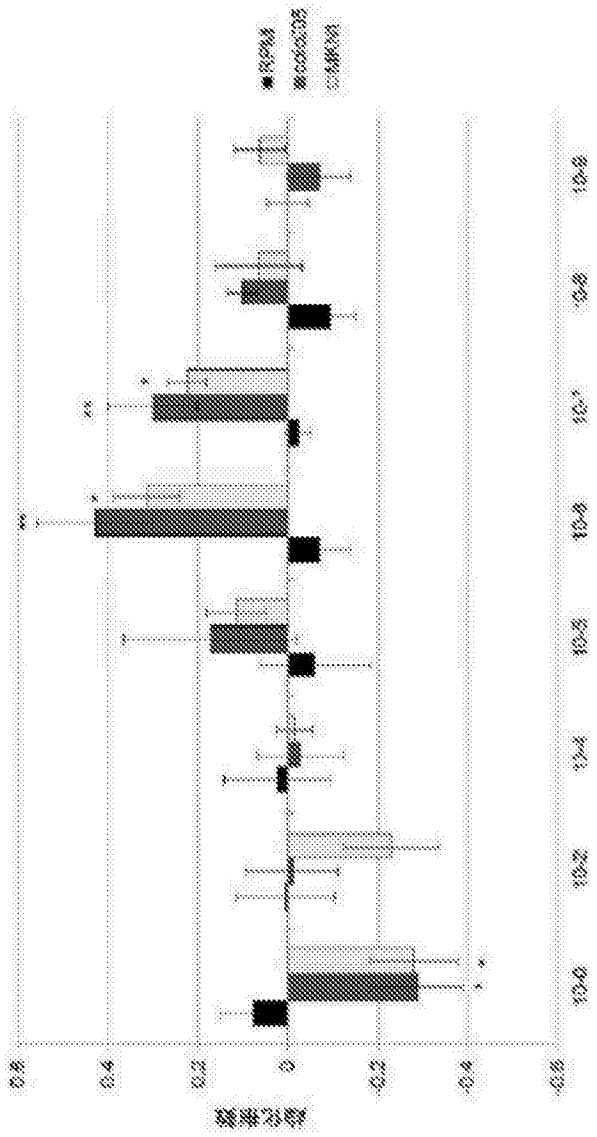


图18

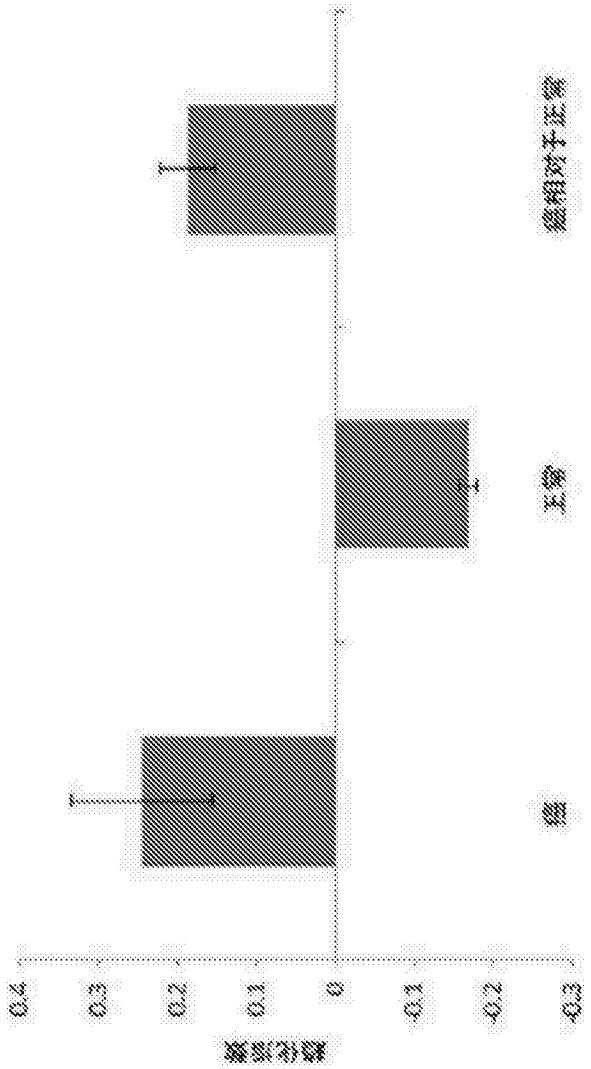


图19

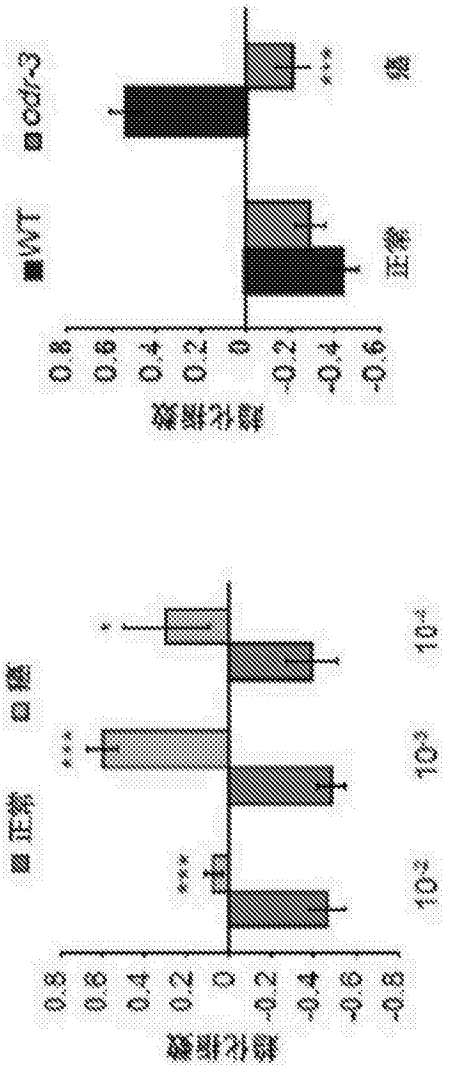


图20

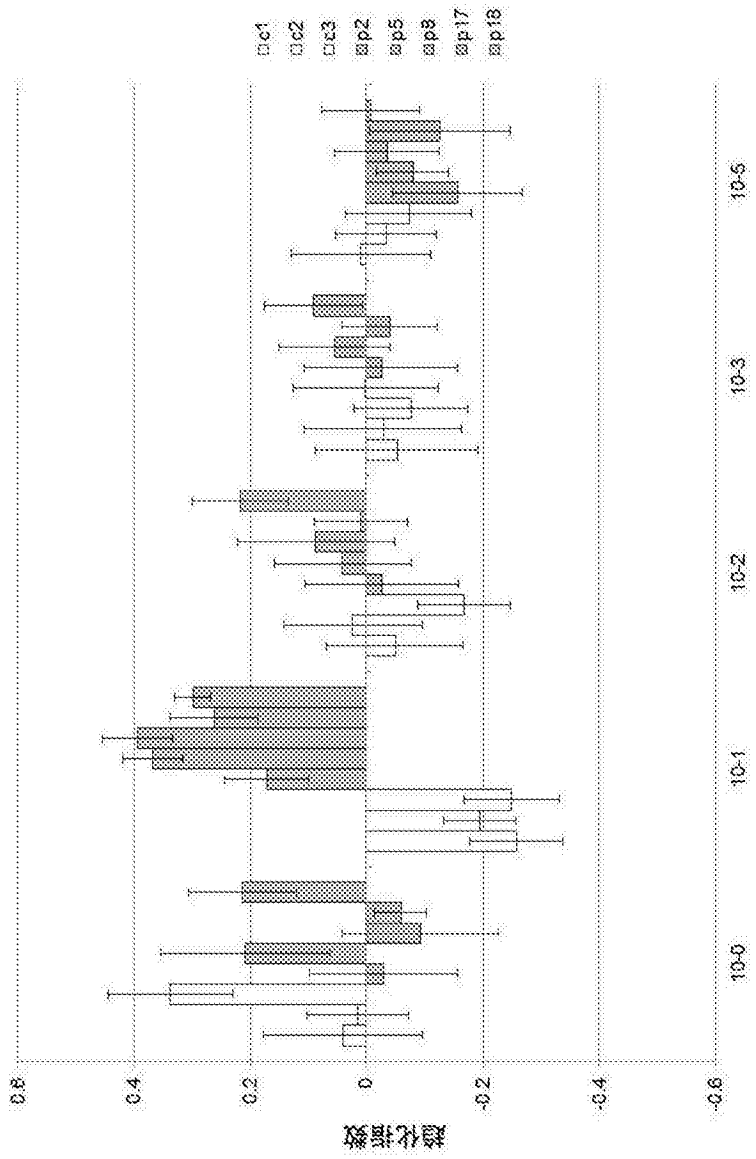
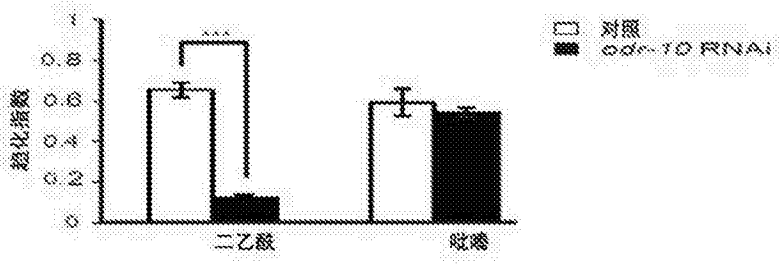

c1
c2
c3
p2
p5
p8
p17
p18
10-5
10-3
10-2
10-1
10-0
0.8
0.4
0.2
0
-0.2
-0.4
-0.6
趋化指数

图21

A



B

气味物质	候补基因数
引诱剂	
异戊醇 (Iaa)	21
苯甲醛 (Bz)	50
丁酮 (But)	17
戊二酮 (Pd)	39
吡嗪 (Py)	56
三甲基噻唑 (Tmt)	22
驱避剂	
壬醇 (Nona)	4
辛醇 (Oct)	10
高 Iaa	1
高 Bz	7
高二乙酰 (De)	28

C

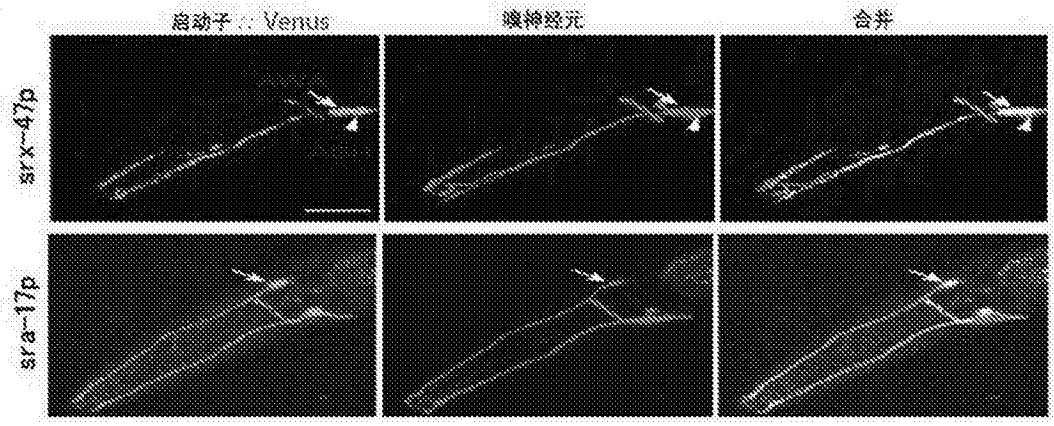


图22

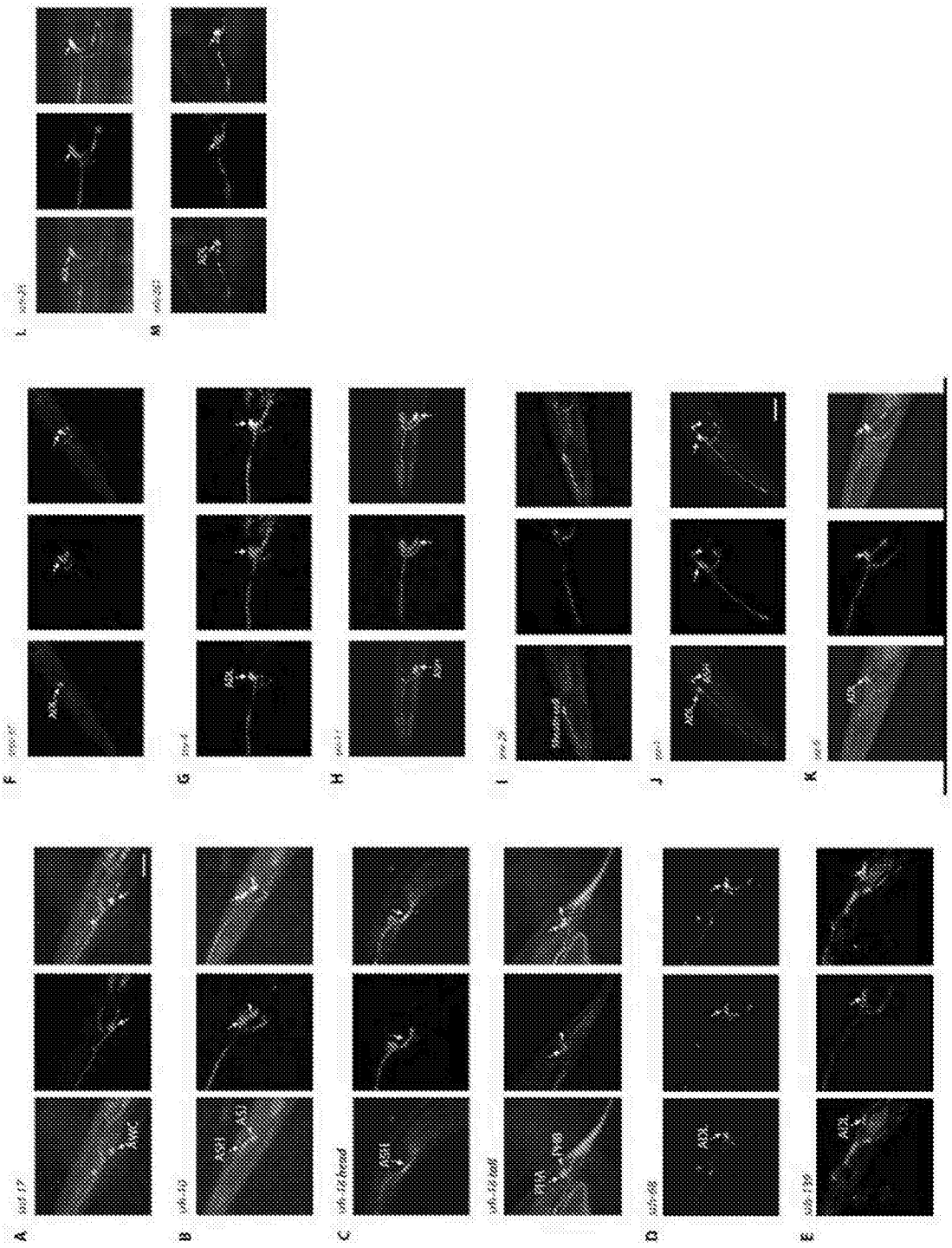


图23

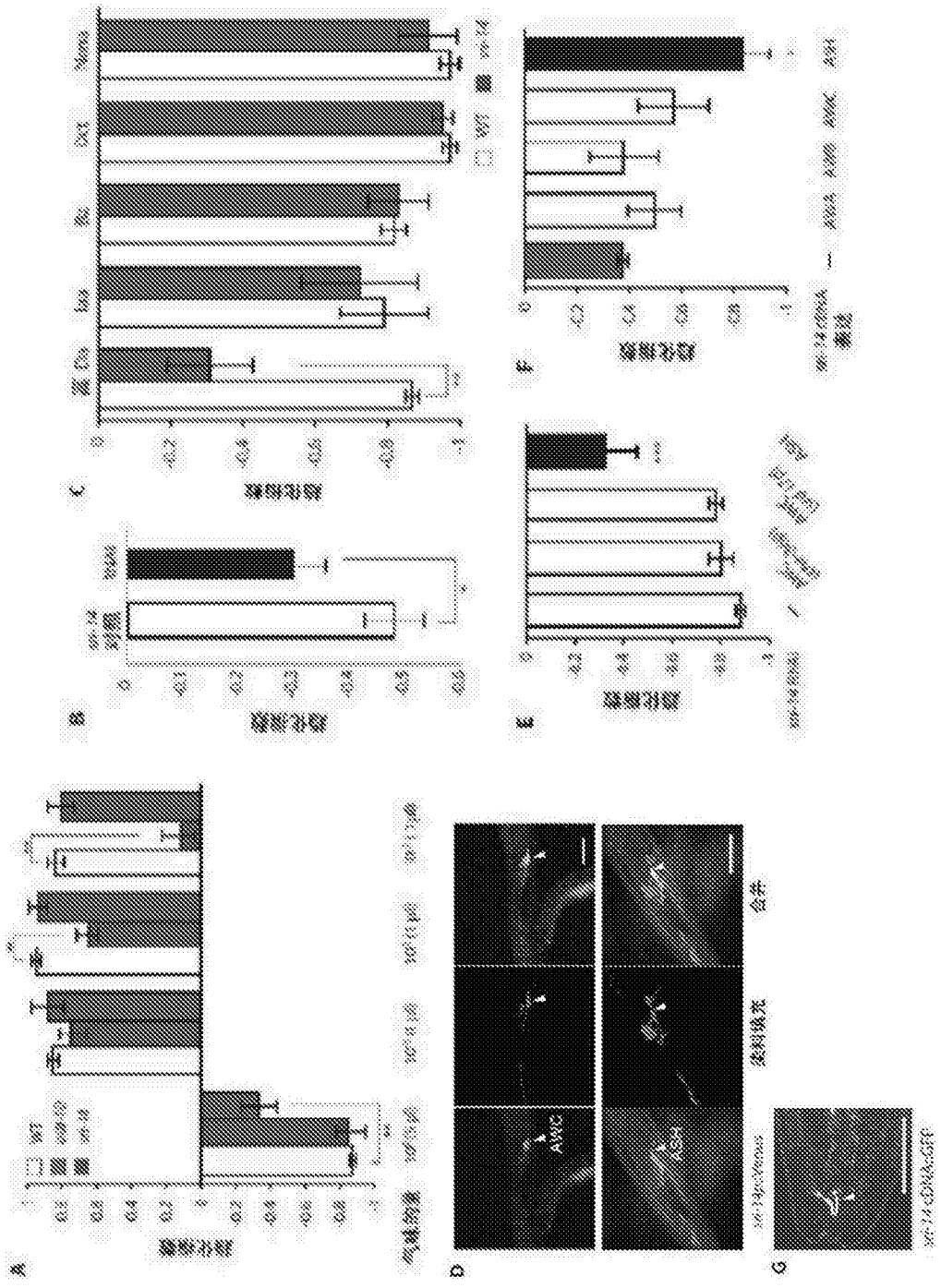


图24

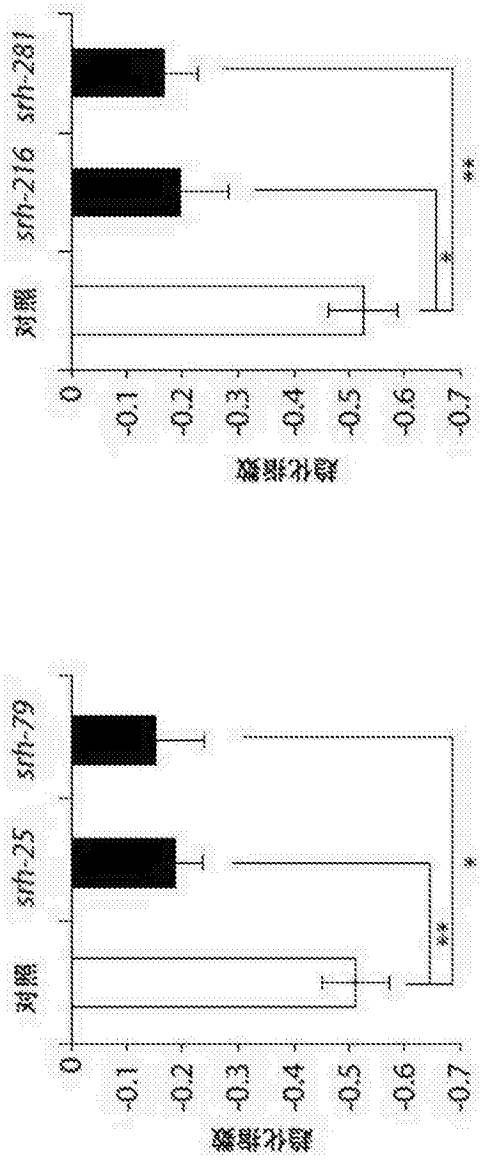

srh-281
srh-216
对照
0
-0.1
-0.2
-0.3
-0.4
-0.5
-0.6
-0.7
趋化指数
**
*
srh-79
srh-25
对照
0
-0.1
-0.2
-0.3
-0.4
-0.5
-0.6
-0.7
趋化指数
*
**

图25

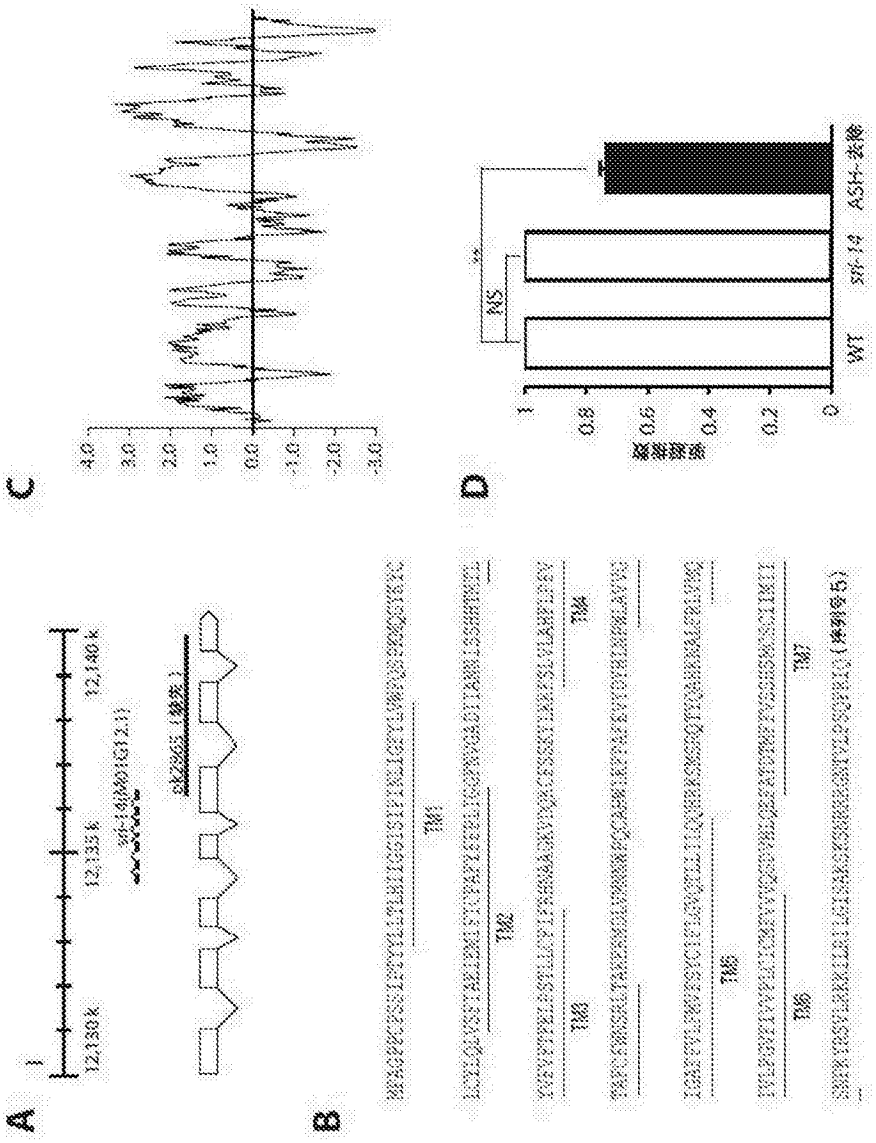


图26

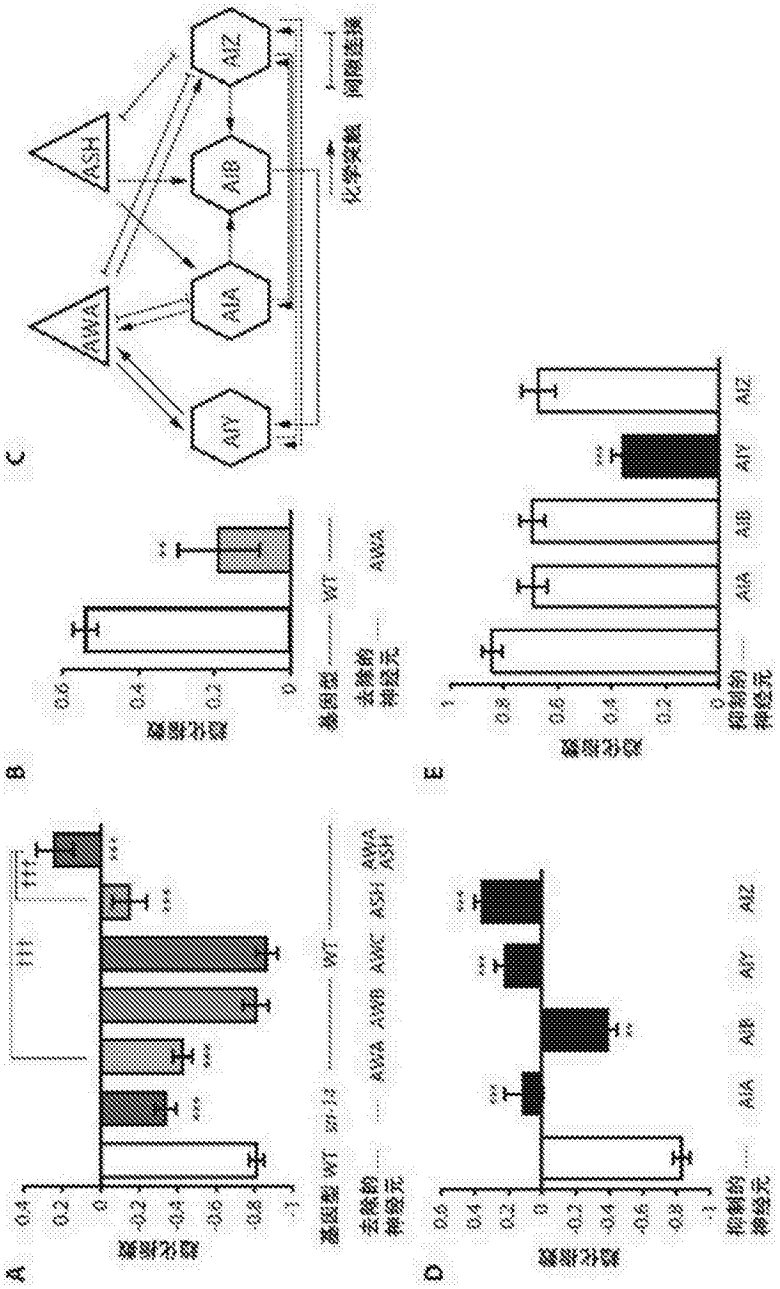

A
B
C
D
E
AIZ
AIY
AIB
AIA
AWA
ASH
化学突触
间隙连接
趋化指数
去除的神经元
基因型
WT
unc-13
AWA
AWB
AWC
ASH
AIZ
AIY
AIB
AIA

图27

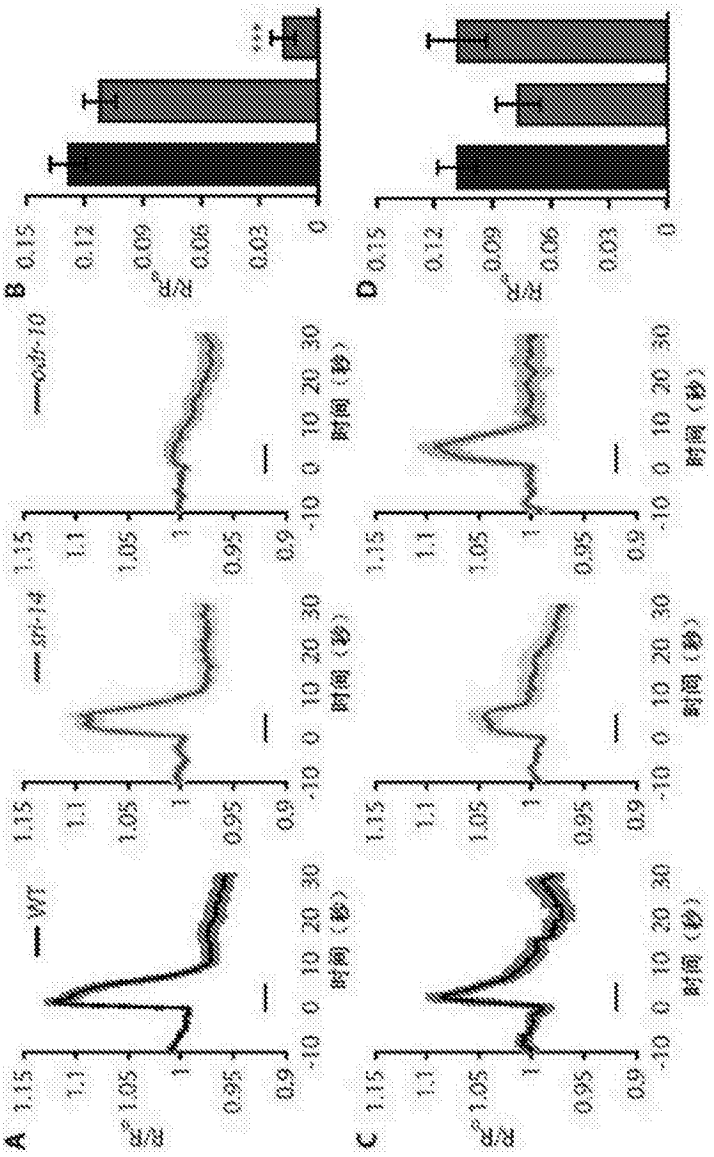


图28

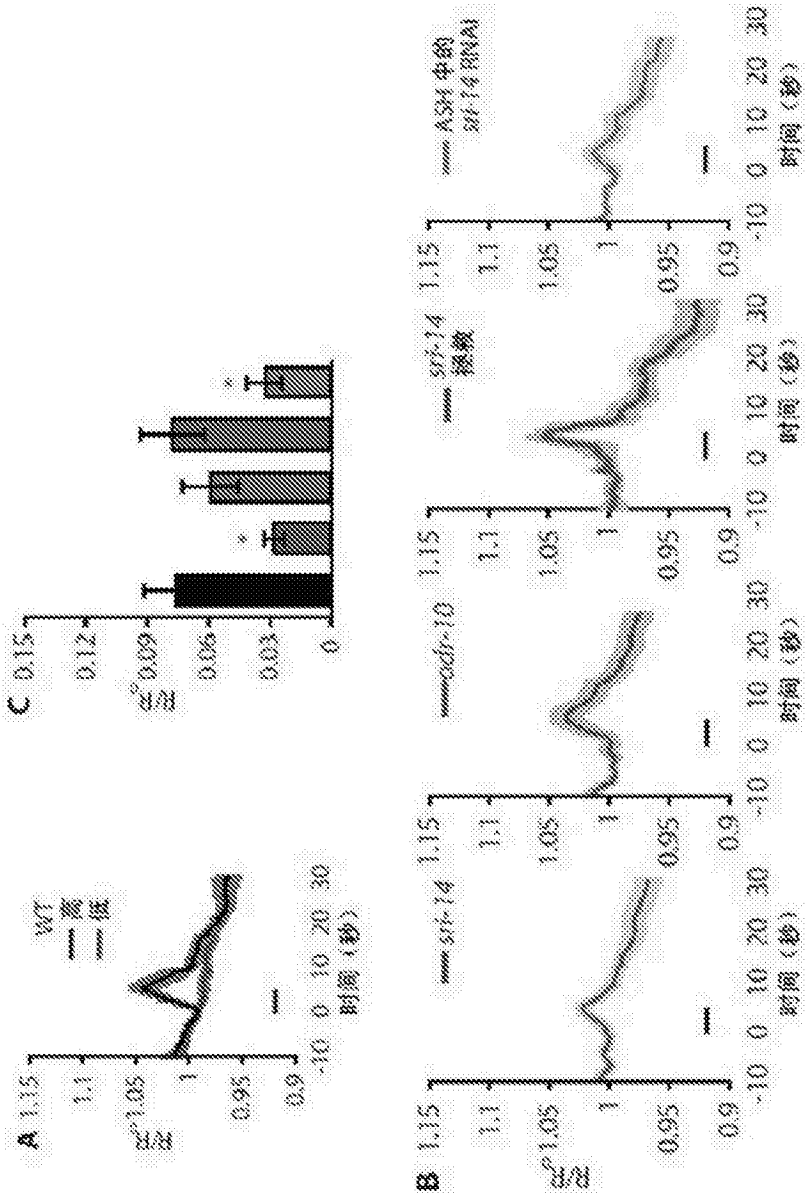

A
B
C
VC1
裸鼠
值
时间（秒）
srh-14
odr-10
ASH 中的
srh-14 RNAi
裸鼠
0.15
0.12
0.09
0.06
0.03
0
1.15
1.1
1.05
1
0.95
0.9
-10
0
10
20
30

图29

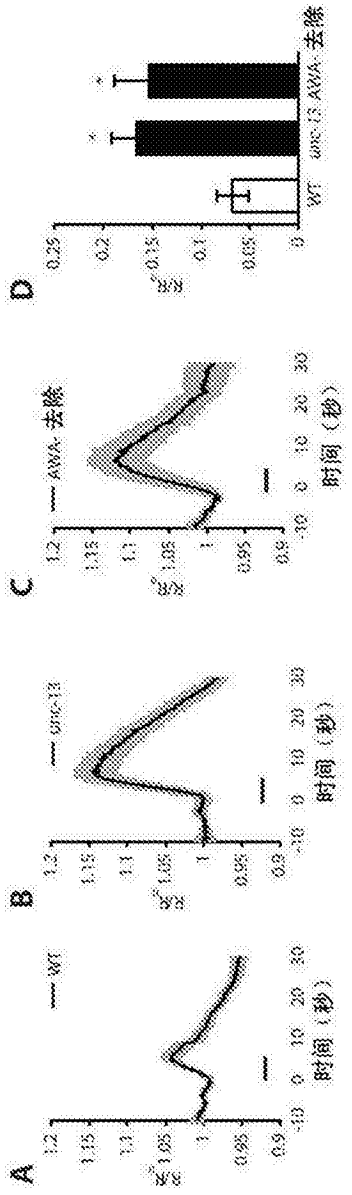


图30

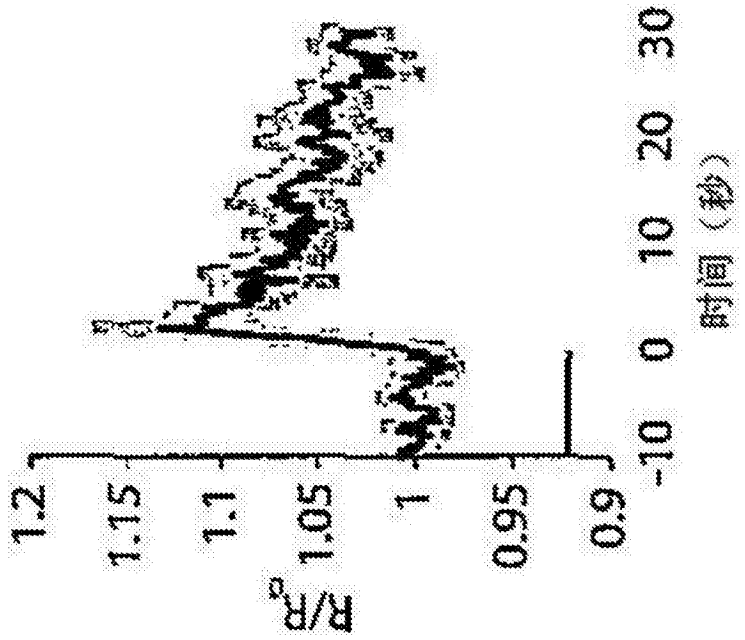

1.2
1.15
1.1
1.05
1
0.95
0.9
R/R0
-10
0
10
20
30
时间（秒）

图31

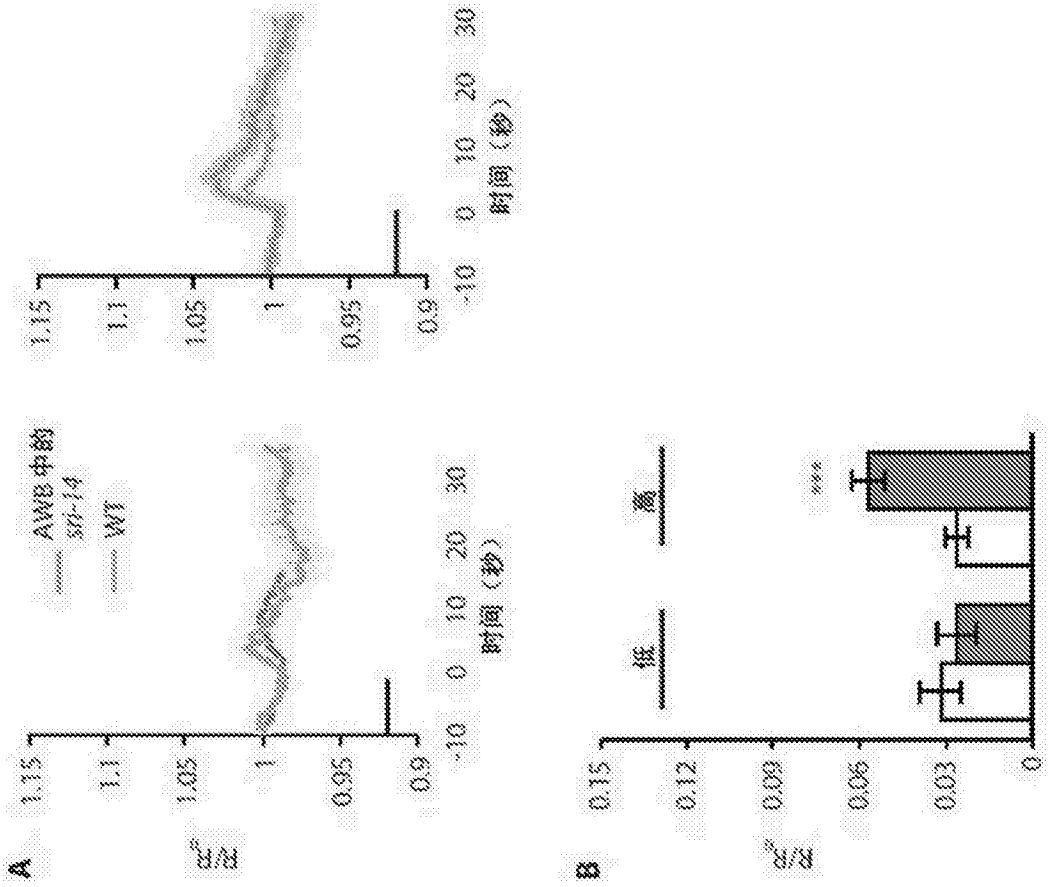

A
AWB中的
sri-14
WT
1.15
1.1
1.05
1
0.95
0.9
R/R0
-10
0
10
20
30
时间（秒）
B
低
高
***
0.15
0.12
0.09
0.06
0.03
0
R/R0

图32

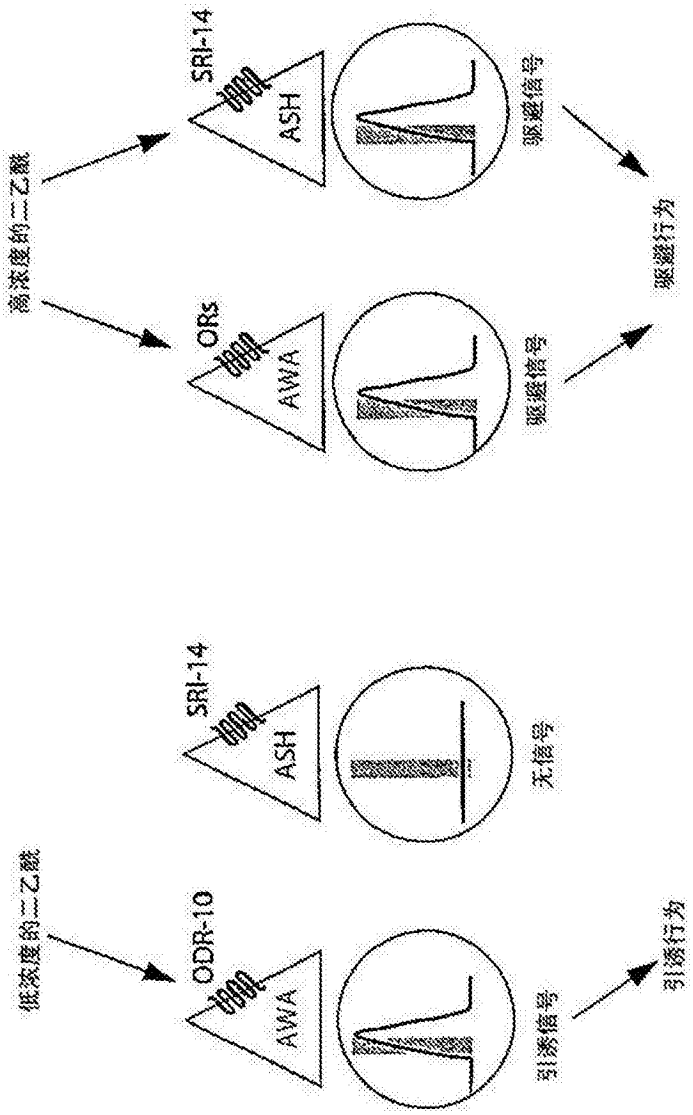

高浓度的二乙酰
SRI-14
ASH
驱避信号
ORs
AWA
驱避信号
驱避行为
低浓度的二乙酰
SRI-14
ASH
无信号
ODR-10
AWA
引诱信号
引诱行为

图33

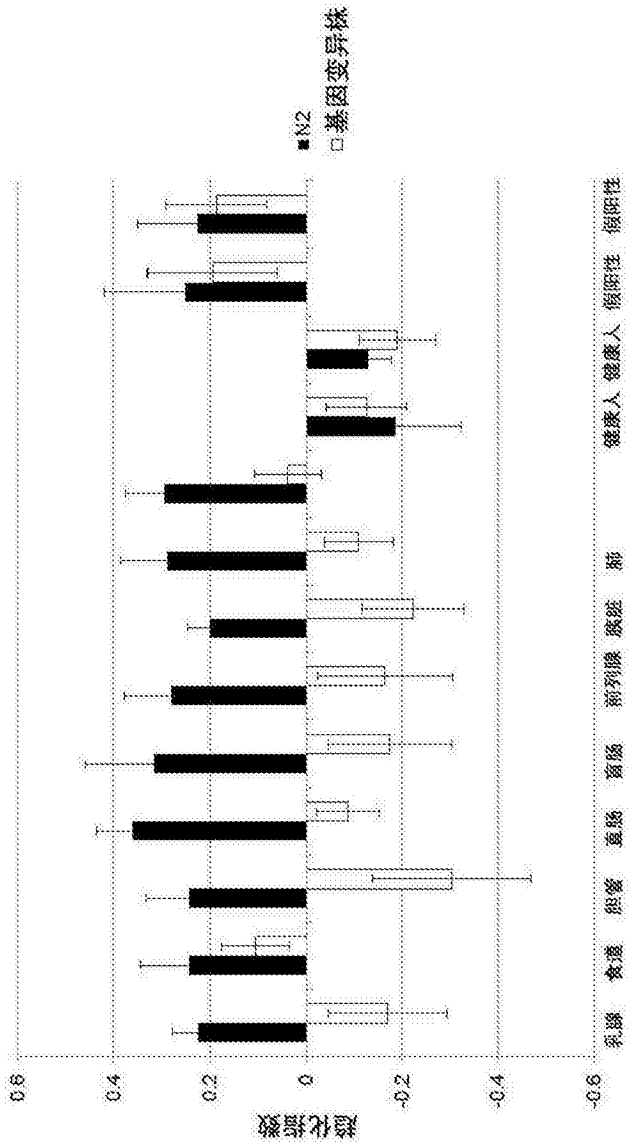

基因变异株
N2
趋化指数
0.6
0.4
0.2
0
-0.2
-0.4
-0.6
丙酮酸
柠檬酸
乙酸乙酯
苯甲醛
2-庚酮
吡嗪
2-戊酮
新戊醇
2-丁酮
苯乙醇
乙醇

图34

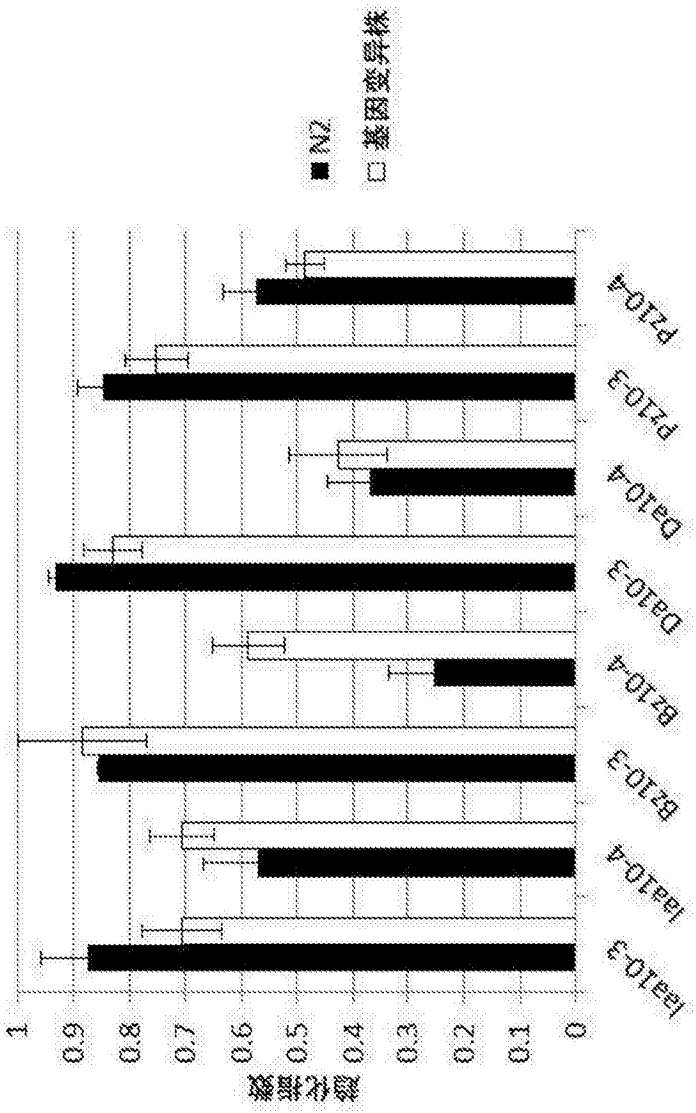

N2
基因变异株
pzl10-4
pzl10-3
bal10-4
bal10-3
bzl10-4
bzl10-3
laa10-4
laa10-3
1
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
趋化指数

图35

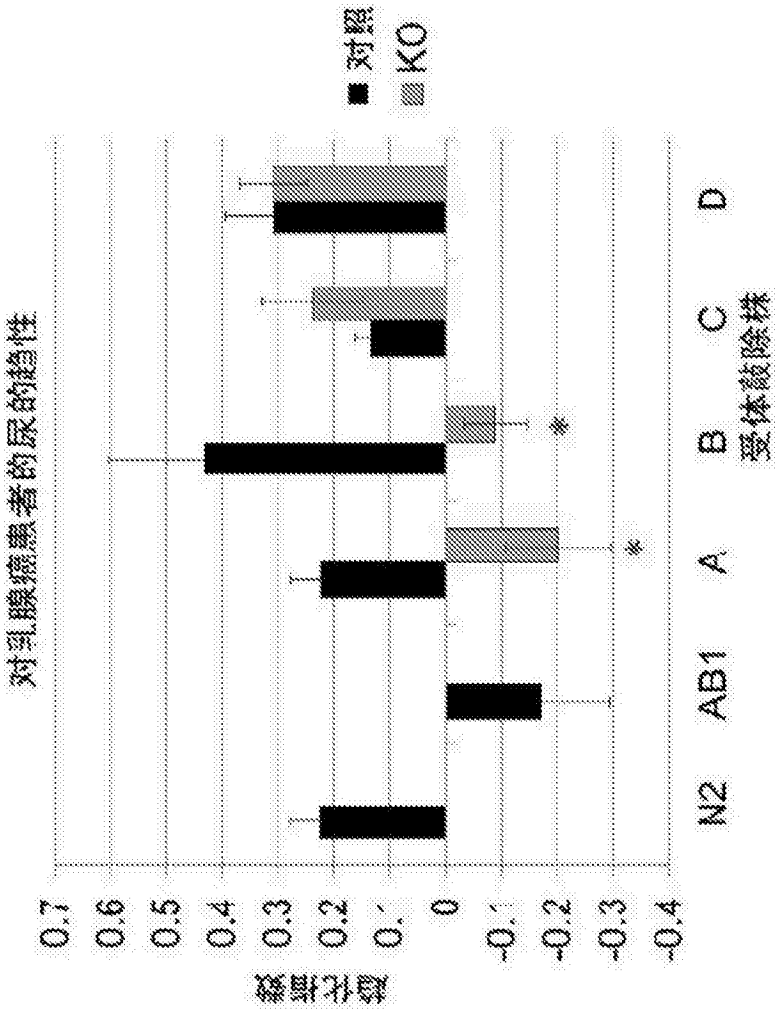

对照
KO
对乳腺癌患者的尿的趋性
趋化指数
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
-0.1
-0.2
-0.3
-0.4
N2
AB1
A
B
C
D
受体敲除株
*
*

图36

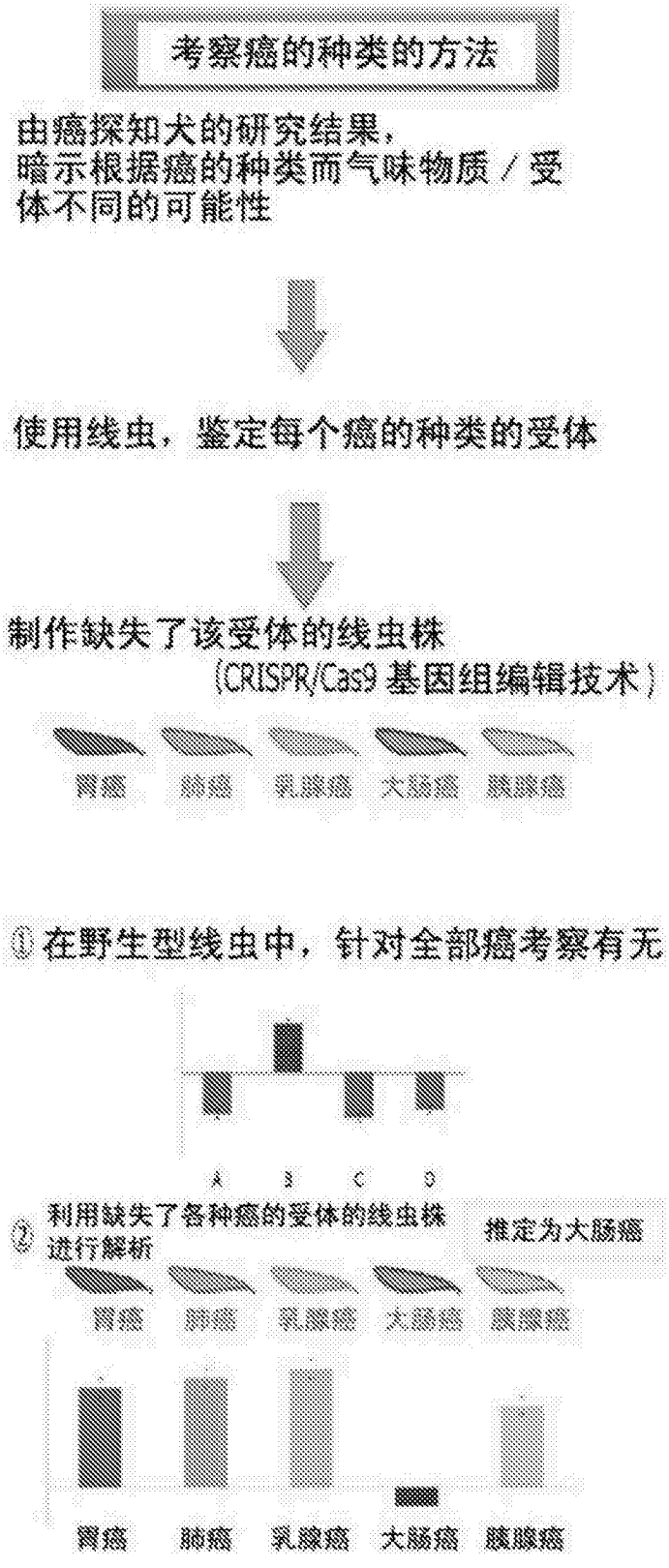

考察癌的种类的方法
由癌探知犬的研究结果，
暗示根据癌的种类而气味物质／受
体不同的可能性
使用线虫，鉴定每个癌的种类的受体
制作缺失了该受体的线虫株
(CRISPR/Cas9 基因组编辑技术)
胃癌
肺癌
乳腺癌
大肠癌
胰腺癌
① 在野生型线虫中，针对全部癌考察有无
A
B
C
D
② 利用缺失了各种癌的受体的线虫株
进行解析
推定为大肠癌
胃癌
肺癌
乳腺癌
大肠癌
胰腺癌
胃癌
肺癌
乳腺癌
大肠癌
胰腺癌

图37