(19) 中华人民共和国国家知识产权局

(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112639124 A
(43) 申请公布日 2021.04.09

(21) 申请号 201980056876.9

(22) 申请日 2019.08.02

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2021.02.26

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/JP2019/030606 2019.08.02

(87) PCT国际申请的公布数据
WO2021/024331 JA 2021.02.11

(71) 申请人 株式会社东芝
地址 日本东京都

(72) 发明人 桥本幸二　稻田美雅　伊藤桂子

(74) 专利代理机构 中国贸促会专利商标事务所有限公司 11038
代理人 郑天松

(51) Int.Cl.
C12Q 1/6851 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)

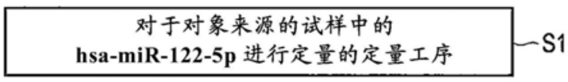
权利要求书2页　说明书12页
序列表3页　附图6页
按照条约第19条修改的权利要求书2页

(54) 发明名称

分析方法及试剂盒

(57) 摘要

根据实施方式，提供判定对象中的胰腺癌的罹患的有无的分析方法，其包括对于对象来源的试样中的hsa-miR-122-5p进行定量。



CN 112639124 A

1.判定所述对象中的胰腺癌的罹患的有无的分析方法，其包括对于对象来源的试样中的hsa-miR-122-5p进行定量。

2.辅助所述对象中的胰腺癌的罹患的有无的判定的分析方法，其包括对于对象来源的试样中的hsa-miR-122-5p进行定量。

3.权利要求1或2所述的方法，其中所述胰腺癌的罹患的有无的判定不使用hsa-miR-122-5p以外的标志物的检测或定量结果进行。

4.权利要求1～3之任一项所述的方法，其还包括在所述对象中的hsa-miR-122-5p的存在量比对照中的hsa-miR-122-5p的存在量多时，判定为所述对象罹患胰腺癌的判定工序。

5.权利要求1～4之任一项所述的方法，其中所述胰腺癌的罹患的有无的判定包括所述对象中的胰腺癌的预后判定、或者所述对象中的胰腺癌的再发的有无的判定。

6.权利要求1～5之任一项所述的方法，其中所述胰腺癌的罹患的有无的判定与其他癌区别进行。

7.权利要求6所述的方法，其中所述其他癌含乳腺癌、大肠癌、胃癌、肺癌、卵巢癌、前列腺癌、胆管癌、食道癌、肝脏癌、脑肿瘤、膀胱癌、肉瘤、子宫体癌及子宫肉瘤。

8.权利要求1～7之任一项所述的方法，其中所述试样是血清。

9.权利要求1～8之任一项所述的方法，其中所述定量使用选自下列的至少1种核酸进行：用于扩增hsa-miR-122-5p的引物组(以下称为“第1引物组”)、用于逆转录hsa-miR-122-5p的逆转录用引物、用于延伸hsa-miR-122-5p的延伸用引物、及用于检测hsa-miR-122-5p的核酸探针。

10.权利要求9所述的方法，其中所述定量包括：

(S1-1)使含与hsa-miR-122-5p的序列(以下称为“第1序列”)杂交的第1引物部及第1LAMP识别序列的逆转录用引物的所述第1引物部与所述第1序列杂交，逆转录所述第1序列，得到含所述第1序列的互补序列(以下称为“第1a的序列”)的逆转录产物的逆转录工序、

(S1-2)使所述逆转录产物和所述hsa-miR-122-5p解离的解离工序、

(S1-3)使含与所述第1a的序列杂交的第2引物部及第2LAMP识别序列的延伸用引物的所述第2引物部与所述逆转录产物的所述第1a的序列杂交，使所述延伸用引物及所述逆转录产物以互相作为模板延伸而得到含所述第1a的序列的互补序列的延伸产物的延伸工序、

(S1-4)使用第1引物组、由LAMP反应扩增所述延伸产物，得到扩增产物的扩增工序、及

(S1-5)检测得到的所述扩增产物的检测工序。

11.权利要求9或10所述的方法，其中所述第1引物组：

含SEQ ID NO:8的FIP引物、SEQ ID NO:9的BIP引物及SEQ ID NO:10的LB引物，

含SEQ ID NO:8的FIP引物、SEQ ID NO:9的BIP引物及SEQ ID NO:11的LB引物，

含SEQ ID NO:12的FIP引物、SEQ ID NO:13的BIP引物及SEQ ID NO:10的LB引物，或者

含SEQ ID NO:14的FIP引物、SEQ ID NO:15的BIP引物及SEQ ID NO:10的LB引物，

所述逆转录用引物含SEQ ID NO:2，所述延伸用引物含SEQ ID NO:3，

所述逆转录用引物含SEQ ID NO:4，所述延伸用引物含SEQ ID NO:5，或者

所述逆转录用引物含SEQ ID NO:6，所述延伸用引物含SEQ ID NO:7。

12.用于检测胰腺癌的试剂盒，其含选自下列的至少1种核酸：用于扩增hsa-miR-122-5p的引物组(以下称为“第1引物组”)、用于逆转录hsa-miR-122-5p的逆转录用引物、用于延

伸hsa-miR-122-5p的延伸用引物、及用于检测hsa-miR-122-5p的核酸探针。

13.权利要求12所述的试剂盒,其中所述第1引物组:

含SEQ ID NO:8的FIP引物、SEQ ID NO:9的BIP引物及SEQ ID NO:10的LB引物,

含SEQ ID NO:8的FIP引物、SEQ ID NO:9的BIP引物及SEQ ID NO:11的LB引物,

含SEQ ID NO:12的FIP引物、SEQ ID NO:13的BIP引物及SEQ ID NO:10的LB引物,或者

含SEQ ID NO:14的FIP引物、SEQ ID NO:15的BIP引物及SEQ ID NO:10的LB引物,

所述逆转录用引物含SEQ ID NO:2,所述延伸用引物含SEQ ID NO:3,

所述逆转录用引物含SEQ ID NO:4,所述延伸用引物含SEQ ID NO:5,或者

所述逆转录用引物含SEQ ID NO:6,所述延伸用引物含SEQ ID NO:7。

分析方法及试剂盒

【技术领域】

[0001]　本发明涉及分析方法及试剂盒。

【背景技术】

[0002]　近年,microRNA(miRNA)和疾病的关系受到关注。报告了miRNA具有调节基因表达的功能,在各种疾病中其种类或表达量从初期的阶段改变。即,在具有某疾病的患者中,特定的miRNA量与健康者比较而增加或减少。因此,研究从受试者采集的试样中的该miRNA的量成为知晓患者罹患该疾病与否的手段。

[0003]　【发明的概要】

[0004]　【发明要解决的课题】

[0005]　本发明旨在提供可简便地判定对象中的胰腺癌的罹患的有无的分析方法。

[0006]　【用于解决课题的手段】

[0007]　根据实施方式,提供判定对象中的胰腺癌的罹患的有无的分析方法,其含对于对象来源的试样中的hsa-miR-122-5p进行定量。

[0008]　【附图的简单的说明】

[0009]　【图1】图1是显示第1实施方式的分析方法的一例的流程图。

[0010]　【图2】图2是显示实施方式的定量工序的一例的流程图。

[0011]　【图3】图3是显示实施方式的定量工序的一例的模式图。

[0012]　【图4】图4是显示第1实施方式的分析方法的一例的流程图。

[0013]　【图5】图5是显示第2实施方式的分析方法的一例的流程图。

[0014]　【图6】图6是显示例1的实验结果的坐标图。

[0015]　【图7】图7是显示例2的实验结果的坐标图。

[0016]　【图8】图8是显示例3的实验结果的坐标图。

[0017]　【图9】图9是显示例4的实验结果的坐标图。

【具体实施方式】

[0018]　接下来,参照附图而对于实施方式的分析方法及试剂盒进行说明。

[0019]　【第1实施方式】

[0020]　(分析方法)

[0021]　实施方式的分析方法是用于判定对象中的胰腺癌的罹患的有无的方法。

[0022]　对象是供于分析的动物、即,提供后述的试样的动物。对象可为具有某些疾病的动物,也可为健康的动物。例如,对象也可为有罹患胰腺癌的可能性的动物或曾罹患胰腺癌的动物等。

[0023]　对象优选为人。或者,对象也可为其他动物。其他动物例如是哺乳动物,含例如,猴等的灵长类、小鼠、大鼠或豚鼠等的啮齿类、狗、猫或兔等的伴侣动物、马、牛或猪等的家畜动物、或者属于展示动物等的动物。

[0024] 根据实施方式的胰腺癌是指形成在胰腺内的恶性肿瘤(新生物)。胰腺癌一般还包括称为“胰腺癌”、“胰腺癌”或“胰腺癌”的。另外，根据实施方式的胰腺癌还包括任何种类的胰腺癌，含上皮性肿瘤(例如，内分泌肿瘤及外分泌肿瘤)、以及非上皮性肿瘤。另外，胰腺癌还包括任何病期，含例如，癌停留在胰腺之中的状态、癌进一步波及周边的组织的状态、癌进一步向淋巴节转移的状态、及有癌向进一步远离的器官的转移的状态等。

[0025] 本分析方法如图1所示，含对于对象来源的试样中的hsa-miR-122-5p进行定量(定量工序(S1))。

[0026] 对象来源的试样优选为血清。试样也可为此外的体液、例如，血液、血浆、间质液、尿、便、汗、唾液、口腔内粘膜、鼻腔内粘膜、咽头粘膜、咳痰、淋巴液、髓液、泪液、母乳、羊水或精液等。或者，试样可为组织或细胞等，也可为从对象采集，培养的组织或细胞、或者其上清。另外，也可为细胞株化的培养细胞。

[0027] 试样的采集方法可使用根据试样的种类的一般的方法。采集的试样也可以例如，不抑制后述的逆转录、延伸及扩增反应的状态或由这些反应成为适宜的状态的方式由公知的任何手段预处理。预处理，例如，是细切、均化、离心、沉淀、提取及/或分离等。

[0028] 例如，提取也可使用市售的核酸提取试剂盒进行。或者，也可不使用市售的试剂盒而通过例如，将材料用缓冲液稀释，进行80～100℃的加热处理，离心分离，采集其上清进行提取。

[0029] hsa-miR-122-5p是具有下述的序列的miRNA。:

[0030] UGGAGUGUGACAAUGGUGUUUG(SEQ ID NO:1)

[0031] 以下，将hsa-miR-122-5p也称为“目标miRNA”。另外，将SEQ ID NO:1的序列也称为“第1序列”。

[0032] 目标miRNA的定量可用可对RNA进行定量的一般的方法进行。例如，可使用PCR法、qPCR法、LAMP法等、浊度或吸光度测定法、荧光测定法或电化学测定法、或者这些的组合等。

[0033] 在使用qPCR法时，例如，可使用市售的试剂盒进行定量。市售的试剂盒是TaqMan(注册商标)Advanced miRNA Assays(ThermoFisher制、ID:477827_mir)、miRCURY LNA miRNA PCR Assays(Qiagen制、产品目录No.YP02103132)等。另外，也能使用SYBR(注册商标)Green qPCR microRNA检测系统(原点Technologies制)及对于目标miRNA特异性地进行扩增的引物而进行定量。

[0034] 优选的定量工序(S1)将目标miRNA特异性地逆转录及延伸，将延伸产物由LAMP法扩增，由检测得到的扩增产物的方法进行。以下，对于这样的定量工序(S1)的一例进行说明。定量工序(S1)包括例如，图2及图3中所示的以下的工序。

[0035] (S1-1)使含与目标miRNA1的第1序列2杂交的第1引物部4及第1LAMP识别序列的逆转录用引物3(以下，也称为“RT引物”)的第1引物部4与第1序列2杂交，将第1序列2逆转录，得到含第1a的序列5(目标miRNA1的互补的DNA)的逆转录产物6的逆转录工序、

[0036] (S1-2)使逆转录产物6和目标miRNA1解离的解离工序、

[0037] (S1-3)使含与第1a的序列5杂交的第2引物部8及第2LAMP识别序列的延伸用引物7(以下，也称为“EL引物”)的第2引物部8与逆转录产物6的第1a的序列5杂交，使EL引物7及逆转录产物6以互相作为模板延伸而得到含第1a的序列5的互补序列9(即，与第1序列相对应的DNA序列)的延伸产物10的延伸工序、

[0038] (S1-4)将延伸产物10由LAMP反应扩增,得到扩增产物的扩增工序、及

[0039] (S1-5)检测得到的扩增产物的检测工序。

[0040] RT引物3的第1引物部4是作为与第1序列2杂交而用于将第1序列2逆转录而生成互补的DNA(cDNA)的引物活动的核酸序列。第1引物部4例如,具有含第1序列2的3'末端的连续的至少5个碱基序列。

[0041] EL引物7的第2引物部8是作为与第1a的序列5杂交而用于生成其互补序列的引物活动的核酸序列。第2引物部8例如,具有含第1a的序列5的3'末端的连续的至少5个碱基序列。

[0042] 第1引物部4、第2引物部8可仅由DNA构成,也可含LNA及/或PNA。越多含这些,可使杂交的结合力变得越强。从而,LNA及/或PNA的数根据与杂交的序列的期望的Tm值而确定即可。例如,使含LNA及/或PNA,则可在更高的温度进行逆转录工序(S1-1)及延伸工序(S1-3),能抑制非特异性的结合。能由结果高精度地将目标miRNA逆转录及延伸。

[0043] 第1LAMP识别序列及第2LAMP识别序列是含在扩增工序(S1-4)中结合了LAMP扩增用引物的序列(识别序列)的核酸碱基序列。识别序列也可为一般在LAMP扩增用引物中使用。例如,第1LAMP识别序列也可以从第1引物部4侧向5'末端的顺序含B1序列、B2序列(及任意地LB序列)及B1序列。进而,第2LAMP识别序列也可从第2引物部8侧向5'末端的顺序含F1序列、F2序列(及任意地LB序列)及F1序列。

[0044] 但是,第1LAMP识别序列及第2LAMP识别序列优选以下述的(1)～(7)的组合含识别序列。其中,下述的各识别序列的顺序是从第1引物部4或第2引物部8侧向5'末端的顺序。“c”是指刚才记载的序列的互补序列。例如,“LBc序列”是指LB序列的互补序列。“虚拟序列”是具有与第1a的序列、F2序列、F1序列、LF序列、B1序列、B2序列、LB序列及其互补序列不同的碱基序列的核酸序列。

[0045] (1)第1LAMP识别序列含B2序列,

[0046] 第2LAMP识别序列含B1c序列、F1序列及F2序列。

[0047] (此时,以第1a的序列的互补序列9的至少1部分作为LB序列。)

[0048] (2)第1LAMP识别序列含LBc序列及B2序列,

[0049] 第2LAMP识别序列含B1c序列、F1序列及F2序列。

[0050] (3)第1LAMP识别序列含虚拟序列及B2序列,

[0051] 第2LAMP识别序列含B1c序列、F1序列及F2序列。

[0052] (4)第1LAMP识别序列含B1序列及B2序列,

[0053] 第2LAMP识别序列含F1序列、LFc序列及F2序列。

[0054] (5)第1LAMP识别序列含B2序列,

[0055] 第2LAMP识别序列含F1序列、LFc序列及F2序列。

[0056] (6)第1LAMP识别序列含LBc序列及B2序列,

[0057] 第2LAMP识别序列含F1序列及F2序列。

[0058] (7)第1LAMP识别序列含B1序列及B2序列,

[0059] 第2LAMP识别序列含LFc序列及F2序列。

[0060] 通过以上的组合而更特异性地逆转录及延伸目标miRNA变得可能,胰腺癌检测的精度提升。

[0061] 在以LAMP识别序列的组合作为上述(1)时,优选使用含以下的表1中所示的RT引物3及EL引物7的逆转录及延伸用引物组A或B。

[0062] 【表1】

[0063]

逆转录及延伸用引物组A		
引物名	序列编号	序列(5'-3')
RT	2	CGGAACGGCA TAAAAAGCC**C AAACACCA**
EL	3	GAATGTGACC ACGCGGATAC AGACTTTCGA TCCACGCTGG GACCGAGGCC AGACTCTACC TGGG**TGGAGT GTGACAA**
逆转录及延伸用引物组B		
引物名	序列编号	序列(5'-3')
RT	4	GGCGCCGAAA CAATATTCCT **CAAACACCA**
EL	5	GATCTAGAAG GCCGCCAGTC GTTCAGCCTA CGGCCGTTGT CATCCGTAGC AGGACGCTCA GGG**TGGAGTG TGACAA**

[0064] *粗体字表示第1引物部或第2引物部。

[0065] 也可在RT引物3的第1引物部4和第1LAMP识别序列之间、EL引物7的第2引物部8和第2LAMP识别序列之间、及/或各LAMP识别序列所含的各识别序列之间,存在间隔物序列。间隔物序列是与第1a的序列、各识别序列及它们的互补序列的序列不同,并且不给后述的延伸产物的扩增反应不良影响的核酸序列。间隔物序列可仅由DNA构成,也可含LNA及/或PNA。例如,间隔物序列是1个碱基～16个碱基,优选为聚T序列或聚A序列等。

[0066] 逆转录工序(S1-1)通过将例如,RT引物3、逆转录酶、盐及脱氧核苷三磷酸(dNTP)等的底物(根据需要,作为反应试剂的增稠剂、pH调制用缓冲材、表面活性剂、使退火特异性增大的离子及/或成为逆转录酶的辅因子的离子)等添加到试样中进行。作为逆转录酶,可使用例如,M-MuLV逆转录酶、AMV逆转录酶、Transcriptor逆转录酶、SuperScript(注册商标)Transcriptor逆转录酶、或者MultiScribe逆转录酶等。温度优选维持在例如约10℃～55℃。

[0067] 解离工序(S1-2)例如,可通过将反应液加热到80℃～100℃而进行。

[0068] 延伸工序(S1-3)通过将例如,EL引物7、DNA聚合酶、盐及dNTP等的底物(根据需要增稠剂、pH调制用缓冲材、表面活性剂及离子)等添加到含逆转录产物6的溶液中来进行。温度优选维持在约10℃～80℃。

[0069] 扩增工序(S1-4)使用LAMP法进行。在此工序中,通过将例如,LAMP扩增用引物组、锁取代型DNA聚合酶、盐及dNTP等的底物(根据需要增稠剂、pH调制用缓冲材、表面活性剂及离子)等添加到含延伸产物10的溶液中,使其在等温扩增反应条件下维持而进行。

[0070] LAMP扩增用引物组的种类及序列根据第1LAMP识别序列及第2LAMP识别序列的序列而选择。例如,LAMP扩增用引物组含与第1LAMP识别序列及第2LAMP识别序列的序列相对应的FIP引物及BIP引物。如果需要,其也可含F3引物、B3引物及/或LF引物或LB引物等的环引物。

[0071] 在以LAMP识别序列的组合作为上述(1)的组合时,作为LAMP扩增用引物组,可使用例如,以下的表2中所示的LAMP扩增用引物组A或B。再者,关于LAMP扩增用引物组A的LB引物,可使用SEQ ID NO:8或9的任何一方。

[0072] 【表2】

[0073]

LAMP扩增用引物组A		
引物名	序列编号	序列（5'-3'）
FIP	6	CCAGCGTGGA TCGAAAGTCT GTGAATGTGA CCACGCGGAT
BIP	7	GACCGAGGCC AGACTCTACC TCGGAACGGC ATAAAAAGCC
LB	8	GTGTGACAAT GGTGTTTG
LB	9	TGACAATGGT GTTTGGGC
LAMP扩增用引物组B		
引物名	序列编号	序列（5'-3'）
FIP	10	AACGGCCGTA GGCTGAACGG ATCTAGAAGG CCGCCAGT
BIP	11	GTCATCCGTA GCAGGACGCT CAGGCGCCGA AACAATATTC CT
LB	8	GTGTGACAAT GGTGTTTG

[0074] 可根据以上的工序，将目标miRNA更特异性地逆转录、延伸及扩增。特别是，在使用表1及表2中所示的引物时，逆转录、延伸及扩增的特异性提升。从而，能更高灵敏度地检测胰腺癌的罹患的有无。

[0075] 检测工序(S1-5)可由检测核酸的一般的方法进行。在检测工序中，例如，可使用浊度的信号、光学信号或电化学信号等。

[0076] 在使用浊度时，检测例如对应于扩增产物或扩增反应的存在增加的反应液的浊度、浊度的变化量或浊度的开始时间即可。检测例如，可使用浊度计或分光光度计，或者由目测等进行。

[0077] 在使用光学信号时，例如，在发生对应于扩增产物或扩增反应的存在改变的光学信号的标记物质(荧光试剂或嵌入剂等)的存在下进行扩增反应，检测光学信号的量、变化量或其开始时间即可。检测例如，可使用公知的任何光学传感器，或者由目测等进行。

[0078] 在使用电化学信号时，例如，在发生对应于扩增产物的增加改变的电化学信号的标记物质(氧化还原探针等)的存在下进行扩增反应，检测电化学信号的量、变化量或开始时间即可。检测例如，可使用具备电极的电化学检测用装置进行。

[0079] 电化学检测用装置含例如芯片。芯片具备1个面上具备电极的基板。电极当例如金时，由于灵敏度良好而优选。在上述1个面上带含扩增产物的溶液，则电极与溶液相接，可检测自其中存在的标记物质的电化学信号。

[0080] 以上说明的浊度、光学信号及电化学信号等的检测可从扩增反应的开始在特定的时间点进行，也可经时进行。经时可为连续，也可通过以期望的时间间隔在多个时间点检测。

[0081] 另外，也可在扩增产物的检测中，使用例如，含目标miRNA、目标miRNA的cDNA或延伸产物11的至少1部分的序列或其互补的序列的核酸探针。通过检测这样的核酸探针和扩增产物的杂交，可检测扩增产物。

[0082] 如上所述，在检测工序(S1-5)中得到的各信号的量、变化量或开始时间是反映扩增产物的量，从这些信息算出试样中原本存在的目标miRNA的存在量、即，定量。

[0083] 例如，存在于试样中的目标miRNA的存在量越多，越可在更短的时间内观察到信号的变化的开始。因此，可使用表示开始时间和目标miRNA的存在量的关系的校准曲线而进行试样中的目标miRNA的定量。校准曲线可通过对于以不同的已知的浓度含目标miRNA的多个标准试样而测量信号的开始时间来制成。对于此校准曲线和对于对象来源的试样得到的开

始时间的测定结果进行比较。可由此算出试样中的目标miRNA的存在量。

[0084] 例如，试样中的目标miRNA的存在量可作为每试样的单位量的目标miRNA的拷贝数得到。

[0085] 可从根据以上说明的任何方法的定量工序(S1)中得到的定量结果判定对象中的胰腺癌的罹患的有无。这样的判定例如，可由可在图4的(a)中所示的定量工序(S1)之后进行的判定工序(S2)进行。

[0086] 例如，在判定工序(S2)中，在对象中的目标miRNA的存在量比对照中的目标miRNA的存在量多时，可判定为对象罹患胰腺癌。对照可为健康体。健康体是指至少未罹患胰腺癌的个体。健康体优选为不具有任何疾病或异常的健康的个体。

[0087] 其中，作为对照选择的个体在本分析方法中可为与受检查的对象不同的个体，但优选属于相同的种的个体、即当对象是人时，对照也是人。另外，对照的年龄、性别及身高体重等的身体的条件、或者人数不特别限定，身体的条件优选为在本分析方法中与受检查的对象相同的或类似。

[0088] 对照中的目标miRNA的存在量可在进行实施方式的分析方法之前，使用相同的或类似的种类的试样及方法预先得到。或者，对照中的目标miRNA的存在量也可为从文献等的过去的见解得到的值。

[0089] 或者，也可在定量工序(S1)中得到的定量值在预先确定的阈值以上时，判定为对象罹患胰腺癌。例如，阈值可通过用与定量工序(S1)中使用的方法相同的方法对于健康的个体或具有其他癌的个体和具有胰腺癌的个体的目标miRNA定量值进行测定、比较来确定。各个体也可为多个。阈值可根据使用的方法、试样的种类、测定条件而不同。

[0090] 其中还包括判定为对象罹患胰腺癌，判定为罹患胰腺癌的可能性高。

[0091] 另外，判定为对象罹患胰腺癌还包括将对象中的胰腺癌的罹患的有无与其他癌区别判定。即，在判定工序(S2)中判定为罹患胰腺癌时，可是指对象未罹患其他癌，罹患胰腺癌。其他癌，例如，含分类为胰腺癌以外的癌(恶性肿瘤、恶性新生物、癌及肉瘤)。其他癌含例如，乳腺癌、大肠癌、胃癌、肺癌、卵巢癌、前列腺癌、胆管癌、食道癌、肝脏癌、脑肿瘤、膀胱癌、肉瘤、子宫体癌及子宫肉瘤等。

[0092] 另外，判定为对象罹患胰腺癌还包括判定对象中的胰腺癌的预后或胰腺癌的再发的有无。此时，对象可为例如在进行本分析方法的以前判定为罹患胰腺癌的对象、受胰腺癌的治疗的对象、从胰腺癌治愈的对象、及/或胰腺癌的经过观察中的对象等。

[0093] 例如，在这样的对象中进行目标miRNA的定量的结果，在定量值比对照高，或者在预先确定的阈值以上时，能判定为对象中的胰腺癌的预后不良或胰腺癌再发，或者其可能性高。这样的分析方法如图4的(b)所示，在定量工序(S1)之后，包括从定量的结果判定对象中的胰腺癌的预后或胰腺癌的再发的有无的判定工序(S3)。

[0094] 在进一步的的实施方式中，在判定工序(S2)或(S3)之后，也能根据结果而选择用于适用于对象的治疗法的种类或药剂的种类。治疗法或药剂是为了胰腺癌的治疗的。治疗法的种类或药剂的种类含治疗法或药剂的使用量、时机或期间。这样的分析方法如图4的(c)所示，在判定工序(S2)或(S3)之后，包括从定量的结果选择用于适用于对象的治疗法的种类或药剂的种类的选择工序(S4)。

[0095] 另外，也可在进一步的的实施方式中，在判定工序(S2)或(S3)之后，为了进一步确

认所述判定，将对象供于进一步的的胰腺癌用的检查、例如，细胞学诊断等。

[0096] 实施方式的分析方法不包括对于hsa-miR-122-5p以外的标志物进行检测或定量的工序。进而，胰腺癌的罹患的有无的判定不使用hsa-miR-122-5p以外的标志物的检测或定量结果进行。即，通过根据实施方式的分析方法，对于1种miRNA(hsa-miR-122-5p)进行定量，能简便地判定对象中的胰腺癌的罹患的有无。hsa-miR-122-5p以外的标志物含miRNA、RNA、DNA、蛋白质、糖蛋白质或肽等。

[0097] 再者，由于实施方式的分析方法能使用可在健康诊断等中容易地采集的血清，可早期发现胰腺癌。而且，实施方式的分析方法可与细胞学诊断等比较而大大减轻对象的肉体的及经济的负担的同时，由于程序容易而对于检查者的负担也少。另外，血清由于其中所含的miRNA浓度稳定，能进行更正确的检查。

[0098] (标志物)

[0099] 根据实施方式，提供胰腺癌检测用标志物，含hsa-miR-122-5p。

[0100] 实施方式的胰腺癌检测用标志物可在例如，对象中的胰腺癌的罹患的有无的判定、对象中的胰腺癌的预后判定、及对象中的胰腺癌的再发的有无的判定等中使用。

[0101] 另外，实施方式的标志物可还在适用于对象的治疗方法的种类或药剂的种类的选择中使用。其中，治疗方法或药剂是为了胰腺癌的治疗的。

[0102] 或者，实施方式的标志物能还在试样中的胰腺癌细胞的检测中使用。

[0103] (试剂盒)

[0104] 根据实施方式，提供胰腺癌检测用试剂盒。

[0105] 所述试剂盒含选自用于扩增hsa-miR-122-5p的引物组(以下，称为“第1引物组”)、用于将hsa-miR-122-5p逆转录的RT引物、用于延伸hsa-miR-122-5p的EL引物、及用于检测hsa-miR-122-5p的核酸探针的至少1种核酸。

[0106] 第1引物组例如是LAMP扩增用的引物组。作为第1引物组，可使用例如，表2中所示的LAMP扩增用引物组A或B的至少1个。

[0107] 在实施方式的试剂盒含RT引物及EL引物时，可使用表1中所示的逆转录及延伸用引物组A或B的至少1个。

[0108] 核酸探针含hsa-miR-122-5p的至少1部分的序列或其互补序列、或者，hsa-miR-122-5p的cDNA的至少1部分的序列或其互补序列。

[0109] 试剂盒中所含的上述核酸也可个别或任何组合而与适合的载体一同收容在容器而提供。适合的载体，例如是水或缓冲液等。容器是例如，管或微量滴定板等。或者，这些核酸也可附着或固定于微流体芯片等的固相而提供。

[0110] 试剂盒除了上述核酸之外，也可含在逆转录、延伸及/或扩增中使用的试剂、在检测中使用的指示剂(例如，SYBR Green或EVA Green等的荧光染料、在电流检测时是钌六胺等的金属络合物)等。

[0111] 实施方式的胰腺癌检测用试剂盒可在例如，对象中的胰腺癌的罹患的有无的判定、对象中的胰腺癌的预后判定、及对象中的胰腺癌的再发的有无的判定等中使用。另外，实施方式的试剂盒可还在适用于对象的治疗方法的种类或药剂的种类的选择中使用。其中，治疗方法或药剂是为了胰腺癌的治疗的。或者，实施方式的试剂盒能还在试样中的胰腺癌细胞的检测中使用。

[0112] 根据进一步的的实施方式，胰腺癌检测用试剂盒作为含选自用于扩增hsa-miR-122-5p的引物组、用于将hsa-miR-122-5p逆转录的RT引物、用于延伸hsa-miR-122-5p的EL引物、及用于检测hsa-miR-122-5p的核酸探针的至少1种核酸的胰腺癌的诊断用组合物或诊断药提供。另外，根据实施方式，也提供上述核酸的至少1种用于制造胰腺癌的诊断用组合物或胰腺癌的诊断药的用途。

[0113] 【第2实施方式】

[0114] 在第2实施方式中，也提供用于辅助对象中的胰腺癌的罹患的有无的判定的分析方法，如图5的(a)所示，包括对于对象来源的试样中的hsa-miR-122-5p进行定量(定量工序(S11))。

[0115] “辅助判定”，例如，包括取得关于对象罹患胰腺癌的可能性的信息。这样的分析方法如图5的(b)所示，包括以下的工序。

[0116] (S11)对于对象来源的试样中的hsa-miR-122-5p进行定量的定量工序、及

[0117] (S12)得到关于对象罹患胰腺癌的可能性的信息的信息取得工序。

[0118] 定量工序(S11)可由与上述的定量工序(S1)同样的方法进行。在信息取得工序(S12)中得到的信息是指例如，从定量工序(S11)的定量结果得到的，关于试样中的目标miRNA的存在量的信息。例如，信息是扩增产物的定量值或试样中的目标miRNA的定量值等。

[0119] 所述信息通过与如上所述的对照或预先确定的阈值比较，可在成为试样的来源的对象中的胰腺癌的罹患的有无的判定、对象中的胰腺癌的预后判定、胰腺癌的再发的有无的判定、或者适用于对象的治疗法的种类或药剂的种类的选择等中使用。

[0120] [实施例]

[0121] 接下来，对于使用实施方式的分析方法或试剂盒进行的实验进行记载。

[0122] 【例1.健康者血清及癌患者血清中的hsa-miR-122-5p的定量(qRT-PCR法)】

[0123] 准备从健康者16受试体、乳腺癌患者22受试体、大肠癌患者6受试体、胃癌患者6受试体、肺癌患者3受试体、卵巢癌患者6受试体、胰腺癌患者11受试体、胆管癌患者5受试体、食道癌患者5受试体、肝脏癌患者5受试体、脑肿瘤患者5受试体、膀胱癌患者5受试体、胰腺癌患者5受试体、肉瘤患者5受试体、子宫体癌患者5受试体、子宫肉瘤患者5受试体得到的血清。

[0124] 从全部血清提取RNA。提取使用NucleoSpin(注册商标)miRNA Plasma(商品名、宝生物公司制)进行。

[0125] 接下来，将存在于提取样品中的短链RNA逆转录，合成及扩增cDNA。合成根据TaqMan(注册商标)Advanced miRNA Assay(商品名、ThermoFisher·Scientific公司制)的处理说明书而使用TaqMan(注册商标)Advanced miRNA cDNA Synthesis Kit(商品名、ThermoFisher·Scientific公司制)进行。

[0126] 接下来，使用TaqMan(注册商标)Fast Advanced Master Mix(商品名、ThermoFisher·Scientific公司制)及TaqMan(注册商标)Advanced miRNA Assay ID：477855_mir而进行TaqMan PCR，对于Ct值进行测定，对于miRNA进行定量。10^2拷贝在检测界限以下。

[0127] 定量的结果示于图6。图6是显示健康者、胰腺癌以外的癌患者及胰腺癌患者的定量结果的箱形图。

[0128] 具体而言，hsa-miR-122-5p在健康者中以10^3～10^4拷贝量级分布，在胰腺癌以外的癌患者中以10^4～10^5拷贝量级分布，在胰腺癌患者中以$10^{4\sim6}$拷贝量级分布。癌患者分布于比健康者高的值，再者胰腺癌患者显示比其他癌高的值。结果表明，在胰腺癌患者中血清中的hsa-miR-122-5p的存在量多。

[0129] 各自区分健康者及癌患者、胰腺癌患者及健康者+其他癌患者、胰腺癌患者及其他癌患者的AUC(Area Under Curve)示于以下的表3。

[0130] 【表3】

[0131]

	AUC
健康者vs癌患者	0.95
胰腺癌患者vs健康者+其他癌患者	0.85
胰腺癌患者vs其他癌患者	0.83

[0132] 区分健康者和癌患者的AUC是约0.95，胰腺癌患者和健康者+其他癌患者之间的AUC是约0.85，胰腺癌患者和其他癌患者之间的AUC是约0.83。

[0133] 从而表明，SEQ ID NO:1的miRNA、即hsa-miR-122-5p作为用于将胰腺癌与健康者及其他癌区别检测的标志物是高性能的。

[0134] 【例2.健康者血清及癌患者血清中的hsa-miR-122-5p的定量(LAMP法)】

[0135] 受试体的明细与例1相同。另外，RNA的提取用与例1相同的方法进行。将提取样品2μL在反应体积20μL、16℃10分钟、42℃5分钟、85℃5分钟的条件下逆转录。逆转录反应液的组成是67unit MultiScribe(注册商标)Reverse Transcriptase(*)、1×RT Buffer(*)、0.1mM的dNTPs(*)、4U的RNA酶OUT(商品名、ThermoFisher・Scientific公司制)、10nM的RT引物(表5、SEQ ID NO:2)。附“*”的全部使用High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit(商品名、ThermoFisher・Scientific公司制)中所含的。

[0136] 向逆转录后的反应液添加5μL延伸液而进行延伸20次95℃2分钟后，95℃20秒钟-59℃30秒钟-72℃10秒钟的循环。延伸液在25μL延伸反应液中，含DeepVent(exo-)DNApolymerase(0.5U、NewEnglandBio)，调整为终浓度成为0.2×ThermoPol Buffer(DeepVent(exo-)DNApolymerase附属)、0.2mM的$MgSO_4$、0.12mM的dNTPs、10nM的EL引物(表5、SEQ ID NO:3)。

[0137] 接下来，将延伸的产物1μL在反应体积25μL、65℃60分钟的条件下进行LAMP扩增，同时测定荧光强度的开始时间。LAMP扩增液含8U的Tin(exo-)LF DNApolymerase(Optigene)、0.5μL的EvaGreen(注册商标)(Biotium)，调整为终浓度各自成为20mM的Tris-HCl(pH8.0)、50mM的KCl、8mM的$MgSO_4$、10mM的(NH4)SO4、0.1％的Tween-20、0.8M的甜菜碱、各1.4mM的dNTPs、1.6μM的FIP引物(表5、SEQ ID NO:6)、1.6μM的BIP引物(表5、SEQ ID NO:7)、及0.8μM的LB引物(表5、SEQ ID NO:8)。用实时PCR装置，经时测定荧光强度，对于超阈值的时间进行测定。

[0138] 【表4】

[0139]

引物组 A

[0140]

引物名	序列编号	序列（5'-3'）
RT	2	CGGAACGGCA TAAAAAGCCC AAACACCA
EL	3	GAATGTGACC ACGCGGATAC AGACTTTCGA TCCACGCTGG GACCGAGGCC AGACTCTACC TGGGTGGAGT GTGACAA
FIP	6	CCAGCGTGGA TCGAAAGTCT GTGAATGTGA CCACGCGGAT
BIP	7	GACCGAGGCC AGACTCTACC TCGGAACGGC ATAAAAAGCC
LB	8	GTGTGACAAT GGTGTTTG

[0141] 将SEQ ID NO:1的合成RNA的0、10^2、10^3、10^4及10^5拷贝/μL使用表5的引物组A逆转录、延伸及LAMP扩增，同样地测定荧光强度的开始时间。使用结果而制成SEQ ID NO:1的RNA的拷贝数和开始时间的校准曲线(图7)。校准曲线对于浊度的开始时间的miRNA浓度依赖性优良。因此得知，引物组A能特异性地延伸及扩增目标miRNA。使用此校准曲线而从各受试体中的开始时间算出RNA的拷贝数。

[0142] 定量的结果示于图8。图8是显示健康者、胰腺癌以外的癌患者及胰腺癌患者的定量结果的箱形图。定量值在健康者中以10^4～10^5拷贝量级分布，在胰腺癌以外的癌患者中以10^5拷贝量级分布，在胰腺癌患者中以10^6拷贝量级分布。癌患者分布于比健康者高的值，再者胰腺癌患者显示比其他癌高的值。结果表明，在胰腺癌患者中血清中的hsa-miR-122-5p的存在量多。

[0143] 各自区分健康者及癌患者、胰腺癌患者及健康者+其他癌患者、胰腺癌患者及其他癌患者的AUC(Area Under Curve)示于以下的表4。

[0144] 【表5】

[0145]

	AUC
健康者vs癌患者	0.85
胰腺癌患者vs健康者+其他癌患者	0.83
胰腺癌患者vs其他癌患者	0.80

[0146] 区分健康者和癌患者的AUC是约0.85，胰腺癌患者和健康者+其他癌患者之间的AUC是约0.83，胰腺癌患者和其他癌患者之间的AUC是约0.80。

[0147] 结果表明，SEQ ID NO:1的miRNA、即hsa-miR-122-5p作为用于将胰腺癌与健康者及其他癌区别检测的标志物是高性能的。另外得知，使用LAMP法的本例的结果如例1一样，是比使用qRT-PCR更高的分离能。

[0148] 【例3.LB序列的探讨】

[0149] 代替SEQ ID NO:8的LB序列而使用表6中所示的SEQ ID NO:9的LB序列以与例2同样的方法扩增由例2中制作的合成RNA的校准曲线用延伸产物。

[0150] 【表6】

[0151]

引物名	序列编号	序列(5’-3’)
LB	9	TGACAATGGT GTTTGGGC

[0152] 结果，在使用SEQ ID NO:9的LB引物时，浊度的开始时间的miRNA浓度依赖性也良好，miRNA的拷贝数是0之时的非特异性扩增少。从而表明，SEQ ID NO:9的LB序列也能在本LAMP扩增系中有效地使用。

[0153] 【例4.引物组的特异性的评价】

[0154]　另外，使用表7中所示的引物组B而与例2在相同的条件下，进行SEQ ID NO:1的合成RNA的0、10^3、10^4、10^5及10^6拷贝/μL的逆转录、延伸及LAMP扩增，测量浊度的开始时间。

[0155]　【表7】

[0156]

引物组 B		
引物名	序列编号	序列（5'-3'）
RT	4	GGCGCCGAAA CAATATTCCT CAAACACCA
EL	5	GATCTAGAAG GCCGCCAGTC GTTCAGCCTA CGGCCGTTGT CATCCGTAGC AGGACGCTCA GGGTGGAGTG TGACAA
FIP	10	AACGGCCGTA GGCTGAACGG ATCTAGAAGG CCGCCAGT
BIP	11	GTCATCCGTA GCAGGACGCT CAGGCGCCGA AACAATATTC CT
LB	8	GTGTGACAAT GGTGTTTG

[0157]　结果示于图9。在使用引物组B时，浊度的开始时间的miRNA浓度依赖性也良好。从结果得知，引物组B也能特异性地延伸及扩增目标miRNA。从而提示，当使用此引物组时，胰腺癌的检测的精度提升。

[0158]　【例5.电化学检测】

[0159]　调制含在例2中使用的FIP引物及BIP引物（各48μM）、LB引物（24μM）的引物溶液。向硅酮制流路包装（流路宽度×高度：1mm×1mm）使用微量分注机点斑100nL引物溶液。将使电极图案化的DNA芯片基板（玻璃（0.8mm）/钛（500nm）/金（2000nm））和该流路包装整合到盒中，制作芯片。

[0160]　接下来，调整表8中所示的组成的LAMP扩增反应液。

[0161]　[表8：LAMP扩增反应液的组成]

[0162]

成分	终浓度
Tris-HCl（pH8.8）	20mM
KCl	60mM
$MgSO_4$	8mM
$(NH_4)_2SO_4$	10mM
Tween20	0.1%
dNTPs	各1.4mM
Tin exo-DNA聚合酶	48个单位（×3）
甜菜碱	0.8M
RuHex	1mM
模板	1μL
反应液量	60μL

[0163]　向上述LAMP扩增反应液添加1μL例2中使用的延伸后的模板，在表9中所示的条件下进行电化学测定。

[0164]　[表9：电化学测定条件]

[0165]

项目	详细
测定方法	线性扫描伏安法（Linear Sweep Voltammetry，LSV）
扫描电位	0.1～-0.4V

扫描速度	0.5V/s
温度	65℃

[0166] 开始LAMP扩增反应，则钌六胺(RuHex)的还原电流值开始增加。得知，延伸产物的存在量越多，越能快速地使用本芯片定量检测电流增加的时间。

[0167] 对于本发明的几个实施方式进行说明，但这些实施方式仅例如是提示，不旨在限定发明的范围。这些新的实施方式能以此外的各种各样的形态实施，可在不脱离发明的要点的范围内进行各种省略、置换，变更。这些实施方式或其变形含在发明的范围或要点中的同时，含在记载在专利权利要求的发明及其均等的范围内。

[0168] 【符号的说明】

[0169] 1…目标miRNA，

[0170] 2…第1序列，

[0171] 3…逆转录用引物(RT引物)，

[0172] 4…第1引物部，

[0173] 5…第1a的序列，

[0174] 6…逆转录产物，

[0175] 7…延伸用引物(EL引物)，

[0176] 8…第2引物部，

[0177] 9…第1a的序列的互补序列，

[0178] 10…延伸产物

序列表

<110> Kabushiki Kaisha Toshiba

<120> 分析方法及试剂盒

<130> 19S0178PCT

<160> 11

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 22

<212> RNA

<213> 人

<400> 1

uggaguguga caaugguguu ug 22

<210> 2

<211> 28

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> RT 引物

<400> 2

cggaacggca taaaaagccc aaacacca 28

<210> 3

<211> 77

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> EL 引物

<400> 3

gaatgtgacc acgcggatac agactttcga tccacgctgg gaccgaggcc agactctacc 60

tgggtggagt gtgacaa 77

<210> 4

<211> 29

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> RT 引物

<400> 4

ggcgccgaaa caatattcct caaacacca 29

<210> 5

<211> 76
<212> DNA
<213> 人工的
<220>
<223> EL 引物
<400> 5
gatctagaag gccgccagtc gttcagccta cggccgttgt catccgtagc aggacgctca 60
gggtggagtg tgacaa 76
<210> 6
<211> 40
<212> DNA
<213> 人工的
<220>
<223> FIP 引物
<400> 6
ccagcgtgga tcgaaagtct gtgaatgtga ccacgcggat 40
<210> 7
<211> 40
<212> DNA
<213> 人工的
<220>
<223> BIP 引物
<400> 7
gaccgaggcc agactctacc tcggaacggc ataaaaagcc 40
<210> 8
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工的
<220>
<223> LB 引物
<400> 8
gtgtgacaat ggtgtttg 18
<210> 9
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工的
<220>
<223> LB 引物
<400> 9

tgacaatggt gtttgggc 18

〈210〉 10

〈211〉 38

〈212〉 DNA

〈213〉 人工的

〈220〉

〈223〉 FIP 引物

〈400〉 10

aacggccgta ggctgaacgg atctagaagg ccgccagt 38

〈210〉 11

〈211〉 42

〈212〉 DNA

〈213〉 人工的

〈220〉

〈223〉 BIP 引物

〈400〉 11

gtcatccgta gcaggacgct caggcgccga aacaatattc ct 42

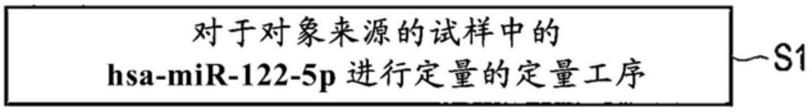

对于对象来源的试样中的
hsa-miR-122-5p 进行定量的定量工序
S1

图1

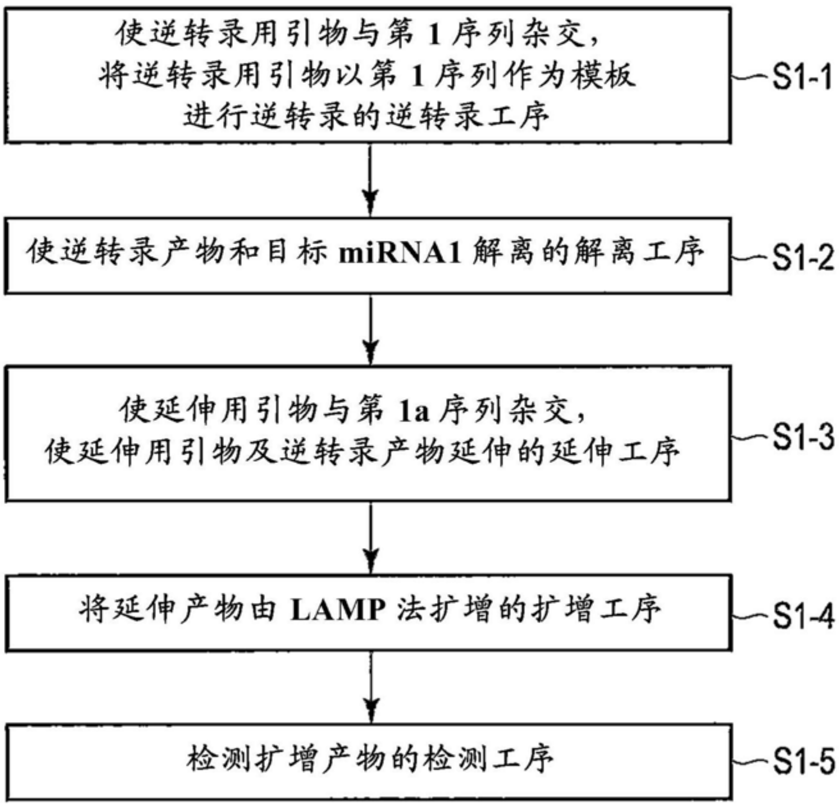

使逆转录用引物与第 1 序列杂交，
将逆转录用引物以第 1 序列作为模板
进行逆转录的逆转录工序
S1-1
使逆转录产物和目标 miRNA1 解离的解离工序
S1-2
使延伸用引物与第 1a 序列杂交，
使延伸用引物及逆转录产物延伸的延伸工序
S1-3
将延伸产物由 LAMP 法扩增的扩增工序
S1-4
检测扩增产物的检测工序
S1-5

图2

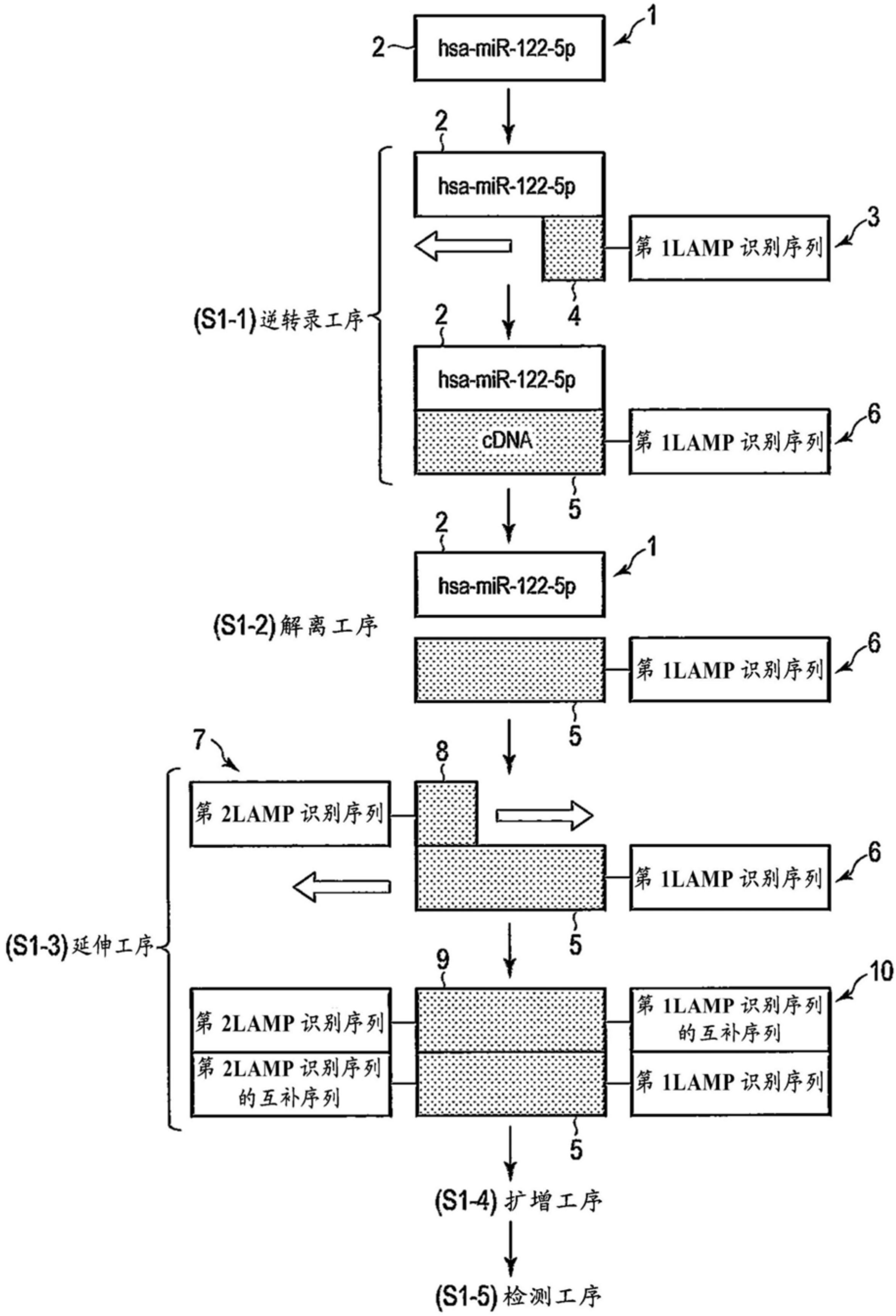

1
2
hsa-miR-122-5p
2
hsa-miR-122-5p
第 1LAMP 识别序列
3
4
(S1-1)逆转录工序
2
hsa-miR-122-5p
cDNA
第 1LAMP 识别序列
6
5
2
hsa-miR-122-5p
1
(S1-2)解离工序
第 1LAMP 识别序列
6
5
7
8
第 2LAMP 识别序列
第 1LAMP 识别序列
6
5
(S1-3)延伸工序
9
10
第 2LAMP 识别序列
第 1LAMP 识别序列的互补序列
第 2LAMP 识别序列的互补序列
第 1LAMP 识别序列
5
(S1-4) 扩增工序
(S1-5) 检测工序

图3

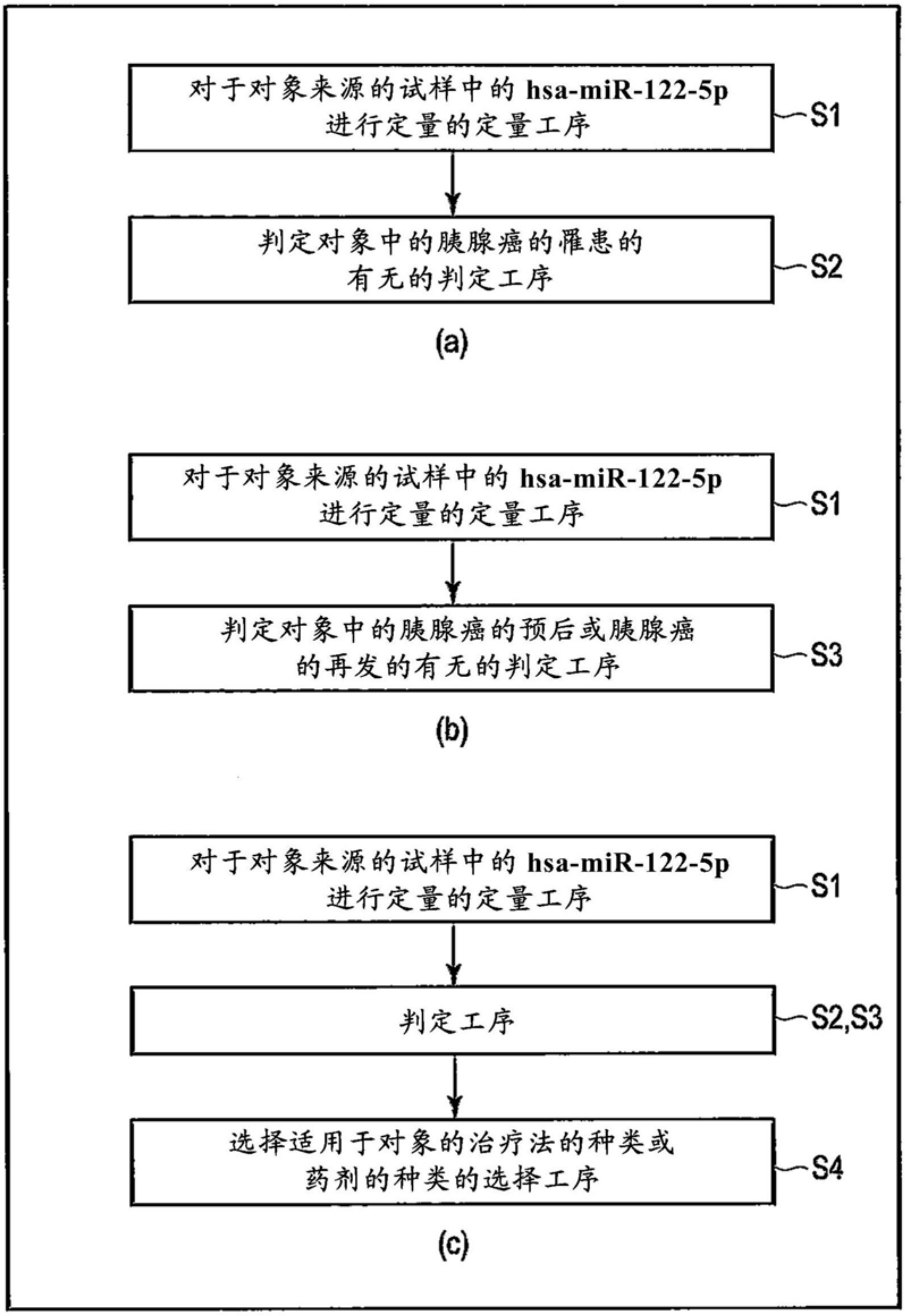

对于对象来源的试样中的 hsa-miR-122-5p 进行定量的定量工序
S1
判定对象中的胰腺癌的罹患的有无的判定工序
S2
(a)
对于对象来源的试样中的 hsa-miR-122-5p 进行定量的定量工序
S1
判定对象中的胰腺癌的预后或胰腺癌的再发的有无的判定工序
S3
(b)
对于对象来源的试样中的 hsa-miR-122-5p 进行定量的定量工序
S1
判定工序
S2,S3
选择适用于对象的治疗法的种类或药剂的种类的选择工序
S4
(c)

图4

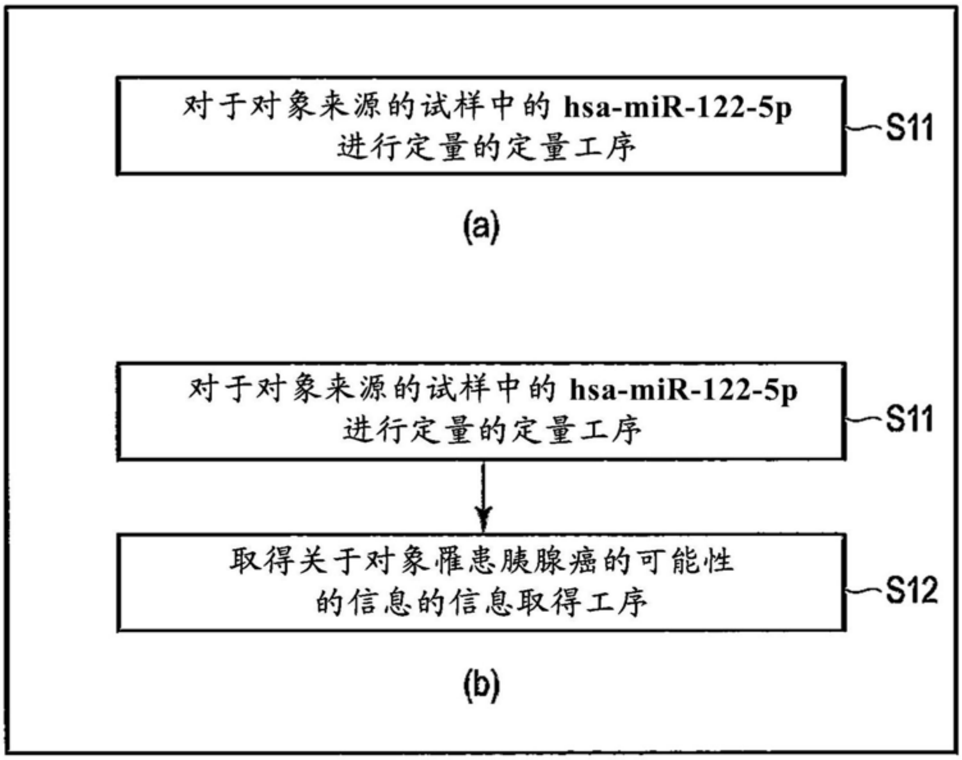

对于对象来源的试样中的 hsa-miR-122-5p
进行定量的定量工序
S11
(a)
对于对象来源的试样中的 hsa-miR-122-5p
进行定量的定量工序
S11
取得关于对象罹患胰腺癌的可能性
的信息的信息取得工序
S12
(b)

图5

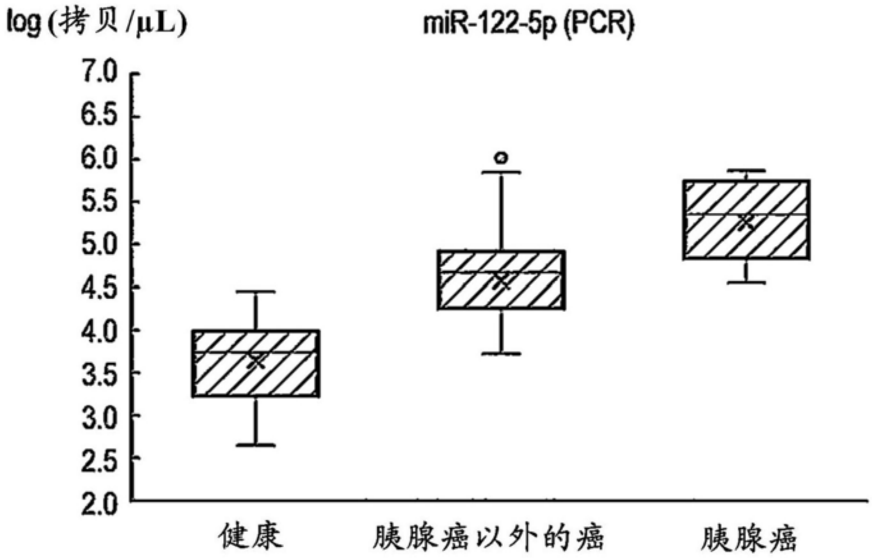

log (拷贝/μL)
miR-122-5p (PCR)
7.0
6.5
6.0
5.5
5.0
4.5
4.0
3.5
3.0
2.5
2.0
健康
胰腺癌以外的癌
胰腺癌

图6

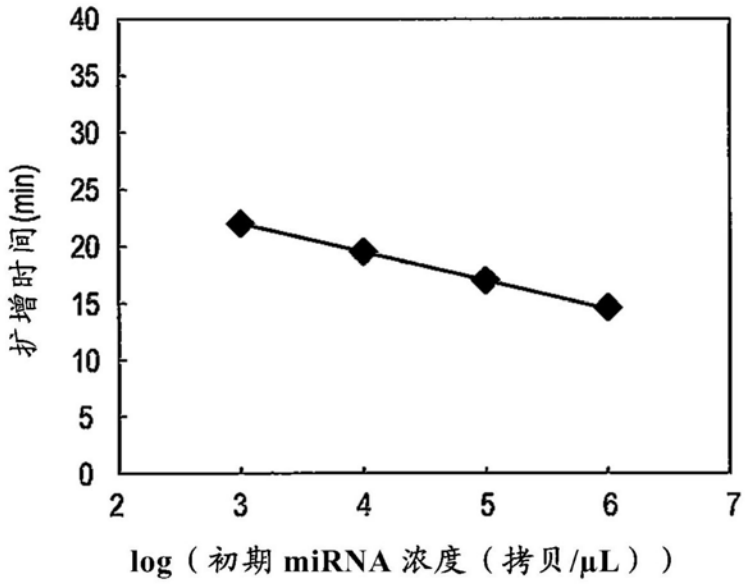

40
35
30
25
20
15
10
5
0
扩增时间(min)
2
3
4
5
6
7
log（初期 miRNA 浓度（拷贝/μL））

图7

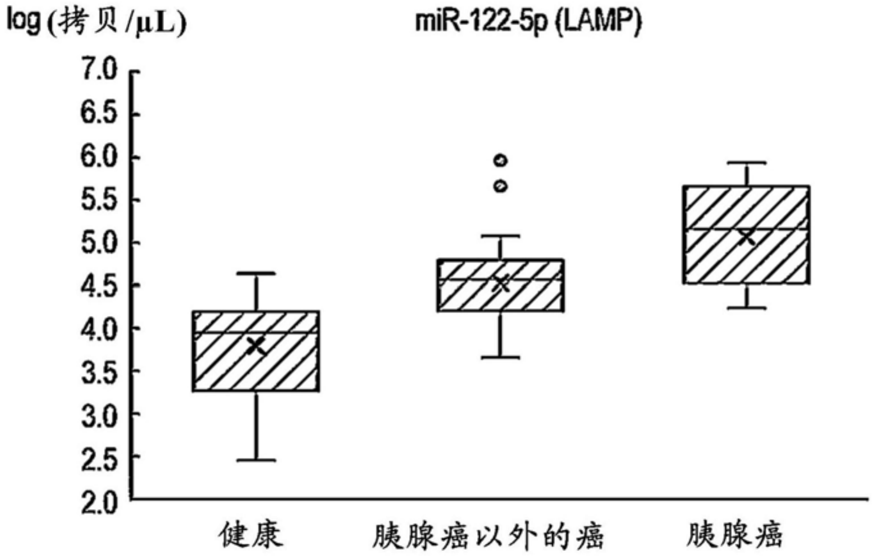

log(拷贝/μL)
miR-122-5p (LAMP)
7.0
6.5
6.0
5.5
5.0
4.5
4.0
3.5
3.0
2.5
2.0
健康
胰腺癌以外的癌
胰腺癌

图8

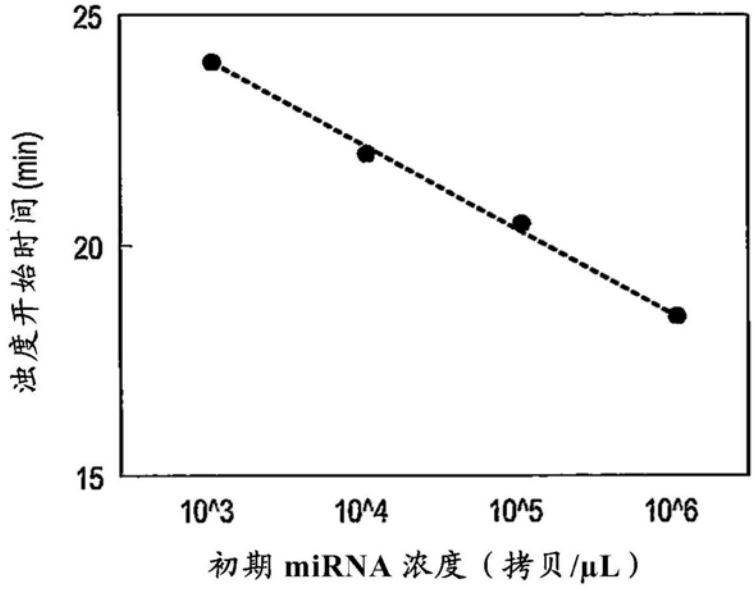


图9

1.判定对象中的胰腺癌的罹患的有无的分析方法，其包括对于对象来源的试样中的hsa-miR-122-5p进行定量，

在所述判定中，判定为所述对象罹患胰腺癌而未罹患其他癌。

2.辅助对象中的胰腺癌的罹患的有无的判定的分析方法，其包括对于对象来源的试样中的hsa-miR-122-5p进行定量，

在所述判定中，判定为所述对象罹患胰腺癌而未罹患其他癌。

3.权利要求1或2所述的方法，其中所述胰腺癌的罹患的有无的判定不使用hsa-miR-122-5p以外的标志物的检测或定量结果进行。

4.权利要求1～3之任一项所述的方法，其还包括在所述对象中的hsa-miR-122-5p的存在量比对照中的hsa-miR-122-5p的存在量多时，判定为所述对象罹患胰腺癌的判定工序。

5.权利要求1～4之任一项所述的方法，其中所述胰腺癌的罹患的有无的判定包括所述对象中的胰腺癌的预后判定、或者所述对象中的胰腺癌的再发的有无的判定。

6.权利要求5所述的方法，其中所述其他癌含乳腺癌、大肠癌、胃癌、肺癌、卵巢癌、前列腺癌、胆管癌、食道癌、肝脏癌、脑肿瘤、膀胱癌、肉瘤、子宫体癌及子宫肉瘤。

7.权利要求1～6之任一项所述的方法，其中所述试样是血清。

8.权利要求1～7之任一项所述的方法，其中所述定量使用选自下列的至少1种核酸进行：用于扩增hsa-miR-122-5p的引物组(以下称为“第1引物组”)、用于逆转录hsa-miR-122-5p的逆转录用引物、用于延伸hsa-miR-122-5p的延伸用引物、及用于检测hsa-miR-122-5p的核酸探针。

9.权利要求8所述的方法，其中所述定量包括：

(S1-1)使含与hsa-miR-122-5p的序列(以下称为“第1序列”)杂交的第1引物部及第1LAMP识别序列的逆转录用引物的所述第1引物部与所述第1序列杂交，逆转录所述第1序列，得到含所述第1序列的互补序列(以下称为“第1a的序列”)的逆转录产物的逆转录工序、

(S1-2)使所述逆转录产物和所述hsa-miR-122-5p解离的解离工序、

(S1-3)使含与所述第1a的序列杂交的第2引物部及第2LAMP识别序列的延伸用引物的所述第2引物部与所述逆转录产物的所述第1a的序列杂交，使所述延伸用引物及所述逆转录产物以互相作为模板延伸而得到含所述第1a的序列的互补序列的延伸产物的延伸工序、

(S1-4)使用第1引物组、由LAMP反应扩增所述延伸产物，得到扩增产物的扩增工序、及

(S1-5)检测得到的所述扩增产物的检测工序。

10.权利要求8或9所述的方法，其中所述第1引物组：

含SEQ ID NO:8的FIP引物、SEQ ID NO:9的BIP引物及SEQ ID NO:10的LB引物，

含SEQ ID NO:8的FIP引物、SEQ ID NO:9的BIP引物及SEQ ID NO:11的LB引物，

含SEQ ID NO:12的FIP引物、SEQ ID NO:13的BIP引物及SEQ ID NO:10的LB引物，或者

含SEQ ID NO:14的FIP引物、SEQ ID NO:15的BIP引物及SEQ ID NO:10的LB引物，

所述逆转录用引物含SEQ ID NO:2，所述延伸用引物含SEQ ID NO:3，

所述逆转录用引物含SEQ ID NO:4，所述延伸用引物含SEQ ID NO:5，或者

所述逆转录用引物含SEQ ID NO:6，所述延伸用引物含SEQ ID NO:7。

11.用于检测胰腺癌的试剂盒，其含选自下列的至少1种核酸：用于扩增hsa-miR-122-5p的引物组(以下称为“第1引物组”)、用于逆转录hsa-miR-122-5p的逆转录用引物、用于延

伸hsa-miR-122-5p的延伸用引物、及用于检测hsa-miR-122-5p的核酸探针，

其中所述检测不检测其他癌，而检测胰腺癌。

12.权利要求11所述的试剂盒，其中所述第1引物组：

含SEQ ID NO:8的FIP引物、SEQ ID NO:9的BIP引物及SEQ ID NO:10的LB引物，

含SEQ ID NO:8的FIP引物、SEQ ID NO:9的BIP引物及SEQ ID NO:11的LB引物，

含SEQ ID NO:12的FIP引物、SEQ ID NO:13的BIP引物及SEQ ID NO:10的LB引物，或者

含SEQ ID NO:14的FIP引物、SEQ ID NO:15的BIP引物及SEQ ID NO:10的LB引物，

所述逆转录用引物含SEQ ID NO:2，所述延伸用引物含SEQ ID NO:3，

所述逆转录用引物含SEQ ID NO:4，所述延伸用引物含SEQ ID NO:5，或者

所述逆转录用引物含SEQ ID NO:6，所述延伸用引物含SEQ ID NO:7。

13.权利要求11所述的试剂盒，其中所述其他癌含乳腺癌、大肠癌、胃癌、肺癌、卵巢癌、前列腺癌、胆管癌、食道癌、肝脏癌、脑肿瘤、膀胱癌、肉瘤、子宫体癌及子宫肉瘤。