



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105331727 A

(43) 申请公布日 2016. 02. 17

(21) 申请号 201510864133. 8

(22) 申请日 2015. 12. 01

(71) 申请人 湖南宏雅基因技术有限公司

地址 410205 湖南省长沙市岳麓大道 57 号
奥克斯广场环球中心 A 座 2418 室

(72) 发明人 贺毅憬 刘杨 彭艳 肖飞 虞健
涂超峰

(74) 专利代理机构 长沙正奇专利事务所有限责
任公司 43113

代理人 卢宏 周栋

(51) Int. Cl.

C12Q 1/68(2006. 01)

权利要求书2页 说明书9页
序列表5页

(54) 发明名称

一种人外周血循环肿瘤 DNA 中 septin 9 基因
甲基化的检测试剂盒

(57) 摘要

本发明公开了一种人外周血循环肿瘤 DNA 中 septin 9 基因甲基化的检测试剂盒,其中包括:septin9 基因目的位点的甲基化特异引物;septin9 基因目的位点的非甲基化特异的双脱氧胞苷修饰引物;septin9 基因特异的水解探针;内参基因的引物和内参基因的水解探针;所述 septin9 基因目的位点为 septin9 基因 V2 转录本 γ 1 外显子区所包含的至少一个 CpG 位点;所述内参基因为 GAPDH、 β -actin、B2M、SDHA、HPRT1 中的一种或者多种。本发明所述试剂盒的组份设置及其结果判读方案使得检测过程简便,可操作性强。检测结果可靠、特异性好。

1. 一种人外周血循环肿瘤 DNA 中 septin9 基因甲基化的检测试剂盒, 其特征在于, 所述试剂盒中包括: septin9 基因目的位点的甲基化特异引物; septin9 基因目的位点的非甲基化特异的双脱氧胞苷修饰引物; septin9 基因特异的水解探针; 内参基因的引物和内参基因的水解探针; 所述 septin9 基因目的位点为 septin9 基因 V2 转录本 γ 1 外显子区所包含的至少一个 CpG 位点; 所述内参基因为 GAPDH、 β -actin、B2M、SDHA、HPRT1 中的一种或者多种。

2. 如权利要求 1 所述的试剂盒, 其特征在于, 所述 septin9 基因目的位点的甲基化特异引物包括:

正向引物: 5'-ggctcttgagccacagc-3';

反向引物: 5'-tttgggcagccaaacaaagttctctgt-3';

所述 septin9 基因目的位点非甲基化特异的双脱氧胞苷修饰引物包括:

正向引物: 5'-gactcttgaacccacagac-3', 所述正向引物的 3' 端被双脱氧胞苷修饰;

反向引物: 5'-tttgggcagccaaacaaagttctctgt-3';

所述 septin9 基因特异的水解探针为: 5'-accgccgcgcgcgctcta-3'。

3. 如权利要求 2 所述的试剂盒, 其特征在于, 所述内参基因的引物和内参基因的水解探针如下:

GAPDH:

正向引物: 5'-ttggaaaaggatatttttattgtaaaa-3';

反向引物: 5'-aattccccaaaacacccaaacaccca-3';

探针: 5'-ctaacctttaaaatcaa-3';

β -actin:

正向引物: 5'-taatttgtgtgtgtgttttggggtttg-3';

反向引物: 5'-cctccaccaattcaaacaacaccaa-3';

探针: 5'-aaatacacacaaacaccca-3';

B2M:

正向引物: 5'-tttatttgattataatggaaagtatg-3';

反向引物: 5'-atttcataaactaaaaacaaaaaac-3';

探针: 5'-aacaataccttaataat-3';

SDHA:

正向引物: 5'-gtggtagagttaattattatagtag-3';

反向引物: 5'-aatataatattaacaataaccacat-3';

探针: 5'-taatattaacaataaccac-3';

HPRT1:

正向引物: 5'-gattatagataggggtgagagaaaga-3';

反向引物: 5'-cttatagataggggtgagagaaaga-3';

探针: 5'-accacaaataatacacatcc-3'。

4. 如权利要求 3 所述的试剂盒, 其特征在于, 所述 septin9 基因的探针和内参基因的探针 5' 端报告荧光基团为 FAM、TET、HEX、TAMRA、Texas Red、Rox、Cy5 中的一种或多种; 所述 septin9 基因的探针和内参基因的探针 3' 端的猝灭基团为 BHQ1、BHQ2、TAMRA、DABCYL 中一

种或多种。

5. 如权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒中还包括阴性质控品、阳性质控品和无模板对照。

6. 如权利要求 5 所述的试剂盒,其特征在于,所述阳性质控品为亚硫酸氢盐修饰的全甲基化人类基因组 DNA,所述阴性质控品为亚硫酸氢盐修饰的非甲基化人类基因组 DNA。

一种人外周血循环肿瘤 DNA 中 septin 9 基因甲基化的检测试剂盒

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,具体涉及一种人外周血循环肿瘤 DNA 中 septin 9 基因甲基化的检测试剂盒。

背景技术

[0002] 结直肠癌是在世界范围内导致人类死亡的重大疾病之一。在欧洲和美国的癌症新发病中结直肠癌分别排在第二和第三,欧洲 2012 年结直肠癌新发病例约为 447000 人,死亡病例约为 215000 人,美国 2013 年新发病例约为 142820 人,死亡病例约为 50830 人。而在中国,结直肠癌在 2012 年的新发病例约为 400000 人,已成为中国人发病率及死亡率第三高的疾病。

[0003] 通过常规筛查可实现结直肠癌的早期检测,进而进行早期治疗来阻止病程进展甚至治愈。但现状是 60% -70% 的结直肠癌患者是在中期或者晚期才被诊断发现,只有接近 40% 的患者是在早期被发现的。来自 USPSTF (US Preventive Services Task Force) 的数据显示通过定期的筛查可避免近 60% 因结直肠癌导致的死亡,且结直肠癌患者的 5 年生存率也将由 46% 提升至 73%。因此一种有效的结直肠癌早期筛查方法将提高患者的 5 年生存率,降低死亡率。

[0004] 目前主要有便潜血实验 (FOBT [愈创木脂法 (gFOBT) 和免疫化学法 (iFOBT)])、结肠镜两种结直肠癌筛查方法。作为一种常规的筛查方法,愈创木脂法便潜血实验 (gFOBT) 会因饮食,药物和其他因素的影响而导致假阳性,因而影响检测的稳定性。免疫化学法便潜血实验 (iFOBT) 在敏感性和特异性上比传统的愈创木脂法便潜血实验 (gFOBT) 表现要优越,但大多数临床实验室进行的 iFOBT 还是定性的而且如果样本从搜集到检测之间超过 5 天,其检出率将大大降低。相比之下,结肠镜是一种侵入式的检测并且在检测前需要相应的肠道准备以确保大肠腔内满意的视野。其还有可能引起如消化道出血、肠穿孔和感染等并发症。而且患有严重心脏病、心肺功能障碍、急性腹泻、严重溃疡性结肠炎、克罗恩病、腹膜炎等疾病的患者及孕妇不能进行结肠镜检查。因此不论是便潜血实验或是结肠镜都存在患者依从性不好的问题。在美国便潜血实验的筛查率仅为 10%,2008 年 50 岁以上人群结肠镜筛查率为 50.2%。而在中国,便潜血实验和结肠镜的筛查率分别预计不足 5% 和 3%。由于传统发的结直肠癌筛查方法存在低效性或侵入性,所以现急需一种更加方便,更加精确的筛查方法来提高结直肠癌的筛查率。

[0005] 最近,基于血液的结直肠癌检测 -SEPT9 基因甲基化检测有望应用于临床筛查。多个临床试验发现甲基化的 SEPT9 基因是结直肠癌早期检测的特异的生物标记。在结直肠癌早期,SEPT9 基因被超甲基化,其 DNA 被坏死或凋亡的肿瘤细胞释放到外周血中。可通过检测受检者的外周血中 SEPT9 基因甲基化的程度来判断其患结直肠癌的风险。循环 DNA 被发现于人类外周血清中,且其在风湿、肿瘤等多种疾病中的含量会急剧增加。甲基化的 DNA 同样也被发现存在于人类血清中。Lofton-Day 及其同事在结直肠癌患者和健康对照人群的血

样中测试了 3 个 DNA 甲基化生物标记。SEPT9 被证明是特异性最好的候选标记。随后,多个病例对照研究证实了 SEPT9 可作为结直肠癌检测的甲基化生物标记。在这些病例对照研究中 SEPT9 检测的敏感性和特异性分别为 67-79.3% 和 86-99%。这些研究证明了 SEPT9 检测是一种精确,合适,快速以及微创的结直肠癌检测方法。

[0006] DNA 甲基化是一个在胞嘧啶或腺嘌呤上添加一个甲基基团的生化过程,它在细胞由于细胞分裂、分化为特异组织时改变基因的转录和表达。细胞中的基因甲基化结果通常是永久及单向的,以防止细胞恢复为干细胞或转变为其他类型组织。DNA 的甲基化通常在受精卵形成时被去处掉以达到生殖细胞重编程过程中的表观遗传学沉默进而保持基因组完整性,而在发育过程中细胞连续分裂时又重新建立。这种 DNA 甲基化的重建是一种独立于经典的孟德尔遗传定律的遗传过程,使特定的基因以亲源特异的方式表达。这种过程被称作基因组印记。除了基因组印记之外, DNA 甲基化还是哺乳动物正常发育中很多其他遗传过程的重要组成部分,例如:X 染色体失活、重复元素的抑制等。

[0007] DNA 甲基化主要发生在 CpG 位点。哺乳动物中 60% -90% 的 CpG 位点是呈甲基化状态的。未甲基化的 CpG 位点经常成簇的存在,这些成簇的 CpG 位点被称作 CpG 岛。而 CpG 岛则常存在于很多基因的 5' 调控区,特别是启动子区。在癌症患者中,启动子区高度甲基化的基因的转录被沉默,DNA 甲基化的逐渐累积还将导致长期基因沉默。DNA 甲基化通过两种方式抑制基因的转录。第一种,某基因转录因子的结合可能被 DNA 甲基化阻断。第二种,甲基化的 DNA 可能与甲基-CpG-结合域蛋白(MBDs)相结合来招募其他蛋白至其位点,如组蛋白去乙酰化酶和其他染色质重塑蛋白,形成致密、失活的染色质(异染色质)。

[0008] DNA 甲基化是癌症发展的重要要素,它与众多恶性肿瘤相关。在癌症中存在着低甲基化和超甲基化两种形式,他们在癌症发生机制中扮演着不同的角色。异常的超甲基化经常发生在基因的启动子区的 CpG 岛,它可导致抑癌基因的转录沉默或失活。相反地,低甲基化则与染色体不稳定和失去遗传印记相关。DNA 甲基化对胚胎发育和体细胞分裂 都有重要意义,因为甲基化状态基本上会高保真的传递给子细胞。

[0009] Septin 家族是真核生物中一组高度保守的 GTP 结合蛋白。它们是一些骨架蛋白,在细胞分裂和区隔化中起到结构支撑的作用。在人类中共有 13 种 septin 基因。所有的 septin 家族成员可以形成异源复合物并进一步形成高级结构,如:纤丝、笼状复合物等。这些独特的结构是细胞分裂中细胞进程控制所需要的。最近有研究表明,在人类中,septin 蛋白可以在病原细菌周围形成笼状结构以固定有害微生物、防止它们侵入其他细胞。

[0010] SEPT9 基因定位于染色体 17q25.3 位置。该基因有 18 种转录本,编码 15 个多肽。其在肌动蛋白动态、血管生成、细胞运动、细胞增殖、细胞形状、胞质分裂、微管调控、胞外分泌等生理活动中扮演着重要的角色。最近有研究指出,该基因与乳腺癌、结直肠癌、卵巢癌、头颈癌、白血病和淋巴瘤等的发生紧密相关,还可能是唐氏综合症,遗传性神经痛性肌萎缩、和细菌感染的致病因素。在小鼠胚胎中敲除该基因是致死的。

[0011] Septin 家族各成员存在于稳定的 6-8 亚基核心异聚体中,该类型异聚体中均包含 SEPT2、SEPT6 和 SEPT7 亚基。由 6 个以上亚基组成的异聚体中还包含 SEPT9。最近有研究指出 SEPT9 占据了八聚体复合物的末端,在亚基的聚合中起到了关键作用,进而使异聚体更稳定。其在胞浆运动中对子细胞的分离也很重要。因此,胞浆运动可能因 SEPT9 的异常表达或不表达而受到严重影响。当 SEPT9 基因被超甲基化而转录受到抑制时,其在 septin

复合物中的重要作用的丧失可能是结直肠癌发生机制的关键因素。

[0012] SEPT9 在肿瘤发生机制中的作用首次发现于混合性淋巴瘤中,研究表明混合性淋巴瘤的原癌基因是 SEPT9 与其他基因的融合。乳腺癌、卵巢癌的杂合丧失现象中的常见区域中也有 SEPT9 基因,这说明该基因是一个可能的肿瘤抑制基因。在一些肿瘤细胞系中 SEPT9 的 V4 转录本的表达缺失或减弱,并可通过 5- 氮杂胞苷处理而重新获得活性,这一发现也证实了上述观点。更进一步的,SEPT9_V2 转录本的启动子区的 DNA 超甲基化以及该基因的表达下调均导致结直肠癌的发生,也说明该基因是一个抑癌基因。人们在结直肠活检组织、激光显微切割上皮细胞和基质中发现 SEPT9 基因的 mRNA 表达量在从腺瘤到异型增生到癌的进展过程中逐步下降,且与正常对照相比,其在结直肠癌中的表达显著下调。SEPT9 的超甲基化与结直肠癌中失去其 mRNA 表达的显著相关性表明 SEPT9 的表达下调可能可以解释结直肠癌从良性到恶性病变的病理进程。不过,也有一些研究发现在乳腺癌、前列腺癌、卵巢癌和肝癌组织中 SEPT9 某些亚型是过表达的。与结直肠癌中相反,这些发现表明某些特定的 SEPT9 转录本是致癌基因。例如,在卵巢癌中存在多种 SEPT9 基因亚型的表达,并且各不同亚型的表达呈现组织特异性。SEPT9 的这些截然相反的作用说明在不同肿瘤中 DNA 甲基化状态的变化可能是一种常见的现象,DNA 甲基化是调节不同 SEPT9 亚型表达的固有的机制。

[0013] 最近研究表明,结直肠腺瘤和癌组织中 SEPT9_V2 转录本的主要的甲基化状态变化仅限于发生在第三 CpG 岛 (CGI3) 这一个 CpG 岛上。该区域包含 SEPT9_V2 转录本的启动子区和 ATG 起始密码子。在腺瘤和结直肠癌中该区域呈现出不同的甲基化状况:在结直肠癌中甲基化是从 CGI3 的核心区延伸到 5' 端,而在腺瘤中,CGI3 的 5' 端未发生甲基化,这可能说明甲基化范围的扩大是由腺瘤发展为结直肠癌进程中的晚期事件。这种 CGI3 核心区域的甲基化形式的区别可能代表着甲基化状况的转换,反应了结直肠粘膜恶化的细胞进程。CGI3 区域的超甲基化可能抑制 SEPT9_V2 转录本的正常表达,进而扰乱结构纤丝的形成和关键的细胞功能。

[0014] 在细胞凋亡、坏死和增殖过程中,细胞内 DNA 会释放或分泌到循环血液当中成为游离循环 DNA (cfDNA)。其含量被发现在癌症患者的血清中有所升高。测量血清中 cfDNA 来作为肿瘤标志物的尝试都因血清中异常的 cfDNA 浓度的不稳定性及其含量易受创伤、炎症、中风、甚至剧烈运动等多种因素的影响而未能成功。直到 cfDNA 中肿瘤特异的突变被发现,基于突变分析的肿瘤早期诊断才成为可能。将 cfDNA 突变检测变成一项真正的诊断产品存在一些障碍,如:在疾病发展的早期突变序列的低含量;无法透过突变检测指示肿瘤的位置以及突变检测本身的技术难题。不过,肿瘤特异的碱基突变不是 cfDNA 携带的唯一的序列信息。表观遗传学信息,如某些富含 GC 序列的片段的 DNA 甲基化也能从 cfDNA 的检测分析中获得。

[0015] 一种 cfDNA 甲基化标记要成为一种疾病筛查或诊断产品需要满足几个条件,首先,该 cfDNA 标记物在血清中的含量要足够持续稳定且可被检测到。第二,该标志物应具有独特、稳定的甲基化模式,以便于检出并区别于其他疾病相关的甲基化。第三,该标记敏感性和特异性必须优化到能区分肿瘤的甲基化状态和正常组织的甲基化状态。第四,该标记的水平不受感染、怀孕、其他肿瘤和消炎药物等干扰因素的影响。最后,测试本身应具有可操作性,可分析性,简单,和便捷等特点。

[0016] 过去 5 年的多个病例对照研究中证实了在结直肠癌早期检测中外周血游离 DNA 的 SEPT9 基因甲基化检测表现出稳定的高敏感性 (67-79.3%) 和高特异性 (86-99%), 由此可见, 检测游离 DNA 的 SEPT9 甲基化情况可以作为结直肠癌早期诊断一个较好的分子指标。

[0017] 目前检测甲基化的方法主要有以下几种:

[0018] (1) 直接测序法 (bisulfite sequencing PCR、BSP)。直接测序法的原理是: 重亚硫酸盐使 DNA 中未发生甲基化的胞嘧啶脱氨基转变成尿嘧啶, 而甲基化的胞嘧啶保持不变, PCR 扩增后, 尿嘧啶全部转化成胸腺嘧啶, 最后对 PCR 产物进行测序并且与未经处理的序列比较, 判断 CpG 位点是否发生甲基化。该实验方法首先需要进行引物设计 (每个基因设计一对引物, 引物位置尽可能的避开 DNA 中的 CG 位点), 随后需要对目的条带进行切胶回收; 回收后的 PCR 产物连接克隆载体; 挑选阳性克隆测序并对测序结果进行分析。但此方法实验过程长, 需要大量的克隆测序, 过程较为繁琐, 实验检测的费用高。

[0019] (2) 甲基化特异性 PCR 法 (Methylmion Specific PCR、MSP)。该方法为用重亚硫酸盐使胞嘧啶转化为尿嘧啶, 进行引物设计 (每个基因设计两对引物, 分别为: 甲基化引物 M、非甲基化引物 U, 对应扩增甲基化和非甲基化的目的片段), 有时需设计巢式引物; PCR 扩增: 对甲基化和非甲基化的目的片段分别进行扩增, 此时应尽可能使用梯度 PCR 仪, 同时使用不同的退火温度, 以筛选到合适的退火温度; 对 PCR 产物电泳。该方法检测时间相对较长, 不能及时获得检测结果。

[0020] (3) 甲基化敏感性解链曲线分析法 (MS-High Resolution Melting Curve、MS-HRM)。该方法利用经亚硫酸氢盐处理 (修饰) 后的甲基化 DNA 与非甲基化 DNA 之间的碱基差异, 结合碱基变化会引起产物熔解温度变化及熔解曲线差异以及在反应结束后热变性熔解曲线图明显不同的原理, 结合梯度甲基化标准品, 可绘制标准梯度曲线。对比待检样品的热变性曲线在标准曲线中的区域, 即可得出该样品的甲基化水平区间。该方法需要不同甲基化程度的标准品, 实验结果读取复杂繁琐。并且该方法用的荧光染料为饱和荧光染料, 结果只能检测一个荧光信号通道, 不能同时分析样本内参基因的扩增情况, 不能推断硫化修饰的效果, 容易出现重亚硫酸盐处理不完全的问题以及假阴性。

[0021] (4) 甲基化敏感性限制性内切酶 (methylation-sensitive restriction Endonuclease, MS-RE 法)。这种方法利用甲基化敏感性限制性内切酶对甲基化区的不切割的特性, 将 DNA 消化为不同大小的片段后再进行分析。常使用的甲基化敏感的限制性内切酶有 HpaII-MspI (识别序列 CCGG) 和 SmaI-XmaI (CCCGGG) 等。由于后者识别的碱基数相对较多, 其碱基序列在体内出现的概率相对较低, 所以以前者即 HpaII-MspI 更常用。其中 HpaII 和 MspI 均能识别 CCGG 序列, 然而当序列中的胞嘧啶发生甲基化时, HpaII 不切割, 利用 HpaII-MspI 的这种属性处理 DNA, 随后进行 Southern 或 PCR 扩增分离产物, 明确甲基化状态。这是一种经典的甲基化研究方法, 其优点是: 相对简单, 成本低廉, 甲基化位点明确, 实验结果易解释; 缺点是: 1. 由于 CG 不仅仅限于 CCGG 序列中, 因此非该序列中的 CG 将被忽略; 2. 只有检测与转录相关的关键性位点的甲基化状态时, 该检测方法的结果才有意义; 3. 相对而言, Southern 方法较复杂, 且需要样本的量较大; 4. 存在着酶不完全消化引起的假阳性的问题; 5. 不适用于混合样本。

发明内容

[0022] 本发明旨在克服上述技术的不足,提供一种用于结直肠癌诊断的人外周血中循环肿瘤 DNA 中 septin9 基因甲基化检测的试剂盒,。

[0023] 为了达到上述目的,本发明的技术方案是:

[0024] 所述人外周血循环肿瘤 DNA 中 septin 9 基因甲基化的检测试剂盒中包括: septin9 基因目的位点的甲基化特异引物;septin9 基因目的位点的非甲基化特异的双脱氧胞苷修饰引物;septin9 基因特异的水解探针;内参基因的引物和内参基因的水解探针;所述 septin9 基因目的位点为 septin9 基因 V2 转录本 γ 1 外显子区所包含的至少一个 CpG 位点;所述内参基因为 GAPDH、 β -actin、B2M、SDHA、HPRT1 中的一种或者多种。

[0025] 优选地,所述 septin9 基因目的位点的甲基化特异引物(其终浓度为:0.1~1 μ M)包括:

[0026] 正向引物:5'-ggctcttgagccacaggc-3'(SEQ ID NO.1);

[0027] 反向引物:5'-tttgggcagccaaacaaagttctctgt-3'(SEQ ID NO.2);

[0028] 所述 septin9 基因目的位点非甲基化特异的双脱氧胞苷修饰引物(其终浓度为:0.1~1 μ M)包括:

[0029] 正向引物:5'-gactcttgaaccacagac-3'(SEQ ID NO.3),所述正向引物的 3' 端被双

[0030] 脱氧胞苷修饰;

[0031] 反向引物:5'-tttgggcagccaaacaaagttctctgt-3'(SEQ ID NO.4);

[0032] 所述 septin9 基因特异的水解探针(其终浓度为:0.1~1 μ M)为:

[0033] 5'-accgccgcccgcgcgtcta-3'(SEQ ID NO.5)。

[0034] 优选地,所述内参基因的引物和内参基因的水解探针如下:

[0035] GAPDH:

[0036] 正向引物:5'-ttggaaaaggatatttttattgtataaa-3'(SEQ ID NO.6);

[0037] 反向引物:5'-aattccccaaaacacccaaacaccca-3'(SEQ ID NO.7);

[0038] 探针:5'-ctaacctttaaaatcaa-3'(SEQ ID NO.8);

[0039] β -actin:

[0040] 正向引物:5'-taatttggtgtgtgtgttttgggggttg-3'(SEQ ID NO.9);

[0041] 反向引物:5'-cctccaccaattcaaacaacaccaa-3'(SEQ ID NO.10);

[0042] 探针:5'-aaatacacacaaacaccca-3'(SEQ ID NO.11);

[0043] B2M:

[0044] 正向引物:5'-tttatttgattataatggaaagtatg-3'(SEQ ID NO.12);

[0045] 反向引物:5'-atttcataaactaaaaacaaaaaac-3'(SEQ ID NO.13);

[0046] 探针:5'-aacaataaccttaataat-3'(SEQ ID NO.14);

[0047] SDHA:

[0048] 正向引物:5'-gtggtagagttaattattatatagtatg-3'(SEQ ID NO.15);

[0049] 反向引物:5'-aaatataatattaacaataaccacat-3'(SEQ ID NO.16);

[0050] 探针:5'-taatattaacaataaccac-3'(SEQ ID NO.17);

[0051] HPRT1:

[0052] 正向引物:5'-gattatagataggggtgagagaaaga-3'(SEQ ID NO.18);

[0053] 反向引物:5'-cttatagataggggtgagagaaaga-3' (SEQ ID NO. 19);

[0054] 探针:5'-accacaaataatacacatcc-3' (SEQ ID NO. 20)。

[0055] 优选地,所述 septin9 基因的探针和内参基因的探针 5' 端报告荧光基团为 FAM、TET、HEX、TAMRA、Texas Red、Rox、Cy5 中的一种或多种;所述 septin9 基因的探针和内参基因的探针 3' 端的猝灭基团为 BHQ1、BHQ2、TAMRA、DABCYL 中一种或多种。

[0056] 优选地,所述试剂盒中还包括阴性质控品、阳性质控品和无模板对照,所述无模板对照是指不含人类基因组 DNA 的反应体系。优选地,所述阳性质控品为亚硫酸氢盐修饰的全甲基化人类基因组 DNA,所述阴性质控品为亚硫酸氢盐修饰的非甲基化人类基因组 DNA。

[0057] 所述试剂盒中,PCR 扩增反应体系的终浓度组成为:1 ~ 10×PCR 缓冲液、0.1 ~ 1mM dNTPs、0.01 ~ 0.10U/ul TaqDNA 聚合酶、1 ~ 5mM 氯化镁。

[0058] 本发明通过 septin9 基因与内参基因 PCR 扩增结果的计算,来对检测结果给出判定,提高了检测结果的敏感性和可靠性。septin9 基因与内参基因 PCR 扩增结果指其 Ct 值,即 septin9 基因与内参基因的荧光信号到达设定的阈值时所经历的循环数。通过 septin9 基因与内参基因 PCR 扩增结果的计算来对检测结果给出判定的方式是:septin9 基因 Ct ≤ 32,判定结果:甲基化阳性;septin9 基因 Ct > 32,septin9 基因 Ct-内参基因 Ct ≤ 8,判定结果:甲基化阳性;Ct > 32,septin9 基因 Ct-内参基因 Ct > 8,判定结果:甲基化阴性。

[0059] 本发明利用双脱氧胞苷修饰引物阻滞了 septin9 基因目的位点非甲基化模板的非特异性扩增,提高了其灵敏度,可以在循环肿瘤 DNA 中检测 septin9 基因甲基化状况,操作简单。通过目的基因与内参基因 PCR 扩增结果的计算,来对检测结果给出判定,提高了检测结果的敏感性和可靠性。

[0060] 本申请与直接测序法的不同之处在于此申请所用方法为直接通过 PCR(聚合酶链式反应)得到的荧光信号直接判断“CpG 位点的甲基化”的状态;而直接测序法需要通过 PCR 对目标区域扩增后进行测序反应方能得到“CpG 位点的甲基化”的状态。

[0061] 本发明所述试剂盒的组份设置及其结果判读方案使得检测过程简便,可操作性强。检测结果可靠、特异性好。

具体实施方式

[0062] 实施例 1

[0063] 材料:待检血浆样本、阳性质控品、阴性质控品。所述阳性质控品为亚硫酸氢盐修饰的全甲基化人类基因组 DNA,所述阴性质控品为亚硫酸氢盐修饰的非甲基化人类基因组 DNA。

[0064] 人外周血循环肿瘤 DNA 中 septin 9 基因甲基化的检测试剂盒,其中包括:septin9 基因目的位点的甲基化特异引物;septin9 基因目的位点的非甲基化特异的双脱氧胞苷修饰引物;septin9 基因特异的水解探针;内参基因的引物和内参基因的水解探针;所述 septin9 基因目的位点为 septin9 基因 V2 转录本 γ1 外显子区所包含的至少一个 CpG 位点;所述内参基因为 GAPDH、β-actin、B2M、SDHA、HPRT1 中的一种或者多种。

[0065] 所述 septin9 基因目的位点的甲基化特异引物(其终浓度为:0.1 ~ 1uM)包括:

[0066] 正向引物:5'-ggctcttgagccacaggc-3' (SEQ ID NO. 1);

- [0067] 反向引物 :5' -tttgggcagccaaacaaagttctctgt-3' (SEQ ID NO. 2) ;
- [0068] 所述 septin9 基因目的位点非甲基化特异的双脱氧胞苷修饰引物 (其终浓度为 : 0.1 ~ 1uM) 包括 :
- [0069] 正向引物 :5' -gactcttgaaccacagac-3' (SEQ ID NO. 3), 所述正向引物的 3' 端被双
- [0070] 脱氧胞苷修饰 ;
- [0071] 反向引物 :5' -tttgggcagccaaacaaagttctctgt-3' (SEQ ID NO. 4) ;
- [0072] 所述 septin9 基因特异的水解探针 (其终浓度为 : 0.1 ~ 1uM) 为 :
- [0073] 5' -accgccgccgcgcgtcta-3' (SEQ ID NO. 5) 。
- [0074] 所述内参基因的引物和内参基因的水解探针如下 :
- [0075] GAPDH :
- [0076] 正向引物 :5' -ttggaaaaggatatttttattgtaaaa-3' (SEQ ID NO. 6) ;
- [0077] 反向引物 :5' -aattccccaaaacacccaaacaccca-3' (SEQ ID NO. 7) ;
- [0078] 探针 :5' -ctaacctttaaaatcaaat-3' (SEQ ID NO. 8) ;
- [0079] β -actin :
- [0080] 正向引物 :5' -taatttgtgtgtgtgttttggggtttg-3' (SEQ ID NO. 9) ;
- [0081] 反向引物 :5' -cctccaccaattcaaacaacaccaa-3' (SEQ ID NO. 10) ;
- [0082] 探针 :5' -aaatacacacaaacaccca-3' (SEQ ID NO. 11) ;
- [0083] B2M :
- [0084] 正向引物 :5' -tttatttgattataatggaaagtatg-3' (SEQ ID NO. 12) ;
- [0085] 反向引物 :5' -atttcataaactaaaaacaaaaaac-3' (SEQ ID NO. 13) ;
- [0086] 探针 :5' -aacaataaccttaataaat-3' (SEQ ID NO. 14) ;
- [0087] SDHA :
- [0088] 正向引物 :5' -gtggtagagttatattatatagtagt-3' (SEQ ID NO. 15) ;
- [0089] 反向引物 :5' -aaatataatattaacaataaccacat-3' (SEQ ID NO. 16) ;
- [0090] 探针 :5' -taatattaacaataaccac-3' (SEQ ID NO. 17) ;
- [0091] HPRT1 :
- [0092] 正向引物 :5' -gattatagataggggtgagagaaaga-3' (SEQ ID NO. 18) ;
- [0093] 反向引物 :5' -cttatagataggggtgagagaaaga-3' (SEQ ID NO. 19) ;
- [0094] 探针 :5' -accacaaataatacacatcc-3' (SEQ ID NO. 20) 。
- [0095] 仪器 :Lightcycler 480、nanodrop 1000、高速离心机、水浴锅、漩涡震荡仪、冰箱、烘箱、灭菌锅。
- [0096] 试剂 :循环肿瘤 DNA 提取试剂盒 (上海医脉赛科)、DNA 聚合酶 (罗氏公司)、10×PCR Buffer (罗氏公司)、MgCl₂ (罗氏公司)、dNTP (TaKaRa)、纯化水。
- [0097] 引物 :所有引物纯度应达到电泳级 (PAGE) 或 HPLC 级, 不含杂带。提供合成机构出具的合成产物的质检证明, 如 PAGE 电泳结果或 HPLC 分析图谱, 证明使用 PAGE 或者 HPLC 纯化后应有明显单峰 PAGE 或者 HPLC 纯化图谱, 浓度为 10ng/μl 备用。
- [0098] (1) 循环肿瘤 DNA 的提取
- [0099] 采用上海医脉赛科技有限公司的循环肿瘤 DNA 提取试剂盒提取病人循环肿瘤

DNA,具体步骤如下:

[0100] A、血浆样品至 2ml 离心管中,加入蛋白消化液 A、蛋白酶 K、37℃恒温孵 30min。

[0101] B、加入核酸结合液、DNA 提取磁珠,混合后加入 SolutionER,置于旋转混和仪,温和混匀 25min。

[0102] C、用磁分离架吸附磁珠 1min,弃上清。

[0103] D、加入洗涤液 I 洗涤磁珠两次。

[0104] E、加入洗涤液 II 洗涤磁珠两次。

[0105] F、吸附磁珠,弃上清后静置 3-6min。

[0106] G、加入洗脱液,置于室温,混和均匀洗脱 5min。

[0107] H、磁场吸附磁珠,回收含基因组 DNA 的洗脱液。

[0108] I、通过微量 DNA 定量对样品中获得的 DNA 含量进行定量测定。

[0109] B、将上述获得的循环肿瘤 DNA 作为模板

[0110] (2)PCR 反应的体系和反应条件

[0111] 所述 PCR 扩增反应体系的终浓度组成为:1 ~ 10×PCR 缓冲液、0.1 ~ 1mM dNTPs、0.1 ~ 1uM septin9 甲基化引物、0.1 ~ 1uM septin9 非甲基化双脱氧胞苷引物 0.1 ~ 1uM 内参基因引物 0.05 ~ 2ng/ul 模板 DNA、0.1 ~ 1uM septin9Taqman 水解探针、0.1 ~ 1uM 内参基因 Taqman 水解探针、0.01 ~ 0.10U/ul TaqDNA 聚合酶、1 ~ 5mM 氯化镁。

[0112] 所述检测基因为 septin9 基因、septin9 甲基化基因,所述内参基因为 GAPDH、 β -actin(ACTB)、B2M、SDHA、HPRT1 中的一种或者多种。所述 septin9 基因的探针和内参基因的探针 5' 端报告荧光基团为 FAM、TET、HEX、TAMRA、Texas Red、Rox、Cy5 中的一种或多种;所述 septin9 基因的探针和内参基因的探针 3' 端的猝灭基团为 BHQ1、BHQ2、TAMRA、DABCYL 中一种或多种。

[0113] 所述 dNTPs 中包括 10mM dATP、10mM dCTP、10mM dTTP 和 10mM dGTP,所述 PCR 体系中包含 Tris·Cl、氯化钾、硫酸镁和氯化镁。

[0114] 所述 PCR 扩增反应的具体过程为:92 ~ 97℃预变性 5 ~ 35 分钟,再进行聚合酶链式反应扩增阶段,92 ~ 97℃变性 10 ~ 30s,50 ~ 65℃退火 10 ~ 30s,并进行 35 ~ 55 个循环。

[0115] (3)PCR 反应的加样布局(见表 1)

[0116] 待测 DNA 样品、阴性质控品、阳性质控品和无模板对照均进行 3 个复孔检测,PCR 仪 96 孔板加样布局见下表。表中 PC 代表阳性质控品(Positive Control),NC 代表阴性质控品(Negative Control),NTC 代表无模板对照(No template control),S 代表检测样本(sample)。

[0117] 表 1

[0118]

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	PC	PC	PC	S7	S7	S7						
B	NC	NC	NC	S8	S8	S8						
C	S1	S1	S1	S9	S9	S9						
D	S2	S2	S2	S...	S...	S...						
E	S3	S3	S3	NTC	NTC	NTC						
F	S4	S4	S4									

G	S5	S5	S5									
H	S6	S6	S6									

[0119] (4) 实验结束以后,按以下步骤进行检测结果的分析和判定(见表2):

[0120] 进行无模板对照(NTC)的扩增曲线分析,septin9 和内参基因(最优选:ACTB)此时应无扩增曲线明显扩增信号,说明实验无污染,可以继续分析。

[0121] 质控品的内参基因(ACTB)应均有扩增信号,且呈S型扩增曲线,质控品内参基因(ACTB)的CP值应符合下表中参数范围;阴性质控品的septin9 应无明显扩增曲线变化,阳性质控品septin9 的CP值应符合下表中质控品的参数范围。质控品检测满足以上条件时,证明实验有效,可继续分析。

[0122] 表 2

[0123]

质控品	反应	septin9, CP	内参基因, CP
阳性质控品	PCR1	CP<33	CP<33
	PCR2	CP<33	CP<33
	PCR3	CP<33	CP<33
阴性质控品	PCR1	无扩增	CP<33
	PCR2	无扩增	CP<33
	PCR3	无扩增	CP<33

[0124] 样本的内参基因(ACTB)应均有扩增信号,且呈S型扩增曲线,样本单个PCR检测结果应参照表3 样本检测-单个PCR 结果判读。

[0125] 表 3

[0126]

样本结果	Septin9	Septin9-内参基因
甲基化阳性	Ct≤32	-
	Ct>32	ΔCt≤8
甲基化阴性	Ct>32	ΔCt>8

[0127] 若不符合表3 中的1、2 项要求,则建议重新检测。

[0128] 在以上实施例中未注明具体条件的实验方法,均按照常规条件,例如按照分子克隆实验指南(第三版,J. 萨姆布鲁克等著)中所述的条件或制造厂商所建议的条件进行操作。

[0001]

SEQUENCE LISTING

<110> 中南大学

<120> 一种人外周血循环肿瘤 DNA 中 septin 9 基因甲基化的检测试剂盒

<160> 20

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工合成

<400> 1

ggctcttgag cccacaggc 19

<210> 2

<211> 27

<212> DNA

<213> 人工合成

<400> 2

tttgggcagc caaacaaagt tctctgt 27

<210> 3

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工合成

<400> 3

gactcttgaa cccacagac 19

<210> 4

<211> 27

<212> DNA

<213> 人工合成

<400> 4

tttgggcagc caaacaaagt tctctgt 27

[0002]

<210>	5	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人工合成	
<400>	5	
	accgccgccg cgcgtcta	19
<210>	6	
<211>	27	
<212>	DNA	
<213>	人工合成	
<400>	6	
	ttggaaaagg atattttat tgtaaaa	27
<210>	7	
<211>	26	
<212>	DNA	
<213>	人工合成	
<400>	7	
	aattccccaa aacacccaaa caccca	26
<210>	8	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人工合成	
<400>	8	
	ctaaccttta aaatcaaat	19
<210>	9	
<211>	27	
<212>	DNA	
<213>	人工合成	
<400>	9	

[0003]

taatttgtgt gtgtgttttg gggtttg	27
<210> 10	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> 人工合成	
<400> 10	
cctccaccca attcaaaca caccaa	26
<210> 11	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工合成	
<400> 11	
aaatacacac aaacaccca	19
<210> 12	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> 人工合成	
<400> 12	
tttatttgat tataatggaa agtatg	26
<210> 13	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> 人工和合成	
<400> 13	
atttcataaa ctaaaaaaca aaaaaac	27
<210> 14	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工合成	

[0004]

<400> 14	
aacaaatacc ttaaataat	19
<210> 15	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> 人工合成	
<400> 15	
gtggtagag ttaatattat atagtatg	28
<210> 16	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> 人工合成	
<400> 16	
aaatataata ttaacaataa ccaccat	27
<210> 17	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工合成	
<400> 17	
taatattaac aataaccac	19
<210> 18	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> 人工合成	
<400> 18	
gattatagat aggggtgaga gaaaga	26
<210> 19	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> 人工合成	

[0005]

<400> 19

cttatagata ggggtgagag aaag

24

<210> 20

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工合成

<400> 20

accacaaata atacacatcc

20