



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104903464 B

(45)授权公告日 2018.04.24

(21)申请号 201380066924.5

(72)发明人 A.古普塔 N.舍恩布伦纳

(22)申请日 2013.12.19

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 104903464 A

代理人 杜艳玲 黄希贵

(43)申请公布日 2015.09.09

(51)Int.Cl.

(30)优先权数据

61/740895 2012.12.21 US

C12Q 1/6806(2018.01)

C12Q 1/6827(2018.01)

C07F 15/00(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2015.06.19

(56)对比文件

US 6031098 A,2000.02.29,

US 6120992 A,2000.09.19,

WO 01/05800 A2,2001.01.25,

WO 2007084380 A2,2007.07.26,

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2013/077282 2013.12.19

(87)PCT国际申请的公布数据

WO2014/096126 EN 2014.06.26

审查员 姜岚

(73)专利权人 霍夫曼-拉罗奇有限公司

地址 瑞士巴塞尔

权利要求书3页 说明书11页 附图7页

(54)发明名称

用于从混合物富集突变核酸的化合物和方法

(57)摘要

由于非常过量的野生型DNA的同时存在,从生物样品检测罕见体细胞突变的存在经常是挑战性的。本发明描述了通过排除可扩增的野生型DNA而允许富集突变体DNA的新化合物和方法。

1. 一种从样品富集核酸混合物中的靶核酸序列变体的方法,所述靶核酸以两种变体序列的形式存在,其中所述变体在单个核苷酸位置处不同,所述方法包括:

提供包括所述靶核酸序列的样品,其中所述要富集的变体在过量的另一变体中以低丰度存在于所述样品中;

提供与所述靶核酸序列的一条链互补的寡核苷酸,其中所述寡核苷酸在所述单个核苷酸位置处具有与要富集的变体的错配且在所述单个核苷酸位置处与所述另一变体完美匹配;

提供适合于所述寡核苷酸与所述靶核酸杂交的条件,以产生由所述寡核苷酸和所述靶核酸序列的任一种变体的一条链组成的双链体多核苷酸;

加热所述样品,使得核酸的混合物变性;

使所述双链体多核苷酸与连接至亲和标记物的错配嵌入化合物接触以产生反应混合物,其中所述错配嵌入化合物能够结合所述含有错配的双链体多核苷酸且不能结合所述不含有错配的双链体多核苷酸;

使所述反应混合物经历亲和基质,所述亲和基质识别和结合所述错配嵌入化合物上的亲和标记物;

洗涤所述反应混合物和使所述亲和基质与未结合所述亲和基质的所有材料分离;和

提供缓冲液以从所述亲和基质洗脱核酸,和收集洗脱的含有富集的靶核酸序列变体的缓冲液,其中所述具有亲和标记物的错配嵌入化合物是以15 μ M以上的浓度存在的Rh (bpy)₂ (phzi) (PEG3-生物素)³⁺。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述要富集的变体是突变体等位基因,且另一变体是野生型等位基因。

3. 根据权利要求2所述的方法,其中所述突变体等位基因是突变体EGFR等位基因,且所述野生型等位基因是野生型EGFR等位基因。

4. 一种用于从样品检测核酸混合物中的靶核酸序列的突变体等位基因的方法,其中所述突变体等位基因在单个核苷酸位置处与野生型等位基因不同且在过量的野生型等位基因中以低丰度存在于所述样品中,所述方法包括:

富集所述样品中的突变体等位基因,其中所述富集如下进行:

提供与所述靶核酸序列的一条链互补的寡核苷酸,其中所述寡核苷酸在所述单个核苷酸位置处具有与所述突变体等位基因的错配且在所述单个核苷酸位置处与所述野生型等位基因完美匹配;

加热所述样品,使得核酸的混合物变性;

提供适合于所述寡核苷酸与所述靶核酸杂交的条件,以产生由所述寡核苷酸以及所述突变体等位基因或所述野生型等位基因的一条链组成的双链体多核苷酸;

使所述双链体多核苷酸与连接至亲和标记物的错配嵌入化合物接触以产生反应混合物,其中所述错配嵌入化合物能够结合所述含有错配的双链体多核苷酸且不能结合所述不含有错配的双链体多核苷酸;

使所述反应混合物经历亲和基质,所述亲和基质识别和结合所述错配嵌入化合物上的亲和标记物;

洗涤所述反应混合物和使所述亲和基质与未结合所述亲和基质的所有材料分离;和

提供缓冲液以从所述亲和基质洗脱核酸,和收集洗脱的含有富集的突变体等位基因的缓冲液;

扩增所述富集的突变体等位基因;和

检测富集的扩增的突变体等位基因的产物或从所述富集的扩增的突变体等位基因产生的信号,其中所述具有亲和标记物的错配嵌入化合物是以15 μ M以上的浓度存在的Rh (bpy)₂ (phzi) (PEG3-生物素)³⁺。

5. 根据权利要求4所述的方法,其中所述突变体等位基因是突变体EGFR等位基因,且所述野生型等位基因是野生型EGFR等位基因。

6. 根据权利要求4-5中的任一项所述的方法,其中所述扩增步骤用等位基因特异性的引物进行。

7. 一种从样品富集核酸混合物中的靶核酸序列变体的方法,所述靶核酸以两种变体序列的形式存在,其中所述变体在单个核苷酸位置处不同,所述方法包括:

提供包括所述靶核酸序列的样品,其中所述要富集的变体在过量的另一变体中以低丰度存在于所述样品中;

加热所述样品,使得核酸的混合物变性;

提供适合于所述靶核酸的重退火的条件,其中可以在一种变体序列的一条链和另一变体序列的一条链之间形成双链体多核苷酸,以在所述变体存在差异的单个核苷酸位置处产生错配;

使所述双链体多核苷酸与连接至亲和标记物的错配嵌入化合物接触以产生反应混合物,其中所述错配嵌入化合物能够结合所述含有错配的双链体多核苷酸且不能结合所述不含有错配的双链体多核苷酸;

使所述反应混合物经历亲和基质,所述亲和基质识别和结合所述错配嵌入化合物上的亲和标记物;

洗涤所述反应混合物和使所述亲和基质与未结合所述亲和基质的所有材料分离;和

提供缓冲液以从所述亲和基质洗脱核酸,和收集洗脱的含有富集的靶核酸序列变体的缓冲液,其中所述具有亲和标记物的错配嵌入化合物是以15 μ M以上的浓度存在的Rh (bpy)₂ (phzi) (PEG3-生物素)³⁺。

8. 根据权利要求7所述的方法,其中所述要富集的变体是突变体等位基因,且另一变体是野生型等位基因。

9. 根据权利要求8所述的方法,其中所述突变体等位基因是突变体EGFR等位基因,且所述野生型等位基因是野生型EGFR等位基因。

10. 一种用于从样品检测核酸混合物中的靶核酸序列的突变体等位基因的方法,其中所述突变体等位基因在单个核苷酸位置处与野生型等位基因不同且在过量的野生型等位基因中以低丰度存在于所述样品中,所述方法包括:

富集所述样品中的突变体等位基因,其中所述富集如下进行:

加热所述样品,使得核酸的混合物变性;

提供适合于所述靶核酸的重退火的条件,其中可以在所述突变体等位基因的一条链和所述野生型等位基因的一条链之间形成双链体多核苷酸,以在所述等位基因存在差异的单个核苷酸位置处产生错配;

使所述双链体多核苷酸与连接至亲和标记物的错配嵌入化合物接触以产生反应混合物,其中所述错配嵌入化合物能够结合所述含有错配的双链体多核苷酸且不能结合所述不含有错配的双链体多核苷酸;

使所述反应混合物经历亲和基质,所述亲和基质识别和结合所述错配嵌入化合物上的亲和标记物;

洗涤所述反应混合物和使所述亲和基质与未结合所述亲和基质的所有材料分离;和

提供缓冲液以从所述亲和基质洗脱核酸,和收集洗脱的含有富集的靶核酸序列变体的缓冲液;

扩增所述富集的突变体等位基因;和

检测富集的扩增的突变体等位基因的产物或从所述富集的扩增的突变体等位基因产生的信号,其中所述具有亲和标记物的错配嵌入化合物是以 $15\mu\text{M}$ 以上的浓度存在的 $\text{Rh}(\text{bpy})_2(\text{phzi})(\text{PEG3-生物素})^{3+}$ 。

11. 根据权利要求10所述的方法,其中所述突变体等位基因是突变体EGFR等位基因,且所述野生型等位基因是野生型EGFR等位基因。

12. 根据权利要求10-11的任一项所述的方法,其中所述扩增步骤用等位基因特异性的引物进行。

13. 用于富集混合物中的罕见等位基因DNA的化合物,其中所述化合物是以 $15\mu\text{M}$ 以上的浓度存在的 $\text{Rh}(\text{bpy})_2(\text{phzi})(\text{PEG3-生物素})^{3+}$ 。

用于从混合物富集突变核酸的化合物和方法

技术领域

[0001] 本发明涉及核酸化学和核酸扩增的领域。具体地，本发明涉及使用可以检测核酸中的碱基对错配的化合物和方法富集低丰度突变靶核酸。

背景技术

[0002] 已知大多数人遗传疾病和癌症由核基因中的突变造成。一般而言，认为突变是遗传基因座处的特定多态变体。所述突变可以是单个核苷酸差异，经常被称作点突变。在细胞和组织水平，在特定遗传基因座处的多态性可以导致显著改变的细胞行为。但是，因为即使相对较小的细胞或组织样品可以含有数百万或数十亿含有该特定遗传基因座的DNA分子，在遗传基因座处的多态变体的范围和频率的表示需要检测潜在地以非常低频率存在的等位基因。在大多数情况下，由于非常过量的野生型DNA的同时存在，来自生物样品的罕见突变的存在的检测提出了巨大的挑战。

[0003] 因此，本领域中需要选择性地和准确地富集低拷贝突变体DNA的方法，使得它们的存在在执行扩增反应(诸如PCR)以后可以是可检测的。

发明内容

[0004] 本发明涉及用于富集样品中的低丰度等位基因(例如突变体DNA)的方法和组合物，所述样品允许随后检测这样的等位基因。在第一方面，本发明涉及从样品富集核酸混合物中的靶核酸序列变体的方法，所述靶核酸以两种变体序列的形式存在，其中所述变体在单个核苷酸位置处不同，所述方法包括，提供包括所述靶核酸序列的样品，其中所述要富集的变体在大量过量的另一变体中以低丰度存在于所述样品中；提供与所述靶核酸序列的一条链互补的寡核苷酸，其中所述寡核苷酸在所述单个核苷酸位置处具有与要富集的变体的错配且在所述单个核苷酸位置处与所述另一变体完美匹配；提供适合于所述寡核苷酸与所述靶核酸杂交的条件，以产生由所述寡核苷酸和所述靶核酸序列的任一种变体的一条链组成的双链体多核苷酸；使所述双链体多核苷酸与连接至亲和标记物的错配嵌入化合物接触以产生反应混合物，其中所述错配嵌入化合物能够结合所述含有错配的双链体多核苷酸且不能结合所述不含有错配的双链体多核苷酸；使所述反应混合物经历亲和基质，所述亲和基质识别和结合所述错配嵌入化合物上的亲和标记物；洗涤所述反应混合物和使所述亲和基质与未结合所述亲和基质的所有材料分离；和提供缓冲液以从所述亲和基质洗脱核酸，和收集洗脱的含有富集的靶核酸序列变体的缓冲液。

[0005] 在第二方面，本发明涉及从样品检测核酸混合物中的靶核酸序列的突变体等位基因的方法，其中所述突变体等位基因在单个核苷酸位置处与野生型等位基因不同且在大量过量的野生型等位基因中以低丰度存在于所述样品中，所述方法包括，富集所述样品中的突变体等位基因，其中所述富集如下进行：提供与所述靶核酸序列的一条链互补的寡核苷酸，其中所述寡核苷酸在所述单个核苷酸位置处具有与所述突变体等位基因的错配且在所述单个核苷酸位置处与所述野生型等位基因完美匹配；提供适合于所述寡核苷酸与所述靶

核酸杂交的条件,以产生由所述寡核苷酸以及所述突变体等位基因或所述野生型等位基因的一条链组成的双链体多核苷酸;使所述双链体多核苷酸与连接至亲和标记物的错配嵌入化合物接触以产生反应混合物,其中所述错配嵌入化合物能够结合所述含有错配的双链体多核苷酸且不能结合所述不含有错配的双链体多核苷酸;使所述反应混合物经历亲和基质,所述亲和基质识别和结合所述错配嵌入化合物上的亲和标记物;洗涤所述反应混合物和使所述亲和基质与未结合所述亲和基质的所有材料分离;和提供缓冲液以从所述亲和基质洗脱核酸,和收集洗脱的含有富集的突变体等位基因的缓冲液;扩增所述富集的突变体等位基因;和检测富集的扩增的突变体等位基因的产物或从所述富集的扩增的突变体等位基因产生的信号。

[0006] 在第三方面,本发明涉及从样品富集核酸混合物中的靶核酸序列变体的方法,所述靶核酸以两种变体序列的形式存在,其中所述变体在单个核苷酸位置处不同,所述方法包括:提供包括所述靶核酸序列的样品,其中所述要富集的变体在大量过量的另一变体中以低丰度存在于所述样品中;加热所述样品,使得核酸的混合物变性;提供适合于所述靶核酸的重退火的条件,其中可以在一种变体序列的一条链和另一变体序列的一条链之间形成双链体多核苷酸,以在所述变体存在差异的单个核苷酸位置处产生错配;使所述双链体多核苷酸与连接至亲和标记物的错配嵌入化合物接触以产生反应混合物,其中所述错配嵌入化合物能够结合所述含有错配的双链体多核苷酸且不能结合所述不含有错配的双链体多核苷酸;使所述反应混合物经历亲和基质,所述亲和基质识别和结合所述错配嵌入化合物上的亲和标记物;洗涤所述反应混合物和使所述亲和基质与未结合所述亲和基质的所有材料分离;和提供缓冲液以从所述亲和基质洗脱核酸,和收集洗脱的含有富集的靶核酸序列变体的缓冲液。

[0007] 在第四方面,本发明涉及从样品检测核酸混合物中的靶核酸序列的突变体等位基因的方法,其中所述突变体等位基因在单个核苷酸位置处与野生型等位基因不同且在大量过量的野生型等位基因中以低丰度存在于所述样品中,所述方法包括:富集所述样品中的突变体等位基因,其中所述富集如下进行:加热所述样品,使得核酸的混合物变性;提供适合于所述靶核酸的重退火的条件,其中可以在所述突变体等位基因的一条链和所述野生型等位基因的一条链之间形成双链体多核苷酸,以在所述等位基因存在差异的单个核苷酸位置处产生错配;使所述双链体多核苷酸与连接至亲和标记物的错配嵌入化合物接触以产生反应混合物,其中所述错配嵌入化合物能够结合所述含有错配的双链体多核苷酸且不能结合所述不含有错配的双链体多核苷酸;使所述反应混合物经历亲和基质,所述亲和基质识别和结合所述错配嵌入化合物上的亲和标记物;洗涤所述反应混合物和使所述亲和基质与未结合所述亲和基质的所有材料分离;和提供缓冲液以从所述亲和基质洗脱核酸,和收集洗脱的含有富集的靶核酸序列变体的缓冲液;扩增所述富集的突变体等位基因;和检测富集的扩增的突变体等位基因的产物或从所述富集的扩增的突变体等位基因产生的信号。

[0008] 在第五方面,本发明涉及用于富集罕见等位基因DNA的化合物,其中所述化合物是图2的化合物。

附图说明

[0009] 图1显示了基于铑的嵌入剂 $\text{Rh}(\text{bpy})_2(\text{chrysi})^{3+}$ (左) 和 $\text{Rh}(\text{bpy})_2(\text{phzi})^{3+}$ (右) 的

结构。

[0010] 图2显示了本发明的生物素结合的铑嵌入剂 $\text{Rh}(\text{bpy})_2(\text{phzi})(\text{PEG3-生物素})^{3+}$ 的结构。

[0011] 图3显示了 $\text{Rh}(\text{bpy})_2(\text{phzi})^{3+}$ 和 $\text{Rh}(\text{bpy})_2(\text{phzi-CO}_2\text{H})^{3+}$ 对就人EGFR基因中的T790M突变位点而言完美匹配的突变双链体(M-PM)和C:A错配双链体的切割效率的UPLC分析。

[0012] 图4是 $\text{Rh}(\text{bpy})_2(\text{phzi-CO}_2\text{H})^{3+}$ (*Rh* (羧基))、 $\text{Rh}(\text{bpy})_2(\text{phzi})^{3+}$ (*Rh* (Barton)) 和 $\text{Rh}(\text{bpy})_2(\text{phzi})(\text{PEG3-生物素})^{3+}$ (*Rh* (bio)) 随着紫外光照射时间而变化的切割效率的图解表示。

[0013] 图5是随着每种铑螯合剂的浓度而变化的、 $\text{Rh}(\text{bpy})_2(\text{phzi})^{3+}$ (*Rh* (Barton)) 在30分钟紫外光照射以后、和 $\text{Rh}(\text{bpy})_2(\text{phzi})(\text{PEG3-生物素})^{3+}$ (*Rh* (bio)) 在30分钟或60分钟紫外光照射以后的切割效率的图解表示。

[0014] 图6显示了参与 $[\text{Rh}(\text{bpy})_2(\text{phzi-CO}_2\text{H})](\text{Cl})_3$ 的合成的化合物的结构(参见实施例5)。

[0015] 图7显示了参与 $[\text{Rh}(\text{bpy})_2(\text{phzi})(\text{PEG}_3\text{-生物素})](\text{Cl})_3$ 的合成的化合物的结构(参见实施例6)。

具体实施方式

[0016] 定义

[0017] 除非另外定义,在本文中使用的所有技术和科学术语具有本发明所属领域的技术人员通常理解的含义。下述参考文献给技术人员提供了在本发明中使用的许多术语的一般定义:Singleton等人, *Dictionary of Microbiology and Molecular Biology* (1994年第2版); *The Cambridge Dictionary of Science and Technology* (Walker编, 1988); *The Glossary of Genetics*, 第5版, R. Rieger等人(编), Springer Verlag (1991); 和 Hale & Marham, *The Harper Collins Dictionary of Biology* (1991)。本文中使用的下述术语具有归于它们的含义,除非另有说明。

[0018] 术语“核酸”表示核苷酸(例如,核糖核苷酸、脱氧核糖核苷酸、核苷酸类似物等)的聚合物,并且包含脱氧核糖核酸(DNA)、核糖核酸(RNA)、DNA-RNA杂交物、寡核苷酸、多核苷酸、适体、肽核酸(PNA)、PNA-DNA缀合物、PNA-RNA缀合物等,其包含以直链或支链方式共价连接在一起的核苷酸。核酸通常是单链的或双链的,并且一般含有磷酸二酯键,尽管在某些情况下,包括可以具有替代主链的核酸类似物,包括、例如,磷酰胺(Beaucage等人(1993) *Tetrahedron* 49(10):1925);硫代磷酸酯(Mag等人(1991) *Nucleic Acids Res.* 19:1437;和美国专利号5,644,048)、二硫代磷酸酯(Briu等人(1989) *J. Am. Chem. Soc.* 111:2321)、O-甲基亚磷酰胺(O-methylphosphoroamidite)连接(参见Eckstein, *Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach*, Oxford University Press (1992))和肽核酸主链和连接(参见,Egholm (1992) *J. Am. Chem. Soc.* 114:1895)。其它类似物核酸包括具有带正电荷主链的类似物核酸(Denpcy等人(1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 6097);具有非离子主链(美国专利号5,386,023、5,637,684、5,602,240、5,216,141和4,469,863)和非核糖主链的类似物核酸,包括在美国专利号5,235,033和5,034,506中描述的类似物核酸。含有一个或多个碳环糖的核酸也被包括在核酸的定义内(参见

Jenkins等人(1995) Chem. Soc. Rev. 第169-176页),并且类似物也描述在例如Rawls, C & E News 1997年6月2日第35页中。可以完成核糖-磷酸主链的这些修饰,以促进另外部分(诸如标记)的添加或以改变这样的分子在生理环境中的稳定性和半衰期。

[0019] 除了通常在核酸中发现的天然存在的杂环碱基(例如,腺嘌呤、鸟嘌呤、胸腺嘧啶、胞嘧啶和尿嘧啶)以外,核苷酸类似物也可以包括非天然存在的杂环碱基,诸如在例如Seela等人(1999) Helv. Chim. Acta 82:1640中所述的那些。在核苷酸类似物中使用的某些碱基充当熔化温度(T_m)改性剂。例如,这些中的一些包括7-脱氮嘌呤(例如,7-脱氮鸟嘌呤、7-脱氮腺嘌呤等)、吡唑并[3,4-d]嘧啶、丙炔基-dN(例如,丙炔基-dU、丙炔基-dC等)等。参见,例如,美国专利号5,990,303。其它代表性的杂环碱基包括,例如,次黄嘌呤、肌苷、黄嘌呤;2-氨基嘌呤、2,6-二氨基嘌呤、2-氨基-6-氯嘌呤、次黄嘌呤、肌苷和黄嘌呤的8-氮杂衍生物;腺嘌呤、鸟嘌呤、2-氨基嘌呤、2,6-二氨基嘌呤、2-氨基-6-氯嘌呤、次黄嘌呤、肌苷和黄嘌呤的7-脱氮-8-氮杂衍生物;6-氮胞苷;5-氟胞苷;5-氯胞苷;5-碘胞苷;5-溴胞苷;5-甲基胞苷;5-丙炔基胞苷;5-溴乙烯基尿嘧啶;5-氟尿嘧啶;5-氯尿嘧啶;5-碘尿嘧啶;5-溴尿嘧啶;5-三氟甲基尿嘧啶;5-甲氧基甲基尿嘧啶;5-乙炔基尿嘧啶;5-丙炔基尿嘧啶,等。

[0020] “核苷”表示包含与糖部分(核糖糖或脱氧核糖糖)、糖部分的衍生物、或糖部分的功能等同物(例如碳环)共价连接的碱基或碱性基团(其包含至少一个同素环、至少一个杂环、至少一个芳基和/或类似基团)的核酸组分。例如,当核苷包括糖部分时,碱基通常连接至该糖部分的1'-位置。如上所述,碱基可以是天然存在的碱基或非天然存在的碱基。示例性的核苷包括核糖核苷、脱氧核糖核苷、二脱氧核糖核苷和碳环核苷。

[0021] “核苷酸”表示核苷的酯,例如,核苷的磷酸酯,其具有一个、两个、三个或更多个共价连接至核苷的糖部分的5'位置的磷酸酯基团。

[0022] 术语“多核苷酸”和“寡核苷酸”互换使用。“寡核苷酸”是有时用于描述较短多核苷酸的术语。寡核苷酸可以包含与指定的核苷酸序列的区域对应的至少6个核苷酸,例如至少约10-12个核苷酸,或至少约15-30个核苷酸。

[0023] 术语“富集靶核酸序列变体”表示增加靶核酸序列的期望变体的量和增加样品中期望变体相对于不期望变体的比率。通常,要富集的期望变体在核酸样品中不如不期望变体普遍,且占靶核酸序列的所有变体的总量的小于50%。在许多情况下,期望变体表示突变体等位基因,且不期望变体表示野生型等位基因。

[0024] 本文中使用的术语“野生型”表示这样的基因或等位基因:其当从天然存在的来源分离时,具有该基因或等位基因的特征。野生型基因或野生型等位基因是在群体中最经常观察到的基因,且任意命名为所述基因或等位基因的“正常”或“野生型”形式。

[0025] 相反,术语“突变体”或“突变的”表示这样的基因或等位基因:其与野生型基因或等位基因相比表现出序列中的修饰。术语“突变”表示通常保守的核酸序列的核苷酸序列中的变化,所述变化导致与正常的(未改变的)序列或野生型序列区分开的突变体的形成。突变通常可以分成2大类:即,碱基对置换(例如单个核苷酸置换)和移码突变。后者需要一个至几个核苷酸对的插入或缺失。

[0026] 术语“等位基因”表示相差仅一个或几个碱基的两个序列。

[0027] 术语“错配”DNA或“异源双链体”DNA表示包括一个或多个错配碱基配对的DNA。错

配碱基配对表示相对碱基的特定对,在DNA双链体的背景下,其不可形成氢键合的碱基对(T与A,或G与C)之一。异源双链体DNA包括这样的双链DNA:其中在一条链中的一个或多个碱基与或不与相对链中的一个或多个碱基互补,以及这样的双链DNA:其中任一条链的一个或多个碱基具有或不具有相对碱基,这归因于在一条链中与相对链相比的插入或缺失。相反,同源双链体DNA表示这样的双链DNA:其中每条链是另一条链的完全互补物,且每个碱基与相对碱基形成氢键合的碱基对。

[0028] 术语“分子结合配偶体”和“特异性结合配偶体”表示表现出特异性结合的分子对,通常是生物分子对。非限制性例子是受体和配体、抗体和抗原、生物素和抗生物素蛋白、和生物素和抗生蛋白链菌素。还可以通过在如下所定义的“亲和标记物”和“亲和基质”之间发生的结合来表示分子结合配偶体。

[0029] “亲和”标记是可以特异性地结合它的分子结合配偶体的分子。所述结合可以通过共价键或非共价键(例如,离子键、氢键等)。本文中使用的亲和标记物(诸如生物素)可以选择性地结合亲和基质,诸如抗生蛋白链菌素包被的珠子或颗粒。

[0030] 本文中使用的“亲和基质”表示可以特异性地结合它的分子结合配偶体的、附着于固体支持物或固体基质(例如磁性胶乳颗粒、玻璃珠)的表面的分子。所述结合可以通过共价键或非共价键。本文中使用的亲和基质(诸如抗生蛋白链菌素包被的磁性胶乳颗粒)可以选择性地结合亲和标记物,诸如生物素。

[0031] “PCR扩增”或简称的“PCR”表示这样的聚合酶链式反应:其涉及使用核酸序列作为模板,用于产生该序列的大量互补物。所述模板可以与具有与模板序列的一部分互补的序列的引物杂交,并与合适的反应混合物(包括dNTP和聚合酶)接触。用聚合酶延伸引物,从而产生与原始模板互补的核酸。为了扩增双链核酸分子的两条链,使用2种引物,其中的每一种可以具有与核酸链之一的一部分互补的序列。将核酸分子的链变性,例如通过加热,并重复该过程,这时用上述步骤的新合成的链充当后续步骤中的模板。PCR扩增方案可以包括变性反应、杂交反应和延伸反应的几个至许多循环,以产生足够量的靶核酸。

[0032] 术语“等位基因特异性的引物”或“AS引物”表示这样的引物:其与靶序列的超过一种变体杂交,但是能够区分靶序列的变体,因为仅对于所述变体之一,所述引物在合适条件下被核酸聚合酶有效地延伸。对于靶序列的其它变体,所述延伸是低效的、无效的或不可检测的。

[0033] 术语“共同引物”表示包括等位基因特异性的引物的引物对中的第二种引物。共同引物不是等位基因特异性的,即不会区分靶序列的变体,所述变体会被等位基因特异性的引物区分。

[0034] 术语“互补的”或“互补性”用于表示通过沃森-克里克碱基配对规则关联的多核苷酸的反平行链。术语“完美互补的”或“100%互补性”表示这样的互补序列:在反平行链之间具有所有碱基的沃森-克里克配对,即,在多核苷酸双链体中的任意两个碱基之间没有错配。但是,即使在没有完美互补性存在下,在反平行链之间形成双链体。术语“部分互补的”或“不完全互补的”表示小于100%完美的、反平行的多核苷酸链之间的任何碱基比对(例如,在多核苷酸双链体中存在至少一个错配或未匹配的碱基)。部分互补链之间的双链体的稳定性通常低于完美互补链之间的双链体。

[0035] 术语“样品”表示含有核酸或推测含有核酸的任何组合物。这包括从个体分离的组

织或流体的样品,例如,皮肤、血浆、血清、脊髓液、淋巴液、滑液、尿、泪水、血细胞、器官和肿瘤,并且也表示从取自个体的细胞建立的体外培养物的样品,包括福尔马林固定的石蜡包埋组织(FPET)和从其分离的核酸。

[0036] 术语“基本序列”表示多核苷酸或寡核苷酸中的核苷酸的序列。核苷酸修饰诸如含氮碱基修饰、糖修饰或其它主链修饰不是基本序列的一部分。标记(诸如与寡核苷酸缀合的生色团)也不是基本序列的一部分。因而,两种寡核苷酸可以共有相同的基本序列,但是在修饰和标记方面存在差异。

[0037] 术语“引物”表示这样的寡核苷酸:其与靶核酸中的序列杂交,且能够充当沿着核酸的互补链合成(在适合于这样的合成的条件下)的起始点。本文中使用的术语“探针”表示这样的寡核苷酸:其与靶核酸中的序列杂交,且通常被可检测地标记。探针可以具有修饰(诸如3'-端修饰,其使探针不可被核酸聚合酶延伸)和一个或多个生色团。具有相同序列的寡核苷酸可以在一个测定中充当引物和在不同的测定中充当探针。

[0038] 本文中使用的术语“靶序列”、“靶核酸”或“靶标”表示要扩增、检测或扩增并检测的核酸序列部分。

[0039] 术语“杂交的”和“杂交”表示两个核酸之间的碱基配对相互作用,其导致双链体的形成。不要求2个核酸在它们的全长上具有100%互补性即可实现杂交。

[0040] 术语“选择性的杂交”和“特异性杂交”表示核酸大部分(50%或更多的杂交分子)或几乎排它地(90%或更多的杂交分子)与存在于复杂混合物中的特定核酸的杂交,所述复杂混合物中也存在其它核酸。例如,在典型的PCR条件下,引物与靶核酸特异性地杂交以排除也存在于溶液中的非靶核酸。特异性地杂交的引物会驱动靶核酸的扩增以产生靶核酸的扩增产物,所述扩增产物至少是最优势的扩增产物,且优选地是几乎排它的(例如,代表样品中的所有扩增产物的90%或更多)扩增产物。优选地,非特异性的扩增产物以不可检测的如此少的量存在,或以可与特异性扩增产物容易辨别的如此少的量检测到。类似地,探针与靶核酸特异性地杂交以排除也存在于反应混合物中的非靶核酸。特异性地杂交的探针允许靶核酸的特异性检测以产生可检测信号,所述信号至少是最优势的信号,且优选地是几乎排它的(例如,代表样品中的所有扩增产物的90%或更多)信号。

[0041] 临床和诊断应用面临的一个关键担忧是检测临床上重要的低水平突变和少数等位基因的能力。检测突变的能力在许多疾病领域中是重要的,但是特别对于从组织活组织检查和体液(诸如血浆或血清)检测早期癌症而言。检测罕见突变或等位基因在其中具有重要性的其它领域包括:关于预后的疾病分期和分子绘图,或针对个别患者的定制疗法,以及监测疾病的治疗结果和减轻/复发。癌症有关的突变的有效检测取决于采用的技术和方法的选择性。癌基因和肿瘤抑制基因突变的检测和鉴别需要分析不同类型的样品,包括癌变前的或癌性的组织、痰、尿、粪便和血液中的循环细胞外的DNA。样品通常由野生型和突变体DNA组成,且野生型DNA的量经常超过突变体DNA的量 10^1 - 10^8 或 10^9 倍,这使得这些低丰度突变的检测和鉴别极其困难。

[0042] 已经采用许多方法来检测突变。在一组方法中,聚合酶链式反应(PCR)是检测系统的一个组分。PCR能够特异性地扩增存在于大得多的数目的其它序列(例如野生型DNA)中的靶核酸序列(例如突变体DNA)。等位基因特异性的PCR(AS-PCR)是能够区分相差少至单个核苷酸的序列的方法。PCR和AS-PCR的灵敏度和特异性使得,即使在有大得多的量的非靶变

体(例如野生型)存在下,可以选择性地扩增核酸的靶变体(例如突变体)。对于许多AS-PCR测定,可以在过量的野生型DNA中检测突变体DNA,所述野生型DNA的群体比突变体DNA的群体大100-1,000倍。但是,该灵敏度水平不足以准确地检测和鉴别以 10^{-3} - 10^{-6} 个突变体:野生型DNA的比例存在的极低浓度的突变。因此,为了将突变体浓度增加至可以达到准确和精确检测的水平,富集方法的应用经常是有益的或必要的。

[0043] 在美国专利号6,031,098中,Barton等人描述了错配特异性的、基于铈的嵌入剂的2个家族的合成和功能,所述嵌入剂基于一对庞大嵌入配体5,6-二氢-2H-苯并[*a*]吩嗪-9-甲酰二胺(chrysi)和3,4-苯并[*a*]吩嗪-9-甲酰二胺(phzi)。这些分子的结构显示在图1中。在两种化合物中,空间上扩大的配体因为过大而不可容易地嵌入常规B型DNA的碱基堆叠中。但是,所述化合物能够以高亲和力结合热力学上失稳的错配位点。对于 $\text{Rh}(\text{bpy})_2(\text{chrysi})^{3+}$ 的结合亲和力是在 10^6M^{-1} 的量级,对于 $\text{Rh}(\text{bpy})_2(\text{phzi})^{3+}$ 是在 10^8M^{-1} 的量级。亲和力与错配相关失稳有关联。基于当将金属络合物插入碱基对堆叠中时挤出错配碱基的容易性,可以理解亲和力和错配稳定作用之间的关联。大多数失稳的位点最容易被金属络合物结合。在所有可能的序列背景下,化合物总计结合超过80%的错配位点。与沃森-克里克碱基配对的DNA位点相比,这些基于铈的嵌入剂表现出对错配DNA位点高1,000倍或更高的选择性。除了牢固地和选择性地结合错配以外,所述复合物会促进在光活化以后在错配位点处的直接链断裂。经证实在2kb质粒内的单个错配能够被这些嵌入剂分子结合和切割。

[0044] 本发明利用基于铈的嵌入剂的错配结合性质,并描述了较高结合亲和力化合物 $\text{Rh}(\text{bpy})_2(\text{phzi})^{3+}$ 的新颖改进形式的合成,所述形式允许将它固定化至固体支持物。这样的改进的铈螯合剂化合物的一个例子显示在图2上。通过产生这样的条件:其使得低丰度突变体DNA作为含有单碱基错配的异源双链体存在,突变体DNA可以使用固定化的(phzi)嵌入剂来捕获,并与过量的野生型DNA分离,所述野生型DNA不含有错配且不可结合(phzi)嵌入剂。然后可以对富集的突变体DNA群体进行扩增反应(例如等位基因特异性的PCR)从而进行检测。

[0045] 提供以下实施例和附图以帮助理解本发明,本发明的真实范围在所附权利要求书中阐述。

实施例

[0046] 实施例1 5,6-二氢-5,6-二氧代苯并[*a*]吩嗪-9-甲酸甲酯的合成

[0047] 将2,3-二氯萘-1,4-二酮(4.5 g, 20 mmol)、3,4-二氨基苯甲酸甲酯(3.32 g, 20 mmol)和150 mL吡啶加入250mL圆底烧瓶中,并在回流冷凝器中放置1小时。溶液显示为深赤褐色,但是没有形成任何沉淀迹象。将溶液放置过夜,以观察是否有任何沉淀物在室温形成。

[0048] 将反应物冷却过夜后,形成沉淀物,并在预称重的烧结玻璃漏斗中过滤以产生棕红色固体。将中间体用吡啶冲洗并在真空干燥器中干燥过夜。次日早晨将漏斗再次称重,并揭示5.7-g中间体已经被分离。然后对该整个量进行下述的氧化步骤。

[0049] 在氧化步骤中,将中间体置于250mL圆底烧瓶中,并在剧烈磁力搅拌下将50 mL乙酸、3.0 mL去离子水和5 mL浓硝酸以该次序小心地加入。然后将反应混合物置于沸水浴中并回流。亮黄色沉淀物在加热后开始形成。由于重沉淀物,搅拌棒变得被固定化。为了减轻该现象,加入另外10-mL冰醋酸试样。将反应混合物回流1小时,然后冷却至室温并过滤,从

而产生金黄色粉末状固体。将该产物也用各20 mL的乙醇和乙醚冲洗,并放置干燥过夜。

[0050] 实施例2合成: $[\text{Rh}(\text{bpy})_2\text{Cl}_2]\text{Cl}$

[0051] 根据Zeglis, B.M. & Barton, J.K. *Nat. Protoc.* 2007, 2, 122-134,制备 $[\text{Rh}(\text{bpy})_2\text{Cl}_2]\text{Cl}$ 。简而言之,将 RhCl_3 (0.64 g, 2.8 mmol) 和单盐酸胍 (50 mg, 7.35 mmol) 溶解在50ml圆底烧瓶中的12.5ml去离子水中。还向相同的50ml圆底烧瓶中加入通过将0.85g (5.6 mmol) 2,2'-二吡啶基溶解在20-mL乙醇中制备的、单独制备的溶液。通过重复施加真空,随后用氩气回充,除去溶解氧。这之后将反应混合物回流,直到所有物质已经溶解。回流20分钟以后,反应物变成亮橙色溶液,并用烧结玻璃过滤漏斗过滤。重要的是,趁热过滤溶液,以仅仅分离存在于溶液中的产物且拒绝任何不溶性杂质。然后将滤液在4℃储存过夜以促进结晶。

[0052] 将冷却的滤液过滤,产生黄色结晶固体。得到的 $[\text{Rh}(\text{bpy})_2\text{Cl}_2]\text{Cl}$ 的质量是780mg,并在环境温度在干燥室中储存。

[0053] 实施例3合成: $[\text{Rh}(\text{bpy})_2(\text{OTf})_2]\text{OTf}$

[0054] 将 $[\text{Rh}(\text{bpy})_2\text{Cl}_2]\text{Cl}$ (500mg, 1.0mmol) 置于具有14/20接头的3-颈圆底烧瓶中。将2个橡胶隔片放在烧瓶的左和右颈末端,并将适配器放在中央以允许盐酸清除。通过将含有的任何空气抽真空,随后用氩气填充,将烧瓶除氧。然后小心地加入三氟甲磺酸并快速地溶解 $[\text{Rh}(\text{bpy})_2\text{Cl}_2]\text{Cl}$ 成为黄色澄清溶液。因为文献将反应溶液搅拌16小时,所以将它放置过夜。

[0055] 将丙酮/干冰浴准备用于下一步,其中将300ml乙醚倒入1000ml圆底烧瓶中,装配干燥管,并在干冰浴中冷却。将反应混合物溶液倒入另一个试管中,并逐滴加入冷乙醚溶液中。随着淡黄色固体沉淀在烧瓶的底部,反应混合物呈现混浊。将沉淀的产物穿过称重的媒介物烧结玻璃漏斗过滤,并立即置于真空干燥器中,因为发现它对水分非常敏感。将所有物质(其产量为750mg)用于下一步。

[0056] 实施例4 $[\text{Rh}(\text{bpy})_2(\text{NH}_3)_2](\text{OTf})_3$ 的合成

[0057] 将在前一反应中得到的所有 $[\text{Rh}(\text{bpy})_2(\text{OTf})_2]\text{OTf}$ 置于250ml圆底烧瓶中。然后将30ml氢氧化铵加入烧瓶中并搅拌。然后将混合物回流并煮沸约15分钟,直到所有组分进入淡黄色溶液中。然后通过旋转蒸发除去多余的氢氧化铵,产生黄白色固体。将该产物(最终产量720mg)在真空干燥器中干燥过夜。

[0058] 实施例5 $[\text{Rh}(\text{bpy})_2(\text{phzi-CO}_2\text{H})](\text{Cl})_3$ 的合成

[0059] 醌配体

[0060] 5,6-二氢-5,6-二氧代苯并[a]吩嗪-9-甲酸甲酯,

[0061] 5,6-二氢-5,6-二氧代苯并[a]吩嗪-10-甲酸甲酯

[0062] 的混合物

[0063] 将500mg $[\text{Rh}(\text{bpy})_2(\text{NH}_3)_2](\text{OTf})_3$ (0.5mmol) 和198.75 mg (0.625 mmol) 如在图6中所述的醌配体在环境温度溶解在250 mL乙腈中。此后不久,将10 mL 0.4M氢氧化钠加入反应物中,并在密闭容器中搅拌3小时。观察到颜色变化,指示反应已经发生。反应混合物的LC-MS分析揭示,在碱性缀合条件下,通过甲酯中间体的原位水解而得到期望的化合物。然后通过加入增加量的0.4M盐酸将反应物中和至pH 7,直到达到中性pH。通过在环境温度旋转蒸发,除去反应物中所含的乙腈。

[0064] 得到的残余物包被烧瓶且具有棕黄色外观,然后将其溶解在少量去离子水(~25 mL)中。然后将该溶液在4℃储存过夜。在下述条件下使用半制备柱通过反相HPLC纯化粗产物。

[0065] 柱:

[0066] Waters Symmetry Shield RP8, 5um, 7.8x300mm, P/N WAT248000, L/N M90845D01

[0067] 缓冲液:

[0068] A 100 mM TEAA

[0069] B 乙腈

[0070] 流速 6 mL/min

[0071] 将柱在100%A缓冲液中平衡,并使用6 mL/min流速将整个样品量(53-mL)注射穿过泵。用100%A进一步洗涤5分钟以后,开始梯度,并收集30秒(3-mL)级分。

[0072] 通过LC-MS来分析级分,并将最纯的级分合并和低压冻干。LC-MS分析显示对于期望的产物在715的M/e处的预期亲本离子峰和与亲本铑复合物非常类似的紫外波谱。

[0073] 实施例6 [Rh(bpy)₂(phzi)(PEG₃-生物素)](Cl)₃的合成

[0074] 如在图7中所述,在剧烈磁力搅拌下将Rh(bpy)₂(phzi-COOH)Cl₃ (160 mg, 195μmol)溶解在250 mL圆底烧瓶内的20 mL DMF中。单独地将100 mg (239μmol) EZ-Link Amine-PEG3-Biotin (Thermo Scientific, product# 21347)溶解在40 mL乙腈中。注:少量物质保持不溶解。在搅拌下将EZ-Link Amine-PEG3-Biotin溶液加入烧瓶中。单独地如下制备0.5 M的TBTU [O-(苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基脲鎓四氟硼酸盐] (Alfa Aesar, 储备物编号L13470)在乙腈中的溶液:将321 mg溶解在2-mL乙腈中,并在搅拌下将其加入反应物中。使反应在室温进行30分钟,并通过取等分试样和经LC-MS分析来监测进程。该分析清楚地表明,所有起始材料已经耗尽,并且主要反应产物似乎为期望的靶分子[Rh(bpy)₂(phzi)(PEG₃-生物素)](Cl)₃ (图2)。另外,也观察到接近地洗脱的次要副产物。将反应物搅拌90分钟。在此时注意到一些不溶物,并将反应混合物穿过有沟的滤纸过滤。将滤液用去离子水稀释至500 mL,并再次穿过0.45微米过滤器过滤。将该物质储存在冰箱中,直到需要用于如下所述通过反相HPLC纯化。

[0075] LC-MS分析

[0076] 使用C-8反相柱和历时20分钟的15-30%的乙腈在10 mM TEAA中的线性梯度,通过LC-MS分析上述的反应物。

[0077] 纯化

[0078] 如下所述开发了基于制备型反相HPLC的方法。

[0079] 柱:

[0080] Waters Symmetry Shield RP8, 5um, 7.8x300mm, P/N WAT248000, L/N M90845D01

[0081] 缓冲液:

[0082] A 100 mM TEAA

[0083] B 乙腈

[0084] 流速 3 mL/min

[0085] 将柱在100%A缓冲液中平衡,并使用4 mL/min流速将1/5 (100-mL)的粗产物注射穿过泵。用100%A进一步洗涤5分钟以后,开始梯度,并收集60秒(3-mL)级分。

[0086] 通过LC-MS来分析级分,并将最纯的级分合并和低压冻干。

[0087] 实施例7 使用铈螯合剂对错配DNA的光切割

[0088] 指定测定用于试验铈螯合剂在仅用含有错配位点的DNA双链体光活化以后的嵌入和促进链断裂的能力。合成了具有以下特征的与荧光染料连接的寡核苷酸,其跨人表皮生长因子受体(EGFR)基因的T790M点突变。将在氨基酸位置790处具有“C”等位基因的野生型基因的有义链的寡核苷酸与FAM荧光团连接(WT-S-FAM)。将野生型基因(具有“G”残基)的反义链的互补寡核苷酸与JA270荧光团连接(WT-AS-JA270)。将具有“T”等位基因的T790M突变基因的有义链的寡核苷酸与HEX荧光团连接(M-S-HEX)。将T790M突变基因(具有“A”残基)的反义链的互补寡核苷酸与Cy5.5荧光团连接(M-AS-Cy5.5)。在野生型寡核苷酸之间和在突变体寡核苷酸之间产生的双链体是完美匹配的,而在一个野生型寡核苷酸和一个突变体寡核苷酸之间产生的双链体携带在点突变位点处的错配。例如,在WT-S-FAM寡核苷酸和M-AS-Cy5.5寡核苷酸之间的双链体含有C:A错配,其可以被铈螯合剂识别和在光活化后切割。

[0089] 进行一个实验,其中将10 μM 的亲本铈螯合剂 $\text{Rh}(\text{bpy})_2(\text{phzi})^{3+}$ (图1)或根据实施例5中的方案合成的羧基中间体铈螯合剂 $\text{Rh}(\text{bpy})_2(\text{phzi}-\text{CO}_2\text{H})^{3+}$ 与2 μM 由M-S-HEX和M-AS-Cy5.5组成的寡核苷酸对一起温育以产生完美匹配的突变双链体,或与2 μM 由WT-S-FAM和M-AS-Cy5.5组成的寡核苷酸对一起温育以产生C:A错配双链体。温育以后,使用UV Stratalinker™ 1800 (Stratagene)在365nm波长照射溶液在0分钟至60分钟范围内的时间量,并使用Waters UPLC柱和荧光检测器分析切割的存在与否。实验结果显示在图3上。两种铈螯合剂表明在完美匹配的突变双链体(M-PM柱)中没有发生切割。相反,在C:A错配双链体中观察到有效切割,完整的寡核苷酸峰消失,且在紫外光照射以后出现切割的寡核苷酸峰。当将螯合剂与野生型完美匹配的寡核苷酸双链体一起温育时,观察到类似的结果,尽管羧基中间体铈螯合剂表现出微小量的非特异性的切割(数据未显示)。

[0090] 实施例8 铈螯合剂的对比

[0091] 使用与在实施例7中所述相同的条件进行一个实验,以对比亲本铈螯合剂 $\text{Rh}(\text{bpy})_2(\text{phzi})^{3+}$ 、羧基中间体螯合剂 $\text{Rh}(\text{bpy})_2(\text{phzi}-\text{CO}_2\text{H})^{3+}$ 和生物素结合的铈螯合剂 $\text{Rh}(\text{bpy})_2(\text{phzi})(\text{PEG}_3\text{-生物素})^{3+}$ 在切割含有C:A错配的寡核苷酸双链体中的性能。将2 μM C:A错配双链体与10 μM 铈螯合剂一起温育,然后光活化0、15、30、45和60分钟。该实验的结果显示在图4上。生物素结合的铈螯合剂显示紫外光照射60分钟以后双链体的大约60%切割,与此相比,其它两种铈螯合剂显示90-98%切割。

[0092] 接着,研究了使用不同螯合剂浓度时生物素结合的铈螯合剂的切割活性,并与在相同浓度范围内的亲本铈螯合剂的切割活性进行对比。结果显示在图5上。在5 μM 和10 μM 浓度,亲本铈螯合剂显示比生物素结合的铈螯合剂更大的切割效率。但是,在15 μM 以上的浓度,亲本螯合剂显示不一致的切割效率,而生物素结合的铈螯合剂在这些较高浓度表现出有效切割,在紫外光照射60分钟以后在25 μM 的浓度观察到超过90%切割。

[0093] 实施例9 使用 $\text{Rh}(\text{bpy})_2(\text{phzi})(\text{PEG}_3\text{-生物素})^{3+}$ 对突变体DNA的富集和检测

[0094] 提供样品,从其中可以提取核酸混合物,例如,人基因组DNA。所述样品可以来自组织诸如皮肤、器官和肿瘤,或来自流体诸如血液、血浆、血清、尿,或来自含有或推测含有核

酸的任何组合物。从该核酸混合物,感兴趣的靶基因,例如,人EGFR基因,可以含有某个变异诸如点突变,其以低丰度存在于所述基因的大量过量的另一变体(其可以是非突变型或野生型基因)中。

[0095] 为了富集靶基因的低丰度突变体等位基因,将过量的与靶基因的野生型等位基因的链(例如有义链或链S)之一互补且完美匹配的寡核苷酸(寡聚C)加入含有提取的基因组DNA的溶液中。然后将该溶液在90℃或更高的温度加热以变性双链基因组DNA,然后逐渐冷却至允许发生单DNA链的重退火的温度。在退火步骤中,一些链S:寡聚C双链体可以形成,其中野生型DNA-链S:寡聚C杂合物将是完美匹配的,但是突变体DNA-链S:寡聚C双链体将具有在点突变位置处的错配。

[0096] 然后将生物素结合的铈螯合剂Rh(bpy)₂(phzi)(PEG3-生物素)³⁺加入溶液中并进行温育,使得所述螯合剂可以在错配位置处结合突变体DNA-链S:寡聚C双链体。接着,加入涂有抗生蛋白链菌素的固体基质。这样的固体基质的例子可以是抗生蛋白链菌素包被的磁性颗粒诸如得自Invitrogen的抗生蛋白链菌素偶联的Dynabeads®、得自Promega的Streptavidin MagneSphere®顺磁颗粒、和得自Solulink的NanoLink™和MagnaLink™抗生蛋白链菌素磁珠。温育(例如在40℃保持1小时)以后,使用磁体分离颗粒并洗掉所有没有结合颗粒的核酸,其包括野生型DNA和多余的寡聚C。然后使用适当的洗脱缓冲液从磁性颗粒洗脱结合的突变体DNA-链S,且然后可以充当用在扩增反应中的模板。使用EGFR基因作为一个例子,使用等位基因特异性的引物和TaqMan®探针,在公开于美国专利申请系列号13/324,705中的实时PCR条件下,可以扩增各种突变体EGFR等位基因。

[0097] 在富集靶基因的低丰度突变体等位基因的一种替代方法中,在足以使核酸混合物变性为单链分子的高温(例如95℃)加热样品。然后将温度降低以允许每个单链与它的互补链再退火。使所有的或几乎所有的携带突变体等位基因的单链与含有野生型等位基因的互补链退火以形成突变体:野生型错配双链体。然后将生物素结合的铈螯合剂Rh(bpy)₂(phzi)(PEG3-生物素)³⁺加入溶液中并进行温育,使得所述螯合剂可以特异性地结合错配双链体。如上所述进行实验的其它部分,从而产生富集的突变体DNA群体,其可以用在扩增反应中进行检测。

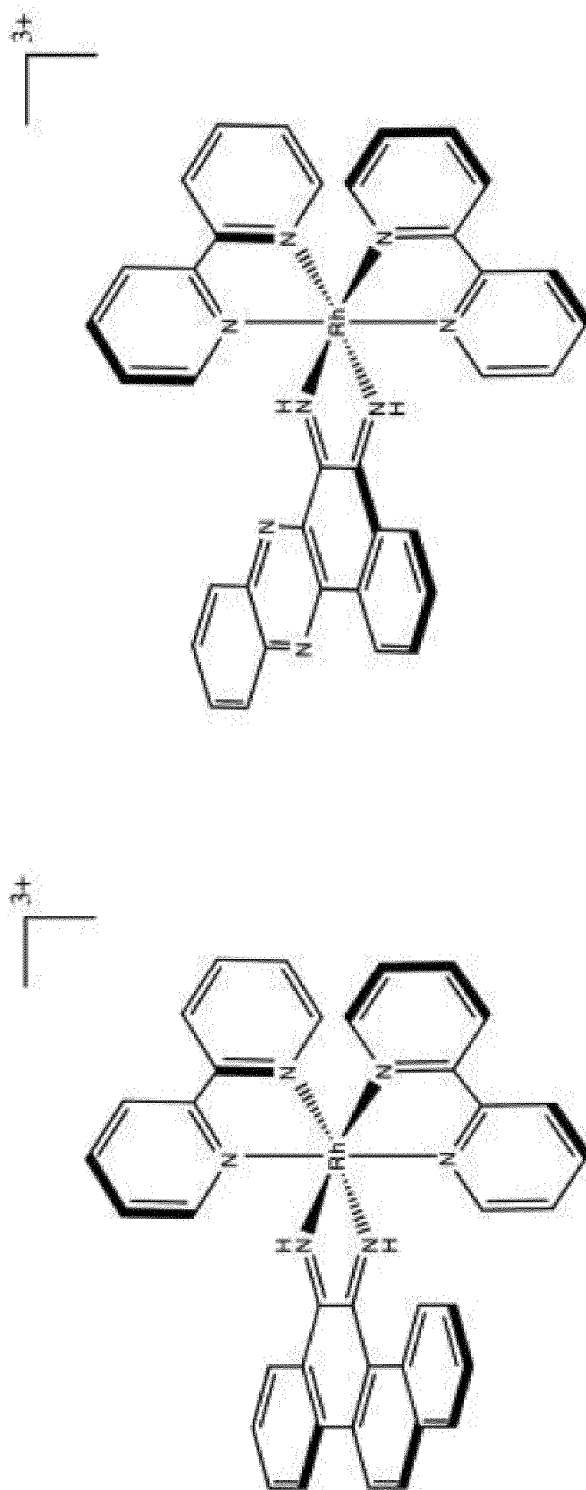


图 1

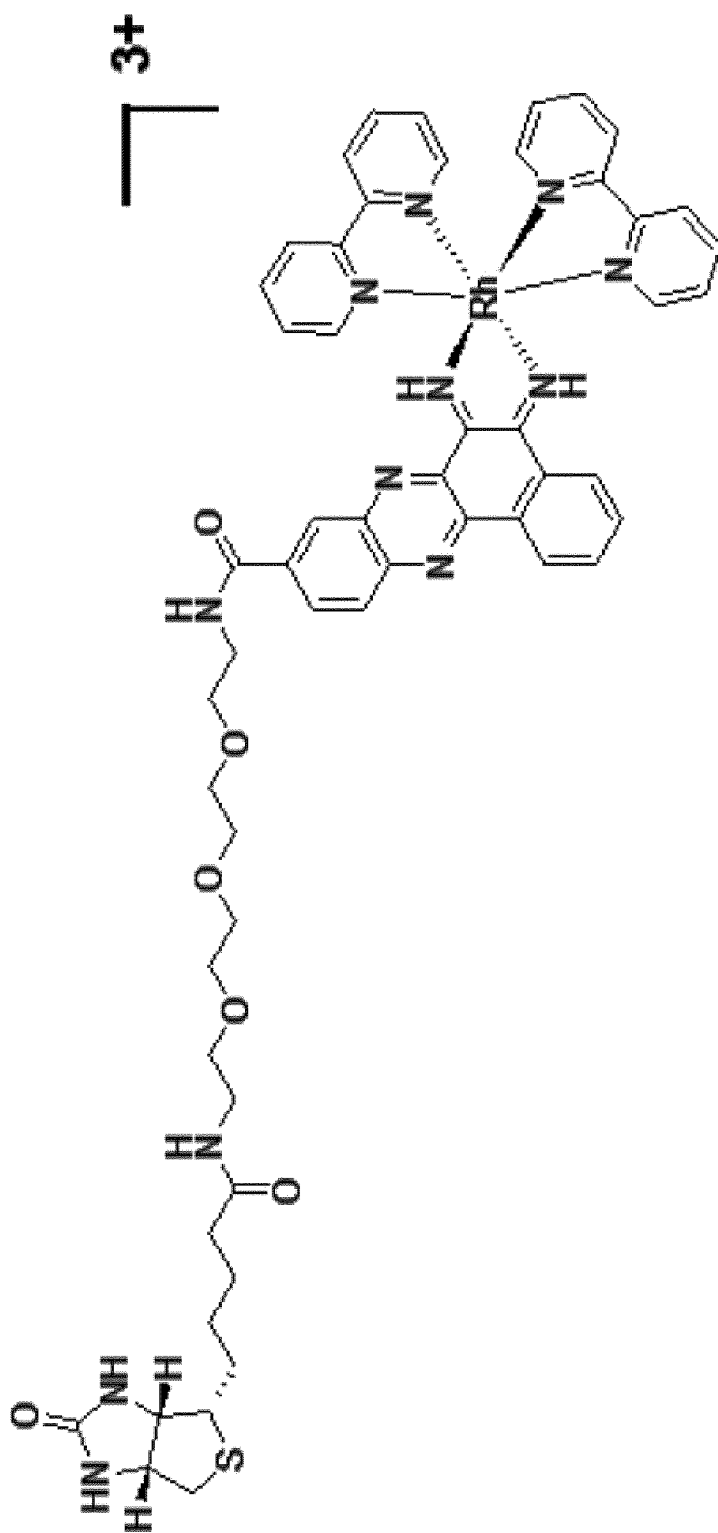


图 2

UPLC切割分析

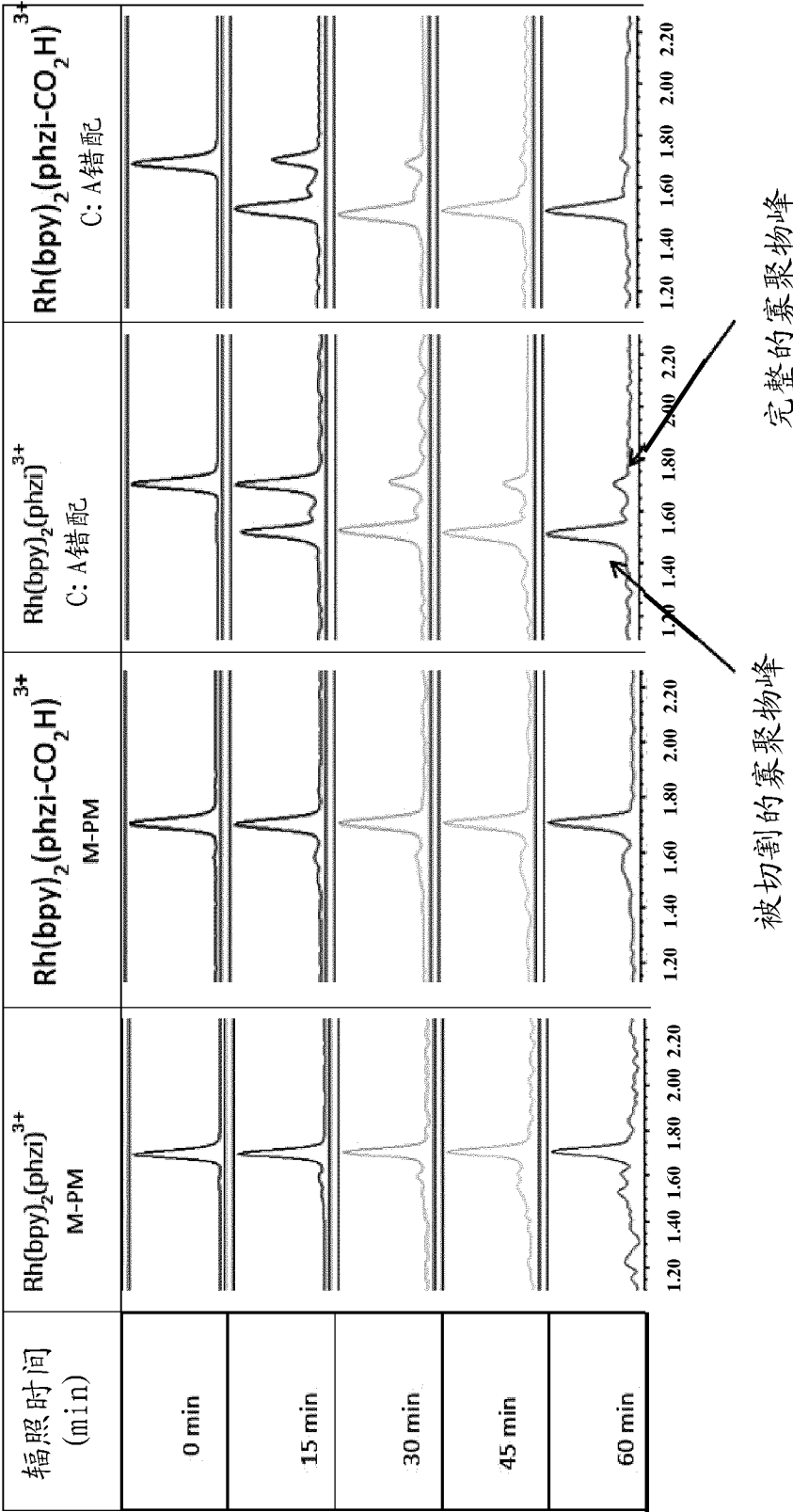


图 3

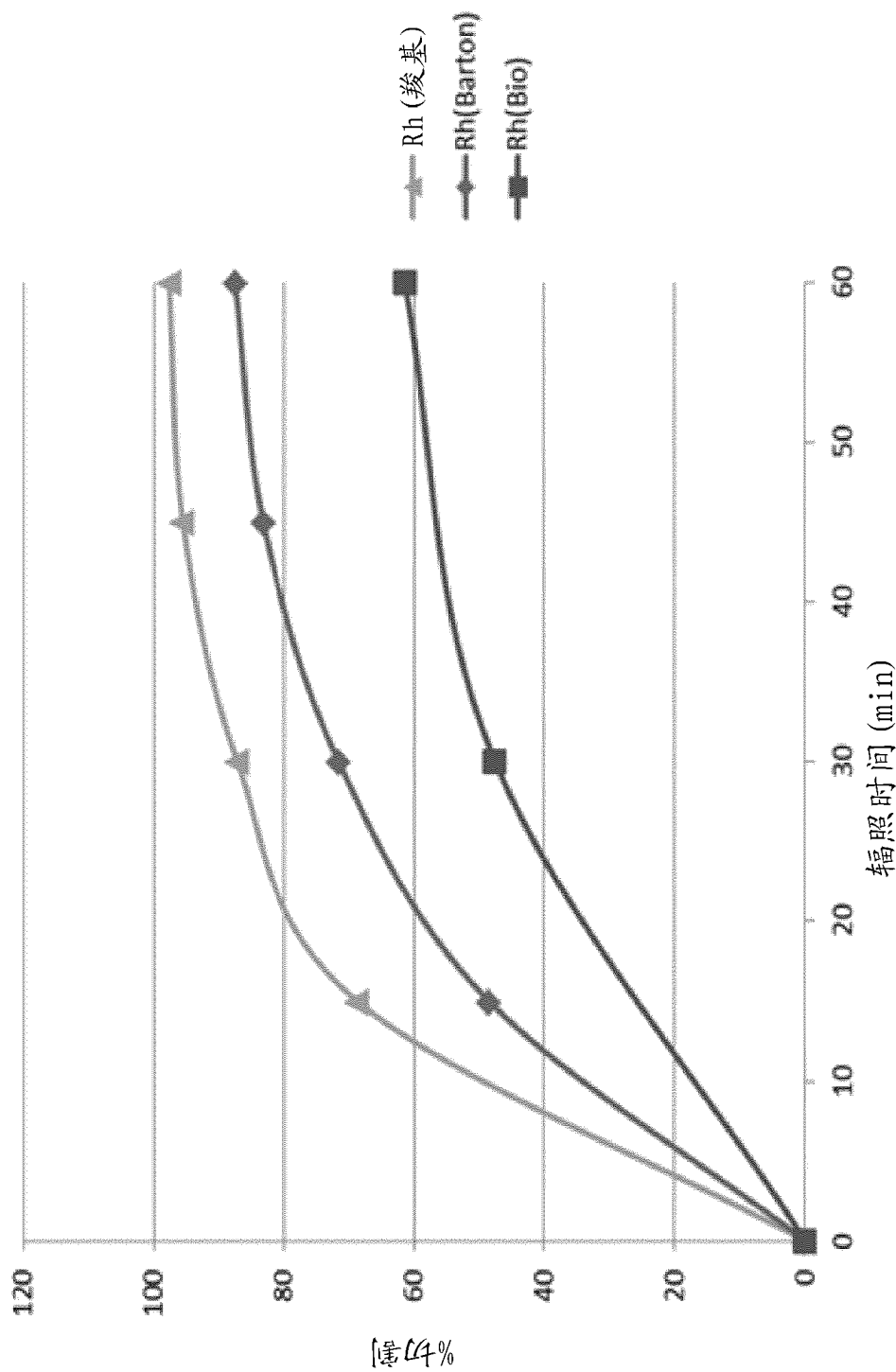


图 4

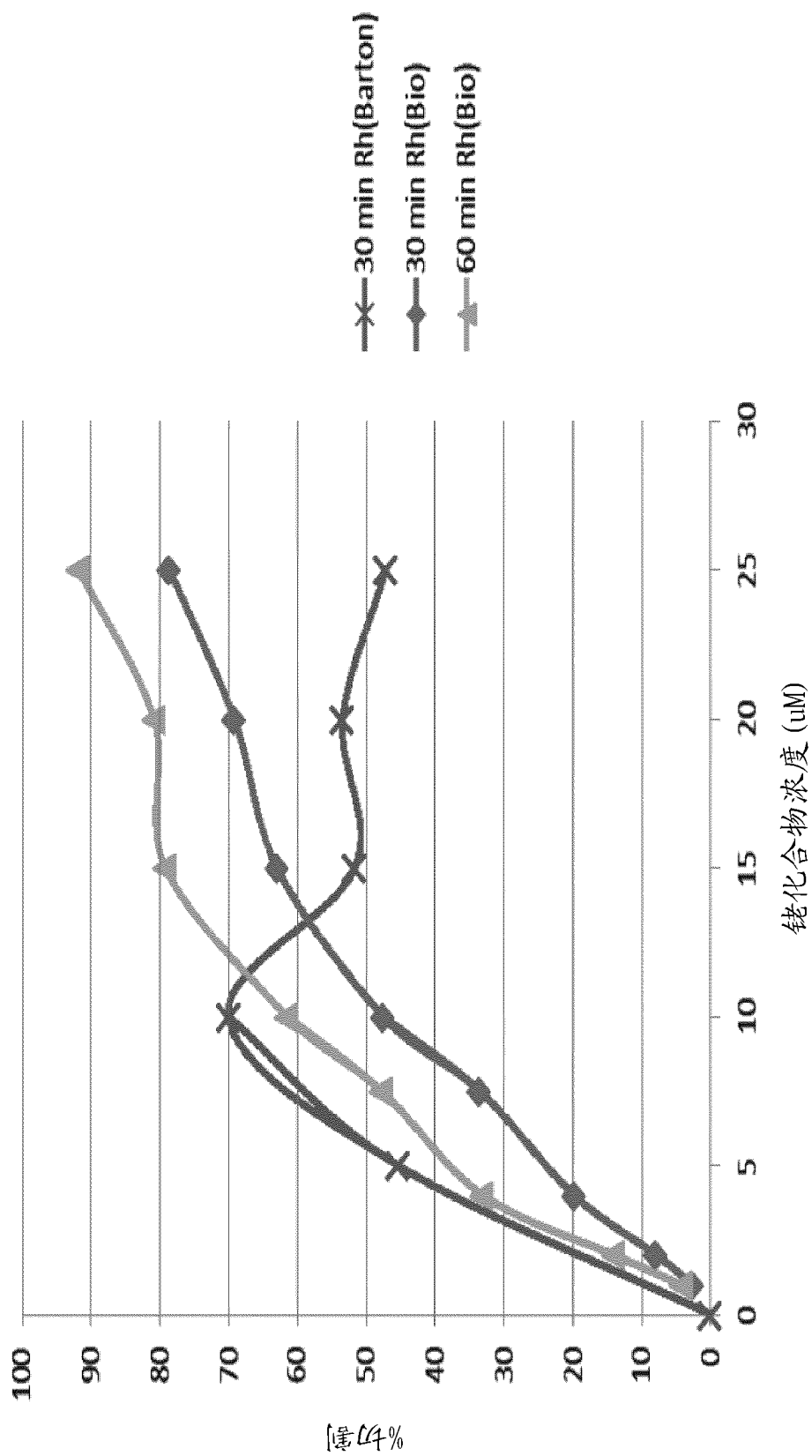


图 5

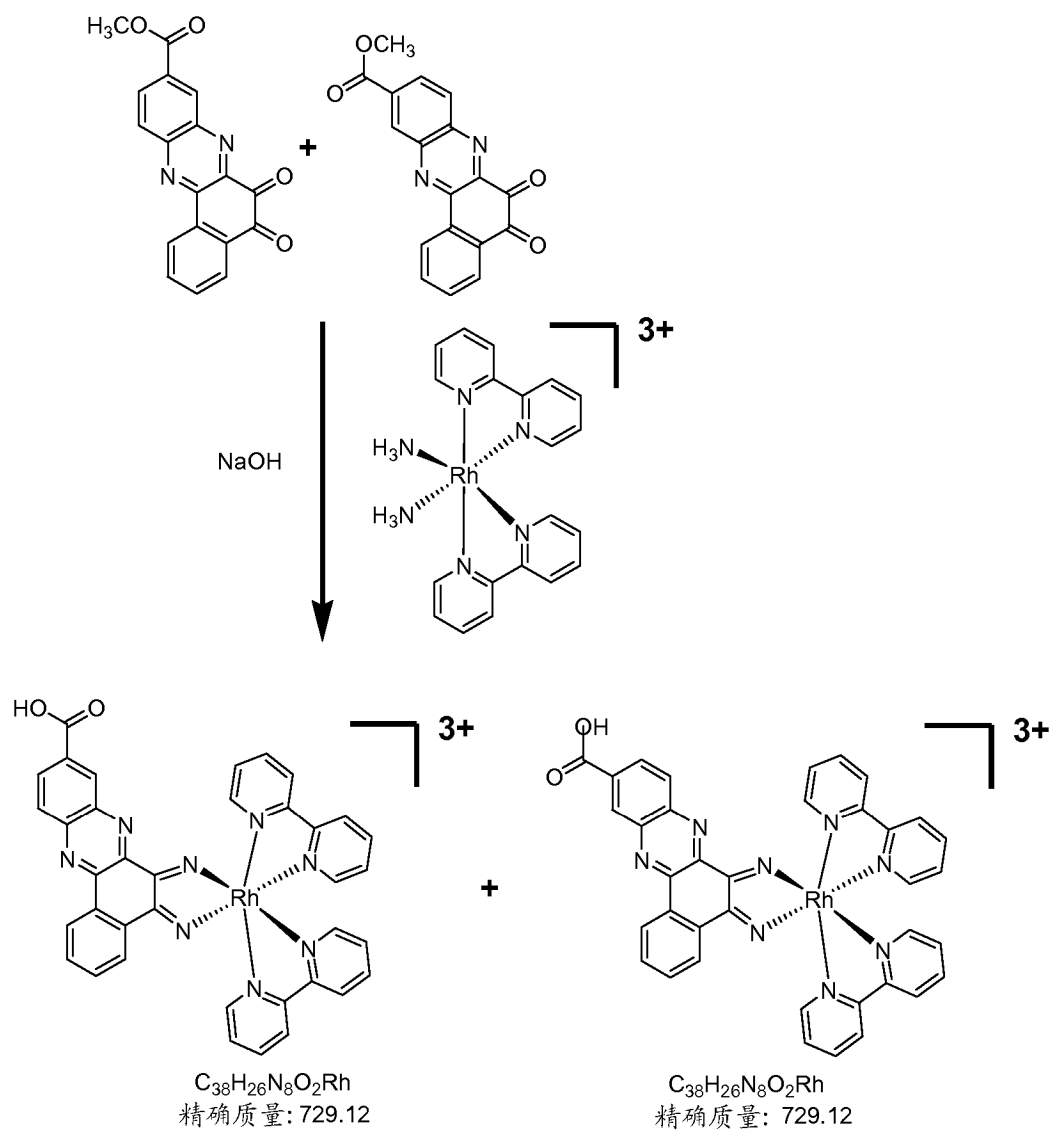


图 6

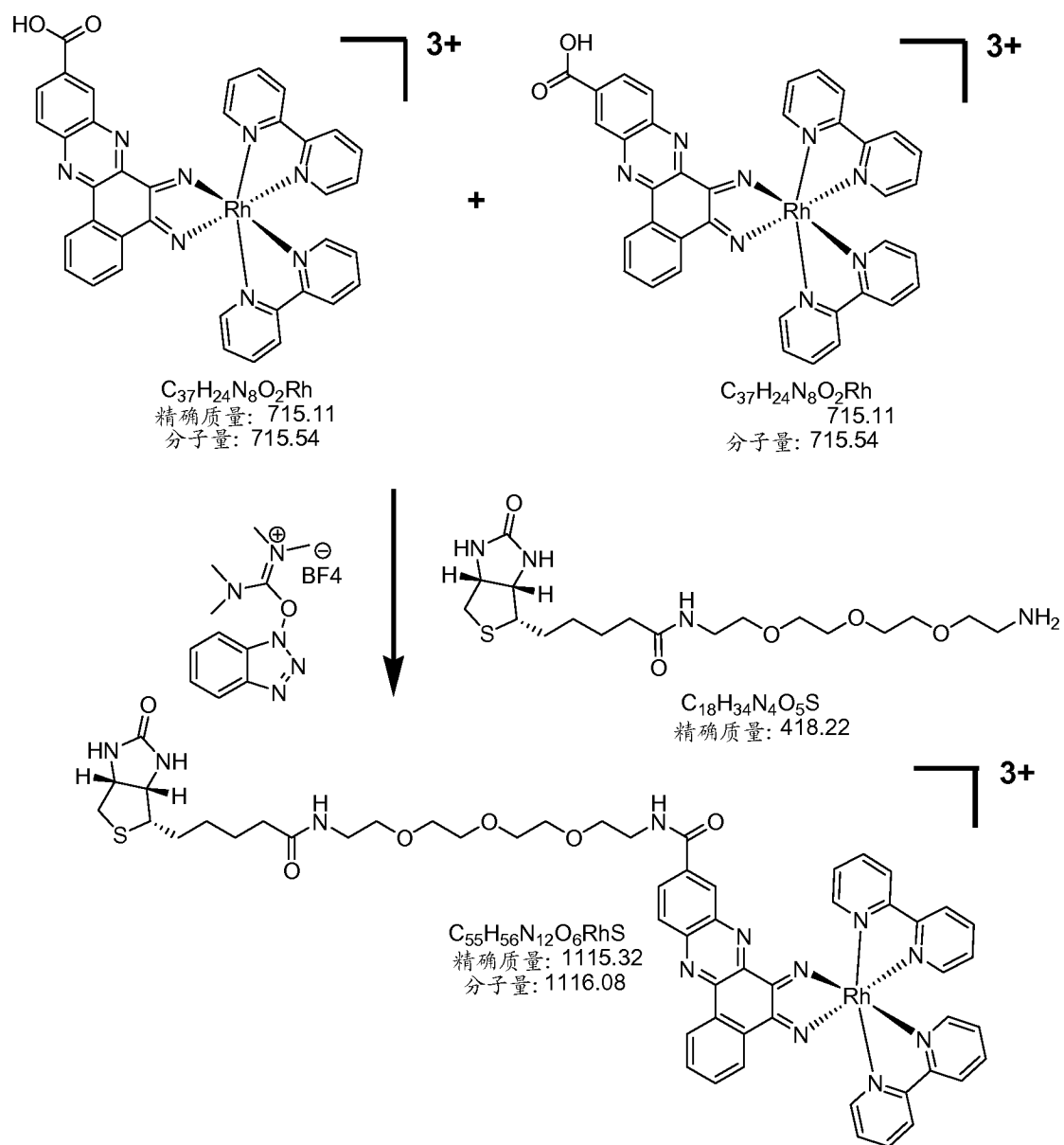


图 7