



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107607712 A

(43)申请公布日 2018.01.19

(21)申请号 201711003881.2

(22)申请日 2017.10.24

(71)申请人 李翀

地址 100101 北京市朝阳区大屯路15号中  
国科学院生物物理研究所

(72)发明人 李翀 李书成

(74)专利代理机构 北京创遇知识产权代理有限  
公司 11577

代理人 武媛 吕学文

(51)Int.Cl.

G01N 33/558(2006.01)

G01N 33/574(2006.01)

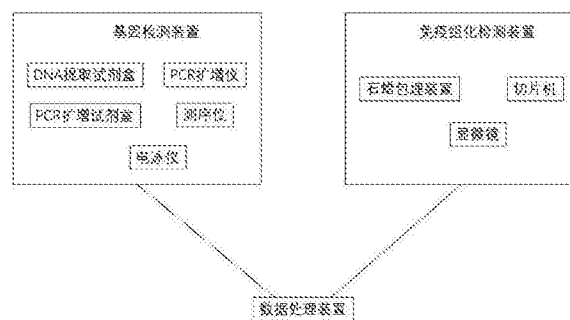
权利要求书2页 说明书16页  
序列表5页 附图2页

(54)发明名称

用于预测膀胱癌患者化疗敏感性的系统

(57)摘要

本发明公开了一种用于预测膀胱癌患者化疗敏感性的系统,所述系统包括基因检测装置、免疫组化检测装置以及数据处理装置,其中,所述基因检测装置、所述免疫层析检测装置的检测结果通过所述数据处理装置进行分析处理;其中,所述基因检测装置包括DNA提取试剂盒、引物组、PCR扩增仪、PCR纯化试剂盒、测序仪以及电泳仪。本发明用于预测膀胱癌患者化疗敏感性的系统,通过利用膀胱癌突变基因包括FGFR3、HRAS、TERT启动子、TP53、TSC1、PIK3CA、HER2,异常表达蛋白包括EGFR、ERCC1、CK20、BRCA1、CD44、RRM1、PD-L1、TUBB3、Ki67及CD71,设计制备相应的特异性引物和抗体进行检测,以满足上述分子病理指标的检测需求,且简便、经济,可以大大提高膀胱癌化疗敏感性预测准确性,用于指导新辅助化疗实施。



1. 一种用于预测膀胱癌患者化疗敏感性的系统,其特征在于,所述系统包括基因检测装置、免疫组化检测装置以及数据处理装置,其中,所述基因检测装置、所述免疫层析检测装置的检测结果通过所述数据处理装置进行分析处理;

其中,所述基因检测装置包括DNA提取试剂盒、引物组、PCR扩增仪、PCR纯化试剂盒、测序仪以及电泳仪;所述DNA提取试剂盒提取的膀胱组织DNA经过PCR扩增仪扩增后获得的产物经过PCR纯化试剂盒纯化,纯化后获得的纯化DNA经过测序仪测序,获得目的基因的DNA序列;

所述免疫组化检测装置包括石蜡包埋装置、切片机以及显微镜,石蜡包埋装置将膀胱组织进行石蜡包埋后,通过切片机获得膀胱组织切片,所述膀胱组织切片,通过对应的抗原和抗体对所述膀胱组织切片进行处理,经过所述显微镜观察获得膀胱组织切片检测结果;

将测序仪获得的的目的基因DNA序列和膀胱组织切片检测结果输入数据处理装置进行处理,将测序仪获得的的目的基因DNA序列与正常基因DNA序列比对,确定膀胱组织突变基因,同时,将膀胱组织组织切片的检测结果与正常膀胱组织切片蛋白表达量进行比较,确定特定蛋白的表达量;根据相关基因突变种类以及蛋白表达量的数据,判定患者化疗后抵抗或者缓解。

2. 根据权利要求1所述的用于预测膀胱癌患者化疗敏感性的系统,其特征在于,

所述引物组包括基因FGFR3引物组:SEQ ID NO.1、SEQ ID NO.2、SEQ ID NO.3、SEQ ID NO.4、SEQ ID NO.5、SEQ ID NO.6;

基因HRAS引物组:SEQ ID NO.7、SEQ ID NO.8、SEQ ID NO.9、SEQ ID NO.10;

基因TERT引物组:SEQ ID NO.11、SEQ ID NO.12;

基因TP53引物组:SEQ ID NO.13、SEQ ID NO.14;

基因TSC1引物组:SEQ ID NO.15、SEQ ID NO.16、SEQ ID NO.17、SEQ ID NO.18、SEQ ID NO.19、SEQ ID NO.20;

基因PIK3CA引物组:SEQ ID NO.21、SEQ ID NO.22、SEQ ID NO.23、SEQ ID NO.24;

基因HER2引物组:SEQ ID NO.25、SEQ ID NO.26、SEQ ID NO.27、SEQ ID NO.28。

3. 根据权利要求2所述的用于预测膀胱癌患者化疗敏感性的系统,其特征在于,

所述蛋白为ERCC1、EGFR、CK20、BRCA1、CD44、RRM1、PD-L1、TUBB3、Ki67及CD71;

所述抗体为ERCC1、EGFR、CK20、BRCA1、CD44、RRM1、PD-L1、TUBB3、Ki67及CD71对应的一抗;

当检测到TSC1、TERT启动子、PIK3CA基因突变;CD71、CD44、Ki67、BRCA1蛋白高表达,化疗后会抵抗;

当检测到FGFR3、HRAS、HER2、TP53基因突变;RRM1、CK20、TUBB3、ERCC1、EGFR、PD-L1蛋白低表达,化疗后会缓解。

4. 根据权利要求1所述的用于预测膀胱癌患者化疗敏感性的系统,其特征在于,所述系统还包括用于检测DNA的浓度的分光光度计。

5. 根据权利要求1所述的用于预测膀胱癌患者化疗敏感性的系统,其特征在于,所述基因检测装置还包括用于纯化DNA的96孔板。

6. 根据权利要求1所述的用于预测膀胱癌患者化疗敏感性的系统,其特征在于,所述系统还包括用于对DNA的离心分离离心机。

7. 根据权利要求1所述的用于预测膀胱癌患者化疗敏感性的系统,其特征在于,所述基因检测装置还包括BigDye® Terminator v3.1 cycle sequencing Kit作为测序反应试剂盒。

8. 根据权利要求1所述的用于预测膀胱癌患者化疗敏感性的系统,其特征在于,所述数据处理装置为手机或者计算机。

## 用于预测膀胱癌患者化疗敏感性的系统

### 技术领域

[0001] 本发明涉及生物基因及免疫检测技术领域,具体涉及一种用于预测膀胱癌患者化疗敏感性的系统。

### 背景技术

[0002] 膀胱癌(bladder cancer,BC)是泌尿系最常见肿瘤之一,其发病率及死亡率均居我国泌尿系肿瘤首位。膀胱癌可分为乳头状非肌层浸润性膀胱癌和肌层浸润性膀胱癌,前者往往向膀胱腔内生长,具有高复发率,术后复发率可达70%;后者具有较强的增殖、侵袭、转移能力,比例高达50%的患者可发生致命性转移。手术是膀胱癌的主要治疗方式,对于局限性膀胱癌,手术预后良好;对于非局限性膀胱癌,尤其是肌层浸润性膀胱癌,单纯手术具有较高的复发率和远处转移风险,达不到理想的治疗效果。因此,针对后者,手术期后往往需要进行系统化疗以降低复发转移率。作为恶性肿瘤局部手术和放疗前的全身性化疗,新辅助化疗能够消灭潜在微小转移灶,为患者提供手术条件、提高手术根治率;能够降低肿瘤细胞活性,使其手术时不易散布入血,减少术中转移,改善膀胱癌术后患者预后。

[0003] 膀胱癌早期新辅助化疗方案采用顺铂、阿霉素、甲氨蝶呤及长春新碱,后来陆续引入了新型细胞毒性药物,如吉西他滨、紫杉醇,大大提高了膀胱癌新辅助化疗的临床应用效果。然而,新辅助化疗尽管能够绝对改善膀胱癌总体预后,但对化疗耐药的膀胱癌患者收效甚微,并很可能因此延误此类患者的治疗,此外,新辅助化疗固有的毒副作用可使该治疗对患者的不利加大。如何有效甄别、预测患者应用新辅助化疗缓解或抵抗对新辅助化疗应用的有效性至关重要,且是本领域的亟待攻克的难题。

[0004] 目前,肿瘤通过一系列的分子机制对化疗产生耐药,这些分子机制包含的基因、分子信号等的异常可反映肿瘤的耐药能力。因此,检测肿瘤耐药、预后相关的热点分子病理指标并设计合理的panel,可在一定程度上预测肿瘤对化疗的敏感性,指导化疗方案的执行。

[0005] 传统影像学或有创检查仅能直观反映肿瘤大小、数目、侵袭范围等属性,不涉及肿瘤的发生、发展、耐药机制,无法对膀胱癌患者化疗敏感性给出一个量化指标,更遑论应用于恶性肿瘤化疗敏感性方面的预测。检测单一分子病理指标往往有很大偏差,无法保证预测患者化疗敏感性的准确性。

[0006] 综上所述,传统的设备无法对膀胱癌患者化疗的敏感性给出量化指标,且单一的病理指标无法保证预测患者化疗敏感性的准确性,亟待进一步的改进。

### 发明内容

[0007] 本发明的目的在于提供一种用于预测膀胱癌患者化疗敏感性的系统,用以解决现有装置无法对膀胱癌患者化疗的敏感性给出量化指标,无法保证预测患者化疗敏感性的准确性。

[0008] 为实现上述目的,本发明提供一种用于预测膀胱癌患者化疗敏感性的系统,所述系统包括基因检测装置、免疫组化检测装置以及数据处理装置,其中,所述基因检测装置、

所述免疫层析检测装置的检测结果通过所述数据处理装置进行分析处理；

[0009] 其中,所述基因检测装置包括DNA提取试剂盒、引物组、PCR扩增仪、PCR纯化试剂盒、测序仪以及电泳仪;所述DNA提取试剂盒提取的膀胱组织DNA经过PCR扩增仪扩增后获得的产物经过PCR纯化试剂盒纯化,纯化后获得的纯化DNA经过测序仪测序,获得目的基因的DNA序列;

[0010] 所述免疫组化检测装置包括石蜡包埋装置、切片机以及显微镜,石蜡包埋装置将膀胱组织进行石蜡包埋后,通过切片机获得膀胱组织切片,所述膀胱组织切片,通过对应的抗原和抗体对所述膀胱组织切片进行处理,经过所述显微镜观察获得膀胱组织切片检测结果;

[0011] 将测序仪获得的目的基因DNA序列和膀胱组织切片检测结果输入数据处理装置进行处理,将测序仪获得的目的基因DNA序列与正常基因DNA序列比对,确定膀胱组织突变基因,同时,将膀胱组织组织切片的检测结果与正常膀胱组织切片蛋白表达量进行比较,确定特定蛋白的表达量;

[0012] 根据相关基因突变种类以及蛋白表达量的数据,判定患者化疗后抵抗或者缓解。

[0013] 优选的,所述引物组包括基因FGFR3引物组:SEQ ID NO.1、SEQ ID NO.2、SEQ ID NO.3、SEQ ID NO.4、SEQ ID NO.5、SEQ ID NO.6;

[0014] 基因HRAS引物组:SEQ ID NO.7、SEQ ID NO.8、SEQ ID NO.9、SEQ ID NO.10;

[0015] 基因TERT引物组:SEQ ID NO.11、SEQ ID NO.12;

[0016] 基因TP53引物组:SEQ ID NO.13、SEQ ID NO.14;

[0017] 基因TSC1引物组:SEQ ID NO.15、SEQ ID NO.16、SEQ ID NO.17、SEQ ID NO.18、SEQ ID NO.19、SEQ ID NO.20;

[0018] 基因PIK3CA引物组:SEQ ID NO.21、SEQ ID NO.22、SEQ ID NO.23、SEQ ID NO.24;

[0019] 基因HER2引物组:SEQ ID NO.25、SEQ ID NO.26、SEQ ID NO.27、SEQ ID NO.28。

[0020] 优选的,所述蛋白为ERCC1、EGFR、CK20、BRCA1、CD44、RRM1、PD-L1、TUBB3、Ki67及CD71;

[0021] 所述抗体为ERCC1、EGFR、CK20、BRCA1、CD44、RRM1、PD-L1、TUBB3、Ki67及CD71对应的一抗;

[0022] 当检测到TSC1、TERT启动子、PIK3CA基因突变;CD71、CD44、Ki67、BRCA1蛋白高表达,化疗后会抵抗;

[0023] 当检测到FGFR3、HRAS、HER2、TP53基因突变;RRM1、CK20、TUBB3、ERCC1、EGFR、PD-L1蛋白低表达,化疗后会缓解。

[0024] 优选的,所述系统还包括用于检测DNA的浓度的分光光度计。

[0025] 优选的,所述基因检测装置还包括用于纯化DNA的96孔板。

[0026] 优选的,所述系统还包括用于对DNA的离心分离离心机。

[0027] 优选的,所述基因检测装置还包括BigDye® Terminator v3.1 cyclesequencing Kit作为测序反应试剂盒。

[0028] 优选的,所述数据处理装置为手机或者计算机。

[0029] 本发明具有如下优点:

[0030] 本发明用于预测膀胱癌患者化疗敏感性的系统,通过利用膀胱癌突变基因包括

FGFR3、HRAS、TERT启动子、TP53、TSC1、PIK3CA、HER2,异常表达蛋白包括EGFR、ERCC1、CK20、BRCA1、CD44、RRM1、PD-L1、TUBB3、Ki67及CD71,设计制备相应的特异性引物和抗体进行检测,以满足上述分子病理指标的检测需求,且简便、经济,可以大大提高膀胱癌化疗敏感性预测准确性,用于指导新辅助化疗实施。

### 附图说明

[0031] 图1为本发明的用于预测膀胱癌患者化疗敏感性的系统的组成示意图。

[0032] 图2为本发明的实施例1中,FGFR3、HRAS、TERT启动子、TP53、TSC1、PIK3CA和HER2基因突变与GC抵抗或GC缓解之间的关系图,GC抵抗组TSC1、TERT启动子、PIK3CA的基因突变比率显著高于GC缓解组;而GC抵抗组FGFR3、HRAS、HER2、TP53的基因突变比率显著低于GC缓解组。

[0033] 图3为本发明的实施例1中,EGFR、ERCC1、CK20、BRCA1、CD44、RRM1、PD-L1、TUBB3、Ki67及CD71蛋白的表达量与GC抵抗或GC缓解之间的关系图,GC抵抗组CD71、CD44、Ki67、BRCA1蛋白表达量显著高于GC缓解组;而GC抵抗组RRM1、CK20、TUBB3、ERCC1、EGFR、PD-L1蛋白表达量显著低于GC缓解组。

### 具体实施方式

[0034] 以下实施例用于说明本发明,但不用来限制本发明的范围。

[0035] 如图1所示,本发明的用于预测膀胱癌患者化疗敏感性的系统,其包括基因检测装置、免疫组化检测装置以及数据处理装置,其中,基因检测装置、免疫层析检测装置的检测结果通过数据处理装置进行分析处理;其中,基因检测装置包括DNA提取试剂盒、引物组、PCR扩增仪、PCR纯化试剂盒、测序仪以及电泳仪;DNA提取试剂盒提取的膀胱组织DNA经过PCR扩增仪扩增后获得的产物经过PCR纯化试剂盒纯化,纯化后获得的纯化DNA经过测序仪测序,获得目的基因的DNA序列;

[0036] 免疫组化检测装置包括石蜡包埋装置、切片机以及显微镜,石蜡包埋装置将膀胱组织进行石蜡包埋后,通过切片机获得膀胱组织切片,膀胱组织切片,通过对应的抗原和抗体对膀胱组织切片进行处理,经过显微镜观察获得膀胱组织切片检测结果;

[0037] 将测序仪获得的基因DNA序列和膀胱组织切片检测结果输入数据处理装置进行处理,将测序仪获得的基因DNA序列与正常基因DNA序列比对,确定膀胱组织突变基因,同时,将膀胱组织组织切片的检测结果与正常膀胱组织切片蛋白表达量进行比较,确定特定蛋白的表达量。

[0038] TSC1、TERT启动子、PIK3CA基因突变;CD71、CD44、Ki67、BRCA1蛋白高表达,提示化疗后会抵抗,敏感性差;FGFR3、HRAS、HER2、TP53基因突变;RRM1、CK20、TUBB3、ERCC1、EGFR、PD-L1蛋白低表达,提示化疗后会缓解,敏感性高。

[0039] 具体的,基因检测装置提取膀胱组织标本DNA,用Sanger测序技术,检测膀胱癌组织中与膀胱癌密切相关的基因突变,包括FGFR3、HRAS、TERT启动子、TP53、TSC1、PIK3CA和HER2基因的突变情况,其中,引物组包括基因FGFR3引物组:SEQ ID NO.1、SEQ ID NO.2、SEQ ID NO.3、SEQ ID NO.4、SEQ ID NO.5、SEQ ID NO.6;基因HRAS引物组:SEQ ID NO.7、SEQ ID NO.8、SEQ ID NO.9、SEQ ID NO.10;基因TERT引物组:SEQ ID NO.11、SEQ ID NO.12;基因

TP53引物组:SEQ ID NO.13、SEQ ID NO.14;基因TSC1引物组:SEQ ID NO.15、SEQ ID NO.16、SEQ ID NO.17、SEQ ID NO.18、SEQ ID NO.19、SEQ ID NO.20;基因PIK3CA引物组:SEQ ID NO.21、SEQ ID NO.22、SEQ ID NO.23、SEQ ID NO.24;基因HER2引物组:SEQ ID NO.25、SEQ ID NO.26、SEQ ID NO.27、SEQ ID NO.28。

[0040] PCR扩增引物组由能分别特异性扩增出FGFR3、HRAS、TERT启动子、TP53、TSC1、PIK3CA和HER2基因序列的引物组成,具体的目的基因序列及相应引物如表1。

[0041] 表1目的基因序列及引物组成

[0042]

基因名称	扩增区域	上游引物	下游引物	参考序列号
FGFR3	Exon7	SEQ ID NO.1:AACAAGTTTGGCAGCATCCG	SEQ ID NO.2:TTGAGCACGGTAACGTAGGG	NC_000004.12
	Exon10	SEQ ID NO.3:CAACGCCCATGTCTTTGCAG	SEQ ID NO.4:TGAGCAGAGACGAGGAGAGG	
	Exon15	SEQ ID NO.5:GAGAGGTGGAGAGGCTTCAG	SEQ ID NO.6:CTACTGGCATGACCCCCAC	
HRAS	Exon1	SEQ ID NO.7:CTGTGGGTTTGCCCTTCAGA	SEQ ID NO.8:GCGCCAGGCTCACCTCTAT	NC_000011.10
	Exon2	SEQ ID	SEQ ID	

[0043]

		NO.9: TGAGAGGTACCAGGGAGAGG	NO.10: TCACGGGGTTCACCTGTACT	
TERT	启动子区	SEQ ID NO.11: CGTCCTGCCCTTCACCTT	SEQ ID NO.12: AGCGCTGCCTGAAACTCG	NC_000005.10
TP53	Exon8	SEQ ID NO.13: AGGACCTGATTCCTTACTGC C	SEQ ID NO.14: CTGAGGCATAACTGCACCCT	NC_000017.11
TSC1	Exon15a	SEQ ID NO.15: GAATACCGACTGCCATTCTT	SEQ ID NO.16: AGGGCTTTCATCAGCACTG	NC_000068.7
	Exon15b	SEQ ID NO.17: GCAAGCCTTTACTCCCATAG	SEQ ID NO.18: GGCACACCATCTTCCTCTG	
	Exon15c	SEQ ID NO.19: CAGCCCATCATTTTGTTCATC	SEQ ID NO.20: AGGTGGGAGTGTGAAGAATG	
PIK3	Exon9	SEQ ID NO.21: GAATCCAGAGGGGAAAATA TG	SEQ ID NO.22: TCCATTTTAGCACTTACCTGT GAC	NC_000003.12
CA	Exon20	SEQ ID NO.23: TTCAGGAGATGTGTTACAAG GC	SEQ ID NO.24: TCCAGAGTGAGCTTTCATTT C	
HER2	Exon19	SEQ ID NO.25: CCCACGCTCTTCTCACTCAT	SEQ ID NO.26: TCCTTCCGTGCTCCTAGCA	NC_000017.11
	Exon20	SEQ ID NO.27: TGGTCTCCCATACCCTCTCA	SEQ ID NO.28: CAAAGAGCCCAGGTGCATA	

[0044] 本发明的基因检测装置检测相关基因的突变情况步骤如下：

[0045] 步骤1：利用DNA提取试剂盒提取膀胱组织DNA；将破碎处理的组织经蛋白酶K消化后，采用Qiagen公司DNA提取试剂盒(QIAamp DNA Mini Kit)提取组织DNA。

[0046] 步骤2：利用引物组的引物以及PCR扩增仪对目标基因进行扩增，将扩增的产物通过电泳仪电泳获得目标基因PCR产物的电泳条带；

[0047] 步骤3：通过PCR纯化试剂盒对PCR产物进行纯化获得纯化的目标基因DNA；其中PCR纯化试剂盒采用Qiagen公司PCR纯化试剂盒(QIAquick PCR Purification Kit)进行纯化。

[0048] 步骤4：通过PCR仪对目标DNA进行测序反应，获得测序反应产物；其中，Sanger测序



反应采用BigDye® Terminator v3.1 cycle sequencing Kit测序试剂盒(Sanger sequencing Kits&Reagents)进行。

[0049] 步骤5:将获得的测序反应产物进行纯化,获得纯化后的测序反应产物;

[0050] 步骤6:将纯化后的测序反应产物通过测序仪进行DNA测序;其中,测序仪采用ABI 3730测序仪测序。

[0051] 步骤7:利用数据处理装置手机或者计算机对DNA测序结果进行分析处理。数据处理装置采用Variant Report v1.1软件对测序结果进行分析。

[0052] 本发明通过免疫组化装置检测膀胱癌组织中异常表达的蛋白质,免疫组织化学染色检测膀胱癌标本中异常表达的蛋白质包括EGFR、ERCC1、CK20、BRCA1、CD44、RRM1、PD-L1、TUBB3、Ki67及CD71。以及上述蛋白所对应的抗体。

[0053] 本发明通过免疫组化装置具体的检测步骤如下:

[0054] 步骤1:通过石蜡包埋装置将膀胱癌组织石蜡包埋并切片,获得石蜡切片;

[0055] 步骤2:通过切片机对膀胱癌组织石蜡切片进行烤片、脱蜡水化;

[0056] 步骤3:组织抗原修复;

[0057] 步骤4:3% $H_2O_2$ 封闭内源性过氧化氢酶;

[0058] 步骤5:抗体杂交,以EGFR、ERCC1、CK20、BRCA1、CD44、RRM1、PD-L1、TUBB3、Ki67及CD71等蛋白质的特异性抗体对切片进行免疫组化染色。

[0059] 步骤6:显色;

[0060] 步骤7:复染;

[0061] 步骤8:脱水、透明和封片。

[0062] 本发明免疫组化装置基于Sanger测序法和免疫组化(IHC)技术,通过基因检测装置以及免疫组化装置组成的用于预测膀胱癌患者化疗敏感性的系统,检测组织膀胱癌相关基因突变及异常表达蛋白,进而形成膀胱癌分子病理指标pane1对患者膀胱癌复发、预后、药物敏感性进行分析,以用于指导膀胱癌新辅助化疗的实施。

[0063] 实施例1

[0064] 本实施例1对来自上海仁济医院的39例膀胱癌患者组织标本,含“吉西他滨/顺铂抵抗组(简称:GC抵抗)23例”、“吉西他滨/顺铂缓解组(简称:GC缓解)16例”,进行膀胱癌相关基因测序和异常表达蛋白IHC染色。标本信息如表3。

[0065] 表2.膀胱癌患者组织样本信息

[0066]

样本编号	GC抵抗/缓解	性别	年龄	肿瘤部位	肿瘤大小	分型	分级	TNM 分期
BC01	抵抗	男	56	右侧壁	5.3×4.6	移行细胞癌	II-III级	T3N0M0
BC02	抵抗	男	79	右侧壁	2.2×2.7	移行细胞癌	II级	T3N0M0
BC03	抵抗	女	67	左侧壁	2.1×1.7	移行细胞癌	II级	T3N0M0
BC04	抵抗	男	49	膀胱颈	8.0×6.1	移行细胞癌	III级	T2N0M0
BC05	抵抗	男	50	侧壁、三角区	4.2×2.6	移行细胞癌	III级	T3aN0M0
BC06	抵抗	男	76	右后壁	5.5×4.3	移行细胞癌	III级	T2N0M0
BC07	抵抗	女	69	左、右侧壁	2.5×1.6	移行细胞癌	III级	T3N0M0
BC08	抵抗	男	75	侧壁、三角区	2.8×3.5	移行细胞癌	II-III级	T3aN0M0
BC09	抵抗	女	65	左前壁	4.1×3.2	移行细胞癌	III级	T3N0M0
BC10	抵抗	男	59	侧壁	3.2×2.6	移行细胞癌	II级	T2N0M0

BC11	抵抗	男	68	左后壁	4.4 × 4.5	移行细胞癌	II-III级	T3N0M0
BC12	抵抗	男	72	前后壁	2.5 × 2	移行细胞癌	II-III级	T2aN0M0
BC13	抵抗	男	81	膀胱颈	2 × 3	移行细胞癌	III级	T2N0M0
BC14	抵抗	男	64	三角区	5.5 × 6	移行细胞癌	II级	T2aNxMx
BC15	抵抗	男	58	膀胱颈	2.9 × 3.0	移行细胞癌	II-III级	T4N0M0
BC16	抵抗	女	78	侧壁、三角区	3.2 × 2.6	移行细胞癌	III级	T4N0M0
BC17	抵抗	男	71	顶壁	1.6 × 2.1	移行细胞癌	II-III级	T3aN0M0
BC18	抵抗	男	64	前壁	2.5 × 3	移行细胞癌	II-III级	T4N0M0
BC19	抵抗	男	71	左后壁	3.1 × 2.6	移行细胞癌	III级	T3N0M0
BC20	抵抗	女	63	左侧壁	2 × 3.5	移行细胞癌	III级	T2N0M0
BC21	抵抗	男	82	三角区	2.6 × 2.2	移行细胞癌	II-III级	T2N0M0
BC22	抵抗	男	75	右侧壁	6.4 × 5.1	移行细胞癌	III级	T3N0M0
BC23	抵抗	男	68	后侧壁	2.0 × 2.5	移行细胞癌	III级	T3N0M0
BC24	缓解	男	77	三角区	2.0 × 1.0	移行细胞癌	III级	T2NxMx
BC25	缓解	女	59	左侧壁	1.5 × 1.1	移行细胞癌	III级	T2NM0
BC26	缓解	男	62	后侧壁	2.1 × 1.9	移行细胞癌	III级	T3N0M0
BC27	缓解	男	70	左侧壁	1.2 × 2.4	移行细胞癌	III级	T2N0M0
BC28	缓解	男	68	顶壁	1.5 × 2.5	移行细胞癌	II-III级	T3aN0M0
BC29	缓解	男	72	左后壁	5 × 4	移行细胞癌	II-III级	TaN0M0
BC30	缓解	女	81	左、右侧壁	2.5 × 1.8	移行细胞癌	III级	T3N0M0
BC31	缓解	男	67	右侧壁	1 × 2	移行细胞癌	III级	T3N0M0
BC32	缓解	男	75	右侧壁	5.5 × 4.5	移行细胞癌	III级	T2N0M0
BC33	缓解	女	58	膀胱颈	2.0 × 1.5	移行细胞癌	II-III级	T3N0M0
BC34	缓解	男	59	左前壁	4 × 3	移行细胞癌	II级	T3N0M0
BC35	缓解	女	64	前壁	2.5 × 3.0	移行细胞癌	II-III级	T4N0M0
BC36	缓解	男	70	左侧壁	2.0 × 3.0	移行细胞癌	II级	T2N0M0

[0067]

[0068]	BC37	缓解	男	74	后侧壁	1.8×2.5	移行细胞癌	III级	T3N0M0
	BC38	缓解	男	62	左后壁	4.2×2.5	移行细胞癌	II级	T2N0M0
	BC39	缓解	男	61	右后壁	4×7	移行细胞癌	III级	T3bN0M0

[0069] 1、取材、样品保存膀胱癌组织

[0070] 本发明所获得的膀胱组织标本-80℃或液氮保存。每个患者的标本分为两部分，一部分4%甲醛固定，常温保存，后续予以石蜡包埋并切片；另一部分以组织剪剪碎后-80或液氮保存，后续用以提取DNA。

[0071] 2、Sanger测序

[0072] 提取组织DNA，破碎处理的组织经蛋白酶K消化后，采用Qiagen公司DNA提取试剂盒(QIAamp DNA Mini Kit)提取组织DNA，具体操作按产品说明书进行，组织DNA提取后以Thermo公司NanoDrop 2000分光光度计检测样品DNA浓度。

[0073] 其中，组织DNA的提取过程如下：

[0074] a. 将破碎后的组织(约30mg左右)置于离心管中，加入180μl ATL缓冲液和20ul蛋白酶K(PK)，震荡20s，56℃水浴锅消化至组织溶解；

[0075] b. 加入200ul AL缓冲液，荡15，于70℃水浴锅作用10min；

[0076] c. 加入200ul 95%以上纯度的乙醇，震荡15s；

[0077] d. 准备离心柱及收集管，将上一步所得混合物加入离心柱中，8000rpm离心机离心1min，丢弃收集管内液体；

[0078] e. 向离心柱内小心加入500ul AW1缓冲液，14000rpm离心机离心3min，丢弃收集管内液体；

[0079] f. 向离心柱内小心加入500ul AW2缓冲液，14000rpm离心3min，丢弃收集管内液体；

[0080] g. 离心柱空转1min去除残留AW2缓冲液；

[0081] h. 离心柱置于1.5ml干净EP，加入200ul AE缓冲液或ddH<sub>2</sub>O，室温放置数分钟后保存于-20冰箱。

[0082] 3、利用PCR扩增仪扩增，通过PCR电泳仪对PCR产物电泳：如表1的上下游引物对FGFR3、HRAS、TERT启动子、TP53、TSC1、PIK3CA和HER2基因序列进行特异性扩增。其中，PCR扩增体系配置如下：10×PCR buffer，2.5ul；10×PCR buffer，3ul；2.5Mm dNTPs，3ul；上游引物，1ul；下游引物，1ul；LA Taq酶，0.3ul；样品DNA模板，2ul；H<sub>2</sub>O，15.2ul。

[0083] PCR反应程序：96℃2min预变性，96℃30s、57℃30s、72℃2min，35个循环，72℃延伸5min，4℃∞。不同基因PCR程序条件有所差异。

[0084] 4、PCR产物纯化：采用Qiagen公司PCR纯化试剂盒(QIAquick PCR Purification Kit)对PCR产物进行纯化，纯化步骤如下：

[0085] a. 150ul PB缓冲液加到PCR产物，充分混合；

[0086] b. 将上步所得混合物移至吸附柱，13000rpm离心1min；

[0087] c. 向吸附柱中加入750ul PE缓冲液，反应5min，13000离心1min，弃废液后空转一次，去除残留废液；

- [0088] d. 吸附柱置于干净EP管,往吸附柱中央加50 $\mu$ l EB或ddH<sub>2</sub>O,静置数分钟溶解吸附的DNA;
- [0089] e. 13000rpm离心1min,收集溶解的DNA,-20保存。
- [0090] 5、测序反应,采用BigDye<sup>®</sup> Terminator v3.1 cycle sequencing Kit作为测序反应试剂盒。试剂:BigDye,0.4 $\mu$ l;sequencing Buffer,0.8 $\mu$ l;引物(3.2pmol/ $\mu$ l),1 $\mu$ l;(2)步所得PCR产物,1 $\mu$ l;H<sub>2</sub>O,1.8 $\mu$ l。
- [0091] 测序反应配置体系如下,PCR测序反应程序:96 $^{\circ}$ C 2min预变性,96 $^{\circ}$ C 10s,55 $^{\circ}$ C 5s,60 $^{\circ}$ C 90s,25个循环,4 $^{\circ}$ C  $\infty$ ,不同基因PCR程序条件有所差异。
- [0092] 6、测序反应产物纯化,采用乙醇/EDTA-Na<sub>2</sub>法纯化测序反应产物,具体步骤如下:
- [0093] a. 离心96孔板,每孔加入2.5 $\mu$ l EDTA-Na<sub>2</sub>(0.125mol/L),40 $\mu$ l 85%乙醇,充分震荡数分钟,4 $^{\circ}$ C,2000-3000g条件下离心30min;
- [0094] b. 96孔板倒离心至离心力达到900rpm时立即停止,每孔加入50 $\mu$ l 70%乙醇,充分震荡1min,4 $^{\circ}$ C,3000g条件下离心15min,重复该步骤1次;
- [0095] c. 96孔板室温,避光放置15~30min后,每孔加入10 $\mu$ l去离子甲酰胺HIDI,离心,96 $^{\circ}$ C PCR仪反应2min,4 $^{\circ}$ C取出。
- [0096] 7、按ABI 3730测序仪说明书操作进行对PCR纯化产物进行测序。
- [0097] 8、利用数据处理装置对测序峰图进行分析,判断相关基因突变与否及突变类别。
- [0098] 通过本发明的免疫组化装置对相关抗原进行检测,其步骤如下:
- [0099] (1) 膀胱癌组织石蜡包埋装置进行包埋、切片机进行切片,60 $^{\circ}$ C烤片1-2h,二甲苯脱蜡三次,各10min。
- [0100] (2) 依次浸入100%、95%、85%、75%和纯水中,各5min。
- [0101] (3) 蒸馏水清洗2次,每次5min。
- [0102] (4) 3%过氧化氢封闭20min。
- [0103] (5) EDTA修复:煮开后维持20min,注意及时添加EDTA,自然冷却。
- [0104] (6) PBST(PBS+0.025% Triton X-100)缓冲液清洗3次,每次5min。
- [0105] (7) 血清封闭液封闭1-2h(封闭液:10%血清+1%BSA+PBST)。
- [0106] (8) 吸干后,滴加适量的一抗(体积50-100 $\mu$ l左右,一抗稀释液:1%BSA+PBST。于组织玻片上,放入水湿盒中,4 $^{\circ}$ C冰箱过夜。
- [0107] (9) PBST缓冲液清洗3次,每次5min。
- [0108] (10) 滴加适量的二抗,室温反应1小时。
- [0109] (11) PBST缓冲液清洗3次,每次5min。
- [0110] (12) DAB显色5min左右,随时镜下观察,组织颜色变成黄褐色时,浸入蒸馏水中终止反应。
- [0111] (13) 苏木素染核2-3分钟,蒸馏水洗涤,盐酸酒精分化30s,蒸馏水洗涤,自来水或1%氨水返蓝。
- [0112] (14) 脱水、透明:依次侵入75%、95%、100%和二甲苯1、二甲苯2、二甲苯3中各1min。
- [0113] (15) 从二甲苯中取出玻片,擦干,滴加中性树脂,加盖玻片封片。
- [0114] 如图2所示,基因检测装置对基因测序结果,通过对基因测序数据进行分析,鉴定

了仁济医院39例膀胱癌组织标本中FGFR3、HRAS、TERT启动子、TP53、TSC1、PIK3CA、HER27个热点基因突变情况。GC抵抗组TSC1、TERT启动子、PIK3CA的基因突变比率显著高于GC缓解组；而GC抵抗组FGFR3、HRAS、HER2、TP53的基因突变比率显著低于GC缓解组。

[0115] 如图3所示,本发明的免疫组化染色的结果,对上海仁济医院39对膀胱癌及正常组织标本进行IHC染色结果,对膀胱癌组织分析病理指标panel及病情、化疗必要性、敏感性评估。GC抵抗组TSC1、TERT启动子、PIK3CA的基因突变比率显著高于GC缓解组；而GC抵抗组FGFR3、HRAS、HER2、TP53的基因突变比率显著低于GC缓解组。GC抵抗组CD71、CD44、Ki67、BRCA1蛋白表达量显著高于GC缓解组；而GC抵抗组RRM1、CK20、TUBB3、ERCC1、EGFR、PD-L1蛋白表达量显著低于GC缓解组。

[0116] 综上所述,(1) TSC1、TERT启动子、PIK3CA基因突变;CD71、CD44、Ki67、BRCA1蛋白高表达,提示化疗后会抵抗。(2) FGFR3、HRAS、HER2、TP53基因突变;RRM1、CK20、TUBB3、ERCC1、EGFR、PD-L1蛋白低表达,提示化疗后会缓解。结合检测到的膀胱癌组织突变基因及相关蛋白异常表达情况,汇成膀胱癌患者分子病理指标panel,对患者病情、化疗必要性及敏感性进行评估,对指导医生对患者实施新辅助化疗具有重要意义。

[0117] 本发明利用Sanger基因测序金标准,其针对基因突变位点设计引物,通过PCR直接扩增测序,具有高准确性、简便、快捷的特点。IHC依据抗原抗体特异性反应原理,通过化学反应对目的蛋白进行相对定量的研究。本发明通过同时对多个分子病理指标panel可予以本发明较高的预测效果加成,具有良好的应用前景。

[0118] 虽然,上文中已经用一般性说明及具体实施例对本发明作了详尽的描述,但在本发明基础上,可以对之作一些修改或改进,这对本领域技术人员而言是显而易见的。因此,在不偏离本发明精神的基础上所做的这些修改或改进,均属于本发明要求保护的范围。

## SEQUENCE LISTING

- <120> 用于预测膀胱癌患者化疗敏感性的系统  
 <160> 28  
 <170> PatentIn version 3.5  
 <210> 1  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
 <400> 1  
 aacaagtttg gcagcatccg
- <210> 2  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
 <400> 2  
 ttgagcacgg taacgtaggg 20
- [0119] <210> 3  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
 <400> 3  
 caacgccat gtctttgcag 20
- <210> 4  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
 <400> 4  
 tgagcagaga cgaggagagg 20
- <210> 5  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
 <400> 5  
 gagaggtgga gaggetttag 20

	<210> 6	
	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
	<400> 6	
	ctactggcat gacccccac	19
	<210> 7	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
	<400> 7	
	ctgtgggttt gccctcaga	20
	<210> 8	
	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
	<400> 8	
[0120]	gcgccagget cacctetat	19
	<210> 9	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
	<400> 9	
	tgagaggta cagggagagg	20
	<210> 10	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
	<400> 10	
	tcacggggtt cacctgtact	20
	<210> 11	
	<211> 19	
	<212> DNA	



	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
	<400> 11	
	cgctctgccc cttcacctt	19
	<210> 12	
	<211> 18	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
	<400> 12	
	agcgcctgctt gaaactcg	18
	<210> 13	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
	<400> 13	
	aggacctgat ttccttaactg cc	22
[0121]	<210> 14	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
	<400> 14	
	ctgaggcata actgcacct	20
	<210> 15	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
	<400> 15	
	gaataccgac tgccattct	20
	<210> 16	
	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
	<400> 16	
	agggcattca tcagcactg	19

<210>	17	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列 (Artificial Sequence)	
<400>	17	
	gcaagccttt acteccatag	20
<210>	18	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人工序列 (Artificial Sequence)	
<400>	18	
	ggcacacat ctctctg	19
<210>	19	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列 (Artificial Sequence)	
<400>	19	
	cagcccatca tttgtcatc	20
[0122]		
<210>	20	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列 (Artificial Sequence)	
<400>	20	
	aggtgggagt gtaagaatg	20
<210>	21	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	人工序列 (Artificial Sequence)	
<400>	21	
	gaatccagag gggaaaaata tg	22
<210>	22	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	人工序列 (Artificial Sequence)	
<400>	22	
	tecatttag cacttaectg tgac	24

<210> 23  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
 <400> 23

ttcaggagat gtgttacaag gc 22

<210> 24  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
 <400> 24

tccagagtga gctttcattt tc 22

<210> 25  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
 <400> 25

cccacgctet tctcactcat 20

[0123]

<210> 26  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
 <400> 26

tcttctctgt cctctagca 20

<210> 27  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
 <400> 27

tggtctccca taccctctca 20

<210> 28  
 <211> 19  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
 <400> 28

caaagagccc aggtgcata 19

## 序列表

&lt;110&gt; 李翀

&lt;120&gt; 用于预测膀胱癌患者化疗敏感性的系统

&lt;130&gt; 201710

&lt;160&gt; 28

&lt;170&gt; SIPOSequenceListing 1.0

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列 (Artificial Sequence)

&lt;400&gt; 1

aacaagtttg gcagcatccg

20

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列 (Artificial Sequence)

&lt;400&gt; 2

ttgagcacgg taacgtaggg

20

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列 (Artificial Sequence)

&lt;400&gt; 3

caacgcccacat gtctttgcag

20

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列 (Artificial Sequence)

&lt;400&gt; 4

tgagcagaga cgaggagagg

20

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列 (Artificial Sequence)

&lt;400&gt; 5

gagaggtgga gaggetttag

20

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 19

<212> DNA	
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
<400> 6	
ctactggcat gacccccac	19
<210> 7	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
<400> 7	
ctgtgggttt gcccttcaga	20
<210> 8	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
<400> 8	
gcgccagget cacctctat	19
<210> 9	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
<400> 9	
tgagaggtag caggagagg	20
<210> 10	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
<400> 10	
tcacggggtt cacctgtact	20
<210> 11	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
<400> 11	
cgctctgccc cttcacett	19
<210> 12	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
<400> 12	

agcgctgcct gaaactcg	18
<210> 13	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
<400> 13	
aggacctgat ttccttactg cc	22
<210> 14	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
<400> 14	
ctgaggcata actgcaccct	20
<210> 15	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
<400> 15	
gaataccgac tgccatttct	20
<210> 16	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
<400> 16	
agggctttca tcagcactg	19
<210> 17	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
<400> 17	
gcaagccttt actcccatag	20
<210> 18	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
<400> 18	
ggcacaccat cttcctctg	19
<210> 19	
<211> 20	

<212> DNA	
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
<400> 19	
cagcccatca ttttgcac	20
<210> 20	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
<400> 20	
aggtgggagt gtgaagaatg	20
<210> 21	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
<400> 21	
gaatccagag gggaaaaata tg	22
<210> 22	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
<400> 22	
tccatttag cacttacctg tgac	24
<210> 23	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
<400> 23	
ttcaggagat gtgttacaag gc	22
<210> 24	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
<400> 24	
tccagagtga gctttcattt tc	22
<210> 25	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
<400> 25	

---

cccacgctct tctcactcat	20
<210> 26	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
<400> 26	
tccttcctgt cctcctagea	20
<210> 27	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
<400> 27	
tggctccc taccctetca	20
<210> 28	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
<400> 28	
caaagagccc aggtgcata	19



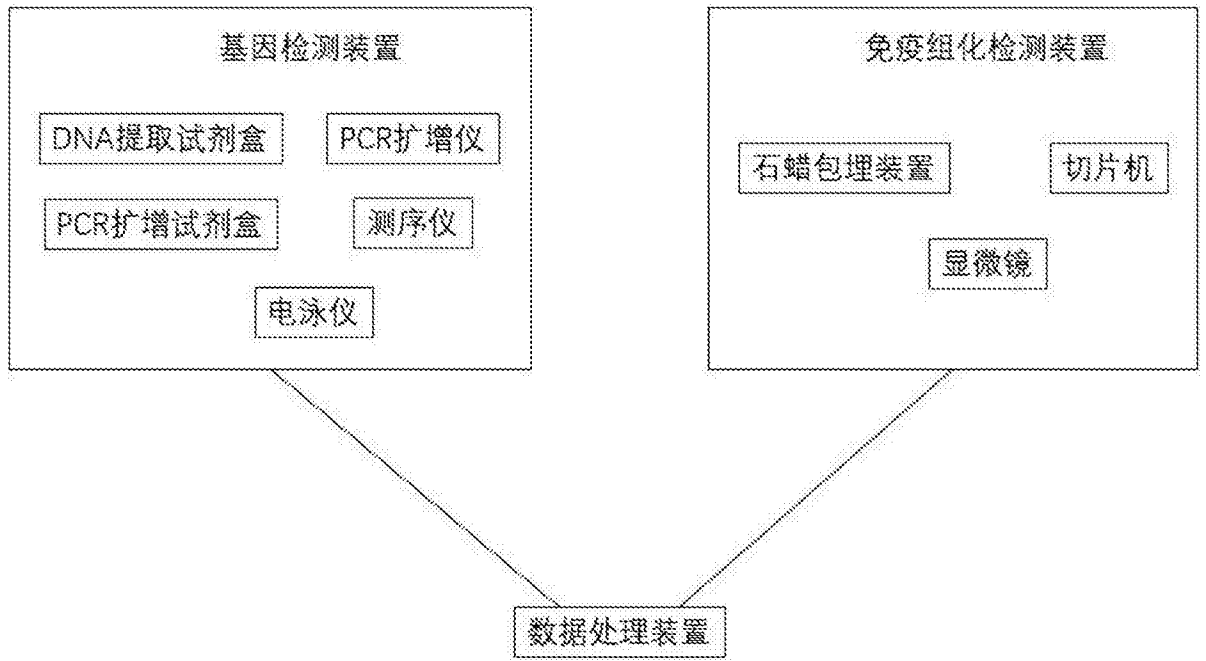


图1

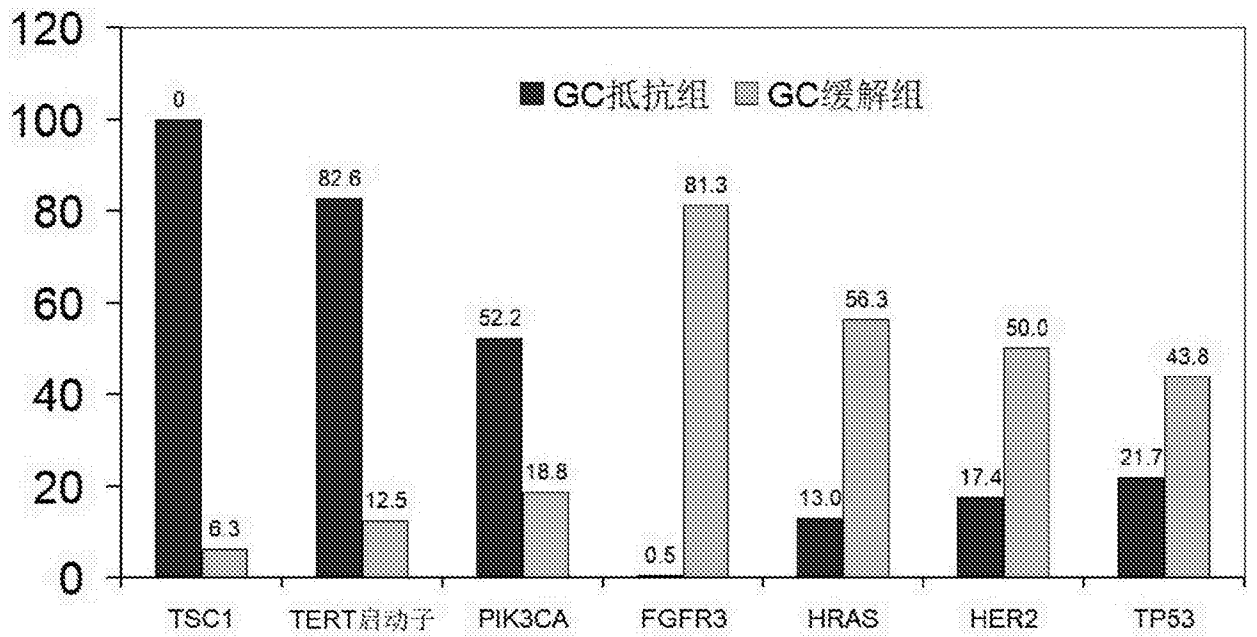


图2

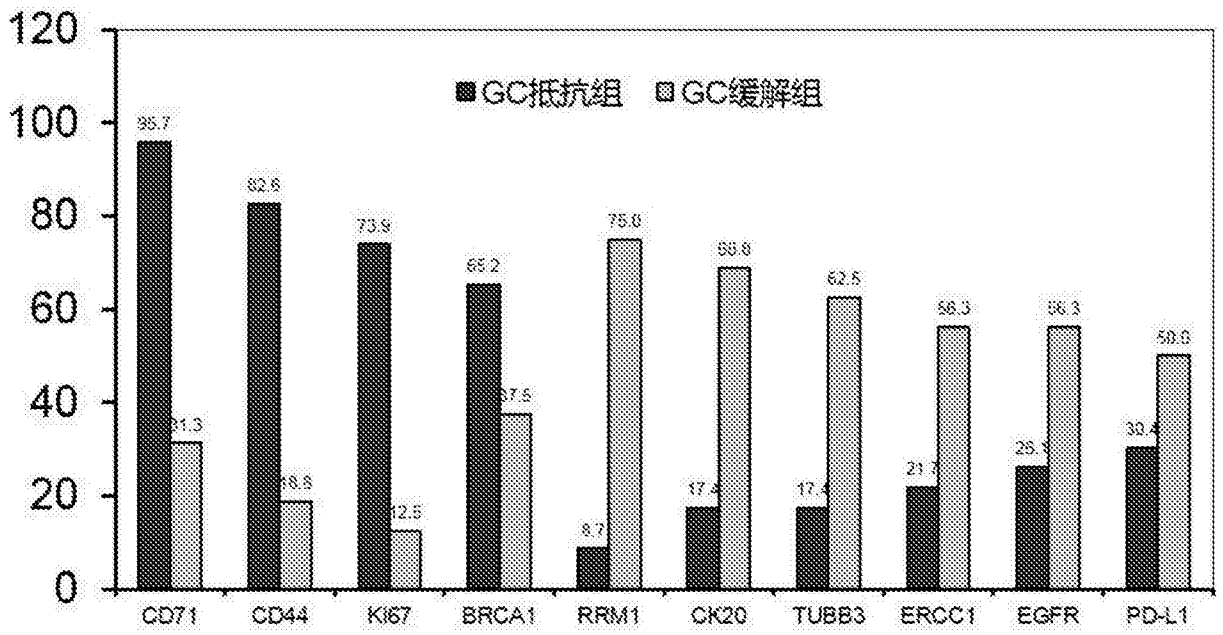


图3