



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I865427 B

(45)公告日：中華民國 113 (2024) 年 12 月 11 日

(21)申請案號：106142279

(22)申請日：中華民國 106 (2017) 年 12 月 01 日

(51)Int. Cl. : C12Q1/6827 (2018.01)

C12Q1/6886 (2018.01)

(30)優先權：2016/12/01 美國

62/428,893

(71)申請人：英商牛津生物力學公眾有限公司 (英國) OXFORD BIODYNAMICS PLC (GB)
英國

(72)發明人：葛藍德 法蘭西斯 黑克特 GRAND, FRANCIS HECTOR (GB)；瑞瑪達斯 阿洛爾 賽爾凡 RAMADASS, AROUL SELVAM (GB)；阿考里特雀夫 艾力山卓 AKOULITCHEV, ALEXANDRE (GB)；杭特 伊旺 HUNTER, EWAN (GB)

(74)代理人：陳長文

(56)參考文獻：

WO 2009147386A1

期刊 Flavahan et al., "Insulator dysfunction and oncogene activation in IDH mutant gliomas", Nature, Vol. 529, 23 December 2015, Pages 110-114

審查人員：林佳慧

申請專利範圍項數：2 項 圖式數：9 共 103 頁

(54)名稱

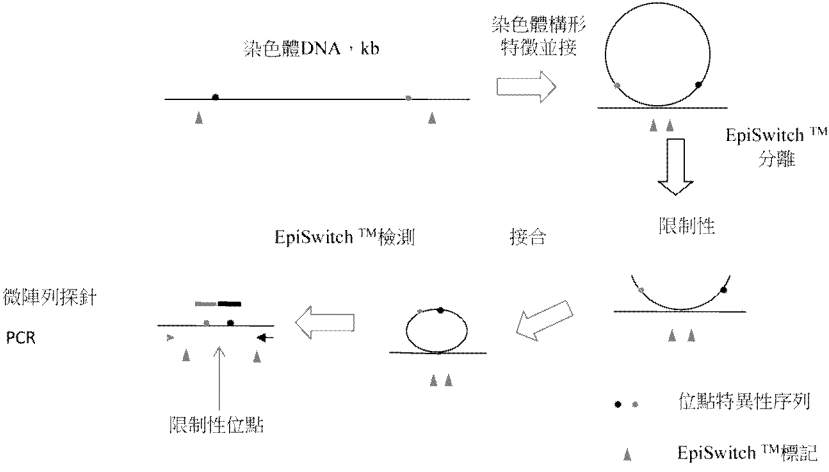
測定癌症預後之方法

(57)摘要

本發明提供一種測定表觀遺傳染色體交互作用的方法，該表觀遺傳染色體交互作用與一種癌症預後伴隨表觀遺傳測試相關。

The invention provides a method of determining the epigenetic chromosome interactions which are relevant to a prognostic companion epigenetic test for cancer.

指定代表圖：



【圖1】



I865427

【發明摘要】

【中文發明名稱】

測定癌症預後之方法

【英文發明名稱】

METHOD OF DETERMINING PROGNOSIS FOR A CANCER

【中文】

本發明提供一種測定表觀遺傳染色體交互作用的方法，該表觀遺傳染色體交互作用與一種癌症預後伴隨表觀遺傳測試相關。

【英文】

The invention provides a method of determining the epigenetic chromosome interactions which are relevant to a prognostic companion epigenetic test for cancer.

【指定代表圖】

圖1

【代表圖之符號簡單說明】

無

【發明說明書】

【中文發明名稱】

測定癌症預後之方法

【英文發明名稱】

METHOD OF DETERMINING PROGNOSIS FOR A CANCER

【技術領域】

本發明係關於檢測染色體交互作用。

【先前技術】

全球人類期望在所有技術態樣，且特定言之在藥物領域中快捷及有效的服務。個人化療法之改良通常依賴於使用諸如蛋白質、mRNA、抗體及SNP標記之生物標記。

【發明內容】

本發明者已研究染色體交互作用在癌症預後中之角色。其研究顯示，特異性染色體交互作用與特定結果相關聯，該等結果諸如對療法之反應。作為此研究之部分，本發明者亦已研發出一種尤其適合於檢測在檢測染色體交互作用期間產生之接合核酸之新穎表觀遺傳測試分析法。

因此，本發明提供一種測定表觀遺傳染色體交互作用之方法，該等表觀遺傳染色體交互作用與一種區別子群之間之癌症預後伴隨表觀遺傳測試相關，該方法包含使來自子群之第一組核酸與表示染色體交互作用之指標群體的第二組核酸接觸，及使互補序列雜交，其中第一組核酸及第二組核酸中之核酸表示包含來自在表觀遺傳染色體交互作用中已聚集在一起的兩個染色體區的序列的接合產物，且其中第一組核酸與第二組核酸之間的雜交圖案允許測定何種表觀遺傳染色體交互作用特定出現於該群體中的子群，其中該等子群在與預後相關之至少一個特徵上有差異。通常該等子群

在對酪胺酸激酶抑制劑療法反應方面有差異，及/或該癌症與自激酶基因及/或酪胺酸激酶受體基因之異常表現相關聯，及/或該癌症與以下一或多種基因之遺傳或表觀遺傳改變相關聯：FIP1L1、PDGFRA、Flt3、ABL1、FGFR1及cKIT。

本發明亦提供一種測定癌症預後之方法，該方法包含：(a)對已藉由以上方法鑑別之染色體交互作用分型，及/或(b)檢測與(i)對酪胺酸激酶抑制劑療法反應及/或(ii)自激酶基因及/或酪胺酸激酶受體基因異常表現及/或(iii)以下一或多種基因相關之至少一個表觀遺傳染色體交互作用存在或不存在：FIP1L1、PDGFRA、Flt3、ABL1、FGFR1及cKIT。

本發明進一步提供一種用於使用在PCR反應期間活化後可檢測之探針定量檢測與染色體交互作用相關之接合序列，其中該接合序列包含來自在表觀遺傳染色體交互作用中聚集在一起之兩個染色體區的序列，其中該方法包含使接合序列與探針在PCR反應期間接觸，及檢測探針活化之程度，且其中該探針結合接合位點。該方法允許使用雙標記螢光水解探針以MIQE順應性方式檢測的特定交互作用。

申請人之研究第一次為行業提供一種用於測定腫瘤情形預後之MIQE順應性染色體構形(3C)分析。

【圖式簡單說明】

圖1為3C方法之示意圖。3C意謂染色體構形捕獲(chromatin conformation capture/chromosome conformation capture)。

圖2為曲率及彎曲性相對於接合序列1之序列位置之圖。以度/10.5 bp螺旋圈為單位之預測曲率以黑色(在左邊Y軸上，評分0至9)展示，及以a.u.為單位之彎曲性以灰色(在右邊Y軸上，評分4至6.5)展示。自0至500之鹼基對序號展示於X軸上。

圖3為曲率及彎曲性相對於接合序列2之序列位置之圖。以度/10.5 bp螺旋圈為單位之預測曲率以黑色(在左邊Y軸上，評分0至12)展示，及以a.u.為單位之彎曲性以灰色(在右邊Y軸上，評分3至6.5)展示。自0至700之鹼基對序號展示於X軸上。

圖4為曲率及彎曲性相對於接合序列3之序列位置之圖。以度/10.5 bp螺旋圈為單位之預測曲率以黑色(在左邊Y軸上，評分0至9)展示，及以a.u.為單位之彎曲性以灰色(在右邊Y軸上，評分4至6)展示。自0至450之鹼基對序號展示於X軸上。

圖5為曲率及彎曲性相對於接合序列4之序列位置之圖。以度/10.5 bp螺旋圈為單位之預測曲率以黑色(在左邊Y軸上，評分0至10)展示，及以a.u.為單位之彎曲性以灰色(在右邊Y軸上，評分3至7)展示。自0至500之鹼基對序號展示於X軸上。

圖6為曲率及彎曲性相對於接合序列5之序列位置之圖。以度/10.5 bp螺旋圈為單位之預測曲率以黑色(在左邊Y軸上，評分0至9)展示，及以a.u.為單位之彎曲性以灰色(在右邊Y軸上，評分3至6.5)展示。自0至700之鹼基對序號展示於X軸上。

圖7為曲率及彎曲性相對於接合序列6之序列位置之圖。以度/10.5 bp螺旋圈為單位之預測曲率以黑色(在左邊Y軸上，評分0至12)展示，及以a.u.為單位之彎曲性以灰色(在右邊Y軸上，評分3至6.5)展示。自0至600之鹼基對序號展示於X軸上。

圖8及圖9展示關於治療性實施例之資料。

【實施方式】

本發明係關於鑑別特定異常方法，特定言之用穩固定量測試。本發明具有若干不同態樣，其尤其包括：

- 一種用於鑑別與不同子群相關之表觀遺傳染色體交互作用之方法
- 一種用於鑑別個體之子群之方法
- 一種定量檢測與染色體交互作用相關之接合序列之方法
- 一種在PCR反應期間活化後可檢測之水解探針，其中該探針結合接合核酸之接合位點
- 一種選擇用於PCR反應之引子及探針之方法
- 一種治療癌症之方法
- 一種用於治療癌症之核酸
- 一種鑑別治療劑之方法。

與本發明相關之癌症

本發明係關於與癌症相關之表觀遺傳交互作用，例如由不同遺傳機制(諸如酶之突變(包括由DNA之去甲基化造成之彼等突變))引起或由可替代的基因剪接或由斷點突變引起之癌症。癌症可由受體之上調引起。癌症可與自激酶基因及/或酪胺酸激酶受體基因之異常表現相關聯，例如細胞質激酶基因及/或絲胺酸/蘇胺酸激酶基因。癌症可與以下一或多種基因之遺傳或表觀遺傳改變相關聯：FIP1L1、PDGFRA、Flt3、ABL1、FGFR1及cKIT。癌症可與對ATP模擬物敏感之蛋白質之遺傳或表觀遺傳改變相關聯，視情況酪胺酸激酶基因，諸如ABL1、布魯東氏酪胺酸激酶(Bruton's Tyrosine Kinase)、cKIT FGFR1、PDGFRA及PDGFRB。當表現時，酪胺酸激酶基因(ABL1、布魯東氏、cKIT、FGFR1及PDGFRA)在功能上通常分類為『致癌基因』。對ATP模擬物敏感之蛋白質之遺傳或表觀遺傳改變可歸因於使對ATP模擬物敏感之蛋白質之上調的基因的表現改變。舉例而言，認為FIP1L1直接上調PDGFRA mRNA表現。

癌症可為白血病、骨髓增生腫瘤、腫瘤、肺癌或卵巢癌。癌症可選

自以下各者：特發性嗜伊紅白血球增多症候群(iHES)、慢性及急性嗜伊紅球性白血病、慢性骨髓性白血病(CML)、急性骨髓性白血病(AML)、急性淋巴球性白血病(ALL)、PDGFRA陽性非小細胞肺癌(NSCLC)、神經膠母細胞瘤(包括多形性神經膠母細胞瘤及星形細胞瘤)、前列腺癌、晚期卵巢癌、腸胃基質腫瘤(GIST)及腎細胞癌。

分型之染色體交互作用

本發明係關於對染色體交互作用之分型，例如與癌症及/或對酪胺酸激酶抑制劑療法反應相關聯的彼等染色體交互作用。染色體交互作用將影響疾病之態樣或與其相關聯，諸如在本文中之疾病病狀中之任一者上。染色體交互作用可影響對疾病之敏感性、對療法之反應或復發之可能性，或與其相關聯。染色體交互作用可影響患者及/或患者子群之預後，或與其相關聯。本文中揭示特異性染色體交互作用、基因及區，且在一個實施例中，可對彼等染色體交互作用或彼等基因及區中之染色體交互作用進行分型。較佳區揭示為表1a中之範圍。本文中揭示特異性接合序列。染色體交互作用之分型可能需要檢測此類接合序列或其同源物及/或片段。

較佳染色體交互作用、基因及區(基因體位置)展示於各表中，該等表包括表5、表6、表7、表8、表9、表10、表11、表12、表13及表14。其他較佳染色體交互作用為可使用本文中提及之任何核酸(例如探針或引子對)定義或檢測之彼等。

分型之染色體交互作用可為或可不為基因(包括編碼序列)與其調節區(諸如啟動子)之間存在的染色體交互作用。

染色體交互作用可與基因之失調(例如增強子之活性之改變(諸如增加或降低))相關聯。染色體交互作用可與突變相關聯，諸如斷點突變，其產生融合基因體(染色體)產物(其可或可不引起已更改活性之融合蛋白質之

表現)。

斷點突變可為：

- 本文中提及之任何此類突變，或
- 在本文中提及之任何基因內，跨越本文中提及之任何基因或包括本文中提及之任何基因，或
- 與癌症相關聯或引起癌症之斷點突變。

斷裂點突變可為至少1,000個核苷酸、10,000個核苷酸、50,000個核苷酸、100,000個核苷酸、500,000個核苷酸，諸如至少800,000個核苷酸長度，其表示缺失片段之長度。

預後

如本文所使用，預後係指預測醫學病狀之可能病程，諸如一或多個結果。預後因子為例如在治療或未治療個體中客觀地可量測及提供關於癌症疾病之可能結果之資訊的臨床或生物特徵。預測因子可提供關於自治療之可能益處(例如關於腫瘤縮小或存活之任一者)之資訊。此類預測因子可用於鑑別最可能獲益於既定療法之患者亞群。標記可具有關於預後以及預測自治療之可能益處的特性。

激酶

本發明可能係關於激酶基因或激酶受體基因之改變，例如表現之改變及/或表觀遺傳形式之改變及/或遺傳(基因體序列)改變，且此與癌症相關聯及/或引起癌症。因此，通常癌症可與激酶基因及/或酪胺酸激酶受體之異常表現相關聯。在一個實施例中，癌症與細胞質酪胺酸激酶(例如ABL1)及/或細胞質激酶(例如絲胺酸/蘇胺酸激酶)之異常表現相關聯。術語『異常表現』可包括上調或下調，或可包括表現不同蛋白質。

在此情況下，『激酶』可功能上定義為，在細胞核、細胞質中或在細

胞膜處、或包括胞外位置之任何其他細胞位置，在轉移ATP至其他蛋白質期間經歷之構形改變。相關激酶家族之實例包括在細胞表面上之受體酪胺酸激酶(例如PDGFRA)及非受體激酶，諸如細胞質酪胺酸激酶(例如ABL1)及絲胺酸/蘇胺酸激酶。

表觀遺傳交互作用

如本文中所使用，術語『表觀遺傳』交互作用通常係指染色體上遠端區之間的交互作用，在一個實施例中，該交互作用為動態的且視該染色體之該區之狀態而更改、形成或斷裂。

在本發明之特定方法中，染色體交互作用藉由首先產生包含來自為交互作用之一部分之染色體之兩個區之序列的接合核酸檢測。在此類方法中，區可藉由任何合適的手段交聯。在一較佳實施例中，交互作用使用甲醛交聯，但亦可藉由任何醛、或D-生物素-e-胺基己酸-N-羥基丁二醯亞胺酯或地高辛(Digoxigenin)-3-O-甲基羰基-e-胺基己酸-N-羥基丁二醯亞胺酯交聯。可使用多聚甲醛(Paraformaldehyde)，且可交聯相隔4埃之DNA鏈。

染色體交互作用可反映染色體之區之狀態，舉例而言，其是否正在轉錄或回應於生理學條件之改變而受抑制。已發現特定出現於如本文所定義之子群之染色體交互作用為穩定的，因此提供量測兩個子群之間的差異之可信賴的手段。

另外，例如與其他表觀遺傳標記，諸如甲基化或組蛋白之結合改變相比，特定於特徵(諸如疾病病狀)之染色體交互作用通常將發生在生物過程早期中。因此，本發明之方法能夠檢測生物過程之早期階段。此允許可因此更有效的早期干預(例如治療)。此外，同一子群內之個體之間的相關染色體交互作用存在極小差異。

表觀遺傳交互作用之位置及原因

表觀遺傳染色體交互作用可重疊及包括展示編碼相關或未描述基因之染色體之區，但同樣可在基因間區中。在本發明中檢測之染色體交互作用可由潛在DNA序列之改變、由環境因素、DNA甲基化、非編碼反義RNA轉錄物、非突變致癌物、組蛋白修飾、染色體重塑及特異性局部DNA交互作用引起。同一染色體交互作用可由不同個體之不同因子引起。舉例而言，特定染色體交互作用可由DNA甲基化之改變引起，例如歸因於自其中觀測到交互作用之染色體之不同區中之IDH之突變。同一染色體交互作用可由潛在序列之改變引起，例如觀測到交互作用處之染色體之相同區之缺失。

引起染色體交互作用之改變可由潛在核酸序列之改變引起，該潛在核酸序列本身不直接影響基因產物或基因表現之模式。此類改變可例如為在基因內及/或外部之SNP's、基因融合，及/或基因間DNA、微小RNA及非編碼RNA之缺失。舉例而言，已知，大致20%之SNPs在非編碼區中，且因此如所描述之方法在非編碼情形下亦為有用的。聚集在一起形成交互作用之染色體之區在同一染色體上可相隔少於5 kb、3 kb、1 kb、500個鹼基對或200個鹼基對。聚集在一起形成交互作用之染色體之區可在同一染色體上相隔大於5 kb、10 kb、50 kb、100 kb、200 kb、500 kb或大於800 kb，且可例如為800 kb至1,200 kb，諸如相隔900 kb至1,000 kb。本文中所揭示之任何此類值及範圍可指正常染色體(不具有斷點突變)或具有斷點突變之染色體。

檢測之染色體交互作用較佳地在本文中提及之基因中之任一者內。然而，其亦可處於基因之上游或下游，例如距基因或距編碼序列之上游或下游之高達50,000、高達30,000、高達20,000、高達10,000或高達5000個

鹼基。

臨床情形之類型

本發明之目的為準許與限定群體中之子群之特徵相關之染色體交互作用的檢測。舉例而言，此技術允許基於特異性表現型(例如關於醫學病狀)之生物標記，亦即藉由識別特定染色體構形特徵及/或該特定特徵之改變而分級。限定子群之特徵與癌症預後相關。在關於疾病之特異性特徵之情況下，諸如對治療有反應、鑑別最有效療法/藥物、監測疾病之病程、鑑別疾病之傾向性、鑑別殘餘疾病之存在及/或復發之可能性，可使用本發明之方法。因此，該等方法可用於或可不用於診斷特異性病狀之存在。在一個實施例中，本發明可用於例如以持續方式監測對治療之反應。本發明之方法可用於對疾病之機制為未知的、不明確或複雜的基因座分型。染色體交互作用之檢測提供一種在不同調節程度下之隨後改變(其中一些為複雜的)的高效方法。舉例而言，在一些情況下，約37,000個非編碼RNA可由單脈衝活化。

與預後相關之特徵

特徵可為對酪胺酸激酶抑制劑療法有反應。特徵可為自激酶基因及/或自酪胺酸激酶基因之異常表現，例如特徵可為酪胺酸激酶表現上調。已知與癌症預後相關之激酶包括在細胞表面上之受體酪胺酸激酶(例如PDGFRA)、非受體激酶、細胞質酪胺酸激酶(例如ABL1)及絲胺酸/蘇胺酸激酶。特徵可為自對基因產物(其對已知抑制劑(例如酪胺酸激酶抑制劑)有反應)有反應或編碼該基因產物之激酶基因異常表現。特徵可為對基因產物(其對酪胺酸激酶抑制劑有反應)有反應或編碼該基因產物之基因的遺傳或表觀遺傳改變。特徵可為以下一或多種基因之遺傳或表觀遺傳改變：FIP1L1、PDGFRA、Flt3、ABL1、FGFR1及cKIT。

特徵可為對為ATP模擬物之藥物有反應。酪胺酸激酶基因(例如ABL1、布魯東氏、cKIT、FGFR1、PDGFRA及PDGFRB)編碼對ATP模擬物敏感之蛋白質。

特徵可為對特定治療及/或預防(尤其特定醫藥治療及/或預防)，例如酪胺酸激酶抑制劑，有反應，視情況其中藥物已知靶向受體酪胺酸激酶(例如PDGFRA)，較佳地來自包含達沙替尼(Dasatinib)、克諾拉尼(crenolanib)、多韋替尼(dovitinib)及伊馬替尼(Imatinib)之組之一或多者。酪胺酸激酶抑制劑可為西地尼布(Cediranib)、克諾拉尼、達沙替尼(施達塞(Sprycel))；多韋替尼、伊馬替尼(格列維克(Gleevec))；IMC-3G3(奧拉單抗(Olaratumab)、LY3012207)拉特維(Lartruvo) (PDGFRA)；馬賽替尼(Masitinib) (AB1010)、尼羅替尼(Nilotinib) (塔希納(Tasigna))；帕佐泮尼(Pazopanib)；PKC412 (米噪妥林(midostaurin)、CGP41251)；喹雜替尼(Quizartinib)；瑞戈非尼(Regorafenib)；索拉非尼(Sorafenib) (雷沙瓦(Nexavar))；舒尼替尼(Sunitinib)(舒癌特(Sutent))；凡塔藍尼(Vatalanib)；S116836。特徵可易患特定病狀，視情況嗜伊紅細胞過多。

子群及個人化治療

如本文中所使用，「子群」較佳地係指群體子群(群體中之子群)、更佳地特定動物之群體中之子群，該特定動物諸如特定真核生物或哺乳動物(例如人類、非人類、非人類靈長類或嚙齒動物，例如小鼠或大鼠)。最佳地，「子群」係指人類群體中之子群。

本發明包括檢測及治療群體中之特定子群。在此類子群內，將存在或不存在本文所論述之特徵(諸如對治療有反應)。關於染色體之表觀遺傳交互作用差異一般言之為在基因體水平下存在之結構性差異。本發明者已發現，既定群體中之子集之間(例如兩個或至少兩個子集)的此等不同。鑑

別此等差異將允許醫師將其患者分類為群體之一個子集之部分，如方法中所描述。因此，本發明為醫師提供基於患者之表觀遺傳染色體交互作用個人化患者之藥物的方法，及提供尤其由於鑑別為該子群之部分而影響其預後之患者之子群的可替代的更有效治療範圍。

通常子群應為至少群體之1%、5%、10%、30%、50%或80%。群體可為一般群體。群體可為癌症患者之組，其中癌症視情況為以下任一種癌症：iHES、慢性及急性嗜伊紅球性白血病、慢性骨髓性白血病(CML)、急性骨髓性白血病(AML)、急性淋巴球性白血病(ALL)、PDGFRA陽性非小細胞肺癌(NSCLC)、神經膠母細胞瘤(包括多形性神經膠母細胞瘤及星形細胞瘤)、前列腺癌、晚期卵巢癌、腸胃基質腫瘤(GIST)及腎細胞癌。一或多個子群可具有上文所列之癌症中之任一者，且測定癌症預後之方法可在患有以上癌症中之任一者之個體上進行。

產生接合核酸

本發明之某些實施例利用接合核酸，特定言之接合DNA。此等包含來自在染色體交互作用中聚集在一起之兩個區之序列，且因此提供關於交互作用之資訊。本文中所描述之EpiSwitch™方法使用此類接合核酸之產生，檢測染色體交互作用。

因此，本發明之方法可包含藉由以下產生接合核酸(例如DNA)之步驟：

(i)存在於染色體基因座處之表觀遺傳染色體交互作用之活體外交聯；

(ii)視情況自該染色體基因座分離交聯DNA；

(iii)使該交聯DNA經受剪切，例如藉由用剪切其至少一次之酶(特定言之在該染色體基因座內剪切至少一次之酶)限制性消化而剪切；

(iv)接合該交聯裂解DNA端部(特定言之，以形成DNA環)；以及

(v)鑑別該接合DNA及/或該DNA環之存在，特定言之使用諸如PCR(聚合酶鏈式反應)之技術，以鑑別特異性染色體交互作用之存在。

PCR可用於檢測或鑑別接合核酸，例如所產生之PCR產物之大小可指示存在之特異性染色體交互作用，且因此可用於鑑別基因座之狀態。熟習此項技術者應瞭解可用於在所關注之染色體基因座內剪切DNA之許多限制酶。顯而易見的是，所使用之特定酶應視所研究之基因座及位於其中之DNA之序列而定。可用於剪切本發明所描述之DNA之限制酶之非限制性實例為TaqI。

諸如EpiSwitch™技術之實施例

EpiSwitch™技術涉及在檢測特異性針對表現型之表觀遺傳染色體構形特徵中使用微陣列EpiSwitch™標記資料。以本文中所描述之方式利用接合核酸之實施例(諸如EpiSwitch™)具有若干優點。其具有低程度之隨機噪音，例如因為來自本發明之第一組核酸之核酸序列與第二組核酸雜交或未能與第二組核酸雜交。此提供一種二進位結果，從而准許一種在表觀遺傳程度下量測複雜機制的相對簡單方法。EpiSwitch™技術亦具有快速處理時間及低成本優點。在一個實施例中，處理時間為3至6小時。

樣本及樣本治療

樣本將含有來自個體之DNA。其通常應含有細胞。在一個實施例中，樣本係藉由最小侵入性手段獲得，且可例如為血液。可提取DNA，且用標準限制酶剪切。此可預定保持何種染色體構形，且將用EpiSwitch™平台檢測。在樣本為先前獲自患者血液樣本之一個實施例中，所描述方法為有利的，因為程序為最小侵入性的。由於組織與血液之間的染色體交互作用同步，包括水平轉移，所以血液樣本可用於檢測組織

(諸如與疾病相關之組織)中之染色體交互作用。對於某些病狀，諸如癌症，由於突變之遺傳雜訊可影響相關組織中之染色體交互作用『信號』，且因此使用血液為有利的。

與本發明相關之核酸之特性

本發明之實施例中製備或檢測之核酸可與本文中提及之第一核酸及第二核酸相同，或具有該第一核酸及第二核酸之特性中之任一者。本發明之核酸通常包含兩個部分，各自包含來自染色體交互作用中聚集在一起之染色體之兩個區中之一者之序列。通常各部分長度為至少8、10、15、20、30或40個核苷酸，例如10至40個核苷酸長度。較佳核酸包含來自任一表中提及之任一基因的序列。較佳核酸結合本文中提及之任何特異性探針或引子序列。較佳地，核酸為DNA。應理解，當定義特定序列時，本發明可視需要在特定實施例中使用互補序列。

第二組核酸--「指標」序列

第二組核酸序列具有一組指標序列之功能，且基本上為適合於鑑別子群特異性序列之一組核酸序列。其可表示「背景」染色體交互作用，且可以一些方法選擇或未經選擇。其一般為所有可能染色體交互作用之子集。

第二組核酸可藉由任何合適方法得到。其可由計算得到，或其可基於個體中之染色體交互作用。其通常表示比第一組核酸大之群體組。在一個特定實施例中，第二組核酸表示特定基因組中之所有可能表觀遺傳染色體交互作用。在另一特定實施例中，第二組核酸表示本文中所描述之群體中存在之較大比例之所有可能表觀遺傳染色體交互作用。在一個特定實施例中，第二組核酸表示在至少20、50、100或500個基因中(例如在20至100或50至500個基因中)之至少50%或至少80%之表觀遺傳染色體交互作

用。

第二組核酸通常表示視情況修改、調節或以任何方式介導群體之疾病病況/表現型之至少100個可能表觀遺傳染色體交互作用。第二組核酸可表示影響物種之疾病病況之染色體交互作用，例如包含編碼與任何疾病病況、對疾病或疾病表現型之傾向性相關聯之細胞因子、激酶或調節子的核酸序列。第二組核酸通常包含表示限定子群之特徵相關及不相關之表觀遺傳交互作用的序列。

在一個特定實施例中，第二組核酸至少部分地源於群體中之天然存在序列，且通常藉由電子雜交方法獲得。相比於存在於天然存在核酸中之對應核酸部分，該等核酸可進一步包含單個或多個突變。突變包括一或多個核苷酸鹼基對之缺失、取代及/或添加。在一個特定實施例中，第二組核酸可包含表示與存在於天然存在物種中之對應核酸部分具有至少70%序列一致性之同源物及/或直系同源物的序列。在另一特定實施例中，提供與存在於天然存在物種中對應核酸部分之至少80%序列一致性或至少90%序列一致性。

第二組核酸之特性

在一個特定實施例中，第二組核酸中存在至少100個不同核酸序列，較佳地至少1000、2000或5000個不同核酸序列，具有高達100,000、1,000,000或10,000,000個不同核酸序列。典型數目應為100至1,000,000，諸如1,000至100,000個不同核酸序列。所有、或至少90%或至少50%之此等序列將對應於不同染色體交互作用。

在一個特定實施例中，第二組核酸表示至少20個不同基因座或基因，較佳地至少40個不同基因座或基因，且更佳地至少100、至少500、至少1000或至少5000個不同基因座或基因(諸如100至10,000個不同基因

座或基因)中之染色體交互作用。第二組核酸之長度適合於其根據Watson Crick鹼基配對與第一組核酸特異性地雜交，以允許鑑別特定出現於子群之染色體交互作用。通常第二組核酸將包含序列中對應於在染色體交互作用中聚集在一起之兩個染色體區的兩個部分。第二組核酸通常包含至少10，較佳地20，及又較佳地30個鹼基(核苷酸)長度之核酸序列。在另一實施例中，核酸序列可為至多500，較佳地至多100，及又較佳地至多50個鹼基對長度。在一較佳實施例中，第二組核酸包含17與25個鹼基對之間的核酸序列。在一個實施例中，至少100%、80%或50%之第二組核酸序列之長度如上文所描述。較佳地，不同核酸不具有任何重疊序列，例如至少100%、90%、80%或50%之核酸在至少5個連續核苷酸內不具有相同序列。

鑒於第二組核酸充當『指標』，則相同集合之第二核酸可與不同集合之表示不同特徵之子群之第一核酸一起使用，亦即第二組核酸可表示可用於鑑別與不同特徵相關之染色體交互作用的核酸『通用』集。

第一組核酸

第一組核酸通常來自已知由存在或不存在與預後伴隨表觀遺傳測試相關之特徵(諸如本文中提及之任何此類特徵)限定之兩個或更多個不同子群中的個體。第一核酸可具有本文中提及之第二組核酸之特徵及特性中之任一者。第一組核酸通常源於來自已經歷如本文所描述之治療及處理，特定言之EpiSwitch™交聯及裂解步驟之個體的樣本。通常第一組核酸表示存在於取自個體之樣本中之染色體交互作用之全部或至少80%或50%。

通常，相比於由第二組核酸表示之染色體交互作用，第一組核酸表示較小群體的跨越由第二組核酸表示之基因座或基因之染色體交互作用，亦即第二組核酸表示所定義基因座或基因集合中之交互作用之背景或指標

集合。

在一個實施例中，第一組核酸經標記，且通常來自不同子群之核酸用不同標記物標記。此使得在檢測方法中區分其。

核酸

本文中所描述之核酸可呈包含至少200、至少500、至少1000、至少5000或至少10000個本發明之不同核酸之核酸庫形式，諸如『第二』核酸。本發明提供一種通常包含至少200個不同核酸之特定核酸庫。該庫可呈結合至陣列之核酸之形式。

雜交

本發明需要一種用於使來自第一組核酸及第二組核酸之全部或部分互補的核酸序列雜交的手段。在一個實施例中，在單一分析中，亦即在單一雜交步驟中，使全部第一組核酸與全部第二組核酸接觸。然而，可使用任何合適的分析。

標記之核酸及雜交之圖案

可較佳地使用諸如螢光團(螢光分子)之獨立標記或輔助檢測成功雜交之放射性標記來標記本文中提及之核酸。某些標記可在UV光下檢測。例如在本文中所描述之陣列上之雜交圖案表示兩個子群之間的表觀遺傳染色體交互作用差異，且因此提供一種比較表觀遺傳染色體交互作用及測定何種表觀遺傳染色體交互作用特定出現於本發明之群體中之子群的方法。

術語『雜交圖案』廣泛地涵蓋第一組核酸與第二組核酸之間存在及不存在雜交，亦即來自第一集合之特異性核酸與來自第二集合之特異性核酸雜交，且因此其不限於任何特定分析或技術，或需要具有在其上可檢測到『圖案』的表面或陣列。

特異性病狀及子群之選擇

藉由聚焦於染色體交互作用及染色體交互作用之改變上，本發明者已鑑別可潛在地對例如使用酪胺酸激酶抑制劑(TKI)之救命治療診斷干預有反應、使用習知診斷將遺漏的患者組。

在一個實施例中，本發明之方法檢測對酪胺酸激酶抑制劑療法(例如為ATP模擬物之抑制劑)之反應。較佳地，檢測例如患有升高的嗜酸性球之患者中之對癌症之酪胺酸激酶抑制劑療法之反應。較佳地，癌症為iHES、慢性及急性嗜伊紅球性白血病、急性骨髓性白血病(AML)、PDGFRA陽性非小細胞肺癌、神經膠母細胞瘤(包括多形性神經膠母細胞瘤及星形細胞瘤)、前列腺癌、晚期卵巢癌或腸胃基質腫瘤(GIST)。在此類實施例中，較佳檢測PDGFRA及/或FIP1L1中之染色體交互作用，諸如本文中所描述之任何特異性交互作用(例如參考特異性引子及/或探針)。

較佳地，檢測在本文中提及之相關基因(例如在該等基因中之至少1、2、3、4、5或6個中)中之任一者內存在或不存在染色體交互作用中之任一者。較佳地，以該方法測定存在或不存在由本文中所揭示之任何特異性引子及/或探針序列表示之染色體交互作用。此等許多基因或染色體交互作用可用於本文中提及之不同實施例中之任一者。

本發明提供一種方法，其包含檢測存在或不存在染色體交互作用，通常1至5、或5至20、或5至500個此類交互作用，以便測定在個體中存在或不存在特徵。較佳地，染色體交互作用為本文中提及之基因中之任一者中之彼等染色體交互作用。

3C交互作用及癌症

本發明之不同實施例可能係關於本文中提及之任何癌症或基因，例如下文列舉之彼等。

本發明者已發現與癌症相關聯之ABL1、布魯東酪胺酸激酶、cKIT、

FGFR1、F1PL1、FLT3及PDGFRA中之3C交互作用，該癌症包括乳癌、卵巢癌、白血病、神經膠瘤、淋巴瘤及癌瘤。

通常與本文中所描述之方法相關或使用其來鑑別之交互作用與以下病狀中之任一者相關聯：急性骨髓性白血病(AML)，慢性淋巴球性白血病(CLL)、慢性骨髓性白血病(CML)，CML母細胞危象，腸胃基質腫瘤(GIST)，骨髓發育不良症候群(MDS)，骨髓增生病(骨髓增生腫瘤，MPN)，X性聯無 γ 球蛋白血症(XLA)，B細胞惡性疾病，NHL，淋巴瘤(所有分類)，骨髓瘤，反覆性成熟B細胞腫瘤，慢性移植體對抗宿主疾病，復發性毛細胞白血病，復發性或頑固性實體腫瘤，頑固性套細胞淋巴瘤，擴大的食管胃癌，類風濕性關節炎，肥大細胞增多症，肥大細胞白血病，前列腺腫瘤，晚期黑素瘤，突變的惡性黑色素瘤，第二線(2nd Line)不可切除性或轉移性腸胃基質腫瘤(GIST)，表現惡性間皮瘤，晚期鉑頑固性卵巢癌，復發性卵巢上皮癌、輸卵管癌或原發性腹膜癌，卵巢輕度惡性潛在腫瘤，子宮漿液性乳頭狀癌瘤，廣泛期小細胞肺癌，局部晚期鼻咽癌，復發性/頑固性非霍奇金氏淋巴瘤(Hodgkin's Lymphoma)，轉移性腎細胞癌，轉移性胃腸胰臟神經內分泌腫瘤，反覆性卵巢透明細胞癌瘤，食道鱗狀細胞癌，持續性子宮癌，乳房腫瘤，甲狀腺癌，口腔腺瘤，急性白血病，前列腺腫瘤，易位FGFR1-3、突變的或擴大的反覆性頭頸癌，表現FGFR-TACC基因融合之反覆性惡性神經膠瘤，晚期非小細胞肺癌。

在一個實施例中，與本文中所描述之方法相關或使用其來鑑別之交互作用與以下病狀中之任一者相關聯：iHES、非小細胞肺癌(NSCLC)、結腸直腸癌、轉移性黑素瘤、腎細胞癌、頑固性霍奇金氏淋巴瘤、先前治療的卵巢癌、局部晚期鼻咽癌、頑固性慢性淋巴球性白血病/小淋巴球性淋巴瘤(CLL/SLL)、舒尼替尼(Sunitinib)失效的腸胃基質腫瘤(GIST)。較

佳病狀為神經膠瘤、急性骨髓性白血病及乳癌、iHES及慢性白血病。

ABL1 (細胞質酪胺酸激酶基因)中之例如位於9q34處之交互作用與以下疾病相關聯：急性骨髓性白血病(AML)、慢性淋巴球性白血病(CLL)、乳癌、腸胃基質腫瘤(GIST)、骨髓發育不良症候群(MDS)或骨髓增生病(骨髓增生腫瘤，MPN)。

布魯東酪胺酸激酶(細胞質酪胺酸激酶基因)中之例如位於Xq22.1處之交互作用與以下疾病相關聯：X性聯無 γ 球蛋白血症(XLA)、B細胞惡性疾病、NHL、淋巴瘤(所有分類)、骨髓瘤、慢性淋巴球性白血病、反覆性成熟B細胞腫瘤、慢性移植體對抗宿主疾病、復發性毛細胞白血病、復發性或頑固性實體腫瘤、頑固性套細胞淋巴瘤、擴大的食管胃癌瘤及類風濕性關節炎。

cKIT (受體酪胺酸激酶基因)中之例如位於4q12處之交互作用與以下疾病相關聯：肥大細胞增多症及肥大細胞白血病及前列腺腫瘤，晚期黑素瘤，突變的惡性黑色素瘤，第二線不可切除性或轉移性腸胃基質腫瘤(GIST)，表現惡性間皮瘤，晚期鉑頑固性卵巢癌，復發性卵巢上皮癌、輸卵管癌或原發性腹膜癌，或卵巢輕度惡性潛在腫瘤，廣泛期小細胞肺癌，局部晚期鼻咽癌，復發性/頑固性非霍奇金氏淋巴瘤，轉移性腎細胞癌，轉移性胃腸胰臟神經內分泌腫瘤，反覆性卵巢透明細胞癌瘤，食道鱗狀細胞癌，持續性子宮癌及乳房腫瘤。

FGFR1 (受體酪胺酸激酶基因)中之例如位於8p11處之交互作用與以下疾病相關聯：甲狀腺癌，口腔腺瘤，慢性白血病，急性白血病，前列腺腫瘤及乳癌，易位FGFR1-3、突變的或擴大的反覆性頭頸癌，表現FGFR-TACC基因融合之反覆性惡性神經膠瘤，晚期非小細胞肺癌。

FIP1L1 (頻繁地融合至PDGFRA (例如4q12)之聚腺苷酸化特異性因

子)中之交互作用與以下疾病相關聯：iHES、慢性白血病。

FLT3 (受體酪胺酸激酶基因)中之例如位於13q11-12.2處之交互作用與以下疾病相關聯：慢性白血病、急性骨髓性白血病及乳癌、iHES、慢性白血病、非小細胞肺癌(NSCLC)、結腸直腸癌、轉移性黑素瘤或腎細胞癌、神經膠瘤、頑固性霍奇金氏淋巴瘤、先前治療的卵巢癌、局部晚期鼻咽癌、頑固性慢性淋巴球性白血病/小淋巴球性淋巴瘤(CLL/SLL)、舒尼替尼失效的腸胃基質腫瘤(GIST)。

PDGFRA (受體酪胺酸激酶基因)中之例如位於4q12處之交互作用與以下疾病相關聯：神經膠瘤、慢性白血病、急性骨髓性白血病、乳癌、iHES。

所測試之個體

待測試之個體可患有或可不患有本文中提及之任何疾病病狀或特徵之任何症狀。個體可處於任何此類病狀或特徵之風險下。個體可處於由於特徵所致之風險下。個體可具有由於特徵所致之較糟的預後，且可能需要特定於特徵的療法。個體可能已恢復，或處於自病狀或特徵恢復的過程中。個體較佳地為哺乳動物，諸如靈長類、人類、非人類哺乳動物或嚙齒動物。個體可為雄性或雌性。個體可為30歲或更大。個體可為29歲或更小。

此處所論述之基因、基因座、區及核酸中之任一者可具有本文中提及之個體之類型中之任一者，或來自本文中提及之個體之類型中之任一者。

較佳基因區、基因座、基因及染色體交互作用

對於本發明之所有態樣而言，在本文中提及較佳基因區、基因座、基因及染色體交互作用。通常在本發明之方法中，自本文中列舉之相關基

因中之至少1、2、3、4、5或6個檢測染色體交互作用。較佳地檢測存在或不存在由本文中提及之引子及/或探針序列表示之相關特異性染色體交互作用中之至少1、2、3、4、5或6個。

區可在本文中提及之基因中之任一者之上游或下游，例如如距編碼序列之50 kb上游或20 kb下游。

在一個實施例中，所檢測之染色體交互作用存在於各表中展示之位置中之任一者處或存在於各表中展示之區中之任一者中。在其中在方法中檢測接合產物之情況下，則可檢測展示於本文中所揭示之引子或探針序列中之任一者中之序列。因此，通常可檢測來自接合產物之兩個區(亦即來自染色體交互作用之兩個位點)之序列。在較佳實施例中，在方法中使用引子及/或探針，該等引子及/或探針包含與本文中所揭示之引子及/或探針相同或互補序列，或由其組成。在一些實施例中，使用引子及/或探針，該等引子及/或探針包含與本文中展示之引子及/或探針序列中之任一者同源的序列。

藉由定量PCR (qPCR)檢測接合產物

在一個實施例中，例如使用螢光檢測來定量檢測與染色體交互作用相關之接合序列。此實施例可在本文中所揭示或與本文中所揭示之分型/檢測方法相關之任何接合序列上進行，但不限於此類序列或方法。因此，可進行關於qPCR之實施例，以檢測包含來自在任何染色體交互作用中結合在一起、可具有本文中提及之特徵中之任一者之染色體之區之序列的任何接合序列。

因此，本發明提供一種用於使用在PCR反應期間活化後可檢測之探針定量檢測與染色體交互作用相關之接合序列的方法，其中該接合序列包含來自在表觀遺傳染色體交互作用中聚集在一起的兩個染色體區的序列，

其中該方法包含使接合序列與探針在PCR反應期間接觸，且檢測探針活化的程度，且其中該探針結合接合位點。

引子及探針序列可為所揭示之任何此類特異性序列或特異性序列之同源物及/或片段。引子序列通常能夠擴增在檢測染色體交互作用之方法中製備之接合產物，諸如3C或EpiSwitch™方法，例如本文中所描述之任何此類方法或接合產物。引子通常為單向的。視情況，將引子序列設計成針對於所討論之3C交互作用之接合產物為獨特的。探針通常能夠特異性結合接合產物中之序列，包括接合位點。探針通常為『水解』探針，自其中可裂解/釋放一或多個部分，以便在PCR反應期間激活標記。

接合序列可藉由交聯核酸樣本，隨後例如藉由酶消化或藉由物理剪切方法使核酸斷裂成較小碎片來製備。接著進行接合步驟。接合序列通常源於來自己經歷如本文所描述之治療及處理(特定言之EpiSwitch™交聯及裂解步驟)之個體或細胞株之樣本。接合序列可為如以上方法中之任一者中所定義或藉由以上方法中之任一者製備之接合產物。接合序列之接合位點可包含用於剪切交聯核酸之限制酶之限制酶識別序列。較佳限制酶為TaqI或TaqI之任何改質形式(其例如識別相同限制位點)。接合DNA分子可包含10至100個核苷酸鹼基、或10至400個核苷酸鹼基、或10至500個核苷酸鹼基、或200至600個核苷酸鹼基、或200至800個核苷酸鹼基或200至1000個核苷酸鹼基長度之核酸序列。

較佳地，僅一個集合之引子(亦即，能夠一起擴增之兩個PCR引子)用於檢測，且不進行用多於一個集合之引子之嵌套式PCR。較佳地引子為單向的。甚至更佳地，選擇引子序列使得其對於所討論之3C交互作用為獨特的。在一個實施例中，在存在不擴增及/或不結合至探針之其他核酸(諸如其他接合產物)下進行檢測方法。通常其他核酸(諸如接合產物)可表示

存在之核酸或接合產物之至少10%、30%或至少50%。

藉由qPCR檢測之情形

本文中所描述之qPCR方法可用於檢測相關之任何情形(例如本文中所描述之任何情形)中之染色體交互作用。其將通常用於檢測與例如如本文所定義之子群相關聯之染色體交互作用。可使用其檢測與突變、自基因之表現之改變或基因之失調相關聯之染色體交互作用及/或染色體交互作用的改變。

本文中所描述之qPCR方法可用於檢測染色體交互作用，其中來自在表觀遺傳染色體交互作用中聚集在一起之兩個染色體區之序列在染色體中位於相隔至少1000個鹼基對或相隔至少10,000個鹼基對或相隔至少100,000個鹼基對。本文中所描述之qPCR方法可用於檢測長程染色體交互作用，其中來自在表觀遺傳染色體交互作用中聚集在一起之兩個染色體區之序列位於相隔大於100,000個鹼基對，且因此交互作用產生大於100千個鹼基，視情況大於500千個鹼基，較佳地大於900千個鹼基之DNA環。本文中所描述之qPCR方法可用於檢測長程染色體交互作用，其與對酪胺酸激酶抑制劑療法(諸如PDGFRA)有反應之基因之遺傳或表觀遺傳改變相關聯。

qPCR探針之設計/結構

用於qPCR反應之探針之設計可以在接合位點附近，在包含該接合位點，視情況具有與來自該等染色體區中之每一者之序列互補的序列之DNA分子上之位點特異性結合該接合DNA分子。探針跨越兩個片段之接合點，且例如具有將至少5、10或20個核苷酸鹼基5'及3'結合至接合位點之序列。探針可包含10至40個核苷酸鹼基長度之核酸序列，或較佳地包含10至35個核苷酸鹼基長度之核酸序列，或更佳地包含20至30個核苷酸

鹼基長度之核酸序列。探針可具有與接合DNA分子之序列具有至少70%同源性/一致性或如本文所定義之其他一致性程度的序列。

qPCR探針之標記

探針一般使用具有失活態及活性態之可檢測標記來標記，因此可以僅在活化時才檢測到。活化程度將與模板(接合產物)存在於PCR反應中之程度相關。可在所有或部份PCR，例如至少50%或80%之PCR循環期間進行檢測。

探針可包含共價連接至寡核苷酸之一端之螢光團及連接至核苷酸之另一端之淬滅劑，因此螢光團之螢光會被淬滅劑淬滅。在一個實施例中，螢光團連接至寡核苷酸之5'端，且淬滅劑共價連接至寡核苷酸之3'端。可用於本發明之方法中之螢光團包括FAM、TET、JOE、Yakima黃、HEX、花青3、ATTO 550、TAMRA、ROX、德克薩斯紅(Texas red)、花青(Cyanine)3.5、LC610、LC 640、ATTO 647N、花青5、花青5.5及ATTO 680。可與適當螢光團一起使用之淬滅劑包括TAM、BHQ1、DAB、Eclip、BHQ2及BBQ650，視情況其中該螢光團選自HEX、德克薩斯紅及FAM。螢光團與淬滅劑之較佳組合包括FAM與BHQ1、及德克薩斯紅與BHQ2。其他較佳組合示於表3中。

探針在qPCR分析中之使用

本發明之水解探針通常使用濃度上匹配之陰性對照物進行溫度梯度最佳化。較佳地，對單一步驟PCR反應進行最佳化。更佳地，計算標準曲線。使用跨越接合序列之接合點來結合之特異性探針之優點為不需要使用嵌套式PCR(nested PCR)方法即可達成針對接合序列之特異性。本文所描述之方法允許準確及精確定量低複本數之靶標。可在溫度梯度最佳化之前，純化(例如凝膠純化法)靶標接合序列。可對靶標接合序列進行定序。較佳

地，使用約10 ng、或5至15 ng、或10至20 ng、或10至50 ng、或10至200 ng模板DNA進行PCR反應。設計正向及反向引子，因此可例如藉由與序列互補，使一個引子結合至接合DNA序列中代表的其中一個染色體區之序列，且另一引子結合至接合DNA序列中代表之另一個染色體區。

接合DNA靶標之選擇

本發明提供一種選擇用於如本文所定義之PCR方法中之引子及探針之方法，其包含基於其結合及擴增接合序列之能力選擇引子，及基於其將結合至之靶標序列之特性(特定言之靶標序列之曲率)選擇探針序列。

通常設計/選擇探針，以結合至跨越限制位點之並接限制性片段之接合序列。在本發明之一個實施例中，例如使用本文中提及之特異性演算法，計算與特定染色體交互作用相關之可能接合序列之預測曲率。曲率可表述為度/螺旋圈，例如10.5°/螺旋圈。選擇接合序列，以靶向曲率傾向峰值分數為至少5°/螺旋圈，通常至少10°/螺旋圈、15°/螺旋圈或20°/螺旋圈，例如5°/螺旋圈至20°/螺旋圈的接合序列。較佳地，計算至少20、50、100、200或400個鹼基，諸如接合位點上游及/或下游之20至400個鹼基之每一圈螺旋曲率傾向分數。因此，在一個實施例中，接合產物中之靶標序列具有此等程度中之任一者之曲率。亦可基於最低熱力學結構自由能選擇靶標序列。

樣本製備及染色體交互作用檢測之較佳實施例

本文中描述製備樣本及檢測染色體構形之方法。可使用此等方法之最佳化(非習知)型式，例如如此章節中所描述。

通常樣本將含有至少 2×10^5 個細胞。樣本可含有高達 5×10^5 個細胞。在一個實施例中，樣本將含有 2×10^5 至 5.5×10^5 個細胞。

本文中描述存在於染色體基因座處之表觀遺傳染色體交互作用之交

聯。可在進行細胞裂解之前進行此。可進行細胞裂解3至7分鐘，諸如4至6或約5分鐘。在一些實施例中，進行細胞裂解至少5分鐘且小於10分鐘。

本文中描述用限制酶消化DNA。通常，在約55°C至約70°C下，諸如約65°C，進行DNA限制約10至30分鐘時間段，諸如約20分鐘。

較佳地，使用常見剪切限制酶，此產生平均片段大小高達4000個鹼基對之接合DNA之片段。視情況，限制酶產生平均片段大小為約200至300個鹼基對(諸如約256個鹼基對)之接合DNA之片段。在一個實施例中，典型片段大小為200個鹼基對至4,000個鹼基對，諸如400至2,000或500至1,000個鹼基對。

在EpiSwitch方法之一個實施例中，在DNA限制性消化步驟與DNA接合步驟之間不進行DNA沈澱步驟。

本文中描述DNA接合。通常進行DNA接合5至30分鐘，諸如約10分鐘。

樣本中之蛋白質可例如使用蛋白酶，視情況蛋白酶K，進行酶消化。蛋白質可進行酶消化約30分鐘至1小時之時間段，例如約45分鐘。在一個實施例中，在蛋白質消化(例如蛋白酶K消化)之後，不存在交叉反轉或苯酚DNA提取步驟。

在一個實施例中，PCR檢測能夠檢測接合核酸之單一複本，較佳地具有存在/不存在接合核酸之二進位讀出。

療法及鑑別治療劑

本發明者已發現染色體交互作用如何與癌症之療法相關，包括用於癌症之治療之化合物如何亦可直接作用於3C染色體構形。舉例而言，已發現ATP模擬物伊馬替尼(已知對於活化酪胺酸激酶直接起作用)在伊馬替尼反應性基因(諸如cKIT)中直接作用於3C染色體構形。

因此，鑑別或監測與靶向已知治療劑相關聯之染色體構形之改變可用於鑑別引起構形之相同改變且具有相同治療效果的化合物。因此，鑑別或監測與靶向已知治療劑相關聯之染色體構形之改變可用於鑑別對藉由治療劑或亦可引起染色體構形之改變之其他治療劑的治療敏感的個體或細胞。

本發明進一步提供治療性核酸，其可用於藉由更改例如如本文中所提及之相關染色體交互作用而預防或治療癌症。此類核酸可為DNA或RNA，且可藉由『干擾』(諸如RNAi)起作用。

同源物及片段

本發明包括使用本文中提及之核酸之同源物及/或片段，包括本文中所揭示之特異性序列。此類同源物及/或片段可具有與初始核酸相同的結合特性，例如能夠特異性結合相關接合產物。

聚核苷酸/核酸(例如DNA)之同源物通常例如與至少10、15、20、30、100或更多個連續核苷酸之區，或與來自涉及染色體交互作用之染色體之區的核酸的部分，具有至少70%同源性，較佳地至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少97%、至少98%或至少99%同源性。可基於核苷酸一致性(有時稱為「硬同源性」)計算同源性。

舉例而言，UWGCG封裝提供可用於計算同源性及/或序列一致性%(例如用於其預設情況)之BESTFIT程式(Devereux等人(1984) *Nucleic Acids Research* 12, p387-395)。PILEUP及BLAST演算法可用於計算同源性及/或序列一致性%及/或對序列進行排列(諸如鑑別等效或對應序列(通常對於其預設情況))，例如如Altschul S. F. (1993) *J Mol Biol* 36:290-300; Altschul, S, F等人(1990) *J Mol Biol* 215:403-10中所描述。

執行BLAST分析之軟體為可經由國家生物技術資訊中心(National

Center for Biotechnology Information)公開獲得。此演算法涉及藉由鑑別查詢序列中之長度 W 之短字來首先鑑別高記分序列對(HSP)，該等短字當與資料庫序列中相同長度之字比對時匹配或滿足某些正值臨限值分數 T 。 T 稱為鄰域字分數臨限值(Altschul等人，前述)。此等初始鄰域字命中充當用於起始檢索之種子以尋找含有其之HSP。字命中沿各序列在兩個方向上延伸，只要累積比對分數增加即可。當以下情況時，字命中在各方向中之延伸中斷：累積比對分數自其達成之最大值降低量 X ；累積分數歸因於一或多種負記分殘基比對之累積而變成0或低於0；或達到任一序列之末端。BLAST演算法參數 W 、 T 及 X 決定比對之靈敏度及速度。BLAST程式使用之預設字長(W)為11，BLOSUM62記分矩陣(參見Henikoff及Henikoff (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10915-10919)比對(B)為50，期望值(E)為10， $M = 5$ 、 $N = 4$ ，且比較兩個鏈。

BLAST演算法對兩個序列之間的相似性進行統計分析；參見例如Karlin及Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5873-5787。藉由BLAST演算法提供之一種相似性量測為最小總和機率($P(N)$)，其提供兩個核苷酸序列之間偶然出現匹配之機率的指示。舉例而言，若第一序列與第二序列相比之最小總和機率小於約1，較佳地小於約0.1，更佳地小於約0.01，且最佳小於約0.001，則認為序列與另一序列相似。

同源序列通常相差1、2、3、4或更多個鹼基，諸如小於10、15或20個鹼基(其可為核苷酸之取代、缺失或插入)。此等改變可跨越上文提及之區中之任一者關於計算同源性及/或序列一致性%量測。

片段之長度通常為初始序列之至少90%、80%或50%。其可自5'及/或3'端截斷至少5、8或10個核苷酸。

陣列

第二組核酸可結合至陣列，且在一個實施例中，存在至少15,000、45,000、100,000或250,000個結合至陣列之不同第二核酸，其較佳地表示至少300、900、2000或5000個基因座。在一個實施例中，第二核酸之不同群體之一或多個或所有結合至陣列之多於一個不同區，效果上在陣列上重複，從而允許錯誤檢測。陣列可基於Agilent SurePrint G3定製CGH微陣列平台。可藉由雙色系統進行檢測第一核酸與陣列之結合。

治療劑

本文中提及治療劑。本發明提供此類藥劑，用於預防或治療相關病狀。此可包含向有需要之個體投與治療有效量之藥劑。本發明之方法可用於選擇治療之個體。本發明之方法，且特定言之用於進行預後伴隨表觀遺傳測試之方法，可包括治療步驟，其中藉由該方法鑑別之人可接著投與預防或治療相關病狀之藥劑，例如酪胺酸激酶抑制劑，較佳地來自包括以下之已知酪胺酸激酶抑制劑之組的酪胺酸激酶抑制劑：西地尼布、克諾拉尼、達沙替尼(施達塞)，多韋替尼、伊馬替尼(格列維克)，IMC-3G3 (奧拉單抗，LY3012207)拉特維(PDGFR α)，馬賽替尼(AB1010)、尼羅替尼(塔希納)，帕佐泮尼，PKC412 (米喏妥林，CGP41251)，喹雜替尼，瑞戈非尼，索拉非尼(雷沙瓦)，舒尼替尼(舒癌特)，凡塔藍尼，S116836；更佳地來自包含達沙替尼、克諾拉尼、多韋替尼及伊馬替尼之組的一或多個。

藥劑之配方視藥劑之性質而定。藥劑將呈含有該藥劑及醫藥學上可接受之載劑或稀釋劑之醫藥組合物形式提供。適合載劑及稀釋劑包括等張鹽水溶液，例如磷酸鹽緩衝鹽水。典型經口劑量組合物包括錠劑、膠囊、液體溶液及液體懸浮液。可調配藥劑以用於非經腸、靜脈內、肌肉內、皮下、經皮或經口投與。

可根據各種參數，尤其根據所使用之物質，待治療個體之年齡、體重及病狀，投藥途徑以及所需方案決定藥劑劑量。醫師將能夠決定任何特定藥劑之所需投藥途徑及劑量。然而，適合劑量可為0.1至100毫克/公斤體重，諸如1至40毫克/公斤體重，例如得自1至3次每日。

本文中提及物質之形式

本文中提及之物質(諸如核酸或治療劑)中之任一者可為純化或分離形式。其可呈不同於自然界中發現之形式，例如其可與其他物質組合存在，其與該物質組合在自然界中不存在。核酸(包括本文中所定義之序列之部分)可具有不同於在自然界中發現之彼等之序列，例如在如關於同源性部分中所描述之序列中具有至少1、2、3、4或更多個核苷酸改變。核酸可在5'或3'端處具有異源序列。核酸可化學不同於在自然界中發現之彼等，例如其可以一些方法改性，但較佳地仍能夠進行Watson-Crick鹼基配對。若適當，核酸將呈雙鏈或單鏈形式提供。本發明提供呈單鏈或雙鏈形式之所有本文中提及之特異性核酸序列，且因此包括與所揭示之任何序列互補的鏈。

本發明亦提供一種用於進行本發明之任何方法，包括檢測與特定子群相關聯之染色體交互作用的套組。此類套組可包括能夠檢測相關染色體交互作用之特異性結合劑，諸如能夠檢測藉由本發明之方法產生之接合核酸之藥劑。存在於套組中之較佳藥劑包括能夠與接合核酸或引子對雜交之探針，例如如本文所描述能夠在PCR反應或qPCR反應中擴增接合核酸的可水解探針。

本發明亦提供一種能夠檢測相關染色體交互作用之裝置。裝置較佳地包含能夠檢測染色體交互作用之任何特異性黏合劑、探針或引子對，諸如本文中所描述之任何此類藥劑、探針或引子對。

本文中提及之核酸可呈DNA形式。

具體實施例

EpiSwitch™平台技術檢測基因座在正常條件與異常條件之間調節改變之表觀遺傳調節特徵。EpiSwitch™平台鑑別及監測與調節人類染色體之高階結構(亦稱為染色體構形特徵)相關聯之基因調節之基本表觀遺傳程度。染色體特徵為基因失調級聯中之明顯主要步驟。相對於利用晚期表觀遺傳及基因表現生物標記(諸如DNA甲基化及RNA分析)之生物標記平台，其為具有獨特優點集合的高階生物標記。

EpiSwitch™陣列分析

定製EpiSwitch™陣列篩檢平台以4個密度15K、45K、100K及250K獨特染色體構形出現，各嵌合片段在陣列上重複4次，分別地製備有效密度60K、180K、400K及1百萬。

定製設計的EpiSwitch™陣列

15K EpiSwitch™陣列可篩檢包括用EpiSwitch™生物標記發現技術詢問之約300個基因座之完全基因組。EpiSwitch™陣列建構於Agilent SurePrint G3定製CGH微陣列平台上，此技術提供4個密度60K、180K、400K及1百萬之探針。由於各EpiSwitch™探針呈現為一式四份，則每陣列密度減少至15K、45K、100K及250K，因此允許統計評估再現性。每遺傳基因座詢問之潛在EpiSwitch™標記之平均數目為50；因此可研究之基因座之數目為300、900、2000及5000。

EpiSwitch™定製陣列管線

EpiSwitch™陣列為具有一組樣品之雙色系統，在產生EpiSwitch™庫之後，以Cy5標記，且欲比較/分析之其他樣本(對照)以Cy3標記。使用Agilent SureScan掃描儀掃描陣列，且所得特徵使用Agilent特徵提取軟體

提取。接著，使用EpiSwitch™陣列處理R腳本處理資料。使用標準雙色封裝在Bioconductor R：Limma*中處理陣列。使用Limma*中標準化之陣列函數進行陣列之標準化，且對於Agilent陽性對照及EpiSwitch™陽性對照進行此標準化。基於Agilent旗標呼叫過濾資料，移除Agilent對照探針，且平均該技術複製探針，以使用Limma*對其進行分析。探針係基於所比較之2個情形之間的差異模型化，且接著使用偽發現率校正。使用變異係數(CV) $\leq 30\%$ 之探針，該等探針 ≤ -1.1 或 ≥ 1.1 且通過 $p \leq 0.1$ FDR p值，以進一步篩檢。為了減少探針組，使用FactorMineR R封裝進行其他多因子分析。

*註：LIMMA為用於評估微陣列實驗中差異表現之線性模型及經驗貝葉斯方法(Empirical Bayes Process)。Limma為用於分析由微陣列或RNA-Seq產生之基因表現資料的R封裝。

最初基於最終挑選之調整的p值、FC及CV $< 30\%$ (任意截止點)參數選擇探針池。僅基於前兩個參數(調整的p值；FC)獲得其他分析及最終清單。

統計管線

使用EpiSwitch™ R分析封裝處理EpiSwitch™篩檢陣列，以便選擇轉譯至EpiSwitch™ PCR平台上之高值EpiSwitch™標記。

步驟1

基於其校正p值(偽發現率，FDR)選擇探針，其為改性直鏈回歸模型之結果。選擇低於p值 ≤ 0.1 之探針，且接著進一步以其表觀遺傳率(ER)降低，探針ER必須為 ≤ -1.1 或 ≥ 1.1 ，以便選擇以用於進一步分析。最後過濾一變化係數(CV)，探針必須低於 ≤ 0.3 。

步驟2

基於其選擇ER選擇來自統計清單之前40個標記作為PCR轉譯之標記。具有最高負ER負載之前20個標記及具有最高正ER負載之前20個標記形成清單。

步驟3

自步驟1所得之標記，統計學上顯著之探針形成使用超幾何富集(HE)之富集分析之基礎。此分析實現自顯著探針清單之標記減少，且與來自步驟2之標記一起形成轉譯至EpiSwitch™ PCR平台上之探針之清單。

統計探針由HE處理，以測定哪些遺傳位置具有統計學上顯著探針之富集，指示哪些遺傳位置為表觀遺傳差異中心。

選擇基於校正p值之最顯著富集的基因座，以用於產生探針清單。選擇低於p值0.3或0.2之遺傳位置。用來自步驟2之標記，定位至此等遺傳位置之統計探針形成EpiSwitch™ PCR轉譯之高值標記。

陣列設計及處理

1. 使用SII軟體(目前v3.2)處理遺傳基因座以：
 - a. 拉出在此等特異性遺傳基因座處之基因組之序列(具有50kb上游及20kb下游之基因序列)
 - b. 定義此區內之序列涉及CC's之機率
 - c. 使用特異性RE剪切序列
 - d. 測定哪些限制性片段可能在某一取向上交互作用
 - e. 對不同CC's交互作用之可能性一起進行排序。
2. 測定陣列大小且因此測定可用的探針位置之數目(x)
3. 拉出x/4交互作用。
4. 對於各交互作用，限定30bp至部分1之限制位點及30bp至部分2之限制位點之序列。檢查不重複之彼等區，若如此在清單上，排除且取下

下一個交互作用。加入兩個30bp以限定探針。

5. 產生x/4探針+所限定對照探針之清單，且複製4次以產生待在陣列上產生之清單

6. 針對定製CGH陣列，上傳探針之清單至Agilent Sure設計網站上。

7. 使用探針組以設計Agilent定製CGH陣列。

陣列處理

1. 使用EpiSwitch™ SOP處理樣本以用於產生模板。

2. 由陣列處理實驗室進行乙醇沈澱清除。

3. 按照Agilent SureTag完全DNA標記套組處理樣本，用於血液、細胞或組織之基因體DNA分析酶標記的基於Agilent寡核苷酸陣列的CGH

4. 使用Agilent C掃描儀使用Agilent特徵提取軟體掃描。

公開案

本文中提及之所有公開案之內容以引用之方式併入至本說明書中，且可用於進一步定義與本發明相關之特徵。

實例

實例1.癌症中之染色體交互作用之分析

前言

目前基於基因體DNA之腫瘤學診斷方法為昂貴、半定量的且不能捕獲所有斷點變體。基於嵌套RT-PCR之診斷方法需要活細胞，必須使用其他方法確認，且具有複雜的RNA處理步驟。本研究中研發之方法捕獲所有斷點變體，為定量的，不具有RNA穩定性問題，使用較小樣本體積且處理時間快。因此，該方法減少錯誤診斷且從而給予錯誤治療之機會。

本研究亦鑑別治療學上對酪胺酸激酶抑制劑有反應之3C交互作用。

此形成可用於檢測可用酪胺酸激酶抑制劑治療之患者之預後測試的基礎。例如歸因於斷點變體，目前測試係不準確或不敏感的。錯誤診斷將導致患者不能接收酪胺酸激酶抑制劑療法而相反接收該等患者對其無反應的類固醇。未用例如iHES治療之患者之預後較差。

吾人研究關於癌症之表觀遺傳交互作用及其在患者分級中之用途，以用於用酪胺酸激酶抑制劑治療。使用高解析度染色體構形捕獲或3C分析平台(稱為EpiSwitch™)及定量PCR，吾人定位、評價及定量在具有或不具有IDH突變之神經膠瘤細胞株中之FIP1L1與PDGFRA之間的構形並接。藉由4q12處之間質性缺失及與同慢性嗜伊紅球形白血病相關聯之FIP1L1融合之PDGFRA的失調促使吾人小組亦研究相同染色體構形交互作用是否存在於EOL-1及其他白血病細胞株中。

藉由使用高解析度染色體構形捕獲或3C分析平台(稱為EpiSwitch™)，鑑別與突變相關之一些3C表觀遺傳交互作用。為了最佳化引子，吾人在具有Qiagen QIAgility高精度自動化PCR系統之96孔盤分析上使用溫度梯度，且在36個獨立溫度梯度PCR中測試72個引子。篩檢總共20個個體OBD預測3C交互作用。若可能，針對各預測交互作用使用多個引子組。吾人使用10 ng來自兩個AML細胞株EOL-1及HL-60之靶標3C模板最佳化一步PCR。使用SYBR檢測及濃度匹配陰性對照，進行(靶標之)PCR擴增。陰性對照包括未用甲醛處理為3C樣本(具有消化及接合)之EOL-1及正常基因體DNA。所有PCR產物在LabChip上運行。預期大小之PCR產物使用凝膠(Invitrogen)純化，且在正向及反向引子取向上定序。每反應以3.2 pmol/μL使用引子，其中模板濃度為1 ng/μL/100 bp。提出展示與預測3C片段具有100%同源性之產物，以用於qPCR設計。

為了篩檢IDH1 SNP rs11554137及IDH1 R132H突變，將10 ng 3C模

板與源於學術公開案之習知IDH1基因體引子一起使用；此等引子序列經另外設計且不包括於本申請案中。

使用基於水解探針之qPCR與濃度匹配陰性對照進行一步qPCR。接著，使用針對靶標3C DNA片段之接合點區設計之水解探針最佳化B7 462 bp交互作用之檢測。用於qPCR分析之探針針對3C DNA片段具有特異性。EOL-1模板(10 ng)用於在基於溫度梯度之qPCR (58°C至68°C)中最佳化探針。選擇針對水解探針qPCR分析研究之引子。B7產物用於設計3C片段特異性qPCR。用5'-FAM/BHQ1-3'或5'德克薩斯紅/BHQ2-3'標記之雙標記水解探針用於檢測定序交互作用。探針設計成跨越3C片段之接合點區，從而確保3C產物之檢測針對FIPL1L1及PDGFRA交互作用具有特異性。由定序產物產生qPCR標準曲線(10^6 -1複本)。

雙標記5'FAM-BHQ1至3'標記水解探針用於檢測定序交互作用。在20 ng下篩檢所有樣本，且記錄MMP1複本數。定序PCR產物B7用於生成qPCR篩檢之標準曲線。調整至20 ng 3C庫DNA之qPCR模板與濃度匹配的陰性對照一起使用。對照包括源於脂肪組織切片及正常血液之3C庫。額外陰性對照包括未甲醛固定之細胞株材料、經消化及接合之庫材料及正常基因體DNA。根據American Society of Hematology's guidelines進行此研究。細胞株由ATCC提供。具有知情同意之患者材料藉由Tissue Solutions (Oxford BioDynamics TSD-OBD2273)提供。

在六個所鑑別之FIP1L1-PDGFR α 3C序列取向序列中，兩個再次出現(表1)。特異性地，基因體序列標記GBA461GB_GBA496A6鑑別四次。基因體序列FH147946_FH149AA7鑑別兩次。使用一步PCR，在AML細胞株EOL-1中擴增此等六個交互作用。使用一步PCR，可再現地在AML細胞株(急性骨髓性嗜伊紅球性白血病)EOL-1 (n = 2，水解探針分析)中發

現FIP1L1 PDGFRA 3C B7交互作用。EOL-1中之FIP1L1與PDGFRA之間的拓樸絕緣損耗可部分地由缺失介導。

在兩個伊馬替尼敏感細胞株GDM-1 (n = 1)及HL-60 (n = 2)中擴增462鹼基對B7交互作用。FIP1L1基因與PDGFRA基因之間的拓樸絕緣損耗機制係未知的，然而，兩個細胞株均對伊馬替尼有反應。神經膠母細胞瘤細胞株DBTRG-05MG (n = 2 qPCR分析)及U-373 (n = 1 qPCR分析)亦呈B7交互作用陽性。DBTRG-05MG中發現之最大複本數為29.89個複本(20 ng模板，表2)。不具有經鑑別之IDH1突變或SNP rs11554137之一個神經膠瘤樣本具有1.19個(每20 ng)之FIPL1-PDGFRA 3C片段。具有經鑑別之IDH1 R132H突變之兩個神經膠瘤樣本呈FIPL1-PDGFRA 3C片段陽性。

由定序PCR產物產生qPCR標準曲線(10^6 -1複本)。使用CFX管理者軟體(BioRad)進行qPCR資料之分析。用MMP1中之穩定3C交互作用進行標準化。標準曲線展示使用一步qPCR在AML及神經膠母細胞瘤樣本中之B7交互作用之選擇性擴增。

使用染色體構形成功地檢測與神經膠母細胞瘤及AML細胞株中之FLIPL1及PDGFRA與之間的絕緣體功能損耗相關之DNA序列。使用qPCR，FIP1L1基因與PDGFRA基因之間的絕緣損耗引起在AML及神經膠母細胞瘤中之可檢測的3C更改。使用習知定序方法，此等交互作用將為不可檢測的。

實例2.定量PCR分析之研究

為了符合MIQE指南中闡述之qPCR之資料及技術要求，吾人研究使用qPCR之擴增及檢測3C的新穎技術。定量即時PCR (qPCR)准許在靶標樣本中測定較高靈敏度下之DNA複本數。發現此尤其適合於關於檢測染

色體交互作用之核酸產物之分析的需求。

MIQE指南提供關於qPCR實驗必須報告以確保其相關性、準確度、正確解釋及可重複性之最小資訊的規定。MIQE (定量即時PCR實驗之公開案之最小資訊)在針對DNA微陣列分析、蛋白質組研究實驗、基因組序列規定及在RNA干擾研究及代謝組研究下論述之彼等制定之類似指南上模型化，其所有均為MIBBI (關於生物及生物醫學研究之最小資訊)傘下協調的方案。

通常在3C分析中，若使用基於螢光之PCR方法時，則在3C片段之複合DNA之限定『恆定』區中設計多個引子組。然而，此類方法並不依循qPCR之MIQE原理，且技術上為嵌套式PCR之衍生。此類方法需要已知其中至少一半交互作用。

在習知檢測技術中，DNA聚合酶僅裂解與已知DNA靶標雜交之探針，且當反向PCR引子結合至相同3C庫片段時。螢光增加僅當靶標與探針互補且在PCR期間擴增時才發生。因為此等要求，未檢測到非特異性擴增。

自檢測接合產物所需之基因體DNA之數量，吾人評估，一些基因座特異性接合事件可在僅1/2,000至1/20,000之哺乳動物細胞中發生。因此，用習知方法對接合產物之可信賴的量化僅當在習知技術中向各PCR添加大量DNA (亦即，許多基因組等效物)時才為可能的。然而，用吾人已研究出之新穎技術，吾人常規地使用20至100 ng 3C模板($\sim 3.2 \times 10^4$ 至 1.6×10^5 個基因組等效物)/PCR。吾人之技術需要3C可水解探針以經由接合點結合。此亦為與PCR分析相容之微陣列分析。

為何現有技術使用習知技術並不起作用？關於檢測及量化3C複本數之特異性的技術問題

習知方法需要兩個集合之引子及兩輪PCR。技術上此為用基於螢光之檢測的嵌套式PCR的衍生。其他方法模擬此，但具有一個引子組且在四十與五十個PCR循環之間。儘管在樣本之間可發現差異，但方法不能描述為定量的且含有多種嚴重技術問題：

(a) 嵌套式PCR認為為非定量性，在一些反應中之引子組與達至平頂期之PCR之間的功效差異使得不可能進行低複本數之準確及精確量化。

(b) 非特異性產物可用嵌套引子擴增。

(c) 分析通常不定序。

(d) 用兩輪PCR方法，自資料不能獲得關於複本數之『真實』絕對量化。

(e) 未構建標準曲線(其需要一輪PCR)，從而不可能進行低複本數之準確及精確量化。

(f) 現有試劑盒不符合針對安全臨床qPCR分析建立之指南。

(g) TaqMan PCR通常擴增多種PCR產物，產生關於產物之特異性的嚴重技術問題。

(h) 相對於針對使用水解探針以用於檢測3C，探針位於『恆定區』中。

(i) 恆定區不為針對3C片段或TaqI位點兩者之序列特異性區域，因此不確定藉由水解探針檢測之PCR產物為3C片段之任何特異性主張。

習知方法使用以下對照：

對照1. 製備含有等量所有接合產物之對照模板。使用此模板對引子功效之差異進行標準化。

對照2. 藉由增加基因體距離來測定所分隔位點之間的交互作用，以評估隨機交互作用之頻率。良好起始點應為測試由介於0至100 kb範圍內之

基因體距離所分隔位點之間的大約12個交互作用。

對照3. 當比較兩個不同細胞類型或兩個不同病狀時，測定假定在兩個情況中具有類似構形之基因體區中之交互作用。使用此資料集以用於標準化，以便由獲自所關注之區之數據進行定量比較。

當在對引子功效標準化之後檢測特異性交互作用(對照1)時，觀測到交互作用頻率中之局部峰(對照2)。接著即可採用無關基因體區(對照3)之分析來比較不同細胞或細胞狀態，以確定特異性交互作用是否與諸如基因座之轉錄的生物活性相關。

然而，吾等已發展之技術並不需要此類對照在適當位置上。所達成之特異性擴增及檢測係歸因於選擇引子及探針之結合靶標，與螢光淬滅劑標記系統組合使用。舉例而言，表3列舉一些適合螢光探針及淬滅劑。

實例3.靶標序列之特徵

EpiSwitch™ qPCR技術獨特地用於檢測跨越並列接合之DNA片段中之TaqI限制位點之靶標水解探針(表4)。通常，依據針對探針之雜交功效及其形成二級結構之傾向及可能干擾探針雜交過程之其他生物物理學特性(包括摺疊及彎曲特性以及最小自由能程度)來選擇使用水解探針進行檢測時所選擇之位點。此解釋為何迄今為止在3C檢測之情況下所採用之任何水解探針均靶向接合片段之一個部分內之探針，且兩者不會重疊。此點強烈阻礙在靶標序列內之所有接合及未接合片段中僅檢測接合產物的特異性。

在TaqI限制位點周圍之查理檢查點(Check Point Charlie，CC)之並列接合處之DNA之曲率及最小自由能程度指示二級結構構形，區分用於水解探針雜交之習知靶向序列。在跨越限制位點之並接TaqI片段上設計探針。藉由BEND演算法¹藉由對二核苷酸幾何形狀之旋角、傾角及扭轉角

求和計算DNA之曲率。曲率表述為度/螺旋圈，例如 10.5° /螺旋圈或 1° /鹼基對。TaqI限制位點處之最小自由能 ΔG 藉由Zuker²演算法計算，其中能量最小化之評估使用最接近相鄰能量參數³。

在EpiSwitch™技術中，吾人掃描自TaqI位點上游及下游序列之高達400個鹼基，且計算DNA之曲率。由於高二級結構之兩個CC接合一起，相比於用於水解探針雜交之習知靶標序列，接合位點處之靶標序列展示曲率傾向之定量差異。技術尋找高於 $> 5^\circ$ /螺旋圈之曲率傾向峰值分數。與低於 5° /螺旋圈之相鄰序列之谷線相比之值可展示，DNA可呈現弧形構形。

另外，吾人掃描TaqI限制位點之上游及下游序列之高達20個鹼基，且計算在 60°C 下在 0 mM Na^+ 及 4.5 mM Mg^{++} (用寡核苷酸校正)之離子條件下之直鏈DNA的最小自由能 ΔG ，如Zuker演算法中所描述。選擇具有在 60°C 下之自由能程度低於 <1.15 千卡/莫耳之熱力學結構的序列用於探針設計。

存在於基因類似啟動子、內含子、終止子之調節區中之此類序列指示二級結構構形，該二級結構構形藉由EpiSwitch™平台藉由計算曲率及自由能值鑑別。設計探針為在用上文所描述之曲率傾向及最小自由能程度選擇之序列上跨越TaqI限制位點。

儘管水解探針之習知用途不應用於靶向雜交，CC位點之接合接頭處之此類生物物理學上受限序列，在EpiSwitch處理及檢測之情況下，吾人能夠使用對與所有qPCR對照重疊之TaqI接合位點特異性地水解探針，表明藉由針對非特異性對照之複本數目的接合產物的高效及成比例檢測。此為靶向3C重疊之水解探針之第一實踐用途，適當進行及在EpiSwitch分析之情況下，基於對於有效探針檢測之溫度梯度測試設計。

以下實例說明方法：

序列1

TTCCACGTGGCCTACCACAGCATGTCAGGCCTGGGGGCAGAATCTTGCCATACTGTGCAGCCCAAATTTGAATGCC
AAAGGCTTTTCGTTTGTCTCTGGGGGGCCACAGTCTAGGTCTAGTTCTGTGCAGGAGTTGTAATATTTGCTCTTCTCT
CCCTCCTCCAGCTCGCAGACCTCTGAAGAGAGTGCCATTGAGACGGGTTCCAGCAGTTCCACCTTCATCAAGAGAG
AGGACGAGACCATTGAAGACATCGAAAAGATAAAACAGGTGTTAGTGAGGATATGGGGAAATAAAACCTCATA
CACTTCTGGTGGGATTGTAAATGGTGCAGCTGCTTTGAAGAACAGCCTGGCCATTTTCTCAAATGGTGAAACATG
GAGTTACCATGTGAGTCCTCCACCTTAGAGGAATGAAAACATATTCAGACAAAACTGTACGTGAATATTCATAG
CAGCATTATTCTTAATAGAAAGTGGAAGAAAGAAACCTCGCAGCTG

下文繪製序列之曲率傾向曲線。此處，曲線展示50與100個鹼基之間的高於5°及隨後較低分數之谷線的曲率傾向量級。此指示DNA之曲率構形。TaqI區周圍之序列之DNA摺疊及自由能評估產生在60℃、4.5 mM Mg⁺⁺離子條件下之1.13千卡/莫耳的最低熱力學結構自由能ΔG。此區對應於指示高度調節區之FIP1L1之內含子區及PDGFRA基因之3'端。選擇此並接TaqI片段，且設計探針為跨越限制位點。

序列2

TGGGAGTGGGTGGAGTGAGAACCTGGGAGAAGGCCAGCCCTTTATATCCAGGCAGACAGCTCCAAGTGCCACCA
TGGATCAGCCAGTCTTGCAGGGGTGATGCTATTCAGCTACAGATGGCTTGATCCTGAGTCATTTCTTCTTTTCCAT
GCAGTGTGTCCACCGTGATCTGGCTGCTCGCAACGTCTCTGGCACAAGGAAAAATTGTGAAGATCTGTGACTTT
GGCCTGGCCAGAGACATCATGCATGATTCGAAAAGATAAAACAGGTGTTAGTGAGGATATGGGGAAATAAAACC
CTCATACACTTCTGGTGGGATTGTAAATGGTGCAGCTGCTTTGAAGAACAGCCTGGCCATTTTCTCAAATGGTGA
AACATGGAGTTACCATGTGAGTCCTCCACCTTAGAGGAATGAAAACATATTCAGACAAAACTGTACGTGAATAT
TCATAGCAGCATTATTCTTAATAGAAAGTGGAAGAAAGAAACCTCGCAGCTGCATCAACTGATGAATGGATAGAT
TAAATGTGTTATATCCATACAGCGGAATATTATTTGGCAAGGACAATAAAATGAAGTACTGGTAGATGTTACAACA
CGGATGAACCTTACAAATGTGGAAGCTAAAGATGTCAGTCCGT

兩個並接片段之TaqI周圍之647 bp序列之掃描展示在較低分數之谷線周圍在大約210 bp位置處高於5°/螺旋圈的曲率傾向量級。TaqI區周圍之44 bp序列之DNA摺疊及自由能評估產生在60℃、4.5 mM Mg⁺⁺離子條件下之0.78千卡/莫耳之最低熱力學結構自由能ΔG。

序列3

GCAGCTGCGAGGTTTTCTTTTCCACTTTCTATTAAGAATAATGCTGCTATGAATATTCACGTACAAGTTTTGTCTG
AATATGTTTTCATTCCTCTAAGGTGGAGGACTCACATGGTAACTCCATGTTTCACCATTTGAGAAAAATGGCCAGGC
TGTTCTTCAAAGCAGCTGCACCATTTTACAATCCCACCAGAAGTGTATGAGGGTTTTATTTCCCATATCCTCACTA
ACACCTGTTTTATCTTTTCGAGGTCCTTGCTGAACCTGGACCTATAAATGACGTCAATGATAGTGATCCCTACTGCA
GAAATCTACAAGTGGCTATAAAGAACTCTGTAGGTAAGAAATTCTGTAAGATCAGAAAGTACAATGAATTCACCTC
ATAATAAATTACTTGGTGGACACCAAATGGGTGCTAAATTGATTGGGTAGAAGGAATTGTATGCCCAAGCCACAT
GGC

跨越TaqI限制位點之上游及下游之462 bp序列之掃描展示大約在400 bp與450 bp之間，高於5°/螺旋圈之傾向量級，其中周圍序列值低於5°/螺旋圈。TaqI區周圍之44 bp序列之DNA摺疊及自由能評估產生在60℃、4.5 mM Mg⁺⁺離子條件下之-0.93千卡/莫耳之最低熱力學結構自由能ΔG。

序列4

AGTACTTCCTCTCCCCTCCCATTGTTAAAAATAGTTTACATTGCTTCCCAGGCTGGGCTGGTGGAGTTGGCACGA
GATGTCAGAGGAACCTGAGTCATGCTCAGGCCCAAGCCCTGTTGGCAGGCAGACCACTGCTTTCTGGCCTTCCGT
GACTATCTGAAAAAATCGTGAATGGCTAGAGCTACTCTTCACTTGCTGAACATTTTCAAAAAGAATTGAGAACTT
CTGGATTAAATTGCCTTCTTCTCGAAAAGATAAAACAGGTGTTAGTGAGGATATGGGGAAATAAAACCTCATA
ACTTCTGGTGGGATTGTAATGGTGCAGCTGCTTTGAAGAACAGCCTGGCCATTTTCTCAAATGGTGAAACATG
GAGTTACCATGTGAGTCCTCCACCTTAGAGGAATGAAAACATATTCAGACAAAACTTGACGTGAATATTCATAG
CAGCATTATTCTTAATAGAAAGTGAAAAAGAAAACCTCGCAGC

跨越TaqI限制位點之上游及下游之499 bp序列之掃描展示在大約160 bp及240 bp處之兩個曲率傾向峰。TaqI區周圍之44 bp序列之DNA摺疊及自由能評估產生在60℃、4.5 mM Mg⁺⁺離子條件下之1.14千卡/莫耳之最低熱力學結構自由能。

序列5

CCTCTCCACACAAACCTGCTACTGAGTACCTTCGCTAACTTAACCATTCACTCACCTGGAAGACCACCTACTAGC
AGAAGGATTCTTAACAAATGTAAAGAAAAGTAAGGACTTTACACTAACAATACAAAATAACTCTCTCTTTGACAAT
TCAAAAAACAAAAGATGTTGAACTTTGACATTTACAGAAATTAATGTCAAATGTGACACAATACCATCACATCTGG
CTAACTAACTCTTATGCTTTTTTTAGTAAGGAACAACCTTTGAGCCTCAATATCTTAATTCTTAAAATGATAAAGAAC
ACTTAACTCAATTTGTTGAGATCAAATAAGGTAATGTAAAAGTGGGATTTTTATTTTACTTATTTATTGAAAACC
CTGGGACCTTCCAGATGGGACTAACTGGGGAAAAGTGGACAAGTTACAAACAAAGAACTCAAAGGAAAAGTCAT
TGGCACTGATCTCTAAGATGCTATCACATGTGATTGGTGGTTGATTTTATTAACAAATTATAAGCAAAGTACTACAA
AGGTGGCTTTAAAAAGAAAATAAAGCAATTCAGAAACTACTTTTTCATGTAGCTTGATGTGTGCTCCATGT

跨越TaqI限制位點之上游及下游之609 bp序列之掃描展示在大約200

bp及500 bp處的具有較低分數谷線之兩個曲率傾向峰。TaqI區周圍之44 bp序列之DNA摺疊及自由能評估產生在60°C、4.5 mM Mg⁺⁺離子條件下之0.51千卡/莫耳之最低熱力學結構自由能 ΔG 。

序列6

```
AAATGATGAGGCACGGGTGAATAAGATAGTTGGAAGTGACACATACAGATTTCAAATAATTCCTAAAGGTGTAT
GGTTTTCTTTCCCTACAAATCCTACTTTTCAGTTCTTTTGATACATGGACCCAGAGTGGAATTGCTGGATCATATGATA
ATTCTATTTTAACTTCTTGATGGACCTCTGTTTTGTTTTGTTTTTACAGAGGCTGCAACATTTATATTCCTACTA
ATAATGCACAGGGGTTTCGGATTTCTCCACATCCTTGCCAACACTTGATATTCCTGGGTTTTTGTATAATGGCCATC
CTAATAGGTGTGGGGACATGAGGTTTTCAATATGCTTGTGGGACATCGAAAACCCTGGGACCCTCCAGATGGGA
CTAACTGGGGAAAGTGGACAAGTTACAAACAAAGAACTCAAAGGAAAGTCATTGGCACTGATCTCTAAGATGCT
ATCACATGTGATTGGTGGTTGATTTTATTAACAAATTATAAGCAAAGTACTACAAAGGTGGCTTTAAAAAGAAAAAT
AAAGCAATTCACAGAACTACTTTTTTCATGTAGCTTGTATGTGTGCTCCATG
```

跨越TaqI限制位點之上游及下游之586 bp序列之掃描展示在大約300 bp及500 bp處具有較低分數谷線之兩個曲率傾向峰。TaqI區周圍之44 bp序列之DNA摺疊及自由能評估產生在60°C、4.5 mM Mg⁺⁺離子條件下之0.51千卡/莫耳之最低熱力學結構自由能 ΔG 。

參考文獻：

1. Goodsell, D.S.及Dickerson, R.E. (1994) 「Bending and curvature calculations in B-DNA」 Nuc. Acids Res. 22, 5497-5503
2. Zuker (2003). Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. Nuc. Acids Res. 31, 3406-3415
3. SantaLucia, Jr (1998) A unified view of polymer, dumbbell and oligonucleotide DNA nearest-neighbor thermodynamics. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 1460-1465

表1a.

孔	大 小 bp	ENSEMBL BLAT位置 FIP1L1	ENSEMBL BLAT位 置 PDGFRA	片 段 之 間 的距離(bp)	引子1	引子2
A1	501	4: <u>53379986-53380174</u> *	4: 54294960-54295285 RF	914786	TTCCACGTGGCCTACCACAG	CAGCTGCGAGGTTTTCTTTT
A1	647	4: <u>53379986-53380318</u>	4: 54285685-54285944 RF	905367	TGGGAGTGGGTGGAGTGAGA	ACGGACTGACATCTTTAGCTTCC
B1及B7	462	4: <u>53379986-53380176</u>	4: 54278879-54279091 RR	898703	GCAGCTGCGAGGTTTTCTTT	GCCATGTGGCTTGGGCATAC
C1	499	4: <u>53379986-53380194</u>	4: 54281532-54281784 RF	901338	AGTACTTCCTCTCCCCTCCCA	GCAGCTGCGAGGTTTTCTTTT
D7及E7	609	4: 53361094-53361416	4: <u>54281778-54281990</u> FR	920362	CCTCTCCACACAAACCTGCTA	ACATGGAGCACACATACAAGCTAC
D7	586	4: 53369589-53369898	4: <u>54281778-54282010</u> FR	911880	AAATGATGAGGCACGGGTGAA	CATGGAGCACACATACAAGCTAC

*來自引子之序列

表1b.六個反覆性FIP1L1及PDGFRA交互作用及鹼基對(BP)大小

編號	交互作用	孔編號	鹼基對大小
1	FIP1L1PDGFRA_4_GBA461GB_GBA496A6_FH15A743_FH161379_RF	A1	501
2	FIP1L1及PDGFRA_4_GBA461GB_GBA496A6_FH149644_FH15A108_RF A1	A1	647
3	FIP1L1及PDGFRA_4_GBA461GB_GBA496A6_FH145047_FH147946_RR	B1及B7	B1: 462
4	FIP1L1及PDGFRA_4_GBA461GB_GBA496A6_FH145047_FH147946_RF	C1	499
5	FIP1L1及PDGFRA_4_GBAAA81A_GBAA7581_FH147946_FH149AA7_FR	D7及E7	D7: 609
6	FIP1L1及PDGFRA_4_GBA31931_GBA36063_FH147946_FH149AA7_FR	D7	586

表1c.接合片段之序列

編號	序列
1	TTCCACGTGGCCTACCACAGCATGTCAGGCCTGGGGGCAGAATCTTGCCATACTGTGCAGCCCAAATTTGAATGCCAAAGGCTTTCGTTTGTCTCTGGGGGGCCACAGTCTAG GTCTAGTTCTGTGCAGGAGTTGTAATATTTGCTCTTCTCTCCCTCCTCAGCTCGCAGACCTCTGAAGAGAGTGCCATTGAGACGGGTTCAGCAGTTCCACCTTCATCAAGAG AGAGGACGAGACCATTGAAGACATCGAAAAGATAAAACAGGTGTTAGTGAGGATATGGGGAAATAAAACCCTCATACACTTCTGGTGGGATTGTAAAATGGTGCAGCTGCTT TGAAGAACAGCCTGGCCATTTTCTCAAATGGTGAAACATGGAGTTACCATGTGAGTCCTCCACCTTAGAGGAATGAAAACATATTAGACAAAAACTTGTACGTGAATATTCAT AGCAGCATTATTCTTAATAGAAAGTGG
2	TGGGAGTGGGTGGAGTGAGAACCTGGGAGAAGGCCAGCCCTTATATCCAGGCAGACAGCTCCAAGTGCCACCATGGATCAGCCAGTCTTGCAGGGGTGATGCTATTCAGC TACAGATGGCTTGATCCTGAGTCATTTCTCCTTTTCCATGCAGTGTGTCCACCGTGATCTGGCTGCTCGAACGTCCTCCTGGCACAAGGAAAAATTGTGAAGATCTGTGACT TTGGCCTGGCCAGAGACATCATGCATGATTCGAAAAGATAAAACAGGTGTTAGTGAGGATATGGGGAAATAAAACCCTCATACACTTCTGGTGGGATTGTAAAATGGTGCAGC TGCTTTGAAGAACAGCCTGGCCATTTTCTCAAATGGTGAAACATGGAGTTACCATGTGAGTCCTCCACCTTAGAGGAATGAAAACATATTAGACAAAAACTTGTACGTGAATA TTCATAGCAGCATTATTCTTAATAGAAAGTGGAAAAAGAAAACCTCGCAGCTGCATCAACTGATGAATGGATAGATTAAATGTGTTATATCCATACAGCGGAATATTATTTGGCA AGGACAATAAAATGAAGTACTGGTAGATGTTACAACACGGATGAACCTTACAAATGTGGAAGCTAAAGATGTCAGTCCGT
3	GCAGCTGCGAGGTTTTCTTTTTCCACTTTCTATTAAGAATAATGCTGCTATGAATATTCACGTACAAGTTTTGTCTGAATATGTTTTATTCTCTAAGGTGGAGGACTCACATG GTAATCCATGTTTCACCATTTGAGAAAATGGCCAGGCTGTTCTTCAAAGCAGCTGCACCATTTTACAATCCCACCAGAAAGTGATGAGGGTTTTATTTCCCATATCCTCACTA ACACCTGTTTTATCTTTTCGAGGTCCTTGCTGAACCTGGACCTATAAATGACGTCAATGATAGTGATCCCTACTGCAGAAATCTACAAGTGGCTATAAAGAACTCTGTAGGTAAG AAATTCTGTAAGATCAGAAAGTACAATGAATTCACCTCATAATAAATTACTTGGTGGACACCAAATGGGTGCTAAATTGATTGGGTAGAAGGAATTGTATGCCCAAGCCACATG GC
4	AGTACTTCTCTCCCCTCCCATATTGTTAAAAATAGTTTACATTGCTTCCCAGGCTGGGCTGGTGGAGTTGGCACGAGATGTCAGAGGAACCTGAGTCATGCTCAGGCCCAAG CCCTGTTGGCAGGCAGACCACTGCTTTCTGGCCTTCCGTGACTATCTGAAAAAATCGTGAATGGCTAGAGCTACTCTTCACTTGCTGAACATTTTCAAAAAGAATTGAGAAC TTCTGGATTAAATTGCCTTCTTCTCGAAAAGATAAAACAGGTGTTAGTGAGGATATGGGGAAATAAAACCCTCATACACTTCTGGTGGGATTGTAAAATGGTGCAGCTGCTTT GAAGAACAGCCTGGCCATTTTCTCAAATGGTGAAACATGGAGTTACCATGTGAGTCCTCCACCTTAGAGGAATGAAAACATATTAGACAAAAACTTGTACGTGAATATTCATA GCAGCATTATTCTTAATAGAAAGTGGAAAAAGAAAACCTCGCAGC
5	CCTCTCCACACAAACCTGCTACTGAGTACCTTCGCTAACTTAACCATTATTACCCCTGGAAGACCACCTACTAGCAGAAGGATTCTTAACAAATGTAAAGAAAGTAAGGACT TTACACTAACAACTACAAAATACTCTCTCTTTGACAATTCAAAAAACAAAAGATGTTGAACTTTGACATTTACAGAATTAAATGTCAAATGTGACACAATACCATCACATCTGG

	CTAACTAACTCTTATGCTTTTTTTAGTAAGGAACAACCTTTTGAGCCTCAATATCTTAATTCTTAAATGATAAAGAACACTTAACTCAATTTGTTGAGATCAAATAAGGTAATGTAA AAGTGGGATTTTTATTTTTACTTATTTATTCGAAAACCCTGGGACCCTTCCAGATGGGACTAACTGGGGAAAGTGGACAAGTTACAAACAAAGAACTCAAAGGAAAGTCATT GGCACTGATCTCTAAGATGCTATCACATGTGATTGGTGGTTGATTTTATTAACAAATTATAAGCAAAGTACTACAAAGGTGGCTTTAAAAAGAAAATAAAGCAATTCACAGAAA CTACTTTTTTCATGTAGCTTGTATGTGTGCTCCATGT
6	AAATGATGAGGCACGGGTGAATAAGATAGTTGGAAGTGACACATACAGATTTCAAATAATTCCCTAAAGGTGTATGGTTTTCTTCCCTACAAATCCTACTTTCAGTTCTTTTGT ACATGGACCCAGAGTGGAATTGCTGGATCATATGATAATTCTATTTTTAACTTCTTGATGGACCTCTGTTTTTGTGTTTTTACAGAGGCTGCAACATTTTATATTCCTACTAAT AATGCACAGGGGTTTCGGATTTCTCCACATCCTTGCCAACACTTGATATTTCTGGGTTTTTTGATAATGGCCATCCTAATAGGTGTGGGGACATGAGGTTTTCAATATGCTTGTG GGACATCGAAAACCCTGGGACCCTTCCAGATGGGACTAACTGGGGAAAGTGGACAAGTTACAAACAAAGAACTCAAAGGAAAGTCATTGGCACTGATCTCTAAGATGCTA TCACATGTGATTGGTGGTTGATTTTATTAACAAATTATAAGCAAAGTACTACAAAGGTGGCTTTAAAAAGAAAATAAAGCAATTCACAGAACTACTTTTTTCATGTAGCTTGTAT GTGTGCTCCATG

表2

適應症	細胞株或臨床樣本	IDH1 SNP rs11554137狀態	IDH1 R132H狀態	20 ng中之FIP1L1-PDGFR 3C DNA複本 (+/-)	20 ng中之 MMP1 3C複本
急性骨髓性白血病(AML)	AML-193	野生型	野生型	+ (0.04)	0.37
多形性寡樹突狀星形細胞瘤	BT-412	野生型	R132H**	不在分析中	
多形性神經膠母細胞瘤	DBTRG-05MG	野生型	野生型	+ (0.05)	0.35
AML (嗜酸性)	EOL-1	野生型	野生型	+ (0.03)	0
急性骨髓單核細胞性白血病	GDM-1	野生型	野生型	+ (1.99)	7.3
AML	HL-60	rs11554137*	野生型	+ (0.18)	1.24
AML	KG-1	rs11554137	野生型	-(0)	4.2
神經膠母細胞瘤星形細胞瘤	U-373	野生型	野生型	+ (2.01)	1.24
神經膠母細胞瘤星形細胞瘤	U87	野生型	野生型	不在分析中	-
寡樹突神經膠質瘤	47436	野生型	R132H	- (0)	1.89

適應症	細胞株或臨床樣本	IDH1 SNP rs11554137狀態	IDH1 R132H狀態	20 ng中之FIP1L1-PDGFR 3C DNA複本 (+/-)	20 ng中之 MMP1 3C複本
寡樹突神經膠質瘤	47679	野生型	野生型	+ (1.19)	2
寡樹突神經膠質瘤	81600	野生型	R132H	- (0)	0.96
寡樹突神經膠質瘤	174694	野生型	R132H	+(0.04)	0.61
寡樹突神經膠質瘤	184263	野生型	野生型	+ (0.06)	5.19
寡樹突星狀膠質細胞瘤	30736	野生型	野生型	- (0)	1.12
脂肪組織切片	91013A	野生型	野生型	- (0)	6.05
正常血液	17153	未分析	未分析	- (0)	4.53
正常血液	17335	野生型	野生型	- (0)	2.18
正常血液	17353	野生型	野生型	- (0)	3.09

*先前陽性，Dodémont等人，2011；**先前陽性，Flavahan等人，2016

表3.

螢光團	Abs [nm]	Em [nm]	3'淬滅劑
FAM	495	520	TAM、BHQ1、DAB、Eclip
TET	521	536	TAM、BHQ1
JOE	520	548	TAM、BHQ1、BHQ2
Yakima黃	530	549	BHQ1、Eclip
HEX	535	556	TAM、BHQ1、BHQ2、 Eclip、BBQ650
花青3	552	570	BHQ1、BHQ2、BBQ650

ATTO 550	554	576	TAM、BHQ2
TAMRA	544	576	BHQ2
ROX	575	602	TAM、BHQ2、BBQ650
德克薩斯紅	583	603	BHQ2、BBQ650
花青3.5	588	604	BHQ2
LC 610	590	610	BHQ2
LC 640	625	640	BHQ2、BBQ650
ATTO 647N	644	669	BHQ2、BBQ650
花青5	649	670	BHQ2、BBQ650
花青5.5	675	694	BHQ2、BBQ650
ATTO 680	680	700	BBQ650

表4.探針之詳情

探針名稱	45047FPRC		OBDFH010_03_FAM	
探針序列	5'-Texas RED-TCAGCAAGGACCTCGAAAAGATAAAACA-BHQ2-3'		5'-FAM-ATTTATTTCGAAAACCCTGGGACCC-BHQ1-3'	
正向引子	. 5'-GCAGCTGCGAGGTTTTCTTT-3'		5'-CCTCTCCCACACAAACCTGCTA-3'	
反向引子	5'-GCCATGTGGCTTGGGCATAC-3'		5'-ACATGGAGCACACATACAAGCTAC-3'	
交互作用標識符	B7 462 bp，PCR 8.		D6/E7，609 bp.	
基因體位置	4:54278879-54279091	4:53379986-53380176	4:53361094-53361416	4:54281778-54281990
取向	正向	反向	正向	正向
重疊基因	RP11-231C18.3，PDGFRA	FIP1L1，RP11-231C18.3	SCFD2	RP11-231C18.3，PDGFRA

探針名稱	45047FPRC		OBDFH010_03_FAM	
查詢起點-終點	188-400	1-191	1-323	320-532
長度	213	191	323	213
分數	413	368	620	412
E-val	1.6E-115	5.6E-102	6.5E-178	3.9E-115
一致性%	100.00	99.48	100.00	100.00

實例4.其他研究

目前在多種適應症中習知診斷性方法(例如定序)遺漏異位酪胺酸激酶活化之檢測。

酪胺酸激酶抑制劑，例如達沙替尼、伊馬替尼及依魯替尼(Ibrutinib)/依布魯維卡(Imbruvica) (Janssen-Cilag Ltd)正在研究用於許多惡性腫瘤(慢性)及體質病症。針對布魯東酪胺酸激酶(BTK)抑制劑之潛在非惡性適應症之實例包括關節炎。

在開酪胺酸激酶抑制劑處方之前，臨床醫師需要靶標酪胺酸激酶中之分子病變之證據。使用習知診斷將遺漏使用酪胺酸激酶抑制劑(TKI)之潛在救命治療診斷干預。

關於藥物治療之本發明之態樣：

(a) 伊馬替尼在治療上靶向3C構形：

吾人表明，已知直接作用於活化酪胺酸激酶之ATP模擬物伊馬替尼亦直接作用於伊馬替尼反應性基因(諸如cKIT)中3C染色體構形。

(b) GSK在治療上靶向3C構形：

針對IDH1抑制劑GSK864提供資料，表明此藥物在多種細胞株中直接抑制染色體構形。用於有效治療之腫瘤學患者之分級可藉由鑑別酪胺酸激酶基因中之活化突變及在其他路徑中之後天性改變來進行。以此方式幫助分級患者之診斷性程序具有巨大的潛在益處。針對FIP1L1及PDGFRA增強子區之構形改變使具有IDH1 R132H突變之神經膠瘤患者中之PDGFRA表現上調。用伊馬替尼治療異位PDGFRA過度表現。

以下資料係關於3C標記及其在功能性qPCR分析中之用途。ABL1及cKIT在非惡性樣本與細胞株之間展示二進位差異。

RC = 反向互補。真實反向引子序列鄰近於RC序列。

鑑別3C交互作用之基因及其涉及之適應症：

1. ABL1，位於9q34處之細胞質酪胺酸激酶基因：疾病適應症：急性骨髓性白血病(AML)、慢性淋巴球性白血病(CLL)、乳癌。慢性骨髓性白血病(CML)及CML母細胞危象或腸胃基質腫瘤(GIST)。骨髓發育不良症候群(MDS)或骨髓增生病(骨髓增生腫瘤，MPN)。

2. 布魯東酪胺酸激酶，位於Xq22.1處之細胞質酪胺酸激酶基因：疾病適應症：

X性聯無 γ 球蛋白血症(XLA)、B細胞惡性疾病。NHL、淋巴瘤(所有分類)、骨髓瘤。慢性淋巴球性白血病。患有反覆性成熟B細胞腫瘤之患者。慢性移植體對抗宿主疾病。復發性毛細胞白血病。復發性或頑固性實體腫瘤。頑固性套細胞淋巴瘤。擴大的食管胃癌瘤及類風濕性關節炎。

3. cKIT，位於4q12處之受體酪胺酸激酶，疾病適應症：

肥大細胞增多症及肥大細胞白血病及前列腺腫瘤。晚期黑素瘤、突變的惡性黑色素瘤、第二線不可切除性或轉移性腸胃基質腫瘤(GIST)、表現惡性間皮瘤。晚期鉑頑固性卵巢癌。復發性卵巢上皮癌、輸卵管癌或原發性腹膜癌，或卵巢輕度惡性潛在腫瘤。患有以下疾病之患者：子宮漿液性乳頭狀癌瘤、廣泛期小細胞肺癌、局部晚期鼻咽癌、復發性/頑固性非霍奇金氏淋巴瘤。轉移性腎細胞癌、轉移性胃腸胰臟神經內分泌腫瘤、反覆性卵巢透明細胞癌瘤、食道鱗狀細胞癌、持續性子宮癌及乳房腫瘤。

4. FGFR1，位於8p11處之受體酪胺酸激酶基因：疾病適應症：甲狀腺癌、口腔腺瘤、慢性白血病、急性白血病、前列腺腫瘤及乳癌。易位FGFR1-3、突變的或擴大的反覆性頭頸癌。表現FGFR-TACC基因融合之

反覆性惡性神經膠瘤。患有晚期非小細胞肺癌之患者。

5. FIP1L1，通常融合至PDGFRA (4q12)之聚腺苷酸化特異性因子。
非酪胺酸激酶基因：iHES、慢性白血病。

6. FLT3，位於13q11-12.2處之受體酪胺酸激酶基因：疾病適應症：
慢性白血病、急性骨髓性白血病及乳癌、iHES、慢性白血病。非小細胞
肺癌(NSCLC)。結腸直腸癌、轉移性黑素瘤或腎細胞癌、神經膠瘤、頑固
性霍奇金氏淋巴瘤。先前治療的卵巢癌。局部晚期鼻咽癌瘤。頑固性慢性
淋巴球性白血病/小淋巴球性淋巴瘤(CLL/SLL)。舒尼替尼失效的腸胃基
質腫瘤(GIST)。

7. PDGFRA，位於4q12處之受體酪胺酸激酶基因：疾病適應症：神
經膠瘤。慢性白血病、急性骨髓性白血病及乳癌、iHES、慢性白血病。

表5. ABL1 3C交互作用1號。

交互作用之名稱：ORF1_9_130700600_130703071_130719461_130720884_FR								
選擇探針之序列。在Taq I接合點之任一側插入25 bp區。								
5'-CTTATAGCCTGTCTCTCTTGCTGATCGAGGTTGCAACGAGCTGAGATTGC-3'								
正向引子之序列：5'-TTGGAGTTCCAGGGTGATACTGTC-3'								
反向引子之序列：5'-ACCAACGCTATTCTTGGCTTCCA-3'								
PCR序列BLAT之位置。請注意前兩列為真實同源性。								
基因體位置	重疊基因	取向	查詢 起點	查詢 終點	長度	分數	E-val	一致性%
9:130719465- 130719839	ABL1	正向	96	470	375	715	2.00E-206	99.20
9:130702984-	EXOSC2	正向	5	95	91	172	6.00E-43	96.70

	130703074								
	X:136026579-136026620	SLC9A6	反向	93	137	45	65	1.10E-10	93.33
使用周邊血液樣本區別正常及惡性材料(CML、CML-BC、CLL、乳癌)之基於血液的測試。陽性對照為CML母細胞危象細胞株K562。									
循環qPCR (WI103)。3C分析定序用於標準曲線之產物。水解探針靶向3C片段之接合點									

>ORF1_9_130700600_130703071_130719461_130720884_FR

GCAAGCTCCACCTCCTGGGTTC AAGTGATTCTCCTGCCTCAGCCTCCTGAGTAGCTGGGATTACAGGTGTGCCCCACCAT
GCTCTGCTAATTTATCTATTTT TAGTAGAGATGGGGTTTCACCATGTTGGTCAGGCTGGTCTTGAATTCCTGACCTTGTG
ATCCACCCGCCTCGGCCTCCCAAAGTGCTGGGATTACAGACATGAGACACTGCACCCTGCCCCATTCCTTTTAATCTCCC

TTGGAATTAGCTGTTTGGTTGATTTGGAGTTCCAGGGTGATACTGCTGAGTCATAAATGATTTATTTGTGAATTTCTGT
GGCTGGTCACGTATTTTGGTCTGTTTGTATTTCCCTTCCCCTCTCTGTGTCTCCTTATAGCCTGTCTCTCTTGCTGATC
GAGGTTGCAACGAGCTGAGATTGCACGCCACTGCACTCCAGCCTGGGCGACGGAGTGAGACTCCATCTCANNNNNNNNNN
NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNTGATGACAGCCCAACCTGTCACTTTTTTCAGATCCCTTTTTATGAAAGAATTTGCT
TAAGTTGTGTCTGAAGACAAACCAATTTCTTTGGACCCTGGGTATTCTTTTTCTAAGGGAATACCATGTTATTTTGTGTT
ACAGATTGTTTTCGATCTTTCATAGGCTGATCTTCTAGAGTTGGTTAATATCCATGTAGGTTAGATTGAAAACTTGAA
TTCAGAAATGTACGGTGTTGGAGCAGACATGGATCTGGAAGCCAAGAATAGCGTTGGTGTGTTGTTGATGGTGAATCTG

實驗室晶片資料展示正常材料(患者375)而非慢性骨髓性白血病母細胞危象細胞株K562中之3C交互作用之擴增(68℃引子退火溫度)。亦在退火溫度67.5℃及66.4℃下發現此模式。預期產物大小：515 bp。

表6. ABL 3C交互作用2號。

交互作用之名稱：ORF1_9_130700600_130703071_130719461_130720884_RF									
選擇探針(待測試)之序列。在Taq I接合點之任一側插入25 bp區。 5'-GGGCCAAGTGTGACTCTCAGGTTTTTCGACCTGCCTCAGCCTCCCAAAGT-3'									
正向引子之序列：5'-ATGCAGGAGGTAAAATGGAGGGT-3'									
反向引子之序列：5'-CAAAGAGACAGCTCCGTCAGAGA-3'									
PCR序列BLAT之位置。請注意前兩列為真實同源性。									
基因體位置	重疊基因	取向	查詢起點	查詢終點	長度	分數	E-val	一致性	%

9:130720517-130720886	ABL1	反向	256	625	370	724	4.40E-209	100.00
9:130700586-130700859	EXOSC2	正向	1	273	275	497	7.90E-141	97.82

使用周邊血液樣本區別正常及惡性材料(CML、CML-BC、CLL、乳癌)之基於血液的測試。

循環qPCR (Wii103)。3C分析定序用於標準曲線之產物。水解探針靶向3C片段之接合點

>ORF1_9_130700600_130703071_130719461_130720884_RF

CCACTGCACCAGAGCAAAGAGCAAAGGAGAGATGTCAGGAGGTAAATGGAGGGTGGGAAGAGAATGGCTGAAGGAGAGG
GTGGCCTTATTGGCCATTCAAGGATTTTGACTTTGATTCATATGATGTGGGAAGGCCTTGGAGAATTTCCGAGGGGA
CTATACTATCTGATGTATGTTTCAGTATGAAATAGAATCTCTCTGGCTGCTATGATCTGAAGGAGGACAAGGGAGCAGGG
ATCCACGGGGGCATTGATTGCACAGAGCCAGGTAAGAGTGATGATGCTTGGACCAAAGTGGTGGCACTGGGTGGAGGGT
CAGAACCGACAAAGATTGCTCTCGGATTAGATGTGGGATATGGGGGTGTGAGAGGGGCCAAGTGTGACTCTCAGGTTTTC
GACCTGCCTCAGCCTCCCAAAGTGCTGGGATTACAGGTGTGAGCCACCGCACCTGGCCTTCTGTCTGTATTTTTAAAAA
AAGATATTCATGACAACCAAGGGGAGAGGTAAGGTCACAGTGATGTGCTCTGGGTCAAAGATTGTTGAGCCTGGACCAT
GGAGAGGGGAGGAAAAGATGGAGGTGTGGGGTCAAGGGGAGAGGCTGCAGAGGACAGGACAGTGTGTGGCCAAGGCTGCT
GTTTGTTCCCTTCATCACCCTGGCCAGGCTGAGGTCCAGGCAGTGTCTCTGACGGAGCTGTCTCTTTGCACACGAGGAGC
CTGAAATATGGAAGTAAGTCGGGCTCTTGATGTTCTGTTGCTGACTGAGACTACAAGGCTATTTTTGAATCCCCAT

實驗室晶片資料展示正常材料(患者375)而非惡性材料(源於細胞株 K562)在67.5℃下中之3C交互作用之擴增。預期產物大小：676 bp

表7.布魯東酪胺酸激酶3C交互作用1號

交互作用之名稱：ORF2_X_101355470_101357976_101407183_101408846_FR
選擇探針之序列。 5'-TTGAGGACAAGGACCTCGAGATACTGCCGAGAAATCC-3'
正向引子之序列：5'-ATGTTGTCTAACCTGTATGTTCT-3'
反向引子之序列：5'-CTTCCTCTGCCGGGTGCTAA-3'
PCR序列BLAT之位置。請注意前兩列為真實同源性。

基因體位置	重疊基因	取向	查詢名稱	查詢 起點	查詢 終點	查詢 取向	長度	分數	E-val	一致性%
X:101407180-101407241 (3 bp)	RPL36A-HNRNPH2, GLA	反向	Query_1	5	66	正向	62	123	3.00E-25	100.00
X: (2 bp) 101357937-101357978	BTK	反向	Query_1	61	102	正向	42	83.8	3.00E-13	100.00
5:154143558-154143584	MFAP3	正向	Query_1	65	91	正向	27	46.1	0.057	96.30
12:41941194-41941215		反向	Query_1	69	90	正向	22	44.1	0.22	100.00

使用周邊血液樣本區別正常及惡性材料(B細胞白血病)之基於血液的測試。陽性對照細胞株 RAMOS (伯基特氏(Burkitt's)淋巴瘤株)。

循環qPCR (Wii03)。3C分析定序用於標準曲線之產物。水解探針靶向3C片段之接合點

B細胞惡性腫瘤=認為涉及布魯東酪胺酸激酶之任何惡性疾病。

>ORF2_X_101355470_101357976_101407183_101408846_FR
ATGAGTCCTGAAACAGAGAGAGAGGTCATGCTGTTGGTGTGGTGTAGGAGGTGGGATGCC
TCACACATCCTCACTTAAAGCCTCACACTTCCGGTGTGTATCTTTCTAGTACATTTTGAA
TCCCAGAAGACCTCCATGAACCCACATATTTCCAGAGGTTTCTCCTCTCACAAAATACTT
TTCAGGGACAAAAAAGAGAAAATACTAATTGAAATACACTGCCTAACTGAATATATTTCCC
ACCTCCCAGCCCAGGCTTAGCTCACATCCTACCTTCTTGATGAAGCTGTTCCCCCATATC
CATGCCCTCACTAATGTCTCAGTTTTTAGAAATTTTACAGTGCTTATAAACTTTCTTCTG
ATGTTGTCTAACCTGTATGTTCTTTGAGGACAAGGACCTCGAGATACTGCCGAGAAATCC
ACGACCCCAAAAGGAGAAAAAATGGCACGAATCTTAGTTCCCCATTCCTCCTACCCACCC
TAGATGTTCTAACGGTTAGCACCCGGCAGAGGAAGAGCAGAAGTTCACAAGAAGGGTCTG

實驗室晶片資料展示僅在此退火溫度下在細胞株中之3C交互作用之擴增。預期產物大小：155 bp。

表8. cKIT酪胺酸激酶交互作用1號：

交互作用之名稱：ORF3_4_54711719_54715167_54736749_54740853_FR

選擇探針(待測試)之序列： TCACCCAGAATAAGGCTTC TCGATTCTAAGTTCTACAAGA										
正向引子之序列：cKIT_003 (5'- CAGTGCGGTGGGAGTACTGT-3')										
反向引子之序列：cKIT 004 (5'-TTCAGCAGGTGCGTGTTTCAG-3')										
正向引子之序列：cKIT_001 (5'-AGTGCGGTGGGAGTACTGTG-3')*										
反向引子之序列：cKIT_002 (5'-ACATTTCAGCAGGTGCGTGT-3')*										
兩個引子組(001/002及003/004)均擴增交互作用。引子序列之PCR序列BLAT之位置係針對cKIT003及cKIT004 (針對額外引子，一步PCR及定序資料亦已確認)。										
基因體位置	重疊基因	取向	查詢名稱	查詢起點	查詢終點	查詢取向	長度	分數	E-val	一致性%
4:54714861-54715168	KIT	正向		1	307	正向	308	585	2.80E-167	99.68
4:54736751-54736823	KIT	正向		308	381	正向	74	134	1.80E-31	98.65
使用周邊血液樣本區別正常及惡性材料(EOL1)之基於血液的測試。陽性對照細胞株EOL1及(嗜伊紅球性白血病)及BT142 (神經膠瘤)。										
循環qPCR (WI103)。3C分析定序用於標準曲線之產物。水解探針靶向3C片段之接合點。										

*請注意此等引子群合產生一步產物，且尚未用於嵌套式PCR。

1>ORF3_4_54711719_54715167_54736749_54740853_FR
TCCCATTTTTGAAAGCTTATCCTTTAATGACGAGCTTCAGCCAGTGCGGTGGGAGTACTGT
GATCCTCACGTGGTGGTGACGGGGAGGCAGACATTGAGAACTGAAGGGCTCCCTTTGATC
ATTAGCCTTACATAGGATGCCTTTAATGTTGAGCTAGATTGGAAGCCCAAGTGACTGCTG
AAGTGCACCAAATTAACCTCAGAAGTCACCAATTTCACTCCATTTATGGAAGGGTATTAAC
AGGGGGTTGAGAAACAATTTAAGGAAATGTTAAATAATGTATTATTTCCAAATCACTGCA
TCATATAATTAACATCCTACCTGTTGTTAGCAATTATTTATAGGTCATACAGTATACCAA
AATCAGCCAAAGCAATAAATCACCCAGAATAAGGCTTCTCGATTCTAAGTTCTACAAGAT
GATCAAGGAAGGCTTCCGGATGCTCAGCCCTGAACACGCACCTGCTGAAATGTAAGAGCC
AAAAAATTTTTCTTTTAGGTCACGTTTTCCCTTTTATTTTTCTTTTATAGAGACAGAAACC
CAGATGTTGAGGGTTTTTCATAACACAGTTTGAAATGTCACCTGGATTCTTTATGACACAC
TGGTCAAATGTCATTTCTGTAGTTTATTTTCATAATCTCTTGTCACCAAAAATACAGAAA
GTTTCAGTAATATTTTCATACATGCAGTGTTTTATGTTATCTATATGTCAGTCCATATGTC
CAGTTGCATAGCCCTGGAATTATTACTGAAGTTGCTGGATGCCCATACATTTGAAAACAA
GCTGAGGGCATTGAGGAGGG

實驗室晶片資料展示正常材料而非惡性材料(源於細胞株EOL1)中之

3C交互作用之擴增。預期產物大小為429 bp。

表9. FGFR1 3C交互作用1號：

交互作用之名稱：ORF4_8_38427499_38430449_38480545_38486034_FF								
選擇探針(待測試)之序列。在Taq I接合點之任一側插入25 bp區。 5'-AAACCCCAGCAGCCCCTGCCCAAGTCGAGGGAGCAGCTCCCCACCCAGCCC-3'								
正向引子之序列：5'-AGAAAGAGGCAAAGTTAGGAAGCA-3'								
反向引子之序列：5'-AAAACAGCAACCTATTCAGAGAGC-3'								
PCR序列BLAT之位置。請注意前兩列為真實同源性。								
基因體位置	重疊基 因	取向	查 詢 起點	查 詢 終點	長度	分數	E-val	一致性 %
8:38430233-38430452	FGFR1	正向	9	228	220	422	2.90E-118	97.27
8:38485833-38486036		反向	224	427	204	403	2.00E-112	100.00
使用周邊血液樣本區別正常及惡性材料(甲狀腺癌、口腔腺瘤、慢性白血病、急性白血								

病、前列腺腫瘤及乳癌)之基於血液的測試。陽性對照細胞株CCL30 (鱗狀細胞癌)。

循環qPCR (WI103)。3C分析定序用於標準曲線之產物。水解探針靶向3C片段之接合點

```
>ORF4_8_38427499_38430449_38480545_38486034_FF(5)

GAGCCGCACCATCCTGGGCATCACTTACTGGAGGCTACTGAGCCAGGGCAGTGGGAATTGGAGCATGGGTCAG
TGGGGAAAACAGCTGGCTGCCTGGGAACCCCCATCTCTTTTCCACCCCACTCCTCCAAAAGTCAAAGGAAGAA
AGAGGCCAAAGTTAGGAAGCAAGCTGTAGCAGCATTAAAGCGCATTTTCATTTCCCCCATCCTAAGGGGAAAGGTCG
GCCCTCCCCAGGACTTCTTTGTGTCCGGAGTTGCCCCCTCCCCAGATGCTCAGTTCTTTGCCAAGATTGCCAC
TTGCCAGAGGAACACCCCATTTTCCTTTGGGATAGCTCAGCCTCACCCTCCCTAGCAACAGCTGAACAAACCC
CGCCCCCTCAAACCCAGCAGCCCCCTGCCCAAGTCGAGGGAGCAGCTCCCCACCCAGCCCCAGGATCTGGGTC
CAGCAGACCTGGAGAGTCTGCCCTGGCTGCACAGACCGTGGTGGGACTGTCTGGCGGAAGTGTGTCTGGAGA
CAATGCAGCCCATGTGACAGGCCTTAATGAGTCCCTTCTGGAATCCCAATGGCCAAGTGGCACAGGCTCTC
TGAATAGGTTGCTGTTTTTCAGCAGTGGCAGGGGCTGTGTTGTGGCAACCTCCTCTCTTATTCAACCTCCGGC
ATCTCTCTTCTTTTCTTTCTTTCTTACCTTTGTCTTTTATCTACTTTAACTCTCCTGTTCCCTTTTGATCTC
TTCCTTCTCCTCCACCCTCCTGATTTCTGTTGTTTCTTAGACACAAAATCGCCCTTCACTCCTGCCCTGT
```

實驗室晶片資料展示正常材料(患者375)而非惡性材料(細胞株 CCL30)在68℃下中之3C交互作用之擴增。預期產物大小：460 bp。

表10. FIP1L1 3C交互作用1號：

交互作用之名稱：

>FIP1L1PDGFRA_4_54231931_54236063_55143356_55145047_FR

選擇探針(待測試)之序列。

5'-TATGCTTGTGGGACATCGACAAAAGCAATTATGC-3'

正向引子之序列：5'-TGGAAGTGACACATACAGATTTCAA-3'

反向引子之序列：5'-CTTTCTGCACCGTAGCCAGC-3'

PCR序列BLAT之位置。請注意前兩列為真實同源性。

基因體位置	重疊基因	取向	查詢起點	查詢終點	長度	分數	E-val	一致性%
-------	------	----	------	------	----	----	-------	------

4:53369634-53369898		正向	10	274	265	517	3.00E-143	99.62	
4:54277188-54277335	AC058822.1, PDGFRA	正向	271	418	148	293	7.00E-76	100.00	
10:61991285-61991356	ARID5B	正向	123	194	72	87.7	8.00E-14	90.28	
10:103537280-103537327	NEURL1	正向	35	82	48	87.7	8.00E-14	97.92	

使用周邊血液樣本區別正常及惡性材料(急性骨髓性白血病)之基於血液的測試。陽性對照細胞株EOL1 (嗜酸性急性白血病株)。

循環qPCR (WI103)。3C分析定序用於標準曲線之產物。水解探針靶向3C片段之接合點。

>FIP1L1PDGFRA_4_54231931_54236063_55143356_55145047_FR
CAGCTAAAGACTACTTTTCCAAGCCTCTTGCAGCTAGCTATGGACAAATGATGAGGCACG
GGTGAATAAGATAGTTGGAAGTGACACATACAGATTTCAATAATTCCCTAAAGGTGTAT
GGTTTTCTTTCCCTACAAATCCTACTTTTCAGTTCTTTTGTACATGGACCCAGAGTGGAAT
TGCTGGATCATATGATAATTCTATTTTTAACTTCTTGATGGACCTCTGTTTTTGT
TTTTTACAGAGGCTGCAACATTTTATATTCCTACTAATAATGCACAGGGGTTCGGATTTC
TCCACATCCTTGCCAACTTGATATTTCTGGGTTTTTGATAATGGCCATCCTAATAG
GTGTGGGGACATGAGGTTTTCAATATGCTTGTGGGACATCGACAAAAGCAATTATGCTAA
TTTCCTTCCCTGTGGGCTCAATTCCTTTTTTGACACGATGACTTGAGAGGAGTCATTATGA
TTACTCCAAACAGGAAAGACACTCGCCAGCTGTCCGCCCGCAGAGAGCTGGCTACGGTG
CAGAAAGCTGAGGAGGCGTCTGGAGTTTTTGGGTGTTAATGATTCTGCCTGCCACAGGT
CGGGTCTTGGGGTCTGGAGCGTTTTGGGAAGGTGGTTGAAGGAACAGCCTATGGATTAAGC
CGGTCCCAACCTGTCATGAAAGTTGCAGTGAAGATGCTAAAACGTAAGTGCTCCTTCCTG
GGGATTTTTTGTAGCACGGGGATTTTTTGAGCATGGGGATATTAAGGGAATTTCTCAAAT
CATGCAGCTAGTAAATAAGA

表11. FLT3 3C交互作用1號：

預測交互作用之名稱：ORF5_13_28025286_28026644_28116701_28118054_RF
選擇探針(待測試)之序列。在Taq I接合點之任一側插入25 bp區。 5'-CCTCGGCGACAGAGTGAGACTCTGTCGATCTCATTCTTTGGTTTCTGAAC-3'
正向引子之序列：5'-GGTATGTGCCTGTAGTCCCAACT-3'

反向引子之序列：5'-GAAGGATGGTGAAACGCTTACGG-3'

PCR序列BLAT之位置。請注意前兩列為真實同源性。

基因體位置	重疊基因	取向	查詢起點	查詢終點	長度	分數	E-val	一致性%
13:28025285-28025376	FLT3	正向	81	172	92	174	1.50E-43	96.74
13:28117987-28118056		正向	15	84	70	139	5.30E-33	100.00

使用周邊血液樣本區別正常及惡性材料(急性骨髓性白血病)之基於血液的測試。

循環qPCR (WI103)。3C分析定序用於標準曲線之產物。水解探針靶向3C片段之接合點。

>ORF5_13_28025286_28026644_28116701_28118054_RF

TAATTGCATCACTGCACTCCAGCC**TGGGCAACAGTGAGA**ACTTGTCTTAAAGAAACAAAGCAGGTTCTTTCCTCTCAGAAAGCCCCTCTCTTACTAGAGAGAGAGCTGTTCTCCTCTCTCTTTCTTCTATTAAACCTCCGCTCCTAAAAACACANNCCCTAAAAACTAGCCTGGGCAACATGGTAAAACCTGTCTCTACAAAAACACAAATAAACTAGCCAGGCCTGGT**GGTATGTGCCTGTAGTCCCACT**ATTCAGGGAAGCTGAGGTGGGAGGTTTGCTTGAGACCGGGAAGTCCAGGCTGCAGTGAGCCGAGATGGCGCCACTGCACTCTAGCCTCGGCGACAGAGTGAGACTCTGTTCGATCTCATTCTTTGGTTTCTGAACTCAGCCCACTTTCCCTCACATAATACAGATCTTCCCGAGAGTC**CCGTAAGCGTTTCACCATCCTTC**TTTTTCCAGTTTGCCTTTGTAAAGCTCATTTCTTTTACTGTGAAATTAATAAATAGCAATAATACAAATCTCTTTTAAGGTATATAAAAAATCTTCCCTGAGGAGCTCTGTAGGAATTATAAGTAGATCACGATTCAATTTATTCTAATATACGAGTTTAACCCAATTTACAATTTACATATCTTTAGGAAATGGCTTCATGCTTTCAGACCACAAATATTCCAAAAGGAATAATTCAGTGTATTTAATATTCCAG**TGAACAGAACGAATCAAAGGGGC**TAAGTACTGACCAGTGGATACTGGTCAC

實驗室晶片資料，B列。此展示正常材料(患者376)而非惡性材料(源於AML患者277)在67.5℃下中之3C交互作用之擴增。預期產物大小：223 bp。

表12. Flt3 3C交互作用2號：

交互作用之名稱：ORF5_13_28025286_28026644_28116701_28118054_FF
選擇探針(待測試)之序列。在Taq I接合點之任一側插入25 bp區。
5'-ACTTTACTGTGTCCCCATCACGTGTCGACAGAGTCTCACTCTGTGCGCCGA-3'

循環qPCR (WI103)。3C分析定序用於標準曲線之產物。水解探針靶向3C片段之接合點。

實驗室晶片資料展示正常材料(患者376)而非惡性材料(源於AML患者377)在68.0°C下中之3C交互作用之擴增。預期產物大小：204 bp。

交互作用之名稱：ORF5_13_28025286_28026644_28116701_28118054_RR

選擇探針(待測試)之序列。在Taq I接合點之任一側插入25 bp區。

5'-GAGTTCAGAAACCAAAGAATGAGATCGAGTGATTGCTAGGTGATGGACCT-3'

正向引子之序列：5'-GAAGGATGGTGAAACGCTTACGG-3'

反向引子之序列：5'-TGCACCCCAACAGGAGTTTTCTA-3'

PCR序列BLAT之位置。請注意前兩列為真實同源性。

基因體位置	重疊基因	取向	查詢起點	查詢終點	長度	分數	E-val	一致性%
13:28116700-28116784		正向	50	134	85	164	1.40E-40	98.82
13:28025280-28025338	FLT3	反向	1	57	59	93	2.40E-19	96.61

使用周邊血液樣本區別正常及惡性材料(急性骨髓性白血病)之基於血液的測試。

循環qPCR (WI103)。3C分析定序用於標準曲線之產物。水解探針靶向3C片段之接合點。

>ORF5_13_28025286_28026644_28116701_28118054_RR
GTGACCAGTATCCACTGGTCAGTACTTAGCCCCCTTGATTTCGTTCTGTTCACTGGAATATTAAATACACTGAA
ATTATTCCTTTTGAATATTTGTGGTCTGAAAGCATGAAGCCATTTCCTAAAGATATGTAAATTGTAAATTGG
GTTAACTCGTATATTAGAATAAATTGAATCGTGATCTACTTATAATTCCTACAGAGCTCCTCAGGGAAGAAT
TTTTATATACCTTAAAAGAGATTTGTATTATTGCTATTTATTAATTCACAGTAAAAAGAAATGAGCTTTACA
AAGGCAACTGGAAAAAAGAAGGATGGTGAAACGCTTACGGGACTCTCGGGAAGATCTGTATTATGTGAGGGA
AAGTGGGCTGAGTTCAGAAACCAAAGAATGAGATCGAGTGATTGCTAGGTGATGGACCTGTAGGGAGAGATCA
CTAGATGAGTTCAGGTGGTAAAATAGAAAACTCCTGTTGGGGTGCAAGTGAGAGATGAAGGTAGTGAAATGAAAG
GATGGGGATCAATTTTATATGAGGGCTTTAATTTGAAATGGGAATTTGGTGATATTCTCAGAGCAGCACAAAGT
TTTCATGCCATGGAAAAGCAGCAGGAAAAATGTAAACCTTGCCAAATACACGGGAAAGTCTCCAAGGGTGTCCC
AGTGACTTACTTGCCATAAACAAAGCCATTCTGAGCACTTCTGGCTATGAAATTTCAAAATACATGTTTGA
GAGAAATTTACTGACACTTTTATGATTTTAGAGGATAATTTAGATTTCATAAATTTGTTTCCTTCCCTT

實驗室晶片資料展示正常材料(患者376)而非惡性材料(源於AML患者277)在68.0℃下中之3C交互作用之擴增。預期產物大小：173 bp。

表14. FLT3 3C交互作用4號：

交互作用之名稱：ORF5_13_28009061_28014204_28025286_28026644_FR

選擇探針(待測試)之序列。在Taq I接合點之任一側插入25 bp區。
5'-GCTGGAGGATTGCTTGAGCTTGGGAGGTCGATCTCATTCTTTGGTTTCTGAAC-3'

正向引子之序列：5'-GCTTCTGGAGGCCAGGGATTAT-3'

反向引子之序列：5'-AGCCCCCTTTGATTCGTTCTGTTC-3'

PCR序列BLAT之位置。請注意前兩列為真實同源性。

基因體位置	重疊基因	取向	查詢起點	查詢終點	長度	分數	E-val	一致性 %
13:28025286-28025660	FLT3	正向	325	699	375	723	6.80E-209	100.00
13:28013880-28014203	FLT3	正向	1	324	324	627	6.70E-180	99.07
X:47532217-47532398		反向	132	313	182	267	1.10E-71	84.07

使用周邊血液樣本區別正常及惡性材料(急性骨髓性白血病)之基於血液的測試。

循環qPCR (WI103)。3C分析定序用於標準曲線之產物。水解探針靶向3C片段之接合點。

>ORF5_13_28009061_28014204_28025286_28026644_FR
CACACTCATGCTTCATAAGAAAGGGCTAGTGGCTTCTGGAGGCCAGGGATTATTTTATTTAGTTTATTTAG
TTGTCTACTTCACTGCACTGAACCTTAAGAGCTTTTAATTTATTAATCATTGGCTGAAATCAGGAAAGGTG
TTTTTTTCCCTAAAAACATTTTATCAATATGTCTTAGGGCAGGCAGAGGAGCTCATGCCCTGTGATCCCAG
CACTTTGGGAGGCTGAGGTGGGGGAATCGCTTGAGCCAGGAGTTCAAGACCAGCCTGGGCAATACAGTGATA
CCCTATTTCTACAAAAAATAAAAACTTAGCCTGGCGTGGTGCTGCCCTCCCATGGTCCTAGCTACTTGGAAG
GCCGTGGCTGGAGGATTGCTTGAGCTTGGGAGGTCGATCTCATTCTTTGGTTTCTGAACTCAGCCCCACTTTCC
CTCACATAATACAGATCTTCCCGAGAGTCCCCTAAGCGTTTCACCATCCTTCTTTTTTCCAGTTTGCTTTGT
AAAGCTCATTTCTTTTACTGTGAAATTAATAAATAGCAATAATACAAATCTCTTTTAAGGTATATAAAAATT
CTTCCCTGAGGAGCTCTGTAGGAATTATAAGTAGATCACGATTCAATTTATTCTAATATACGAGTTTAACCCA
ATTTACAATTTACATATCTTTAGGAAATGGCTTCATGCTTTCAGACCACAAATATCCAAAAGGAATAATTC
AGTGTATTTAATATTCCAGTGAACAGAACGAATCAAAGGGGCTAAGTACTGACCAGTGGATACTGGTCAC

實驗室晶片資料展示正常材料(患者376)而非惡性材料(源於AML患

者277)在68℃下中之3C交互作用之擴增。預期產物大小：742 bp。

額外資料

溫度梯度資料之確認提供於以下。呈字母次序之各基因之所選擇交互作用呈現於下，包括20 ng中之各交互作用之平均複本(每反應=一個孔/96孔盤)。

1. ABL1，ABL1-515，源於K562細胞株及正常血液(10 ng/反應)之材料之基於SYBR的qPCR分析。

與每20 ng正常血液中之複本33.24667，SD +/- 35.04153相比，K562展示20 ng中之減少的平均複本數(12.36333，SD +/- 15.67294) ($p = 0.143245$ ，T測試)。

2. 布魯東酪胺酸激酶

ORF2_X_101355470_101357976_101407183_101408846_FR

與每20 ng正常血液中之複本43.83277，SD +/- 72.808926相比，細胞株(BT142、EOL1及HL60)展示20 ng中之減少的平均複本數(20.99338，SD +/- 43.413166) ($p = 0.41426$ ，T測試)。

3. cKIT實驗：高度顯著差異。

ORF3_4_54711719_54715167_54736749_54740853_FR

與每20 ng正常血液中之複本2.639932 (SD +/- 1.742175)相比，惡性細胞株(BT142、EOL1及HL60)展示20 ng中之減少的平均複本數(0.205135SD，SD +/- 0.453526) ($p = 0.001294$ ，T測試)。此為細胞株與非惡性樣本之間的高度顯著差異。

4. FGFR1，

ORF4_8_38427499_38430449_38480545_38486034_F

與每20 ng正常血液中之複本1.242222 (SD +/- 1.715319)相比，惡性細胞株CCL30展示20 ng中之增加的平均複本數2.05 (SD +/- 0.843267) ($p = 0.314743$ ，T測試)。

5.FIP1L1實驗

FIP1L1PDGFRA_4_54231931_54236063_55143356_55145047_FR

與每20 ng正常血液中之複本32.61117 (SD +/- 38.58252)相比，惡性細胞株(BT142、EOL1及HL60)展示20 ng中之減少的平均複本數13.07325 (SD +/- 19.46042) ($p = 0.147896$ ，T測試)。

6.FLT3實驗：

ORF5_13_28009061_28014204_28025286_28026644_F：顯著差異

與每20 ng正常血液中之複本6.587778 (SD +/- 7.672794)相比，惡性患者材料展示20 ng中之減少的平均複本數0.427619 (SD +/- 0.667599) ($p = 0.043238$ ，T測試)。

藥物靈敏度及伊馬替尼

伊馬替尼(Glivec)展示針對多種酪胺酸激酶(包括ABL1、cKIT及PDGFRA)之活性。臨床試驗在慢性骨髓性白血病中之成功為鑑別藥物遺傳策略提供動力。

關於伊馬替尼在以下伊馬替尼反應性選擇基因中之作用之新穎資料的實例描述於下。針對用伊馬替尼治療之樣本，向各孔添加20 ng模板。

上文提出之cKIT交互作用(ORF3_4_54711719_54715167_54736749_54740853_FR)及伊馬替尼：

cKIT及例示性資料。BT142細胞已用1 μ m伊馬替尼治療。將20 ng模板載入至各孔中。請注意cKIT 3C交互作用在伊馬替尼治療細胞株中完全

不存在(參見下文)。

孔C1中之產物已確認為上文提出之cKIT交互作用(ORF3_4_54711719_54715167_54736749_54740853_FR)。此資料說明伊馬替尼直接作用於cKIT 3C染色體構形。

BT142細胞株中之MMP1交互作用展示於下。此確定樣本之質量。此為基於水解探針之分析。

細胞株	Cq	MMP1複本數
BT142對照	37.29354288	12.16144613
BT142對照	35.68147305	36.19699893
BT142對照	36.33204621	23.30823893
BT142伊馬替尼(I M) 1 μM	35.6402365	37.2211193
BT142 1 μM	36.14604001	26.43413752
BT142 1 μM	35.88943195	31.44606744

GSK864對於治療細胞株之作用

不具有固定對照之MMP-1 3C量化及甲醛治療樣本。用於本申請案中
之例示性細胞株為：

- (a) DBTRG-05MG (神經膠母細胞瘤)。
- (b) HL-60 (急性骨髓性白血病)。

此等細胞株已用IDH1抑制劑GSK864治療24小時及48小時。在細胞株DBTRG中觀測到二進位差異，且HL60中之定量差異，展示化合物直接作用於MMP1染色體構形(參見圖8)。

細胞株	Cq	20 ng中之複本數
DBTRG 24小時對照	39.91101	2.898388
DBTRG 24小時對照	38.34145	8.990504
DBTRG 24小時對照	NaN	NaN
DBTRG 24GSK 1 μm	NaN	NaN
DBTRG 24GSK 1 μm	NaN	NaN
DBTRG 24GSK 1 μm	NaN	NaN
NaN = 0個複本		

HL60細胞株已用IDH1抑制劑GSK864治療24小時及48小時。在細胞株HL60中之3C MMP1複本數中觀測到二進位定量差異，展示化合物直接作用於MMP1染色體構形(參見圖9)。

細胞株	Cq	20 ng中之複本數
HL-60 48小時對照	35.94292	50.70651
HL-60 48小時對照	35.20558	86.30136
HL-60 48小時對照	36.69911	29.39049
HL-60 48小時GSK864	40.32569	2.149149
HL-60 48小時GSK864	37.49586	16.54413
HL-60 48小時GSK864	37.10877	21.87217
20 ng =一個反應孔。		

總結

此等使用SYBR綠檢測之一步分析展示正常血液與惡性材料之間的區別(請參見上文表中描述之細胞株)。當與正常材料(例如cKIT及FLT3)或例如CCL30 FGFR1細胞株所獲得相比時，qPCR 3C複本數可在惡性細胞株中顯著地減少。

認為藥物伊馬替尼(Glivec：Novartis PLC)針對BCR-ABL蛋白質起作用。吾人證實伊馬替尼針對基因cKIT中鑑別之3C構形交互作用的直接新穎作用。資料展示伊馬替尼直接治療性作用於3C構形。

另外，GSK864 (IDH1突變抑制劑)展示在細胞株DBTRG及HL60中在1 μm下直接作用於3C MMP1複本數。

【序列表】

<110> 英商牛津生物力學有限公司 (Oxford BioDynamics Limited)

<120> 檢測方法

<130> P103730TW01

<140> 106142279

<141> 2017-12-01

<150> US 62/428,893

<151> 2016-12-01

<160> 72

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 501

<212> DNA

<213> 智人

<400> 1

ttccacgtgg cctaccacag catgtcaggc ctgggggcag aatcttgcca tactgtgcag	60
cccaaatttg aatgccaaag gctttcgttt gtctctgggg ggccacagtc taggtctagt	120
tctgtgcagg agttgtaata tttgctcttc tctccctcct ccagctcgca gacctctgaa	180
gagagtgcc ttagagacggg ttccagcagt tccaccttca tcaagagaga ggacgagacc	240
attgaagaca tcgaaaagat aaaacaggtg ttagtgagga tatggggaaa taaaaccctc	300
atacatttct ggtgggattg taaaatggtg cagctgcttt gaagaacagc ctggccattt	360
tctcaaatgg tgaacatgg agttaccatg tgagtccctc accttagagg aatgaaaaca	420
tattcagaca aaaacttgta cgtgaatatt catagcagca ttattcttaa tagaaagtgg	480
aaaaagaaaa cctcgcagct g	501

<210> 2

<211> 647

<212> DNA

<213> 智人

<400> 2

tgggagtggg tggagtgaga acctgggaga aggccagccc tttatatcca ggcagacagc	60
tccaagtgcc accatggatc agccagtcct gcaggggtga tgctattcag ctacagatgg	120
cttgatcctg agtcatttct tccctttcca tgcagtgtgt ccaccgtgat ctggctgctc	180
gcaacgtcct cctggcaca ggaataattg tgaagatctg tgactttggc ctggccagag	240
acatcatgca tgattcgaaa agataaaaca ggtgttagtg aggatatggg gaaataaaac	300
cctcatacac ttctgggtggg attgtaaaat ggtgcagctg ctttgaagaa cagcctggcc	360
atcttctcaa atggtgaaac atggagttac catgtgagtc ctccacctta gaggaatgaa	420
aacatattca gacaaaaact tgtacgtgaa tattcatagc agcattattc ttaatagaaa	480
gtggaaaaag aaaacctcgc agctgcatca actgatgaat ggatagatta aatgtgttat	540
atccatacag cggaatatta ttggcaagg acaataaaat gaagtactgg tagatgttac	600
aacacggatg aaccttaca atgtggaagc taaagatgic agtccgt	647

<210> 3
<211> 462
<212> DNA
<213> 智人

<400> 3 gcagctgcga gggtttcttt ttccactttc tattaagaat aatgctgcta tgaatattca	60
cgtacaagtt ttgtctgaa tatgttttca ttccctctaa gtggaggact cacatggtaa	120
ctccatgttt caccatttga gaaaatggcc aggctgttct tcaaagcagc tgcaccattt	180
tacaatccca ccagaagtgt atgagggttt tatttcccca tctctcact aacacctgtt	240
ttatcttttc gaggtccttg ctgaacctgg acctataaat gacgtcaatg atagtgatec	300
ctactgcaga aatctacaag tggctataaa gaactctgta ggtaagaaat tctgtaagat	360
cagaaagtac aatgaattca ctccataata aattacttgg tggacaccaa atgggtgcta	420
aattgattgg gtagaaggaa ttgtatgcc aagccacatg gc	462

<210> 4
<211> 499
<212> DNA
<213> 智人

<400> 4
agtacttctt ctcctctccc atattgttaa aaatagttaa cattgcttcc caggctgggc 60

tgggtggagt ggcacgagat gtcagaggaa cctgagtcac gctcaggccc aagccctgtt 120

ggcaggcaga ccactgcttt ctggccttcc gtgactatct gaaaaaaatc gtgaatggct 180

agagctactc ttcacttgct gaacattttc aaaaagaatt gagaacttct ggattaaatt 240

gccttcttcc tcgaaaagat aaaacagggtg ttagtgagga tatggggaaa taaaaccctc 300

atacacttct ggtgggattg taaaatgggtg cagctgcttt gaagaacagc ctggccattt 360

tctcaaatgg tgaacatgg agttaccatg tgagtcttcc accttagagg aatgaaaaca 420

tattcagaca aaaacttgta cgtgaatatt catagcagca ttattcttaa tagaaagtgg 480

aaaaagaaaa cctcgcagc 499

<210> 5
<211> 609
<212> DNA
<213> 智人

<400> 5
cctctccac acaaacctgc tactgagtac cttegttaac ttaaccattc attcacctg 60

gaagaccacc tactagcaga aggattctta acaaatgtaa agaaagtaag gactttacac 120

taacaataca aaactaactc tctctttgac aattcaaaaa acaaaagatg ttgaactttg 180

acatttacag aattaaatgt caaatgtgac acaataccat cacatctggc taactaactc 240

ttatgctttt tttagtaagg aacaactttt gagcctcaat atcttaattc ttaaaatgat 300

aaagaacact taactcaatt tgttgagatc aaataaggta atgtaaaagt gggattttta 360

tttttactta tttattcgaa aacctggga cccttcaga tgggactaac tggggaaagt 420

ggacaagtta caaacaaga aactcaaagg aaagtcattg gcactgatct ctaagatgct 480

atcacatgtg attgggtggt gattttatta acaaattata agcaaagtac tacaaagggtg 540

gctttaaaaa gaaaataaag caattcacag aaactacitt ttcattgtac ttgtatgtgt 600

gctccatgt 609

<210>	6	
<211>	586	
<212>	DNA	
<213>	智人	
<400>	6	
aaatgatgag	gcacgggtga ataagatagt tggaagtgac acatacagat ttcaaataat	60
tccttaaagg	tgtatggttt tctttcccta caaatcctac tttcagttct tttgtacatg	120
gaccagagt	ggaattgctg gatcatatga taattctatt tttaacttct tgatggacct	180
ctgtttttgt	tttgtttttt acagaggctg caacatttta tattcctact aataatgcac	240
aggggttcgg	atttctccac atccttgcca acacttgata tttcctgggt tttttgataa	300
tggccatcct	aatagggtgtg gggacatgag gttttcaata tgcttggtgg acatcgaaaa	360
ccctgggacc	cttccagatg ggactaactg gggaaagtgg acaagttaca aacaaagaaa	420
ctcaaaggaa	agtcattggc actgatctct aagatgctat cacatgtgat tggtggttga	480
ttttattaac	aaattataag caaagtacta caaaggtggc tttaaaaaga aaataaagca	540
attcacagaa	actacttttt catgtagctt gtatgtgtgc tccatg	586

<210>	7	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	智人	
<400>	7	
ttccacgtgg	cctaccacag	20

<210>	8	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	智人	
<400>	8	
cagctgcgag	gttttctttt	20

<210>	9	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	智人	

<400> 9
tgggagtggg tggagtgaga 20

<210> 10
<211> 23
<212> DNA
<213> 智人

<400> 10
acggactgac atcttttagct tcc 23

<210> 11
<211> 20
<212> DNA
<213> 智人

<400> 11
gcagctgcga ggttttcttt 20

<210> 12
<211> 20
<212> DNA
<213> 智人

<400> 12
gccatgtggc ttgggcatac 20

<210> 13
<211> 21
<212> DNA
<213> 智人

<400> 13
agtacttect ctcccctccc a 21

<210> 14
<211> 21
<212> DNA
<213> 智人

<400> 14
gcagctgcga ggttttcttt t 21

<210> 15

<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	智人	
<400>	15	
cctctccac acaaacctgc ta		22
<210>	16	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	智人	
<400>	16	
acatggagca cacatacaag ctac		24
<210>	17	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	智人	
<400>	17	
aaatgatgag gcacgggtga a		21
<210>	18	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	智人	
<400>	18	
catggagcac acatacaagc tac		23
<210>	19	
<211>	480	
<212>	DNA	
<213>	智人	
<400>	19	
ttccacgtgg cctaccacag catgtcaggc ctgggggcag aatcttgcca tactgtgcag		60
cccaaatttg aatgccaaag gctttcgttt gtctctgggg ggccacagtc taggtctagt		120
tctgtgcagg agttgtaata ttgtctcttc tctccctcct ccagctcgca gacctctgaa		180
gagagtgcc a ttgagacggg ttccagcagt tccaccttca tcaagagaga ggacgagacc		240
attgaagaca tcgaaaagat aaaacaggtg ttagtgagga tatggggaaa taaaaccctc		300

atacacttct ggtgggattg taaaatggtg cagctgcitt gaagaacagc ctggccattt	360
tctcaaatgg tgaacatgg agttaccatg tgagtcctcc accttagagg aatgaaaaca	420
tattcagaca aaaacttgta cgtgaatatt catagcagca ttattcttaa tagaaagtgg	480
<210> 20	
<211> 647	
<212> DNA	
<213> 智人	
<400> 20	
tgggagtggg tggagtgaga acctgggaga aggccagccc tttatatcca ggcagacagc	60
tccaagtgcc accatggatc agccagtcct gcaggggtga tgctattcag ctacagatgg	120
cttgatcctg agtcatttct tctttttcca tgcagtgtgt ccaccgtgat ctggctgctc	180
gcaacgtcct cctggcacaa ggaaaaattg tgaagatctg tgactttggc ctggccagag	240
acatcatgca tgattcgaaa agataaaaca ggtgttagtg aggatatggg gaaataaaac	300
cctcatacac ttctgggtggg attgtaaaat ggtgcagctg ctttgaagaa cagcctggcc	360
attttctcaa atggtgaaac atggagttac catgtgagtc ctccacctta gaggaatgaa	420
aacatattca gacaaaaact tgtacgtgaa tattcatagc agcattattc ttaatagaaa	480
gtggaaaaag aaaacctcgc agctgcatca actgatgaat ggatagatta aatgtgttat	540
atccatacag cggaatatta tttggcaagg acaataaaat gaagtactgg tagatgttac	600
aacacggatg aaccttaca atgtggaagc taaagatgtc agtccgt	647

<210> 21
<211> 462
<212> DNA
<213> 智人

gcagctgcga ggttttcttt ttcactttc tattaagaat aatgctgcta tgaatattca	60
cgtacaagtt ttgtctgaa tatgttttca ttctcttaag gtggaggact cacatggtaa	120
ctccatgttt caccatttga gaaaatggcc aggctgttct tcaaagcagc tgcaccattt	180
tacaatecca ccagaagtgt atgagggttt tatttcecca tatcctcact aacacctgtt	240

ttatcttttc gaggtccttg ctgaacctgg acctataaat gacgtcaatg atagtgatcc 300

ctactgcaga aatctacaag tggctataaa gaactctgta ggtaagaaat tctgtaagat 360

cagaaagtac aatgaattca cttcataata aattacttgg tggacaccaa atgggtgcta 420

aattgattgg gtagaaggaa ttgtatgccc aagccacatg gc 462

<210> 22

<211> 499

<212> DNA

<213> 智人

<400> 22

agtacttctt ctcctctccc atattgttaa aaatagttaa cattgcttcc caggctgggc 60

tgggtggagt ggccacgagat gtcagaggaa cctgagtcac gtcagagccc aagccctgtt 120

ggcaggcaga ccactgcttt ctggccttcc gtgactatct gaaaaaaatc gtgaatggct 180

agagctactc ttcacttgct gaacattttc aaaaagaatt gagaacttct ggattaaatt 240

gccttcttcc tcgaaaagat aaaacagggtg ttagtgagga tatggggaaa taaaaccctc 300

atacatttct ggtgggattg taaaatgggtg cagctgcttt gaagaacagc ctggccattt 360

tctcaaatgg tgaaacatgg agttaccatg tgagtcttcc accttagagg aatgaaaaca 420

tattcagaca aaaacttgta cgtgaatatt catagcagca ttattcttaa tagaaagtgg 480

aaaaagaaaa cctcgcagc 499

<210> 23

<211> 609

<212> DNA

<213> 智人

<400> 23

cctctcccac acaaacctgc tactgagtac cttegttaac ttaaccattc attaccctg 60

gaagaccacc tactagcaga aggattctta acaaatgtaa agaaagtaag gactttacac 120

taacaataca aaactaactc tctctttgac aattcaaaaa aaaaagatg ttgaactttg 180

acatttacag aattaaatgt caaatgtgac acaataccat cacatctggc taactaactc 240

ttatgctttt tttagtaagg aacaactttt gagcctcaat atcttaattc ttaaaatgat 300

aaagaacact taactcaatt tgttgagatc aaataaggta atgtaaaagt gggattttta 360

tttttactta tttattcgaa aaccctggga cccttccaga tgggactaac tggggaaagt 420

ggacaagtta caaacaaga aactcaaagg aaagtcattg gcactgatct ctaagatgct 480

atcacatgtg attgggtggtt gatthtatta acaaattata agcaaagtac tacaaggtg 540

gctttaaaaa gaaaataaag caattcacag aaactacttt ttcattgtagc ttgtatgtgt 600

gctccatgt 609

<210> 24

<211> 586

<212> DNA

<213> 智人

<400> 24

aatgatgag gcacgggtga ataagatagt tggaaagtac acatacagat ttcaaataat 60

tccttaaagg tgtatggttt tctttcccta caaatcctac tttcagttct tttgtacatg 120

gacctcagat ggaattgctg gatcatatga taattctatt tttacttct tgatggacct 180

ctgtttttgt tttgtttttt acagaggctg caacatttta tttcctact aataatgcac 240

aggggttcgg atttctccac atccttgcca acatttgata tttcctgggt tttttgataa 300

tggccatcct aatagggtgtg gggacatgag gttttcaata tgcttggtgg acatcgaaaa 360

ccctgggacc cttccagatg ggactaactg gggaaagtgg acaagttaca aacaaagaaa 420

ctcaaaggaa agtcattggc actgatctct aagatgctat cacatgtgat tgggtggttga 480

ttttattaac aaattataag caaagtacta caaaggtggc tttaaaaaga aaataaagca 540

attcacagaa actacttttt catgtagctt gtatgtgtgc tccatg 586

<210> 25

<211> 28

<212> DNA

<213> 智人

<400> 25

tcagcaagga cctcgaagag ataaaaca 28

<210> 26
<211> 24
<212> DNA
<213> 智人

<400> 26
atttattcga aaaccctggg accc 24

<210> 27
<211> 20
<212> DNA
<213> 智人

<400> 27
gcagctgcga ggttttcttt 20

<210> 28
<211> 22
<212> DNA
<213> 智人

<400> 28
cctctccac acaaacctgc ta 22

<210> 29
<211> 20
<212> DNA
<213> 智人

<400> 29
gccatgtggc ttgggcatac 20

<210> 30
<211> 24
<212> DNA
<213> 智人

<400> 30
acatggagca cacatacaag ctac 24

<210> 31
<211> 50
<212> DNA
<213> 智人

<400>	31	
cttatagcct gtctctcttg ctgatcgagg ttgcaacgag ctgagattgc		50
<210>	32	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	智人	
<400>	32	
ttggagttcc agggtgatac tgtc		24
<210>	33	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	智人	
<400>	33	
accaacgcta ttcttggctt cca		23
<210>	34	
<211>	800	
<212>	DNA	
<213>	智人	
<220>		
<221>	misc_feature	
<222>	(472)..(504)	
<223>	n 爲 a、c、g 或 t	
<400>	34	
gcaagctcca ctcctgggt tcaagtgatt ctctgcctc agcctcctga gtagctggga		60
ttacagtggt gccccaccat gctctgctaa tttatctatt tttagtagag atggggtttc		120
accatgttgg tcaggctgggt cttgaattcc tgaccttgta atccaccgc ctcggcctcc		180
caaagtgtg ggattacaga catgagacac tgcacctgc cccattcctt ttaatctccc		240
ttggaattag ctgtttggtt gatttggagt tccagggtga tactgtctga gtcataaatg		300
atattattgt gaatttctgt ggctggtcac gtattttggt cctgtttgta tttcccttcc		360
cctctctgtg tctccttata gcctgtctct cttgctgac gaggttgcaa cgagctgaga		420
ttgcacgcca ctgcactccc agcctgggcg acggagtgag actccatctc annnnnnnnn		480

nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnntgatga cagcccaacc tgtcactttt ttcagatccc	540
tttttatgaa agaatttgct taagttgtgt ctgaagacaa accaatttct ttggaccctg	600
ggtattcttt ttctaaggga ataccatggt attttgtgtt acagattgtt tgcgatcttt	660
cataggctga tctttctaga gttggttaat atccatgtag gttagattga aaaacttgaa	720
ttcagaaatg tacggtgttg gagcagacat ggatctggaa gccaagaata gcgttggtgt	780
tgttgttgat ggtgaatctg	800

<210> 35
<211> 49
<212> DNA
<213> 智人

<400> 35 gggccaaagt tgactctcag gttttcgacc tgcctcagcc tcccaaagt	49
---	----

<210> 36
<211> 23
<212> DNA
<213> 智人

<400> 36 atgcaggagg taaaatggag ggt	23
---------------------------------------	----

<210> 37
<211> 23
<212> DNA
<213> 智人

<400> 37 caaagagaca gtcctcag aga	23
-------------------------------------	----

<210> 38
<211> 800
<212> DNA
<213> 智人

<400> 38 ccactgcacc agagcaaaga gcaaaaggag agatgcagga ggtaaaatgg aggggtgggaa	60
gagaatggct gaaggagagg gtggccttat tggcccatTT caaggatttt gactttgatt	120

catatgatgt ggggaaggcct tggagaatit tccgagggga ctatactatc tgatgtatgt	180
ttcagtatga aatagaatct ctctggctgc tatgatctga aggaggacaa gggagcaggg	240
attccacggg ggcattgatt gcacagagcc aggtaagagt gatgatgctt ggaccaaagt	300
ggtggcactg ggtggagggt cagaaccgac aagatttgct ctcggattag atgtgggata	360
tgggggtgtg agaggggccca agtgtgactc tcaggttttc gacctgcctc agcctcccaa	420
agtgtctggga ttacagggtgt gagccaccgc acctggcctt ctgtctgtat ttttaaaaaa	480
aagatattca tgacaaccaa ggggagaggt aaggtcacag tgatgtgctc tgggtcaaag	540
attgttgagc ctggaccatt ggagagggga ggaaaagatg gaggtgtggg gtcaagggga	600
gaggctgcag aggacaggac agtgtgtggc caaggctgct gtttgttcct tcataccct	660
ggccaggctg aggtccaggc agtgttctct gacggagctg tctctttgca cacgaggagc	720
ctgaaatatg gaaaagtaag tcgggctctt gatgttcctg tttgctgact gagactacaa	780
ggctatTTTT gaatcccat	800

<210> 39
<211> 37
<212> DNA
<213> 智人

<400> 39	
ttgaggacaa ggacctcgag atactgccga gaaatcc	37

<210> 40
<211> 23
<212> DNA
<213> 智人

<400> 40	
atgttgtcta acctgtatgt tct	23

<210> 41
<211> 20
<212> DNA
<213> 智人

<400> 41	
cttcctctgc cgggtgctaa	20

<210> 42
<211> 540
<212> DNA
<213> 智人

<400> 42
atgagtcctg aaacagagag agaggtcatg ctgttggtgt ggtgtaggag gtgggatgcc 60

tcacacatcc tcacttaaag cctcacactt ccggtgtgta tctttctagt acattttgaa 120

tcccagaaga cctccatgaa cccacatatt tccagagggt tctcctctca caaaatactt 180

ttcagggaca aaaaagagaa aatactaatt gaaatacact gcctaactga atatatccc 240

acctcccagc ccaggcttag ctcacatcct accttcttga tgaagctgtt ccccatatc 300

catgccctca ctaatgtctc agtttttaga aattttacag tgcttataaa ctttcttctg 360

atgttgtcta acctgtatgt tctttgagga caaggacctc gagatactgc cgagaaatcc 420

acgaccccaa aaggagaaaa aatggcacga atcttagttc cccattcctc ctaccacccc 480

tagatgttct aacggttagc acccggcaga ggaagagcag aagttcaca gaagggtctg 540

<210> 43
<211> 40
<212> DNA
<213> 智人

<400> 43
tcaccagaa taaggcttct cgattctaag ttctacaaga 40

<210> 44
<211> 20
<212> DNA
<213> 智人

<400> 44
cagtgcggtg ggagtactgt 20

<210> 45
<211> 20
<212> DNA
<213> 智人

<400> 45	
ttcagcaggt gcgtgttcag	20
<210> 46	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 智人	
<400> 46	
agtgcggtgg gagtactgtg	20
<210> 47	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 智人	
<400> 47	
acatttcagc aggtgcgtgt	20
<210> 48	
<211> 800	
<212> DNA	
<213> 智人	
<400> 48	
tcccatTTTg aaagcttata cTTtaattgac gagcttcagc cagtgcggtg ggagtactgt	60
gatactcacg tggtagtgac ggggaggcag acattgagaa ctgaagggtc cctttgatc	120
attagcctta cataggatgc cTTtaattgt gagctagatt ggaagcccaa gtgactgctg	180
aagtcacca aattaactca gaagtcacca atttcactcc atttatggaa gggatattaac	240
aggggggttg gaaacaattt aaggaaatgt taaataatgt attatttcca aatcactgca	300
tcatataatt aacatcctac ctgttgtag caattattta taggtcatac agtataccaa	360
aatcagccaa agcaataaat caccagaat aaggcttcctc gattctaagt tctacaagat	420
gatcaaggaa ggcttccgga tgctcagccc tgaacacgca cctgctgaaa tgtaagagcc	480
aaaaaatttt tcctttaggt cacgttttcc cttttatttt tctttttaga gacagaaacc	540
cagatgttga gggttttcat aacacagttt gaaatgtcac ttggattctt tatgacacac	600
tggTcaaatg tcatttctgt agtttatTTT cataatctct tgtcaccaaa aatacagaaa	660

gtttcagtaa tatttcatac atgcagtgtt ttatgtttatc tatatgtcag tccatatgtc	720
cagttgcata gccctggaat tattactgaa gttgctggat gcccatacat ttgaaaacaa	780
gctgagggca ttgaggaggg	800
<210> 49	
<211> 51	
<212> DNA	
<213> 智人	
<400> 49	
aaacccagc agccccctgcc caagtcgagg gagcagctcc ccacccagcc c	51
<210> 50	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> 智人	
<400> 50	
agaaagaggc aaagttagga agca	24
<210> 51	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> 智人	
<400> 51	
aaaacagcaa cctattcaga gagg	24
<210> 52	
<211> 800	
<212> DNA	
<213> 智人	
<400> 52	
gagccgcacc atcctgggca tcacttactg gaggctactg agccagggca gtgggaattg	60
gagcatgggt cagtggggaa aacagctggc tgcctgggaa ccccatctc ttttccacc	120
cactcctcca aaagtcaaag gaagaaagag gcaaagttag gaagcagctg tagcagcatt	180
aagcgcattt catttcccc atcctaaggg gaaaggtcgg ccttccccag gacttctttg	240
tgtccggagt tgccccctcc ccagatgctc agttctttgc caagattgcc acttgccaga	300

ggaacacccc atttcctttg ggatagctca gctcaccct tccctagcaa cagctgaaca	360
aaccccgccc ctcaaaaccc cagcagcccc tgcccaagtc gagggagcag ctccccaccc	420
agccccagga tctgggtcca gcagacctgg agagtctgcc ctggctgcac agaccgtggt	480
gggactgtct ggcggaactg ttgtctggag acaatgcagc ccatgtgaca ggccttaatg	540
agtcccttct ggaatcccac aatggccaag tggcacaggc tctctgaata ggttgcgttt	600
tttcagcagt ggcaggggct gtgttgggc aacctcctct cttattcaac ctccggcctc	660
tctcttcttt tcttttcttt cttacctttg tcttttatct actttaactc tctgttccc	720
ttttgatctc ttctttctcc tccaccttcc tgatttctgt tgtttcttag acacaaaatc	780
gcccttcaact cctgccctgt	800

<210> 53
<211> 34
<212> DNA
<213> 智人

<400> 53 tatgcttgtg ggacatcgac aaaagcaatt atgc	34
---	----

<210> 54
<211> 25
<212> DNA
<213> 智人

<400> 54 tggaagtgac acatacagat ttcaa	25
---	----

<210> 55
<211> 20
<212> DNA
<213> 智人

<400> 55 ctttctgcac cgtagccagc	20
-----------------------------------	----

<210> 56
<211> 800
<212> DNA
<213> 智人

<400>	56	
cagctaaaga ctacttttcc aagcctcttg cagctagcta tggacaaatg atgaggcacg	60	
ggtgaataag atagtggaa gtgacacata cagatttcaa ataattccct aaagggtgat	120	
ggtttttctt cctacaaat cctactttca gttcttttgt acatggacct agagtggaat	180	
tgctggatca tatgataatt ctatttttaa ctctttgatg gacctctgtt tttgttttgt	240	
tttttacaga ggctgcaaca ttttatattc ctactaataa tgcacagggg ttcggatttc	300	
tccacatcct tgccaacact tgatatttcc tgggtttttt gataatggcc atcctaatag	360	
gtgtggggac atgaggtttt caatatgctt gtgggacatc gacaaaagca attatgctaa	420	
tttccttccc tgtgggctca attccttttt tgacacgatg acttggagga gtcattatga	480	
ttactccaaa caggaaagac actcgcccag ctgtccggcc gcagagagct ggctacggtg	540	
cagaaagctg aggaggcgtc tggagttttt ggggtgttaat gattctgcct gccacaggt	600	
cgggtcttgg ggtctggagc gtttgggaag gtggttgaag gaacagccta tggattaagc	660	
cggtcceaac ctgtcatgaa agttgcagtg aagatgctaa aacgtaagtg ctccttctg	720	
gggatttttt gagcacgggg attttttgag catggggata ttaagggaat ttctcaaat	780	
catgcagcta gtaaataaga	800	

<210> 57
<211> 50
<212> DNA
<213> 智人

<400>	57	
cctcggcgac agagtgagac tctgtcgatc tcattctttg gtttctgaac	50	

<210> 58
<211> 23
<212> DNA
<213> 智人

<400>	58	
ggtatgtgcc tgtagtccca act	23	

<210> 59

<211> 23
<212> DNA
<213> 智人

<400> 59
gaaggatggg gaaacgccta cgg 23

<210> 60
<211> 800
<212> DNA
<213> 智人

<220>
<221> misc_feature
<222> (156)..(191)
<223> n 爲 a、c、g 或 t

<400> 60
taattgcac actgcactcc agcctgggca acagtgagaa cttgtcttaa agaaacaaag 60

caggttcttt cctctcagaa gcccctctct ctactagag agagagctgt tctcctctct 120

ctttcttcta ttaaacctcc gctcctaaaa acacannnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 180

nnnnnnnnnn nccctaaaaa actagcctgg gcaacatggg aaaaccctgt ctctacaaaa 240

aacacaaata aactagccag gcctgggtgg atgtgcctgt agtcccaact attcagggaa 300

gctgaggtgg gaggtttgct tgagaccggg aagtccaggc tgcagtgagc cgagatggcg 360

ccactgcact ctagcctcgg cgacagagtg agactctgtc gatctcattc tttggtttct 420

gaactcagcc cactttccct cacataatac agatcttccc gagagtcccg taagcgtttc 480

accatccttc tttttccag ttgaccttg taaagctcat ttctttttac tgtgaaatta 540

ataaatagca ataatacaaa tctcttttaa gglatataaa aattcttccc tgaggagctc 600

tgtaggaatt ataagtagat cagattcaa tttattctaa tatacgagtt taaccaatt 660

tacaatttac atatctttag gaaatggctt catgctttca gaccacaaat attccaaaag 720

gaataatttc agtgtattta atattccagt gaacagaacg aatcaaaggg gctaagtact 780

gaccagtgga tactggtcac 800

<210> 61

<211>	50	
<212>	DNA	
<213>	智人	
<400>	61	
actttactgt gtcccatca cgtgtcgaca gagtctcact ctgtcgccga		50
<210>	62	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	智人	
<400>	62	
caagcatctc tcaggatccc cat		23
<210>	63	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	智人	
<400>	63	
actattcagg gaagctgagg tgg		23
<210>	64	
<211>	800	
<212>	DNA	
<213>	智人	
<220>		
<221>	misc_feature	
<222>	(1)..(128)	
<223>	n 爲 a、c、g 或 t	
<220>		
<221>	misc_feature	
<222>	(610)..(645)	
<223>	n 爲 a、c、g 或 t	
<400>	64	
nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn		60
nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn		120
nnnnnnnnnaa gaatgtcca aggctcaacg aatgctcca tcagaatgcc tgggaatcca		180
ttcagagaaa ggtgtctaca agccatgatg ctcaagtaat tagcaagaaa gttcaaggat		240

gaggaggaga tccagcaaac tectacagcc ctcatttatg cccgctaaag caataaatcc 300

ctgcaggacc aagcatctct caggatcccc atggatgcgg aggataaaca cagagcagag 360

acaaggttac tgctacttta ctgtgtcccc atcacgtgic gacagagtct cactctgtcg 420

ccgaggctag agtgcagtgg cgccatctcg gctcactgca gcctggactt cccggctca 480

agcaaacctc ccacctcagc ttcctgaat agttgggact acaggcacat accaccaggc 540

ctggctagtt tatttgtgtt ttttgtagag acagggtttt accatgttgc ccaggctagt 600

tttttagggn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnn nnnntgtgt ttttaggagc 660

ggaggtttaa tagaagaaag agagaggaga acagctctct ctctagtaag agagaggggc 720

ttctgagagg aaagaacctg ctttgtttct ttaagacaag ttctcactgt tgcccaggct 780

ggagtgcagt gatgcaatta 800

<210> 65

<211> 50

<212> DNA

<213> 智人

<400> 65

gagttcagaa accaaagaat gagatcgagt gattgctagg tgatggacct 50

<210> 66

<211> 23

<212> DNA

<213> 智人

<400> 66

gaaggatggt gaaacgctta cgg 23

<210> 67

<211> 23

<212> DNA

<213> 智人

<400> 67

tgcaccccaa caggagtttt cta 23

<210> 68

<211> 800
<212> DNA
<213> 智人

<400> 68
gtgaccagta tccactggtc agtacttagc ccccttgatt cgttctgttc actggaatat 60

taaatacact gaaattattc cttttggaat atttgtggtc tgaaagcatg aagccatttc 120

ctaaagatat gtaaattgta aattgggtta aactcgtata ttagaataaa ttgaatcgtg 180

atctacttat aattcctaca gagctcctca gggaagaatt tttatatacc ttaaaagaga 240

tttgtattat tgctatttat taatttcaca gtaaaaagaa atgagcttta caaaggcaaa 300

ctggaaaaaa gaaggatggg gaaacgctta cgggactctc gggaagatct gtattatgtg 360

agggaaagtg ggctgagttc agaaacccaa gaatgagatc gagtgattgc taggtgatgg 420

acctgtaggg agagatcact agatgagttc aggtggtaaa tagaaaactc ctgttggggg 480

gcagtgagag atgaaggtag tgaaatgaaa ggatggggat caattttata tgagggcttt 540

aatttgaaat gggaatttgg tgatattctc agagcagcac aagttttcat gccatggaaa 600

agcagcagga aaaatgtaaa ccttgccaat aacacgggaa agtctccaag ggtgcccagt 660

gacttacttg cctataaaca aagccattcc tgagcacitc tggctatgaa atttcaaaat 720

acatgtttta gagaatttta ctgacacttt tatgatttta gaggataatt tagatttcat 780

aaattttggt tccttcctt 800

<210> 69
<211> 53
<212> DNA
<213> 智人

<400> 69
gctggaggat tgcttgagct tgggaggtcg atctcattct ttggtttctg aac 53

<210> 70
<211> 22
<212> DNA
<213> 智人

<400> 70
gcttctggag gccagggatt at 22

<210>	71	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	智人	
<400>	71	
agccccctttg attcgttctg ttc		23
<210>	72	
<211>	800	
<212>	DNA	
<213>	智人	
<400>	72	
cacactcatg cttcataaga aagggttagt ggcttctgga ggccagggat tatttttatt		60
tagttttatt tagttgtcta cttcactgca ctgaactctt aagagctttt aatttattaa		120
tcatttggct gaaatcagga aagggtgttt ttttccctaa aaacattttt atcaatatgt		180
cttagggcag gcagaggagc tcatgccctg tgatcccagc accttgggag gctgaggtagg		240
gggaatcgct tgagcccagg agttcaagac cagcctgggc aatacagtga taccctattt		300
ctacaaaaa taaaaaactt agcctggcgt ggtgctgccc tcccatggtc ctagctactt		360
ggaaggccgt ggctggagga ttgcttgagc ttgggaggtc gatctcattc tttggtttct		420
gaactcagcc cactttccct cacataatac agatcttccc gagagtcccg taagcgtttc		480
accatccttc tttttccag ttgaccttg taaagctcat ttctttttac tgtgaaatta		540
ataaatagca ataatacaaa tctcttttaa ggtatataaa aattcttccc tgaggagctc		600
tgtaggaatt ataagtagat cacgattcaa ttatttctaa tatacgagtt taaccaatt		660
tacaatttac atatcttttag gaaatggctt catgctttca gaccacaaat attccaaaag		720
gaataatttc agtgtattta atattccagt gaacagaacg aatcaaaggg gctaagtact		780
gaccagtgga tactggtcac		800

【發明申請專利範圍】

【請求項1】

一種測定個體之癌症預後之方法，其包含檢測與FIP1L1及PDGFRA基因兩者相關之至少一個表觀遺傳染色體交互作用存在或不存在，其中檢測染色體交互作用存在或不存在係藉由包含以下步驟之方法進行：

(a) 在得自該個體之樣本中，活體外交聯已在染色體交互作用中聚集在一起之染色體區以形成交聯核酸；

(b) 以酶對該交聯核酸進行限制性消化裂解；

(c) 接合該交聯且經裂解之核酸端以形成接合產物；及

(d) 檢測該接合產物；

藉此測定染色體交互作用存在或不存在，且其中接合產物之檢測係藉由：

以下引子對中之任一者：

(a) TTCCACGTGGCCTACCACAG (SEQ ID NO: 7)及

CAGCTGCGAGGTTTTCTTTT (SEQ ID NO: 8)；

(b) TGGGAGTGGGTGGAGTGAGA (SEQ ID NO: 9)及

ACGGACTGACATCTTTAGCTTCC (SEQ ID NO: 10)；

(c) GCAGCTGCGAGGTTTTCTTTT (SEQ ID NO: 11)及

GCCATGTGGCTTGGGCATAC (SEQ ID NO: 12)；

(d) AGTACTTCCTCTCCCCTCCCA (SEQ ID NO: 13)及

GCAGCTGCGAGGTTTTCTTTT (SEQ ID NO: 14)；

(e) CCTCTCCCACACAAACCTGCTA (SEQ ID NO: 15)及

ACATGGAGCACACATACAAGCTAC (SEQ ID NO: 16)；

(f) AAATGATGAGGCACGGGTGAA (SEQ ID NO: 17)及

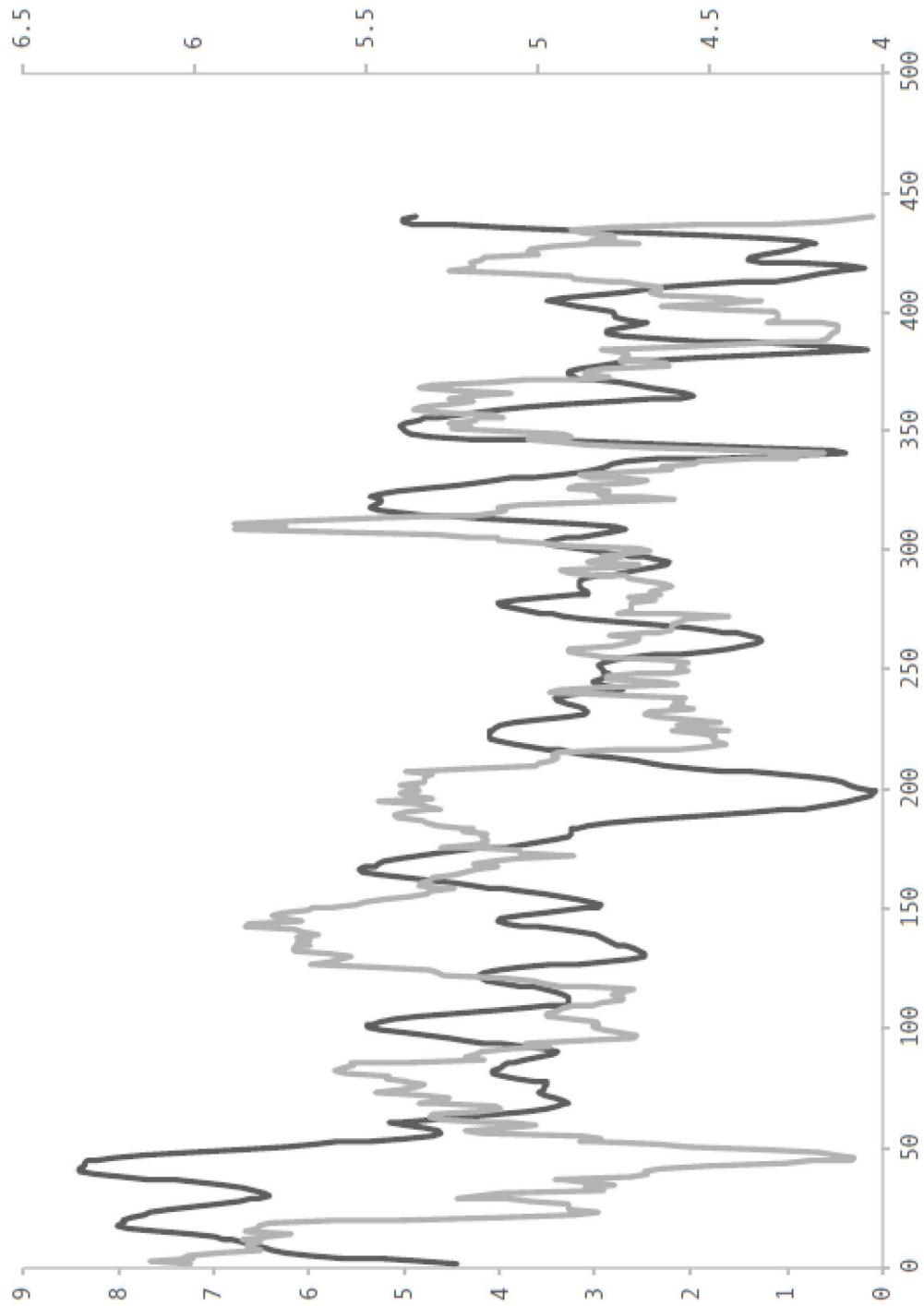
CATGGAGCACACATACAAGCTAC (SEQ ID NO: 18)。

【請求項2】

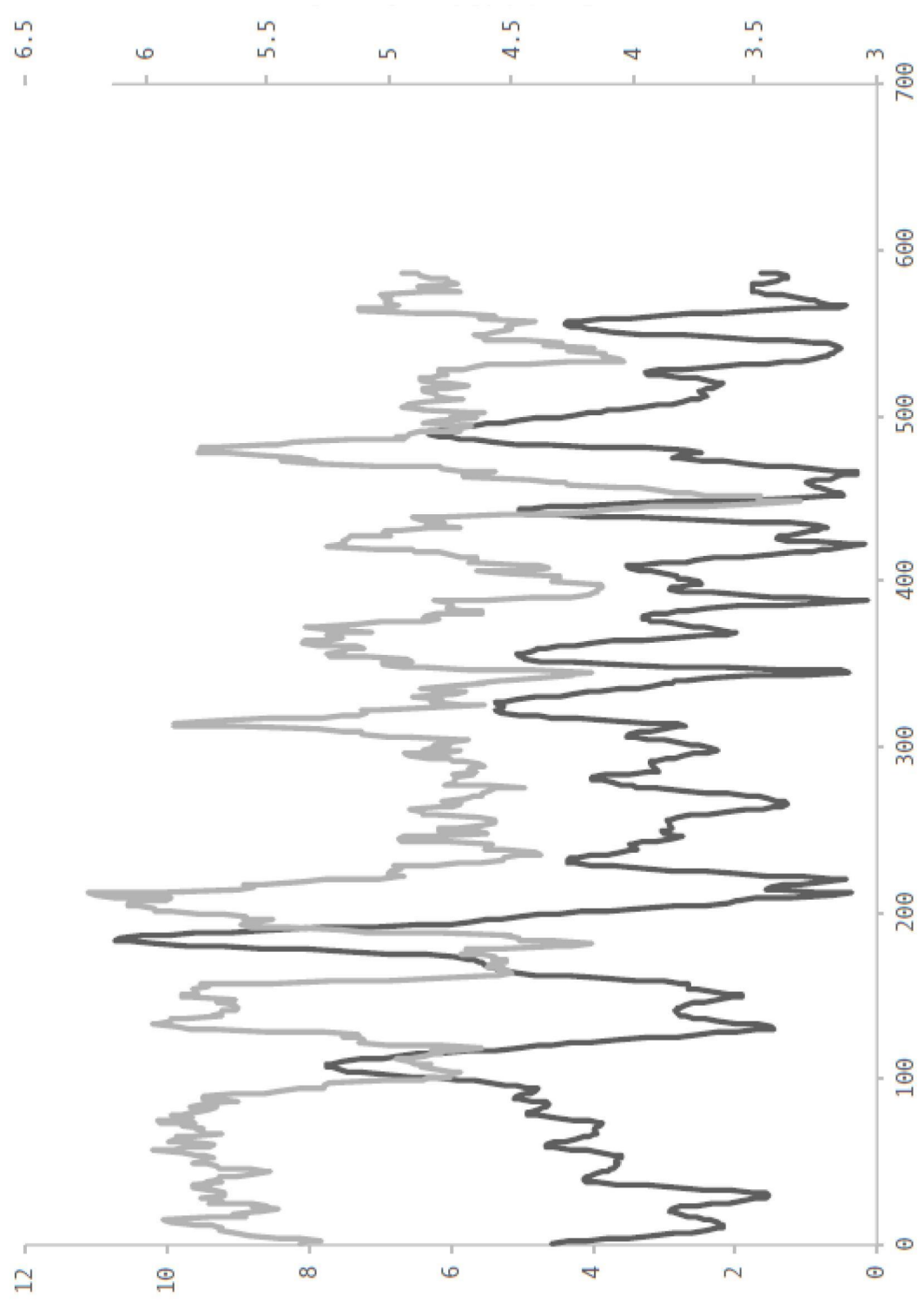
如請求項1之方法，其中該癌症為以下中之任一者：

- (a) 特發性嗜伊紅白血球增多症候群(iHES)
- (b) 慢性及急性嗜伊紅球性白血病
- (c) 急性骨髓性白血病(AML)
- (d) PDGFRA陽性非小細胞肺癌
- (e) 神經膠母細胞瘤，包括多形性神經膠母細胞瘤及星形細胞瘤
- (f) 前列腺癌
- (g) 晚期卵巢癌
- (h) 腸胃基質腫瘤(GIST)。

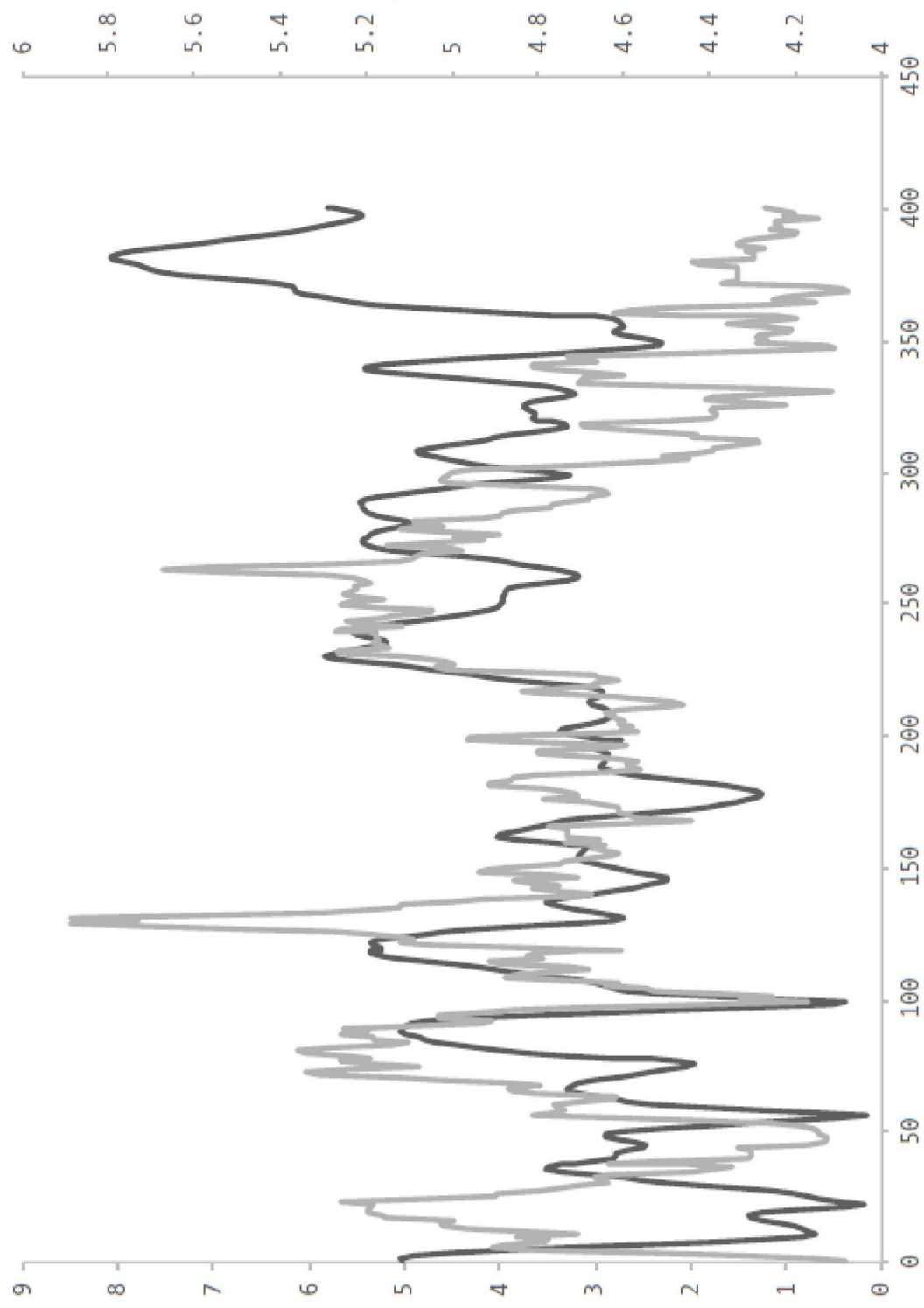




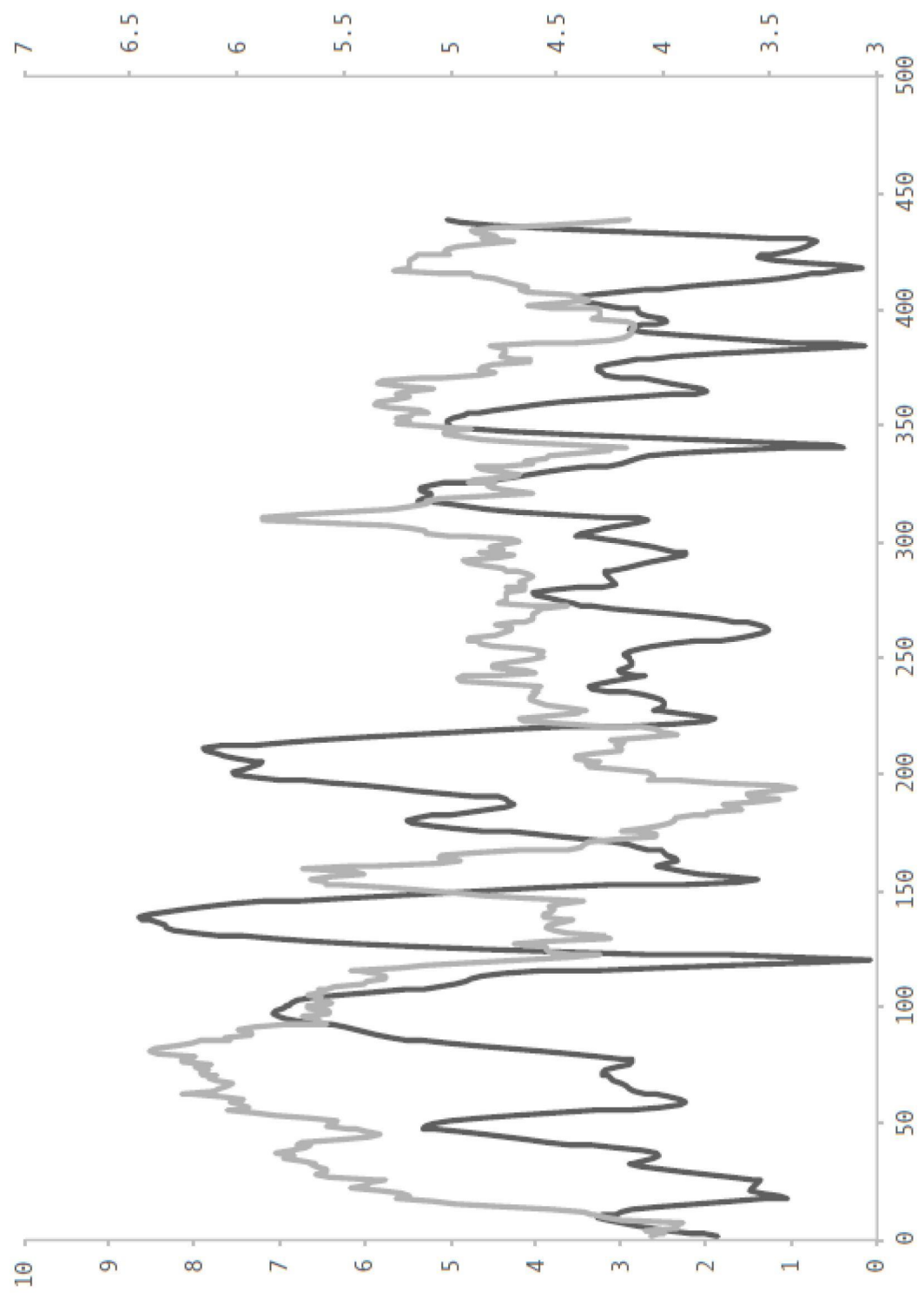
【圖2】



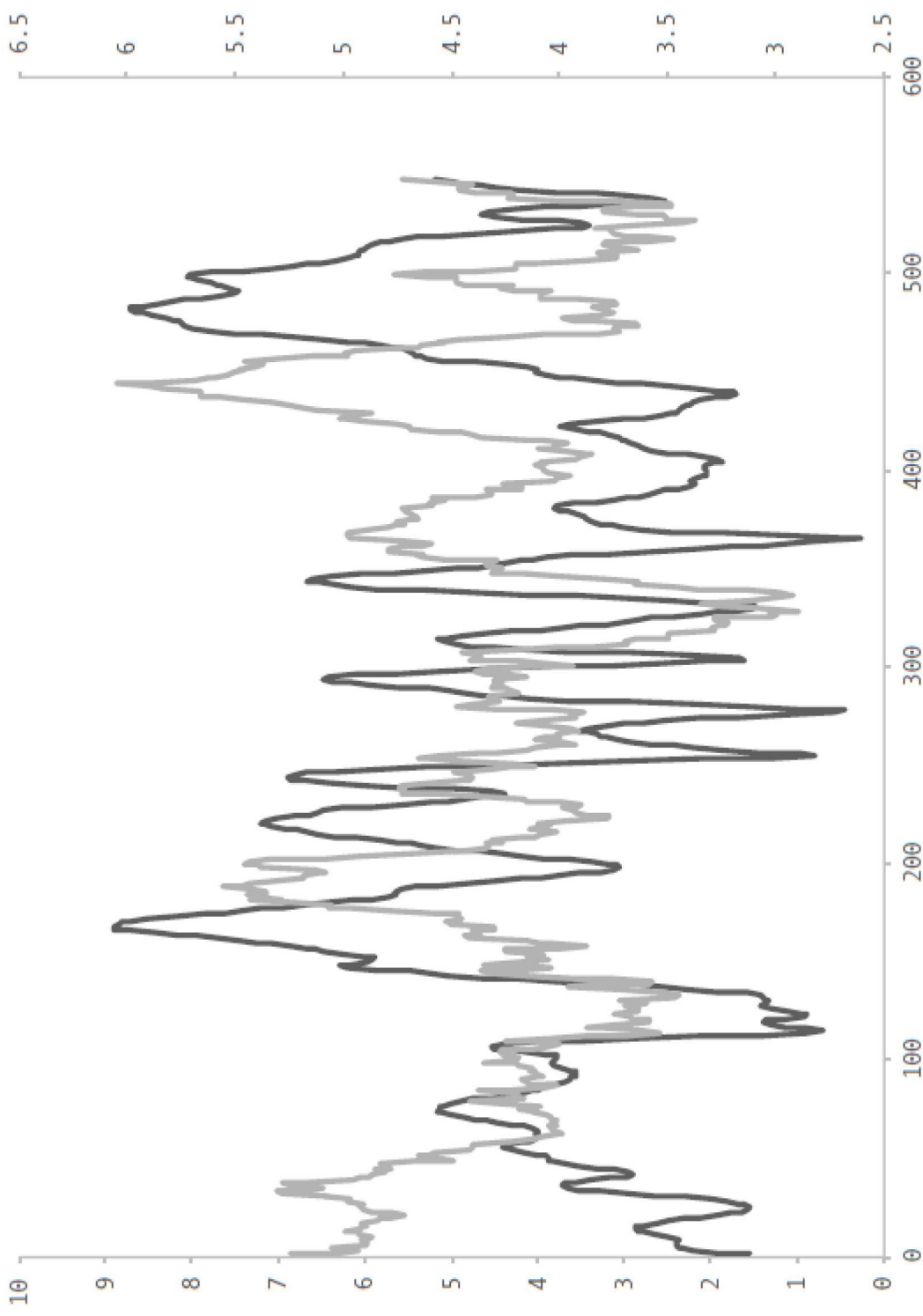
【圖3】



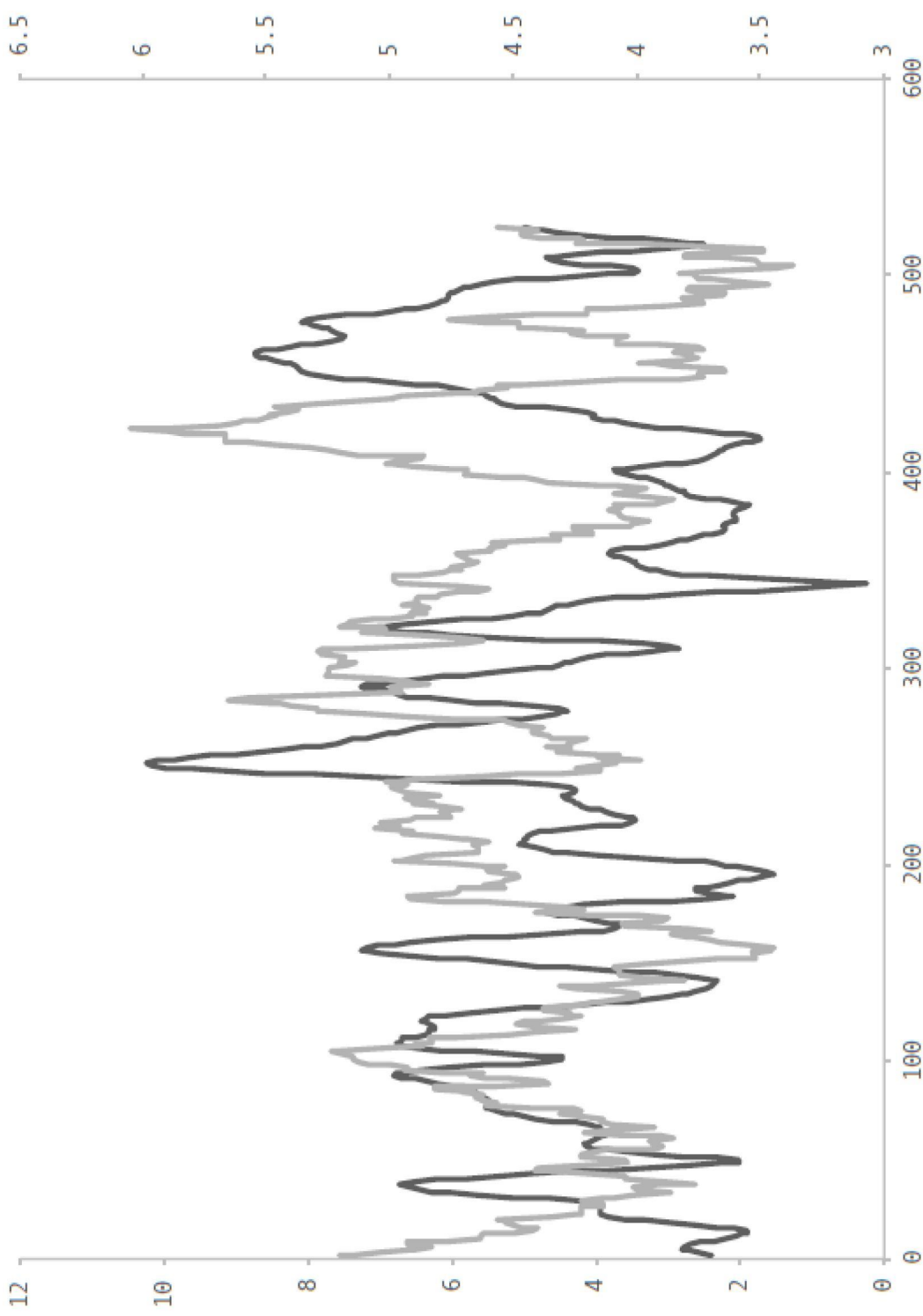
【圖4】



【圖5】

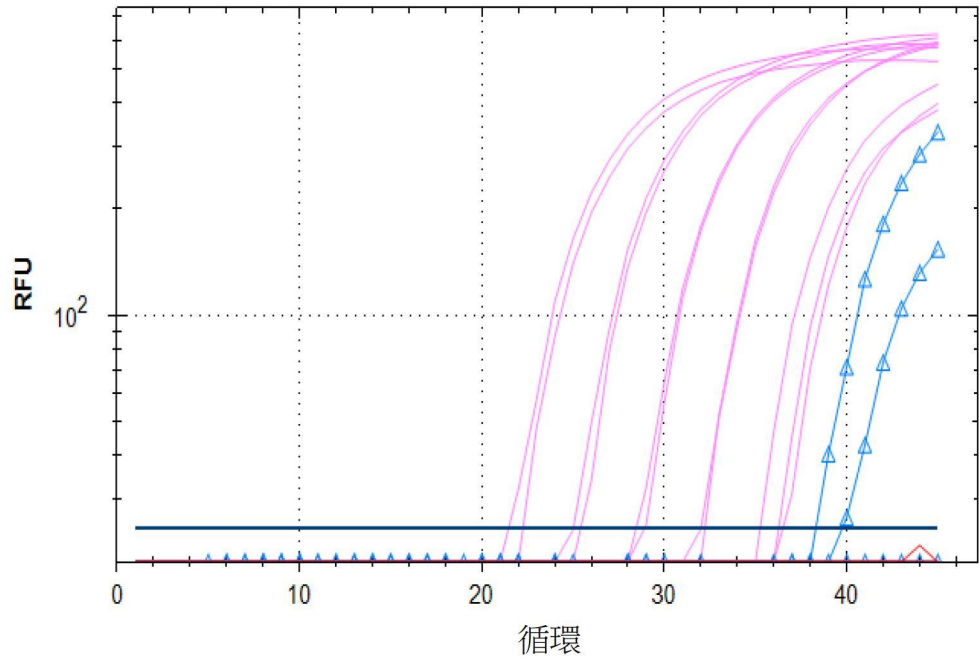


【圖6】

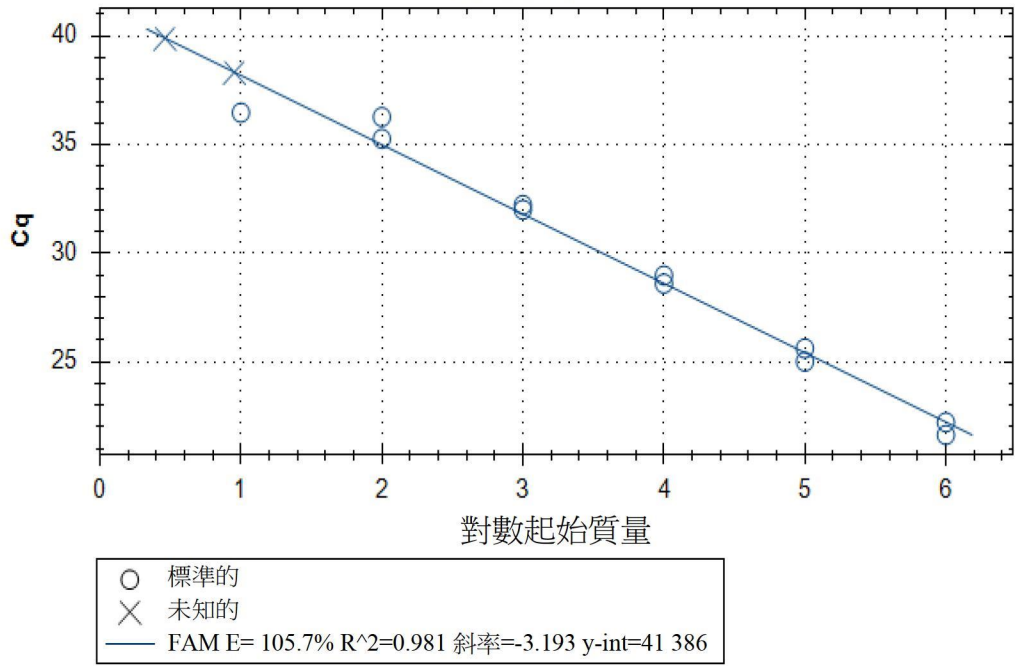


【圖7】

用抑制劑GSK864治療之DBTRG，擴增MMP1複本數。

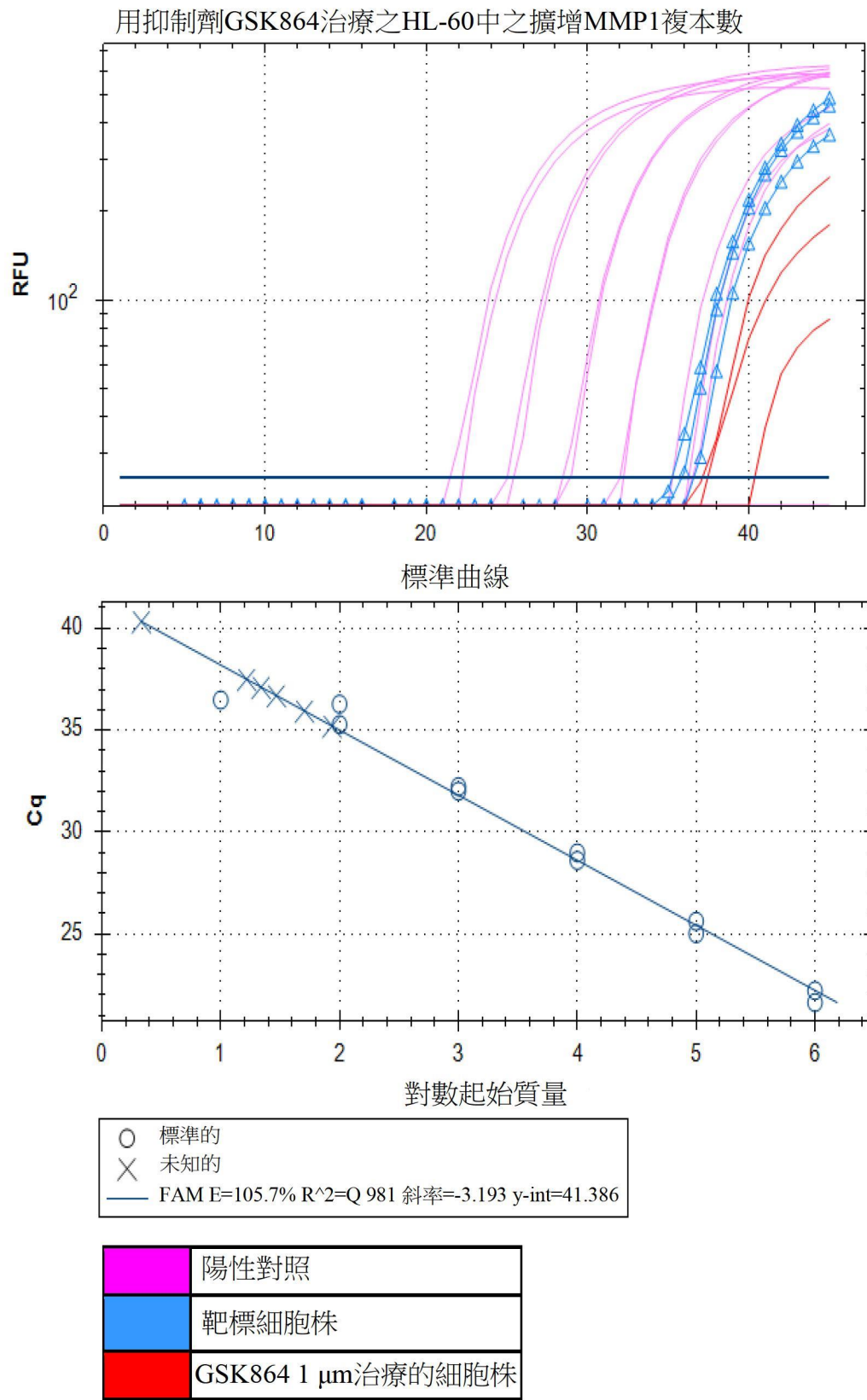


標準曲線



	陽性對照
	靶標細胞株
	GSK864 1 μm治療的細胞株

【圖8】



【圖9】