



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110578001 A

(43)申请公布日 2019.12.17

(21)申请号 201910898042.4

(22)申请日 2019.09.23

(71)申请人 广州滴纳生物科技有限公司

地址 510700 广东省广州市黄埔区伴河路
96号1栋619房(仅限办公)

(72)发明人 马淑燕 田慧珍 黎道娇

(74)专利代理机构 广州华进联合专利商标代理
有限公司 44224

代理人 戴志攀

(51)Int.Cl.

C12Q 1/6886(2018.01)

C12Q 1/6858(2018.01)

C12N 15/11(2006.01)

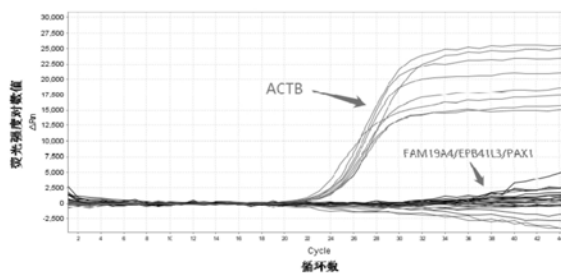
权利要求书1页 说明书10页
序列表2页 附图2页

(54)发明名称

用于检测宫颈癌相关基因甲基化的检测试剂盒及其使用方法

(57)摘要

本发明涉及一种用于检测宫颈癌相关基因甲基化的检测试剂盒及其使用方法,检测试剂盒包括用于检测FAM19A4基因甲基化的第一引物对和第一探针、用于检测EPB41L3基因甲基化的第二引物对和第二探针以及用于检测PAX1基因甲基化的第三引物对和第三探针。本发明的检测试剂盒从众多宫颈癌相关基因中筛选了三个与宫颈癌高度特异性相关的基因FAM19A4、EPB41L3和PAX1,并在此三个基因的启动子区各设计筛选得到一组特异性强且兼容性好的甲基化检测引物对和探针。通过使用上述三组引物对和探针去扩增待测DNA样本,然后根据荧光定量PCR扩增结果的相对荧光值即可确定待测DNA样本的基因甲基化检测结果。



1. 一种用于检测宫颈癌相关基因甲基化的检测试剂盒, 其特征在于, 包括用于检测FAM19A4基因甲基化的第一引物对和第一探针、用于检测EPB41L3基因甲基化的第二引物对和第二探针以及用于检测PAX1基因甲基化的第三引物对和第三探针; 其中, 所述第一引物对的核苷酸序列分别如SEQ ID NO.1和SEQ ID NO.2所示, 所述第一探针的核苷酸序列如SEQ ID NO.3所示, 所述第二引物对的核苷酸序列分别如SEQ ID NO.4和SEQ ID NO.5所示, 所述第二探针的核苷酸序列如SEQ ID NO.6所示, 所述第三引物对的核苷酸序列分别如SEQ ID NO.7和SEQ ID NO.8所示, 所述第三探针的核苷酸序列如SEQ ID NO.9所示。

2. 根据权利要求1所述的检测试剂盒, 其特征在于, 还包括内参引物对和内参探针, 所述内参引物对的核苷酸序列分别如SEQ ID NO.10和SEQ ID NO.11所示, 所述内参探针的核苷酸序列如SEQ ID NO.12所示。

3. 根据权利要求1所述的检测试剂盒, 其特征在于, 所述第一探针、所述第二探针和所述第三探针的5'端均连接有荧光报告基团, 且所述第一探针、所述第二探针和所述第三探针的荧光报告基团互不相同, 所述第一探针、所述第二探针和所述第三探针的3'端均连接有荧光淬灭基团。

4. 根据权利要求3所述的检测试剂盒, 其特征在于, 所述荧光报告基团选自FAM、JOE、VIC、HEX、ROX、CY3或CY5, 所述荧光淬灭基团选自BHQ、TAMRA或MGB。

5. 根据权利要求1~4任一项所述的检测试剂盒, 其特征在于, 还包括PCR缓冲液、dNTPs、MgCl₂、UNG酶、Taq DNA聚合酶、阳性质控品和阴性质控品中的一种或多种。

6. 一种权利要求1~6任一项所述的检测试剂盒的使用方法, 其特征在于, 包括以下步骤:

使用所述第一引物对、所述第一探针、所述第二引物对、所述第二探针、所述第三引物对、所述第三探针与亚硫酸盐转化后的待测DNA样本配制PCR反应体系, 然后进行荧光定量PCR反应。

7. 根据权利要求6所述的使用方法, 其特征在于, 所述荧光定量PCR反应的条件为: 49℃~51℃UNG酶反应1min~3min; 94℃~96℃变性4min~6min; 94℃~96℃变性4s~6s, 54℃~56℃退火延伸34s~36s并收集荧光信号, 45个循环。

8. 根据权利要求6所述的使用方法, 其特征在于, 还包括分析荧光定量PCR数据的步骤, 所述分析荧光定量PCR数据的方法包括以下步骤: 分别获取PAX1基因的Ct值、FAM19A4基因的Ct值和EPB41L3基因的Ct值与内参基因的Ct值之间的差值, 根据差值判断对应基因的甲基化检测结果。

9. 根据权利要求8所述的使用方法, 其特征在于, 所述根据差值判断对应基因的甲基化检测结果的方法为: 当所述差值≤9时, 对应基因的甲基化检测结果为阳性, 当所述差值大于9或未检出时, 对应基因的甲基化检测结果为阴性。

10. 根据权利要求6所述的使用方法, 其特征在于, 所述待测DNA样本选自人宫颈脱落细胞、阴道分泌物、尿液、宫颈组织、血浆、血清和血细胞中的一种或多种。

用于检测宫颈癌相关基因甲基化的检测试剂盒及其使用方法

技术领域

[0001] 本发明涉及基因检测技术领域,特别是涉及一种用于检测宫颈癌相关基因甲基化的检测试剂盒及其使用方法。

背景技术

[0002] 宫颈癌是常见的妇科恶性肿瘤之一,患病的高峰年龄为40~60岁,近年来宫颈癌的发病年龄呈年轻化趋势。研究表明,宫颈癌的诱发,与人类乳头瘤病毒(HPV)的病原体有关。高危型HPV(hrHPV)感染后,宫颈癌的发生需要经历多个步骤:从hrHPV持续感染,到癌前病变(CIN1期→CIN2期→CIN3期),最后才发展成浸润癌。宫颈癌的发生发展,尤其是癌前病变到浸润癌,绝大多数病人需要经历很长一段时间。hrHPV感染后经3~5年可以进展为高级别病变的CIN2期和CIN3期,而进一步发展为浸润癌则需20~30年,癌前病变及宫颈癌早期可以没有任何症状。癌前病变时间很长,如果在这个阶段通过筛查早发现,尽早采取有效的干预治疗措施,则可以较好的避免癌前病变进一步发展成癌症,大大降低宫颈癌的发生率和死亡率,从而达到预防宫颈癌的目的。

[0003] 目前宫颈癌的筛查方法主要有两种:宫颈细胞学检查和HPV检查,宫颈细胞学检查主要通过对宫颈脱落细胞进行染色,观察细胞形态变化进而判断宫颈细胞有没有癌变情况;HPV检查通过核酸检测等方法,检测宫颈有没有感染HPV病毒,属于病因检查。细胞学检查特异度较高,但灵敏度较低,且细胞学的结果判断需要专业的病理医生在显微镜下进行判读,结果受主观影响,容易出现漏诊、误诊现象,而且由于病理医生的短缺,低资源地区难以普及。HPV检测的灵敏度高,但特异性较差,其假阳性率比较高,大部分HPV为一过性感染,不会发展为宫颈癌前病变或宫颈癌,HPV阳性结果给妇女造成了不必要的恐慌,也浪费了医疗资源。因此,亟需一种可以识别真正具有宫颈癌高风险的生物学标志物,实现对宫颈癌及癌前病变的早期、灵敏和稳定的诊断,以便进行及时、有效的治疗,降低医疗成本,节约社会资源。

发明内容

[0004] 基于此,有必要提供一种灵敏度高、特异性强的用于检测宫颈癌相关基因甲基化的检测试剂盒。

[0005] 一种用于检测宫颈癌相关基因甲基化的检测试剂盒,包括用于检测FAM19A4基因甲基化的第一引物对和第一探针、用于检测EPB41L3基因甲基化的第二引物对和第二探针以及用于检测PAX1基因甲基化的第三引物对和第三探针;其中,所述第一引物对的核苷酸序列分别如SEQ ID NO.1和SEQ ID NO.2所示,所述第一探针的核苷酸序列如SEQ ID NO.3所示,所述第二引物对的核苷酸序列分别如SEQ ID NO.4和SEQ ID NO.5所示,所述第二探针的核苷酸序列如SEQ ID NO.6所示,所述第三引物对的核苷酸序列分别如SEQ ID NO.7和SEQ ID NO.8所示,所述第三探针的核苷酸序列如SEQ ID NO.9所示。

[0006] DNA甲基化是一种重要的表观修饰,它在不改变DNA序列的情况下,在CpG岛5'端胞

嘧啶加上甲基基团,从而使该DNA的表达沉默,对基因表达模式以及基因组的稳定性起重要的调控作用。人类抑癌基因启动子的高甲基化,在许多肿瘤的发生、发展的各阶段均有其特异性的改变模式。研究发现,宿主抑癌基因甲基化水平随宫颈病变严重程度的增加而升高,因而DNA甲基化可以作为宫颈癌及癌前病变筛查的生物学标志物。但进一步研究发现,单独检测某一个基因甲基化指标,其对宫颈癌的灵敏度和特异性较低。而本发明的用于检测宫颈癌相关基因甲基化的检测试剂盒,从众多宫颈癌相关基因中筛选了三个与宫颈癌高度特异性相关的基因FAM19A4、EPB41L3和PAX1,并在此三个基因的启动子区各设计筛选得到一组特异性强且兼容性好的甲基化检测引物对和探针。通过使用上述三组引物对和探针去扩增经核酸提取和亚硫酸盐转化的待测DNA样本,然后根据荧光定量PCR扩增结果的相对荧光值即可确定待测样本中对应基因的甲基化检测结果,进而判断是否为宫颈癌及癌前病变。与常规试剂盒相比,本发明的检测试剂盒具有快速、方便、灵敏度高及特异性强的特点,对宫颈癌的早期诊断及预后判断起重要作用。

[0007] 在其中一个实施例中,还包括内参引物对和内参探针,所述内参引物对的核苷酸序列分别如SEQ ID NO.10和SEQ ID NO.11所示,所述内参探针的核苷酸序列如SEQ ID NO.12所示。

[0008] 在其中一个实施例中,所述第一探针、所述第二探针和所述第三探针的5'端均连接有荧光报告基团,且所述第一探针、所述第二探针和所述第三探针的荧光报告基团互不相同,所述第一探针、所述第二探针和所述第三探针的3'端均连接有荧光淬灭基团。

[0009] 在其中一个实施例中,所述荧光报告基团选自FAM、JOE、VIC、HEX、ROX、CY3或CY5,所述荧光淬灭基团选自BHQ、TAMRA或MGB。

[0010] 在其中一个实施例中,还包括PCR缓冲液、dNTPs、MgCl₂、UNG酶、Taq DNA聚合酶、阳性质控品和阴性质控品中的一种或多种。

[0011] 本发明还提供了一种上述检测试剂盒的使用方法,包括以下步骤:

[0012] 使用所述第一引物对、所述第一探针、所述第二引物对、所述第二探针、所述第三引物对、所述第三探针与亚硫酸盐转化后的待测DNA样本配制PCR反应体系,然后进行荧光定量PCR反应。

[0013] 在其中一个实施例中,所述荧光定量PCR反应的条件为:49℃~51℃UNG酶反应1min~3min;94℃~96℃变性4min~6min;94℃~96℃变性4s~6s,54℃~56℃退火延伸34s~36s并收集荧光信号,45个循环。

[0014] 在其中一个实施例中,还包括分析荧光定量PCR数据的步骤,所述分析荧光定量PCR数据的方法包括以下步骤:分别获取PAX1基因的Ct值、FAM19A4基因的Ct值和EPB41L3基因的Ct值与内参基因的Ct值之间的差值,根据差值判断对应基因的甲基化检测结果。

[0015] 在其中一个实施例中,所述根据差值判断对应基因的甲基化检测结果的方法为:当所述差值≤9时,对应基因的甲基化检测结果为阳性,当所述差值大于9或未检出时,对应基因的甲基化检测结果为阴性。

[0016] 在其中一个实施例中,所述待测DNA样本选自人宫颈脱落细胞、阴道分泌物、尿液、宫颈组织、血浆、血清和血细胞中的一种或多种。

附图说明

[0017] 图1为实施例4中特异性试验结果图,其中,纵坐标表示校正荧光强度的对数值,横坐标表示荧光定量PCR扩增的循环数;

[0018] 图2为实施例4中对于FAM19A4基因的灵敏性试验结果图,其中,纵坐标表示校正荧光强度的对数值,横坐标表示荧光定量PCR扩增的循环数;

[0019] 图3为实施例4中对于EPB41L3基因的灵敏性试验结果图,其中,纵坐标表示校正荧光强度的对数值,横坐标表示荧光定量PCR扩增的循环数;

[0020] 图4为实施例4中对于PAX1基因的灵敏性试验结果图,其中,纵坐标表示校正荧光强度的对数值,横坐标表示荧光定量PCR扩增的循环数。

具体实施方式

[0021] 为了便于理解本发明,下面将对本发明进行更全面的描述,并给出了本发明的较佳实施例。但是,本发明可以以许多不同的形式来实现,并不限于本文所描述的实施例。相反地,提供这些实施例的目的是使对本发明的公开内容的理解更加透彻全面。

[0022] 除非另有定义,本文所使用的所有的技术和科学术语与属于本发明的技术领域的技术人员通常理解的含义相同。本文中在本发明的说明书中所使用的术语只是为了描述具体的实施例的目的,不是旨在于限制本发明。本文所使用的术语“和/或”包括一个或多个相关的所列项目的任意的和所有的组合。

[0023] 本发明一实施例的一种用于检测宫颈癌相关基因甲基化的检测试剂盒,包括用于检测FAM19A4基因甲基化的第一引物对和第一探针、用于检测EPB41L3基因甲基化的第二引物对和第二探针以及用于检测PAX1基因甲基化的第三引物对和第三探针。其中,第一引物对的核苷酸序列分别如SEQ ID NO.1和SEQ ID NO.2所示,第一探针的核苷酸序列如SEQ ID NO.3所示,第二引物对的核苷酸序列分别如SEQ ID NO.4和SEQ ID NO.5所示,第二探针的核苷酸序列如SEQ ID NO.6所示,第三引物对的核苷酸序列分别如SEQ ID NO.7和SEQ ID NO.8所示,第三探针的核苷酸序列如SEQ ID NO.9所示。

[0024] DNA甲基化是一种重要的表观修饰,它在不改变DNA序列的情况下,在CpG岛5'端胞嘧啶加上甲基基团,从而使该DNA的表达沉默,对基因表达模式以及基因组的稳定性起重要的调控作用。人类抑癌基因启动子的高甲基化,在许多肿瘤的发生、发展的各阶段均有其特异性的改变模式。研究发现,宿主抑癌基因甲基化水平随宫颈病变严重程度的增加而升高,因而DNA甲基化可以作为宫颈癌及癌前病变筛查的生物学标志物。但进一步研究发现,单独检测某一个基因甲基化指标,其对宫颈癌的灵敏度和特异性较低。而本发明的用于检测宫颈癌相关基因甲基化的检测试剂盒,从众多宫颈癌相关基因中筛选了三个与宫颈癌高度特异性相关的基因FAM19A4、EPB41L3和PAX1,并在此三个基因的启动子区各设计筛选得到一组特异性强且兼容性好的甲基化检测引物对和探针。通过使用上述三组引物对和探针去扩增经核酸提取和亚硫酸盐转化的待测DNA样本,然后根据荧光定量PCR扩增结果的相对荧光值即可确定待测样本中对应基因的甲基化检测结果,进而判断是否为宫颈癌及癌前病变。与常规试剂盒相比,本发明的检测试剂盒具有快速、方便、灵敏度高及特异性强的特点,对宫颈癌的早期诊断及预后判断起重要作用。

[0025] 在一个具体示例中,检测试剂盒还包括内参引物对和内参探针,内参引物对的核

核苷酸序列分别如SEQ ID NO.10和SEQ ID NO.11所示,内参探针的核苷酸序列如SEQ ID NO.12所示,具体可参见表1。

[0026] 表1

靶标	序列编码	名称	序列 (5'~3')
FAM19A4	SEQ ID No.1	正向引物	TTTTTTCGTAGGAGTTTC
	SEQ ID No.2	反向引物	CGAAACTAAATACTAATC
	SEQ ID No.3	第一探针	GCGTTTTTCGGGTTTCGGT
EPB41L3	SEQ ID No.4	正向引物	GTTTGTAGAATAATTAATTATGA
	SEQ ID No.5	反向引物	CTCCTAAAACTCGACCTC
	SEQ ID No.6	第二探针	GGATTAGATTCGGAATTTAAGTCG
PAX1	SEQ ID No.7	正向引物	ATTGTTGGGATAGAGTGGTG
	SEQ ID No.8	反向引物	AAACGCATAAATCCGAC
	SEQ ID No.9	第三探针	TTTCGTCGGTCGCGTTT
ACTB	SEQ ID No.10	正向引物	AAAAATAAATCCATATAAAAA
	SEQ ID No.11	反向引物	GGAGGAGTAGGTTTTATTG

	SEQ ID No.12	内参探针	ACTACTTATTCCAATTCACGATACAA
--	--------------	------	----------------------------

[0029] 在一个具体示例中,第一探针、第二探针和第三探针的5'端均连接有荧光报告基团,且第一探针、第二探针和第三探针的荧光报告基团互不相同,第一探针、第二探针和第三探针的3'端均连接有荧光淬灭基团。

[0030] 在一个具体示例中,荧光报告基团选自FAM、JOE、VIC、HEX、ROX、CY3或CY5,荧光淬灭基团选自BHQ、TAMRA或MGB。

[0031] 在一个具体示例中,第一探针的5'端连接有FAM基团,3'端连接有BHQ基团;第二探针的5'端连接有ROX基团,3'端连接有BHQ基团;第三探针的5'端连接有CY5基团,3'端连接有BHQ基团;内参探针的5'端连接有JOE基团,3'端连接有BHQ基团。

[0032] 在一个具体示例中,上述检测试剂盒还包括ddH₂O、PCR缓冲液、dNTPs、MgCl₂、UNG酶、Taq DNA聚合酶、阳性质控品和阴性质控品中的一种或多种,通过在反应体系里面增加UNG酶,可以有效地降低污染,提高准确性。可以理解,这些组分也可以单独销售或购买,阳性质控品即甲基化基因组DNA,阴性质控品即非甲基化基因组DNA。

[0033] 本发明一实施例的一种上述检测试剂盒的使用方法,包括以下步骤:

[0034] 使用上述第一引物对、第一探针、第二引物对、第二探针、第三引物对、第三探针与亚硫酸盐转化后的待测DNA样本配制PCR反应体系,然后进行荧光定量PCR反应。

[0035] 在一个具体示例中,荧光定量PCR反应的条件为:49℃~51℃UNG酶反应1min~3min;94℃~96℃变性4min~6min;94℃~96℃变性4s~6s,54℃~56℃退火延伸34s~36s并收集荧光信号,45个循环。

[0036] 在一个具体示例中,还包括分析荧光定量PCR数据的步骤,分析荧光定量PCR数据的方法包括以下步骤:分别获取PAX1基因的Ct值、FAM19A4基因的Ct值和EPB41L3基因的Ct

值与内参基因的Ct值之间的差值,根据差值判断对应基因的甲基化检测结果。

[0037] 具体地,根据差值判断对应基因的甲基化检测结果的方法为:当差值 ≤ 9 时,对应基因的甲基化检测结果为阳性,当差值大于9或未检出时,对应基因的甲基化检测结果为阴性。

[0038] 在一个具体示例中,上述亚硫酸盐转化步骤包括转化、结合、第一次洗涤、脱磺基、第二次洗涤、第三次洗涤、第四次洗涤、干燥以及洗脱等步骤。

[0039] 在一个具体示例中,PCR反应体系中,各引物的浓度均为180nM~220nM,各探针的浓度均为80nM~120nM,PCR反应体系的总体积为20 μ L~30 μ L,其中待测DNA样本的体积为4 μ L~6 μ L。

[0040] 在一个具体示例中,待测DNA样本选自人宫颈脱落细胞、阴道分泌物、尿液、宫颈组织、血浆、血清和血细胞中的一种或多种,优选为人宫颈脱落细胞。

[0041] 综上所述,本发明的检测试剂盒基于荧光PCR方法检测待测DNA样本中FAM19A4、EPB41L3和PAX1三个基因的甲基化,可对宫颈癌的早期诊断提供参考,具有检测速度快、步骤简单、灵敏度高、特异性强等优点。

[0042] 以下为具体实施例。

[0043] 实施例1

[0044] 本实施例的用于宫颈癌相关基因甲基化检测的检测试剂盒中,包括用于检测FAM19A4基因甲基化的第一引物对和第一探针、用于检测EPB41L3基因甲基化的第二引物对和第二探针、用于检测PAX1基因甲基化的第三引物对和第三探针以及用于检测内参基因ACTB的内参引物对和内参探针,由上海生工有限公司合成,具体如表1所示。

[0045] 第一探针5'端标记有荧光报告基团FAM,3'端标记有荧光淬灭基团BHQ;

[0046] 第二探针5'端标记有荧光报告基团ROX,3'端标记有荧光淬灭基团BHQ;

[0047] 第三探针5'端标记有荧光报告基团CY5,3'端标记有荧光淬灭基团BHQ;内参探针5'端标记有荧光报告基团JOE,3'端标记有荧光淬灭基团BHQ。

[0048] 实施例2

[0049] 本实施例的用于宫颈癌相关基因甲基化检测的检测试剂盒中,除了含有实施例1的引物对和探针,还包括PCR缓冲液、dNTPs、MgCl₂、UNG酶、Taq DNA聚合酶、ddH₂O、阳性质控品和阴性质控品,阳性质控品采用人甲基化基因组DNA,阴性质控品采用人非甲基化基因组DNA。

[0050] 实施例3

[0051] 一、材料、试剂、仪器

[0052] 本实施例中,甲基化检测采用实施例1的检测试剂盒,DNA提取试剂盒购自于QIAGEN公司,亚硫酸盐转化试剂盒购自于Zymo公司,PCR缓冲液、dNTPs、UNG酶和Taq DNA聚合酶购自于Takara公司,MgCl₂购自于Sigma公司,荧光定量PCR仪为ABI7500。

[0053] 二、样本准备

[0054] 阳性质控品采用人甲基化基因组DNA,阴性质控品采用人非甲基化基因组DNA,待测DNA样本为1例宫颈癌患者的宫颈脱落细胞和1例正常健康人的宫颈脱落细胞。

[0055] 三、DNA提取

[0056] 1.在1.5mL离心管中加入0.1mL待测DNA样本,然后依次加入10 μ L蛋白酶K溶液、

0.1mL裂解液和10μL磁珠，涡旋混匀，把离心管在56℃中放置10分钟；

[0057] 2.将离心管放置在磁力架中进行磁吸2min，吸走全部弃液，加入0.5mL洗液A，混匀确保磁珠彻底重悬，将悬浮磁珠移至到1.5mL的离心管中；

[0058] 3.将离心管放置在磁力架中进行磁吸2min，吸走全部弃液，加入0.5mL洗液B，混匀确保磁珠彻底重悬；

[0059] 4.将离心管放置在磁力架中进行磁吸2min，吸走全部弃液，加入0.5mL洗液C，混匀确保磁珠彻底重悬；

[0060] 5.将离心管放置在磁力架中进行磁吸2min，吸走全部弃液，用10μL~100μL枪头尽量除去残余液体，将离心管移至无磁性试管架上，打开管盖，室温干燥2分钟；

[0061] 6.加入50μL洗脱液，盖紧管盖涡旋混匀重悬磁珠，把离心管于56℃中孵育3分钟；

[0062] 7.将离心管放置在磁力架中进行磁吸2min，将全部洗脱液移至新的0.2mL PCR管中。

[0063] 四、亚硫酸盐转化

[0064] 1.在20μL DNA的0.2mL PCR管中加入120μL亚硫酸盐溶液，盖紧离心管后，涡旋混匀后短暂离心，将离心管置于普通PCR仪中进行反应，反应条件设置为95℃10分钟、60℃60分钟；

[0065] 2.将反应结束后的DNA溶液转移到新的1.5mL离心管中，加入600μL结合液和10μL磁珠涡旋混匀，室温静置5分钟；

[0066] 3.将离心管放置在磁力架中进行磁吸2min，吸走全部弃液，加入400μL洗液B，涡旋混匀确保磁珠彻底重悬；

[0067] 4.将离心管放置在磁力架中进行磁吸2min，吸走全部弃液，加入200μL脱碘液，涡旋混匀确保磁珠彻底重悬，室温静置15分钟；

[0068] 5.将离心管放置在磁力架中进行磁吸2min，吸走全部弃液，加入400μL洗液B，涡旋混匀确保磁珠彻底重悬；

[0069] 6.将离心管放置在磁力架中进行磁吸2min，吸走全部弃液，加入400μL洗液B，涡旋混匀确保磁珠彻底重悬；

[0070] 7.将离心管放置在磁力架中进行磁吸2min，吸走全部弃液，用10μL~100μL枪头尽量除去残余液体，将离心管移至无磁性试管架上，打开管盖，室温干燥2分钟；

[0071] 8.加入50μL洗脱液，盖紧管盖涡旋混匀重悬磁珠，把离心管于56℃中孵育4分钟；

[0072] 9.将离心管放置在磁力架中进行磁吸2min，将全部洗脱液移至新的1.5mL PCR管中备用。

[0073] 五、PCR流程

[0074] 1、PCR反应液的配制

[0075] 根据实验数量，按下表所示配制PCR反应液：

[0076]	单个 PCR 反应的组份		单个 PCR 反应的量	
	SEQ ID No.1 (10 μ M)		0.5 μ L	
	SEQ ID No.2 (10 μ M)		0.5 μ L	
	SEQ ID No.3 (10 μ M)		0.25 μ L	
	SEQ ID No.4 (10 μ M)		0.5 μ L	
	SEQ ID No.5 (10 μ M)		0.5 μ L	
	SEQ ID No.6 (10 μ M)		0.25 μ L	
	SEQ ID No.7 (10 μ M)		0.5 μ L	
	SEQ ID No.8 (10 μ M)		0.5 μ L	
	SEQ ID No.9 (10 μ M)		0.25 μ L	
	SEQ ID No.10 (10 μ M)		0.5 μ L	
	SEQ ID No.11 (10 μ M)		0.5 μ L	
	SEQ ID No.12 (10 μ M)		0.25 μ L	
	UNG 酶 (1U/ μ L)		0.1 μ L	
	TaqDNA 聚合酶 (5U/ μ L)		0.4 μ L	
	dNTP (10mM)		0.5 μ L	
	MgCl ₂ (25mM)		4 μ L	
	PCR 缓冲液 (10*)		5 μ L	
[0077]	ddH ₂ O		5 μ L	
	Total		20 μ L	

[0078] 2. 加样

[0079] 在准备好的PCR反应管中分别加入20 μ L的PCR反应液和5 μ L待测DNA样本,盖紧管盖后,瞬时低速离心。阴性质控品和阳性质控品的加样与待测DNA样本相同。

[0080] 3. 荧光定量PCR检测

[0081] 1) 荧光通道选择:每个样本选择FAM、JOE、ROX和CY5共4个通道。参比荧光 (Passive Reference) 设置为none;

[0082] 2) 反应条件设定如下表 (反应体积设定为25 μ L):

[0083]	步骤		温度 (°C)	时间 (秒)	循环数 (次)
	Stage 1	UNG 酶反应	50	120	1
	Stage 2	预变性	95	300	1
	Stage 3	变性	95	5	45
		退火、延伸及检测荧光	55	35	

[0084] 六、结果分析

[0085] 1. PCR结果分析

[0086] 反应结束后自动保存结果,使用仪器配套软件自动分析结果,如果PCR扩增中FAM19A4、EPB41L3和PAX1三个基因中的任一基因有扩增曲线,则计算其对应的 Δ Ct值, Δ Ct值为所检基因的Ct值与内参基因ACTB的Ct值之间的差值,差值的大小反映所检基因与内参基因之间的相对定量。

[0087] 2. 检测结果判定

[0088] 以FAM19A4、EPB41L3和PAX1基因对应的三个 ΔCt 值中最小的 ΔCt 值作为判断标准,当 $\Delta Ct \leq 9.0$ 时结果为阳性,说明具有宫颈癌风险高;当 $\Delta Ct > 9.0$ 或N.D.时结果为阴性,说明具有宫颈癌风险低,其中N.D.为“Not Detected”的缩写,意思是“未检出”。

[0089] 3. 检测结果

[0090] FAM19A4、EPB41L3和PAX1基因甲基化在正常样本中均未检出,结果为阴性,在宫颈癌样本中均检出,结果为阳性。结果见下表所示:

样本	检测项目	Ct 值	ΔCt 值	判断结果
阳性质控品	FAM19A4	32.1	2.1	阳性
	EPB41L3	32.3	2.3	
	PAX1	31.9	1.9	
	ACTB	30.0	/	
阴性质控品	FAM19A4	N.D.	N.D.	阴性
	EPB41L3	N.D.	N.D.	
	PAX1	N.D.	N.D.	
	ACTB	30.0	/	
健康人样本	FAM19A4	N.D.	N.D.	阴性
	EPB41L3	N.D.	N.D.	
	PAX1	N.D.	N.D.	
	ACTB	28.2	/	
宫颈癌样本	FAM19A4	29.8	2.2	阳性
	EPB41L3	29.9	2.3	
	PAX1	30.7	3.1	
	ACTB	27.6	/	

[0092] 实施例4

[0093] 本实施例采用实施例1的检测试剂盒进行特异性试验、灵敏性试验以及临床样本的检测。各实验结果如下所示:

[0094] 1. 特异性试验结果:采用实施例1的检测试剂盒对健康人样本和空白样本进行检测,结果如图1所示,内参蛋白ACTB具有扩增曲线,FAM19A4、EPB41L3和PAX1三个基因无扩增曲线,表明实施例1的检测试剂盒对宫颈癌具有较好的特异性,对正常样本和空白对照等均无交叉反应。

[0095] 2. 灵敏性试验结果:对FAM19A4、EPB41L3和PAX1三个甲基化基因,使用质粒样本按照 $10^5 \text{copies}/\mu\text{L}$ 、 $10^4 \text{copies}/\mu\text{L}$ 、 $10^3 \text{copies}/\mu\text{L}$ 、 $10^2 \text{copies}/\mu\text{L}$ 、 $10^1 \text{copies}/\mu\text{L}$ 的质粒浓度进行扩增,结果如图2~4所示,图中从高到低浓度的扩增曲线依次表示采用实施例1的检测试剂盒对 $10^5 \text{copies}/\mu\text{L}$ 、 $10^4 \text{copies}/\mu\text{L}$ 、 $10^3 \text{copies}/\mu\text{L}$ 、 $10^2 \text{copies}/\mu\text{L}$ 、 $10^1 \text{copies}/\mu\text{L}$ 质粒浓度进行扩增检测的结果,表明实施例1的检测试剂盒的检测敏感性达到 $10^1 \text{copies}/\mu\text{L}$ 。

[0096] 3. 临床样本的检测结果:在100例健康人样本中检出1例,在58例CIN I样本中检出2例;在26例宫颈癌患者样本中检出26例,在78例CIN II 及CIN III样本中检出71例。具体结果如下表所示,表明实施例1的检测试剂盒的灵敏度和特异性均高于单一基因甲基化检测。

样本类型	实施例 1 检测试剂盒		单独 FAM19A4 检测结果		单独 EPB41L3 检测结果		单独 PAX1 检测结果	
	阳性	阴性	阳性	阴性	阳性	阴性	阳性	阴性
[0097] 宫颈癌 (26 例)	26	0	17	9	22	4	20	6
CIN III (33 例)	31	2	20	11	25	8	26	7
CIN II (45 例)	40	5	32	13	36	9	33	12
CIN I (58 例)	2	56	2	56	2	56	2	56
健康人 (100 例)	1	99	1	99	1	99	1	99

[0098] 由上述实施例可知,本发明的用于检测宫颈癌相关基因甲基化的检测试剂盒适用于样本中FAM19A4、EPB41L3和PAX1三个基因的甲基化检测,可以为宫颈癌的早期诊断提供参考。与常规的试剂盒相比,本发明的检测试剂盒具有高灵敏度、高特异性,可以对人宫颈癌进行早期无创诊断。

[0099] 对比例1

[0100] 本对比例针对宫颈癌相关基因PAX1、FAM19A4、PHACTR3和DAPK进行甲基化检测,根据以下序列制备试剂盒,使用质粒样本按照 $10^5\text{copies}/\mu\text{L}$ 、 $10^4\text{copies}/\mu\text{L}$ 、 $10^3\text{copies}/\mu\text{L}$ 、 $10^2\text{copies}/\mu\text{L}$ 、 $10^1\text{copies}/\mu\text{L}$ 的质粒浓度进行扩增,其仅能扩增 $10^5\text{copies}/\mu\text{L}$ 和 $10^4\text{copies}/\mu\text{L}$ 样本,表明其检测敏感性为 $10^4\text{copies}/\mu\text{L}$ 。且该试剂盒经临床样本测试,仅在宫颈癌样本中有扩增阳性结果,在癌前病变CIN III和CIN II中均无扩增,说明该试剂盒无法检测宫颈癌前病变,临床灵敏度低。

[0101] 针对PAX1的引物和检测探针:

[0102] PAX1-F: 5' -TTAGGGGGTAGTTGAGTAAGTT-3'

[0103] PAX1-R: 5' -AAAATAACCTATAAATCCCCAAACAA-3'

[0104] PAX1-M: 5' -AAATAAAACGCGACGCATTAT-3'

[0105] PAX1-U: 5' -AAATAAAACACAACACATTATAACCC-3'

[0106] 针对FAM19A4的引物和检测探针:

[0107] FAM19A4-F: 5' -TTTTAGTAGTAGTTTTAGGTTTT-3'

[0108] FAM19A4-R: 5' -ATCCCTTCCAACCCTTCTTA-3'

[0109] FAM19A4-M: 5' -CCGTACCGCCTCCCCGCGAAAA-3'

[0110] FAM19A4-U: 5' -CCATACCACCTCCCCACAAAA-3'

[0111] 针对PHACTR3的引物和检测探针:

[0112] PHACTR3-F: 5' -GTTGGGGGAAGAGAGGTAGATT-3'

[0113] PHACTR3-R: 5' -CTTCCAAAAACAAATACCCAAAC-3'

[0114] PHACTR3-M: 5' -AACCCAAAACCGACGCTAAACGA-3'

[0115] PHACTR3-U: 5' -AATAACCCAAAACCAACTAAAC-3'

[0116] 针对DAPK的引物和检测探针:

[0117] DAPK-F: 5' -TTTTGGAGGTGGGAAAGTTG-3'

[0118] DAPK-R: 5' -AAAAACACCCTTTATTAATAACTAAAC-3'

[0119] DAPK-M: 5' -ACCCCGCGCGCGGTAAA-3'

[0120] DAPK-U: 5' -ACCCCTCAACCCACACACACAT-3'

[0121] 以上所述实施例的各技术特征可以进行任意的组合,为使描述简洁,未对上述实

施例中的各个技术特征所有可能的组合都进行描述,然而,只要这些技术特征的组合不存在矛盾,都应当认为是本说明书记载的范围。

[0122] 以上所述实施例仅表达了本发明的几种实施方式,其描述较为具体和详细,但不能因此而理解为对发明专利范围的限制。应当指出的是,对于本领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明构思的前提下,还可以做出若干变形和改进,这些都属于本发明的保护范围。因此,本发明专利的保护范围应以所附权利要求为准。

序列表

<110> 广州滴纳生物科技有限公司

<120> 用于检测宫颈癌相关基因甲基化的检测试剂盒及其使用方法

<160> 12

<170> SIP0SequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 1

tttttttcgta ggagtttc 18

<210> 2

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 2

cgaaactaaa tactaatc 18

<210> 3

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 3

gcgttttcgg gtttcggt 18

<210> 4

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 4

gtttgtagaa taattaatta tga 23

<210> 5

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 5

ctcctaaaac tcgacctc 18

<210> 6

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 6
ggattagatt cggaatttaa gtcg 24
<210> 7
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 7
atttgggata gagtggtg 18
<210> 8
<211> 17
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 8
aaacgcataa atccgac 17
<210> 9
<211> 17
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 9
tttcgtcggc cgcgttt 17
<210> 10
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 10
aaaaataaat ccatataaaa a 21
<210> 11
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 11
ggaggagtag gttttattg 19
<210> 12
<211> 26
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 12
actacttatt ccaattcacg atacaa 26

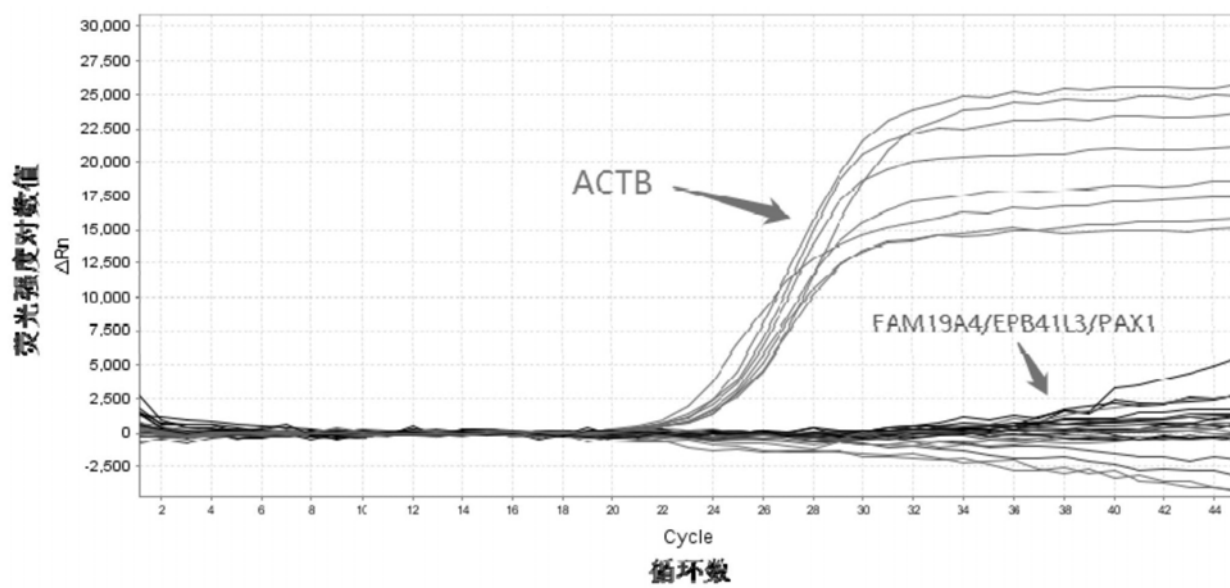


图1

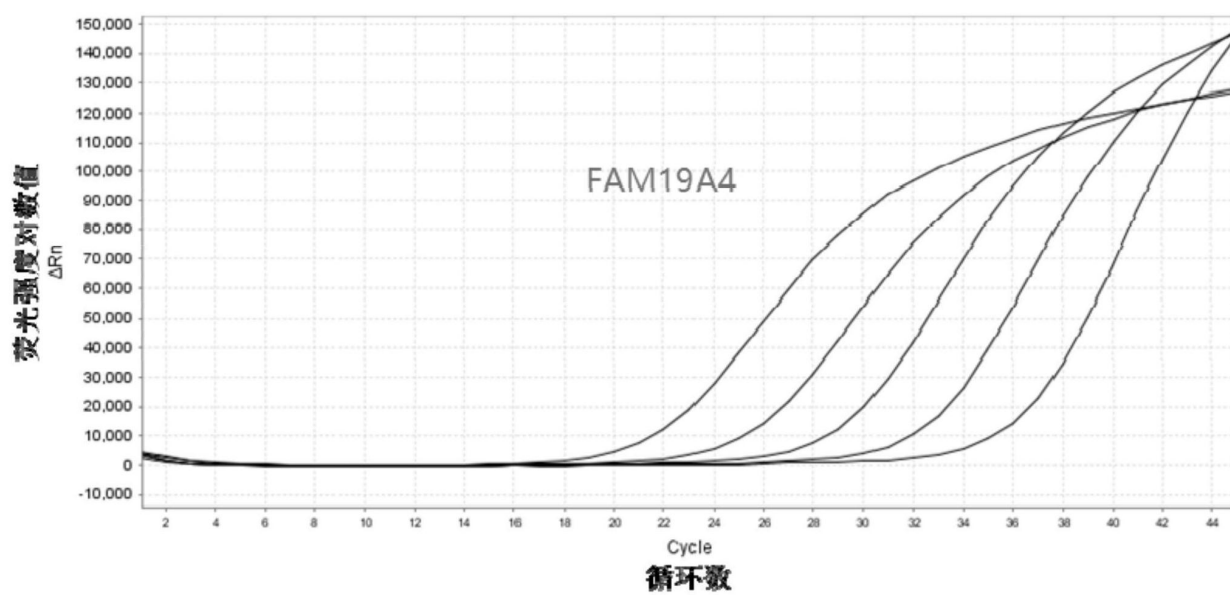


图2

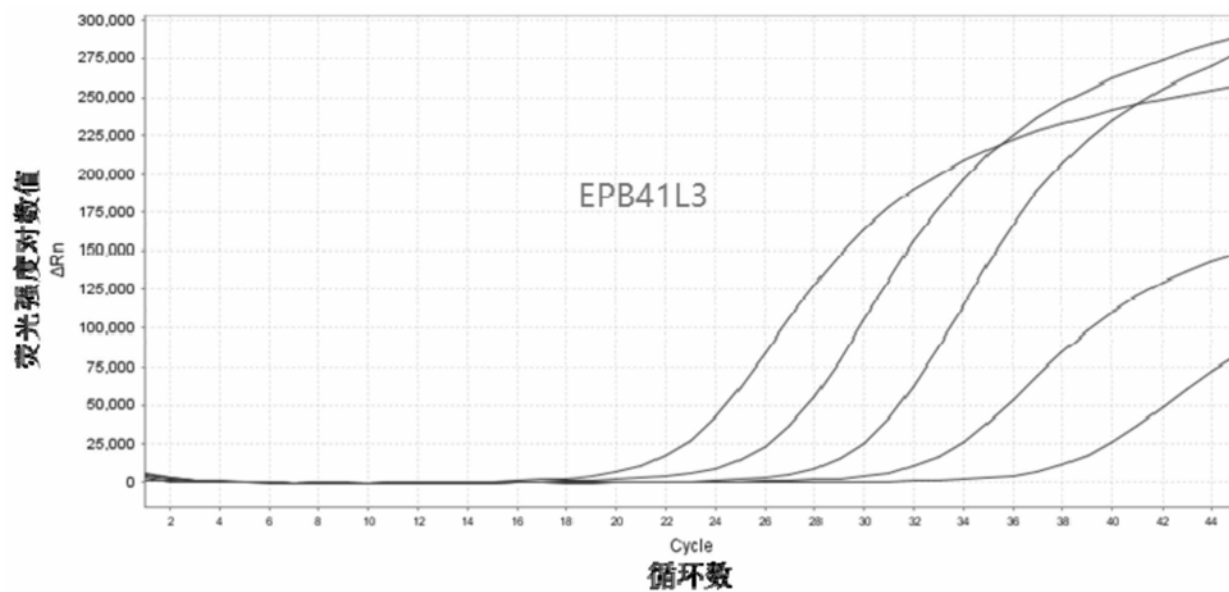


图3

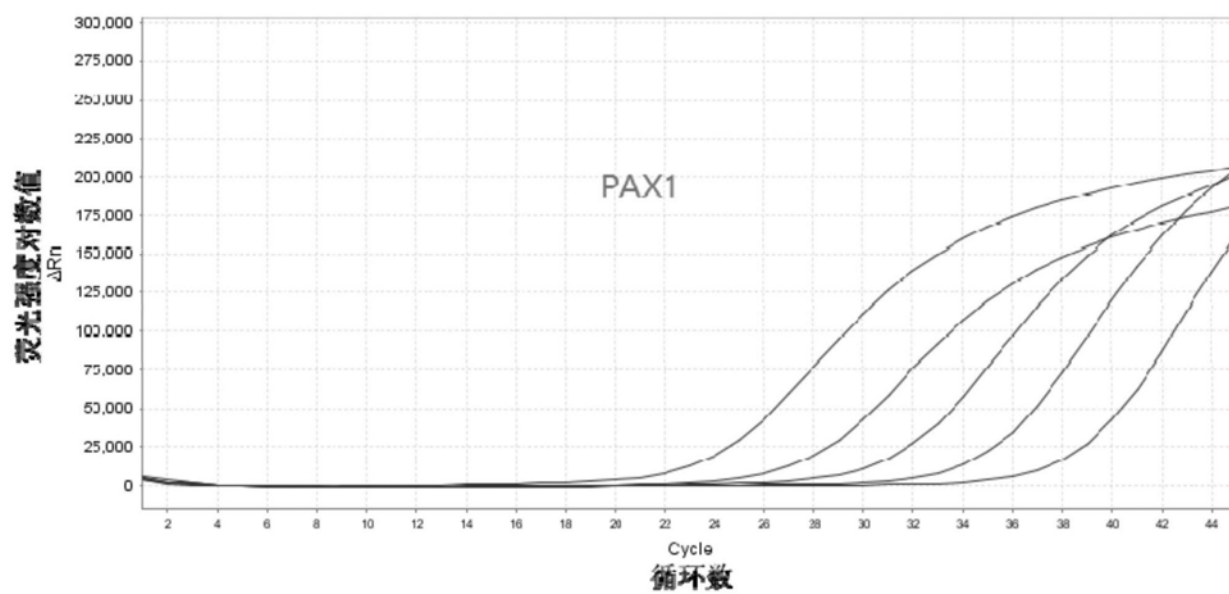


图4