



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111549140 A

(43)申请公布日 2020.08.18

(21)申请号 202010512112.0

(22)申请日 2020.06.08

(71)申请人 重庆医科大学附属第一医院
地址 400016 重庆市渝中区友谊路1号

(72)发明人 向廷秀

(74)专利代理机构 焦作加贝专利代理事务所
(普通合伙) 41182

代理人 冯新志

(51)Int.Cl.

C12Q 1/6886(2018.01)

C12Q 1/686(2018.01)

C12N 15/11(2006.01)

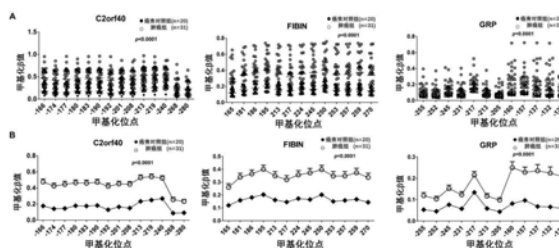
权利要求书1页 说明书8页
序列表3页 附图5页

(54)发明名称

一种检测肺癌相关基因C2orf40、FIBIN和GRP甲基化的试剂盒及其应用

(57)摘要

本发明公开了选自C2orf40、FIBIN和GRP基因中的至少一个基因的甲基化检测试剂在制备用于诊断受试者是否患有肺癌或用于预测受试者是否具有患肺癌风险或用于判断肺癌预后的试剂盒中的应用,属于生物检测技术领域。本发明通过基因联合检测,可以提高早期诊断的敏感性和特异性。利用本方法进行检测,方法方便快捷、价格低廉,适于推广应用。



1. 选自C2orf40、FIBIN和GRP基因中的至少一个基因的甲基化检测试剂在制备用于诊断受试者是否患有肺癌或用于预测受试者是否具有患肺癌风险或用于判断肺癌预后的试剂盒中的应用。

2. 根据权利要求1所述的应用,其特征在於,所述甲基化检测试剂用于检测所述基因的启动子甲基化状态。

3. 根据权利要求2所述的应用,其特征在於,所述甲基化检测试剂包括用于检测所述基因启动子甲基化状态的特异性引物。

4. 根据权利要求3所述的应用,其特征在於,用于检测C2orf40基因启动子甲基化状态的特异性引物包括具有SEQ ID NO.1所示核苷酸序列的上游引物和具有SEQ ID NO.2所示核苷酸序列的下游引物;用于检测C2orf40基因启动子非甲基化状态的特异性引物包括具有SEQ ID NO.3所示核苷酸序列的上游引物和具有SEQ ID NO.4所示核苷酸序列的下游引物。

5. 根据权利要求3所述的应用,其特征在於,用于检测FIBIN基因启动子甲基化状态的特异性引物包括具有SEQ ID NO.5所示核苷酸序列的上游引物和具有SEQ ID NO.6所示核苷酸序列的下游引物;用于检测FIBIN基因启动子非甲基化状态的特异性引物包括具有SEQ ID NO.7所示核苷酸序列的上游引物和具有SEQ ID NO.8所示核苷酸序列的下游引物。

6. 根据权利要求3所述的应用,其特征在於,用于检测GRP基因启动子甲基化状态的特异性引物包括具有SEQ ID NO.9所示核苷酸序列的上游引物和具有SEQ ID NO.10所示核苷酸序列的下游引物;用于检测GRP基因启动子非甲基化状态的特异性引物包括具有SEQ ID NO.11所示核苷酸序列的上游引物和具有SEQ ID NO.12所示核苷酸序列的下游引物。

7. 根据权利要求1-6任一所述的应用,其特征在於,所述甲基化检测试剂进一步包括用于提取样本DNA的试剂。

8. 根据权利要求1-5任一所述的应用,其特征在於,所述样本包括选自支气管灌洗液、痰液、组织、细胞中的至少一种。

9. 选自C2orf40、FIBIN和GRP基因中的至少一个基因的启动子甲基化检测试剂在制备适用于以下方法的试剂盒中的应用,所述方法包括:

S1,提取受试者样本DNA,

S2,利用所述检测试剂检测所述基因的启动子甲基化状态,

S3,根据S2检测得到的甲基化状态,诊断受试者是否患有肺癌或预测受试者是否具有患肺癌风险或判断肺癌预后情况。

10. 一种用于诊断受试者是否患有肺癌或用于预测受试者是否具有患肺癌风险或用于判断肺癌预后的试剂盒,其特征在於,包括选自C2orf40、FIBIN和GRP基因中的至少一个基因的启动子甲基化状态检测试剂,其中,用于检测C2orf40基因启动子甲基化状态的特异性引物包括具有SEQ ID NO.1所示核苷酸序列的上游引物和具有SEQ ID NO.2所示核苷酸序列的下游引物;用于检测FIBIN基因启动子甲基化状态的特异性引物包括具有SEQ ID NO.5所示核苷酸序列的上游引物和具有SEQ ID NO.6所示核苷酸序列的下游引物;用于检测GRP基因启动子甲基化状态的特异性引物包括具有SEQ ID NO.9所示核苷酸序列的上游引物和具有SEQ ID NO.10所示核苷酸序列的下游引物。

一种检测肺癌相关基因C2orf40、FIBIN和GRP甲基化的试剂盒及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及生物检测技术领域,具体地,涉及一种检测肺癌相关基因C2orf40、FIBIN和GRP甲基化的试剂盒及其应用。

背景技术

[0002] 肺癌是目前全球最常见的恶性肿瘤之一,全世界每年有159万人死于肺癌,在男性和女性均位列首位。《全球癌症报告2014》,研究显示2012年全球癌症患者和死亡病例都在令人不安地增加,在肺、肝、食道、胃等4种恶性肿瘤中,中国新增病例和死亡人数均居世界首位。目前肺癌占全部癌症死亡的22.7%,已成为我国癌症死亡第一杀手。多数患者就诊时已属中晚期,错失早期治疗的机会。据统计,非小细胞肺癌(non small cell lung cancer, NSCLC)总的5年生存率仅为15%,其中早期NSCLC 5年生存率高达80%,而根治术后(包括进展期)的NSCLC 5年生存率则为35%~50%。肺癌如此之高的死亡率与缺乏早期检测手段及治疗欠佳密切相关,故早期诊断和治疗显得尤为重要。

[0003] 但肺癌早期患者症状不典型或没有自觉症状,诊断率仅为15%。传统的肺癌筛查方法(X线和痰细胞学检查)并没有降低肺癌的病死率,很大程度上归因于其早期诊断的特异性及敏感性有限。目前,肺癌的早期诊断方法主要有影像学、痰脱落细胞、肿瘤标志物、纤维支气管、胸腔镜及纵隔镜检查,以及其他细胞或病理检查。常用的肿瘤标志物有癌胚抗原(CEA)、神经元特异烯醇化酶(NSE)、细胞角蛋白19片段(CYFRA21-1)、CA-125、肺癌相关抗原、血管内皮生长因子、增生细胞核抗原、表皮生长因子受体等。以液基细胞学为基础检测痰液脱落细胞FHIT基因微卫星不稳定性和杂合性缺失,也正作为肺癌早期诊断的新途径。遗憾的是,迄今为止没有发现一个敏感性和特异性均较高的分子标志物。

[0004] 近年来,DNA甲基化在肺癌的研究中取得较大进展,为肺癌的早期诊断,风险评估,预后判断和干预治疗提供了新的靶点。最初,NSCLC中甲基化研究主要聚焦于研究单个功能相对明确的抑癌基因在肺癌发生发展中的作用,以及其甲基化状态与肺癌临床病理参数的相关性,探索这些基因可否作为肺癌预测或预后的评判指标。在多项独立的研究中证实具有较高甲基化频率的基因包括:APC、CDH1、p16INK4a、MGMT、RASSF1A、RARbeta等。

[0005] 目前,大多数研究仅仅检测肿瘤组织的甲基化情况,缺乏对照,无法评价其作为诊断指标的敏感性和特异性。随着分子生物学的发展,一些高通量的检测方法可同时检测更多位点的甲基化,但是采用这些不同的高通量方法报道的甲基化位点各不相同,彼此之间很少有重复性。

发明内容

[0006] 为了解决上述技术问题中的至少一个,根据发明人多年的前期研究发现,C2orf40、FIBIN和GRP基因在多数正常组织中高表达,但在肺癌患者中异常低表达,并且与肿瘤分期呈现负相关。结合在线大数据及Methtarget分析,联合检测C2orf40、FIBIN和GRP

可以作为肺癌早筛、诊断、疗效评价、预后判断的生物标志物,从而完成本发明。

[0007] 本发明第一方面提供选自C2orf40、FIBIN和GRP基因中的至少一个基因的甲基化检测试剂在制备用于诊断受试者是否患有肺癌或用于预测受试者是否具有患肺癌风险或用于判断肺癌预后的试剂盒中的应用。

[0008] 在本发明的一些实施方案中,所述甲基化检测试剂用于检测所述基因的启动子甲基化状态。

[0009] 在本发明的一些具体实施方案中,所述甲基化检测试剂包括用于检测所述基因启动子甲基化状态的特异性引物。

[0010] 在本发明的一些优选实施方案中,用于检测C2orf40基因启动子甲基化状态的特异性引物包括具有SEQ ID NO.1所示核苷酸序列的上游引物和具有SEQ ID NO.2所示核苷酸序列的下游引物;用于检测C2orf40基因启动子非甲基化状态的特异性引物包括具有SEQ ID NO.3所示核苷酸序列的上游引物和具有SEQ ID NO.4所示核苷酸序列的下游引物。

[0011] 在本发明的一些优选实施方案中,用于检测FIBIN基因启动子甲基化状态的特异性引物包括具有SEQ ID NO.5所示核苷酸序列的上游引物和具有SEQ ID NO.6所示核苷酸序列的下游引物;用于检测FIBIN基因启动子非甲基化状态的特异性引物包括具有SEQ ID NO.7所示核苷酸序列的上游引物和具有SEQ ID NO.8所示核苷酸序列的下游引物。

[0012] 在本发明的一些优选实施方案中,用于检测GRP基因启动子甲基化状态的特异性引物包括具有SEQ ID NO.9所示核苷酸序列的上游引物和具有SEQ ID NO.10所示核苷酸序列的下游引物;用于检测GRP基因启动子非甲基化状态的特异性引物包括具有SEQ ID NO.11所示核苷酸序列的上游引物和具有SEQ ID NO.12所示核苷酸序列的下游引物。

[0013] 在本发明的一些实施方案中,所述甲基化检测试剂进一步包括用于提取样本DNA的试剂。

[0014] 在本发明中,所述样本包括选自支气管灌洗液、痰液、组织和细胞中的至少一种。

[0015] 本发明的第二方面提供选自C2orf40、FIBIN和GRP基因中的至少一个基因的启动子甲基化检测试剂在制备适用于以下方法的试剂盒中的应用,所述方法包括:

[0016] S1,提取受试者样本DNA,

[0017] S2,利用所述检测试剂检测所述基因的启动子甲基化状态,

[0018] S3,根据S2检测得到的甲基化状态,诊断受试者是否患有肺癌或预测受试者是否具有患肺癌风险或判断肺癌预后情况。

[0019] 在本发明的一些实施方案中,当受试者C2orf40、FIBIN和GRP基因中的至少一个基因甲基化水平高于正常水平时,诊断受试者患有肺癌,或预测受试者具有患肺癌风险,或判断肺癌预后不良。

[0020] 本发明的第三方面提供一种用于诊断受试者是否患有肺癌或用于预测受试者是否具有患肺癌风险或用于判断肺癌预后的试剂盒,包括选自C2orf40、FIBIN和GRP基因中的至少一个基因的启动子甲基化状态检测试剂,其中,用于检测C2orf40基因启动子甲基化状态的特异性引物包括具有SEQ ID NO.1所示核苷酸序列的上游引物和具有SEQ ID NO.2所示核苷酸序列的下游引物;用于检测C2orf40基因启动子非甲基化状态的特异性引物包括具有SEQ ID NO.3所示核苷酸序列的上游引物和具有SEQ ID NO.4所示核苷酸序列的下游引物。用于检测FIBIN基因启动子甲基化状态的特异性引物包括具有SEQ ID NO.5所示核苷

酸序列的上游引物和具有SEQ ID NO.6所示核苷酸序列的下游引物;用于检测FIBIN基因启动子非甲基化状态的特异性引物包括具有SEQ ID NO.7所示核苷酸序列的上游引物和具有SEQ ID NO.8所示核苷酸序列的下游引物。用于检测GRP基因启动子甲基化状态的特异性引物包括具有SEQ ID NO.9所示核苷酸序列的上游引物和具有SEQ ID NO.10所示核苷酸序列的下游引物;用于检测GRP基因启动子非甲基化状态的特异性引物包括具有SEQ ID NO.11所示核苷酸序列的上游引物和具有SEQ ID NO.12所示核苷酸序列的下游引物。

[0021] 本发明的有益效果

[0022] 本发明通过基因联合检测,可以提高早期诊断的敏感性和特异性。利用本方法进行检测,方法方便快捷、价格低廉,适于推广应用。

[0023] 另外,DNA甲基化是肿瘤发生中较频繁的早期事件,作为肿瘤早期诊断和筛查具有RNA、蛋白及基因突变不能比的优势:

[0024] 1) DNA样本极其稳定,不似RNA及蛋白,受环境影响大;

[0025] 2) 甲基化特异PCR (MSP) 的敏感性、方法操作简单,不需要昂贵的仪器设备,比定量检测方法更可行(临床样品中不可避免地存在源于正常细胞的序列会严重干扰肿瘤细胞特征性的遗传学标志的检出,造成定量检测方法早期诊断肿瘤的障碍;探讨筛选的抑癌基因甲基化在乳腺癌发生发展中的作用,实验方法简单可行;

[0026] 3) 抑癌基因启动子甲基化多发生于CpG岛,位置相对基因突变来说更局限,易于设计探针和引物;

[0027] 4) 可同时设计多对引物进行联合检测;

[0028] 5) 适合于各种体液检测。

附图说明

[0029] 图1示出了I期肺癌及癌旁组织RNA-sequence转录组结果。结果显示C2orf40、FIBIN和GRP在肺癌组织的表达显著低于癌旁组织($p < 0.0001$)。

[0030] 图2示出了MethHC DNA甲基化数据库(<http://methhc.mbc.nctu.edu.tw/php/index.php>)获取TCGA数据组中人肺癌组织样本和配对正常肺组织样本的C2orf40、FIBIN和GRP启动子相对甲基化水平。

[0031] 图3示出了(<http://bio-bigdata.hrbmu.edu.cn/diseasemeth/>)450K Illumina Infinim HumanMethylation450Beadchip平台检测三个基因在肺腺癌和肺鳞癌中的启动子差异甲基化检测结果($p < 0.0001$,绝对甲基化差异值见图)

[0032] 图4示出了Methtarget检测C2orf40、FIBIN和GRP启动子甲基化的状态。

[0033] 图5示出了MSP检测临床诊断非癌患者(肺炎或肺结核)支气管灌洗液中C2orf40、FIBIN和GRP启动子甲基化状态的代表图。

[0034] 图6示出了MSP检测临床病理诊断为阳性的肺癌患者支气管灌洗液中C2orf40、FIBIN和GRP启动子甲基化状态的代表图。

[0035] 图7示出了利用在线预后分析软件Kaplan-Meier Plotter(<http://kmplot.com/analysis/>)分析了FIBIN表达水平与肺癌患者预后的相关性。

具体实施方式

[0036] 为了使本发明所解决的技术问题、技术方案及有益效果更加清楚明白,以下结合实施例,对本发明进行进一步详细说明。

[0037] 实施例

[0038] 以下例子在此用于示范本发明的优选实施方案。本领域内的技术人员会明白,下述例子中披露的技术代表发明人发现的可以用于实施本发明的技术,因此可以视为实施本发明的优选方案。但是本领域内的技术人员根据本说明书应该明白,这里所公开的特定实施例可以做很多修改,仍然能得到相同的或者类似的结果,而非背离本发明的精神或范围。

[0039] 除非另有定义,所有在此使用的技术和科学的术语,和本发明所属领域内的技术人员所通常理解的意思相同,在此公开引用及他们引用的材料都将以引用的方式被并入。

[0040] 那些本领域内的技术人员将意识到或者通过常规试验就能了解许多这里所描述的发明的特定实施方案的许多等同技术。这些等同将被包含在权利要求书中。

[0041] 下述实施例中的实验方法,如无特殊说明,均为常规方法。下述实施例中所用的仪器设备,如无特殊说明,均为实验室常规仪器设备;下述实施例中所用的试验材料,如无特殊说明,均为自常规生化试剂商店购买得到的。

[0042] 实施例1基因转录组分析

[0043] 通过对I期肺癌组织及癌旁(病理诊断未见明显异常)组织进行基因转录组二代测序,通过基因表达差异分析,其中1742个基因表达下调,3029个基因表达上调,发明人发现,C2orf40、FIBIN和GRP基因在T1和N0期的癌组织中广泛表达下调,位列差异表达下调基因的前10, ($p < 0.0001$, $\text{padj} < 0.0001$, $\log_2\text{Fold} > 3.0$) 结合在线数据库Oncomine查询(<https://www.oncomine.org/>),结果显示,对比正常肺组织来说,C2orf40、FIBIN和GRP在肺癌组织中低表达(图1),这意味着C2orf40、FIBIN和GRP很有可能可以作为一个肺癌早期诊断的生物学标志物。

[0044] 实施例2基因启动子甲基化状态与肺癌关联

[0045] MethHC DNA甲基化数据库(<http://methhc.mbc.nctu.edu.tw/php/index.php>)获取TCGA数据组中人肺癌组织样本和配对正常肺组织样本的C2orf40、FIBIN和GRP启动子相对甲基化水平(结果如图2所示)。

[0046] 本发明根据C2orf40、FIBIN和GRP启动子的基因序列,设计特异性引物,利用亚硫酸氢钠转化以及MSP方法检测DNA样本中3个基因启动子区域的甲基化水平。

[0047] 用于快速鉴定甲基化状态的特异性引物,包括:

[0048] 引物1:5' -ATGGAAGGCGTCGAGGATC-3' (SEQ ID No.1)

[0049] 引物2:5' -CCATCCATCTCCCCGCCG-3' (SEQ ID No.2)

[0050] 引物3:5' -GATGGAAGGTGTTGAGGATT-3' (SEQ ID No.3)

[0051] 引物4:5' -ACCATCCATCTCCCCACCA-3' (SEQ ID No.4)

[0052] 引物5:5' -GTTTGGTTACGGAGAATCGTC-3' (SEQ ID No.5)

[0053] 引物6:5' -AACCTCGTCCCTTCTCCCG-3' (SEQ ID No.6)

[0054] 引物7:5' -ATGTTTGGTTATGGAGAATTGTT-3' (SEQ ID No.7)

[0055] 引物8:5' -AAACCTCATCCCTTCTCCCA-3' (SEQ ID No.8)

[0056] 引物9:5' -GGTTTTTCGTTACGTTTGTGTC-3' (SEQ ID No.9)

- [0057] 引物1:5'-ACACCAACGTCTAAATAACGCG-3' (SEQ ID No.10)
- [0058] 引物11:5'-GGGTTTTTTGTTATGTTTGTGTT-3' (SEQ ID No.11)
- [0059] 引物12:5'-CACACCAACATCTAAATAACACA-3' (SEQ ID No.12)
- [0060] 1DNA的提取
- [0061] 1.1支气管灌洗液、痰液、组织DNA提取
- [0062] (1) 将液氮倒入研钵中,将组织迅速倒至研钵中,用力研磨组织,迅速将研磨的组织粉末移至无酶EP管中;
- [0063] (2) 加入600 μ L TENS和12 μ L蛋白酶K,电动研磨;
- [0064] (3) 55 $^{\circ}$ C孵育24h,直至组织完全裂解;
- [0065] (4) 冷却至室温,加入170 μ L的6M饱和NaCl,振荡15s;
- [0066] (5) 4 $^{\circ}$ C离心,12000g,15min;
- [0067] (6) 移上清至无酶EP管中,加入600 μ L异丙醇,上下颠倒混合(7-8次)至有新的絮状物析出;
- [0068] (7) 4 $^{\circ}$ C离心,4000g,5min,负压吸去上清;
- [0069] (8) 加入75%乙醇800 μ L,轻弹管壁使沉淀漂浮,4 $^{\circ}$ C离心,4000g,5min,弃上清,重复洗一次;
- [0070] (9) 负压吸去上清,干燥DNA,根据DNA多少添加TE buffer 20-200 μ L,溶解后测浓度,-30 $^{\circ}$ C冰箱保存。
- [0071] 1.2细胞DNA提取(QIAamp kit)
- [0072] (1) PBS 1mL清洗细胞,加1ml胰酶消化5min;
- [0073] (2) 离心800rpm,5min,弃上清;
- [0074] (3) 加180 μ L Buffer ATL混匀,吸至EP管中;
- [0075] (4) 加入20 μ L蛋白酶K,混匀,55 $^{\circ}$ C恒温孵育30min,直至细胞完全裂解;
- [0076] (5) 加入20mg/ μ L Rnase A 20 μ L,震荡混匀15s,室温孵育2-5min;
- [0077] (6) 加200 μ L Buffer AL,混匀15s,70 $^{\circ}$ C恒温孵育10min;
- [0078] (7) 加200 μ L无水乙醇,混匀15s;
- [0079] (8) 液体吸至套管中,离心8000rpm,1min;
- [0080] (9) 弃下清,加500 μ L Buffer AW1,离心8000rpm,1min;
- [0081] (10) 弃下清,加500 μ L Buffer AW2,离心12000rpm,3min;
- [0082] (11) 弃下清,空离12000rpm,1min;
- [0083] (12) 将柱子转移至新的EP管中,加30 μ L Buffer AE/三蒸水,室温静置3min;
- [0084] (13) 离心8000rpm,1min,EP管中即DNA,测浓度。
- [0085] 2.DNA重亚硫酸盐修饰、甲基化检测
- [0086] 2.1DNA重亚硫酸盐修饰(EZ DNA methylation-Gold Kit试剂盒)
- [0087] 制备CT Conversion Reagent,按体系依次加入:

	试剂	剂量
[0088]	M-Dilution Buffer	300 μ L
	M-Dissolving Buffer	500 μ L
	DEPC水	900 μ L

[0089] 室温下溶解并震荡10min。

[0090] 亚硫酸氢盐处理DNA

[0091] (1) 在M-Wash Buffer中加入无水乙醇24mL备用；

[0092] (2) 在130 μ L CT Conversion Reagent中加入20 μ L (0.2-0.5ug) DNA；

[0093] (3) 恒温孵育混合液:98 $^{\circ}$ C,10min;64 $^{\circ}$ C,2.5h;4 $^{\circ}$ C,20h;

[0094] (4) 将液体吸至套管柱子中,加入M-Binding Buffer 600 μ L,混匀,12000rpm离心30s,弃液体；

[0095] (5) 加M-Wash Buffer 200 μ L,12000rpm离心30s；

[0096] (6) 加200 μ L M-Desulphonation Buffer,室温下放置20min,离心12000rpm,30s；

[0097] (7) 加M-Wash Buffer 200 μ L,12000rpm离心30s;重复一次；

[0098] (8) 将柱子移入新的EP管内,加M-Elution Buffer 10 μ L到柱子中,离心12000rpm,30s；

[0099] (9) -20 $^{\circ}$ C保存。

[0100] 2.1Methtarget筛选潜在的甲基化位点作为肺癌的诊断生物标志物

[0101] 为明确在肺癌中有意义的分子标记物,发明人根据发明人的前期研究基础、利用TCGA数据集、MethHC在线分析 (<http://MethHC.mbc.nctu.edu.tw>) 和kaplan-Meier Plotter (<http://kmplot.com/analysis/>) 预后分析筛选潜在的甲基化位点作为早期肺癌的诊断生物标志物(如图4)。对筛选到的基因分析CpG岛,采用多重目的区域甲基化富集测序,根据FDR<0.05而 β 绝对值差异>0.2筛选出的肺癌中高甲基化位点基因。

[0102] 2.2甲基化特异性PCR (MSP)

[0103] 为了甲基化检测方法能简化及临床推广应用,根据前期Methtarget测序结果,明确甲基化位点,采用甲基化特异性MSP进一步验证和优化,以便该检测方法能推广应用。

[0104] (1) 配制25 μ L反应体系：

	试剂	剂量
	10×PCR buffer	2.5μL
	5'-引物 (10μM)	1.5μL
	3'-引物 (10μM)	1.5μL
[0105]	MgCl ₂ (25mM)	2μL
	dNTPs (2.5mM)	2μL
	Amplitaq Gold 360 (5U/μL)	0.1875μL
	亚硫酸氢盐处理DNA	1μL
	DEPC	14.3125μL

[0106] (2) 混匀, 瞬离;

[0107] (3) PCR仪上机: 95°C 10min; 95°C 30s, 60°C/58°C 30s, 72°C 30s, 循环次数40次; 72°C 5min;

[0108] 3. 在正常肺组织和肺癌组织中的甲基化情况

[0109] 发明人选取了100例肺癌组织和20例正常肺组织(癌旁由病理科医生确认为病理正常), 72例支气管灌洗液来检测3个基因启动子的甲基化情况。MSP结果显示, C2orf40、FIBIN和GRP三个基因在肺癌组织中呈现高甲基化状态(图6), 甲基化率分别为85%、94%和77%, 而在20例正常肺组织中没有检测到甲基化存在(表1)。

[0110] 表1肺癌组织及癌旁组织的甲基化状态

	基因	样本	甲基化	非甲基化	甲基化频率
	C2orf40	肺癌 (n=100)	85	15	85%
		癌旁 (n=20)	0	20	0%
[0111]	FIBIN	肺癌 (n=100)	94	6	94%
		癌旁 (n=20)	0	20	0%
	GRP	肺癌 (n=100)	77	23	77%
		癌旁 (n=20)	0	20	0%

[0112] 为了验证MSP的结果, 发明人在31例肺癌组织和20例正常肺组织中进行了Methtarget测序检测, 结果显示3个基因在肺癌组织中的启动子甲基化位点明显高于正常肺组织中的(图3)。

[0113] 发明人对支气管灌洗液(其中72例临床诊断为肺癌, 17例临床诊断为肺炎或肺结核(非癌))进行了DNA甲基化检测、细胞学检测及临床病理诊断。与临床病理诊断相比较, C2orf40、FIBIN和GRP三个基因甲基化检测的灵敏度分别是84.7%、77.8%和72.2%, 特异

性分别是88.2%，100%和87.5%。该结果更加说明FIBIN、C2orf40和GRP中肺癌进行预防、早期诊断、临床治疗评价(表2,表3,图5,图6)。

[0114] 表2三个基因在支气管灌洗液中的甲基化情况

基因	样本	甲基化	非甲基化	甲基化比率
C2orf40	肺癌 (n=72)	61	11	84.7%
FIBIN	肺癌 (n=72)	56	16	77.8%
[0115] GRP	肺癌 (n=72)	52	20	72.2%
C2orf40	非癌 (n=17)	2	15	11.8%
FIBIN	非癌 (n=16)	0	16	0%
GRP	非癌 (n=16)	2	14	12.5%

[0116] 表3三个基因甲基化检测的敏感性、特异性及AUC (ROC曲线下面积)

	敏感性	特异性	曲线下面积	p值	95%置信区间
[0117] C2orf40	0.847	0.882	0.865	<0.0001	0.763-0.966
FIBIN	0.778	1.000	0.889	<0.0001	0.823-0.955
GRP	0.722	0.875	0.799	<0.0001	0.684-0.913
三者联合	1.000	0.760	0.882	<0.0001	0.755-1.000

[0118] 发明人利用在线预后分析软件Kaplan-Meier Plotter (<http://kmplot.com/analysis/>) 分析了FIBIN表达水平与肺癌患者预后的相关性。结果显示,2437名肺癌患者中,FIBIN高表达组的无复发生存时间的较大四分位数为99.43个月,显著高于FIBIN低表达组的51.53个月(HR=0.61,p<0.0001),参见图7。该结果提示,人肺癌组织中FIBIN的表达水平高的患者的预后优于表达低的患者,FIBIN的表达水平可以作为肺癌患者预后判断的标志物。

[0119] 在本发明提及的所有文献都在本申请中引用作为参考,就如同每一篇文献被单独引用作为参考那样。此外应理解,在阅读了本发明的上述讲授内容之后,本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改,这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

序列表

<110> 重庆医科大学附属第一医院

<120> 一种检测肺癌相关基因C2orf40、FIBIN和GRP甲基化的试剂盒及其应用

<130> JIA-2020-1-W-009

<160> 12

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 1

atggaaggcg tcgaggatc 19

<210> 2

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 2

ccatccatct ccccgccg 18

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 3

gatggaaggt gttgaggatt 20

<210> 4

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 4

accatccatc tccccacca 19

<210> 5

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 5

gtttggttac ggagaatcgt c 21

<210> 6

<211> 19

<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 6
aacctcgtcc cttctcccg 19
<210> 7
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 7
atgttttggtt atggagaatt gtt 23
<210> 8
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 8
aaacctcatc ccttctccca 20
<210> 9
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 9
ggtttttcgt tacgtttgtg tc 22
<210> 10
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 10
acaccaacgt ctaaataacg cg 22
<210> 11
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 11
gggttttttg ttatgtttgt gtt 23
<210> 12
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 12

cacaccaaca tctaaataac aca 23

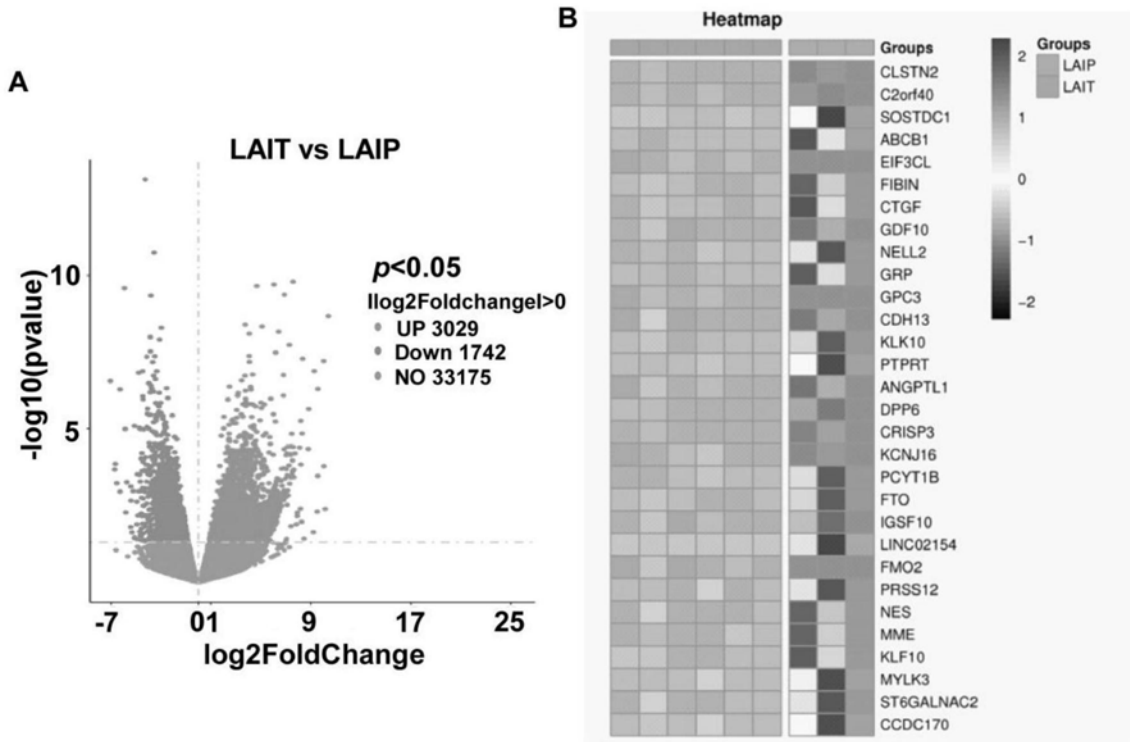


图1

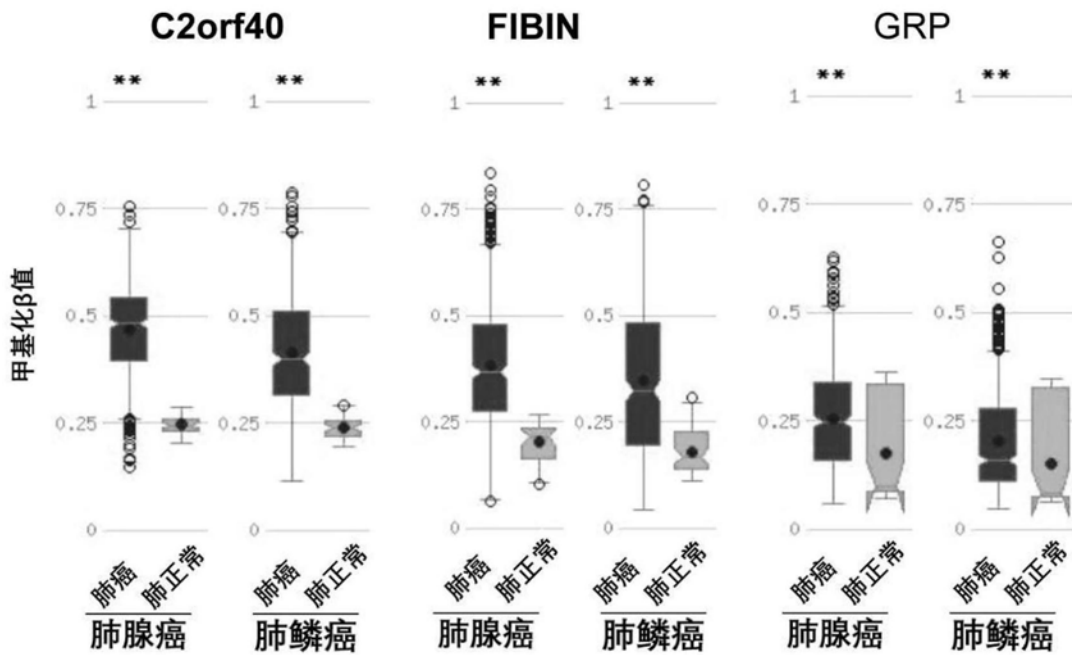


图2

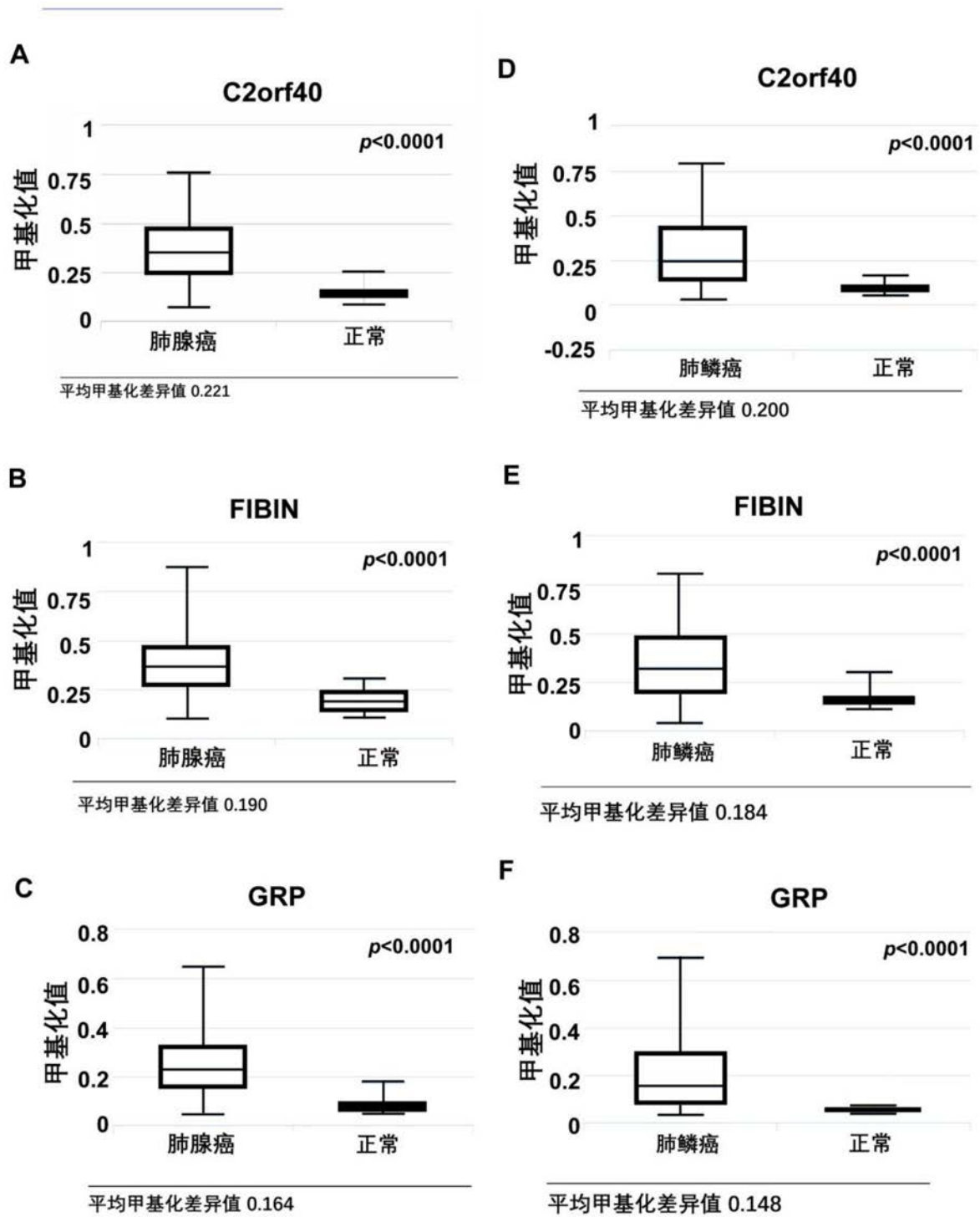


图3

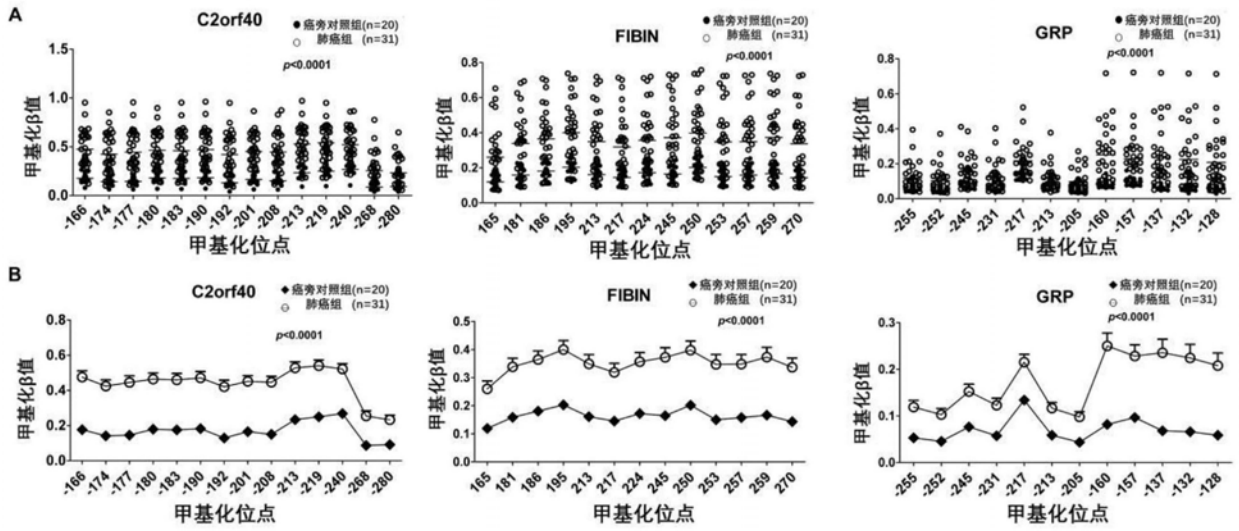


图4

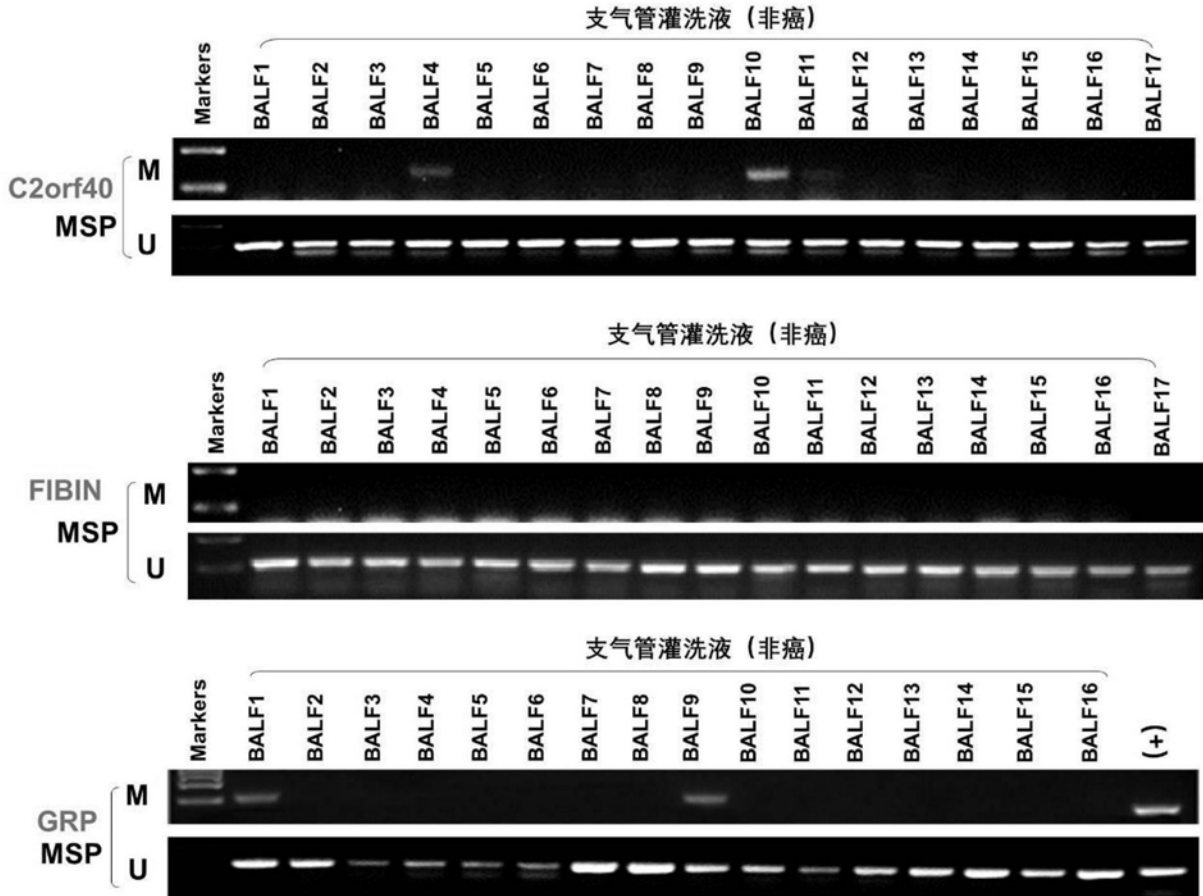


图5

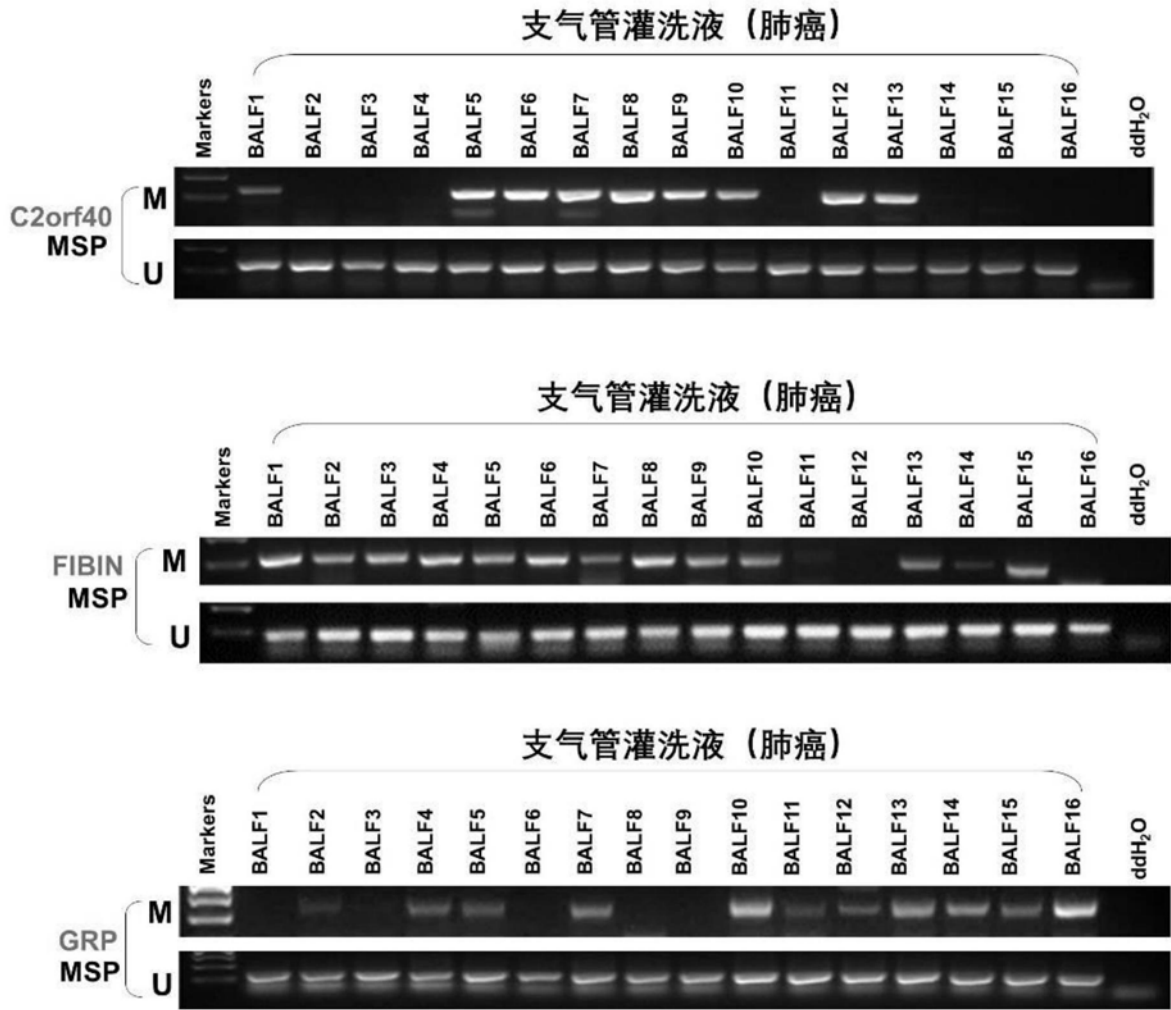


图6

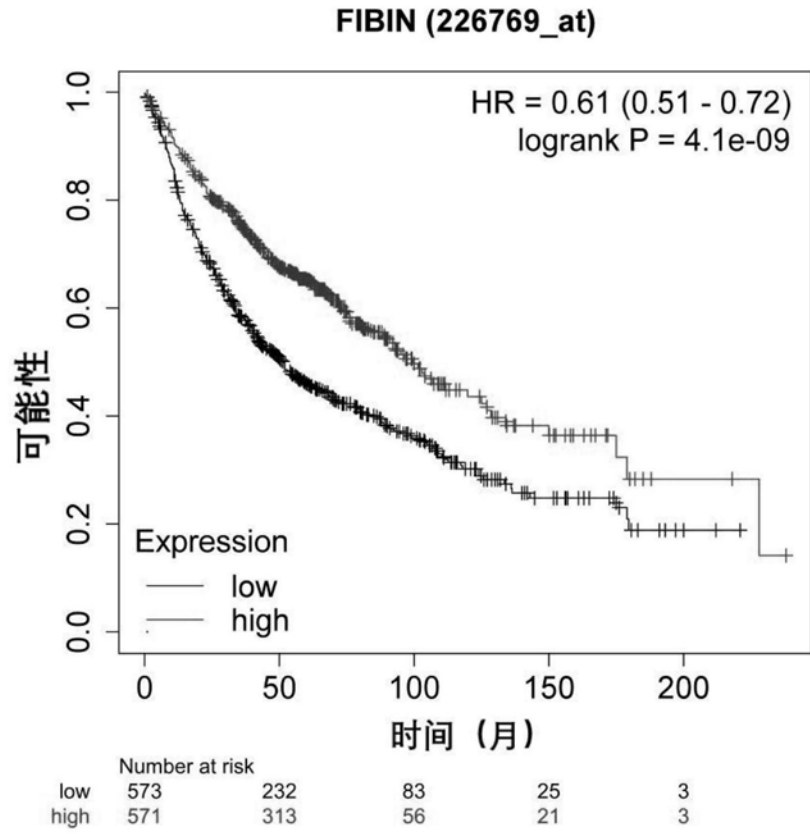


图7