



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 114667355 B

(45) 授权公告日 2024.12.10

(21) 申请号 202080077651.4
 (22) 申请日 2020.11.05
 (65) 同一申请的已公布的文献号
 申请公布号 CN 114667355 A
 (43) 申请公布日 2022.06.24
 (30) 优先权数据
 10-2019-0141548 2019.11.07 KR
 (85) PCT国际申请进入国家阶段日
 2022.04.28
 (86) PCT国际申请的申请数据
 PCT/KR2020/015360 2020.11.05
 (87) PCT国际申请的公布数据
 W02021/091239 KO 2021.05.14
 (73) 专利权人 基因特力株式会社
 地址 韩国大田广域市
 (72) 发明人 安城皖 吴泰祯
 (74) 专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494
 专利代理师 陈桢

(51) Int.Cl.
 C12Q 1/6886 (2006.01)
 (56) 对比文件
 CN 104673896 A, 2015.06.03
 CN 108410980 A, 2018.08.17
 Alexey A Evdokimov等.GLAD-PCR assay of DNA methylation markers associated with colorectal cancer.Biology and Medicine.2016,第8卷(第7期),摘要.
 Chung Hyun Tae等.Alcohol dehydrogenase,iron containing,1 promoter hypermethylation associated with colorectal cancer differentiaion.BMC Cancer.2013,(第13期),摘要.
 黄子懿等.粪便多基因甲基化联合检测在结直肠癌及癌前病变诊断中的价值.肿瘤研究与临床.2023,全文.

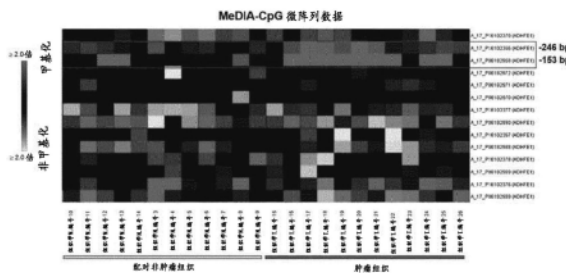
审查员 倪志远

权利要求书1页 说明书9页
序列表3页 附图2页

(54) 发明名称
检测结直肠癌的方法

(57) 摘要

本发明涉及一种提供关于结直肠癌诊断的信息的方法、一种用于诊断结直肠癌的组合物以及包含所述组合物的试剂盒,并且更特别涉及:一种提供关于通过使用特异性扩增多个甲基化结直肠癌标记基因的引物诊断结直肠癌的信息的方法;一种用于诊断结直肠癌的组合物;以及一种包含所述组合物的试剂盒。



1. 引物和探针在制备用于检测样品中SDC2(黏结蛋白聚糖2)和ADHFE1(含铁醇脱氢酶1)基因的CpG甲基化的试剂盒中的用途,所述样品具有用至少一种试剂不同修饰的甲基化SDC2和ADHFE1基因以及非甲基化SDC2和ADHFE1基因,其中所述引物和探针包含:特异性扩增甲基化SDC2基因的引物,和能够与扩增的甲基化SDC2基因互补杂交的探针,其中所述引物的序列为SEQ ID NO: 10和11,其中所述探针的序列为SEQ ID NO: 12;以及特异性扩增甲基化ADHFE1基因的引物,和能够与扩增的甲基化ADHFE1基因互补杂交的探针,其中所述引物的序列为SEQ ID NO: 1和2或SEQ ID NO: 4和5,其中所述探针的序列为SEQ ID NO: 3或6。

2. 根据权利要求1所述的用途,其中所述试剂是亚硫酸氢盐、酸式亚硫酸盐、二亚硫酸盐或其组合。

3. 根据权利要求1所述的用途,其中至少一个胞嘧啶碱基通过所述试剂的处理转化为尿嘧啶或不同于胞嘧啶的碱基。

4. 根据权利要求1所述的用途,其中使用选自以下的方法检测甲基化:PCR、基因芯片和测序。

5. 根据权利要求1所述的用途,其中使用选自以下的方法检测甲基化:甲基化特异性PCR、定量PCR、合成法测序和连接法测序。

6. 根据权利要求1所述的用途,其中使用选自以下的方法检测甲基化:实时甲基化特异性PCR和使用甲基化DNA特异性结合蛋白的PCR。

7. 根据权利要求1所述的用途,其中使用选自使用甲基化DNA特异性结合抗体的PCR法进行所述甲基化的检测。

8. 根据权利要求4-7中任一项所述的用途,其中甲基化是通过检测与所述探针结合并展现荧光的材料来检测的。

9. 一种用于诊断结直肠癌的组合物,所述组合物包含:

至少一种试剂,所述至少一种试剂不同地修饰甲基化SDC2(黏结蛋白聚糖2)和ADHFE1(含铁醇脱氢酶1)基因以及非甲基化SDC2和ADHFE1基因;以及

特异性扩增甲基化SDC2基因的引物,和能够与扩增的甲基化SDC2基因互补杂交的探针,其中所述引物的序列为SEQ ID NO: 10和11,其中所述探针的序列为SEQ ID NO: 12;以及特异性扩增甲基化ADHFE1基因的引物,和能够与扩增的甲基化ADHFE1基因互补杂交的探针,其中所述引物的序列为SEQ ID NO: 1和2或SEQ ID NO: 4和5,其中所述探针的序列为SEQ ID NO: 3或6。

10. 根据权利要求9所述的组合物,其中所述试剂是亚硫酸氢盐、酸式亚硫酸盐、二亚硫酸盐或其组合。

11. 根据权利要求9所述的组合物,其中至少一个胞嘧啶碱基通过所述试剂的处理转化为尿嘧啶或不同于胞嘧啶的碱基。

12. 一种用于诊断结直肠癌的试剂盒,所述试剂盒包含根据权利要求9至11中任一项所述的组合物。

检测结直肠癌的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种提供关于诊断结直肠癌的信息的方法、一种用于诊断结直肠癌的组合物以及包括所述组合物的试剂盒,并且更特别涉及一种提供关于使用特异性扩增多个甲基化结直肠癌标记基因的引物诊断结直肠癌的信息的方法、一种用于诊断结直肠癌的组合物以及一种包括所述组合物的试剂盒。

背景技术

[0002] 在哺乳动物细胞的基因组DNA中,除了A、C、G和T之外,还存在第五种碱基,是5-甲基胞嘧啶(5-mC),其中一个甲基附接至胞嘧啶环的第五个碳上。5-mC始终仅附接至CG二核苷酸的C(5'-mCG-3'),并且该CG通常表示为CpG。CpG中的C大部分被其所附接的甲基甲基化。CpG的这种甲基化抑制了基因组中重复序列如Alu或转座子的表达,并且CpG是哺乳动物细胞中最常发生基因外变化的位点。该CpG的5-mC通过脱氨基作用自然转化为T。因此,在哺乳动物基因组中CpG仅以1%的频率出现,远低于其正常频率($1/4 \times 1/4 = 6.25\%$)。

[0003] 存在称为CpG位点(CpG岛)的区域,其中CpG非常密集。CpG位点长度为0.2-3kb,并且是C、G碱基分布百分比大于50%且CpG分布百分比为3.75%以上的高度集中区域。约45,000个CpG位点出现在整个人基因组中,并且集中发现于调控基因表达的启动子区域。实际上,CpG位点出现在持家基因的启动子中,持家基因约占人基因的一半(Cross S.等人,Curr.Opin.Gene Develop.,5:309,1995)。已知异常的DNA甲基化主要发生在相应基因的5'调控区,从而降低相应基因的表达。

[0004] 在另一方面,在正常人的体细胞中,这些持家基因启动子区域的CpG岛没有发生甲基化,而是X染色体上的印记基因和失活基因发生甲基化,从而阻止所述印记基因和失活基因在发育过程中的表达。

[0005] 在癌变过程中,启动子CpG岛发生甲基化,并且相应基因的表达受损。特别是当肿瘤抑制基因的调控区CpG岛发生甲基化时,这些基因的表达和功能被阻断(像编码序列突变),从而促进癌症的发生和发展,所述肿瘤抑制基因调控细胞周期或细胞凋亡、修复DNA、参与细胞粘附和细胞间相互作用、并抑制侵袭和转移。由于老化,CpG岛上也可能出现部分甲基化。

[0006] 肿瘤相关基因的调控区甲基化是癌症的重要指示物,因此可以按多种方式使用,如癌症的诊断和早期诊断、癌症风险的预测、癌症预后的预测、治疗后的随访、对抗癌疗法的反应预测等。实际上,最近已经积极尝试研究血液、痰、唾液、粪便、尿液等中的肿瘤相关基因的启动子甲基化,并将其结果用于治疗各种类型的癌症(Ahlquist,D.A.等人,Gastroenterol.,119:1219,2000)。

[0007] 在这种技术背景下,本申请的诸位发明人确定可以使用特异性扩增多个甲基化结直肠癌标记基因的引物以高检测限和准确性检测结直肠癌标记基因的甲基化,从而完成本发明。

发明内容

[0008] 本发明的目的是提供一种提供关于使用特异性扩增多个甲基化结直肠癌标记基因的引物诊断结直肠癌的信息的方法。

[0009] 本发明的另一个目的是提供一种使用特异性扩增多个甲基化结直肠癌标记基因的引物诊断结直肠癌的组合物。

[0010] 本发明的再另一个目的是提供一种包括所述组合物的用于诊断结直肠癌的试剂盒。

[0011] 为了实现上述目的,本发明提供了一种提供关于诊断结直肠癌的信息的方法,所述方法包括(a)将样品用至少一种试剂处理,所述至少一种试剂不同地修饰甲基化SDC2(黏结蛋白聚糖2)和ADHFE1(含铁醇脱氢酶1)基因以及非甲基化SDC2和ADHFE1基因;以及(b)用特异性扩增所述甲基化SDC2和ADHFE1基因的引物进行处理。

[0012] 此外,本发明提供了一种用于诊断结直肠癌的组合物,所述组合物包括不同地修饰甲基化SDC2(黏结蛋白聚糖2)和ADHFE1(含铁醇脱氢酶1)基因以及非甲基化SDC2和ADHFE1基因的至少一种试剂,以及特异性扩增所述甲基化SDC2和ADHFE1基因的引物。

[0013] 此外,本发明提供了一种包括所述组合物的用于诊断结直肠癌的试剂盒。

附图说明

[0014] 图1示出使用结直肠癌手术患者的癌组织及其相邻正常组织DNA进行基因组水平甲基化分析(MeDIA-CpG微阵列)的结果;

[0015] 图2示出使用甲基化特异性引物对ADHFE1基因扩增的结果;

[0016] 图3示出使用甲基化特异性引物对ADHFE1基因扩增的结果;以及

[0017] 图4示出在正常人和结直肠癌患者中,通过检测SDC2基因的甲基化和ADHFE1基因的甲基化诊断结直肠癌的结果。

具体实施方式

[0018] 除非另外定义,否则本文使用的所有技术和科学术语均具有与本发明所属领域的技术人员通常所理解的含义相同的含义。通常,本文所用的命名法是本领域熟知的,并且是典型的。

[0019] 本申请的诸位发明人已经确定,与基于单个结直肠癌标记基因的甲基化检测的程度相比,使用特异性扩增多个甲基化结直肠癌标记基因的引物可以改善甲基化DNA检测的灵敏性和特异性。在根据本发明的具体实施方案中,与SDC2基因的甲基化检测相比,通过检测SDC2基因和ADHFE1基因的甲基化改善了结直肠癌诊断的灵敏性和特异性,由此在诊断结直肠癌方面的有用性很高。

[0020] 因此,本发明的一个方面涉及一种提供关于诊断结直肠癌的信息的方法,所述方法包括(a)将样品用至少一种试剂处理,所述至少一种试剂不同地修饰甲基化SDC2(黏结蛋白聚糖2)和ADHFE1(含铁醇脱氢酶1)基因以及非甲基化SDC2和ADHFE1基因;以及(b)用特异性扩增所述甲基化SDC2和ADHFE1基因的引物进行处理。

[0021] 在本发明中,步骤(a)是将所述样品用不同地修饰甲基化SDC2和ADHFE1基因和非甲基化SDC2和ADHFE1基因的至少一种试剂处理。

[0022] 如本文所用,术语“甲基化”意指修饰成5-甲基胞嘧啶(5-mC),其中甲基附接至胞嘧啶碱基环的第五个碳,并且5-甲基胞嘧啶始终仅附接至CG二核苷酸的C(5'-mCG-3'),并且这种CG通常称为CpG。CpG的甲基化抑制了基因组中重复序列如Alu或转座子的表达,并且CpG是哺乳动物细胞中最常发生基因外变化的位点。该CpG的5-mC通过脱氨作用自然转化为T,因此,在哺乳动物基因组中CpG仅以1%的频率存在,远低于其正常频率($1/4 \times 1/4 = 6.25\%$)。

[0023] 存在称为CpG岛的区域,其中CpG非常密集。CpG岛长度为0.2-3kb,并且是C、G碱基分布百分比大于50%且CpG分布百分比为3.75%以上的高度集中位点。约45,000个CpG岛出现在整个人基因组中,并且集中发现于调控基因表达的启动子区域。CpG岛实际上出现在持家基因的启动子中,持家基因约占人基因的一半。

[0024] 从样本中分离的核酸是从样本的生物样品中获得的。为了诊断结直肠癌或结直肠癌的进展,必须通过刮取或活检从结直肠组织中分离核酸。这种样品可以通过本领域已知的各种医学程序获得。

[0025] 通过与来自不存在结直肠组织细胞生长异常的样本的核酸的相同部分进行比较来测量从样本获得的样品的核酸的甲基化程度。高甲基化指示至少一种核酸中存在甲基化的等位基因。当在不存在结直肠组织细胞生长异常的样本中测试相同的核酸时,甲基化等位基因不会出现。

[0026] “正常”细胞是不显示异常细胞形态或细胞学特性变化的细胞。“肿瘤”细胞是癌细胞,而“非肿瘤”细胞是作为患病组织的部分但不是肿瘤部位的细胞。

[0027] 根据本发明,通过确定从样本中分离的至少一种核酸的甲基化阶段,可以对样本的结直肠组织中的细胞生长异常进行早期诊断。可以将至少一种核酸的甲基化阶段与从未展现出异常结直肠组织细胞生长的样本分离的至少一种核酸的甲基化阶段进行比较。优选地,核酸是含有CpG的核酸,如CpG岛。

[0028] 根据本发明,可以诊断样本的结直肠组织中的细胞生长异常的倾向性(predisposition),包括确定从样本中分离的至少一种核酸的甲基化。可以将至少一种核酸的甲基化阶段与从在结直肠组织中没有异常细胞生长倾向性的样本中分离的至少一种核酸的甲基化阶段进行比较。

[0029] 如本文所用,术语“倾向性”是指易经受上述细胞生长异常的特性。具有倾向性的样本是尚未展现出细胞生长异常但其中存在细胞生长异常或其中发生细胞生长异常的可能性增加的样本。

[0030] 靶DNA中CpG甲基化的存在可以是疾病的指示物,并且例如可以测量靶DNA的启动子、5'非翻译区和内含子中的任何一个的CpG甲基化。

[0031] 含有CpG的基因通常是DNA。然而,本发明的方法可以使用含有例如DNA或者DNA和RNA(包括mRNA)的样品进行,其中DNA或RNA可以是单链或双链,或者可以使用含有DNA-RNA杂交体的样品。

[0032] 也可以使用核酸混合物。如本文所用,术语“多重”包括在一种基因中存在多个待检测的特定核酸序列位点的情况和在一个管(单个反应器)中包括多种靶DNA序列的情况。待检测的特定核酸序列可以是分子的一部分,或者可以最初以离散分子的形式存在,其中特定序列构成整个核酸序列。核酸序列不一定是以纯形式存在的核酸,并且核酸可以是

复杂混合物中的一小部分,如在人总DNA中包含的一种。

[0033] 特别地,本发明涉及检测在单个反应器中的样品中多种靶DNA序列的甲基化,其中所述样品可以包括多种靶DNA序列,并且可以不受限制地使用任何靶DNA,只要它是当其表达由于异常甲基化而被抑制时影响结直肠癌发生或发展的基因以及控制基因即可。

[0034] 在本发明中,样品可以源自人体,并且样品可以包括例如结直肠癌组织、细胞、粪便、尿液、血液、血清或血浆。

[0035] 可以不受限制地使用不同地修饰甲基化DNA和非甲基化DNA的至少一种试剂,只要它能够区分非甲基化胞嘧啶碱基和甲基化胞嘧啶碱基即可,并且所述试剂的例子可以包括但不限于亚硫酸氢盐、酸式亚硫酸盐、二亚硫酸盐及其组合。特别地,当用试剂处理时,甲基化胞嘧啶碱基未发生转化,而非甲基化胞嘧啶碱基可以转化为尿嘧啶或除胞嘧啶之外的碱基。

[0036] 在本发明中,步骤 (b) 是用特异性扩增所述甲基化SDC2基因和所述甲基化ADHFE1基因的引物进行处理。

[0037] 例如,对于引物,可以将正向和反向引物配对并同时用于PCR。CpG区的甲基化“C”必然位于引物的3'端,从而展现出甲基化检测的高特异性。特异性扩增甲基化ADHFE1基因的正向引物可包括例如SEQ ID NO:1或4的序列。反向引物可包括例如SEQ ID NO:2或5的序列。特异性扩增甲基化SDC2基因的引物可包括SEQ ID NO:10或11的序列。

[0038] 本发明还可包括用探针进行处理,所述探针能够与使用步骤 (b) 中的引物特异性扩增的甲基化SDC2基因和甲基化ADHFE1基因各自互补杂交。

[0039] 在杂交反应中,用于实现特定严格水平的条件根据待杂交核酸的特性而变化。例如,在选择杂交条件时考虑待杂交的核酸位点的长度、同源性程度、核苷酸序列组成(例如GC/AT比率)和核酸类型(例如RNA、DNA)。另一个考虑因素是核酸是否固定在例如过滤器等上。

[0040] 非常严格条件的例子如下:室温下2X SSC/0.1% SDS (杂交条件),室温下0.2X SSC/0.1% SDS (低严格条件),42°下0.2X SSC/0.1% SDS (中严格条件)和68°C下0.1X SSC (高严格条件)。洗涤过程可以使用这些条件中的任何一种进行,并且例如可以使用高严格条件或上述条件中的任何一种。可以按上述顺序每次应用这些条件10至15分钟,或者可以重复应用上述条件的全部或一些。然而,如上所述,最佳条件根据所涉及的特定杂交反应而变化,并且可以通过实验确定。通常,高严格条件用于目的探针的杂交。

[0041] 能够与扩增的甲基化SDC2基因互补杂交的探针可包括例如SEQ ID NO:3或6的序列。能够与扩增的甲基化ADHFE1基因互补杂交的探针可包括SEQ ID NO:12的序列。

[0042] 在一些情况下,探针可以被可检测地标记,并且可以用例如放射性同位素、荧光化合物、生物发光化合物、化学发光化合物、金属螯合物或酶标记。如上所述的探针的适当标记是本领域熟知的技术,并且可以通过典型方法进行。

[0043] 可以基于荧光信号检测扩增产物的量。检测方法可以包括使用嵌入剂(所述嵌入剂通过与探针所结合的扩增产物的双链DNA结合而展示荧光)的嵌入方法,使用其中5'端用荧光材料标记且3'端用淬灭剂标记的寡核苷酸的方法,等。

[0044] 根据本发明的扩增可以通过实时定量扩增(例如实时聚合酶链式反应(PCR))进行,并且在实时PCR中,可以使用荧光信号检测PCR扩增产物的量。随着实时PCR的进行,荧光

信号的强度随多核苷酸量的增加成比例地增加,并且获得了显示荧光信号强度(取决于扩增循环数)的扩增特征曲线。

[0045] 总体上,扩增特征曲线被划分为:基线区域,所述基线区域显示基本上不反映多核苷酸量的背景荧光信号;指数区域,所述指数区域中荧光信号随着多核苷酸产物的量的增加而增加;以及平台区域,所述平台区域中PCR达到饱和并且因此荧光信号的强度不再增加。

[0046] 通常,从基线区域到指数区域的转变点(即当PCR扩增产物的量达到荧光可检测的量时的点)处的荧光信号强度称为阈值,并且与扩增特征曲线上的阈值对应的扩增循环数称为阈值循环(Ct)值。

[0047] 通过测量Ct值、分析其中基于标准材料的Ct(阈值循环)值确定浓度的标准曲线、并确认扩增基因的浓度,可以确定甲基化特异性灵敏性和/或特异性。

[0048] 在一个实施方案中,可以使用选自以下的任何方法检测甲基化:PCR、甲基化特异性PCR、实时甲基化特异性PCR、使用甲基化DNA特异性结合蛋白的PCR、使用甲基化DNA特异性结合抗体的PCR、定量PCR、基因芯片、测序、合成法测序、和连接法测序。

[0049] (1) 甲基化特异性PCR:对于通过甲基化特异性PCR的检测,在用硫酸氢盐处理时,5'-CpG'-3'区域的胞嘧啶在甲基化的情况下仍为胞嘧啶,而在非甲基化的情况下转化为尿嘧啶。因此,对于用亚硫酸氢盐处理后获得的经修饰核苷酸序列,可以构建与其中存在5'-CpG-3'核苷酸序列的区域相对应的引物。当使用引物进行PCR时,在甲基化的情况下,由于使用了与甲基化核苷酸序列相对应的引物,产生了PCR产物,并且可以通过琼脂糖凝胶电泳确认甲基化。此处,甲基化检测探针可以是TaqMan、分子信标、或具有自我报告功能或能量转移标记功能的探针,但不限于此。

[0050] (2) 实时甲基化特异性PCR:实时甲基化特异性PCR是一种由甲基化特异性PCR改进得到的实时测量方法,并且包括用亚硫酸氢盐处理基因组DNA,设计对应于甲基化情况的PCR引物,并使用这些引物进行实时PCR。此处,有两种检测方法:使用与扩增核苷酸序列互补的TaqMan探针的检测方法和使用SYBR Green的检测方法。因此,实时甲基化特异性PCR能够仅选择性地定量分析甲基化DNA。这样,使用体外甲基化DNA样品创建标准曲线,并且还将核苷酸序列中没有5'-CpG-3'序列的基因扩增作为标准化的阴性对照组,由此定量分析甲基化的程度。

[0051] (3) 使用甲基化DNA特异性结合蛋白的PCR、定量PCR和DNA芯片测定:在使用甲基化DNA特异性结合蛋白的PCR或DNA芯片方法中,在将仅与甲基化DNA特异性结合的蛋白质与DNA混合后,所述蛋白质仅与甲基化DNA特异性结合,因此可以选择性分离甲基化DNA。

[0052] 此外,甲基化可以通过定量PCR来测量,并且将用甲基化DNA特异性结合蛋白分离的甲基化DNA用荧光染料标记并与集成有互补探针的DNA芯片杂交,从而测量甲基化。

[0053] (4) 差异甲基化的检测-亚硫酸氢盐测序方法:另一种检测含有甲基化CpG的核酸的方法包括使含核酸样品与修饰非甲基化胞嘧啶的药剂接触,并且使用CpG特异性寡核苷酸引物扩增样品中的含CpG核酸。此处,寡核苷酸引物的特征可以在于通过区分修饰的甲基化和非甲基化核酸来检测甲基化核酸。扩增步骤是可选和优选的,但不是必需的。该方法依赖于PCR反应以区分经修饰的(例如,经化学修饰的)甲基化DNA和非甲基化DNA。

[0054] (5) 亚硫酸氢盐测序方法:另一种检测含有甲基化CpG的核酸的方法包括使含核酸

样品与修饰非甲基化胞嘧啶的药剂接触,并且使用非甲基化依赖性寡核苷酸引物扩增样品中的含CpG核酸。此处,寡核苷酸引物的特征可以在于在不区分修饰的甲基化和非甲基化核酸的情况下来扩增核酸。已结合亚硫酸氢盐测序描述了扩增产物,以用于通过下一代测序方法检测甲基化核酸或使用测序引物通过Sanger方法测序。

[0055] (6) 下一代测序方法包括合成法测序方法和连接法测序方法。这些方法的特征在于,不是创建细菌克隆,而是将单个DNA片段空间上分离、原位扩增(克隆扩增)并测序。此处,由于同时读取了数十万个片段,因此这种方法也称为大规模平行测序方法。

[0056] 基本上,进行合成法测序方法,使用通过依序附接单核苷酸或二核苷酸获得信号的方法,并且其例子可包括焦磷酸测序、离子激流和Solexa方法。

[0057] 基于合成法测序方法的NGS设备的例子包括Roche的454平台、Illumina的HiSeq平台、Life Technology的Ion PGM平台、以及Pacific BioSciences的PacBio平台。454和Ion PGM使用乳液PCR作为克隆扩增方法,而HiSeq使用桥式扩增。合成法测序方法通过检测经依序附接一个核苷酸合成DNA时产生的磷酸、质子、或预附接荧光来读取序列。在检测序列的方法中,454使用的是用磷酸盐的焦磷酸测序方法,而Ion PGM使用质子检测。HiSeq和PacBio检测荧光以解码序列。

[0058] 连接法测序方法是使用DNA连接酶的测序技术,所述DNA连接酶识别DNA核苷酸序列中某些位置的核苷酸。与大多数使用聚合酶的测序技术不同,连接法测序方法不使用聚合酶,并且其特征在于DNA连接酶不会连接错配的序列。其中一个例子是SOLiD系统。在该技术中,间隔读取两个碱基,通过引物重置独立重复五次,因此通过重复读取每个碱基两次来提高准确性。

[0059] 在连接法测序方法中,在由16个组合构成的二核苷酸引物组中,依次连接对应于核苷酸序列的二核苷酸引物,最后分析这些连接的组合,并完成对应DNA的核苷酸序列。

[0060] 此处,下一代测序方法可以通过合成法测序方法或连接法测序方法来举例说明。甲基化DNA特异性结合蛋白包括但不限于MBD2bt,并且抗体为5'-甲基-胞嘧啶抗体,但不限于此。

[0061] 关于本发明中使用的引物,当在步骤(a)中使用诸如亚硫酸氢盐等试剂时,5'-CpG'-3位点的胞嘧啶在甲基化的情况下仍然为胞嘧啶,而在非甲基化的情况下转化为尿嘧啶。因此,对于用诸如亚硫酸氢盐等试剂处理后获得的经修饰核苷酸序列,可以构建与其中存在5'-CpG-3'核苷酸序列的区域相对应的引物。

[0062] 引物可以被构建为与待扩增基因座的每条链具有“大体上”互补性。这意味着引物具有足够的互补性,以在聚合反应条件下与相应的核酸链杂交。

[0063] 本发明的另一方面涉及一种用于诊断结直肠癌的组合物,所述组合物包括不同地修饰甲基化黏结蛋白聚糖2(SDC2)和ADHFE1基因以及非甲基化SDC2和ADHFE1基因的至少一种试剂,以及特异性扩增所述甲基化SDC2基因和所述甲基化ADHFE1基因的引物。

[0064] 由于根据本发明的组合物中含有的组分与上述组分重叠,因此对上述组分的描述同样适用于此。

[0065] 本发明的再另一方面涉及一种包括上述组合物的用于检测靶DNA甲基化的试剂盒。

[0066] 在一个实施方案中,所述试剂盒包括:在其中容纳样品的区室化承载装置、包括试

剂的容器、以及包括用于甲基化SDC2基因和甲基化ADHFE1基因各自的引物的容器。在一些情况下,它还可以包括包含用于检测甲基化SDC2基因和甲基化ADHFE1基因各自的扩增产物的探针的容器。

[0067] 承载装置适用于容纳一个或多个单独容器,如瓶子和管,所述一个或多个单独容器含有用于本发明方法的独立部件。关于本发明的说明书,本领域普通技术人员可以容易地确定容器中必要药剂的分配。

[0068] 通过以下实施例可以更好地理解本发明。这些实施例仅用于说明本发明,而不应解释为限制本发明的范围,如对于本领域技术人员而言将清楚的。

[0069] 实施例1. 结直肠癌特异性甲基化基因ADHFE1的选择

[0070] 诸位发明人使用12名结直肠癌手术患者的癌组织及其相邻正常组织DNA进行了基因组水平甲基化分析(MeDIA-CpG微阵列),以寻找在结直肠癌中特异性甲基化的基因,因此报告了结直肠癌中的32种甲基化基因(Oh等人,Journal of Molecular Diagnostics, 2013;15(4):498-507:补充表1)。在这些32种基因中,选择在结直肠癌组织中高度甲基化的ADHFE1(NM_144650,含铁醇脱氢酶1)作为结直肠癌特异性甲基化基因(图1)。

[0071] 实施例2. 用于ADHFE1甲基化检测的引物和探针的验证

[0072] 为了构建用于检测ADHFE1基因的甲基化的引物,对于用亚硫酸氢盐修饰的ADHFE1基因序列,使用MethPrimer(<http://www.urogene.org/cgi-bin/methprimer/methprimer.cgi>)设计甲基化特异性引物和探针(表1)。

[0073] [表1]

[0074] 用于检测ADHFE1基因甲基化的引物和探针序列

基因组别	引物	序列(5' → 3')	SEQ ID NO:
ADHFE1 (组1)	F	AGGGTGGATGGTGCGAGC	1
	R	CCTACCCACCCGCTTCGCG	2
	探针	[HEX]TGAGGTTTAGATAGGTGATTCGCGAAGCG[BHQ1]	3
ADHFE1 (组2)	F	GTGGATGGTGCAGCGTC	4
	R	CGACCAATCACGAAAACCTACCCG	5
	探针	[HEX]CGTGGGAAAATGGTTTTGAGTTCG ATTGGT[BHQ1]	6
COL2A1	F	TAGGAGTATTAGTAATGTTAGGAGTA	7
	R	CTTTACTACCCCAAAAAAACCCTAATCC	8
	探针	[CY5]AGAAGAAGGGAGGGGTGTTAGGAGAGG[BHQ2]	9

[0076] 为了确认所设计的引物对ADHFE1基因的甲基化特异性检测能力,使用甲基化和非甲基化对照DNA(EpiTect PCR对照DNA组(Qiagen,目录号59695))进行定量甲基化特异性实时PCR(qMSP)方法。对于qMSP,使用AB 7500Fast(Thermo Fischer)仪器。制备总计30 μ l的PCR反应溶液(用亚硫酸氢盐修饰的20ng/2 μ l模板人DNA、6 μ l的5X AptaTaq DNA Master(Roche Diagnostics)、2 μ l(2.5pmol/ μ l)的甲基化特异性PCR引物(IDT,美国)、2 μ l(2.5pmol/ μ l)的TaqMan探针(IDT,美国)和14 μ l的DW),并在95 $^{\circ}$ C持续5分钟、95 $^{\circ}$ C持续15秒

并且然后65°C持续1分钟的条件下进行PCR总计40个循环。实时确定是否扩增了PCR产物。将作为内部对照基因的COL2A1基因一起扩增(图2)。

[0077] 如图2所示,在甲基化DNA中扩增出ADHFE1(组1)和对照基因COL2A1二者,但在非甲基化DNA中未扩增出ADHFE1(组1)基因并且仅扩增出对照基因COL2A1,表明针对ADHFE1(组1)基因的甲基化特异性引物正常工作。

[0078] 如图3所示,在甲基化DNA中扩增出ADHFE1(组2)和对照基因COL2A1二者,但在非甲基化DNA中未扩增出ADHFE1(组2)基因并且仅扩增出对照基因COL2A1,表明针对ADHFE1(组2)基因的甲基化特异性引物正常工作。

[0079] 实施例3:在粪便DNA中通过SDC2和ADHFE1基因甲基化组合增加结直肠癌诊断性能为了确定在将作为早期诊断结直肠癌的常规甲基化生物标记的ADHFE1基因和SDC2基因(韩国专利号10-1142131)的甲基化组合后诊断结直肠癌的能力是否得以改善,在结肠镜检查后在24名正常人(延世医学中心体检中心(Yonsei Medical Center Check-Up Center))和在33名结直肠癌患者(延世医学中心结直肠和肛门外科(Yonsei Medical Center, Colorectal and Anal Surgery))中测量SDC2基因的甲基化(图4)先前测量了这些样本的SDC2甲基化,并使用了在结肠镜检查后在24名正常人中的1人(4.2%)中观察到阳性SDC2甲基化以及在18名结直肠癌患者(54.5%)中观察到阳性SDC2甲基化的样本。

[0080] 使用实施例2中描述的定量甲基化特异性实时PCR(qMSP)方法进行这些样本中的甲基化测量。对于qMSP,使用AB 7500Fast(Thermo Fischer)仪器,并使用EZ甲基化金试剂盒(EZ Methylation Gold Kit)(目录号D5006,Zymo Research,美国)以使用亚硫酸氢盐进行修饰。使用总计30 μ l的PCR反应溶液(用亚硫酸氢盐修饰的2.0 μ g/10 μ l粪便DNA、6 μ l的5X AptaTaq DNA Master(Roche Diagnostics)、2 μ l(2.5pmol/ μ l)的甲基化特异性PCR引物(IDT,美国)、2 μ l(2.5pmol/ μ l)TaqMan探针(IDT,美国)和6 μ l的DW)测量粪便DNA中的SDC2和ADHFE1基因的甲基化,并且将作为内部对照基因的COL2A1基因一起扩增。在95°C持续5分钟、95°C持续15秒以及然后65°C持续1分钟的条件下进行PCR总计40个循环。实时确定是否扩增了PCR产物(图3)。将甲基化和非甲基化对照DNA(EpiTect PCR对照DNA组(Qiagen,目录号59695))用作对照并测试。

[0081] [表2]

[0082] SDC2基因甲基化检测的引物和探针序列

基因	引物	序列(5' → 3')	SEQ ID NO:
[0083] SDC2	F	GTAGAAATTAATAAGTGAGAGGGCGTC	10
	R	ACGACTCAAACCTCGAAAACCTCGAACTCG	11
	探针	[FAM]TTCGGGGCGTAGTTGCGGGCGG[BHQ1]	12

[0084] 当在结肠镜检查后在正常人的粪便中测量ADHFE1基因(组2)的甲基化时,仅在1人中观察到阳性甲基化(特异性为95.8%),而在26名结直肠癌患者中观察到阳性甲基化(灵敏性为78.8%),表明它在检测结直肠癌方面是有效的。此外,在将ADHFE1基因(组2)甲基化和先前已知的SDC2基因甲基化组合后,在结肠镜检查后总计2名正常人(包括1个另外的人)显示阳性甲基化,表明特异性高达91.7%;也就是说,在特异性方面没有显著损失。另外,总计27名结直肠癌患者(包括9名另外的患者)显示阳性甲基化,表明灵敏性显著增加至

81.8% (图4, $P < 0.033$, 费歇尔精确检验)。

[0085] 实用性

[0086] 根据本发明, 可以使用特异性扩增多个甲基化结直肠癌标记基因的引物以高检测灵敏性检测甲基化, 凭此本发明的方法与使用单一标记基因的检测方法相比能够改善检测肠癌的能力并能够准确且快速地诊断结直肠癌, 因此是有用的。

[0087] 尽管已在上文详细地公开了本发明的具体实施方案, 但是对于本领域的普通技术人员将显而易见的是描述仅仅是优选的示例性实施方案, 而不应被解释为限制本发明的范围。因此, 本发明的实质范围应由所附权利要求及其等同物定义。

[0088] 序列表自由文本

[0089] 附有电子文件。

- [0001] <110> 基因特力株式会社
[0002] <120> 检测结直肠癌的方法
[0003] <130> PP-B2454
[0004] <160> 12
[0005] <170> KopatentIn 2.0
[0006] <210> 1
[0007] <211> 18
[0008] <212> DNA
[0009] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0010] <220>
[0011] <223> Primer
[0012] <400> 1
[0013] aggggtgatg gtgcgagc 18
[0014] <210> 2
[0015] <211> 19
[0016] <212> DNA
[0017] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0018] <220>
[0019] <223> 引物(Primer)
[0020] <400> 2
[0021] cctaccacc cgcttcgcg 19
[0022] <210> 3
[0023] <211> 30
[0024] <212> DNA
[0025] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0026] <220>
[0027] <223> 探针(Probe)
[0028] <400> 3
[0029] tgaggtttag ataggtgatt tcgcaagcg 30
[0030] <210> 4
[0031] <211> 18
[0032] <212> DNA
[0033] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0034] <220>
[0035] <223> 引物(Primer)
[0036] <400> 4
[0037] gtggatggtg cgagcgtc 18
[0038] <210> 5

- [0039] <211> 23
[0040] <212> DNA
[0041] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0042] <220>
[0043] <223> 引物(Primer)
[0044] <400> 5
[0045] cgaccaatca cgaaaactac ccg 23
[0046] <210> 6
[0047] <211> 30
[0048] <212> DNA
[0049] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0050] <220>
[0051] <223> 探针(Probe)
[0052] <400> 6
[0053] cgtgggaaaa tggttttgag ttcgattggt 30
[0054] <210> 7
[0055] <211> 26
[0056] <212> DNA
[0057] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0058] <220>
[0059] <223> 引物(Primer)
[0060] <400> 7
[0061] taggagtatt agtaatgtta ggagta 26
[0062] <210> 8
[0063] <211> 27
[0064] <212> DNA
[0065] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0066] <220>
[0067] <223> 引物(Primer)
[0068] <400> 8
[0069] ctttactacc ccaaaaaaac ccaatcc 27
[0070] <210> 9
[0071] <211> 27
[0072] <212> DNA
[0073] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0074] <220>
[0075] <223> 探针(Probe)
[0076] <400> 9
[0077] agaagaaggg aggggtgtta ggagagg 27

-
- [0078] <210> 10
[0079] <211> 27
[0080] <212> DNA
[0081] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0082] <220>
[0083] <223> 引物(Primer)
[0084] <400> 10
[0085] gtagaaatta ataagtgaga gggcgtc 27
[0086] <210> 11
[0087] <211> 28
[0088] <212> DNA
[0089] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0090] <220>
[0091] <223> 引物(Primer)
[0092] <400> 11
[0093] acgactcaaa ctcgaaaact cgaactcg 28
[0094] <210> 12
[0095] <211> 22
[0096] <212> DNA
[0097] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0098] <220>
[0099] <223> 探针(Probe)
[0100] <400> 12
[0101] ttcggggcgt agttgcgggc gg 22

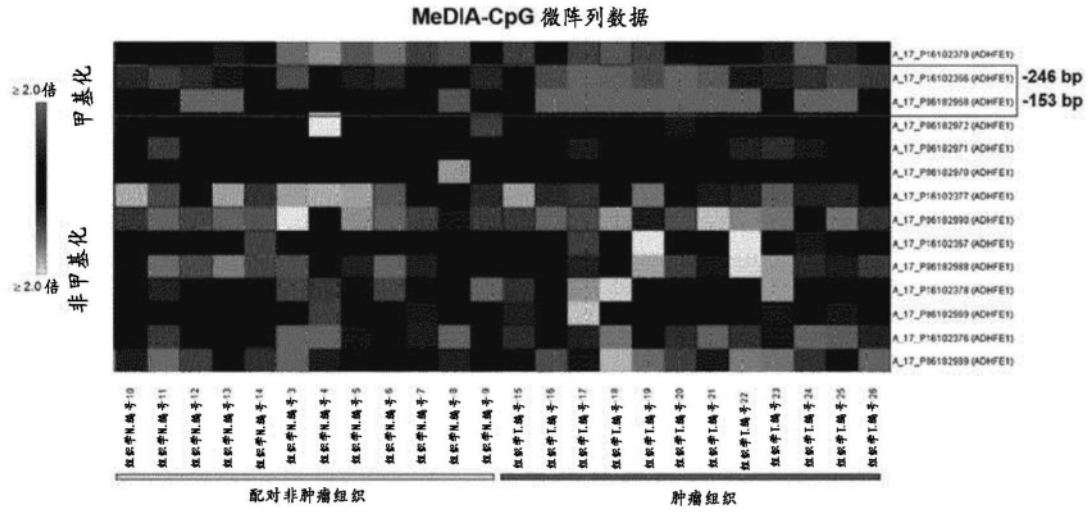


图1

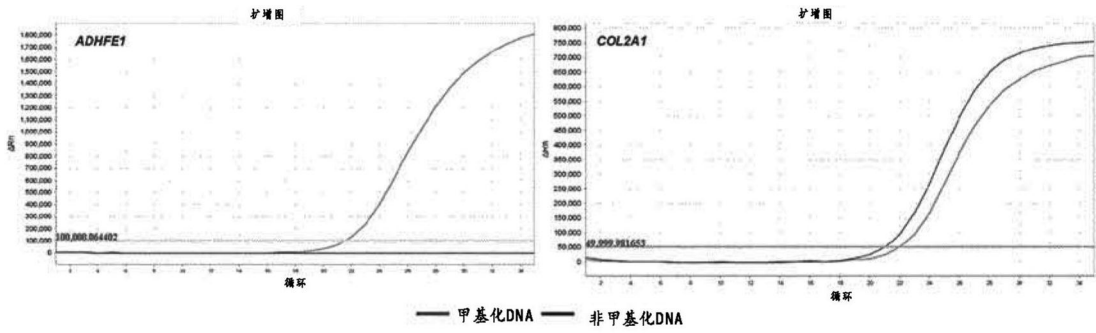


图2

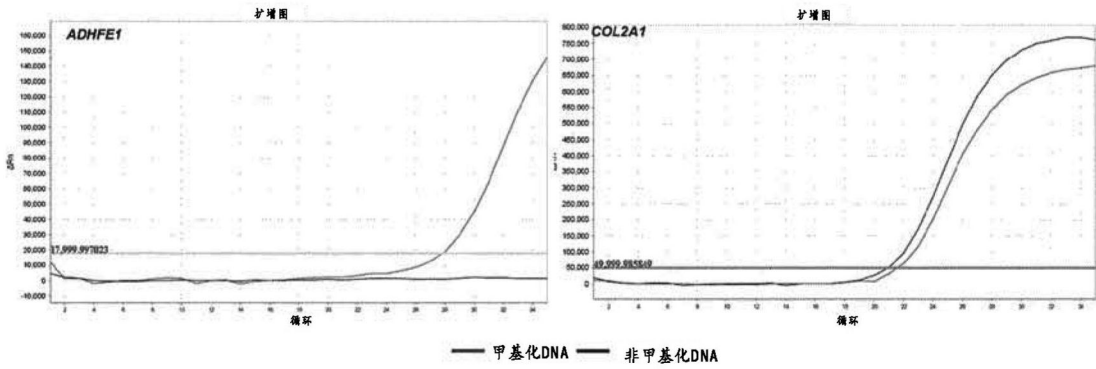


图3

结肠镜检查后正常人				结直肠癌患者			
样品编号	COL2A1	SDC2	ADHFE1	样品编号	COL2A1	SDC2	ADHFE1
1	25.2	未测出	未测出	1	24.9	29.4	28.8
2	25.3	未测出	未测出	2	25.4	28.5	28.0
3	29.2	未测出	未测出	3	24.3	23.6	24.2
4	25.5	未测出	33.4	4	23.5	28.7	27.2
5	28.1	未测出	未测出	5	26.4	26.7	26.2
6	30.3	未测出	未测出	6	24.2	28.6	24.8
7	29.4	未测出	未测出	7	24.9	26.1	27.0
8	28	未测出	未测出	8	25.4	25.5	24.2
9	25.1	未测出	未测出	9	21.9	26.2	23.6
10	27.1	未测出	未测出	10	23	25.3	25.6
11	30.2	未测出	未测出	11	30.4	未测出	未测出
12	30	未测出	未测出	12	26.8	未测出	32.5
13	30.8	未测出	未测出	13	30.8	未测出	未测出
14	31.6	未测出	未测出	14	30.1	未测出	未测出
15	25.7	未测出	未测出	15	25.1	未测出	未测出
16	27.3	未测出	未测出	16	27.4	未测出	31.9
17	30	未测出	未测出	17	25.9	未测出	26.6
18	31.5	31.5	未测出	18	29.7	未测出	32.2
19	29.2	未测出	未测出	19	30.3	未测出	34.1
20	32	未测出	未测出	20	26.9	未测出	28.8
21	29.3	未测出	未测出	21	27.7	32.5	31.6
22	28.4	未测出	未测出	22	27.5	33	未测出
23	28.4	未测出	未测出	23	18.6	29.4	28.1
24	28.6	未测出	未测出	24	22	25.8	24.6
				25	20.2	31.6	24.9
				26	22	33.4	26.7
				27	26.4	31.3	32.4
				28	23.9	28.9	29.8
				29	24.5	未测出	31.7
				30	28	未测出	34.1
				31	23.2	未测出	26.2
				32	33.3	未测出	未测出
				33	30.9	未测出	未测出

图4