



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102051408 B

(45) 授权公告日 2012. 07. 04

(21) 申请号 200910193654. X

应用进展. 《中华检验医学杂志》. 2002, 第 25 卷
(第 2 期), 71-72.

(22) 申请日 2009. 11. 04

审查员 孙谦

(73) 专利权人 高新

地址 510630 广东省广州市天河路 600 号中
山大学附属第三医院

(72) 发明人 高新 庞俊 刘伟鹏

(74) 专利代理机构 广州三环专利代理有限公司
44202

代理人 戴建波

(51) Int. Cl.

C12Q 1/68 (2006. 01)

C12N 15/11 (2006. 01)

(56) 对比文件

US 20050221329 A1, 2005. 10. 06, 全文.

US 20090241205 A1, 2009. 09. 24, 全文.

邹雄. 肿瘤标志在肿瘤早期诊断中的研究与

权利要求书 1 页 说明书 8 页 附图 1 页

(54) 发明名称

用于前列腺癌转移早期诊断的试剂盒

(57) 摘要

本发明提供用于前列腺癌转移早期诊断的两对引物对: 第一引物对具有 SEQ ID NO :1、SEQ ID NO :2 所示的序列, 第二引物对具有 SEQ ID NO :3、SEQ ID NO :4 所示的序列。本发明还提供一种用于前列腺癌转移早期诊断的试剂盒, 包含上述的两对引物对。该试剂盒还可包含具有 SEQ ID NO :5、SEQ ID NO :6 所示的序列的引物对, 用于巢式 PCR 扩增。本发明通过甲基化特异性聚合酶链式反应来检测前列腺癌组织中脑衰蛋白反应调节蛋白 -4 基因启动子区的甲基化状况来判定有无前列腺癌的转移。该方法利用分子生物学原理, 具有很高的特异性和准确率, 可以在早期明确诊断出前列腺癌的微小转移。

1. 用于前列腺癌转移早期诊断的两对引物对,其特征在于,第一引物对具有 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2 所示的序列,第二引物对具有 SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4 所示的序列,并通过其甲基化特异性聚合酶链式反应,来检测前列腺癌组织中脑衰蛋白反应调节蛋白-4 基因启动子区的甲基化状况,以判定有无前列腺癌的转移。

2. 一种用于前列腺癌转移早期诊断的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒包含 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2 的第一引物对和 SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4 的第二引物对,并通过其甲基化特异性聚合酶链式反应,来检测前列腺癌组织中脑衰蛋白反应调节蛋白-4 基因启动子区的甲基化状况,以判定有无前列腺癌的转移。

3. 如权利要求 2 所述的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒还包含 SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6 的外引物对。

4. 如权利要求 2 或 3 所述的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒还包含 PCR 反应液。

5. 如权利要求 2 或 3 所述的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒还包含基因组 DNA 提取试剂。

用于前列腺癌转移早期诊断的试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及用于前列腺癌转移的诊断试剂盒,特别是用于前列腺癌转移早期诊断的试剂盒。

背景技术

[0002] 前列腺癌在西方许多国家是男性最常见的恶性肿瘤。在美国,前列腺癌更是占男性癌症死亡原因的第二位。近年来,我国的前列腺癌发病率有明显增加,前列腺癌已成为泌尿外科领域一个越来越重要的课题。前列腺癌的治疗方案的选择主要根据患者年龄、一般状况、肿瘤分期及分级具体而定,也就是说在确定治疗方案之前必须首先明确患者及肿瘤的具体情况。肿瘤具体情况明确依靠于正确的诊断。目前前列腺癌的诊断主要有以下几种方法:

[0003] (1) 直肠指诊:在体格检查中,直肠指诊是发现、诊断前列腺癌的最有帮助的第一线检查,但是直肠指诊是一种非特异性的检查,发现前列腺癌时常常病理分级已达恶性程度较高的级别,也即到了前列腺癌的晚期。

[0004] (2) 前列腺特异性抗原测定:前列腺特异性抗原是一种蛋白酶,通常只在前列腺液和精液测得,如果在血液中测得前列腺特异性抗原存在,往往可作为患者发生良性或恶性前列腺病变的标志。前列腺特异性抗原作为单一检查,目前具有较好的前列腺癌阳性诊断预测率,同样,它也帮助提高了许多小病灶、低分级前列腺癌的发现率与诊断率。但是,有近 30% 前列腺癌患者的血清前列腺特异性抗原可能不升高,只在正常范围内(即前列腺特异性抗原 $< 4.0 \text{ ng/ml}$) 波动。即使直肠指诊呈阴性、血清前列腺特异性抗原 $< 4.0 \text{ ng/ml}$ 的患者,仍有 30% 的前列腺穿刺发现前列腺癌的可能性。

[0005] (3) 经直肠超声检查与前列腺穿刺活检:经直肠超声检查是诊断前列腺癌的一种非常有价值的手段,它可帮助医师检查患者的前列腺以及周围组织结构寻找可疑病灶,并能初步判断肿瘤的体积大小。此外,它还能帮助引导医师进行前列腺可触及或不可触及的病变的穿刺活检。而即便在超声引导下,系统的前列腺六点穿刺的假阳性率仍可高达 23%~42%。经直肠超声检查在前列腺癌诊断特异性方面也较低,发现一个前列腺低回声病灶要与多种疾病相鉴别。

[0006] (4) 其它影像学检查:(a) 计算机断层扫描(CT)检查:由于 CT 检查不能显示正常前列腺的三个带(外周带、中央带和移行带),加之多数肿瘤组织的密度与正常腺体近似或相同,因此 CT 不能用来诊断早期前列腺癌及前列腺癌的早期转移;(b) 磁共振扫描(MRI):磁共振有很好的软组织分辨率,能直接多方向平面(三维)成像,因此, MRI 对前列腺的检查优于其它影像学方法。但经腹部 MRI 仅可发现 60% 的前列腺癌,只可对 57% 的前列腺癌患者进行准确的临床分期,同时对前列腺癌的早期转移的诊断阳性率仍然较低。

[0007] 综上所述,目前对前列腺癌的诊断,尤其是前列腺癌早期转移的诊断,仍然没有比较有效的方法。目前所使用的帮助进行前列腺癌临床分期的方法,都存在着不能鉴别该肿瘤究竟是早期的器官局限肿瘤还是已经发生微转移的局部晚期癌的不足。而这种鉴别诊断

对于患者的预后非常重要,因为如已发展为局部晚期癌,手术治愈的可能性就微乎其微了。据《吴阶平泌尿外科学》上卷第五十章《前列腺肿瘤》指出:在术前诊断为器官局限性肿瘤的患者中有将近50%术后病理证实为局部晚期癌。如能术前明确前列腺癌患者所患为器官局限肿瘤或是局部晚期癌,从而选择合适的治疗方案,将极大裨益于治疗效果提高及患者生活质量的改善。

[0008] 因此有必要提供一种新的前列腺癌的诊断方法,尤其是前列腺癌早期转移的诊断方法来克服现有技术中存在的缺陷。

发明内容

[0009] 为了克服现有检查手段不能早期诊断前列腺癌转移的不足,本发明的目的之一在于提供一种前列腺癌转移早期诊断的方法,该方法利用分子生物学原理,能够明确诊断出前列腺癌的转移,更重要的是对前列腺癌的微小转移也能早期明确诊断。

[0010] 本发明的另一目的在于提供一种用于前列腺癌转移早期诊断的试剂盒,该试剂盒可以明确诊断出前列腺癌的微小转移,准确率非常高。

[0011] 为实现上述目的,本发明一方面提供一种前列腺癌转移早期诊断的方法,该方法包括:(a)提取前列腺癌组织的基因组DNA;(b)分别利用SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2所示的M引物对和SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4所示的U引物对,使用甲基化特异性聚合酶链式反应(Methylation specific PCR, MSP)进行PCR扩增;(c)对上述PCR扩增的产物进行电泳;(d)根据特异性条带的有无来判断是否发生转移。

[0012] 在本发明的另一个实施方式中,在步骤(b)之前还使用SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:6所示的外引物对来扩增所述基因组DNA,随后再进行步骤(b),即采用巢式PCR对基因组DNA进行扩增,以增加本发明方法的灵敏度,使结果更加稳定可靠。

[0013] 另一方面,本发明提供一种用于前列腺癌转移早期诊断的试剂盒,其包含SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2所示的M引物对;和SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4所示的U引物对。在优选的实施方式中,所述试剂盒还包括SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:6所示的外引物对。在实际应用中,本发明的试剂盒还包含PCR反应液、基因组DNA提取试剂中的一种或多种,以方便操作。所述PCR反应液具有广泛的涵义,通常包含PCR反应体系中除引物对以外的其他组分,例如dNTP、PCR缓冲液、聚合酶等;所述基因组DNA提取试剂具有广泛的含义,通常包含提取基因组DNA所需的各种试剂,例如苯酚、氯仿、异丙醇等。

[0014] 本发明通过甲基化特异性聚合酶链式反应来检测前列腺癌组织中脑衰蛋白反应调节蛋白-4(Collapsin response mediator protein-4, CRMP4)基因启动子区的甲基化状况来判定有无前列腺癌的转移。该方法利用分子生物学原理,具有很高的特异性和准确率,可以在早期明确诊断出前列腺癌的微小转移。

附图说明

[0015] 图1是显示经本发明的方法对各样本处理后的PCR产物的电泳结果图。

具体实施方式

[0016] 以下将结合实验和附图对本发明作详细描述。

[0017] 发明原理

[0018] 脱氧核糖核酸 (DNA) 甲基化是指 DNA 分子上 CpG 双核苷酸中的胞嘧啶 (C) 处于甲基化状态, 即一个甲基团以共价键的形式结合到 CpG 双核苷酸上胞嘧啶的 5- 碳原子上, 形成 5- 甲基胞嘧啶。在基因组转录区, CpG 相互聚集, 称之为 CpG 岛 (CpG islands)。CpG 岛一般长 0.5 ~ 2.0kb, 常位于 5' 端基因启动子区。在正常细胞中, 大多数管家基因的 5' CpG 岛处于非甲基化状态; 而在肿瘤细胞中, 许多基因的 CpG 岛则表现为异常的高甲基化。DNA 甲基化并不改变核苷酸的序列, 而是通过改变染色体结构和组蛋白乙酰化作用的水平等, 从而间接导致基因转录抑制, 也就是使其表达下调。

[0019] CRMP4 基因作为 CRMP 家族的一个成员, 是参与神经元分化和突触重组调控的重要分子。但研究发现, CRMP4 在前列腺癌中是抑制前列腺癌转移的抑癌基因, 其在转移性前列腺癌中的表达较良性前列腺增生及局限性前列腺癌明显下调, 表达下调的原因之一是因为 CRMP4 启动子区存在着明显的高甲基化状态。因而, 检测 CRMP4 启动子区的甲基化状态的高低就可以明确前列腺癌有无转移, 即 CRMP4 启动子区高甲基化提示前列腺癌有转移, CRMP4 启动子区低或无甲基化提示前列腺癌没有转移。影响 CRMP4 基因表达的 CpG 位点, 关键的有以下 10 个: -848、-841、-690、-680、-678、-674、-671、-665、-660、-658。因此, 检测这 10 个位点甲基化的程度即可判断前列腺癌是否发生转移, 检测方法即为 MSP 法。

[0020] MSP 的原理: 双链 DNA 变性解链后, 在亚硫酸氢盐 (HSO_3^-) 作用下发生胞嘧啶 (C) → 尿嘧啶 (U) 转化, C 若已有甲基化则无此改变。但是, 甲基化修饰只发生于 5' → 3' 方向 C-G (胞嘧啶 - 鸟嘌呤) 相联结构的 C 上。因此, 在 HSO_3^- 作用后, DNA CpG 位点若无甲基化, 则序列中的改变为 C → U, CG → UG; 若有甲基化则为 C → C, CG → CG。因而用不同的引物做 PCR, 即可检测出这种差异, 从而确定基因有无 CpG 岛甲基化。根据目的基因修饰前后的改变, 相应设计 M (甲基化) 和 U (非甲基化) 引物, 如果 M 引物可以扩增, 则判定存在甲基化; 如果 U 引物可以扩增, 则判定为非甲基化; 如果 M 和 U 引物同时得到扩增, 则判定这些 CpG 位点同时存在甲基化和非甲基化两种状态。

[0021] 将扩增的产物进行电泳, 即可判断相应引物 (M 引物和 U 引物) 是否扩增得到特异性片段, 根据片段的有无来判断对应基因是否存在甲基化。存在甲基化者, 可以判定前列腺癌已发生转移。

[0022] 实施例

[0023] 一、引物

[0024] 在本发明的实施例中, 根据上述原理设计出的引物如下:

[0025] M 引物对 (SEQ ID NO:1 和 SEQ ID NO:2):

[0026] 正义引物: TTTTGTAGTTTTTGAGAGCGAGTTAC;

[0027] 反义引物: CTCTACCATAACGCGAATCGAATACGACG;

[0028] 扩增得到的片断为 222bp。

[0029] U 引物对 (SEQ ID NO:3 和 SEQ ID NO:4):

[0030] 正义引物: GTTTTTGTAGTTTTTGAGAGTGAGTTAT;

[0031] 反义引物: CTCTCCTCTACCATAACACAAATCAAATACAACA;

[0032] 扩增得到的片断为 226bp。

[0033] 外引物对 (SEQ ID NO:5 和 SEQ ID NO:6)

[0034] 正义引物: TGATTTTGAGATTTAGTTAGGTAGTG;

[0035] 反义引物: TTTCCTCTTTACATCTACCTCAC;

[0036] 扩增得到的片断为 612bp。

[0037] 二、方法步骤

[0038] 1. 基因组 DNA 的提取

[0039] 在本发明中, 基因组 DNA 的提取使用酚氯仿法, 当然本领域的技术人员可以预期到, 也可以使用本领域已知的其他方法来提取基因组 DNA。另外, 该实施例中所使用的试剂和试剂的量仅是示例性的, 本领域技术人员可根据实际情况作相应调整。如不特别指出, 所用双蒸水 (DDW)、EP 管均经高压蒸汽灭菌。

[0040] 1) 取新鲜或冰冻前列腺癌组织块 0.1g, 尽量剪碎后置于玻璃匀浆器中, 加入 1ml 的细胞裂解缓冲液匀浆至不见组织块, 转入 1.5ml 离心管中, 加入蛋白酶 K (500 μ g/ml) 20 μ l, 混匀。在 65℃ 恒温水浴锅中水浴 30min, 也可转入 37℃ 水浴 12 ~ 24h, 间歇振荡离心管数次。于台式离心机以 12000rpm 离心 5min, 取上清液入另一离心管中;

[0041] 2) 加 2 倍体积异丙醇, 倒转混匀后, 可以看见丝状物, 用 100 μ l 吸头挑出, 晾干, 用 200 μ l TE 重新溶解;

[0042] 3) 加等量的酚、氯仿、异戊醇振荡混匀, 离心 12000rpm, 5min;

[0043] 4) 取上层溶液至另一管, 加入等体积的氯仿: 异戊醇, 振荡混匀, 离心 12000rpm, 5min;

[0044] 5) 取上层溶液至另一管, 加入 1/2 体积的 7.5mol/L 乙酸氨, 再加入 2 倍体积的无水乙醇, 混匀后室温沉淀 2min, 离心 12000rpm, 10min;

[0045] 6) 小心倒掉上清液, 将离心管倒置于吸水纸上, 将附于管壁的残液除掉;

[0046] 7) 用 1ml 70% 乙醇洗涤沉淀物 1 次, 离心 12000rpm, 5min;

[0047] 8) 小心倒掉上清液, 将离心管倒置于吸水纸上, 将附于管壁的残余液滴除掉, 室温干燥;

[0048] 9) 加 200 μ l TE 重新溶解沉淀物, 然后置于 -20℃ 保存备用。

[0049] 2. 亚硫酸氢钠修饰基因组 DNA

[0050] 1) 将约 2 μ g DNA 于 1.5ml EP 管中使用 DDW 稀释至 50 μ l;

[0051] 2) 加 5.5 μ l 新鲜配制的 3M NaOH;

[0052] 3) 42℃ 水浴 30min;

[0053] 4) 加 30 μ l 10mM 对苯二酚 (氢醌) 至上述水浴后混合液中 (溶液变成淡黄色);

[0054] 5) 加 520 μ l 3.6M 亚硫酸氢钠 (配制方法例如: 1.88g 亚硫酸氢钠使用 DDW 稀释, 并以 3M NaOH 滴定溶液至 pH5.0 (要准确), 最终体积为 5ml; 大浓度的亚硫酸氢钠很难溶, 但加入 NaOH 后会慢慢溶解) 至上述水浴后溶液中;

[0055] 6) EP 管外裹以铝箔纸 (避光), 轻柔颠倒混匀溶液;

[0056] 7) 加 200 μ l 石蜡油 (防止水分蒸发, 限制氧化), 并在 50℃ 避光水浴 16h。

[0057] 3. 修饰后 DNA 的纯化回收

[0058] 根据本发明, 可使用本领域已知的任何合适的方法来纯化回收修饰后的 DNA, 例如可使用市售的合适的回收试剂盒来完成该步骤。以下是使用市售的 Promega Wizard Cleanup DNA 纯化回收系统 (Promega, A7280) 进行修饰后 DNA 纯化回收的一个例子, 具体

步骤如下。

[0059] 1) 将移液器枪头伸入石蜡油层下,先轻轻加压使其中一小段石蜡油排出,然后吸取混合液至一洁净 1.5mlEP 管中;

[0060] 2) 以下使用 Promega A7280 DNA 纯化回收系统

[0061] a) 70℃水浴预热 DDW ;配制 80%异丙醇;

[0062] b) 加 1ml Promega Wizard DNA Clean-up 树脂,轻柔颠倒混匀,使 DNA 充分与树脂结合;

[0063] c) 将注射器针筒与试剂盒提供的回收小柱紧密连接后,将上述混合物用移液器移至针筒内,用 2ml 以上的 EP 管放置小柱下接收废液。加针栓,轻轻加压,将液体挤出,此时可见小柱内有白色的树脂沉积;

[0064] d) 将注射器与小柱分离后拔出针栓,再将针筒与小柱连接,向针筒内加入 2ml 80%的异丙醇,插入针栓,轻轻加压,将异丙醇挤出;

[0065] e) 将注射器与小柱分离,将小柱置于洁净 1.5ml 洁净 EP 管上,离心 12000rpm, 2min,以甩去残余异丙醇成分,使树脂干燥(此时,修饰后 DNA 处于与树脂结合的状态);

[0066] f) 将小柱取下置于另一洁净 1.5mlEP 管上,移液器加 50ul 预热好的 DDW,室温放置 5min ;离心 12000rpm, 20s (此为洗脱步骤),此时 EP 管内液体即为洗脱的修饰后 DNA 溶液,终体积为 50ul ;

[0067] 3) 加 5.5 μ l 新鲜配制的 3M NaOH,室温放置 15min ;

[0068] 4) 加 33 μ l 10M 乙酸铵,以中和 NaOH,使溶液 pH 于 7.0 左右。

[0069] 5) 加 4 μ l 10mg/ml 糖原(作为沉淀指示剂);

[0070] 6) 加 270 μ l 冰无水乙醇,置于 -20 度,过夜沉淀;

[0071] 7) 4℃, 12000rpm 离心, 30min, 倒去上清液,收集沉淀(不必吸净);

[0072] 8) 加 500 μ l 70%乙醇(不要将沉淀吹打起来,只要把乙醇加上即可),轻柔倾斜 EP 管,旋转一圈,再次离心, 4℃ 12000rpm, 5min ;离心后倒掉上清,再加同量乙醇,同样再做一遍(此为洗涤步骤,共 2 次);

[0073] 9) 倒掉上清,并常温简短离心后,将附壁乙醇离至 EP 管底,移液器小心将残余液体吸净,室温干燥 5min,或沉淀由不透明变为半透明或透明时,加入 20-30 μ l DDW,溶解沉淀;-20℃保存 DNA 溶液。

[0074] 4. 对修饰后 DNA 进行 MSP

[0075] 本领域技术人员可意识到,可使用合适的手段(例如试剂盒)进行 MSP,以下以 TaKaRa Taq™(编号 DR001A) 试剂盒为例进行说明。在本发明的方法中,可采用两种 PCR 方法进行 MSP,分别为(1)直接 PCR 法或(2)巢式 PCR 法。

[0076] (1) 直接 PCR 法

[0077] 按下表 1 所示建立反应体系,并按下表 2 所示的条件进行 PCR 扩增:

[0078] 表 1 反应体系

[0079]

基因组 DNA	1 μl
M 或 U 引物 (各 20 pmol/μl)	0.5 μl
dNTP 混合物 (各 2.5 mM)	2 μl
10× PCR 缓冲液(Mg ²⁺ Plus)	2 μl
<i>TaKaRa Taq</i> TM (5 U/μl)	0.125 μl
<hr/>	
dH ₂ O 加至	25 μl

[0080] 表 2 反应条件

[0081] 94 $^{\circ}$ C 1min 1 个循环

[0082] 98 $^{\circ}$ C 10sec

[0083] 64 $^{\circ}$ C 30sec 30 个循环

[0084] 72 $^{\circ}$ C 30sec

[0085] (2) 另外,在本步骤中,可使用巢式 PCR 对基因组 DNA 进行扩增,具体方法及条件如下:

[0086] 按下表 3 所示建立反应体系,并按下表 4 所示的条件进行外引物 PCR 扩增:

[0087] 表 3 反应体系

[0088]

硫化处理后基因组 DNA	1 μl
外引物对 (各 20 pmol/μl)	1 μl
dNTP 混合物 (各 2.5 mM)	2 μl
10× PCR 缓冲液(Mg ²⁺ Plus)	2.5 μl
<i>TaKaRa Taq</i> TM (5 U/μl)	0.125 μl
dH ₂ O 加至	25 μl

[0089] 表 4 反应条件

[0090] 95 $^{\circ}$ C 1min 1 个循环

[0091] 98 $^{\circ}$ C 10sec

[0092] 55 $^{\circ}$ C 30sec 30 个循环

[0093] 72 $^{\circ}$ C 30sec

[0094] 在使用外引物对扩增后,再取适量外引物扩增产物,以上述 M 引物对和 U 引物对作为内引物进行 PCR 扩增,按下表 5 所示建立反应体系,并按下表 6 所示的条件进行 PCR 扩增:

[0095] 表 5 反应体系

[0096]	第一步 PCR 反应产物	1 μ l
	M 或 U 引物 (各 20 pmol/ μ l)	1 μ l
	dNTP 混合物 (各 2.5 mM)	2 μ l
	10 \times PCR 缓冲液(Mg ²⁺ Plus)	2.5 μ l
	<i>TaKaRa Taq</i> TM (5 U/ μ l)	0.125 μ l
	dH ₂ O 加至	25 μ l

[0097] 表 6 反应条件

[0098] 94 $^{\circ}$ C 1min 1 个循环

[0099] 94 $^{\circ}$ C 30sec

[0100] 64 $^{\circ}$ C 30sec 30 个循环

[0101] 72 $^{\circ}$ C 30sec

[0102] 5. MSP 产物的凝胶电泳

[0103] 1) 取 12 μ l PCR 产物 (直接 PCR 产物) 进行 3% 琼脂糖凝胶电泳 ;

[0104] 2) 在紫外灯下观察电泳条带, 以确定是否得到特异性条带。

[0105] 利用上述方法步骤, 以具有转移性性质的组织和不具有转移性质的组织进行实验, 得到的各样本的电泳结果见图 1。在图 1 中显示的有 : 局限性前列腺癌 (L1、L2、L3、L4、L5), 转移性前列腺癌 (M1、M2、M3、M4、M5、M6、M7), 前列腺癌细胞系 (PC3、PC3M、DU145), 前列腺增生 (BPH1、BPH2), 正常前列腺 (N1、N2), 局限性前列腺癌淋巴结 (L3-LN、L4-LN、L5-LN) 和转移性前列腺癌淋巴结 (M5-LN、M6-LN、M7-LN)。结果可见所有具有转移特性的前列腺癌细胞系、多数转移性前列腺癌和转移性前列腺癌淋巴结可见甲基化条带 (即 M 条带)。利用巢式 PCR 产物进行 MSP 产物的凝胶电泳, 可得到比图 1 的结果效果更好的图片, 且结果更加可靠和稳定。

[0106] 本发明具有很高的特异性, 因 CRMP4 只在转移性前列腺癌中表达下调 (原因之一即为甲基化), 在其它肿瘤 (比如肝癌、肺癌、胃癌等) 未观察到此现象, 因而只有在转移性前列腺癌中才存在 CRMP4 甲基化现象。另外本发明 also 具有很高的准确性, 每个标本重复 3 次, 结果相同。在 5/7 的转移性前列腺癌标本及所有转移特性的前列腺癌细胞系中, 都能扩增甲基化条带。本发明仅需 2.5-25ngDNA (100mg 组织或者更少) 即可检测。

[0107] 本领域技术人员可以预期到, 也可使用巢式 PCR 进行本发明的 MSP 方法, 以增加本发明方法的准确性和特异性。

[0108] 以上所述仅为本发明的优选实施方式, 并不用于限制本发明的范围。根据本发明的公开内容所作出的改进、等同变化均应包含在本发明的保护范围内。

[0109] 序列表

[0110] <110> 申请人 : 高新

[0111] <120> 用于前列腺癌转移早期诊断的试剂盒

[0112] <160> 6

[0113] <210> 1

[0114] <211> 27

[0115]	<212>DNA	
[0116]	<213> 人工序列	
[0117]	<400>1	
[0118]	tttttgtagt ttttgagagc gagttac	27
[0119]	<210>2	
[0120]	<211>29	
[0121]	<212>DNA	
[0122]	<213> 人工序列	
[0123]	<400>2	
[0124]	ctctaccata acgcgaatcg aatacgacg	29
[0125]	<210>3	
[0126]	<211>29	
[0127]	<212>DNA	
[0128]	<213> 人工序列	
[0129]	<400>3	
[0130]	gttttttgta gtttttgaga gtgagttat	29
[0131]	<210>4	
[0132]	<211>34	
[0133]	<212>DNA	
[0134]	<213> 人工序列	
[0135]	<400>4	
[0136]	ctctcctcta ccataacaca aatcaaatac aaca	34
[0137]	<210>5	
[0138]	<211>26	
[0139]	<212>DNA	
[0140]	<213> 人工序列	
[0141]	<400>2	
[0142]	tgattttgag atttagttag gtagtg	26
[0143]	<210>6	
[0144]	<211>23	
[0145]	<212>DNA	
[0146]	<213> 人工序列	
[0147]	<400>2	
[0148]	tttcctcttt acatctacct cac	23

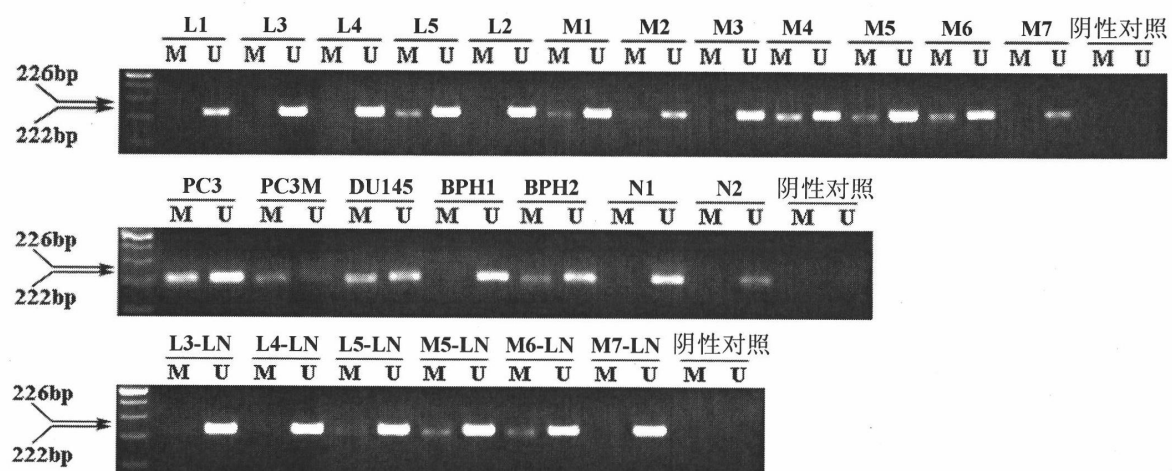


图 1