



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 113388664 A

(43) 申请公布日 2021.09.14

(21) 申请号 202110571327.4

C12Q 1/6869 (2018.01)

(22) 申请日 2015.01.26

(30) 优先权数据

61/931,974 2014.01.27 US

(62) 分案原申请数据

201580016111.4 2015.01.26

(71) 申请人 阿谢尔德克斯有限公司

地址 美国科罗拉多州

(72) 发明人 乔舒阿·斯塔尔 贾森·迈尔斯

(74) 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227

代理人 郑斌 韩晓帆

(51) Int.Cl.

C12Q 1/6806 (2018.01)

C12Q 1/6844 (2018.01)

权利要求书2页 说明书34页

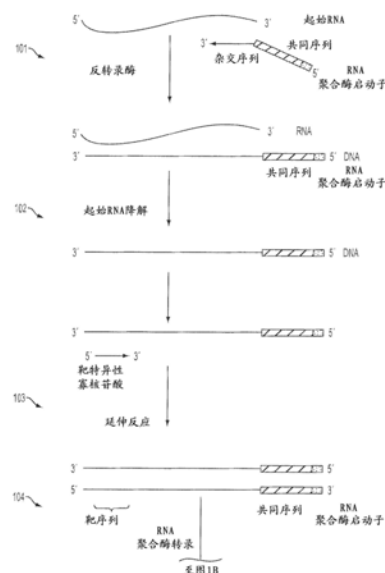
序列表15页 附图21页

(54) 发明名称

用于制备核酸的等温方法及相关组合物

(57) 摘要

根据本发明的一些方面,提供了用于核酸测序的制备方法及相关组合物。在一些实施方案中,本文的方法提供了在等温条件下模板核酸的快速扩增,以产生可直接用于标准下一代核酸测序系统的样品,所述测序系统包括:例如,基于高通量流动池的测序系统。在一些实施方案中,本发明的一些方面涉及用于制备核酸的方法,所述方法涉及在等温条件下指数扩增核酸,以用于测序。



1. 制备用于分析的核酸的方法,所述方法包括:
 - a) 破坏核酸以产生包含DNA模板序列的核酸片段,其中所述DNA模板序列包含靶区域和邻接区域;
 - b) 将寡核苷酸接头连接至所述核酸片段以产生包含所述DNA模板序列的核酸模板,其中所述寡核苷酸接头包含RNA聚合酶启动子序列和共同序列;
 - c) 在RNA聚合酶、逆转录酶、DNA聚合酶和具有RNA酶H活性的酶的存在下,对所述核酸模板进行等温扩增反应,所述等温扩增反应包括以下的两个或多个循环:(i) RNA聚合酶转录,(ii) cDNA合成,以及(iii) DNA聚合酶延伸,从而对所述DNA模板序列进行指数扩增,其中每个循环包括:
 - 对包含靶特异性杂交序列的第一寡核苷酸进行的延伸;以及
 - 对包含与所述共同序列互补之序列的第二寡核苷酸进行的延伸。
2. 权利要求1所述的方法,其还包括对来自(c)的经指数扩增产物的核酸分子或其一部分进行测序。
3. 权利要求2所述的方法,其中所述核酸分子含有非模板序列,所述非模板序列充当引发测序反应之测序引物的杂交位点。
4. 权利要求2或3所述的方法,其中在多重反应中对所述核酸分子进行测序,所述多重反应包括源自不同来源的不同核酸分子。
5. 权利要求4所述的方法,其中所述不同来源为从其中获得所述核酸分子的不同对象。
6. 权利要求4所述的方法,其中所述不同来源为从其中获得所述核酸分子的不同组织。
7. 权利要求4至6中任一项所述的方法,其中所述不同核酸分子包含标识来源的条形码序列。
8. 权利要求1至7中任一项所述的方法,其中所述核酸片段是包含基因重排部分的染色体区段。
9. 权利要求8所述的方法,其中所述基因重排是倒位、缺失或易位。
10. 权利要求1至9中任一项所述的方法,其中所述靶区域在所述邻接区域的5'处。
11. 权利要求1至9中任一项所述的方法,其中所述靶区域在所述邻接区域的3'处。
12. 权利要求1至11中任一项所述的方法,其中所述靶特异性杂交序列与所述靶区域或其一部分互补。
13. 权利要求1至12中任一项所述的方法,其中所述靶区域包含第一基因的序列,并且所述邻接区域包含第二基因的序列。
14. 权利要求13所述的方法,其中所述第一基因是RET、ROS1或ALK。
15. 权利要求1至14中任一项所述的方法,其中所述核酸模板是双链DNA模板。
16. 权利要求15所述的方法,其中通过RNA聚合酶酶促产生合成RNA,所述RNA聚合酶转录所述RNA聚合酶启动子序列下游的DNA。
17. 权利要求1至16中任一项所述的方法,其中所述第一寡核苷酸或第二寡核苷酸包含另外的非互补序列。
18. 权利要求17所述的方法,其中所述另外的非互补序列包含条形码序列、索引序列、接头序列或测序引物杂交序列中的至少一种。
19. 权利要求1至18中任一项所述的方法,其中所述第一寡核苷酸或第二寡核苷酸包含

所述RNA聚合酶启动子序列。

20. 权利要求1至19中任一项所述的方法,其中所述第一寡核苷酸或第二寡核苷酸的延伸为反转录。

21. 权利要求20所述的方法,其中所述反转录合成第一DNA链,所述第一DNA链是与合成RNA互补的,导致在所述第一DNA链与所述合成RNA之间形成RNA-DNA杂交体。

22. 权利要求1至21中任一项所述的方法,其中所述等温扩增反应包括RNA-DNA杂交体中RNA部分的降解。

23. 权利要求21或22所述的方法,其中所述第一寡核苷酸或第二寡核苷酸的延伸使得合成与所述第一DNA链互补的第二DNA链,导致形成包含所述第一DNA链和第二DNA链的双链DNA。

24. 权利要求23所述的方法,其中所述RNA聚合酶转录从包含所述第一DNA链和第二DNA链的双链DNA中转录得到合成RNA。

25. 权利要求24所述的方法,其中在每个循环之后纯化经转录合成RNA,并且将经纯化的合成RNA用作后续循环的起始材料。

26. 权利要求1至25中任一项所述的方法,其中所述等温扩增反应在35℃至45℃的温度下进行。

27. 权利要求1至26中任一项所述的方法,其中所述邻接区域包含未知DNA序列。

用于制备核酸的等温方法及相关组合物

[0001] 本申请是申请号为201580016111.4的中国专利申请的分案申请,原申请是2015年1月26日提交的PCT国际申请PCT/US2015/012842于2016年09月23日进入中国国家阶段的申请。

技术领域

[0002] 本申请涉及用于制备核酸的等温方法及相关组合物。

背景技术

[0003] 下一代测序技术近来的进步已经导致研究和临床环境中测序及制备方法的快速增加。高通量能力及高涵盖深度使下一代测序成为分子诊断中有吸引力且有前景的方向。作为全基因组测序的替代,可以探寻(interrogate)基因的特定子集并可以将多个样品合并(例如,多重地)入单个测序运行(例如,流动池泳道(flow cell lane)),因此减低了分析的整体成本。目前的方法仍然限速,并且对改善的方法有所需求。

发明内容

[0004] 本发明的一些方面涉及这样的认识,即用于制备用于测序的核酸的现存方法既是劳动密集的,又经常需要大量的起始材料。还已经认识到,现存方法涉及的步骤(例如连接步骤、末端修复以及多腺苷酸加尾)既冗长又低效,使得这些方法无法用于获取快速且精确的测序结果,而这是分子诊断背景中所需的。在一些实施方案中,本文的方法提供了在等温条件下快速扩增模板核酸,以产生可直接用于标准下一代核酸测序系统的样品,所述系统包括例如高通量基于流动池的测序系统。在一些实施方案中,本发明的一些方面涉及用于制备核酸的方法,该方法包括在等温条件下指数扩增核酸以用于测序。因此,在一些实施方案中,本文所提供的方法是有优势的,因为其利用了等温反应条件,规避了对专门的温度循环机器的需求。在一些实施方案中,本文所提供的方法是有优势的,因为可以使用RNA和/或DNA作为起始材料利用所述方法。因此,在一些实施方案中,可以使用提取自多种不同类型的样品(例如,血液以及其他组织样品,包括获取自病理学分析的样品)的核酸利用所述方法,从而使得能够对通常组织样品进行平行诊断测试。

[0005] 在一些实施方案中,已经认识到传统的制备方法经常不仅依赖于温度循环(例如,如用PCR),而且依赖于不变的、已知的序列,以设计靶区域侧翼的扩增引物。在一些实施方案中,这限制了使用现存方法所捕获到的遗传事件的类型,使得检测由超突变、基因重排或者与未知遗传伴侣融合所导致的核酸变体成为挑战。因此,在一些实施方案中,本文所提供的方法可用于制备用于以检测大范围基因变体、重排或多态性为目的之测序的核酸。例如,在一些实施方案中所提供的方法对于扩增核酸模板是有优势的,所述核酸模板包含与未知序列融合的已知靶序列,以达到鉴定未知序列的目的。因此,在一些实施方案中,本文所提供的方法可用于制备由基因重排导致的核酸融合。在一些实施方案中,所述融合为已进行了染色体重排的基因中所编码的mRNA融合。在一些实施方案中,所述融合为含有由于染色

体重排而已经融合在一起的两个基因座的染色体区段。因此,在一些实施方案中,本文所提供的制备方法可用于以对核酸进行测序为目的而扩增核酸库以检测基因组重排或融合。在一些实施方案中,本文所提供的方法可以用于检测基因组重排或融合,该方法使用测序作为标准病理学测定(例如,荧光原位杂交测定)的补充诊断测试。在一些实施方案中,本文所提供的制备方法可用于新式基因组装(例如鸟枪法测序)。在这样的实施方案中,具有杂交序列的寡核苷酸可以用于扩增含有基因组组装片段之间(例如,重叠群之间)连接的核酸。因此,在一些实施方案中,制备方法可以用于通过扩增含有基因组组装片段之间连接的核酸来确认基因组组装预期的正确性,从而确定该片段任一侧的实际序列,并确认该实际序列是否符合基因组组装预期。

[0006] 本发明的一些方面涉及制备用于分析的核酸的方法。在一些实施方案中,所述方法包括(a)由核酸模板产生合成RNA;(b)在等温反应中指数扩增所述合成RNA;以及(c)由所述指数扩增的合成RNA产生cDNA,其中所述cDNA包含至少一条非靶序列。本发明另一些方面涉及确定核酸模板序列的方法。在一些实施方案中,所述方法包括(a)由核酸模板产生合成RNA;(b)在等温反应中,指数扩增所述合成RNA;(c)由所述指数扩增的合成RNA产生cDNA;以及(d)对所述cDNA进行测序。在某些实施方案中,重复步骤(b)的指数扩增。在一些实施方案中,在步骤(b)的每个连续轮(round)后纯化所述扩增的合成RNA,并且将所述纯化的合成RNA用作步骤(b)后续轮的起始材料。在某些实施方案中,重复的步骤(b)的至少两个等温反应包括由寡核苷酸引发(prime)的模板依赖性延伸,所述寡核苷酸具有与所述模板合成RNA或第一DNA链的嵌套序列(nested sequence)互补的杂交序列。

[0007] 在一些实施方案中,所述等温反应包括模板依赖性延伸和RNA聚合酶转录的两个或更多个循环。在某些实施方案中,每个循环中的至少一次模板依赖性延伸为反转录。在一些实施方案中,所述等温反应在35℃至45℃范围的温度下进行。在某些实施方案中,所述等温反应所进行的持续时间为45分钟至90分钟。在一些实施方案中,所述等温反应包括合成第一DNA链的模板依赖性延伸,所述第一DNA链与所述合成RNA互补,从而导致在所述第一DNA链和所述合成RNA之间形成RNA-DNA杂交体。在某些实施方案中,所述等温反应还包括所述RNA-DNA杂交体中所述合成RNA部分的降解。在一些实施方案中,所述降解为酶促介导的降解。在某些实施方案中,所述降解由RNA酶H介导。在一些实施方案中,所述等温反应还包括合成第二DNA链的模板依赖性延伸,所述第二DNA链与所述第一DNA互补,从而导致形成包含所述第一和第二DNA链的双链DNA。在一些实施方案中,所述等温反应还包括RNA聚合酶介导的转录反应,所述转录反应由所述双链DNA转录合成的RNA。

[0008] 在一些实施方案中,重复的步骤(b)的至少两个等温反应包括由寡核苷酸引发的模板依赖性延伸,所述寡核苷酸具有与所述模板合成RNA或第一DNA链互补的杂交序列以及附加的非互补序列。在某些实施方案中,所述附加的非互补序列包含一个或更多个条形码序列(barcode sequence)、索引序列(index sequence)或接头序列(adapter sequence)。

[0009] 在一些实施方案中,所述方法还包括通过使用包含靶特异性杂交序列的寡核苷酸进行至少一次延伸反应产生所述核酸模板;以及使用多个不同的寡核苷酸进行至少一次延伸反应,所述不同的寡核苷酸共有位于不同杂交序列5'的共同序列(common sequence)。

[0010] 在某些实施方案中,所述核酸模板包含靶区域和邻接区域(adjacent region)。在一些实施方案中,所述靶特异性杂交序列与所述靶区域互补,并且其中所述不同杂交序列

的至少一条与所述邻接区域互补。在某些实施方案中,所述靶区域包含第一基因的序列,并且所述邻接区域包含第二基因的序列。在一些实施方案中,所述第一基因为RET、ROS1或ALK。

[0011] 在某些实施方案中,所述核酸模板为包含启动子的双链DNA,其中通过RNA聚合酶酶促产生所述合成RNA,所述RNA聚合酶特异性地与所述启动子结合,并转录所述启动子下游的DNA。在一些实施方案中,所述RNA聚合酶为T3、T7或SP6聚合酶。在某些实施方案中,由从所述核酸模板产生的中间双链DNA转录所述合成RNA,其中所述核酸模板为分离的RNA。在一些实施方案中,所述分离的RNA为信使RNA(message RNA,mRNA)、微RNA(microRNA)、核糖体RNA、转移RNA或非编码RNA。在某些实施方案中,所述mRNA为由包含基因重排的染色体区段编码的融合mRNA。在一些实施方案中,所述核酸模板为包含基因重排部分的染色体区段。在某些实施方案中,所述基因重排为倒位、缺失或易位。在一些实施方案中,所述cDNA包含非模板序列,其充当引发测序反应之测序引物的杂交位点。在某些实施方案中,在多重反应中对所述cDNA进行测序,所述多重反应包括源自不同来源的不同核酸。在一些实施方案中,所述不同来源为从其中获得所述核酸模板的不同对象。在某些实施方案中,所述不同来源为从其中获得所述核酸模板的不同组织。

[0012] 本发明的另一些方面涉及对核酸进行测序的方法。在一些实施方案中,所述方法包括由核酸模板产生合成RNA,所述模板包含靶区域和邻接区域;产生双链核酸,所述双链核酸包含使用所述合成RNA作为模板通过模板依赖性延伸合成的第一链,以及使用所述第一链作为模板通过模板依赖性延伸合成的第二链,其中所述双链核酸代表所述核酸模板的所述靶区域和所述邻接区域;并且使用所述双链核酸进行测序反应,以确定所述靶区域和所述邻接区域的核苷酸序列。在一些实施方案中,所述方法还包括扩增所述合成RNA,以及使用所述扩增的合成RNA作为模板产生所述双链核酸。在一些实施方案中,通过等温扩增来扩增所述合成RNA。在某些实施方案中,通过等温扩增指数扩增所述合成RNA。在一些实施方案中,通过聚合酶链式反应扩增所述合成RNA。

[0013] 在某些实施方案中,所述方法还包括扩增所述双链核酸并且对所述扩增的双链核酸进行测序。在一些实施方案中,产生所述双链核酸的每条链,以使得其含有充当引发测序反应之测序引物的杂交位点的非模板序列。在某些实施方案中,在多重反应中对所述双链核酸进行测序,所述多重反应包括源自不同来源的不同核酸。在一些实施方案中,所述不同核酸包含标识来源的条形码序列。

[0014] 本发明的另一些方面涉及包含可用于本文所公开方法之组分的试剂盒。在一些实施方案中,所述试剂盒包含容纳冻干组合物的容器,所述组合物包含至少一个包含杂交序列和RNA聚合酶启动子序列的寡核苷酸;反转录酶;DNA聚合酶;以及RNA聚合酶。在一些实施方案中,所述组合物还包含RNA酶H。在某些实施方案中,所述反转录酶选自:AMV反转录酶、RSV反转录酶、HIV-1反转录酶和HIV-2反转录酶。在一些实施方案中,所述DNA聚合酶选自:Taq聚合酶、Pheonix Taq聚合酶、Phusion聚合酶、T4聚合酶、T7聚合酶、Klenow片段、Klenow exo-、phi29聚合酶、VeraSeq ULtra聚合酶和EnzScript。在某些实施方案中,所述RNA聚合酶选自:T3聚合酶、T7聚合酶和SP6聚合酶。在一些实施方案中,所述至少一个寡核苷酸还包含至少一个条形码序列、索引序列和接头序列。在某些实施方案中,所述容器为多室筒(multichamber cartridge)的室。

附图说明

[0015] 图1A-G描绘了以RNA作为模板开始的用于靶核酸序列等温扩增的工作流程的非限制实例,该靶核酸序列侧翼为3' 未知融合伴侣。

[0016] 图2A-E示出以RNA作为模板开始的用于靶核酸序列等温扩增的工作流程的非限制实例,该靶核酸序列侧翼为5' 未知序列。

[0017] 图3A-D描绘了使用DNA作为模板的用于靶核酸序列等温扩增的工作流程的非限制实例。

[0018] 图4A-E描绘了以RNA作为模板开始的用于靶核酸序列等温扩增的工作流程的非限制实例,该靶核酸序列侧翼为5' 或3' 未知序列。

具体实施方式

[0019] 本文的方法使得能够快速制备模板核酸,以产生可直接用于标准核酸测序系统的样品,该系统包括例如高通量基于流动池的测序系统。在一些实施方案中,提供了制备方法,该方法包括在等温条件下指数扩增核酸以用于测序。因此,在一些实施方案中,本文所提供的方法是有优势的,因为其利用了等温反应条件,规避了对专门的温度循环机器的需求。在一些实施方案中,提供了用于制备用于测序的核酸的方法,所述方法包括在等温条件下交替进行的模板依赖性延伸和RNA转录反应,从而指数扩增模板核酸。此外,在一些实施方案中,本文所公开的制备方法可在约2小时至5小时内产生扩增的核酸以用于测序,从而使得通过测序的相对快速分子诊断测试成为可能。此外,本文提供的方法使得在通常组织样品上进行平行测试(例如,通过测序和基于图像的分析)成为可能。例如,在一些实施方案中,本文公开的用于制备核酸的方法适合用于从获得的用于病理学分析的生物样品(例如福尔马林固定的组织切片、血液以及其他组织)提取核酸。

[0020] 应理解的是本文提供的方法具有许多应用,包括而不限于,制备用于部分或完全核苷酸测序的核酸。在一些实施方案中,本文提供的方法是有优势的,因为可以使用大量的不同核酸作为起始材料(包括RNA或DNA)利用所述方法。在一些实施方案中,本文公开的方法包括制备代表存在于基因组中的染色体区段的核酸,包括哺乳动物基因组,并且更具体为人基因组。使用本文公开的方法制备的核酸可以包括基因组的子集(subset)(如外显子或外显子组)、转录物组或其子集,或其他获自细胞的DNA或RNA。

[0021] 在一些实施方案中,本文公开的方法包括制备核酸,其目的为通过测序确定在样品中的核酸是否存在。该方法可用于,例如诊断以及法庭的应用。在一些实施方案中,本文公开的方法包括制备核酸,其目的为确定核酸序列中是否包含突变或变体,例如,等位基因变体,包括单核苷酸多态性、基因重排、拷贝数量的变化等。在一些实施方案中,本文公开的方法包括制备核酸,其目的为确定样品中存在基因修饰的生物体或基因工程化的核酸。

[0022] 在一些实施方案中,本文公开的方法可用于从任何合适的样品(例如,食物样品、环境样品、生物样品(例如,血样等))制备核酸,其目的为对存在于样品中的核酸进行检测和/或测序。在一些实施方案中,可以制备核酸以促进基于序列之对样品中的病原体、感染性物质或生物体的检测。术语“食物样品”指任何可食用的液体、半固体、固体以及干材料,包括例如肉和肉制品、奶和基于奶的产品、蛋和基于蛋的产品、烘焙类产品、糖果、蔬菜、水果以及包括饮用水的饮料、等。环境样品包括地表水、地下水、海洋水的样品、土壤样品以及

大气样品等。术语“生物样品”包括任何细胞、组织、生物学流体、器官或其部分。生物样品可以体外获自或来自例如细胞或组织培养物。或者，生物样品可以获自或来自生物体。例如，包括血液、痰、尿液、组织活检物（例如肿瘤组织活检物）以及其他在临床实验室中通常测试的样品。术语生物样品也包括已被处理以用于分析的样品，例如固定的组织切片。

[0023] 在一些实施方案中，本文公开的方法包括制备核酸，其目的为通过测序或其他检测方法确定是否有已知的核酸已经发生突变从而导致疾病（例如癌症）。在一些实施方案中，本文公开的方法包括制备核酸，其目的为通过对核酸进行测序确定在对象中是否存在具体的病症。所述病症可以为例如：癌症、非癌的病症，如神经退行性病症，或感染。在一些实施方案中，本文公开的方法包括制备核酸，其目的为评估两种材料之间存在的基因区别，例如，正常组织与患病组织之间。在一些实施方案中，本文公开的方法包括制备核酸，其目的为通过测序或其他方法确定个体的携带状态(carrier status)。在一些实施方案中，本文公开的方法包括从产前样品中制备核酸，其目的为产前基因测试。本文公开的方法可用于制备样品以通过测序确定微生物中的抗生素抗性 or 涉及病毒时的免疫或抗病毒抗性的潜在原因。

[0024] 此外，在该方法的某些实施方案中，可以平行地进行多个反应，其目的为处理或评估来自多个来源（例如，多个患者样品）的多个核酸和/或样品。例如，可以对每个样品评估10-25、15-50、25-75、50-100、75-200、100-500、200-500、200-1000、500-1500、1000-2500、2500-5000或更多个核酸（例如，不同的基因座，例如，不同的融合断裂点多态性）。应当理解的是，在单个反应室或分开的反应室中可以进行多个反应。此外，来自多个不同来源的样品可以平行处理。例如，1-25、25-50、50-100、100-500、500-1000、1000-2500、2500-5000或更多或中间数目的来源可以平行处理。

[0025] 应当理解的是，本文公开的方法可以是自动化的和/或可以包括机器人技术的使用，以用于进行反应或在反应之间转移材料。例如，在自动化的实施中，使用本文公开的制备方法制备的核酸可被转移至测序平台，以使用机器人技术或其他自动化组件进行测序。另外，从测序系统的检测器或传感器获取的测序数据可被输入电脑、移动设备，和/或在屏幕上显示，以使得使用者可以远程监测测序反应的进程或获取并分析从测序反应得到的信息。

[0026] 在一些实施方案中，通过核酸测序分析通过本文公开的方法制备的核酸。在一些实施方案中，所述核酸测序为下一代测序方法。在一些实施方案中，所述下一代测序方法为通过可用于Illumina下一代测序机的合成方法的测序，其中待测序的扩增DNA之侧翼的接头序列包含用于该方法的合适序列。在一些实施方案中，所述测序方法使用适用于Ion Torrent测序平台的离子半导体，其中待测序的扩增DNA之侧翼的接头序列包含用于该方法的合适序列。另外的用于核酸分析的测序方法包括但不限于链终止测序（也称为Sanger测序）、通过连接的测序（也称为SOLiD测序）、454焦磷酸测序，以及单分子实时测序（也称为Pacific Biosciences测序）。

[0027] 在一些实施方案中，通过合成的测序（例如，使用Illumina系统）包括使用接头序列(P5、P7)，其与待分析的核酸的任一末端相连，并与在流动池内固定的P5和P7寡核苷酸互补。在一些实施方案中，该方法包括固定的DNA分子的克隆扩增，随后添加荧光标记的核苷酸，其在合成时一个循环一次地并入互补的DNA链中。除了P5和P7接头序列之外，该扩增DNA

也可含有用于与一个或更多个测序寡核苷酸杂交的序列(例如,称为Rd1或Rd2的序列)。

[0028] 在一些实施方案中,离子半导体测序方法(例如,使用Ion Torrent系统)包括有区别的接头序列(A,P1),将其连接于待分析的核酸的任一末端,并允许将该核酸分子连接于球状颗粒。在一些实施方案中,将球状颗粒缀合的核酸通过乳液PCR(emulsion PCR,emPCR)扩增,并加样于用于测序的芯片孔中。该离子半导体测序机基于在DNA链聚合期间检测所释放的质子,所述DNA链与颗粒缀合的模板DNA互补。通过高敏感离子传感器检测每个释放的氢离子。

[0029] 在一些实施方案中,本文提供的方法包括通过扩增靶序列将附加序列与靶核酸连接。在一些实施方案中,寡核苷酸包含用于与模板核酸和附加序列杂交的杂交序列。在一些实施方案中,所述附加序列包含一个或更多个以下非限制实例,包括:标识符序列(例如,条形码)、测序引物杂交序列(例如,Rd1)、接头序列,及其他。在一些实施方案中,接头序列为涉及用下一代测序技术分析的序列。在一些实施方案中,接头序列为用于基于Illumina测序技术的P5(SEQ ID NO:62)和/或P7(SEQ ID NO:63)序列。在一些实施方案中,接头序列为与Ion Torrent测序技术兼容的P1(SEQ ID NO:64)和A(SEQ ID NO:65)。

[0030] 在一些实施方案中,提供的方法用于制备涵盖基因重排事件的核酸,其已经发生于目的基因区域和未知融合伴侣之间。因此,更一般地,本文所提供的方法用于制备及评估具有与邻接区域相邻之靶区域的核酸(例如,其邻接区域待被确定的序列)。在一些情况中,所述靶区域为已知基因(例如,癌基因)的区域,其为产生引起疾病之融合蛋白的基因重排的热点。因此,在一些实施方案中,本文所描述的方法可用于鉴定融合事件的位置以及未知融合伴侣序列二者。在一些实施方案中,本文所提供的方法可用于扩增已发生于已知靶序列3'的基因重排。在一些实施方案中,方法可用于扩增已发生于已知靶基因座5'的基因重排。在另一些实施方案中,该方法可用于鉴定倒位、缺失或易位事件。在一些实施方案中,靶核酸为信使RNA。在一些实施方案中,靶核酸为染色体RNA区段。本文所提供的方法可用于通过分离基因组DNA并扩增包含与这些融合相关的断裂点的基因座,从而在DNA水平制备涵盖这些重排的核酸。在另一些实施方案中,本文所提供的方法可用于通过分离细胞RNA并扩增包含这些重排的基因座所编码的融合mRNA,从而在RNA水平制备涵盖这些重排的核酸。在一些实施方案中,该方法可用于评估与癌症相关的RET、ROS1、FGFR3以及ALK融合。

[0031] 以下表格提供了基因重排的另一一些非限制实例列表,其可以使用本文提供的方法进行探寻。

[0032] 表1:由染色体重排导致的癌基因

[0033]

癌基因	功能/活性	癌症*
AF4/HRX	融合影响 HRX 转录因子/甲基转移酶。HRX 也称为 MLL、ALL1 和 HTRX1	急性白血病
ALK/NPM	易位产生的具有核磷蛋白质 (NPM) 的融合蛋白	大细胞性淋巴瘤
AML1/MTG8	由易位产生的新融合蛋白	急性白血病
BCR/ABL	由 BCR 和 ABL 融合产生的新蛋白质触发非调控的细胞生长	慢性髓性及急性淋巴性白血病
DEK/CAN	融合蛋白	急性髓性白血病
E2A/PBX1	融合蛋白	急性前体 B 细胞白血病
ENL/HRX	由易位 t (11; 19) 产生的融	急性白血病

[0034]

	合蛋白	
ERG/TLS	由 t (16:21) 易位产生的融合蛋白。ERG 蛋白为转录因子。	髓性白血病
EWS/FLI-1	由 t(11:22) 易位产生的融合蛋白	尤因肉瘤
FGFR3-TACC3	融合蛋白	膀胱癌
KIF5B-RET	融合蛋白	NSCLC
LYT-10/C ALPHA1	由与 C ALPHA1 免疫球蛋白基因座相邻之 LYT-10 的 (10; 14) (q24; q32) 易位形成的融合蛋白	
MTG8/AML1	转录阻抑因子与转录因子融合。AML1 也被称为 RUNX1。	急性白血病
MYH11/CBFB	通过由 16 号染色体中的倒位的转录因子融合产生的新蛋白质。	急性髓性白血病
PBX1/E2A	通过 t (1:19) 易位形成的融合蛋白。转录因子。	急性前体 B 细胞白血病
PIST-ROS	由 6q21 上 240 千碱基的染色体纯合子缺失导致	多形性胶质母细胞瘤
RAR/PML	由 t (15:17) 易位导致的融合蛋白。视黄酸受体。	急性早幼粒细胞白血病
REL/NRG	通过 2 号染色体中的缺失形成的融合蛋白。转录因子。	B 细胞淋巴瘤
SET/CAN	通过 9 号染色体的重排形成的融合蛋白。蛋白质定位	急性髓性白血病

[0035] *该列中所列出的癌症类型为与每种癌基因主要相关的那些类型,但此表不是完全列表。

[0036] 在一些实施方案中,所提供的方法用于制备核酸,其具有位于邻接区域(例如,未知序列内容的邻接区域)5' 的靶区域。例如,图1举例说明了用于制备核酸的示例性方法,该核酸具有位于邻接区域5' 的靶区域。在步骤101中,获得起始RNA或将其作为模板分子提供。将RNA模板暴露于多个寡核苷酸,其共有位于不同杂交序列5' 的共同序列。在一些实施方案中,由多个寡核苷酸所共有的共同序列也包含RNA聚合酶启动子序列。在一些实施方案中,

至少一个杂交序列与该RNA模板的区域杂交,并且作用是引发第一反转录酶反应以产生与起始RNA互补的DNA分子。在步骤102中,将该起始RNA模板从杂交的RNA-DNA分子酶促降解(例如,通过RNA酶H)。应当理解的是,如本文所述,虽然在所提供的实施例中使用了RNA酶H,也可使用许多具有RNA酶活性的酶。

[0037] 在步骤103中,存留的DNA分子被一个或更多个靶特异性寡核苷酸接触,以使得靶特异性寡核苷酸与该DNA的区域杂交并延伸以合成互补的DNA链。在一些实施方案中,此反应由Phoenix DNA聚合酶进行。在一些实施方案中,此反应由也具有DNA聚合酶活性的双功能反转录酶(例如,AMV反转录酶)进行。然而,应当理解的是,如本文所描述,可以使用其他合适的聚合酶。在步骤104中,使用在共同序列中包含的RNA聚合酶启动子,RNA聚合酶转录与DNA模板互补的RNA分子。在一些实施方案中,可以将步骤101至步骤104重复多个循环,每个循环以从步骤104产生的互补RNA分子开始,其充当步骤101的模板。转录的RNA可接着在步骤105中纯化。

[0038] 在步骤106中,含有5' 共同序列的纯化RNA随后与一个或更多个靶特异性寡核苷酸接触。靶特异性寡核苷酸#1与互补RNA在靶序列处杂交,并引发模板依赖性反转录酶反应以产生互补的DNA链。在步骤107中,将RNA模板从互补的杂交RNA-DNA分子中由RNA酶H酶促降解(例如通过RNA酶活性)。在步骤108中,存留的DNA分子与寡核苷酸接触,所述寡核苷酸包含编码RNA聚合酶启动子的序列,该序列位于与存在于所述DNA分子3' 末端上的共同序列互补的序列5' 端。所述寡核苷酸在反应中通过DNA聚合酶的活性延伸以产生互补的DNA链。在步骤109中,RNA聚合酶利用该RNA聚合酶启动子转录互补的RNA分子。将步骤106至步骤109重复多个循环,每个循环从步骤109产生的互补的RNA分子开始,所述RNA分子充当步骤106的模板,从而扩增步骤109的RNA。

[0039] 应当理解的是,在一些实施方案中,从106至109的循环数至少部分地受到等温反应持续时间的影 响。此外,在一些实施方案中,当该过程通过步骤109循环时,所产生的DNA模板累积,以使得最后的循环导致RNA分子库相对于起始材料的指数扩增。来自反应109的RNA分子也可在步骤110中纯化,为后续步骤做准备。在一些实施方案中,步骤101至步骤109在单个反应管中连续进行。在一些实施方案中,所有涉及步骤101至步骤109的组分在开始时并贯穿整个反应存在。在一些实施方案中,步骤101至步骤109以等温反应进行。

[0040] 任选地,可以进行扩增的第二个循环,其中在步骤110中纯化的RNA分子与一个或更多个靶特异性寡核苷酸接触。在步骤111中,所述靶特异性寡核苷酸与互补RNA在靶序列处杂交,并引发模板依赖性反转录酶反应,产生互补的DNA链。在步骤112中,将RNA模板从互补的DNA链酶促降解(例如,由RNA酶H)。在步骤113中,存留的DNA分子与寡核苷酸接触,所述寡核苷酸包含编码RNA聚合酶启动子的序列,该序列位于与存在于所述DNA分子3' 末端上的共同序列互补的序列5' 端。该寡核苷酸通过DNA聚合酶的活性延伸以产生互补的DNA链。在步骤114中,RNA聚合酶利用所述RNA聚合酶启动子以转录互补的RNA分子。将步骤111至步骤114重复多个循环,每个循环从步骤114产生的互补的RNA分子开始,其充当步骤111的模板。来自步骤114的RNA分子也可在步骤115中纯化,为后续步骤做准备。在一些实施方案中,如果需要,也可进行另外的扩增循环。

[0041] 在步骤116中,纯化的RNA与一个或更多个靶特异性寡核苷酸#2接触,所述寡核苷酸包含靶特异性序列和位于所述靶特异性序列5' 的附加序列,所述附加序列可包含共同序

列、条形码、索引或接头序列。所述靶特异性寡核苷酸与互补RNA在靶序列处杂交,并引发反转录酶反应,产生互补的DNA链,其也包含由靶特异性寡核苷酸#2提供的5'附加序列。在一些实施方案中,靶特异性寡核苷酸#1与靶特异性寡核苷酸#2包含有区别的序列。在一些实施方案中,靶特异性寡核苷酸#2的序列存在于模板DNA分子3'内/靶特异性寡核苷酸#1序列下游,以使得反应嵌套。

[0042] 在步骤117中,将RNA模板链酶促降解(例如通过RNA酶H)。在步骤118中,存留的DNA分子与寡核苷酸接触,所述寡核苷酸包含与存在于所述DNA分子3'末端上的共同序列互补的序列以及附加序列,所述附加序列可包含任何一个或更多个序列,其包括条形码、索引和接头序列。所述寡核苷酸杂交并延伸以产生互补的DNA链。所得的DNA分子是双链的,并且包含靶序列及其邻接序列,其侧翼为附加序列,所述附加序列包含用于合适的测序平台的接头序列。在反应119中将产物纯化并准备用于分析。任选地,在步骤118的寡核苷酸上提供的附加序列可包含位于互补的共同序列5'的RNA聚合酶启动子。在此情况下,在步骤118的延伸反应之后,在步骤120中,RNA聚合酶利用所述RNA聚合酶启动子以转录互补的RNA分子。将步骤116至步骤118重复多个循环,每个循环从步骤118产生的互补的RNA分子开始,其充当步骤116的模板。来自步骤120的RNA分子也可在步骤121中纯化,为后续步骤做准备。

[0043] 可以进行另外的扩增循环以在核酸的一端或两端添加附加序列。在步骤122中,具有与RNA分子3'末端互补的序列的寡核苷酸与该RNA杂交,并引发模板依赖性反转录酶反应,产生互补的DNA链。在一些实施方案中,步骤122的寡核苷酸包含附加序列。在一些实施方案中,所述附加序列包含条形码、索引和/或接头序列。在步骤123中,将RNA模板从互补DNA链酶促降解(例如,通过RNA酶H)。在步骤124中,存留的DNA分子与寡核苷酸接触,所述寡核苷酸包含与存在于所述DNA分子3'末端上的共同序列互补的序列以及附加序列,所述附加序列可包含任何一个或更多个序列,其包括条形码、索引和接头序列。在一些实施方案中,所述寡核苷酸杂交并延伸以产生互补的DNA链,其在步骤125中纯化。在一些实施方案中,所得的DNA分子为双链的,并且包含靶序列及其邻接区域,其侧翼为附加序列,所述附加序列包含用于合适的测序平台的接头序列。

[0044] 在一些实施方案中,提供的方法用于制备核酸,所述核酸具有位于邻接区域(例如,未知序列内容的邻接区域)3'的靶区域。例如,图2举例说明了用于制备具有位于邻接区域3'之靶区域的核酸的示例性方法。获取起始RNA或将其作为模板分子提供。在步骤201中,该RNA模板暴露于一个或更多个靶特异性寡核苷酸,指的是靶特异性寡核苷酸#1,其与起始RNA的靶区域互补。靶特异性寡核苷酸#1杂交并引发第一反转录酶反应以产生与起始RNA互补的DNA分子。在步骤202中,将所述起始RNA模板从互补的杂交RNA-DNA分子酶促降解(例如,通过RNA酶H)。在步骤203中,存留的DNA分子与多个寡核苷酸接触,所述寡核苷酸共有位于不同杂交序列5'的共同序列(例如,随机或伪随机序列、不同的预定序列组等)。在一些实施方案中,被多个寡核苷酸共有的共同序列还含有RNA聚合酶启动子序列。在一些实施方案中,至少一个杂交序列与DNA的区域杂交并延伸以合成第二互补DNA链。在步骤204中,使用RNA聚合酶启动子序列,RNA聚合酶转录与DNA模板互补的RNA分子。该经转录的RNA接着在步骤205中纯化。

[0045] 在步骤206中,含有5'共同序列的纯化的RNA随后与一个或更多个靶特异性寡核苷酸#1接触。靶特异性寡核苷酸与互补RNA在靶序列处杂交并引发模板依赖性反转录酶反应,

产生互补的DNA链。在反应207中,将该RNA模板从互补的杂交RNA-DNA分子酶促降解(例如, RNA酶H活性)。在步骤208中,存留的DNA分子与寡核苷酸接触,所述寡核苷酸包含编码RNA聚合酶启动子的序列,所述启动子序列位于与存在于所述DNA分子3'末端上的共同序列互补的序列5'端。所述寡核苷酸延伸以产生互补的DNA链。在步骤209中, RNA聚合酶利用所述RNA聚合酶启动子转录互补的RNA分子。将步骤206至步骤209重复多个循环,每个循环从步骤209产生的互补的RNA分子开始,其充当步骤206的模板。来自反应209的RNA分子也可在步骤210中纯化,为后续步骤做准备。在一些实施方案中,步骤201至步骤209在单个反应管中连续进行。在一些实施方案中,步骤201至步骤209以等温反应进行。

[0046] 任选地,可以进行扩增的第二个循环,其中在步骤210中纯化的RNA分子与一个或更多个靶特异性寡核苷酸#2接触。在一些实施方案中,一个或更多个靶特异性寡核苷酸的使用增添了特异性,并且还富集了包含靶序列的核酸。在步骤211中,该靶特异性寡核苷酸#2与互补RNA在靶序列处杂交,并引发模板依赖性反转录酶反应,产生互补的DNA链。在步骤212中,将RNA模板酶促降解(例如, RNA酶H)。在步骤213中,存留的DNA分子与寡核苷酸接触,所述寡核苷酸包含编码RNA聚合酶启动子的序列,所述启动子序列位于与存在于所述DNA分子3'末端上的共同序列互补的序列5'端。所述寡核苷酸通过DNA聚合酶的活性延伸以产生互补的DNA链。在一些实施方案中, DNA活性由双功能酶(例如, AMV反转录酶)提供。在步骤214中, RNA聚合酶转录互补的RNA分子。将步骤211至步骤214重复多个循环,每个循环从步骤214产生的互补的RNA分子开始,其充当步骤211的模板。步骤214产生的RNA分子也可在步骤215中纯化。在一些实施方案中,如果需要,也可进行另外的扩增循环。

[0047] 在步骤216中,纯化的RNA与一个或更多个靶特异性寡核苷酸#2接触,所述寡核苷酸包含靶特异性序列及5'附加序列,所述附加序列可包含共同区域、条形码、索引和/或接头序列。然而,应当理解的是,在该过程中可以使用相似的方法将附加序列在其他点处并入。所述靶特异性寡核苷酸与互补RNA在靶序列处杂交,并引发反转录酶反应,产生互补的DNA链,所述DNA链也包含由靶特异性寡核苷酸#2提供的5'附加序列。在一些实施方案中,靶特异性寡核苷酸#1与靶特异性寡核苷酸#2包含有区别的序列。在一些实施方案中,靶特异性寡核苷酸#2的序列存在于模板DNA分子3'内/靶特异性寡核苷酸#1序列下游,以使得反应嵌套进行。

[0048] 在步骤217中,将RNA模板酶促降解(例如RNA酶H)。在反应218中,存留的DNA分子与寡核苷酸接触,所述寡核苷酸包含与存在于所述DNA分子3'末端上的共同序列互补的序列以及附加序列,所述附加序列可包含条形码、索引和/或接头序列。所述寡核苷酸杂交并延伸以产生互补的DNA链。所得的DNA分子是双链的,并且包含靶序列及其邻接序列,其侧翼为附加序列,所述附加序列包含用于合适的测序平台的接头序列。在步骤219中将产物纯化并准备用于分析。

[0049] 在一些实施方案中,图1和图2中描述的方法也可在相同反应容器(例如,管、筒孔(cartridge well))中平行进行,例如以类似于图4的方式进行。

[0050] 在一些实施方案中,提供的方法用于使用DNA模板制备包含靶基因座和邻接区域的核酸。例如,图3描绘了用于使用DNA模板扩增包含靶基因座和邻接区域的核酸的示例性方法。获取起始DNA或将其作为模板分子提供。在步骤301中,该DNA分解成片段(例如,具有适合长度以用于测序的片段,例如,片段长度范围为100-600、100-1000、100-1500或更多碱

基对)。在步骤302中,片段化DNA的末端被修复,并且将末端磷酸基团添加于每个5'末端。在步骤302中,还通过末端转移酶的活性在每个3'末端产生单个腺苷突出端。使用该末端磷酸基团和腺苷突出端,在步骤303中将双接头连接于DNA片段的任一末端上。在一些实施方案中,该接头分子可包含共同序列。在一些实施方案中,该接头分子还包含RNA聚合酶启动子序列,以使得连接反应产生在两端侧翼为共同序列和RNA聚合酶启动子序列的双链DNA分子。

[0051] 在一些实施方案中,寡核苷酸(例如,充当接头分子的寡核苷酸)可包含一个或更多个修饰以加强其稳定性和/或并入该寡核苷酸的反应产物的稳定性。这样的修饰的非限制实例包括碱基修饰和骨架修饰。在一些实施方案中,磷硫酰键的存在或其他在3'胸腺嘧啶突出端中的骨架修饰阻止了3'核酸外切酶将寡核苷酸平末端化的活性。在一些实施方案中,寡核苷酸接头分子的底链(bottom stand)可具有反向的脱氧胸腺嘧啶,其阻止了PCR/AMP在后续步骤中产生非基因特异性的产物。

[0052] 在步骤304中,RNA聚合酶使用侧翼RNA聚合酶启动子序列的一个或两个转录,以在一个或两个方向都产生互补的RNA分子。在一些实施方案中,RNA从DNA分子的正链和负链两者合成。在一些实施方案中,从这两条链合成是有优势的,因为可以使用靶特异性寡核苷酸,根据合成RNA分子所来源的链沿着单个DNA链在5'或3'方向延伸,从而延伸所合成的RNA。因此,在一些实施方案中,从模板分子的正链和负链两者产生RNA促进了在靶序列任意方向上邻接的未知序列的扩增及鉴定。

[0053] 在步骤305中,将该RNA分子与包含与RNA分子上的共同序列互补之序列的寡核苷酸接触。在一些实施方案中,所述寡核苷酸还包含RNA聚合酶启动子序列。在步骤305中,所述寡核苷酸杂交并引发反转录酶反应,产生互补的DNA分子。在步骤306中,将该RNA模板从互补的杂交RNA-DNA分子酶促降解(例如,RNA酶H)。在步骤307中,存留的DNA分子与一个或更多个靶特异性寡核苷酸接触。在一些实施方案中,所述靶特异性寡核苷酸包含附加序列,所述附加序列可包含条形码、索引和/或接头序列。所述靶特异性寡核苷酸与DNA的靶区域杂交并延伸,产生互补的DNA链。在步骤308中,RNA聚合酶转录与DNA模板互补的RNA分子。将步骤305至步骤308重复多个循环,每个循环从步骤308产生的互补的RNA分子开始,其充当步骤305的模板。来自步骤308的RNA分子也可在步骤309中纯化,为后续步骤做准备。在一些实施方案中,步骤301至步骤309在单个反应管中连续进行。在一些实施方案中,步骤301至步骤309以等温反应进行。

[0054] 在步骤310中,纯化的RNA分子与一个或更多个靶特异性寡核苷酸#2接触。在一些实施方案中,所述靶特异性寡核苷酸包含附加序列,所述附加序列包含条形码、索引和接头序列。所述靶特异性寡核苷酸#2杂交,并引发反转录酶反应,产生互补的DNA分子。在一些实施方案中,靶特异性寡核苷酸#1与靶特异性寡核苷酸#2包含相同的序列。在一些实施方案中,靶特异性寡核苷酸#1与靶特异性寡核苷酸#2包含不同的序列。在一些实施方案中,靶特异性寡核苷酸#2的序列存在于模板DNA分子3'内/靶特异性寡核苷酸#1序列下游,以使得反应嵌套进行。

[0055] 由步骤310所得到的DNA分子可包含在靶特异性寡核苷酸#2上提供的附加序列。在步骤311中,将RNA模板酶促降解(例如RNA酶H)。存留的DNA分子与寡核苷酸接触,所述寡核苷酸包含与存在于所述DNA分子3'末端上的共同序列互补的序列。在一些实施方案中,所述

寡核苷酸包含任何一个或更多个附加序列,所述附加序列包含条形码、索引和接头序列。在步骤312中,所述寡核苷酸与DNA分子的共同序列杂交并延伸以产生互补的DNA链。步骤312的DNA产物是双链的,并且包含靶区域和邻接区域,其侧翼为附加序列,所述附加序列包含用于合适的测序平台的接头序列。在步骤313中将产物纯化并准备用于分析。

[0056] 在一些实施方案中,提供的方法用于制备核酸,所述核酸具有在其5' 和/或3' 端上侧翼为邻接区域(例如,未知序列内容的邻接区域)的靶区域。例如,图4举例说明了用于制备具有靶区域以及5' 和/或3' 邻接区域的核酸的示例性方法。在步骤401中,获取起始RNA或将其作为模板分子提供。将RNA模板暴露于多个寡核苷酸,所述寡核苷酸共有位于不同杂交序列5' 的共同序列(共同序列#1)。在一些实施方案中,由多个寡核苷酸所共有的共同序列也包含RNA聚合酶启动子序列。在一些实施方案中,至少一个杂交序列与该RNA模板的区域杂交,并且作用为引发第一反转录酶反应以产生与起始RNA互补的DNA分子。在步骤402中,将该起始RNA模板从杂交的RNA-DNA分子酶促降解(例如,通过RNA酶H)。应当理解的是,如本文所述,虽然在所提供的实例中使用了RNA酶H,也可使用许多具有RNA酶活性的酶。

[0057] 在步骤403中,存留的DNA分子与多个寡核苷酸接触,所述寡核苷酸共有位于不同杂交序列5' 的共同序列(例如,随机或伪随机序列、不同的预定序列组等)。在一些实施方案中,多个寡核苷酸共有的共同序列也包含RNA聚合酶启动子序列。在一些实施方案中,至少一个杂交序列与DNA的区域杂交并延伸以合成第二互补DNA链。在步骤404中,RNA聚合酶使用RNA聚合酶启动子序列转录与DNA模板互补的RNA分子。在一些实施方案中,RNA聚合酶启动子存在于DNA模板的两端上。在一些实施方案中,这两个RNA聚合酶启动子都可被RNA聚合酶利用以产生互补RNA的两条链。该经转录的RNA接着在步骤405中纯化。

[0058] 在步骤406中,合成自一条或两条模板链的经纯化RNA与一个或更多个靶特异性寡核苷酸#1接触。靶特异性寡核苷酸与互补RNA在靶序列处(例如,在共同序列处)杂交并引发模板依赖性反转录酶反应,产生互补的DNA链。在反应407中,将该RNA模板从互补的杂交RNA-DNA分子酶促降解(例如,RNA酶H活性)。在步骤408中,存留的DNA分子与寡核苷酸接触,所述寡核苷酸包含编码RNA聚合酶启动子的序列,其位于与存在于所述DNA分子3' 末端上的共同序列互补的序列5' 端。所述寡核苷酸延伸以产生互补的DNA链。在步骤409中,RNA聚合酶利用所述RNA聚合酶启动子转录互补的RNA分子。将步骤406至步骤409重复多个循环,每个循环从步骤409产生的互补的RNA分子开始,其充当步骤406的模板。来自反应409的RNA分子也可在步骤410中纯化,为后续步骤做准备。在一些实施方案中,步骤401至步骤409在单个反应管中连续进行。在一些实施方案中,步骤401至步骤409以等温反应进行。

[0059] 在步骤411中,纯化的RNA与一个或更多个靶特异性寡核苷酸接触,所述寡核苷酸包含位于靶特异性序列5' 的附加序列。在一些实施方案中,附加序列包括但不限于条形码、索引和/或接头序列。所述靶特异性寡核苷酸与互补RNA在靶序列处杂交,并引发模板依赖性反转录酶反应,产生互补的DNA链。在反应412中,将该RNA模板从互补的杂交RNA-DNA分子酶促降解(例如,RNA酶H活性)。在步骤413中,存留的DNA分子与寡核苷酸接触,所述寡核苷酸包含与存在于所述DNA分子3' 末端上的共同序列互补的序列。在一些实施方案中,步骤413的寡核苷酸包含附加序列,所述附加序列包括但不限于条形码、索引和/或接头序列。所述寡核苷酸延伸以产生互补的DNA链,其在步骤414中被纯化。在一些实施方案中,所得的DNA分子是双链的,并且包含靶序列及其邻接区域,其侧翼为附加序列,所述附加序列包含

用于合适的测序平台(例如,Illumina平台、Ion Torrent平台,等)的接头序列。

[0060] 如本文所使用的,术语“核酸”指包含通过核苷酸间键共价连接在一起的多个核苷酸的聚合分子。在一些实施方案中,核酸为通过核苷酸间键共价连接在一起的多个核糖核苷酸形成的核糖核酸(ribonucleic acid, RNA)。在一些实施方案中,核酸为通过核苷酸间键共价连接在一起的多个脱氧核糖核苷酸形成的脱氧核糖核酸(deoxyribonucleic acid, DNA)。在一些实施方案中,核酸包括一个或更多个核苷酸类似物(例如桥联的核苷酸)或经修饰的核苷酸,包括有标签的或被标记的核苷酸。在一些实施方案中,核酸仅包括天然存在的核苷酸。在一些实施方案中,核酸仅包括非天然存在的核苷酸。在一些实施方案中,核酸包括天然存在的核苷酸与非天然存在的核苷酸的组合。在一些实施方案中,核酸为单链。在一些实施方案中,核酸为双链。在一些实施方案中,核酸具有单链及双链区域的组合。术语核酸还涵盖具有核糖核苷酸、脱氧核糖核苷酸、核苷酸类似物(如桥联的核苷酸)和/或经修饰的核苷酸(包括有标签的或被标记的核苷酸)之混合物的杂交分子。在一些方面,对核酸的破坏可有利于产生更小的核酸片段。在一些实施方案中,通过以下任何方式进行破坏:超声(即,流体动力学剪切)、声学剪切、针头剪切(needle shearing)、弗氏压碎器(French pressure cell),或酶促(例如,限制性)消化。如本文所使用的术语“启动子”指通过RNA聚合酶开始核酸模板转录的核酸区域。

[0061] 如本文所使用的,术语“寡核苷酸”指短核酸。在一些实施方案中,寡核苷酸长度为2至250个核苷酸、长度为2至100个核苷酸、长度为10至100个核苷酸、长度为10至50个核苷酸、或长度为10至30个核苷酸。在一些实施方案中,寡核苷酸长度达2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、150、200或250个核苷酸。在一些实施方案中,寡核苷酸为单链。在一些实施方案中,寡核苷酸为双链。在一些实施方案中,寡核苷酸包含杂交序列,其通过与至少部分的靶核酸形成互补碱基对与靶核酸杂交。

[0062] 在一些实施方案中,寡核苷酸具有能够引发延伸反应的3'末端。在一些实施方案中,杂交序列长度可以为6至50个核苷酸、长度为6至35个核苷酸、长度为6至20个核苷酸、长度为10至25个核苷酸。在合适的温度及溶液离子强度条件下,当单链形式的核酸分子或其杂交序列可退火于其他核酸分子时,寡核苷酸能够与另一核酸“杂交”,如cDNA、基因组DNA或RNA。当两个核酸包含足够的互补序列时发生杂交,并且依赖于杂交的严格性,碱基之间的错配是可能的。在一些实施方案中,核酸杂交的合适的严格性依赖于核酸的长度以及互补程度、GC含量,以及其他参数。在一些实施方案中,两个核苷酸序列之间的相似性或同源性程度越大,则具有那些序列的核酸的杂交体的 T_m 值就越大。核酸杂交的相对稳定性(对应于更高的 T_m)按如下顺序降低:RNA:RNA、DNA:RNA、DNA:DNA。术语“互补”描述了能够彼此杂交的核苷酸碱基之间的关系。例如,对于DNA而言,腺苷与胸腺嘧啶互补,而胞嘧啶与鸟嘌呤互补。

[0063] 在一些实施方案中,寡核苷酸中的GC含量约为20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%或更高。在一些实施方案中,寡核苷酸中的GC含量的范围为20%至80%、20%至70%、35%至65%、40%至60%、或45%至55%。在一些实施方案中,寡核苷酸在3'末端上包含多个(例如,2-3、2-4、2-5个或更多个)鸟嘌呤或胞嘧啶核苷

酸(例如,GC夹)。

[0064] 在一些实施方案中,本文所公开的寡核苷酸包含一个或更多个经修饰的核苷酸。在一些实施方案中,修饰寡核苷酸的5'和/或3'末端。在一些实施方案中,修饰一个或更多个内部的核苷酸。寡核苷酸可以在碱基部分、糖部分或磷酸骨架上进行修饰,以例如改善该分子的稳定性、对核酸酶介导的降解的抗性、其杂交参数等。在一些实施方案中,寡核苷酸可以包含的经修饰碱基部分选自:5-氟尿嘧啶、5-溴尿嘧啶、5-氯尿嘧啶、5-碘尿嘧啶、次黄嘌呤、黄嘌呤、4-乙酰胞嘧啶、5-(羧基羟基甲基)尿嘧啶、5-羧甲基氨基甲基-2-硫代尿苷、5-羧甲基氨基甲基尿嘧啶、二氢尿嘧啶、 β -D-半乳糖基Q核苷(beta-D-galactosylqueosine)、肌苷、N6-异戊烯腺嘌呤、1-甲基鸟嘌呤、1-甲基肌苷、2,2-二甲基鸟嘌呤、2-甲基腺嘌呤、2-甲基鸟嘌呤、3-甲基胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、N6-腺嘌呤、7-甲基鸟嘌呤、5-甲基氨基甲基尿嘧啶、5-甲氧基氨基甲基-2-硫尿嘧啶、 β -D-甘露糖基Q核苷、5'-甲氧基羧基甲基尿嘧啶、5-甲氧基尿嘧啶、2-甲硫基-N6-异戊烯腺嘌呤、怀丁氧苷(wybutoxosine)、假尿嘧啶、Q核苷、2-硫胞嘧啶、5-甲基-2-硫尿嘧啶、2-硫尿嘧啶、4-硫尿嘧啶、5-甲基尿嘧啶、尿嘧啶-5-氧基乙酸甲酯、尿嘧啶-5-氧基乙酸,以及2,6-二氨基嘌呤。另外修饰的实例包括甲基化、加“帽”、一个或更多天然存在的核苷酸替换为类似物,以及核苷酸间修饰,例如具有无电荷的连接(例如,膦酸甲基酯、磷酸三酯、氨基磷酸酯、氨基甲酸酯等)和具有带电荷的连接(硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯等)的那些、及其组合。此外,在一些实施方案中本文的寡核苷酸也可用能够提供直接或非直接的可检测信号的标记修饰。示例性的标记包括放射性同位素、荧光分子、生物素等。在一些实施方案中,本文公开的寡核苷酸包含5'生物素连接基团(linker)或其他合适的连接基团。在一些实施方案中,寡核苷酸包含限制性消化序列,以使得以合适的限制性消化酶进行的切割导致去除该连接基团。在另一些实施方案中,寡核苷酸的5'末端包含核酸序列,其与结合于珠或其他支持物(例如,流动池基底)的核酸互补。

[0065] 在一些实施方案中,其中多个寡核苷酸组合于共同反应中,设计寡核苷酸以最小化或防止同源或异源多聚体(例如,同源或异源二聚体)的形成。

[0066] 在一些实施方案中,寡核苷酸包含与核酸的靶序列互补的杂交序列,其中所述靶序列在距离核酸的已知序列与邻接序列之间的连接的预定距离内。在一些实施方案中,所述连接为基因组组装中片段之间的连接。在一些实施方案中,所述连接为导致两个核酸之间融合的断裂点(例如,由基因组重排导致的断裂点)。在一些实施方案中,靶序列的末端在核酸的已知序列与邻接序列(例如,未知序列)之间的连接的10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、300或更多个核苷酸之内。

[0067] 在一些实施方案中,靶特异性寡核苷酸在本文公开的制备方法中的使用促进了扩增本来难以用相对引物靶向的模板,所述靶特异性寡核苷酸具有与在模板上的不同的靶序列(例如,靶序列#1和靶序列#2)在相同方向或取向上互补的杂交序列。在该实施方案中,使用具有与不同靶序列在相同方向或取向上互补的杂交序列的靶特异性寡核苷酸,提供了与模板已知区域互补的两条杂交序列的特异性益处,而不必利用具有与靶序列在相反方向互补的杂交序列的靶特异性寡核苷酸以覆盖靶区域。因此,在一些实施方案中,使用与靶序列在相同方向或取向上互补的寡核苷酸促进了在通常反应中的跨长模板区域的嵌合(tile)。

[0068] 在一些实施方案中,寡核苷酸(例如,靶寡核苷酸,具有不同杂交序列的寡核苷酸)

也可包含附加的功能性序列。在一些实施方案中,通过使用在其5'末端含有附加序列的寡核苷酸扩增靶序列从而将附加序列并入核酸中。在一些实施方案中,包含共同序列的寡核苷酸也含有附加序列。在一些实施方案中,靶特异性寡核苷酸也含有附加序列。在一些实施方案中,附加序列包含一个或更多个以下非限制实例:标识符序列(例如,条形码,索引)、测序引物杂交序列(例如,Rd1)和接头序列。在一些实施方案中,接头序列为用于下一代测序系统的序列。在一些实施方案中,接头序列为用于基于Illumina测序技术的P5 (SEQ ID NO:62) 和P7 (SEQ ID NO:63) 序列。在一些实施方案中,接头序列为与Ion Torrent测序技术兼容的P1 (SEQ ID NO:64) 和A (SEQ ID NO:65)。

[0069] 如本文所使用的,“条形码”或“索引”序列为充当核酸来源或位置识别符的核苷酸序列。例如,条形码或索引序列可以用于鉴定患者,从其所获得的核酸模板待用于处理和测序。在一些实施方案中,并入DNA片段中的条形码或索引序列使得能够在单个流动池上对多个不同样品进行测序。在一些实施方案中,可使用索引序列以定向序列成像器(sequence imager),其目的在于检测单个测序反应。在一些实施方案中,条形码或索引序列的长度可以为2至25个核苷酸、2至15个核苷酸、2至10个核苷酸、2至6个核苷酸。

[0070] 如本文所使用的,“接头”序列指用于将核酸(例如,扩增的DNA产物)与下一代测序平台或其他物质相连,以用于固定核酸的序列。在一些实施方案中,接头序列包含测序引物杂交序列。在一些实施方案中,接头序列包含用于基于Illumina测序的P5 (SEQ ID NO:62) 和/或P7 (SEQ ID NO:63) 序列。在一些实施方案中,接头序列包含与Ion Torrent测序技术兼容的P1 (SEQ ID NO:64) 和/或A (SEQ ID NO:65) 序列。在一些实施方案中,接头序列的长度可以为4至50个核苷酸、4至30个核苷酸、4至20个核苷酸、15至30个核苷酸。

[0071] 如本文所使用的,术语“扩增”指增加核酸模板拷贝数的过程。在一些实施方案中,扩增包括使用一种或更多种由模板合成核酸的聚合酶。在一些实施方案中,扩增在等温反应下完成。在一些实施方案中,扩增在包括多个温度循环(如在聚合酶链式反应中)的条件下完成。在一些实施方案中,扩增包括一个或更多个模板依赖性延伸,其由在其3'末端与模板杂交的寡核苷酸引发。在一些实施方案中,模板依赖性延伸通过反转录酶进行。在一些实施方案中,模板依赖性延伸通过DNA聚合酶进行。在一些实施方案中,模板依赖性延伸通过还含有DNA聚合酶活性的反转录酶进行。模板依赖性延伸反应可使用任何合适的核酸作为模板来进行。在一些实施方案中,模板依赖性延伸在DNA模板上进行。在一些实施方案中,模板依赖性延伸在RNA模板上进行。在一些实施方案中,扩增包括一个或更多个转录反应。在一些实施方案中,扩增包括一个或更多个模板依赖性延伸与一个或更多个转录反应的组合。在一些实施方案中,扩增导致核酸模板拷贝数的线性增加。在一些实施方案中,在线性扩增中,核酸的一个或更多个拷贝由单独一组的一个或更多个核酸模板产生。在一些实施方案中,扩增导致核酸模板拷贝数的指数增加。在一些实施方案中,在指数扩增中,新形成的核酸拷贝充当用于产生其他模板拷贝的模板,从而导致核酸库的指数扩增。

[0072] 如本文所使用的,术语“模板”指双链或单链核酸,其充当核酸合成的底物,例如用于模板依赖性延伸或转录反应。在双链DNA分子的情况中,其两条链的至少一部分的变性可在核酸合成之前或与其相结合地进行。在一些实施方案中,模板为单链,并且不需要在核酸合成之前或与其相结合地进行变性。在一些实施方案中,当与核酸模板的一部分互补的寡核苷酸通过杂交序列与模板杂交时,合适的聚合酶随后可合成与该模板互补的核酸。在一

些实施方案中, RNA聚合酶可从启动子区合成与模板的反义链互补的核酸。在一些实施方案中, 模板为具有长度达10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、1000、2000、3000或更多个核苷酸的核酸。

[0073] 如本文所使用的, 术语“模板依赖性延伸”指这样的过程, 其中寡核苷酸通过杂交序列在其3'末端与单链核酸模板的互补序列杂交, 所述寡核苷酸通过互补核苷酸与该寡核苷酸3'末端的顺序共价键合酶促延伸, 从而形成与模板互补的新核酸。在一些实施方案中, 模板依赖性延伸产生部分或完全的带有与模板杂交之延伸产物的双链核酸。

[0074] 在一些实施方案中, 延伸反应包括与模板核酸的互补区域杂交的寡核苷酸, 并且作用是引发延伸反应以产生互补DNA链。在一些实施方案中, 由模板合成互补DNA链可通过DNA聚合酶进行。在一些实施方案中, 在酶进行模板依赖性延伸的条件下使用DNA聚合酶I。也能够执行该功能的DNA聚合酶的非限制实例包括: Taq聚合酶、Pheonix Taq聚合酶、Phusion聚合酶、T4聚合酶、T7聚合酶、Klenow片段、Klenow exo-、phi29聚合酶、AMV反转录酶、M-MuLV反转录酶、HIV-1反转录酶、VeraSeq Ultra聚合酶和EnzScript。在一些实施方案中, DNA聚合酶不是反转录酶。在一些实施方案中, DNA聚合酶作用于DNA模板。在一些实施方案中, DNA聚合酶作用于RNA模板。

[0075] 在一些实施方案中, 延伸反应包括在RNA上进行的反转录, 以产生互补的DNA分子(依赖RNA的DNA聚合酶活性)。在一些实施方案中, 可以使用来自小鼠莫洛尼鼠白血病病毒(molony murine leukemia virus, M-MLV)的反转录酶。应当理解的是, 可以使用许多其他反转录酶, 包括但不限于: AMV反转录酶、RSV反转录酶、HIV-1反转录酶、HIV-2反转录酶或者其他本文所公开的酶。

[0076] 如本文所使用的, 术语“延伸产物”指与核酸模板互补并且由模板依赖性延伸形成的核酸。在一些实施方案中, 与核酸模板杂交的寡核苷酸的杂交序列的3'末端充当引物以用于模板依赖性延伸, 这产生与所述核酸模板互补的新核酸。延伸产物可以完全或部分地与其所产自的核酸模板互补。

[0077] 在一些实施方案中, 使用具有杂交序列和附加序列的寡核苷酸产生延伸产物, 所述杂交序列与靶核酸互补, 所述附加序列位于杂交序列的5'端, 其不与模板互补, 并且并入延伸产物的5'末端。该附加序列可包含标签、条形码、索引、接头或其他序列以用于将期望的特征并入延伸产物中。在一些实施方案中, 当延伸反应并未延伸至模板全长时, 产生部分互补的延伸产物。

[0078] 在一些实施方案中, 部分互补的延伸产物在模板内部序列上引发。在一些实施方案中, 部分互补的延伸产物具有与模板序列完全互补的3'区域以及非互补的5'区域, 其中非互补的5'区域为引发产生延伸产物之延伸反应的寡核苷酸的附加序列。

[0079] 如本文所使用的, 术语“等温反应”指这样的反应, 其包括一种或更多种作用于核酸模板的酶, 以在相对均一的温度条件下产生模板或部分模板的拷贝。在一些实施方案中, 等温反应包括在相对均一的温度条件下指数扩增DNA和/或RNA分子, 为测序做准备。在一些实施方案中, 等温反应在相对均一的温度条件下, 在稳定的状态反应条件下进行。在一些实施方案中, 等温反应包括在相对均一的温度条件下进行一轮或更多轮的扩增。在一些实施方案中, 等温反应在以下范围中进行: 35℃至50℃、38℃至42℃、39℃至42℃或35℃至45℃(例如, 约41℃)。在一些实施方案中, 等温反应在约35℃、36℃、37℃、38℃、39℃、40℃、41

℃、42℃、43℃、44℃、45℃、46℃、47℃、48℃、49℃或50℃下进行。

[0080] 如本文所使用的,术语“聚合酶”指合成核酸的酶。该术语涵盖DNA聚合酶、RNA聚合酶以及反转录酶等。在一些实施方案中,聚合酶通过由在其3'末端与模板杂交的寡核苷酸引发的模板依赖性延伸合成核酸。在一些实施方案中,聚合酶通过转录反应合成核酸。在一些实施方案中,聚合酶在合适的缓冲液条件下以及在以下温度范围中优化地合成核酸:35℃至80℃或35℃至75℃或35℃至70℃或35℃至70℃或35℃至65℃或35℃至60℃或35℃至55℃或35℃至50℃或35℃至45℃或40℃至70℃或50℃至60℃或55℃至65℃。

[0081] 在一些实施方案中,聚合酶为热稳定的聚合酶。在一些实施方案中,所述热稳定的聚合酶为来自于例如水生栖热菌 (*Thermus aquaticus*)、嗜热栖热菌 (*T. thermophilus*)、*T. bockianus*、黄栖热菌 (*T. flavus*)、红色栖热菌 (*T. ruber*)、*Thermococcus litoralis*、激烈火球菌 (*Pyrococcus furiosus*)、沃氏火球菌 (*P. wosei*)、*Pyrococcus spec.*、海栖热袍菌 (*Thermatoga maritime*)、嗜酸热源体 (*Thermoplasma acidophilus*) 或 *Sulfolobus spec.* 之嗜热的真细菌 (*Eubacteria*) 或古细菌 (*Archaeobacteria*) 聚合酶。

[0082] 在一些实施方案中,本文所公开的方法包括RNA的降解。这种酶的一个非限制性实例为RNA酶H,其降解RNA-DNA杂交体中的RNA链。另外的核糖核酸酶的实例包括RNA酶A、RNA酶I、RNA酶III和RNA酶L。在一些实施方案中,使用非酶促方法降解RNA。应当理解的是,存在许多方法及试剂在反应中降解RNA,包括但不限于提高溶液的pH(其可以通过许多方法完成,包括但不限于添加NaOH),以及提高反应温度。在一些实施方案中,该反应的pH通过添加NaOH提高至pH为10.0。

[0083] 在一些实施方案中,本文公开的方法包括去除或降解反应中过量的寡核苷酸和其他核酸。在一些实施方案中,将核酸酶促降解。在一些实施方案中,在存在允许酶执行指定活性的缓冲液和条件的情况下,大肠杆菌 (*E. coli*) 核酸外切酶I被用于降解单链核酸。

[0084] 在一些实施方案中,本文公开的方法包括将双链接头与DNA片段的任一末端相连。在此情景下,连接指两个核酸之间的共价磷酸二酯键。在一些实施方案中,连接会在两条双链DNA分子之间发生,例如在双链接头与双链DNA片段之间,以使得在DNA的两条链之间形成共价磷酸二酯键。在一些实施方案中,连接活性通过连接酶酶促执行。任何下述非限制列表中的具有连接酶活性的酶可用于进行该反应:大肠杆菌DNA连接酶、T4 DNA连接酶、Taw DNA连接酶、T3 DNA连接酶。

[0085] 在一些实施方案中,本文公开的方法包括将RNA聚合酶启动子序列与核酸相连。添加RNA聚合酶启动子允许RNA聚合酶的识别,这将会执行依赖于DNA的RNA聚合酶活性,产生互补的RNA链。该启动子的实例包括但不限于T7、T3和SP6启动子。

[0086] 在一些实施方案中,本文公开的方法包括从反应混合物纯化核酸,为后续的步骤或分析做准备。在一些实施方案中,进行RNA纯化。在一些实施方案中,可以使用任何合适的纯化方法。在一些实施方案中,可以使用AMPure试剂盒,其使用了基于珠的固相提取。在一些实施方案中,另外的方法包括但不限于其他固相提取方法(例如,基于柱的方法)及液体-液体提取方法(例如,酚-氯仿)。

[0087] 在一些实施方案中,所提供的试剂盒包含多种对于进行制备和/或测序反应必要的试剂以及根据本文所述方法使用的说明书。本文所公开的任何酶、寡核苷酸、核酸或试剂可以以任何组合配制于试剂盒中。在试剂盒的一些实施方案中,至少一个容器为可重复使

用的容器。在试剂盒的一些实施方案中,至少一个容器为一次性使用的容器。在试剂盒的一些实施方案中,至少一个容器为管、瓶或筒(例如,多孔筒)。在一些实施方案中,配置试剂盒以使得在筒的不同位置处进行一个或更多个过程。在一些实施方案中,筒可装有或含有用于制备核酸的每组步骤或过程的干燥或冻干的组分。在一些实施方案中,本文所提供的试剂盒包含管,例如扣盖管或旋盖管。在试剂盒的一些实施方案中,瓶为扣盖瓶或旋盖瓶。在一些实施方案中,至少一个容器为玻璃小瓶。在一些实施方案中,将容器一起放置于盒子或包装中。在一些实施方案中,试剂盒还包含用于制备核酸的说明书(例如,根据实施例1至实施例3所概述的一个或更多个步骤)。在一些实施方案中,试剂盒还包含用于在特定的温度下(例如,低于0℃,室温等)储存至少一个容器的说明书。在一些实施方案中,试剂盒还包含使用该试剂盒中所提供的试剂进行任何本文公开方法的说明书。

[0088] 虽然在一些实施方案中,本文公开的试剂盒可用于研究目的,但在另一些实施方案中,本文公开的试剂盒可用于诊断目的。因此,在一些实施方案中,所述试剂盒包含一种或更多种试剂或组分,其可用于在患有病症(例如,癌症)的个体中诊断或辅助诊断的方法。

[0089] 通过以下实施例将更加详细地描述本发明的示例性实施方案。这些实施方案为本发明的示例,本领域技术人员将认识到本发明不限于这些示例性实施方案。

[0090] 实施例

[0091] 实施例1:使用反转录酶与标签随机寡核苷酸(randomer)和靶向第二链寡核苷酸扩增3'融合事件的等温方法

[0092] 扩增#1

[0093] 作为向扩增带有未知融合伴侣的3'融合事件的第一步,使用从福尔马林固定的组织样品获得的RNA进行第一扩增反应。

[0094] 在室温下,用反应缓冲液将下列反应物集合:

- [0095] • 1μL纯化的RNA (50ng)
- [0096] • 1μL 3μM V3-FGFR GSP1
- [0097] • 1μL 5μM T7-N9随机寡核苷酸
- [0098] • 2μL dH₂O

[0099] 将反应物温和混合,离心若干秒并转移至热循环仪,在那里将其在65℃孵育2分钟,随后41℃孵育11.5分钟。

[0100] 在一些实施方案中,使用酶混合物。在一些实施方案中,在使用前,将所述酶混合物冻干并重构。在一些实施方案中,所述酶混合物包含2种、3种或更多种酶。在一些实施方案中,所述酶混合物还包含高分子量的糖混合物(例如,葡聚糖)。在一些实施方案中,所述酶混合物为用于等温RNA扩增的酶混合物。在一些实施方案中,所述酶混合物包含反转录酶(例如,禽类成髓细胞性白血病病毒反转录酶)、RNA酶H和RNA聚合酶(例如,T7 RNA聚合酶)。在一些实施方案中,所述酶混合物包含4单位至10单位的反转录酶、0.01单位至0.1单位的RNA酶H,以及10单位至40单位的RNA聚合酶。

[0101] 在上述的寡核苷酸-RNA退火反应过程中,制备所述酶混合物。解冻用于该冻干酶混合物的稀释剂,之后将30μL的冷稀释剂添加至该冻干的酶混合物,并孵育6分钟。紧接着上述退火反应,将5μL酶混合物添加至每个退火的RNA-寡核苷酸混合物,并在41℃下孵育45分钟至90分钟。

[0102] 使用RNA XP AMPure珠进行RNA纯化

[0103] 将下列物质添加至上述反应，

[0104] • 36μL AMPure珠

[0105] 将混悬液充分混合并在室温下孵育5分钟。使用磁体经2至4分钟收集珠，并且溶液表现为澄清。弃去上清液，并用200μL的70%乙醇在磁体上洗涤珠三次。在第二次洗涤后，将珠在室温下干燥10分钟。最后，通过从磁体移除管并将珠重悬在15μL 10mM的Tris-HCl pH 8.3洗脱缓冲液中洗脱RNA，该洗脱缓冲液包含于AMPure试剂盒中。将该RNA-珠溶液置于磁体上2分钟，之后将RNA溶液转移至新的PCR管中，确保避免将珠转移到新管中。

[0106] 扩增#2

[0107] 在室温下，用反应缓冲液将下列反应物集合：

[0108] • 2μL来自上述扩增反应#1的物质

[0109] • 1μL 3μM V3-FGFR GSP1

[0110] • 1μL 5μM T7-cRNA R2P

[0111] • 1μL dH₂O

[0112] 将反应物温和混合，离心若干秒并转移至热循环仪，在那里将其在65℃孵育2分钟，随后41℃孵育11.5分钟。

[0113] 在上述的寡核苷酸-RNA退火反应过程中，制备酶混合物。解冻用于该冻干的酶混合物的稀释剂，之后将30μL的冷稀释剂添加至所述冻干的酶混合物，并孵育6分钟。紧接着上述退火反应，将5μL酶混合物添加至每个退火的RNA-寡核苷酸混合物，并在41℃下孵育45分钟至90分钟。

[0114] 使用RNA XP AMPure珠进行RNA纯化

[0115] 如上所述进行RNA纯化，在15μL 10mM的Tris-HCl pH 8.0洗脱缓冲液中洗脱该RNA。

[0116] 扩增#3

[0117] 在室温下，用反应缓冲液将下列反应物集合：

[0118] • 1μL来自上述扩增反应#2的物质

[0119] • 1μL 3μM V3-FGFR GSP2

[0120] • 1μL 5μM T7-cRNA R2P

[0121] • 2μL dH₂O

[0122] 将反应物温和混合，离心若干秒并转移至热循环仪，在那里将其在65℃孵育2分钟，随后41℃孵育11.5分钟。

[0123] 在上述的寡核苷酸-RNA退火反应过程中，制备酶混合物。解冻用于该冻干的酶混合物的稀释剂，之后将30μL的冷稀释剂添加至所述冻干的酶混合物，并孵育6分钟。紧接着上述退火反应，将5μL酶混合物添加至每个退火的RNA-寡核苷酸混合物，并在41℃下孵育45分钟至90分钟。

[0124] 使用RNA XP AMPure珠进行RNA纯化

[0125] 如上所述进行RNA纯化，此时在6μL 10mM的Tris-HCl pH 8.3洗脱缓冲液中洗脱该RNA。

[0126] 扩增#4

[0127] 在室温下,用反应缓冲液将下列反应物集合:

[0128] • 5μL来自上述扩增#3的物质

[0129] • 1μL 10μM P5

[0130] • 1μL 10μM P7

[0131] 将反应物温和混合,离心若干秒并转移至热循环仪,在那里将其在65℃孵育2分钟,随后41℃孵育11.5分钟。

[0132] 在上述的寡核苷酸-RNA退火反应过程中,制备酶混合物。解冻用于该冻干的酶混合物的稀释剂,之后将30μL的冷稀释剂添加至所述冻干的酶混合物中,并孵育6分钟。紧接着上述退火反应,将5μL酶混合物添加至每个退火的RNA-寡核苷酸混合物,并在41℃下孵育45分钟至90分钟。

[0133] 使用DNA XP AMPure珠进行DNA纯化

[0134] 将下列物质添加至上述反应,

[0135] • 36μL AMPure珠

[0136] 将混悬液充分混合并在室温下孵育5分钟。使用磁体经2至4分钟收集珠,并且溶液表现为澄清。弃去上清液,并用200μL的70%乙醇在磁体上洗涤珠三次。在第二次洗涤后,将珠在室温下干燥5分钟。最后,通过从磁体移除管并将珠重悬在15μL 10mM的Tris-HCl pH 8.3洗脱缓冲液中洗脱DNA,该洗脱缓冲液包含于AMPure试剂盒中。将该RNA-珠溶液置于磁体上2分钟,之后将DNA溶液转移至新的PCR管中,确保避免将珠转移到新管中。随后该最终的DNA产物准备进行测序。

[0137] 实施例2:使用反转录酶与标签随机寡核苷酸及靶向第二链寡核苷酸扩增5'融合事件的等温方法

[0138] 扩增#1

[0139] 朝向扩增包含带有未知融合伴侣之5'融合事件的基因座的第一步,为使用靶/基因特异性引物在所获得的样品RNA上进行反转录酶事件。

[0140] 在室温下,用反应缓冲液将下列反应物集合:

[0141] • 1μL纯化的RNA (50ng)

[0142] • 1μL 3μM V3-FGFR GSP1

[0143] • 1μL 5μM T7-N9随机寡核苷酸

[0144] • 2μL dH₂O

[0145] 将反应物温和混合,离心若干秒并转移至热循环仪,在那里将其在65℃孵育2分钟,随后41℃孵育11.5分钟。

[0146] 在上述的寡核苷酸-RNA退火反应过程中,制备酶混合物。解冻用于该冻干的酶混合物的稀释剂,之后将30μL的冷稀释剂添加至所述冻干的酶混合物,并孵育6分钟。紧接着上述退火反应,将5μL酶混合物添加至每个退火的RNA-寡核苷酸混合物,并在41℃下孵育45分钟至90分钟。

[0147] 使用RNA XP AMPure珠进行RNA纯化

[0148] 将下列物质添加至上述反应,

[0149] • 36μL AMPure珠

[0150] 将混悬液充分混合并在室温下孵育5分钟。使用磁体经2至4分钟收集珠,并且溶液

表现为澄清。弃去上清液,并用200μL的70%乙醇在磁体上洗涤珠三次。在第二次洗涤后,将珠在室温下干燥10分钟。最后,通过从磁体移除管并将小珠重悬在15μL 10mM的Tris-HCl pH 8.3洗脱缓冲液中洗脱RNA,该洗脱缓冲液包含于AMPure试剂盒中。将该RNA-珠溶液置于磁体上2分钟,之后将RNA溶液转移至新的PCR管中,确保避免将珠转移到新管中。

[0151] 扩增#2

[0152] 在室温下,用反应缓冲液将下列反应物集合:

[0153] • 2μL来自上述扩增#1的物质

[0154] • 1μL 3μM V3-FGFR GSP1

[0155] • 1μL 5μM T7-cRNA R2P

[0156] • 1μL dH₂O

[0157] 将反应物温和混合,离心若干秒并转移至热循环仪,在那里将其在65℃孵育2分钟,随后41℃孵育11.5分钟。

[0158] 在上述的寡核苷酸-RNA退火反应过程中,制备酶混合物。解冻用于该冻干的酶混合物的稀释剂,之后将30μL的冷稀释剂添加至所述冻干的酶混合物中,并孵育6分钟。紧接着上述退火反应,将5μL酶混合物添加至每个退火的RNA-寡核苷酸混合物,并在41℃下孵育45分钟至90分钟。

[0159] 使用RNA XP AMPure珠进行RNA纯化

[0160] 如上所述进行RNA纯化,在15μL 10mM的Tris-HCl pH 8.0洗脱缓冲液中洗脱该RNA。

[0161] 扩增#3

[0162] 在室温下,用反应缓冲液将下列反应物集合:

[0163] • 1μL来自上述扩增#2的物质

[0164] • 1μL 3μM V3-FGFR GSP2

[0165] • 1μL 5μM T7-cRNA R2P

[0166] • 2μL dH₂O

[0167] 将反应物温和混合,离心若干秒并转移至热循环仪,在那里将其在65℃孵育2分钟,随后41℃孵育11.5分钟。

[0168] 在上述的寡核苷酸-RNA退火反应过程中,制备酶混合物。解冻用于该冻干的酶混合物的稀释剂,之后将30μL的冷稀释剂添加至所述冻干的酶混合物中,并孵育6分钟。紧接着上述退火反应,将5μL酶混合物添加至每个退火的RNA-寡核苷酸混合物,并在41℃下孵育45分钟至90分钟。

[0169] 使用RNA XP AMPure珠进行RNA纯化

[0170] 如上所述进行RNA纯化,此时在6μL 10mM的Tris-HCl pH 8.3洗脱缓冲液中洗脱该RNA。

[0171] 扩增#4

[0172] 在室温下,用反应缓冲液将下列反应物集合:

[0173] • 5μL来自上述扩增#3的物质

[0174] • 1μL 10μM P5

[0175] • 1μL 10μM P7

[0176] 将反应物温和混合,离心若干秒并转移至热循环仪,在那里将其在65℃孵育2分钟,随后41℃孵育11.5分钟。

[0177] 在上述的寡核苷酸-RNA退火反应过程中,制备酶混合物。解冻用于该冻干的酶混合物的稀释剂,之后将30μL的冷稀释剂添加至所述冻干的酶混合物,并孵育6分钟。紧接着上述退火反应,将5μL酶混合物添加至每个退火的RNA-寡核苷酸混合物,并在41℃下孵育45分钟至90分钟。

[0178] 使用DNA XP AMPure珠进行DNA纯化

[0179] 将下列物质添加至上述反应,

[0180] • 36μL AMPure珠

[0181] 将混悬液充分混合并在室温下孵育5分钟。使用磁体经2至4分钟收集珠,并且溶液表现为澄清。弃去上清液,并用200μL的70%乙醇在磁体上洗涤珠三次。在第二次洗涤后,将珠在室温下干燥5分钟。最后,通过从磁体移除管并将珠重悬在15μL 10mM的Tris-HCl pH 8.3洗脱缓冲液中洗脱DNA,该洗脱缓冲液包含于AMPure试剂盒中。将该RNA-珠溶液置于磁体上2分钟,之后将DNA溶液转移至新的PCR管中,确保避免将珠转移到新管中。随后该最终的DNA产物准备进行测序。

[0182] 实施例3:以基因组DNA开始的指数扩增靶序列的等温方法

[0183] 为了制备双链基因组DNA的靶区域以用于分析,首先将DNA片段化成大小为100bp至600bp。

[0184] 为了修复片段的末端,之后将相对的末端进行磷酸化和腺苷酸化,制备如下反应物:

[0185] • 10μL片段化DNA (50-250ng)

[0186] • 4μL末端修复缓冲液

[0187] • 1μL末端修复混合物

[0188] • 1μL Taq聚合酶 (A加尾)

[0189] • 1μL 2mM dNTP

[0190] 将反应物温和混合,并在12℃下在热循环仪中孵育15分钟,37℃孵育15分钟,之后72℃孵育15分钟,随后在4℃直到进行下面的步骤。

[0191] 在上述反应过程中,通过将每个寡核苷酸等体积混合、加热至95℃并使其冷却至室温,将含有5' RNA聚合酶启动子序列的寡核苷酸接头序列退火。

[0192] 在室温下,将下列连接反应物集合:

[0193] • 40μL上述制备的DNA

[0194] • 1μL MiSeq索引2接头

[0195] • 4.9μL连接缓冲液

[0196] • 2μL DNA连接酶

[0197] 之后使反应在16℃下进行30分钟,之后在22℃进行30分钟,随后4℃。

[0198] 以1.8×反应体积用Ampure XP珠纯化。

[0199] 扩增#1

[0200] 在室温下,用反应缓冲液将下列反应物集合:

[0201] • 2μL来自上述连接反应的纯化的DNA

[0202] • 1μL引物T7-R2P cRNA 5μM

[0203] • 1μL GSP1 3μM

[0204] • 1μL dH₂O

[0205] 将反应物温和混合,离心若干秒并转移至热循环仪,在那里将其在65℃孵育2分钟,随后41℃孵育11.5分钟。

[0206] 在上述的寡核苷酸-RNA退火反应过程中,制备酶混合物。解冻用于该冻干的酶混合物的稀释剂,之后将30μL的冷稀释剂添加至所述冻干的酶混合物,并孵育6分钟。紧接着上述退火反应,将5μL酶混合物添加至每个退火的RNA-寡核苷酸混合物,并在41℃下孵育45分钟至90分钟。

[0207] 使用RNA XP AMPure珠进行RNA纯化

[0208] 将下列物质添加至上述反应,

[0209] • 36μL AMPure珠

[0210] 将混悬液充分混合并在室温下孵育5分钟。使用磁体经2至4分钟收集珠,并且溶液表现为澄清。弃去上清液,并用200μL的70%乙醇在磁体上洗涤珠三次。在第二次洗涤后,将珠在室温下干燥10分钟。最后,通过从磁体移除管并将小珠重悬在15μL 10mM的Tris-HCl pH 8.3洗脱缓冲液中洗脱RNA,该洗脱缓冲液包含于AMPure试剂盒中。将该RNA-珠溶液置于磁体上2分钟,之后将RNA溶液转移至新的PCR管中,确保避免将珠转移到新管中。

[0211] 扩增#2

[0212] 在室温下,用反应缓冲液将下列反应物集合:

[0213] • 2μL来自上述扩增#1的RNA

[0214] • 1μL T7-R2P-cRNA 5μM

[0215] • 1μL GSP23μM

[0216] • 1μL dH₂O

[0217] 将反应物温和混合,离心若干秒并转移至热循环仪,在那里将其在65℃孵育2分钟,随后41℃孵育11.5分钟。

[0218] 在上述的寡核苷酸-RNA退火反应过程中,制备酶混合物。解冻用于该冻干的酶混合物的稀释剂,之后将30μL的冷稀释剂添加至所述冻干的酶混合物,并孵育6分钟。紧接着上述退火反应,将5μL酶混合物添加至每个退火的RNA-寡核苷酸混合物,并在41℃下孵育45分钟至90分钟。

[0219] 扩增#4

[0220] 在室温下,用反应缓冲液将下列反应物集合:

[0221] • 5μL来自上述扩增#3的物质

[0222] • 1μL 10μM P5

[0223] • 1μL 10μM P7

[0224] 将反应物温和混合,离心若干秒并转移至热循环仪,在那里将其在65℃孵育2分钟,随后41℃孵育11.5分钟。

[0225] 在上述的寡核苷酸-RNA退火反应过程中,制备酶混合物。解冻用于该冻干的酶混合物的稀释剂,之后将30μL的冷稀释剂添加至所述冻干的酶混合物,并孵育6分钟。紧接着上述退火反应,将5μL酶混合物添加至每个退火的RNA-寡核苷酸混合物,并在41℃下孵育45

分钟至90分钟。

[0226] 使用DNA XP AMPure珠进行DNA纯化

[0227] 将下列物质添加至上述反应，

[0228] • 36μL AMPure珠

[0229] 将混悬液充分混合并在室温下孵育5分钟。使用磁体经2至4分钟收集珠，并且溶液表现为澄清。弃去上清液，并用200μL的70%乙醇在磁体上洗涤珠三次。在第二次洗涤后，将珠在室温下干燥10分钟。最后，通过从磁体移除管并将珠重悬在15μL 10mM的Tris-HCl pH 8.3洗脱缓冲液中洗脱DNA，该洗脱缓冲液包含于AMPure试剂盒中。将该DNA-珠溶液置于磁体上2分钟，之后将DNA溶液转移至新的PCR管中，确保避免将珠转移到新管中。随后该最终的DNA产物准备进行测序。

[0230] 实施例4：使用反转录酶与标签随机寡核苷酸及随机第二链寡核苷酸扩增未知5'和/或3'融合事件的等温方法

[0231] 扩增#1

[0232] 作为向扩增带有未知融合伴侣的3'融合事件的第一步，使用从福尔马林固定的组织样品获得的RNA进行第一扩增反应。

[0233] 在室温下，用反应缓冲液将下列反应物集合：

[0234] • 1μL纯化的RNA (50ng)

[0235] • 1μL 5μM T7-N9随机寡核苷酸

[0236] • 3μL dH₂O

[0237] 将反应物温和混合，离心若干秒并转移至热循环仪，在那里将其在65℃孵育2分钟，随后41℃孵育11.5分钟。

[0238] 在上述的寡核苷酸-RNA退火反应过程中，制备酶混合物。解冻用于该冻干的酶混合物的稀释剂，之后将30μL的冷稀释剂添加至所述冻干的酶混合物，并孵育6分钟。紧接着上述退火反应，将5μL酶混合物添加至每个退火的RNA-寡核苷酸混合物，并在41℃下孵育45分钟至90分钟。

[0239] 使用RNA XP AMPure珠进行RNA纯化

[0240] 将下列物质添加至上述反应，

[0241] • 36μL AMPure珠

[0242] 将混悬液充分混合并在室温下孵育5分钟。使用磁体经2至4分钟收集珠，并且溶液表现为澄清。弃去上清液，并用200μL的70%乙醇在磁体上洗涤珠三次。在第二次洗涤后，将珠在室温下干燥10分钟。最后，通过从磁体移除管并将珠重悬在15μL 10mM的Tris-HCl pH 8.3洗脱缓冲液中洗脱RNA，该洗脱缓冲液包含于AMPure试剂盒中。将该RNA-珠溶液置于磁体上2分钟，之后将RNA溶液转移至新的PCR管中，确保避免将珠转移到新管中。

[0243] 扩增#2

[0244] 在室温下，用反应缓冲液将下列反应物集合：

[0245] • 2μL来自上述扩增反应#1的物质

[0246] • 1μL 3μM GSP1 (5'或3'定向引物)

[0247] • 1μL 5μM R2P

[0248] • 1μL dH₂O

[0249] 将反应物温和混合,离心若干秒并转移至热循环仪,在那里将其在65℃孵育2分钟,随后41℃孵育11.5分钟。

[0250] 在上述的寡核苷酸-RNA退火反应过程中,制备酶混合物。解冻用于该冻干的酶混合物的稀释剂,之后将30μL的冷稀释剂添加至所述冻干的酶混合物,并孵育6分钟。紧接着上述退火反应,将5μL酶混合物添加至每个退火的RNA-寡核苷酸混合物,并在41℃下孵育45分钟至90分钟。

[0251] 使用RNA XP AMPure珠进行RNA纯化

[0252] 如上所述进行RNA纯化,在15μL 10mM的Tris-HCl pH 8.0洗脱缓冲液中洗脱该RNA。

[0253] 扩增#3

[0254] 在室温下,用反应缓冲液将下列反应物集合:

[0255] • 5μL来自上述扩增#2的物质

[0256] • 1μL 10μM P5

[0257] • 1μL 10μM P7

[0258] 反应物温和混合,离心若干秒并转移至热循环仪,在那里将其在65℃孵育2分钟,随后41℃孵育11.5分钟。

[0259] 在上述的寡核苷酸-RNA退火反应过程中,制备酶混合物。解冻用于该冻干的酶混合物的稀释剂,之后将30μL的冷稀释剂添加至所述冻干的酶混合物,并孵育6分钟。紧接着上述退火反应,将5μL酶混合物添加至每个退火的RNA-寡核苷酸混合物,并在41℃下孵育45分钟至90分钟。

[0260] 使用DNA XP AMPure珠进行DNA纯化

[0261] 将下列物质添加至上述反应,

[0262] • 36μL AMPure珠

[0263] 将混悬液充分混合并在室温下孵育5分钟。使用磁体经2至4分钟收集珠,并且溶液表现为澄清。弃去上清液,并用200μL的70%乙醇在磁体上洗涤珠三次。在第二次洗涤后,将珠在室温下干燥5分钟。最后,通过从磁体移除管并将珠重悬在15μL 10mM的Tris-HCl pH 8.3洗脱缓冲液中洗脱DNA,该洗脱缓冲液包含于AMPure试剂盒中。将该RNA-珠溶液置于磁体上2分钟。之后将DNA溶液转移至新的PCR管中,确保避免将珠转移到新管中。随后该最终的DNA产物准备进行测序。

[0264] 实施例5:寡核苷酸

[0265] 下面的表格提供了用于扩增核酸为测序分析做准备的示例性寡核苷酸序列,例如,如实施例1至实施例3所述。

[0266]

T7随机寡核苷酸RT随机寡核苷酸		
SEQ ID	名称	序列
1	T7- N6	GAAATTAATACGACTCACTATAGGGAAGACGTGTGCTCTTC CGATCTNNNNNN
2	T7-N9	GAAATTAATACGACTCACTATAGGGAAGACGTGTGCTCTTC CGATCTNNNNNNNN
3	T7-N15	GAAATTAATACGACTCACTATAGGGAAGACGTGTGCTCTTC CGATCTNNNNNNNNNNNNNNNN
4	T7-cRNA-R2P	GAAATTAATACGACTCACTATAGGGAAGACGTGTGCTCTTC CGATCT
3' FGFR GSP1寡核苷酸		
SEQ ID	名称	序列
5	FGFR1_007_19 3 GSP1	GGATCTCGACGCTCTCCCTCAACCCTGCTTGCAGGAT
6	FGFR1_008_14 7 GSP1	GGATCTCGACGCTCTCCCTCCTCCATCTCTTTGTGCGGTGGT
7	FGFR1_009_20 5 GSP1	GGATCTCGACGCTCTCCCTATGAGGAAGGCCCTGTGC
8	FGFR1_010_14 8 GSP1	GGATCTCGACGCTCTCCCTCCCCAGAGTTCATGGATGCACT
9	FGFR1_011_12 4 GSP1	GGATCTCGACGCTCTCCCTAAAGCAGCCCTCTCCCAGG
10	FGFR1_012_11 3 GSP1	GGATCTCGACGCTCTCCCTATTTCTGAGATCAGGTCTGACA AG
11	FGFR1_016_14 0 GSP1	GGATCTCGACGCTCTCCCTTGCTGAAGGAGGGTCACCG
12	FGFR1_017_10 8 GSP1	GGATCTCGACGCTCTCCCTTTCAAGCAGCTGGTGGAAGAC
13	FGFR1_018_17 8 GSP1	GGATCTCGACGCTCTCCCTCAGCCCAGCTTGCCAATGGC
14	FGFR3_007_19	GGATCTCGACGCTCTCCCTGTCTGGTTGGCCGGCAGC

[0267]

	3 GSP1	
15	FGFR3_008_14 7 GSP1	GGATCTCGACGCTCTCCCTGACGTTGTGCAAGGAGAGAACC T
16	FGFR3_009_19 3 GSP1	GGATCTCGACGCTCTCCCTCGCCTCGTCAGCCTCCAC
17	FGFR3_010_14 8 GSP1	GGATCTCGACGCTCTCCCTACCAGTGGTGTGTTGGAGCT
18	FGFR3_011_12 4 GSP1	GGATCTCGACGCTCTCCCTCGAAGCAGCCCTCCCCAA
19	FGFR3_012_11 3 GSP1	GGATCTCGACGCTCTCCCTACCAGGTCCGACAGGTCC
20	FGFR3_016_14 0 GSP1	GGATCTCGACGCTCTCCCTCATGGACAAGCCCGCCAA
21	FGFR3_017_10 8 GSP1	GGATCTCGACGCTCTCCCTGGAGGACCTGGACCGTGTC
22	FGFR3_018_14 8 GSP1	GGATCTCGACGCTCTCCCTCCTCAGGGGACGACTCCG
3' GSP2 FGFR Rd1寡核苷酸		
SEQ ID	名称	序列
23	FGFR1_007_19 3-GSP2	ACACTCTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTCTTGCAGGA TGGGCCGGTGA
24	FGFR1_008_14 7-GSP2 R1P	ACACTCTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTCATCTCTTT GTCGGTGGTATTAACTCCA
25	FGFR1_009_20 5-GSP2 R1P	ACACTCTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTACAGGGGC GAGGTCATCAC
26	FGFR1_010_14 8-GSP2 R1P	ACACTCTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTTGGATGCAC TGGAGTCAGCA
27	FGFR1_011_12 4-GSP2 R1P	ACACTCTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTCTCTCCAG GGGTTTGCTAA
28	FGFR1_012_11 3-GSP2 R1P	ACACTCTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTGAGATCAG GTCTGACAAGTCTTTCTCTG
29	FGFR1_012_11 3-GSP2 R1P	ACACTCTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTGAGATCAG GTCTGACAAGTCTTTCTCTG
30	FGFR1_016_14 0-GSP2 R1P	ACACTCTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTGAGGGTCA CCGCATGGACAAG
31	FGFR1_017_10 8-GSP2 R1P	ACACTCTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTCATCGTGCC CTTGACCTCCA
32	FGFR1_018_17 8-GSP2 R1P	ACACTCTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTGCCAATGG CGGACTCAAACG
33	FGFR3_007_19 3-GSP2 R1P	ACACTCTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTCTGCAGGAT GGGCCGGTG
34	FGFR3_008_14 7-GSP2 R1P	ACACTCTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTAGCTCCTTG TCGGTGGTGTTAG
35	FGFR3_009_19 3-GSP2 R1P	ACACTCTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTCGTCAGCCT CCACCAGCT
36	FGFR3_010_14 8-GSP2 R1P	ACACTCTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTCCAGTGGTG TGTGGAGCTCAT
37	FGFR3_011_12 4-GSP2 R1P	ACACTCTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTCCAAGGG GCTTGCCCAG
38	FGFR3_012_11 3-GSP2 R1P	ACACTCTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTCCGACAGG TCCTTGTCAGTGG
39	FGFR3_016_14	ACACTCTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTCCCGCCAAC

[0268]

	0-GSP2 RIP	TGCACACAC	
40	FGFR3_017_10 8-GSP2 RIP	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTGTGTCCTTA CCGTGACGTCCA	
41	FGFR3_018_14 8-GSP2 RIP	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTCGACTCCGT GTTTGCCAC	
P5索引标签寡核苷酸			
SEQ ID	名称	序列	机器索引
42	P5_1_v3	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACT AGATCGCACACTCTTTCCCTACACGACGCT CTTC	TAGATCGC
43	P5_2_v3	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACC TCTCTATACACTCTTTCCCTACACGACGCTC TTC	CTCTCTAT
44	P5_3_v3	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACT ATCCTCTACACTCTTTCCCTACACGACGCTC TTC	TATCCTCT
45	P5_4_v3	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC AGAGTAGAACACTCTTTCCCTACACGACGC TCTTC	AGAGTAGA
46	P5_5_v3	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC GTAAGGAGACACTCTTTCCCTACACGACGC TCTTC	GTAAGGAG
47	P5_6_v3	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC ACTGCATAACACTCTTTCCCTACACGACGC TCTTC	ACTGCATA
48	P5_7_v3	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC AAGGAGTAACACTCTTTCCCTACACGACGC TCTTC	AAGGAGTA
49	P5_8_v3	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACC TAAGCCTACACTCTTTCCCTACACGACGCT CTTC	CTAAGCCT
P7索引标签寡核苷酸			
SEQ ID	名称	序列	机器索引
50	P7_1_v3	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATTCGCC T TAGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTT CCGATCT	TAAGGCGA
51	P7_2_v3	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATCTAGT ACGGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTT CCGATCT	CGTACTAG
52	P7_3_v3	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATTTCTG CCTGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTT CCGATCT	AGGCAGAA
53	P7_4_v3	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATGCTCA GGAGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTT CCGATCT	TCCTGAGC
54	P7_5_v3	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATAGGAG TCCGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTT CCGATCT	GGACTCCT
55	P7_6_v3	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATCATGC CTAGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTT CCGATCT	TAGGCATG
56	P7_7_v3	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATGTAGA	CTCTCTAC

[0269]

		GAGGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTT CCGATCT	
57	P7_8_v3	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATCCTCT CTGGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTT CCGATCT	CAGAGAGG
58	P7_9_v3	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATAGCGT AGCGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTT CCGATCT	GCTACGCT
59	P7_10_v3	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATCAGCC TCGGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTT CCGATCT	CGAGGCTG
60	P7_11_v3	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATTGCCT C'TTGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTT CCGATCT	AAGAGGCA
61	P7_12_v3	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATTCTCT ACGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTC CGATCT	GTAGAGGA

[0270] 虽然本文描述并举例说明了本发明的几个实施方案,但本领域普通技术人员将容易预见到用于执行本文所述的功能和/或获得结果和/或一种或更多种优势的多种其他手段和/或结构,并且每种这样的改变和/或修改都被认为在本发明的范围之内。更一般地,本领域技术人员将容易理解,本文所描述的所有参数、尺寸、材料和构造都意在为示例性的,并且实际的参数、尺寸、材料和/或构造将根据使用本发明教导的具体应用。本领域技术人员将认识到,或能够仅使用常规实验确定本文所描述的本发明具体实施方案的许多等效方案。因此,应当理解的是,前面的实施方案仅仅通过实例的方式展示,并且除非特别描述并要求,本发明可以在所附权利要求范围及其等同的范围内实施。本发明涉及本文所描述的每个单独的特征、系统、制品、材料和/或方法。此外,如果该特征、系统、制品、材料和/或方法并非互不相同,则任何两个或更多个该特征、系统、制品、材料和/或方法的组合也包含在本发明的范围内。

[0271] 除非明确相反指明,否则本文在说明书和权利要求中所使用的不定冠词“一个/种”应理解为意指“至少一个/种”。

[0272] 本文在说明书和权利要求中使用的短语“和/或”应理解为意指相关联的要素(即在某些情况下相关联存在,而在其他情况下不相关联地存在的要素)中的“任意一个或两者”。除非明确相反指明,否则除了被“和/或”分句特别地确定的要素之外,其他要素可以任选地存在,无论其与特别确定的那些要素是否相关。因此,作为一个非限制实例,提及“A和/或B”,当与开放性语句如“包含”结合使用时,在一个实施方案中,可指有A而没有B(任选地,包括除了B之外的要素);在另一个实施方案中,指有B而没有A(任选地,包括除了A之外的要素);在另一个实施方案中,指A与B两者(任选地,包括其他要素);等。

[0273] 本文在说明书和权利要求中使用的“或”应该理解为与上文定义的“和/或”具有相同含义。例如,当分离列表中的项时,“或”或者“和/或”应被解释为包括性的,即在许多要素或要素列表中,以及任选地另外的未列出的项中,包括至少一个/种,但也包括多于一个/种的要素。仅当术语明确相反指明,例如“只有其中之一”或“恰好其中之一”,或者当在权利要求中使用“由...组成”时,将指包含许多要素或要素列表中的恰好一个/种要素。一般而言,当前面是排他性术语如“任一”、“其中之一”、“仅其中之一”或“恰好其中之一”时,本文所使用的术语“或”应当仅被解释为排除性的选择(即,“一个或另一个,但并非两者全部”)。当在权利要求中使用“基本上由...组成”时,应当具有其用于专利法领域中的通常含义。

[0274] 本文在说明书和权利要求中使用的短语“至少一个/种”涉及一系列的一个/种或更多个/种要素,应当被理解为意指在要素列表中,选自任何一个/种或更多个/种要素的至少一个/种要素,但未必包括该要素列表中具体列出的各个/种和每个/种要素中的至少一个/种,并且不排除该要素列表中的任何要素的组合。该定义也允许除了在要素列表中被具体确定的、短语“至少一个/种”所指的要素以外,其他要素可任选的存在,无论是否与具体确定的那些要素相关。因此,作为一个非限制性实例,“A和B中的至少一个/种”(或等同的,“A或B中的至少一个/种”,或等同的,“A和/或B中的至少一个/种”)在一个实施方案中可指至少一个/种(任选地包括多于一个/种)A,而不存在B(且任选地包括除B之外的要素);在另一个实施方案中,指至少一个/种(任选地包括多于一个/种)B,而不存在A(且任选地包括除A之外的要素);在另一个实施方案中,指至少一个/种(任选地包括多于一个/种)A,和至少一个/种(任选地包括多于一个/种)B(并且任选地包括其他要素);等。

[0275] 在权利要求以及在上述的说明书中,所有的过渡短语如“包含”、“包括”、“带有”、“具有”、“含有”、“涉及”、“保持”等应理解为开放式的,即意为包括但不限于。如美国专利局的专利审查程序手册(the United States Patent Office Manual of Patent Examining Procedures),2111.03章所述,只有过渡短语“由...组成”和“基本上由...组成”应分别为封闭式或半封闭式过渡短语。

[0276] 在权利要求中使用序数词如“第一”、“第二”、“第三”等修饰权利要求要素自身并不意味着任何优先、在先、或一项权利要求要素与另一项的顺序或进行方法动作的时间顺序,而仅仅是用作标记以区分一项具有特定名称的权利要求要素与另一项具有相同名称的权利要求要素(除了序数词的使用外),从而区分所述权利要求要素。

[0277] 本申请之母案申请的原始权利要求作为本说明书的一部分并入此处:

[0278] 1. 制备用于分析的核酸的方法,所述方法包括:

[0279] (a) 由核酸模板产生合成RNA;

[0280] (b) 在等温反应中,指数扩增所述合成RNA;以及

[0281] (c) 由所述指数扩增的合成RNA产生cDNA,其中所述cDNA包含至少一条非靶序列。

[0282] 2. 确定核酸模板序列的方法,所述方法包括:

[0283] (a) 由核酸模板产生合成RNA;

[0284] (b) 在等温反应中,指数扩增所述合成RNA;

[0285] (c) 由所述指数扩增的合成RNA产生cDNA;以及

[0286] (d) 对所述cDNA进行测序。

[0287] 3. 权利要求1或2中任一项所述的方法,其中所述等温反应包括模板依赖性延伸和RNA聚合酶转录的两个或更多个循环。

[0288] 4. 权利要求3所述的方法,其中每个循环中的至少一次模板依赖性延伸为反转录。

[0289] 5. 权利要求3或4所述的方法,其中所述等温反应在35℃至45℃范围的温度下进行。

[0290] 6. 权利要求5所述的方法,其中所述等温反应所进行的持续时间为45分钟至90分钟。

[0291] 7. 权利要求1至6中任一项所述的方法,其中所述等温反应包括合成第一DNA链的模板依赖性延伸,所述第一DNA链与所述合成RNA互补,从而导致在所述第一DNA链和所述合

成RNA之间形成RNA-DNA杂交体。

[0292] 8. 权利要求7所述的方法, 其中所述等温反应还包括所述RNA-DNA杂交体中所述合成RNA部分的降解。

[0293] 9. 权利要求8所述的方法, 其中所述降解为酶促介导的降解。

[0294] 10. 权利要求9所述的方法, 其中所述降解由RNA酶H介导。

[0295] 11. 权利要求7至10中任一项所述的方法, 其中所述等温反应还包括合成第二DNA链的模板依赖性延伸, 所述第二DNA链与所述第一DNA互补, 从而导致形成包含所述第一和第二DNA链的双链DNA。

[0296] 12. 权利要求11所述的方法, 其中所述等温反应还包括RNA聚合酶介导的转录反应, 所述转录反应由所述双链DNA转录合成的RNA。

[0297] 13. 权利要求1至12中任一项所述的方法, 其中重复步骤 (b)。

[0298] 14. 权利要求13所述的方法, 其中在步骤 (b) 的每个连续轮后纯化所述扩增的合成RNA, 并且将所述纯化的合成RNA用作步骤 (b) 后续轮的起始材料。

[0299] 15. 权利要求14所述的方法, 其中重复的步骤 (b) 的至少两个所述等温反应包括由寡核苷酸引发的模板依赖性延伸, 所述寡核苷酸具有与所述模板合成RNA或第一DNA链的嵌套序列互补的杂交序列。

[0300] 16. 权利要求14或15所述的方法, 其中重复的步骤 (b) 的至少两个等温反应包括由寡核苷酸引发的模板依赖性延伸, 所述寡核苷酸具有与所述模板合成RNA或第一DNA链互补的杂交序列以及附加的非互补序列。

[0301] 17. 权利要求16所述的方法, 其中所述附加的非互补序列包含一个或更多个条形码序列、索引序列或接头序列。

[0302] 18. 权利要求1至17中任一项所述的方法, 其还包括通过使用包含靶特异性杂交序列的寡核苷酸进行至少一次延伸反应产生所述核酸模板; 以及通过使用多个不同的寡核苷酸进行至少一次延伸反应, 所述不同的寡核苷酸共有位于不同杂交序列5' 的共同序列。

[0303] 19. 权利要求1至18中任一项所述的方法, 其中所述核酸模板包含靶区域和邻接区域。

[0304] 20. 权利要求19所述的方法, 其中所述靶特异性杂交序列与所述靶区域互补, 并且其中所述不同杂交序列的至少一条与所述邻接区域互补。

[0305] 21. 权利要求19或20所述的方法, 其中所述靶区域包含第一基因的序列, 并且所述邻接区域包含第二基因的序列。

[0306] 22. 权利要求21所述的方法, 其中所述第一基因为RET、ROS1或ALK。

[0307] 23. 权利要求1至22中任一项所述的方法, 其中所述核酸模板为包含启动子的双链DNA, 其中通过RNA聚合酶酶促产生所述合成RNA, 所述RNA聚合酶特异性地与所述启动子结合, 并转录所述启动子下游的DNA。

[0308] 24. 权利要求23所述的方法, 其中所述RNA聚合酶为T3、T7或SP6聚合酶。

[0309] 25. 权利要求1至24中任一项所述的方法, 其中由从所述核酸模板产生的中间双链DNA转录所述合成RNA, 其中所述核酸模板为分离的RNA。

[0310] 26. 权利要求25所述的方法, 其中所述分离的RNA为信使RNA (mRNA)、微RNA、核糖体RNA、转移RNA或非编码RNA。

- [0311] 27. 权利要求26所述的方法,其中所述mRNA为由包含基因重排的染色体区段编码的融合mRNA。
- [0312] 28. 权利要求27所述的方法,其中所述核酸模板为包含基因重排部分的染色体区段。
- [0313] 29. 权利要求27或28所述的方法,其中所述基因重排为倒位、缺失或易位。
- [0314] 30. 权利要求2至29中任一项所述的方法,其中所述cDNA包含非模板序列,其充当引发测序反应之测序引物的杂交位点。
- [0315] 31. 权利要求2至29中任一项所述的方法,其中在多重反应中对所述cDNA进行测序,所述多重反应包括源自不同来源的不同核酸。
- [0316] 32. 权利要求31所述的方法,其中所述不同来源为从其中获得所述核酸模板的不同对象。
- [0317] 33. 权利要求32所述的方法,其中所述不同来源为从其中获得所述核酸模板的不同组织。
- [0318] 34. 用于对核酸进行测序的方法,所述方法包括:
- [0319] 由核酸模板产生合成RNA,所述模板包含靶区域和邻接区域;
- [0320] 产生双链核酸,所述双链核酸包含使用所述合成RNA作为模板通过模板依赖性延伸合成的第一链,以及使用所述第一链作为模板通过模板依赖性延伸合成的第二链,其中所述双链核酸代表所述核酸模板的靶区域和邻接区域;以及
- [0321] 使用所述双链核酸进行测序反应,以确定所述靶区域和所述邻接区域的核苷酸序列。
- [0322] 35. 权利要求34所述的方法,其还包括扩增所述合成RNA,以及使用所述扩增的合成RNA作为模板产生所述双链核酸。
- [0323] 36. 权利要求35所述的方法,其中通过等温扩增来扩增所述合成RNA。
- [0324] 37. 权利要求36所述的方法,其中通过等温扩增指数扩增所述合成RNA。
- [0325] 38. 权利要求36或37所述的方法,其中通过聚合酶链式反应扩增所述合成RNA。
- [0326] 39. 权利要求34至38中任一项所述的方法,其还包括扩增所述双链核酸并且对所述扩增的双链核酸进行测序。
- [0327] 40. 权利要求34至39中任一项所述的方法,其中产生所述双链核酸的每条链,以使得其含有充当引发测序反应之测序引物的杂交位点的非模板序列。
- [0328] 41. 权利要求34至40中任一项所述的方法,其中在多重反应中对所述双链核酸进行测序,所述多重反应包括源自不同来源的不同核酸。
- [0329] 42. 权利要求41所述的方法,其中所述不同核酸包含标识来源的条形码序列。
- [0330] 43. 试剂盒,其包含:
- [0331] 容纳冻干组合物的容器,所述组合物包含至少一个包含杂交序列和RNA聚合酶启动子序列的寡核苷酸;反转录酶;DNA聚合酶;以及RNA聚合酶。
- [0332] 44. 权利要求43所述的试剂盒,其中所述组合物还包含RNA酶H。
- [0333] 45. 权利要求43或44所述的试剂盒,其中所述反转录酶选自:AMV反转录酶、RSV反转录酶、HIV-1反转录酶、HIV-2反转录酶等。
- [0334] 46. 权利要求43至45中任一项所述的试剂盒,其中所述DNA聚合酶选自:Taq聚合

酶、Pheonix Taq聚合酶、Phusion聚合酶、T4聚合酶、T7聚合酶、Klenow片段、Klenow exo-、phi29聚合酶、VeraSeq ULtra聚合酶和EnzScript。

[0335] 47. 权利要求43至46中任一项所述的试剂盒,其中所述RNA聚合酶选自:T3聚合酶、T7聚合酶和SP6聚合酶。

[0336] 48. 权利要求43至47中任一项所述的试剂盒,其中所述至少一个寡核苷酸还包含至少一个条形码序列、索引序列和接头序列。

[0337] 49. 权利要求43至47中任一项所述的试剂盒,其中所述容器为多室筒的室。

序列表

<110> ARCHERDX, INC.	
<120> 用于制备核酸的等温方法及相关组合物	
<130> 2210405.125W01	
<140> PCT/US2015/012842	
<141> 2015-01-26	
<150> 61/931,974	
<151> 2014-01-27	
<160> 65	
<170> PatentIn version 3.5	
<210> 1	
<211> 53	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述:合成的寡聚核苷酸	
<220>	
<221> 修饰的碱基	
<222> (48) .. (53)	
<223> a, c, t, g, 未知或其他	
<400> 1	
gaaattaata cgactcacta tagggaagac gtgtgctctt ccgatctnnn nnn	53
<210> 2	
<211> 56	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述:合成的寡聚核苷酸	
<220>	
<221> 修饰的碱基	
<222> (48) .. (56)	
<223> a, c, t, g, 未知或其他	
<400> 2	
gaaattaata cgactcacta tagggaagac gtgtgctctt ccgatctnnn nnnnnn	56
<210> 3	
<211> 62	
<212> DNA	
<213> 人工序列	

<220>	
<223> 人工序列的描述:合成的寡聚核苷酸	
<220>	
<221> 修饰的碱基	
<222> (48) .. (62)	
<223> a, c, t, g, 未知或其他	
<400> 3	
gaaattaata cgactcacta tagggaagac gtgtgctctt ccgatctnnn nnnnnnnnnn	60
nn	62
<210> 4	
<211> 47	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述:合成的寡聚核苷酸	
<400> 4	
gaaattaata cgactcacta tagggaagac gtgtgctctt ccgatct	47
<210> 5	
<211> 37	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述:合成的寡聚核苷酸	
<400> 5	
ggatctcgac gctctccctc aaccctgctt gcaggat	37
<210> 6	
<211> 41	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述:合成的寡聚核苷酸	
<400> 6	
ggatctcgac gctctccctc ctccatctct ttgtcggtgg t	41
<210> 7	
<211> 38	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述:合成的寡聚核苷酸	

<400> 7	
ggatctcgac gctctcccta tgaggaaggc ccctgtgc	38
<210> 8	
<211> 41	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述:合成的寡聚核苷酸	
<400> 8	
ggatctcgac gctctccctc cccagagttc atggatgcac t	41
<210> 9	
<211> 38	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述:合成的寡聚核苷酸	
<400> 9	
ggatctcgac gctctcccta aagcagccct ctcccagg	38
<210> 10	
<211> 43	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述:合成的寡聚核苷酸	
<400> 10	
ggatctcgac gctctcccta tttctgagat caggtctgac aag	43
<210> 11	
<211> 38	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述:合成的寡聚核苷酸	
<400> 11	
ggatctcgac gctctccctt gctgaaggag ggtcaccg	38
<210> 12	
<211> 40	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	

〈223〉 人工序列的描述:合成的寡聚核苷酸	
〈400〉 12	
ggatctcgac gctctccctt tcaagcagct ggtggaagac	40
〈210〉 13	
〈211〉 39	
〈212〉 DNA	
〈213〉 人工序列	
〈220〉	
〈223〉 人工序列的描述:合成的寡聚核苷酸	
〈400〉 13	
ggatctcgac gctctccctc agcccagctt gccaatggc	39
〈210〉 14	
〈211〉 37	
〈212〉 DNA	
〈213〉 人工序列	
〈220〉	
〈223〉 人工序列的描述:合成的寡聚核苷酸	
〈400〉 14	
ggatctcgac gctctccctg tctggttggc cggcagc	37
〈210〉 15	
〈211〉 42	
〈212〉 DNA	
〈213〉 人工序列	
〈220〉	
〈223〉 人工序列的描述:合成的寡聚核苷酸	
〈400〉 15	
ggatctcgac gctctccctg acgttgtgca aggagagaac ct	42
〈210〉 16	
〈211〉 37	
〈212〉 DNA	
〈213〉 人工序列	
〈220〉	
〈223〉 人工序列的描述:合成的寡聚核苷酸	
〈400〉 16	
ggatctcgac gctctccctc gcctcgtcag cctccac	37
〈210〉 17	
〈211〉 39	
〈212〉 DNA	
〈213〉 人工序列	

<220>	
<223> 人工序列的描述:合成的寡聚核苷酸	
<400> 17	
ggatctcgac gctctcccta ccagtgggtg gttggagct	39
<210> 18	
<211> 37	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述:合成的寡聚核苷酸	
<400> 18	
ggatctcgac gctctccctc gaagcagccc tccccaa	37
<210> 19	
<211> 37	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述:合成的寡聚核苷酸	
<400> 19	
ggatctcgac gctctcccta ccaggtccga caggtcc	37
<210> 20	
<211> 37	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述:合成的寡聚核苷酸	
<400> 20	
ggatctcgac gctctccctc atggacaagc ccgccaa	37
<210> 21	
<211> 38	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述:合成的寡聚核苷酸	
<400> 21	
ggatctcgac gctctccctg gaggacctgg accgtgtc	38
<210> 22	
<211> 37	
<212> DNA	

<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述:合成的寡聚核苷酸	
<400> 22	
ggatctcgac gctctccctc ctcaggggac gactccg	37
<210> 23	
<211> 53	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述:合成的寡聚核苷酸	
<400> 23	
acactctttc cctacacgac gctcttccga tctcttgcag gatgggccgg tga	53
<210> 24	
<211> 61	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述:合成的寡聚核苷酸	
<400> 24	
acactctttc cctacacgac gctcttccga tctcatctct ttgtcggtgg tattaactcc	60
a	61
<210> 25	
<211> 52	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述:合成的寡聚核苷酸	
<400> 25	
acactctttc cctacacgac gctcttccga tctacagggg cgaggtcatc ac	52
<210> 26	
<211> 53	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述:合成的寡聚核苷酸	
<400> 26	
acactctttc cctacacgac gctcttccga tcttggatgc actggagtca gca	53
<210> 27	

<211> 54	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述:合成的寡聚核苷酸	
<400> 27	
acactctttc cctacacgac gctcttccga tctctctccc aggggtttgc ctaa	54
<210> 28	
<211> 61	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述:合成的寡聚核苷酸	
<400> 28	
acactctttc cctacacgac gctcttccga tctgagatca ggtctgacaa gtctttctct	60
g	61
<210> 29	
<211> 61	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述:合成的寡聚核苷酸	
<400> 29	
acactctttc cctacacgac gctcttccga tctgagatca ggtctgacaa gtctttctct	60
g	61
<210> 30	
<211> 54	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述:合成的寡聚核苷酸	
<400> 30	
acactctttc cctacacgac gctcttccga tctgagggtc accgcatgga caag	54
<210> 31	
<211> 53	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述:合成的寡聚核苷酸	

<400> 31	
acactcttttc cctacacgac gctcttccga tctcatcgtg gccttgacct cca	53
<210> 32	
<211> 53	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述:合成的寡聚核苷酸	
<400> 32	
acactcttttc cctacacgac gctcttccga tctgccaatg gcggactcaa acg	53
<210> 33	
<211> 51	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述:合成的寡聚核苷酸	
<400> 33	
acactcttttc cctacacgac gctcttccga tctctgcagg atgggccggt g	51
<210> 34	
<211> 55	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述:合成的寡聚核苷酸	
<400> 34	
acactcttttc cctacacgac gctcttccga tctagctcct tgtcgggtggt gttag	55
<210> 35	
<211> 51	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述:合成的寡聚核苷酸	
<400> 35	
acactcttttc cctacacgac gctcttccga tctcgtcagc ctccaccage t	51
<210> 36	
<211> 55	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	

〈223〉 人工序列的描述:合成的寡聚核苷酸	
〈400〉 36	
acactcttttc cctacacgac gctctttccga tctccagtgg tgtgttgag ctcac	55
〈210〉 37	
〈211〉 51	
〈212〉 DNA	
〈213〉 人工序列	
〈220〉	
〈223〉 人工序列的描述:合成的寡聚核苷酸	
〈400〉 37	
acactcttttc cctacacgac gctctttccga tctcccaagg ggcttgccca g	51
〈210〉 38	
〈211〉 54	
〈212〉 DNA	
〈213〉 人工序列	
〈220〉	
〈223〉 人工序列的描述:合成的寡聚核苷酸	
〈400〉 38	
acactcttttc cctacacgac gctctttccga tctccgacag gtccttgtca gtgg	54
〈210〉 39	
〈211〉 51	
〈212〉 DNA	
〈213〉 人工序列	
〈220〉	
〈223〉 人工序列的描述:合成的寡聚核苷酸	
〈400〉 39	
acactcttttc cctacacgac gctctttccga tctcccgcca actgcacaca c	51
〈210〉 40	
〈211〉 54	
〈212〉 DNA	
〈213〉 人工序列	
〈220〉	
〈223〉 人工序列的描述:合成的寡聚核苷酸	
〈400〉 40	
acactcttttc cctacacgac gctctttccga tctgtgtcct taccgtgacg tcca	54
〈210〉 41	
〈211〉 52	
〈212〉 DNA	
〈213〉 人工序列	

<220>	
<223> 人工序列的描述:合成的寡聚核苷酸	
<400> 41	
acactcttttc cctacacgac gctcttccga tctcgactcc gtgtttgccc ac	52
<210> 42	
<211> 64	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述:合成的寡聚核苷酸	
<400> 42	
aatgatacgg cgaccaccga gatctacact agatcgacac ctcttttcct acacgacgct	60
cttc	64
<210> 43	
<211> 64	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述:合成的寡聚核苷酸	
<400> 43	
aatgatacgg cgaccaccga gatctacacc tctctataca ctcttttcct acacgacgct	60
cttc	64
<210> 44	
<211> 64	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述:合成的寡聚核苷酸	
<400> 44	
aatgatacgg cgaccaccga gatctacact atcctctaca ctcttttcct acacgacgct	60
cttc	64
<210> 45	
<211> 64	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述:合成的寡聚核苷酸	
<400> 45	
aatgatacgg cgaccaccga gatctacaca gagtagaaca ctcttttcct acacgacgct	60

cttc	64
<210> 46	
<211> 64	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述:合成的寡聚核苷酸	
<400> 46	
aatgatacgg cgaccaccga gatctacacg taaggagaca ctcttttcct acacgacgct	60
cttc	64
<210> 47	
<211> 64	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述:合成的寡聚核苷酸	
<400> 47	
aatgatacgg cgaccaccga gatctacaca ctgcataaca ctcttttcct acacgacgct	60
cttc	64
<210> 48	
<211> 64	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述:合成的寡聚核苷酸	
<400> 48	
aatgatacgg cgaccaccga gatctacaca aggagtaaca ctcttttcct acacgacgct	60
cttc	64
<210> 49	
<211> 64	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述:合成的寡聚核苷酸	
<400> 49	
aatgatacgg cgaccaccga gatctacacc taagcctaca ctcttttcct acacgacgct	60
cttc	64
<210> 50	
<211> 66	

<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述:合成的寡聚核苷酸	
<400> 50	
caagcagaag acggcatacg agattcgcct tagtgactgg agttcagacg tgtgctcttc	60
cgatct	66
<210> 51	
<211> 66	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述:合成的寡聚核苷酸	
<400> 51	
caagcagaag acggcatacg agatctagta cggtagactgg agttcagacg tgtgctcttc	60
cgatct	66
<210> 52	
<211> 66	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述:合成的寡聚核苷酸	
<400> 52	
caagcagaag acggcatacg agatttctgc ctgtgactgg agttcagacg tgtgctcttc	60
cgatct	66
<210> 53	
<211> 66	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述:合成的寡聚核苷酸	
<400> 53	
caagcagaag acggcatacg agatgctcag gaggactgg agttcagacg tgtgctcttc	60
cgatct	66
<210> 54	
<211> 66	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	

<223> 人工序列的描述:合成的寡聚核苷酸

<400> 54

caagcagaag acggcatacg agataggagt ccgtgactgg agttcagacg tgtgctcttc 60
cgatct 66

<210> 55

<211> 66

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡聚核苷酸

<400> 55

caagcagaag acggcatacg agatcatgcc tagtgactgg agttcagacg tgtgctcttc 60
cgatct 66

<210> 56

<211> 66

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡聚核苷酸

<400> 56

caagcagaag acggcatacg agatgtagag aggtgactgg agttcagacg tgtgctcttc 60
cgatct 66

<210> 57

<211> 66

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡聚核苷酸

<400> 57

caagcagaag acggcatacg agatcctctc tggtagactgg agttcagacg tgtgctcttc 60
cgatct 66

<210> 58

<211> 66

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡聚核苷酸

<400> 58

caagcagaag acggcatacg agatagcgta gcgtgactgg agttcagacg tgtgctcttc 60

cgatct	66
<210> 59	
<211> 66	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述:合成的寡聚核苷酸	
<400> 59	
caagcagaag acggcatacg agatcagcct cggtgactgg agttcagacg tgtgctcttc	60
cgatct	66
<210> 60	
<211> 66	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述:合成的寡聚核苷酸	
<400> 60	
caagcagaag acggcatacg agattgcctc ttgtgactgg agttcagacg tgtgctcttc	60
cgatct	66
<210> 61	
<211> 66	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述:合成的寡聚核苷酸	
<400> 61	
caagcagaag acggcatacg agattcctct acgtgactgg agttcagacg tgtgctcttc	60
cgatct	66
<210> 62	
<400> 62	
000	
<210> 63	
<400> 63	
000	
<210> 64	
<400> 64	
000	
<210> 65	
<400> 65	

000

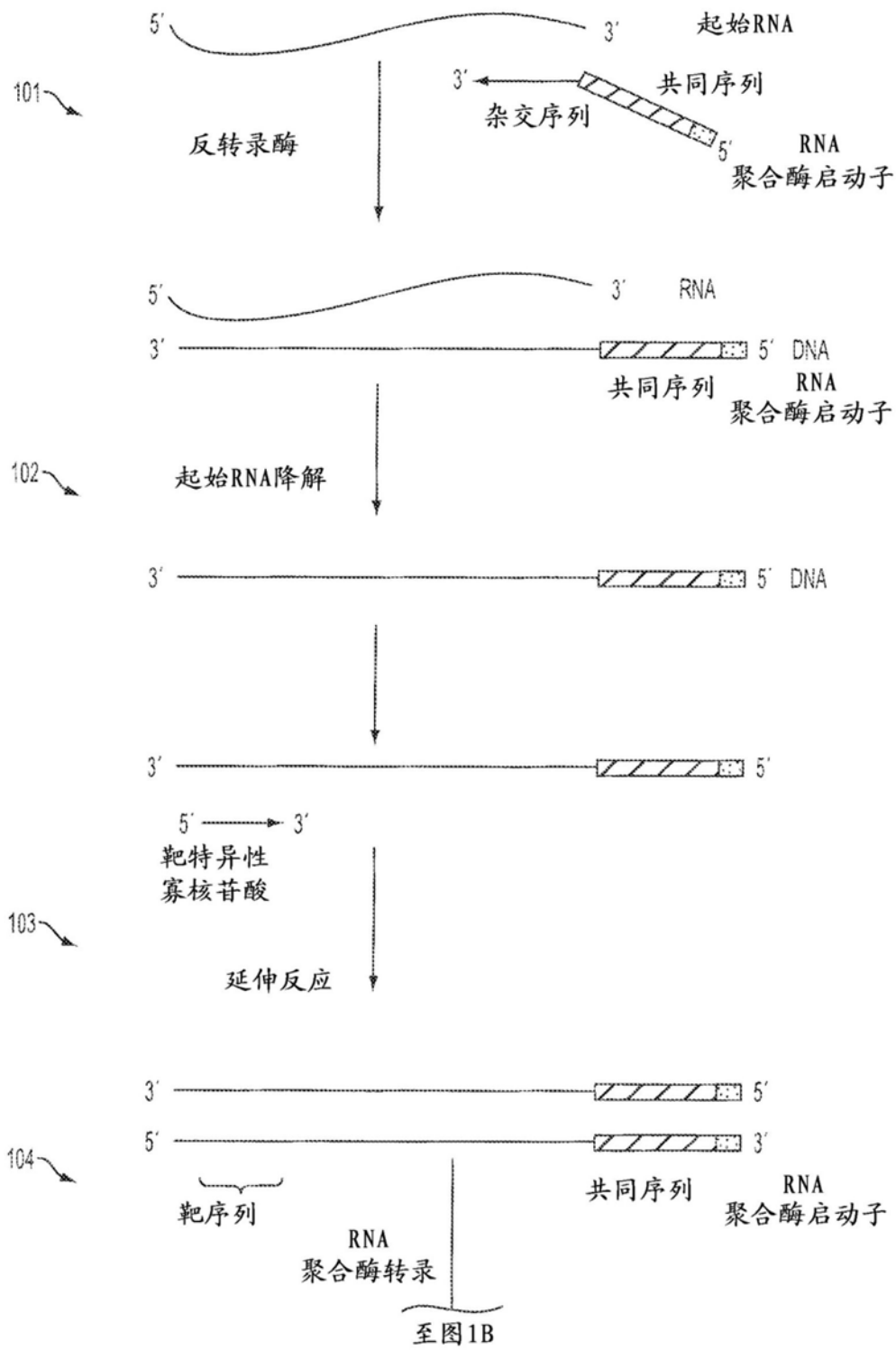


图1A

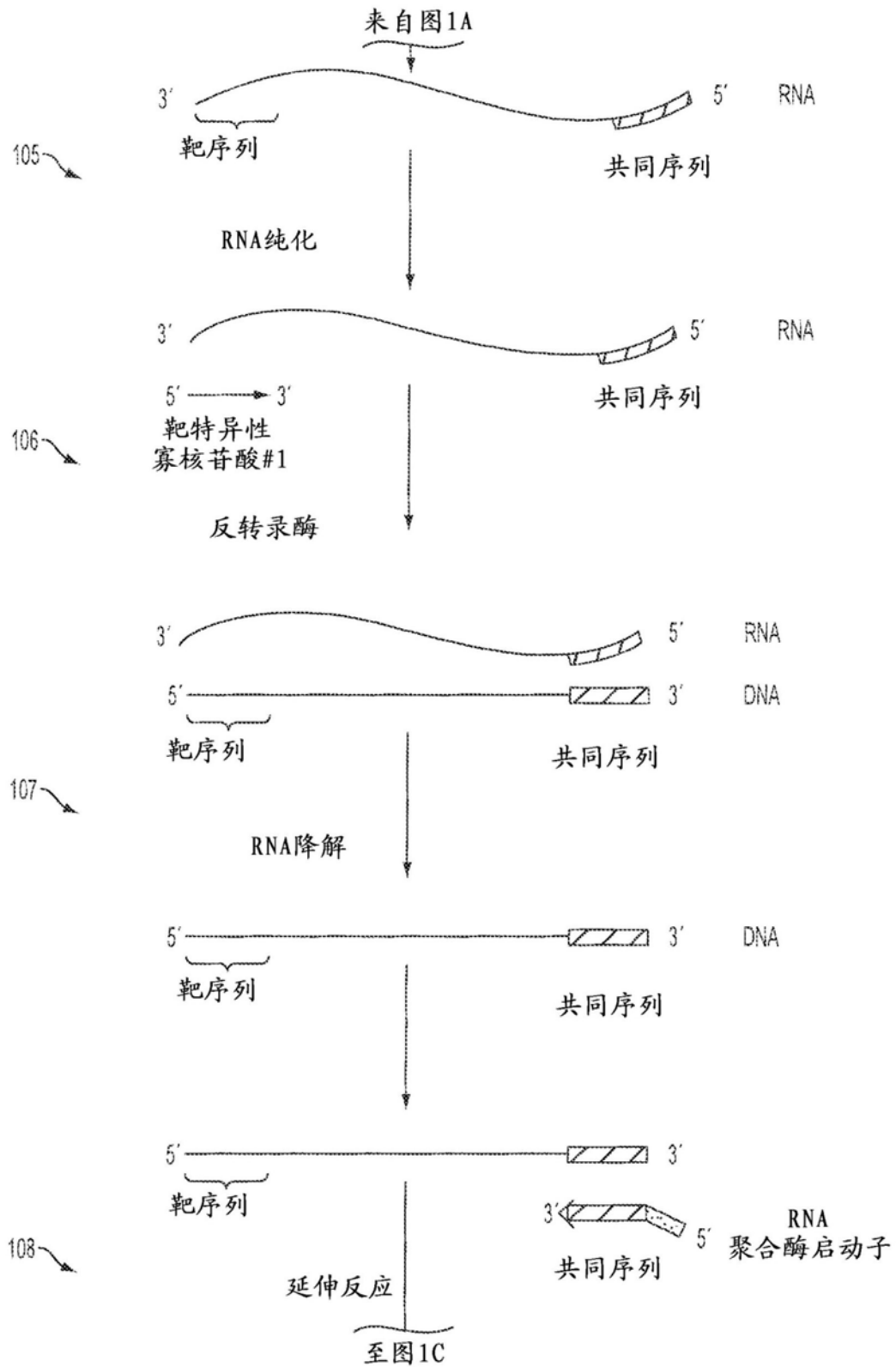


图1B

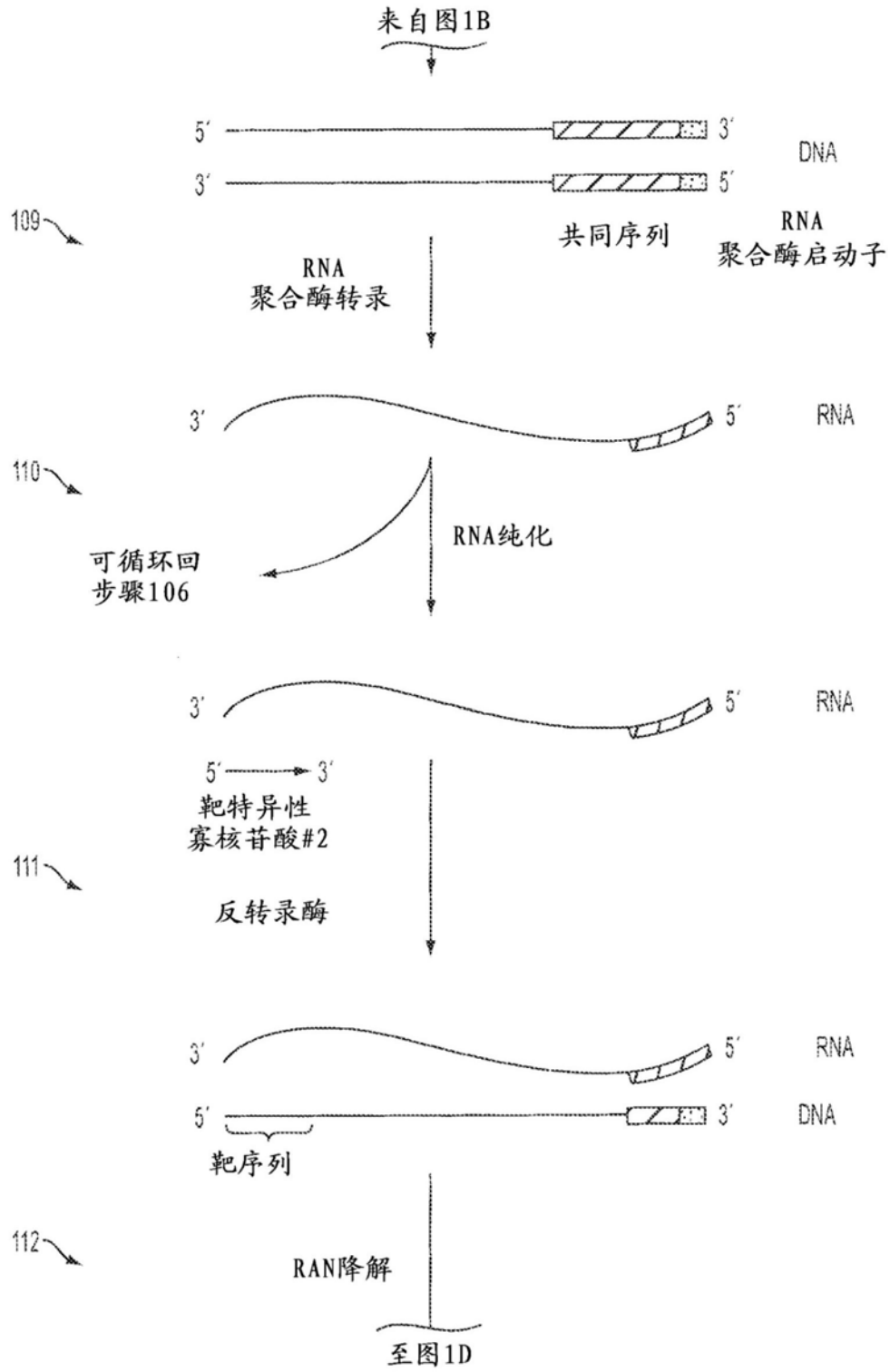


图1C

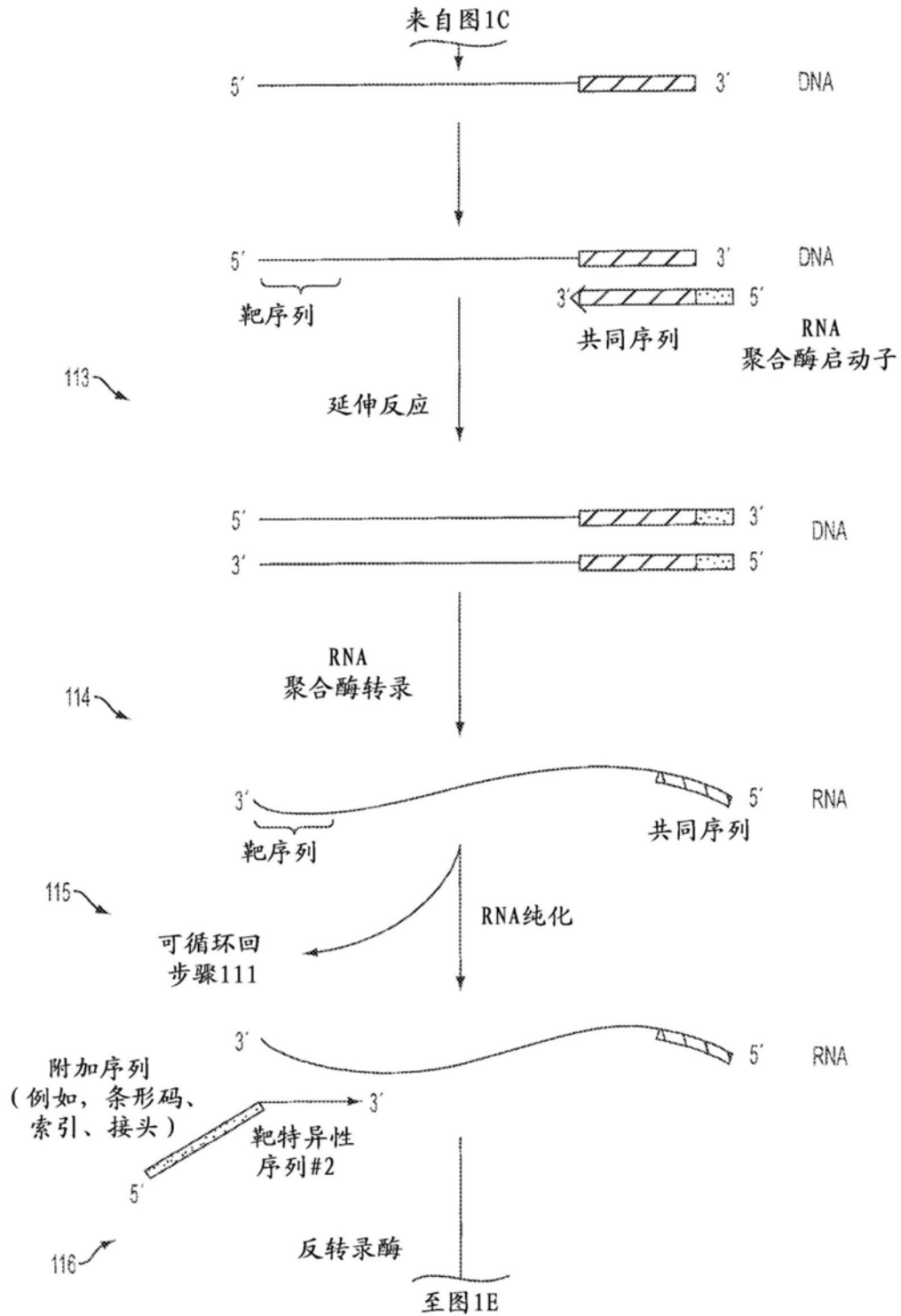


图1D

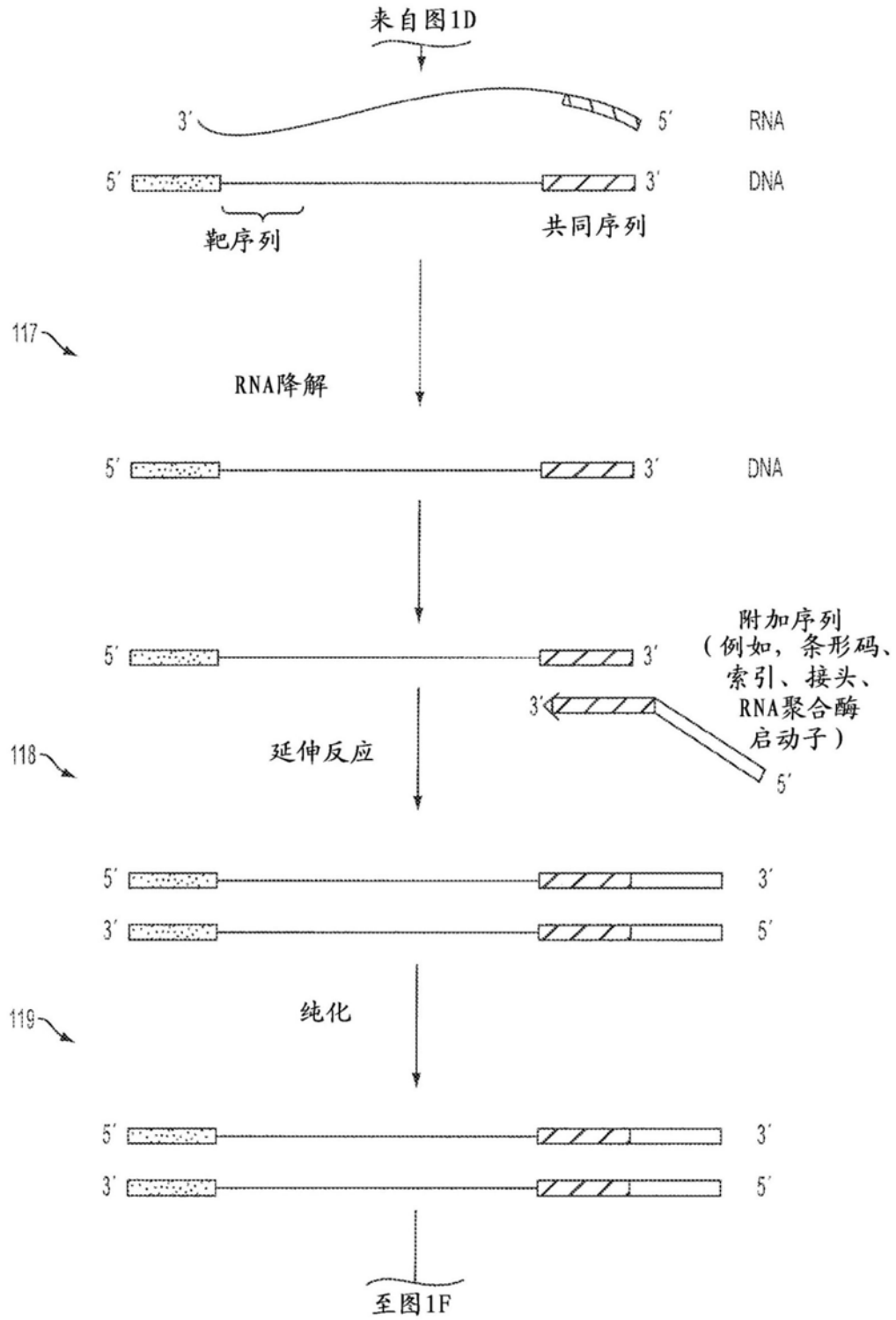


图1E

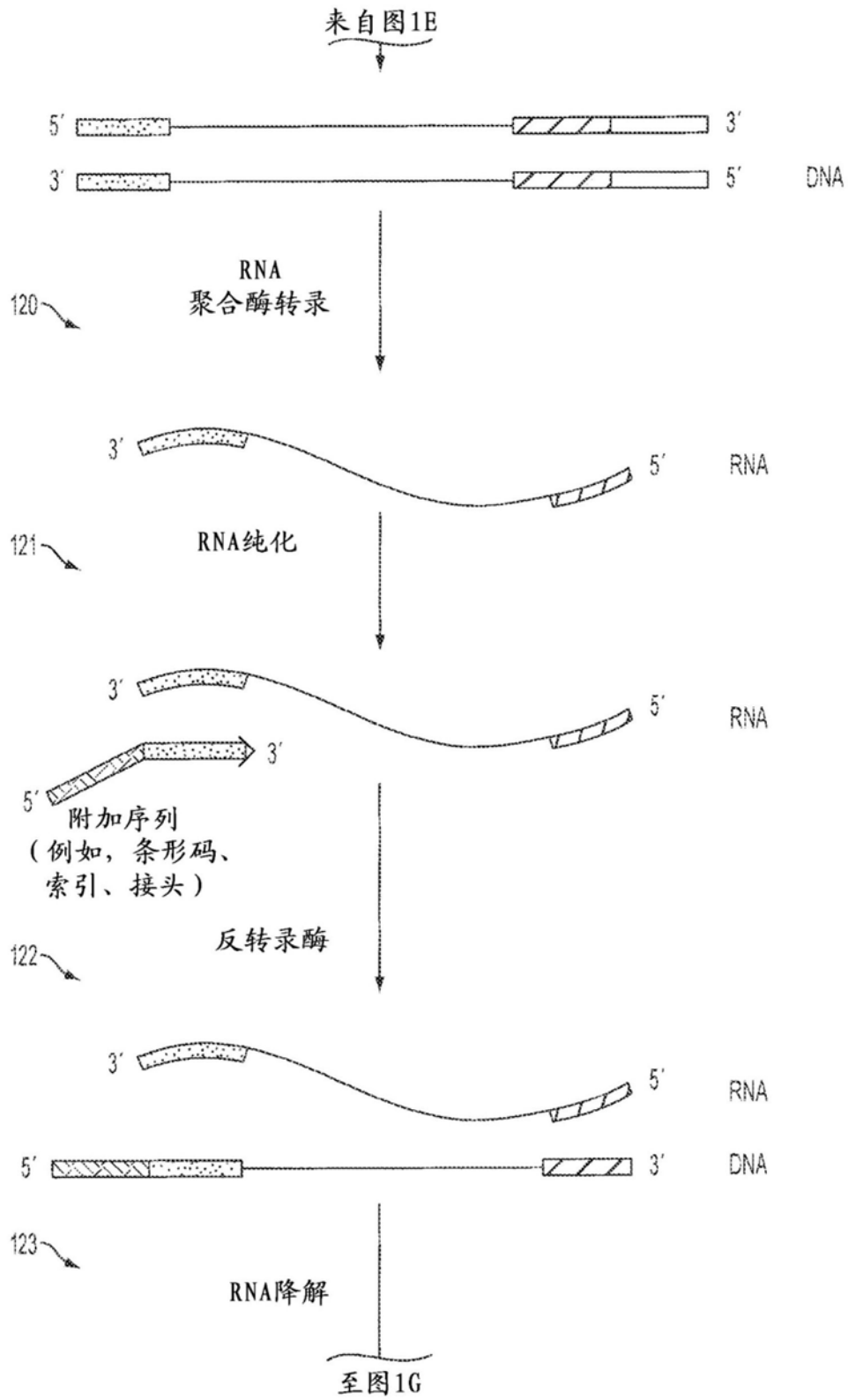


图1F

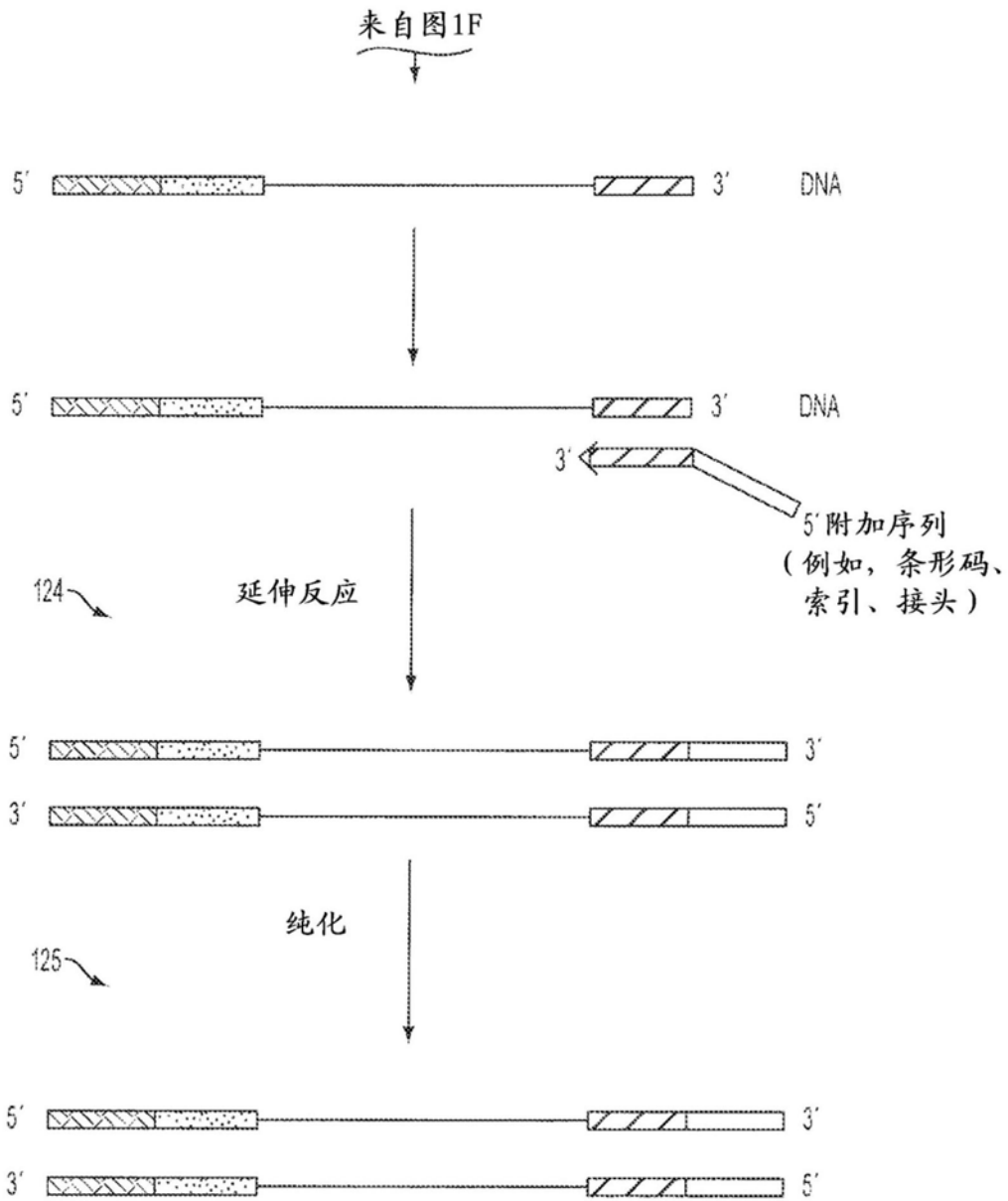


图1G

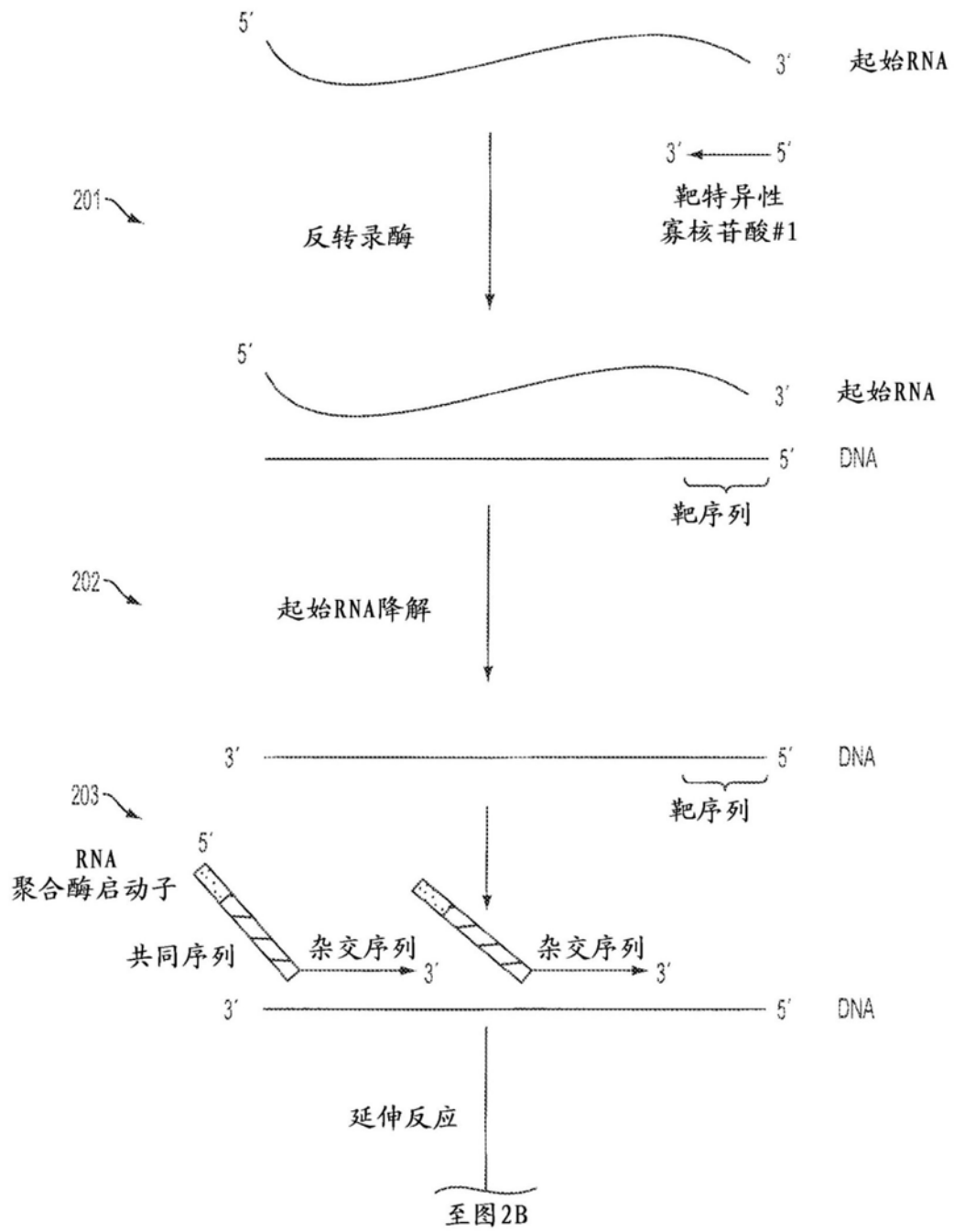
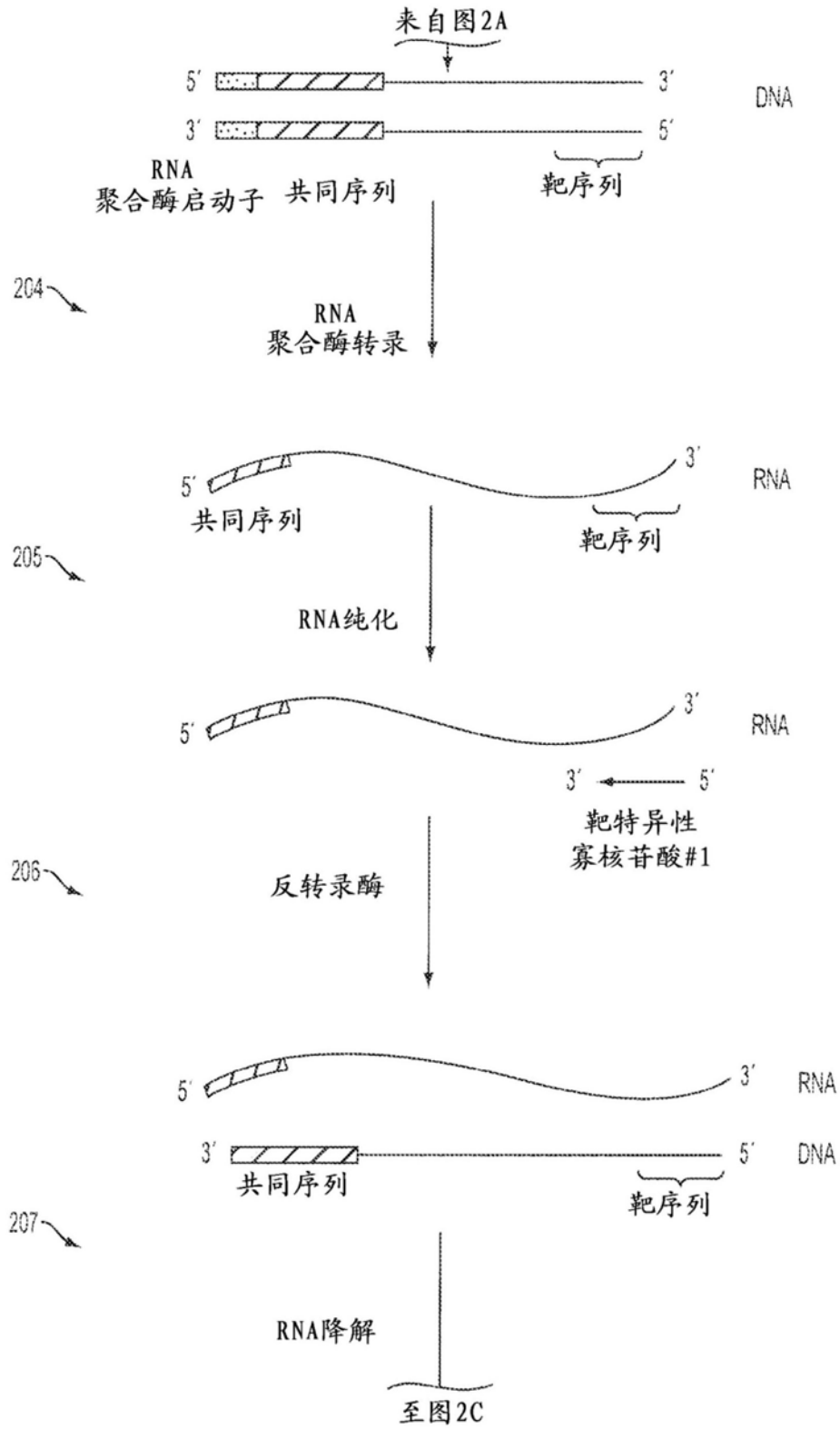


图2A



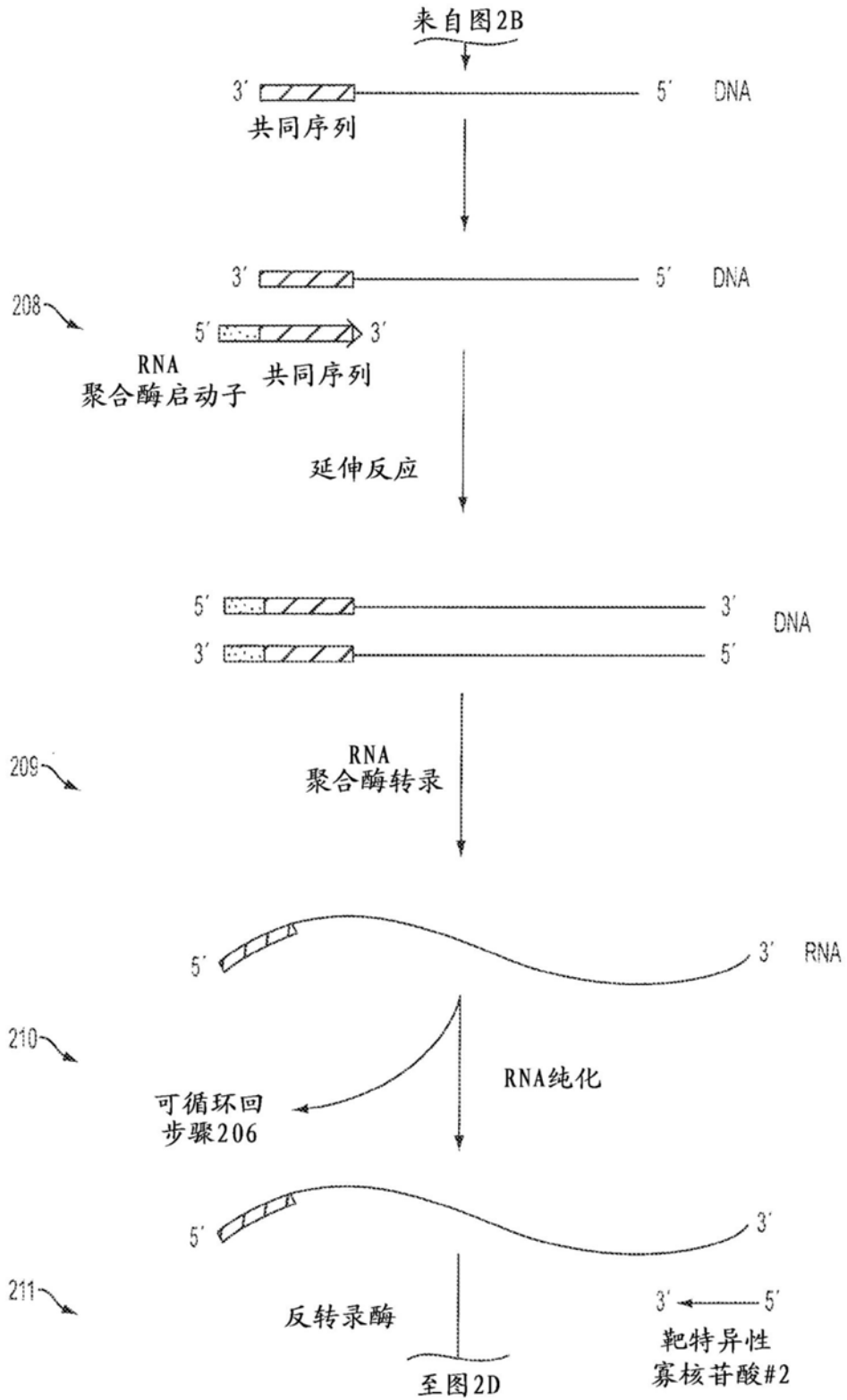


图2C

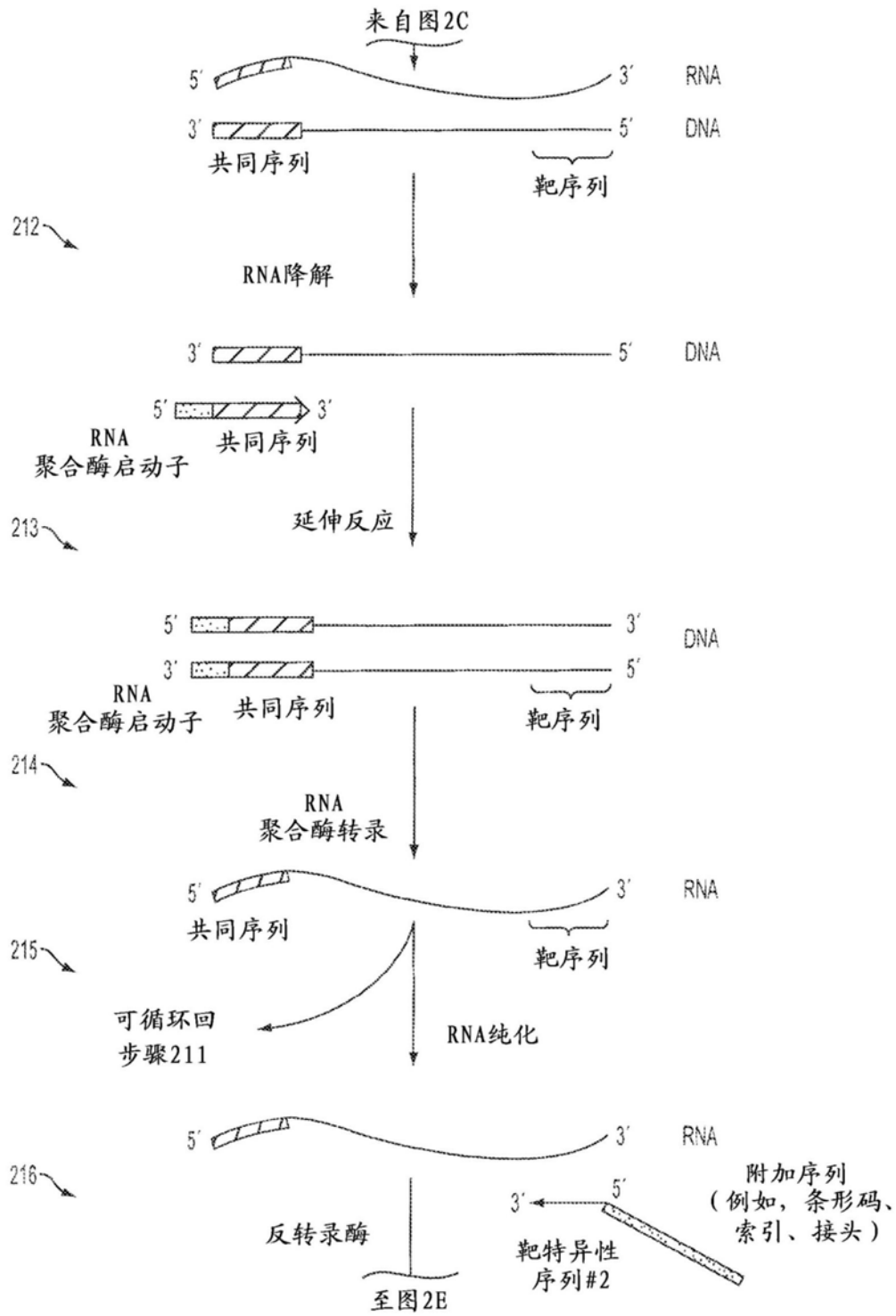


图2D

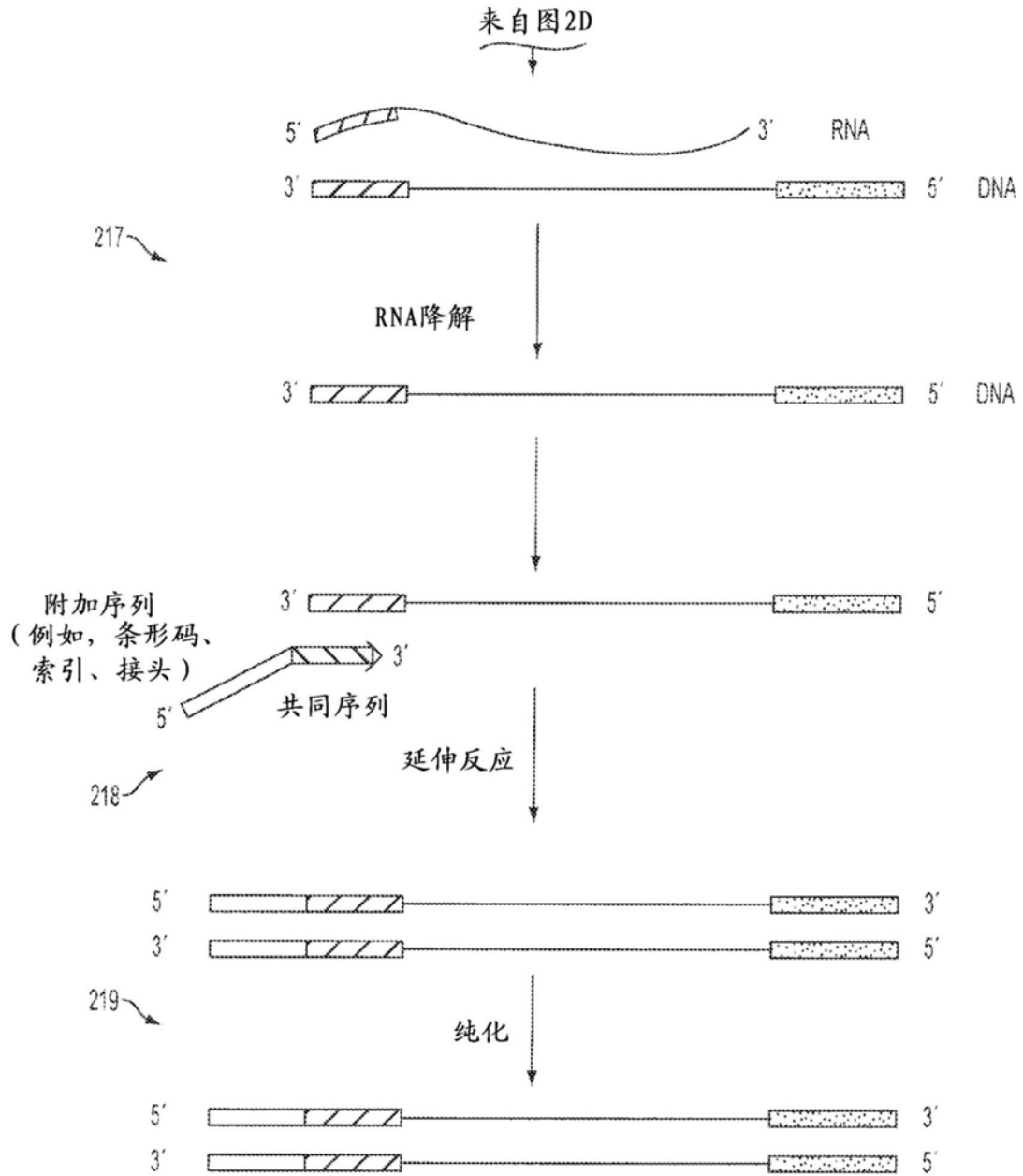


图2E

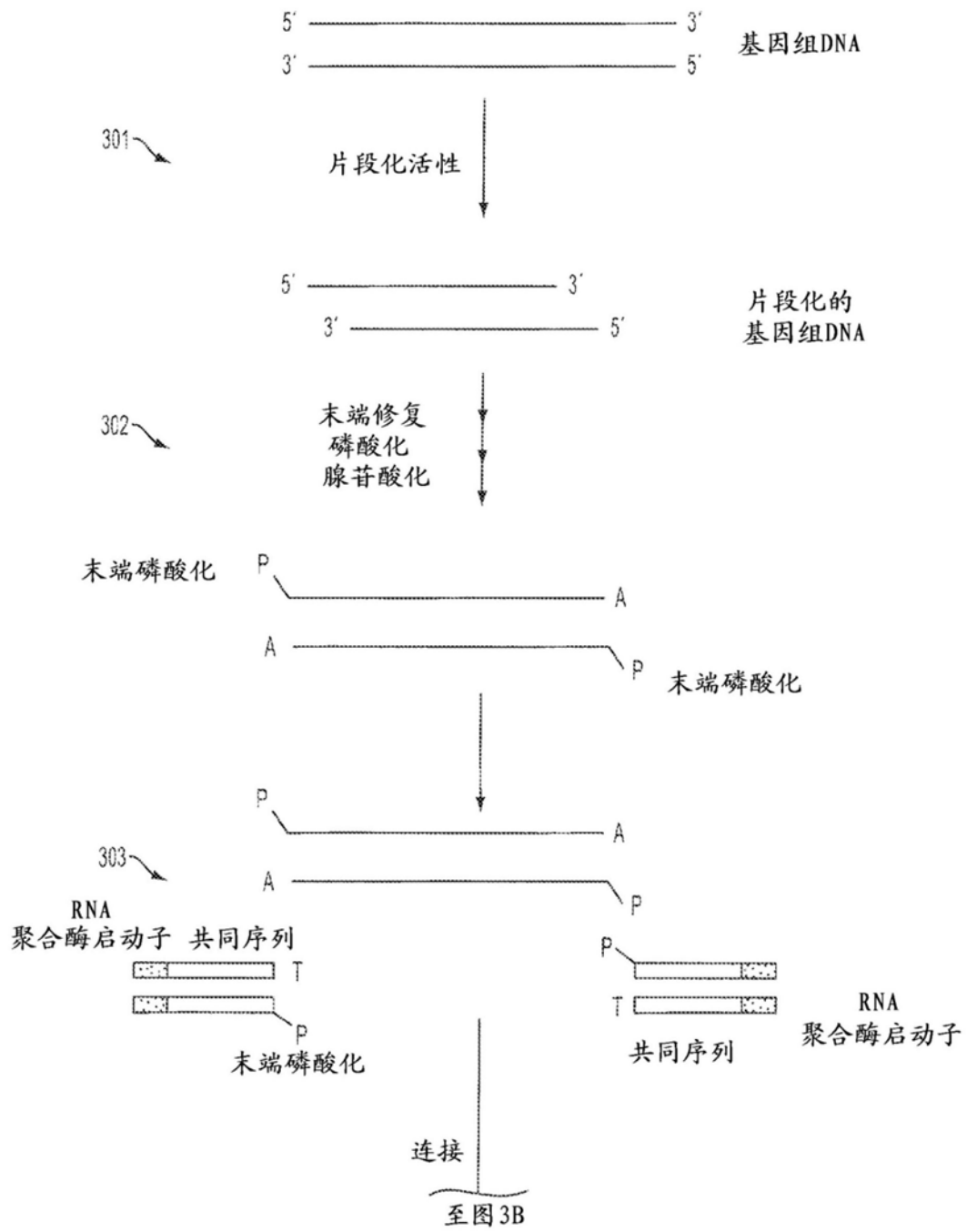


图3A

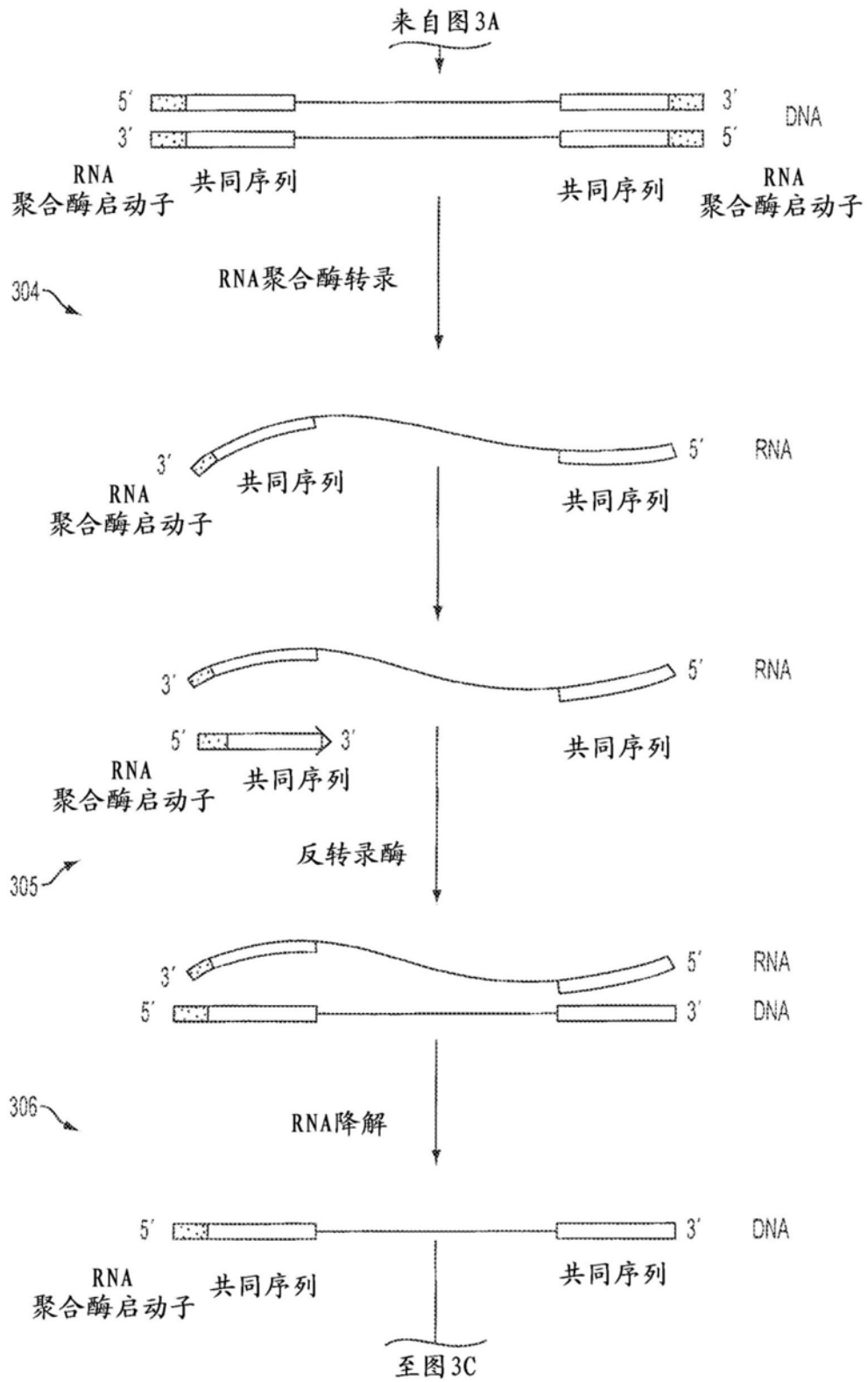


图3B

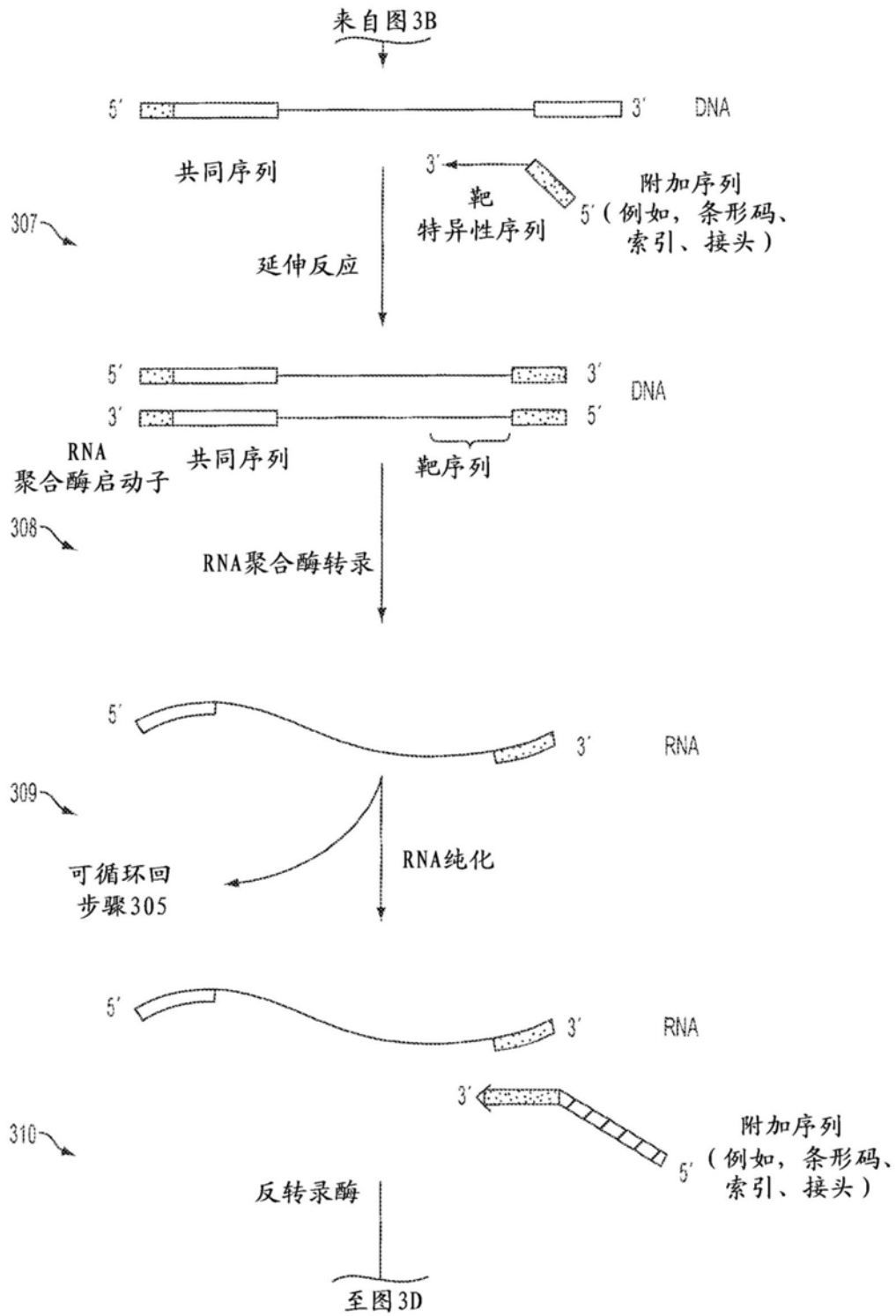


图3C

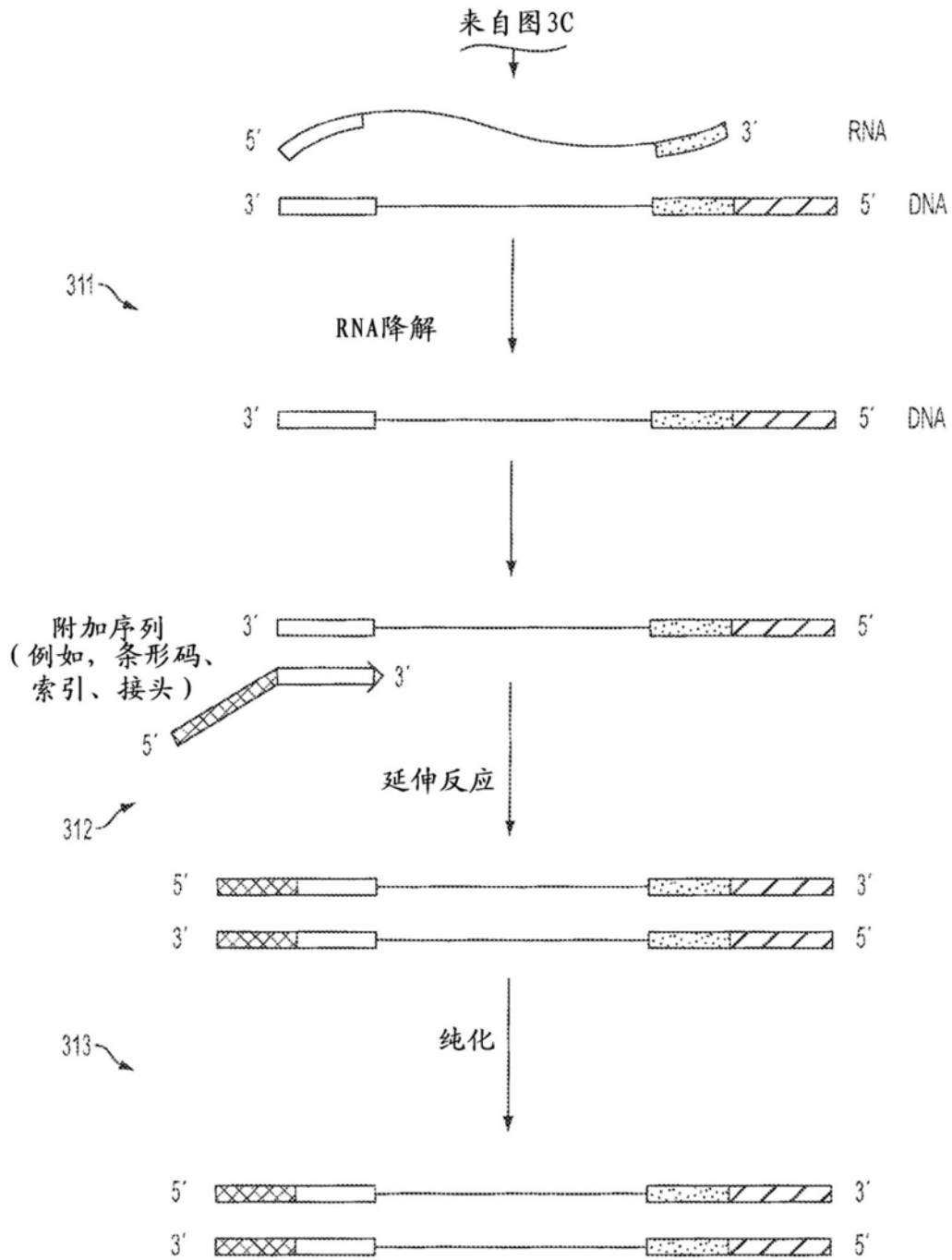


图3D

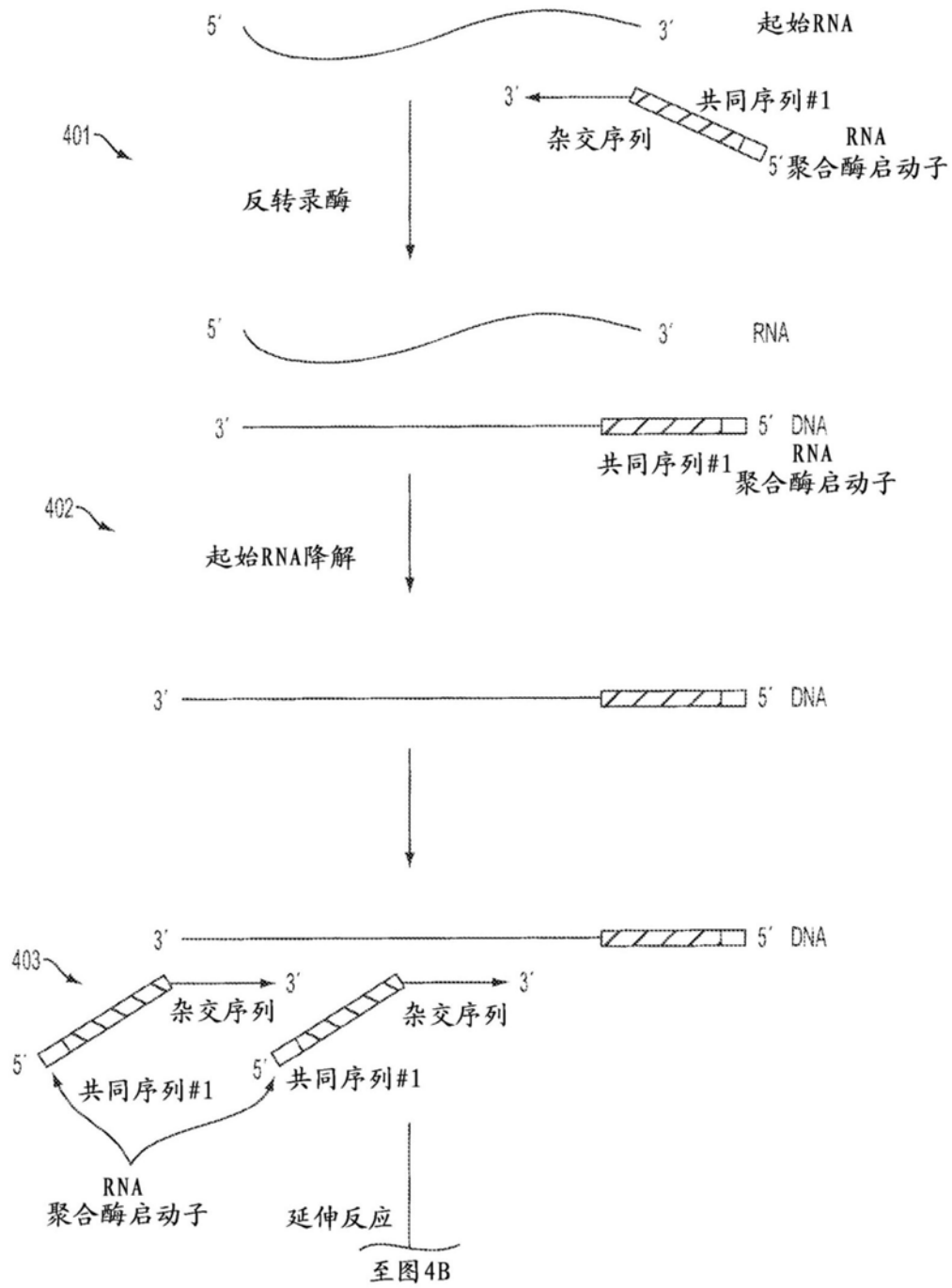


图4A

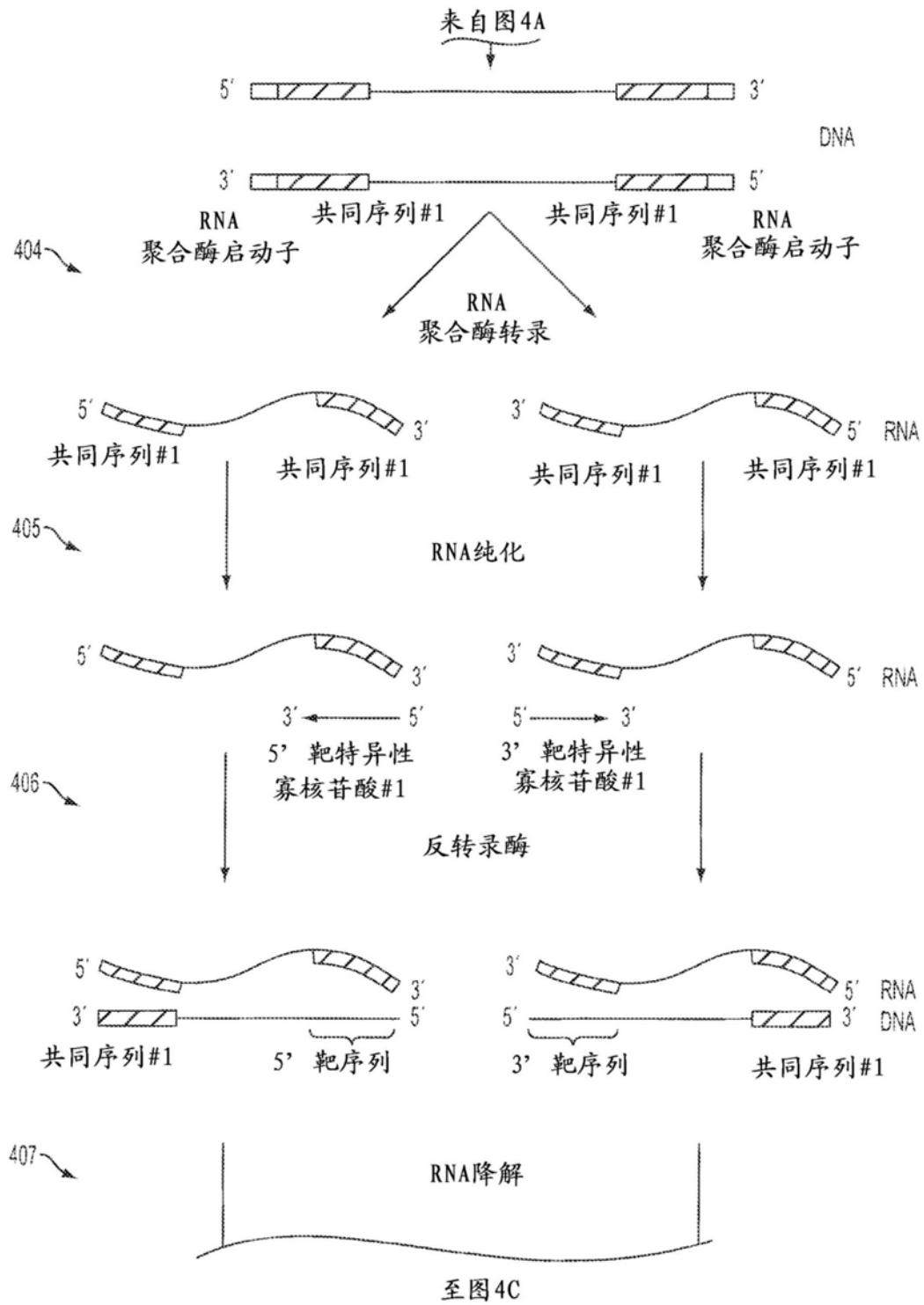


图4B

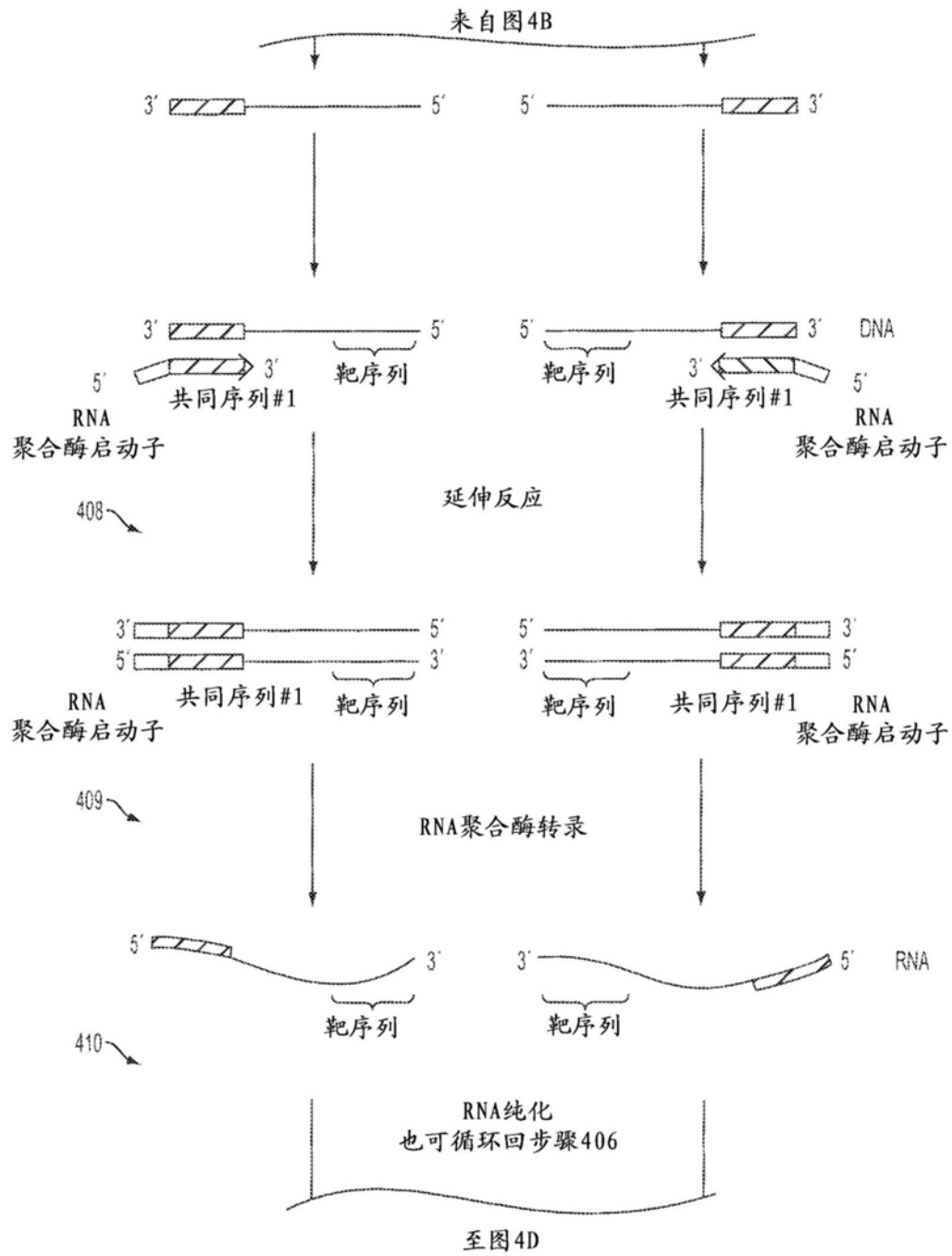


图4C

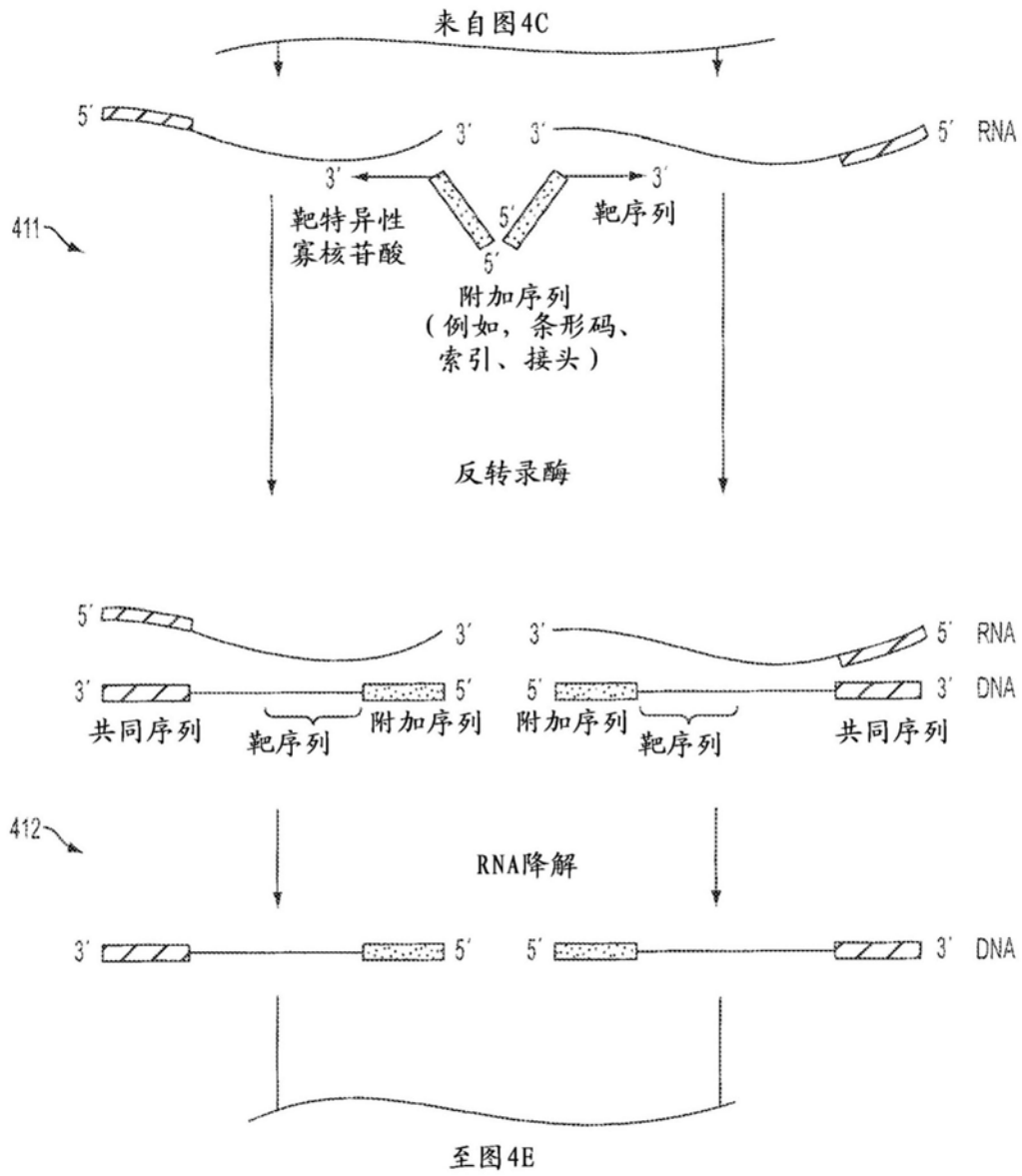


图4D

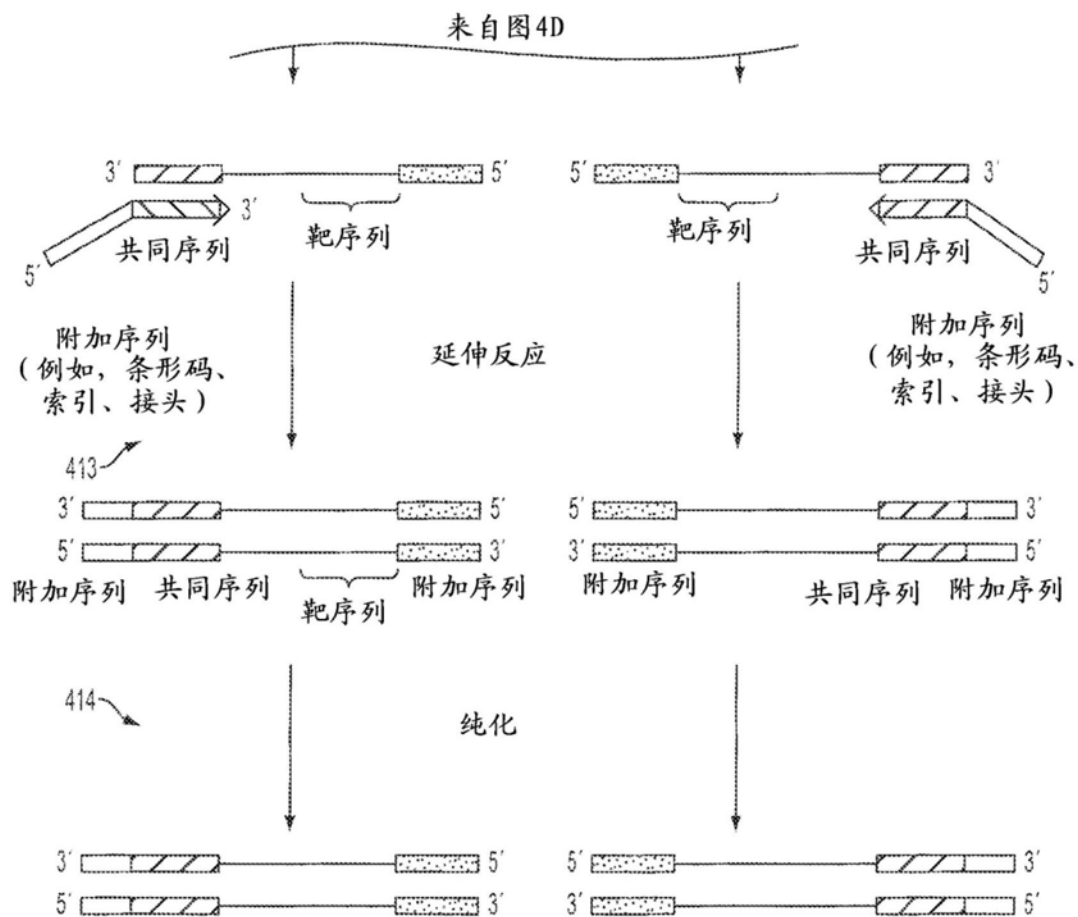


图4E