



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 107326066 B

(45) 授权公告日 2021.10.26

(21) 申请号 201710204778.8

(22) 申请日 2005.07.22

(65) 同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 107326066 A

(43) 申请公布日 2017.11.07

(30) 优先权数据  
534,289 2004.07.23 NZ  
539,219 2005.04.04 NZ  
60/692,619 2005.06.20 US

(62) 分案原申请数据  
200580031939.3 2005.07.22

(73) 专利权人 环太平洋生物技术有限公司  
地址 新西兰达尼丁

(72) 发明人 P·J·吉尔福德 N·J·克尔  
R·波洛克

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所  
11247

代理人 胡志君 黄革生

(51) Int.Cl.  
C12Q 1/6886 (2018.01)  
G01N 33/574 (2006.01)

审查员 谢庆宁

权利要求书1页 说明书21页  
序列表7页 附图74页

(54) 发明名称

用于膀胱癌检测的尿标记物

(57) 摘要

肿瘤的早期诊断是决定患肿瘤的患者存活率的一个主要因素,所述肿瘤包括膀胱肿瘤。BTM或UBTM家族成员可在膀胱肿瘤组织和其它肿瘤组织中高度或持续地累积,和/或可在患者尿中累积,且因此可用作膀胱癌和其它类型癌症的标记物。在某些实施方案中,BTM或UBTM可在尿中累积,对UBTM家族成员进行检测可作为一种有效的诊断方法。在一些实施方案中,定量PCR方法优于微阵列方法。在其它实施方案中,对多种BTM或UBTM进行检测和定量可提高膀胱癌检测的敏感性和特异性,且因此提供了用于确定膀胱癌阶段和类型的方法。试剂盒提供了实施本发明方法的简易、便捷的途径。

1. 用于检测缩写为BTM的膀胱癌标记物表达水平的试剂的用途,用于制备在人受试者的尿中检测膀胱癌的试剂盒,其中BTM是HOXA13。

2. 权利要求1的用途,还包括使用一种或多种进一步的试剂,所述进一步的试剂能够检测选自图14a或14b所示的至少一种其它BTM的表达水平,其中所述至少一种其它BTM不含CDC2。

3. 权利要求1的用途,其中所述BTM并不与血液相关联。

4. 根据权利要求1所述的用途,其中所述试剂盒确定BTM mRNA的累积。

5. 根据权利要求1-4中任意一项所述的用途,其中所述试剂盒包括使用了微阵列。

6. 根据权利要求1-4中任意一项所述的用途,其中所述试剂盒包括使用了定量聚合酶链反应或杂交方法。

7. 根据权利要求1-4中任意一项所述的用途,其中所述试剂盒确定BTM蛋白质的累积或BTM肽的累积。

8. 根据权利要求7所述的用途,其中所述试剂包含抗体。

9. 权利要求8的用途,其中所述抗体为多克隆抗体。

10. 权利要求8的用途,其中所述抗体为单克隆抗体。

11. 根据权利要求1-4中任意一项所述的用途,其还包括使用用来检测TOP2A、MDK或BIRC15的试剂。

12. 权利要求1的用途,其中所述试剂盒从疑患膀胱癌患者的生物样本中确定选自图14a或14b的两种或多种BTM标记物的组合的累积,其中所述两种或多种BTM标记物的组合不含CDC2。

13. 用于检测用人在受试者尿中检测人膀胱癌的缩写为BTM的膀胱癌标记物表达水平的装置,其包含:其上具有BTM的组合的捕获剂的基质,所述组合选自图14a和14b,其中一种BTM是人的HOXA13且其中所述组合的捕获剂不包括针对CDC2的捕获剂;以及与所述基质相联的检测器,该检测器能够检测与所述捕获剂关联的所述BTM组合。

14. 权利要求13的装置,其中至少一种所述捕获剂包含寡核苷酸。

15. 权利要求13的装置,其中至少一种所述捕获剂包含抗体。

16. 用人在受试者尿中检测人膀胱癌的试剂盒,其包含:基质;其上的至少两种缩写为BTM的膀胱癌标记物的组合的捕获剂,所述组合选自图14a和14b,其中一种BTM是人的HOXA13且其中所述组合的捕获剂不包括针对CDC2的捕获剂;和使用说明书。

17. 权利要求16的试剂盒,其中至少一种所述捕获剂为BTM-特异的寡核苷酸。

18. 权利要求16的试剂盒,其中至少一种所述捕获剂为BTM-特异的抗体。

19. 权利要求2的用途,其中至少一种其它BTM选自BIRC2、IGFBP5、MDK、MGP、NOV1、NRP1、SEMA3F、SPAG5、TOP2A,且其中所述标记物不存在于血液中。

## 用于膀胱癌检测的尿标记物

[0001] 本申请是中国专利申请200580031939.3的分案申请,原申请的申请日是2005年7月22日,发明名称是“用于膀胱癌检测的尿标记物”。

[0002] 优先权要求

[0003] 本专利申请要求以下专利申请的优先权:新西兰临时专利申请号534,289(于2004年7月23日申请的“用于膀胱癌检测的标记物”,申请人:太平洋Edge生物科技公司(Pacific Edge Biotechnology Ltd.));新西兰临时专利申请号539,219(于2005年4月4日申请的“用于膀胱癌检测的标记物”,申请人:太平洋Edge生物技术有限公司(Pacific Edge Biotechnology Ltd.));以及美国临时专利申请号60/692,619(于2005年6月20日申请的“用于膀胱癌检测的尿标记物”,发明人:Parry John Guilford、Natalie Jane Kerr和Robert Pollock)。以上的每一申请均全部在此引入作为参考。

### 发明领域

[0004] 本发明涉及癌症检测。具体地,本发明涉及应用标记物进行膀胱癌检测。更具体地,本发明涉及应用尿标记物进行膀胱癌检测。而更具体地,本发明涉及应用尿中的寡核苷酸、蛋白质和/或抗体标记物对膀胱癌进行检测、分型和分期。

[0005] 发明背景

[0006] 介绍

[0007] 对癌症进行早期治疗时,癌症患者的存活率可大为提高。在膀胱癌的情况下,在疾病早期诊断出的患者的5年存活率大于90%,而与之相比在疾病晚期诊断出的患者其5年存活率约为15-30%。因此,导致膀胱癌早期诊断的进展可改进患者的预后。已建立的应用尿标本进行膀胱癌检测的方法为细胞学方法。但是,已知细胞学方法仅对约75%的浸润性膀胱癌的检测敏感,且仅对约25%的浅表性膀胱癌的检测敏感(Lotan和Roehrborn,泌尿学(Urology) 61,109-118(2003))。

[0008] 广义上将膀胱癌分为两类,浸润性和浅表性。浸润性类型渗入到下面的组织层,而浅表类型趋向于主要以息肉样生长于膀胱内腔中。

[0009] 对尿中特异癌标记物进行鉴定可提供用于癌症早期诊断并导致早期治疗和预后改进的有益方法。特异癌标记物也可提供用于监控疾病进程并保证所监控的外科、放疗和化疗治疗的功效的方法。但是,对多种主要癌症而言,可用的标记物的缺点在于敏感性和特异性不足。

[0010] 目前,用于膀胱癌检测的最可靠的方法为膀胱镜检查联合以受损部位的活组织切片检查。但是,该技术费时、为侵入性且其敏感性仅为约90%,这意味着约10%的癌症患者不能用这些方法得以检测。非侵入性方法中的尿细胞学方法,可通过显微镜检测片状脱落的恶性细胞,为目前的优选方法。尽管细胞学方法的特异性约为95%,但其对低度损伤的敏感性很低(9-25%),非常依赖样本质量且受到观测者间的高度差异的影响。

[0011] 最近,已尝试对膀胱活组织标本中的遗传标记物进行检测。最常用的方法为微阵列分析,方法中将含有与推断的遗传标记的部分互补的寡核苷酸的阵列,与获自患者样本

的mRNA或cDNA样本进行接触。用这些方法,一些近期的报告已鉴定出多种推测的膀胱癌标记物。但是,阵列技术相对而言为非定量性且变异较大。

[0012] 对可指示膀胱癌存在的血液或尿标记物进行检测提供了用于改进该疾病检测的一种潜在方法。尽管膀胱癌血液标记物的研发进展缓慢,但已获得几种尿蛋白质标记物。对这些标记物的试验显示出优于细胞学方法的敏感性,但其特异性并非最佳,这是由于也通常可在患非恶性肿瘤疾病的患者中观测到这些标记物的水平提高,所述非恶性肿瘤疾病包括炎症、尿结石病和良性前列腺增生。例如,检测特异核基质蛋白的NMP22,其敏感性为47-87%且其特异性为58-91%。NMP22的高变异性意味着其并非为用于膀胱癌的快速、简易检测的理想方法。

[0013] 其它的尿试验包括基因转录物的RT-PCR扩增,所述基因转录物如来自尿样本细胞沉淀中的端粒酶hTERT。RT-PCR试验提供了潜在的高敏感性,但其对已存在的RT-PCR标记物的特异性仍然未知。

[0014] 需要用于癌症早期检测和诊断的其它方法。本发明提供了基于癌症标记物,特别是基于膀胱癌标记物的其它方法、组合物、试剂盒和设备,以助于癌症的早期检测和诊断。

[0015] 发明概述

[0016] 联合应用微阵列分析和定量聚合酶链反应(qPCR),我们已经能够鉴定出选择用于膀胱癌的特异遗传标记物。在一些实施方案中,我们已经发现可用于膀胱肿瘤分期的标记物,且在其它实施方案中,我们已经鉴定出可区分肿瘤类型的标记物。在其它实施方案中,我们出乎预料地发现,两种或多种标记物的组合可提供用于膀胱癌检测的高度可靠和敏感的方法。而在进一步的实施方案中,我们已鉴定出在膀胱癌细胞中但不在血细胞中高度表达的标记物。因此,在许多实施方案中,膀胱癌试验出乎预料地优于现有技术中的试验。

[0017] 在某些实施方案中,应用微阵列分析来鉴定与非恶性膀胱组织相比在膀胱肿瘤组织中高度表达的基因。这些基因以及这些基因所编码的蛋白质,在此称为膀胱肿瘤标记物(BTM)。应当理解术语BTM并不需要标记物仅对膀胱肿瘤特异。确切地说,BTM表达的提高也可见于其它类型的肿瘤,包括恶性肿瘤。也应当理解BTM包括在血细胞中不高度表达的标记物。借助于来自尿的取样,并不存在于现有技术的活组织样本中通常存在的在其它细胞类型中的表达。术语BTM也包括用于膀胱癌检测的单独标记物的组合。

[0018] 在其它实施方案中,提供了鉴定样本中存在标记物的方法,包括免疫组织化学和定量聚合酶链反应(qPCR)。qPCR方法不易于产生在微阵列方法中常见的假象。此类假象包括置于阵列点上的寡核苷酸配体的数量差异、染料与阵列点上已杂交寡核苷酸的不均一和非预测性结合、非特异物质从阵列点上的不均一洗涤以及其它问题。

[0019] 在此公开的某些基因所编码的蛋白质由细胞分泌、从细胞切割或在细胞死亡时从细胞中释放。这些mRNA转录物及其蛋白质具有额外的用途,如用作膀胱癌的诊断标记物或用作监控已确认疾病进程的标记物。这些标记物可单独应用或彼此联合应用。此外,也可将保留在细胞内或与细胞关联的其它基因、RNA转录物及编码的蛋白质单独或彼此联合应用,以作为尿标记物。

[0020] 浅表性和浸润性膀胱癌的治疗策略可有所不同。浸润性膀胱癌需要更为紧急的外科切除,且其允许的治疗选择要少于浅表性膀胱癌。与之相反,浅表性膀胱癌可应用膀胱腔内化疗或膀胱腔内BCG免疫疗法成功地进行治疗。

[0021] 但目前,还没有不需进行膀胱镜检查即可简易且可靠地区分浅表性和浸润性膀胱癌类别的方法。应用如尿试验的非侵入性方法来区分这些类别的能力将允许临床医生选择适宜的治疗方案,而无需依赖昂贵、繁琐且通常患者不易接受的膀胱镜检查。

[0022] 我们已经出乎意料地发现,某些尿标记物,特别是不在血液中高水平存在的标记物,当联合或单独应用这些标记物时可对膀胱癌进行高度可靠、敏感且特异的诊断。

[0023] 附图简述

[0024] 本发明的描述参考其中的特定实施方案以及附图,其中:

[0025] 图1显示的表格描述了用于qPCR分析中的样本数和来源。

[0026] 图2显示的表格描述了用于本发明膀胱癌的qPCR分析的标记物和标记物的寡核苷酸探针。

[0027] 图3显示了应用微阵列方法从浸润性膀胱癌样本中鉴定出的BTM列表。

[0028] 图4显示了应用微阵列方法从浅表性膀胱癌样本中鉴定出的BTM列表。

[0029] 图5显示了应用定量PCR对特定BTM进行分析的研究中获得的结果列表。

[0030] 图6a-6af描述的柱状图显示了相对频率对Log2倍数改变数据,所述数据获自浸润性和浅表性膀胱肿瘤的多种肿瘤标记物的定量PCR研究。图6a:SPAG5,浸润性;图6b:SPAG5,浅表性;图6c:TOP2a,浸润性;图6d:TOP2a,浅表性;图6e: CDC2,浸润性;图6f: CDC2,浅表性;图6g: ENG,浸润性;图6h: ENG,浅表性;图6i: IGFBP5,浅表性;图6j: NOV,浅表性;图6k: NRP1,浸润性;图6l: NRP1,浅表性;图6m: SEMA3F,浅表性;图6n: EGFL6,浸润性;图6o: EGFL6,浅表性;图6p: MGP,浸润性;图6q: SEM2,浸润性;图6r: SEM2,浅表性;图6s: CHGA,浸润性;和图6t: CHGA,浅表性;图6u: BIRC5,浸润性;图6v: BIRC5,浅表性;图6w: UBE2C,浸润性;图6x: UBE2C,浅表性;图6y: HoxA13,浸润性;图6z: HoxA13,浅表性;图6aa: MDK,浸润性;图6ab: MDK,浅表性;图6ac: Thy1,浸润性;图6ad, Thy1,浅表性;图6ae: SMC4L1,浸润性;6af: SMC4L1,浅表性。

[0031] 图7显示了应用定量PCR对尿样本的特定BTM进行分析的研究中获得的结果列表。

[0032] 图8描述的盒须图(box and whisker plot)显示了在患者和健康对照的尿中膀胱癌标记物的相对累积量。12种BTM中的每一个的数据均成对显示;每一对的上盒代表来自健康对照患者的尿样本,且下盒代表来自患膀胱癌的患者尿样本。盒定义25%、50%和75%。所有数据为相对于健康对照中位值的Log2倍数改变。点代表离群值。

[0033] 图9描述了从全血中提取的总RNA与来自膀胱癌组织中的RNA相比较的定量PCR分析的条形图。

[0034] 图10描述了膀胱癌患者尿中标记物转录物的过度累积的中位值。分别显示了患者和健康对照间以及患者和非恶性对照间的Log2差异。

[0035] 图11描述的盒须图显示了癌症患者尿中标记物转录物与健康和非恶性对照相比的过表达。盒定义25%、50%和75%。所有数据相应于健康对照中位值。点填充的盒相应于健康受试者样本。暗影填充的盒相应于非恶性泌尿科疾病患者的样本,且斜纹填充的盒相应于膀胱癌患者样本,a. H0XA13;b. IGFBP5;c. MDK;d. MGP;e. NRP1;f. SEMA3F;g. SMC4L1;h. TOP2A;i. UBE2C。点代表离群值。

[0036] 图12a-12b描述的柱状图分别显示了高于浸润性和浅表性类型肿瘤正常表达中位值第95个百分点的标记物的数目。结果基于12个标记物的qPCR数据,并对每一肿瘤样本分别显示。

[0037] 图13a-13b描述的表格显示了多种标记物对精确区分肿瘤组织和非恶性组织的能力的影响。根据源于qPCR数据的正态分布创建表格。图13a描述了多种标记物对以95%特异性精确区分浸润性膀胱癌组织和非恶性组织的能力的影响。图13b描述的表格显示了多种标记物对以95%特异性精确区分浅表性膀胱癌组织和非恶性组织的能力的影响。

[0038] 图14a-14b描述的表格显示了标记物的组合在95%特异性处对浸润性移行细胞癌(TCC)敏感性,所述敏感性根据qPCR数据的正态分布进行计算。图14a:浸润性移行细胞癌(TCC)。图14b:浅表性TCC。

[0039] 图15描述的图表显示了多种标记物对精确区分获自膀胱癌(TCC)患者的尿样本和获自患非恶性泌尿科疾病的患者尿样本的能力的影响。根据由尿qPCR分析获得的数据的正态分布创建表格。

[0040] 图16描述的图表显示了尿中标记物的组合以95%特异性检测TCC的敏感性,根据尿qPCR数据的正态分布进行计算。

[0041] 图17描述的盒须图显示了由浅表性和浸润性膀胱癌患者尿提取的RNA的BTM比值。盒定义了第25、50和75个百分点。灰色阴影盒代表来自浅表性膀胱癌患者的样本,且细线条盒代表来自浸润性膀胱癌患者的样本。a. TOP2A/HOXA13组合;b. TOP2A/IGFBP5组合;和c. TOP2A/SEMA3F组合。点代表离群值。

[0042] 图18描述的盒须图显示了不同阶段膀胱癌患者尿中的BTM比值。盒定义了第25、50和75个百分点。点填充盒相应于浅表性肿瘤患者样本,灰色阴影盒相应于1期浸润性肿瘤患者样本,且细线条盒相应于2-3期肿瘤患者样本:a. TOP2A/HOXA13组合;b. TOP2A/IGFBP5组合;和c. TOP2A/SEMA3F组合。点代表离群值。

[0043] 图19描述的盒须图显示了从浅表性和浸润性膀胱肿瘤中提取的RNA的BTM比值。盒定义了第25、50和75个百分点。灰色阴影盒代表浅表性膀胱肿瘤样本,且细线条盒代表浸润性膀胱肿瘤样本:a. TOP2A/HOXA13组合,b. TOP2A/IGFBP5组合,和c. TOP2A/SEMA3F组合。点代表离群值。

[0044] 图20描述的盒须图显示了应用于膀胱癌检测的一种标记物组合。该图显示了与健康和非恶性对照相比癌症患者尿中四种标记物组的过表达。盒定义了第25、50和75个百分点。所有数据与健康对照中位值相应。点填充盒相应于健康受试者的样本。灰色阴影填充盒相应于非恶性泌尿科疾病患者的样本,且斜纹填充盒相应于膀胱癌患者的样本:a. HOXA13,b. MGP;c. SEMA3F和d. TOP2A。点代表离群值。

[0045] 图21描述的盒须图显示了用于确定膀胱癌组织学类型的标记物组合。该图显示了浅表性和浸润性膀胱癌患者的尿中提取的RNA的BTM比值。盒定义了第25、50和75个百分点。灰色阴影盒代表浅表性膀胱癌患者的样本,且细线条盒代表浸润性膀胱癌患者的样本:a. TOP2A/SEMA3F组合,b. TOP2A/HOXA13组合。点代表离群值。

[0046] 发明详述

[0047] 定义

[0048] 在详细描述本发明的实施方案之前,对用于此处的术语提供一些定义是有益的。

[0049] 术语“标记物”意指与一种生物现象的存在具有数量或质量关联的分子。“标记物”的实例包括基因、基因片段、RNA、RNA片段、蛋白质或蛋白质片段、相关代谢物、副产物或其它鉴定分子,无论其与现象之下的机制直接或间接相关。

[0050] 术语“敏感性”意指测试为阳性的患病个体的比例。因此,敏感性提高意指较低的假阴性测试结果。

[0051] 术语“特异性”意指测试为阴性的未患病个体的比例。因此,特异性提高意指较低的假阳性测试结果。

[0052] 术语“BTM”或“膀胱肿瘤标记物”或“BTM家族成员”意指与膀胱癌关联的标记物。术语BTM也包括单一标记物的组合,所述组合可提高膀胱癌检测的敏感性和特异性。在本申请书的一些部分中,为方便起见,术语BTM可包括UBTM(此处定义的)。BTM的非限制性实例包括在此处的图3和4中。

[0053] 可通过以下步骤鉴定出BTM:从疑患膀胱癌的患者样本组织中提取RNA,将RNA应用到其上具多种寡核苷酸的微阵列上,允许样本RNA与阵列上的寡核苷酸进行杂交,然后对测定的与阵列每一个点结合的RNA的水平进行定量。如果存在的标记物的水平高于阈值,则将该标记物作为BTM,所述阈值为应用微阵列方法检测的存在于正常、非恶性组织中的正常值至少约1.2倍。备选地,阈值可高于正常值约2倍,高于正常值约3倍、4倍或甚至高于正常值5倍。我们所指的“正常”是指大于正常群体的90%。在其它情况下,正常可意指95%的存在水平(即对均值的标准差(SD)约为2),且在其它情况下,正常大于约97.5%(即SD约为3)或99%。

[0054] 而在进一步的情况下,可选择存在于肿瘤组织但不以显著程度存在于血液中的BTM。此处“显著程度”是指通过qPCR检测时肿瘤组织中的数量高于血液中存在数量的至少约5个循环。

[0055] 术语“UBTM”或“尿膀胱肿瘤标记物”或“UBTM家族成员”意指除TOP2A、MDK或BIRC5之外的尿中与膀胱癌关联的BTM标记物。术语UBTM也包括两种标记物的组合和三种标记物的组合,所述组合提高了应用尿样本检测膀胱癌的敏感性和特异性。UBTM的非限制性实例包括在此处的图14a和14b中。

[0056] 在其它情况下,可应用微阵列方法或应用qPCR方法鉴定尿中的UBTM,其中所述方法应用的正向引物、反向引物和探针的选择基于待评估的标记物。应用尿检测膀胱癌的阈值可高于正常受试者尿中标记物的水平,患膀胱癌的阈值高出约1个循环(2倍)、2个循环(4倍)、3个循环(8倍)、4个循环(16倍)、5个循环(32倍)或更多。

[0057] 术语“qPCR”是指定量聚合酶链反应。

[0058] 术语“表达”包括由基因或基因的部分产生mRNA,并包括由RNA、基因或基因的部分产生编码蛋白质,以及包括与表达关联的可检测物质的显现。例如,如抗体的结合配体与基因或其它寡核苷酸、蛋白质或蛋白质片段的结合以及结合的配体的视觉显现包括在术语“表达”的范围之内。因此,免疫印迹(如Western印迹)中点密度的提高包括于下述生物分子的术语“表达”之内。

[0059] 术语“表达速度”意指转录物或蛋白质的时间依赖的数量改变。

[0060] 术语“过表达”用于下述情形,即每特定时间段内一种细胞或细胞类型中标记物的表达速度高于另一细胞或细胞类型中标记物的表达速度。

[0061] 术语“累积”是指与正常均值相比样本中标记物的数量增加。我们所说的“增加的数量”意指标记物的数量高于正常范围的90%、95%、97.5%、99%或更多的应用微阵列方法检测时至少约1.2倍、2倍、3倍、4倍或5倍。应用qPCR检测时,“数量增加”是指标记物的数

量高于正常范围的90%、95%、97.5%或99%的至少约1个循环(2倍)、2个循环(4倍)、3个循环(8倍)、4个循环(16倍)、5个循环(32倍)或更多。

[0062] 累积包括细胞内标记物数量的增加(基于每个细胞)或可指样本中具有特定标记物的细胞数目的增加。因此,累积可意指与不以膀胱癌为特征的疾病相比,尿中标记物的总数量的增加(基于每个体积)。累积也可反映在特定细胞类型中BTM表达速度的提高,和/或以正常表达速度表达BTM的细胞数量的提高。此外,累积也可反映由于细胞膜完整性丧失或细胞死亡和破坏而存在的游离mRNA。

[0063] 本发明实施方案的描述

[0064] 提供了用于肿瘤检测和评估的标记物,所述肿瘤包括膀胱肿瘤。已发现多种基因和蛋白质与膀胱肿瘤相关。对取自膀胱肿瘤患者的样本和取自正常尿道上皮的非恶性样本所进行的微阵列分析得出了惊人的发现,即在多种膀胱肿瘤中,某些基因过表达和尿中基因产物累积的特定模式与疾病相关联。最令人惊异的是,已分离出下述的标记物,该标记物在膀胱癌患者尿样本中以高水平存在,但在健康个体特别是患有非恶性泌尿科疾病(包括显示血尿)的个体中以低水平存在。因此标记物检测可作为肿瘤特别是膀胱肿瘤存在的指征,所述标记物如基因产物(例如,如mRNA的寡核苷酸)以及由寡核苷酸翻译的蛋白质和肽。

[0065] 可以理解,特定标记物或标记物组的水平可取决于产生的尿量与存在的标记物数量的比值。因此,在以尿量减少为特征(例如尿体积减少)的病症中,标记物浓度可能提高,但并不表示患有膀胱癌。因此,在一些实施方案中,可根据给定时间内产生的总尿量对标记物数量进行校正。备选地,可根据尿样本中的总细胞数对标记物浓度进行校正,且在其它实施方案中,可根据尿中存在的总蛋白质对标记物浓度进行校正。另一方面,产尿增加可稀释肿瘤标记物,并由此易于掩盖膀胱癌的存在。此类情况可能与以下所述相关,即水摄入量增加、盐摄入量减少、利尿剂用量增加,或抗利尿激素的产生或活性受到抑制。

[0066] 在一些实施方案中,可应用本领域内已知的方法检测肾脏功能。这些方法包括,举例而言,如肌酐清除检测。但应当理解,存在多种用于肾功能检测的适宜方法。发现肾功能异常时,可应用适宜的校正对检测的标记物累积进行调整。由此,可更为准确地诊断膀胱癌。

[0067] 可应用任何适宜的技术对样本中的癌标记物进行检测,且所述技术可包括但不限于,寡核苷酸探针、qPCR或针对癌标记物的抗体。

[0068] 应当理解,受试样本并非限于疑患肿瘤的组织样本。标记物可分泌到血清中、由细胞膜脱落或与落入尿中的细胞关联。因此,样本可包括任何身体样本,并包括血液、血清、腹腔洗液、脑脊液、尿和粪便标本。

[0069] 样本中一种癌标记物的检测可成为受试者体内肿瘤存在的指征。但可以理解,通过对多种癌标记物存在与否及其表达量进行分析,可提高诊断敏感性并降低假阳性和/或假阴性结果的频率。因此,根据本发明的多种标记物可用于提高癌症的早期检测和诊断。

[0070] 癌症检测的总体方法

[0071] 下述方法为可用于癌症(包括膀胱癌)检测的非限定方法,所述检测应用BTM或UBTM家族成员进行。

[0072] 应用核酸探针选择标记物的杂交方法

[0073] 这些方法包括将核酸探针与支持物结合,并在适宜条件下与源自受试样本的RNA

或cDNA杂交(Sambrook,J.,E Fritsch,E.和T Maniatis,分子克隆:实验指南,第三版,冷泉港实验出版社:冷泉港(2001))。这些方法根据需要可应用于来自肿瘤组织或体液样本的BTM或UBTM。RNA或cDNA制备物通常标记以荧光或放射性分子以用于检测和定量。在一些应用中,杂交的DNA可与分支且荧光标记的结构连接以提高信号强度(Nolte,F.S.,用于对临床样本中核酸序列进行直接定量的分子DNA信号扩增(Branched DNA signal amplification for direct quantitation of nucleic acid sequences in clinical specimens),临床化学进展(Adv.Clin.Chem),33,201-35(1998))。通过在低盐溶液(如0.1 x SSC,0.5%SDS)中过度洗涤移除未杂交的信号,之后通过荧光检测或通过凝胶影像的光密度测定法对杂交的数量进行定量。支持物可为固体,如尼龙或硝化纤维膜,或支持物可由在液体悬液中杂交的微球或小珠组成。为允许洗涤和纯化,小珠可为磁性小珠(Haukanes,B-I和Kvam,C,磁性小珠在生物试验中的应用(Application of magnetic beads in bioassays),生物技术(Bio/Technology)11,60-63(1993))或可将小珠进行荧光标记以使其能够应用流式细胞仪进行分析(参见如Spiro,A.,Lowe,M.和Brown,D.,应用流式细胞仪对DNA序列进行多重鉴定和定量的基于小珠的方法(A Bead-Based Method for Multiplexed Identification and Quantitation of DNA Sequences Using Flow Cytometry),应用环境微生物学(Appl.Env.Micro),66,4258-4265(2000))。

[0074] 杂交技术的一种变更为定量基因 **Plex®** 试验(QuantiGene **Plex®** assay (Genospectra,Fremont)),该试验将荧光小珠支持物与分支DNA信号扩增联合。而有关杂交技术的另一变更为杂交为 **Quantikine®** mRNA 试验(R&D Systems,Minneapolis)。试验方法为如在产商的使用说明书所描述的。简言之,该试验应用与洋地黄毒苷(Digoxigenin)缀合连接的寡核苷酸杂交探针。通过应用与抗洋地黄毒苷抗体偶联的碱性磷酸酶在比色试验中对杂交进行检测。

[0075] 其它方法为领域内公知且无需在此进一步描述。

[0076] 定量PCR(qPCR)

[0077] 可应用BTM特异引物和探针对肿瘤样本、血清和尿样本进行定量PCR(qPCR)。在受控反应中,PCR反应中形成的产物量(Sambrook,J.,E Fritsch,E.和T Maniatis,分子克隆:实验指南,第三版,冷泉港实验出版社:冷泉港(2001))与起始模板的数量相关联。当处于Log期且试剂即将耗尽前终止PCR反应以对PCR产物进行定量。然后将PCR产物进行琼脂糖或聚丙烯酰胺凝胶电泳,用溴化乙锭或类似的DNA染料对其染色,并通过光密度测定法对染色强度进行测定。备选地,可应用对产物累积进行实时检测的PCR仪对PCR反应进程进行监测,所述PCR仪如Applied Biosystems'Prism 7000或Roche Light Cycler。实时PCR可检测合成的PCR产物中DNA嵌入染料(如Sybr Green)的荧光强度,也可检测当由猝灭分子分离时报告分子所释放的荧光;DNA链从引物寡核苷酸延伸后,报告和猝灭分子掺入到与靶DNA分子杂交的寡核苷酸探针中。在下一个PCR循环中通过Taq聚合酶的酶活性将寡核苷酸探针进行替代并进行降解,并自猝灭分子释放出报告分子。

[0078] 在一些实施方案中,正向引物、反向引物和探针组分别包括SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:14和SEQ ID NO:27。备选的前述引物和探针组分别包括SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:15和SEQ ID NO:28。在其它实施方案中,引物和探针组分别包括SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:16和SEQ ID NO:29,分别包括SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:17和SEQ ID NO:30,分别包括SEQ ID

NO:5、SEQ ID NO:18和SEQ ID NO:31,分别包括SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:19和SEQ ID NO:32,分别包括SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:20和SEQ ID NO:33,分别包括SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:21和SEQ ID NO:34,分别包括SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:22和SEQ ID NO:35,分别包括SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:23和SEQ ID NO:36,分别包括SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:24和SEQ ID NO:37,分别包括SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:25和SEQ ID NO:38以及分别包括SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:26和SEQ ID NO:39。

[0079] 酶联免疫吸附试验 (ELISA)

[0080] 简言之,在夹心ELISA试验中,将针对BTM/UBTM的多克隆或单克隆抗体结合到固相支持物上(Crowther, J.R. ELISA指南(The ELISA guidebook). Humana Press: New Jersey (2000); Harlow, E. 和 Lane, D., 抗体应用: 实验手册(Using antibodies: a laboratory manual). Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor (1999))或结合到悬浮小珠上。其它方法为领域内已知且无需在此进一步描述。单克隆抗体可源自杂交瘤或筛选自噬菌体抗体文库(Hust M. 和 Dubel S., 用于体外产生人类抗体片段的噬菌体展示载体(Phage display vectors for the in vitro generation of human antibody fragments). 分子生物学方法(Method MoI Biol). 295:71-96 (2005))。应用非靶蛋白质制备物和去污剂封闭非特异结合位点。然后将捕获抗体与含BTM/UBTM抗原的尿或组织制备物进行孵育。洗涤混合物后,将抗体/抗原复合物与检测靶BTM/UBTM的二级抗体孵育。二级抗体通常与荧光分子或其它报告分子缀合连接,前述分子或可在酶反应中得以检测或可应用缀合以报告分子的三级抗体进行检测(Crowther, Id.)。备选地,在直接ELISA中,可将含BTM/UBTM的制备物与支持物或小珠结合,并应用抗体报告分子缀合物直接对靶抗原进行检测(Crowther, Id.)。

[0081] 用于产生单克隆抗体和多克隆抗血清的方法为领域内公知,且无需在此多加着墨。

[0082] 免疫组织化学

[0083] 可应用膀胱肿瘤、淋巴结或远处转移上的抗标记物抗体对肿瘤标记物进行鉴定和定位。此类方法也可用于检测如直肠结肠、胰腺、卵巢、黑素瘤、肝脏、食道、胃、子宫内膜和脑。

[0084] 通常,可应用免疫组织化学检测组织中的BTM(Harlow, E. 和 Lane, D., 抗体应用: 实验手册(Using antibodies: a laboratory manual). 冷泉港实验出版社: 冷泉港(Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor) (1999))。简言之,将石蜡包埋的或冷冻OCT-包埋的组织样本切成4-8 $\mu$ m的薄片并置于载玻片上,固定和渗透,然后与针对BTM的一级单克隆或多克隆抗体孵育。一级抗体可与用于直接检测抗原的检测分子或报告分子缀合连接,或备选地,也可应用与报告分子或检测分子缀合连接的二级抗体对一级抗体自身进行检测。洗涤以及激活任意的报告分子后,可应用显微镜技术显现BTM的存在。

[0085] 方法也可用于对膀胱癌患者外科移除肿瘤之前和之后采取的血清或血浆中的标记物家族成员进行免疫检测,方法也可用于对罹患其它癌症的患者中的标记物家族成员进行检测,所述其它癌症包括但不限于,直肠结肠、胰腺、卵巢、黑素瘤、肝脏、食道、胃、子宫内膜和脑,以及用于对来自膀胱癌患者的尿和粪便中的标记物家族成员进行免疫检测。

[0086] 也可应用其它标准免疫检测技术对组织或尿中的BTM和UBTM进行检测,所述技术

如免疫印迹或免疫沉淀(Harlow,E.和Lane,D.,Using antibodies:a laboratory manual.Cold Spring Harbor Laboratory Press:Cold Spring Harbor(1999))。进行免疫印迹时,应用聚丙烯酰胺凝胶在变性或非变性条件下对来自组织或体液的含BTM/UBTM的蛋白质制备物进行电泳。然后将蛋白质转移到如尼龙的膜支持物上。然后将BTM/UBTM直接或间接与单克隆或多克隆抗体进行如已描述的用于免疫组化的反应。备选地,在一些制备物中,可直接将蛋白质点到膜上,而不需先期的电泳分离步骤。可通过光密度测定法对信号进行定量。

[0087] 进行免疫沉淀时,将含BTM或UBTM的可溶性制备物与抗BTM/UBTM的单克隆或多克隆抗体孵育。然后将反应液与惰性小珠孵育,所述小珠由与A蛋白或G蛋白共价连接的琼脂糖或聚丙烯酰胺制成。A或G蛋白小珠与抗体进行特异反应并形成与小珠结合的抗体-BTM/UBTM-抗原固定化复合体。洗涤步骤后,可通过免疫印迹或ELISA对结合的BTM/UBTM进行检测和定量。

[0088] 应用计算机分析阵列或qPCR数据

[0089] 收集原始数据,并通过比较膀胱肿瘤基因的表达水平与非肿瘤组织的同一基因的表达对倍数改变进行分析。提供了用于得出表达提高结论的阈值(例如,1.5倍提高、2倍提高,以及在备选实施方案中,3倍提高、4倍提高或5倍提高)。应理解,选择用于得出表达提高结论的其它阈值并不背离本发明的范围。肿瘤基因表达的进一步分析包括,将显示表达提高的那些基因与已知膀胱肿瘤的表达谱进行匹配以提供肿瘤诊断。

[0090] 应用BTM和UBTM监控TCC治疗的进程

[0091] 除用于TCC的快速诊断和早期检测外,在组织、血清或尿中检测出的BTM和UBTM标记物也可用于监控患者对治疗的反应。在这些应用中,开始全身的、囊泡内或血管内化疗、放疗或免疫治疗后,以一定的时间间隔采取尿和/或血清样本。标记物累积的降低可指示出肿瘤体积的减小,并作为治疗有效性的指征。可应用降低速度预测用于每一患者或治疗的最佳治疗剂量。

[0092] 评估的标记物选自已知的人类基因。评估的基因在图3和4中显示。图3和4中包括基因名称、HUGO标识符、MWG oligo number、NCBI mRNA参考序列编号和蛋白质参考编号。全长序列见于<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/>。

[0093] 用于膀胱癌诊断和评估的鉴定标记物在图2以及本申请书后附的序列表中显示。

[0094] 本发明的方面

[0095] 因此,在某些方面中,本发明包括用于膀胱癌检测的方法,所述方法包括检测尿中UBTM家族成员的累积。

[0096] 在其它方面中,UBTM家族成员并非显著程度地与血液相关联。

[0097] 在额外的方面中,UBTM选自图3或4中所示的群体。

[0098] 另外,在某些方面中,通过检测BTM或UBTM mRNA的累积实施检测步骤。

[0099] 在一些方面中,应用微阵列实施检测步骤。

[0100] 在其它方面中,应用定量聚合酶链反应或杂交方法实施检测步骤。

[0101] 在进一步的方面中,通过检测UBTM蛋白质的累积实施检测步骤。

[0102] 而在进一步的方面中,通过检测UBTM肽的累积实施检测步骤。

[0103] 在这些方面的一些方面中,实施检测步骤所应用的UBTM抗体既可为多克隆抗体也

可为单克隆抗体。

[0104] 在额外的方面中,方法包括检测该样本中两种或多种UBTM家族成员的累积。

[0105] 这些额外方面的某些方面中,方法包括检测TOP2A、MDK或BIRC5。

[0106] 而进一步的方法包括检测选自TOP2A-HOXA13、TOP2A-IGFBP5和TOP2A-SEMA3F的一对或多对标记物。

[0107] 在本发明的其它方面中,用于膀胱癌检测的方法包括对疑患膀胱癌患者的生物样本中两种或多种BTM家族成员组合的累积进行检测,所述BTM家族成员组合选自图14a或14b。

[0108] 在这些方面的一些方面中,生物样本选自血液、血清、血浆、组织、尿、粪便、脑脊液和腹膜洗液。

[0109] 而进一步的方法包括BTM或UBTM特异的抗体并包括用于产生这些抗体的方法,所产生的抗体既可为多克隆抗体也可为单克隆抗体。

[0110] 在这些方面的某些方面中,单克隆抗体靶向的BTM或UBTM可选自图3或4中所示的群体。

[0111] 在这些方面的另外方面中,方法进一步包括抗另一BTM或UBTM的另一抗体。

[0112] 本方面的额外方法包括用于检测BTM的设备,包含其上具有BTM或UBTM组合的捕获剂的基质,所述组合选自图14a或14b;以及包含与该基质关联的监测器,该监测器能够检测与该捕获剂关联的该BTM或UBTM组合。

[0113] 在这些方面的某些方面中,捕获剂包含寡核苷酸。

[0114] 在额外的方面中,捕获剂包含抗体。

[0115] 在一些方面中,BTM或UBTM选自图3或4中给定的群体。

[0116] 本发明也包括用于癌症检测的试剂盒,试剂盒包含基质、其上的至少两种BTM或UBTM组合的捕获剂以及使用说明书,所述组合选自图14a或14b。

[0117] 一些试剂盒包括的捕获剂为BTM-或UBTM-特异的寡核苷酸,或BTM-特异的抗体。

[0118] 在一些试剂盒中,BTM或UBTM选自图3或4中描述的群体。

[0119] 在某些试剂盒中,标记物选自IGFBP5、MGP、SEMA3F和HOXA13。

[0120] 额外的方面包括用于检测膀胱癌存在的方法,该方法包括确定尿样本中一种或多种标记物的存在,所述标记物选自BIRC2、CDC2、HOXA13、IGFBP5、MDK、MGP、NOV、NRP1、SEMA3F、SPAG5、TOP2A,且其中该标记物基本不存在于血液中。

[0121] 本发明的其它方面包括用于区分恶性和非恶性膀胱疾病的方法,该方法包括确定测定该患者尿中一种或多种标记物的累积,所述标记物选自HOXA13、IGFBP5、MDK、MGP、NRP1、SEMA3F、SMC4L1、TOP2A和UBE2C;以及测定该样本中该标记物与膀胱癌存在关联的比值。

[0122] 在这些方面的某些方面中,方法包括测定尿中至少第二BTM的累积。

[0123] 在这些实施方案的一些实施方案中,第一标记物为TOP2A且第二标记物选自HOXA13、IGFBP5和SEMA3F。

[0124] 在额外的方面中,本发明包括将标记物累积比值与作为浅表性膀胱癌、1期浸润性膀胱癌或2-3期浸润性膀胱癌的指征相关联。

[0125] 而在进一步的方面中,本发明包括用于确定膀胱癌治疗功效的方法,方法包括将

患者第一样本中存在的一种或多种标记物与一段时间治疗后患者第二样本中存在的一种或多种标记物进行比较,前述两种样本中的标记物选自图3或图4。

[0126] 如文中所述,可通过测定一种或多种肿瘤标记物的表达实现对肿瘤的检测。已出乎预料地发现,多种BTM或UBTM的表达提高与确诊的膀胱癌的存在密切关联。检测到的最低显著性相关的p值约为0.018。多数相关是显著性的P值小于 $10^{-10}$ 。显著性如此之高,可能并不需要检测多于一种的BTM或UBTM的表达或累积。但是,本发明的BTM冗余应用可提高膀胱癌检测的可靠性。

[0127] 此处提供的方法也包括高敏感性的试验。qPCR极端敏感,并可用于检测样本中极低拷贝数(例如1-100)的基因产物。具有如此高的敏感性,使得极早期检测与膀胱癌相关联的事件成为可能。

[0128] 方法

[0129] 肿瘤收集

[0130] 膀胱肿瘤样本和非恶性尿道上皮样本收集自日本的京都大学医院(Kyoto University Hospital, Japan)和合作的其它日本医院所进行的外科切除术标本。

[0131] 尿收集

[0132] 非恶性对照和膀胱癌患者的尿样本获自日本的京都大学医院(Kyoto University Hospital, Japan)(图1)。健康对照样本获自高加索人和日本人志愿者。

[0133] RNA提取

[0134] 在TriReagent:水(3:1)混合物中将肿瘤组织进行均质化,然后用氯仿提取。之后应用RNeasy™方法(Qiagen)从水相中纯化总RNA。也从16种癌细胞系提取RNA,并将之合并以用作参考RNA。

[0135] 将尿样本与等体积的裂解缓冲液(5.64M盐酸胍、0.5%肌氨酰、50mM乙酸钠(pH 6.5)和1mM  $\beta$ -巯基乙醇;用1.5M HEPES调节pH至pH 8)混合以从尿中提取RNA。然后用Trizol和RNeasy™方法提取总RNA。在合成cDNA之前,应用Qiagen QIAquick™PCR纯化试剂盒进一步纯化RNA制备物。

[0136] 从三个健康志愿者的血液中提取RNA,所述提取操作应用Trizol/RNeasy™提取经3.6%葡聚糖沉淀从全血中富集的细胞。

[0137] 微阵列玻片制备

[0138] 在环氧包被的载玻片(MWG Biotech)上印刷约30,000个50mer寡核苷酸(MWG Biotech),所示操作根据产商的说明书应用基因机器微阵列操作机器人进行。

[0139] RNA的标记和杂交

[0140] 应用Superscript II™逆转录酶(Invitrogen)由5 $\mu$ g总RNA转录生成cDNA,反应中包含5-(3-氨基烯丙基)-2'脱氧尿苷-5'-三磷酸。然后在Microcon柱子中对反应进行去离子化,之后与Cy3或Cy5在重碳酸盐缓冲液中室温孵育1小时。应用QIAquick柱子(Qiagen)移除未掺入的染料并在SpeedVac中将样本浓缩至15 $\mu$ l。然后将Cy3和Cy5标记的cDNAs与Ambion ULTRAhyb™缓冲液混合,于100°C变性2分钟并在杂交盒中于42°C 16小时杂交至微阵列玻片。然后洗涤玻片并在Axon 4000A™扫描器中以两种功率设置扫描玻片两次。

[0141] 癌标记物基因的微阵列分析

[0142] 将来自53个膀胱肿瘤和20个非恶性(“正常”)膀胱组织样本的RNA标记以Cy5并以

二份或三份形式杂交,同时设有Cy3标记的参考RNA。经归一化后通过倍数改变和统计学概率评估29,718个基因中每一基因的表达变化。

#### [0143] 归一化方法

[0144] 将Genepix™软件检测的荧光强度中位值减去局部背景强度进行校正。将背景校正后强度小于零的点排除。为便于归一化,将强度比和总的点强度(overall spot intensities)进行log转换。应用LOCFIT™软件包中运行的局部回归对染料和空间偏差进行log转换的强度比值(logged intensity ratio)的校正。根据总的点强度和部位同时对Log转换的强度比进行回归。局部回归的剩余值提供了校正的log转换的倍数改变。用于质量控制时,根据点强度和定位对每一归一化的微阵列的比值进行作图。随后观察图是否存在任何假相。另外,应用ANOVA模型检测pin-tip偏差。将所有归一化的结果和参数插入Postgres数据库进行统计分析。

#### [0145] 统计学分析

[0146] 为更好比较检测的阵列间的倍数改变,换算Log2(比值)以使每个阵列具有相同的总体标准差。该标准化过程降低了组织内平均类型变异性。进一步转变Log2(比)以使每一寡核苷酸的中位值为零并利于结果的视觉观察。然后应用基于倍数改变的秩检验(rank-test)来提高噪强度(noise robustness)。该检验由两个步骤组成:(i) 计算阵列内倍数改变秩(Rfc),和ii) 从肿瘤组织的(Rfc)中位值中减去正常组织的(Rfc)中位值。两个中位值秩的差异定义了倍数改变秩的分值。经标准化的数据进行以下额外的3个统计学检验:1) 双样本student's t-检验,2) Wilcoxon检验和3) 微阵列统计学分析(SAM)。给出每一统计学方法(秩倍数改变、t-检验、Wilcoxon检验和SAM)确定的300个最显著上调基因的每一检验的秩分值(rank score)。如果一个基因出现在一个列表,但不在一个或多个其它列表中,则在其分值中加入权重系数500。然后将所有秩分值相加得出一个和的秩分值。

#### [0147] 标记物组合的统计学分析

[0148] 为确定应用两种或三种标记物组合区分肿瘤和非恶性样本的价值,对来自肿瘤和非恶性样本的qPCR数据进行以下分析。应用样本均值和标准差生成非恶性样本和肿瘤样本的正态分布。然后确定肿瘤表达数据的数值超过非恶性分布中定义的阈值(例如,大于50%、70%、75%、80%、90%、95%或99%)的概率(即敏感性)。对于标记物的组合,确定至少一种标记物超过阈值的概率。

[0149] 为证明分析尿样本以及肿瘤样本中标记物组合的价值,也应用TCC患者和非恶性对照的尿样本而获得的qPCR数据进行正态分布分析,所述数据在图1的系列2中描述。确定从TCC患者获得的qPCR数据值超过在非恶性样本分布中定义的阈值(例如,大于50%、70%、75%、80%、90%、95%或99%)的概率。

#### [0150] 检测尿中膀胱癌标记物的方法

[0151] 在一些实施方案中,需要对尿样本进行BTM试验。通常,用于这些体液中寡核苷酸、蛋白质和肽的试验方法为领域内公知。然而,出于阐述的目的,可应用夹心酶联免疫吸附试验(ELISA)对尿中的BTM水平进行定量。用于血浆或血清试验时,将5μl等份的适当稀释的样本或系列稀释的标准BTM和75μl过氧化物酶连接的抗人BTM抗体加到微滴定板的孔内。于30℃孵育30分钟后,用含0.05%吐温-20的磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤孔以移除未结合的抗体。然后将结合的BTM和抗BTM抗体复合体与含H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的邻苯二胺于30℃孵育15分钟。加入1M

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>终止反应,并用微滴定板读取器检测492nm处的吸光值。应当理解,抗BTM抗体可为单克隆抗体或多克隆抗血清。

[0152] 由于多种蛋白质为(1)由细胞分泌,(2)从细胞膜分开,(3)细胞死亡时从细胞内释放或(4)包含于脱落细胞内,因此可以理解,也可在尿中检测BTM。另外,可通过检测样本中的BTM表达或可通过检测样本中的BTM累积对膀胱癌进行诊断。现有技术中的诊断方法包括膀胱镜检查、细胞学检查以及检测由这些方法提取的细胞。此类方法依赖于对尿、尿道上皮刷检样本或在其它情况下的膀胱壁活检标本中肿瘤细胞进行鉴定。这些方法的缺点在于几种类型的误差,包括取样误差,观测者间的鉴定误差,等等。

[0153] 定量实时PCR

[0154] 实时或定量PCR (qPCR) 用于对PCR模板拷贝数进行绝对或相对定量。应用Primer Express V 2.0™ (Applied Biosystems) 设计Taqman™探针和引物组。如果可能,将所有潜在的剪接变体均包括在生成的扩增子中,其中的扩增子优选地在来自MWG-Biotech的微阵列寡核苷酸覆盖的区域。引物和探针序列在图2中显示。备选地,如果靶基因为由涵盖目的扩增子的Assay-on-Demand™表达试验 (Applied Biosystems) 所代表,则应用这些靶基因。在in-house设计的试验中,应用SYBR green标记方法和由参考RNA制备的cDNA滴定引物浓度。在ABI Prism™ 7000测序系统中以标准循环条件进行扩增。当观察到解离曲线中形成单一扩增产物时,应用最适引物浓度和5' FAM-3' TAMRA磷酸盐Taqman™探针 (Proligo) (终浓度250nM) 制备625倍浓度范围的标准曲线。给定的标准曲线回归系数大于0.98的试验用于随后的试验中。

[0155] 可在两个96孔平板上进行试验,每一RNA样本代表单一的cDNA。每一平板包含参考cDNA标准曲线,该曲线包括625倍的浓度范围并以二次重复进行。分析包括计算ΔCT (靶基因CT-平均参考cDNA CT)。ΔCT直接与Log2倍数改变的负值成比例。然后计算与非恶性Log2倍数改变的中位值相关的Log2倍数改变 (Log2倍数改变-正常Log2倍数改变中位值)。然后将倍数改变聚簇于频率等级内,并以盒须点制图或绘图。

[0156] 筛选膀胱恶性肿瘤的血清和尿标记物

[0157] 可从阵列数据中筛选推定的血清标记物,所述筛选基于(i)编码的蛋白质由细胞分泌或从胞膜分离的可能性;分泌可能性基于用TargetP™进行的分析 (Emanuelsson等;分子生物学杂志 (J. Mol. Biol.) 300,1005-1006 (2000)), 以及基于(ii) 其求和的秩分值。但是,肿瘤样本中过表达的变化程度不仅反映出肿瘤的异质性,也反映出肿瘤样本污染有“正常”组织的程度的变化性,所述“正常”组织包括平滑肌、结缔组织、粘膜下层细胞 (参见U.S 专利6,335,170)、基质细胞和非恶性上皮细胞。在多种情形下,“正常”污染的范围从5%到70%,其中位值约为25%。

[0158] 因此,通过分析尿样本中的BTM,我们已经能够减少这些“假阳性”结果,前述尿标本并未重度污染有正常膀胱细胞。此外,与先前文献中的使用微阵列方法相比,通过应用qPCR方法,我们已经能够更为精确地测定尿样本中的mRNA水平。因此,我们已经能够避免与其它膀胱细胞类型的主要污染,并因此避免了临床样本微阵列分析领域中一个较为棘手的问题。

[0159] 通过检测尿中标记物的累积,且并不依赖于肿瘤中的表达速率,我们出乎意料地发现了可用于检测膀胱癌并确定其阶段和/或其类型的多种BTM。此外,由于尿中存在血液

是导致病人就医并询问膀胱癌可能性的一个主要症状,因此,我们所证明的BTM并不在血液中高表达使得该标记物在诊断极具应用价值。这些标记物包括IGFBP5、MGP、SEMA3F和HOXA13(参见图9)。

[0160] 检测累积优于定义“过表达”。累积增加可反映出真正的分子生物学意义上的过表达或表达速率提高(即每单位时间的每细胞内核不均一RNA(hnRNA)分子、mRNA分子或蛋白质的数量增加)。但是,累积也可意指特定体积内(如尿中)的标记物数量增加,尽管表达速率并未提高。例如,即使肿瘤细胞产生正常数量的标记物,观测到样本中此类细胞数目的增加也可作为癌症存在的指标。此外,累积可反映出样本中的游离或可溶性RNA。在一些情况下,产生标记物的肿瘤细胞可发生死亡并将细胞成分释放到周围的组织中。如果细胞成分能够进入尿,则可在尿中检测出游离的标记物RNA。这些现象可能特别有助于浅表性膀胱癌的诊断,此类癌症通常很难获得满意的选择性和特异性。在尿中检测到标记物的累积可成为浅表性膀胱癌首批指征中的一个。因此,应用本发明的方法和设备,可对早期的膀胱癌进行检测。

[0161] 我们也注意到,在检测累积时,需小心校正样本体积的变化。例如,尿中每单位体积的标记物数量可依赖于受试者的肾功能。因此,在尿产生降低的情况下,尿中的细胞(包括肿瘤细胞)经过了浓缩,由此得出较高累积检测值(每单位体积)可能为假相。可通过独立地检测尿产量(例如,每单位时间内的尿输出量)和尿清除率(例如,检测肌酸酐或BUN)来减少此类假相的产生。相反,在尿输出量增加的情况下,如多尿症,含标记物的细胞进行了稀释并产生假相性的低累积检测值。但是,可对利尿剂的使用、水摄入量和其它可使标记物累积发生变异但并非与样本中标记物的真实累积或数量相关的其它因素进行控制。在这些情况下,可对尿产生速率校正标记物的数量。

[0162] 因此,与本领域内方法相比,我们的方法通过检测尿中的BTM,能够降低假阳性结果的发生率,表明这些方法优于本领域内方法。

[0163] 尿标记物选自以上描述的阵列数据,但并未应用从胞膜分泌或切割的标准。因此,预期不能用于血清标记物的胞内和膜结合的标记物可包括在尿标记物之内。

## 实施例

[0164] 于此描述的实施例用于对本发明的实施方案进行示例的目的,且并非意在限定本发明的范围。其它实施方案、方法和分析类型为分子诊断领域内的技术人员所熟知,无需在此详细描述。基于文中这些教导的在本领域范围内的实施方案也认为是本发明的一部分。

[0165] 实施例1:用于浅表性和浸润性膀胱恶性肿瘤的标记物的鉴定

[0166] 浸润性和浅表性膀胱癌基因表达模式的微阵列数据系统的遗传聚类分析显示出大量的显著差异。因此,在随后的分析中分别对这些癌症类型进行分别处理。然而,高比例的基因在两种类型的癌症中均为过表达。图3描述的表格显示了用于浸润性膀胱恶性肿瘤的标记物的微阵列研究结果。199个浸润性标记物中有31个符合以上描述的血清标记物标准(在图中以“S”表示)。图4描述的表格显示了用于浅表性膀胱恶性肿瘤的微阵列研究结果。170个浅表性标记物中有34个符合以上用于血清标记物的标准。图3和4包括基因的HUGO符号(“符号”)、MWG Biotech寡核苷酸编号、NCBI mRNA参考序列号、蛋白质参考序列号、肿瘤和非恶性基因表达间的平均倍数改变、肿瘤样本个体表达和非恶性样本表达中位值间的

最大倍数改变、Student's t-检验的未作调整的原始结果、双样本Wilcoxon检验的结果和求和的秩分值。

[0167] 浸润性膀胱癌标记物分析中的199个基因的平均倍数改变(肿瘤:非恶性组织)位于从1.3到5.3的范围内,且最大倍数改变位于从2.1到60.9范围内。用于浅表性膀胱癌分析时,170个标记物的过表达均值位于1.1.3到3.0之间,且最大过表达位于1.9到144之间。对于每一显示的标记物,发现其作为癌标记物特异性的统计显著性极高。除极少数例外,student t-检测值均低于 $10^{-3}$ ,表明应用这些标记物的诊断与膀胱癌密切相关。应当指出由微阵列研究得出的倍数改变倾向于低估了应用更为精确的如qPCR技术所观测到的实际表达变化。但是,由于别处描述的原因,微阵列分析可存在一种或多种严重的假相的问题。因此,我们发展了基于qPCR的方法以更为精确地检测膀胱癌的存在和分期。

[0168] 实施例2:qPCR分析

[0169] 应用qPCR对图3和4中显示的基因子集的基因表达进行更为敏感和精确的定量。应用30个浸润性膀胱肿瘤、25个浅表性膀胱肿瘤和18个正常尿道上皮样本的信使RNA进行微阵列分析鉴定出的18个基因(图3和4)进行分析,结果在图5中显示。显示了用于浸润性和浅表性类型膀胱癌的以下标记物的数据,标记物SPAG5、TOP2a、CDC2、ENG、NRP1、EGFL6、SEM2、CHGA、UBE2C、HOXA13、MDK、THY1、BIRC5和SMC4L1。与正常尿道上皮相比标记物SEMA3F、IGFBP5和NOV仅在浅表性类型中过表达,且MGP仅在浸润性类型中过表达;这些标记物保持与未过表达的肿瘤样本中的正常尿道上皮类似的表达水平。图5包括基因名称、基因别名、基因符号、肿瘤(T)和非恶性(N)组织间的倍数改变的中位值、肿瘤样本个体和非恶性组织表达中位值间的最大倍数改变、和其表达水平高于非恶性样本表达水平的95%的肿瘤样本的百分比。

[0170] 图5中标记物的倍数改变中位值(与非恶性组织表达中位值相比的肿瘤组织),除CHGA之外,对于浸润性膀胱肿瘤为2到128倍,且对于浅表性膀胱肿瘤为2到39倍。对于浸润性肿瘤的最大倍数改变为从24到2526倍,且对于浅表性肿瘤为从6倍到619倍。CHGA的表达模式值得注意,这是因为该标记物在一部分肿瘤(图6s-6t)中的表达非常高,但在其它肿瘤中的表达检测不到。其在15/25的浅表性肿瘤、15/29的浸润性肿瘤和9/10的正常样本中的表达检测不到。正常样本中的低表达排除了对肿瘤过表达水平与正常相比的比例进行精确定量,但如果可对BTM mRNA的累积进行检测并定量时,可将其用作膀胱癌诊断的基础。对于浸润性肿瘤,在大于等于90%的情况下,SPAG5、TOP2A和CDC2基因的表达水平在肿瘤中高于“正常”范围的95%。除BIRC5外,在浸润性肿瘤中检测的图5中的其余基因在大于45%的样本中的表达高于正常的95%。在浅表性肿瘤中,SPAG5、TOP2A、CDC2、ENG和NRP1基因在大于等于80%的情况下表达水平在肿瘤中高于非恶性范围的95%。除CHGA、UBE2C和BIRC5之外,在浅表性肿瘤中检测的图5中的其余基因在大于40%的样本中的表达高于正常的95%。

[0171] 图6a-6af描述的柱状图比较了观测的18个基因系列中每一个基因的表达频率(垂直轴)和该基因表达的Log2倍数改变(水平轴),图中所述表达即包括正常组织(开放条)也包括浅表性或浸润性肿瘤组织(黑条)。我们惊异地发现,这18个基因中的每一个在正常和肿瘤组织间的频率分布基本分离。例如,图6c描述了浸润性肿瘤中TOP2a表达的结果。仅观测到两个肿瘤样本其表达水平位于正常范围内。

[0172] 应用qPCR以从相同体积的尿中提取的总RNA为材料测定了病人和对照者尿中18个

BTM的累积(图1:样本系列1),所述BTM为SPAG5、TOP2A、CDC2、ENG、IGFBP5、NOV、NRP1、SEMA3F、EGFL6、MGP、SEM2、CHGA、UBE2C、HOXA13、MDK、THY1、BIRC5和SMC4L1。显示有17个BTM在患者尿样本中的累积高于对照尿样本,而EGFL6除外(图7)。17个BTM的倍数差异中位值位于从2倍到265倍之间。单一患者样本与对照的中位值水平的最大差异位于从26倍到>10,000倍。

[0173] 图8以盒须图显示了13个BTM的BTM转录物累积差异,且以对照样本的表达中位值进行归一化。图8显示尿中的MDK、SEMA3F和TOP2A在癌症患者和对照者之间不存在交叠。另外,IGFBP5、HOXA13、MGP、NRP1、SMC4L1、SPAG4和UBE2C转录物的高水平累积几乎总是与膀胱癌相关联。图8中描述的其余BTM(BIRC5、NOV和CDC2)在膀胱癌患者尿中的表达高于正常对照样本至少约3倍。

[0174] 血尿是引起患者注意并检测是否存在膀胱癌的主要临床症状(即尿中存在肉眼可见或显微镜下可见的血液)。血液通常为肉眼可见,或可应用尿“插入条(dipsticks)”化学检测血红蛋白。仅有分别约15%和4%的宏观可见和显微可见血尿的病例与膀胱癌有关。因此,膀胱癌测试需具有高特异性,重要的是全血中标记物的表达水平很低,或在一些情况下表达水平检测不到。因此,为提高对高特异性标记物的鉴定,应用qPCR以血液RNA为材料测定了图8中14个标记物中12个标记物的表达。应用从血液和膀胱肿瘤组织中提取的5 $\mu$ g总RNA和图2中显示的引物和探针进行qPCR。图9显示了每一标记物高出背景的循环数。标记物MGP、IGFBP5、SEMA3F和HoxA13的转录物不可在血液中检测出,但标记物SMC4L1和UBE2c在血液中特别表达。我们注意到,显示PCR循环数的数据,为固有的Log<sub>2</sub>绘图,因此1个循环数的增加表示信号的双倍提高。因此,评价肿瘤组织和血液中存在的标记物间的差异时,两个循环的差异表示4倍的表达差异。同样,5个循环的差异(例如对TOP2A而言)表明表达为2<sup>5</sup>或32倍的表达差异。已检测到其它如TOP2A和MDK标记物可在血液中表达,但由于血液中表达和膀胱肿瘤表达间存在巨大差异,因此仍可将它们视为合理的标记物。

[0175] 为进一步检测全血和膀胱肿瘤中标记物表达间的差异,并改进对膀胱癌尿标记物的筛选,应用另外的20个患者、13个正常对照和26个非恶性对照(图1:样本系列2)的尿RNA对选择的9个标记物进行进一步的分析。非恶性对照包括有下述20个样本,即通过细胞学检查或可在其尿中检出潜血或白血细胞。所有9个标记物均在对照和癌症患者样本间显示出差异,癌症患者样本的Log<sub>2</sub>过表达中位值与健康样本和非恶性样本相比分别为从5.4到10.4和从4.0到10.1(图10)。图11中显示了阐明该数据的盒须图。

[0176] 如由血液qPCR数据所预测的,与健康对照相比,标记物UBE2C和SMC4L1在非恶性对照尿中显示出明显的累积增加。与健康对照尿样本相比,非恶性样本的尿样本中NRP1也显著提高,并在癌症患者样本和非恶性患者样本间显示出明显交叠, TOP2A和MDK也显示出提高,但由于它们在TCC细胞中的表达极高,并因此在非恶性患者尿样本和癌症患者样本间维持了明显的差异。相反,与健康对照样本相比,HOXA13、IGFBP5、SEMA3F和MGP仅在非恶性尿样本中显示出轻度的提高。

[0177] 总体而言,6个标记物(SEMA3F、HOXA13、MDK、IGFBP5、MGP和TOP2A)在癌症患者样本和非恶性对照间显示出最小的交叠。剩余的3个标记物(NRP1、UBE2C、SMC4L1)在非恶性对照子集中显示出显著的提高并与癌症患者样本交叠。与健康对照相比RNA标记物在非恶性对照尿中的累积增加,与这些标记物在造血和内皮细胞源细胞中的表达一致,前述两种细胞

存在于非恶性疾病患者的尿中。因此,与不考虑血液中标记物表达的现有本领域方法相比,应用尿样本通过分别的标记物进行膀胱癌诊断可显示出敏感性和特异性的提高。该结果对基于现有技术的诊断方法而言,可为完全未预料的。

[0178] 数据显示了令人惊异的发现,将尿标记物用于膀胱癌时显示出高度敏感性和特异性,而仅应用肿瘤基因表达数据的微阵列分析则不能进行精确预测。需要将造血和/或内皮来源的细胞中假定标记物的表达考虑在内。可通过一些方法实现:(i) 血液RNA的qPCR分析,(ii) 表达数据库分析(例如,血液和血管/内皮细胞RNA的EST文库)和/或(iii)从未分级尿中提取的RNA进行qPCR分析。

[0179] 敏感性和特异性

[0180] 根据此处公开和分析的两个系列的样本,用于膀胱癌检测的敏感性超过95%。包括非恶性疾病患者样本的系列2中的特异性也超过95%。

[0181] 实施例3:多种标记物在膀胱癌检测中的用途

[0182] 图12a-12b描述的柱状图显示了与正常样本相比的肿瘤样本个体中其表达显著提高(“过表达”)的基因的数目。柱状图由图5中显示的首批的12个标记物获得的qPCR数据。30个浸润性肿瘤的PCR分析中,其中的27个(90%)至少有4个基因过表达超过95个百分点(图12a)。25个浅表性肿瘤的分析中,其中的23个(92%)至少有4个基因过表达超过95个百分点(图12b)。这些发现表明,与正常组织相比有多个基因过表达的情况下,癌症检测的可靠性可大为提高,并使得癌症诊断更为确切。但在一些情况下,单一标记物基因的表达提高足以诊断癌症。

[0183] 应用标记物组合成功区分肿瘤和非肿瘤样本的可靠性进一步在图13中描述的统计分析中说明。该分析比较了肿瘤和非恶性样本qPCR基因表达数据的正态分布。qPCR数据已在图5中进行总结。该分析显示了增加用于区分肿瘤和非恶性样本的标记物数目对检测敏感性(具有固定95%特异性)的影响。尽管18种标记物中仅有少数当单独用于该分析时其敏感性高于90、95或99%,但两种或三种标记物的组合可获得图14a和14b中两种或三种标记物的大量组合才可达到的高敏感性。

[0184] 图14a和14b显示了用于检测浸润性和浅表性移行细胞癌(TCC)的特异标记物和标记物组合的敏感性,前述检测具有固定的95%特异性。仅显示了敏感性>90%的组合。图14a中显示的15种标记物中,单独应用TOP2A, SPAG5和CDC2检测浸润性膀胱癌的敏感性约为95%。显示的其它标记物当单独应用时其敏感性较低。

[0185] 但是,两种上述标记物的组合可显著提高浸润性膀胱癌检测的敏感性(图13a和图14a)。发现在105个两种标记物组合中,有13个组合在应用时其敏感性高于95%。实际上,应用两种标记物时,在105个标记物组合中有42个组合的最低敏感性达到90%。

[0186] 用于浅表性膀胱癌(图13b和图14b)时,发现任何单一标记物的敏感性均未能超过90%,但是,136个双标记物组合中的11个组合达到了该阈值。22个三标记物组合的敏感性达到>95%。

[0187] 应用标记物组合也可显著提高应用尿样本检测膀胱癌的敏感性。图15和16显示了应用尿qPCR数据时单一标记物和标记物组合的检测敏感性。

[0188] 如图16中所示,尽管仅IGFBP5的敏感性>95%,但双标记物组合和37个三标记物组合达到该阈值。

[0189] 实施例4:浅表性和浸润性膀胱癌患者中转录物累积的差异

[0190] 从图5中可以看出,以下几种BTM在浸润性膀胱癌和浅表性膀胱癌中的表达存在差异,包括SEMA3F、HOXA13、TOP2A和SPAG5。为对此观察作以延伸,进一步比较了浸润性和浅表性膀胱癌患者尿中这些转录物的累积。

[0191] 从来自图1中描述的患者的等体积尿中提取RNA,并通过qPCR检测BTM累积。然后将特异BTM组合的累积表述为比值。BTM组合由下述BTM组成,一种BTM在浸润性膀胱肿瘤中的过表达高于浅表性膀胱肿瘤,且一种BTM在浅表性肿瘤中的过表达高于浸润性肿瘤。

[0192] 图17显示了对20个浅表性和14个浸润性TCC患者的尿样本进行的三个标记物组合的分析。显示的组合为:(i) TOP2A和HOXA13,(ii) TOP2A和IGFBP5和(iii) TOP2A和SEMA3F。可以看出这些标记物组合可将浅表性和浸润性TCC患者的尿标本区分开来。在浅表性和浸润性类型的TCC间的表达显示出差异的图5中的其它标记物,也能够用于尿样本分析来确定TCC类型。

[0193] 此外,图18显示可应用包括TOP2A的双标记物组合将浸润性膀胱癌区分为1期-2期和3期的肿瘤。

[0194] 这些观测显示测定尿中几种BTM转录物的累积可对浸润性和浅表性类型的膀胱癌进行区分。此外,应用qPCR测定膀胱癌患者尿样本的BTM比值来区分浸润性和浅表性类型的能力优于应用肿瘤RNA所进行的同样分析。图19对此进行了说明,所显示的盒须图用于:(i) TOP2A和HOXA13,(ii) TOP2A和IGFBP5和(iii) TOP2A和SEMA3F,应用来自约23个浅表性和28个浸润性膀胱肿瘤RNA制备物的qPCR数据;尽管这些BTM比值仍可允许对浅表性和浸润性类型膀胱癌进行区分,但在浅表性和浸润性比值间存在较大交叠。该发现可能反映了肿瘤RNA制备物污染有如肌肉和成纤维细胞的细胞类型,所述细胞具有不同于恶性细胞的BTM比值。备选地,该发现也可反映出脱落到尿中的恶性细胞的BTM表达与保留在肿瘤体的那些细胞的BTM表达具有较大的差异。无论何种原因导致了所观测的结果,我们的结论是,检测尿中BTM累积明显优于常规的组织样本微阵列分析。

[0195] 实施例5:膀胱肿瘤标记物的抗体

[0196] 在额外的方面中,本发明包括生成抗BTM抗体。应用此处描述的方法,可应用微阵列和/或qPCR方法鉴定出新型BTM。一旦鉴定出推定的标记物,可生产足够数量的标记物以适于引发免疫反应。在一些情况下,可应用全长BTM,而在其它情况下,BTM的肽片段足以作为免疫原。可将免疫原注射到适宜的宿主内(例如,小鼠、兔等),且如果需要,可注射佐剂以增强免疫反应,所述佐剂如弗氏完全佐剂和弗氏不完全佐剂。应当理解,抗体的制备为免疫学领域的常规技术且不需在此进一步描述。最终,可产生针对用此处描述的方法鉴定出的BTM或UBTM的抗体。

[0197] 而在进一步的实施方案中,可制备对抗此处描述的肿瘤标记物蛋白质或蛋白质核心的抗体,或制备抗BTM独特型寡核苷酸序列的抗体。尽管某些蛋白质可糖基化,但糖基化模式可存在差异,这因此可导致对缺乏通常糖基化模式的BTM形式的错误检测。因此,在本发明的某些方面中,BTM免疫原可包括去糖基化BTM或去糖基化BTM的片段。可应用领域内已知的一种或多种糖苷酶进行去糖基化反应。备选地,可在糖基化反应缺陷细胞系中表达BTM cDNA,所述细胞系如原核细胞系,包括大肠杆菌等。

[0198] 可制备载体以使其含有编码BTM的寡核苷酸。多种此类载体可基于领域内已知的

标准载体。可应用载体转染多种细胞系以产生BTM生产细胞系,该细胞系可产生所需数量的BTM用以产生特定抗体或其它制剂,所述抗体或制剂用于BTM检测或用于对研发的BTM或UBTM试验进行归一化。

#### [0199] 实施例6:试剂盒

[0200] 基于本发明的发现,可构想并产生几种类型的试验试剂盒。首先,可制备具有预包被有检测分子(或“捕获剂”)的检测装置的试剂盒。在用于检测BTM mRNA的实施方案中,此类装置可包含下述基质(例如,玻璃、硅、石英、金属等),该基质上结合有可与待检测mRNA杂交的作为捕获剂的寡核苷酸。在一些实施方案中,可通过mRNA(标记以cy3、cy5、放射性标记物或其它标记物)与基质上的寡核苷酸杂交实现对mRNA的直接检测。在其它实施方案中,mRNA的检测可通过以下步骤实现,首先制备与目的mRNA互补的DNA(cDNA)。然后将标记的cDNA与基质上的寡核苷酸杂交并进行检测。

[0201] 无论应用何种检测方法,均需要将受试BTM的表达与标准检测的表达进行比较。例如,可根据总细胞DNA、组成型表达的RNA(如核糖体RNA)的表达或其它相对恒定的标记物对RNA表达进行标准化。在检测体液(如尿)中的BTM的实施方案中,标准品可为文中所示的由未患恶性疾病的受试者获得的等体积尿。

[0202] 试剂盒中也可应用抗体作为捕获剂。在一些实施方案中,基质(如多孔平板)可含有与其连附的特异BTM或UBTM捕获剂。在一些实施方案中,试剂盒可包含封闭剂。封闭剂可用于减少非特异结合。例如,可应用不含BTM寡核苷酸的任何方便来源的过量DNA来减少非特异寡核苷酸的结合,所述DNA如鲑鱼精DNA。可应用过量的如血清白蛋白的封闭蛋白质减少非特异抗体结合。可以理解,用于检测寡核苷酸和蛋白质的多种方法为领域内公知,且可应用可特异检测BTM关联分子的任何策略并视为本发明的范围之内。

[0203] 在依赖抗体检测的实施方案中,可在每细胞基础上或在总细胞、组织或体液蛋白质、体液体积、组织质量(重量)的基础上表达BTM蛋白质或肽。另外,血清中的BTM可基于相对高含量的如白蛋白的血清蛋白质进行表达。

[0204] 除基质外,试验试剂盒可包含捕获剂(如探针)、洗液(例如,SSC、其它盐类、缓冲液、去污剂等),以及包含检测部分(例如,cy3、cy5、放射性标记物等)。试剂盒也可包括使用说明书和包装。

#### [0205] 实施例7:用于膀胱癌I检测的BTM组合

[0206] 在一系列实施方案中,可将用于测试BTM HOXA13、MGP、SEMA3F和TOP2A的试剂单独或以组合形式加入到试剂盒内,以用于测试未分级尿或尿细胞沉淀并实现膀胱癌的检测。这些BTM在癌症患者和对照中的累积范围在图20中显示。从已诊断有膀胱癌并需要监控疾病进程或治疗反应的患者或显现泌尿科症状或无症状的个体中收集尿样本,所述泌尿科症状包括宏观可见或显微可见的血尿。应用试剂盒测试患者或个体的未分级尿中的BTM时,需采取约2ml的尿用于试验。对于应用尿沉淀的试验,需收集>20ml的尿。

[0207] 适宜的试剂盒包括:(i)用于使用和解释结果的说明书,(ii)用于稳定和纯化未分级尿或尿沉淀中的RNA的试剂,(iii)用于cDNA合成的试剂,包括dNTPs和逆转录酶,和(iv)用于对BTM cDNA进行定量的试剂。在一种形式中,这些试剂将用于定量PCR,且包括特异的跨外显子寡核苷酸引物、标记以检测探针的第三寡核苷酸、Taq聚合酶和PCR所需的其它缓冲液、盐和dNTPs。试剂盒也可应用其它方法检测转录物,如BTM RNA与标记探针的直接杂交

或分支DNA技术；(v) 用于检测源自高转录基因的转录物以用作质量对照检测的寡核苷酸和探针，所述基因如 $\beta$ -肌动蛋白；和(vi) BTM靶序列的定量样本，所述定量样本用作内校准标准以及健康和非恶性对照中BTM转录物累积的上限参考。可将上限定义为对照范围的第95个或第99个百分点，但也可应用其它界限。特别地，用于浅表性膀胱癌诊断时，适宜的阈值为超过约50%，在其它情况下为超过约60%、70%或80%。

[0208] 因此，应用本发明的方法，可以优于现有技术方法的敏感性和特异性对膀胱癌以及膀胱癌的阶段和类型进行检测。

[0209] 在一些实施方案中，应用常规方法(如肌酸酐检测)对肾功能进行测定。在这些实施方案的一些实施方案中，可通过检测肾功能(例如，尿样本的尿体积、细胞体积、细胞数或总细胞蛋白质)对标记物累积进行校正。

[0210] 用于涉及qPCR的试验时，如果受试样本中的BTM累积高于上限多于一个PCR循环，则将超过预定上限的受试样本标定为阳性。对于其它检测方法，将高于正常上限(例如，第90个、95个或97.5个百分点)大于两倍的结果标定为阳性。

[0211] 实施例8：用于膀胱癌II检测的BTM组合

[0212] 在另一系列实施方案中，尿中TOP2A/SEMA3F和TOP2A/HOXA13中的一个或两个标记物组合的累积可用于提供诊断膀胱癌患者中存在的膀胱癌组织学类型的有力预测，所述膀胱癌的诊断应用任何类型的尿或血液试验实现。因此，对膀胱癌类型进行诊断时，可不需要膀胱镜检查和组织学检查。

[0213] 用于测试这些比值的试剂盒包含实施例7中描述的组分(i)到(iv)。根据标准qPCR方法对BTM累积进行定量后，计算TOP2A/SEMA3F和TOP2A/HOXA13比值。浅表性和浸润性膀胱癌患者尿中的这些比值范围在图21中显示。应用qPCR试验，TOP2A和SEMA3F间的差异小于5个循环，同时SEMA3F为最高丰度的转录物时，可预测为浸润性膀胱癌，且差异大于5个循环时可预测为浅表性膀胱癌。应用TOP2A和HOXA13时，差异小于8个循环，同时HOXA13为最高丰度的转录物时，可预测为浸润性膀胱癌，且差异大于8个循环时可预测为浅表性膀胱癌。

[0214] 实施例9：应用BTM评估膀胱癌进程

[0215] 为评估膀胱肿瘤的进程，通过膀胱壁活检获得组织样本，或通过随时间收集膀胱癌患者的尿样本。对不同时间采取的样本中BTM、UBTM或其组合的累积进行评估。BTM或UBTM分别的或组合的累积增加为膀胱癌进程的指征。

[0216] 实施例10：应用BTM评估膀胱癌的治疗

[0217] 为评估膀胱肿瘤的治疗效果，在治疗开始前采取组织和/或尿样本。测定一种或多种BTM或UBTM的基线水平，所述水平表述为多种BTM和UBTM彼此间的比值。起始治疗，且治疗可包括领域内已知的任何治疗，包括适于疾病类型和阶段的外科、放射治疗或化学治疗。治疗过程中，采取组织和/或尿样本并分析BTM和/或UBTM的存在及存在数量。测定多种BTM和UBTM比值，并将结果与以下所述进行比较：(1) 病人治疗前的基线水平，或(2) 由未患膀胱癌个体的群体获得的正常值。

[0218] 参考引入

[0219] 在此申请书中引用的所有出版物和专利均全部在此加入作为参考。本申请书包括核苷酸和/或蛋白质序列。计算机可读格式的序列列表及含序列列表的磁盘也包括于本发明之内并在此全部加入作为参考。

[0220] 工业适用性

[0221] 用于检测BTM和UBTM家族成员的方法,包括应用微阵列和/或实时PCR方法检测核酸、蛋白质和肽。本发明的组合物和方法可用于疾病诊断、疗效评价,以及用于生产适于测定BTM家族成员或UBTM家族成员的表达的试剂或试验试剂盒。

		序 列 表	
[0001]			
[0002]	<110>	环太平洋生物技术有限公司	
[0003]	<120>	用于膀胱癌检测的尿标记物	
[0004]	<130>	PEBL-01012W00	
[0005]	<150>	NZ534289	
[0006]	<151>	2004-07-23	
[0007]	<150>	NZ539,219	
[0008]	<151>	2005-04-4	
[0009]	<150>	US 60/692619	
[0010]	<151>	2005-06-20	
[0011]	<160>	39	
[0012]	<170>	PatentIn版本3.3	
[0013]	<210>	1	
[0014]	<211>	22	
[0015]	<212>	DNA	
[0016]	<213>	人	
[0017]	<400>	1	
[0018]		aattcagagg ccttctgaag ga	22
[0019]	<210>	2	
[0020]	<211>	20	
[0021]	<212>	DNA	
[0022]	<213>	人	
[0023]	<400>	2	
[0024]		ccgcccagac acctacattg	20
[0025]	<210>	3	
[0026]	<211>	16	
[0027]	<212>	DNA	
[0028]	<213>	人	
[0029]	<400>	3	
[0030]		gccgccgagg aataat	16
[0031]	<210>	4	
[0032]	<211>	23	
[0033]	<212>	DNA	
[0034]	<213>	人	
[0035]	<400>	4	
[0036]		gcaggtgtca gcaagtatga tca	23
[0037]	<210>	5	
[0038]	<211>	22	

[0039]	<212>	DNA	
[0040]	<213>	人	
[0041]	<400>	5	
[0042]	aattgtgacc	gcaaaggatt ct	22
[0043]	<210>	6	
[0044]	<211>	16	
[0045]	<212>	DNA	
[0046]	<213>	人	
[0047]	<400>	6	
[0048]	cggaccccag	caacca	16
[0049]	<210>	7	
[0050]	<211>	22	
[0051]	<212>	DNA	
[0052]	<213>	人	
[0053]	<400>	7	
[0054]	ggagtgtggt	gaccagcaag ac	22
[0055]	<210>	8	
[0056]	<211>	25	
[0057]	<212>	DNA	
[0058]	<213>	人	
[0059]	<400>	8	
[0060]	cctgtcattt	acgctgtctt tacct	25
[0061]	<210>	9	
[0062]	<211>	18	
[0063]	<212>	DNA	
[0064]	<213>	人	
[0065]	<400>	9	
[0066]	tgctctcctg	ggtggcag	18
[0067]	<210>	10	
[0068]	<211>	23	
[0069]	<212>	DNA	
[0070]	<213>	人	
[0071]	<400>	10	
[0072]	ttcatatccc	ctcagcagag atg	23
[0073]	<210>	11	
[0074]	<211>	19	
[0075]	<212>	DNA	
[0076]	<213>	人	
[0077]	<400>	11	

[0078]	ctcgaggtgt acgcgctgt	19
[0079]	<210> 12	
[0080]	<211> 21	
[0081]	<212> DNA	
[0082]	<213> 人	
[0083]	<400> 12	
[0084]	tacaaggaga tccggaaagg c	21
[0085]	<210> 13	
[0086]	<211> 19	
[0087]	<212> DNA	
[0088]	<213> 人	
[0089]	<400> 13	
[0090]	tgaacctggc catcagcat	19
[0091]	<210> 14	
[0092]	<211> 22	
[0093]	<212> DNA	
[0094]	<213> 人	
[0095]	<400> 14	
[0096]	tctgctgaac cagctcttct tg	22
[0097]	<210> 15	
[0098]	<211> 26	
[0099]	<212> DNA	
[0100]	<213> 人	
[0101]	<400> 15	
[0102]	ccctatagtt aatgccaaca tcttca	26
[0103]	<210> 16	
[0104]	<211> 26	
[0105]	<212> DNA	
[0106]	<213> 人	
[0107]	<400> 16	
[0108]	accttctcca attttctcta ttttgg	26
[0109]	<210> 17	
[0110]	<211> 21	
[0111]	<212> DNA	
[0112]	<213> 人	
[0113]	<400> 17	
[0114]	atggtgaggc agtgcacctt t	21
[0115]	<210> 18	
[0116]	<211> 18	

[0117]	<212>	DNA	
[0118]	<213>	人	
[0119]	<400>	18	
[0120]	cagcagatgc	cacgcttg	18
[0121]	<210>	19	
[0122]	<211>	23	
[0123]	<212>	DNA	
[0124]	<213>	小鼠	
[0125]	<400>	19	
[0126]	cccatcgaa	cacacagtta tct	23
[0127]	<210>	20	
[0128]	<211>	23	
[0129]	<212>	DNA	
[0130]	<213>	人	
[0131]	<400>	20	
[0132]	cgtcagcttg	ggaatagatg aag	23
[0133]	<210>	21	
[0134]	<211>	23	
[0135]	<212>	DNA	
[0136]	<213>	人	
[0137]	<400>	21	
[0138]	gcgaatatca	gccatggagt aga	23
[0139]	<210>	22	
[0140]	<211>	21	
[0141]	<212>	DNA	
[0142]	<213>	人	
[0143]	<400>	22	
[0144]	tagtgacaga	ccccaggctg a	21
[0145]	<210>	23	
[0146]	<211>	21	
[0147]	<212>	DNA	
[0148]	<213>	人	
[0149]	<400>	23	
[0150]	ttgagctcgt	ggacaggctt a	21
[0151]	<210>	24	
[0152]	<211>	18	
[0153]	<212>	DNA	
[0154]	<213>	人	
[0155]	<400>	24	

[0156]	gcccgttgaa aacctccc	18
[0157]	<210> 25	
[0158]	<211> 19	
[0159]	<212> DNA	
[0160]	<213> 人	
[0161]	<400> 25	
[0162]	caggcttccc agctccatc	19
[0163]	<210> 26	
[0164]	<211> 21	
[0165]	<212> DNA	
[0166]	<213> 人	
[0167]	<400> 26	
[0168]	cgttaggctg gtcaccttct g	21
[0169]	<210> 27	
[0170]	<211> 25	
[0171]	<212> DNA	
[0172]	<213> 人	
[0173]	<400> 27	
[0174]	acccaactgg tagggcttca tgcca	25
[0175]	<210> 28	
[0176]	<211> 30	
[0177]	<212> DNA	
[0178]	<213> 人	
[0179]	<400> 28	
[0180]	ttctgtggaa ttagtgacct agcaaattgtg	30
[0181]	<210> 29	
[0182]	<211> 31	
[0183]	<212> DNA	
[0184]	<213> 人	
[0185]	<400> 29	
[0186]	agccgggatc taccataccc attgactaac t	31
[0187]	<210> 30	
[0188]	<211> 27	
[0189]	<212> DNA	
[0190]	<213> 人	
[0191]	<400> 30	
[0192]	aatgaggcgg tgggtcaatat cctgtcgc	27
[0193]	<210> 31	
[0194]	<211> 27	

[0195]	<212>	DNA			
[0196]	<213>	人			
[0197]	<400>	31			
[0198]	aagagaaagc	agtgcaaacc	ttcccgt	27	
[0199]	<210>	32			
[0200]	<211>	22			
[0201]	<212>	DNA			
[0202]	<213>	人			
[0203]	<400>	32			
[0204]	tggcatctgc	acggcggtag	ag	22	
[0205]	<210>	33			
[0206]	<211>	27			
[0207]	<212>	DNA			
[0208]	<213>	人			
[0209]	<400>	33			
[0210]	cccattcagg	atcacacagg	agatggc	27	
[0211]	<210>	34			
[0212]	<211>	22			
[0213]	<212>	DNA			
[0214]	<213>	人			
[0215]	<400>	34			
[0216]	ctctggctcc	gtgttccgag	gc	22	
[0217]	<210>	35			
[0218]	<211>	20			
[0219]	<212>	DNA			
[0220]	<213>	人			
[0221]	<400>	35			
[0222]	acgcggccag	tgcaaggcat		20	
[0223]	<210>	36			
[0224]	<211>	32			
[0225]	<212>	DNA			
[0226]	<213>	人			
[0227]	<400>	36			
[0228]	agagctaaag	tccaagagag	gatccgagaa	cg	32
[0229]	<210>	37			
[0230]	<211>	23			
[0231]	<212>	DNA			
[0232]	<213>	人			
[0233]	<400>	37			

---

[0234]	caccgtcagt gccgtgttcc agg	23
[0235]	<210> 38	
[0236]	<211> 24	
[0237]	<212> DNA	
[0238]	<213> 人	
[0239]	<400> 38	
[0240]	agagtcggtc ggaggctctg gctg	24
[0241]	<210> 39	
[0242]	<211> 27	
[0243]	<212> DNA	
[0244]	<213> 人	
[0245]	<400> 39	
[0246]	tgctaacagt cttgcaggtc tcccag	27

样本	系列 1	系列 2
<b>TCC 患者</b>		
浅表性	7	13
浸润性	10	4
原位癌	2	1
未知的阶段	2	2
<b>非恶性 对照</b>		
神经性膀胱		6
前列腺增生		9
尿石病		9
感染		2
健康对照	10	13

图1

名称	别名	符号	正向引物	Seq ID #	反向引物	Seq ID #	探针	Seq ID #
精子相关抗原 5	MAP126; DEEPST1; HMAP126	SPAG5	AATTCAGAGCCCTCTGAAGGA	1	TCTGCTGAAACCAGCTCTCTTG	14	ACCCAACTGGTAGGGCTTCATGCCA	27
拓扑异构酶 (DNA) II $\alpha$ -170kDa	TOP2A	TOP2A	CGCCCCAGACACCTACATTC	2	CCCTATAGTAAAGCCACATCTTC	15	TTCTGTGGAAATTAGTACCAGCAAAATGTG	28
细胞分裂周期 2, G1 至 S 和 G2 至 M	CDK1	CDK2	GCCGCCGGGGAAATAAT	3	ACCTTCTCCAAATTTCTCTATTTTG	16	AGCCGGGATCTTACCATACCACCTTGGACTAACT	29
内皮糖蛋白 (遗传出血性毛细血管扩张综合征 1)	END; ORW; HHT1; ORW1; CD105	ENG	GCAGGTGTCCAGCAAGTATGATCA	4	ATGTTGAGCGAGTGCACCTTT	17	AATGAGGCGGTGGTCAATATCCTGTGG	30
胰岛素样生长因子结合蛋白 5	IGFBP5	IGFBP5	AATTGTGACCGCAAGGATTCT	5	CAGCAGATGCCACGCTTG	18	AAGAGAAAGCAGTGGAAACCTTCCCGT	31
肾癌细胞增殖过表达的基因	CCN3; NOVH; IGFBP9	NOV	CGACCCAGCAACCA	6	CCCCATCCAAACACACAGTATCT	19	TGGCATCTGACGGGGGTAGAG	32
神经丝蛋白 1	NRP; VEGF165R	NRP1	GGAGTGTGTGAGCCAGGAAAGAC	7	CGTGAAGCTTGGGAAATAGATGAAG	20	CCCATTCAGGATCACACAGGAGATGSC	33
sema 结构域, 免疫球蛋白结构域 (0), 短碱性结构域, 分泌的, (神经号蛋白) 3F	SEMA4; SEMAK; SEMA-IV; sema IV	SEMA3F	CCGTGTCAATTTAGCGTGTCTTTAQC	8	GCGAATATCAGCCATGGAGTAGA	21	CTCTGGCTCCCGTGTTCGGAGGC	34
EGF 样结构域, 多个 6	DKFZP664F2063; DKFZ0564F2063	EGFL6	TGCTCTCTCGGTTGGCAG	9	TAGTGACAGACCCAGGCTGA	22	ACGCGGCCAGTGCAGGGCAT	35
表皮生长因子受体	NTI; MGLAP	MGP	TTCAATCCCTCAGCAGAGATG	10	TTGAGCTCGTGGACAGGCTTA	23	AGAGCTAAAAGTCCAAAGAGAGGATCCGAGAAC	36
神经生长蛋白 2	LOC56920; FLJ00014	SEMA2	CTCGAGGTGTACCGGCTGT	11	GCCGTTGAAACCTCCG	24	CACCGTCAAGTCCGCTGTTCCAGG	37
嗜神经蛋白 A (甲状腺分泌蛋白 1)	CGA	CHGA	TACAAGGAGATCCGGAAAGGC	12	CAGSCTCCACGCTCCATC	25	AGAGTGGTCCGAGGCTCTGGCTG	38
Thy-1 细胞表面抗原	CD80	THY1	TGAACCTGGCCATCAGGCAT	13	CGTTAGGCTGGTCACTTCTG	26	TGCTAACAGTCTTGCAGGCTCTCCCGAG	39
髓鞘蛋白 13	UBQH10; dL447F3.2	UBQ2C						
同源框 A13	HOXA13	HOXA13						
中期因子 (神经发生促进因子 2)	NEGF2	MDK	Tagman(R) Gene Expression Assay Hs00426284_m1					
含有坏死病毒 IAP 重复序列 5 (存活蛋白)	API6; EPR-1	BIRC5	Tagman(R) Gene Expression Assay Hs00171064_m1					
染色体 4 的 SMC4 结构域样蛋白 1 (酵母)	CAPC; hCAP-C	SMC4L1	Tagman(R) Gene Expression Assay Hs00969709_g1					

图 2



基因名称	HUGO	MWG oligo #	NCBI mRNA 参考序列	平均倍率新序列	最大倍率改变	T 检验	Wilcoxon 检验	总和秩	血清新的?
前列腺素 12 (前列腺素) 受体	PTGER2	89	NM_009863.3	NP_009863.1	3.2	31.5	3.9E-07	4.09E-08	270.5
BCN 的 L1 亚型 (BCN1)	BCN1	88	NM_145785.1	NP_068738.1	1.8	3.3	2.7E-06	4.9E-08	270.5
乙酰胺与丙酮酸-乙酮的逆反应	HAMR	102	NM_016017.1	NP_056017.1	2.7	6.8	1.8E-05	0.00000726	291
肌蛋白 6	CLONE	87	NM_021185.2	NP_067018.1	3.2	30.1	7.9E-07	6.07E-08	286.5
肌蛋白 11 (Hic)	HST1H1D	87	NM_008330.2	NP_053311.1	2.1	4.8	4.9E-06	7.37E-08	305.5
染色体 10 号区域 3	CLONE2		NM_016151.3	NP_069012.2	2.1	4.3	9E-06	6.07E-08	300.5
果糖胺酶 1	KITCE1	91	NM_014708.3	NP_055823.1	2.2	4.2	2.4E-01	0.00000068	305
果糖胺酶 2	KITCE2	91	NM_014709.3	NP_055824.1	2.2	4.2	2.4E-01	0.00000068	305
果糖胺酶 3	KITCE3	91	NM_014710.3	NP_055825.1	2.2	4.2	2.4E-01	0.00000068	305
果糖胺酶 4	KITCE4	91	NM_014711.3	NP_055826.1	2.2	4.2	2.4E-01	0.00000068	305
果糖胺酶 5	KITCE5	91	NM_014712.3	NP_055827.1	2.2	4.2	2.4E-01	0.00000068	305
果糖胺酶 6	KITCE6	91	NM_014713.3	NP_055828.1	2.2	4.2	2.4E-01	0.00000068	305
果糖胺酶 7	KITCE7	91	NM_014714.3	NP_055829.1	2.2	4.2	2.4E-01	0.00000068	305
果糖胺酶 8	KITCE8	91	NM_014715.3	NP_055830.1	2.2	4.2	2.4E-01	0.00000068	305
果糖胺酶 9	KITCE9	91	NM_014716.3	NP_055831.1	2.2	4.2	2.4E-01	0.00000068	305
果糖胺酶 10	KITCE10	91	NM_014717.3	NP_055832.1	2.2	4.2	2.4E-01	0.00000068	305
果糖胺酶 11	KITCE11	91	NM_014718.3	NP_055833.1	2.2	4.2	2.4E-01	0.00000068	305
果糖胺酶 12	KITCE12	91	NM_014719.3	NP_055834.1	2.2	4.2	2.4E-01	0.00000068	305
果糖胺酶 13	KITCE13	91	NM_014720.3	NP_055835.1	2.2	4.2	2.4E-01	0.00000068	305
果糖胺酶 14	KITCE14	91	NM_014721.3	NP_055836.1	2.2	4.2	2.4E-01	0.00000068	305
果糖胺酶 15	KITCE15	91	NM_014722.3	NP_055837.1	2.2	4.2	2.4E-01	0.00000068	305
果糖胺酶 16	KITCE16	91	NM_014723.3	NP_055838.1	2.2	4.2	2.4E-01	0.00000068	305
果糖胺酶 17	KITCE17	91	NM_014724.3	NP_055839.1	2.2	4.2	2.4E-01	0.00000068	305
果糖胺酶 18	KITCE18	91	NM_014725.3	NP_055840.1	2.2	4.2	2.4E-01	0.00000068	305
果糖胺酶 19	KITCE19	91	NM_014726.3	NP_055841.1	2.2	4.2	2.4E-01	0.00000068	305
果糖胺酶 20	KITCE20	91	NM_014727.3	NP_055842.1	2.2	4.2	2.4E-01	0.00000068	305
果糖胺酶 21	KITCE21	91	NM_014728.3	NP_055843.1	2.2	4.2	2.4E-01	0.00000068	305
果糖胺酶 22	KITCE22	91	NM_014729.3	NP_055844.1	2.2	4.2	2.4E-01	0.00000068	305
果糖胺酶 23	KITCE23	91	NM_014730.3	NP_055845.1	2.2	4.2	2.4E-01	0.00000068	305
果糖胺酶 24	KITCE24	91	NM_014731.3	NP_055846.1	2.2	4.2	2.4E-01	0.00000068	305
果糖胺酶 25	KITCE25	91	NM_014732.3	NP_055847.1	2.2	4.2	2.4E-01	0.00000068	305
果糖胺酶 26	KITCE26	91	NM_014733.3	NP_055848.1	2.2	4.2	2.4E-01	0.00000068	305
果糖胺酶 27	KITCE27	91	NM_014734.3	NP_055849.1	2.2	4.2	2.4E-01	0.00000068	305
果糖胺酶 28	KITCE28	91	NM_014735.3	NP_055850.1	2.2	4.2	2.4E-01	0.00000068	305
果糖胺酶 29	KITCE29	91	NM_014736.3	NP_055851.1	2.2	4.2	2.4E-01	0.00000068	305
果糖胺酶 30	KITCE30	91	NM_014737.3	NP_055852.1	2.2	4.2	2.4E-01	0.00000068	305
果糖胺酶 31	KITCE31	91	NM_014738.3	NP_055853.1	2.2	4.2	2.4E-01	0.00000068	305
果糖胺酶 32	KITCE32	91	NM_014739.3	NP_055854.1	2.2	4.2	2.4E-01	0.00000068	305
果糖胺酶 33	KITCE33	91	NM_014740.3	NP_055855.1	2.2	4.2	2.4E-01	0.00000068	305
果糖胺酶 34	KITCE34	91	NM_014741.3	NP_055856.1	2.2	4.2	2.4E-01	0.00000068	305
果糖胺酶 35	KITCE35	91	NM_014742.3	NP_055857.1	2.2	4.2	2.4E-01	0.00000068	305
果糖胺酶 36	KITCE36	91	NM_014743.3	NP_055858.1	2.2	4.2	2.4E-01	0.00000068	305
果糖胺酶 37	KITCE37	91	NM_014744.3	NP_055859.1	2.2	4.2	2.4E-01	0.00000068	305
果糖胺酶 38	KITCE38	91	NM_014745.3	NP_055860.1	2.2	4.2	2.4E-01	0.00000068	305
果糖胺酶 39	KITCE39	91	NM_014746.3	NP_055861.1	2.2	4.2	2.4E-01	0.00000068	305
果糖胺酶 40	KITCE40	91	NM_014747.3	NP_055862.1	2.2	4.2	2.4E-01	0.00000068	305
果糖胺酶 41	KITCE41	91	NM_014748.3	NP_055863.1	2.2	4.2	2.4E-01	0.00000068	305
果糖胺酶 42	KITCE42	91	NM_014749.3	NP_055864.1	2.2	4.2	2.4E-01	0.00000068	305
果糖胺酶 43	KITCE43	91	NM_014750.3	NP_055865.1	2.2	4.2	2.4E-01	0.00000068	305
果糖胺酶 44	KITCE44	91	NM_014751.3	NP_055866.1	2.2	4.2	2.4E-01	0.00000068	305
果糖胺酶 45	KITCE45	91	NM_014752.3	NP_055867.1	2.2	4.2	2.4E-01	0.00000068	305
果糖胺酶 46	KITCE46	91	NM_014753.3	NP_055868.1	2.2	4.2	2.4E-01	0.00000068	305
果糖胺酶 47	KITCE47	91	NM_014754.3	NP_055869.1	2.2	4.2	2.4E-01	0.00000068	305
果糖胺酶 48	KITCE48	91	NM_014755.3	NP_055870.1	2.2	4.2	2.4E-01	0.00000068	305
果糖胺酶 49	KITCE49	91	NM_014756.3	NP_055871.1	2.2	4.2	2.4E-01	0.00000068	305
果糖胺酶 50	KITCE50	91	NM_014757.3	NP_055872.1	2.2	4.2	2.4E-01	0.00000068	305
果糖胺酶 51	KITCE51	91	NM_014758.3	NP_055873.1	2.2	4.2	2.4E-01	0.00000068	305
果糖胺酶 52	KITCE52	91	NM_014759.3	NP_055874.1	2.2	4.2	2.4E-01	0.00000068	305
果糖胺酶 53	KITCE53	91	NM_014760.3	NP_055875.1	2.2	4.2	2.4E-01	0.00000068	305
果糖胺酶 54	KITCE54	91	NM_014761.3	NP_055876.1	2.2	4.2	2.4E-01	0.00000068	305
果糖胺酶 55	KITCE55	91	NM_014762.3	NP_055877.1	2.2	4.2	2.4E-01	0.00000068	305
果糖胺酶 56	KITCE56	91	NM_014763.3	NP_055878.1	2.2	4.2	2.4E-01	0.00000068	305
果糖胺酶 57	KITCE57	91	NM_014764.3	NP_055879.1	2.2	4.2	2.4E-01	0.00000068	305
果糖胺酶 58	KITCE58	91	NM_014765.3	NP_055880.1	2.2	4.2	2.4E-01	0.00000068	305
果糖胺酶 59	KITCE59	91	NM_014766.3	NP_055881.1	2.2	4.2	2.4E-01	0.00000068	305
果糖胺酶 60	KITCE60	91	NM_014767.3	NP_055882.1	2.2	4.2	2.4E-01	0.00000068	305
果糖胺酶 61	KITCE61	91	NM_014768.3	NP_055883.1	2.2	4.2	2.4E-01	0.00000068	305
果糖胺酶 62	KITCE62	91	NM_014769.3	NP_055884.1	2.2	4.2	2.4E-01	0.00000068	305
果糖胺酶 63	KITCE63	91	NM_014770.3	NP_055885.1	2.2	4.2	2.4E-01	0.00000068	305
果糖胺酶 64	KITCE64	91	NM_014771.3	NP_055886.1	2.2	4.2	2.4E-01	0.00000068	305
果糖胺酶 65	KITCE65	91	NM_014772.3	NP_055887.1	2.2	4.2	2.4E-01	0.00000068	305
果糖胺酶 66	KITCE66	91	NM_014773.3	NP_055888.1	2.2	4.2	2.4E-01	0.00000068	305
果糖胺酶 67	KITCE67	91	NM_014774.3	NP_055889.1	2.2	4.2	2.4E-01	0.00000068	305
果糖胺酶 68	KITCE68	91	NM_014775.3	NP_055890.1	2.2	4.2	2.4E-01	0.00000068	305
果糖胺酶 69	KITCE69	91	NM_014776.3	NP_055891.1	2.2	4.2	2.4E-01	0.00000068	305
果糖胺酶 70	KITCE70	91	NM_014777.3	NP_055892.1	2.2	4.2	2.4E-01	0.00000068	305
果糖胺酶 71	KITCE71	91	NM_014778.3	NP_055893.1	2.2	4.2	2.4E-01	0.00000068	305
果糖胺酶 72	KITCE72	91	NM_014779.3	NP_055894.1	2.2	4.2	2.4E-01	0.00000068	305
果糖胺酶 73	KITCE73	91	NM_014780.3	NP_055895.1	2.2	4.2	2.4E-01	0.00000068	305
果糖胺酶 74	KITCE74	91	NM_014781.3	NP_055896.1	2.2	4.2	2.4E-01	0.00000068	305
果糖胺酶 75	KITCE75	91	NM_014782.3	NP_055897.1	2.2	4.2	2.4E-01	0.00000068	305
果糖胺酶 76	KITCE76	91	NM_014783.3	NP_055898.1	2.2	4.2	2.4E-01	0.00000068	305
果糖胺酶 77	KITCE77	91	NM_014784.3	NP_055899.1	2.2	4.2	2.4E-01	0.00000068	305
果糖胺酶 78	KITCE78	91	NM_014785.3	NP_055900.1	2.2	4.2	2.4E-01	0.00000068	305
果糖胺酶 79	KITCE79	91	NM_014786.3	NP_055901.1	2.2	4.2	2.4E-01	0.00000068	305
果糖胺酶 80	KITCE80	91	NM_014787.3	NP_055902.1	2.2	4.2	2.4E-01	0.00000068	305
果糖胺酶 81	KITCE81	91	NM_014788.3	NP_055903.1	2.2	4.2	2.4E-01	0.00000068	305
果糖胺酶 82	KITCE82	91	NM_014789.3	NP_055904.1	2.2	4.2	2.4E-01	0.00000068	305
果糖胺酶 83	KITCE83	91	NM_014790.3	NP_055905.1	2.2	4.2	2.4E-01	0.00000068	305
果糖胺酶 84	KITCE84	91	NM_014791.3	NP_055906.1	2.2	4.2	2.4E-01	0.00000068	305
果糖胺酶 85	KITCE85	91	NM_014792.3	NP_055907.1	2.2	4.2	2.4E-01	0.00000068	305
果糖胺酶 86	KITCE86	91	NM_014793.3	NP_055908.1	2.2	4.2	2.4E-01	0.00000068	305
果糖胺酶 87	KITCE87	91	NM_014794.3	NP_055909.1	2.2	4.2	2.4E-01	0.00000068	305
果糖胺酶 88	KITCE88	91	NM_014795.3	NP_055910.1	2.2	4.2	2.4E-01	0.00000068	305
果糖胺酶 89	KITCE89	91	NM_014796.3	NP_055911.1	2.2	4.2	2.4E-01	0.00000068	305
果糖胺酶 90	KITCE90	91	NM_014797.3	NP_055912.1	2.2	4.2	2.4E-01	0.00000068	305
果糖胺酶 91	KITCE9								





基因名称	HUGO	MWG oligo #	NCBI mRNA 参考序列	蛋白质参考 序列	平均 倍数 改变	最大 倍数 改变	T 检验	Wilcoxon 检验	总和秩	血清 新的?
MAX 二聚体蛋白 4	MXD4	mwhuman3064A082 58	NM 008445-2	NP 008445.1	1.7	4.1	1.1E-05	0.000134	1718.5	
磷酸肌醇 1-磷酸酯受体蛋白-2	FAPP2	mwhuman3064A089 64	NM 026510-2	NP 116028.1	1.5	3.3	1.6E-05	3.66781E-05	1725.5	新的
核孔蛋白 210	NUP210	mwhuman3064B741 29	NM 024921-2	NP 079199-2	1.6	2.8	6.9E-05	0.00104262	1728.5	新的
Carc 酪氨酸激酶	CSK	mwhuman3064A016 29	NM 004383.1	NP 004374.1	1.5	5.1	7.3E-05	8.58148E-07	3601	
神经总蛋白 1	NRP1	mwhuman3064A030 81	NM 003873-2	NP 003854-2	2.3	17.2	0.00276	0.00472854	6359	

图3(接上页)







名称	别名	符号	浸润性			浅表性		
			中位值T:N 倍数改变	最大T:N 倍数改变	%T > 正常的 95%	中位值T:N 倍数改变	最大T:N 倍数改变	%T > 正常的 95%
精子相关抗原 5	MAP126; DEEPEST; hMAP126	SPAG5	40	516	93	8	60	83
拓扑异构酶(DNA) II α 170kDa	TOP2; TP2A	TOP2A	128	1136	93	39	417	88
细胞分裂周期2, G1至S 和G2至M	CDK1	CDC2	121	2526	93	27	152	88
内皮糖蛋白 (遗传出血性 毛细血管扩张综合征 I)	END; ORW; HHT1; ORW1; CD105	ENG	4	32	57	8	35	84
胰岛素样生长因子 结合蛋白 5	IBP5	IGFBP5				7	164	60
肾脏细胞瘤过量 表达的基因	CCN3; NOVH; IGFBP9	NOV				4	16	65
神经毡蛋白 1	NRP; VEGF165R	NRP1	7	195	89	10	37	80
sema 结构域, 免疫球蛋白结构域(g), 短碱性结构域, 分泌的。(脑信号蛋白) 3F	SEMA4; SEMAK; SEMA-IV; sema IV	SEMA3F				2	6	68
EGF 样结构域, 多个 6	W80; MAEG; DKFZP564P2063; DKFZp564P2063	EGFL6	4	37	55	4	59	67
基质Gla-蛋白	NTI; MGLAP	MGP	3	1303	59			
脑信号蛋白 sem2	LOC56920; FLJ00014	SEM2	6	54	72	9	38	75
嗜铬粒蛋白A (甲状旁 腺分泌蛋白 1)	CGA	CHGA	0	4096	48	5	>10,000	36
遍在蛋白羧基酶 E2C	UBCH10; dJ447F3.2	UBE2C	44	219	47	11	619	14
同源框 A13	HOX1; HOX1J	HOXA13	4	58	46	11	117	67
中期因子 (神经突生 长促进因子 2)	NEGF2	MDK	2	56	59	2	8	68
Thy-1 细胞表面抗原	CD90	THY1	48	481	89	21	79	86

图5

名称	别名	符号	浸润性			浅表性		
			中位值T:N 倍数改变	最大T:N 倍数改变	%T > 正常的 95%	中位值T:N 倍数改变	最大T:N 倍数改变	%T > 正常的 95%
含有杆状病毒IAP重复 序列 5 (存活蛋白)	API4; EPR-1	BIRC5	28	140	12	9	293	14
染色体 4 的 SMC4 结构维持样 1 (酵母)	CAPC; hCAP-C	SMC4L1	6	24	59	3	16	43

图5(接上页)

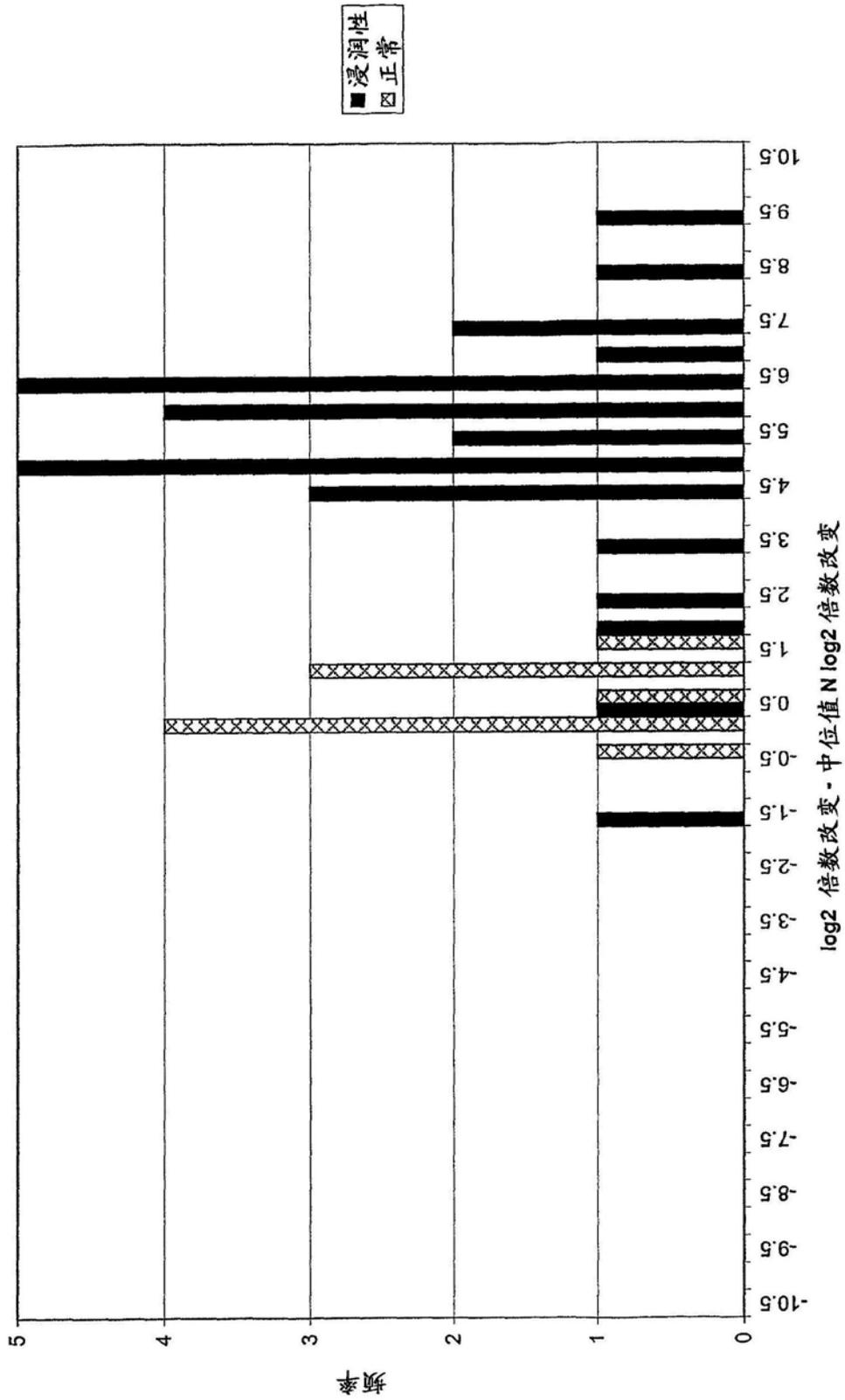


图6a

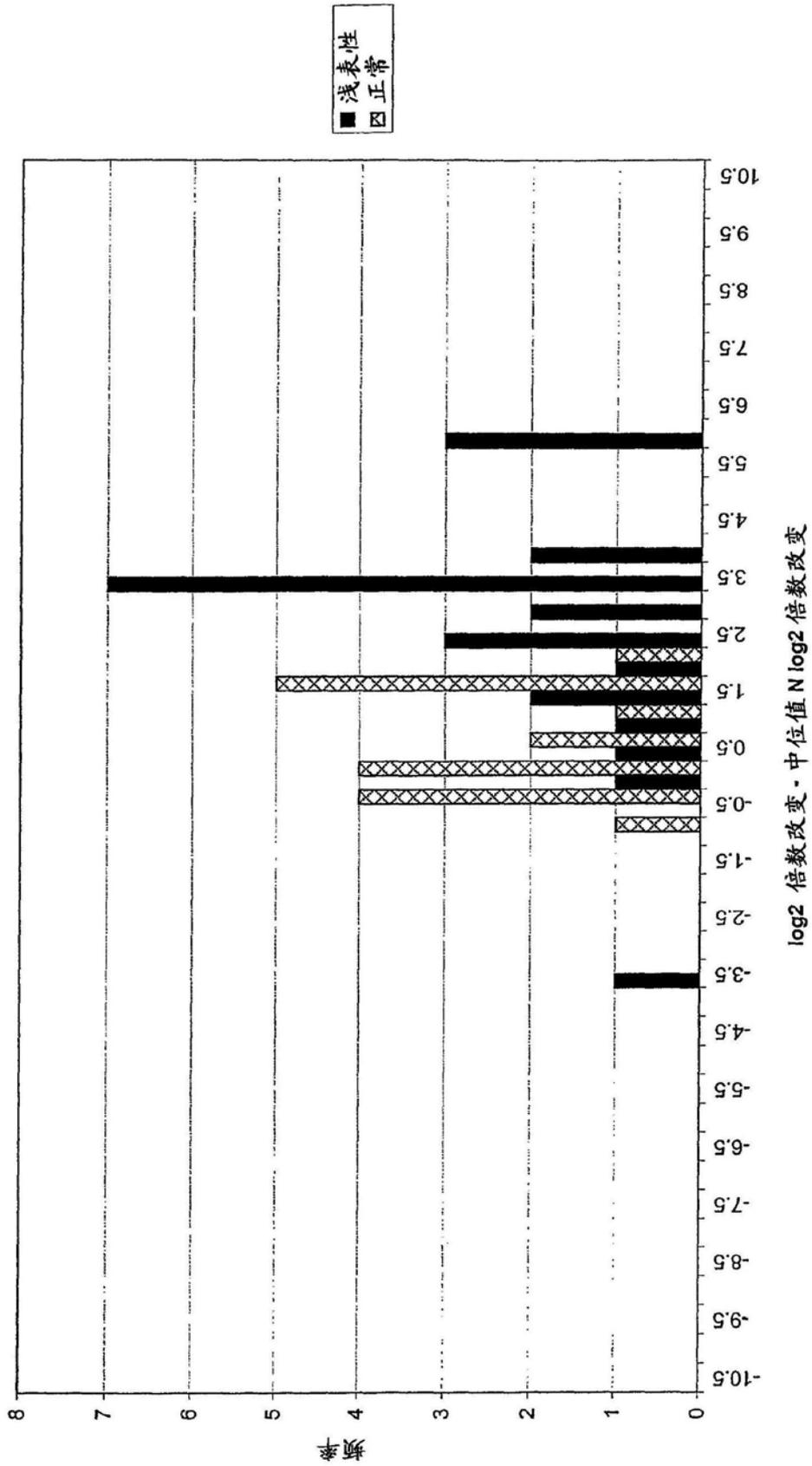


图6b

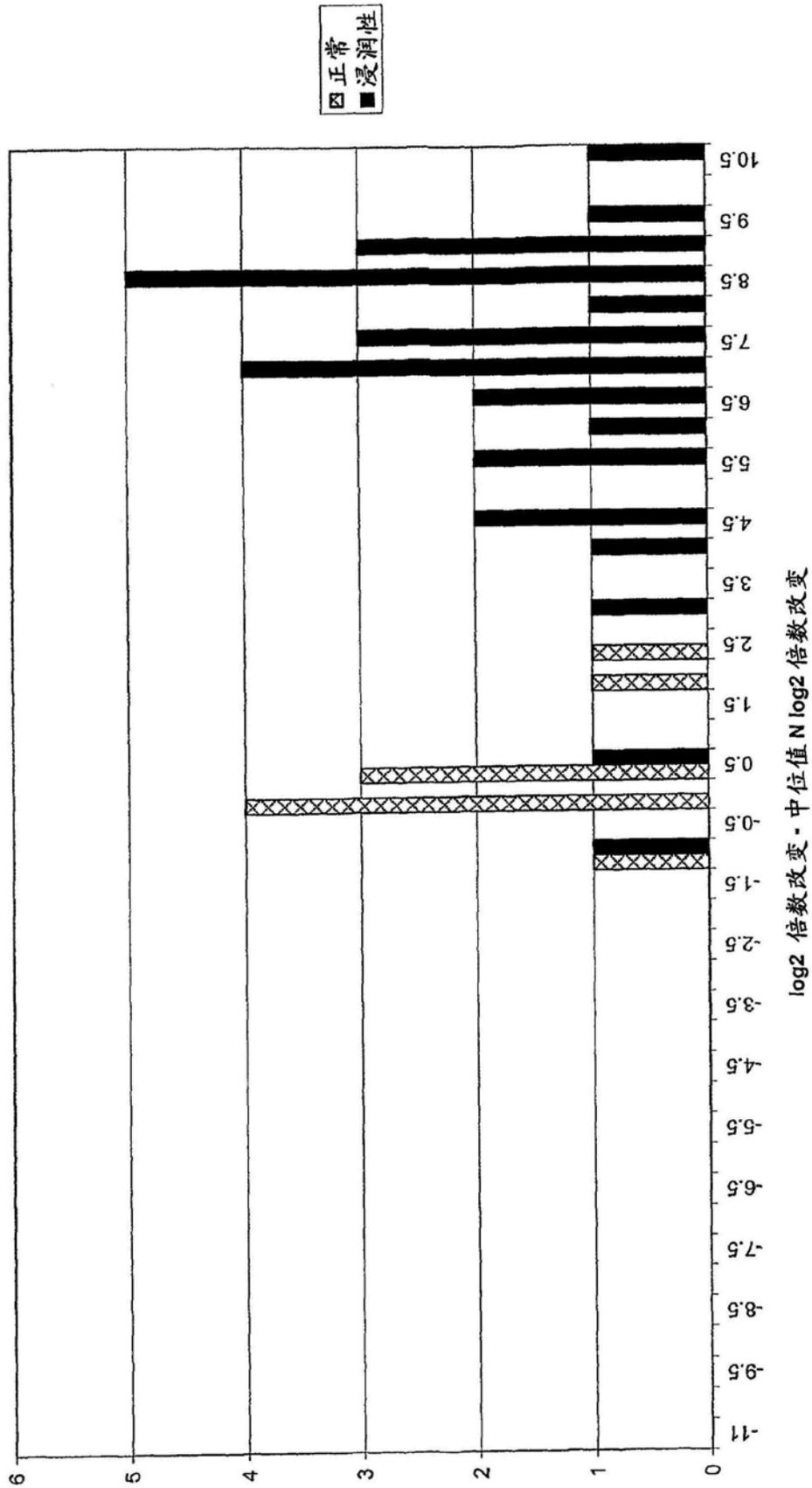


图6c

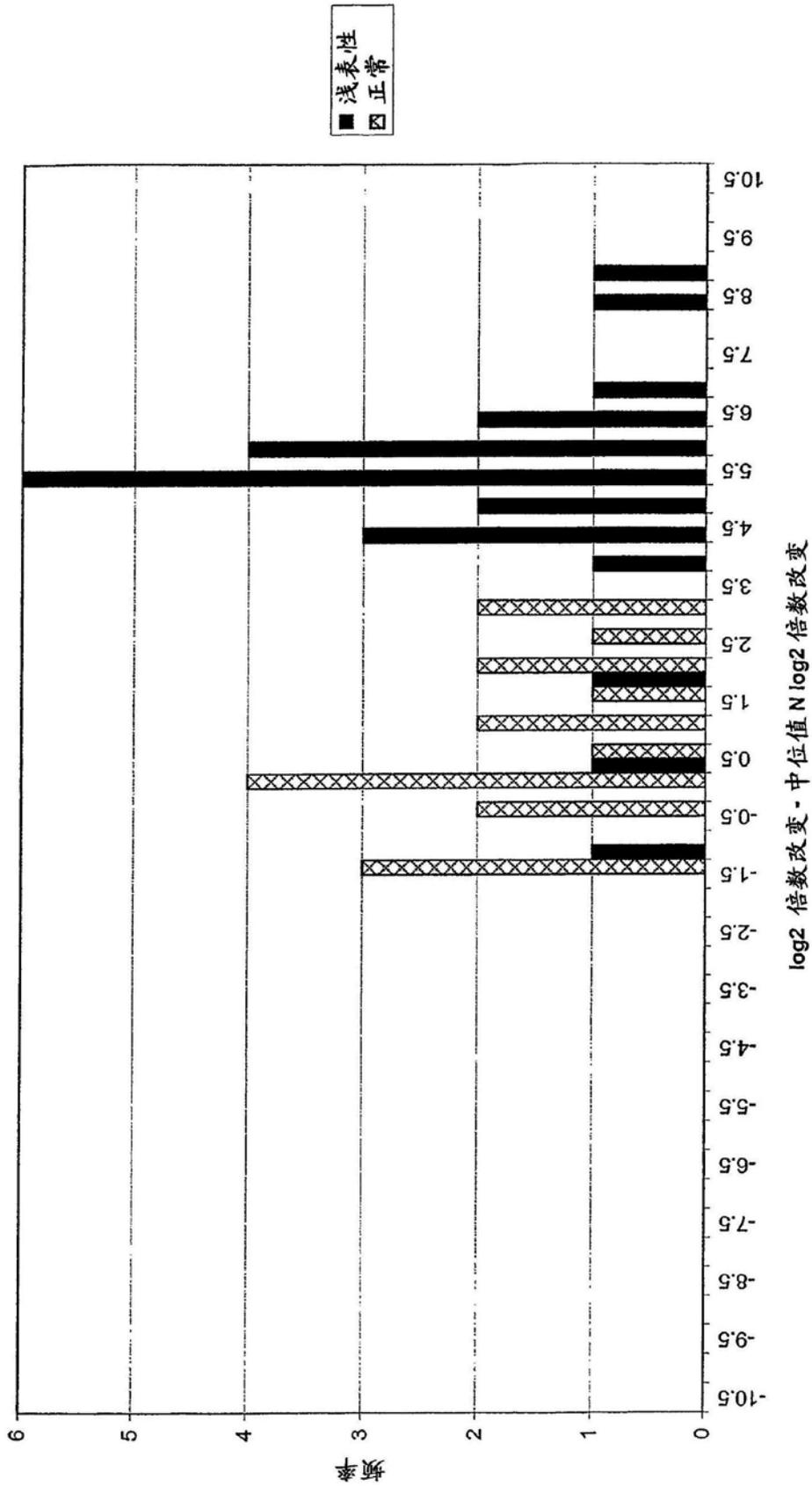


图6d

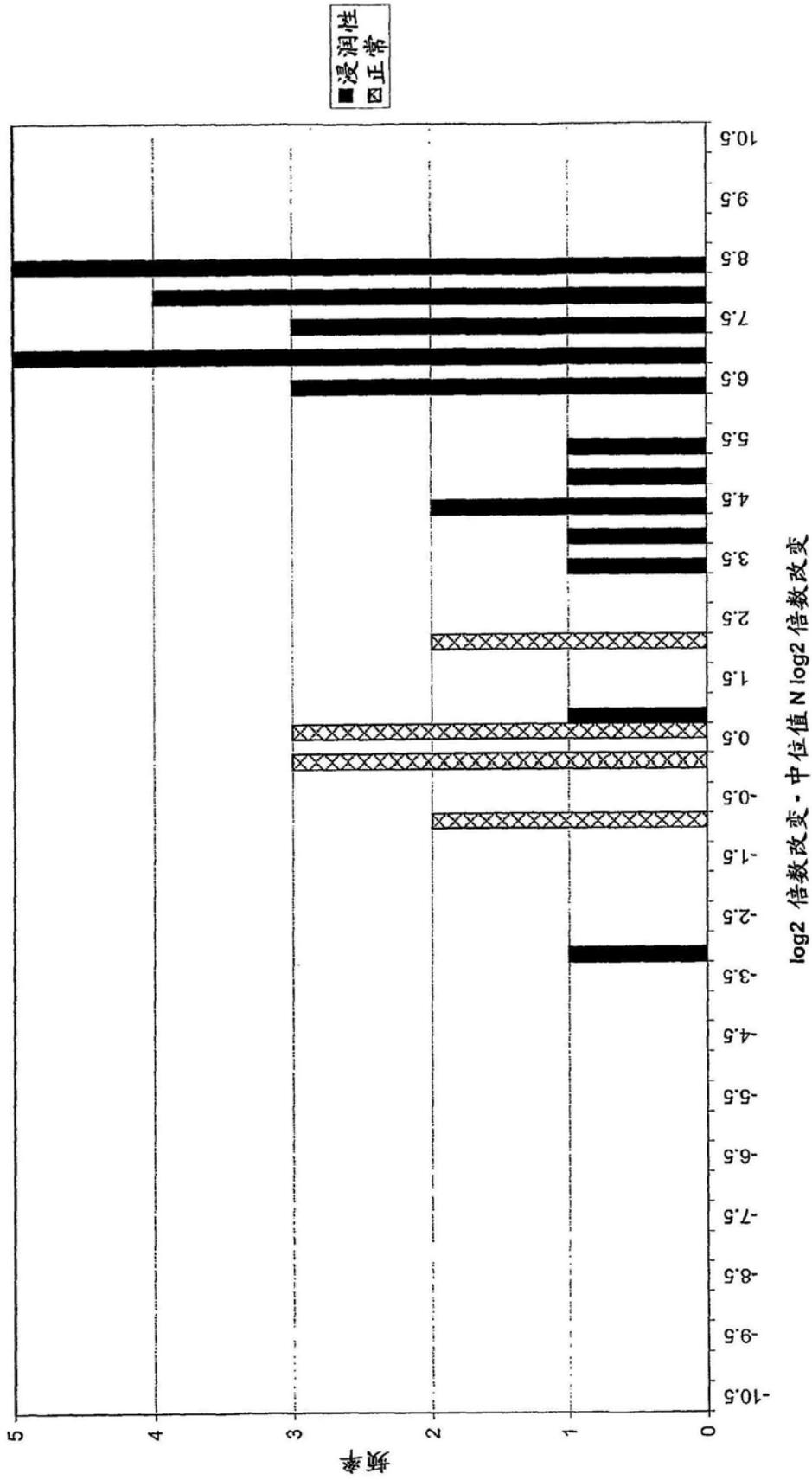


图6e

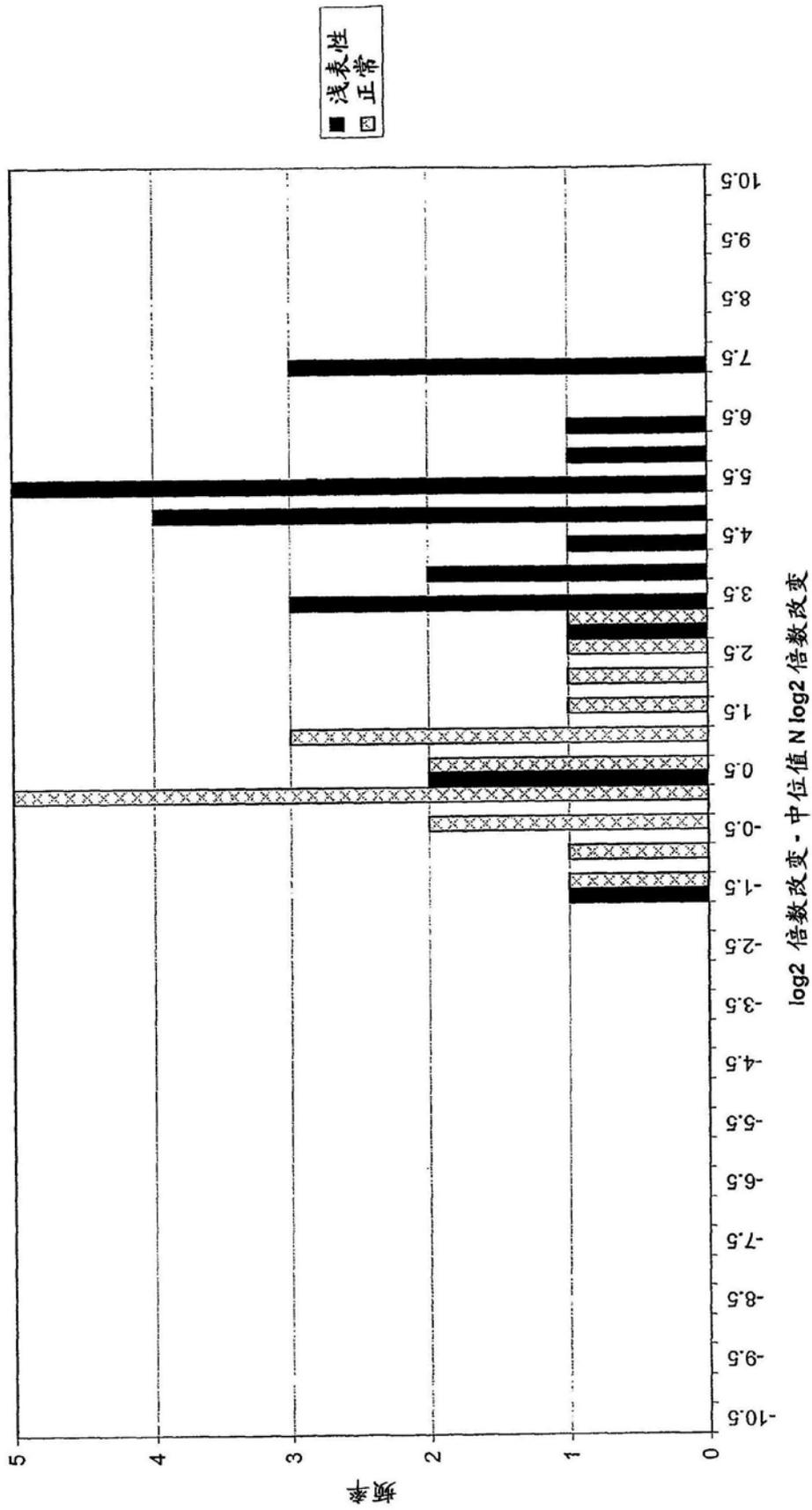


图6f

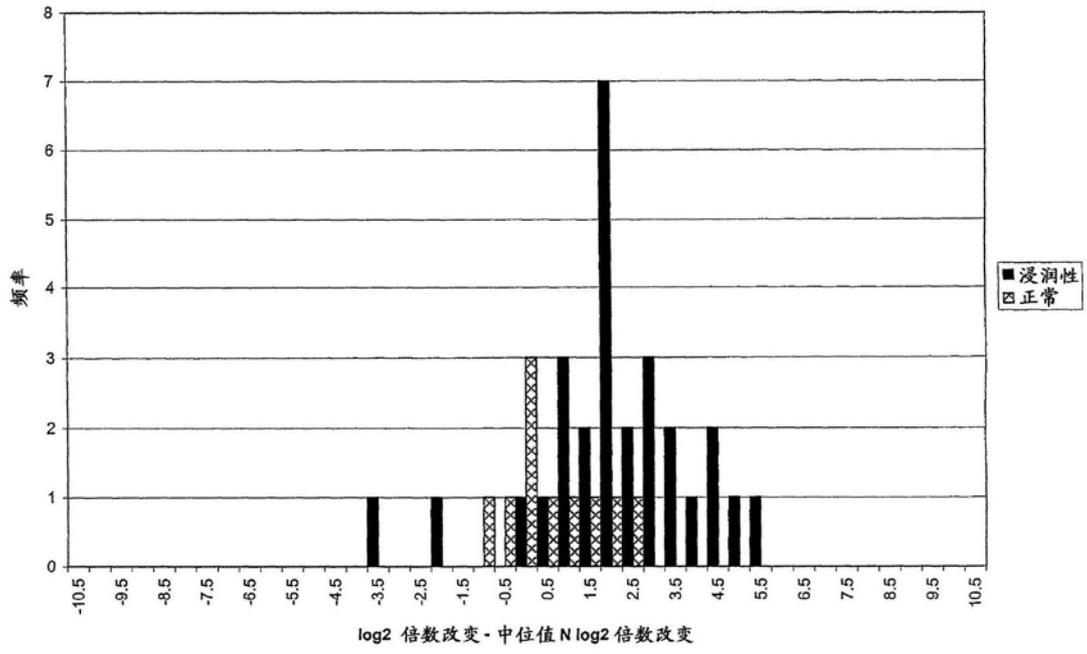


图6g

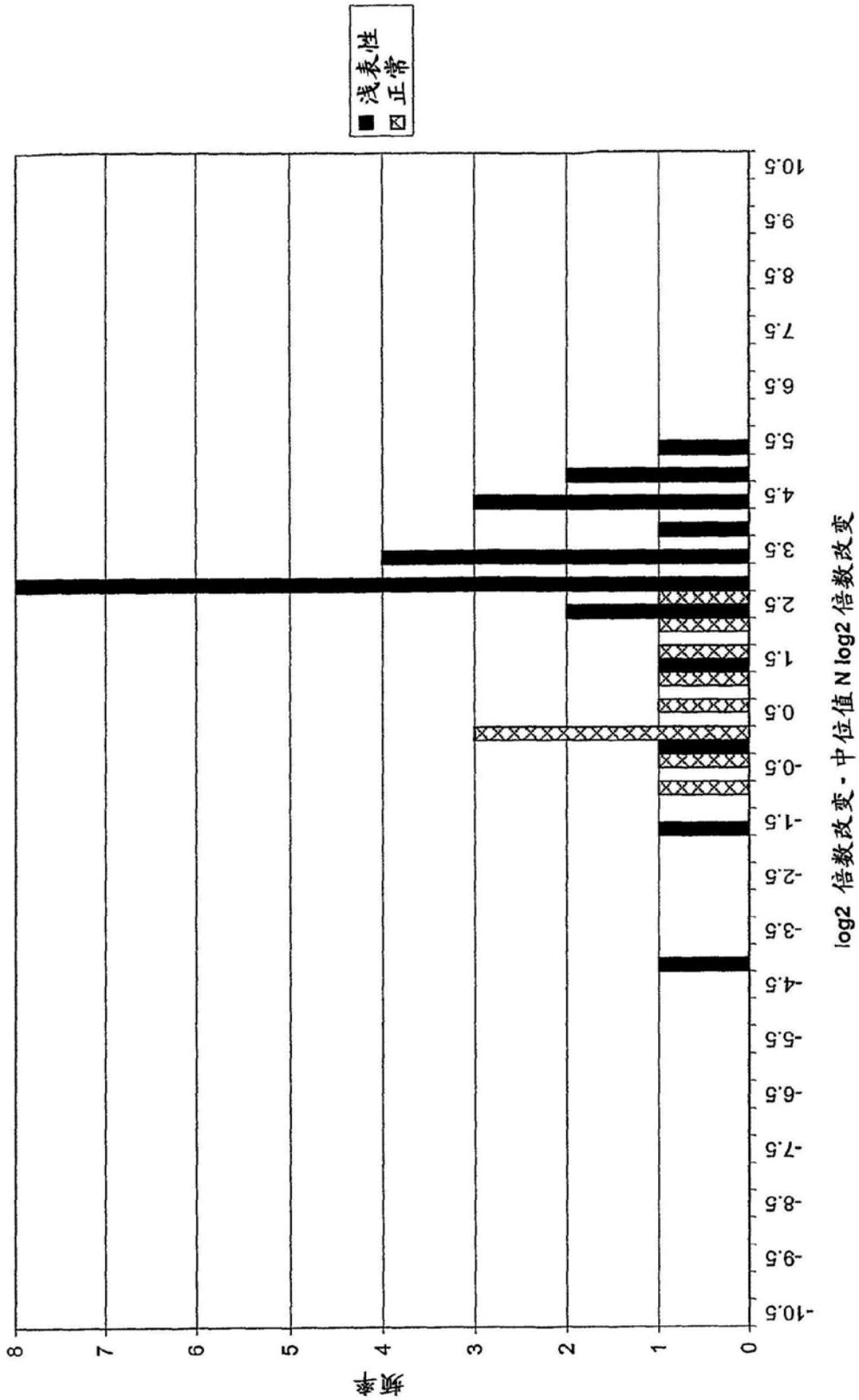


图6h

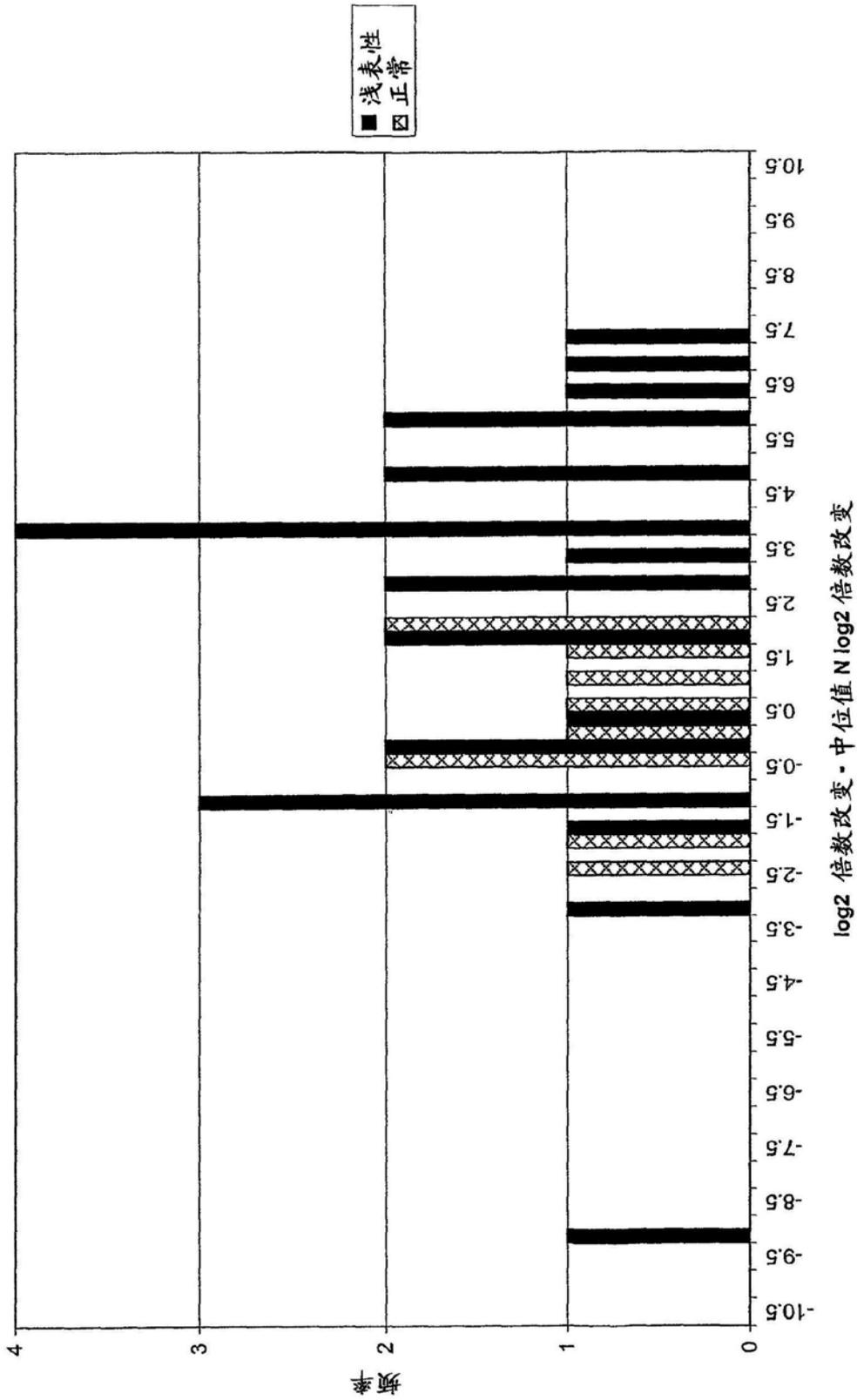


图6i

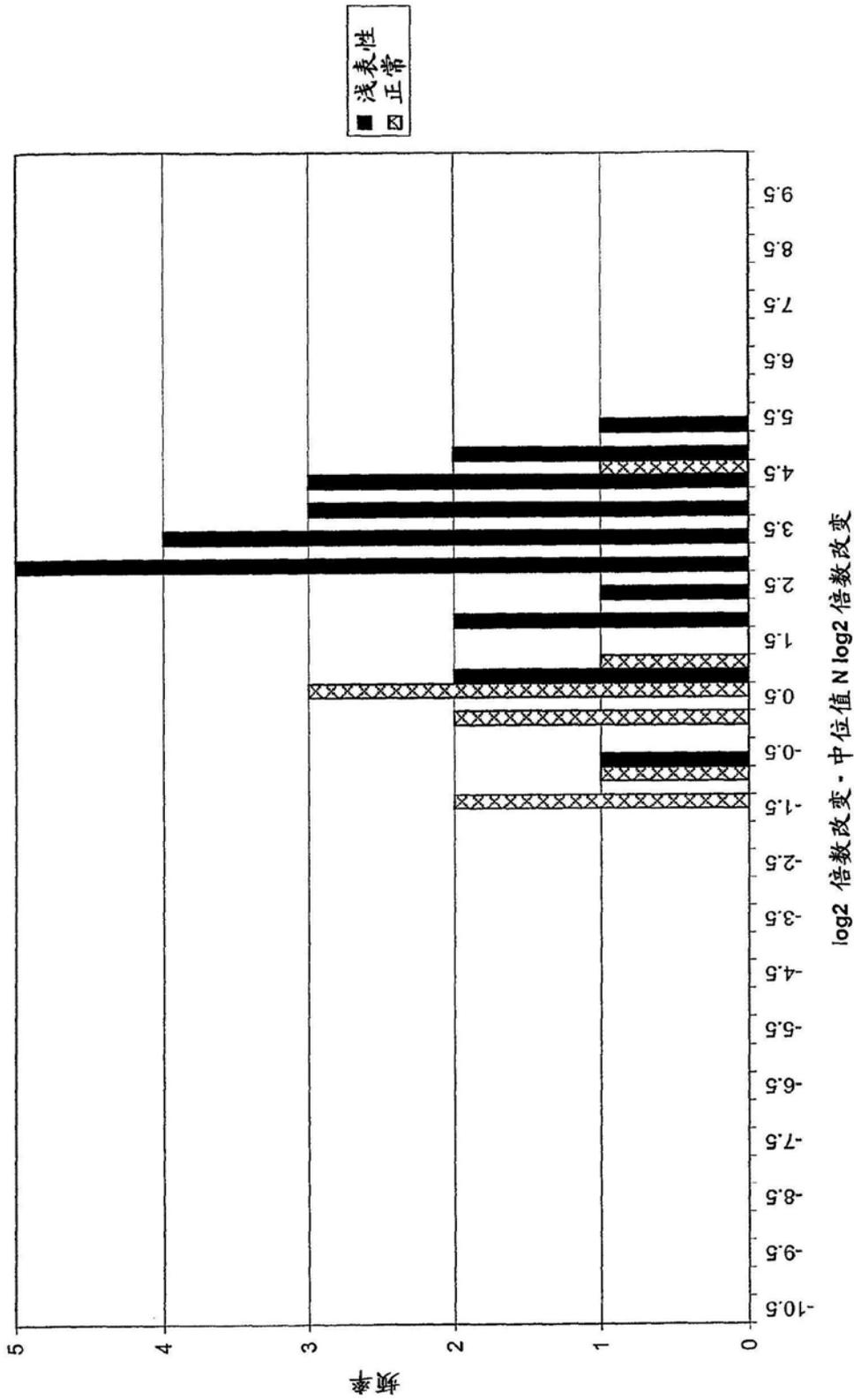


图6j

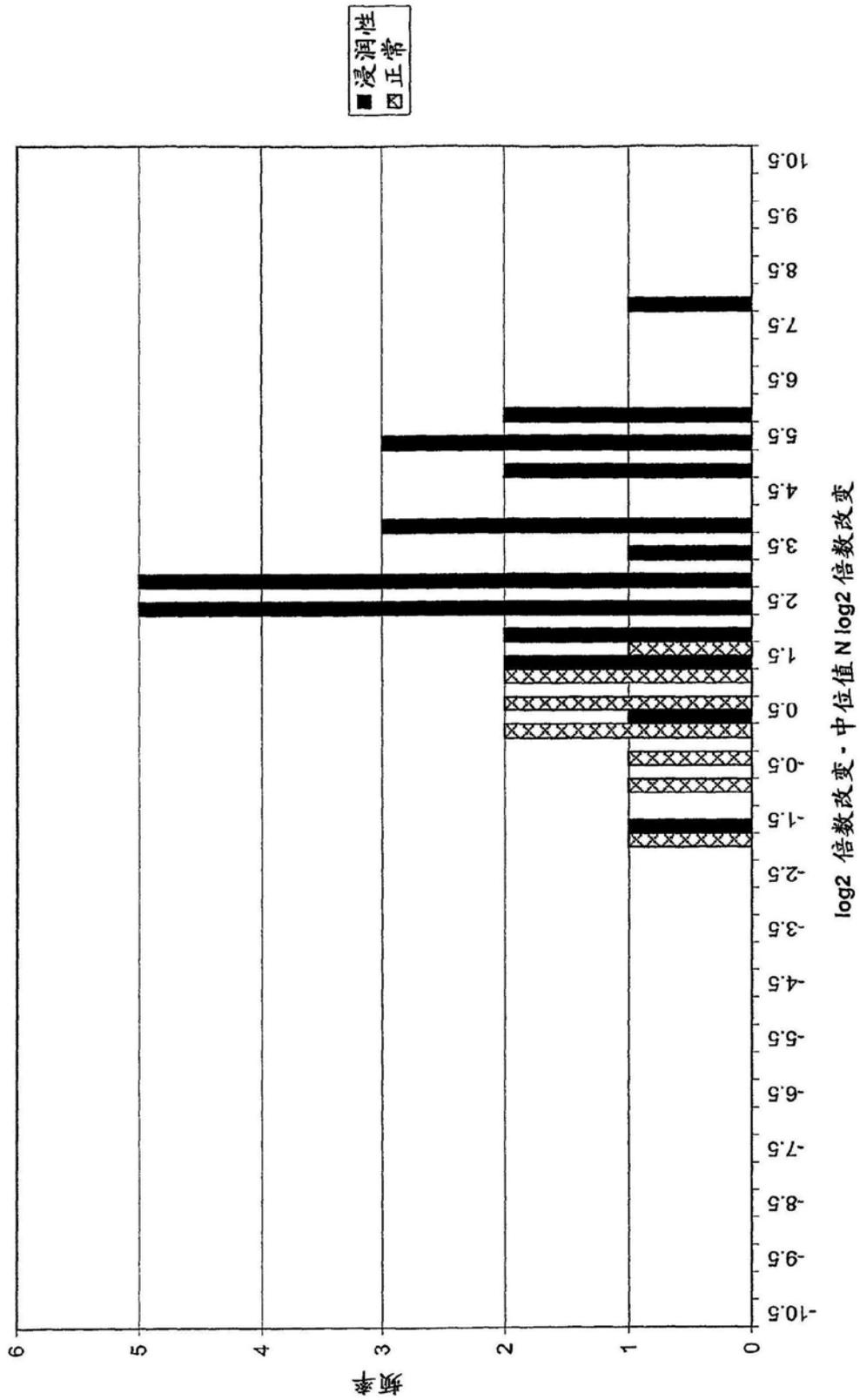


图6k

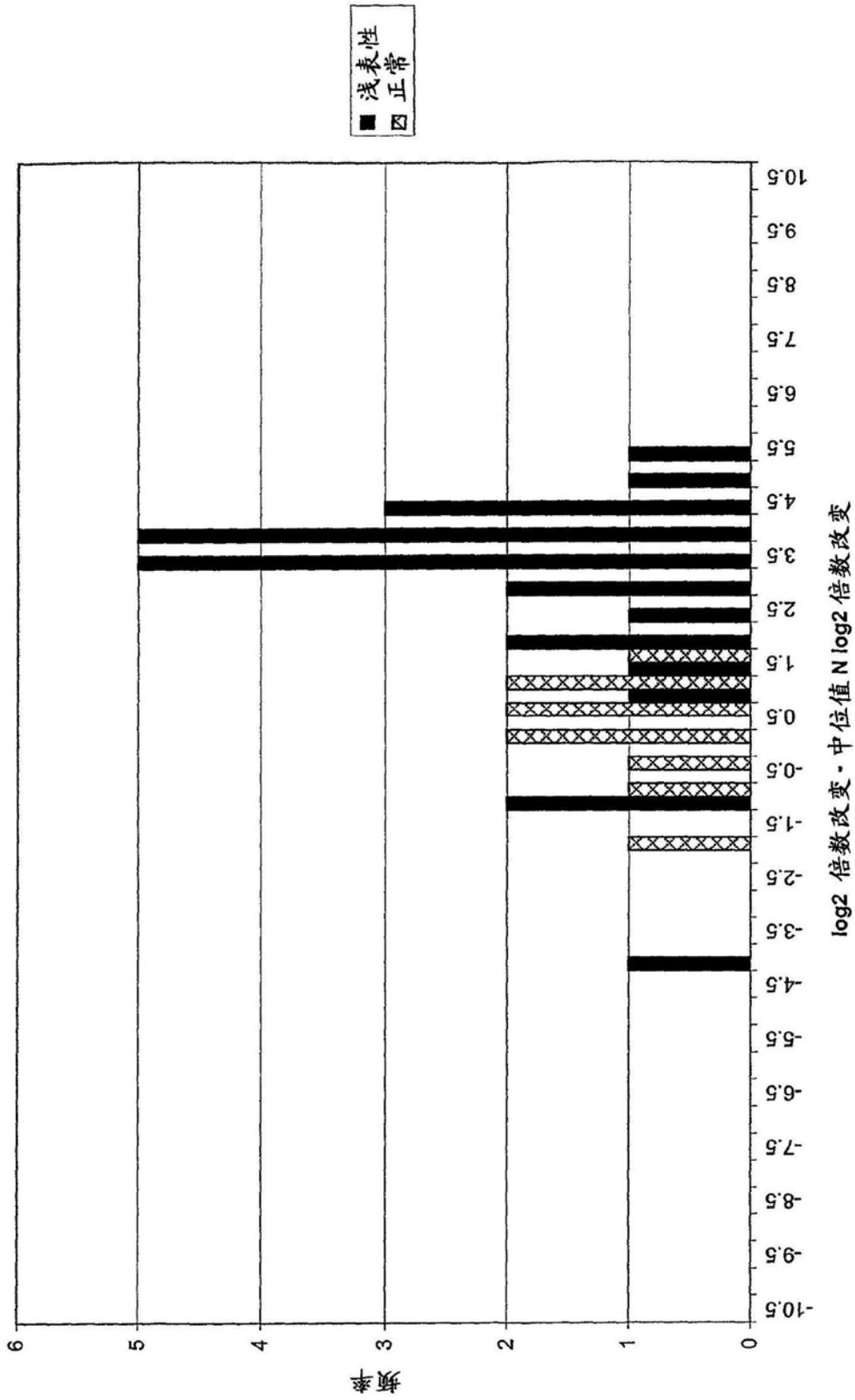


图61

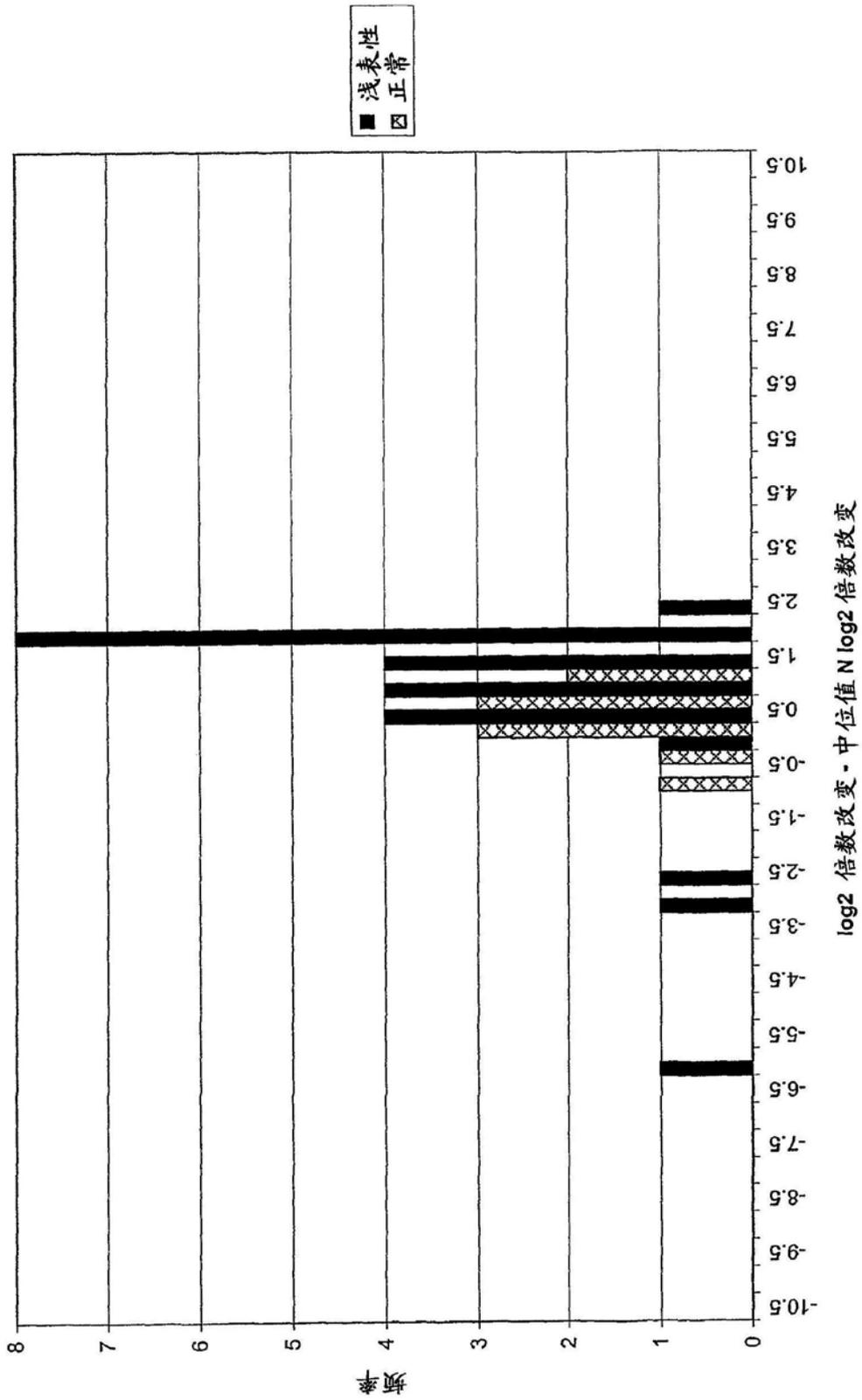


图6m

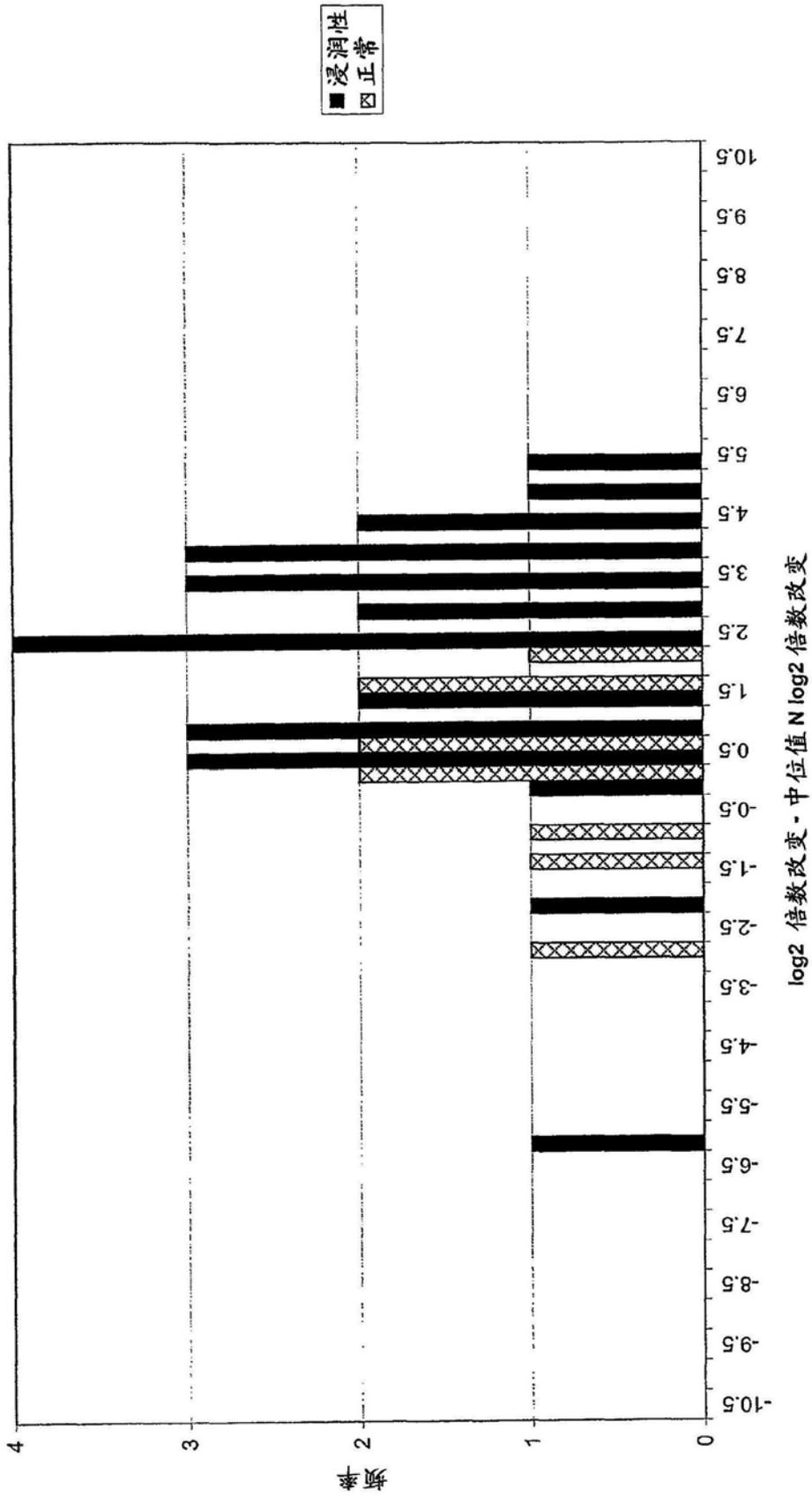


图6n

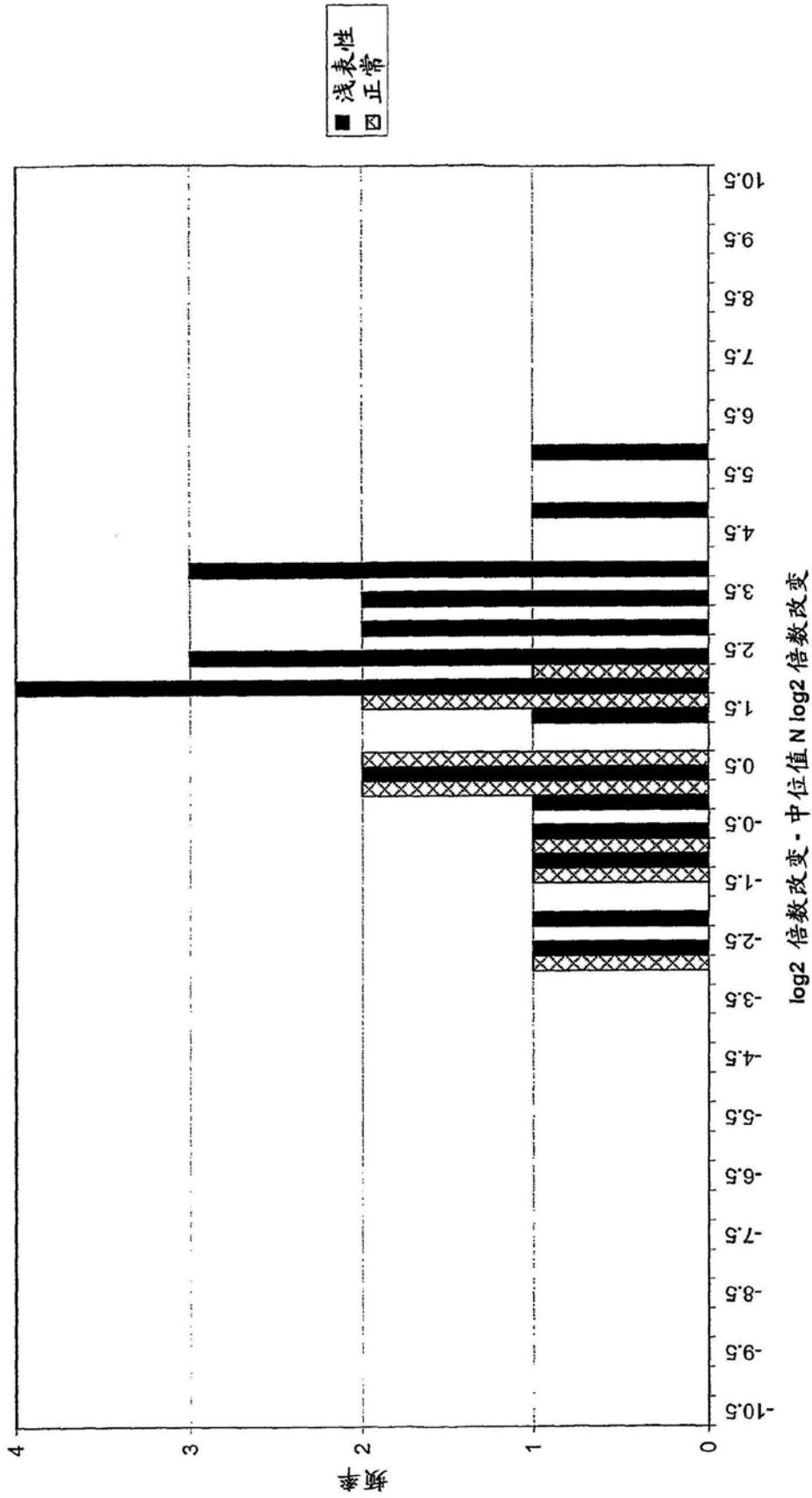


图60

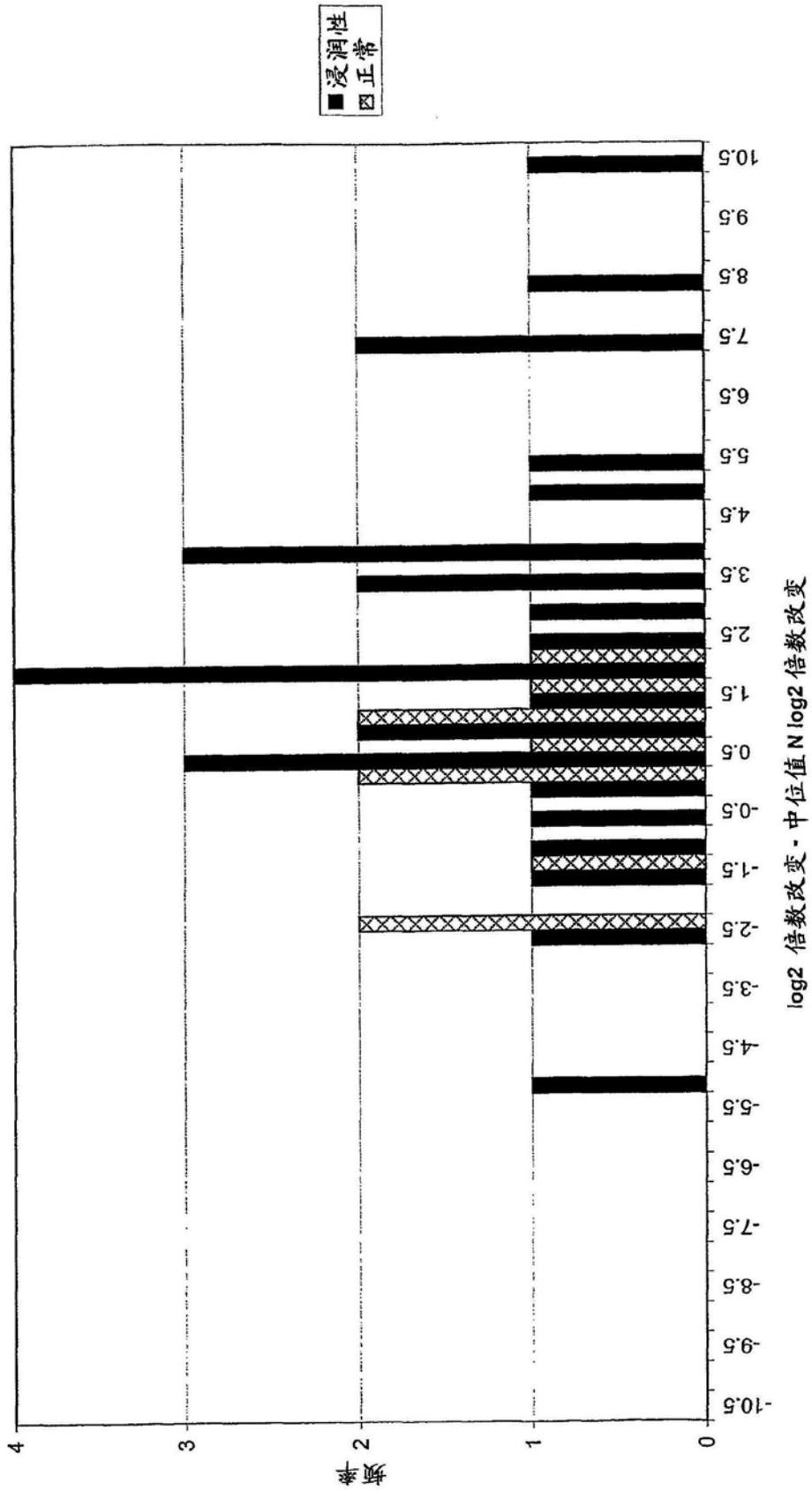


图6p

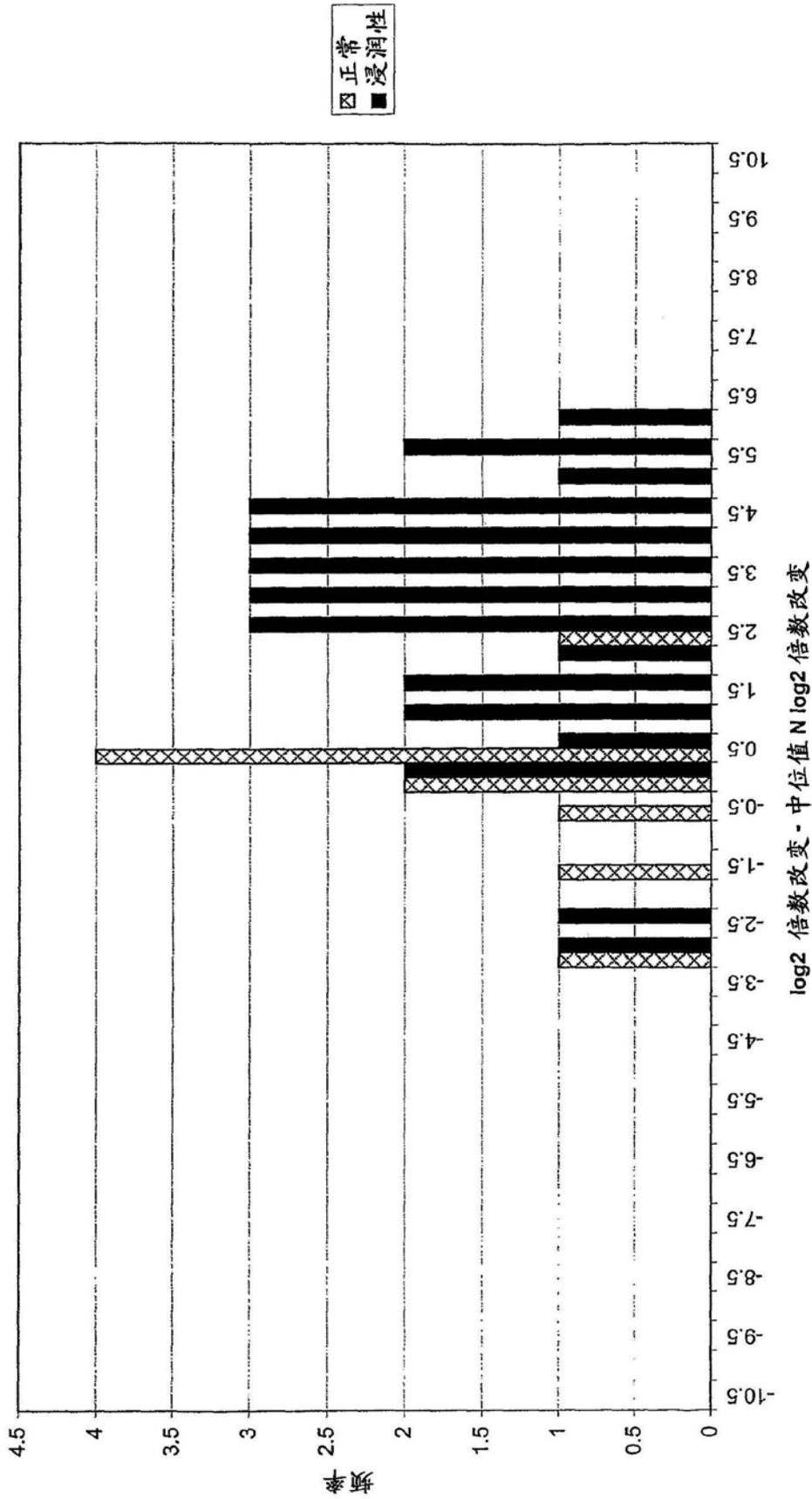


图6q

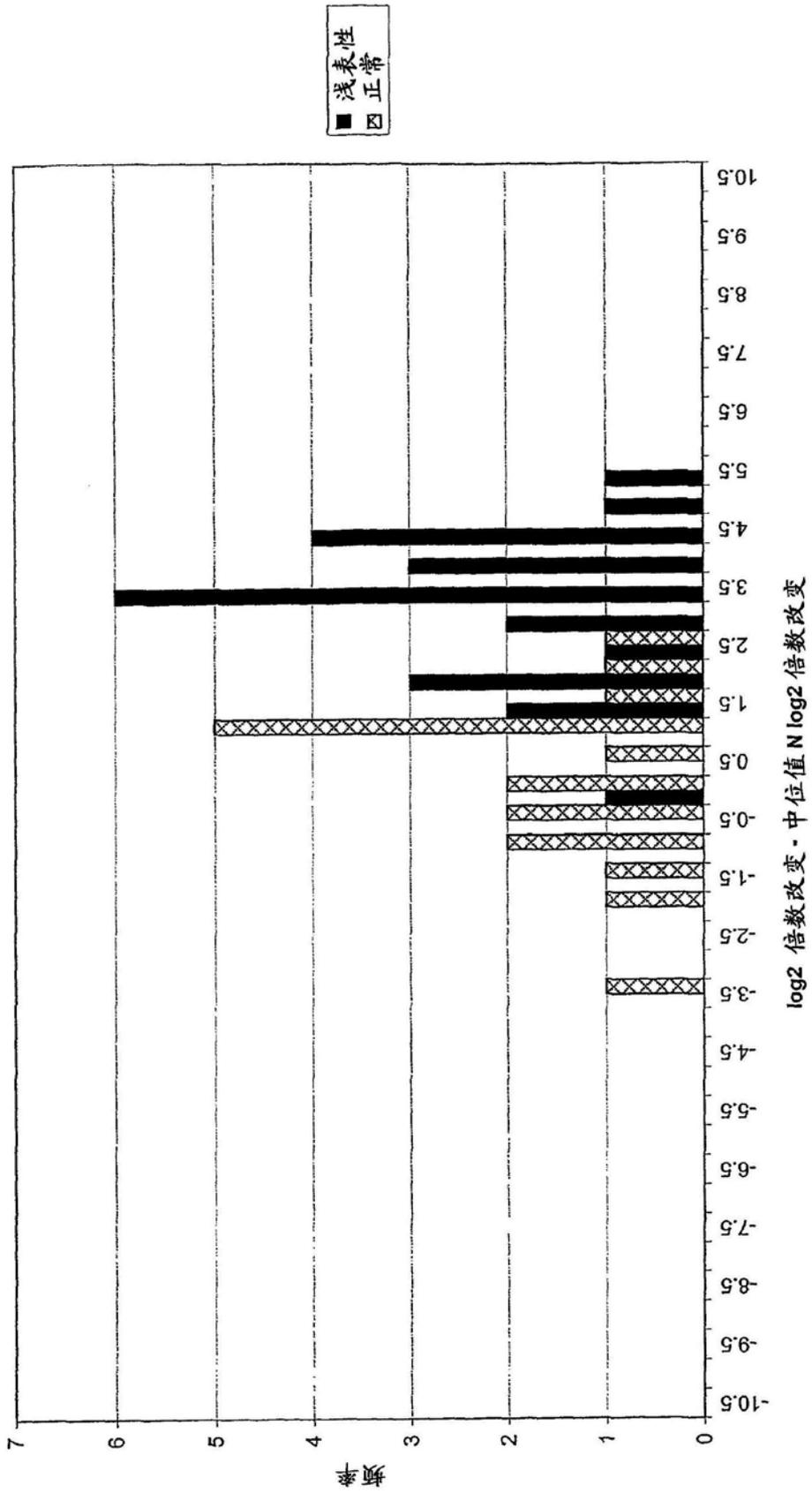


图6r

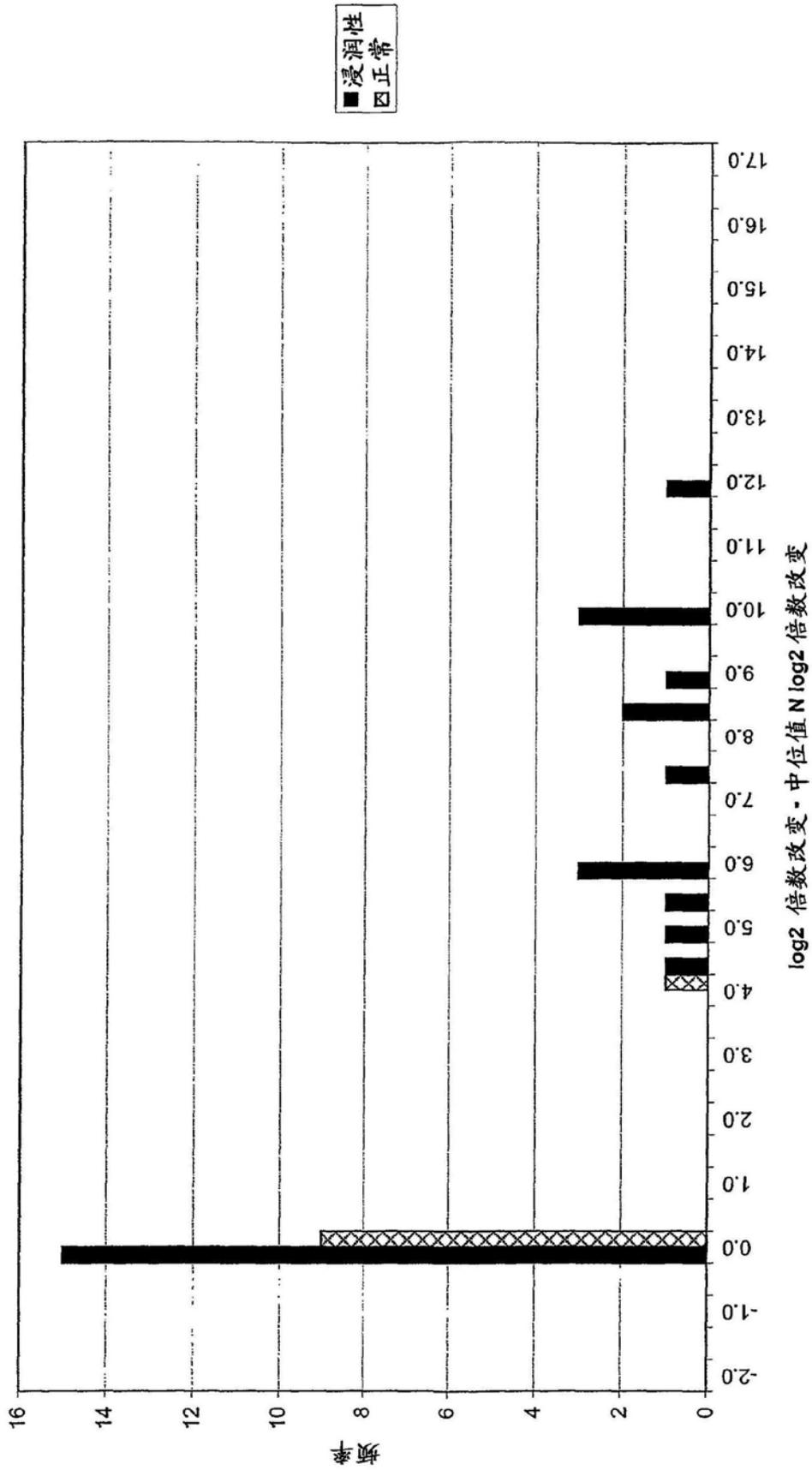


图6s

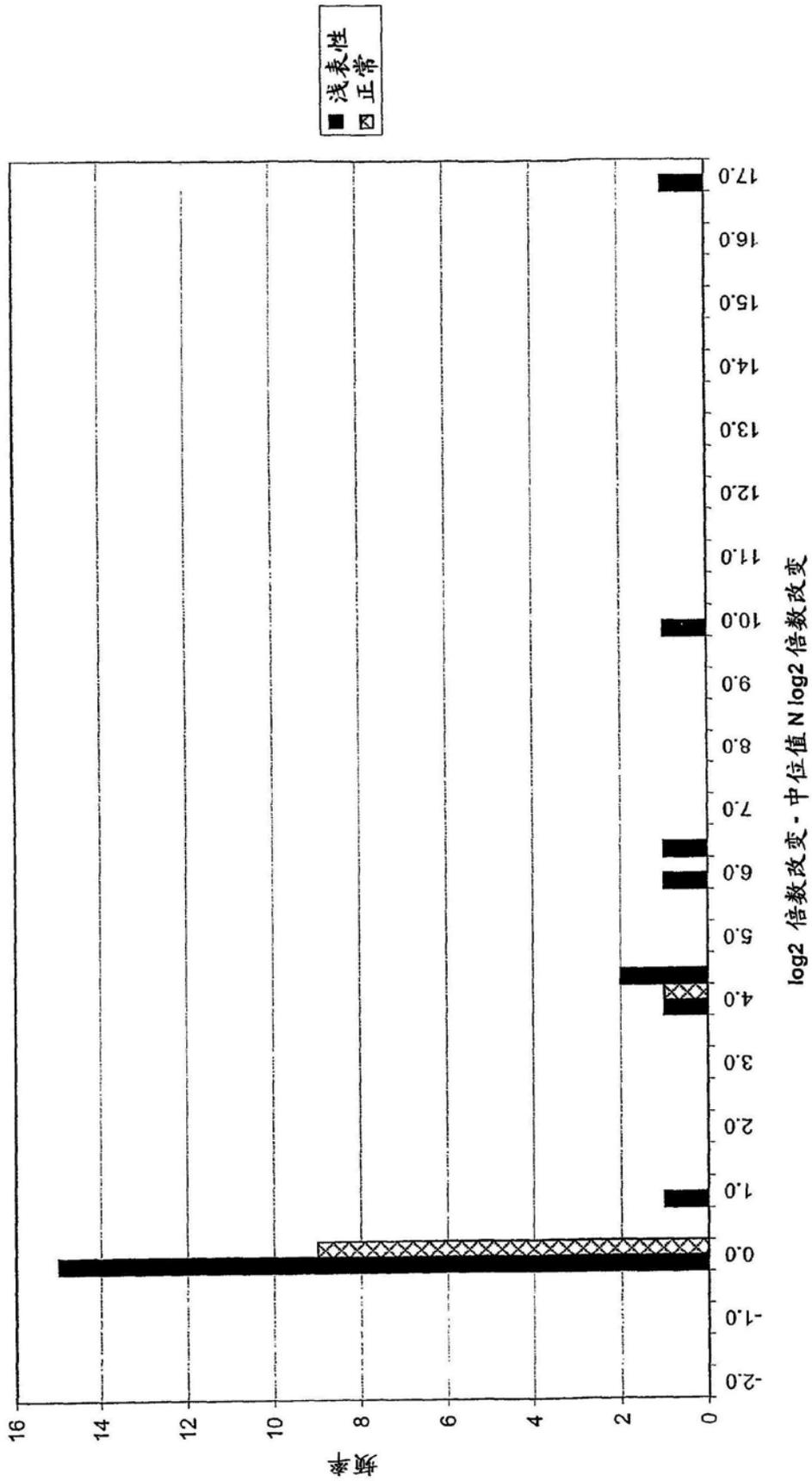


图6t

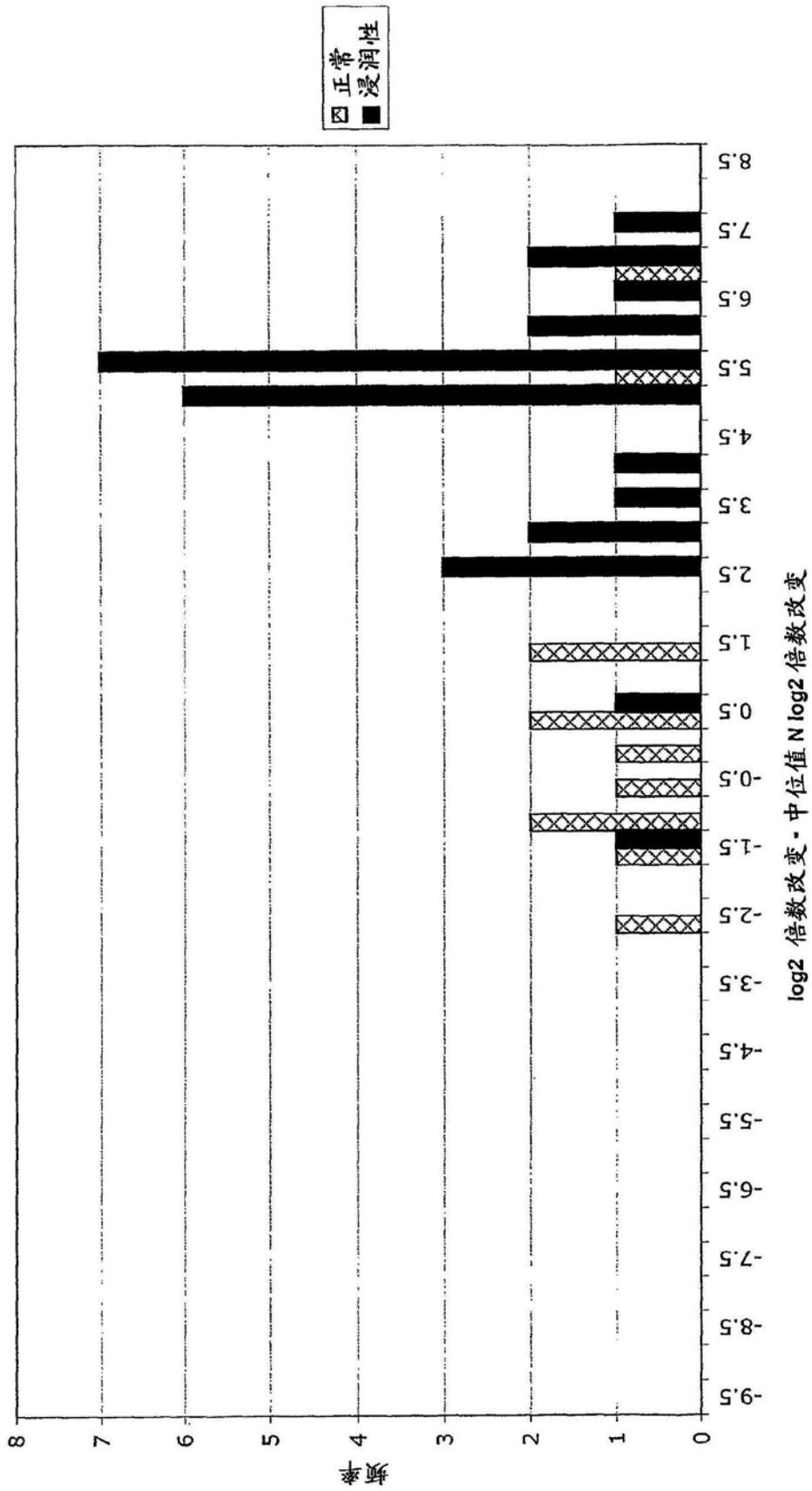


图6u

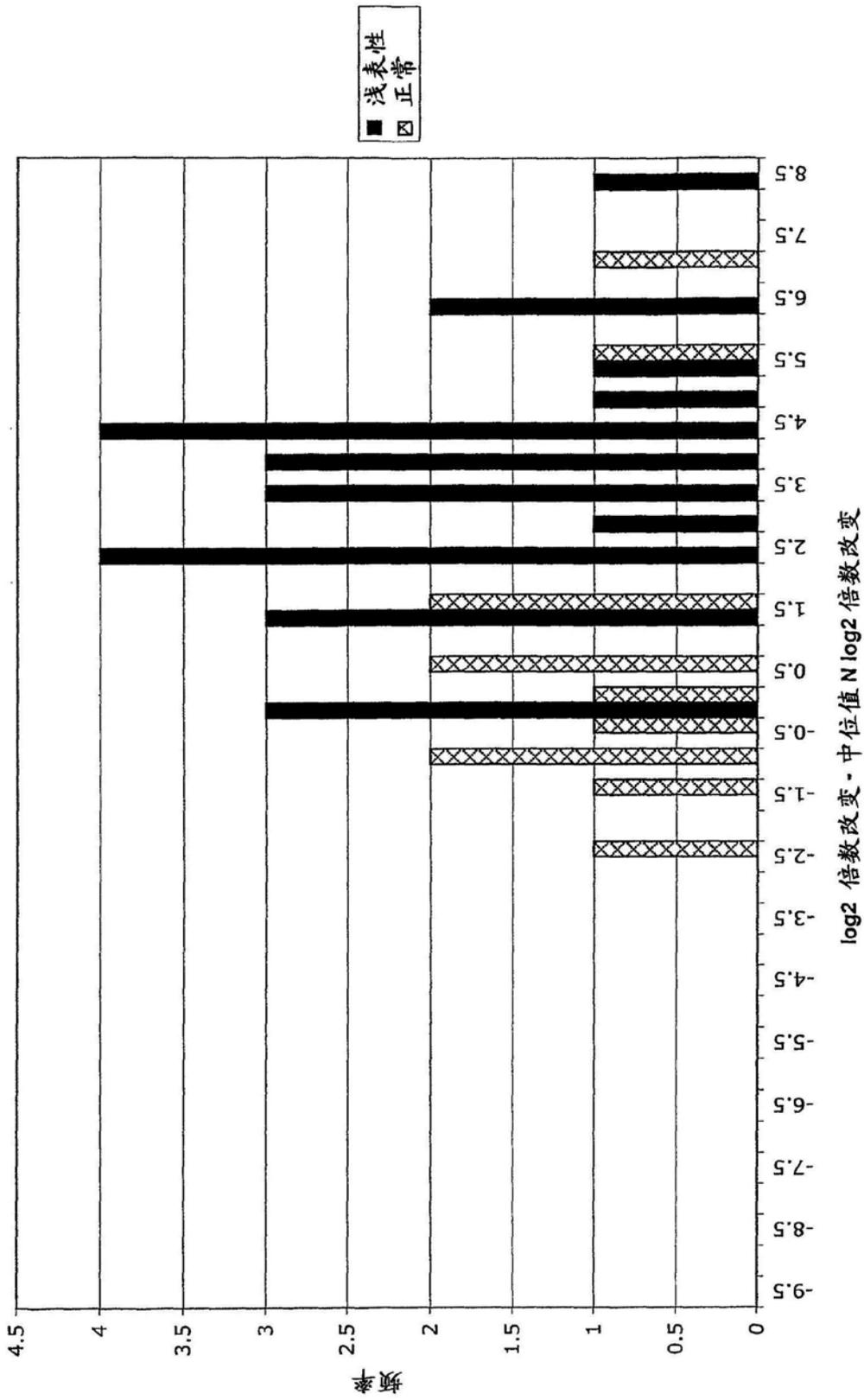


图6v

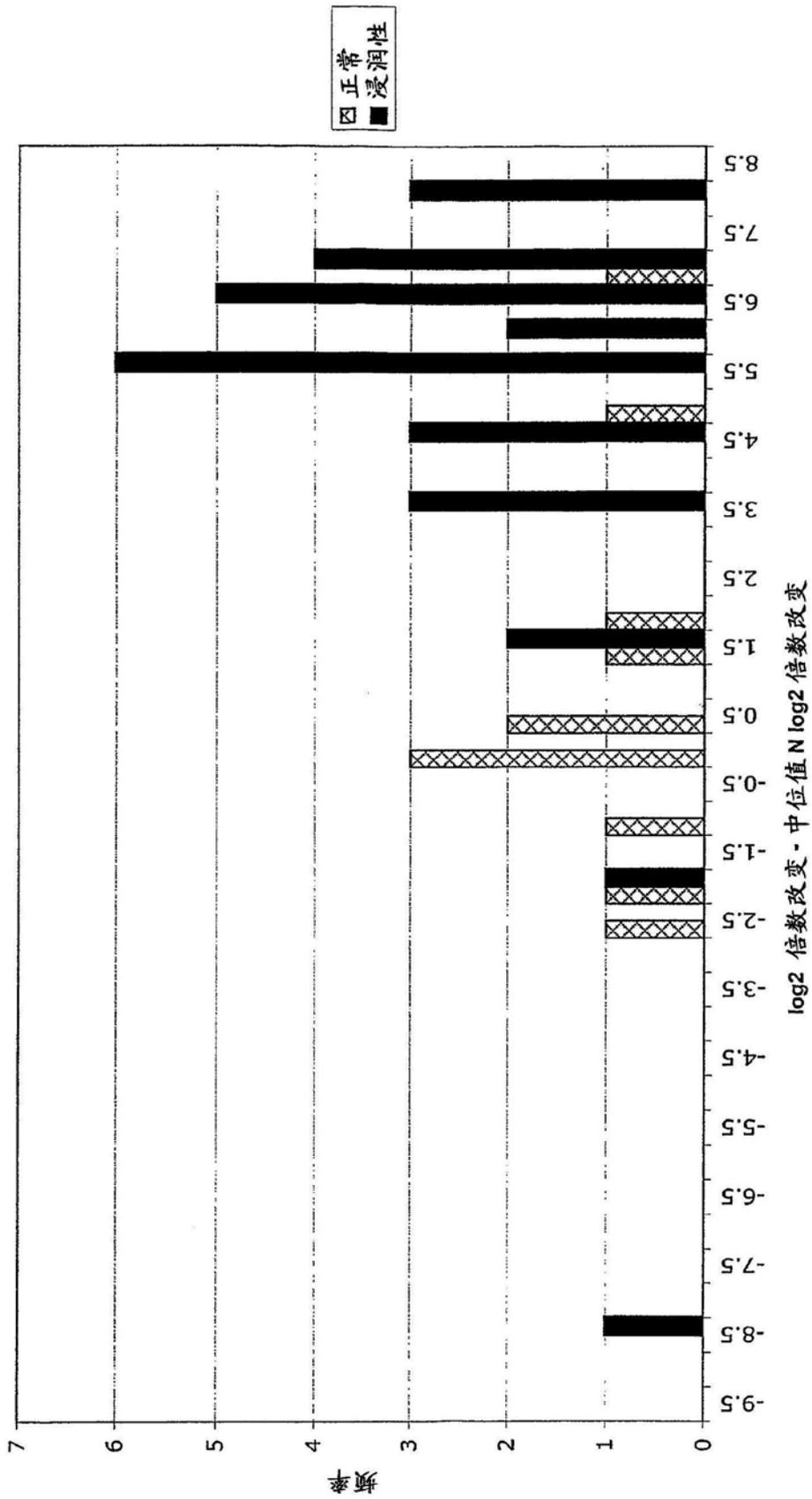


图6w

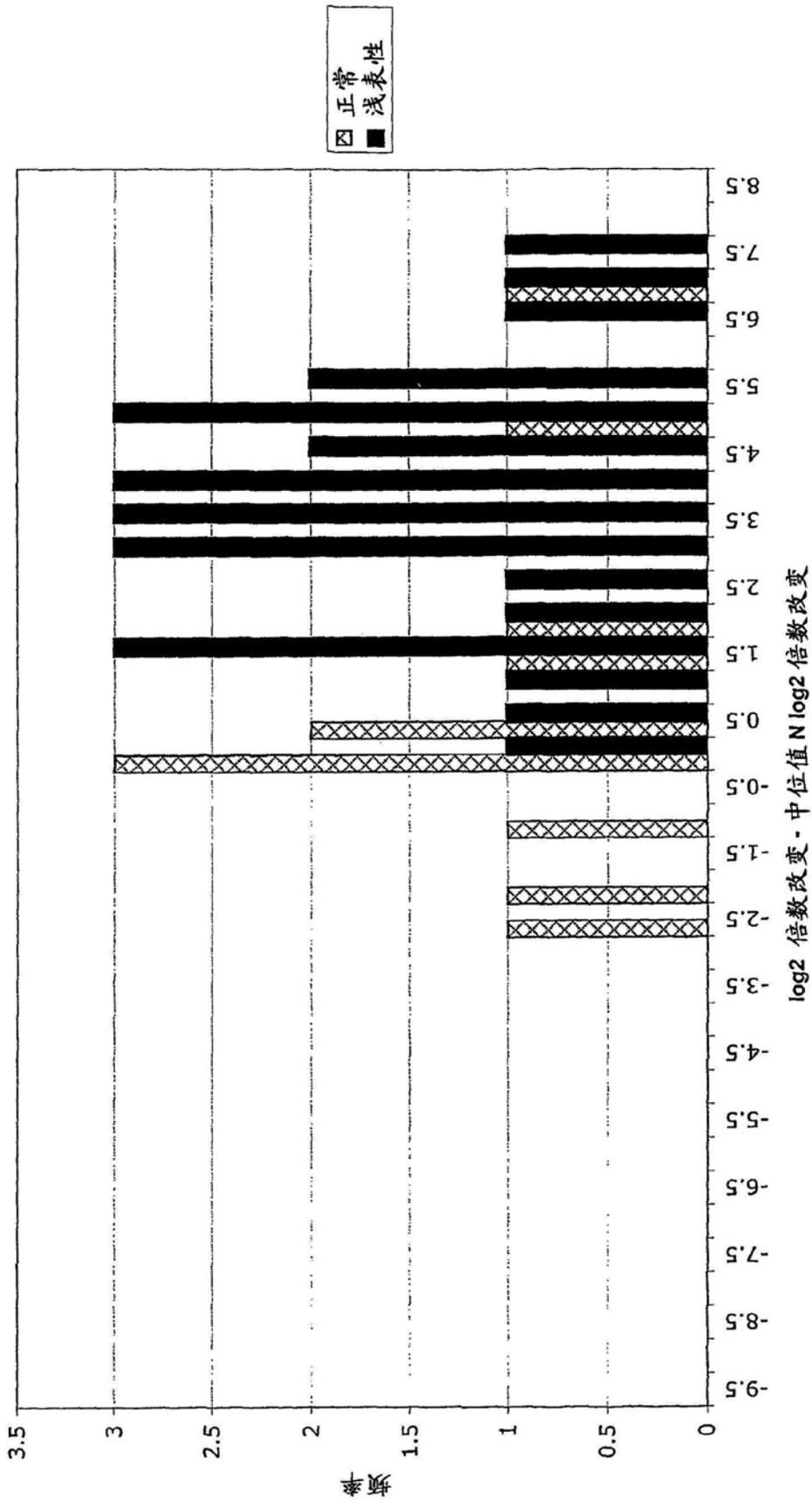


图6x

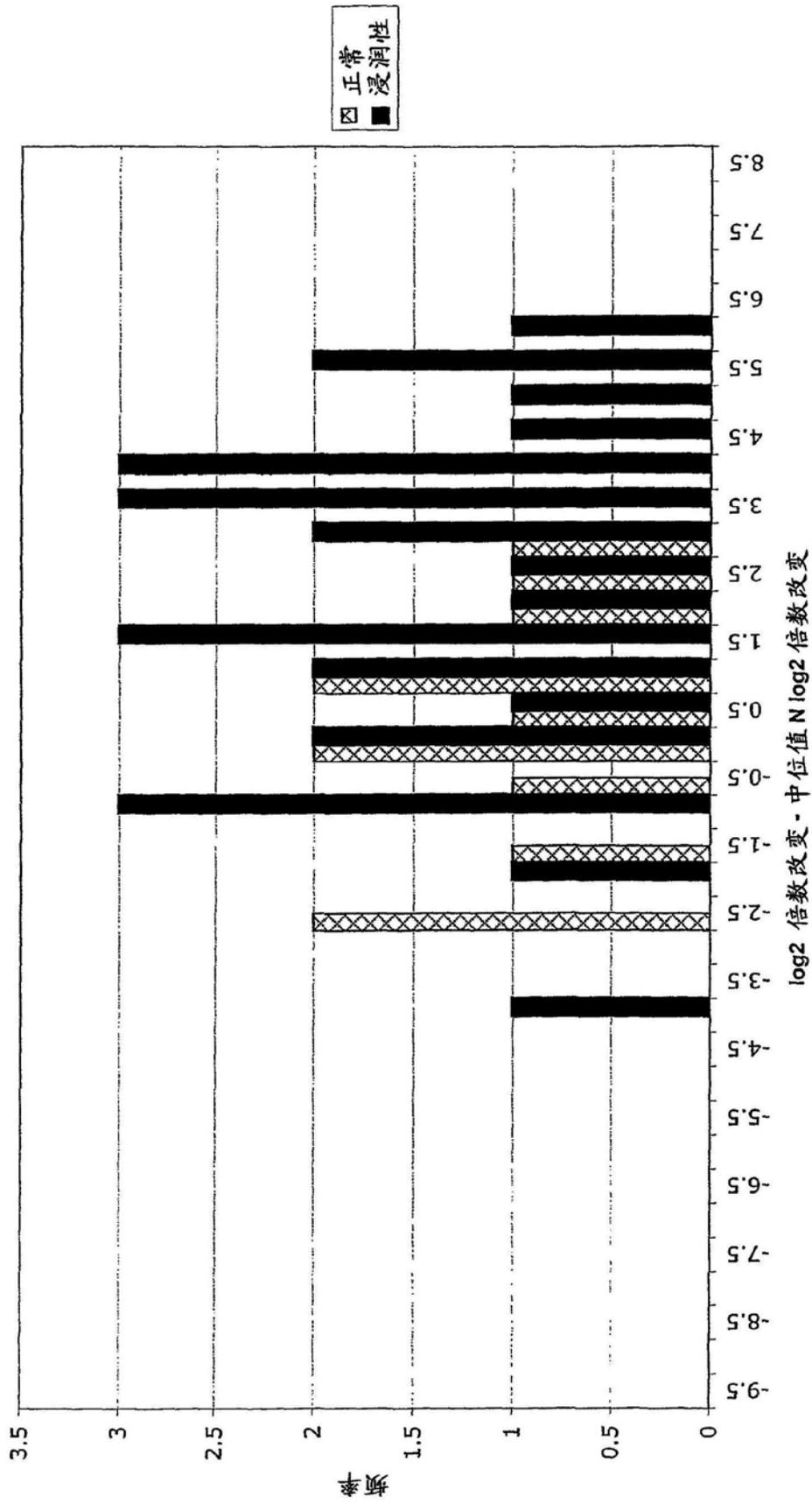


图6y

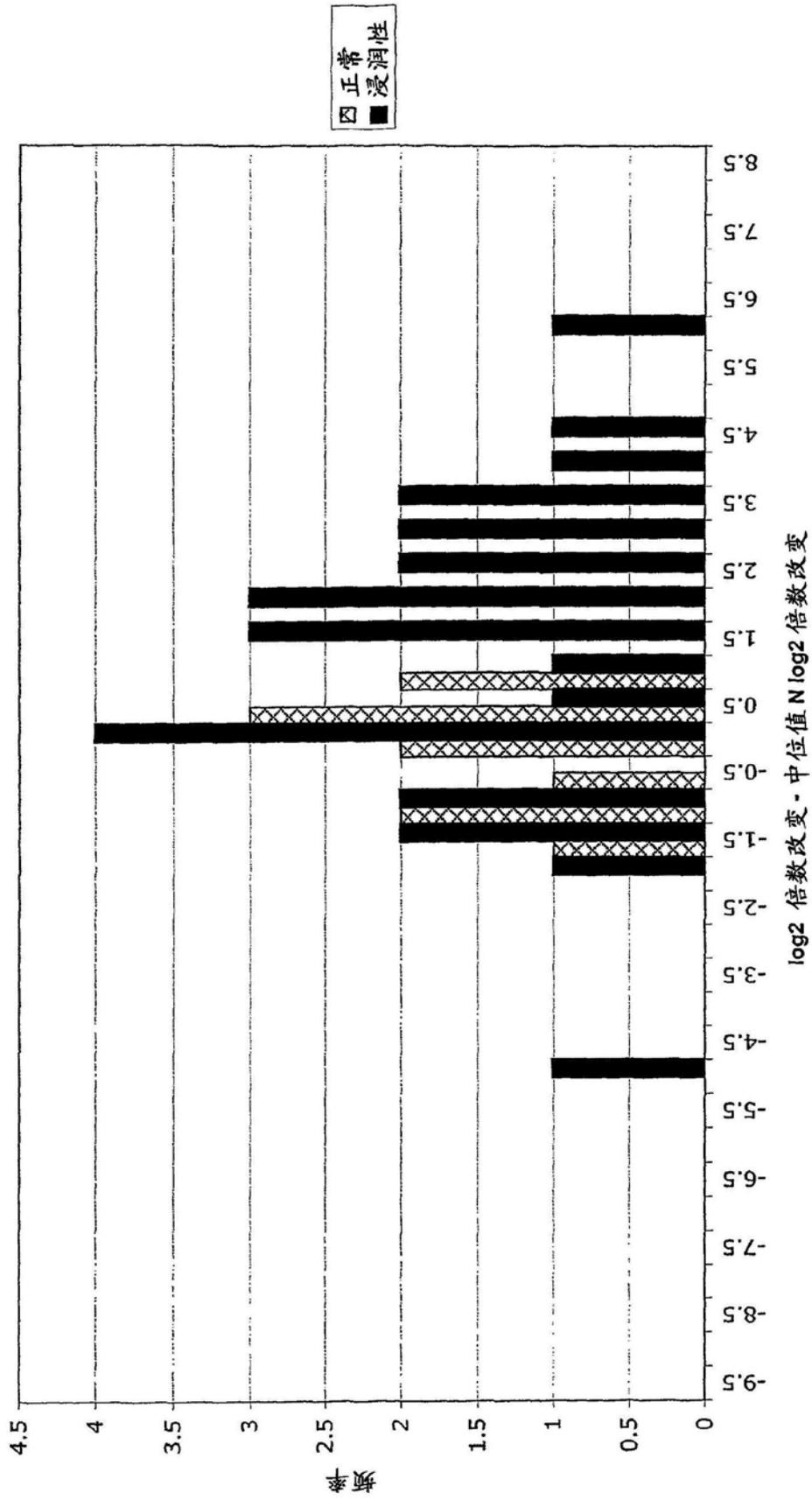


图6aa

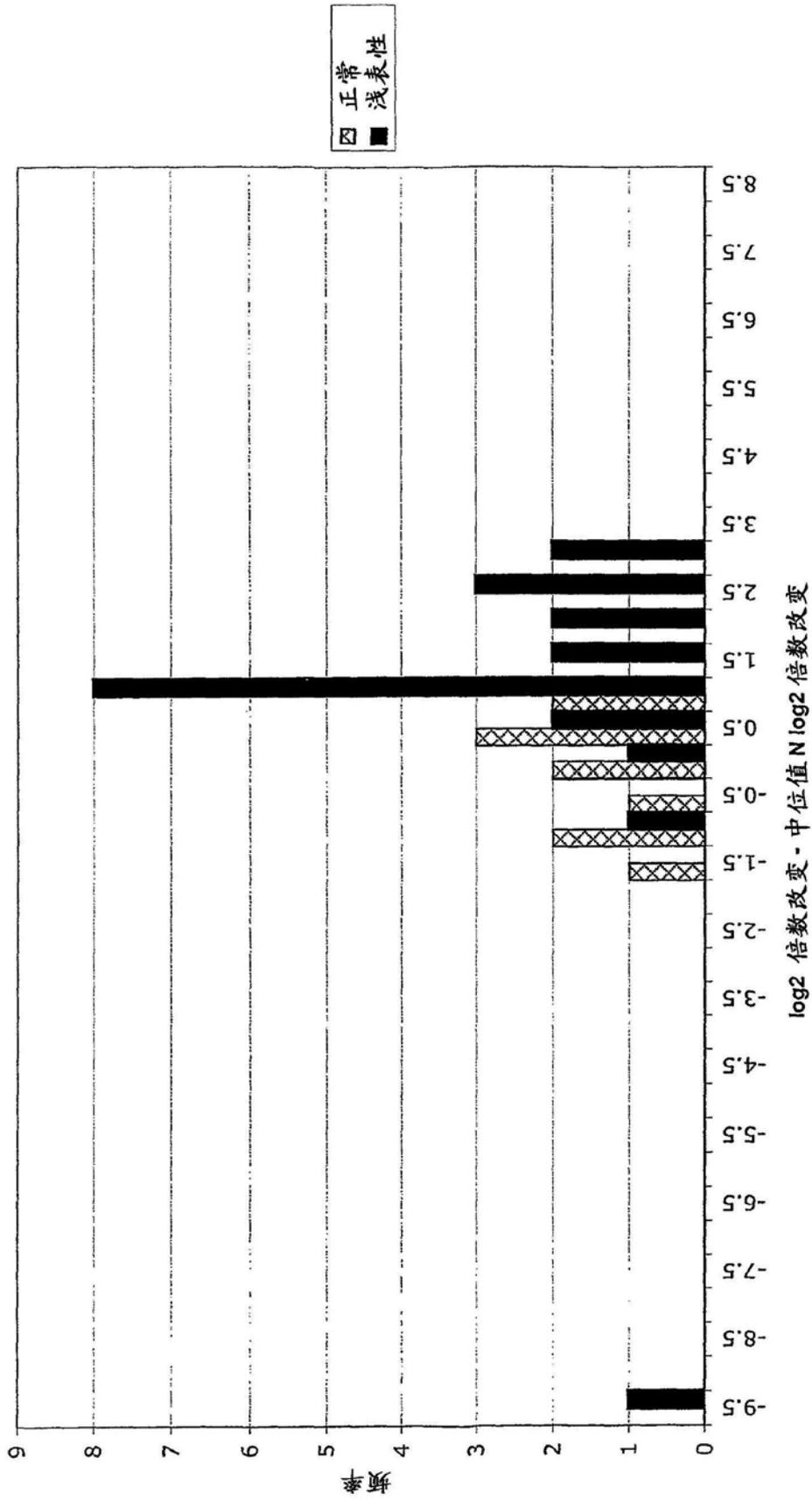


图6ab

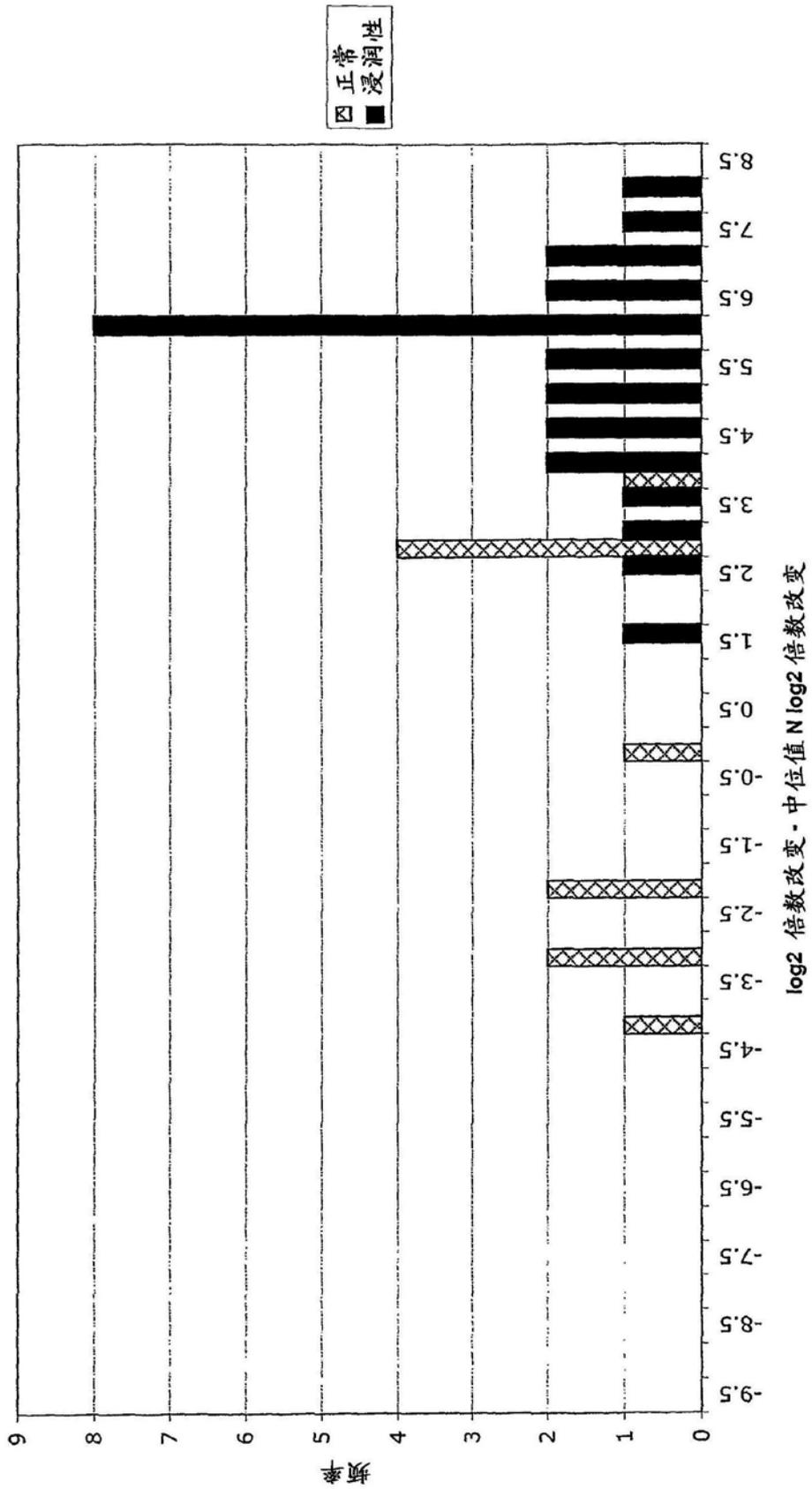


图6ac

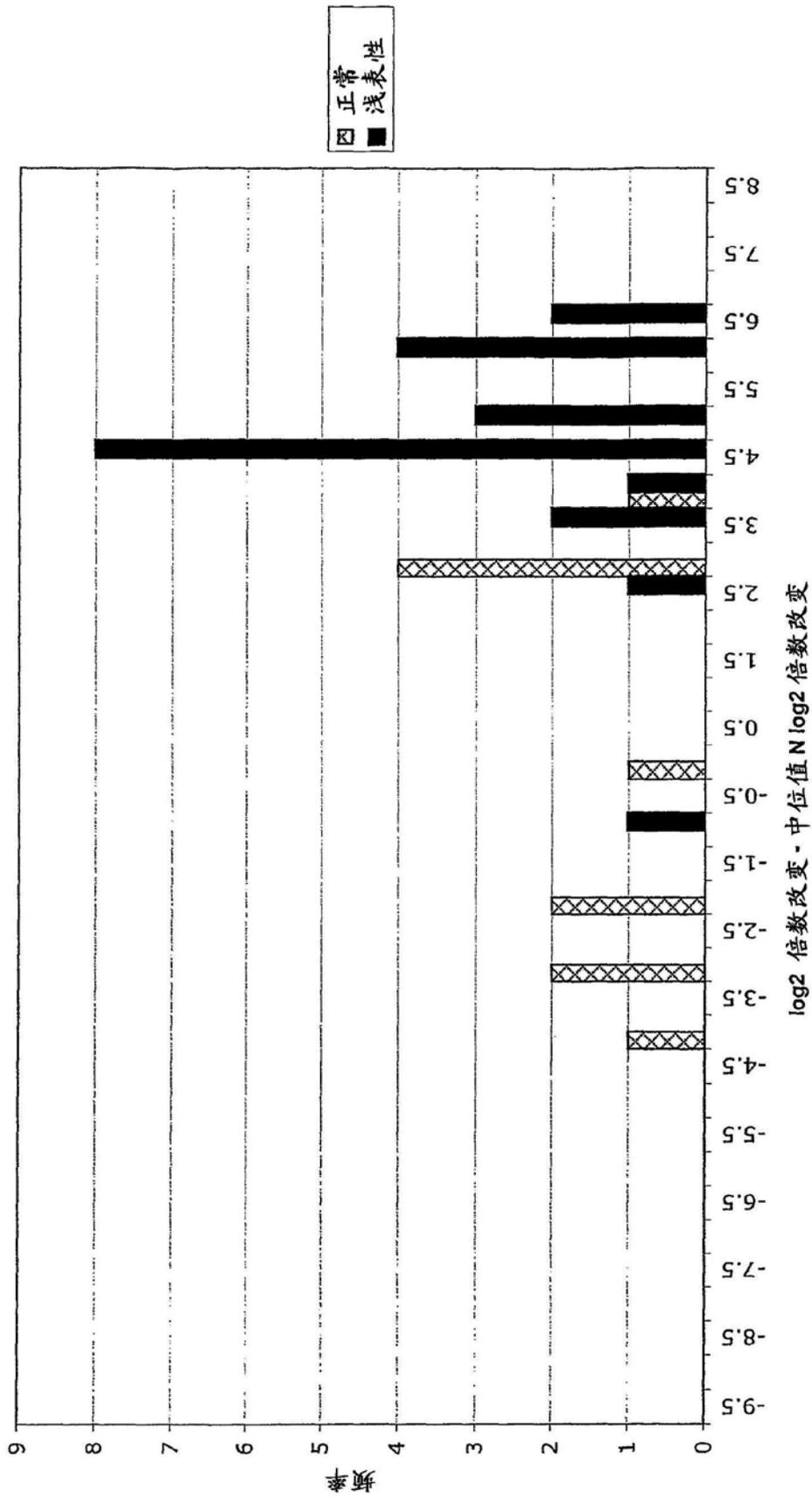


图6ad

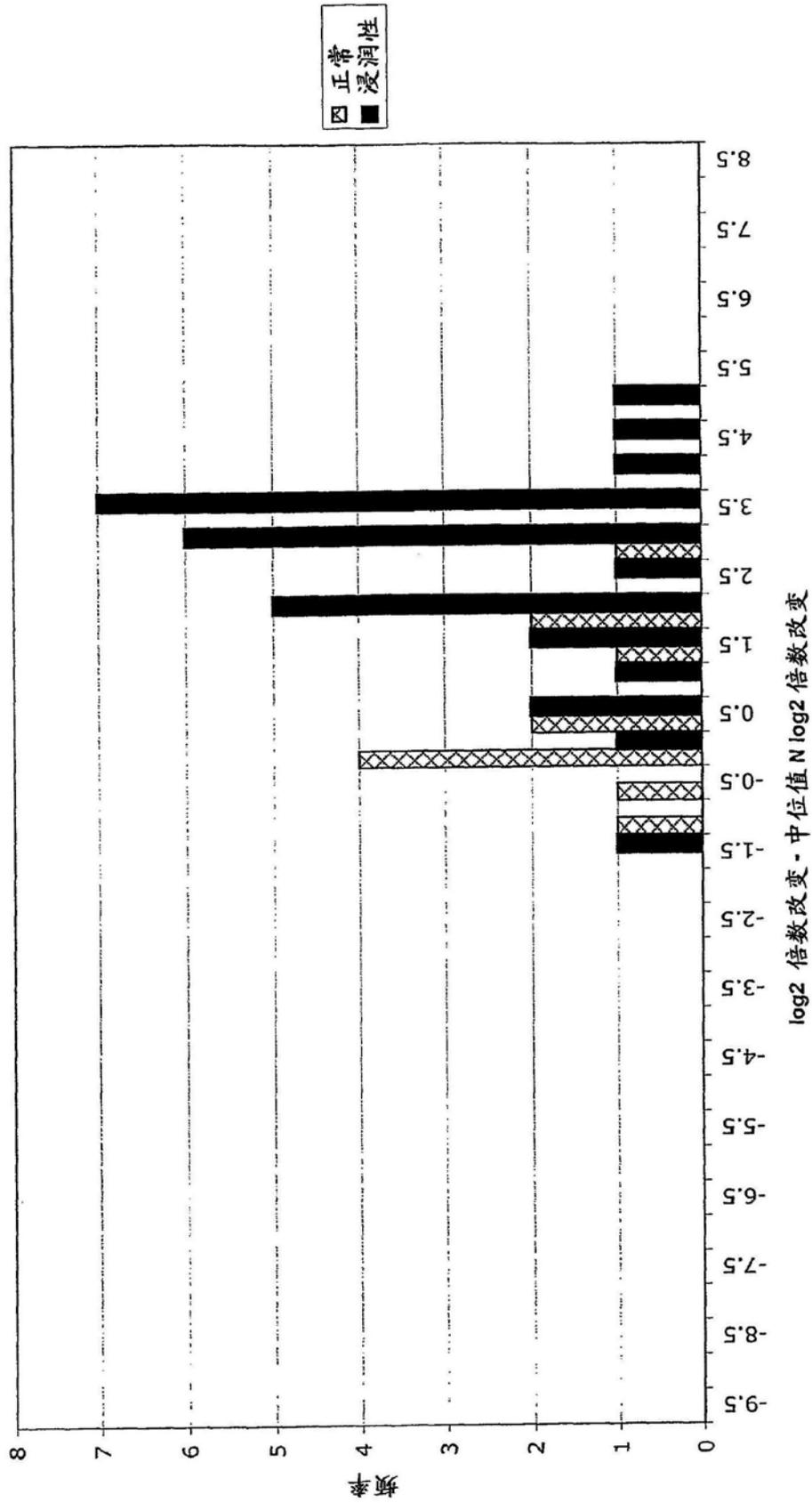


图6ae

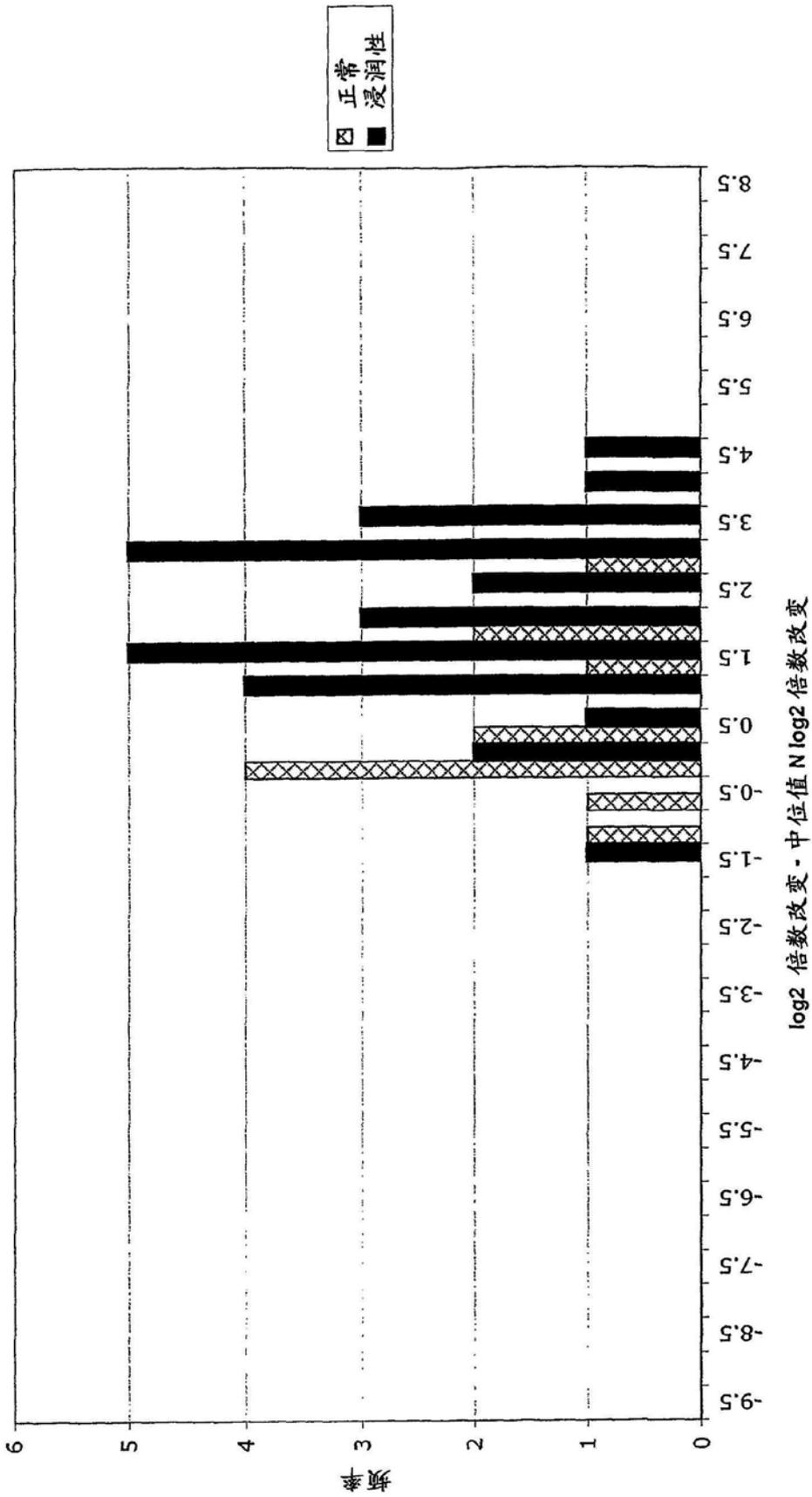


图6af

名称	符号	中位值 患者: 对照 倍数改变	最大值 患者: 对照 倍数改变
精子相关抗原 5	SPAG5	8	304
拓扑异构酶(DNA) II $\alpha$ 170kDa	TOP2A	165	5716
细胞分裂周期2, G1至S和 G2至M	CDC2	5	2370
内皮糖蛋白 (遗传出血性毛细血管扩张综合症1)	ENG	12	240
胰岛素样生长因子结合蛋白 5	IGFBP5	85	14,862
肾胚细胞瘤过量表达的基因	NOV	6	730
神经毡蛋白 1	NRP1	43	380
sema结构域, 免疫球蛋白结构域(Ig), 短碱性结构域, 分泌的, (脑信号蛋白) 3F	SEMA3F	35	567
EGF样结构域, 多个6	EGFL6	1	1
基质 Gla 蛋白	MGP	17	1147
脑信号蛋白 sem2	SEM2	5	501
嗜铬粒蛋白A(甲状腺分泌蛋白1)	CHGA	NT	NT
泛在蛋白缀合酶 E2C	UBE2C	63	1461
同源框 A13	HOXA13	20	1221
中期因子 (神经突生长促进因子 2)	MDK	265	4188
Thy-1 细胞表面抗原	THY1	2	26
含有杆状病毒 IAP 重复序列 5 (存活蛋白)	BIRC5	81	3524
染色体 4 的 SMC4 结构维持样 1 (酵母)	SMC4L1	13	232

图7

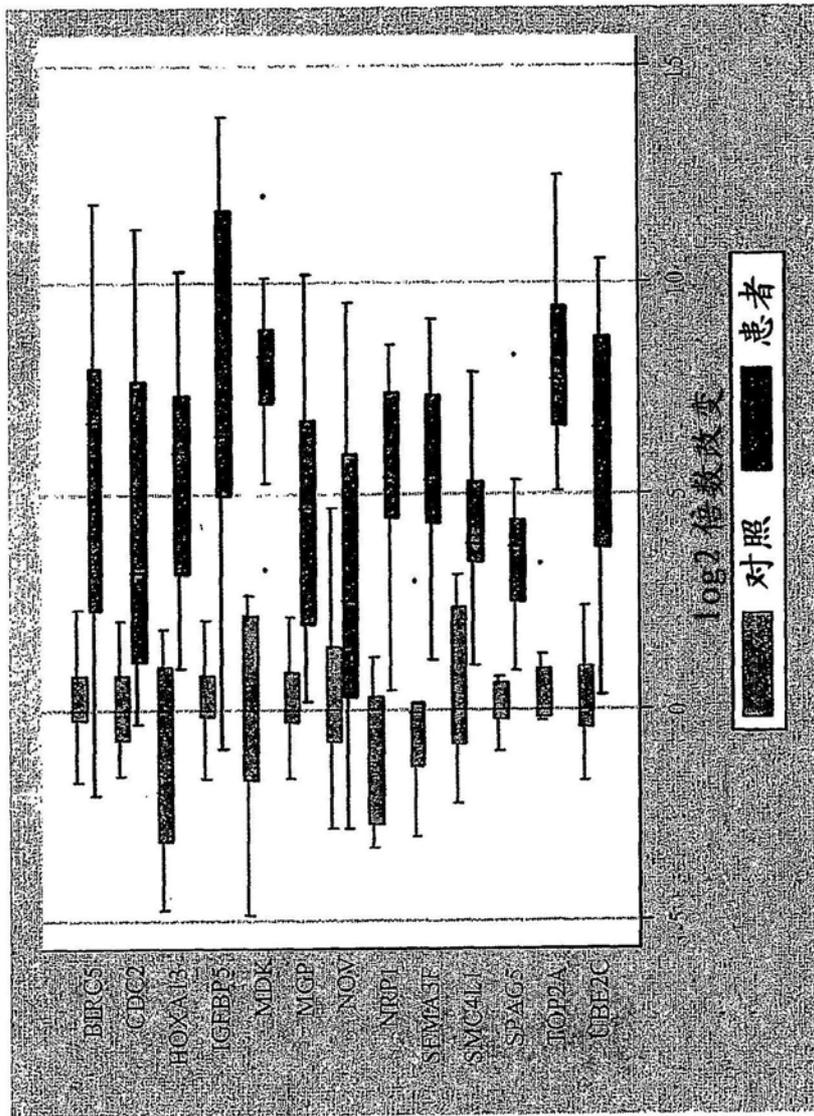


图8

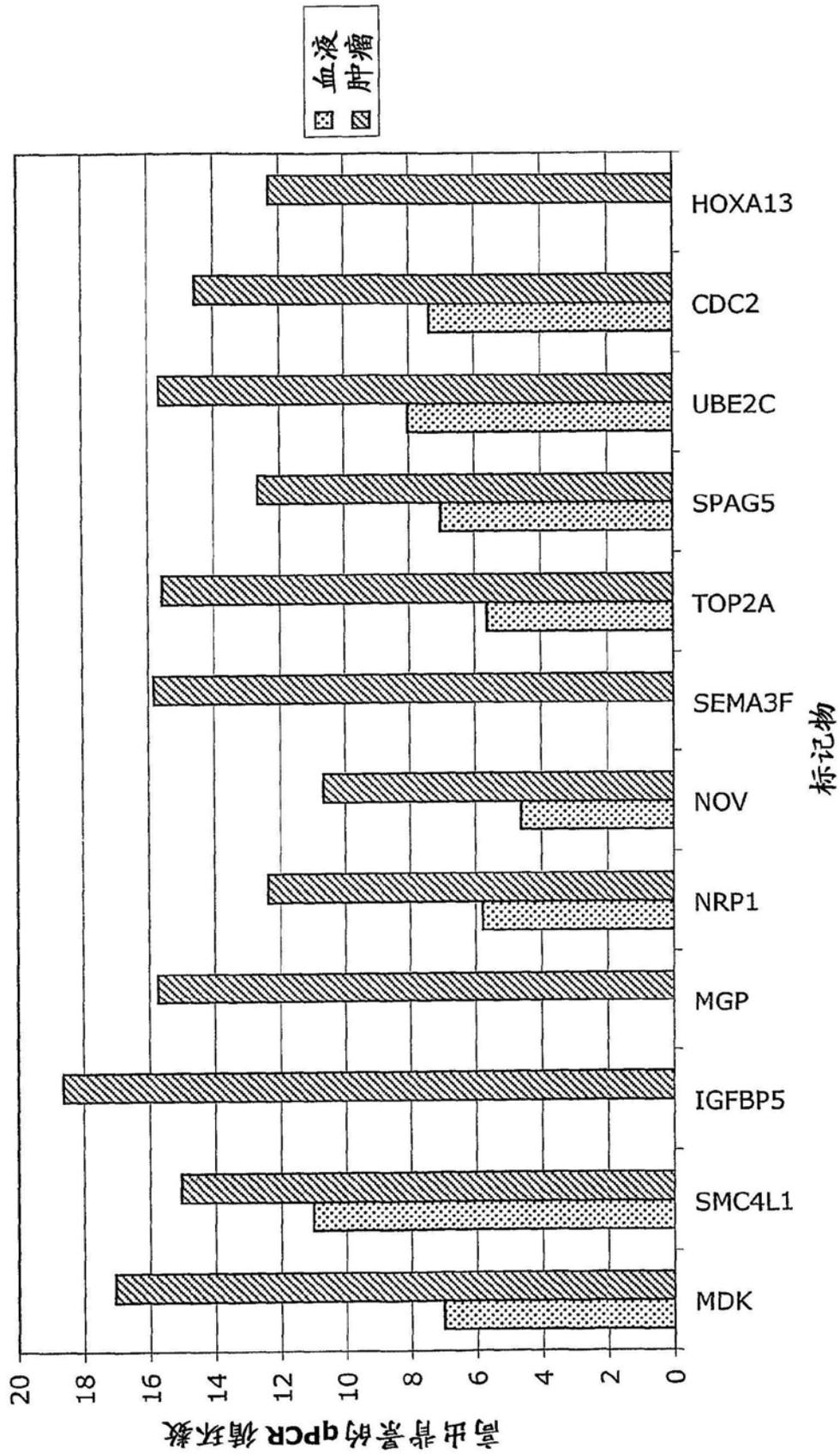


图9

标记物	中位值 log2 差异	中位值 log2 差异
	患者: 健康对照	患者: 非恶性对照
HoxA13	8	7.2
IGFBP5	10.4	10.1
NRP1	6.2	4.9
Sema3F	8.3	7.4
Top2a	6.3	6
UBE2c	6.4	4.6
SMC4L1	5.4	4
MDK	10.1	7.7
MGP	7.1	7.2

图10

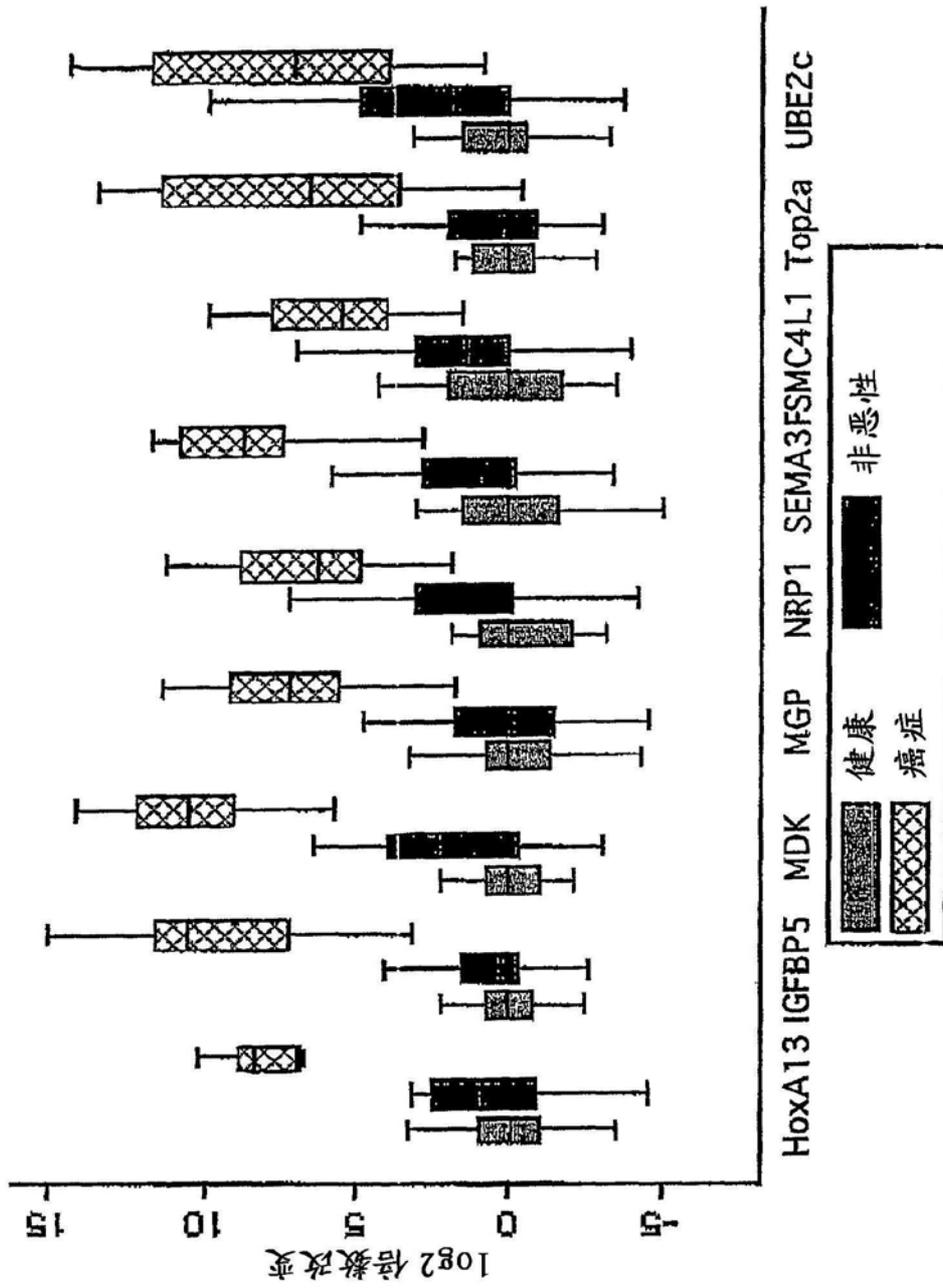


图11

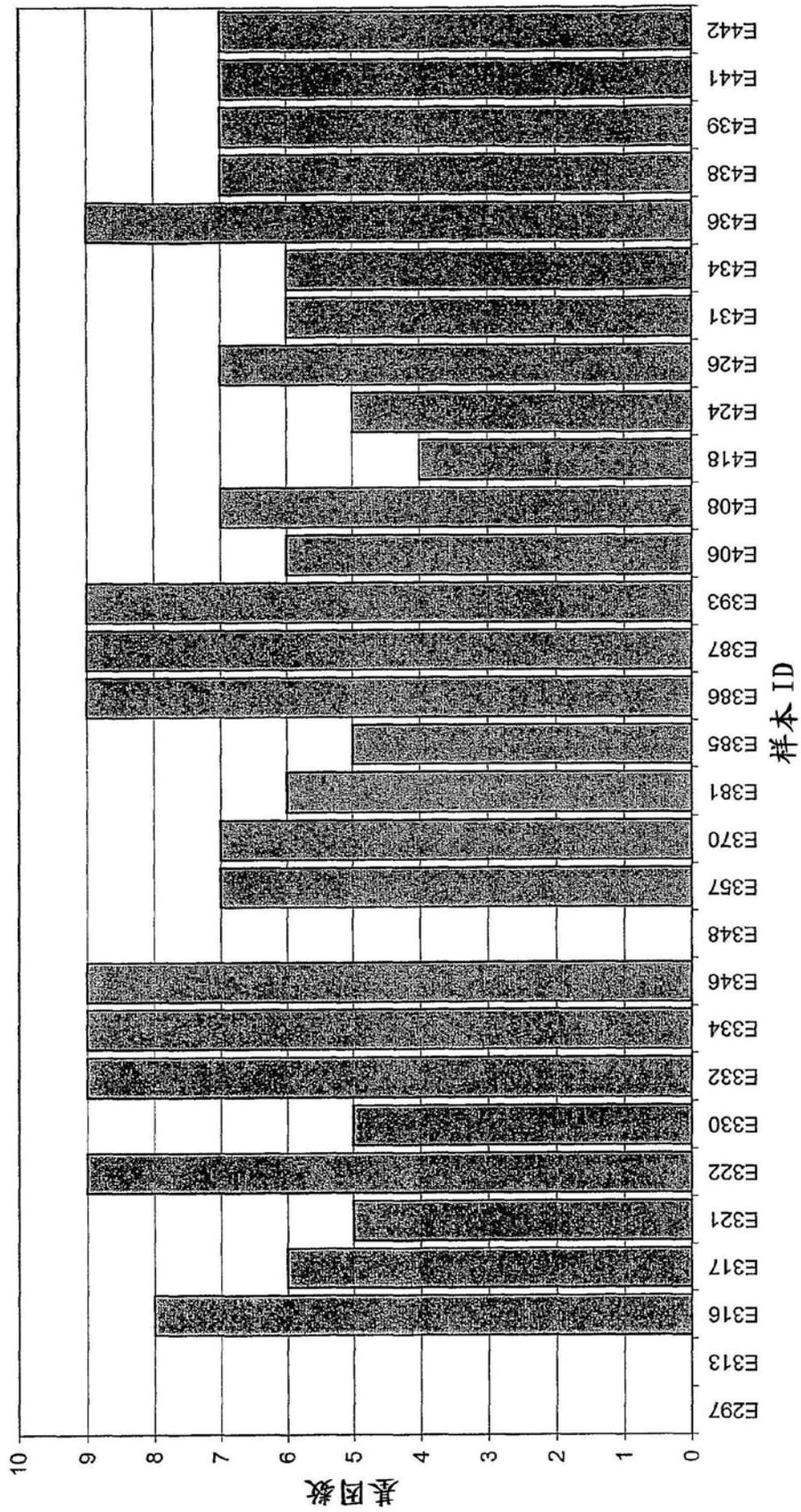


图12a

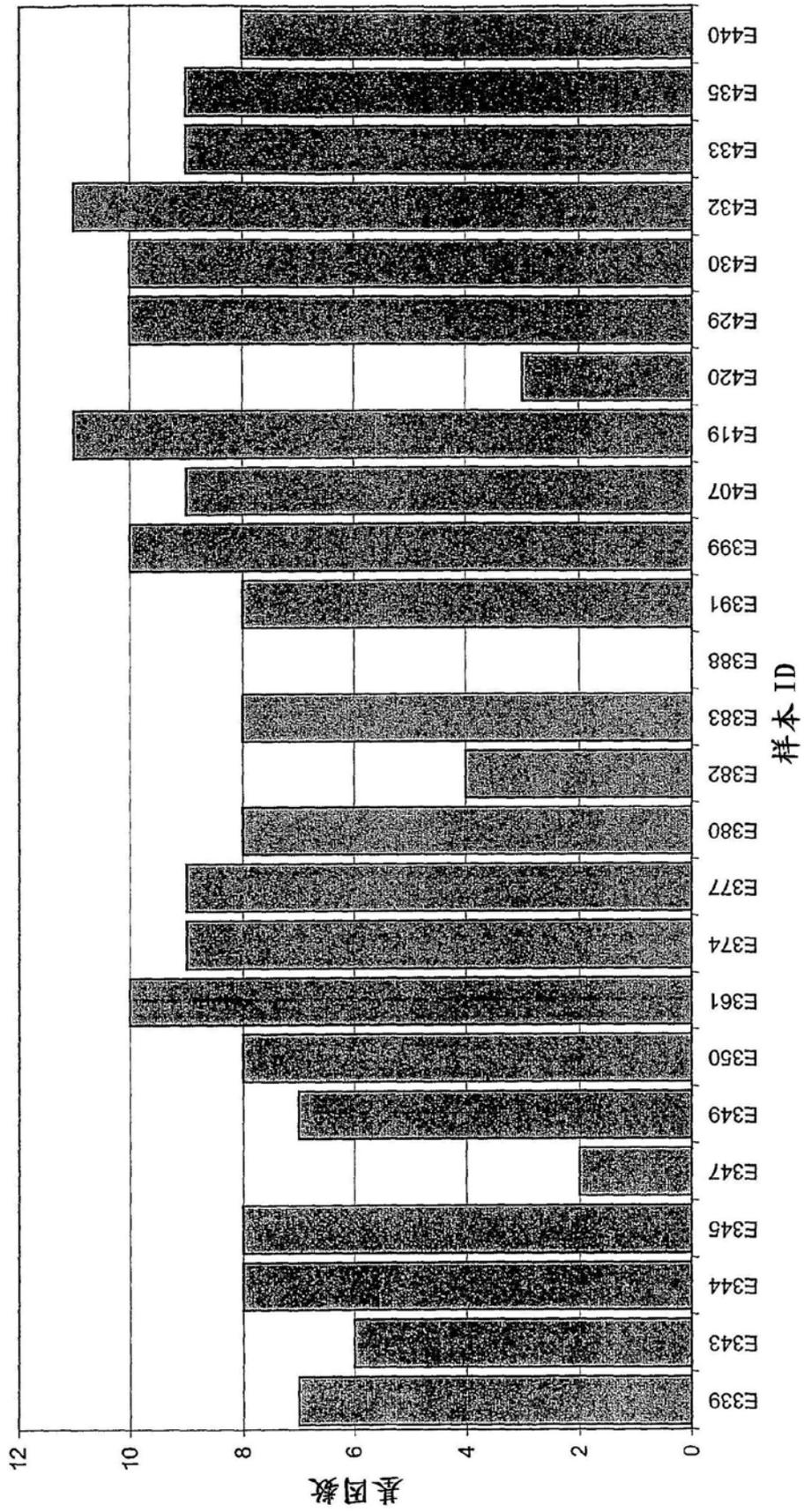


图12b

试验中 标记物 的数	总的可能 试验	具敏感性的试验数			具敏感性的试验的比例		
		>=90%	>=95%	>=99%	>=90%	>=95%	>=99%
1	15	3	2	0	20%	13%	0%
2	105	42	13	3	40%	13%	3%
3	455	247	233	62	54%	51%	14%

图13a

试验中 标记物 的数	总的可能 试验	具敏感性的试验数			具敏感性的试验的比例		
		$\geq 90\%$	$\geq 95\%$	$\geq 99\%$	$\geq 90\%$	$\geq 95\%$	$\geq 99\%$
1	17	0	0	0	0%	0%	0%
2	136	11	1	0	8%	1%	0%
3	680	136	22	0	20%	3%	0%

图13b

**单一标记物**

<b>标记物</b>	<b>敏感性</b>
TOP2a	<u>96.6%</u>
SPAG5	<u>96.2%</u>
CDC2	<u>94.8%</u>
NRP1	<u>79.2%</u>
CHGA	<u>70.6%</u>
SEM2	<u>55.2%</u>
THY1	<u>52.9%</u>
SMC4L1	<u>50.3%</u>
MGP	<u>49.4%</u>
MDK	<u>48.7%</u>
ENG	<u>47.7%</u>
UBE2c	<u>45.3%</u>
EGFL6	<u>39.2%</u>
BIRC5	<u>36.1%</u>
HOXA13	<u>32.6%</u>

**两种标记物的组合**

<b>标记物 1</b>	<b>标记物 2</b>	<b>敏感性</b>
TOP2a	CDC2	<u>99.4%</u>
SPAG5	TOP2A	<u>99.3%</u>
SPAG5	CDC2	<u>99.3%</u>
NRP1	UBE2c	<u>98.1%</u>
SPAG5	MDK	<u>96.8%</u>
TOP2a	THY1	<u>96.7%</u>
SPAG5	CHGA	<u>96.6%</u>
TOP2a	CHGA	<u>96.5%</u>
SPAG5	THY1	<u>96.5%</u>
TOP2a	MDK	<u>96.2%</u>
CDC2	CHGA	<u>95.4%</u>
TOP2a	ENG	<u>95.3%</u>
TOP2a	MGP	<u>95.1%</u>
SPAG5	NRP1	<u>95.0%</u>
SPAG5	BIRC5	<u>94.9%</u>
TOP2a	NRP1	<u>94.9%</u>
SPAG5	MGP	<u>94.8%</u>
SPAG5	EGFL6	<u>94.8%</u>
TOP2a	HOXA13	<u>94.7%</u>
TOP2a	EGFL6	<u>94.7%</u>

图14a

## 两种标记物的组合 (接上页)

标记物 1	标记物 2	敏感性
TOP2a	BIRC5	<u>94.7%</u>
SPAG5	ENG	<u>94.6%</u>
SPAG5	HOXA13	<u>94.4%</u>
CDC2	THY1	<u>94.4%</u>
CDC2	MDK	<u>93.9%</u>
SPAG5	SEM2	<u>93.8%</u>
TOP2a	SMC4L1	<u>93.7%</u>
TOP2a	SEM2	<u>93.6%</u>
CDC2	NRP1	<u>93.6%</u>
CDC2	MGP	<u>93.3%</u>
CDC2	ENG	<u>93.1%</u>
TOP2a	UBE2c	<u>92.8%</u>
SPAG5	UBE2c	<u>92.7%</u>
CDC2	EGFL6	<u>92.4%</u>
CDC2	BIRC5	<u>92.4%</u>
SPAG5	SMC4L1	<u>92.4%</u>
CDC2	HOXA13	<u>92.3%</u>
CDC2	SEM2	<u>91.2%</u>
NRP1	MDK	<u>91.2%</u>
NRP1	THY1	<u>90.6%</u>
CDC2	SMC4L1	<u>90.6%</u>
CDC2	UBE2c	<u>90.0%</u>

## 三种标记物的组合

标记物 1	标记物 2	标记物 3	敏感性
SPAG5	TOP2a	CDC2	<u>100.0%</u>
SPAG5	TOP2a	NRP1	<u>99.9%</u>
TOP2a	CDC2	NRP1	<u>99.9%</u>
SPAG5	TOP2a	CHGA	<u>99.9%</u>
SPAG5	CDC2	NRP1	<u>99.9%</u>
TOP2a	CDC2	CHGA	<u>99.9%</u>
SPAG5	TOP2a	SEM2	<u>99.9%</u>
SPAG5	CDC2	CHGA	<u>99.9%</u>
SPAG5	TOP2a	THY1	<u>99.8%</u>
SPAG5	TOP2a	SMC4L1	<u>99.8%</u>
SPAG5	TOP2a	MGP	<u>99.9%</u>
SPAG5	TOP2a	MDK	<u>99.9%</u>
SPAG5	TOP2a	ENG	<u>99.9%</u>
SPAG5	TOP2a	UBE2c	<u>99.8%</u>
SPAG5	TOP2a	EGFL6	<u>99.8%</u>
TOP2a	CDC2	SEM2	<u>99.8%</u>

图14a (接上页)

三种标记物的组合 (接上页)			敏感性
标记物 1	标记物 2	标记物 3	
SPAG5	TOP2a	BIRC5	<u>99.8%</u>
TOP2a	CDC2	THY1	<u>99.7%</u>
SPAG5	TOP2a	HOXA13	<u>99.8%</u>
TOP2a	CDC2	SMC4L1	<u>99.8%</u>
SPAG5	CDC2	SEM2	<u>99.8%</u>
TOP2a	CDC2	MGP	<u>99.8%</u>
TOP2a	CDC2	MDK	<u>99.8%</u>
TOP2a	CDC2	ENG	<u>99.8%</u>
SPAG5	CDC2	THY1	<u>99.7%</u>
TOP2a	CDC2	UBE2c	<u>99.7%</u>
SPAG5	CDC2	SMC4L1	<u>99.8%</u>
SPAG5	CDC2	MGP	<u>99.8%</u>
SPAG5	CDC2	MDK	<u>99.8%</u>
SPAG5	CDC2	ENG	<u>99.8%</u>
TOP2a	CDC2	EGFL6	<u>99.7%</u>
SPAG5	CDC2	UBE2c	<u>99.7%</u>
TOP2a	CDC2	BIRC5	<u>99.7%</u>
TOP2a	CDC2	HOXA13	<u>99.7%</u>
SPAG5	CDC2	EGFL6	<u>99.7%</u>
SPAG5	CDC2	BIRC5	<u>99.7%</u>
SPAG5	CDC2	HOXA13	<u>99.7%</u>
TOP2a	NRP1	CHGA	<u>99.5%</u>
SPAG5	NRP1	CHGA	<u>99.5%</u>
TOP2a	NRP1	SEM2	<u>99.2%</u>
CDC2	NRP1	CHGA	<u>99.3%</u>
TOP2a	NRP1	THY1	<u>98.9%</u>
TOP2a	NRP1	SMC4L1	<u>99.1%</u>
SPAG5	NRP1	SEM2	<u>99.2%</u>
TOP2a	NRP1	MGP	<u>99.2%</u>
TOP2a	NRP1	MDK	<u>99.2%</u>
TOP2a	ENG	NRP1	<u>99.1%</u>
SPAG5	NRP1	THY1	<u>98.9%</u>
TOP2a	NRP1	UBE2c	<u>99.0%</u>
SPAG5	NRP1	SMC4L1	<u>99.1%</u>
SPAG5	NRP1	MGP	<u>99.2%</u>
SPAG5	NRP1	MDK	<u>99.2%</u>
SPAG5	ENG	NRP1	<u>99.1%</u>
TOP2a	NRP1	EGFL6	<u>99.0%</u>
SPAG5	NRP1	UBE2c	<u>99.0%</u>
TOP2a	SEM2	CHGA	<u>99.1%</u>
TOP2a	NRP1	BIRC5	<u>98.8%</u>

图14a (接上页)

三种标记物的组合 (接上页)			敏感性
标记物 1	标记物 2	标记物 3	
TOP2a	CHGA	THY1	<u>98.8%</u>
TOP2a	NRP1	HOXA13	<u>98.9%</u>
SPAG5	NRP1	EGFL6	<u>99.0%</u>
CDC2	NRP1	SEM2	<u>98.7%</u>
TOP2a	CHGA	SMC4L1	<u>99.0%</u>
SPAG5	SEM2	CHGA	<u>99.1%</u>
SPAG5	NRP1	BIRC5	<u>98.8%</u>
TOP2a	MGP	CHGA	<u>99.1%</u>
CDC2	NRP1	THY1	<u>98.3%</u>
TOP2a	CHGA	MDK	<u>99.1%</u>
TOP2a	ENG	CHGA	<u>99.0%</u>
SPAG5	CHGA	THY1	<u>98.8%</u>
SPAG5	NRP1	HOXA13	<u>98.9%</u>
CDC2	NRP1	SMC4L1	<u>98.6%</u>
TOP2a	CHGA	UBE2c	<u>98.9%</u>
CDC2	NRP1	MGP	<u>98.7%</u>
SPAG5	CHGA	SMC4L1	<u>99.0%</u>
CDC2	NRP1	MDK	<u>98.7%</u>
SPAG5	MGP	CHGA	<u>99.1%</u>
CDC2	ENG	NRP1	<u>98.6%</u>
SPAG5	CHGA	MDK	<u>99.1%</u>
SPAG5	ENG	CHGA	<u>99.0%</u>
CDC2	NRP1	UBE2c	<u>98.5%</u>
TOP2a	EGFL6	CHGA	<u>98.9%</u>
SPAG5	CHGA	UBE2c	<u>98.9%</u>
TOP2a	CHGA	BIRC5	<u>98.7%</u>
CDC2	NRP1	EGFL6	<u>98.4%</u>
TOP2a	CHGA	HOXA13	<u>98.8%</u>
SPAG5	EGFL6	CHGA	<u>98.9%</u>
CDC2	SEM2	CHGA	<u>98.6%</u>
CDC2	NRP1	BIRC5	<u>98.1%</u>
SPAG5	CHGA	BIRC5	<u>98.7%</u>
TOP2a	SEM2	THY1	<u>97.8%</u>
CDC2	CHGA	THY1	<u>98.1%</u>
CDC2	NRP1	HOXA13	<u>98.3%</u>
SPAG5	CHGA	HOXA13	<u>98.8%</u>
TOP2a	SEM2	SMC4L1	<u>98.2%</u>
CDC2	CHGA	SMC4L1	<u>98.4%</u>
TOP2a	MGP	SEM2	<u>98.3%</u>
CDC2	MGP	CHGA	<u>98.5%</u>
TOP2a	SEM2	MDK	<u>98.4%</u>

图14a (接上页)

三种标记物的组合 (接上页)			
标记物 1	标记物 2	标记物 3	敏感性
CDC2	CHGA	MDK	<u>98.6%</u>
TOP2a	THY1	SMC4L1	<u>97.5%</u>
TOP2a	ENG	SEM2	<u>98.3%</u>
SPAG5	SEM2	THY1	<u>97.8%</u>
CDC2	ENG	CHGA	<u>98.5%</u>
TOP2a	MGP	THY1	<u>97.7%</u>
TOP2a	MDK	THY1	<u>97.8%</u>
TOP2a	SEM2	UBE2c	<u>98.1%</u>
TOP2a	ENG	THY1	<u>97.6%</u>
CDC2	CHGA	UBE2c	<u>98.3%</u>
SPAG5	SEM2	SMC4L1	<u>98.2%</u>
TOP2a	MGP	SMC4L1	<u>98.2%</u>
SPAG5	MGP	SEM2	<u>98.3%</u>
TOP2a	MDK	SMC4L1	<u>98.2%</u>
SPAG5	SEM2	MDK	<u>98.4%</u>
TOP2a	UBE2c	THY1	<u>97.4%</u>
TOP2a	MGP	MDK	<u>98.3%</u>
TOP2a	ENG	SMC4L1	<u>98.1%</u>
SPAG5	THY1	SMC4L1	<u>97.5%</u>
SPAG5	ENG	SEM2	<u>98.3%</u>
TOP2a	ENG	MGP	<u>98.2%</u>
SPAG5	MGP	THY1	<u>97.7%</u>
TOP2a	ENG	MDK	<u>98.2%</u>
SPAG5	MDK	THY1	<u>97.8%</u>
TOP2a	UBE2c	SMC4L1	<u>97.8%</u>
TOP2a	EGFL6	SEM2	<u>98.0%</u>
SPAG5	SEM2	UBE2c	<u>98.1%</u>
SPAG5	ENG	THY1	<u>97.6%</u>
CDC2	EGFL6	CHGA	<u>98.3%</u>
TOP2a	MGP	UBE2c	<u>98.0%</u>
SPAG5	MGP	SMC4L1	<u>98.1%</u>
TOP2a	UBE2c	MDK	<u>98.1%</u>
SPAG5	MDK	SMC4L1	<u>98.2%</u>
TOP2a	EGFL6	THY1	<u>97.3%</u>
TOP2a	ENG	UBE2c	<u>97.9%</u>
TOP2a	SEM2	BIRC5	<u>97.7%</u>
SPAG5	UBE2c	THY1	<u>97.3%</u>
CDC2	CHGA	BIRC5	<u>97.9%</u>
SPAG5	MGP	MDK	<u>98.3%</u>
SPAG5	ENG	SMC4L1	<u>98.1%</u>
SPAG5	ENG	MGP	<u>98.2%</u>

图14a (接上页)

三种标记物的组合 (接上页)			
标记物 1	标记物 2	标记物 3	敏感性
SPAG5	ENG	MDK	<u>98.2%</u>
TOP2a	BIRC5	THY1	<u>96.8%</u>
TOP2a	SEM2	HOXA13	<u>97.8%</u>
TOP2a	EGFL6	SMC4L1	<u>97.8%</u>
SPAG5	UBE2c	SMC4L1	<u>97.8%</u>
SPAG5	EGFL6	SEM2	<u>98.0%</u>
CDC2	CHGA	HOXA13	<u>98.1%</u>
TOP2a	EGFL6	MGP	<u>98.0%</u>
SPAG5	MGP	UBE2c	<u>98.0%</u>
TOP2a	EGFL6	MDK	<u>98.0%</u>
SPAG5	UBE2c	MDK	<u>98.1%</u>
TOP2a	HOXA13	THY1	<u>97.0%</u>
TOP2a	BIRC5	SMC4L1	<u>97.4%</u>
TOP2a	ENG	EGFL6	<u>97.9%</u>
SPAG5	EGFL6	THY1	<u>97.3%</u>
SPAG5	ENG	UBE2c	<u>97.9%</u>
SPAG5	SEM2	BIRC5	<u>97.6%</u>
TOP2a	MGP	BIRC5	<u>97.6%</u>
CDC2	SEM2	THY1	<u>96.6%</u>
TOP2a	BIRC5	MDK	<u>97.6%</u>
TOP2a	EGFL6	UBE2c	<u>97.6%</u>
TOP2a	ENG	BIRC5	<u>97.4%</u>
TOP2a	HOXA13	SMC4L1	<u>97.5%</u>
SPAG5	BIRC5	THY1	<u>96.8%</u>
SPAG5	SEM2	HOXA13	<u>97.8%</u>
SPAG5	EGFL6	SMC4L1	<u>97.8%</u>
TOP2a	MGP	HOXA13	<u>97.7%</u>
CDC2	SEM2	SMC4L1	<u>97.2%</u>
SPAG5	EGFL6	MGP	<u>98.0%</u>
TOP2a	HOXA13	MDK	<u>97.8%</u>
SPAG5	EGFL6	MDK	<u>98.0%</u>
CDC2	MGP	SEM2	<u>97.4%</u>
TOP2a	BIRC5	UBE2c	<u>97.2%</u>
TOP2a	ENG	HOXA13	<u>97.6%</u>
SPAG5	HOXA13	THY1	<u>97.0%</u>
CDC2	SEM2	MDK	<u>97.5%</u>
SPAG5	BIRC5	SMC4L1	<u>97.4%</u>
SPAG5	ENG	EGFL6	<u>97.9%</u>
CDC2	THY1	SMC4L1	<u>96.2%</u>
CDC2	ENG	SEM2	<u>97.3%</u>
SPAG5	MGP	BIRC5	<u>97.6%</u>

图14a (接上页)

## 三种标记物的组合 (接上页)

标记物 1	标记物 2	标记物 3	敏感性
SPAG5	BIRC5	MDK	<u>97.6%</u>
CDC2	MGP	THY1	<u>96.4%</u>
TOP2a	UBE2c	HOXA13	<u>97.4%</u>
CDC2	MDK	THY1	<u>96.5%</u>
SPAG5	EGFL6	UBE2c	<u>97.6%</u>
SPAG5	ENG	BIRC5	<u>97.4%</u>
SPAG5	HOXA13	SMC4L1	<u>97.5%</u>
CDC2	SEM2	UBE2c	<u>97.0%</u>
CDC2	ENG	THY1	<u>96.3%</u>
SPAG5	MGP	HOXA13	<u>97.7%</u>
SPAG5	HOXA13	MDK	<u>97.8%</u>
CDC2	MGP	SMC4L1	<u>97.1%</u>
TOP2a	EGFL6	BIRC5	<u>97.1%</u>
SPAG5	BIRC5	UBE2c	<u>97.2%</u>
CDC2	MDK	SMC4L1	<u>97.2%</u>
SPAG5	ENG	HOXA13	<u>97.6%</u>
CDC2	UBE2c	THY1	<u>95.9%</u>
CDC2	MGP	MDK	<u>97.4%</u>
CDC2	ENG	SMC4L1	<u>97.0%</u>
CDC2	ENG	MGP	<u>97.2%</u>
TOP2a	EGFL6	HOXA13	<u>97.3%</u>
SPAG5	UBE2c	HOXA13	<u>97.3%</u>
CDC2	ENG	MDK	<u>97.3%</u>
CDC2	UBE2c	SMC4L1	<u>96.6%</u>
CDC2	EGFL6	SEM2	<u>96.9%</u>
CDC2	MGP	UBE2c	<u>96.9%</u>
TOP2a	BIRC5	HOXA13	<u>96.8%</u>
CDC2	UBE2c	MDK	<u>97.0%</u>
SPAG5	EGFL6	BIRC5	<u>97.1%</u>
CDC2	EGFL6	THY1	<u>95.8%</u>
CDC2	ENG	UBE2c	<u>96.7%</u>
CDC2	SEM2	BIRC5	<u>96.3%</u>
SPAG5	EGFL6	HOXA13	<u>97.3%</u>
CDC2	BIRC5	THY1	<u>95.0%</u>
CDC2	SEM2	HOXA13	<u>96.6%</u>
CDC2	EGFL6	SMC4L1	<u>96.6%</u>
CDC2	EGFL6	MGP	<u>96.8%</u>
CDC2	EGFL6	MDK	<u>96.9%</u>
SPAG5	BIRC5	HOXA13	<u>96.8%</u>
CDC2	HOXA13	THY1	<u>95.3%</u>
CDC2	BIRC5	SMC4L1	<u>95.9%</u>

图14a (接上页)

三种标记物的组合 (接上页)

标记物 1	标记物 2	标记物 3	敏感性
CDC2	ENG	EGFL6	<u>96.7%</u>
CDC2	MGP	BIRC5	<u>96.2%</u>
CDC2	BIRC5	MDK	<u>96.3%</u>
CDC2	EGFL6	UBE2c	<u>96.3%</u>
CDC2	ENG	BIRC5	<u>96.0%</u>
CDC2	HOXA13	SMC4L1	<u>96.2%</u>
CDC2	MGP	HOXA13	<u>96.4%</u>
CDC2	HOXA13	MDK	<u>96.5%</u>
CDC2	BIRC5	UBE2c	<u>95.6%</u>
CDC2	ENG	HOXA13	<u>96.3%</u>
CDC2	UBE2c	HOXA13	<u>95.9%</u>
CDC2	EGFL6	BIRC5	<u>95.5%</u>
CDC2	EGFL6	HOXA13	<u>95.8%</u>
CDC2	BIRC5	HOXA13	<u>95.0%</u>
NRP1	SEM2	CHGA	<u>94.6%</u>
NRP1	CHGA	THY1	<u>92.6%</u>
NRP1	CHGA	SMC4L1	<u>94.0%</u>
NRP1	MGP	CHGA	<u>94.4%</u>
NRP1	CHGA	MDK	<u>94.6%</u>
ENG	NRP1	CHGA	<u>94.1%</u>
NRP1	CHGA	UBE2c	<u>93.5%</u>
NRP1	EGFL6	CHGA	<u>93.4%</u>
NRP1	CHGA	BIRC5	<u>92.1%</u>
NRP1	CHGA	HOXA13	<u>92.6%</u>
NRP1	SEM2	THY1	<u>86.8%</u>
NRP1	SEM2	SMC4L1	<u>89.3%</u>
NRP1	MGP	SEM2	<u>90.0%</u>
NRP1	SEM2	MDK	<u>90.3%</u>

图14a (接上页)

## 单一标记物

标记物	敏感性
TOP2a	<u>84.5%</u>
CHGA	<u>63.7%</u>
NRP1	<u>66.9%</u>
ENG	<u>62.2%</u>
SPAG5	<u>64.8%</u>
SEM2	<u>71.0%</u>
MDK	<u>43.4%</u>
HOXA13	<u>56.8%</u>
IGFBP5	<u>44.4%</u>
SEMA3F	<u>39.7%</u>
EGFL6	<u>40.6%</u>
SMC4L1	<u>35.8%</u>
NOV	<u>26.6%</u>
UBE2c	<u>26.8%</u>
BIRC5	<u>18.8%</u>
THY1	<u>30.9%</u>

## 两种标记物的组合

标记物 1	标记物 2	敏感性
CDC2	TOP2a	<u>95.4%</u>
TOP2a	SEM2	<u>91.2%</u>
CDC2	SEM2	<u>90.7%</u>
TOP2a	NRP1	<u>91.9%</u>
TOP2a	SPAG5	<u>91.2%</u>
TOP2a	CHGA	<u>92.2%</u>
CDC2	NRP1	<u>91.5%</u>
TOP2a	ENG	<u>90.9%</u>
CDC2	SPAG5	<u>90.7%</u>
CDC2	CHGA	<u>91.8%</u>
CDC2	ENG	<u>90.4%</u>

## 三种标记物的组合

标记物 1	标记物 2	标记物 3	敏感性
CDC2	TOP2a	CHGA	<u>97.8%</u>
CDC2	TOP2a	NRP1	<u>97.5%</u>
CDC2	TOP2a	SPAG5	<u>97.3%</u>
CDC2	TOP2a	ENG	<u>97.2%</u>
CDC2	TOP2a	SEM2	<u>97.0%</u>
HOXA13	CDC2	TOP2a	<u>96.6%</u>

图14b

三种标记物的组合 (接上页)			敏感性
标记物 1	标记物 2	标记物 3	
CDC2	TOP2a	MDK	<u>96.4%</u>
CDC2	TOP2a	IGFBP5	<u>96.3%</u>
TOP2a	NRP1	CHGA	<u>96.2%</u>
CDC2	TOP2a	SEMA3F	<u>96.1%</u>
CDC2	NRP1	CHGA	<u>96.1%</u>
CDC2	TOP2a	EGFL6	<u>95.8%</u>
TOP2a	SPAG5	CHGA	<u>95.8%</u>
TOP2a	ENG	CHGA	<u>95.7%</u>
CDC2	SPAG5	CHGA	<u>95.6%</u>
CDC2	ENG	CHGA	<u>95.6%</u>
CDC2	TOP2a	SMC4L1	<u>95.4%</u>
TOP2a	SEM2	CHGA	<u>95.4%</u>
TOP2a	NRP1	SPAG5	<u>95.3%</u>
CDC2	SEM2	CHGA	<u>95.3%</u>
TOP2a	NRP1	ENG	<u>95.2%</u>
CDC2	NRP1	SPAG5	<u>95.2%</u>
CDC2	NRP1	ENG	<u>95.1%</u>
TOP2a	NRP1	SEM2	<u>94.9%</u>
CDC2	TOP2a	NOV	<u>94.9%</u>
CDC2	NRP1	SEM2	<u>94.8%</u>
UBE2c	CDC2	TOP2a	<u>94.8%</u>
TOP2a	ENG	SPAG5	<u>94.7%</u>
HOXA13	TOP2a	CHGA	<u>94.7%</u>
CDC2	ENG	SPAG5	<u>94.6%</u>
CDC2	TOP2a	THY1	<u>94.6%</u>
HOXA13	CDC2	CHGA	<u>94.5%</u>
BIRC5	CDC2	TOP2a	<u>94.5%</u>
TOP2a	SPAG5	SEM2	<u>94.4%</u>
TOP2a	MDK	CHGA	<u>94.4%</u>
TOP2a	ENG	SEM2	<u>94.3%</u>
CDC2	SPAG5	SEM2	<u>94.3%</u>
TOP2a	IGFBP5	CHGA	<u>94.2%</u>
CDC2	MDK	CHGA	<u>94.2%</u>
CDC2	ENG	SEM2	<u>94.2%</u>
HOXA13	TOP2a	NRP1	<u>94.1%</u>
CDC2	IGFBP5	CHGA	<u>94.1%</u>
HOXA13	CDC2	NRP1	<u>94.0%</u>
TOP2a	SEMA3F	CHGA	<u>93.9%</u>
TOP2a	NRP1	MDK	<u>93.8%</u>
CDC2	SEMA3F	CHGA	<u>93.7%</u>
TOP2a	NRP1	IGFBP5	<u>93.6%</u>

图14b (接上页)

三种标记物的组合 (接上页)			敏感性
标记物 1	标记物 2	标记物 3	
CDC2	NRP1	MDK	<u>93.6%</u>
HOXA13	TOP2a	SPAG5	<u>93.5%</u>
TOP2a	EGFL6	CHGA	<u>93.5%</u>
CDC2	NRP1	IGFBP5	<u>93.4%</u>
HOXA13	TOP2a	ENG	<u>93.4%</u>
HOXA13	CDC2	SPAG5	<u>93.3%</u>
CDC2	EGFL6	CHGA	<u>93.3%</u>
TOP2a	NRP1	SEMA3F	<u>93.3%</u>
HOXA13	CDC2	ENG	<u>93.3%</u>
TOP2a	SPAG5	MDK	<u>93.1%</u>
CDC2	NRP1	SEMA3F	<u>93.1%</u>
TOP2a	ENG	MDK	<u>93.0%</u>
HOXA13	TOP2a	SEM2	<u>93.0%</u>
TOP2a	SPAG5	IGFBP5	<u>92.9%</u>
TOP2a	SMC4L1	CHGA	<u>92.9%</u>
CDC2	SPAG5	MDK	<u>92.9%</u>
TOP2a	ENG	IGFBP5	<u>92.9%</u>
CDC2	ENG	MDK	<u>92.8%</u>
HOXA13	CDC2	SEM2	<u>92.8%</u>
TOP2a	NRP1	EGFL6	<u>92.8%</u>
CDC2	SPAG5	IGFBP5	<u>92.7%</u>
CDC2	SMC4L1	CHGA	<u>92.7%</u>
CDC2	ENG	IGFBP5	<u>92.7%</u>
CDC2	NRP1	EGFL6	<u>92.6%</u>
TOP2a	SEM2	MDK	<u>92.6%</u>
TOP2a	SPAG5	SEMA3F	<u>92.6%</u>
NRP1	SPAG5	CHGA	<u>92.5%</u>
TOP2a	ENG	SEMA3F	<u>92.5%</u>
NRP1	ENG	CHGA	<u>92.5%</u>
TOP2a	SEM2	IGFBP5	<u>92.4%</u>
CDC2	SEM2	MDK	<u>92.4%</u>
CDC2	SPAG5	SEMA3F	<u>92.4%</u>
CDC2	ENG	SEMA3F	<u>92.3%</u>
TOP2a	NRP1	SMC4L1	<u>92.2%</u>
CDC2	SEM2	IGFBP5	<u>92.2%</u>
TOP2a	NOV	CHGA	<u>92.1%</u>
TOP2a	SPAG5	EGFL6	<u>92.0%</u>
TOP2a	SEM2	SEMA3F	<u>92.0%</u>
CDC2	NRP1	SMC4L1	<u>92.0%</u>
NRP1	SEM2	CHGA	<u>92.0%</u>
UBE2c	TOP2a	CHGA	<u>91.9%</u>

图14b (接上页)

三种标记物的组合 (接上页)			敏感性
标记物 1	标记物 2	标记物 3	
TOP2a	ENG	EGFL6	<u>91.9%</u>
CDC2	NOV	CHGA	<u>91.9%</u>
CDC2	SPAG5	EGFL6	<u>91.8%</u>
CDC2	SEM2	SEMA3F	<u>91.8%</u>
UBE2c	CDC2	CHGA	<u>91.7%</u>
CDC2	ENG	EGFL6	<u>91.7%</u>
ENG	SPAG5	CHGA	<u>91.7%</u>
TOP2a	THY1	CHGA	<u>91.6%</u>
BIRC5	THY1	CHGA	<u>91.5%</u>
TOP2a	EGFL6	SEM2	<u>91.4%</u>
HOXA13	TOP2a	MDK	<u>91.4%</u>
TOP2a	SPAG5	SMC4L1	<u>91.4%</u>
CDC2	THY1	CHGA	<u>91.3%</u>
TOP2a	NRP1	NOV	<u>91.3%</u>
TOP2a	ENG	SMC4L1	<u>91.3%</u>
BIRC5	CDC2	CHGA	<u>91.2%</u>
HOXA13	TOP2a	IGFBP5	<u>91.2%</u>
CDC2	EGFL6	SEM2	<u>91.2%</u>
HOXA13	CDC2	MDK	<u>91.2%</u>
CDC2	SPAG5	SMC4L1	<u>91.1%</u>
SPAG5	SEM2	CHGA	<u>91.1%</u>
UBE2c	TOP2a	NRP1	<u>91.1%</u>
CDC2	NRP1	NOV	<u>91.0%</u>
CDC2	ENG	SMC4L1	<u>91.0%</u>
ENG	SEM2	CHGA	<u>91.0%</u>
HOXA13	CDC2	IGFBP5	<u>90.9%</u>
UBE2c	CDC2	NRP1	<u>90.9%</u>
NRP1	ENG	SPAG5	<u>90.8%</u>
HOXA13	TOP2a	SEMA3F	<u>90.7%</u>
TOP2a	SEM2	SMC4L1	<u>90.7%</u>
TOP2a	NRP1	THY1	<u>90.7%</u>
HOXA13	NRP1	CHGA	<u>90.7%</u>
TOP2a	MDK	IGFBP5	<u>90.6%</u>
BIRC5	TOP2a	NRP1	<u>90.6%</u>
HOXA13	CDC2	SEMA3F	<u>90.5%</u>
CDC2	SEM2	SMC4L1	<u>90.4%</u>
CDC2	NRP1	THY1	<u>90.4%</u>
CDC2	MDK	IGFBP5	<u>90.4%</u>
TOP2a	NOV	SPAG5	<u>90.4%</u>
BIRC5	CDC2	NRP1	<u>90.3%</u>
TOP2a	ENG	NOV	<u>90.2%</u>

图14b (接上页)

三种标记物的组合 (接上页)			敏感性
标记物 1	标记物 2	标记物 3	
NRP1	SPAG5	SEM2	<u>90.2%</u>
UBE2c	TOP2a	SPAG5	<u>90.2%</u>
TOP2a	MDK	SEMA3F	<u>90.1%</u>
NRP1	MDK	CHGA	<u>90.1%</u>
CDC2	NOV	SPAG5	<u>90.1%</u>
NRP1	ENG	SEM2	<u>90.1%</u>
HOXA13	TOP2a	EGFL6	<u>90.0%</u>
UBE2c	TOP2a	ENG	<u>90.0%</u>
CDC2	ENG	NOV	<u>90.0%</u>

图14b (接上页)

试验中标记物的数	总的可能试验	具敏感性的试验数				具敏感性的试验的比例				
		>=90%	>=95%	>=99%	>=90%	>=95%	>=99%	>=90%	>=95%	>=99%
1	9	1	1	1	0	11%	11%	11%	11%	0%
2	36	15	8	8	2	42%	22%	22%	22%	6%
3	84	59	37	37	13	70%	44%	44%	44%	16%

图15

## 单一标记物

标记物	敏感性(%)
IGFBP5	98
HoxA13	85
Sema3F	80
UBE2c	42
NRP1	37
Top2a	74
SMC4L1	34
MDK	79
MGP	70

## 两种标记物的组合

标记物1	标记物2	敏感性(%)
IGFBP5	HoxA13	99.2
IGFBP5	Sema3F	99.0
IGFBP5	MDK	98.9
IGFBP5	Top2a	98.9
IGFBP5	MGP	98.6
IGFBP5	UBE2c	97.5
IGFBP5	NRP1	97.3
IGFBP5	SMC4L1	97.2
HoxA13	Sema3F	94.0
HoxA13	MDK	93.5
HoxA13	Top2a	93.1
Sema3F	MDK	92.2
Sema3F	Top2a	91.7
HoxA13	MGP	91.3
Top2a	MDK	91.0

## 三种标记物的组合

标记物1	标记物2	标记物3	敏感性(%)
IGFBP5	HoxA13	Sema3F	99.6
IGFBP5	HoxA13	Top2a	99.6
IGFBP5	HoxA13	MDK	99.6
IGFBP5	Sema3F	Top2a	99.5
IGFBP5	Sema3F	MDK	99.5

图16

三种标记物的组合 (接上页)

标记物1	标记物2	标记物3	敏感性 (%)
IGFBP5	Top2a	MDK	99.5
IGFBP5	HoxA13	MGP	99.5
IGFBP5	Sema3F	MGP	99.4
IGFBP5	Top2a	MGP	99.3
IGFBP5	MDK	MGP	99.3
IGFBP5	HoxA13	UBE2c	99.1
IGFBP5	HoxA13	NRP1	99.0
IGFBP5	HoxA13	SMC4L1	99.0
IGFBP5	Sema3F	UBE2c	99.0
IGFBP5	UBE2c	Top2a	98.9
IGFBP5	Sema3F	NRP1	98.9
IGFBP5	UBE2c	MDK	98.9
IGFBP5	Sema3F	SMC4L1	98.9
IGFBP5	NRP1	Top2a	98.8
IGFBP5	NRP1	MDK	98.8
IGFBP5	Top2a	SMC4L1	98.8
IGFBP5	SMC4L1	MDK	98.8
IGFBP5	UBE2c	MGP	98.5
IGFBP5	NRP1	MGP	98.4
IGFBP5	SMC4L1	MGP	98.4
IGFBP5	UBE2c	NRP1	97.3
IGFBP5	UBE2c	SMC4L1	97.3
HoxA13	Sema3F	Top2a	97.2
HoxA13	Sema3F	MDK	97.2
IGFBP5	NRP1	SMC4L1	97.1
HoxA13	Top2a	MDK	97.0
Sema3F	Top2a	MDK	96.5
HoxA13	Sema3F	MGP	96.3
HoxA13	Top2a	MGP	96.0
HoxA13	MDK	MGP	96.0
Sema3F	Top2a	MGP	95.3
Sema3F	MDK	MGP	95.3
Top2a	MDK	MGP	94.9
HoxA13	Sema3F	UBE2c	93.9
HoxA13	UBE2c	Top2a	93.4
HoxA13	Sema3F	NRP1	93.4
HoxA13	UBE2c	MDK	93.3
HoxA13	Sema3F	SMC4L1	93.3
HoxA13	NRP1	Top2a	92.8

图16 (接上页)

HoxA13	NRP1	MDK	92.7
HoxA13	Top2a	SMC4L1	92.7
HoxA13	SMC4L1	MDK	92.7
Sema3F	UBE2c	Top2a	92.3
Sema3F	UBE2c	MDK	92.3
Sema3F	NRP1	Top2a	91.6
UBE2c	Top2a	MDK	91.6
Sema3F	NRP1	MDK	91.6
Sema3F	Top2a	SMC4L1	91.6
Sema3F	SMC4L1	MDK	91.6
HoxA13	UBE2c	MGP	91.2
NRP1	Top2a	MDK	90.9
Top2a	SMC4L1	MDK	90.8
HoxA13	NRP1	MGP	90.4
HoxA13	SMC4L1	MGP	90.4

图16(接上页)

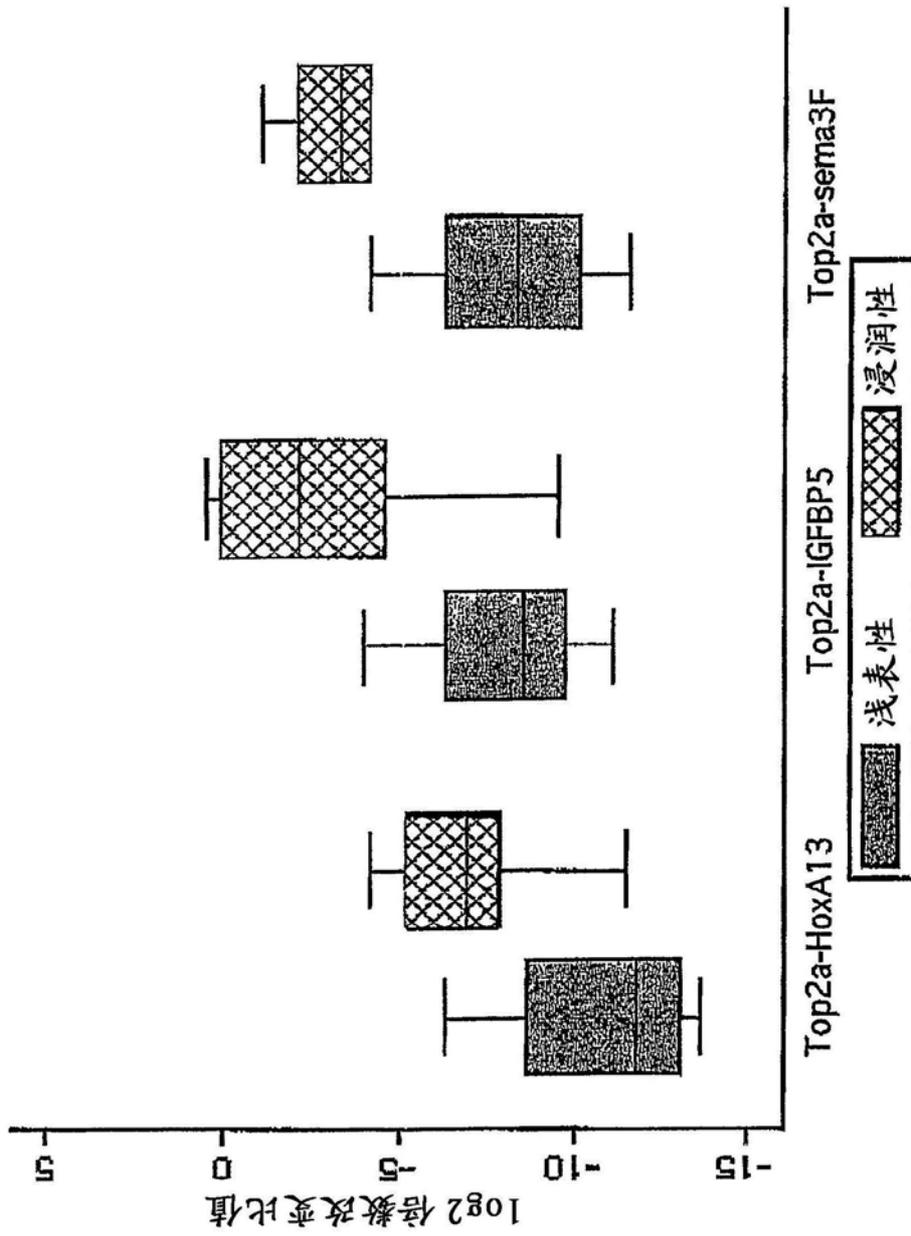


图17

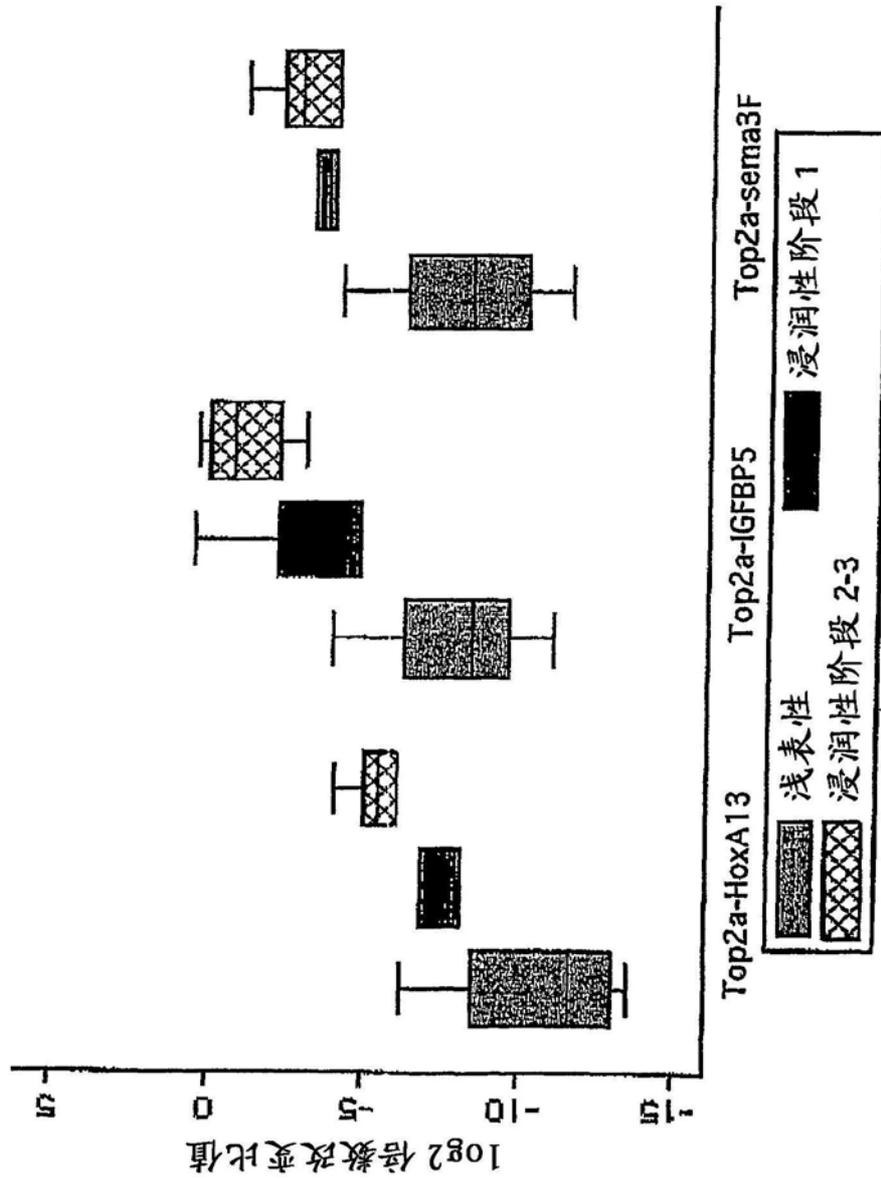


图18

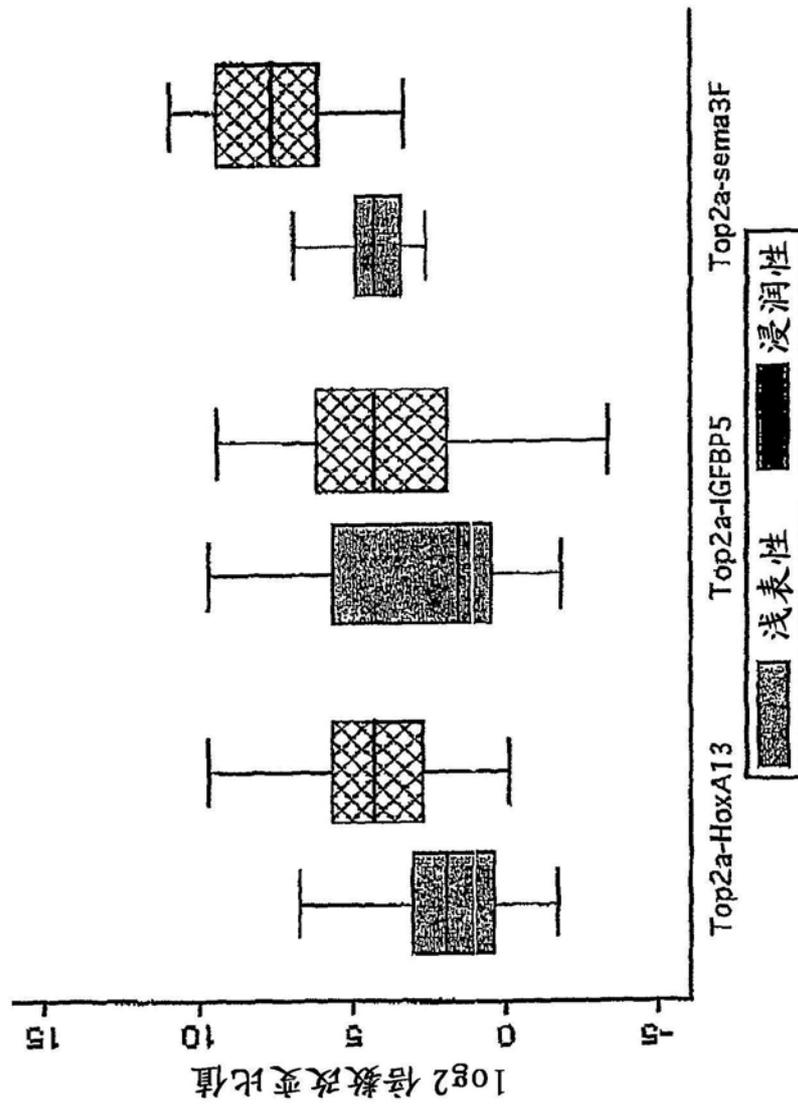
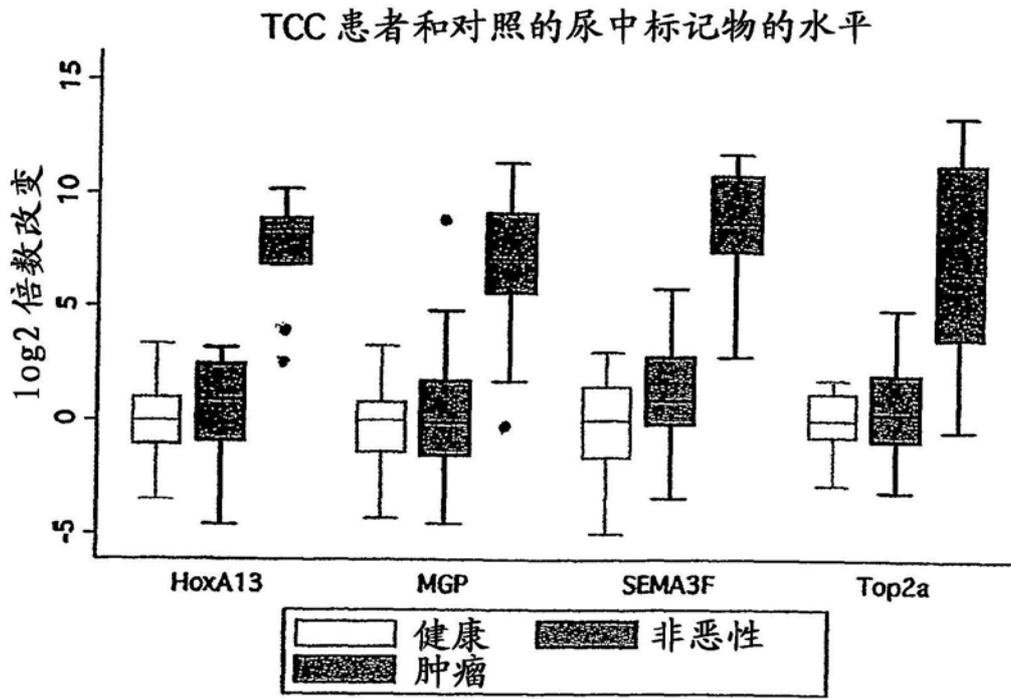


图19



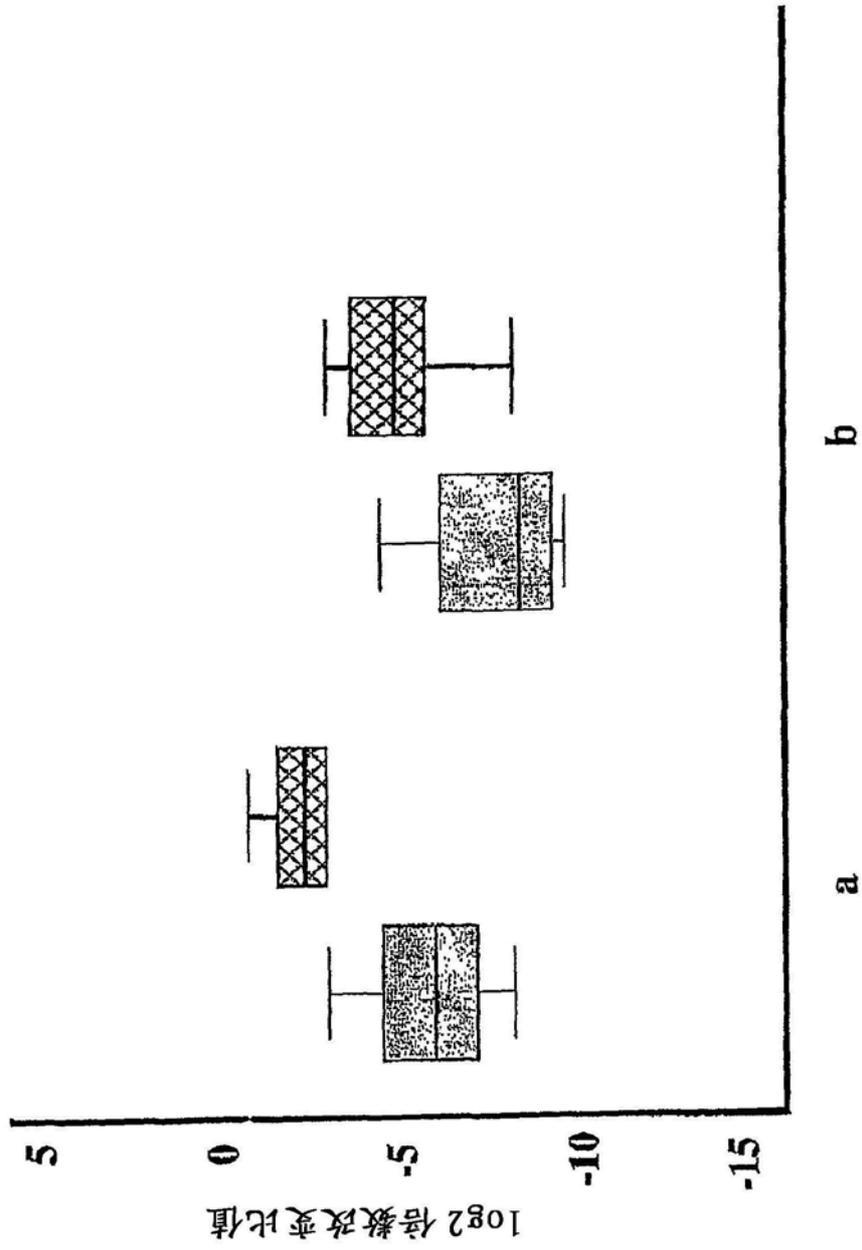


图21