(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 115210385 A
(43)申请公布日 2022.10.18

(21)申请号 202180018443.1

(22)申请日 2021.01.07

(30)优先权数据
62/958,599 2020.01.08 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2022.09.01

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2021/012541 2021.01.07

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2021/142153 EN 2021.07.15

(71)申请人 博锑生技股份有限公司
地址 中国台湾台北市

(72)发明人 曹汀 黄勤修 胡贤彬 张斐钰 谢依玲

(74)专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494
专利代理师 封新琴

(51)Int.Cl.
C12Q 1/6886(2006.01)

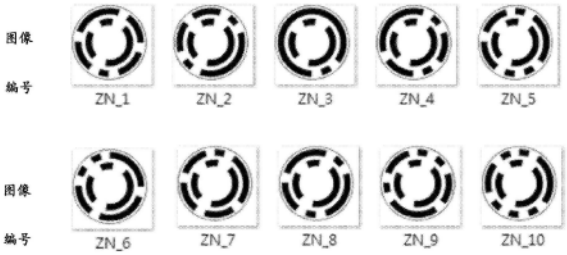
权利要求书42页 说明书145页
序列表176页 附图19页

(54)发明名称

用于检测肺癌中的DNA突变的图像区分多重测定

(57)摘要

本文提供了用于检测与癌症(例如,肺癌)相关的DNA和/或RNA突变的存在的方法和试剂盒。所述方法和试剂盒采用微载体,每种微载体都具有对DNA或RNA突变具有特异性的探针和探针序列独特的标识符。在从样品中分离并扩增核酸后,扩增的DNA与对DNA或RNA突变具有特异性的、与微载体偶联的探针的杂交表明样品中存在突变。由于可以通过检测标识符来鉴定每种微载体,因此提供了多重筛查测定。可以筛查突变的代表性基因包括例如针对DNA突变的KRAS、NRAS、PIK3CA、BRAF、EGFR、AKT1、MEK1和HER2和/或针对RNA突变的ALK、ROS、RET、NTRK1和cMET。



CN 115210385 A

1.一种用于检测KRAS、NRAS、PIK3CA、BRAF、EGFR、AKT1、MEK1和HER2基因中的突变的存在的方法,所述方法包括:

(a)从样品中分离DNA;

(b)使用对所述KRAS、NRAS、PIK3CA、BRAF、EGFR、AKT1、MEK1和HER2基因中的每一个中的一种或多种DNA突变的基因座具有特异性的引物对,通过聚合酶链反应(PCR)扩增所述分离的DNA;

(c)将所述扩增的DNA与至少七种探针杂交,所述至少七种探针包括对所述KRAS、NRAS、PIK3CA、BRAF、EGFR、AKT1、MEK1和HER2基因中的每一个中的DNA突变具有特异性的一种或多种探针,其中所述至少七种探针中的每一种与微载体偶联,并且其中所述微载体中的每一种包含对应于与其偶联的所述探针的标识符;

(d)检测所述扩增的DNA与所述至少七种探针的杂交存在或不存在,其中所述扩增的DNA与所述探针之一的杂交表明对应于所述探针的所述DNA突变的存在;

(e)检测所述微载体的标识符;和

(f)将所述微载体的检测到的标识符与检测到的所述扩增的DNA与所述微载体的对应探针的杂交存在或不存在相关联。

2.如权利要求1所述的方法,其中所述KRAS、NRAS、PIK3CA、BRAF、EGFR、AKT1、MEK1和HER2基因是人基因。

3.如权利要求1或2所述的方法,其中步骤(b)包括在至少七种阻断核酸的存在下通过PCR扩增所述分离的DNA,其中所述至少七种阻断核酸中的每一种与对应于所述KRAS、PIK3CA、BRAF、EGFR、AKT1、MEK1或HER2基因中的DNA突变之一的野生型DNA基因座杂交并且防止所述野生型DNA基因座的扩增。

4.如权利要求3所述的方法,其中所述至少七种阻断核酸中的每一种包含:

与所述对应的野生型DNA基因座杂交的单链寡核苷酸;和

阻断从所述单链寡核苷酸延伸的3'末端部分。

5.如权利要求4所述的方法,其中所述3'末端部分包含一个或多个反向脱氧胸苷。

6.如权利要求3-5中任一项所述的方法,其中所述至少七种阻断核酸中的每一种都包含一种或多种选自由以下组成的组的经修饰的核苷酸:锁核酸(LNA)、肽核酸(PNA)、己糖核酸(HNA)、苏糖核酸(TNA)、乙二醇核酸(GNA)和环己烯基核酸(CeNA)。

7.如权利要求2-6中任一项所述的方法,其中所述KRAS基因中的所述一种或多种DNA突变包括一种或多种编码G12D、G12V或G12C突变的KRAS蛋白的DNA突变。

8.如权利要求7所述的方法,其中所述KRAS基因中的所述一种或多种DNA突变包括编码G12D、G12V和G12C突变的KRAS蛋白的DNA突变。

9.如权利要求8所述的方法,其中对所述KRAS基因中的一种或多种DNA突变具有特异性的探针包括:

(1)第一探针,其包含选自由以下组成的组的序列:TAGTTGGAGCT(SEQ ID NO:38)、TGTGGTAGTTG(SEQ ID NO:40)、TGATGGCGTAG(SEQ ID NO:42)、TGGAGCTGATGGC(SEQ ID NO:44)和GCGTAGGCAAG(SEQ ID NO:46);

(2)第二探针,其包含选自由以下组成的组的序列:CTGTTGGCGTAGG(SEQ ID NO:48)、GTAGTTGGAGCTG(SEQ ID NO:50)、TGGAGCTGTTGGC(SEQ ID NO:52)、TTGTGGTAGTTGG(SEQ ID

NO:54)和GGCGTAGGCAAGA(SEQ ID NO:56);和

(3)第三探针,其包含选自由以下组成的组的序列:TAGTTGGAGCTT(SEQ ID NO:58)、GCGTAGGCAAGA(SEQ ID NO:60)、GGAGCTTGTGGC(SEQ ID NO:62)、TTGTGGCGTAGG(SEQ ID NO:64)和TGTGGTAGTTGG(SEQ ID NO:66);

其中所述三种探针中的每一种都与具有不同标识符的微载体偶联。

10.如权利要求9所述的方法,其中所述三种探针中的每一种还包含5'端处的八个核苷酸,并且其中所述5'端处的所述八个核苷酸是腺嘌呤或胸腺嘧啶核苷酸。

11.如权利要求10所述的方法,其中所述对所述KRAS基因中的一种或多种DNA突变具有特异性的探针包括:

(1)第一探针,其包含选自由以下组成的组的序列:TTTTTTTTTTTTAATAGTTGGAGCT(SEQ ID NO:39)、TTTTTTTTTTTTAATGTGGTAGTTG(SEQ ID NO:41)、TTTTTTTTTTTTAATGATGGCGTAG(SEQ ID NO:43)、TTTTTTTTTTTATGGAGCTGATGGC(SEQ ID NO:45)和TTTTTTTTTTTTAAGCGTAGGCAAG(SEQ ID NO:47);

(2)第二探针,其包含选自由以下组成的组的序列:TTTTTTTTTTTACTGTTGGCGTAGG(SEQ ID NO:49)、TTTTTTTTTTTAGTAGTTGGAGCTG(SEQ ID NO:51)、TTTTTTTTTTTATGGAGCTGTTGGC(SEQ ID NO:53)、TTTTTTTTTTTTATTGTGGTAGTTGG(SEQ ID NO:55)和TTTTTTTTTTTAGGCGTAGGCAAGA(SEQ ID NO:57);和

(3)第三探针,其包含选自由以下组成的组的序列:TTTTTTTTTTTAATAGTTGGAGCTT(SEQ ID NO:59)、TTTTTTTTTTTAAGCGTAGGCAAGA(SEQ ID NO:61)、TTTTTTTTTTTAAGGAGCTTGTGGC(SEQ ID NO:63)、TTTTTTTTTTTTAATTGTGGCGTAGG(SEQ ID NO:65)和TTTTTTTTTTTAATGTGGTAGTTGG(SEQ ID NO:67);

其中所述三种探针中的每一种都与具有不同标识符的微载体偶联。

12.如权利要求7-11中任一项所述的方法,其中步骤(b)包括使用包含序列GTACTGGTGGAGTATTTGATAGTG(SEQ ID NO:1)和CGTCAAGGCACTCTTGCCTAC(SEQ ID NO:2)的引物对通过PCR扩增所述分离的DNA。

13.如权利要求7-12中任一项所述的方法,其中步骤(b)包括在与对应于所述KRASDNA突变之一的野生型KRASDNA基因座杂交并且防止所述野生型KRASDNA基因座扩增的阻断核酸的存在下通过PCR扩增所述分离的DNA,并且其中所述阻断核酸包含序列TACGCCACCAGCT(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:281);TTGGAGCTGGTGGCGTA(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:282);GCTGGTGGCGTAGGCA(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:283);GCTGGTGGCGTAGGC(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:284);或TTGGAGCTGGTGGCGT(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:285);斜体的核酸表示锁核酸。

14.如权利要求2-13中任一项所述的方法,其中所述PIK3CA基因中的所述一种或多种DNA突变包括一种或多种编码E542K或E545K突变的PIK3CA蛋白的DNA突变。

15.如权利要求14所述的方法,其中所述PIK3CA基因中的所述一种或多种DNA突变包括编码E542K和E545K突变的PIK3CA蛋白的DNA突变。

16.如权利要求15所述的方法,其中对所述PIK3CA基因中的一种或多种DNA突变具有特异性的探针包括:

(1)第一探针,其包含选自由以下组成的组的序列:GCTCAGTGATTTTAG(SEQ ID NO:87)、

TGCTCAGTGATTTT(SEQ ID NO:89)、GCTCAGTGATTTTAG(SEQ ID NO:91)、CCTGCTCAGTGATTTTA(SEQ ID NO:93)和CTCAGTGATTTTAGA(SEQ ID NO:95);和

(2)第二探针,其包含选自由以下组成的组的序列:TTCTCCTGCTTA(SEQ ID NO:97)、CTCCTGCTTAGT(SEQ ID NO:99)、TCTCCTGCTTAG(SEQ ID NO:101)、TCCTGCTTAGTG(SEQ ID NO:103)和CTCCTGCTTAGTGA(SEQ ID NO:105);

其中所述两种探针中的每一种都与具有不同标识符的微载体偶联。

17.如权利要求16所述的方法,其中所述两种探针中的每一种还包含5'端处的八个核苷酸,并且其中所述5'端处的所述八个核苷酸是腺嘌呤或胸腺嘧啶核苷酸。

18.如权利要求17所述的方法,其中所述对所述PIK3CA基因中的一种或多种DNA突变具有特异性的探针包括:

(1)第一探针,其包含选自由以下组成的组的序列:TTTTTTTTTAGCTCAGTGATTTTAG(SEQ ID NO:88)、TTTTTTTTTTGCTCAGTGATTTT(SEQ ID NO:90)、TTTTTTTTTAGCTCAGTGATTTTAG(SEQ ID NO:92)、TTTTTTTCCTGCTCAGTGATTTTA(SEQ ID NO:94)和TTTTTTTTTTTTCTCAGTGATTTTAGA(SEQ ID NO:96);和

(2)第二探针,其包含选自由以下组成的组的序列:TTTTTTTTTTTTTCTCCTGCTTA(SEQ ID NO:98)、TTTTTTTTTTTTTCTCCTGCTTAGT(SEQ ID NO:100)、TTTTTTTTTTTTATCTCCTGCTTAG(SEQ ID NO:102)、TTTTTTTTTTTTTTTTCCTGCTTAGTG(SEQ ID NO:104)和TTTTTTTTTTTTTCTCCTGCTTAGTGA(SEQ ID NO:106);

其中所述三种探针中的每一种都与具有不同标识符的微载体偶联。

19.如权利要求14-18中任一项所述的方法,其中步骤(b)包括使用包含序列CAATTTCTACAAGAGATCCTCTCTCT(SEQ ID NO:5)和CTCCATTTTAGCACTTACCTGTGAC(SEQ ID NO:6)的引物对通过PCR扩增所述分离的DNA。

20.如权利要求14-19中任一项所述的方法,其中步骤(b)包括在与对应于所述PIK3CA DNA突变之一的野生型PIK3CA DNA基因座杂交并且防止所述野生型PIK3CA DNA基因座扩增的阻断核酸的存在下通过PCR扩增所述分离的DNA,并且其中所述至少七种阻断核酸中的至少一种包含序列CTGAAATCACTGAGCAGG(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:291);TCTCTGAAATCACTGAGCAGG(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:292);TCTCTGAAATCACTGAGCAGG(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:293);TCTCTGAAATCACTGAGCAGG(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:294);或TCTCTGAATTCACTGAGCAGG(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:295);斜体的核酸表示锁核酸。

21.如权利要求2-20中任一项所述的方法,其中所述PIK3CA基因中的所述一种或多种DNA突变包括编码H1047R突变的PIK3CA蛋白的DNA突变。

22.如权利要求21所述的方法,其中所述对所述PIK3CA基因中的一种或多种DNA突变具有特异性的探针包括:

(1)第一探针,其包含选自由以下组成的组的序列:GATGCACGTCATG(SEQ ID NO:107)、TGAATGATGCACG(SEQ ID NO:109)、TGATGCACGTC(SEQ ID NO:111)、AATGATGCACGTCA(SEQ ID NO:113)和AATGATGCACGTC(SEQ ID NO:115);

其中所述第一探针与具有标识符的微载体偶联。

23.如权利要求22所述的方法,其中所述第一探针还包含5'端处的八个核苷酸,并且其中所述5'端处的所述八个核苷酸是腺嘌呤或胸腺嘧啶核苷酸。

24.如权利要求23所述的方法,其中所述对所述PIK3CA基因中的一种或多种DNA突变具有特异性的探针包括:

(1)第一探针,其包含选自由以下组成的组的序列:TTTTTTTTTTTTTTGATGCACGTCATG(SEQ ID NO:108)、TTTTTTTTTTTGAATGATGCACG(SEQ ID NO:110)、TTTTTTTTTTTTGATGCACGTC(SEQ ID NO:112)、TTTTTTTTTTTAATGATGCACGTCA(SEQ ID NO:114)和TTTTTTTTTTTAATGATGCACGTC(SEQ ID NO:116);

其中所述第一探针与具有标识符的微载体偶联。

25.如权利要求21-24中任一项所述的方法,其中步骤(b)包括使用包含序列ACCCTAGCCTTAGATAAAACTGAGC(SEQ ID NO:7)和TTTGTTGTCCAGCCACCATGA(SEQ ID NO:8)的引物对通过PCR扩增所述分离的DNA。

26.如权利要求21-25中任一项所述的方法,其中步骤(b)包括在与对应于所述PIK3CA DNA突变之一的野生型PIK3CA DNA基因座杂交并且防止所述野生型PIK3CA DNA基因座扩增的阻断核酸的存在下通过PCR扩增所述分离的DNA,并且其中所述至少七种阻断核酸中的至少一种包含序列CACCATGATGTGCAT(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:296);CCACCATGATGTGCAT(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:297);CACCATGATGTGCAT(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:298);CCACCATGATGTGCATCA(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:299);或CATGATGTGCA(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:300);斜体的核酸表示锁核酸。

27.如权利要求2-26中任一项所述的方法,其中所述BRAF基因中的所述一种或多种DNA突变包括一种或多种编码V600E突变的BRAF蛋白的DNA突变。

28.如权利要求27所述的方法,其中对所述BRAF基因中的一种或多种DNA突变具有特异性的探针包含选自由以下组成的组的序列:TTTGGTCTAGCTACAGA(SEQ ID NO:79)、CTACAGAGAAATCTCGA(SEQ ID NO:81)、GTGATTTTGGTCTAGCT(SEQ ID NO:83)和TCTAGCTACAGAGAAAT(SEQ ID NO:85)。

29.如权利要求28所述的方法,其中所述对所述BRAF基因中的一种或多种DNA突变具有特异性的探针还包含5'端处的八个核苷酸,并且其中所述5'端处的所述八个核苷酸是腺嘌呤或胸腺嘧啶核苷酸。

30.如权利要求29所述的方法,其中所述对所述BRAF基因中的一种或多种DNA突变具有特异性的探针包含选自由以下组成的组的序列:TTTTTTAATTGAGAAATCTCGATGGAG(SEQ ID NO:78)、TTTTTTAATTTTTGGTCTAGCTACAGA(SEQ ID NO:80)、TTTTTTAATTCTACAGAGAAATCTCGA(SEQ ID NO:82)、TTTTTTAATTGTGATTTTGGTCTAGCT(SEQ ID NO:84)和TTTTTTAATTTCTAGCTACAGAGAAAT(SEQ ID NO:86)。

31.如权利要求27-30中任一项所述的方法,其中步骤(b)包括使用包含序列ATAGCCTCAATTCTTACCATCCACAAAATG(SEQ ID NO:9)和CAGATATATTTCTTCATGAAGACCTCACAGTAA(SEQ ID NO:10)的引物对通过PCR扩增所述分离的DNA。

32.如权利要求27-31中任一项所述的方法,其中步骤(b)包括在与对应于所述BRAF DNA突变的野生型BRAF DNA基因座杂交并且防止所述野生型BRAF DNA基因座扩增的阻断核

酸的存在下通过PCR扩增所述分离的DNA,并且其中所述至少七种阻断核酸中的至少一种包含序列GAGATTTCACTGTAGC(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:301);GAGATTTCACTGTAGC(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:302);GAGATTTCACTGTAGC(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:303);GAGATTTCACTGTAGC(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:304);或GAGATTTCACTGTAGC(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:305);斜体的核酸表示锁核酸。

33.如权利要求2-32中任一项所述的方法,其中所述EGFR基因中的所述一种或多种DNA突变包括一种或多种编码G719A突变的EGFR蛋白的DNA突变。

34.如权利要求33所述的方法,其中对所述EGFR基因中的一种或多种DNA突变具有特异性的探针包含选自由以下组成的组的序列:TCAAAGTGCTGGCCTC(SEQ ID NO:117)、AGATCAAAGTGCTGGCCTCCG(SEQ ID NO:119)、AAAGTGCTGGCCT(SEQ ID NO:121)、AGTGCTGGCCT(SEQ ID NO:123)和AAGTGCTGGCCTC(SEQ ID NO:125)。

35.如权利要求34所述的方法,其中所述对所述EGFR基因中的一种或多种DNA突变具有特异性的探针还包含5'端处的八个核苷酸,并且其中所述5'端处的所述八个核苷酸是腺嘌呤或胸腺嘧啶核苷酸。

36.如权利要求35所述的方法,其中所述对所述EGFR基因中的一种或多种DNA突变具有特异性的探针包含选自由以下组成的组的序列:TTTTTTTTTTCAAAGTGCTGGCCTC(SEQ ID NO:118)、TTTTTTAGATCAAAGTGCTGGCCTCCG(SEQ ID NO:120)、TTTTTTTTTTTAAAGTGCTGGCCT(SEQ ID NO:122)、TTTTTTTTTTTTTAGTGCTGGCCT(SEQ ID NO:124)和TTTTTTTTTTTTTAAGTGCTGGCCTC(SEQ ID NO:126)。

37.如权利要求33-36中任一项所述的方法,其中步骤(b)包括使用包含序列CTTGTGGAGCCTCTTACACCC(SEQ ID NO:11)和TGCCGAACGCACCGGA(SEQ ID NO:12)的引物对通过PCR扩增所述分离的DNA。

38.如权利要求33-37中任一项所述的方法,其中步骤(b)包括在与对应于所述EGFR DNA突变的野生型EGFR DNA基因座杂交并且防止所述野生型EGFR DNA基因座扩增的阻断核酸的存在下通过PCR扩增所述分离的DNA,并且其中所述至少七种阻断核酸中的至少一种包含序列CGGAGCCCAGCACTTTGA(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:306);CGCACCGGAGCCCAGCACT(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:307);GAGCCCAGCAC(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:308);CGCACCGGAGCCCAGCAC(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:309);或CGCACCGGAGCCCAGCACTTA(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:310);斜体的核酸表示锁核酸。

39.如权利要求2-38中任一项所述的方法,其中所述EGFR基因中的所述一种或多种DNA突变包括一种或多种编码E746_A750del突变的EGFR蛋白的DNA突变。

40.如权利要求39所述的方法,其中对所述所述EGFR基因中的一种或多种DNA突变具有特异性的探针包括:

(1)第一探针,其包含选自由以下组成的组的序列:AATCAAAACATCTCCGAAAG(SEQ ID NO:128)、CAAAACATCTCCG(SEQ ID NO:130)、AACATCTCCG(SEQ ID NO:132)和AAACATCTCCGAAAGCC(SEQ ID NO:134);和

(2)第二探针,其包含选自由以下组成的组的序列:AATCAAGACATCTCCGA(SEQ ID NO:136)、GCAATCAAGACATCTCCGA(SEQ ID NO:138)、AATCAAGACATCTC(SEQ ID NO:140)、

AATCAAGACATCTCCGAAAGC(SEQ ID NO:142)和CAAGACATCTCCGA(SEQ ID NO:144)；

其中所述两种探针中的每一种都与具有不同标识符的微载体偶联。

41.如权利要求40所述的方法，其中所述两种探针中的每一种还包含5'端处的八个核苷酸，并且其中所述5'端处的所述八个核苷酸是腺嘌呤或胸腺嘧啶核苷酸。

42.如权利要求41所述的方法，其中所述对所述EGFR基因中的一种或多种DNA突变具有特异性的探针包括：

(1)第一探针，其包含选自由以下组成的组的序列：TTTTTTTTTAATCAAAACATCTCCG(SEQ ID NO:127)、TTTTTTTTTAATCAAAACATCTCCGAAAG(SEQ ID NO:129)、TTTTTTTTTTTACAAAACATCTCCG(SEQ ID NO:131)、TTTTTTTTTTTTTTTAACATCTCCG(SEQ ID NO:133)和TTTTTTTTTTTTTTAAACATCTCCGAAAGCC(SEQ ID NO:135)；和

(2)第二探针，其包含选自由以下组成的组的序列：TTTTTTTTAATCAAGACATCTCCGA(SEQ ID NO:137)、TTTTTTGCAATCAAGACATCTCCGA(SEQ ID NO:139)、TTTTTTTTAATCAAGACATCTC(SEQ ID NO:141)、TTTTTTTTAATCAAGACATCTCCGAAAGC(SEQ ID NO:143)和TTTTTTTTTTTCAAGACATCTCCGA(SEQ ID NO:145)；

其中所述两种探针中的每一种都与具有不同标识符的微载体偶联。

43.如权利要求39-42中任一项所述的方法，其中步骤(b)包括使用包含序列GCCAGTTAACGTCTTCCTTCTC(SEQ ID NO:13)和ATCGAGGATTTCCTTGTTGGCTT(SEQ ID NO:14)的引物对通过PCR扩增所述分离的DNA。

44.如权利要求39-43中任一项所述的方法，其中步骤(b)包括在与对应于所述EGFR DNA突变的野生型EGFR DNA基因座杂交并且防止所述野生型EGFR DNA基因座扩增的阻断核酸的存在下通过PCR扩增所述分离的DNA，并且其中所述至少七种阻断核酸中的至少一种包含序列CGGAGATGTTGCTTCTCTTAATTCC(invdT)$_n$，其中n为1、2或3(SEQ ID NO:311)；CGGAGATGTTGCTTCTCT(invdT)$_n$，其中n为1、2或3(SEQ ID NO:312)；GTTGCTTCTCTTAATTCC(invdT)$_n$，其中n为1、2或3(SEQ ID NO:313)；ATGTTGCTTCTCT(invdT)$_n$，其中n为1、2或3(SEQ ID NO:314)；或TTGCTTCTCTTA(invdT)$_n$，其中n为1、2或3(SEQ ID NO:315)；斜体的核酸表示锁核酸。

45.如权利要求2-44中任一项所述的方法，其中所述EGFR基因中的所述一种或多种DNA突变包括一种或多种编码T790M、C797S、S768I、V769_D770insASV、H773_V774insH、D770_N771insG或D770_N771insSVD突变的EGFR蛋白的DNA突变。

46.如权利要求45所述的方法，其中所述EGFR基因中的所述一种或多种DNA突变包括编码T790M、C797S、S768I、V769_D770insASV、H773_V774insH、D770_N771insG和D770_N771insSVD突变的EGFR蛋白的DNA突变。

47.如权利要求46所述的方法，其中所述对所述EGFR基因中的一种或多种DNA突变具有特异性的探针包括：

(1)第一探针，其包含选自由以下组成的组的序列：GAGATGCATGATGA(SEQ ID NO:146)、TGAGATGCATGATGAG(SEQ ID NO:147)、ATGAGATGCATGATGAG(SEQ ID NO:148)、TGAGCTGCATGATGA(SEQ ID NO:149)和CATGAGATGCATGATGA(SEQ ID NO:150)；

(2)第二探针，其包含选自由以下组成的组的序列：CCAGGAGGCTGCCG(SEQ ID NO:461)、CAGGAGGCTGCCGA(SEQ ID NO:463)、TCCAGGAGGCTGCC(SEQ ID NO:465)、CCAGGAGGCTGCC(SEQ

ID NO:467)和CAGGAGGCTGCC(SEQ ID NO:469)；

(3)第三探针，其包含选自由以下组成的组的序列：CCAGGAGGGAGCC(SEQ ID NO:471)、CCAGGAGGGAGCCG(SEQ ID NO:473)、TCCAGGAGGGAGCC(SEQ ID NO:475)、CAGGAGGGAGCCG(SEQ ID NO:477)和CAGGAGGGAGCCGA(SEQ ID NO:479)；

(4)第四探针，其包含选自由以下组成的组的序列：ATGGCCATCTTGG(SEQ ID NO:421)、GGCCATCTTGGA(SEQ ID NO:423)、GATGGCCATCTTG(SEQ ID NO:425)、TGATGGCCATCTTG(SEQ ID NO:427)和TGGCCATCTTGG(SEQ ID NO:429)；

(5)第五探针，其包含选自由以下组成的组的序列：GTGATGGCCGG(SEQ ID NO:431)、TGATGGCCGGCG(SEQ ID NO:433)、GTGATGGCCGGCGT(SEQ ID NO:435)、GATGGCCGGCGT(SEQ ID NO:437)和GATGGCCCGCGTG(SEQ ID NO:439)；

(6)第六探针，其包含选自由以下组成的组的序列：AACCCCCATCACGT(SEQ ID NO:441)、GACAACCCCCATCACG(SEQ ID NO:443)、CGTGGACAACCCCCATCA(SEQ ID NO:445)、CCCATCACGTGT(SEQ ID NO:447)和TGGACAACCCCCATCAC(SEQ ID NO:449)；和

(7)第七探针，其包含选自由以下组成的组的序列：GCCAGCGTGGACGG(SEQ ID NO:451)、CGTGGACGGTAACC(SEQ ID NO:453)、GACGGTAACCCCC(SEQ ID NO:455)、CCAGCGTGGACGGT(SEQ ID NO:457)和GCCAGCGTGGACGGTA(SEQ ID NO:459)；

其中所述七种探针中的每一种都与具有不同标识符的微载体偶联。

48.如权利要求47所述的方法，其中所述对所述EGFR基因中的一种或多种DNA突变具有特异性的七种探针中的每一种还包含5'端处的八个核苷酸，并且其中所述5'端处的所述八个核苷酸是腺嘌呤或胸腺嘧啶核苷酸。

49.如权利要求48所述的方法，其中所述对所述EGFR基因中的一种或多种DNA突变具有特异性的探针包括：

(1)第一探针，其包含选自由以下组成的组的序列：TTTTTTTTTTTGAGATGCATGATGA(SEQ ID NO:352)、TTTTTTTTTGAGATGCATGATGAG(SEQ ID NO:353)、TTTTTTTTATGAGATGCATGATGAG(SEQ ID NO:354)、TTTTTTTTTTTGAGCTGCATGATGA(SEQ ID NO:355)和TTTTTTTCATGAGATGCATGATGA(SEQ ID NO:356)；

(2)第二探针，其包含选自由以下组成的组的序列：TTTTTTTTTTACCAGGAGGCTGCCG(SEQ ID NO:462)、TTTTTTTTTTTACAGGAGGCTGCCGA(SEQ ID NO:464)、TTTTTTTTTTATCCAGGAGGCTGCC(SEQ ID NO:466)、TTTTTTTTTTACCAGGAGGCTGCC(SEQ ID NO:468)和TTTTTTTTTTACAGGAGGCTGCC(SEQ ID NO:470)；

(3)第三探针，其包含选自由以下组成的组的序列：TTTTTTTTTTACCAGGAGGGAGCC(SEQ ID NO:472)、TTTTTTTTTTACCAGGAGGGAGCCG(SEQ ID NO:474)、TTTTTTTTTTATCCAGGAGGGAGCC(SEQ ID NO:476)、TTTTTTTTTTACAGGAGGGAGCCG(SEQ ID NO:478)和TTTTTTTTTTACAGGAGGGAGCCGA(SEQ ID NO:480)；

(4)第四探针，其包含选自由以下组成的组的序列：TTTTTTTTATGGCCATCTTGG(SEQ ID NO:422)、TTTTTTTTTAGGCCATCTTGGA(SEQ ID NO:424)、TTTTTTAGATGGCCATCTTG(SEQ ID NO:426)、TTTTTTTGATGGCCATCTTG(SEQ ID NO:428)和TTTTTTTTTTGGCCATCTTGG(SEQ ID NO:430)；

(5)第五探针，其包含选自由以下组成的组的序列：TTTTTTTTTTGTGATGGCCGG(SEQ ID

NO:432)、TTTTTTTTTTTTTGATGGCCGGCG(SEQ ID NO:434)、TTTTTTTTTTTGTGATGGCCGGCGT(SEQ ID NO:436)、TTTTTTTTTTTTTTGATGGCCGGCGT(SEQ ID NO:438)和TTTTTTTTTTTTTGATGGCCCGCGTG(SEQ ID NO:440)；

(6)第六探针，其包含选自由以下组成的组的序列：TTTTTTTTTTTAACCCCCATCACGT(SEQ ID NO:442)、TTTTTTTGACAACCCCCATCACG(SEQ ID NO:444)、TTTCGTGGACAACCCCCATCA(SEQ ID NO:446)、TTTTTTTTTTTTCCCATCACGTGT(SEQ ID NO:448)和TTTTTTTTGGACAACCCCCATCAC(SEQ ID NO:450)；和

(7)第七探针，其包含选自由以下组成的组的序列：TTTTTTTTTTTGCCAGCGTGGACGG(SEQ ID NO:452)、TTTTTTTTTTTCGTGGACGGTAACC(SEQ ID NO:454)、TTTTTTTTTTTGACGGTAACCCCC(SEQ ID NO:456)、TTTTTTTTTTTCCAGCGTGGACGGT(SEQ ID NO:458)和TTTTTTTGCCAGCGTGGACGGTA(SEQ ID NO:460)；

其中所述七种探针中的每一种都与具有不同标识符的微载体偶联。

50.如权利要求45-49中任一项所述的方法，其中步骤(b)包括使用以下引物对通过PCR扩增所述分离的DNA：包含序列CCTCCACCGTGCAGATCATC(SEQ ID NO:15)和TTCCCTGATTACCTTTGCGAT(SEQ ID NO:16)的引物对；包含序列CCACACTGACGTGCCTCT(SEQ ID NO:511)和GCACACGTAGGGGTTGTCCAAGA(SEQ ID NO:512)的引物对；包含序列CCACACTGACGTGCCTCT(SEQ ID NO:513)和GTACACGCTGGCCACGCCG(SEQ ID NO:514)的引物对；包含序列CCACACTGACGTGCCTCT(SEQ ID NO:515)和CAGGCGGCACACGTGAT(SEQ ID NO:516)的引物对；和/或包含序列CCACACTGACGTGCCTCT(SEQ ID NO:517)和AGGCGGCACACGTGCGGGTTAC(SEQ ID NO:518)的引物对。

51.如权利要求45-50中任一项所述的方法，其中步骤(b)包括在与对应于所述EGFR DNA突变的野生型EGFR DNA基因座杂交并且防止所述野生型EGFR DNA基因座扩增的阻断核酸的存在下通过PCR扩增所述分离的DNA，并且其中所述至少七种阻断核酸中的至少一种包含序列CATCACGCAGCTCATG(invdT)$_n$，其中n为1、2或3(SEQ ID NO:316)；TGCAGCTCATCACGCAGC(invdT)$_n$，其中n为1、2或3(SEQ ID NO:317)；TCATCACGCAGCTCAT(invdT)$_n$，其中n为1、2或3(SEQ ID NO:318)；TCATCACGCAGC(invdT)$_n$，其中n为1、2或3(SEQ ID NO:319)；或CTCATCACGCAGC(invdT)$_n$，其中n为1、2或3(SEQ ID NO:320)；斜体的核酸表示锁核酸。

52.如权利要求2-51中任一项所述的方法，其中所述EGFR基因中的所述一种或多种DNA突变包括一种或多种编码L858R突变的EGFR蛋白的DNA突变。

53.如权利要求52所述的方法，其中所述对所述EGFR基因中的一种或多种DNA突变具有特异性的探针包括：第一探针，其包含选自由以下组成的组的序列：ATTTTGGGCGGGCC(SEQ ID NO:151)、TTGGGCGGGCCAAA(SEQ ID NO:153)、GCGGGCCAAACT(SEQ ID NO:155)、GGGCGGGCCAAACT(SEQ ID NO:157)和TGGGCGGGCCA(SEQ ID NO:159)；

其中所述第一探针与具有标识符的微载体偶联。

54.如权利要求53所述的方法，其中所述第一探针还包含5'端处的八个核苷酸，并且其中所述5'端处的所述八个核苷酸是腺嘌呤或胸腺嘧啶核苷酸。

55.如权利要求54所述的方法，其中所述对所述EGFR基因中的一种或多种DNA突变具有特异性的探针包括：第一探针，其包含选自由以下组成的组的序列：

TTTTTTTATTTTGGGCGGGCC(SEQ ID NO:152)、TTTTTTTTAATTGGGCGGGCCAAA(SEQ ID NO:154)、TTTTTTTAAAAAAGCGGGCCAAACT(SEQ ID NO:156)、TTTTTTTTAAAAGGGCGGGCCAAACT(SEQ ID NO:158)和TTTTTTTTAAATGGGCGGGCCA(SEQ ID NO:160)；

其中所述第一探针与具有标识符的微载体偶联。

56.如权利要求52-55中任一项所述的方法，其中步骤(b)包括使用包含序列GGAGGACCGTCGCTTGG(SEQ ID NO:17)和TCTTTCTCTTCCGCACCCAG(SEQ ID NO:18)的引物对通过PCR扩增所述分离的DNA。

57.如权利要求52-56中任一项所述的方法，其中步骤(b)包括在与对应于所述EGFR DNA突变的野生型EGFR DNA基因座杂交并且防止所述野生型EGFR DNA基因座扩增的阻断核酸的存在下通过PCR扩增所述分离的DNA，并且其中所述至少七种阻断核酸中的至少一种包含序列CCAGCAGTTTGGCCAGCCCT(invdT)$_n$，其中n为1、2或3(SEQ ID NO:321)；CCAGCAGTTTGGCCAGCCCT(invdT)$_n$，其中n为1、2或3(SEQ ID NO:322)；CCAGCAGTTTGGCCAGCCCT(invdT)$_n$，其中n为1、2或3(SEQ ID NO:323)；AGCAGTTTGGCCAGCC(invdT)$_n$，其中n为1、2或3(SEQ ID NO:324)；或CCAGCAGTTTGGCCAGCCCT(invdT)$_n$，其中n为1、2或3(SEQ ID NO:325)；斜体的核酸表示锁核酸。

58.如权利要求2-57中任一项所述的方法，其中所述AKT1基因中的所述一种或多种DNA突变包括一种或多种编码E17K突变的AKT1蛋白的DNA突变。

59.如权利要求58所述的方法，其中对所述AKT1基因中的一种或多种DNA突变具有特异性的探针包含选自由以下组成的组的序列：TGTAGGGAAGTACA(SEQ ID NO:370)、TCTGTAGGGAAGTAC(SEQ ID NO:372)、GTCTGTAGGGAAGTACAT(SEQ ID NO:374)、CCGCACGTCTGTAGGGA(SEQ ID NO:376)和ACGTCTGTAGGGAAGTA(SEQ ID NO:378)。

60.如权利要求59所述的方法，其中所述对所述AKT1基因中的一种或多种DNA突变具有特异性的探针还包含5'端处的七个核苷酸，并且其中所述5'端处的所述七个核苷酸是腺嘌呤或胸腺嘧啶核苷酸。

61.如权利要求60所述的方法，其中所述对所述AKT1基因中的一种或多种DNA突变具有特异性的探针包含选自由以下组成的组的序列：TTTTTTTTTTTTTTGTAGGGAAGTACA(SEQ ID NO:371)、TTTTTTTTTTTTCTGTAGGGAAGTAC(SEQ ID NO:373)、TTTTTTTGTCTGTAGGGAAGTACAT(SEQ ID NO:375)、TTTTTTTCCGCACGTCTGTAGGGA(SEQ ID NO:377)和TTTTTTTTACGTCTGTAGGGAAGTA(SEQ ID NO:379)。

62.如权利要求58-61中任一项所述的方法，其中步骤(b)包括使用包含序列GAGGGTCTGACGGGTAGAGTG(SEQ ID NO:380)和TGGCCGCCAGGTCTTGATGTA(SEQ ID NO:381)的引物对通过PCR扩增所述分离的DNA。

63.如权利要求58-62中任一项所述的方法，其中步骤(b)包括在与对应于所述AKT1 DNA突变的野生型AKT1 DNA基因座杂交并且防止所述野生型AKT1 DNA基因座扩增的阻断核酸的存在下通过PCR扩增所述分离的DNA，并且其中所述至少七种阻断核酸中的至少一种包含序列TGTACTCCCCTACA(invdT)$_n$，其中n为1、2或3(SEQ ID NO:382)；GATGTACTCCCCT(invdT)$_n$，其中n为1、2或3(SEQ ID NO:383)；ATGTACTCCCCTAC(invdT)$_n$，其中n为1、2或3(SEQ ID NO:384)；GTACTCCCCTACA(invdT)$_n$，其中n为1、2或3(SEQ ID NO:385)；或GATGTACTCCCCTACA(invdT)$_n$，其中n为1、2或3(SEQ ID NO:386)；斜体的核酸表示锁核酸。

64.如权利要求2-63中任一项所述的方法，其中所述MEK1基因中的所述一种或多种DNA突变包括一种或多种编码K57N突变的MEK1蛋白的DNA突变。

65.如权利要求64所述的方法，其中对所述MEK1基因中的一种或多种DNA突变具有特异性的探针包含选自由以下组成的组的序列：TTACCCAGAATCAGAA(SEQ ID NO:387)、CCAGAATCAGAAGGTG(SEQ ID NO:389)、TTCTTACCCAGAATCA(SEQ ID NO:391)、CCTTTCTTACCCAGAATC(SEQ ID NO:393)和CAGAATCAGAAGGTGG(SEQ ID NO:395)。

66.如权利要求65所述的方法，其中所述对所述MEK1基因中的一种或多种DNA突变具有特异性的探针还包含5'端处的八个核苷酸，并且其中所述5'端处的所述八个核苷酸是腺嘌呤或胸腺嘧啶核苷酸。

67.如权利要求66所述的方法，其中所述对所述MEK1基因中的一种或多种DNA突变具有特异性的探针包含选自由以下组成的组的序列：TTTTTAAATTTACCCAGAATCAGAA(SEQ ID NO:388)、TTTTTAAATCCAGAATCAGAAGGTG(SEQ ID NO:390)、TTTTTAAATTTCTTACCCAGAATCA(SEQ ID NO:392)、TTTTTAAATCCTTTCTTACCCAGAATC(SEQ ID NO:394)和TTTTTAAATCAGAATCAGAAGGTGG(SEQ ID NO:396)。

68.如权利要求64-67中任一项所述的方法，其中步骤(b)包括使用包含序列CTTGATGAGCAGCAGCGAAA(SEQ ID NO:397)和CCTTCAGTTCTCCCACCTTCTG(SEQ ID NO:398)的引物对通过PCR扩增所述分离的DNA。

69.如权利要求64-68中任一项所述的方法，其中步骤(b)包括在与对应于所述MEK1 DNA突变的野生型MEK1 DNA基因座杂交并且防止所述野生型MEK1 DNA基因座扩增的阻断核酸的存在下通过PCR扩增所述分离的DNA，并且其中所述至少七种阻断核酸中的至少一种包含序列TCTGCTTCTGGGTAAG(invdT)$_n$，其中n为1、2或3(SEQ ID NO:399)；TTCTGCTTCTGGGTAAGA(invdT)$_n$，其中n为1、2或3(SEQ ID NO:400)；CACCTTCTGCTTCTGGG(invdT)$_n$，其中n为1、2或3(SEQ ID NO:401)；TCTGCTTCTGGGTA(invdT)$_n$，其中n为1、2或3(SEQ ID NO:402)；或CACCTTCTGCTTCTGGGTAAGA(invdT)$_n$，其中n为1、2或3(SEQ ID NO:403)；斜体的核酸表示锁核酸。

70.如权利要求2-69中任一项所述的方法，其中所述HER2基因中的所述一种或多种DNA突变包括一种或多种编码A775_G776insYVMA突变的HER2蛋白的DNA突变。

71.如权利要求70所述的方法，其中所述对所述HER2基因中的一种或多种DNA突变具有特异性的探针包含选自由以下组成的组的序列：ATACGTGATGTCTTAC(SEQ ID NO:404)、ACGTGATGGCTTACGT(SEQ ID NO:406)、AAGCATACGTGATGGCT(SEQ ID NO:408)、GCATACGTGATGGCTT(SEQ ID NO:410)和GCATACGTGATGGCTTA(SEQ ID NO:412)。

72.如权利要求71所述的方法，其中所述对所述HER2基因中的一种或多种DNA突变具有特异性的探针还包含5'端处的五个核苷酸，并且其中所述5'端处的所述五个核苷酸是腺嘌呤或胸腺嘧啶核苷酸。

73.如权利要求72所述的方法，其中所述对所述HER2基因中的一种或多种DNA突变具有特异性的探针包含选自由以下组成的组的序列：TTTTTTTTTATACGTGATGTCTTAC(SEQ ID NO:405)、TTTTTTTTTTTACGTGATGGCTTACGT(SEQ ID NO:407)、TTTTTAAGCATACGTGATGGCT(SEQ ID NO:409)、TTTTTTTGCATACGTGATGGCTT(SEQ ID NO:411)和TTTTTTTGCATACGTGATGGCTTA(SEQ ID NO:413)。

74.如权利要求70-73中任一项所述的方法，其中步骤(b)包括使用包含序列ATGGCTGTGGTTTGTGATGGT(SEQ ID NO:414)和ACACCAGCCATCACGTAAGACA(SEQ ID NO:415)的引物对通过PCR扩增所述分离的DNA。

75.如权利要求1-74中任一项所述的方法，其中所述样品是血液、血清或血浆样品。

76.如权利要求75所述的方法，其中(a)包括从所述样品中分离循环游离DNA(cfDNA)，并且其中所述分离的cfDNA在(b)中通过PCR扩增。

77.如权利要求1-76中任一项所述的方法，其中所述方法还包括：

在(b)中使用对阳性对照DNA序列具有特异性的引物对来扩增所述阳性对照DNA序列；

在(c)中将所述扩增的阳性对照基因序列与对所述阳性对照基因序列具有特异性的探针杂交，其中所述对所述阳性对照基因序列具有特异性的探针与具有对应于阳性对照的标识符的微载体偶联；

在(d)中检测所述扩增的阳性对照DNA序列与所述对所述阳性对照基因序列具有特异性的探针的杂交存在或不存在；和

在(e)中检测所述对应于阳性对照的标识符。

78.如权利要求1-77中任一项所述的方法，其中所述方法还包括：

在(d)中检测所述扩增的DNA与具有对应于阴性对照的标识符的微载体的杂交的不存在，其中所述具有对应于所述阴性对照的所述标识符的微载体包含不与所述扩增的DNA杂交的探针；和

在(e)中检测所述对应于阴性对照的标识符。

79.一种用于检测ALK、ROS、RET、NTRK1和cMET基因中的突变的存在的方法，所述方法包括：

(a)从样品中分离RNA；

(b)通过逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)由所述分离的RNA扩增DNA，其中扩增所述DNA包括：

(1)使用对所述ALK、ROS、RET、NTRK1和cMET基因中的每一个具有特异性的第一引物、所述分离的RNA、和逆转录酶，由所述分离的RNA生成对所述ALK、ROS、RET、NTRK1和cMET基因中的每一个具有特异性的cDNA，和

(2)使用在(b)(1)中生成的所述cDNA、DNA聚合酶、所述第一引物、和对所述ALK、ROS、RET、NTRK1和cMET基因中的每一个具有特异性的第二引物，通过聚合酶链反应(PCR)来扩增对所述ALK、ROS、RET、NTRK1和cMET基因中的每一个具有特异性的DNA，所述第二引物结合至与所述对应的第一引物相反的所述cDNA链，并且促进与所述对应的第一引物所促进的方向相反的链延伸；

(c)将所述扩增的DNA与至少五种探针杂交，所述至少五种探针包括对所述ALK、ROS、RET、NTRK1和cMET基因中的每一个中的突变具有特异性的一种或多种探针，其中所述至少五种探针中的每一种与微载体偶联，并且其中所述微载体中的每一种包含对应于与其偶联的所述探针的标识符；

(d)检测所述扩增的DNA与所述至少五种探针的杂交存在或不存在，其中所述扩增的DNA与所述探针之一的杂交表明对应于所述探针的所述突变的存在；

(e)检测所述微载体的标识符；和

(f)将所述微载体的检测到的标识符与检测到的所述扩增的DNA与所述微载体的对应探针的杂交存在或不存在相关联。

80.如权利要求79所述的方法,其中所述ALK、ROS、RET、NTRK1和cMET基因是人基因。

81.如权利要求79或权利要求80所述的方法,其中所述ALK、ROS、RET和NTRK1基因中的所述突变中的一种或多种包括融合基因。

82.如权利要求81所述的方法,其中所述ALK、ROS、RET和NTRK1基因中的所述突变中的每一种都包括融合基因。

83.如权利要求79-82中任一项所述的方法,其中所述ALK基因中的所述一种或多种突变包括EML4-ALK融合基因。

84.如权利要求83所述的方法,其中所述第一引物对EML4基因座的区域具有特异性,并且所述第二引物对ALK基因座的区域具有特异性。

85.如权利要求83所述的方法,其中所述第二引物对EML4基因座的区域具有特异性,并且所述第一引物对ALK基因座的区域具有特异性。

86.如权利要求83-85中任一项所述的方法,其中所述ALK基因中的所述一种或多种突变包括EML E13:ALK E20、EML E20:ALK E20和EML E6:ALK E20 EML4-ALK融合基因中的一种或多种。

87.如权利要求86所述的方法,其中所述ALK基因中的所述一种或多种突变包括EML E13:ALK E20、EML E20:ALK E20和EML E6:ALK E20 EML4-ALK融合基因。

88.如权利要求87所述的方法,其中对所述ALK基因中的一种或多种突变具有特异性的探针包括:

(1)第一探针,其包含选自由以下组成的组的序列AAAGGACCTAAAGTGT(SEQ ID NO:161)、CCTAAAGTGTACCGC(SEQ ID NO:163)、GGGAAAGGACCTAAAG(SEQ ID NO:165)、AGTGTACCGCCGGAA(SEQ ID NO:167)和TACCGCCGGAAGCACC(SEQ ID NO:169);

(2)第二探针,其包含选自由以下组成的组的序列:GACTATGAAATATTGTAC(SEQ ID NO:171)、GAAATATTGTACTTGTAC(SEQ ID NO:173)、TATTGTACTTGTACCGCC(SEQ ID NO:175)、TGTACCGCCGGAAGCAC(SEQ ID NO:177)和CCGCCGGAAGCACCAGGA(SEQ ID NO:179);

(3)第三探针,其包含选自由以下组成的组的序列:TGTCATCATCAACCAA(SEQ ID NO:181)、ATGTCATCATCAACC(SEQ IDNO:183)、GTGTACCGCCGGAAGC(SEQ ID NO:185)、TCAACCAAGTGTACCG(SEQ ID NO:187)和TACCGCCGGAAGCACCA(SEQ ID NO:189);和

(4)第四探针,其包含选自由以下组成的组的序列:CGAAAAAAACAGCCAA(SEQ ID NO:191)、TCGCGAAAAAAACAGC(SEQ ID NO:193)、GTGTACCGCCGGAAGC(SEQ ID NO:195)、TACCGCCGGAAGCACC(SEQ ID NO:197)和ACAGCCAAGTGTACCG(SEQ ID NO:199);

其中所述四种探针中的每一种都与具有不同标识符的微载体偶联。

89.如权利要求88所述的方法,其中所述四种探针中的每一种还包含5'端处的八个核苷酸,并且其中所述5'端处的所述八个核苷酸是腺嘌呤或胸腺嘧啶核苷酸。

90.如权利要求89所述的方法,其中所述对所述ALK基因中的一种或多种突变具有特异性的探针包括:

(1)第一探针,其包含选自由以下组成的组的序列:TTTTTTTTTTAAAGGACCTAAAGTGT(SEQ ID NO:162)、TTTTTTTTTTCCTAAAGTGTACCGC(SEQ ID NO:164)、

TTTTTTTTTTGGGAAAGGACCTAAAG(SEQ ID NO:166)、TTTTTTTTTTAGTGTACCGCCGGAA(SEQ ID NO:168)和TTTTTTTTTTTACCGCCGGAAGCACC(SEQ ID NO:170)；

(2)第二探针，其包含选自由以下组成的组的序列：TTTTTTTTTTTTGACTATGAAATATTGTAC(SEQ ID NO:172)、TTTTTTTTTTTTGAAATATTGTACTTGTAC(SEQ ID NO:174)、TTTTTTTTTTTTTATTGTACTTGTACCGCC(SEQ ID NO:176)、TTTTTTTTTTTTTTGTACCGCCGGAAGCAC(SEQ ID NO:178)和TTTTTTTTTTTTCCGCCGGAAGCACCAGGA(SEQ ID NO:180)；

(3)第三探针，其包含选自由以下组成的组的序列：TTTTTTTTTTTTTTGTCATCATCAACCAA(SEQ ID NO:182)、TTTTTTTTTTTTTTATGTCATCATCAACC(SEQ ID NO:184)、TTTTTTTTTTTTTGTGTACCGCCGGAAGC(SEQ ID NO:186)、TTTTTTTTTTTTTTCAACCAAGTGTACCG(SEQ ID NO:188)和TTTTTTTTTTTTTTTACCGCCGGAAGCACCA(SEQ ID NO:190)；和

(4)第四探针，其包含选自由以下组成的组的序列：TTTTTTTTTTTTCGAAAAAAACAGCCAA(SEQ ID NO:192)、TTTTTTTTTTTTTCGCGAAAAAAACAGC(SEQ ID NO:194)、TTTTTTTTTTTTGTGTACCGCCGGAAGC(SEQ ID NO:196)、TTTTTTTTTTTTTTACCGCCGGAAGCACC(SEQ ID NO:198)和TTTTTTTTTTTTTTACAGCCAAGTGTACCG(SEQ ID NO:200)；

其中所述四种探针中的每一种都与具有不同标识符的微载体偶联。

91.如权利要求83-90中任一项所述的方法，其中对所述ALK基因中的一种或多种突变具有特异性的第一引物包含序列AGTTGGGGTTGTAGTCGGTCAT(SEQ ID NO:363)或GAAGCCTCCCTGGATCTCC(SEQ ID NO:364)。

92.如权利要求83-91中任一项所述的方法，其中对所述ALK基因中的一种或多种突变具有特异性的第二引物包含选自由以下组成的组的序列：TATGGAGCAAAACTACTGTAGAGCC(SEQ ID NO:357)、CCAGCTACATCACACACCTTGACT(SEQ ID NO:358)和TAATACCAAAAGTTACCAAAACTGCA(SEQ ID NO:359)。

93.如权利要求79-92中任一项所述的方法，其中所述ROS基因中的所述一种或多种突变包括选自由CD74-ROS和SLC34A2-ROS组成的组的ROS融合基因。

94.如权利要求93所述的方法，其中所述第一引物对CD74或SLC34A2的区域具有特异性，并且所述第二引物对ROS基因座的区域具有特异性。

95.如权利要求93所述的方法，其中所述第二引物对CD74或SLC34A2基因座的区域具有特异性，并且所述第一引物对ROS基因座的区域具有特异性。

96.如权利要求93所述的方法，其中所述第一引物对CD74或SLC34A2基因座的区域具有特异性，并且所述第二引物对ROS基因座的区域具有特异性；或者其中所述第二引物对CD74或SLC34A2基因座的区域具有特异性，并且所述第一引物对ROS基因座的区域具有特异性。

97.如权利要求93-96中任一项所述的方法，其中所述ROS基因中的所述一种或多种突变包括CD74 E6:ROS E32、CD74 E6:ROS E34、SLC34A2 E4:ROS E32和SLC34A2 E4:ROS E34融合基因中的一种或多种。

98.如权利要求97所述的方法，其中所述ROS基因中的所述一种或多种突变包括CD74 E6:ROS E32、CD74 E6:ROS E34、SLC34A2E4:ROS E32和SLC34A2 E4:ROS E34融合基因。

99.如权利要求98所述的方法，其中所述对所述ROS基因中的一种或多种突变具有特异性的探针包括：

(1)第一探针，其包含选自由以下组成的组的序列：ACTGACGCTCCACCGAAA(SEQ ID NO:

201)、CCACTGACGCTCCACCGA(SEQ ID NO:203)、GCTGGAGTCCCAAATAAAC(SEQ ID NO:205)、GGAGTCCCAAATAAACCAG(SEQ ID NO:207)和CACCGAAAGCTGGAGTCCC(SEQ ID NO:209)；

(2)第二探针，其包含选自由以下组成的组的序列：CCGAAAGATGATTTT(SEQ ID NO:211)、GACGCTCCACCGAAA(SEQ ID NO:213)、ACTGACGCTCCACCGA(SEQ ID NO:215)、GATGATTTTTGGATA(SEQ ID NO:217)和TGATTTTTGGATACCA(SEQ ID NO:219)；

(3)第三探针，其包含选自由以下组成的组的序列：AGCGCCTTCCAGCTGGTTGGA(SEQ ID NO:221)、CTGGTTGGAGCTGGAGTCCC(SEQ ID NO:223)、AGTAGCGCCTTCCAGCTGGTTG(SEQ ID NO:225)、GCTGGAGTCCCAAATAAACCA(SEQ ID NO:227)和GGAGTCCCAAATAAACCAGG(SEQ ID NO:229)；和

(4)第四探针，其包含选自由以下组成的组的序列：GCGCCTTCCAGCTGGTTG(SEQ ID NO:231)、GTAGCGCCTTCCAGCTGGT(SEQ ID NO:233)、TGGTTGGAGATGATTTTT(SEQ ID NO:235)、GATGATTTTTGGATACCAG(SEQ ID NO:237)和TGATTTTTGGATACCA(SEQ ID NO:239)；

其中所述四种探针中的每一种都与具有不同标识符的微载体偶联。

100.如权利要求99所述的方法，其中所述四种探针中的每一种还包含5'端处的八个核苷酸，并且其中所述5'端处的所述八个核苷酸是腺嘌呤或胸腺嘧啶核苷酸。

101.如权利要求100所述的方法，其中所述对所述ROS基因中的一种或多种突变具有特异性的探针包括：

(1)第一探针，其包含选自由以下组成的组的序列：TTTTTTTTTTTACTGACGCTCCACCGAAA(SEQ ID NO:202)、TTTTTTTTTTTCCACTGACGCTCCACCGA(SEQ ID NO:204)、TTTTTTTTTTGCTGGAGTCCCAAATAAAC(SEQ ID NO:206)、TTTTTTTTTTGGAGTCCCAAATAAACCAG(SEQ ID NO:208)和TTTTTTTTTTCACCGAAAGCTGGAGTCCC(SEQ ID NO:210)；

(2)第二探针，其包含选自由以下组成的组的序列：TTTTTTTTTTTCCGAAAGATGATTTT(SEQ ID NO:212)、TTTTTTTTTTTGACGCTCCACCGAAA(SEQ ID NO:214)、TTTTTTTTTTACTGACGCTCCACCGA(SEQ ID NO:216)、TTTTTTTTTTGATGATTTTGGATA(SEQ ID NO:218)和TTTTTTTTTTTGATTTTGGATACCA(SEQ ID NO:220)；

(3)第三探针，其包含选自由以下组成的组的序列：TTTTTTTTTTAGCGCCTTCCAGCTGGTTGGA(SEQ ID NO:222)、TTTTTTTTTTCTGGTTGGAGCTGGAGTCCC(SEQ ID NO:224)、TTTTTTTTTTAGTAGCGCCTTCCAGCTGGTTG(SEQ ID NO:226)、TTTTTTTTTTGCTGGAGTCCCAAATAAACCA(SEQ ID NO:228)和TTTTTTTTTTGGAGTCCCAAATAAACCAGG(SEQ ID NO:230)；和

(4)第四探针，其包含选自由以下组成的组的序列：TTTTTTTTTGCGCCTTCCAGCTGGTTG(SEQ ID NO:232)、TTTTTTTTTGTAGCGCCTTCCAGCTGGT(SEQ ID NO:234)、TTTTTTTTTGGTTGGAGATGATTTT(SEQ ID NO:236)、TTTTTTTTTGATGATTTTGGATACCAG(SEQ ID NO:238)和TTTTTTTTTTGATTTTGGATACCA(SEQ ID NO:240)；

其中所述四种探针中的每一种都与具有不同标识符的微载体偶联。

102.如权利要求93-101中任一项所述的方法，其中对所述ROS基因中的一种或多种突变具有特异性的第一引物包含序列AATTCAATACATACTATCAGCTTTCTCCCACTGTATTGAA(SEQ ID NO:21)或AATATTTCTGGTACGAGTGGGATTGTAACAACCAGAAATA(SEQ ID NO:22)。

103.如权利要求93-102中任一项所述的方法，其中对所述ROS基因中的一种或多种突变具有特异性的第二引物包含序列GGAGTGCCATCGCTGTTTGAAATGAGCAGGCACT(SEQ ID NO:

19)或TACAGCCCTGGATATTCTTAGTAGCGC(SEQ ID NO:20)。

104.如权利要求79-103中任一项所述的方法,其中所述RET基因中的所述一种或多种突变包括选自由KIF5B-RET组成的组的RET融合基因。

105.如权利要求104所述的方法,其中所述第一引物对KIF5B或CCDC6基因座的区域具有特异性,并且所述第二引物对RET基因座的区域具有特异性。

106.如权利要求104所述的方法,其中所述第二引物对KIF5B或CCDC6基因座的区域具有特异性,并且所述第一引物对RET基因座的区域具有特异性。

107.如权利要求104所述的方法,其中所述第一引物对KIF5B基因座的区域具有特异性,并且所述第二引物对RET基因座的区域具有特异性;或者其中所述第二引物对KIF5B基因座的区域具有特异性,并且所述第一引物对RET基因座的区域具有特异性。

108.如权利要求104-107中任一项所述的方法,其中所述RET基因中的所述一种或多种突变包括KIF5B E15:RET E11、KIF5BE15:RET E12、KIF5B E16:RET E12、KIF5B E22:RET E12、KIF5BE23:RET E12和CCDC6 E1:RET E12融合基因中的一种或多种。

109.如权利要求108所述的方法,其中所述RET基因中的所述一种或多种突变包括KIF5B E15:RET E11、KIF5B E15:RET E12、KIF5B E16:RET E12、KIF5B E22:RET E12和KIF5B E23:RET E12融合基因。

110.如权利要求109所述的方法,其中对所述RET基因中的一种或多种突变具有特异性的探针包括:

(1)第一探针,其包含选自由以下组成的组的序列:GTGGGAAATAATGATGTAAA(SEQ ID NO:241)、CTGTGGGAAATAATGATGTA(SEQ ID NO:243)、GATCCACTGTGCGACGAGCT(SEQ ID NO:245)、TGATGTAAAGATCCACTGTG(SEQ ID NO:247)和TCCACTGTGCGACGAGCTGT(SEQ ID NO:249);

(2)第二探针,其包含选自由以下组成的组的序列:TGGGAAATAATGATGTAAA(SEQ ID NO:251)、CTGTGGGAAATAATGATGTA(SEQ ID NO:253)、GGAGGATCCAAAGTGGGAAT(SEQ ID NO:255)、GGATCCAAAGTGGGAATT(SEQ ID NO:257)和ATGATGTAAAGGAGGATCC(SEQ ID NO:259);

(3)第三探针,其包含选自由以下组成的组的序列:CTTCGTATCTCTCAAGAGGAT(SEQ ID NO:481)、GTATCTCTCAAGAGGATCCAA(SEQ ID NO:483)、TTCGTATCTCTCAAGAG(SEQ ID NO:485)、TCAAGAGGATCCAAA(SEQ ID NO:487)和TCTCTCAAGAGG(SEQ ID NO:489);

(4)第四探针,其包含选自由以下组成的组的序列:GTTAAAAAGGAGGATCCAA(SEQ ID NO:491)、ACAAGAGTTAAAAAGGAGGA(SEQ ID NO:493)、AAGAGTTAAAAAGGAGGATC(SEQ ID NO:495)、AAAAGGAGGATCCAAAG(SEQ ID NO:497)和AAGGAGGATCCAAAGTG(SEQ ID NO:499);和

(5)第五探针,其包含选自由以下组成的组的序列:AAACAGGAGGATCCAAA(SEQ ID NO:501)、AAGTGCACAAACAGGAGG(SEQ ID NO:503)、GTGCACAAACAGGAGGATC(SEQ ID NO:505)、CACAAACAGGAGGAT(SEQ ID NO:507)和AACAGGAGGATCCAAA(SEQ ID NO:509);

其中所述五种探针中的每一种都与具有不同标识符的微载体偶联。

111.如权利要求110所述的方法,其中所述四种探针中的每一种还包含5'端处的八个核苷酸,并且其中所述5'端处的所述八个核苷酸是腺嘌呤或胸腺嘧啶核苷酸。

112.如权利要求111所述的方法,其中所述对所述RET基因中的一种或多种突变具有特异性的探针包括:

(1)第一探针,其包含选自由以下组成的组的序列:TTTTTTTTTTGTGGGAAATAATGATGTAAA(SEQ ID NO:242)、TTTTTTTTTTCTGTGGGAAATAATGATGTA(SEQ ID NO:244)、TTTTTTTTTTGATCCACTGTGCGACGAGCT(SEQ ID NO:246)、TTTTTTTTTTTGATGTAAAGATCCACTGTG(SEQ ID NO:248)和TTTTTTTTTTTCCACTGTGCGACGAGCTGT(SEQ ID NO:250);

(2)第二探针,其包含选自由以下组成的组的序列:TTTTTTTTTTGGGAAATAATGATGTAAA(SEQ ID NO:252)、TTTTTTTTTCTGTGGGAAATAATGATGTA(SEQ ID NO:254)、TTTTTTTTTGGAGGATCCAAAGTGGGAAT(SEQ ID NO:256)、TTTTTTTTTGGATCCAAAGTGGGAATT(SEQ ID NO:258)和TTTTTTTTTATGATGTAAAGGAGGATCC(SEQ ID NO:260);

(3)第三探针,其包含选自由以下组成的组的序列:TTTTTTTTCTTCGTATCTCTCAAGAGGAT(SEQ ID NO:482)、TTTTTTTTTGTATCTCTCAAGAGGATCCAA(SEQ ID NO:484)、TTTTTTTTTTCGTATCTCTCAAGAG(SEQ ID NO:486)、TTTTTTTTTCAAGAGGATCCAAA(SEQ ID NO:488)和TTTTTTTTTCTCTCAAGAGG(SEQ ID NO:490);

(4)第四探针,其包含选自由以下组成的组的序列:TTTTTTTTGTTAAAAAGGAGGATCCAA(SEQ ID NO:492)、TTTTTTTTACAAGAGTTAAAAAGGAGGA(SEQ ID NO:494)、TTATTATTAAGAGTTAAAAAGGAGGATC(SEQ ID NO:811)、TTTTTTTTAAAAGGAGGATCCAAAG(SEQ ID NO:498)和TTTTTTTTAAGGAGGATCCAAAGTG(SEQ ID NO:500);和

(5)第五探针,其包含选自由以下组成的组的序列:TTTTTTTAAACAGGAGGATCCAAA(SEQ ID NO:502)、TTTTTATTAAGTGCACAAACAGGAGG(SEQ ID NO:504)、TATTATTATGTGCACAAACAGGAGGATC(SEQ ID NO:506)、TATTTTTTCACAAACAGGAGGAT(SEQ ID NO:508)和TTTTATTTAACAGGAGGATCCAAA(SEQ ID NO:510);

其中所述五种探针中的每一种都与具有不同标识符的微载体偶联。

113.如权利要求103-112中任一项所述的方法,其中对所述RET基因中的一种或多种突变具有特异性的第一引物包含序列GTGATCGCACAGTAGGACAGCGGCTGCGATC(SEQ ID NO:26)或CTCTAGGAGATATCATTCCAAATTCGCCTTCTCCTAG(SEQ ID NO:27)。

114.如权利要求106-113中任一项所述的方法,其中对所述RET基因中的一种或多种突变具有特异性的第二引物包含选自由以下组成的组的序列:TTTCTGGTGCTATGAGGAAATGACCAACCACCAGA(SEQ ID NO:23)、AAGGAGTTAGCAGCATGTCAGC(SEQ ID NO:519)、AACTTCAGACTTTACACAACCTGC(SEQ ID NO:520)和ATTGATTCTGATGACACCGGA(SEQ ID NO:521)。

115.如权利要求79-114中任一项所述的方法,其中所述NTRK1基因中的所述一种或多种突变包括CD74-NTRK1融合基因。

116.如权利要求115所述的方法,其中所述第一引物对CD74基因座的区域具有特异性,并且所述第二引物对NTRK1基因座的区域具有特异性。

117.如权利要求115所述的方法,其中所述第二引物对CD74基因座的区域具有特异性,并且所述第一引物对NTRK1基因座的区域具有特异性。

118.如权利要求115-117中任一项所述的方法,其中所述NTRK1基因中的所述一种或多种突变包括CD74 E8:NTRK1 E12融合基因。

119.如权利要求118所述的方法,其中对所述NTRK1基因中的一种或多种突变具有特异性的探针包含选自由以下组成的组的序列:CAGGATCTGGGCCCAGACA(SEQ ID NO:261)、

GATCTGGGCCCAGACACTA(SEQ ID NO:263)、CCAGACACTAACAGCACAT(SEQ ID NO:265)、GGGCCCAGACACTAACAGC(SEQ ID NO:267)和CTAACAGCACATCTGGAGA(SEQ ID NO:269)。

120.如权利要求119所述的方法,其中所述对所述NTRK1基因中的一种或多种突变具有特异性的探针还包含5'端处的八个核苷酸,并且其中所述5'端处的所述八个核苷酸是腺嘌呤或胸腺嘧啶核苷酸。

121.如权利要求120所述的方法,其中所述对所述NTRK1基因中的一种或多种突变具有特异性的探针包含选自由以下组成的组的序列:TTTTTTTTTTACAGGATCTGGGCCCAGACA(SEQ ID NO:262)、TTTTTTTTTTAGATCTGGGCCCAGACACTA(SEQ ID NO:264)、TTTTTTTTTTACCAGACACTAACAGCACAT(SEQ ID NO:266)、TTTTTTTTTTAGGGCCCAGACACTAACAGC(SEQ ID NO:268)和TTTTTTTTTTACTAACAGCACATCTGGAGA(SEQ ID NO:270)。

122.如权利要求115-120中任一项所述的方法,其中对所述NTRK1基因中的一种或多种突变具有特异性的第一引物包含序列GGACGAAAATCCAGACCCCAAAAGGTGTTTCGT(SEQ ID NO:32)。

123.如权利要求115-122中任一项所述的方法,其中对所述NTRK1基因中的一种或多种突变具有特异性的第二引物包含序列AGAAGACGTGACAGGAACTGGAGGACCCGTCTT(SEQ ID NO:30)。

124.如权利要求79至123中任一项所述的方法,其中所述cMET基因中的所述一种或多种突变导致外显子跳读。

125.如权利要求124所述的方法,其中所述cMET基因中的所述一种或多种突变导致外显子14的跳读。

126.如权利要求125所述的方法,其中对所述cMET基因中的一种或多种突变具有特异性的探针包含选自由以下组成的组的序列:AGAAAGCAAATTAAAGAT(SEQ ID NO:271)、AGCAAATTAAAGATCAG(SEQ ID NO:273)、AAATTAAAGATCAGTTTC(SEQ ID NO:275)、AGATCAGTTTCCTAATTC(SEQ ID NO:277)和AAGATCAGTTTCCTAATT(SEQ ID NO:279)。

127.如权利要求126所述的方法,其中所述对所述cMET基因中的一种或多种突变具有特异性的探针还包含5'端处的八个核苷酸,并且其中所述5'端处的所述八个核苷酸是腺嘌呤或胸腺嘧啶核苷酸。

128.如权利要求127所述的方法,其中所述对所述cMET基因中的一种或多种突变具有特异性的探针包含选自由以下组成的组的序列:TTTTTTTTTTAGAAAGCAAATTAAAGAT(SEQ ID NO:272)、TTTTTTTTTTAGCAAATTAAAGATCAG(SEQ ID NO:274)、TTTTTTTTTTAAATTAAAGATCAGTTTC(SEQ ID NO:276)、TTTTTTTTTTAGATCAGTTTCCTAATTC(SEQ ID NO:278)和TTTTTTTTTTAAGATCAGTTTCCTAATT(SEQ ID NO:280)。

129.如权利要求124-128中任一项所述的方法,其中对所述cMET基因中的一种或多种突变具有特异性的第一引物包含序列GACAGTATTTTGCAGTAATGGACTGGATATATCAGA(SEQ ID NO:29)。

130.如权利要求124-129中任一项所述的方法,其中对所述cMET基因中的一种或多种突变具有特异性的第二引物包含序列GAATTTCACAGGATTGATTGCTGGTGTTGTCTC(SEQ ID NO:28)。

131.如权利要求79-130中任一项所述的方法,其中所述样品是血液、血清或血浆样品。

132.如权利要求131所述的方法，其中在(a)中从所述样品中分离RNA包括从肿瘤条件血小板、肿瘤外泌体和循环肿瘤细胞(CTC)中的一种或多种中分离RNA。

133.如权利要求79-132中任一项所述的方法，其中所述方法还包括：

在(b)中通过逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)由所述分离的RNA扩增阳性对照DNA序列，其中扩增所述阳性对照DNA序列包括：

(1)使用对所述阳性对照序列具有特异性的第一引物、所述分离的RNA、和逆转录酶，由所述分离的RNA生成对所述阳性对照序列具有特异性的cDNA，和

(2)使用对(1)中生成的所述阳性对照序列具有特异性的所述cDNA、DNA聚合酶、所述第一引物、和对所述阳性对照序列具有特异性的第二引物，通过聚合酶链反应(PCR)扩增对所述阳性对照序列具有特异性的DNA，所述第二引物结合与所述对应的第一引物相反的所述cDNA链，并且促进与所述对应的第一引物所促进的方向相反的链延伸；

在(c)中将所述扩增的阳性对照基因序列与对所述阳性对照基因序列具有特异性的探针杂交，其中所述对所述阳性对照基因序列具有特异性的探针与具有对应于阳性对照的标识符的微载体偶联；

在(d)中检测所述扩增的阳性对照DNA序列与所述对所述阳性对照基因序列具有特异性的探针的杂交存在或不存在；和

在(e)中检测所述对应于阳性对照的标识符。

134.如权利要求79-133中任一项所述的方法，其中所述方法还包括：

在(d)中检测所述扩增的DNA与具有对应于阴性对照的标识符的微载体的杂交的不存在，其中所述具有对应于所述阴性对照的所述标识符的微载体包含不与所述扩增的DNA杂交的探针；和

在(e)中检测所述对应于阴性对照的标识符。

135.一种用于检测基因中的突变的存在的方法，所述方法包括：

(a)从样品中分离DNA和RNA；

(b)使用对KRAS、NRAS、PIK3CA、BRAF、EGFR、AKT1、MEK1和HER2基因中的每一个中的一种或多种DNA突变的基因座具有特异性的引物对，通过聚合酶链反应(PCR)扩增所述分离的DNA；

(c)通过逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)由所述分离的RNA扩增DNA，其中由所述分离的RNA扩增所述DNA包括：

(1)使用对所述ALK、ROS、RET、NTRK1和cMET基因中的每一个具有特异性的第一引物、所述分离的RNA和逆转录酶，由所述分离的RNA生成对所述ALK、ROS、RET、NTRK1和cMET基因中的每一个具有特异性的cDNA，和

(2)使用在(c)(1)中生成的所述cDNA、DNA聚合酶、所述第一引物、和对所述ALK、ROS、RET、NTRK1和cMET基因中的每一个具有特异性的第二引物，通过聚合酶链反应(PCR)来扩增对所述ALK、ROS、RET、NTRK1和cMET基因中的每一个具有特异性的DNA，所述第二引物结合至与所述对应的第一引物相反的所述cDNA链，并且促进与所述对应的第一引物所促进的方向相反的链延伸；

(d)将在(b)中通过PCR扩增的所述DNA与至少七种探针杂交，所述至少七种探针包含对KRAS、NRAS、PIK3CA、BRAF、EGFR、AKT1、MEK1和HER2基因中的每一个中的突变具有特异性的

一种或多种探针,其中所述至少七种探针中的每一种与微载体偶联,并且其中所述微载体中的每一种包含对应于与其偶联的所述探针的标识符;

(e)检测在(b)中通过PCR扩增的所述DNA与所述至少七种探针的杂交存在或不存在,其中所述扩增的DNA与所述探针之一的杂交表明对应于所述探针的所述突变的存在;

(f)将在(c)中通过RT-PCR扩增的所述DNA与至少五种探针杂交,所述至少五种探针包含对所述ALK、ROS、RET、NTRK1和cMET基因中的每一个中的突变具有特异性的一种或多种探针,其中所述至少五种探针中的每一种与微载体偶联,并且其中所述微载体中的每一种包含对应于与其偶联的所述探针的标识符;

(g)检测在(c)中通过RT-PCR扩增的所述DNA与所述至少五种探针的杂交存在或不存在,其中所述扩增的DNA与所述探针之一的杂交表明对应于所述探针的所述突变的存在;

(h)检测所述微载体的标识符;和

(i)将所述微载体的检测到的标识符与在(e)和(g)中检测到的所述扩增的DNA与所述微载体的对应探针的杂交存在或不存在相关联。

136.如权利要求135所述的方法,其中(a)包括:

通过离心所述样品来分离富含总RNA的血浆(TRRP),其中所述样品包括全血或血浆;

对所述TRRP进行一个或多个离心步骤以生成RNA级分和细胞游离DNA(cfDNA)级分,其中所述RNA级分包含以下中的一种或多种:血小板、白细胞、外泌体、循环肿瘤细胞和游离RNA;

从所述cfDNA级分中分离DNA;和

从所述RNA级分中分离RNA。

137.如权利要求1-136中任一项所述的方法,其中所述引物对中的每一种包含与检测试剂偶联的引物。

138.如权利要求137所述的方法,其中所述检测试剂包括荧光检测试剂,并且其中在(d)中检测所述扩增的DNA与所述探针的杂交存在或不存在包括所述荧光检测试剂的荧光成像。

139.如权利要求137所述的方法,其中所述检测试剂包含生物素,并且其中在步骤(d)中检测所述扩增的DNA与所述探针的杂交存在或不存在包括:

(1)在(c)中杂交后,将所述微载体与缀合至信号发射实体的链霉亲和素接触;和

(2)检测来自与所述微载体缔合的所述信号发射实体的信号。

140.如权利要求139所述的方法,其中所述信号发射实体包括藻红蛋白(PE)。

141.如权利要求1-140中任一项所述的方法,其中在(e)中检测所述微载体的标识符包括所述标识符的明场成像。

142.如权利要求1-141中任一项所述的方法,其中所述微载体的标识符包括数字条形码。

143.如权利要求142所述的方法,其中所述微载体中的每一种包含:

(i)第一光聚合物层;

(ii)第二光聚合物层;和

(iii)所述第一层和所述第二层之间的中间层,所述中间层具有表示限定在其上的所述标识符的编码图案,其中所述中间层部分基本地可透光并且部分基本地不透光,这表示

对应于所述微载体的代码，其中所述微载体的最外表面包含光致抗蚀剂光致聚合物，并且所述光致抗蚀剂光致聚合物被所述对所述DNA突变具有特异性的探针官能化，并且其中所述微载体具有与水大概相同的密度。

144.如权利要求1-141中任一项所述的方法，其中所述微载体的标识符包括模拟代码。

145.如权利要求144所述的方法，其中所述微载体中的每一种包含：

(i)具有第一表面和第二表面的基本透明聚合物层，所述第一表面和所述第二表面彼此平行；

(ii)构成二维形状的基本不透明层，其中所述基本不透明层附接到所述基本透明聚合物层的第一表面并且包围所述基本透明聚合物层的中心部分，其中所述基本不透明层的二维形状表示模拟代码，并且其中所述模拟码对应于所述标识符；和

(iii)对所述突变具有特异性的所述探针，其中所述探针在所述基本透明聚合物层的至少所述中心部分中与所述基本透明聚合物层的第一表面和第二表面中的至少一个偶联。

146.如权利要求145所述的方法，其中所述微载体中的每一种还包含用于定向所述基本不透明聚合物层的模拟代码的定向指示器。

147.如权利要求145或权利要求146所述的方法，其中所述基本透明聚合物层的聚合物包括环氧基聚合物。

148.如权利要求147所述的方法，其中所述环氧基聚合物是SU-8。

149.一种包括至少七种微载体的试剂盒，其中所述至少七种微载体中的每一种包含：

(i)与所述微载体偶联的探针，其中所述探针对KRAS、PIK3CA、BRAF、EGFR、AKT1、MEK1或HER2基因中的DNA突变具有特异性；和

(ii)对应于与其偶联的所述探针的标识符；

其中所述试剂盒包括：包含对所述KRAS基因中的DNA突变具有特异性的探针的至少一种微载体、包含对所述PIK3CA基因中的DNA突变具有特异性的探针的至少一种微载体、包含对所述BRAF基因中的DNA突变具有特异性的探针的至少一种微载体、包含对所述EGFR基因中的DNA突变具有特异性的探针的至少一种微载体、包含对所述AKT1基因中的DNA突变具有特异性的探针的至少一种微载体、包含对所述MEK1基因中的DNA突变具有特异性的探针的至少一种微载体、和包含对所述HER2基因中的DNA突变具有特异性的探针的至少一种微载体；和

其中所述KRAS、NRAS、PIK3CA、BRAF、EGFR、AKT1、MEK1和HER2基因是人基因。

150.如权利要求149所述的试剂盒，其还包括：

至少七种阻断核酸，其中所述至少七种阻断核酸中的每一种与对应于所述KRAS、PIK3CA、BRAF、EGFR、AKT1、MEK1或HER2基因中的所述DNA突变之一的野生型DNA基因座杂交，并且防止所述野生型DNA基因座的扩增。

151.如权利要求150所述的试剂盒，其中所述至少七种阻断核酸中的每一种包含：

与所述对应的野生型DNA基因座杂交的单链寡核苷酸；和

阻断从所述单链寡核苷酸延伸的3'末端部分。

152.如权利要求151所述的试剂盒，其中所述3'末端部分包含一个或多个反向脱氧胸苷。

153.如权利要求149-152中任一项所述的试剂盒，其中所述至少七种阻断核酸中的每

一种都包含一种或多种选自由以下组成的组的经修饰的核苷酸:锁核酸(LNA)、肽核酸(PNA)、己糖核酸(HNA)、苏糖核酸(TNA)、乙二醇核酸(GNA)和环己烯基核酸(CeNA)。

154.如权利要求149-153中任一项所述的试剂盒,其中所述KRAS基因中的所述DNA突变包括一种或多种编码G12D、G12V或G12C突变的KRAS蛋白的DNA突变。

155.如权利要求154所述的试剂盒,其中所述KRAS基因中的所述DNA突变包括编码G12D、G12V和G12C突变的KRAS蛋白的DNA突变。

156.如权利要求155所述的试剂盒,其中对所述KRAS基因中的所述DNA突变具有特异性的探针包括:

(1)第一探针,其包含选自由以下组成的组的序列:TAGTTGGAGCT(SEQ ID NO:38)、TGTGGTAGTTG(SEQ ID NO:40)、TGATGGCGTAG(SEQ ID NO:42)、TGGAGCTGATGGC(SEQ ID NO:44)和GCGTAGGCAAG(SEQ ID NO:46);

(2)第二探针,其包含选自由以下组成的组的序列:CTGTTGGCGTAGG(SEQ ID NO:48)、GTAGTTGGAGCTG(SEQ ID NO:50)、TGGAGCTGTTGGC(SEQ ID NO:52)、TTGTGGTAGTTGG(SEQ ID NO:54)和GGCGTAGGCAAGA(SEQ ID NO:56);和

(3)第三探针,其包含选自由以下组成的组的序列:TAGTTGGAGCTT(SEQ ID NO:58)、GCGTAGGCAAGA(SEQ ID NO:60)、GGAGCTTGTGGC(SEQ ID NO:62)、TTGTGGCGTAGG(SEQ ID NO:64)和TGTGGTAGTTGG(SEQ ID NO:66);

其中所述三种探针中的每一种都与具有不同标识符的微载体偶联。

157.如权利要求156所述的试剂盒,其中所述三种探针中的每一种还包含5'端处的八个核苷酸,并且其中所述5'端处的所述八个核苷酸是腺嘌呤或胸腺嘧啶核苷酸。

158.如权利要求157所述的试剂盒,其中所述对所述KRAS基因中的所述DNA突变具有特异性的探针包括:

(1)第一探针,其包含选自由以下组成的组的序列:TTTTTTTTTTTTAATAGTTGGAGCT(SEQ ID NO:39)、TTTTTTTTTTTTAATGTGGTAGTTG(SEQ ID NO:41)、TTTTTTTTTTTTAATGATGGCGTAG(SEQ ID NO:43)、TTTTTTTTTTTTATGGAGCTGATGGC(SEQ ID NO:45)和TTTTTTTTTTTTAAGCGTAGGCAAG(SEQ ID NO:47);

(2)第二探针,其包含选自由以下组成的组的序列:TTTTTTTTTTTACTGTTGGCGTAGG(SEQ ID NO:49)、TTTTTTTTTTTAGTAGTTGGAGCTG(SEQ ID NO:51)、TTTTTTTTTTTATGGAGCTGTTGGC(SEQ ID NO:53)、TTTTTTTTTTTATTGTGGTAGTTGG(SEQ ID NO:55)和TTTTTTTTTTTAGGCGTAGGCAAGA(SEQ ID NO:57);和

(3)第三探针,其包含选自由以下组成的组的序列:TTTTTTTTTTTAATAGTTGGAGCTT(SEQ ID NO:59)、TTTTTTTTTTTAAGCGTAGGCAAGA(SEQ ID NO:61)、TTTTTTTTTTTAAGGAGCTTGTGGC(SEQ ID NO:63)、TTTTTTTTTTTTAATTGTGGCGTAGG(SEQ ID NO:65)和TTTTTTTTTTTAATGTGGTAGTTGG(SEQ ID NO:67);

其中所述三种探针中的每一种都与具有不同标识符的微载体偶联。

159.如权利要求154-158中任一项所述的试剂盒,其还包括引物对,所述引物对包含序列GTACTGGTGGAGTATTTGATAGTG(SEQ ID NO:1)和CGTCAAGGCACTCTTGCCTAC(SEQ ID NO:2)。

160.如权利要求154-159中任一项所述的试剂盒,其还包括与对应于所述KRASDNA突变之一的野生型KRASDNA基因座杂交并且防止所述野生型KRASDNA基因座扩增的阻断核酸,并

且其中所述阻断核酸包含序列TACGCCACCAGCT(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:281);TTGGAGCTGGTGGCGTA(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:282);GCTGGTGGCGTAGGCA(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:283);GCTGGTGGCGTAGGC(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:284);或TTGGAGCTGGTGGCGT(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:285);斜体的核酸表示锁核酸。

161.如权利要求149-160中任一项所述的试剂盒,其中所述PIK3CA基因中的所述DNA突变包括一种或多种编码E542K或E545K突变的PIK3CA蛋白的DNA突变。

162.如权利要求161所述的试剂盒,其中所述PIK3CA基因中的所述DNA突变包括编码E542K和E545K突变的PIK3CA蛋白的DNA突变。

163.如权利要求162所述的试剂盒,其中对所述PIK3CA基因中的所述DNA突变具有特异性的探针包括:

(1)第一探针,其包含选自由以下组成的组的序列:GCTCAGTGATTTTAG(SEQ ID NO:87)、TGCTCAGTGATTTT(SEQ ID NO:89)、GCTCAGTGATTTTAG(SEQ ID NO:91)、CCTGCTCAGTGATTTTA(SEQ ID NO:93)和CTCAGTGATTTTAGA(SEQ ID NO:95);和

(2)第二探针,其包含选自由以下组成的组的序列:TTCTCCTGCTTA(SEQ ID NO:97)、CTCCTGCTTAGT(SEQ ID NO:99)、TCTCCTGCTTAG(SEQ ID NO:101)、TCCTGCTTAGTG(SEQ ID NO:103)和CTCCTGCTTAGTGA(SEQ ID NO:105);

其中所述两种探针中的每一种都与具有不同标识符的微载体偶联。

164.如权利要求163所述的试剂盒,其中所述两种探针中的每一种还包含5'端处的八个核苷酸,并且其中所述5'端处的所述八个核苷酸是腺嘌呤或胸腺嘧啶核苷酸。

165.如权利要求164所述的试剂盒,其中所述对所述PIK3CA基因中的所述DNA突变具有特异性的探针包括:

(1)第一探针,其包含选自由以下组成的组的序列:TTTTTTTTTAGCTCAGTGATTTTAG(SEQ ID NO:88)、TTTTTTTTTGCTCAGTGATTTT(SEQ ID NO:90)、TTTTTTTTTAGCTCAGTGATTTTAG(SEQ ID NO:92)、TTTTTTTCCTGCTCAGTGATTTTA(SEQ ID NO:94)和TTTTTTTTTTTTCTCAGTGATTTTAGA(SEQ ID NO:96);和

(2)第二探针,其包含选自由以下组成的组的序列:TTTTTTTTTTTTTCTCCTGCTTA(SEQ ID NO:98)、TTTTTTTTTTTTTCTCCTGCTTAGT(SEQ ID NO:100)、TTTTTTTTTTTATCTCCTGCTTAG(SEQ ID NO:102)、TTTTTTTTTTTTTTTTCCTGCTTAGTG(SEQ ID NO:104)和TTTTTTTTTTTTTCTCCTGCTTAGTGA(SEQ ID NO:106);

其中所述三种探针中的每一种都与具有不同标识符的微载体偶联。

166.如权利要求161-165中任一项所述的试剂盒,其还包括引物对,所述引物对包含序列CAATTTCTACAAGAGATCCTCTCTCT(SEQ ID NO:5)和CTCCATTTTAGCACTTACCTGTGAC(SEQ ID NO:6)。

167.如权利要求161-166中任一项所述的试剂盒,其还包括与对应于所述PIK3CA DNA突变之一的野生型PIK3CA DNA基因座杂交并且防止所述野生型PIK3CA DNA基因座扩增的阻断核酸,并且所述阻断核酸包含序列CTGAAATCACTGAGCAGG(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:291);TCTCTGAAATCACTGAGCAGG(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:292);TCTCTGAAATCACTGAGCAGG(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:293);

TCTCTGAAATCACTGAGCAGG(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:294);或TCTCTGAATTCACTGAGCAGG(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:295);斜体的核酸表示锁核酸。

168.如权利要求149-167中任一项所述的试剂盒,其中所述PIK3CA基因中的所述DNA突变包括编码H1047R突变的PIK3CA蛋白的DNA突变。

169.如权利要求168所述的试剂盒,其中所述对所述PIK3CA基因中的所述DNA突变具有特异性的探针包含选自由以下组成的组的序列:GATGCACGTCATG(SEQ ID NO:107)、TGAATGATGCACG(SEQ ID NO:109)、TGATGCACGTC(SEQ ID NO:111)、AATGATGCACGTCA(SEQ ID NO:113)和AATGATGCACGTC(SEQ ID NO:115)。

170.如权利要求169所述的试剂盒,其中所述探针还包含5'端处的八个核苷酸,并且其中所述5'端处的所述八个核苷酸是腺嘌呤或胸腺嘧啶核苷酸。

171.如权利要求170所述的试剂盒,其中所述对所述PIK3CA基因中的所述DNA突变具有特异性的探针包含选自由以下组成的组的序列:TTTTTTTTTTTTTTGATGCACGTCATG(SEQ ID NO:108)、TTTTTTTTTTGAATGATGCACG(SEQ ID NO:110)、TTTTTTTTTTTTGATGCACGTC(SEQ ID NO:112)、TTTTTTTTTTTAATGATGCACGTCA(SEQ ID NO:114)和TTTTTTTTTTTTAATGATGCACGTC(SEQ ID NO:116)。

172.如权利要求168-171中任一项所述的试剂盒,其还包括引物对,所述引物对包含序列ACCCTAGCCTTAGATAAAACTGAGC(SEQ ID NO:7)和TTTGTTGTCCAGCCACCATGA(SEQ ID NO:8)。

173.如权利要求168-172中任一项所述的试剂盒,其还包括与对应于所述PIK3CA DNA突变之一的野生型PIK3CA DNA基因座杂交并且防止所述野生型PIK3CA DNA基因座扩增的阻断核酸,并且其中所述阻断核酸包含序列CACCATGATGTGCAT(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:296);CCACCATGATGTGCAT(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:297);CACCATGATGTGCAT(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:298);CCACCATGATGTGCATCA(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:299);或CATGATGTGCA(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:300);斜体的核酸表示锁核酸。

174.如权利要求149-173中任一项所述的试剂盒,其中所述BRAF基因中的所述DNA突变包括编码V600E突变的BRAF蛋白的DNA突变。

175.如权利要求174所述的试剂盒,其中对所述BRAF基因中的所述DNA突变具有特异性的探针包含选自由以下组成的组的序列:TTTGGTCTAGCTACAGA(SEQ ID NO:79)、CTACAGAGAAATCTCGA(SEQ ID NO:81)、GTGATTTTGGTCTAGCT(SEQ ID NO:83)和TCTAGCTACAGAGAAAT(SEQ ID NO:85)。

176.如权利要求175所述的试剂盒,其中所述对所述BRAF基因中的一种或多种DNA突变具有特异性的探针还包含5'端处的八个核苷酸,并且其中所述5'端处的所述八个核苷酸是腺嘌呤或胸腺嘧啶核苷酸。

177.如权利要求176所述的试剂盒,其中所述对所述BRAF基因中的所述DNA突变具有特异性的探针包含选自由以下组成的组的序列:TTTTTTAATTGAGAAATCTCGATGGAG(SEQ ID NO:78)、TTTTTTAATTTTTGGTCTAGCTACAGA(SEQ ID NO:80)、TTTTTTAATTCTACAGAGAAATCTCGA(SEQ ID NO:82)、TTTTTTAATTGTGATTTTGGTCTAGCT(SEQ ID NO:84)和TTTTTTAATTTCTAGCTACAGAGAAAT(SEQ ID NO:86)。

178.如权利要求174-177中任一项所述的试剂盒,其还包括引物对,所述引物对包含序列ATAGCCTCAATTCTTACCATCCACAAAATG(SEQ ID NO:9)和CAGATATATTTCTTCATGAAGACCTCACAGTAA(SEQ ID NO:10)。

179.如权利要求174-178中任一项所述的试剂盒,其还包括与对应于所述BRAF DNA突变的野生型BRAF DNA基因座杂交并且防止所述野生型BRAF DNA基因座扩增的阻断核酸,并且其中所述阻断核酸包含序列GAGATTTCACTGTAGC(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:301);GAGATTTCACTGTAGC(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:302);GAGATTTCACTGTAGC(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:303);GAGATTTCACTGTAGC(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:304);或GAGATTTCACTGTAGC(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:305);斜体的核酸表示锁核酸。

180.如权利要求149-179中任一项所述的试剂盒,其中所述EGFR基因中的所述DNA突变包括编码G719A突变的EGFR蛋白的DNA突变。

181.如权利要求180所述的试剂盒,其中对所述EGFR基因中的所述DNA突变具有特异性的探针包含选自由以下组成的组的序列:TCAAAGTGCTGGCCTC(SEQ ID NO:117)、AGATCAAAGTGCTGGCCTCCG(SEQ ID NO:119)、AAAGTGCTGGCCT(SEQ ID NO:121)、AGTGCTGGCCT(SEQ ID NO:123)和AAGTGCTGGCCTC(SEQ ID NO:125)。

182.如权利要求181所述的试剂盒,其中所述对所述EGFR基因中的所述DNA突变具有特异性的探针还包含5'端处的八个核苷酸,并且其中所述5'端处的所述八个核苷酸是腺嘌呤或胸腺嘧啶核苷酸。

183.如权利要求182所述的试剂盒,其中所述对所述EGFR基因中的所述DNA突变具有特异性的探针包含选自由以下组成的组的序列:TTTTTTTTTTCAAAGTGCTGGCCTC(SEQ ID NO:118)、TTTTTTAGATCAAAGTGCTGGCCTCCG(SEQ ID NO:120)、TTTTTTTTTTTAAAGTGCTGGCCT(SEQ ID NO:122)、TTTTTTTTTTTTTAGTGCTGGCCT(SEQ ID NO:124)和TTTTTTTTTTTTTAAGTGCTGGCCTC(SEQ ID NO:126)。

184.如权利要求180-183中任一项所述的试剂盒,其还包括引物对,所述引物对包含序列CTTGTGGAGCCTCTTACACCC(SEQ ID NO:11)和TGCCGAACGCACCGGA(SEQ ID NO:12)。

185.如权利要求180-184中任一项所述的试剂盒,其还包括与对应于所述EGFR DNA突变的野生型EGFR DNA基因座杂交并且防止所述野生型EGFR DNA基因座扩增的阻断核酸,并且其中所述阻断核酸包含序列CGGAGCCCAGCACTTTGA(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:306);CGCACCGGAGCCCAGCACT(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:307);GAGCCCAGCAC(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:308);CGCACCGGAGCCCAGCAC(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:309);或CGCACCGGAGCCCAGCACTTA(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:310);斜体的核酸表示锁核酸。

186.如权利要求149-185中任一项所述的试剂盒,其中所述EGFR基因中的所述DNA突变包括编码E746_A750del突变的EGFR蛋白的DNA突变。

187.如权利要求186所述的试剂盒,其中对所述EGFR基因中的所述DNA突变具有特异性的探针包括:

(1)第一探针,其包含选自由以下组成的组的序列:AATCAAAACATCTCCGAAAG(SEQ ID NO:128)、CAAAACATCTCCG(SEQ ID NO:130)、AACATCTCCG(SEQ ID NO:132)和

AAACATCTCCGAAAGCC(SEQ ID NO:134);和

(2)第二探针,其包含选自由以下组成的组的序列:AATCAAGACATCTCCGA(SEQ ID NO:136)、GCAATCAAGACATCTCCGA(SEQ ID NO:138)、AATCAAGACATCTC(SEQ ID NO:140)、AATCAAGACATCTCCGAAAGC(SEQ ID NO:142)和CAAGACATCTCCGA(SEQ ID NO:144);

其中所述两种探针中的每一种都与具有不同标识符的微载体偶联。

188.如权利要求187所述的试剂盒,其中所述两种探针中的每一种还包含5'端处的八个核苷酸,并且其中所述5'端处的所述八个核苷酸是腺嘌呤或胸腺嘧啶核苷酸。

189.如权利要求188所述的试剂盒,其中所述对所述EGFR基因中的所述DNA突变具有特异性的探针包括:

(1)第一探针,其包含选自由以下组成的组的序列:TTTTTTTTTAATCAAAACATCTCCG(SEQ ID NO:127)、TTTTTTTTTAATCAAAACATCTCCGAAAG(SEQ ID NO:129)、TTTTTTTTTTTACAAAACATCTCCG(SEQ ID NO:131)、TTTTTTTTTTTTTTTAACATCTCCG(SEQ ID NO:133)和TTTTTTTTTTTTTTAAACATCTCCGAAAGCC(SEQ ID NO:135);和

(2)第二探针,其包含选自由以下组成的组的序列:TTTTTTTTAATCAAGACATCTCCGA(SEQ ID NO:137)、TTTTTTGCAATCAAGACATCTCCGA(SEQ ID NO:139)、TTTTTTTTAATCAAGACATCTC(SEQ ID NO:141)、TTTTTTTTAATCAAGACATCTCCGAAAGC(SEQ ID NO:143)和TTTTTTTTTTTCAAGACATCTCCGA(SEQ ID NO:145);

其中所述两种探针中的每一种都与具有不同标识符的微载体偶联。

190.如权利要求186-189中任一项所述的试剂盒,其还包括引物对,所述引物对包含序列GCCAGTTAACGTCTTCCTTCTC(SEQ ID NO:13)和ATCGAGGATTTCCTTGTTGGCTT(SEQ ID NO:14)。

191.如权利要求186-190中任一项所述的试剂盒,其还包括与对应于所述EGFR DNA突变的野生型EGFR DNA基因座杂交并且防止所述野生型EGFR DNA基因座扩增的阻断核酸,并且其中所述阻断核酸包含序列CGGAGATGTTGCTTCTCTTAATTCC(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:311);CGGAGATGTTGCTTCTCT(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:312);GTTGCTTCTCTTAATTCC(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:313);ATGTTGCTTCTCT(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:314);或TTGCTTCTCTTA(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:315);斜体的核酸表示锁核酸。

192.如权利要求149-191中任一项所述的试剂盒,其中所述EGFR基因中的所述DNA突变包括一种或多种编码T790M、C797S、S768I、V769_D770insASV、H773_V774insH、D770_N771insG或D770_N771insSVD突变的EGFR蛋白的DNA突变。

193.如权利要求192所述的试剂盒,其中所述EGFR基因中的所述DNA突变包括编码T790M、C797S、S768I、V769_D770insASV、H773_V774insH、D770_N771insG和D770_N771insSVD突变的EGFR蛋白的DNA突变。

194.如权利要求193所述的试剂盒,其中所述对所述EGFR基因中的所述DNA突变具有特异性的探针包括:

(1)第一探针,其包含选自由以下组成的组的序列:GAGATGCATGATGA(SEQ ID NO:146)、TGAGATGCATGATGAG(SEQ ID NO:147)、ATGAGATGCATGATGAG(SEQ ID NO:148)、TGAGCTGCATGATGA(SEQ ID NO:149)和CATGAGATGCATGATGA(SEQ ID NO:150);

(2)第二探针,其包含选自由以下组成的组的序列:CCAGGAGGCTGCCG(SEQ ID NO:461)、CAGGAGGCTGCCGA(SEQ ID NO:463)、TCCAGGAGGCTGCC(SEQ ID NO:465)、CCAGGAGGCTGCC(SEQ ID NO:467)和CAGGAGGCTGCC(SEQ ID NO:469);

(3)第三探针,其包含选自由以下组成的组的序列:CCAGGAGGGAGCC(SEQ ID NO:471)、CCAGGAGGGAGCCG(SEQ ID NO:473)、TCCAGGAGGGAGCC(SEQ ID NO:475)、CAGGAGGGAGCCG(SEQ ID NO:477)和CAGGAGGGAGCCGA(SEQ ID NO:479);

(4)第四探针,其包含选自由以下组成的组的序列:ATGGCCATCTTGG(SEQ ID NO:421)、GGCCATCTTGGA(SEQ ID NO:423)、GATGGCCATCTTG(SEQ ID NO:425)、TGATGGCCATCTTG(SEQ ID NO:427)和TGGCCATCTTGG(SEQ ID NO:429);

(5)第五探针,其包含选自由以下组成的组的序列:GTGATGGCCGG(SEQ ID NO:431)、TGATGGCCGGCG(SEQ ID NO:433)、GTGATGGCCGGCGT(SEQ ID NO:435)、GATGGCCGGCGT(SEQ ID NO:437)和GATGGCCCGCGTG(SEQ ID NO:439);

(6)第六探针,其包含选自由以下组成的组的序列:AACCCCCATCACGT(SEQ ID NO:441)、GACAACCCCCATCACG(SEQ ID NO:443)、CGTGGACAACCCCCATCA(SEQ ID NO:445)、CCCATCACGTGT(SEQ ID NO:447)和TGGACAACCCCCATCAC(SEQ ID NO:449);和

(7)第七探针,其包含选自由以下组成的组的序列:GCCAGCGTGGACGG(SEQ ID NO:451)、CGTGGACGGTAACC(SEQ ID NO:453)、GACGGTAACCCCC(SEQ ID NO:455)、CCAGCGTGGACGGT(SEQ ID NO:457)和GCCAGCGTGGACGGTA(SEQ ID NO:459);

其中所述七种探针中的每一种都与具有不同标识符的微载体偶联。

195.如权利要求194所述的试剂盒,其中对所述EGFR基因中的所述DNA突变具有特异性的七种探针中的每一种还包含5'端处的八个核苷酸,并且其中所述5'端处的所述八个核苷酸是腺嘌呤或胸腺嘧啶核苷酸。

196.如权利要求195所述的试剂盒,其中所述对所述EGFR基因中的所述DNA突变具有特异性的探针包括:

(1)第一探针,其包含选自由以下组成的组的序列:TTTTTTTTTTGAGATGCATGATGA(SEQ ID NO:352)、TTTTTTTTTGAGATGCATGATGAG(SEQ ID NO:353)、TTTTTTTATGAGATGCATGATGAG(SEQ ID NO:354)、TTTTTTTTTTGAGCTGCATGATGA(SEQ ID NO:355)和TTTTTTTCATGAGATGCATGATGA(SEQ ID NO:356);

(2)第二探针,其包含选自由以下组成的组的序列:TTTTTTTTTTACCAGGAGGCTGCCG(SEQ ID NO:462)、TTTTTTTTTTACAGGAGGCTGCCGA(SEQ ID NO:464)、TTTTTTTTTTATCCAGGAGGCTGCC(SEQ ID NO:466)、TTTTTTTTTTACCAGGAGGCTGCC(SEQ ID NO:468)和TTTTTTTTTTACAGGAGGCTGCC(SEQ ID NO:470);

(3)第三探针,其包含选自由以下组成的组的序列:TTTTTTTTTTACCAGGAGGGAGCC(SEQ ID NO:472)、TTTTTTTTTTACCAGGAGGGAGCCG(SEQ ID NO:474)、TTTTTTTTTTATCCAGGAGGGAGCC(SEQ ID NO:476)、TTTTTTTTTTACAGGAGGGAGCCG(SEQ ID NO:478)和TTTTTTTTTTACAGGAGGGAGCCGA(SEQ ID NO:480);

(4)第四探针,其包含选自由以下组成的组的序列:TTTTTTTTATGGCCATCTTGG(SEQ ID NO:422)、TTTTTTTTTAGGCCATCTTGGA(SEQ ID NO:424)、TTTTTTAGATGGCCATCTTG(SEQ ID NO:426)、TTTTTTTGATGGCCATCTTG(SEQ ID NO:428)和TTTTTTTTTTGGCCATCTTGG(SEQ ID

NO:430)；

(5)第五探针，其包含选自由以下组成的组的序列：TTTTTTTTTTGTGATGGCCGG(SEQ ID NO:432)、TTTTTTTTTTTTGATGGCCGGCG(SEQ ID NO:434)、TTTTTTTTTTGTGATGGCCGGCGT(SEQ ID NO:436)、TTTTTTTTTTTTTGATGGCCGGCGT(SEQ ID NO:438)和TTTTTTTTTTTTGATGGCCCGCGTG(SEQ ID NO:440)；

(6)第六探针，其包含选自由以下组成的组的序列：TTTTTTTTTTAACCCCCATCACGT(SEQ ID NO:442)、TTTTTTTGACAACCCCCATCACG(SEQ ID NO:444)、TTTTCGTGGACAACCCCCATCA(SEQ ID NO:446)、TTTTTTTTTTTCCCATCACGTGT(SEQ ID NO:448)和TTTTTTTTGGACAACCCCCATCAC(SEQ ID NO:450)；和

(7)第七探针，其包含选自由以下组成的组的序列：TTTTTTTTTTGCCAGCGTGGACGG(SEQ ID NO:452)、TTTTTTTTTTCGTGGACGGTAACC(SEQ ID NO:454)、TTTTTTTTTTGACGGTAACCCCC(SEQ ID NO:456)、TTTTTTTTTTCCAGCGTGGACGGT(SEQ ID NO:458)和TTTTTTGCCAGCGTGGACGGTA(SEQ ID NO:460)；

其中所述七种探针中的每一种都与具有不同标识符的微载体偶联。

197.如权利要求192-196中任一项所述的试剂盒，其还包括：包含序列CCTCCACCGTGCAGATCATC(SEQ ID NO:15)和TTCCCTGATTACCTTTGCGAT(SEQ ID NO:16)的引物对；包含序列CCACACTGACGTGCCTCT(SEQ ID NO:511)和GCACACGTAGGGGTTGTCCAAGA(SEQ ID NO:512)的引物对；包含序列CCACACTGACGTGCCTCT(SEQ ID NO:513)和GTACACGCTGGCCACGCCG(SEQ ID NO:514)的引物对；包含序列CCACACTGACGTGCCTCT(SEQ ID NO:515)和CAGGCGGCACACGTGAT(SEQ ID NO:516)的引物对；和/或包含序列CCACACTGACGTGCCTCT(SEQ ID NO:517)和AGGCGGCACACGTGCGGGTTAC(SEQ ID NO:518)的引物对。

198.如权利要求192-197中任一项所述的试剂盒，其还包括与对应于所述EGFR DNA突变的野生型EGFR DNA基因座杂交并且防止所述野生型EGFR DNA基因座扩增的阻断核酸，并且其中所述阻断核酸包含序列CATCACGCAGCTCATG(invdT)$_n$，其中n为1、2或3(SEQ ID NO:316)；TGCAGCTCATCACGCAGC(invdT)$_n$，其中n为1、2或3(SEQ ID NO:317)；TCATCACGCAGCTCAT(invdT)$_n$，其中n为1、2或3(SEQ ID NO:318)；TCATCACGCAGC(invdT)$_n$，其中n为1、2或3(SEQ ID NO:319)；或CTCATCACGCAGC(invdT)$_n$，其中n为1、2或3(SEQ ID NO:320)；斜体的核酸表示锁核酸。

199.如权利要求149-198中任一项所述的试剂盒，其中所述EGFR基因中的所述DNA突变包括编码L858R突变的EGFR蛋白的DNA突变。

200.如权利要求199所述的试剂盒，其中所述对所述EGFR基因中的所述DNA突变具有特异性的探针包含选自由以下组成的组的序列：ATTTTGGGCGGGCC(SEQ ID NO:151)、TTGGGCGGGCCAAA(SEQ ID NO:153)、GCGGGCCAAACT(SEQ ID NO:155)、GGGCGGGCCAAACT(SEQ ID NO:157)和TGGGCGGGCCA(SEQ ID NO:159)。

201.如权利要求200所述的试剂盒，其中所述探针还包含5'端处的八个核苷酸，并且其中所述5'端处的所述八个核苷酸是腺嘌呤或胸腺嘧啶核苷酸。

202.如权利要求201所述的试剂盒，其中所述对所述EGFR基因中的所述DNA突变具有特异性的探针包含选自由以下组成的组的序列：TTTTTTTATTTTGGGCGGGCC(SEQ ID NO:152)、

TTTTTTTTAATTGGGCGGGCCAAA(SEQ ID NO:154)、TTTTTTTAAAAAAGCGGGCCAAACT(SEQ ID NO:156)、TTTTTTTTAAAAGGGCGGGCCAAACT(SEQ ID NO:158)和TTTTTTTTTAAATGGGCGGGCCA(SEQ ID NO:160)。

203.如权利要求199-202中任一项所述的试剂盒,其还包括引物对,所述引物对包含序列GGAGGACCGTCGCTTGG(SEQ ID NO:17)和TCTTTCTCTTCCGCACCCAG(SEQ ID NO:18)。

204.如权利要求199-203中任一项所述的试剂盒,其还包括与对应于所述EGFR DNA突变的野生型EGFR DNA基因座杂交并且防止所述野生型EGFR DNA基因座扩增的阻断核酸,并且其中所述阻断核酸包含序列CCAGCAGTTTGGCCAGCCCT(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:321);CCAGCAGTTTGGCCAGCCCT(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:322);CCAGCAGTTTGGCCAGCCCT(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:323);AGCAGTTTGGCCAGCC(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:324);或CCAGCAGTTTGGCCAGCCCT(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:325);斜体的核酸表示锁核酸。

205.如权利要求149-204中任一项所述的试剂盒,其中所述AKT1基因中的所述DNA突变包括编码E17K突变的AKT1蛋白的DNA突变。

206.如权利要求205所述的试剂盒,其中对所述AKT1基因中的所述DNA突变具有特异性的探针包含选自由以下组成的组的序列:TGTAGGGAAGTACA(SEQ ID NO:370)、TCTGTAGGGAAGTAC(SEQ ID NO:372)、GTCTGTAGGGAAGTACAT(SEQ ID NO:374)、CCGCACGTCTGTAGGGA(SEQ ID NO:376)和ACGTCTGTAGGGAAGTA(SEQ ID NO:378)。

207.如权利要求206所述的试剂盒,其中所述对所述AKT1基因中的所述DNA突变具有特异性的探针还包含5'端处的七个核苷酸,并且其中所述5'端处的所述七个核苷酸是腺嘌呤或胸腺嘧啶核苷酸。

208.如权利要求207所述的试剂盒,其中所述对所述AKT1基因中的所述DNA突变具有特异性的探针包含选自由以下组成的组的序列:TTTTTTTTTTTTTTGTAGGGAAGTACA(SEQ ID NO:371)、TTTTTTTTTTTTCTGTAGGGAAGTAC(SEQ ID NO:373)、TTTTTTGTCTGTAGGGAAGTACAT(SEQ ID NO:375)、TTTTTTTCCGCACGTCTGTAGGGA(SEQ ID NO:377)和TTTTTTTTACGTCTGTAGGGAAGTA(SEQ ID NO:379)。

209.如权利要求205-208中任一项所述的试剂盒,其还包括引物对,所述引物对包含序列GAGGGTCTGACGGGTAGAGTG(SEQ ID NO:380)和TGGCCGCCAGGTCTTGATGTA(SEQ ID NO:381)。

210.如权利要求205-209中任一项所述的试剂盒,其还包括与对应于所述AKT1 DNA突变的野生型AKT1 DNA基因座杂交并且防止所述野生型AKT1 DNA基因座扩增的阻断核酸,并且其中所述阻断核酸包含序列TGTACTCCCCTACA(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:382);GATGTACTCCCCT(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:383);ATGTACTCCCCTAC(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:384);GTACTCCCCTACA(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:385);或GATGTACTCCCCTACA(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:386);斜体的核酸表示锁核酸。

211.如权利要求149-210中任一项所述的试剂盒,其中所述MEK1基因中的所述DNA突变包括编码K57N突变的MEK1蛋白的DNA突变。

212.如权利要求211所述的试剂盒,其中对所述MEK1基因中的所述DNA突变具有特异性的探针包含选自由以下组成的组的序列:TTACCCAGAATCAGAA(SEQ ID NO:387)、

CCAGAATCAGAAGGTG(SEQ ID NO:389)、TTCTTACCCAGAATCA(SEQ ID NO:391)、CCTTTCTTACCCAGAATC(SEQ ID NO:393)和CAGAATCAGAAGGTGG(SEQ ID NO:395)。

213.如权利要求212所述的试剂盒,其中所述对所述MEK1基因中的所述DNA突变具有特异性的探针还包含5'端处的八个核苷酸,并且其中所述5'端处的所述八个核苷酸是腺嘌呤或胸腺嘧啶核苷酸。

214.如权利要求213所述的试剂盒,其中所述对所述MEK1基因中的所述DNA突变具有特异性的探针包含选自由以下组成的组的序列:TTTTTAAATTTACCCAGAATCAGAA(SEQ ID NO:388)、TTTTTAAATCCAGAATCAGAAGGTG(SEQ ID NO:390)、TTTTTAAATTTCTTACCCAGAATCA(SEQ ID NO:392)、TTTTTAAATCCTTTCTTACCCAGAATC(SEQ ID NO:394)和TTTTTAAATCAGAATCAGAAGGTGG(SEQ ID NO:396)。

215.如权利要求211-214中任一项所述的试剂盒,其还包括引物对,所述引物对包含序列CTTGATGAGCAGCAGCGAAA(SEQ ID NO:397)和CCTTCAGTTCTCCCACCTTCTG(SEQ ID NO:398)。

216.如权利要求211-215中任一项所述的试剂盒,其还包括与对应于所述MEK1 DNA突变的野生型MEK1 DNA基因座杂交并且防止所述野生型MEK1 DNA基因座扩增的阻断核酸,并且其中所述阻断核酸包含序列TCTGCTTCTGGGTAAG(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:399);TTCTGCTTCTGGGTAAGA(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:400);CACCTTCTGCTTCTGGG(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:401);TCTGCTTCTGGGTA(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:402);或CACCTTCTGCTTCTGGGTAAGA(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:403);斜体的核酸表示锁核酸。

217.如权利要求149-216中任一项所述的试剂盒,其中所述HER2基因中的所述DNA突变包括编码A775_G776insYVMA突变的HER2蛋白的DNA突变。

218.如权利要求217所述的试剂盒,其中对所述HER2基因中的所述DNA突变具有特异性的探针包含选自由以下组成的组的序列:ATACGTGATGTCTTAC(SEQ ID NO:404)、ACGTGATGGCTTACGT(SEQ ID NO:406)、AAGCATACGTGATGGCT(SEQ ID NO:408)、GCATACGTGATGGCTT(SEQ ID NO:410)和GCATACGTGATGGCTTA(SEQ ID NO:412)。

219.如权利要求218所述的试剂盒,其中所述对所述HER2基因中的所述DNA突变具有特异性的探针还包含5'端处的五个核苷酸,并且其中所述5'端处的所述五个核苷酸是腺嘌呤或胸腺嘧啶核苷酸。

220.如权利要求219所述的试剂盒,其中所述对所述HER2基因中的所述DNA突变具有特异性的探针包含选自由以下组成的组的序列:TTTTTTTTTATACGTGATGTCTTAC(SEQ ID NO:405)、TTTTTTTTTTTACGTGATGGCTTACGT(SEQ ID NO:407)、TTTTTAAGCATACGTGATGGCT(SEQ ID NO:409)、TTTTTTTGCATACGTGATGGCTT(SEQ ID NO:411)和TTTTTTTGCATACGTGATGGCTTA(SEQ ID NO:413)。

221.如权利要求217-220中任一项所述的试剂盒,其还包括引物对,所述引物对包含序列ATGGCTGTGGTTTGTGATGGT(SEQ ID NO:414)和ACACCAGCCATCACGTAAGACA(SEQ ID NO:415)。

222.一种包括至少五种微载体的试剂盒,其中所述至少五种微载体中的每一种包含:

(i)与所述微载体偶联的探针,其中所述探针对ALK、ROS、RET、NTRK1或cMET基因中的RNA突变具有特异性;和

(ii)对应于与其偶联的所述探针的标识符；

其中所述试剂盒包括：包含对所述ALK基因中的RNA突变具有特异性的探针的至少一种微载体、包含对所述ROS基因中的RNA突变具有特异性的探针的至少一种微载体、包含对所述RET基因中的RNA突变具有特异性的探针的至少一种微载体、包含对所述NTRK1基因中的RNA突变具有特异性的探针的至少一种微载体和包含对所述cMET基因中的RNA突变具有特异性的探针的至少一种微载体；并且

其中所述ALK、ROS、RET、NTRK1和cMET基因是人基因。

223.如权利要求222所述的试剂盒，其中所述ALK、ROS、RET和NTRK1基因中的所述突变中的每一种都包括融合基因。

224.如权利要求223所述的试剂盒，其中所述ALK基因中的所述突变包括EML E13:ALK E20、EML E20:ALK E20和EML E6:ALK E20 EML4-ALK融合基因中的一种或多种。

225.如权利要求224所述的试剂盒，其中所述ALK基因中的所述突变包括EML E13:ALK E20、EML E20:ALK E20和EML E6:ALK E20 EML4-ALK融合基因。

226.如权利要求225所述的试剂盒，其中对所述ALK基因中的所述突变具有特异性的探针包括：

(1)第一探针，其包含选自由以下组成的组的序列AAAGGACCTAAAGTGT(SEQ ID NO:161)、CCTAAAGTGTACCGC(SEQ ID NO:163)、GGGAAAGGACCTAAAG(SEQ ID NO:165)、AGTGTACCGCCGGAA(SEQ ID NO:167)和TACCGCCGGAAGCACC(SEQ ID NO:169)；

(2)第二探针，其包含选自由以下组成的组的序列：GACTATGAAATATTGTAC(SEQ ID NO:171)、GAAATATTGTACTTGTAC(SEQ ID NO:173)、TATTGTACTTGTACCGCC(SEQ ID NO:175)、TGTACCGCCGGAAGCAC(SEQ ID NO:177)和CCGCCGGAAGCACCAGGA(SEQ ID NO:179)；

(3)第三探针，其包含选自由以下组成的组的序列：TGTCATCATCAACCAA(SEQ ID NO:181)、ATGTCATCATCAACC(SEQ ID NO:183)、GTGTACCGCCGGAAGC(SEQ ID NO:185)、TCAACCAAGTGTACCG(SEQ ID NO:187)和TACCGCCGGAAGCACCA(SEQ ID NO:189)；和

(4)第四探针，其包含选自由以下组成的组的序列：CGAAAAAAACAGCCAA(SEQ ID NO:191)、TCGCGAAAAAAACAGC(SEQ ID NO:193)、GTGTACCGCCGGAAGC(SEQ ID NO:195)、TACCGCCGGAAGCACC(SEQ ID NO:197)和ACAGCCAAGTGTACCG(SEQ ID NO:199)；

其中所述四种探针中的每一种都与具有不同标识符的微载体偶联。

227.如权利要求226所述的试剂盒，其中所述四种探针中的每一种还包含5'端处的八个核苷酸，并且其中所述5'端处的所述八个核苷酸是腺嘌呤或胸腺嘧啶核苷酸。

228.如权利要求227所述的试剂盒，其中所述对所述ALK基因中的所述突变具有特异性的探针包括：

(1)第一探针，其包含选自由以下组成的组的序列：TTTTTTTTTTAAAGGACCTAAAGTGT(SEQ ID NO:162)、TTTTTTTTTTCCTAAAGTGTACCGC(SEQ ID NO:164)、TTTTTTTTTTGGGAAAGGACCTAAAG(SEQ ID NO:166)、TTTTTTTTTTAGTGTACCGCCGGAA(SEQ ID NO:168)和TTTTTTTTTTTACCGCCGGAAGCACC(SEQ ID NO:170)；

(2)第二探针，其包含选自由以下组成的组的序列：TTTTTTTTTTTTGACTATGAAATATTGTAC(SEQ ID NO:172)、TTTTTTTTTTTTGAAATATTGTACTTGTAC(SEQ ID NO:174)、TTTTTTTTTTTTTATTGTACTTGTACCGCC(SEQ ID NO:176)、TTTTTTTTTTTTTTGTACCGCCGGAAGCAC

(SEQ ID NO:178)和TTTTTTTTTTTTCCGCCGGAAGCACCAGGA(SEQ ID NO:180)；

(3)第三探针，其包含选自由以下组成的组的序列：TTTTTTTTTTTTTTGTCATCATCAACCAA(SEQ ID NO:182)、TTTTTTTTTTTTTTATGTCATCATCAACC(SEQ ID NO:184)、TTTTTTTTTTTTTTGTGTACCGCCGGAAGC(SEQ ID NO:186)、TTTTTTTTTTTTTTTCAACCAAGTGTACCG(SEQ ID NO:188)和TTTTTTTTTTTTTTTACCGCCGGAAGCACCA(SEQ ID NO:190)；和

(4)第四探针，其包含选自由以下组成的组的序列：TTTTTTTTTTTTCGAAAAAAACAGCCAA(SEQ ID NO:192)、TTTTTTTTTTTTTTCGCGAAAAAAACAGC(SEQ ID NO:194)、TTTTTTTTTTTTTGTGTACCGCCGGAAGC(SEQ ID NO:196)、TTTTTTTTTTTTTTACCGCCGGAAGCACC(SEQ ID NO:198)和TTTTTTTTTTTTTTACAGCCAAGTGTACCG(SEQ ID NO:200)；

其中所述四种探针中的每一种都与具有不同标识符的微载体偶联。

229.如权利要求224-228中任一项所述的试剂盒，其还包括：适用于生成对所述ALK基因中的所述突变具有特异性的cDNA的第一引物，其中所述第一引物包含序列AGTTGGGGTTGTAGTCGGTCAT(SEQ ID NO:363)或GAAGCCTCCCTGGATCTCC(SEQ ID NO:364)；和对所述ALK基因中的所述突变具有特异性的第二引物，所述第二引物包含选自由以下组成的组的序列：TATGGAGCAAAACTACTGTAGAGCC(SEQ ID NO:357)、CCAGCTACATCACACACCTTGACT(SEQ ID NO:358)和TAATACCAAAAGTTACCAAAACTGCA(SEQ ID NO:359)。

230.如权利要求223-229中任一项所述的试剂盒，其中所述ROS基因中的所述突变包括选自由CD74-ROS和SLC34A2-ROS组成的组的ROS融合基因。

231.如权利要求230所述的试剂盒，其中所述ROS基因中的所述突变包括CD74 E6:ROS E32、CD74 E6:ROS E34、SLC34A2 E4:ROSE32和SLC34A2 E4:ROS E34融合基因。

232.如权利要求231所述的试剂盒，其中对所述ROS基因中的所述突变具有特异性的探针包括：

(1)第一探针，其包含选自由以下组成的组的序列：ACTGACGCTCCACCGAAA(SEQ ID NO:201)、CCACTGACGCTCCACCGA(SEQ ID NO:203)、GCTGGAGTCCCAAATAAAC(SEQ ID NO:205)、GGAGTCCCAAATAAACCAG(SEQ ID NO:207)和CACCGAAAGCTGGAGTCCC(SEQ ID NO:209)；

(2)第二探针，其包含选自由以下组成的组的序列：CCGAAAGATGATTTT(SEQ ID NO:211)、GACGCTCCACCGAAA(SEQ ID NO:213)、ACTGACGCTCCACCGA(SEQ ID NO:215)、GATGATTTTTGGATA(SEQ ID NO:217)和TGATTTTTGGATACCA(SEQ ID NO:219)；

(3)第三探针，其包含选自由以下组成的组的序列：AGCGCCTTCCAGCTGGTTGGA(SEQ ID NO:221)、CTGGTTGGAGCTGGAGTCCC(SEQ ID NO:223)、AGTAGCGCCTTCCAGCTGGTTG(SEQ ID NO:225)、GCTGGAGTCCCAAATAAACCA(SEQ ID NO:227)和GGAGTCCCAAATAAACCAGG(SEQ ID NO:229)；和

(4)第四探针，其包含选自由以下组成的组的序列：GCGCCTTCCAGCTGGTTG(SEQ ID NO:231)、GTAGCGCCTTCCAGCTGGT(SEQ ID NO:233)、TGGTTGGAGATGATTTTT(SEQ ID NO:235)、GATGATTTTTGGATACCAG(SEQ ID NO:237)和TGATTTTTGGATACCA(SEQ ID NO:239)；

其中所述四种探针中的每一种都与具有不同标识符的微载体偶联。

233.如权利要求232所述的试剂盒，其中所述四种探针中的每一种还包含5'端处的八个核苷酸，并且其中所述5'端处的所述八个核苷酸是腺嘌呤或胸腺嘧啶核苷酸。

234.如权利要求233所述的试剂盒，其中所述对所述ROS基因中的所述突变具有特异性

的探针包括：

(1)第一探针，其包含选自由以下组成的组的序列：TTTTTTTTTTTACTGACGCTCCACCGAAA(SEQ ID NO:202)、TTTTTTTTTTTCCACTGACGCTCCACCGA(SEQ ID NO:204)、TTTTTTTTTTTGCTGGAGTCCCAAATAAAC(SEQ ID NO:206)、TTTTTTTTTTTGGAGTCCCAAATAAACCAG(SEQ ID NO:208)和TTTTTTTTTTTCACCGAAAGCTGGAGTCCC(SEQ ID NO:210)；

(2)第二探针，其包含选自由以下组成的组的序列：TTTTTTTTTTTTCCGAAAGATGATTTT(SEQ ID NO:212)、TTTTTTTTTTTTGACGCTCCACCGAAA(SEQ ID NO:214)、TTTTTTTTTTTTACTGACGCTCCACCGA(SEQ ID NO:216)、TTTTTTTTTTTTGATGATTTTTGGATA(SEQ ID NO:218)和TTTTTTTTTTTTTGATTTTTGGATACCA(SEQ ID NO:220)；

(3)第三探针，其包含选自由以下组成的组的序列：TTTTTTTTTTTTAGCGCCTTCCAGCTGGTTGGA(SEQ ID NO:222)、TTTTTTTTTTTTCTGGTTGGAGCTGGAGTCCC(SEQ ID NO:224)、TTTTTTTTTTTTAGTAGCGCCTTCCAGCTGGTTG(SEQ ID NO:226)、TTTTTTTTTTTTGCTGGAGTCCCAAATAAACCA(SEQ ID NO:228)和TTTTTTTTTTTTGGAGTCCCAAATAAACCAGG(SEQ ID NO:230)；和

(4)第四探针，其包含选自由以下组成的组的序列：TTTTTTTTTTGCGCCTTCCAGCTGGTTG(SEQ ID NO:232)、TTTTTTTTTTGTAGCGCCTTCCAGCTGGT(SEQ ID NO:234)、TTTTTTTTTTTGGTTGGAGATGATTTTT(SEQ ID NO:236)、TTTTTTTTTTGATGATTTTTGGATACCAG(SEQ ID NO:238)和TTTTTTTTTTTGATTTTTGGATACCA(SEQ ID NO:240)；

其中所述四种探针中的每一种都与具有不同标识符的微载体偶联。

235.如权利要求230-234中任一项所述的试剂盒，其还包括：适用于生成对所述ROS基因中的所述突变具有特异性的cDNA的第一引物，其中所述第一引物包含序列AATTCAATACATACTATCAGCTTTCTCCCACTGTATTGAA(SEQ ID NO:21)或AATATTTCTGGTACGAGTGGGATTGTAACAACCAGAAATA(SEQ ID NO:22)；和对所述ROS基因中的所述突变具有特异性的第二引物，所述第二引物包含序列GGAGTGCCATCGCTGTTTGAAATGAGCAGGCACT(SEQ ID NO:19)或TACAGCCCTGGATATTCTTAGTAGCGC(SEQ ID NO:20)。

236.如权利要求223-235中任一项所述的试剂盒，其中所述RET基因中的所述突变包括选自由KIF5B-RET组成的组的RET融合基因。

237.如权利要求235所述的试剂盒，其中所述RET基因中的所突变包括KIF5B E15:RET E11、KIF5B E15:RET E12、KIF5B E16:RET E12、KIF5B E22:RET E12和KIF5B E23:RET E12融合基因。

238.如权利要求237所述的试剂盒，其中对所述RET基因中的所述突变具有特异性的探针包括：

(1)第一探针，其包含选自由以下组成的组的序列：GTGGGAAATAATGATGTAAA(SEQ ID NO:241)、CTGTGGGAAATAATGATGTA(SEQ ID NO:243)、GATCCACTGTGCGACGAGCT(SEQ ID NO:245)、TGATGTAAAGATCCACTGTG(SEQ ID NO:247)和TCCACTGTGCGACGAGCTGT(SEQ ID NO:249)；

(2)第二探针，其包含选自由以下组成的组的序列：TGGGAAATAATGATGTAAA(SEQ ID NO:251)、CTGTGGGAAATAATGATGTA(SEQ ID NO:253)、GGAGGATCCAAAGTGGGAAT(SEQ ID NO:255)、GGATCCAAAGTGGGAATT(SEQ ID NO:257)和ATGATGTAAAGGAGGATCC(SEQ ID NO:259)；

(3)第三探针，其包含选自由以下组成的组的序列：CTTCGTATCTCTCAAGAGGAT(SEQ ID

NO:481)、GTATCTCTCAAGAGGATCCAA(SEQ ID NO:483)、TTCGTATCTCTCAAGAG(SEQ ID NO:485)、TCAAGAGGATCCAAA(SEQ ID NO:487)和TCTCTCAAGAGG(SEQ ID NO:489)；

(4)第四探针，其包含选自由以下组成的组的序列：GTTAAAAAGGAGGATCCAA(SEQ ID NO:491)、ACAAGAGTTAAAAAGGAGGA(SEQ ID NO:493)、AAGAGTTAAAAAGGAGGATC(SEQ ID NO:495)、AAAAGGAGGATCCAAAG(SEQ ID NO:497)和AAGGAGGATCCAAAGTG(SEQ ID NO:499)；和

(5)第五探针，其包含选自由以下组成的组的序列：AAACAGGAGGATCCAAA(SEQ ID NO:501)、AAGTGCACAAACAGGAGG(SEQ ID NO:503)、GTGCACAAACAGGAGGATC(SEQ ID NO:505)、CACAAACAGGAGGAT(SEQ ID NO:507)和AACAGGAGGATCCAAA(SEQ ID NO:509)；

其中所述五种探针中的每一种都与具有不同标识符的微载体偶联。

239.如权利要求238所述的试剂盒，其中所述四种探针中的每一种还包含5'端处的八个核苷酸，并且其中所述5'端处的所述八个核苷酸是腺嘌呤或胸腺嘧啶核苷酸。

240.如权利要求239所述的试剂盒，其中所述对所述RET基因中的所述突变具有特异性的探针包括：

(1)第一探针，其包含选自由以下组成的组的序列：TTTTTTTTTTGTGGGAAATAATGATGTAAA(SEQ ID NO:242)、TTTTTTTTTTCTGTGGGAAATAATGATGTA(SEQ ID NO:244)、TTTTTTTTTTGATCCACTGTGCGACGAGCT(SEQ ID NO:246)、TTTTTTTTTTTGATGTAAAGATCCACTGTG(SEQ ID NO:248)和TTTTTTTTTTTCCACTGTGCGACGAGCTGT(SEQ ID NO:250)；

(2)第二探针，其包含选自由以下组成的组的序列：TTTTTTTTTTGGGAAATAATGATGTAAA(SEQ ID NO:252)、TTTTTTTTTCTGTGGGAAATAATGATGTA(SEQ ID NO:254)、TTTTTTTTTGGAGGATCCAAAGTGGGAAT(SEQ ID NO:256)、TTTTTTTTTGGATCCAAAGTGGGAATT(SEQ ID NO:258)和TTTTTTTTTATGATGTAAAGGAGGATCC(SEQ ID NO:260)；

(3)第三探针，其包含选自由以下组成的组的序列：TTTTTTTTTCTTCGTATCTCTCAAGAGGAT(SEQ ID NO:482)、TTTTTTTTTGTATCTCTCAAGAGGATCCAA(SEQ ID NO:484)、TTTTTTTTTTCGTATCTCTCAAGAG(SEQ ID NO:486)、TTTTTTTTTCAAGAGGATCCAAA(SEQ ID NO:488)和TTTTTTTTTCTCTCAAGAGG(SEQ ID NO:490)；

(4)第四探针，其包含选自由以下组成的组的序列：TTTTTTTTGTTAAAAAGGAGGATCCAA(SEQ ID NO:492)、TTTTTTTACAAGAGTTAAAAAGGAGGA(SEQ ID NO:494)、TTATTATTAAGAGTTAAAAAGGAGGATC(SEQ ID NO:811)、TTTTTTTAAAAGGAGGATCCAAAG(SEQ ID NO:498)和TTTTTTTAAGGAGGATCCAAAGTG(SEQ ID NO:500)；和

(5)第五探针，其包含选自由以下组成的组的序列：TTTTTTTAAACAGGAGGATCCAAA(SEQ ID NO:502)、TTTTTATTAAGTGCACAAACAGGAGG(SEQ ID NO:504)、TATTATTATGTGCACAAACAGGAGGATC(SEQ ID NO:506)、TATTTTTCACAAACAGGAGGAT(SEQ ID NO:508)和TTTTATTTAACAGGAGGATCCAAA(SEQ ID NO:510)；

其中所述五种探针中的每一种都与具有不同标识符的微载体偶联。

241.如权利要求235-240中任一项所述的试剂盒，其还包括：适用于生成对所述RET基因中的所述突变具有特异性的cDNA的第一引物，其中所述第一引物包含序列GTGATCGCACAGTAGGACAGCGGCTGCGATC(SEQ ID NO:26)或CTCTAGGAGATATCATTCCAAATTCGCCTTCTCCTAG(SEQ ID NO:27)；和对所述RET基因中的所述突变具有特异性的第二引物，所述第二引物包含选自由以下组成的组的序列：TTTCTGGTGCTATGAGGAAATGACCAACCACCAGA(SEQ ID

NO:23)、AAGGAGTTAGCAGCATGTCAGC(SEQ ID NO:519)、AACTTCAGACTTTACACAACCTGC(SEQ ID NO:520)和ATTGATTCTGATGACACCGGA(SEQ ID NO:521)。

242.如权利要求223-241中任一项所述的试剂盒,其中所述NTRK1基因中的所述突变包括CD74-NTRK1融合基因。

243.如权利要求242所述的试剂盒,其中所述NTRK1基因中的所述突变包括CD74 E8:NTRK1 E12融合基因。

244.如权利要求243所述的试剂盒,其中对所述NTRK1基因中的所述突变具有特异性的探针包含选自由以下组成的组的序列:CAGGATCTGGGCCCAGACA(SEQ ID NO:261)、GATCTGGGCCCAGACACTA(SEQ ID NO:263)、CCAGACACTAACAGCACAT(SEQ ID NO:265)、GGGCCCAGACACTAACAGC(SEQ ID NO:267)和CTAACAGCACATCTGGAGA(SEQ ID NO:269)。

245.如权利要求244所述的试剂盒,其中所述对所述NTRK1基因中的所述突变具有特异性的探针还包含5'端处的八个核苷酸,并且其中所述5'端处的所述八个核苷酸是腺嘌呤或胸腺嘧啶核苷酸。

246.如权利要求245所述的试剂盒,其中所述对所述NTRK1基因中的所述突变具有特异性的探针包含选自由以下组成的组的序列:TTTTTTTTTTACAGGATCTGGGCCCAGACA(SEQ ID NO:262)、TTTTTTTTTTAGATCTGGGCCCAGACACTA(SEQ ID NO:264)、TTTTTTTTTTACCAGACACTAACAGCACAT(SEQ ID NO:266)、TTTTTTTTTTAGGGCCCAGACACTAACAGC(SEQ ID NO:268)和TTTTTTTTTTACTAACAGCACATCTGGAGA(SEQ ID NO:270)。

247.如权利要求242-246中任一项所述的试剂盒,其还包括适用于生成对所述NTRK1基因中的所述突变具有特异性的cDNA的第一引物,其中所述第一引物包含序列GGACGAAAATCCAGACCCCAAAAGGTGTTTCGT(SEQ ID NO:32);和对所述NTRK1基因中的所述突变具有特异性的第二引物,所述第二引物包含序列AGAAGACGTGACAGGAACTGGAGGACCCGTCTT(SEQ ID NO:30)。

248.如权利要求222-247中任一项所述的试剂盒,其中所述cMET基因中的所述突变导致外显子跳读。

249.如权利要求248所述的试剂盒,其中所述cMET基因中的所述突变导致外显子14的跳读。

250.如权利要求249所述的试剂盒,其中对所述cMET基因中的所述突变具有特异性的探针包含选自由以下组成的组的序列:AGAAAGCAAATTAAAGAT(SEQ ID NO:271)、AGCAAATTAAAGATCAG(SEQ ID NO:273)、AAATTAAAGATCAGTTTC(SEQ ID NO:275)、AGATCAGTTTCCTAATTC(SEQ ID NO:277)和AAGATCAGTTTCCTAATT(SEQ ID NO:279)。

251.如权利要求250所述的试剂盒,其中所述对所述cMET基因中的一种或多种突变具有特异性的探针还包含5'端处的八个核苷酸,并且其中所述5'端处的所述八个核苷酸是腺嘌呤或胸腺嘧啶核苷酸。

252.如权利要求251所述的试剂盒,其中所述对所述cMET基因中的所述突变具有特异性的探针包含选自由以下组成的组的序列:TTTTTTTTTTAGAAAGCAAATTAAAGAT(SEQ ID NO:272)、TTTTTTTTTTAGCAAATTAAAGATCAG(SEQ ID NO:274)、TTTTTTTTTTAAATTAAAGATCAGTTTC(SEQ ID NO:276)、TTTTTTTTTTAGATCAGTTTCCTAATTC(SEQ ID NO:278)和TTTTTTTTTTAAGATCAGTTTCCTAATT(SEQ ID NO:280)。

253.如权利要求248-252中任一项所述的试剂盒,其还包括:适用于生成对所述cMET基因中的所述突变具有特异性的cDNA的第一引物,其中所述第一引物包含序列GACAGTATTTTGCAGTAATGGACTGGATATATCAGA(SEQ ID NO:29);和对所述cMET基因中的所述突变具有特异性的第二引物,所述第二引物包含序列GAATTTCACAGGATTGATTGCTGGTGTTGTCTC(SEQ ID NO:28)。

254.如权利要求149-253中任一项所述的试剂盒,其中所述微载体的标识符包括数字条形码。

255.如权利要求254所述的试剂盒,其中所述微载体中的每一种包含:

(i)第一光聚合物层;

(ii)第二光聚合物层;和

(iii)所述第一层和所述第二层之间的中间层,所述中间层具有表示限定在其上的所述标识符的编码图案,其中所述中间层部分基本地可透光并且部分基本地不透光,这表示对应于所述微载体的代码,其中所述微载体的最外表面包含光致抗蚀剂光致聚合物,并且所述光致抗蚀剂光致聚合物被所述对所述DNA突变具有特异性的探针官能化,并且其中所述微载体具有与水大概相同的密度。

256.如权利要求149-253中任一项所述的试剂盒,其中所述微载体的标识符包括模拟代码。

257.如权利要求256所述的试剂盒,其中所述微载体中的每一种包含:

(i)具有第一表面和第二表面的基本透明聚合物层,所述第一表面和所述第二表面彼此平行;

(ii)构成二维形状的基本不透明层,其中所述基本不透明层附接到所述基本透明聚合物层的第一表面并且包围所述基本透明聚合物层的中心部分,其中所述基本不透明层的二维形状表示模拟代码,并且其中所述模拟码对应于所述标识符;和

(iii)对所述突变具有特异性的所述探针,其中所述探针在所述基本透明聚合物层的至少中心部分中与所述基本透明聚合物层的第一表面和第二表面中的至少一个偶联。

258.如权利要求257所述的试剂盒,其中所述微载体中的每一种还包含用于定向所述基本不透明聚合物层的模拟代码的定向指示器。

259.如权利要求257或权利要求258所述的试剂盒,其中所述基本透明聚合物层的聚合物包括环氧基聚合物。

260.如权利要求259所述的试剂盒,其中所述环氧基聚合物是SU-8。

261.一种试剂盒,其包括:

(a)多种探针,其中所述多种中的每一种与微载体偶联,所述微载体具有对应于与其偶联的所述探针的独特标识符,所述多种探针包括:第一探针,其包含序列TTTTTTTTTTTTAATAGTTGGAGCT(SEQ ID NO:39);第二探针,其包含序列TTTTTTTTTTTAGGCGTAGGCAAGA(SEQ ID NO:57);第三探针,其包含序列TTTTTTTTTTTAAGGAGCTTGTGGC(SEQ ID NO:63);第四探针,其包含序列TTTTTTTCCTGCTCAGTGATTTTA(SEQ ID NO:94);第五探针,其包含序列TTTTTTTTTTTATCTCCTGCTTAG(SEQ ID NO:102);第六探针,其包含序列TTTTTTTTTTTTAATGATGCACGTCA(SEQ ID NO:114);第七探针,其包含序列

TTTTTTAATTCTACAGAGAAATCTCGA(SEQ ID NO:82)；第八探针，其包含序列TTTTTTTTTTTTTAGTGCTGGCCT(SEQ ID NO:124)；第九探针，其包含序列TTTTTTTTTTACAAAACATCTCCG(SEQ ID NO:131)；第十探针，其包含序列TTTTTTTTAATCAAGACATCTC(SEQ ID NO:141)；第十一探针，其包含序列TTTTTTTTCATGAGATGCATGATGA(SEQ ID NO:356)；第十二探针，其包含序列TTTTTTTTTTACAGGAGGCTGCCGA(SEQ ID NO:464)；第十三探针，其包含序列TTTTTTTTTTACAGGAGGGAGCCG(SEQ ID NO:478)；第十四探针，其包含序列TTTTTTTAGATGGCCATCTTG(SEQ ID NO:426)；第十五探针，其包含序列TTTTTTTTTTGTGATGGCCGG(SEQ ID NO:432)；第十六探针，其包含序列TTTTTTTTGGACAACCCCCATCAC(SEQ ID NO:450)；第十七探针，其包含序列TTTTTTTGCCAGCGTGGACGGTA(SEQ ID NO:460)；第十八探针，其包含序列TTTTTTTTAAATGGGCGGGCCA(SEQ ID NO:160)；第十九探针，其包含序列TTTTTTTTTTTTTTGTAGGGAAGTACA(SEQ ID NO:371)；第二十探针，其包含序列TTTTTAAATCAGAATCAGAAGGTGG(SEQ ID NO:396)；第二十探针，其包含序列TTTTTAAATCAGAATCAGAAGGTGG(SEQ ID NO:396)；第二十一探针，其包含序列TTTTTTTTTTTACGTGATGGCTTACGT(SEQ ID NO:407)；第二十二探针，其包含序列TTTTTTTTTTAGTGTACCGCCGGAA(SEQ ID NO:168)；第二十三探针，其包含序列TTTTTTTTTTTTGACTATGAAATATTGTAC(SEQ ID NO:172)；第二十四探针，其包含序列TTTTTTTTTTTTTTTACCGCCGGAAGCACCA(SEQ ID NO:190)；第二十五探针，其包含序列TTTTTTTTTTTTTGTGTACCGCCGGAAGC(SEQ ID NO:196)；第二十六探针，其包含序列TTTTTTTTTTTGCTGGAGTCCCAAATAAAC(SEQ ID NO:206)；第二十七探针，其包含序列TTTTTTTTTTTTGACGCTCCACCGAAA(SEQ ID NO:214)；第二十八探针，其包含序列TTTTTTTTTTTTGGAGTCCCAAATAAACCAGG(SEQ ID NO:230)；第二十九探针，其包含序列TTTTTTTTTTGATGATTTTTGGATACCAG(SEQ ID NO:238)；第三十探针，其包含序列TTTTTTTTTTGTGGGAAATAATGATGTAAA(SEQ ID NO:242)；第三十一探针，其包含序列TTTTTTTTTCTGTGGGAAATAATGATGTA(SEQ ID NO:254)；第三十二探针，其包含序列TTTTTTTTTTCTCTCAAGAGG(SEQ ID NO:490)；第三十三探针，其包含序列TTTTTTTTAAGGAGGATCCAAAGTG(SEQ ID NO:500)；第三十四探针，其包含序列TTTTTTTTAAACAGGAGGATCCAAA(SEQ ID NO:502)；第三十五探针，其包含序列TTTTTTTTTTACCAGACACTAACAGCACAT(SEQ ID NO:266)；第三十六探针，其包含序列TTTTTTTTTTAGAAAGCAAATTAAAGAT(SEQ ID NO:272)；

(b)多种引物对，所述多种引物对包含：第一引物对，其包含序列GTACTGGTGGAGTATTTGATAGTG(SEQ ID NO:1)和CGTCAAGGCACTCTTGCCTAC(SEQ ID NO:2)；第二引物对，其包含序列CAATTTCTACAAGAGATCCTCTCTCT(SEQ ID NO:5)和CTCCATTTTAGCACTTACCTGTGAC(SEQ ID NO:6)；第三引物对，其包含序列ACCCTAGCCTTAGATAAAACTGAGC(SEQ ID NO:7)和TTTGTTGTCCAGCCACCATGA(SEQ ID NO:8)；第四引物对，其包含序列ATAGCCTCAATTCTTACCATCCACAAAATG(SEQ ID NO:9)和CAGATATATTTCTTCATGAAGACCTCACAGTAA(SEQ ID NO:10)；第五引物对，其包含序列CTTGTGGAGCCTCTTACACCC(SEQ ID NO:11)和TGCCGAACGCACCGGA(SEQ ID NO:12)；第六引物

对,其包含序列GCCAGTTAACGTCTTCCTTCTC(SEQ IDNO:13)和ATCGAGGATTTCCTTGTTGGCTT(SEQ ID NO:14);第七引物对,其包含序列CCTCCACCGTGCAGATCATC(SEQ ID NO:15)和TTCCCTGATTACCTTTGCGAT(SEQ ID NO:16);第八引物对,其包含序列CCACACTGACGTGCCTCT(SEQ ID NO:511)和GCACACGTAGGGGTTGTCCAAGA(SEQ ID NO:512);第九引物对,其包含序列CCACACTGACGTGCCTCT(SEQ ID NO:513)和GTACACGCTGGCCACGCCG(SEQ ID NO:514);第十引物对,其包含序列CCACACTGACGTGCCTCT(SEQ ID NO:515)和CAGGCGGCACACGTGAT(SEQ ID NO:516);第十一引物对,其包含序列CCACACTGACGTGCCTCT(SEQ ID NO:517)和AGGCGGCACACGTGCGGGTTAC(SEQ ID NO:518);第十二引物对,其包含序列GGAGGACCGTCGCTTGG(SEQ ID NO:17)和TCTTTCTCTTCCGCACCCAG(SEQ ID NO:18);第十三引物对,其包含序列GAGGGTCTGACGGGTAGAGTG(SEQ ID NO:380)和TGGCCGCCAGGTCTTGATGTA(SEQ ID NO:381);第十四引物对,其包含序列CTTGATGAGCAGCAGCGAAA(SEQ ID NO:397)和CCTTCAGTTCTCCCACCTTCTG(SEQ ID NO:398);第十五引物对,其包含序列ATGGCTGTGGTTTGTGATGGT(SEQ ID NO:414)和ACACCAGCCATCACGTAAGACA(SEQ ID NO:415);第十六引物对,其包含序列AGTTGGGGTTGTAGTCGGTCAT(SEQ ID NO:363)和TATGGAGCAAAACTACTGTAGAGCC(SEQ ID NO:357);第十七引物对,其包含序列AGTTGGGGTTGTAGTCGGTCAT(SEQ ID NO:363)和CCAGCTACATCACACACCTTGACT(SEQ ID NO:358);第十八引物对,其包含序列AGTTGGGGTTGTAGTCGGTCAT(SEQ ID NO:363)和TAATACCAAAAGTTACCAAAACTGCA(SEQ ID NO:359);第十九引物对,其包含序列GGAGTGCCATCGCTGTTTGAAATGAGCAGGCACT(SEQ ID NO:19);第二十引物对,其包含序列GGAGTGCCATCGCTGTTTGAAATGAGCAGGCACT(SEQ ID NO:19);第二十一引物对,其包含序列TACAGCCCTGGATATTCTTAGTAGCGC(SEQ ID NO:20);第二十二引物对,其包含序列TACAGCCCTGGATATTCTTAGTAGCGC(SEQ ID NO:20);第二十三引物对,其包含序列GTGATCGCACAGTAGGACAGCGGCTGCGATC(SEQ ID NO:26)和TTTCTGGTGCTATGAGGAAATGACCAACCACCAGA(SEQ ID NO:23);第二十四引物对,其包含序列CTCTAGGAGATATCATTCCAAATTCGCCTTCTCCTAG(SEQ ID NO:27)和TTTCTGGTGCTATGAGGAAATGACCAACCACCAGA(SEQ ID NO:23);第二十五引物对,其包含序列CTCTAGGAGATATCATTCCAAATTCGCCTTCTCCTAG(SEQ ID NO:27)和AAGGAGTTAGCAGCATGTCAGC(SEQ ID NO:519);第二十六引物对,其包含序列CTCTAGGAGATATCATTCCAAATTCGCCTTCTCCTAG(SEQ ID NO:27)和AACTTCAGACTTTACACAACCTGC(SEQ ID NO:520);第二十七引物对,其包含序列CTCTAGGAGATATCATTCCAAATTCGCCTTCTCCTAG(SEQ ID NO:27)和ATTGATTCTGATGACACCGGA(SEQ ID NO:521);第二十八引物对,其包含序列GGACGAAAATCCAGACCCCAAAAGGTGTTTCGT(SEQ ID NO:32)和AGAAGACGTGACAGGAACTGGAGGACCCGTCTT(SEQ ID NO:30);第二十九引物对,其包含序列GACAGTATTTTGCAGTAATGGACTGGATATATCAGA(SEQ ID NO:29)和GAATTTCACAGGATTGATTGCTGGTGTTGTCTC(SEQ ID NO:28);和

(c)多种阻断核酸,所述多种阻断核酸包括:第一阻断核酸,其包含序列TTGGAGCTGGTGGCGT(invdT)$_n$,其中n为1、2、或3(SEQ ID NO:285);第二阻断核酸,其包含序列CTGAAATCACTGAGCAGG(invdT)$_n$,其中n为1、2、或3(SEQ ID NO:291);第三阻断核酸,其包含序列CCACCATGATGTGCATCA(invdT)$_n$,其中n为1、2、或3(SEQ ID NO:299);第四阻断核酸,其包含序列GAGATTTCACTGTAGC(invdT)$_n$,其中n为1、2、或3(SEQ ID NO:301);第五阻断核酸,其包含序列CGCACCGGAGCCCAGCACTTA(invdT)$_n$,其中n为1、2、或3(SEQ ID NO:310);第六

阻断核酸，其包含序列CGGAGATGTTGCTTCTCT(invdT)$_n$，其中n为1、2、或3(SEQ ID NO:312)；第七阻断核酸，其包含序列TGCAGCTCATCACGCAGC(invdT)$_n$，其中n为1、2、或3(SEQ ID NO:317)；第八阻断核酸，其包含序列CCAGCAGTTTGGCCAGCCCT(invdT)$_n$，其中n为1、2、或3(SEQ ID NO:322)；第九阻断核酸，其包含序列GATGTACTCCCCT(invdT)$_n$，其中n为1、2、或3(SEQ ID NO:383)；和第十阻断核酸，其包含序列CACCTTCTGCTTCTGGGTAAGA(invdT)$_n$，其中n为1、2、或3(SEQ ID NO:403)。

262.一种试剂盒，其包括：

(a)多种探针，其中所述多种探针中的每一种与微载体偶联，所述微载体具有对应于与其偶联的所述探针的独特标识符，所述多种探针包括：第一探针，其包含序列TTTTTTTTTTTTAATGATGGCGTAG(SEQ ID NO:43)；第二探针，其包含序列TTTTTTTTTTTAGTAGTTGGAGCTG(SEQ ID NO:51)；第三探针，其包含序列TTTTTTTTTTTAATTGTGGCGTAGG(SEQ ID NO:65)；第四探针，其包含序列TTTTTTTTTAGCTCAGTGATTTTAG(SEQ ID NO:88)；第五探针，其包含序列TTTTTTTTTTTTTTTCCTGCTTAGTG(SEQ ID NO:104)；第六探针，其包含序列TTTTTTTTTTTTTGATGCACGTC(SEQ ID NO:112)；第七探针，其包含序列TTTTTTAATTGAGAAATCTCGATGGAG(SEQ ID NO:78)；第八探针，其包含序列TTTTTTAGATCAAAGTGCTGGCCTCCG(SEQ ID NO:120)；第九探针，其包含序列TTTTTTTTTTTTTTAAACATCTCCGAAAGCC(SEQ ID NO:135)；第十探针，其包含序列TTTTTTTTTTTCAAGACATCTCCGA(SEQ ID NO:145)；第十一探针，其包含序列TTTTTTTTTTTGAGATGCATGATGA(SEQ ID NO:352)；第十二探针，其包含序列TTTTTTTTTTTACAGGAGGCTGCC(SEQ ID NO:470)；第十三探针，其包含序列TTTTTTTTTTTACCAGGAGGGAGCCG(SEQ ID NO:474)；第十四探针，其包含序列TTTTTTTTTATGGCCATCTTGG(SEQ ID NO:422)；第十五探针，其包含序列TTTTTTTTTTTTGATGGCCCGCGTG(SEQ ID NO:440)；第十六探针，其包含序列TTTTTTTTTTTTCCCATCACGTGT(SEQ ID NO:448)；第十七探针，其包含序列TTTTTTTTTTTGACGGTAACCCCC(SEQ ID NO:456)；第十八探针，其包含序列TTTTTTTATTTTGGGCGGGCC(SEQ ID NO:152)；第十九探针，其包含序列TTTTTTTTTTTTCTGTAGGGAAGTAC(SEQ ID NO:373)；第二十探针，其包含序列TTTTTAAATTTCTTACCCAGAATCA(SEQ ID NO:392)；第二十一探针，其包含序列TTTTTAAGCATACGTGATGGCT(SEQ ID NO:409)；第二十二探针，其包含序列TTTTTTTTTTGGGAAAGGACCTAAAG(SEQ IDNO:166)；第二十三探针，其包含序列TTTTTTTTTTTTCCGCCGGAAGCACCAGGA(SEQ ID NO:180)；第二十四探针，其包含序列TTTTTTTTTTTTTTGTGTACCGCCGGAAGC(SEQ ID NO:186)；第二十五探针，其包含序列TTTTTTTTTTTTTCGAAAAAAACAGCCAA(SEQ ID NO:192)；第二十六探针，其包含序列TTTTTTTTTTTACTGACGCTCCACCGAAA(SEQ ID NO:202)；第二十七探针，其包含序列TTTTTTTTTTTGACGCTCCACCGAAA(SEQ ID NO:214)；第二十八探针，其包含序列TTTTTTTTTTTTAGCGCCTTCCAGCTGGTTGGA(SEQ ID NO:222)；第二十九探针，其包含序列TTTTTTTTTTTGATTTTTGGATACCA(SEQ ID NO:240)；第三十探针，其包含序列TTTTTTTTTTTCCACTGTGCGACGAGCTGT(SEQ ID NO:250)；第三十一探针，其包含序列

TTTTTTTTTGGATCCAAAGTGGGAATT(SEQ ID NO:258)；第三十二探针，其包含序列TTTTTTTTTTCAAGAGGATCCAAA(SEQ ID NO:488)；第三十三探针，其包含序列TTTTTTTTACAAGAGTTAAAAAGGAGGA(SEQ ID NO:494)；第三十四探针，其包含序列TTTTTATTAAGTGCACAAACAGGAGG(SEQ ID NO:504)；第三十五探针，其包含序列TTTTTTTTTTACTAACAGCACATCTGGAGA(SEQ ID NO:270)；第三十六探针，其包含序列TTTTTTTTTTAGATCAGTTTCCTAATTC(SEQ ID NO:278)；

（b）多种引物对，所述多种引物对包含：第一引物对，其包含序列GTACTGGTGGAGTATTTGATAGTG(SEQ ID NO:1)和CGTCAAGGCACTCTTGCCTAC(SEQ ID NO:2)；第二引物对，其包含序列CAATTTCTACAAGAGATCCTCTCTCT(SEQ ID NO:5)和CTCCATTTTAGCACTTACCTGTGAC(SEQ ID NO:6)；第三引物对，其包含序列ACCCTAGCCTTAGATAAAACTGAGC(SEQ ID NO:7)和TTTGTTGTCCAGCCACCATGA(SEQ ID NO:8)；第四引物对，其包含序列ATAGCCTCAATTCTTACCATCCACAAAATG(SEQ ID NO:9)和CAGATATATTTCTTCATGAAGACCTCACAGTAA(SEQ IDNO:10)；第五引物对，其包含序列CTTGTGGAGCCTCTTACACCC(SEQ ID NO:11)和TGCCGAACGCACCGGA(SEQ ID NO:12)；第六引物对，其包含序列GCCAGTTAACGTCTTCCTTCTC(SEQ ID NO:13)和ATCGAGGATTTCCTTGTTGGCTT(SEQ ID NO:14)；第七引物对，其包含序列CCTCCACCGTGCAGATCATC(SEQ ID NO:15)和TTCCCTGATTACCTTTGCGAT(SEQ ID NO:16)；第八引物对，其包含序列CCACACTGACGTGCCTCT(SEQ ID NO:511)和GCACACGTAGGGGTTGTCCAAGA(SEQ ID NO:512)；第九引物对，其包含序列CCACACTGACGTGCCTCT(SEQ ID NO:513)和GTACACGCTGGCCACGCCG(SEQ ID NO:514)；第十引物对，其包含序列CCACACTGACGTGCCTCT(SEQ ID NO:515)和CAGGCGGCACACGTGAT(SEQ ID NO:516)；第十一引物对，其包含序列CCACACTGACGTGCCTCT(SEQ ID NO:517)和AGGCGGCACACGTGCGGGTTAC(SEQ ID NO:518)；第十二引物对，其包含序列GGAGGACCGTCGCTTGG(SEQ ID NO:17)和TCTTTCTCTTCCGCACCCAG(SEQ ID NO:18)；第十三引物对，其包含序列GAGGGTCTGACGGGTAGAGTG(SEQ ID NO:380)和TGGCCGCCAGGTCTTGATGTA(SEQ ID NO:381)；第十四引物对，其包含序列CTTGATGAGCAGCAGCGAAA(SEQ ID NO:397)和CCTTCAGTTCTCCCACCTTCTG(SEQ ID NO:398)；第十五引物对，其包含序列ATGGCTGTGGTTTGTGATGGT(SEQ ID NO:414)和ACACCAGCCATCACGTAAGACA(SEQ ID NO:415)；第十六引物对，其包含序列AGTTGGGGTTGTAGTCGGTCAT(SEQ ID NO:363)和TATGGAGCAAAACTACTGTAGAGCC(SEQ ID NO:357)；第十七引物对，其包含序列AGTTGGGGTTGTAGTCGGTCAT(SEQ ID NO:363)和CCAGCTACATCACACACCTTGACT(SEQ ID NO:358)；第十八引物对，其包含序列AGTTGGGGTTGTAGTCGGTCAT(SEQ ID NO:363)和TAATACCAAAAGTTACCAAAACTGCA(SEQ ID NO:359)；第十九引物对，其包含序列GGAGTGCCATCGCTGTTTGAAATGAGCAGGCACT(SEQ ID NO:19)；第二十引物对，其包含序列GGAGTGCCATCGCTGTTTGAAATGAGCAGGCACT(SEQ ID NO:19)；第二十一引物对，其包含序列TACAGCCCTGGATATTCTTAGTAGCGC(SEQ ID NO:20)；第二十二引物对，其包含序列TACAGCCCTGGATATTCTTAGTAGCGC(SEQ ID NO:20)；第二十三引物对，其包含序列GTGATCGCACAGTAGGACAGCGGCTGCGATC(SEQ ID NO:26)和TTTCTGGTGCTATGAGGAAATGACCAACCACCAGA(SEQ ID NO:23)；第二十四引物对，其包含序列CTCTAGGAGATATCATTCCAAATTCGCCTTCTCCTAG(SEQ ID NO:27)和TTTCTGGTGCTATGAGGAAATGACCAACCACCAGA(SEQ ID NO:23)；第二

十五引物对，其包含序列CTCTAGGAGATATCATTCCAAATTCGCCTTCTCCTAG(SEQ ID NO:27)和AAGGAGTTAGCAGCATGTCAGC(SEQ ID NO:519)；第二十六引物对，其包含序列CTCTAGGAGATATCATTCCAAATTCGCCTTCTCCTAG(SEQ ID NO:27)和AACTTCAGACTTTACACAACCTGC(SEQ ID NO:520)；第二十七引物对，其包含序列CTCTAGGAGATATCATTCCAAATTCGCCTTCTCCTAG(SEQ ID NO:27)和ATTGATTCTGATGACACCGGA(SEQ ID NO:521)；第二十八引物对，其包含序列GGACGAAAATCCAGACCCCAAAAGGTGTTTCGT(SEQ ID NO:32)和AGAAGACGTGACAGGAACTGGAGGACCCGTCTT(SEQ ID NO:30)；第二十九引物对，其包含序列GACAGTATTTTGCAGTAATGGACTGGATATATCAGA(SEQ ID NO:29)和GAATTTCACAGGATTGATTGCTGGTGTTGTCTC(SEQ ID NO:28)；和

(c)多种阻断核酸，所述多种阻断核酸包括：第一阻断核酸，其包含序列TTGGAGCTGGTGGCGTA(invdT)$_n$，其中n为1、2、或3(SEQ ID NO:282)；第二阻断核酸，其包含序列TCTCTGAAATCACTGAGCAGG(invdT)$_n$，其中n为1、2、或3(SEQ ID NO:294)；第三阻断核酸，其包含序列CCACCATGATGTGCAT(invdT)$_n$，其中n为1、2、或3(SEQ ID NO:297)；第四阻断核酸，其包含序列GAGATTTCACTGTAGC(invdT)$_n$，其中n为1、2、或3(SEQ ID NO:305)；第五阻断核酸，其包含序列CGCACCGGAGCCCAGCAC(invdT)$_n$，其中n为1、2、或3(SEQ ID NO:309)；第六阻断核酸，其包含序列GTTGCTTCTCTTAATTCC(invdT)$_n$，其中n为1、2、或3(SEQ ID NO:313)；第七阻断核酸，其包含序列CTCATCACGCAGC(invdT)$_n$，其中n为1、2、或3(SEQ ID NO:320)；第八阻断核酸，其包含序列CCAGCAGTTTGGCCAGCCCT(invdT)$_n$，其中n为1、2、或3(SEQ ID NO:325)；第九阻断核酸，其包含序列GATGTACTCCCCTACA(invdT)$_n$，其中n为1、2、或3(SEQ ID NO:386)；和第十阻断核酸，其包含序列CACCTTCTGCTTCTGGG(invdT)$_n$，其中n为1、2、或3(SEQ ID NO:401)。

263.一种试剂盒，其包括：

(a)多种探针，其中所述多种探针中的每一种与微载体偶联，所述微载体具有对应于与其偶联的所述探针的独特标识符，所述多种探针包括：第一探针，其包含序列TTTTTTTTTTTATGGAGCTGATGGC(SEQ ID NO:45)；第二探针，其包含序列TTTTTTTTTTTATGGAGCTGTTGGC(SEQ ID NO:53)；第三探针，其包含序列TTTTTTTTTTTAAGGAGCTTGTGGC(SEQ ID NO:63)；第四探针，其包含序列TTTTTTTTTTTCTCAGTGATTTTAGA(SEQ ID NO:96)；第五探针，其包含序列TTTTTTTTTTTTTCTCCTGCTTAGT(SEQ ID NO:100)；第六探针，其包含序列TTTTTTTTTTTTAATGATGCACGTC(SEQ ID NO:116)；第七探针，其包含序列TTTTTTAATTTCTAGCTACAGAGAAAT(SEQ ID NO:86)；第八探针，其包含序列TTTTTTTTTTCAAAGTGCTGGCCTC(SEQ ID NO:118)；第九探针，其包含序列TTTTTTTTTAATCAAAACATCTCCG(SEQ ID NO:127)；第十探针，其包含序列TTTTTTTTAATCAAGACATCTCCGA(SEQ ID NO:137)；第十一探针，其包含序列TTTTTTTTTGAGATGCATGATGAG(SEQ ID NO:353)；第十二探针，其包含序列TTTTTTTTTTACCAGGAGGCTGCC(SEQ ID NO:468)；第十三探针，其包含序列TTTTTTTTTTACCAGGAGGGAGCC(SEQ ID NO:472)；第十四探针，其包含序列TTTTTTTTTAGGCCATCTTGGA(SEQ ID NO:424)；第十五探针，其包含序列TTTTTTTTTTGTGATGGCCGGCGT(SEQ ID NO:436)；第十六探针，其包含序列TTTTTTTTTTAACCCCCATCACGT(SEQ ID NO:442)；第十七探针，其包含序列

TTTTTTTTTTTCGTGGACGGTAACC(SEQ ID NO:454)；第十八探针，其包含序列TTTTTTTAAAAAAGCGGGCCAAACT(SEQ ID NO:156)；第十九探针，其包含序列TTTTTTTTACGTCTGTAGGGAAGTA(SEQ ID NO:379)；第二十探针，其包含序列TTTTTAAATTTACCCAGAATCAGAA(SEQ ID NO:388)；第二十一探针，其包含序列TTTTTTTTTATACGTGATGTCTTAC(SEQ ID NO:405)；第二十二探针，其包含序列TTTTTTTTTTCCTAAAGTGTACCGC(SEQ ID NO:164)；第二十三探针，其包含序列TTTTTTTTTTTTTATTGTACTTGTACCGCC(SEQ ID NO:176)；第二十四探针，其包含序列TTTTTTTTTTTTTTTCAACCAAGTGTACCG(SEQ ID NO:188)；第二十五探针，其包含序列TTTTTTTTTTTTTTACAGCCAAGTGTACCG(SEQ ID NO:200)；第二十六探针，其包含序列TTTTTTTTTTTCACCGAAAGCTGGAGTCCC(SEQ ID NO:210)；第二十七探针，其包含序列TTTTTTTTTTTCCGAAAGATGATTTT(SEQ ID NO:212)；第二十八探针，其包含序列TTTTTTTTTTTTCTGGTTGGAGCTGGAGTCCC(SEQ ID NO:224)；第二十九探针，其包含序列TTTTTTTTTTTGGTTGGAGATGATTTTT(SEQ ID NO:236)；第三十探针，其包含序列TTTTTTTTTTGATGTAAAGATCCACTGTG(SEQ ID NO:248)；第三十一探针，其包含序列TTTTTTTTTATGATGTAAAGGAGGATCC(SEQ ID NO:260)；第三十二探针，其包含序列TTTTTTTTTGTATCTCTCAAGAGGATCCAA(SEQ ID NO:484)；第三十三探针，其包含序列TTATTATTAAGAGTTAAAAAGGAGGATC(SEQ ID NO:811)；第三十四探针，其包含序列TATTATTATGTGCACAAACAGGAGGATC(SEQ ID NO:506)；第三十五探针，其包含序列TTTTTTTTTTAGGGCCCAGACACTAACAGC(SEQ ID NO:268)；第三十六探针，其包含序列TTTTTTTTTTAAATTAAAGATCAGTTTC(SEQ ID NO:276；

(b)多种引物对，所述多种引物对包含：第一引物对，其包含序列GTACTGGTGGAGTATTTGATAGTG(SEQ ID NO:1)和CGTCAAGGCACTCTTGCCTAC(SEQ ID NO:2)；第二引物对，其包含序列CAATTTCTACAAGAGATCCTCTCTCT(SEQ ID NO:5)和CTCCATTTTAGCACTTACCTGTGAC(SEQ ID NO:6)；第三引物对，其包含序列ACCCTAGCCTTAGATAAAACTGAGC(SEQ ID NO:7)和TTTGTTGTCCAGCCACCATGA(SEQ ID NO:8)；第四引物对，其包含序列ATAGCCTCAATTCTTACCATCCACAAAATG(SEQ ID NO:9)和CAGATATATTTCTTCATGAAGACCTCACAGTAA(SEQ ID NO:10)；第五引物对，其包含序列CTTGTGGAGCCTCTTACACCC(SEQ ID NO:11)和TGCCGAACGCACCGGA(SEQ ID NO:12)；第六引物对，其包含序列GCCAGTTAACGTCTTCCTTCTC(SEQ ID NO:13)和ATCGAGGATTTCCTTGTTGGCTT(SEQ ID NO:14)；第七引物对，其包含序列CCTCCACCGTGCAGATCATC(SEQ ID NO:15)和TTCCCTGATTACCTTTGCGAT(SEQ ID NO:16)；第八引物对，其包含序列CCACACTGACGTGCCTCT(SEQ ID NO:511)和GCACACGTAGGGGTTGTCCAAGA(SEQ ID NO:512)；第九引物对，其包含序列CCACACTGACGTGCCTCT(SEQ ID NO:513)和GTACACGCTGGCCACGCCG(SEQ ID NO:514)；第十引物对，其包含序列CCACACTGACGTGCCTCT(SEQ ID NO:515)和CAGGCGGCACACGTGAT(SEQ ID NO:516)；第十一引物对，其包含序列CCACACTGACGTGCCTCT(SEQ ID NO:517)和AGGCGGCACACGTGCGGGTTAC(SEQ ID NO:518)；第十二引物对，其包含序列GGAGGACCGTCGCTTGG(SEQ ID NO:17)和TCTTTCTCTTCCGCACCCAG(SEQ ID NO:18)；第十三引物对，其包含序列GAGGGTCTGACGGGTAGAGTG(SEQ ID NO:380)和TGGCCGCCAGGTCTTGATGTA(SEQ ID NO:381)；第十四引物对，其包含序列CTTGATGAGCAGCAGCGAAA(SEQ ID NO:397)和

CCTTCAGTTCTCCCACCTTCTG(SEQ ID NO:398)；第十五引物对，其包含序列ATGGCTGTGGTTTGTGATGGT(SEQ ID NO:414)和ACACCAGCCATCACGTAAGACA(SEQ ID NO:415)；第十六引物对，其包含序列AGTTGGGGTTGTAGTCGGTCAT(SEQ ID NO:363)和TATGGAGCAAAACTACTGTAGAGCC(SEQ ID NO:357)；第十七引物对，其包含序列AGTTGGGGTTGTAGTCGGTCAT(SEQ ID NO:363)和CCAGCTACATCACACACCTTGACT(SEQ ID NO:358)；第十八引物对，其包含序列AGTTGGGGTTGTAGTCGGTCAT(SEQ ID NO:363)和TAATACCAAAAGTTACCAAAACTGCA(SEQ ID NO:359)；第十九引物对，其包含序列GGAGTGCCATCGCTGTTTGAAATGAGCAGGCACT(SEQ ID NO:19)；第二十引物对，其包含序列GGAGTGCCATCGCTGTTTGAAATGAGCAGGCACT(SEQ ID NO:19)；第二十一引物对，其包含序列TACAGCCCTGGATATTCTTAGTAGCGC(SEQ ID NO:20)；第二十二引物对，其包含序列TACAGCCCTGGATATTCTTAGTAGCGC(SEQ ID NO:20)；第二十三引物对，其包含序列GTGATCGCACAGTAGGACAGCGGCTGCGATC(SEQ ID NO:26)和TTTCTGGTGCTATGAGGAAATGACCAACCACCAGA(SEQ ID NO:23)；第二十四引物对，其包含序列CTCTAGGAGATATCATTCCAAATTCGCCTTCTCCTAG(SEQ ID NO:27)和TTTCTGGTGCTATGAGGAAATGACCAACCACCAGA(SEQ ID NO:23)；第二十五引物对，其包含序列CTCTAGGAGATATCATTCCAAATTCGCCTTCTCCTAG(SEQ ID NO:27)和AAGGAGTTAGCAGCATGTCAGC(SEQ ID NO:519)；第二十六引物对，其包含序列CTCTAGGAGATATCATTCCAAATTCGCCTTCTCCTAG(SEQ ID NO:27)和AACTTCAGACTTTACACAACCTGC(SEQ ID NO:520)；第二十七引物对，其包含序列CTCTAGGAGATATCATTCCAAATTCGCCTTCTCCTAG(SEQ ID NO:27)和ATTGATTCTGATGACACCGGA(SEQ ID NO:521)；第二十八引物对，其包含序列GGACGAAAATCCAGACCCCAAAAGGTGTTTCGT(SEQ ID NO:32)和AGAAGACGTGACAGGAACTGGAGGACCCGTCTT(SEQ ID NO:30)；第二十九引物对，其包含序列GACAGTATTTTGCAGTAATGGACTGGATATATCAGA(SEQ ID NO:29)和GAATTTCACAGGATTGATTGCTGGTGTTGTCTC(SEQ ID NO:28)；和

(c)多种阻断核酸，所述多种阻断核酸包括：第一阻断核酸，其包含序列TACGCCACCAGCT(invdT)$_n$，其中n为1、2、或3(SEQ ID NO:281)；第二阻断核酸，其包含序列TCTCTGAAATCACTGAGCAGG(invdT)$_n$，其中n为1、2、或3(SEQ ID NO:293)；第三阻断核酸，其包含序列CACCATGATGTGCAT(invdT)$_n$，其中n为1、2、或3(SEQ ID NO:296)；第四阻断核酸，其包含序列GAGATTTCACTGTAGC(invdT)$_n$，其中n为1、2、或3(SEQ ID NO:303)；第五阻断核酸，其包含序列GAGCCCAGCAC(invdT)$_n$，其中n为1、2、或3(SEQ ID NO:308)；第六阻断核酸，其包含序列CGGAGATGTTGCTTCTCTTAATTCC(invdT)$_n$，其中n为1、2、或3(SEQ ID NO:311)；第七阻断核酸，其包含序列CATCACGCAGCTCATG(invdT)$_n$，其中n为1、2、或3(SEQ ID NO:316)；第八阻断核酸，其包含序列CCAGCAGTTTGGCCAGCCCT(invdT)$_n$，其中n为1、2、或3(SEQ ID NO:321)；第九阻断核酸，其包含序列TGTACTCCCCTACA(invdT)$_n$，其中n为1、2、或3(SEQ ID NO:382)；和第十阻断核酸，其包含序列TCTGCTTCTGGGTAAG(invdT)$_n$，其中n为1、2、或3(SEQ ID NO:399)。

用于检测肺癌中的DNA突变的图像区分多重测定

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2020年1月8日提交的美国专利申请号62/958,599的优先权,所述专利的内容以引用方式整体并入本文。

[0003] ASCII文本文件上的序列表的提交

[0004] ASCII文本文件上的以下提交的内容以引用方式整体并入本文:计算机可读形式(CRF)的序列表(文件名:695502001340SEQLIST.TXT,记录日期:2021年1月5日,大小:245KB)。

技术领域

[0005] 本文提供了用于使用微载体以及与其相关的试剂盒对样品中的DNA和/或RNA突变进行多重检测的方法。微载体使用标识符来编码,并且包括用于检测感兴趣的突变的探针。

背景技术

[0006] 早期检测是减少可归因于癌症的死亡的数量的关键重要因素,因为更晚期肿瘤的生长和转移与死亡率增加相关。大多数肺癌病例是散发性的,而不是遗传性的,但若干基因和甚至若干类型的特定突变在这些散发性病例是常见的。例如,EGFR、KRAS、MET、LKB1、BRAF、PIK3CA、ALK、RET和ROS1基因中的突变已经暗示在肺癌中高度相关(参见El-Telbany,A.和Ma,P.C.(2012)Genes Cancer 3:467-480。肺癌患者的总体生存率仍然相对较低,但早期检测和早期鉴定患者以进行靶向疗法(例如,用于某些突变的酪氨酸激酶抑制剂)可以导致响应率改善。因此,需要以高精确度水平同时检查多个基因的全面和快速的测试,而不是单个基因测试。

[0007] 免疫学和分子诊断测定在研究和临床领域中都发挥着关键作用。通常有必要对一组的多个目标执行测定,以获得有意义的或鸟瞰的结果,以促进研究或临床决策。在基因组学和蛋白质组学的时代尤其如此,其中大量的遗传标志物和/或生物标志物被认为影响或预测特定的疾病状态。理论上,多个目标的测定可以通过在不同反应容器中分别平行地或按顺序地测试每个目标来完成(即,多次单重)。然而,采用单重策略的测定不仅经常很麻烦,而且它们通常还需要大样品体积,尤其是当待分析的靶标数量很多时。

[0008] 多重测定在单次测定中同时测量多种分析物(两种或更多种)。多重测定通常用于高通量筛查设置,其中可以一次分析许多样本。多重测定的标志是同时分析许多分析物和平行地分析许多样本的能力,并且是此类测定已经成为领域中(从药物发现到功能基因组学再到临床诊断学)的强大工具的原因。与单重相比,通过在同一反应容器中组合所有目标,该测定更简单且更易于执行,因为每个样品仅处理一个反应容器。因此,所需的测试样品的体积可以显著减少,这在样品(例如,肿瘤组织、脑脊液或骨髓)难以大量获取和/或侵入性地大量获取时尤其重要。同样重要的是事实上可以降低试剂成本并大幅增加测定通量。

[0009] 许多复合物大分子样品的测定由两个步骤组成。在第一步中,将能够特异性捕获

目标大分子的剂附着在固相表面上。这些固定的分子可用于通过各种方式(诸如杂交(例如,在基于DNA、RNA的测定中))从复合物样品中捕获目标大分子。在第二步中,将检测分子与捕获分子和目标的复合物一起孵育并结合,从而发射信号(诸如荧光或其他电磁信号)。然后通过那些信号的强度来量化目标的量。

[0010] 可以通过利用多种捕获剂来进行多重测定,每种捕获剂对不同的目标大分子具有特异性。在基于芯片的阵列多重测定中,每种类型的捕获剂(例如,单链寡核苷酸探针)都连接到芯片上的预先限定的位置。复合物样品中的多重目标的量通过测量检测分子在对应于一种类型的捕获剂的每个位置处的信号来确定。在悬浮阵列多重测定中,微粒或微载体悬浮在测定溶液中。这些微粒或微载体含有鉴定元素,所述鉴定元素可由微粒/微载体的一种或多种元素嵌入、印刷或以其他方式生成。每种类型的捕获剂都固定至具有相同ID的颗粒,并且从具有特定ID的颗粒的表面上的检测分子发射的信号反映了对应目标的量。

[0011] 多重测定特别适合的一种应用是检测DNA和/或RNA突变。特别地,检测与肺癌相关的突变可以有助于早期诊断和鉴定适合靶向疗法的患者,这取决于其癌症的遗传组成。然而,现有的诊断技术经常昂贵或耗时。用于使用连续的、单个的测定检测多个基因突变的方法是耗时的,并且在使用不同测定类型的情况下缺乏一致性(参见Schneider,M.等人(2011)Cancers 3:91-105)。将多重测定技术(诸如模拟编码的微载体)应用于此问题可以提供更便宜、更快速的测定和更准确的结果,同时使得在单个测定中对已知与肿瘤发生相关的许多突变进行多重筛查。

[0012] 因此,需要将稳健且灵敏的多重测定系统应用于筛查DNA和/或突变的问题。这提供了用于在单个测定中多重检测许多DNA和/或RNA突变的机制。

[0013] 本文引用的所有出版物、专利和专利申请均出于所有目的以引用方式整体并入本文。

发明内容

[0014] 为了满足此需要,本文尤其提供了使用微载体的方法和试剂盒,所述微载体使用独特标识符编码,包括用于检测DNA或RNA突变(例如,与肺癌相关的突变)的探针。这些微载体可用于多重测定,在所述多重测定中,每种微载体包括用于检测特定突变的探针和用于将微载体与其相关探针相关联的标识符。本文公开的方法和试剂盒可用于例如监测肺癌、监测对肺癌治疗的响应和/或肺癌的早期筛查/检测。

[0015] 因此,在一个方面,本文提供了用于检测KRAS、NRAS、PIK3CA、BRAF、EGFR、AKT1、MEK1和HER2基因中的DNA突变的存在的方法,所述方法包括:(a)从样品中分离DNA(例如,从患者获得);(b)使用对KRAS、NRAS、PIK3CA、BRAF、EGFR、AKT1、MEK1和HER2基因中的每一个中的一种或多种DNA突变的基因座具有特异性的引物对,通过聚合酶链反应(PCR)扩增分离的DNA(例如,体外);(c)将扩增的DNA与至少七种探针杂交,所述至少七种探针包括对KRAS、NRAS、PIK3CA、BRAF、EGFR、AKT1、MEK1和HER2基因中的每一个中的DNA突变具有特异性的一种或多种探针,其中所述至少七种探针中的每一种都与微载体偶联,并且其中微载体中的每一种都包含对应于与其偶联的探针的标识符;(d)检测扩增的DNA与所述至少七种探针的杂交存在或不存在,其中扩增的DNA和所述探针之一之间的杂交表明对应于所述探针的DNA突变的存在;(e)检测微载体的标识符的存在;和(f)将检测到的微载体的标识符与检测到

的扩增的DNA与微载体的对应探针的杂交存在或不存在相关联。在一些实施方案中，KRAS、NRAS、PIK3CA、BRAF、EGFR、AKT1、MEK1和HER2基因是人基因。

[0016] 在一些实施方案中，步骤(b)包括在至少七种阻断核酸的存在下通过PCR扩增分离的DNA，其中所述至少七种阻断核酸中的每一种与对应于KRAS、PIK3CA、BRAF、EGFR、AKT1、MEK1或HER2基因中的DNA突变之一的野生型DNA基因座杂交，并且防止野生型DNA基因座的扩增。在一些实施方案中，所述至少七种阻断核酸中的每一种都包含：与对应的野生型DNA基因座杂交的单链寡核苷酸；和阻断从单链寡核苷酸延伸的3′末端部分。在一些实施方案中，3′末端部分包含一个或多个反向脱氧胸苷。在一些实施方案中，所述至少七种阻断核酸中的每一种都包含一种或多种选自由以下组成的组的经修饰的核苷酸：锁核酸(LNA)、肽核酸(PNA)、己糖核酸(HNA)、苏糖核酸(TNA)、乙二醇核酸(GNA)和环己烯基核酸(CeNA)。

[0017] 在一些实施方案中，KRAS基因中的一种或多种DNA突变包括一种或多种编码G12D、G12V或G12C突变的KRAS蛋白的DNA突变。在一些实施方案中，KRAS基因中的一种或多种DNA突变包括编码G12D、G12V和G12C突变的KRAS蛋白的DNA突变。在一些实施方案中，对KRAS基因中的一种或多种DNA突变具有特异性的探针包括：(1)第一探针，其包含选自由以下组成的组的序列：TAGTTGGAGCT(SEQ ID NO:38)、TGTGGTAGTTG(SEQ ID NO:40)、TGATGGCGTAG(SEQ ID NO:42)、TGGAGCTGATGGC(SEQ ID NO:44)和GCGTAGGCAAG(SEQ ID NO:46)；(2)第二探针，其包含选自由以下组成的组的序列：CTGTTGGCGTAGG(SEQ ID NO:48)、GTAGTTGGAGCTG(SEQ ID NO:50)、TGGAGCTGTTGGC(SEQ ID NO:52)、TTGTGGTAGTTGG(SEQ ID NO:54)和GGCGTAGGCAAGA(SEQ ID NO:56)；和(3)第三探针，其包含选自由以下组成的组的序列：TAGTTGGAGCTT(SEQ ID NO:58)、GCGTAGGCAAGA(SEQ ID NO:60)、GGAGCTTGTGGC(SEQ ID NO:62)、TTGTGGCGTAGG(SEQ ID NO:64)和TGTGGTAGTTGG(SEQ ID NO:66)；其中三种探针中的每一种与具有不同标识符的微载体偶联。在一些实施方案中，三种探针中的每一种还包含5′端处的八个核苷酸，并且其中5′端处的八个核苷酸是腺嘌呤或胸腺嘧啶核苷酸。在一些实施方案中，对KRAS基因中的一种或多种DNA突变具有特异性的探针包括：(1)第一探针，其包含选自由以下组成的组的序列：TTTTTTTTTTTTAATAGTTGGAGCT(SEQ ID NO:39)、TTTTTTTTTTTTAATGTGGTAGTTG(SEQ ID NO:41)、TTTTTTTTTTTTAATGATGGCGTAG(SEQ ID NO:43)、TTTTTTTTTTTATGGAGCTGATGGC(SEQ ID NO:45)和TTTTTTTTTTTTAAGCGTAGGCAAG(SEQ ID NO:47)；(2)第二探针，其包含选自由以下组成的组的序列：TTTTTTTTTTTACTGTTGGCGTAGG(SEQ ID NO:49)、TTTTTTTTTTTAGTAGTTGGAGCTG(SEQ ID NO:51)、TTTTTTTTTTTATGGAGCTGTTGGC(SEQ ID NO:53)、TTTTTTTTTTTATTGTGGTAGTTGG(SEQ ID NO:55)和TTTTTTTTTTTAGGCGTAGGCAAGA(SEQ ID NO:57)；和(3)第三探针，其包含选自由以下组成的组的序列：TTTTTTTTTTTAATAGTTGGAGCTT(SEQ ID NO:59)、TTTTTTTTTTTAAGCGTAGGCAAGA(SEQ ID NO:61)、TTTTTTTTTTTAAGGAGCTTGTGGC(SEQ ID NO:63)、TTTTTTTTTTAATTGTGGCGTAGG(SEQ ID NO:65)和TTTTTTTTTTTAATGTGGTAGTTGG(SEQ ID NO:67)；其中三种探针中的每一种与具有不同标识符的微载体偶联。在一些实施方案中，步骤(b)包括使用包含序列GTACTGGTGGAGTATTTGATAGTG(SEQ ID NO:1)和CGTCAAGGCACTCTTGCCTAC(SEQ ID NO:2)的引物对通过PCR扩增分离的DNA。在一些实施方案中，步骤(b)包括在与对应于KRAS DNA突变之一的野生型KRAS DNA基因座杂交并且防止野生型KRAS DNA基因座扩增的阻断核酸的存在下通过PCR扩增分离的DNA，并且其中阻断核酸

包含序列TACGCCACCAGCT(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:281);TTGGAGCTGGTGGCGTA(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:282);GCTGGTGGCGTAGGCA(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:283);GCTGGTGGCGTAGGC(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:284);或TTGGAGCTGGTGGCGT(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:285);斜体的核酸表示锁核酸。

[0018] 在一些实施方案中,PIK3CA基因中的一种或多种DNA突变包括一种或多种编码E542K或E545K突变的PIK3CA蛋白的DNA突变。在一些实施方案中,PIK3CA基因中的一种或多种DNA突变包括编码E542K和E545K突变的PIK3CA蛋白的DNA突变。在一些实施方案中,对PIK3CA基因中的一种或多种DNA突变具有特异性的探针包括:(1)第一探针,其包含选自由以下组成的组的序列:GCTCAGTGATTTTAG(SEQ ID NO:87)、TGCTCAGTGATTTT(SEQ ID NO:89)、GCTCAGTGATTTTAG(SEQ ID NO:91)、CCTGCTCAGTGATTTTA(SEQ ID NO:93)和CTCAGTGATTTTAGA(SEQ ID NO:95);和(2)第二探针,其包含选自由以下组成的组的序列:TTCTCCTGCTTA(SEQ ID NO:97)、CTCCTGCTTAGT(SEQ ID NO:99)、TCTCCTGCTTAG(SEQ ID NO:101)、TCCTGCTTAGTG(SEQ ID NO:103)和CTCCTGCTTAGTGA(SEQ ID NO:105);其中两种探针中的每一种与具有不同标识符的微载体偶联。在一些实施方案中,两种探针中的每一种还包含5′端处的八个核苷酸,并且其中5′端处的八个核苷酸是腺嘌呤或胸腺嘧啶核苷酸。对PIK3CA基因中的一种或多种DNA突变具有特异性的探针包括:(1)第一探针,其包含选自由以下组成的组的序列:TTTTTTTTTAGCTCAGTGATTTTAG(SEQ ID NO:88)、TTTTTTTTTGCTCAGTGATTTT(SEQ ID NO:90)、TTTTTTTTAGCTCAGTGATTTTAG(SEQ ID NO:92)、TTTTTTCCTGCTCAGTGATTTA(SEQ ID NO:94)和TTTTTTTTTTTCTCAGTGATTTTAGA(SEQ ID NO:96);和(2)第二探针,其包含选自由以下组成的组的序列:TTTTTTTTTTTTCTCCTGCTTA(SEQ ID NO:98)、TTTTTTTTTTTTTCTCCTGCTTAGT(SEQ ID NO:100)、TTTTTTTTTTATCTCCTGCTTAG(SEQ ID NO:102)、TTTTTTTTTTTTTTTCCTGCTTAGTG(SEQ ID NO:104)和TTTTTTTTTTTTTCTCCTGCTTAGTGA(SEQ ID NO:106);其中三种探针中的每一种与具有不同标识符的微载体偶联。在一些实施方案中,步骤(b)包括使用包含序列CAATTTCTACAAGAGATCCTCTCTCT(SEQ ID NO:5)和CTCCATTTTAGCACTTACCTGTGAC(SEQ ID NO:6)的引物对通过PCR扩增分离的DNA。在一些实施方案中,步骤(b)包括在与对应于PIK3CA DNA突变之一的野生型PIK3CA DNA基因座杂交并且防止野生型PIK3CA DNA基因座扩增的阻断核酸的存在下通过PCR扩增分离的DNA,并且其中至少七种阻断核酸中的至少一种包含序列CTGAAATCACTGAGCAGG(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:291);TCTCTGAAATCACTGAGCAGG(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:292);TCTCTGAAATCACTGAGCAGG(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:293);TCTCTGAAATCACTGAGCAGG(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:294);或TCTCTGAATTCACTGAGCAGG(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:295);斜体的核酸表示锁核酸。在一些实施方案中,PIK3CA基因中的一种或多种DNA突变包括编码H1047R突变的PIK3CA蛋白的DNA突变。在一些实施方案中,对PIK3CA基因中的一种或多种DNA突变具有特异性的探针包括:(1)第一探针,其包含选自由以下组成的组的序列:GATGCACGTCATG(SEQ ID NO:107)、TGAATGATGCACG(SEQ ID NO:109)、TGATGCACGTC(SEQ ID NO:111)、AATGATGCACGTCA(SEQ ID NO:113)和AATGATGCACGTC(SEQ ID NO:115);其中第一探针与具有标识符的微载体偶联。在一些实施方案中,第一探针还包含5′端处的八个核苷酸,并且其中5′端处的八个

核苷酸是腺嘌呤或胸腺嘧啶核苷酸。在一些实施方案中，对PIK3CA基因中的一种或多种DNA突变具有特异性的探针包括：(1)第一探针，其包含选自由以下组成的组的序列：TTTTTTTTTTTTTTGATGCACGTCATG(SEQ ID NO:108)、TTTTTTTTTTGAATGATGCACG(SEQ ID NO:110)、TTTTTTTTTTTTGATGCACGTC(SEQ ID NO:112)、TTTTTTTTTTTTAATGATGCACGTCA(SEQ ID NO:114)和TTTTTTTTTTTTAATGATGCACGTC(SEQ ID NO:116)；其中第一探针与具有标识符的微载体偶联。在一些实施方案中，步骤(b)包括使用包含序列ACCCTAGCCTTAGATAAAACTGAGC(SEQ ID NO:7)和TTTGTTGTCCAGCCACCATGA(SEQ ID NO:8)的引物对通过PCR扩增分离的DNA。在一些实施方案中，步骤(b)包括在与对应于PIK3CA DNA突变之一的野生型PIK3CA DNA基因座杂交并且防止野生型PIK3CA DNA基因座扩增的阻断核酸的存在下通过PCR扩增分离的DNA，并且其中至少七种阻断核酸中的至少一种包含序列CACCATGATGTGCAT(invdT)$_n$，其中n为1、2或3(SEQ ID NO:296)；CCACCATGATGTGCAT(invdT)$_n$，其中n为1、2或3(SEQ ID NO:297)；CACCATGATGTGCAT(invdT)$_n$，其中n为1、2或3(SEQ ID NO:298)；CCACCATGATGTGCATCA(invdT)$_n$，其中n为1、2或3(SEQ ID NO:299)；或CATGATGTGCA(invdT)$_n$，其中n为1、2或3(SEQ ID NO:300)；斜体的核酸表示锁核酸。

[0019] 在一些实施方案中，BRAF基因中的一种或多种DNA突变包括一种或多种编码V600E突变的BRAF蛋白的DNA突变。在一些实施方案中，对BRAF基因中的一种或多种DNA突变具有特异性的探针包含选自由以下组成的组的序列：TTTGGTCTAGCTACAGA(SEQ ID NO:79)、CTACAGAGAAATCTCGA(SEQ ID NO:81)、GTGATTTTGGTCTAGCT(SEQ ID NO:83)和TCTAGCTACAGAGAAAT(SEQ ID NO:85)。在一些实施方案中，对BRAF基因中的一种或多种DNA突变具有特异性的探针还包含5′端处的八个核苷酸，并且其中5′端处的八个核苷酸是腺嘌呤或胸腺嘧啶核苷酸。在一些实施方案中，对BRAF基因中的一种或多种DNA突变具有特异性的探针包含选自由以下组成的组的序列：TTTTTTAATTGAGAAATCTCGATGGAG(SEQ ID NO:78)、TTTTTTAATTTTTGGTCTAGCTACAGA(SEQ ID NO:80)、TTTTTTAATTCTACAGAGAAATCTCGA(SEQ ID NO:82)、TTTTTTAATTGTGATTTTGGTCTAGCT(SEQ ID NO:84)和TTTTTTAATTTCTAGCTACAGAGAAAT(SEQ ID NO:86)。在一些实施方案中，步骤(b)包括使用包含序列ATAGCCTCAATTCTTACCATCCACAAAATG(SEQ ID NO:9)和CAGATATATTTCTTCATGAAGACCTCACAGTAA(SEQ ID NO:10)的引物对通过PCR扩增分离的DNA。在一些实施方案中，步骤(b)包括在与对应于BRAF DNA突变的野生型BRAF DNA基因座杂交并且防止野生型BRAF DNA基因座扩增的阻断核酸的存在下通过PCR扩增分离的DNA，并且其中至少七种阻断核酸中的至少一种包含序列GAGATTTCACTGTAGC(invdT)$_n$，其中n为1、2或3(SEQ ID NO:301)；GAGATTTCACTGTAGC(invdT)$_n$，其中n为1、2或3(SEQ ID NO:302)；GAGATTTCACTGTAGC(invdT)$_n$，其中n为1、2或3(SEQ ID NO:303)；GAGATTTCACTGTAGC(invdT)$_n$，其中n为1、2或3(SEQ ID NO:304)；或GAGATTTCACTGTAGC(invdT)$_n$，其中n为1、2或3(SEQ ID NO:305)；斜体的核酸表示锁核酸。

[0020] 在一些实施方案中，EGFR基因中的一种或多种DNA突变包括一种或多种编码G719A突变的EGFR蛋白的DNA突变。在一些实施方案中，对EGFR基因中的一种或多种DNA突变具有特异性的探针包含选自由以下组成的组的序列：TCAAAGTGCTGGCCTC(SEQ ID NO:117)、AGATCAAAGTGCTGGCCTCCG(SEQ ID NO:119)、AAAGTGCTGGCCT(SEQ ID NO:121)、AGTGCTGGCCT(SEQ ID NO:123)和AAGTGCTGGCCTC(SEQ ID NO:125)。在一些实施方案中，对EGFR基因中的一种或多种DNA突变具有特异性的探针还包含5′端处的八个核苷酸，并且其中5′端处的八

个核苷酸是腺嘌呤或胸腺嘧啶核苷酸。在一些实施方案中，对EGFR基因中的一种或多种DNA突变具有特异性的探针包含选自由以下组成的组的序列：TTTTTTTTTTCAAAGTGCTGGCCTC(SEQ ID NO:118)、TTTTTTAGATCAAAGTGCTGGCCTCCG(SEQ ID NO:120)、TTTTTTTTTTTAAAGTGCTGGCCT(SEQ ID NO:122)、TTTTTTTTTTTTTAGTGCTGGCCT(SEQ ID NO:124)和TTTTTTTTTTTTAAGTGCTGGCCTC(SEQ ID NO:126)。在一些实施方案中，步骤(b)包括使用包含序列CTTGTGGAGCCTCTTACACCC(SEQ ID NO:11)和TGCCGAACGCACCGGA(SEQ ID NO:12)的引物对通过PCR扩增分离的DNA。在一些实施方案中，步骤(b)包括在与对应于EGFR DNA突变的野生型EGFR DNA基因座杂交并且防止野生型EGFR DNA基因座扩增的阻断核酸的存在下通过PCR扩增分离的DNA，并且其中至少七种阻断核酸中的至少一种包含序列CGGAGCCCAGCACTTTGA(invdT)$_n$，其中n为1、2或3(SEQ ID NO:306)；CGCACCGGAGCCCAGCACT(invdT)$_n$，其中n为1、2或3(SEQ ID NO:307)；GAGCCCAGCAC(invdT)$_n$，其中n为1、2或3(SEQ ID NO:308)；CGCACCGGAGCCCAGCAC(invdT)$_n$，其中n为1、2或3(SEQ ID NO:309)；或CGCACCGGAGCCCAGCACTTA(invdT)$_n$，其中n为1、2或3(SEQ ID NO:310)；斜体的核酸表示锁核酸。在一些实施方案中，EGFR基因中的一种或多种DNA突变包括一种或多种编码E746_A750del突变的EGFR蛋白的DNA突变。在一些实施方案中，对EGFR基因中的一种或多种DNA突变具有特异性的探针包括：(1)第一探针，其包含选自由以下组成的组的序列：AATCAAAACATCTCCGAAAG(SEQ ID NO:128)、CAAAACATCTCCG(SEQ ID NO:130)、AACATCTCCG(SEQ ID NO:132)和AAACATCTCCGAAAGCC(SEQ ID NO:134)；和(2)第二探针，其包含选自由以下组成的组的序列：AATCAAGACATCTCCGA(SEQ ID NO:136)、GCAATCAAGACATCTCCGA(SEQ ID NO:138)、AATCAAGACATCTC(SEQ ID NO:140)、AATCAAGACATCTCCGAAAGC(SEQ ID NO:142)和CAAGACATCTCCGA(SEQ ID NO:144)；其中两种探针中的每一种与具有不同标识符的微载体偶联。在一些实施方案中，两种探针中的每一种还包含5′端处的八个核苷酸，并且其中5′端处的八个核苷酸是腺嘌呤或胸腺嘧啶核苷酸。在一些实施方案中，对EGFR基因中的一种或多种DNA突变具有特异性的探针包括：(1)第一探针，其包含选自由以下组成的组的序列：TTTTTTTTAATCAAAACATCTCCG(SEQ ID NO:127)、TTTTTTTTAATCAAAACATCTCCGAAAG(SEQ ID NO:129)、TTTTTTTTTTTACAAAACATCTCCG(SEQ ID NO:131)、TTTTTTTTTTTTTTTAACATCTCCG(SEQ ID NO:133)和TTTTTTTTTTTTTTAAACATCTCCGAAAGCC(SEQ ID NO:135)；和(2)第二探针，其包含选自由以下组成的组的序列：TTTTTTTAATCAAGACATCTCCGA(SEQ ID NO:137)、TTTTTTGCAATCAAGACATCTCCGA(SEQ ID NO:139)、TTTTTTTTAATCAAGACATCTC(SEQ ID NO:141)、TTTTTTTAATCAAGACATCTCCGAAAGC(SEQ ID NO:143)和TTTTTTTTTTTCAAGACATCTCCGA(SEQ ID NO:145)；其中两种探针中的每一种与具有不同标识符的微载体偶联。在一些实施方案中，步骤(b)包括使用包含序列GCCAGTTAACGTCTTCCTTCTC(SEQ ID NO:13)和ATCGAGGATTTCCTTGTTGGCTT(SEQ ID NO:14)的引物对通过PCR扩增分离的DNA。在一些实施方案中，步骤(b)包括在与对应于EGFR DNA突变的野生型EGFR DNA基因座杂交并且防止野生型EGFR DNA基因座扩增的阻断核酸的存在下通过PCR扩增分离的DNA，并且其中至少七种阻断核酸中的至少一种包含序列CGGAGATGTTGCTTCTCTTAATTCC(invdT)$_n$，其中n为1、2或3(SEQ ID NO:311)；CGGAGATGTTGCTTCTCT(invdT)$_n$，其中n为1、2或3(SEQ ID NO:312)；GTTGCTTCTCTTAATTCC(invdT)$_n$，其中n为1、2或3(SEQ ID NO:313)；ATGTTGCTTCTCT(invdT)$_n$，其中n为1、2或3(SEQ ID NO:314)；或TTGCTTCTCTTA(invdT)$_n$，其中n为1、2或3(SEQ ID NO:

315)；斜体的核酸表示锁核酸。在一些实施方案中，EGFR基因中的一种或多种DNA突变包括一种或多种编码T790M、C797S、S768I、V769_D770insASV、H773_V774insH、D770_N771insG或D770_N771insSVD突变的EGFR蛋白的DNA突变。在一些实施方案中，EGFR基因中的一种或多种DNA突变包括编码T790M、C797S、S768I、V769_D770insASV、H773_V774insH、D770_N771insG和D770_N771insSVD突变的EGFR蛋白的DNA突变。在一些实施方案中，对EGFR基因中的一种或多种DNA突变具有特异性的探针包括：(1)第一探针，其包含选自由以下组成的组的序列：GAGATGCATGATGA(SEQ ID NO:146)、TGAGATGCATGATGAG(SEQ ID NO:147)、ATGAGATGCATGATGAG(SEQ ID NO:148)、TGAGCTGCATGATGA(SEQ ID NO:149)和CATGAGATGCATGATGA(SEQ ID NO:150)；(2)第二探针，其包含选自由以下组成的组的序列：CCAGGAGGCTGCCG(SEQ ID NO:461)、CAGGAGGCTGCCGA(SEQ ID NO:463)、TCCAGGAGGCTGCC(SEQ ID NO:465)、CCAGGAGGCTGCC(SEQ ID NO:467)和CAGGAGGCTGCC(SEQ ID NO:469)；(3)第三探针，其包含选自由以下组成的组的序列：CCAGGAGGGAGCC(SEQ ID NO:471)、CCAGGAGGGAGCCG(SEQ ID NO:473)、TCCAGGAGGGAGCC(SEQ ID NO:475)、CAGGAGGGAGCCG(SEQ ID NO:477)和CAGGAGGGAGCCGA(SEQ ID NO:479)；(4)第四探针，其包含选自由以下组成的组的序列：ATGGCCATCTTGG(SEQ ID NO:421)、GGCCATCTTGGA(SEQ ID NO:423)、GATGGCCATCTTG(SEQ ID NO:425)、TGATGGCCATCTTG(SEQ ID NO:427)和TGGCCATCTTGG(SEQ ID NO:429)；(5)第五探针，其包含选自由以下组成的组的序列：GTGATGGCCGG(SEQ ID NO:431)、TGATGGCCGGCG(SEQ ID NO:433)、GTGATGGCCGGCGT(SEQ ID NO:435)、GATGGCCGGCGT(SEQ ID NO:437)和GATGGCCCGCGTG(SEQ ID NO:439)；(6)第六探针，其包含选自由以下组成的组的序列：AACCCCCATCACGT(SEQ ID NO:441)、GACAACCCCCATCACG(SEQ ID NO:443)、CGTGGACAACCCCCATCA(SEQ ID NO:445)、CCCATCACGTGT(SEQ ID NO:447)和TGGACAACCCCCATCAC(SEQ ID NO:449)；和(7)第七探针，其包含选自由以下组成的组的序列：GCCAGCGTGGACGG(SEQ ID NO:451)、CGTGGACGGTAACC(SEQ ID NO:453)、GACGGTAACCCCC(SEQ ID NO:455)、CCAGCGTGGACGGT(SEQ ID NO:457)和GCCAGCGTGGACGGTA(SEQ ID NO:459)；其中七种探针中的每一种与具有不同标识符的微载体偶联。在一些实施方案中，对EGFR基因中的一种或多种DNA突变具有特异性的七种探针中的每一种还包含5′端处的八个核苷酸，并且其中5′端处的八个核苷酸是腺嘌呤或胸腺嘧啶核苷酸。在一些实施方案中，对EGFR基因中的一种或多种DNA突变具有特异性的探针包括：(1)第一探针，其包含选自由以下组成的组的序列：TTTTTTTTTTTGAGATGCATGATGA(SEQ ID NO:352)、TTTTTTTTTGAGATGCATGATGAG(SEQ ID NO:353)、TTTTTTTTATGAGATGCATGATGAG(SEQ ID NO:354)、TTTTTTTTTTGAGCTGCATGATGA(SEQ ID NO:355)和TTTTTTTTCATGAGATGCATGATGA(SEQ ID NO:356)；(2)第二探针，其包含选自由以下组成的组的序列：TTTTTTTTTTACCAGGAGGCTGCCG(SEQ ID NO:462)、TTTTTTTTTTACAGGAGGCTGCCGA(SEQ ID NO:464)、TTTTTTTTTTATCCAGGAGGCTGCC(SEQ ID NO:466)、TTTTTTTTTTACCAGGAGGCTGCC(SEQ ID NO:468)和TTTTTTTTTTACAGGAGGCTGCC(SEQ ID NO:470)；(3)第三探针，其包含选自由以下组成的组的序列：TTTTTTTTTTACCAGGAGGGAGCC(SEQ ID NO:472)、TTTTTTTTTTACCAGGAGGGAGCCG(SEQ ID NO:474)、TTTTTTTTTTATCCAGGAGGGAGCC(SEQ ID NO:476)、TTTTTTTTTTACAGGAGGGAGCCG(SEQ ID NO:478)和TTTTTTTTTTACAGGAGGGAGCCGA(SEQ ID NO:480)；(4)第四探针，其包含选自由以下组成的组的序列：

TTTTTTTTTATGGCCATCTTGG(SEQ ID NO:422)、TTTTTTTTTTAGGCCATCTTGGA(SEQ ID NO:424)、TTTTTTTAGATGGCCATCTTG(SEQ ID NO:426)、TTTTTTTTGATGGCCATCTTG(SEQ ID NO:428)和TTTTTTTTTTTGGCCATCTTGG(SEQ ID NO:430)；(5)第五探针，其包含选自由以下组成的组的序列:TTTTTTTTTTTGTGATGGCCGG(SEQ ID NO:432)、TTTTTTTTTTTTTGATGGCCGGCG(SEQ ID NO:434)、TTTTTTTTTTTGTGATGGCCGGCGT(SEQ ID NO:436)、TTTTTTTTTTTTTGATGGCCGGCGT(SEQ ID NO:438)和TTTTTTTTTTTTTTGATGGCCCGCGTG(SEQ ID NO:440)；(6)第六探针，其包含选自由以下组成的组的序列:TTTTTTTTTTTAACCCCCATCACGT(SEQ ID NO:442)、TTTTTTTTGACAACCCCCATCACG(SEQ ID NO:444)、TTTTCGTGGACAACCCCCATCA(SEQ ID NO:446)、TTTTTTTTTTTTCCCATCACGTGT(SEQ ID NO:448)和TTTTTTTTGGACAACCCCCATCAC(SEQ ID NO:450)；和(7)第七探针，其包含选自由以下组成的组的序列:TTTTTTTTTTTGCCAGCGTGGACGG(SEQ ID NO:452)、TTTTTTTTTTTCGTGGACGGTAACC(SEQ ID NO:454)、TTTTTTTTTTTGACGGTAACCCCC(SEQ ID NO:456)、TTTTTTTTTTCCAGCGTGGACGGT(SEQ ID NO:458)和TTTTTTTGCCAGCGTGGACGGTA(SEQ ID NO:460)；其中七种探针中的每一种与具有不同标识符的微载体偶联。在一些实施方案中，步骤(b)包括使用以下引物对通过PCR扩增分离的DNA:包含序列CCTCCACCGTGCAGATCATC(SEQ ID NO:15)和TTCCCTGATTACCTTTGCGAT(SEQ ID NO:16)的引物对；包含序列CCACACTGACGTGCCTCT(SEQ ID NO:511)和GCACACGTAGGGGTTGTCCAAGA(SEQ ID NO:512)的引物对；包含序列CCACACTGACGTGCCTCT(SEQ ID NO:513)和GTACACGCTGGCCACGCCG(SEQ ID NO:514)的引物对；包含序列CCACACTGACGTGCCTCT(SEQ ID NO:515)和CAGGCGGCACACGTGAT(SEQ ID NO:516)的引物对；和/或包含序列CCACACTGACGTGCCTCT(SEQ ID NO:517)和AGGCGGCACAC GTGCGGGTTAC(SEQ ID NO:518)的引物对。在一些实施方案中，步骤(b)包括在与对应于EGFR DNA突变的野生型EGFR DNA基因座杂交并且防止野生型EGFR DNA基因座扩增的阻断核酸的存在下通过PCR扩增分离的DNA，并且其中至少七种阻断核酸中的至少一种包含序列CATCACGCAGCTCATG(invdT)$_n$，其中n为1、2或3(SEQ ID NO:316)；TGCAGCTCATCACGCAGC(invdT)$_n$，其中n为1、2或3(SEQ ID NO:317)；TCATCACGCAGCTCAT(invdT)$_n$，其中n为1、2或3(SEQ ID NO:318)；TCATCACGCAGC(invdT)$_n$，其中n为1、2或3(SEQ ID NO:319)；或CTCATCACGCAGC(invdT)$_n$，其中n为1、2或3(SEQ ID NO:320)；斜体的核酸表示锁核酸。在一些实施方案中，EGFR基因中的一种或多种DNA突变包括一种或多种编码L858R突变的EGFR蛋白的DNA突变。在一些实施方案中，对EGFR基因中的一种或多种DNA突变具有特异性的探针包括:第一探针，其包含选自由以下组成的组的序列:ATTTTGGGCGGGCC(SEQ ID NO:151)、TTGGGCGGGCCAAA(SEQ ID NO:153)、GCGGGCCAAACT(SEQ ID NO:155)、GGGCGGGCCAAACT(SEQ ID NO:157)和TGGGCGGGCCA(SEQ ID NO:159)；其中第一探针与具有标识符的微载体偶联。在一些实施方案中，第一探针还包含5′端处的八个核苷酸，并且其中5′端处的八个核苷酸是腺嘌呤或胸腺嘧啶核苷酸。在一些实施方案中，对EGFR基因中的一种或多种DNA突变具有特异性的探针包括:第一探针，其包含选自由以下组成的组的序列:TTTTTTTATTTTGGGCGGGCC(SEQ ID NO:152)、TTTTTTTTAATTGGGCGGGCCAAA(SEQ ID NO:154)、TTTTTTTAAAAAAGCGGGCCAAACT(SEQ ID NO:156)、TTTTTTTTAAAAGGGCGGGCCAAACT(SEQ ID NO:158)和TTTTTTTTTAAATGGGCGGGCCA(SEQ ID NO:160)；其中第一探针与具有标识符的微载体偶联。在一些实施方案中，步骤(b)包括使用包含序列GGAGGACCGTCGCTTGG(SEQ ID NO:17)和TCTTTCTCTTCCGCACCCAG(SEQ ID NO:18)的

引物对通过PCR扩增分离的DNA。在一些实施方案中，步骤(b)包括在与对应于EGFR DNA突变的野生型EGFR DNA基因座杂交并且防止野生型EGFR DNA基因座扩增的阻断核酸的存在下通过PCR扩增分离的DNA，并且其中至少七种阻断核酸中的至少一种包含序列CCAGCAGTTTGGCCAGCCCT(invdT)$_n$，其中n为1、2或3(SEQ ID NO:321)；CCAGCAGTITGGCCAGCCCT(invdT)$_n$，其中n为1、2或3(SEQ ID NO:322)；CCAGCAGTTTGGCCAGCCCT(invdT)$_n$，其中n为1、2或3(SEQ ID NO:323)；AGCAGTTTGGCCAGCC(invdT)$_n$，其中n为1、2或3(SEQ ID NO:324)；或CCAGCAGTTTGGCCAGCCCT(invdT)$_n$，其中n为1、2或3(SEQ ID NO:325)；斜体的核酸表示锁核酸。

[0021] 在一些实施方案中，AKT1基因中的一种或多种DNA突变包括一种或多种编码E17K突变的AKT1蛋白的DNA突变。在一些实施方案中，对AKT1基因中的一种或多种DNA突变具有特异性的探针包含选自由以下组成的组的序列：TGTAGGGAAGTACA(SEQ ID NO:370)、TCTGTAGGGAAGTAC(SEQ ID NO:372)、GTCTGTAGGGAAGTACAT(SEQ ID NO:374)、CCGCACGTCTGTAGGGA(SEQ ID NO:376)和ACGTCTGTAGGGAAGTA(SEQ ID NO:378)。在一些实施方案中，对AKT1基因中的一种或多种DNA突变具有特异性的探针还包含5′端处的七个核苷酸，并且其中5′端处的七个核苷酸是腺嘌呤或胸腺嘧啶核苷酸。在一些实施方案中，对AKT1基因中的一种或多种DNA突变具有特异性的探针包含选自由以下组成的组的序列：TTTTTTTTTTTTTTGTAGGGAAGTACA(SEQ ID NO:371)、TTTTTTTTTTTTCTGTAGGGAAGTAC(SEQ ID NO:373)、TTTTTTTGTCTGTAGGGAAGTACAT(SEQ ID NO:375)、TTTTTTTCCGCACGTCTGTAGGGA(SEQ ID NO:377)和TTTTTTTTACGTCTGTAGGGAAGTA(SEQ ID NO:379)。在一些实施方案中，步骤(b)包括使用包含序列GAGGGTCTGACGGGTAGAGTG(SEQ ID NO:380)和TGGCCGCCAGGTCTTGATGTA(SEQ ID NO:381)的引物对通过PCR扩增分离的DNA。在一些实施方案中，步骤(b)包括在与对应于AKT1 DNA突变的野生型AKT1 DNA基因座杂交并且防止野生型AKT1 DNA基因座扩增的阻断核酸的存在下通过PCR扩增分离的DNA，并且其中至少七种阻断核酸中的至少一种包含序列TGTACTCCCCTACA(invdT)$_n$，其中n为1、2或3(SEQ ID NO:382)；GATGTACTCCCCT(invdT)$_n$，其中n为1、2或3(SEQ ID NO:383)；ATGTACTCCCCTAC(invdT)$_n$，其中n为1、2或3(SEQ ID NO:384)；GTACTCCCCTACA(invdT)$_n$，其中n为1、2或3(SEQ ID NO:385)；或GATGTACTCCCCTACA(invdT)$_n$，其中n为1、2或3(SEQ ID NO:386)；斜体的核酸表示锁核酸。

[0022] 在一些实施方案中，MEK1基因中的一种或多种DNA突变包括一种或多种编码K57N突变的MEK1蛋白的DNA突变。在一些实施方案中，对MEK1基因中的一种或多种DNA突变具有特异性的探针包含选自由以下组成的组的序列：TTACCCAGAATCAGAA(SEQ ID NO:387)、CCAGAATCAGAAGGTG(SEQ ID NO:389)、TTCTTACCCAGAATCA(SEQ ID NO:391)、CCTTTCTTACCCAGAATC(SEQ ID NO:393)和CAGAATCAGAAGGTGG(SEQ ID NO:395)。在一些实施方案中，对MEK1基因中的一种或多种DNA突变具有特异性的探针还包含5′端处的八个核苷酸，并且其中5′端处的八个核苷酸是腺嘌呤或胸腺嘧啶核苷酸。在一些实施方案中，对MEK1基因中的一种或多种DNA突变具有特异性的探针包含选自由以下组成的组的序列：TTTTTAAATTTACCCAGAATCAGAA(SEQ ID NO:388)、TTTTTAAATCCAGAATCAGAAGGTG(SEQ ID NO:390)、TTTTTAAATTTCTTACCCAGAATCA(SEQ ID NO:392)、TTTTTAAATCCTTTCTTACCCAGAATC(SEQ ID NO:394)和TTTTTAAATCAGAATCAGAAGGTGG(SEQ ID NO:396)。在一些实施方案中，步骤(b)包括使用包含序列CTTGATGAGCAGCAGCGAAA(SEQ ID NO:397)和CCTTCAGTTCTCCCACCTTCTG

(SEQ ID NO:398)的引物对通过PCR扩增分离的DNA。在一些实施方案中,步骤(b)包括在与对应于MEK1 DNA突变的野生型MEK1 DNA基因座杂交并且防止野生型MEK1 DNA基因座扩增的阻断核酸的存在下通过PCR扩增分离的DNA,并且其中至少七种阻断核酸中的至少一种包含序列TCTGCTTCTGGGTAAG(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:399);TTCTGCTTCTGGGTAAGA(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:400);CACCTTCTGCTTCTGGG(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:401);TCTGCTTCTGGGTA(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:402);或CACCTTCTGCTTCTGGGTAAGA(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:403);斜体的核酸表示锁核酸。

[0023] 在一些实施方案中,HER2基因中的一种或多种DNA突变包括一种或多种编码A775_G776insYVMA突变的HER2蛋白的DNA突变。在一些实施方案中,对HER2基因中的一种或多种DNA突变具有特异性的探针包含选自由以下组成的组的序列:ATACGTGATGTCTTAC(SEQ ID NO:404)、ACGTGATGGCTTACGT(SEQ ID NO:406)、AAGCATACGTGATGGCT(SEQ ID NO:408)、GCATACGTGATGGCTT(SEQ ID NO:410)和GCATACGTGATGGCTTA(SEQ ID NO:412)。在一些实施方案中,对HER2基因中的一种或多种DNA突变具有特异性的探针还包含5′端处的五个核苷酸,并且其中5′端处的五个核苷酸是腺嘌呤或胸腺嘧啶核苷酸。在一些实施方案中,对HER2基因中的一种或多种DNA突变具有特异性的探针包含选自由以下组成的组的序列:TTTTTTTTTATACGTGATGTCTTAC(SEQ ID NO:405)、TTTTTTTTTTTACGTGATGGCTTACGT(SEQ ID NO:407)、TTTTTAAGCATACGTGATGGCT(SEQ ID NO:409)、TTTTTTTGCATACGTGATGGCTT(SEQ ID NO:411)和TTTTTTTGCATACGTGATGGCTTA(SEQ ID NO:413)。在一些实施方案中,步骤(b)包括使用包含序列ATGGCTGTGGTTTGTGATGGT(SEQ ID NO:414)和ACACCAGCCATCACGTAAGACA(SEQ ID NO:415)的引物对通过PCR扩增分离的DNA。

[0024] 在根据本文所述的任何实施方案的一些实施方案中,样品是血液、血清或血浆样品。在一些实施方案中,(a)包括从样品中分离循环游离DNA(cfDNA),并且其中分离的cfDNA在(b)中通过PCR扩增。在一些实施方案中,方法还包括在(b)中使用对阳性对照DNA序列具有特异性的引物对来扩增阳性对照DNA序列;在(c)中将扩增的阳性对照基因序列与对阳性对照基因序列具有特异性的探针杂交,其中对阳性对照基因序列具有特异性的探针与具有对应于阳性对照的标识符的微载体偶联;在(d)中检测扩增的阳性对照DNA序列与对阳性对照基因序列具有特异性的探针的杂交存在或不存在;以及在(e)中检测对应于阳性对照的标识符。在一些实施方案中,方法还包括在(d)中检测扩增的DNA与具有对应于阴性对照的标识符的微载体的杂交的不存在,其中具有对应于阴性对照的标识符的微载体包含不与扩增的DNA杂交的探针;以及在(e)中检测对应于阴性对照的标识符。

[0025] 在另一个方面,本文提供了用于检测ALK、ROS、RET、NTRK1和cMET基因中的突变的存在的方法,所述方法包括:(a)从样品中分离RNA(例如,从患者获得);(b)通过逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)由分离的RNA扩增DNA(例如,体外),其中扩增DNA包括:(1)使用对ALK、ROS、RET、NTRK1和cMET基因中的每一个具有特异性的第一引物、分离的RNA和逆转录酶,由分离的RNA生成对ALK、ROS、RET、NTRK1和cMET基因中的每一个具有特异性的cDNA,以及(2)使用在(b)(1)中生成的cDNA、DNA聚合酶、第一引物、和对ALK、ROS、RET、NTRK1和cMET基因中的每一个具有特异性的第二引物,通过聚合酶链反应(PCR)来扩增对ALK、ROS、RET、NTRK1和cMET基因中的每一个具有特异性的DNA,所述第二引物结合与对应的第一引物相反的cDNA

链，并且促进与对应的第一引物所促进的方向相反的链延伸；(c)将扩增的DNA与至少五种探针杂交，所述至少五种探针包括对ALK、ROS、RET、NTRK1和cMET基因中的每一个中的突变具有特异性的一种或多种探针，其中所述至少五种探针中的每一种与微载体偶联，并且其中微载体中的每一种都包含对应于与其偶联的探针的标识符；(d)检测扩增的DNA与所述至少五种探针的杂交存在或不存在，其中扩增的DNA与所述探针之一的杂交表明对应于所述探针的突变的存在；(e)检测微载体的标识符的存在；以及(f)将检测到的微载体的标识符与检测到的扩增的DNA与微载体的对应探针的杂交存在或不存在相关联。在一些实施方案中，ALK、ROS、RET、NTRK1和cMET基因是人基因。在一些实施方案中，ALK、ROS、RET和NTRK1基因中的突变中的一种或多种包括融合基因。在一些实施方案中，ALK、ROS、RET和NTRK1基因中的突变中的每一种都包括融合基因。

[0026] 在一些实施方案中，ALK基因中的一种或多种突变包括EML4-ALK融合基因。在一些实施方案中，第一引物对EML4基因座的区域具有特异性，并且第二引物对ALK基因座的区域具有特异性。在一些实施方案中，第二引物对EML4基因座的区域具有特异性，并且第一引物对ALK基因座的区域具有特异性。在一些实施方案中，ALK基因中的一种或多种突变包括EML E13:ALK E20、EML E20:ALKE20和EML E6:ALK E20 EML4-ALK融合基因中的一种或多种。在一些实施方案中，ALK基因中的一种或多种突变包括EML E13:ALKE20、EML E20:ALK E20和EML E6:ALK E20 EML4-ALK融合基因。在一些实施方案中，对ALK基因中的一种或多种突变具有特异性的探针包括：(1)第一探针，其包含选自由以下组成的组的序列：AAAGGACCTAAAGTGT(SEQ ID NO:161)、CCTAAAGTGTACCGC(SEQ ID NO:163)、GGGAAAGGACCTAAAG(SEQ ID NO:165)、AGTGTACCGCCGGAA(SEQ ID NO:167)和TACCGCCGGAAGCACC(SEQ ID NO:169)；(2)第二探针，其包含选自由以下组成的组的序列：GACTATGAAATATTGTAC(SEQ ID NO:171)、GAAATATTGTACTTGTAC(SEQ ID NO:173)、TATTGTACTTGTACCGCC(SEQ ID NO:175)、TGTACCGCCGGAAGCAC(SEQ ID NO:177)和CCGCCGGAAGCACCAGGA(SEQ ID NO:179)；(3)第三探针，其包含选自由以下组成的组的序列：TGTCATCATCAACCAA(SEQ ID NO:181)、ATGTCATCATCAACC(SEQ ID NO:183)、GTGTACCGCCGGAAGC(SEQ ID NO:185)、TCAACCAAGTGTACCG(SEQ ID NO:187)和TACCGCCGGAAGCACCA(SEQ ID NO:189)；和(4)第四探针，其包含选自由以下组成的组的序列：CGAAAAAAACAGCCAA(SEQ ID NO:191)、TCGCGAAAAAAACAGC(SEQ ID NO:193)、GTGTACCGCCGGAAGC(SEQ ID NO:195)、TACCGCCGGAAGCACC(SEQ ID NO:197)和ACAGCCAAGTGTACCG(SEQ ID NO:199)；其中四种探针中的每一种与具有不同标识符的微载体偶联。在一些实施方案中，四种探针中的每一种还包含5′端处的八个核苷酸，并且其中5′端处的八个核苷酸是腺嘌呤或胸腺嘧啶核苷酸。在一些实施方案中，对ALK基因中的一种或多种突变具有特异性的探针包括：(1)第一探针，其包含选自由以下组成的组的序列：TTTTTTTTTTAAAGGACCTAAAGTGT(SEQ ID NO:162)、TTTTTTTTTTCCTAAAGTGTACCGC(SEQ ID NO:164)、TTTTTTTTTTGGGAAAGGACCTAAAG(SEQ ID NO:166)、TTTTTTTTTTAGTGTACCGCCGGAA(SEQ ID NO:168)和TTTTTTTTTTTACCGCCGGAAGCACC(SEQ ID NO:170)；(2)第二探针，其包含选自由以下组成的组的序列TTTTTTTTTTTTGACTATGAAATATTGTAC(SEQ ID NO:172)、TTTTTTTTTTTTGAAATATTGTACTTGTAC(SEQ ID NO:174)、TTTTTTTTTTTTTATTGTACTTGTACCGCC(SEQ ID NO:176)、TTTTTTTTTTTTTTGTACCGCCGGAAGCAC(SEQ ID NO:178)和

TTTTTTTTTTTTCCGCCGGAAGCACCAGGA(SEQ ID NO:180);(3)第三探针,其包含选自由以下组成的组的序列:TTTTTTTTTTTTTTTGTCATCATCAACCAA(SEQ ID NO:182)、TTTTTTTTTTTTTATGTCATCATCAACC(SEQ ID NO:184)、TTTTTTTTTTTTTGTGTACCGCCGGAAGC(SEQ ID NO:186)、TTTTTTTTTTTTTTTCAACCAAGTGTACCG(SEQ ID NO:188)和TTTTTTTTTTTTTTACCGCCGGAAGCACCA(SEQ ID NO:190);和(4)第四探针,其包含选自由以下组成的组的序列TTTTTTTTTTTTTCGAAAAAAACAGCCAA(SEQ ID NO:192)、TTTTTTTTTTTTTCGCGAAAAAAACAGC(SEQ ID NO:194)、TTTTTTTTTTTTGTGTACCGCCGGAAGC(SEQ ID NO:196)、TTTTTTTTTTTTTTACCGCCGGAAGCACC(SEQ ID NO:198)和TTTTTTTTTTTTTACAGCCAAGTGTACCG(SEQ ID NO:200);其中四种探针中的每一种与具有不同标识符的微载体偶联。在一些实施方案中,对ALK基因中的一种或多种突变具有特异性的第一引物包含序列AGTTGGGGTTGTAGTCGGTCAT(SEQ ID NO:363)或GAAGCCTCCCTGGATCTCC(SEQ ID NO:364)。在一些实施方案中,对ALK基因中的一种或多种突变具有特异性的第二引物包含选自由以下组成的组的序列:TATGGAGCAAAACTACTGTAGAGCC(SEQ ID NO:357)、CCAGCTACATCACACACCTTGACT(SEQ ID NO:358)和TAATACCAAAAGTTACCAAAACTGCA(SEQ ID NO:359)。

[0027] 在一些实施方案中,ROS基因中的一种或多种突变包括选自由CD74-ROS和SLC34A2-ROS组成的组的ROS融合基因。在一些实施方案中,第一引物对CD74或SLC34A2的区域具有特异性,并且第二引物对ROS基因座的区域具有特异性。在一些实施方案中,第二引物对CD74或SLC34A2基因座的区域具有特异性,并且第一引物对ROS基因座的区域具有特异性。在一些实施方案中,第一引物对CD74或SLC34A2基因座的区域具有特异性,并且第二引物对ROS基因座的区域具有特异性;或者其中第二引物对CD74或SLC34A2基因座的区域具有特异性,并且第一引物对ROS基因座的区域具有特异性。在一些实施方案中,ROS基因中的一种或多种突变包括CD74 E6:ROS E32、CD74 E6:ROS E34、SLC34A2 E4:ROS E32和SLC34A2 E4:ROS E34融合基因中的一种或多种。在一些实施方案中,ROS基因中的一种或多种突变包括CD74 E6:ROS E32、CD74 E6:ROSE34、SLC34A2 E4:ROS E32和SLC34A2 E4:ROS E34融合基因。在一些实施方案中,对ROS基因中的一种或多种突变具有特异性的探针包括:(1)第一探针,其包含选自由以下组成的组的序列:ACTGACGCTCCACCGAAA(SEQ ID NO:201)、CCACTGACGCTCCACCGA(SEQ ID NO:203)、GCTGGAGTCCCAAATAAAC(SEQ ID NO:205)、GGAGTCCCAAATAAACCAG(SEQ ID NO:207)和CACCGAAAGCTGGAGTCCC(SEQ ID NO:209);(2)第二探针,其包含选自由以下组成的组的序列:CCGAAAGATGATTTT(SEQ ID NO:211)、GACGCTCCACCGAAA(SEQ ID NO:213)、ACTGACGCTCCACCGA(SEQ ID NO:215)、GATGATTTTTGGATA(SEQ ID NO:217)和TGATTTTTGGATACCA(SEQ ID NO:219);(3)第三探针,其包含选自由以下组成的组的序列:AGCGCCTTCCAGCTGGTTGGA(SEQ ID NO:221)、CTGGTTGGAGCTGGAGTCCC(SEQ ID NO:223)、AGTAGCGCCTTCCAGCTGGTTG(SEQ ID NO:225)、GCTGGAGTCCCAAATAAACCA(SEQ ID NO:227)和GGAGTCCCAAATAAACCAGG(SEQ ID NO:229);和(4)第四探针,其包含选自由以下组成的组的序列:GCGCCTTCCAGCTGGTTG(SEQ ID NO:231)、GTAGCGCCTTCCAGCTGGT(SEQ ID NO:233)、TGGTTGGAGATGATTTTT(SEQ ID NO:235)、GATGATTTTTGGATACCAG(SEQ ID NO:237)和TGATTTTTGGATACCA(SEQ ID NO:239);其中四种探针中的每一种与具有不同标识符的微载体偶联。在一些实施方案中,四种探针中的每一

种还包含5′端处的八个核苷酸，并且其中5′端处的八个核苷酸是腺嘌呤或胸腺嘧啶核苷酸。在一些实施方案中，对ROS基因中的一种或多种突变具有特异性的探针包括：(1)第一探针，其包含选自由以下组成的组的序列：TTTTTTTTTTTACTGACGCTCCACCGAAA(SEQ ID NO:202)、TTTTTTTTTTTCCACTGACGCTCCACCGA(SEQ ID NO:204)、TTTTTTTTTTGCTGGAGTCCCAAATAAAC(SEQ ID NO:206)、TTTTTTTTTTGGAGTCCCAAATAAACCAG(SEQ ID NO:208)和TTTTTTTTTTCACCGAAAGCTGGAGTCCC(SEQ ID NO:210)；(2)第二探针，其包含选自由以下组成的组的序列：TTTTTTTTTTCCGAAAGATGATTT(SEQ ID NO:212)、TTTTTTTTTTGACGCTCCACCGAAA(SEQ ID NO:214)、TTTTTTTTTTACTGACGCTCCACCGA(SEQ ID NO:216)、TTTTTTTTTTGATGATTTTGGATA(SEQ ID NO:218)和TTTTTTTTTTGATTTTGGATACCA(SEQ ID NO:220)；(3)第三探针，其包含选自由以下组成的组的序列：TTTTTTTTTAGCGCCTTCCAGCTGGTTGGA(SEQ ID NO:222)、TTTTTTTTTCTGGTTGGAGCTGGAGTCCC(SEQ ID NO:224)、TTTTTTTTTAGTAGCGCCTTCCAGCTGGTTG(SEQ ID NO:226)、TTTTTTTTTGCTGGAGTCCCAAATAAACCA(SEQ ID NO:228)和TTTTTTTTTGGAGTCCCAATAAACCAGG(SEQ ID NO:230)；和(4)第四探针，其包含选自由以下组成的组的序列：TTTTTTTTGCGCCTTCCAGCTGGTTG(SEQ ID NO:232)、TTTTTTTTGTAGCGCCTTCCAGCTGGT(SEQ ID NO:234)、TTTTTTTTTGGTTGGAGATGATTTT(SEQ ID NO:236)、TTTTTTTTGATGATTTTGGATACCAG(SEQ ID NO:238)和TTTTTTTTGATTTTGGATACCA(SEQ ID NO:240)；其中四种探针中的每一种与具有不同标识符的微载体偶联。在一些实施方案中，对ROS基因中的一种或多种突变具有特异性的第一引物包含序列AATTCAATACATACTATCAGCTTTCTCCCACTGTATTGAA(SEQ ID NO:21)或AATATTTCTGGTACGAGTGGGATTGTAACAACCAGAAATA(SEQ ID NO:22)。在一些实施方案中，对ROS基因中的一种或多种突变具有特异性的第二引物包含序列GGAGTGCCATCGCTGTTTGAAATGAGCAGGCACT(SEQ ID NO:19)或TACAGCCCTGGATATTCTTAGTAGCGC(SEQ ID NO:20)。

[0028] 在一些实施方案中，RET基因中的一种或多种突变包括选自由KIF5B-RET组成的组的RET融合基因。在一些实施方案中，第一引物对KIF5B或CCDC6基因座的区域具有特异性，并且第二引物对RET基因座的区域具有特异性。在一些实施方案中，第二引物对KIF5B或CCDC6基因座的区域具有特异性，并且第一引物对RET基因座的区域具有特异性。在一些实施方案中，第一引物对KIF5B基因座的区域具有特异性，并且第二引物对RET基因座的区域具有特异性；或者其中第二引物对KIF5B基因座的区域具有特异性，并且第一引物对RET基因座的区域具有特异性。在一些实施方案中，RET基因中的一种或多种突变包括KIF5B E15:RET E11、KIF5B E15:RET E12、KIF5B E16:RET E12、KIF5B E22:RET E12、KIF5B E23:RET E12和CCDC6 E1:RET E12融合基因中的一种或多种。在一些实施方案中，RET基因中的一种或多种突变包括KIF5B E15:RET E11、KIF5B E15:RET E12、KIF5B E16:RET E12、KIF5B E22:RET E12和KIF5B E23:RET E12融合基因。在一些实施方案中，对RET基因中的一种或多种突变具有特异性的探针包括：(1)第一探针，其包含选自由以下组成的组的序列：GTGGGAAATAATGATGTAAA(SEQ ID NO:241)、CTGTGGGAAATAATGATGTA(SEQ ID NO:243)、GATCCACTGTGCGACGAGCT(SEQ ID NO:245)、TGATGTAAAGATCCACTGTG(SEQ ID NO:247)和TCCACTGTGCGACGAGCTGT(SEQ ID NO:249)；(2)第二探针，其包含选自由以下组成的组的序列：TGGGAAATAATGATGTAAA(SEQ ID NO:251)、CTGTGGGAAATAATGATGTA(SEQ ID NO:253)、

GGAGGATCCAAAGTGGGAAT(SEQ ID NO:255)、GGATCCAAAGTGGGAATT(SEQ ID NO:257)和ATGATGTAAAGGAGGATCC(SEQ ID NO:259)；(3)第三探针，其包含选自由以下组成的组的序列:CTTCGTATCTCTCAAGAGGAT(SEQ ID NO:481)、GTATCTCTCAAGAGGATCCAA(SEQ ID NO:483)、TTCGTATCTCTCAAGAG(SEQ ID NO:485)、TCAAGAGGATCCAAA(SEQ ID NO:487)和TCTCTCAAGAGG(SEQ ID NO:489)；(4)第四探针，其包含选自由以下组成的组的序列:GTTAAAAAGGAGGATCCAA(SEQ ID NO:491)、ACAAGAGTTAAAAAGGAGGA(SEQ ID NO:493)、AAGAGTTAAAAAGGAGGATC(SEQ ID NO:495)、AAAAGGAGGATCCAAAG(SEQ ID NO:497)和AAGGAGGATCCAAAGTG(SEQ ID NO:499)；和(5)第五探针，其包含选自由以下组成的组的序列:AAACAGGAGGATCCAAA(SEQ ID NO:501)、AAGTGCACAAACAGGAGG(SEQ ID NO:503)、GTGCACAAACAGGAGGATC(SEQ ID NO:505)、CACAAACAGGAGGAT(SEQ ID NO:507)和AACAGGAGGATCCAAA(SEQ ID NO:509)；其中五种探针中的每一种与具有不同标识符的微载体偶联。在一些实施方案中，四种探针中的每一种还包含5′端处的八个核苷酸，并且其中5′端处的八个核苷酸是腺嘌呤或胸腺嘧啶核苷酸。在一些实施方案中，对RET基因中的一种或多种突变具有特异性的探针包括：(1)第一探针，其包含选自由以下组成的组的序列:TTTTTTTTTTGTGGGAAATAATGATGTAAA(SEQ ID NO:242)、TTTTTTTTTTCTGTGGGAAATAATGATGTA(SEQ ID NO:244)、TTTTTTTTTTGATCCACTGTGCGACGAGCT(SEQ ID NO:246)、TTTTTTTTTTTGATGTAAAGATCCACTGTG(SEQ ID NO:248)和TTTTTTTTTTTTCCACTGTGCGACGAGCTGT(SEQ ID NO:250)；(2)第二探针，其包含选自由以下组成的组的序列:TTTTTTTTTTGGGAAATAATGATGTAAA(SEQ ID NO:252)、TTTTTTTTTCTGTGGGAAATAATGATGTA(SEQ ID NO:254)、TTTTTTTTTTGGAGGATCCAAAGTGGGAAT(SEQ ID NO:256)、TTTTTTTTTGGATCCAAAGTGGGAATT(SEQ ID NO:258、)和TTTTTTTTTATGATGTAAAGGAGGATCC(SEQ ID NO:260)；(3)第三探针，其包含选自由以下组成的组的序列:TTTTTTTTTCTTCGTATCTCTCAAGAGGAT(SEQ ID NO:482)、TTTTTTTTTGTATCTCTCAAGAGGATCCAA(SEQ ID NO:484)、TTTTTTTTTTTCGTATCTCTCAAGAG(SEQ ID NO:486)、TTTTTTTTTTCAAGAGGATCCAAA(SEQ ID NO:488)和TTTTTTTTTTCTCTCAAGAGG(SEQ ID NO:490)；(4)第四探针，其包含选自由以下组成的组的序列:TTTTTTTTTGTTAAAAAGGAGGATCCAA(SEQ ID NO:492)、TTTTTTTTACAAGAGTTAAAAAGGAGGA(SEQ ID NO:494)、TTATTATTAAGAGTTAAAAAGGAGGATC(SEQ ID NO:811)、TTTTTTTTAAAAGGAGGATCCAAAG(SEQ ID NO:498)和TTTTTTTTAAGGAGGATCCAAAGTG(SEQ ID NO:500)；和(5)第五探针，其包含选自由以下组成的组的序列:TTTTTTTTAAACAGGAGGATCCAAA(SEQ ID NO:502)、TTTTTATTAAGTGCACAAACAGGAGG(SEQ ID NO:504)、TATTATTATGTGCACAAACAGGAGGATC(SEQ ID NO:506)、TATTTTTTCACAAACAGGAGGAT(SEQ ID NO:508)和TTTTATTTAACAGGAGGATCCAAA(SEQ ID NO:510)；其中五种探针中的每一种与具有不同标识符的微载体偶联。在一些实施方案中，对RET基因中的一种或多种突变具有特异性的第一引物包含序列GTGATCGCACAGTAGGACAGCGGCTGCGATC(SEQ ID NO:26)或CTCTAGGAGATATCATTCCAAATTCGCCTTCTCCTAG(SEQ ID NO:27)。在一些实施方案中，对RET基因中的一种或多种突变具有特异性的第二引物包含选自由以下组成的组的序列:TTTCTGGTGCTATGAGGAAATGACCAACCACCAGA(SEQ ID NO:23)、AAGGAGTTAGCAGCATGTCAGC(SEQ ID NO:519)、AACTTCAGACTTTACACAACCTGC(SEQ ID NO:520)和ATTGATTCTGATGACACCGGA(SEQ ID NO:521)。

[0029] 在一些实施方案中,NTRK1基因中的一种或多种突变包括CD74-NTRK1融合基因。在一些实施方案中,第一引物对CD74基因座的区域具有特异性,并且第二引物对NTRK1基因座的区域具有特异性。在一些实施方案中,第二引物对CD74基因座的区域具有特异性,并且第一引物对NTRK1基因座的区域具有特异性。在一些实施方案中,NTRK1基因中的一种或多种突变包括CD74 E8:NTRK1 E12融合基因。在一些实施方案中,对NTRK1基因中的一种或多种突变具有特异性的探针包含选自由以下组成的组的序列:CAGGATCTGGGCCCAGACA(SEQ ID NO:261)、GATCTGGGCCCAGACACTA(SEQ ID NO:263)、CCAGACACTAACAGCACAT(SEQ ID NO:265)、GGGCCCAGACACTAACAGC(SEQ ID NO:267)和CTAACAGCACATCTGGAGA(SEQ ID NO:269)。在一些实施方案中,对NTRK1基因中的一种或多种突变具有特异性的探针还包含5′端处的八个核苷酸,并且其中5′端处的八个核苷酸是腺嘌呤或胸腺嘧啶核苷酸。在一些实施方案中,对NTRK1基因中的一种或多种突变具有特异性的探针包含选自由以下组成的组的序列:TTTTTTTTTTACAGGATCTGGGCCCAGACA(SEQ ID NO:262)、TTTTTTTTTTAGATCTGGGCCCAGACACTA(SEQ ID NO:264)、TTTTTTTTTTACCAGACACTAACAGCACAT(SEQ ID NO:266)、TTTTTTTTTTAGGGCCCAGACACTAACAGC(SEQ ID NO:268)和TTTTTTTTTTTACTAACAGCACATCTGGAGA(SEQ ID NO:270)。在一些实施方案中,对NTRK1基因中的一种或多种突变具有特异性的第一引物包含序列GGACGAAAATCCAGACCCCAAAAGGTGTTTCGT(SEQ ID NO:32)。在一些实施方案中,对NTRK1基因中的一种或多种突变具有特异性的第二引物包含序列AGAAGACGTGACAGGAACTGGAGGACCCGTCTT(SEQ ID NO:30)。

[0030] 在一些实施方案中,cMET基因中的一种或多种突变导致外显子跳读。在一些实施方案中,cMET基因中的一种或多种突变导致外显子14的跳读。在一些实施方案中,对cMET基因中的一种或多种突变具有特异性的探针包含选自由以下组成的组的序列:AGAAAGCAAATTAAAGAT(SEQ ID NO:271)、AGCAAATTAAAGATCAG(SEQ ID NO:273)、AAATTAAAGATCAGTTTC(SEQ ID NO:275)、AGATCAGTTTCCTAATTC(SEQ ID NO:277)和AAGATCAGTTTCCTAATT(SEQ ID NO:279)。在一些实施方案中,对cMET基因中的一种或多种突变具有特异性的探针还包含5′端处的八个核苷酸,并且其中5′端处的八个核苷酸是腺嘌呤或胸腺嘧啶核苷酸。在一些实施方案中,对cMET基因中的一种或多种突变具有特异性的探针包含选自由以下组成的组的序列:TTTTTTTTTTAGAAAGCAAATTAAAGAT(SEQ ID NO:272)、TTTTTTTTTTAGCAAATTAAAGATCAG(SEQ ID NO:274)、TTTTTTTTTTAAATTAAAGATCAGTTTC(SEQ ID NO:276)、TTTTTTTTTTAGATCAGTTTCCTAATTC(SEQ ID NO:278)和TTTTTTTTTTAAGATCAGTTTCCTAATT(SEQ ID NO:280)。在一些实施方案中,对cMET基因中的一种或多种突变具有特异性的第一引物包含序列GACAGTATTTTGCAGTAATGGACTGGATATATCAGA(SEQ ID NO:29)。在一些实施方案中,对cMET基因中的一种或多种突变具有特异性的第二引物包含序列GAATTTCACAGGATTGATTGCTGGTGTTGTCTC(SEQ ID NO:28)。

[0031] 在根据本文所述的任何实施方案的一些实施方案中,样品是血液、血清或血浆样品。在一些实施方案中,在(a)中从样品中分离RNA包括从肿瘤条件血小板、肿瘤外泌体和循环肿瘤细胞(CTC)的一种或多种中分离RNA。在一些实施方案中,方法还包括在(b)中通过逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)由分离的RNA扩增阳性对照DNA序列,其中扩增阳性对照DNA序列包括:(1)使用对阳性对照序列具有特异性的第一引物、分离的RNA和逆转录酶,由分离的RNA生成对阳性对照序列具有特异性的cDNA,和(2)使用对(1)中生成的阳性对照序列具有

特异性的cDNA、DNA聚合酶、第一引物和对阳性对照序列具有特异性的第二引物，通过聚合酶链反应(PCR)扩增对阳性对照序列具有特异性的DNA，所述第二引物结合与对应的第一引物相反的cDNA链，并且促进与对应的第一引物所促进的方向相反的链延伸；在(c)中将扩增的阳性对照基因序列与对阳性对照基因序列具有特异性的探针杂交，其中对阳性对照基因序列具有特异性的探针与具有对应于阳性对照的标识符的微载体偶联；在(d)中检测扩增的阳性对照DNA序列与对阳性对照基因序列具有特异性的探针的杂交存在或不存在；以及在(e)中检测对应于阳性对照的标识符。在一些实施方案中，方法还包括在(d)中检测扩增的DNA与具有对应于阴性对照的标识符的微载体的杂交的不存在，其中具有对应于阴性对照的标识符的微载体包含不与扩增的DNA杂交的探针；以及在(e)中检测对应于阴性对照的标识符。

[0032] 在另一个方面，本文提供了用于检测基因中的突变的存在的方法，所述方法包括：(a)从样品中分离DNA和RNA；(b)使用对KRAS、NRAS、PIK3CA、BRAF、EGFR、AKT1、MEK1和HER2基因中的每一个中的一种或多种DNA突变的基因座具有特异性的引物对，通过聚合酶链反应(PCR)扩增分离的DNA；(c)通过逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)由分离的RNA扩增DNA，其中由分离的RNA扩增DNA包括：(1)使用对ALK、ROS、RET、NTRK1和cMET基因中的每一个具有特异性的第一引物、分离的RNA和逆转录酶，由分离的RNA生成对ALK、ROS、RET、NTRK1和cMET基因中的每一个具有特异性的cDNA，以及(2)使用在(c)(1)中生成的cDNA、DNA聚合酶、第一引物、和对ALK、ROS、RET、NTRK1和cMET基因中的每一个具有特异性的第二引物，通过聚合酶链反应(PCR)来扩增对ALK、ROS、RET、NTRK1和cMET基因中的每一个具有特异性的DNA，所述第二引物结合与对应的第一引物相反的cDNA链，并且促进与对应的第一引物所促进的方向相反的链延伸；(d)将在(b)中通过PCR扩增的DNA与至少七种探针杂交，所述至少七种探针包括对KRAS、NRAS、PIK3CA、BRAF、EGFR、AKT1、MEK1和HER2基因中的每一个中的突变具有特异性的一种或多种探针，其中所述至少七种探针中的每一种与微载体偶联，并且其中微载体中的每一种都包含对应于与其偶联的探针的标识符；(e)检测在(b)中通过PCR扩增的DNA与所述至少七种探针的杂交存在或不存在，其中扩增的DNA与所述探针之一的杂交表明对应于所述探针的突变的存在；(f)将在(c)中通过RT-PCR扩增的DNA与至少五种探针杂交，所述至少五种探针包括对ALK、ROS、RET、NTRK1和cMET基因中的每一个中的突变具有特异性的一种或多种探针，其中所述至少五种探针中的每一种与微载体偶联，并且其中微载体中的每一种都包含对应于与其偶联的探针的标识符；(g)检测在(c)中通过RT-PCR扩增的DNA与所述至少五种探针的杂交存在或不存在，其中扩增的DNA与所述探针之一的杂交表明对应于所述探针的突变的存在；(h)检测微载体的标识符的存在；以及(i)将检测到的微载体的标识符与在(e)和(g)中检测到的扩增的DNA与微载体的对应探针的杂交存在或不存在相关联。在一些实施方案中，(a)包括：通过离心样品来分离富含总RNA的血浆(TRRP)，其中样品包括全血或血浆；对TRRP进行一个或多个离心步骤以生成RNA级分和细胞游离DNA(cfDNA)级分，其中RNA级分包含以下中的一种或多种：血小板、白细胞、外泌体、循环肿瘤细胞和游离RNA；从cfDNA级分中分离DNA；并且从RNA级分中分离RNA。

[0033] 在根据本文所述的任何实施方案的一些实施方案中，引物对中的每一种包含与检测试剂偶联的引物。在一些实施方案中，检测试剂包括荧光检测试剂，并且其中在(d)中检测扩增的DNA与所述探针的杂交存在或不存在包括荧光检测试剂的荧光成像。在一些实施

方案中，检测试剂包含生物素，并且其中在步骤(d)中检测扩增的DNA与所述探针的杂交存在或不存在包括：(1)在(c)中杂交后，将微载体与缀合至信号发射实体的链霉亲和素(streptavidin)接触；和(2)检测来自与微载体缔合的信号发射实体的信号。在一些实施方案中，信号发射实体包含藻红蛋白(PE)。在一些实施方案中，在(e)中检测微载体的标识符包括标识符的明场成像。在一些实施方案中，微载体的标识符包括数字条形码。在一些实施方案中，每种微载体包含：(i)第一光致聚合物层；(ii)第二光致聚合物层；和(iii)第一层和第二层之间的中间层，中间层具有表示限定在其上的标识符的编码图案，其中中间层部分基本地可透光并且部分基本地不透光，从而表示对应于微载体的代码，其中微载体的最外表面包含光致抗蚀剂光致聚合物，并且所述光致抗蚀剂光致聚合物被对DNA突变具有特异性的探针官能化，并且其中所述微载体具有与水大概相同的密度。在一些实施方案中，微载体的标识符包含模拟代码。在一些实施方案中，每种微载体包含：(i)具有第一表面和第二表面的基本透明聚合物层，第一表面和第二表面彼此平行；(ii)构成二维形状的基本不透明层，其中基本不透明层附接到基本透明聚合物层的第一表面并且包围基本透明聚合物层的中心部分，其中基本不透明层的二维形状表示模拟代码，并且其中模拟码对应于标识符；和(iii)对突变具有特异性的探针，其中探针在基本透明聚合物层的至少中心部分中与基本透明聚合物层的第一表面和第二表面中的至少一个偶联。在一些实施方案中，每种微载体还包含用于定向基本不透明聚合物层的模拟代码的定向指示器。在一些实施方案中，基本透明聚合物层的聚合物包括环氧基聚合物。在一些实施方案中，环氧基聚合物是SU-8。

[0034] 在另一个方面，本文提供了包含至少七种微载体的试剂盒，其中所述至少七种微载体中的每一种包含：(i)与微载体偶联的探针，其中探针对KRAS、PIK3CA、BRAF、EGFR、AKT1、MEK1或HER2基因中的DNA突变具有特异性；和(ii)对应于与其偶联的探针的标识符；其中试剂盒包括：包含对KRAS基因中的DNA突变具有特异性的探针的至少一种微载体、包含对PIK3CA基因中的DNA突变具有特异性的探针的至少一种微载体、包含对BRAF基因中的DNA突变具有特异性的探针的至少一种微载体、包含对EGFR基因中的DNA突变具有特异性的探针的至少一种微载体、包含对AKT1基因中的DNA突变具有特异性的探针的至少一种微载体、包含对MEK1基因中的DNA突变具有特异性的探针的至少一种微载体和包含对HER2基因中的DNA突变具有特异性的探针的至少一种微载体；并且其中KRAS、NRAS、PIK3CA、BRAF、EGFR、AKT1、MEK1和HER2基因是人基因。

[0035] 在一些实施方案中，试剂盒还包括至少七种阻断核酸，其中所述至少七种阻断核酸中的每一种与对应于KRAS、PIK3CA、BRAF、EGFR、AKT1、MEK1或HER2基因中的DNA突变之一的野生型DNA基因座杂交，并且防止野生型DNA基因座的扩增。在一些实施方案中，所述至少七种阻断核酸中的每一种都包含：与对应的野生型DNA基因座杂交的单链寡核苷酸；和阻断从单链寡核苷酸延伸的3′末端部分。在一些实施方案中，3′末端部分包含一个或多个反向脱氧胸苷。在一些实施方案中，所述至少七种阻断核酸中的每一种都包含一种或多种选自由以下组成的组的经修饰的核苷酸：锁核酸(LNA)、肽核酸(PNA)、己糖核酸(HNA)、苏糖核酸(TNA)、乙二醇核酸(GNA)和环己烯基核酸(CeNA)。

[0036] 在一些实施方案中，KRAS基因中的DNA突变包括一种或多种编码G12D、G12V或G12C突变的KRAS蛋白的DNA突变。在一些实施方案中，KRAS基因中的DNA突变包括编码G12D、G12V和G12C突变的KRAS蛋白的DNA突变。在一些实施方案中，对KRAS基因中的DNA突变具有特异

性的探针包括:(1)第一探针,其包含选自由以下组成的组的序列:TAGTTGGAGCT(SEQ ID NO:38)、TGTGGTAGTTG(SEQ ID NO:40)、TGATGGCGTAG(SEQ ID NO:42)、TGGAGCTGATGGC(SEQ ID NO:44)和GCGTAGGCAAG(SEQ ID NO:46);(2)第二探针,其包含选自由以下组成的组的序列:CTGTTGGCGTAGG(SEQ ID NO:48)、GTAGTTGGAGCTG(SEQ ID NO:50)、TGGAGCTGTTGGC(SEQ ID NO:52)、TTGTGGTAGTTGG(SEQ ID NO:54)和GGCGTAGGCAAGA(SEQ ID NO:56);和(3)第三探针,其包含选自由以下组成的组的序列:TAGTTGGAGCTT(SEQ ID NO:58)、GCGTAGGCAAGA(SEQ ID NO:60)、GGAGCTTGTGGC(SEQ ID NO:62)、TTGTGGCGTAGG(SEQ ID NO:64)和TGTGGTAGTTGG(SEQ ID NO:66);其中三种探针中的每一种与具有不同标识符的微载体偶联。在一些实施方案中,三种探针中的每一种还包含5′端处的八个核苷酸,并且其中5′端处的八个核苷酸是腺嘌呤或胸腺嘧啶核苷酸。在一些实施方案中,对KRAS基因中的DNA突变具有特异性的探针包括:(1)第一探针,其包含选自由以下组成的组的序列:TTTTTTTTTTTTAATAGTTGGAGCT(SEQ ID NO:39)、TTTTTTTTTTTTAATGTGGTAGTTG(SEQ ID NO:41)、TTTTTTTTTTTTAATGATGGCGTAG(SEQ ID NO:43)、TTTTTTTTTTTATGGAGCTGATGGC(SEQ ID NO:45)和TTTTTTTTTTTTAAGCGTAGGCAAG(SEQ IDONO:47);(2)第二探针,其包含选自由以下组成的组的序列:TTTTTTTTTTTACTGTTGGCGTAGG(SEQ ID NO:49)、TTTTTTTTTTAGTAGTTGGAGCTG(SEQ ID NO:51)、TTTTTTTTTTATGGAGCTGTTGGC(SEQ ID NO:53)、TTTTTTTTTTATTGTGGTAGTTGG(SEQ ID NO:55)和TTTTTTTTTTAGGCGTAGGCAAGA(SEQ ID NO:57);和(3)第三探针,其包含选自由以下组成的组的序列:TTTTTTTTTTAATAGTTGGAGCTT(SEQ ID NO:59)、TTTTTTTTTTAAGCGTAGGCAAGA(SEQ ID NO:61)、TTTTTTTTTTAAGGAGCTTGTGGC(SEQ ID NO:63)、TTTTTTTTTTAATTGTGGCGTAGG(SEQ ID NO:65)和TTTTTTTTTTAATGTGGTAGTTGG(SEQ ID NO:67);其中三种探针中的每一种与具有不同标识符的微载体偶联。在一些实施方案中,试剂盒还包括引物对,所述引物对包含序列GTACTGGTGGAGTATTTGATAGTG(SEQ ID NO:1)和CGTCAAGGCACTCTTGCCTAC(SEQ ID NO:2)。在一些实施方案中,试剂盒还包括与对应于KRAS DNA突变的野生型KRAS DNA基因座杂交并且防止野生型KRAS DNA基因座扩增的阻断核酸,并且其中阻断核酸包含序列TACGCCACCAGCT(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:281);TTGGAGCTGGTGGCGTA(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:282);GCTGGTGGCGTAGGCA(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:283);GCTGGTGGCGTAGGC(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:284);或TTGGAGCTGGTGGCGT(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:285);斜体的核酸表示锁核酸。在一些实施方案中,PIK3CA基因中的DNA突变包括一种或多种编码E542K或E545K突变的PIK3CA蛋白的DNA突变。在一些实施方案中,PIK3CA基因中的DNA突变包括编码E542K和E545K突变的PIK3CA蛋白的DNA突变。在一些实施方案中,对PIK3CA基因中的DNA突变具有特异性的探针包括:(1)第一探针,其包含选自由以下组成的组的序列:GCTCAGTGATTTTAG(SEQ ID NO:87)、TGCTCAGTGATTTT(SEQ ID NO:89)、GCTCAGTGATTTTAG(SEQ ID NO:91)、CCTGCTCAGTGATTTTA(SEQ ID NO:93)和CTCAGTGATTTTAGA(SEQ ID NO:95);和(2)第二探针,其包含选自由以下组成的组的序列:TTCTCCTGCTTA(SEQ ID NO:97)、CTCCTGCTTAGT(SEQ ID NO:99)、TCTCCTGCTTAG(SEQ ID NO:101)、TCCTGCTTAGTG(SEQ ID NO:103)和CTCCTGCTTAGTGA(SEQ ID NO:105);其中两种探针中的每一种与具有不同标识符的微载体偶联。在一些实施方案中,两种探针中的每一种还包含5′端处的八个核苷酸,并且其中5′端处的八个核苷酸是腺

嘌呤或胸腺嘧啶核苷酸。在一些实施方案中，对PIK3CA基因中的DNA突变具有特异性的探针包括：(1)第一探针，其包含选自由以下组成的组的序列：TTTTTTTTTAGCTCAGTGATTTTAG(SEQ ID NO:88)、TTTTTTTTTGCTCAGTGATTTT(SEQ ID NO:90)、TTTTTTTTTAGCTCAGTGATTTTAG(SEQ ID NO:92)、TTTTTTTCCTGCTCAGTGATTTTA(SEQ ID NO:94)和TTTTTTTTTTTCTCAGTGATTTTAGA(SEQ ID NO:96)；和(2)第二探针，其包含选自由以下组成的组的序列：TTTTTTTTTTTTCTCCTGCTTA(SEQ ID NO:98)、TTTTTTTTTTTTCTCCTGCTTAGT(SEQ ID NO:100)、TTTTTTTTTTATCTCCTGCTTAG(SEQ ID NO:102)、TTTTTTTTTTTTTTCCTGCTTAGTG(SEQ ID NO:104)和TTTTTTTTTTTTTCTCCTGCTTAGTGA(SEQ ID NO:106)；其中三种探针中的每一种与具有不同标识符的微载体偶联。在一些实施方案中，试剂盒还包括引物对，所述引物对包含序列CAATTTCTACAAGAGATCCTCTCTCT(SEQ ID NO:5)和CTCCATTTTAGCACTTACCTGTGAC(SEQ ID NO:6)。在一些实施方案中，试剂盒还包括与对应于PIK3CA DNA突变的野生型PIK3CA DNA基因座杂交并且防止野生型PIK3CA DNA基因座扩增的阻断核酸，并且其中阻断核酸包含序列CTGAAATCACTGAGCAGG(invdT)$_n$，其中n为1、2或3(SEQ ID NO:291)；TCTCTGAAATCACTGAGCAGG(invdT)$_n$，其中n为1、2或3(SEQ ID NO:292)；TCTCTGAAATCACTGAGCAGG(invdT)$_n$，其中n为1、2或3(SEQ ID NO:293)；TCTCTGAAATCACTGAGCAGG(invdT)$_n$，其中n为1、2或3(SEQ ID NO:294)；或TCTCTGAATTCACTGAGCAGG(invdT)$_n$，其中n为1、2或3(SEQ ID NO:295)；斜体的核酸表示锁核酸。在一些实施方案中，PIK3CA基因中的DNA突变包括编码H1047R突变的PIK3CA蛋白的DNA突变。在一些实施方案中，对PIK3CA基因中的DNA突变具有特异性的探针包含选自由以下组成的组的序列：GATGCACGTCATG(SEQ ID NO:107)、TGAATGATGCACG(SEQ ID NO:109)、TGATGCACGTC(SEQ ID NO:111)、AATGATGCACGTCA(SEQ ID NO:113)和AATGATGCACGTC(SEQ ID NO:115)。在一些实施方案中，对PIK3CA基因中的DNA突变具有特异性的探针包含选自由以下组成的组的序列：TTTTTTTTTTTTTTTGATGCACGTCATG(SEQ ID NO:108)、TTTTTTTTTTTGAATGATGCACG(SEQ ID NO:110)、TTTTTTTTTTTTTGATGCACGTC(SEQ ID NO:112)、TTTTTTTTTTTTAATGATGCACGTCA(SEQ ID NO:114)和TTTTTTTTTTTTTAATGATGCACGTC(SEQ ID NO:116)。在一些实施方案中，探针还包含5′端处的八个核苷酸，并且其中5′端处的八个核苷酸是腺嘌呤或胸腺嘧啶核苷酸。在一些实施方案中，试剂盒还包括引物对，所述引物对包含序列ACCCTAGCCTTAGATAAAACTGAGC(SEQ ID NO:7)和TTTGTTGTCCAGCCACCATGA(SEQ ID NO:8)。在一些实施方案中，试剂盒还包括与对应于PIK3CA DNA突变的野生型PIK3CA DNA基因座杂交并且防止野生型PIK3CA DNA基因座扩增的阻断核酸，并且其中阻断核酸包含序列CACCATGATGTGCAT(invdT)$_n$，其中n为1、2或3(SEQ ID NO:296)；CCACCATGATGTGCAT(invdT)$_n$，其中n为1、2或3(SEQ ID NO:297)；CACCATGATGTGCAT(invdT)$_n$，其中n为1、2或3(SEQ ID NO:298)；CCACCATGATGTGCATCA(invdT)$_n$，其中n为1、2或3(SEQ ID NO:299)；或CATGATGTGCA(invdT)$_n$，其中n为1、2或3(SEQ ID NO:300)；斜体的核酸表示锁核酸。在一些实施方案中，BRAF基因中的DNA突变包括编码V600E突变的BRAF蛋白的DNA突变。在一些实施方案中，对BRAF基因中的DNA突变具有特异性的探针包含选自由以下组成的组的序列：TTTGGTCTAGCTACAGA(SEQ ID NO:79)、CTACAGAGAAATCTCGA(SEQ ID NO:81)、GTGATTTTGGTCTAGCT(SEQ ID NO:83)和TCTAGCTACAGAGAAAT(SEQ ID NO:85)。在一些实施方案中，对BRAF基因中的一种或多种DNA突变具有特异性的探针还包含5′端处的八个核苷酸，

并且其中5′端处的八个核苷酸是腺嘌呤或胸腺嘧啶核苷酸。在一些实施方案中，对BRAF基因中的DNA突变具有特异性的探针包含选自由以下组成的组的序列：TTTTTTAATTGAGAAATCTCGATGGAG(SEQ ID NO:78)、TTTTTTAATTTTTGGTCTAGCTACAGA(SEQ ID NO:80)、TTTTTTAATTCTACAGAGAAATCTCGA(SEQ ID NO:82)、TTTTTTAATTGTGATTTTGGTCTAGCT(SEQ ID NO:84)和TTTTTTAATTTCTAGCTACAGAGAAAT(SEQ ID NO:86)。在一些实施方案中，试剂盒还包括引物对，所述引物对包含序列ATAGCCTCAATTCTTACCATCCACAAAATG(SEQ ID NO:9)和CAGATATATTTCTTCATGAAGACCTCACAGTAA(SEQ ID NO:10)。在一些实施方案中，试剂盒还包括与对应于BRAF DNA突变的野生型BRAF DNA基因座杂交并且防止野生型BRAFDNA基因座扩增的阻断核酸，并且其中阻断核酸包含序列GAGATTTCACTGTAGC(invdT)$_n$，其中n为1、2或3(SEQ ID NO:301)；GAGATTTCACTGTAGC(invdT)$_n$，其中n为1、2或3(SEQ ID NO:302)；GAGATTTCACTGTAGC(invdT)$_n$，其中n为1、2或3(SEQ ID NO:303)；GAGATTTCACTGTAGC(invdT)$_n$，其中n为1、2或3(SEQ ID NO:304)；或GAGATTTCACTGTAGC(invdT)$_n$，其中n为1、2或3(SEQ ID NO:305)；斜体的核酸表示锁核酸。在一些实施方案中，对EGFR基因中的DNA突变具有特异性的探针包含选自由以下组成的组的序列：TCAAAGTGCTGGCCTC(SEQ ID NO:117)、AGATCAAAGTGCTGGCCTCCG(SEQ ID NO:119)、AAAGTGCTGGCCT(SEQ ID NO:121)、AGTGCTGGCCT(SEQ ID NO:123)和AAGTGCTGGCCTC(SEQ ID NO:125)。在一些实施方案中，对EGFR基因中的DNA突变具有特异性的探针还包含5′端处的八个核苷酸，并且其中5′端处的八个核苷酸是腺嘌呤或胸腺嘧啶核苷酸。在一些实施方案中，对EGFR基因中的DNA突变具有特异性的探针包含选自由以下组成的组的序列：TTTTTTTTTTCAAAGTGCTGGCCTC(SEQ ID NO:118)、TTTTTTAGATCAAAGTGCTGGCCTCCG(SEQ ID NO:120)、TTTTTTTTTTTAAAGTGCTGGCCT(SEQ ID NO:122)、TTTTTTTTTTTTTAGTGCTGGCCT(SEQ ID NO:124)和TTTTTTTTTTTTTAAGTGCTGGCCTC(SEQ ID NO:126)。在一些实施方案中，试剂盒还包括引物对，所述引物对包含序列CTTGTGGAGCCTCTTACACCC(SEQ ID NO:11)和TGCCGAACGCACCGGA(SEQ ID NO:12)。在一些实施方案中，试剂盒还包括与对应于EGFR DNA突变的野生型EGFR DNA基因座杂交并且防止野生型EGFR DNA基因座扩增的阻断核酸，并且其中阻断核酸包含序列CGGAGCCCAGCACTTTGA(invdT)$_n$，其中n为1、2或3(SEQ ID NO:306)；CGCACCGGAGCCCAGCACT(invdT)$_n$，其中n为1、2或3(SEQ ID NO:307)；GAGCCCAGCAC(invdT)$_n$，其中n为1、2或3(SEQ ID NO:308)；CGCACCGGAGCCCAGCAC(invdT)$_n$，其中n为1、2或3(SEQ ID NO:309)；或CGCACCGGAGCCCAGCACTTA(invdT)$_n$，其中n为1、2或3(SEQ ID NO:310)；斜体的核酸表示锁核酸。在一些实施方案中，EGFR基因中的DNA突变包括编码E746_A750del突变的EGFR蛋白的DNA突变。在一些实施方案中，对EGFR基因中的DNA突变具有特异性的探针包括：(1)第一探针，其包含选自由以下组成的组的序列：AATCAAAACATCTCCGAAAG(SEQ ID NO:128)、CAAAACATCTCCG(SEQ ID NO:130)、AACATCTCCG(SEQ ID NO:132)和AAACATCTCCGAAAGCC(SEQ ID NO:134)；和(2)第二探针，其包含选自由以下组成的组的序列：AATCAAGACATCTCCGA(SEQ ID NO:136)、GCAATCAAGACATCTCCGA(SEQ ID NO:138)、AATCAAGACATCTC(SEQ ID NO:140)、AATCAAGACATCTCCGAAAGC(SEQ ID NO:142)和CAAGACATCTCCGA(SEQ ID NO:144)；其中两种探针中的每一种与具有不同标识符的微载体偶联。在一些实施方案中，两种探针中的每一种还包含5′端处的八个核苷酸，并且其中5′端处的八个核苷酸是腺嘌呤或胸腺嘧啶核苷酸。在一些实施方案中，对EGFR基因中的DNA突变具有特异性的探针包括：(1)第一探针，其

包含选自由以下组成的组的序列:TTTTTTTTTAATCAAAACATCTCCG(SEQ ID NO:127)、TTTTTTTTTAATCAAAACATCTCCGAAAG(SEQ ID NO:129)、TTTTTTTTTTTACAAAACATCTCCG(SEQ ID NO:131)、TTTTTTTTTTTTTTTTAACATCTCCG(SEQ ID NO:133)和TTTTTTTTTTTTTAAACATCTCCGAAAGCC(SEQ ID NO:135);和(2)第二探针,其包含选自由以下组成的组的序列:TTTTTTTTAATCAAGACATCTCCGA(SEQ ID NO:137)、TTTTTTGCAATCAAGACATCTCCGA(SEQ ID NO:139)、TTTTTTTTAATCAAGACATCTC(SEQ ID NO:141)、TTTTTTTTAATCAAGACATCTCCGAAAGC(SEQ ID NO:143)和TTTTTTTTTTTCAAGACATCTCCGA(SEQ ID NO:145);其中两种探针中的每一种与具有不同标识符的微载体偶联。在一些实施方案中,试剂盒还包括引物对,所述引物对包含序列GCCAGTTAACGTCTTCCTTCTC(SEQ ID NO:13)和ATCGAGGATTTCCTTGTTGGCTT(SEQ ID NO:14)。在一些实施方案中,试剂盒还包括与对应于EGFRDNA突变的野生型EGFRDNA基因座杂交并且防止野生型EGFRDNA基因座扩增的阻断核酸,并且其中阻断核酸包含序列CGGAGATGTTGCTTCTCTTAATTCC(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:311);CGGAGATGTTGCTTCTCT(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:312);GTTGCTTCTCTTAATTCC(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:313);ATGTTGCTTCTCT(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:314);或TTGCTTCTCTTA(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:315);斜体的核酸表示锁核酸。在一些实施方案中,EGFR基因中的DNA突变包括一种或多种编码T790M、C797S、S768I、V769_D770insASV、H773_V774insH、D770_N771insG或D770_N771insSVD突变的EGFR蛋白的DNA突变。在一些实施方案中,EGFR基因中的DNA突变包括编码T790M、C797S、S768I、V769_D770insASV、H773_V774insH、D770_N771insG和D770_N771insSVD突变的EGFR蛋白的DNA突变。在一些实施方案中,对EGFR基因中的DNA突变具有特异性的探针包括:(1)第一探针,其包含选自由以下组成的组的序列:GAGATGCATGATGA(SEQ ID NO:146)、TGAGATGCATGATGAG(SEQ ID NO:147)、ATGAGATGCATGATGAG(SEQ ID NO:148)、TGAGCTGCATGATGA(SEQ ID NO:149)和CATGAGATGCATGATGA(SEQ ID NO:150);(2)第二探针,其包含选自由以下组成的组的序列:CCAGGAGGCTGCCG(SEQ ID NO:461)、CAGGAGGCTGCCGA(SEQ ID NO:463)、TCCAGGAGGCTGCC(SEQ ID NO:465)、CCAGGAGGCTGCC(SEQ ID NO:467)和CAGGAGGCTGCC(SEQ ID NO:469);(3)第三探针,其包含选自由以下组成的组的序列:CCAGGAGGGAGCC(SEQ ID NO:471)、CCAGGAGGGAGCCG(SEQ ID NO:473)、TCCAGGAGGGAGCC(SEQ IDNO:475)、CAGGAGGGAGCCG(SEQ ID NO:477)和CAGGAGGGAGCCGA(SEQ ID NO:479);(4)第四探针,其包含选自由以下组成的组的序列:ATGGCCATCTTGG(SEQ ID NO:421)、GGCCATCTTGGA(SEQ ID NO:423)、GATGGCCATCTTG(SEQ ID NO:425)、TGATGGCCATCTTG(SEQ ID NO:427)和TGGCCATCTTGG(SEQ ID NO:429);(5)第五探针,其包含选自由以下组成的组的序列:GTGATGGCCGG(SEQ ID NO:431)、TGATGGCCGGCG(SEQ ID NO:433)、GTGATGGCCGGCGT(SEQ ID NO:435)、GATGGCCGGCGT(SEQ ID NO:437)和GATGGCCCGCGTG(SEQ ID NO:439);(6)第六探针,其包含选自由以下组成的组的序列:AACCCCCATCACGT(SEQ ID NO:441)、GACAACCCCCATCACG(SEQ ID NO:443)、CGTGGACAACCCCCATCA(SEQ ID NO:445)、CCCATCACGTGT(SEQ ID NO:447)和TGGACAACCCCCATCAC(SEQ ID NO:449);和(7)第七探针,其包含选自由以下组成的组的序列:GCCAGCGTGGACGG(SEQ ID NO:451)、CGTGGACGGTAACC(SEQ ID NO:453)、GACGGTAACCCCC(SEQ ID NO:455)、CCAGCGTGGACGGT(SEQ ID NO:457)和GCCAGCGTGGACGGTA(SEQ ID NO:459);其中七种探针中的每一种与具有不同标识符的微载

体偶联。在一些实施方案中，对EGFR基因中的DNA突变具有特异性的七种探针中的每一种还包含5′端处的八个核苷酸，并且其中5′端处的八个核苷酸是腺嘌呤或胸腺嘧啶核苷酸。在一些实施方案中，对EGFR基因中的DNA突变具有特异性的探针包括：(1)第一探针，其包含选自由以下组成的组的序列：TTTTTTTTTTTGAGATGCATGATGA(SEQ ID NO:352)、TTTTTTTTTTGAGATGCATGATGAG(SEQ ID NO:353)、TTTTTTTTATGAGATGCATGATGAG(SEQ ID NO:354)、TTTTTTTTTTTGAGCTGCATGATGA(SEQ ID NO:355)和TTTTTTTTCATGAGATGCATGATGA(SEQ ID NO:356)；(2)第二探针，其包含选自由以下组成的组的序列：TTTTTTTTTTACCAGGAGGCTGCCG(SEQ ID NO:462)、TTTTTTTTTTACAGGAGGCTGCCGA(SEQ ID NO:464)、TTTTTTTTTTATCCAGGAGGCTGCC(SEQ ID NO:466)、TTTTTTTTTTACCAGGAGGCTGCC(SEQ ID NO:468)和TTTTTTTTTTACAGGAGGCTGCC(SEQ ID NO:470)；(3)第三探针，其包含选自由以下组成的组的序列：TTTTTTTTTTACCAGGAGGGAGCC(SEQ ID NO:472)、TTTTTTTTTTACCAGGAGGGAGCCG(SEQ ID NO:474)、TTTTTTTTTTATCCAGGAGGGAGCC(SEQ ID NO:476)、TTTTTTTTTTACAGGAGGGAGCCG(SEQ ID NO:478)和TTTTTTTTTTACAGGAGGGAGCCGA(SEQ ID NO:480)；(4)第四探针，其包含选自由以下组成的组的序列：TTTTTTTTATGGCCATCTTGG(SEQ ID NO:422)、TTTTTTTTTAGGCCATCTTGGA(SEQ ID NO:424)、TTTTTTAGATGGCCATCTTG(SEQ ID NO:426)、TTTTTTTGATGGCCATCTTG(SEQ ID NO:428)和TTTTTTTTTTGGCCATCTTGG(SEQ ID NO:430)；(5)第五探针，其包含选自由以下组成的组的序列：TTTTTTTTTTGTGATGGCCGG(SEQ ID NO:432)、TTTTTTTTTTTTGATGGCCGGCG(SEQ ID NO:434)、TTTTTTTTTTGTGATGGCCGGCGT(SEQ ID NO:436)、TTTTTTTTTTTTGATGGCCGGCGT(SEQ ID NO:438)和TTTTTTTTTTTTGATGGCCCGCGTG(SEQ ID NO:440)；(6)第六探针，其包含选自由以下组成的组的序列：TTTTTTTTTTAACCCCCATCACGT(SEQ ID NO:442)、TTTTTTTGACAACCCCCATCACG(SEQ ID NO:444)、TTTCGTGGACAACCCCCATCA(SEQ ID NO:446)、TTTTTTTTTTTCCCATCACGTGT(SEQ ID NO:448)和TTTTTTTGGACAACCCCCATCAC(SEQ ID NO:450)；和(7)第七探针，其包含选自由以下组成的组的序列：TTTTTTTTTTGCCAGCGTGGACGG(SEQ ID NO:452)、TTTTTTTTTTCGTGGACGGTAACC(SEQ ID NO:454)、TTTTTTTTTTGACGGTAACCCCC(SEQ ID NO:456)、TTTTTTTTTCCAGCGTGGACGGT(SEQ ID NO:458)和TTTTTTGCCAGCGTGGACGGTA(SEQ ID NO:460)；其中七种探针中的每一种与具有不同标识符的微载体偶联。在一些实施方案中，试剂盒还包括：包含序列CCTCCACCGTGCAGATCATC(SEQ ID NO:15)和TTCCCTGATTACCTTTGCGAT(SEQ ID NO:16)的引物对；包含序列CCACACTGACGTGCCTCT(SEQ ID NO:511)和GCACACGTAGGGGTTGTCCAAGA(SEQ ID NO:512)的引物对；包含序列CCACACTGACGTGCCTCT(SEQ ID NO:513)和GTACACGCTGGCCACGCCG(SEQ ID NO:514)的引物对；包含序列CCACACTGACGTGCCTCT(SEQ ID NO:515)和CAGGCGGCACACGTGAT(SEQ ID NO:516)的引物对；和/或包含序列CCACACTGACGTGCCTCT(SEQ ID NO:517)和AGGCGGCACACGTGCGGGTTAC(SEQ ID NO:518)的引物对。在一些实施方案中，试剂盒还包括与对应于EGFR DNA突变的野生型EGFR DNA基因座杂交并且防止野生型EGFR DNA基因座扩增的阻断核酸，并且其中阻断核酸包含序列CATCACGCAGCTCATG(invdT)$_n$，其中n为1、2或3(SEQ ID NO:316)；TGCAGCTCATCACGCAGC(invdT)$_n$，其中n为1、2或3(SEQ ID NO:317)；TCATCACGCAGCTCAT(invdT)$_n$，其中n为1、2或3(SEQ ID NO:318)；TCATCACGCAGC(invdT)$_n$，其中n为1、2或3(SEQ ID NO:319)；或

CTCATCACGCAGC(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:320);斜体的核酸表示锁核酸。在一些实施方案中,EGFR基因中的DNA突变包括编码L858R突变的EGFR蛋白的DNA突变。在一些实施方案中,对EGFR基因中的DNA突变具有特异性的探针包含选自由以下组成的组的序列:ATTTTGGGCGGGCC(SEQ ID NO:151)、TTGGGCGGGCCAAA(SEQ ID NO:153)、GCGGGCCAAACT(SEQ ID NO:155)、GGGCGGGCCAAACT(SEQ ID NO:157)和TGGGCGGGCCA(SEQ ID NO:159)。在一些实施方案中,探针还包含5′端处的八个核苷酸,并且其中5′端处的八个核苷酸是腺嘌呤或胸腺嘧啶核苷酸。在一些实施方案中,对EGFR基因中的DNA突变具有特异性的探针包含选自由以下组成的组的序列:TTTTTTTATTTTGGGCGGGCC(SEQ ID NO:152)、TTTTTTTTAATTGGGCGGGCCAAA(SEQ ID NO:154)、TTTTTTTAAAAAAGCGGGCCAAACT(SEQ ID NO:156)、TTTTTTTTAAAAGGGCGGGCCAAACT(SEQ ID NO:158)和TTTTTTTTAAATGGGCGGGCCA(SEQ ID NO:160)。在一些实施方案中,试剂盒还包括引物对,所述引物对包含序列GGAGGACCGTCGCTTGG(SEQ ID NO:17)和TCTTTCTCTTCCGCACCCAG(SEQ ID NO:18)。在一些实施方案中,试剂盒还包括与对应于EGFR DNA突变的野生型EGFR DNA基因座杂交并且防止野生型EGFR DNA基因座扩增的阻断核酸,并且其中阻断核酸包含序列CCAGCAGTTTGGCCAGCCCT(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:321);CCAGCAGTTTGGCCAGCCCT(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:322);CCAGCAGTTTGGCCAGCCCT(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:323);AGCAGTTTGGCCAGCC(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:324);或CCAGCAGTTTGGCCAGCCCT(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:325);斜体的核酸表示锁核酸。在一些实施方案中,AKT1基因中的DNA突变包括编码E17K突变的AKT1蛋白的DNA突变。在一些实施方案中,对AKT1基因中的DNA突变具有特异性的探针包含选自由以下组成的组的序列:TGTAGGGAAGTACA(SEQ ID NO:370)、TCTGTAGGGAAGTAC(SEQ ID NO:372)、GTCTGTAGGGAAGTACAT(SEQ ID NO:374)、CCGCACGTCTGTAGGGA(SEQ ID NO:376)和ACGTCTGTAGGGAAGTA(SEQ ID NO:378)。在一些实施方案中,对AKT1基因中的DNA突变具有特异性的探针还包含5′端处的七个核苷酸,并且其中5′端处的七个核苷酸是腺嘌呤或胸腺嘧啶核苷酸。在一些实施方案中,对AKT1基因中的DNA突变具有特异性的探针包含选自由以下组成的组的序列:TTTTTTTTTTTTTTGTAGGGAAGTACA(SEQ ID NO:371)、TTTTTTTTTTTTCTGTAGGGAAGTAC(SEQ ID NO:373)、TTTTTTTGTCTGTAGGGAAGTACAT(SEQ ID NO:375)、TTTTTTTCCGCACGTCTGTAGGGA(SEQ ID NO:377)和TTTTTTTTACGTCTGTAGGGAAGTA(SEQ ID NO:379)。在一些实施方案中,试剂盒还包括引物对,所述引物对包含序列GAGGGTCTGACGGGTAGAGTG(SEQ ID NO:380)和TGGCCGCCAGGTCTTGATGTA(SEQ ID NO:381)。在一些实施方案中,试剂盒还包括与对应于AKT1 DNA突变的野生型AKT1 DNA基因座杂交并且防止野生型AKT1 DNA基因座扩增的阻断核酸,并且其中阻断核酸包含序列TGTACTCCCCTACA(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:382);GATGTACTCCCCT(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:383);ATGTACTCCCCTAC(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:384);GTACTCCCCTACA(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:385);或GATGTACTCCCCTACA(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:386);斜体的核酸表示锁核酸。在一些实施方案中,MEK1基因中的DNA突变包括编码K57N突变的MEK1蛋白的DNA突变。在一些实施方案中,对MEK1基因中的DNA突变具有特异性的探针包含选自由以下组成的组的序列:TTACCCAGAATCAGAA(SEQ ID NO:387)、CCAGAATCAGAAGGTG(SEQ ID NO:389)、TTCTTACCCAGAATCA(SEQ ID NO:391)、

CCTTTCTTACCCAGAATC(SEQ ID NO:393)和CAGAATCAGAAGGTGG(SEQ ID NO:395)。在一些实施方案中,对MEK1基因中的DNA突变具有特异性的探针还包含5′端处的八个核苷酸,并且其中5′端处的八个核苷酸是腺嘌呤或胸腺嘧啶核苷酸。在一些实施方案中,对MEK1基因中的DNA突变具有特异性的探针包含选自由以下组成的组的序列:TTTTTAAATTTACCCAGAATCAGAA(SEQ ID NO:388)、TTTTTAAATCCAGAATCAGAAGGTG(SEQ ID NO:390)、TTTTTAAATTTCTTACCCAGAATCA(SEQ ID NO:392)、TTTTTAAATCCTTTCTTACCCAGAATC(SEQ ID NO:394)和TTTTTAAATCAGAA TCAGAAGGTGG(SEQ ID NO:396)。在一些实施方案中,试剂盒还包括引物对,所述引物对包含序列CTTGATGAGCAGCAGCGAAA(SEQ ID NO:397)和CCTTCAGTTCTCCCACCTTCTG(SEQ ID NO:398)。在一些实施方案中,试剂盒还包括与对应于MEK1 DNA突变的野生型MEK1 DNA基因座杂交并且防止野生型MEK1 DNA基因座扩增的阻断核酸,并且其中阻断核酸包含序列TCTGCTTCTGGGTAAG(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:399);TTCTGCTTCTGGGTAAGA(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:400);CACCTTCTGCTTCTGGG(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:401);TCTGCTTCTGGGTA(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ IDNO:402);或CACCTTCTGCTTCTGGGTAAGA(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:403);斜体的核酸表示锁核酸。在一些实施方案中,HER2基因中的DNA突变包括编码A775_G776insYVMA突变的HER2蛋白的DNA突变。在一些实施方案中,对HER2基因中的DNA突变具有特异性的探针包含选自由以下组成的组的序列:ATACGTGATGTCTTAC(SEQ ID NO:404)、ACGTGATGGCTTACGT(SEQ ID NO:406)、AAGCATACGTGATGGCT(SEQ ID NO:408)、GCATACGTGATGGCTT(SEQ ID NO:410)和GCATACGTGATGGCTTA(SEQ ID NO:412)。在一些实施方案中,对HER2基因中的DNA突变具有特异性的探针还包含5′端处的五个核苷酸,并且其中5′端处的五个核苷酸是腺嘌呤或胸腺嘧啶核苷酸。在一些实施方案中,对HER2基因中的DNA突变具有特异性的探针包含选自由以下组成的组的序列:TTTTTTTTTATACGTGATGTCTTAC(SEQ ID NO:405)、TTTTTTTTTTTACGTGATGGCTTACGT(SEQ ID NO:407)、TTTTTAAGCATACGTGATGGCT(SEQ ID NO:409)、TTTTTTTGCATACGTGATGGCTT(SEQ ID NO:411)和TTTTTTTGCATACGTGATGGCTTA(SEQ ID NO:413)。在一些实施方案中,试剂盒还包括引物对,所述引物对包含序列ATGGCTGTGGTTTGTGATGGT(SEQ ID NO:414)和ACACCAGCCATCACGTAAGACA(SEQ ID NO:415)。

[0037] 在另一个方面,本文提供了包括至少五种微载体的试剂盒,其中所述至少五种微载体中的每一种包含:(i)与微载体偶联的探针,其中探针对ALK、ROS、RET、NTRK1或cMET基因中的RNA突变具有特异性;和(ii)对应于与其偶联的探针的标识符;其中试剂盒包括:包含对ALK基因中的RNA突变具有特异性的探针的至少一种微载体、包含对ROS基因中的RNA突变具有特异性的探针的至少一种微载体、包含对RET基因中的RNA突变具有特异性的探针的至少一种微载体、包含对NTRK1基因中的RNA突变具有特异性的探针的至少一种微载体、包含对cMET基因中的RNA突变具有特异性的探针的至少一种微载体;并且其中ALK、ROS、RET、NTRK1和cMET基因是人基因。在一些实施方案中,ALK、ROS、RET和NTRK1基因中的突变中的每一种都包括融合基因或基因重排。

[0038] 在一些实施方案中,ALK基因中的突变包括EML E13:ALK E20、EML E20:ALK E20和EML E6:ALK E20 EML4-ALK融合基因中的一种或多种。在一些实施方案中,ALK基因中的突变包括EML E13:ALK E20、EML E20:ALK E20和EML E6:ALK E20EML4-ALK融合基因。在一些

实施方案中，对ALK基因中的突变具有特异性的探针包括：(1)第一探针，其包含选自由以下组成的组的序列：AAAGGACCTAAAGTGT(SEQ ID NO:161)、CCTAAAGTGTACCGC(SEQ ID NO:163)、GGGAAAGGACCTAAAG(SEQ ID NO:165)、AGTGTACCGCCGGAA(SEQ ID NO:167)和TACCGCCGGAAGCACC(SEQ ID NO:169)；(2)第二探针，其包含选自由以下组成的组的序列：GACTATGAAATATTGTAC(SEQ ID NO:171)、GAAATATTGTACTTGTAC(SEQ ID NO:173)、TATTGTACTTGTACCGCC(SEQ ID NO:175)、TGTACCGCCGGAAGCAC(SEQ ID NO:177)和CCGCCGGAAGCACCAGGA(SEQ ID NO:179)；(3)第三探针，其包含选自由以下组成的组的序列：TGTCATCATCAACCAA(SEQ ID NO:181)、ATGTCATCATCAACC(SEQ ID NO:183)、GTGTACCGCCGGAAGC(SEQ ID NO:185)、TCAACCAAGTGTACCG(SEQ ID NO:187)和TACCGCCGGAAGCACCA(SEQ ID NO:189)；和(4)第四探针，其包含选自由以下组成的组的序列：CGAAAAAAACAGCCAA(SEQ ID NO:191)、TCGCGAAAAAAACAGC(SEQ ID NO:193)、GTGTACCGCCGGAAGC(SEQ ID NO:195)、TACCGCCGGAAGCACC(SEQ ID NO:197)和ACAGCCAAGTGTACCG(SEQ ID NO:199)；其中四种探针中的每一种与具有不同标识符的微载体偶联。在一些实施方案中，四种探针中的每一种还包含5′端处的八个核苷酸，并且其中5′端处的八个核苷酸是腺嘌呤或胸腺嘧啶核苷酸。在一些实施方案中，对ALK基因中的突变具有特异性的探针包括：(1)第一探针，其包含选自由以下组成的组的序列：TTTTTTTTTTAAAGGACCTAAAGTGT(SEQ ID NO:162)、TTTTTTTTTTCCTAAAGTGTACCGC(SEQ ID NO:164)、TTTTTTTTTTGGGAAAGGACCTAAAG(SEQ ID NO:166)、TTTTTTTTTTAGTGTACCGCCGGAA(SEQ ID NO:168)和TTTTTTTTTTTACCGCCGGAAGCACC(SEQ ID NO:170)；(2)第二探针，其包含选自由以下组成的组的序列TTTTTTTTTTTTGACTATGAAATATTGTAC(SEQ ID NO:172)、TTTTTTTTTTTGAAATATTGTACTTGTAC(SEQ ID NO:174)、TTTTTTTTTTTTATTGTACTTGTACCGCC(SEQ ID NO:176)、TTTTTTTTTTTTTGTACCGCCGGAAGCAC(SEQ ID NO:178)和TTTTTTTTTTTCCGCCGGAAGCACCAGGA(SEQ ID NO:180)；(3)第三探针，其包含选自由以下组成的组的序列：TTTTTTTTTTTTTTGTCATCATCAACCAA(SEQ ID NO:182)、TTTTTTTTTTTTTATGTCATCATCAACC(SEQ ID NO:184)、TTTTTTTTTTTTTGTGTACCGCCGGAAGC(SEQ ID NO:186)、TTTTTTTTTTTTTTCAACCAAGTGTACCG(SEQ ID NO:188)和TTTTTTTTTTTTTTACCGCCGGAAGCACCA(SEQ ID NO:190)；和(4)第四探针，其包含选自由以下组成的组的序列TTTTTTTTTTTTCGAAAAAAACAGCCAA(SEQ ID NO:192)、TTTTTTTTTTTTTCGCGAAAAAAACAGC(SEQ ID NO:194)、TTTTTTTTTTTTGTGTACCGCCGGAAGC(SEQ ID NO:196)、TTTTTTTTTTTTTTACCGCCGGAAGCACC(SEQ ID NO:198)和TTTTTTTTTTTTTTACAGCCAAGTGTACCG(SEQ ID NO:200)；其中四种探针中的每一种与具有不同标识符的微载体偶联。在一些实施方案中，试剂盒还包含适用于生成对ALK基因中的突变具有特异性的cDNA的第一引物，其中第一引物包含序列AGTTGGGGTTGTAGTCGGTCAT(SEQ ID NO:363)或GAAGCCTCCCTGGATCTCC(SEQ ID NO:364)；和对ALK基因中的突变具有特异性的第二引物，所述第二引物包含选自由以下组成的组的序列：TATGGAGCAAAACTACTGTAGAGCC(SEQ ID NO:357)、CCAGCTACATCACACACCTTGACT(SEQ ID NO:358)和TAATACCAAAAGTTACCAAAACTGCA(SEQ ID NO:359)。在一些实施方案中，ROS基因中的突变包括选自由CD74-ROS和SLC34A2-ROS组成的组的ROS融合基因。在一些实施方案中，ROS基因中的突变包括CD74 E6:ROS E32、CD74E6:ROS E34、SLC34A2 E4:ROS E32和SLC34A2 E4:ROS

E34融合基因。在一些实施方案中，对ROS基因中的突变具有特异性的探针包括：(1)第一探针，其包含选自由以下组成的组的序列：ACTGACGCTCCACCGAAA(SEQ ID NO:201)、CCACTGACGCTCCACCGA(SEQ ID NO:203)、GCTGGAGTCCCAAATAAAC(SEQ ID NO:205)、GGAGTCCCAAATAAACCAG(SEQ ID NO:207)和CACCGAAAGCTGGAGTCCC(SEQ ID NO:209)；(2)第二探针，其包含选自由以下组成的组的序列：CCGAAAGATGATTTT(SEQ ID NO:211)、GACGCTCCACCGAAA(SEQ ID NO:213)、ACTGACGCTCCACCGA(SEQ ID NO:215)、GATGATTTTTGGATA(SEQ ID NO:217)和TGATTTTTGGATACCA(SEQ ID NO:219)；(3)第三探针，其包含选自由以下组成的组的序列：AGCGCCTTCCAGCTGGTTGGA(SEQ ID NO:221)、CTGGTTGGAGCTGGAGTCCC(SEQ ID NO:223)、AGTAGCGCCTTCCAGCTGGTTG(SEQ ID NO:225)、GCTGGAGTCCCAAATAAACCA(SEQ ID NO:227)和GGAGTCCCAAATAAACCAGG(SEQ ID NO:229)；和(4)第四探针，其包含选自由以下组成的组的序列：GCGCCTTCCAGCTGGTTG(SEQ ID NO:231)、GTAGCGCCTTCCAGCTGGT(SEQ ID NO:233)、TGGTTGGAGATGATTTTT(SEQ ID NO:235)、GATGATTTTTGGATACCAG(SEQ ID NO:237)和TGATTTTTGGATACCA(SEQ ID NO:239)；其中四种探针中的每一种与具有不同标识符的微载体偶联。在一些实施方案中，四种探针中的每一种还包含5′端处的八个核苷酸，并且其中5′端处的八个核苷酸是腺嘌呤或胸腺嘧啶核苷酸。在一些实施方案中，对ROS基因中的突变具有特异性的探针包括：(1)第一探针，其包含选自由以下组成的组的序列：TTTTTTTTTTTACTGACGCTCCACCGAAA(SEQ ID NO:202)、TTTTTTTTTTCCACTGACGCTCCACCGA(SEQ ID NO:204)、TTTTTTTTTTGCTGGAGTCCCAAATAAAC(SEQ ID NO:206)、TTTTTTTTTTGGAGTCCCAAATAAACCAG(SEQ ID NO:208)和TTTTTTTTTTCACCGAAAGCTGGAGTCCC(SEQ ID NO:210)；(2)第二探针，其包含选自由以下组成的组的序列：TTTTTTTTTTTCCGAAAGATGATTTT(SEQ ID NO:212)、TTTTTTTTTTGACGCTCCACCGAAA(SEQ ID NO:214)、TTTTTTTTTTACTGACGCTCCACCGA(SEQ ID NO:216)、TTTTTTTTTTGATGATTTTTGGATA(SEQ ID NO:218)和TTTTTTTTTTGATTTTGGATACCA(SEQ ID NO:220)；(3)第三探针，其包含选自由以下组成的组的序列：TTTTTTTTTTAGCGCCTTCCAGCTGGTTGGA(SEQ ID NO:222)、TTTTTTTTTTCTGGTTGGAGCTGGAGTCCC(SEQ ID NO:224)、TTTTTTTTTTAGTAGCGCCTTCCAGCTGGTTG(SEQ ID NO:226)、TTTTTTTTTTGCTGGAGTCCCAAATAAACCA(SEQ ID NO:228)和TTTTTTTTTTGGAGTCCCAAATAAACCAGG(SEQ ID NO:230)；和(4)第四探针，其包含选自由以下组成的组的序列：TTTTTTTTTGCGCCTTCCAGCTGGTTG(SEQ ID NO:232)、TTTTTTTTGTAGCGCCTTCCAGCTGGT(SEQ ID NO:234)、TTTTTTTTTTGGTTGGAGATGATTTTT(SEQ ID NO:236)、TTTTTTTTTGATGATTTTTGGATACCAG(SEQ ID NO:238)和TTTTTTTTTTGATTTTGGATACCA(SEQ ID NO:240)；其中四种探针中的每一种与具有不同标识符的微载体偶联。在一些实施方案中，试剂盒还包括适用于生成对ROS基因中的突变具有特异性的cDNA的第一引物，其中第一引物包含序列AATTCAATACATACTATCAGCTTTCTCCCACTGTATTGAA(SEQ ID NO:21)或AATATTTCTGGTACGAGTGGGATTGTAACAACCAGAAATA(SEQ ID NO:22)；和对ROS基因中的突变具有特异性的第二引物，所述第二引物包含序列GGAGTGCCATCGCTGTTTGAAATGAGCAGGCACT(SEQ ID NO:19)或TACAGCCCTGGATATTCTTAGTAGCGC(SEQ ID NO:20)。在一些实施方案中，RET基因中的突变包括选自由KIF5B-RET组成的组的RET融合基因。在一些实施方案中，RET基因中的突变包括KIF5B E15:RET E11、KIF5B E15:RET E12、KIF5B E16:RET E12、KIF5B E22:RET E12和

KIF5B E23:RET E12融合基因。在一些实施方案中,对RET基因中的突变具有特异性的探针包括:(1)第一探针,其包含选自由以下组成的组的序列:GTGGGAAATAATGATGTAAA(SEQ ID NO:241)、CTGTGGGAAATAATGATGTA(SEQ ID NO:243)、GATCCACTGTGCGACGAGCT(SEQ ID NO:245)、TGATGTAAAGATCCACTGTG(SEQ ID NO:247)和TCCACTGTGCGACGAGCTGT(SEQ ID NO:249);(2)第二探针,其包含选自由以下组成的组的序列:TGGGAAATAATGATGTAAA(SEQ ID NO:251)、CTGTGGGAAATAATGATGTA(SEQ ID NO:253)、GGAGGATCCAAAGTGGGAAT(SEQ ID NO:255)、GGATCCAAAGTGGGAATT(SEQ ID NO:257)和ATGATGTAAAGGAGGATCC(SEQ ID NO:259);(3)第三探针,其包含选自由以下组成的组的序列:CTTCGTATCTCTCAAGAGGAT(SEQ ID NO:481)、GTATCTCTCAAGAGGATCCAA(SEQ ID NO:483)、TTCGTATCTCTCAAGAG(SEQ ID NO:485)、TCAAGAGGATCCAAA(SEQ ID NO:487)和TCTCTCAAGAGG(SEQ ID NO:489);(4)第四探针,其包含选自由以下组成的组的序列:GTTAAAAAGGAGGATCCAA(SEQ ID NO:491)、ACAAGAGTTAAAAAGGAGGA(SEQ ID NO:493)、AAGAGTTAAAAAGGAGGATC(SEQ ID NO:495)、AAAAGGAGGATCCAAAG(SEQ ID NO:497)和AAGGAGGATCCAAAGTG(SEQ ID NO:499);和(5)第五探针,其包含选自由以下组成的组的序列:AAACAGGAGGATCCAAA(SEQ ID NO:501)、AAGTGCACAAACAGGAGG(SEQ ID NO:503)、GTGCACAAACAGGAGGATC(SEQ ID NO:505)、CACAAACAGGAGGAT(SEQ ID NO:507)和AACAGGAGGATCCAAA(SEQ ID NO:509);其中五种探针中的每一种与具有不同标识符的微载体偶联。在一些实施方案中,四种探针中的每一种还包含5′端处的八个核苷酸,并且其中5′端处的八个核苷酸是腺嘌呤或胸腺嘧啶核苷酸。在一些实施方案中,对RET基因中的突变具有特异性的探针包括:(1)第一探针,其包含选自由以下组成的组的序列:TTTTTTTTTTGTGGGAAATAATGATGTAAA(SEQ ID NO:242)、TTTTTTTTTTCTGTGGGAAATAATGATGTA(SEQ ID NO:244)、TTTTTTTTTTGATCCACTGTGCGACGAGCT(SEQ ID NO:246)、TTTTTTTTTTTGATGTAAAGATCCACTGTG(SEQ ID NO:248)和TTTTTTTTTTTCCACTGTGCGACGAGCTGT(SEQ ID NO:250);(2)第二探针,其包含选自由以下组成的组的序列:TTTTTTTTTTGGGAAATAATGATGTAAA(SEQ ID NO:252)、TTTTTTTTTCTGTGGGAAATAATGATGTA(SEQ ID NO:254)、TTTTTTTTTGGAGGATCCAAAGTGGGAAT(SEQ ID NO:256)、TTTTTTTTTGGATCCAAAGTGGGAATT(SEQ ID NO:258)和TTTTTTTTTATGATGTAAAGGAGGATCC(SEQ ID NO:260);(3)第三探针,其包含选自由以下组成的组的序列:TTTTTTTTTCTTCGTATCTCTCAAGAGGAT(SEQ ID NO:482)、TTTTTTTTTGTATCTCTCAAGAGGATCCAA(SEQ ID NO:484)、TTTTTTTTTTTCGTATCTCTCAAGAG(SEQ ID NO:486)、TTTTTTTTTTCAAGAGGATCCAAA(SEQ ID NO:488)和TTTTTTTTTTCTCTCAAGAGG(SEQ ID NO:490);(4)第四探针,其包含选自由以下组成的组的序列:TTTTTTTTTGTTAAAAAGGAGGATCCAA(SEQ ID NO:492)、TTTTTTTTACAAGAGTTAAAAAGGAGGA(SEQ ID NO:494)、TTATTATTAAGAGTTAAAAAGGAGGATC(SEQ ID NO:81 1)、TTTTTTTTAAAAGGAGGATCCAAAG(SEQ ID NO:498)和TTTTTTTTAAGGAGGATCCAAAGTG(SEQ ID NO:500);和(5)第五探针,其包含选自由以下组成的组的序列:TTTTTTTTAAACAGGAGGATCCAAA(SEQ ID NO:502)、TTTTTATTAAGTGCACAAACAGGAGG(SEQ ID NO:504)、TATTATTATGTGCACAAACAGGAGGATC(SEQ ID NO:506)、TATTTTTTCACAAACAGGAGGAT(SEQ ID NO:508)和TTTTATTTAACAGGAGGATCCAAA(SEQ ID NO:510);其中五种探针中的每一种与具有不同标识符的微载体偶联。在一些实施方案中,试剂盒还包含适用于生成对RET基

因中的突变具有特异性的cDNA的第一引物，其中第一引物包含序列GTGATCGCACAGTAGGACAGCGGCTGCGATC(SEQ ID NO:26)或CTCTAGGAGATATCATTCCAAATTCGCCTTCTCCTAG(SEQ ID NO:27)；和对RET基因中的突变具有特异性的第二引物，所述第二引物包含选自由以下组成的组的序列：TTTCTGGTGCTATGAGGAAATGACCAACCACCAGA(SEQ ID NO:23)、AAGGAGTTAGCAGCATGTCAGC(SEQ ID NO:519)、AACTTCAGACTTTACACAACCTGC(SEQ ID NO:520)和ATTGATTCTGATGACACCGGA(SEQ ID NO:521)。在一些实施方案中，NTRK1基因中的突变包括CD74-NTRK1融合基因。在一些实施方案中，NTRK1基因中的突变包括CD74 E8:NTRK1 E12融合基因。在一些实施方案中，对NTRK1基因中的突变具有特异性的探针包含选自由以下组成的组的序列：CAGGATCTGGGCCCAGACA(SEQ ID NO:261)、GATCTGGGCCCAGACACTA(SEQ ID NO:263)、CCAGACACTAACAGCACAT(SEQ ID NO:265)、GGGCCCAGACACTAACAGC(SEQ ID NO:267)和CTAACAGCACATCTGGAGA(SEQ ID NO:269)。在一些实施方案中，对NTRK1基因中的突变具有特异性的探针还包含5′端处的八个核苷酸，并且其中5′端处的八个核苷酸是腺嘌呤或胸腺嘧啶核苷酸。在一些实施方案中，对NTRK1基因中的突变具有特异性的探针包含选自由以下组成的组的序列：TTTTTTTTTTACAGGATCTGGGCCCAGACA(SEQ ID NO:262)、TTTTTTTTTTAGATCTGGGCCCAGACACTA(SEQ ID NO:264)、TTTTTTTTTTACCAGACACTAACAGCACAT(SEQ ID NO:266)、TTTTTTTTTTAGGGCCCAGACACTAACAGC(SEQ ID NO:268)和TTTTTTTTTTACTAACAGCACATCTGGAGA(SEQ ID NO:270)。在一些实施方案中，试剂盒还包括适用于生成对NTRK1基因中的突变具有特异性的cDNA的第一引物，其中第一引物包含序列GGACGAAAATCCAGACCCCAAAAGGTGTTTCGT(SEQ ID NO:32)；和对NTRK1基因中的突变具有特异性的第二引物，所述第二引物包含序列AGAAGACGTGACAGGAACTGGAGGACCCGTCTT(SEQ ID NO:30)。在一些实施方案中，cMET基因中的突变导致外显子跳读。在一些实施方案中，cMET基因中的突变导致外显子14的跳读。在一些实施方案中，对cMET基因中的突变具有特异性的探针包含选自由以下组成的组的序列：AGAAAGCAAATTAAAGAT(SEQ ID NO:271)、AGCAAATTAAAGATCAG(SEQ ID NO:273)、AAATTAAAGATCAGTTTC(SEQ ID NO:275)、AGATCAGTTTCCTAATTC(SEQ ID NO:277)和AAGATCAGTTTCCTAATT(SEQ ID NO:279)。在一些实施方案中，对cMET基因中的一种或多种突变具有特异性的探针还包含5′端处的八个核苷酸，并且其中5′端处的八个核苷酸是腺嘌呤或胸腺嘧啶核苷酸。在一些实施方案中，对cMET基因中的突变具有特异性的探针包含选自由以下组成的组的序列：TTTTTTTTTTAGAAAGCAAATTAAAGAT(SEQ ID NO:272)、TTTTTTTTTTAGCAAATTAAAGATCAG(SEQ ID NO:274)、TTTTTTTTTTAAATTAAAGATCAGTTTC(SEQ ID NO:276)、TTTTTTTTTTAGATCAGTTTCCTAATTC(SEQ ID NO:278)和TTTTTTTTTTAAGATCAGTTTCCTAATT(SEQ ID NO:280)。在一些实施方案中，试剂盒还包括适用于生成对cMET基因中的突变具有特异性的cDNA的第一引物，其中第一引物包含序列GACAGTATTTTGCAGTAATGGACTGGATATATCAGA(SEQ ID NO:29)；和对cMET基因中的突变具有特异性的第二引物，所述第二引物包含序列GAATTTCACAGGATTGATTGCTGGTGTTGTCTC(SEQ ID NO:28)。

[0039] 在根据本文描述的任何实施方案的一些实施方案中，微载体的标识符包括数字条形码。在一些实施方案中，每种微载体包含：(i)第一光致聚合物层；(ii)第二光致聚合物层；和(iii)第一层和第二层之间的中间层，中间层具有表示限定在其上的标识符的编码图案，其中中间层部分基本地可透光并且部分基本地不透光，从而表示对应于微载体的代码，

其中微载体的最外表面包含光致抗蚀剂光致聚合物，并且所述光致抗蚀剂光致聚合物被对DNA突变具有特异性的探针官能化，并且其中所述微载体具有与水大概相同的密度。在一些实施方案中，微载体的标识符包含模拟代码。在一些实施方案中，每种微载体包含：(i)具有第一表面和第二表面的基本透明聚合物层，第一表面和第二表面彼此平行；(ii)构成二维形状的基本不透明层，其中基本不透明层附接到基本透明聚合物层的第一表面并且包围基本透明聚合物层的中心部分，其中基本不透明层的二维形状表示模拟代码，并且其中模拟码对应于标识符；和(iii)对突变具有特异性的探针，其中探针在基本透明聚合物层的至少中心部分中与基本透明聚合物层的第一表面和第二表面中的至少一个偶联。在一些实施方案中，每种微载体还包含用于定向基本不透明聚合物层的模拟代码的定向指示器。在一些实施方案中，基本透明聚合物层的聚合物包括环氧基聚合物。在一些实施方案中，环氧基聚合物是SU-8。

[0040] 在另一个方面，本文提供了包含以下的试剂盒：(a)多种探针，其中多种探针中的每一种与微载体偶联，所述微载体具有对应于与其偶联的探针的独特标识符，所述多种探针包括：第一探针，其包含序列TTTTTTTTTTTTAATAGTTGGAGCT(SEQ ID NO:39)；第二探针，其包含序列TTTTTTTTTTTAGGCGTAGGCAAGA(SEQ ID NO:57)；第三探针，其包含序列TTTTTTTTTTTAAGGAGCTTGTGGC(SEQ ID NO:63)；第四探针，其包含序列TTTTTTTCCTGCTCAGTGATTTTA(SEQ ID NO:94)；第五探针，其包含序列TTTTTTTTTTTATCTCCTGCTTAG(SEQ ID NO:102)；第六探针，其包含序列TTTTTTTTTTTTAATGATGCACGTCA(SEQ ID NO:114)；第七探针，其包含序列TTTTTTAATTCTACAGAGAAATCTCGA(SEQ ID NO:82)；第八探针，其包含序列TTTTTTTTTTTTTAGTGCTGGCCT(SEQ ID NO:124)；第九探针，其包含序列TTTTTTTTTTTACAAAACATCTCCG(SEQ ID NO:131)；第十探针，其包含序列TTTTTTTTAATCAAGACATCTC(SEQ ID NO:141)；第十一探针，其包含序列TTTTTTTTCATGAGATGCATGATGA(SEQ ID NO:356)；第十二探针，其包含序列TTTTTTTTTTTACAGGAGGCTGCCGA(SEQ ID NO:464)；第十三探针，其包含序列TTTTTTTTTTTACAGGAGGGAGCCG(SEQ ID NO:478)；第十四探针，其包含序列TTTTTTTAGATGGCCATCTTG(SEQ ID NO:426)；第十五探针，其包含序列TTTTTTTTTTTGTGATGGCCGG(SEQ ID NO:432)；第十六探针，其包含序列TTTTTTTTGGACAACCCCCATCAC(SEQ ID NO:450)；第十七探针，其包含序列TTTTTTTGCCAGCGTGGACGGTA(SEQ ID NO:460)；第十八探针，其包含序列TTTTTTTTAAATGGGCGGGCCA(SEQ ID NO:160)；第十九探针，其包含序列TTTTTTTTTTTTTTGTAGGGAAGTACA(SEQ ID NO:371)；第二十探针，其包含序列TTTTTAAATCAGAATCAGAAGGTGG(SEQ ID NO:396)；第二十探针，其包含序列TTTTTAAATCAGAATCAGAAGGTGG(SEQ ID NO:396)；第二十一探针，其包含序列TTTTTTTTTTTACGTGATGGCTTACGT(SEQ ID NO:407)；第二十二探针，其包含序列TTTTTTTTTTAGTGTACCGCCGGAA(SEQ ID NO:168)；第二十三探针，其包含序列TTTTTTTTTTTGACTATGAAATATTGTAC(SEQ ID NO:172)；第二十四探针，其包含序列TTTTTTTTTTTTTTACCGCCGGAAGCACCA(SEQ ID NO:190)；第二十五探针，其包含序列TTTTTTTTTTTTGTGTACCGCCGGAAGC(SEQ ID NO:196)；第二十六探针，其包含序列

TTTTTTTTTTTGCTGGAGTCCCAAATAAAC(SEQ ID NO:206);第二十七探针,其包含序列TTTTTTTTTTTGACGCTCCACCGAAA(SEQ ID NO:214);第二十八探针,其包含序列TTTTTTTTTTTTGGAGTCCCAAATAAACCAGG(SEQ ID NO:230);第二十九探针,其包含序列TTTTTTTTTTGATGATTTTTGGATACCAG(SEQ ID NO:238);第三十探针,其包含序列TTTTTTTTTTGTGGGAAATAATGATGTAAA(SEQ ID NO:242);第三十一探针,其包含序列TTTTTTTTTCTGTGGGAAATAATGATGTA(SEQ ID NO:254);第三十二探针,其包含序列TTTTTTTTTTCTCTCAAGAGG(SEQ ID NO:490);第三十三探针,其包含序列TTTTTTTAAGGAGGATCCAAAGTG(SEQ ID NO:500);第三十四探针,其包含序列TTTTTTTAAACAGGAGGATCCAAA(SEQ ID NO:502);第三十五探针,其包含序列TTTTTTTTTTACCAGACACTAACAGCACAT(SEQ ID NO:266);第三十六探针,其包含序列TTTTTTTTTAGAAAGCAAATTAAAGAT(SEQ ID NO:272);(b)多种引物对,所述多种引物对包含:第一引物对,其包含序列GTACTGGTGGAGTATTTGATAGTG(SEQ ID NO:1)和CGTCAAGGCACTCTTGCCTAC(SEQ ID NO:2);第二引物对,其包含序列CAATTTCTACAAGAGATCCTCTCTCT(SEQ ID NO:5)和CTCCATTTTAGCACTTACCTGTGAC(SEQ ID NO:6);第三引物对,其包含序列ACCCTAGCCTTAGATAAAACTGAGC(SEQ ID NO:7)和TTTGTTGTCCAGCCACCATGA(SEQ ID NO:8);第四引物对,其包含序列ATAGCCTCAATTCTTACCATCCACAAAATG(SEQ ID NO:9)和CAGATATATTTCTTCATGAAGACCTCACAGTAA(SEQ ID NO:10);第五引物对,其包含序列CTTGTGGAGCCTCTTACACCC(SEQ ID NO:11)和TGCCGAACGCACCGGA(SEQ ID NO:12);第六引物对,其包含序列GCCAGTTAACGTCTTCCTTCTC(SEQ ID NO:13)和ATCGAGGATTTCCTTGTTGGCTT(SEQ ID NO:14);第七引物对,其包含序列CCTCCACCGTGCAGATCATC(SEQ ID NO:15)和TTCCCTGATTACCTTTGCGAT(SEQ ID NO:16);第八引物对,其包含序列CCACACTGACGTGCCTCT(SEQ ID NO:511)和GCACACGTAGGGGTTGTCCAAGA(SEQ ID NO:512);第九引物对,其包含序列CCACACTGACGTGCCTCT(SEQ ID NO:513)和GTACACGCTGGCCACGCCG(SEQ ID NO:514);第十引物对,其包含序列CCACACTGACGTGCCTCT(SEQ ID NO:515)和CAGGCGGCACACGTGAT(SEQ ID NO:516);第十一引物对,其包含序列CCACACTGACGTGCCTCT(SEQ ID NO:517)和AGGCGGCACACGTGCGGGTTAC(SEQ ID NO:518);第十二引物对,其包含序列GGAGGACCGTCGCTTGG(SEQ ID NO:17)和TCTTTCTCTTCCGCACCCAG(SEQ ID NO:18);第十三引物对,其包含序列GAGGGTCTGACGGGTAGAGTG(SEQ ID NO:380)和TGGCCGCCAGGTCTTGATGTA(SEQ ID NO:381);第十四引物对,其包含序列CTTGATGAGCAGCAGCGAAA(SEQ ID NO:397)和CCTTCAGTTCTCCCACCTTCTG(SEQ ID NO:398);第十五引物对,其包含序列ATGGCTGTGGTTTGTGATGGT(SEQ ID NO:414)和ACACCAGCCATCACGTAAGACA(SEQ ID NO:415);第十六引物对,其包含序列AGTTGGGGTTGTAGTCGGTCAT(SEQ ID NO:363)和TATGGAGCAAAACTACTGTAGAGCC(SEQ ID NO:357);第十七引物对,其包含序列AGTTGGGGTTGTAGTCGGTCAT(SEQ ID NO:363)和CCAGCTACATCACACACCTTGACT(SEQ ID NO:358);第十八引物对,其包含序列AGTTGGGGTTGTAGTCGGTCAT(SEQ ID NO:363)和TAATACCAAAAGTTACCAAAACTGCA(SEQ ID NO:359);第十九引物对,其包含序列GGAGTGCCATCGCTGTTTGAAATGAGCAGGCACT(SEQ ID NO:19);第二十引物对,其包含序列GGAGTGCCATCGCTGTTTGAAATGAGCAGGCACT(SEQ ID NO:19);第二十一引物对,其包含序列TACAGCCCTGGATATTCTTAGTAGCGC(SEQ ID NO:20);第二十二引物

对,其包含序列TACAGCCCTGGATATTCTTAGTAGCGC(SEQ ID NO:20);第二十三引物对,其包含序列GTGATCGCACAGTAGGACAGCGGCTGCGATC(SEQ ID NO:26)和TTTCTGGTGCTATGAGGAAATGACCAACCACCAGA(SEQ ID NO:23);第二十四引物对,其包含序列CTCTAGGAGATATCATTCCAAATTCGCCTTCTCCTAG(SEQ ID NO:27)和TTTCTGGTGCTATGAGGAAATGACCAACCACCAGA(SEQ ID NO:23);第二十五引物对,其包含序列CTCTAGGAGATATCATTCCAAATTCGCCTTCTCCTAG (SEQ ID NO:27)和AAGGAGTTAGCAGCATGTCAGC(SEQ ID NO:519);第二十六引物对,其包含序列CTCTAGGAGATATCATTCCAAATTCGCCTTCTCCTAG(SEQ ID NO:27)和AACTTCAGACTTTACACAACCTGC(SEQ ID NO:520);第二十七引物对,其包含序列CTCTAGGAGATATCATTCCAAATTCGCCTTCTCCTAG(SEQ ID NO:27)和ATTGATTCTGATGACACCGGA(SEQ ID NO:521);第二十八引物对,其包含序列GGACGAAAATCCAGACCCCAAAAGGTGTTTCGT(SEQ ID NO:32)和AGAAGACGTGACAGGAACTGGAGGACCCGTCTT(SEQ ID NO:30);第二十九引物对,其包含序列GACAGTATTTTGCAGTAATGGACTGGATATATCAGA(SEQ ID NO:29)和GAATTTCACAGGATTGATTGCTGGTGTTGTCTC(SEQ ID NO:28);和(c)多种阻断核酸,所述多种阻断核酸包含:第一阻断核酸,其包含序列TTGGAGCTGGTGGCGT(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:285);第二阻断核酸,其包含序列CTGAAATCACTGAGCAGG(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:291);第三阻断核酸,其包含序列CCACCATGATGTGCATCA(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:299);第四阻断核酸,其包含序列GAGATTTCACTGTAGC(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:301);第五阻断核酸,其包含序列CGCACCGGAGCCCAGCACTTA(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:310);第六阻断核酸,其包含序列CGGAGATGTTGCTTCTCT(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:312);第七阻断核酸,其包含序列TGCAGCTCATCACGCAGC(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:317);第八阻断核酸,其包含序列CCAGCAGTTTGGCCAGCCCT(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:322);第九阻断核酸,其包含序列GATGTACTCCCCT(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:383);第十阻断核酸,其包含序列CACCTTCTGCTTCTGGGTAAGA(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:403)。

[0041] 在另一个方面,本文提供了包含以下的试剂盒:(a)多种探针,其中多种探针中的每一种与微载体偶联,所述微载体具有对应于与其偶联的探针的独特标识符,所述多种探针包括:第一探针,其包含序列TTTTTTTTTTTTAATGATGGCGTAG(SEQ ID NO:43);第二探针,其包含序列TTTTTTTTTTTAGTAGTTGGAGCTG(SEQ ID NO:51);第三探针,其包含序列TTTTTTTTTTTAATTGTGGCGTAGG(SEQ ID NO:65);第四探针,其包含序列TTTTTTTTTAGCTCAGTGATTTTAG(SEQ ID NO:88);第五探针,其包含序列TTTTTTTTTTTTTTTCCTGCTTAGTG(SEQ ID NO:104);第六探针,其包含序列TTTTTTTTTTTTTGATGCACGTC(SEQ ID NO:112);第七探针,其包含序列TTTTTTAATTGAGAAATCTCGATGGAG(SEQ ID NO:78);第八探针,其包含序列TTTTTTAGATCAAAGTGCTGGCCTCCG(SEQ ID NO:120);第九探针,其包含序列TTTTTTTTTTTTTTAAACATCTCCGAAAGCC(SEQ ID NO:135);第十探针,其包含序列TTTTTTTTTTTCAAGACATCTCCGA(SEQ ID NO:145);第十一探针,其包含序列TTTTTTTTTTTGAGATGCATGATGA(SEQ ID NO:352);第十二探针,其包含序列TTTTTTTTTTTACAGGAGGCTGCC(SEQ ID NO:470);第十三探针,其包含序列TTTTTTTTTTTACCAGGAGGGAGCCG(SEQ ID NO:474);第十四探针,其包含序列TTTTTTTTTATGGCCATCTTGG(SEQ ID NO:422);第十五探针,其包含序列

TTTTTTTTTTTTTGATGGCCCGCGTG(SEQ ID NO:440)；第十六探针，其包含序列TTTTTTTTTTTTCCCATCACGTGT(SEQ ID NO:448)；第十七探针，其包含序列TTTTTTTTTTGACGGTAACCCCC(SEQ ID NO:456)；第十八探针，其包含序列TTTTTTTATTTTGGGCGGGCC(SEQ ID NO:152)；第十九探针，其包含序列TTTTTTTTTTTCTGTAGGGAAGTAC(SEQ ID NO:373)；第二十探针，其包含序列TTTTTAAATTTCTTACCCAGAATCA(SEQ ID NO:392)；第二十一探针，其包含序列TTTTTAAGCATACGTGATGGCT(SEQ ID NO:409)；第二十二探针，其包含序列TTTTTTTTTGGGAAAGGACCTAAAG(SEQ ID NO:166)；第二十三探针，其包含序列TTTTTTTTTTCCGCCGGAAGCACCAGGA(SEQ ID NO:180)；第二十四探针，其包含序列TTTTTTTTTTTTGTGTACCGCCGGAAGC(SEQ ID NO:186)；第二十五探针，其包含序列TTTTTTTTTTTCGAAAAAAACAGCCAA(SEQ ID NO:192)；第二十六探针，其包含序列TTTTTTTTTTACTGACGCTCCACCGAAA(SEQ ID NO:202)；第二十七探针，其包含序列TTTTTTTTTTGACGCTCCACCGAAA(SEQ ID NO:214)；第二十八探针，其包含序列TTTTTTTTTTTAGCGCCTTCCAGCTGGTTGGA(SEQ ID NO:222)；第二十九探针，其包含序列TTTTTTTTTTGATTTTTGGATACCA(SEQ ID NO:240)；第三十探针，其包含序列TTTTTTTTTTCCACTGTGCGACGAGCTGT(SEQ ID NO:250)；第三十一探针，其包含序列TTTTTTTTGGATCCAAAGTGGGAATT(SEQ ID NO:258)；第三十二探针，其包含序列TTTTTTTTTCAAGAGGATCCAAA(SEQ ID NO:488)；第三十三探针，其包含序列TTTTTTTACAAGAGTTAAAAAGGAGGA(SEQ ID NO:494)；第三十四探针，其包含序列TTTTTATTAAGTGCACAAACAGGAGG(SEQ ID NO:504)；第三十五探针，其包含序列TTTTTTTTTACTAACAGCACATCTGGAGA(SEQ ID NO:270)；第三十六探针，其包含序列TTTTTTTTTAGATCAGTTTCCTAATTC(SEQ ID NO:278)；(b)多种引物对，所述多种引物对包含：第一引物对，其包含序列GTACTGGTGGAGTATTTGATAGTG(SEQ ID NO:1)和CGTCAAGGCACTCTTGCCTAC(SEQ ID NO:2)；第二引物对，其包含序列CAATTTCTACAAGAGATCCTCTCTCT(SEQ ID NO:5)和CTCCATTTTAGCACTTACCTGTGAC(SEQ ID NO:6)；第三引物对，其包含序列ACCCTAGCCTTAGATAAAACTGAGC(SEQ ID NO:7)和TTTGTTGTCCAGCCACCATGA(SEQ ID NO:8)；第四引物对，其包含序列ATAGCCTCAATTCTTACCATCCACAAAATG(SEQ ID NO:9)和CAGATATATTTCTTCATGAAGACCTCACAGTAA(SEQ ID NO:10)；第五引物对，其包含序列CTTGTGGAGCCTCTTACACCC(SEQ ID NO:11)和TGCCGAACGCACCGGA(SEQ ID NO:12)；第六引物对，其包含序列GCCAGTTAACGTCTTCCTTCTC(SEQ ID NO:13)和ATCGAGGATTTCCTTGTTGGCTT(SEQ ID NO:14)；第七引物对，其包含序列CCTCCACCGTGCAGATCATC(SEQ ID NO:15)和TTCCCTGATTACCTTTGCGAT(SEQ ID NO:16)；第八引物对，其包含序列CCACACTGACGTGCCTCT(SEQ ID NO:511)和GCACACGTAGGGGTTGTCCAAGA(SEQ ID NO:512)；第九引物对，其包含序列CCACACTGACGTGCCTCT(SEQ ID NO:513)和GTACACGCTGGCCACGCCG(SEQ ID NO:514)；第十引物对，其包含序列CCACACTGACGTGCCTCT(SEQ ID NO:515)和CAGGCGGCACACGTGAT(SEQ ID NO:516)；第十一引物对，其包含序列CCACACTGACGTGCCTCT(SEQ ID NO:517)和AGGCGGCACACGTGCGGGTTAC(SEQ ID NO:518)；第十二引物对，其包含序列GGAGGACCGTCGCTTGG(SEQ ID NO:17)和TCTTTCTCTTCCGCACCCAG(SEQ ID NO:18)；第十三引物对，其包含序列GAGGGTCTGACGGGTAGAGTG(SEQ ID NO:380)和

TGGCCGCCAGGTCTTGATGTA(SEQ ID NO:381);第十四引物对,其包含序列CTTGATGAGCAGCAGCGAAA(SEQ ID NO:397)和CCTTCAGTTCTCCCACCTTCTG(SEQ ID NO:398);第十五引物对,其包含序列ATGGCTGTGGTTTGTGATGGT(SEQ ID NO:414)和ACACCAGCCATCACGTAAGACA(SEQ ID NO:415);第十六引物对,其包含序列AGTTGGGGTTGTAGTCGGTCAT(SEQ ID NO:363)和TATGGAGCAAAACTACTGTAGAGCC(SEQ ID NO:357);第十七引物对,其包含序列AGTTGGGGTTGTAGTCGGTCAT(SEQ ID NO:363)和CCAGCTACATCACACACCTTGACT(SEQ ID NO:358);第十八引物对,其包含序列AGTTGGGGTTGTAGTCGGTCAT(SEQ ID NO:363)和TAATACCAAAAGTTACCAAAACTGCA(SEQ ID NO:359);第十九引物对,其包含序列GGAGTGCCATCGCTGTTTGAAATGAGCAGGCACT(SEQ ID NO:19);第二十引物对,其包含序列GGAGTGCCATCGCTGTTTGAAATGAGCAGGCACT(SEQ ID NO:19);第二十一引物对,其包含序列TACAGCCCTGGATATTCTTAGTAGCGC(SEQ ID NO:20);第二十二引物对,其包含序列TACAGCCCTGGATATTCTTAGTAGCGC(SEQ ID NO:20);第二十三引物对,其包含序列GTGATCGCACAGTAGGACAGCGGCTGCGATC(SEQ ID NO:26)和TTTCTGGTGCTATGAGGAAATGACCAACCACCAGA(SEQ ID NO:23);第二十四引物对,其包含序列CTCTAGGAGATATCATTCCAAATTCGCCTTCTCCTAG(SEQ ID NO:27)和TTTCTGGTGCTATGAGGAAATGACCAACCACCAGA(SEQ ID NO:23);第二十五引物对,其包含序列CTCTAGGAGATATCATTCCAAATTCGCCTTCTCCTAG(SEQ ID NO:27)和AAGGAGTTAGCAGCATGTCAGC(SEQ ID NO:519);第二十六引物对,其包含序列CTCTAGGAGATATCATTCCAAATTCGCCTTCTCCTAG(SEQ ID NO:27)和AACTTCAGACTTTACACAACCTGC(SEQ ID NO:520);第二十七引物对,其包含序列CTCTAGGAGATATCATTCCAAATTCGCCTTCTCCTAG(SEQ ID NO:27)和ATTGATTCTGATGACACCGGA(SEQ ID NO:521);第二十八引物对,其包含序列GGACGAAAATCCAGACCCCAAAAGGTGTTTCGT(SEQ ID NO:32)和AGAAGACGTGACAGGAACTGGAGGACCCGTCTT(SEQ ID NO:30);第二十九引物对,其包含序列GACAGTATTTTGCAGTAATGGACTGGATATATCAGA(SEQ ID NO:29)和GAATTTCACAGGATTGATTGCTGGTGTTGTCTC(SEQ ID NO:28);和(c)多种阻断核酸,所述多种阻断核酸包含:第一阻断核酸,其包含序列TTGGAGCTGGTGGCGTA(invdT)n,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:282);第二阻断核酸,其包含序列TCTCTGAAATCACTGAGCAGG(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:294);第三阻断核酸,其包含序列CCACCATGATGTGCAT(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:297);第四阻断核酸,其包含序列GAGATTTCACTGTAGC(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:305);第五阻断核酸,其包含序列CGCACCGGAGCCCAGCAC(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:309);第六阻断核酸,其包含序列GTTGCTTCTCTTAATTCC(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:313);第七阻断核酸,其包含序列CTCATCACGCAGC(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:320);第八阻断核酸,其包含序列CCAGCAGTTTGGCCAGCCCT(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:325);第九阻断核酸,其包含序列GATGTACTCCCCTACA(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:386);第十阻断核酸,其包含序列CACCTTCTGCTTCTGGG(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:401)。

[0042] 在另一个方面,本文提供了包括以下的试剂盒:(a)多种探针,其中多种探针中的每一种与微载体偶联,所述微载体具有对应于与其偶联的探针的独特标识符,所述多种探针包括:第一探针,其包含序列TTTTTTTTTTTATGGAGCTGATGGC(SEQ ID NO:45);第二探针,其包含序列TTTTTTTTTTTATGGAGCTGTTGGC(SEQ ID NO:53);第三探针,其包含序列TTTTTTTTTTTAAGGAGCTTGTGGC(SEQ ID NO:63);第四探针,其包含序列

TTTTTTTTTTTCTCAGTGATTTTAGA(SEQ ID NO:96)；第五探针，其包含序列TTTTTTTTTTTTTCTCCTGCTTAGT(SEQ ID NO:100)；第六探针，其包含序列TTTTTTTTTTTTAATGATGCACGTC(SEQ ID NO:116)；第七探针，其包含序列TTTTTTAATTTCTAGCTACAGAGAAAT(SEQ ID NO:86)；第八探针，其包含序列TTTTTTTTTTCAAAGTGCTGGCCTC(SEQ ID NO:118)；第九探针，其包含序列TTTTTTTTTAATCAAAACATCTCCG(SEQ ID NO:127)；第十探针，其包含序列TTTTTTTTAATCAAGACATCTCCGA(SEQ ID NO:137)；第十一探针，其包含序列TTTTTTTTTGAGATGCATGATGAG(SEQ ID NO:353)；第十二探针，其包含序列TTTTTTTTTTACCAGGAGGCTGCC(SEQ ID NO:468)；第十三探针，其包含序列TTTTTTTTTTACCAGGAGGGAGCC(SEQ ID NO:472)；第十四探针，其包含序列TTTTTTTTTAGGCCATCTTGGA(SEQ ID NO:424)；第十五探针，其包含序列TTTTTTTTTTGTGATGGCCGGCGT(SEQ ID NO:436)；第十六探针，其包含序列TTTTTTTTTTAACCCCCATCACGT(SEQ ID NO:442)；第十七探针，其包含序列TTTTTTTTTTCGTGGACGGTAACC(SEQ ID NO:454)；第十八探针，其包含序列TTTTTTAAAAAAGCGGGCCAAACT(SEQ ID NO:156)；第十九探针，其包含序列TTTTTTTACGTCTGTAGGGAAGTA(SEQ ID NO:379)；第二十探针，其包含序列TTTTAAATTTACCCAGAATCAGAA(SEQ ID NO:388)；第二十一探针，其包含序列TTTTTTTTATACGTGATGTCTTAC(SEQ ID NO:405)；第二十二探针，其包含序列TTTTTTTTTCCTAAAGTGTACCGC(SEQ ID NO:164)；第二十三探针，其包含序列TTTTTTTTTTTTATTGTACTTGTACCGCC(SEQ ID NO:176)；第二十四探针，其包含序列TTTTTTTTTTTTTTCAACCAAGTGTACCG(SEQ ID NO:188)；第二十五探针，其包含序列TTTTTTTTTTTTTTACAGCCAAGTGTACCG(SEQ ID NO:200)；第二十六探针，其包含序列TTTTTTTTTTCACCGAAAGCTGGAGTCCC(SEQ ID NO:210)；第二十七探针，其包含序列TTTTTTTTTTTCCGAAAGATGATTTT(SEQ ID NO:212)；第二十八探针，其包含序列TTTTTTTTTTTCTGGTTGGAGCTGGAGTCCC(SEQ ID NO:224)；第二十九探针，其包含序列TTTTTTTTTTGGTTGGAGATGATTTTT(SEQ ID NO:236)；第三十探针，其包含序列TTTTTTTTTTGATGTAAAGATCCACTGTG(SEQ ID NO:248)；第三十一探针，其包含序列TTTTTTTTATGATGTAAAGGAGGATCC(SEQ ID NO:260)；第三十二探针，其包含序列TTTTTTTTGTATCTCTCAAGAGGATCCAA(SEQ ID NO:484)；第三十三探针，其包含序列TTATTATTAAGAGTTAAAAAGGAGGATC(SEQ ID NO:811)；第三十四探针，其包含序列TATTATTATGTGCACAAACAGGAGGATC(SEQ ID NO:506)；第三十五探针，其包含序列TTTTTTTTTAGGGCCCAGACACTAACAGC(SEQ ID NO:268)；第三十六探针，其包含序列TTTTTTTTTAAATTAAAGATCAGTTTC(SEQ ID NO:276)；(b)多种引物对，所述多种引物对包括：第一引物对，其包含序列GTACTGGTGGAGTATTTGATAGTG(SEQ ID NO:1)和CGTCAAGGCACTCTTGCCTAC(SEQ ID NO:2)；第二引物对，其包含序列CAATTTCTACAAGAGATCCTCTCTCT(SEQ ID NO:5)和CTCCATTTTAGCACTTACCTGTGAC(SEQ ID NO:6)；第三引物对，其包含序列ACCCTAGCCTTAGATAAAACTGAGC(SEQ ID NO:7)和TTTGTTGTCCAGCCACCATGA(SEQ ID NO:8)；第四引物对，其包含序列ATAGCCTCAATTCTTACCATCCACAAAATG(SEQ ID NO:9)和CAGATATATTTCTTCATGAAGACCTCACAGT

AA(SEQ ID NO:10);第五引物对,其包含序列CTTGTGGAGCCTCTTACACCC(SEQ ID NO:11)和TGCCGAACGCACCGGA(SEQ ID NO:12);第六引物对,其包含序列GCCAGTTAACGTCTTCCTTCTC(SEQ ID NO:13)和ATCGAGGATTTCCTTGTTGGCTT(SEQ ID NO:14);第七引物对,其包含序列CCTCCACCGTGCAGATCATC(SEQ ID NO:15)和TTCCCTGATTACCTTTGCGAT(SEQ ID NO:1 6);第八引物对,其包含序列CCACACTGACGTGCCTCT(SEQ ID NO:511)和GCACACGTAGGGGTTGTCCAAGA(SEQ ID NO:512);第九引物对,其包含序列CCACACTGACGTGCCTCT(SEQ ID NO:513)和GTACACGCTGGCCACGCCG(SEQ ID NO:514);第十引物对,其包含序列CCACACTGACGTGCCTCT(SEQ ID NO:515)和CAGGCGGCACACGTGAT(SEQ ID NO:516);第十一引物对,其包含序列CCACACTGACGTGCCTCT(SEQ ID NO:517)和AGGCGGCACACGTGCGGGTTAC(SEQ ID NO:518);第十二引物对,其包含序列GGAGGACCGTCGCTTGG(SEQ ID NO:17)和TCTTTCTCTTCCGCACCCAG(SEQ ID NO:18);第十三引物对,其包含序列GAGGGTCTGACGGGTAGAGTG(SEQ ID NO:380)和TGGCCGCCAGGTCTTGATGTA(SEQ ID NO:381);第十四引物对,其包含序列CTTGATGAGCAGCAGCGAAA(SEQ ID NO:397)和CCTTCAGTTCTCCCACCTTCTG(SEQ ID NO:398);第十五引物对,其包含序列ATGGCTGTGGTTTGTGATGGT(SEQ ID NO:414)和ACACCAGCCATCACGTAAGACA(SEQ ID NO:415);第十六引物对,其包含序列AGTTGGGGTTGTAGTCGGTCAT(SEQ ID NO:363)和TATGGAGCAAAACTACTGTAGAGCC(SEQ ID NO:357);第十七引物对,其包含序列AGTTGGGGTTGTAGTCGGTCAT(SEQ ID NO:363)和CCAGCTACATCACACACCTTGACT(SEQ ID NO:358);第十八引物对,其包含序列AGTTGGGGTTGTAGTCGGTCAT(SEQ ID NO:363)和TAATACCAAAAGTTACCAAAACTGCA(SEQ ID NO:359);第十九引物对,其包含序列GGAGTGCCATCGCTGTTTGAAATGAGCAGGCACT(SEQ ID NO:19);第二十引物对,其包含序列GGAGTGCCATCGCTGTTTGAAATGAGCAGGCACT(SEQ ID NO:19);第二十一引物对,其包含序列TACAGCCCTGGATATTCTTAGTAGCGC(SEQ ID NO:20);第二十二引物对,其包含序列TACAGCCCTGGATATTCTTAGTAGCGC(SEQ ID NO:20);第二十三引物对,其包含序列GTGATCGCACAGTAGGACAGCGGCTGCGATC(SEQ ID NO:26)和TTTCTGGTGCTATGAGGAAATGACCAACCACCAGA(SEQ ID NO:23);第二十四引物对,其包含序列CTCTAGGAGATATCATTCCAAATTCGCCTTCTCCTAG(SEQ ID NO:27)和TTTCTGGTGCTATGAGGAAATGACCAACCACCAGA(SEQ ID NO:23);第二十五引物对,其包含序列CTCTAGGAGATATCATTCCAAATTCGCCTTCTCCTAG(SEQ ID NO:27)和AAGGAGTTAGCAGCATGTCAGC(SEQ ID NO:519);第二十六引物对,其包含序列CTCTAGGAGATATCATTCCAAATTCGCCTTCTCCTAG(SEQ ID NO:27)和AACTTCAGACTTTACACAACCTGC(SEQ ID NO:520);第二十七引物对,其包含序列CTCTAGGAGATATCATTCCAAATTCGCCTTCTCCTAG(SEQ ID NO:27)和ATTGATTCTGATGACACCGGA(SEQ ID NO:521);第二十八引物对,其包含序列GGACGAAAATCCAGACCCCAAAAGGTGTTTCGT(SEQ ID NO:32)和AGAAGACGTGACAGGAACTGGAGGACCCGTCTT(SEQ ID NO:30);第二十九引物对,其包含序列GACAGTATTTTGCAGTAATGGACTGGATATATCAGA(SEQ ID NO:29)和GAATTTCACAGGATTGATTGCTGGTGTTGTCTC(SEQ ID NO:28);和(c)多种阻断核酸,所述多种阻断核酸包括:第一阻断核酸,其包含序列TACGCCACCAGCT(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:281);第二阻断核酸,其包含序列TCTCTGAAATCACTGAGCAGG(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:293);第三阻断核酸,其包含序列CACCATGATGTGCAT(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:296);第四阻断核酸,其包含序列GAGATTTCACTGTAGC(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:303);第五阻断核酸,其包含序列GAGCCCAGCAC(invdT)$_n$,其中n

为1、2或3(SEQ ID NO:308);第六阻断核酸,其包含序列CGGAGATGTTGCTTCTCTTAATTCC(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:311);第七阻断核酸,其包含序列CATCACGCAGCTCATG(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:316);第八阻断核酸,其包含序列CCAGCAGTTTGGCCAGCCCT(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:321);第九阻断核酸,其包含序列TGTACTCCCCTACA(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:382);第十阻断核酸,其包含序列TCTGCTTCTGGGTAAG(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:399)。

[0043] 应当理解,本文所述的各种实施方案的一种、一些或全部性质可加以组合以形成本发明的其他实施方案。本发明的这些和其他方面对于本领域的技术人员将变得显而易见。

附图说明

[0044] 图1A和1B示出了示例性微载体的两个视图。

[0045] 图1C和1D示出了用于使用示例性微载体进行DNA检测的示例性测定。

[0046] 图2A示出了微载体的三个实例,每个都具有独特的模拟代码。

[0047] 图2B根据一些实施方案示出了具有独特模拟代码的微载体的实例。

[0048] 图2C根据一些实施方案示出了具有独特模拟代码的微载体的实例。

[0049] 图3根据一些实施方案示出了说明用于检测DNA突变和RNA变体存在的示例性方法的流程图。

[0050] 图4和5根据一些实施方案说明了用于优先扩增和检测突变体(图5)而不是对应于感兴趣的DNA突变的野生型(图4)基因座的示例性方案。水平实线指示扩增的DNA序列,水平虚线指示引物/探针/阻断核酸(NA)序列,垂直线指示沃森-克里克碱基配对。

[0051] 图6示出了说明用于从血液样品中分离RNA和细胞游离DNA(cfDNA)的示例性方案的流程图。

[0052] 图7A-7C示出了DNA突变的多重检测的结果。数值反映了对每种指示的DNA突变具有特异性的扩增的DNA(纵列)和每种对指示的DNA突变具有特异性的偶联微载体的探针(行)的每个成对组合获得的荧光信号(以任意单位计,AU)。

[0053] 图8A和8B示出了RNA变体的多重检测的结果。数值反映了对每种指示的RNA变体具有特异性的扩增的RNA样品(纵列)和每种对指示的RNA变体具有特异性的偶联微载体的探针(行)的每个成对组合获得的荧光信号(以任意单位计,AU)。

[0054] 图9A和9B示出了来自患者样品的RNA和DNA突变的多重检测的结果。在图9A中,与本文所述的微载体方法(LCP)相比,从福尔马林固定的、石蜡包埋(FFPE)样品中获得RNA,并且通过下一代测序(NGS)检测所选择的突变。在图9B中,与本文所述的微载体方法(LCP)相比,从胸腔积液或从血清样品中的cfDNA中获得DNA,并通过ddPCR或下一代测序(NGS)检测所选择的突变。

[0055] 图10A-10C示出了本文所述的微载体方法(LCP)与其他突变检测技术在检测从I期或II期肺癌患者获得的组织样品或液体活检(血液样品)中的DNA或RNA突变方面的比较。示出的是使用来自液体活检的DNA或RNA(图10A)、来自组织样品的DNA(图10B)或来自组织样品的RNA(图10C)获得的结果。这些结果证明了LCP方法在检测来自不同样品的DNA或RNA中的各种癌症相关突变方面的多功能性。

具体实施方式

[0056] 在一个方面，本文提供了用于检测KRAS、NRAS、PIK3CA、BRAF、EGFR、AKT1、MEK1和HER2基因中的DNA突变和/或ALK、ROS、RET、NTRK1和cMET基因中的RNA突变的存在的方法。

[0057] 在一些实施方案中，方法包括从样品中分离DNA；使用对KRAS、NRAS、PIK3CA、BRAF、EGFR、AKT1、MEK1和HER2基因中的每一个中的一种或多种DNA突变的基因座具有特异性的引物对，通过聚合酶链反应(PCR)扩增分离的DNA；将扩增的DNA与至少七种探针杂交，所述至少七种探针包括对KRAS、NRAS、PIK3CA、BRAF、EGFR、AKT1、MEK1和HER2基因中的每一个中的DNA突变具有特异性的一种或多种探针，其中所述至少七种探针中的每一种都与微载体偶联，并且其中微载体中的每一种都包含对应于与其偶联的探针的标识符；检测扩增的DNA与所述至少七种探针的杂交存在或不存在，其中扩增的DNA和所述探针之一之间的杂交表明对应于所述探针的DNA突变的存在；检测微载体的标识符的存在；和将检测到的微载体的标识符与检测到的扩增的DNA与微载体的对应探针的杂交存在或不存在相关联。

[0058] 在一些实施方案中，方法包括从样品中分离RNA；通过逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)由分离的RNA扩增DNA，其中扩增DNA包括：使用对ALK、ROS、RET、NTRK1和cMET基因中的每一个具有特异性的第一引物、分离的RNA和逆转录酶，由分离的RNA生成对ALK、ROS、RET、NTRK1和cMET基因中的每一个具有特异性的cDNA，以及使用cDNA、DNA聚合酶、第一引物、和对ALK、ROS、RET、NTRK1和cMET基因中的每一个具有特异性的第二引物，通过聚合酶链反应(PCR)来扩增对ALK、ROS、RET、NTRK1和cMET基因中的每一个具有特异性的DNA，所述第二引物结合与对应的第一引物相反的cDNA链，并且促进与对应的第一引物所促进的方向相反的链延伸；将扩增的DNA与至少五种探针杂交，所述至少五种探针包括对ALK、ROS、RET、NTRK1和cMET基因中的每一个中的突变具有特异性的一种或多种探针，其中所述至少五种探针中的每一种与微载体偶联，并且其中微载体中的每一种都包含对应于与其偶联的探针的标识符；检测扩增的DNA与所述至少五种探针的杂交存在或不存在，其中扩增的DNA与所述探针之一的杂交表明对应于所述探针的突变的存在；检测微载体的标识符的存在；以及将检测到的微载体的标识符与检测到的扩增的DNA与微载体的对应探针的杂交存在或不存在相关联。

[0059] 在一些实施方案中，方法包括从样品中分离DNA和RNA；使用对KRAS、NRAS、PIK3CA、BRAF、EGFR、AKT1、MEK1和HER2基因中的一种或多种DNA突变的基因座具有特异性的引物对，通过聚合酶链反应(PCR)扩增分离的DNA；通过逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)由分离的RNA扩增DNA，其中由分离的RNA扩增DNA包括：使用对ALK、ROS、RET、NTRK1和cMET基因中的每一个具有特异性的第一引物、分离的RNA和逆转录酶，由分离的RNA生成对ALK、ROS、RET、NTRK1和cMET基因中的每一个具有特异性的cDNA，和使用cDNA、DNA聚合酶、第一引物、和对ALK、ROS、RET、NTRK1和cMET基因中的每一个具有特异性的第二引物，通过聚合酶链反应(PCR)来扩增对ALK、ROS、RET、NTRK1和cMET基因中的每一个具有特异性的DNA，所述第二引物结合与对应的第一引物相反的cDNA链，并且促进与对应的第一引物所促进的方向相反的链延伸；将由分离的DNA通过PCR扩增的DNA与至少七种探针杂交，所述至少七种探针包括对KRAS、NRAS、PIK3CA、BRAF、EGFR、AKT1、MEK1和HER2基因中的每一个中的突变具有特异性的一种或多种探针，其中所述至少七种探针中的每一种与微载体偶联，并且其中微载体中的每一种都包含对应于与其偶联的探针的标识符；检测由分离的DNA通过PCR扩增的DNA与所述至少

七种探针的杂交存在或不存在,其中扩增的DNA与所述探针之一的杂交表明对应于所述探针的突变的存在;将由分离的RNA通过RT-PCR扩增的DNA与至少五种探针杂交,所述至少五种探针包括对ALK、ROS、RET、NTRK1和cMET基因中的每一个中的突变具有特异性的一种或多种探针,其中所述至少五种探针中的每一种与微载体偶联,并且其中微载体中的每一种都包含对应于与其偶联的探针的标识符;检测由分离的RNA通过RT-PCR扩增的DNA与所述至少五种探针的杂交存在或不存在,其中扩增的DNA与所述探针之一的杂交表明对应于所述探针的突变的存在;检测微载体的标识符的存在;以及将检测到的微载体的标识符与扩增的DNA与微载体的对应探针的杂交存在或不存在相关联。

[0060] 在另一个方面,本文提供了用于执行本文描述的任何方法的试剂盒。在一些实施方案中,例如,如本文所述,试剂盒包括微载体、探针序列、引物和/或阻断核酸。

[0061] I.一般技术

[0062] 除非另有说明,否则本文所述的技术的实践将采用聚合物技术中的常规技术、微型品制造、微机电系统(MEMS)制造、光刻、微流体、有机化学、生物化学、寡核苷酸合成和修饰、生物缀合化学、核酸杂交、分子生物学、微生物学、遗传学、重组DNA和本领域技术范围内的相关领域。所述技术在本文引用的参考文献中有所描述,并在文献中充分解释。

[0063] 对于分子生物学和重组DNA技术,参见例如(Maniatis,T.等人(1982),Molecular Cloning:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor;Ausubel,F.M.(1987),Current Protocols in Molecular Biology,Greene Pub.Associates and Wiley-Interscience;Ausubel,F.M.(1989),Short Protocols in Molecular Biology:A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology,Greene Pub.Associates and Wiley-Interscience;Sambrook,J.等人(1989),Molecular Cloning:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor;Innis,M.A.(1990),PCR Protocols:A Guide to Methods and Applications,Academic Press;Ausubel,F.M.(1992),Short Protocols in Molecular Biology:A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology,Greene Pub.Associates;Ausubel,F.M.(1995),Short Protocols in Molecular Biology:ACompendium of Methods from Current Protocols inMolecular Biology,Greene Pub.Associates;Innis,M.A.等人(1995),PCRStrategies,Academic Press;Ausubel,F.M.(1999),Short Protocols in Molecular Biology:A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology,Wiley,and annual updates。

[0064] 对于DNA合成技术和核酸化学,参见例如Gait,M.J.(1990),Oligonucleotide Synthesis:A Practical Approach,IRL Press;Eckstein,F.(1991),Oligonucleotides and Analogues:A Practical Approach,IRL Press;Adams,R.L.等人(1992),The Biochemistry of the Nucleic Acids,Chapman&Hall;Shabarova,Z.等人(1994),Advanced Organic Chemistry of Nucleic Acids,Weinheim;Blackburn,G.M.等人(1996),Nucleic Acidds in Chemistry and Biology,Oxford University Press;Hermanson,G.T.(1996),Bioconjugate Techniques,Academic Press)。

[0065] 对于微细加工,参见例如(Campbell,S.A.(1996),The Science and Engineering of Microelectronic Fabrication,Oxford University Press;Zaut,P.V.(1996),Microarray Fabrication:a Practical Guide to Semiconductor Processing,

Semiconductor Services;Madou,M.J.(1997),Fundamentals of Microfabrication,CRC Press;Rai-Choudhury,P.(1997).Handbook of Microlithography,Micromachining,& Microfabrication:Microlithography)。

[0066] II.定义

[0067] 在详细描述本发明之前,应当理解本发明不限于特定的组合物或生物系统,本发明当然可以变化。还应当理解,本文所用的术语仅出于描述特定实施方案的目的,并且并非旨在进行限制。

[0068] 如本文所用,术语“微载体”可指代捕获剂或探针可偶联到其上的物理底物。本公开的微载体可采用任何合适的几何形式或形状。在一些实施方案中,微载体可以是盘形的。通常,微载体的形式或形状将包括至少一个大约10^{-4}m至10^{-7}m的尺寸(因此前缀“微”)。

[0069] 如本文所用,术语“聚合物”可指代包含重复单体的任何大分子结构。聚合物可以是天然的(例如,天然存在的)或合成的(例如,人造的,诸如由非天然单体组成的和/或以非天然存在的构型或组合聚合的聚合物)。

[0070] 如本文所用,术语“基本透明的”和“基本不透明的”可指代光(例如,特定波长的光,诸如红外线、可见光、UV等)穿过底物(诸如聚合物层)的能力。基本透明聚合物可指代透明的、半透明和/或透光的聚合物,而基本不透明聚合物可指代反射和/或吸收光的聚合物。应当理解,材料是基本透明的还是基本不透明的可取决于照射材料的光的波长和/或强度,以及检测穿过材料的光(或其降低或不存在)的方式。在一些实施方案中,与周围材料或图像场相比,基本不透明的材料导致透射光的可感知的减少,例如,如通过光学显微术(例如,明场显微术、暗场显微术、相差显微术、微分干涉相差(DIC)显微术、Nomarski干涉相差(NIC)显微术、Nomarski显微术、霍夫曼调制相差(HMC)显微术或荧光显微术)成像。在一些实施方案中,基本透明的材料允许可感知量的透射光穿过所述材料,例如,如通过光学显微术(例如,明场显微术、暗场显微术、相差显微术、微分干涉相差(DIC)显微术、Nomarski干涉相差(NIC)显微术、Nomarski显微术、霍夫曼调制相差(HMC)显微术或荧光显微术)成像。

[0071] 如本文所用,术语“模拟代码”可指代其中编码的信息以非量化和/或非离散方式表示的任何代码,例如,与数字代码相反。例如,对于有限的值集(例如,0/1型的值),数字代码在离散位置采样,而模拟代码可在更大范围的位置采样(或作为连续的整体)且/或可含有更广泛的值集(例如,形状)。在一些实施方案中,模拟代码可使用一种或多种模拟形状识别技术来读取或解码。

[0072] 如本文所用,“样品”是指含有待检测材料(诸如分子)的组合物。在一个实施方案中,样品是“生物样品”(即,从活体来源(例如,人、动物、植物、细菌、真菌、原生生物、病毒)获得的任何材料)。生物样品可以呈任何形式,包括固体材料(例如,组织、细胞团、活检、FFPE样品等)和生物流体(例如,尿液、血液或血浆、粪便、唾液、淋巴液、泪液、汗液、前列腺液、精液、精子、胆汁、粘液、胸腔积液、羊水和漱口水(含有口腔细胞))。固体材料通常与流体混合。样品还可以指代环境样品,诸如水、空气、土壤或任何其他环境来源。

[0073] 如本说明书中和所附权利要求中所用,单数形式“一个/种(a/an)”和“所述(the)”包括复数提及物,除非内容另外清楚地指示。因此,例如,提及“分子”任选地包括两个或更多个此类分子的组合等。

[0074] 如本文所用,术语“约”是指本技术领域的技术人员容易知道的相应值的通常误差

范围。本文中对“约”一个值或参数的提及包括(以及描述)针对所述值或参数本身的实施方案。

[0075] 应当理解,本文所述的本发明的方面和实施方案包括“包含”方面和实施方案、由方面和实施方案“组成”和“基本上由方面和实施方案组成”。

[0076] III.检测DNA和/或RNA突变的方法

[0077] 本公开的某些方面涉及用于通过使用微载体(例如,本文所述的编码的微载体或描述于国际公开号WO2016198954中的任何微载体)检测DNA突变(例如,KRAS、NRAS、PIK3CA、BRAF、EGFR、AKT1、MEK1和/或HER2基因中的一种或多种突变)和/或RNA突变(例如,ALK、ROS、RET、NTRK1和/或cMET基因中的一种或多种突变)的存在的方法。本公开的方法采用编码的微载体,其具有本文所述(例如,第IV、V和VI部分中)的微载体特征和方面中的一些或全部。有利地,与传统的多重测定相比,这些编码的微载体允许使用大量的潜在独特微载体在改进的多重测定中检测DNA和/或RNA突变并减少识别错误。描述用于检测突变的示例性方法的流程图在图3和6中提供,示例性PCR技术在图4和5中说明本文所用的检测方法可以在本领域已知的任何合适的测定容器(例如微板、培养皿或任何数量的其他众所周知的测定容器)中执行。

[0078] 在一些实施方案中,本公开的方法包括从样品中分离DNA和/或RNA。本领域已知的标准分子技术允许从多种不同类型的样品中分离DNA或RNA。适用于各种样品的DNA和RNA分离试剂盒是可商购获得的。

[0079] 在一些实施方案中,方法包括从同一样品(例如,全血或血浆样品)中分离DNA和RNA。用于分离DNA(例如,循环游离DNA或细胞游离DNA,cfDNA)和RNA(例如,来自血小板、白细胞、外泌体、循环肿瘤细胞和游离RNA中的一种或多种)的示例性方案在图6中示出(还可参见Best,M.G.等人(2015)Cancer Cell 28:666-676)。例如,在一些实施方案中,方法包括通过离心全血或血浆样品(例如,通过以200xg将全血离心20分钟并去除富含总RNA的血浆(TRRP))来分离TRRP、对TRRP进行一个或多个离心步骤以生成RNA级分和细胞游离DNA(cfDNA)级分(例如,通过将TRRP以100xg离心20分钟,去除上层级分,然后再次以360xg离心20分钟)、从cfDNA级分中分离DNA、以及从RNA级分中分离RNA。示例性方案还在实施例2中提供。

[0080] 在一些实施方案中,本公开的方法使用来自样品的、浓度为约0.3ng/μL至约1ng/μL的DNA。在一些实施方案中,本公开的方法使用来自样品的、浓度为至少约0.3ng/μL的DNA。

[0081] 在一些实施方案中,本公开的方法使用来自样品的、浓度为约2ng/μL至约30ng/μL的RNA。在一些实施方案中,本公开的方法使用来自样品的、浓度为至少约2ng/μL的RNA。

[0082] 在一些实施方案中,本公开的方法用于检测、监测、筛查或监测例如被收集样品的患者的肺癌的治疗响应。如本文所用,肺癌可以指代各种类型的肺癌,包括但不限于非小细胞肺癌(例如,包括亚型,诸如腺癌、鳞状上皮细胞癌和大细胞癌)、小细胞或燕麦细胞癌、以及肺类癌肿瘤(例如,支气管类癌)。大量研究已经暗示,许多肺癌中的关键基因中发生了特定突变。例如,KRAS、PIK3CA、BRAF或EGFR中的突变被认为存在于至少40%的非小细胞肺癌中(Rosell,R.等人(2009)$_n$.Engl.J.Med.361:958-967)。突变筛查被认为例如通过鉴定更有可能对靶向治疗(诸如酪氨酸激酶抑制剂)有响应的患者来改善患者的结果。

[0083] 本公开的方法可以用于检测任何合适溶液中的分析物(例如,DNA和/或RNA突变)。

在一些实施方案中，溶液包含生物样品。在一些实施方案中，溶液包含从生物样品中分离的DNA或RNA，以及任选的缓冲液。用于DNA/RNA分离的合适缓冲液是本领域众所周知的。生物样品的实例包括但不限于粪便、血液、血清、血浆、尿液、痰液、胸腔积液、胆汁、脑脊液、皮肤或脂肪组织的间质液、唾液、泪液、支气管-肺泡灌洗液、口咽分泌物、肠液、宫颈阴道或子宫分泌物、以及精液。在一些实施方案中，生物样品可来自人。在其他实施方案中，溶液包含不是生物样品的样品，诸如环境样品、在实验室中制备的样品(例如，含有一种或多种已经被制备、分离、纯化和/或合成的分析物的样品)、固定样品(例如，福尔马林固定的样品、石蜡包埋的样品或FFPE样品)等。

[0084] 在一些实施方案中，本公开的方法包括通过聚合酶链反应(PCR)扩增DNA(例如，从如上文所述的样品中分离的DNA)。PCR技术是本领域众所周知的。简而言之，热稳定的DNA聚合酶用于使用模板DNA链(例如，从样品中分离并且变性的)和寡核苷酸引物对来扩增感兴趣的DNA序列的拷贝，所述寡核苷酸引物对(分别)与DNA模板的正义链和反义链的3′端互补。DNA聚合酶在反应中与两种引物、所有四种脱氧核苷酸(dNTP)、缓冲液、镁离子(例如，MgCl2)和钾离子(例如，KCl)以及任选的其他成分混合。然后对反应混合物进行多个温度变化循环(例如，20-40)，所述多个温度变化循环允许DNA模板的变性、引物退火至变性的单链模板和通过DNA聚合酶延伸引物。具有不同感兴趣的性质(例如，扩增长或重复模板的能力、高保真性、热启动等)的各种DNA聚合酶已被表征用于PCR并且是可商购获得的。

[0085] 在一些实施方案中，本公开的方法包括通过逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)由RNA(例如，从如上文所述的样品中分离的RNA)扩增DNA。RT-PCR技术是本领域众所周知的。简而言之，逆转录酶和与感兴趣的RNA分子的3′端互补的引物用于合成第一cDNA链，然后将第一cDNA链用作如上所述的PCR的模板，所述PCR使用DNA聚合酶和第二引物以与第一引物扩增的方向相反的方向扩增链。在一些实施方案中，第一引物包含5′标记或修饰，诸如生物素。具有不同感兴趣的性质(例如，增加的热稳定性、经修饰的RNase H活性等)的各种逆转录酶已被表征用于RT-PCR并且是可商购获得的。

[0086] 在一些实施方案中，本公开的方法包括由分离的DNA或RNA扩增(例如，通过PCR或RT-PCR)一种或多种感兴趣的特定基因中的一种或多种突变的基因座。如本文，DNA或RNA突变的“基因座”包含突变本身和突变一侧或两侧上的足够的相邻序列，所述序列用于突变的DNA序列的PCR扩增和/或突变的DNA序列与探针的杂交(或，在RNA的情况下，用于由RNA生成的cDNA的PCR扩增)。如本领域已知的，足以用于PCR扩增的最小序列长度可以受若干因素影响，包括但不限于聚合酶、引物的解链温度、引物形成引物二聚体的倾向、模板与引物的比例等。在一些实施方案中，突变的基因座包含至少约100个碱基对的相邻序列(即，包括突变的5′和3′的相邻序列)。在一些实施方案中，突变的基因座包含小于或等于200个碱基对的相邻序列(即，包括突变的5′和3′的相邻序列)。如上所述，DNA突变的基因座可以使用对基因座具有特异性的引物对、使用基因座作为DNA或cDNA模板来扩增。

[0087] 在一些实施方案中，可以使用多个PCR反应例如以检测各种DNA突变。在一些实施方案中，每个PCR反应可以包括多个引物对，每个引物对对感兴趣的DNA突变具有特异性。

[0088] 突变

[0089] 如本文所用，扩增DNA或RNA突变的基因座涵盖扩增突变体基因座和/或对应的野生型基因座。应当理解，在大多数情况下，虽然可以在多重测定中筛查许多突变，但任何单

个样品通常将包括一种或极少数被筛查的突变。在一些实施方案中，本公开的DNA突变是指使用来自样品的DNA来检测的突变，并且本公开的RNA突变是指使用来自样品的RNA来检测的突变(例如，通过生成cDNA，并且随后由RNA生成DNA)。本领域技术人员将理解，突变(诸如点突变、缺失、插入和易位/重排)存在于来自样品(例如，包含肿瘤细胞和/或非肿瘤细胞的样品)的DNA和RNA中。

[0090] 在一些实施方案中，本公开的方法包括扩增KRAS基因中的一种或多种突变(例如，DNA突变)的基因座。KRAS编码KRAS原癌基因，这是在人类癌症中频繁发生突变的小GTP酶，也称为Kirsten rag肉瘤病毒癌基因同系物、PR310c-K-ras癌基因、c-Ki-ras、c-Kirsten-ras、K-Ras2、K-ras p21、GTP酶KRas、细胞c-Ki-ras2原癌基因、细胞转化原癌基因、癌基因KRAS2、转化蛋白p21和v-Ki-ras2 Kirsten大鼠肉瘤2病毒癌基因同系物。在一些实施方案中，KRAS基因是人KRAS基因。在一些实施方案中，人KRAS基因是指由NCBI Entrez Gene ID No.3845描述的基因，包括其突变体和变体。在其他实施方案中，KRAS基因来自以下生物体之一：小鼠(参见例如NCBI Entrez Gene ID No.16653)、大鼠(参见例如NCBI Entrez Gene ID No.24525)、食蟹猴(参见例如NCBI Entrez Gene ID No.102131483)、鱼(参见例如NCBIEntrez Gene ID No.445289)、狗(参见例如NCBI Entrez Gene ID No.403871)、牛(参见例如NCBI Entrez Gene ID No.541140)、马(参见例如NCBI Entrez Gene ID No.100064473)、鸡(参见例如NCBI Entrez Gene ID No.418207)、黑猩猩(参见例如NCBI Entrez Gene ID No.473387)、猕猴(参见例如NCBI Entrez Gene ID No.707977)或猫(参见例如NCBI Entrez Gene ID No.751104)。

[0091] 与癌症相关的多种KRAS突变可通过本文所述的方法合适地检测；参见例如Lovly，C.，L.Horn，W.Pao.2015.KRAS in Non-Small Cell Lung Cancer(NSCLC)。www.mycancergenome.org/content/disease/lung-cancer/kras/的My Cancer Genome(6月18日更新)。在10％-25％的肺癌中发现了KRAS中的点突变。KRAS突变很少与肺癌中的EGFR或ALK改变一起见到，并且与从不吸烟者相比，在以前或当前吸烟者中观察到的更频繁。根据COSMIC数据库(参见cancer.sanger.ac.uk/cosmic)，在肺癌中观察到KRAS的拷贝数增加(5.23％)。在某些癌症中也观察到KRAS的扩增。KRAS突变通常与NSCLC的不良预后相关。然而，最近的大型回顾性研究发现，早期NSCLC患者的KRAS外显子12突变的预后没有差异，这对KRAS突变作为预后生物标志物的作用提出了质疑。测试KRAS突变可以用于确定患者对酪氨酸激酶抑制剂(诸如MEK抑制剂)的敏感性。RAS突变(诸如NSCLC中的RAS突变)与对EGFR抑制剂(诸如西妥昔单抗(cetuximab)、帕尼单抗(panitumumab)和厄洛替尼(erlotinib))的抗性相关。FDA批准的、对KRAS敏感的药物包括索拉非尼(sorafenib)、瑞戈非尼(regorafenib)、帕博西尼(palbociclib)、考比替尼(cobimetinib)和曲美替尼(trametinib)。在本文所述的一些实施方案中，KRAS突变是基于根据人KRAS蛋白的所得氨基酸取代/缺失/移码命名的，例如，如下列出：MT

EYKLVVVGAGGVGKSALTIQLIQNHFVDEYDPTIEDSYRKQVVID

GETCLLDILDTAGQEEYSAMRDQYMRTGEGFLCVFAINNTKSFED

IHHYREQIKRVKDSEDVPMVLVGNKCDLPSRTVDTKQAQDLARS

YGIPFIETSAKTRQGVDDAFYTLVREIRKHKEKMSKDGKKKKKKS

KTKCVIM (SEQ ID NO:326)。示例性人KRAS cDNA序列如下列出：

TGTGCTCGGAGCTCGATTTTCCTAGGCGGCGGCCGCGGCGG

CGGAGGCAGCAGCGGCGGCGGCAGTGGCGGCGGCGAAGGTGG

CGGCGGCTCGGCCAGTACTCCCGGCCCCCGCCATTTCGGACTG

GGAGCGAGCGCGGCGCAGGCACTGAAGGCGGCGGCGGGGCCA

GAGGCTCAGCGGCTCCCAGGCCTGCTGAAAATGACTGAATATA

AACTTGTGGTAGTTGGAGCTGGTGGCGTAGGCAAGAGTGCCTT

GACGATACAGCTAATTCAGAATCATTTTGTGGACGAATATGAT

CCAACAATAGAGGATTCCTACAGGAAGCAAGTAGTAATTGATG

GAGAAACCTGTCTCTTGGATATTCTCGACACAGCAGGTCAAGA

GGAGTACAGTGCAATGAGGGACCAGTACATGAGGACTGGGGA

GGGCTTTCTTTGTGTATTTGCCATAAATAATACTAAATCATTTG

AAGATATTCACCATTATAGAGAACAAATTAAAAGAGTTAAGG

ACTCTGAAGATGTACCTATGGTCCTAGTAGGAAATAAATGTGA

TTTGCCTTCTAGAACAGTAGACACAAAACAGGCTCAGGACTTA

GCAAGAAGTTATGGAATTCCTTTTATTGAAACATCAGCAAAGA

CAAGACAGAGAGTGGAGGATGCTTTTTATACATTGGTGAGAGA

GATCCGACAATACAGATTGAAAAAAATCAGCAAAGAAGAAAA

GACTCCTGGCTGTGTGAAAATTAAAAAATGCATTATAATGTAA

TCTGGGTGTTGATGATGCCTTCTATACATTAGTTCGAGAAATTC

GAAAACATAAAGAAAAGATGAGCAAAGATGGTAAAAAGAAG

AAAAAG (SEQ ID NO:339)。在一些实施方案中，DNA突变导致根据SEQ ID NO:326或SEQ ID NO:339的G12突变。例如，在一些实施方案中，KRAS基因中的DNA突变编码或导致G12C、G12D或G12V突变的KRAS蛋白(编号根据SEQ ID NO:326)。这些DNA突变也在下文的表A1中通过它们的核苷酸位置(而不是突变的多肽密码子)进行了描述。例如，在一些实施方案中，KRAS基因中的DNA突变导致对应于SEQ ID NO:339的cDNA序列中的c.34G>C、c.34G>T、c.35G>A突变。

[0092] 在一些实施方案中，用于扩增KRAS突变(例如，编码或导致G12C、G12D或G12V突变的KRAS蛋白)的基因座的引物对分别包含序列GTACTGGTGGAGTATTTGATAGTG(SEQ ID NO:1)和CGTCAAGGCACTCTTGCCTAC(SEQ ID NO:2)。

[0093] 在一些实施方案中，本公开的方法包括扩增BRAF基因中的一种或多种突变(例如，DNA突变)的基因座。BRAF编码BRAF原癌基因，这是在人类癌症中频繁发生突变的丝氨酸/苏氨酸激酶，也称为B-Raf、BRAF1、B-RAF1、RAFB1、NS7、94kDa B-raf蛋白、p94、鼠肉瘤病毒(v-

raf)癌基因同系物B1、v-raf鼠肉瘤病毒癌基因同系物B和v-raf鼠肉瘤病毒癌基因同系物B1。在一些实施方案中,BRAF基因是人BRAF基因。在一些实施方案中,人BRAF基因是指由NCBI Entrez Gene ID No.673描述的基因,包括其突变体和变体。在其他实施方案中,BRAF基因来自以下生物体之一:小鼠(参见例如NCBI Entrez Gene ID No.109880)、大鼠(参见例如NCBI Entrez Gene ID No.114486)、食蟹猴(参见例如NCBI Entrez Gene ID No.101866436)、鱼(参见例如NCBI Entrez Gene ID No.403065)、狗(参见例如NCBIEntrez Gene ID No.475526)、牛(参见例如NCBI Entrez Gene ID No.536051)、马(参见例如NCBI Entrez Gene ID No.100065760)、鸡(参见例如NCBI Entrez Gene ID No.396239)、黑猩猩(参见例如NCBI Entrez Gene ID No.463781)、猕猴(参见例如NCBI Entrez Gene ID No.693554)或猫(参见例如NCBI Entrez Gene ID No.101092346)。

[0094] 与癌症相关的多种BRAF突变可通过本文所述的方法合适地检测;参见例如Lovly,C.,L.Horn,W.Pao.2015.BRAF in Non-Small Cell Lung Cancer(NSCLC)。www.mycancergenome.org/content/disease/lung-cancer/braf/的My Cancer Genome(6月18日更新)。功能突变的BRAF增益中的大部分改变了激酶结构域中可通过分子测试检测到的残基,最显著的是V600E。BRAF突变和EGFR突变被认为是相互排斥的。通过FISH检测到的BRAF重排(诸如BRAF-KIAA1549)在一些癌症中也有报道。在某些癌症中观察到扩增。已经在多种癌症(包括肺癌)中观察到BRAF的组成型激活,其在多种癌症中导致RAF/MEK/ERK通路的激活。在NSCLC中发现了BRAF中的点突变(1%-4%)和拷贝数增加(1.43%)。在使用化学疗法治疗时,与BRAF融合相关的预后在NSCLC中是中性的。BRAF和MEK1/2抑制剂被批准为或在临床评估中作为用于治疗BRAF突变体癌症的单一药剂或组合。一些具有V600E突变的患者对BRAF抑制剂维罗非尼(vemurafenib)和达拉非尼(dabrafinib)的敏感性增加。BRAF抑制最终可导致对BRA F或MEK抑制剂的抗性。另外,BRAF V600E突变对EGFR疗法(诸如西妥昔单抗或帕尼单抗,以及伊马替尼(imatinib)和舒尼替尼(suniti nib))具有抗性。虽然特定的突变和融合(诸如BRAF D594A/V和K483M)对RAF抑制剂不敏感,但它们对MEK抑制剂敏感。BRAF融合(如BRAF-KIAA1549)对第一代BRAF抑制剂(如维罗非尼)具有抗性,但正在研究第二代BRAF抑制剂。FDA批准的、对BRAF敏感的药物包括达拉非尼(dabrafenib)、维罗非尼、考比替尼和曲美替尼。靶向RAF/MEK/ERK通路可能对BRAF突变体癌症有效。在本文所述的一些实施方案中,BRAF突变是基于根据人BRAF蛋白的所得氨基酸取代/缺失/移码命名的,例如,如下列出:MAALSGGGGGGAEPGQA

LFNGDMEPEAGAGAGAAASSAADPAIPEEVWNIKQMIKLTQEHIE

ALLDKFGGEHNPPSIYLEAYEEYTSKLDALQQREQQLLESLGNGT
DFSVSSSASMDTVTSSSSSSLSVLPSSLSVFQNPTDVARSNPKSPQK
PIVRVFLPNKQRTVVPARCGVTVRDSLKKALMMRGLIPECCAVY
RIQDGEKKPIGWDTDISWLTGEELHVEVLENVPLTTHNFVRKTFF
TLAFCDFCRKLLFQGFRCQTCGYKFHQRCSTEVPLMCVNYDQLD
LLFVSKFFEHHPIPQEEASLAETALTSGSSPSAPASDSIGPQILTSPSP
SKSIPIPQPFRPADEDHRNQFGQRDRSSSAPNVHINTIEPVNIDDLIR
DQGFRGDGGSTTGLSATPPASLPGSLTNVKALQKSPGPQRERKSS
SSSEDRNRMKTLGRRDSSDDWEIPDGQITVGQRIGSGSFGTVYKG
KWHGDVAVKMLNVTAPTPQQLQAFKNEVGVLRKTRHVNILLFM
GYSTKPQLAIVTQWCEGSSLYHHLHIIETKFEMIKLIDIARQTAQG
MDYLHAKSIIHRDLKSNNIFLHEDLTVKIGDFGLATVKSRWSGSH
QFEQLSGSILWMAPEVIRMQDKNPYSFQSDVYAFGIVLYELMTGQ
LPYSNINNRDQIIFMVGRGYLSPDLSKVRSNCPKAMKRLMAECLK
KKRDERPLFPQILASIELLARSLPKIHRSASEPSLNRAGFQTEDFSL
YACASPKTPIQAGGYGAFPVH (SEQ ID NO:329)。示例性人BRAF cDNA序列如下列出：ATGGCGGCGCTGAGCGGTGGCGGTGGTG
GCGGCGCGGAGCCGGGCCAGGCTCTGTTCAACGGGGACATGG
AGCCCGAGGCCGGCGCCGGCGCCGGCGCCGCGGCCTCTTCGGC
TGCGGACCCTGCCATTCCGGAGGAGGTGTGGAATATCAAACAA
ATGATTAAGTTGACACAGGAACATATAGAGGCCCTATTGGACA
AATTTGGTGGGGAGCATAATCCACCATCAATATATCTGGAGGC
CTATGAAGAATACACCAGCAAGCTAGATGCACTCCAACAAAG
AGAACAACAGTTATTGGAATCTCTGGGGAACGGAACTGATTTT
TCTGTTTCTAGCTCTGCATCAATGGATACCGTTACATCTTCTTC
CTCTTCTAGCCTTTCAGTGCTACCTTCATCTCTTTCAGTTTTTCA
AAATCCCACAGATGTGGCACGGAGCAACCCCAAGTCACCACA
AAAACCTATCGTTAGAGTCTTCCTGCCCAACAAACAGAGGACA
GTGGTACCTGCAAGGTGTGGAGTTACAGTCCGAGACAGTCTAA
AGAAAGCACTGATGATGAGAGGTCTAATCCCAGAGTGCTGTGC

[0095]

TGTTTACAGAATTCAGGATGGAGAGAAGAAACCAATTGGTTGG
GACACTGATATTTCCTGGCTTACTGGAGAAGAATTGCATGTGG
AAGTGTTGGAGAATGTTCCACTTACAACACACAACTTTGTACG
AAAAACGTTTTTCACCTTAGCATTTTGTGACTTTTGTCGAAAGC
TGCTTTTCCAGGGTTTCCGCTGTCAAACATGTGGTTATAAATTT
CACCAGCGTTGTAGTACAGAAGTTCCACTGATGTGTGTTAATT
ATGACCAACTTGATTTGCTGTTTGTCTCCAAGTTCTTTGAACAC
CACCCAATACCACAGGAAGAGGCGTCCTTAGCAGAGACTGCCC
TAACATCTGGATCATCCCCTTCCGCACCCGCCTCGGACTCTATT
GGGCCCCAAATTCTCACCAGTCCGTCTCCTTCAAAATCCATTCC
AATTCCACAGCCCTTCCGACCAGCAGATGAAGATCATCGAAAT
CAATTTGGGCAACGAGACCGATCCTCATCAGCTCCCAATGTGC
ATATAAACACAATAGAACCTGTCAATATTGATGACTTGATTAG
AGACCAAGGATTTCGTGGTGATGGAGGATCAACCACAGGTTTG
TCTGCTACCCCCCCTGCCTCATTACCTGGCTCACTAACTAACGT
GAAAGCCTTACAGAAATCTCCAGGACCTCAGCGAGAAAGGAA
GTCATCTTCATCCTCAGAAGACAGGAATCGAATGAAAACACTT
GGTAGACGGGACTCGAGTGATGATTGGGAGATTCCTGATGGGC
AGATTACAGTGGGACAAAGAATTGGATCTGGATCATTTGGAAC
AGTCTACAAGGGAAAGTGGCATGGTGATGTGGCAGTGAAAAT
GTTGAATGTGACAGCACCTACACCTCAGCAGTTACAAGCCTTC
AAAAATGAAGTAGGAGTACTCAGGAAAACACGACATGTGAAT
ATCCTACTCTTCATGGGCTATTCCACAAAGCCACAACTGGCTAT
TGTTACCCAGTGGTGTGAGGGCTCCAGCTTGTATCACCATCTCC
ATATCATTGAGACCAAATTTGAGATGATCAAACTTATAGATAT
TGCACGACAGACTGCACAGGGCATGGATTACTTACACGCCAAG
TCAATCATCCACAGAGACCTCAAGAGTAATAATATATTTCTTC
ATGAAGACCTCACAGTAAAAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTAC
AGTGAAATCTCGATGGAGTGGGTCCCATCAGTTTGAACAGTTG
TCTGGATCCATTTTGTGGATGGCACCAGAAGTCATCAGAATGC

AAGATAAAAATCCATACAGCTTTCAGTCAGATGTATATGCATT
TGGAATTGTTCTGTATGAATTGATGACTGGACAGTTACCTTATT
CAAACATCAACAACAGGGACCAGATAATTTTTATGGTGGGACG
AGGATACCTGTCTCCAGATCTCAGTAAGGTACGGAGTAACTGT
CCAAAAGCCATGAAGAGATTAATGGCAGAGTGCCTCAAAAAG
AAAAGAGATGAGAGACCACTCTTTCCCCAAATTCTCGCCTCTA
TTGAGCTGCTGGCCCGCTCATTGCCAAAAATTCACCGCAGTGC
ATCAGAACCCTCCTTGAATCGGGCTGGTTTCCAAACAGAGGAT
TTTAGTCTATATGCTTGTGCTTCTCCAAAAACACCCATCCAGGC
AGGGGGATATGGTGCGTTTCCTGTCCACTGA (SEQ ID NO:342)。在一些实施方案中,DNA突变导致根据SEQ ID NO:329或SEQ ID NO:342的V600突变。例如,在一些实施方案中,BRAF基因中的DNA突变编码或导致V600E突变的BRAF蛋白(编号根据SEQ ID NO:329)。这些DNA突变也在下文的表A1中通过它们的核苷酸位置(而不是突变的多肽密码子)进行了描述。应当理解的是,一些对V600E BRAF突变的提及将其称为V599E,这是由于早期的不正确的BRAF蛋白序列在大约氨基酸31处缺少密码子(描述参见Gamett,M.J.和Marais,R.(2004)Cancer Cell6:313-9)。例如,在一些实施方案中,BRAF基因中的DNA突变导致对应于SEQ ID NO:342的cDNA序列中的c.1799T>A突变。

[0096] 在一些实施方案中,用于扩增BRAF突变(例如,编码或导致V600E突变的BRAF蛋白)的基因座的引物对分别包含序列ATAGCCTCAATTCTTACCATCCACAAAATG(SEQ ID NO:9)和CAGATATATTTCTTCATGAAGACCTCACAGTAA(SEQ ID NO:10)。

[0097] 在一些实施方案中,本公开的方法包括扩增NRAS基因中的一种或多种突变(例如,DNA突变)的基因座。NRAS编码NRAS原癌基因,这是在人类癌症中频繁发生突变的小GTP酶,也称为神经母细胞瘤RAS病毒癌基因同系物、NCMS、NS6、ALPS4、CMNS和NCMS。在一些实施方案中,NRAS基因是人NRAS基因。在一些实施方案中,人NRAS基因是指由NCBI Entrez Gene ID No.4893描述的基因,包括其突变体和变体。在其他实施方案中,NRAS基因来自以下生物体之一:小鼠(参见例如NCBI Entrez Gene ID No.18176)、大鼠(参见例如NCBI Entrez Gene ID No.24605)、鱼(参见例如NCBI Entrez Gene ID No.30380)、狗(参见例如NCBI Entrez Gene ID No.403872)、牛(参见例如NCBI Entrez Gene ID No.506322)、马(参见例如NCBI EntrezGene ID No.100059469)或黑猩猩(参见例如NCBI Entrez Gene ID No.742713)。

[0098] 与癌症相关的多种NRAS突变是已知的,并且可通过本文所述的方法合适地检测;参见例如Lovly,C.,L.Horn,W.Pao.2015.NRAS in Non-Small Cell Lung Cancer(NSCLC)。www.mycancergenome.org/content/disease/lung-cancer/nras/的My Cancer Genome(6月18日更新)。在癌症中观察到的最频繁的NRAS改变是密码子12、13和61处的(90%)以及磷酸结合环/G1基序(残基10-17)、开关II区域(残基59-67)和G5基序(残基145-147)内的突变。NRAS的体细胞突变在原发性NSCLC中很少报道(0.2%-1%),但它们在致癌作用中的作

用已经得到证明。吸烟和环境致癌物与NRAS突变的肺癌的病因相关。已经将NRAS突变与NSCLC的转移(1.5%)相关联。NRAS中的体细胞突变通常与对标准疗法的响应较差相关。MEK抑制剂(诸如司美替尼(selumetinib))在治疗具有RAS突变的癌症患者中是有效的。NRAS突变(诸如E63K0)与对抗EGFR疗法(诸如西妥昔单抗和帕尼单抗)、抗BRAF疗法(诸如维罗非尼和达拉非尼)、ALK TKI和放射疗法的抗性相关。在本文所述的一些实施方案中,NRAS突变是基于根据人NRAS蛋白的所得氨基酸取代/缺失/移码命名的,例如,如下列出:MTE YKLVVVGAGGVGKSALTIQLIQNHFVDEYDPTIEDSYRKQVVIDG ETCLLDILDTAGQEEYSAMRDQYMRTGEGFLCVFAINNSKSFADI NLYREQIKRVKDSDDVPMVLVGNKCDLPTRTVDTKQAHELAKSY GIPFIETSAKTRQGVEDAFYTLVREIRQYRMKKLNSSDDGTQGCM GLPCVVM (SEQ ID NO:327)。示例性人NRAS cDNA序列如下列出:ATGACTGAGTACAAACTGGTGGTGGTTGGAGCAGGTGGTG TTGGGAAAAGCGCACTGACAATCCAGCTAATCCAGAACCACTT TGTAGATGAATATGATCCCACCATAGAGGATTCTTACAGAAAA CAAGTGGTTATAGATGGTGAAACCTGTTTGTTGGACATACTGG ATACAGCTGGACAAGAAGAGTACAGTGCCATGAGAGACCAAT ACATGAGGACAGGCGAAGGCTTCCTCTGTGTATTTGCCATCAA TAATAGCAAGTCATTTGCGGATATTAACCTCTACAGGGAGCAG ATTAAGCGAGTAAAAGACTCGGATGATGTACCTATGGTGCTAG TGGGAAACAAGTGTGATTTGCCAACAAGGACAGTTGATACAA AACAAGCCCACGAACTGGCCAAGAGTTACGGGATTCCATTCAT TGAAACCTCAGCCAAGACCAGACAGGGTGTTGAAGATGCTTTT TACACACTGGTAAGAGAAATACGCCAGTACCGAATGAAAAAA CTCAACAGCAGTGATGATGGGACTCAGGGTTGTATGGGATTGC CATGTGTGGTGATGTAA (SEQ ID NO:340)。在一些实施方案中,DNA突变导致根据SEQ ID NO:327或SEQ ID NO:340的Q61突变。例如,在一些实施方案中,NRAS基因中的DNA突变编码或导致Q61L突变的NRAS蛋白(编号根据SEQ ID NO:327)。这些DNA突变也在厂文的表A1中通过它们的核苷酸位置(而不是突变的多肽密码子)进行了描述。例如,在一些实施方案中,NRAS基因中的DNA突变导致对应于SEQ ID NO:340的cDNA序列中的c.182A>T突变。

[0099] 在一些实施方案中,用于扩增NRAS突变(例如,编码或导致Q61L突变的NRAS蛋白)的基因座的引物对分别包含序列CCACACCCCCAGGATTCTT(SEQ ID NO:3)和TTGGTCTCTCATGGCACTGT ACTC(SEQ ID NO:4)。

[0100] 在一些实施方案中，本公开的方法包括扩增PIK3CA基因中的一种或多种突变(例如，DNA突变)的基因座。PIK3CA编码I类磷脂酰肌醇-4,5-二磷酸(PI)3-激酶催化亚基，所述亚基也称为p110α蛋白、CLOVE、CWS5、MCM、MCAP、PI3K、CLAPO、MCMTC和PI3K-α。在一些实施方案中，PIK3CA基因是人PIK3CA基因。在一些实施方案中，人PIK3CA基因是指由NCBI Entrez Gene ID No.5290描述的基因，包括其突变体和变体。在其他实施方案中，PIK3CA基因来自以下生物体之一：小鼠(参见例如NCBI Entrez Gene ID No.18706)、大鼠(参见例如NCBI Entrez Gene ID No.170911)、鱼(参见例如NCBI Entrez Gene ID No.561737)、狗(参见例如NCBI Entrez Gene ID No.488084)、牛(参见例如NCBI Entrez Gene ID No.282306)、马(参见例如NCBI Entrez Gene ID No.100058141)、黑猩猩(参见例如NCBI Entrez Gene ID No.460858)或猕猴(参见例如NCBI Entrez Gene ID No.709959)。

[0101] 与癌症相关的多种PIK3CA突变是已知的，并且可通过本文所述的方法合适地检测；参见例如Lovly,C.,L.Horn,W.Pao.2015.PIK3CA in Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC)。www.mycancergenome.org/content/disease/lung-cancer/pik3ca/的My Cancer Genome(6月18日更新)。PIK3CA中的激活突变或扩增导致组成型活性PI3K。大多数功能突变的PIK3CA增益发生在激酶(特别是残基1043、1047和H1049R)、α-螺旋(特别是残基E542K、E545K和546)和C-(特别是残基345和420)结构域内。其他不太频繁发生突变的关键结构域是适体和接头结构域。PIK/AKT/mTOR通路在50％-70％的NSCLC中失调，并且PIK3CA突变在1％-5％的NSCLC中检测到。在肺癌中观察到PIK3CA的拷贝数增加(16％-20％)，在sqNSCLC中更频繁，在SCLC中不太频繁(4.7％)。PIK3CA在sqNSCLC(33％-37％)中扩增，并发生突变(6.5％-16％)。PIK3CA激活通常与不良预后相关。已经提出了，具有组成型活性PIK3的肿瘤对靶向PI3K/AKT/mTOR通路的药剂敏感。在本文所述的一些实施方案中，PIK3CA突变是基于根据人PIK3CA蛋白的所得氨基酸取代/缺失/移码命名的，例如，如下列出：MP

PRPSSGELWGIHLMPPRILVECLLPNGMIVTLECLREATLITIKHEL

FKEARKYPLHQLLQDESSYIFVSVTQEAEREEFFDETRRLCDLRLF

QPFLKVIEPVGNREEKILNREIGFAIGMPVCEFDMVKDPEVQDFRR

NILNVCKEAVDLRDLNSPHSRAMYVYPPNVESSPELPKHIYNKLD

KGQIIVVIWVIVSPNNDKQKYTLKINHDCVPEQVIAEAIRKKTRSM
LLSSEQLKLCVLEYQGKYILKVCGCDEYFLEKYPLSQYKYIRSCIM
LGRMPNLMLMAKESLYSQLPMDCFTMPSYSRRISTATPYMNGET
STKSLWVINSALRIKILCATYVNVNIRDIDKIYVRTGIYHGGEPLCD
NVNTQRVPCSNPRWNEWLNYDIYIPDLPRAARLCLSICSVKGRKG
AKEEHCPLAWGNINLFDYTDTLVSGKMALNLWPVPHGLEDLLNP
IGVTGSNPNKETPCLELEFDWFSSVVKFPDMSVIEEHANWSVSRE
AGFSYSHAGLSNRLARDNELRENDKEQLKAISTRDPLSEITEQEKD
FLWSHRHYCVTIPEILPKLLLSVKWNSRDEVAQMYCLVKDWPPIK
PEQAMELLDCNYPDPMVRGFAVRCLEKYLTDDKLSQYLIQLVQV
LKYEQYLDNLLVRFLLKKALTNQRIGHFFFWHLKSEMHNKTVSQ
RFGLLLESYCRACGMYLKHLNRQVEAMEKLINLTDILKQEKKDE
TQKVQMKFLVEQMRRPDFMDALQGFLSPLNPAHQLGNLRLEECR
IMSSAKRPLWLNWENPDIMSELLFQNNEIIFKNGDDLRQDMLTLQ
IIRIMENIWQNQGLDLRMLPYGCLSIGDCVGLIEVVRNSHTIMQIQ
CKGGLKGALQFNSHTLHQWLKDKNKGEIYDAAIDLFTRSCAGYC
VATFILGIGDRHNSNIMVKDDGQLFHIDFGHFLDHKKKKFGYKRE
RVPFVLTQDFLIVISKGAQECTKTREFERFQEMCYKAYLAIRQHA
NLFINLFSMMLGSGMPELQSFDDIAYIRKTLALDKTEQEALEYFM
KQMNDAHHGGWTTKMDWIFHTIKQHALN (SEQ ID NO:328)。示例性人PIK3CA cDNA序列如下列出：ATGCCTCCACGACCATCAT
CAGGTGAACTGTGGGGCATCCACTTGATGCCCCCAAGAATCCT
AGTAGAATGTTTACTACCAAATGGAATGATAGTGACTTTAGAA
TGCCTCCGTGAGGCTACATTAATAACCATAAAGCATGAACTAT
TTAAAGAAGCAAGAAAATACCCCCTCCATCAACTTCTTCAAGA
TGAATCTTCTTACATTTTCGTAAGTGTTACTCAAGAAGCAGAA
AGGGAAGAATTTTTTGATGAAACAAGACGACTTTGTGACCTTC
GGCTTTTTCAACCCTTTTTAAAAGTAATTGAACCAGTAGGCAA
CCGTGAAGAAAAGATCCTCAATCGAGAAATTGGTTTTGCTATC
GGCATGCCAGTGTGTGAATTTGATATGGTTAAAGATCCAGAAG

[0102]

TACAGGACTTCCGAAGAAATATTCTGAACGTTTGTAAAGAAGC
TGTGGATCTTAGGGACCTCAATTCACCTCATAGTAGAGCAATG
TATGTCTATCCTCCAAATGTAGAATCTTCACCAGAATTGCCAA
AGCACATATATAATAAATTAGATAAAGGGCAAATAATAGTGGT
GATCTGGGTAATAGTTTCTCCAAATAATGACAAGCAGAAGTAT
ACTCTGAAAATCAACCATGACTGTGTACCAGAACAAGTAATTG
CTGAAGCAATCAGGAAAAAAACTCGAAGTATGTTGCTATCCTC
TGAACAACTAAAACTCTGTGTTTTAGAATATCAGGGCAAGTAT
ATTTTAAAAGTGTGTGGATGTGATGAATACTTCCTAGAAAAAT
ATCCTCTGAGTCAGTATAAGTATATAAGAAGCTGTATAATGCT
TGGGAGGATGCCCAATTTGATGTTGATGGCTAAAGAAAGCCTT
TATTCTCAACTGCCAATGGACTGTTTTACAATGCCATCTTATTC
CAGACGCATTTCCACAGCTACACCATATATGAATGGAGAAACA
TCTACAAAATCCCTTTGGGTTATAAATAGTGCACTCAGAATAA
AAATTCTTTGTGCAACCTACGTGAATGTAAATATTCGAGACAT
TGATAAGATCTATGTTCGAACAGGTATCTACCATGGAGGAGAA
CCCTTATGTGACAATGTGAACACTCAAAGAGTACCTTGTTCCA
ATCCCAGGTGGAATGAATGGCTGAATTATGATATATACATTCC
TGATCTTCCTCGTGCTGCTCGACTTTGCCTTTCCATTTGCTCTGT
TAAAGGCCGAAAGGGTGCTAAAGAGGAACACTGTCCATTGGC
ATGGGGAAATATAAACTTGTTTGATTACACAGACACTCTAGTA
TCTGGAAAAATGGCTTTGAATCTTTGGCCAGTACCTCATGGATT
AGAAGATTTGCTGAACCCTATTGGTGTTACTGGATCAAATCCA
AATAAAGAAACTCCATGCTTAGAGTTGGAGTTTGACTGGTTCA
GCAGTGTGGTAAAGTTCCCAGATATGTCAGTGATTGAAGAGCA
TGCCAATTGGTCTGTATCCCGAGAAGCAGGATTTAGCTATTCC
CACGCAGGACTGAGTAACAGACTAGCTAGAGACAATGAATTA
AGGGAAAATGACAAAGAACAGCTCAAAGCAATTTCTACACGA
GATCCTCTCTCTGAAATCACTGAGCAGGAGAAAGATTTTCTAT
GGAGTCACAGACACTATTGTGTAACTATCCCCGAAATTCTACC

[0103]

CAAATTGCTTCTGTCTGTTAAATGGAATTCTAGAGATGAAGTA
GCCCAGATGTATTGCTTGGTAAAAGATTGGCCTCCAATCAAAC
CTGAACAGGCTATGGAACTTCTGGACTGTAATTACCCAGATCC
TATGGTTCGAGGTTTTGCTGTTCGGTGCTTGGAAAAATATTTAA
CAGATGACAAACTTTCTCAGTATTTAATTCAGCTAGTACAGGT
CCTAAAATATGAACAATATTTGGATAACTTGCTTGTGAGATTTT
TACTGAAGAAAGCATTGACTAATCAAAGGATTGGGCACTTTTT
CTTTTGGCATTTAAAATCTGAGATGCACAATAAAACAGTTAGC
CAGAGGTTTGGCCTGCTTTTGGAGTCCTATTGTCGTGCATGTGG
GATGTATTTGAAGCACCTGAATAGGCAAGTCGAGGCAATGGA
AAAGCTCATTAACTTAACTGACATTCTCAAACAGGAGAAGAAG
GATGAAACACAAAAGGTACAGATGAAGTTTTTAGTTGAGCAA
ATGAGGCGACCAGATTTCATGGATGCTCTACAGGGCTTTCTGT
CTCCTCTAAACCCTGCTCATCAACTAGGAAACCTCAGGCTTGA
AGAGTGTCGAATTATGTCCTCTGCAAAAAGGCCACTGTGGTTG
AATTGGGAGAACCCAGACATCATGTCAGAGTTACTGTTTCAGA
ACAATGAGATCATCTTTAAAAATGGGGATGATTTACGGCAAGA
TATGCTAACACTTCAAATTATTCGTATTATGGAAAATATCTGGC
AAAATCAAGGTCTTGATCTTCGAATGTTACCTTATGGTTGTCTG
TCAATCGGTGACTGTGTGGGACTTATTGAGGTGGTGCGAAATT
CTCACACTATTATGCAAATTCAGTGCAAAGGCGGCTTGAAAGG
TGCACTGCAGTTCAACAGCCACACACTACATCAGTGGCTCAAA
GACAAGAACAAAGGAGAAATATATGATGCAGCCATTGACCTG
TTTACACGTTCATGTGCTGGATACTGTGTAGCTACCTTCATTTT
GGGAATTGGAGATCGTCACAATAGTAACATCATGGTGAAAGA
CGATGGACAACTGTTTCATATAGATTTTGGACACTTTTTGGATC
ACAAGAAGAAAAAATTTGGTTATAAACGAGAACGTGTGCCATT
TGTTTTGACACAGGATTTCTTAATAGTGATTAGTAAAGGAGCC
CAAGAATGCACAAAGACAAGAGAATTTGAGAGGTTTCAGGAG
ATGTGTTACAAGGCTTATCTAGCTATTCGACAGCATGCCAATCT

CTTCATAAATCTTTTCTCAATGATGCTTGGCTCTGGAATGCCAG
AACTACAATCTTTTGATGACATTGCATACATTCGAAAGACCCT
AGCCTTAGATAAAACTGAGCAAGAGGCTTTGGAGTATTTCATG
AAACAAATGAATGATGCACATCATGGTGGCTGGACAACAAAA
ATGGATTGGATCTTCCACACAATTAAACAGCATGCATTGAACT
GA (SEQ ID NO:341)。在一些实施方案中,DNA突变导致根据SEQ ID NO:328或SEQ ID NO:341的E542、E545或H1047突变。例如,在一些实施方案中,PIK3CA基因中的DNA突变编码或导致E542K、E545K或H1047R突变的PIK3CA蛋白(编号根据SEQ ID NO:328)。这些DNA突变也在厂文的表A1中通过它们的核苷酸位置(而不是突变的多肽密码子)进行了描述。例如,在一些实施方案中,PI K3CA基因中的DNA突变导致对应于SEQ ID NO:341的cDNA序列中的c.1624G>A、c.1633G>A或c.3140A>G突变。

[0104] 在一些实施方案中,用于扩增PIK3CA突变(例如,编码或导致E542K或E545K突变的PIK3CA蛋白)的基因座的引物对分别包含序列CAATTTCTACAAGAGATCCTCTCTCT(SEQ ID NO:5)和CTCCA TTTTAGCACTTACCTGTGAC(SEQ ID NO:6)。在一些实施方案中,用于扩增PIK3CA突变(例如,编码或导致H1047R突变的PIK3CA蛋白)的基因座的引物对分别包含序列ACCCTAGCCTTAGATAAAACTGAGC(SEQ ID NO:7)和TTTGTTGTCCAGCCACCATGA(SEQ ID NO:8)。

[0105] 在一些实施方案中,本公开的方法包括扩增EGFR基因中的一种或多种突变(例如,DNA突变)的基因座。EGFR编码表皮生长因子受体,这是在人类癌症中频繁发生突变的受体酪氨酸激酶,也称为ERBB、ERBB1、HER1、NISBD2、PIG61和mENA。在一些实施方案中,EGFR基因是人EGFR基因。在一些实施方案中,人EGFR基因是指由NCBI Entrez Gene ID No.1956描述的基因,包括其突变体和变体。在其他实施方案中,EGFR基因来自以下生物体之一:小鼠(参见例如NCBI Entrez Gene ID No.13649)、大鼠(参见例如NCBI Entrez Gene ID No.24329)、狗(参见例如NCBI Entrez Gene ID No.404306)、牛(参见例如NCBI Entrez Gene ID No.407217)、马(参见例如NCBI Entrez Gene ID No.100067755)、鸡(参见例如NCBI EntrezGene ID No.396494)或猫(参见例如NCBI Entrez Gene ID No.100510799)。

[0106] 与癌症相关的多种EGFR突变是已知的,并且可通过本文所述的方法合适地检测;参见例如Lovly,C.,L.Horn,W.Pao.2015.EGFR in Non-Small Cell Lung Cancer(NSCLC)。www.mycancergenome.org/content/disease/lung-cancer/egfr/的MyCancer Genome(6月18日更新)。EGFR改变(包括过表达、扩增和突变)与多种实体瘤的发展相关。癌症中最频繁的EGFR突变位于激酶结构域中,包括残基739-757之间的插入缺失和L858突变,其导致组成型激活。EGFR中的肺癌点突变的发生率为28.94%,同时在5.06%的肺癌中发现拷贝数增加。肺癌中的EGFR突变与亚裔女性非吸烟者的腺癌相关。在NSCLC中频繁遇到特定的点突变:G719、T790M、C797S和L861,并且所述点突变具有不同的治疗相关性。具有外显子18、19和21中的突变的肺癌患者可能对EGFR抑制剂(诸如厄洛替尼和吉非替尼(gefitinib))敏感。已知外显子20中的获得性突变(诸如T790M)对第一代EGFR TKI具有抗性。开发了较晚世代的EGFR TKI(诸如阿法替尼(afatinib)和奥希替尼(osimertinib))以对抗抗性变体(包括T790M)。其他突变(诸如C797S、L844V和L718Q)可能是对第三代TKI的抗性的原因。EGFR改

变也可能驱动对ALK靶向疗法的抗性。FDA批准的EGFR抑制剂包括奥希替尼、吉非替尼、厄洛替尼、耐昔妥珠单抗(necitumumab)和阿法替尼。奥希替尼被批准用于治疗T790M肺癌。吉非替尼被批准用于通过FDA批准的测试检测到的具有EGFR外显子19缺失或外显子21(L858R)取代突变的转移性NSCLC。其他FDA批准的对EGFR敏感的药物包括拉帕替尼(lapatinib)、凡德他尼(vandetanib)、西妥昔单抗和帕尼单抗。在本文所述的一些实施方案中,EGFR突变是基于根据人EGFR蛋白的所得氨基酸取代/缺失/移码命名的,例如,如下列出:

MRPSGTAGAALLALLAALCPASRALEEKKVCQGTSNK

LTQLGTFEDHFLSLQRMFNNCEVVLGNLEITYVQRNYDLSFLKTI
QEVAGYVLIALNTVERIPLENLQIIRGNMYYENSYALAVLSNYDA
NKTGLKELPMRNLQEILHGAVRFSNNPALCNVESIQWRDIVSSDF
LSNMSMDFQNHLGSCQKCDPSCPNGSCWGAGEENCQKLTKIICA
QQCSGRCRGKSPSDCCHNQCAAGCTGPRESDCLVCRKFRDEATC
KDTCPPLMLYNPTTYQMDVNPEGKYSFGATCVKKCPRNYVVTD
HGSCVRACGADSYEMEEDGVRKCKKCEGPCRKVCNGIGIGEFKD
SLSINATNIKHFKNCTSISGDLHILPVAFRGDSFTHTPPLDPQELDIL
KTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGRTKQHGQFSLAVV
SLNITSLGLRSLKEISDGDVIISGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQK
TKIISNRGENSCKATGQVCHALCSPEGCWGPEPRDCVSCRNVSRG
RECVDKCNLLEGEPREFVENSECIQCHPECLPQAMNITCTGRGPD
NCIQCAHYIDGPHCVKTCPAGVMGENNTLVWKYADAGHVCHLC
HPNCTYGCTGPGLEGCPTNGPKIPSIATGMVGALLLLLVVALGIGL
FMRRRHIVRKRTLRRLLQERELVEPLTPSGEAPNQALLRILKETEF
KKIKVLGSGAFGTVYKGLWIPEGEKVKIPVAIKELREATSPKANK
EILDEAYVMASVDNPHVCRLLGICLTSTVQLITQLMPFGCLLDYV
REHKDNIGSQYLLNWCVQIAKGMNYLEDRRLVHRDLAARNVLV
KTPQHVKITDFGLAKLLGAEEKEYHAEGGKVPIKWMALESILHRI
YTHQSDVWSYGVTVWELMTFGSKPYDGIPASEISSILEKGERLPQP
PICTIDVYMIMVKCWMIDADSRPKFRELIIEFSKMARDPQRYLVIQ
GDERMHLPSPTDSNFYRALMDEEDMDDVVDADEYLIPQQGFFSS
PSTSRTPLLSSLSATSNNSTVACIDRNGLQSCPIKEDSFLQRYSSDP
TGALTEDSIDDTFLPVPEYINQSVPKRPAGSVQNPVYHNQPLNPAP
SRDPHYQDPHSTAVGNPEYLNTVQPTCVNSTFDSPAHWAQKGSH
QISLDNPDYQQDFFPKEAKPNGIFKGSTAENAEYLRVAPQSSEFIG
A (SEQ ID NO:330)。示例性人EGFR cDNA序列如下列出：ATGC
GACCCTCCGGGACGGCCGGGGCAGCGCTCCTGGCGCTGCTGGC
TGCGCTCTGCCCGGCGAGTCGGGCTCTGGAGGAAAAGAAAGTT

[0107]

TGCCAAGGCACGAGTAACAAGCTCACGCAGTTGGGCACTTTTG
AAGATCATTTTCTCAGCCTCCAGAGGATGTTCAATAACTGTGA
GGTGGTCCTTGGGAATTTGGAAATTACCTATGTGCAGAGGAAT
TATGATCTTTCCTTCTTAAAGACCATCCAGGAGGTGGCTGGTTA
TGTCCTCATTGCCCTCAACACAGTGGAGCGAATTCCTTTGGAA
AACCTGCAGATCATCAGAGGAAATATGTACTACGAAAATTCCT
ATGCCTTAGCAGTCTTATCTAACTATGATGCAAATAAAACCGG
ACTGAAGGAGCTGCCCATGAGAAATTTACAGGAAATCCTGCAT
GGCGCCGTGCGGTTCAGCAACAACCCTGCCCTGTGCAACGTGG
AGAGCATCCAGTGGCGGGACATAGTCAGCAGTGACTTTCTCAG
CAACATGTCGATGGACTTCCAGAACCACCTGGGCAGCTGCCAA
AAGTGTGATCCAAGCTGTCCCAATGGGAGCTGCTGGGGTGCAG
GAGAGGAGAACTGCCAGAAACTGACCAAAATCATCTGTGCCC
AGCAGTGCTCCGGGCGCTGCCGTGGCAAGTCCCCCAGTGACTG
CTGCCACAACCAGTGTGCTGCAGGCTGCACAGGCCCCCGGGAG
AGCGACTGCCTGGTCTGCCGCAAATTCCGAGACGAAGCCACGT
GCAAGGACACCTGCCCCCCACTCATGCTCTACAACCCCACCAC
GTACCAGATGGATGTGAACCCCGAGGGCAAATACAGCTTTGGT
GCCACCTGCGTGAAGAAGTGTCCCCGTAATTATGTGGTGACAG
ATCACGGCTCGTGCGTCCGAGCCTGTGGGGCCGACAGCTATGA
GATGGAGGAAGACGGCGTCCGCAAGTGTAAGAAGTGCGAAGG
GCCTTGCCGCAAAGTGTGTAACGGAATAGGTATTGGTGAATTT
AAAGACTCACTCTCCATAAATGCTACGAATATTAAACACTTCA
AAAACTGCACCTCCATCAGTGGCGATCTCCACATCCTGCCGGT
GGCATTTAGGGGTGACTCCTTCACACATACTCCTCCTCTGGATC
CACAGGAACTGGATATTCTGAAAACCGTAAAGGAAATCACAG
GGTTTTTGCTGATTCAGGCTTGGCCTGAAAACAGGACGGACCT
CCATGCCTTTGAGAACCTAGAAATCATACGCGGCAGGACCAAG
CAACATGGTCAGTTTTCTCTTGCAGTCGTCAGCCTGAACATAAC
ATCCTTGGGATTACGCTCCCTCAAGGAGATAAGTGATGGAGAT

[0108]

GTGATAATTTCAGGAAACAAAAATTTGTGCTATGCAAATACAA
TAAACTGGAAAAAACTGTTTGGGACCTCCGGTCAGAAAACCAA
AATTATAAGCAACAGAGGTGAAAACAGCTGCAAGGCCACAGG
CCAGGTCTGCCATGCCTTGTGCTCCCCCGAGGGCTGCTGGGGC
CCGGAGCCCAGGGACTGCGTCTCTTGCCGGAATGTCAGCCGAG
GCAGGGAATGCGTGGACAAGTGCAACCTTCTGGAGGGTGAGC
CAAGGGAGTTTGTGGAGAACTCTGAGTGCATACAGTGCCACCC
AGAGTGCCTGCCTCAGGCCATGAACATCACCTGCACAGGACGG
GGACCAGACAACTGTATCCAGTGTGCCCACTACATTGACGGCC
CCCACTGCGTCAAGACCTGCCCGGCAGGAGTCATGGGAGAAA
ACAACACCCTGGTCTGGAAGTACGCAGACGCCGGCCATGTGTG
CCACCTGTGCCATCCAAACTGCACCTACGGATGCACTGGGCCA
GGTCTTGAAGGCTGTCCAACGAATGGGCCTAAGATCCCGTCCA
TCGCCACTGGGATGGTGGGGGCCCTCCTCTTGCTGCTGGTGGT
GGCCCTGGGGATCGGCCTCTTCATGCGAAGGCGCCACATCGTT
CGGAAGCGCACGCTGCGGAGGCTGCTGCAGGAGAGGGAGCTT
GTGGAGCCTCTTACACCCAGTGGAGAAGCTCCCAACCAAGCTC
TCTTGAGGATCTTGAAGGAAACTGAATTCAAAAAGATCAAAGT
GCTGGGCTCCGGTGCGTTCGGCACGGTGTATAAGGGACTCTGG
ATCCCAGAAGGTGAGAAAGTTAAAATTCCCGTCGCTATCAAGG
AATTAAGAGAAGCAACATCTCCGAAAGCCAACAAGGAAATCC
TCGATGAAGCCTACGTGATGGCCAGCGTGGACAACCCCCACGT
GTGCCGCCTGCTGGGCATCTGCCTCACCTCCACCGTGCAGCTC
ATCACGCAGCTCATGCCCTTCGGCTGCCTCCTGGACTATGTCCG
GGAACACAAAGACAATATTGGCTCCCAGTACCTGCTCAACTGG
TGTGTGCAGATCGCAAAGGGCATGAACTACTTGGAGGACCGTC
GCTTGGTGCACCGCGACCTGGCAGCCAGGAACGTACTGGTGAA
AACACCGCAGCATGTCAAGATCACAGATTTTGGGCTGGCCAAA
CTGCTGGGTGCGGAAGAGAAAGAATACCATGCAGAAGGAGGC
AAAGTGCCTATCAAGTGGATGGCATTGGAATCAATTTTACACA

GAATCTATACCCACCAGAGTGATGTCTGGAGCTACGGGGTGAC
TGTTTGGGAGTTGATGACCTTTGGATCCAAGCCATATGACGGA
ATCCCTGCCAGCGAGATCTCCTCCATCCTGGAGAAAGGAGAAC
GCCTCCCTCAGCCACCCATATGTACCATCGATGTCTACATGATC
ATGGTCAAGTGCTGGATGATAGACGCAGATAGTCGCCCAAAGT
TCCGTGAGTTGATCATCGAATTCTCCAAAATGGCCCGAGACCC
CCAGCGCTACCTTGTCATTCAGGGGGATGAAAGAATGCATTTG
CCAAGTCCTACAGACTCCAACTTCTACCGTGCCCTGATGGATG
AAGAAGACATGGACGACGTGGTGGATGCCGACGAGTACCTCA
TCCCACAGCAGGGCTTCTTCAGCAGCCCCTCCACGTCACGGAC
TCCCCTCCTGAGCTCTCTGAGTGCAACCAGCAACAATTCCACC
GTGGCTTGCATTGATAGAAATGGGCTGCAAAGCTGTCCCATCA
AGGAAGACAGCTTCTTGCAGCGATACAGCTCAGACCCCACAGG
CGCCTTGACTGAGGACAGCATAGACGACACCTTCCTCCCAGTG
CCTGAATACATAAACCAGTCCGTTCCCAAAAGGCCCGCTGGCT
CTGTGCAGAATCCTGTCTATCACAATCAGCCTCTGAACCCCGC
GCCCAGCAGAGACCCACACTACCAGGACCCCCACAGCACTGC
AGTGGGCAACCCCGAGTATCTCAACACTGTCCAGCCCACCTGT
GTCAACAGCACATTCGACAGCCCTGCCCACTGGGCCCAGAAAG
GCAGCCACCAAATTAGCCTGGACAACCCTGACTACCAGCAGGA
CTTCTTTCCCAAGGAAGCCAAGCCAAATGGCATCTTTAAGGGC
TCCACAGCTGAAAATGCAGAATACCTAAGGGTCGCGCCACAA
AGCAGTGAATTTATTGGAGCATGA (SEQ ID NO:343)。在一些实施方案中，DNA突变导致根据SEQ ID NO:330或SEQ ID NO:343的G719、E746、T790M、C797S、S768I、V769、H773、D770或L858突变。例如，在一些实施方案中，EGFR基因中的DNA突变编码或导致G719A、E746_A750del、T790M、C797S、S768I、V769_D770insASV、H773_V774insH、D770_N771insG、D770_N771insSVD或L858R突变的EGFR蛋白(编号根据SEQ ID NO:330)。这些DNA突变也在厂文的表A1中通过它们的核苷酸位置(而不是突变的多肽密码子)进行了描述。例如，在一些实施方案中，EGFR基因中的DNA突变导致对应于SEQ ID NO:343的cDNA序列中的c.2156G＞C、c.2235_2249del15、c.2236_2250del15、c.2369C＞T、c.2389T＞A、c.2390G＞C、c.2303G＞T、c.2307_2308ins9GCCAGCGTG、c.2319_2320insCAC、c.2310_2311insGGT、c.2311_2312ins9GCGTGGACA、c.2309_2310AC＞CCAGCGTGGAT或c.2573T＞G突变。

[0109] 在一些实施方案中，用于扩增EGFR突变(例如，编码或导致G719A突变的EGFR蛋白)的基因座的引物对分别包含序列CTTGTGGAGCCTCTTACACCC(SEQ ID NO:11)和TGCCGAACGCACCGGA(SEQ ID NO:12)。在一些实施方案中，用于扩增EGFR突变(例如，编码或导致E746_A750del突变的EGFR蛋白)的基因座的引物对分别包含序列GCCAGTTAACGTCTTCCTTCTC(SEQ ID NO:13)和ATCGAGGATTTCCTTGTTGGCTT(SEQ ID NO:14)。在一些实施方案中，用于扩增EGFR突变(例如，编码或导致T790M、C797S、S768I、V769_D770insASV、H773_V774insH、D770_N771insG、D770_N771insSVD或V769_D770insASV突变的EGFR蛋白)的基因座的引物对分别包含序列CCTCCACCGTGCAGATCATC(SEQ ID NO:15)和TTCCCTGATTACCTTTGCGAT(SEQ ID NO:16)。在一些实施方案中，用于扩增EGFR突变(例如，编码或导致T790M、C797S、S768I、V769_D770insASV、H773_V774insH、D770_N771insG、D770_N771insSVD或V769_D770insASV突变的EGFR蛋白)的基因座的引物对分别包含序列CCTCCACCGTGCAGATCATC(SEQ ID NO:15)和TTCCCTGATTACCTTTGCGAT(SEQ ID NO:16)。在一些实施方案中，用于扩增EGFR突变(例如，编码或导致S768突变的EGFR蛋白)的基因座的引物对分别包含序列CCACACTGACGTGCCTCT(SEQ ID NO:511)和GCACACGTAGGGGTTGTCCAAGA(SEQ ID NO:512)。在一些实施方案中，用于扩增EGFR突变(例如，编码或导致V769_D770insASV突变的EGFR蛋白)的基因座的引物对分别包含序列CCACACTGACGTGCCTCT(SEQ ID NO:513)和GTACACGCTGGCCACGCCG(SEQ ID NO:514)。在一些实施方案中，用于扩增EGFR突变(例如，编码或导致H773_V774insH突变的EGFR蛋白)的基因座的引物对分别包含序列CCACACTGACGTGCCTCT(SEQ ID NO:515)和CAGGCGGCACACGTGAT(SEQ ID NO:516)。在一些实施方案中，用于扩增EGFR突变(例如，编码或导致D770_N771insG突变的EGFR蛋白)的基因座的引物对分别包含序列CCACACTGACGTGCCTCT(SEQ ID NO:517)和AGGCGGCACACGTGCGGGTTAC(SEQ ID NO:518)。在一些实施方案中，用于扩增EGFR突变(例如，编码或导致L858R突变的EGFR蛋白)的基因座的引物对包含序列GGAGGACCGTCGCTTGG(SEQ ID NO:17)。

[0110] 在一些实施方案中，本公开的方法包括扩增AKT1基因中的一种或多种突变(例如，DNA突变)的基因座。AKT1编码在人类癌症中频繁发生突变的RAC-α丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶，其也称为AKT、CWS6、PKB、PKB-ALPHA、PRKBA、RAC和RAC-ALPHA。在一些实施方案中，AKT1基因是人AKT1基因。在一些实施方案中，人AKT1基因是指由NCBI Entrez Gene ID No.207描述的基因，包括其突变体和变体。在其他实施方案中，AKT1基因来自以下生物体之一：小鼠(参见例如NCBI Entrez Gene ID No.11651)、大鼠(参见例如NCBI Entrez Gene ID No.24185)、鱼(参见例如NCBI Entrez Gene ID No.101910198)、狗(参见例如NCBI Entrez Gene ID No.490878)、牛(参见例如NCBI Entrez Gene ID No.280991)、鸡(参见例如NCBIEntrez Gene ID No.395928)或黑猩猩(参见例如NCBI Entrez Gene ID No.740898)。

[0111] 与癌症相关的多种AKT1突变是已知的，并且可通过本文所述的方法合适地检测；参见例如Lovly,C.,L.Horn,W.Pao.2015.AKT1in Non-Small Cell Lung Cancer(NSCLC)。www.mycancergenome.org/content/disease/lung-cancer/akt1/的My Cancer Genome(6月18日更新)。AKT1原癌基因位于14号染色体上，编码丝氨酸-苏氨酸蛋白激酶(PKB)和在细胞增殖、存活、凋亡、细胞生长、葡萄糖代谢、基因组稳定性、转录和新血管形成中发挥作用的PI3K的下游效应子。AKT1促进mTOR信号传导通路的组成型激活和多种癌症中的糖酵解表型。在癌症中观察到的最频繁的AKT1改变是普列克底物蛋白(pleckstrin)同系物结构域中

的E17K。在某些癌症中还观察到了AKT1的扩增和过表达。AKT1中的点突变发生在肺癌中(0.6%),但在sqNSCLC中更频繁(2%-5%)。在肺癌中,1.01%在AKT1中具有拷贝数增加。测试AKT1突变可以用于确定对各种药物(诸如PI3K/AKT/mTOR抑制剂,包括依维莫司(everolimus))的敏感性。AKT1的组成型激活与多种癌症(包括肺癌中的EGFR-TKI)对化学疗法或放射疗法的抗性有关。虽然还没有直接的AKT抑制剂被批准用于癌症,但FDA批准的对AKT1敏感的药物包括依维莫司和西罗莫司(temsirolimus)。临床前数据报告了AKT抑制剂对某些AKT1突变(包括E17K)的抑制。各种变构和ATP竞争性AKT抑制剂当前正在进行临床试验。在本文所述的一些实施方案中,AKT1突变是基于根据人AKT1蛋白的所得氨基酸取代/缺失/移码命名的,例如,如下列出:MSDVAIVKEGWLH

KRGEYIKTWRPRYFLLKNDGTFIGYKERPQDVDQREAPLNNFSVA

QCQLMKTERPRPNTFIIRCLQWTTVIERTFHVETPEEREEWTTAIQ

TVADGLKKQEEEEMDFRSGSPSDNSGAEEMEVSLAKPKHRVTMN

EFEYLKLLGKGTFGKVILVKEKATGRYYAMKILKKEVIVAKDEV

AHTLTENRVLQNSRHPFLTALKYSFQTHDRLCFVMEYANGGELFF

HLSRERVFSEDRARFYGAEIVSALDYLHSEKNVVYRDLKLENLML

DKDGHIKITDFGLCKEGIKDGATMKTFCGTPEYLAPEVLEDNDYG

RAVDWWGLGVVMYEMMCGRLPFYNQDHEKLFELILMEEIRFPR

TLGPEAKSLLSGLLKKDPKQRLGGGSEDAKEIMQHRFFAGIVWQ

HVYEKKLSPPFKPQVTSETDTRYFDEEFTAQMITITPPDQDDSMEC

VDSERRPHFPQFSYSASGTA (SEQ ID NO:331)。示例性人AKT1 cDNA序列如下列出:ATGAGCGACGTGGCTATTGTGAAGGAGGG

TTGGCTGCACAAACGAGGGGAGTACATCAAGACCTGGCGGCC

ACGCTACTTCCTCCTCAAGAATGATGGCACCTTCATTGGCTACA

AGGAGCGGCCGCAGGATGTGGACCAACGTGAGGCTCCCCTCA

[0112]

ACAACTTCTCTGTGGCGCAGTGCCAGCTGATGAAGACGGAGCG
GCCCCGGCCCAACACCTTCATCATCCGCTGCCTGCAGTGGACC
ACTGTCATCGAACGCACCTTCCATGTGGAGACTCCTGAGGAGC
GGGAGGAGTGGACAACCGCCATCCAGACTGTGGCTGACGGCC
TCAAGAAGCAGGAGGAGGAGGAGATGGACTTCCGGTCGGGCT
CACCCAGTGACAACTCAGGGGCTGAAGAGATGGAGGTGTCCCT
GGCCAAGCCCAAGCACCGCGTGACCATGAACGAGTTTGAGTAC
CTGAAGCTGCTGGGCAAGGGCACTTTCGGCAAGGTGATCCTGG
TGAAGGAGAAGGCCACAGGCCGCTACTACGCCATGAAGATCC
TCAAGAAGGAAGTCATCGTGGCCAAGGACGAGGTGGCCCACA
CACTCACCGAGAACCGCGTCCTGCAGAACTCCAGGCACCCCTT
CCTCACAGCCCTGAAGTACTCTTTCCAGACCCACGACCGCCTCT
GCTTTGTCATGGAGTACGCCAACGGGGGCGAGCTGTTCTTCCA
CCTGTCCCGGGAGCGTGTGTTCTCCGAGGACCGGGCCCGCTTC
TATGGCGCTGAGATTGTGTCAGCCCTGGACTACCTGCACTCGG
AGAAGAACGTGGTGTACCGGGACCTCAAGCTGGAGAACCTCA
TGCTGGACAAGGACGGGCACATTAAGATCACAGACTTCGGGCT
GTGCAAGGAGGGGATCAAGGACGGTGCCACCATGAAGACCTT
TTGCGGCACACCTGAGTACCTGGCCCCCGAGGTGCTGGAGGAC
AATGACTACGGCCGTGCAGTGGACTGGTGGGGGCTGGGCGTG
GTCATGTACGAGATGATGTGCGGTCGCCTGCCCTTCTACAACC
AGGACCATGAGAAGCTTTTTGAGCTCATCCTCATGGAGGAGAT
CCGCTTCCCGCGCACGCTTGGTCCCGAGGCCAAGTCCTTGCTTT
CAGGGCTGCTCAAGAAGGACCCCAAGCAGAGGCTTGGCGGGG
GCTCCGAGGACGCCAAGGAGATCATGCAGCATCGCTTCTTTGC
CGGTATCGTGTGGCAGCACGTGTACGAGAAGAAGCTCAGCCCA
CCCTTCAAGCCCCAGGTCACGTCGGAGACTGACACCAGGTATT
TTGATGAGGAGTTCACGGCCCAGATGATCACCATCACACCACC
TGACCAAGATGACAGCATGGAGTGTGTGGACAGCGAGCGCAG
GCCCCACTTCCCCCAGTTCTCCTACTCGGCCAGCGGCACGGCCT
GA (SEQ ID NO:344)。在一些实施方案中,DNA突变导致根据SEQ ID NO:331或SEQ

ID NO:344的E17突变。例如,在一些实施方案中,AKT1基因中的DNA突变编码或导致E17K突变的AKT1蛋白(编号根据SEQ ID NO:331)。此DNA突变也在下文的表A1中通过它们的核苷酸位置(而不是突变的多肽密码子)进行了描述。例如,在一些实施方案中,AKT1基因中的DNA突变导致对应于SEQ ID NO:344的cDNA序列中的c.49G>A突变。

[0113] 在一些实施方案中,用于扩增AKT1突变(例如,编码或导致E17K突变的AKT1蛋白)的基因座的引物对分别包含序列GAGGGTCTGACGGGTAGAGTG(SEQ ID NO:380)和TGGCCGCCAGGTCTTGATGTA(SEQ ID NO:381)。

[0114] 在一些实施方案中,本公开的方法包括扩增MEK1基因中的一种或多种突变(例如,DNA突变)的基因座。MEK1编码在人类癌症中频繁发生突变的双重特异性丝裂原激活蛋白激酶激酶1,其也称为MAP2K1、CFC3、MAPKK1、MKK1和PRKMK1。在一些实施方案中,MEK1基因是人MEK1基因。在一些实施方案中,人MEK1基因是指由NCBI Entrez Gene ID No.5604描述的基因,包括其突变体和变体。在其他实施方案中,MEK1基因来自以下生物体之一:小鼠(参见例如NCBI Entrez Gene ID No.26395)、大鼠(参见例如NCBI Entrez Gene ID No.170851)、鱼(参见例如NCBI Entrez Gene ID No.406728)、狗(参见例如NCBI Entrez Gene ID No.478347)、牛(参见例如NCBI Entrez Gene ID No.533199)、马(参见例如NCBI Entrez Gene ID No.100065996)、黑猩猩(参见例如NCBI Entrez Gene ID No.450188)或猕猴(参见例如NCBI Entrez Gene ID No.710415)。

[0115] 与癌症相关的多种MEK1突变是已知的,并且可通过本文所述的方法合适地检测;参见例如Lovly,C.,L.Horn,W.Pao.2015.MEK1(MAP2K1)in Non-Small Cell Lung Cancer(NSCLC)。www.mycancergenome.org/content/disease/lung-cancer/map2k1/的My Cancer Genome(6月18日更新)。在本文所述的一些实施方案中,MEK1突变是基于根据人MEK1蛋白的所得氨基酸取代/缺失/移码命名的,例如,如下列出:

MPKKKPTPIQLNPAPDGSAVNGTSSAETNLEALQKKLE
ELELDEQQRKRLEAFLTQKQKVGELKDDDFEKISELGAGNGGVV
FKVSHKPSGLVMARKLIHLEIKPAIRNQIIRELQVLHECNSPYIVGF
YGAFYSDGEISICMEHMDGGSLDQVLKKAGRIPEQILGKVSIAVIK
GLTYLREKHKIMHRDVKPSNILVNSRGEIKLCDFGVSGQLIDSMA
NSFVGTRSYMSPERLQGTHYSVQSDIWSMGLSLVEMAVGRYPIPP
PDAKELELMFGCQVEGDAAETPPRPRTPGRPLSSYGMDSRPPMAI
FELLDYIVNEPPPKLPSGVFSLEFQDFVNKCLIKNPAERADLKQLM
VHAFIKRSDAEEVDFAGWLCSTIGLNQPSTPTHAAGV (SEQ ID NO:332)。示例性人MEK1 cDNA序列如下列出:ATGCCCAAGAAG

AAGCCGACGCCCATCCAGCTGAACCCGGCCCCCGACGGCTCTG
CAGTTAACGGGACCAGCTCTGCGGAGACCAACTTGGAGGCCTT
GCAGAAGAAGCTGGAGGAGCTAGAGCTTGATGAGCAGCAGCG
AAAGCGCCTTGAGGCCTTTCTTACCCAGAAGCAGAAGGTGGGA
GAACTGAAGGATGACGACTTTGAGAAGATCAGTGAGCTGGGG
GCTGGCAATGGCGGTGTGGTGTTCAAGGTCTCCCACAAGCCTT
CTGGCCTGGTCATGGCCAGAAAGCTAATTCATCTGGAGATCAA
ACCCGCAATCCGGAACCAGATCATAAGGGAGCTGCAGGTTCTG
CATGAGTGCAACTCTCCGTACATCGTGGGCTTCTATGGTGCGTT
CTACAGCGATGGCGAGATCAGTATCTGCATGGAGCACATGGAT
GGAGGTTCTCTGGATCAAGTCCTGAAGAAAGCTGGAAGAATTC
CTGAACAAATTTTAGGAAAAGTTAGCATTGCTGTAATAAAAGG
CCTGACATATCTGAGGGAGAAGCACAAGATCATGCACAGAGA
TGTCAAGCCCTCCAACATCCTAGTCAACTCCCGTGGGGAGATC
AAGCTCTGTGACTTTGGGGTCAGCGGGCAGCTCATCGACTCCA
TGGCCAACTCCTTCGTGGGCACAAGGTCCTACATGTCGCCAGA
AAGACTCCAGGGGACTCATTACTCTGTGCAGTCAGACATCTGG
AGCATGGGACTGTCTCTGGTAGAGATGGCGGTTGGGAGGTATC
CCATCCCTCCTCCAGATGCCAAGGAGCTGGAGCTGATGTTTGG
GTGCCAGGTGGAAGGAGATGCGGCTGAGACCCCACCCAGGCC
AAGGACCCCCGGGAGGCCCCTTAGCTCATACGGAATGGACAG
CCGACCTCCCATGGCAATTTTTGAGTTGTTGGATTACATAGTCA
ACGAGCCTCCTCCAAAACTGCCCAGTGGAGTGTTCAGTCTGGA
ATTTCAAGATTTTGTGAATAAATGCTTAATAAAAAACCCCGCA
GAGAGAGCAGATTTGAAGCAACTCATGGTTCATGCTTTTATCA
AGAGATCTGATGCTGAGGAAGTGGATTTTGCAGGTTGGCTCTG
CTCCACCATCGGCCTTAACCAGCCCAGCACACCAACCCATGCT
GCTGGCGTCTAA (SEQ ID NO:345)。在一些实施方案中,DNA突变导致根据SEQ ID NO:332或SEQ ID NO:345的Q56或K57突变。例如,在一些实施方案中,MEK1基因中的DNA突变编码或导致K57N突变的MEK1蛋白(编号根据SEQ ID NO:332)。这些DNA突变也在厂文的表A1中通过它们的核苷酸位置(而不是突变的多肽密码子)进行了描述。例如,在一些实施

方案中,MEK1基因中的DNA突变导致对应于SEQ ID NO:345的cDNA序列中的c.171G>T突变。

[0116] 在一些实施方案中,用于扩增MEK1突变(例如,编码或导致K57N突变的MEK1蛋白)的基因座的引物对包含序列CCTTCAGTTCTCCCACCTTCTG(SEQ ID NO:398)。

[0117] 在一些实施方案中,本公开的方法包括扩增HER2基因中的一种或多种突变(例如,DNA突变)的基因座。HER2编码HER2/neu原癌基因,这是在人类癌症中频繁发生突变的受体酪氨酸激酶,也称为ERBB2、HER-2、CD340、MLN19、NEU、NGL和TKR1。在一些实施方案中,HER2基因是人HER2基因。在一些实施方案中,人HER2基因是指由NCBI Entrez Gene ID No.2064描述的基因,包括其突变体和变体。在其他实施方案中,HER2基因来自以下生物体之一:小鼠(参见例如NCBI Entrez Gene ID No.13866)、大鼠(参见例如NCBI Entrez Gene ID No.24337)、鱼(参见例如NCBI Entrez Gene ID No.30300)、狗(参见例如NCBI Entrez Gene ID No.403883)、马(参见例如NCBI Entrez Gene ID No.100054739)、黑猩猩(参见例如NCBI Entrez Gene ID No.454636)或猫(参见例如NCBI Entrez Gene ID No.751824)。

[0118] 与癌症相关的多种HER2突变是已知的,并且可通过本文所述的方法合适地检测;参见例如Lovly,C.,L.Horn,W.Pao.2015.HER2(ERBB2)in Non-Small Cell Lung Cancer(NSCLC)。www.mycancergenome.org/content/disease/lung-cancer/erbb2/的My Cancer Genome(6月18日更新)。在癌症中发现的ERBB2中的改变还包括激酶结构域中的插入或细胞外结构域中的缺失。ERBB2的细胞外结构域的大量缺失导致突变体p95HER2和Δ16HER2。其他常见的突变残基包括G309、S310、S335、L755、777和842。HER2激活与多种癌症类型(包括具有EGFR的共表达的NSCLC)的不良预后相关。在EGFR T790M之后,HER2和MET扩增是在第一代EGFR TKI下在NSLC中的获得性抗性(10%-20%)的最常见发现。FDA批准的对ERBB2敏感的药物包括曲妥珠单抗(trastuzumab)、阿法替尼、拉帕替尼和帕妥珠单抗(pertuzumab)。T790M/激活突变的比例可预测对第三代TKI保持敏感的时间更长的患者。HER2+状态与对内分泌和化学治疗方案的抗性相关。改变(包括95HER2、Δ16HER2、L726、L755、P780和外显子20中的小插入)对曲妥珠单抗或拉帕替尼具有抗性。为了克服对第一代EGFR/HER抑制剂的抗性,第二代EGFR/HER-TKI(包括阿法替尼、达克替尼(dacomitinib)和来那替尼(neratinib))不可逆地阻断EGFR、HER2和HER4的酶促激活。在本文所述的一些实施方案中,HER2突变是基于根据人HER2蛋白的所得氨基酸取代/缺失/移码命名的,例如,如下列出:

MELAALCRWGLLLALLPPGAASTQVCTGT

DMKLRLPASPETHLDMLRHLYQGCQVVQGNLELTYLPTNASLSF

LQDIQEVQGYVLIAHNQVRQVPLQRLRIVRGTQLFEDNYALAVLD

NGDPLNNTTPVTGASPGGLRELQLRSLTEILKGGVLIQRNPQLCYQ

DTILWKDIFHKNNQLALTLIDTNRSRACHPCSPMCKGSRCWGESS

EDCQSLTRTVCAGGCARCKGPLPTDCCHEQCAAGCTGPKHSDCL

ACLHFNHSGICELHCPALVTYNTDTFESMPNPEGRYTFGASCVTA
CPYNYLSTDVGSCTLVCPLHNQEVTAEDGTQRCEKCSKPCARVC
YGLGMEHLREVRAVTSANIQEFAGCKKIFGSLAFLPESFDGDPAS
NTAPLQPEQLQVFETLEEITGYLYISAWPDSLPDLSVFQNLQVIRG
RILHNGAYSLTLQGLGISWLGLRSLRELGSGLALIHHNTHLCFVHT
VPWDQLFRNPHQALLHTANRPEDECVGEGLACHQLCARGHCWG
PGPTQCVNCSQFLRGQECVEECRVLQGLPREYVNARHCLPCHPEC
QPQNGSVTCFGPEADQCVACAHYKDPPFCVARCPSGVKPDLSYM
PIWKFPDEEGACQPCPINCTHSCVDLDDKGCPAEQRASPLTSIISAV
VGILLVVVLGVVFGILIKRRQQKIRKYTMRRLLQETELVEPLTPSG
AMPNQAQMRILKETELRKVKVLGSGAFGTVYKGIWIPDGENVKIP
VAIKVLRENTSPKANKEILDEAYVMAGVGSPYVSRLLGICLTSTV
QLVTQLMPYGCLLDHVRENRGRLGSQDLLNWCMQIAKGMSYLE
DVRLVHRDLAARNVLVKSPNHVKITDFGLARLLDIDETEYHADG
GKVPIKWMALESILRRRFTHQSDVWSYGVTVWELMTFGAKPYD
GIPAREIPDLLEKGERLPQPPICTIDVYMIMVKCWMIDSECRPRFRE
LVSEFSRMARDPQRFVVIQNEDLGPASPLDSTFYRSLLEDDDMGD
LVDAEEYLVPQQGFFCPDPAPGAGGMVHHRHRSSSTRNM (SEQ
ID NO:333)。示例性人HER2 cDNA序列如下列出：ATGGAGCTG
GCGGCCTTGTGCCGCTGGGGGCTCCTCCTCGCCCTCTTGCCCCC
CGGAGCCGCGAGCACCCAAGTGTGCACCGGCACAGACATGAA
GCTGCGGCTCCCTGCCAGTCCCGAGACCCACCTGGACATGCTC
CGCCACCTCTACCAGGGCTGCCAGGTGGTGCAGGGAAACCTGG
AACTCACCTACCTGCCCACCAATGCCAGCCTGTCCTTCCTGCAG
GATATCCAGGAGGTGCAGGGCTACGTGCTCATCGCTCACAACC
AAGTGAGGCAGGTCCCACTGCAGAGGCTGCGGATTGTGCGAG
GCACCCAGCTCTTTGAGGACAACTATGCCCTGGCCGTGCTAGA
CAATGGAGACCCGCTGAACAATACCACCCCTGTCACAGGGGCC
TCCCCAGGAGGCCTGCGGGAGCTGCAGCTTCGAAGCCTCACAG
AGATCTTGAAAGGAGGGGTCTTGATCCAGCGGAACCCCCAGCT

[0119]

CTGCTACCAGGACACGATTTTGTGGAAGGACATCTTCCACAAG
AACAACCAGCTGGCTCTCACACTGATAGACACCAACCGCTCTC
GGGCCTGCCACCCCTGTTCTCCGATGTGTAAGGGCTCCCGCTG
CTGGGGAGAGAGTTCTGAGGATTGTCAGAGCCTGACGCGCACT
GTCTGTGCCGGTGGCTGTGCCCGCTGCAAGGGGCCACTGCCCA
CTGACTGCTGCCATGAGCAGTGTGCTGCCGGCTGCACGGGCCC
CAAGCACTCTGACTGCCTGGCCTGCCTCCACTTCAACCACAGT
GGCATCTGTGAGCTGCACTGCCCAGCCCTGGTCACCTACAACA
CAGACACGTTTGAGTCCATGCCCAATCCCGAGGGCCGGTATAC
ATTCGGCGCCAGCTGTGTGACTGCCTGTCCCTACAACTACCTTT
CTACGGACGTGGGATCCTGCACCCTCGTCTGCCCCCTGCACAA
CCAAGAGGTGACAGCAGAGGATGGAACACAGCGGTGTGAGAA
GTGCAGCAAGCCCTGTGCCCGAGTGTGCTATGGTCTGGGCATG
GAGCACTTGCGAGAGGTGAGGGCAGTTACCAGTGCCAATATCC
AGGAGTTTGCTGGCTGCAAGAAGATCTTTGGGAGCCTGGCATT
TCTGCCGGAGAGCTTTGATGGGGACCCAGCCTCCAACACTGCC
CCGCTCCAGCCAGAGCAGCTCCAAGTGTTTGAGACTCTGGAAG
AGATCACAGGTTACCTATACATCTCAGCATGGCCGGACAGCCT
GCCTGACCTCAGCGTCTTCCAGAACCTGCAAGTAATCCGGGGA
CGAATTCTGCACAATGGCGCCTACTCGCTGACCCTGCAAGGGC
TGGGCATCAGCTGGCTGGGGCTGCGCTCACTGAGGGAACTGGG
CAGTGGACTGGCCCTCATCCACCATAACACCCACCTCTGCTTC
GTGCACACGGTGCCCTGGGACCAGCTCTTTCGGAACCCGCACC
AAGCTCTGCTCCACACTGCCAACCGGCCAGAGGACGAGTGTGT
GGGCGAGGGCCTGGCCTGCCACCAGCTGTGCGCCCGAGGGCA
CTGCTGGGGTCCAGGGCCCACCCAGTGTGTCAACTGCAGCCAG
TTCCTTCGGGGCCAGGAGTGCGTGGAGGAATGCCGAGTACTGC
AGGGGCTCCCCAGGGAGTATGTGAATGCCAGGCACTGTTTGCC
GTGCCACCCTGAGTGTCAGCCCCAGAATGGCTCAGTGACCTGT
TTTGGACCGGAGGCTGACCAGTGTGTGGCCTGTGCCCACTATA

[0120]

AGGACCCTCCCTTCTGCGTGGCCCGCTGCCCCAGCGGTGTGAA
ACCTGACCTCTCCTACATGCCCATCTGGAAGTTTCCAGATGAG
GAGGGCGCATGCCAGCCTTGCCCCATCAACTGCACCCACTCCT
GTGTGGACCTGGATGACAAGGGCTGCCCCGCCGAGCAGAGAG
CCAGCCCTCTGACGTCCATCATCTCTGCGGTGGTTGGCATTCTG
CTGGTCGTGGTCTTGGGGGTGGTCTTTGGGATCCTCATCAAGC
GACGGCAGCAGAAGATCCGGAAGTACACGATGCGGAGACTGC
TGCAGGAAACGGAGCTGGTGGAGCCGCTGACACCTAGCGGAG
CGATGCCCAACCAGGCGCAGATGCGGATCCTGAAAGAGACGG
AGCTGAGGAAGGTGAAGGTGCTTGGATCTGGCGCTTTTGGCAC
AGTCTACAAGGGCATCTGGATCCCTGATGGGGAGAATGTGAAA
ATTCCAGTGGCCATCAAAGTGTTGAGGGAAAACACATCCCCCA
AAGCCAACAAAGAAATCTTAGACGAAGCATACGTGATGGCTG
GTGTGGGCTCCCCATATGTCTCCCGCCTTCTGGGCATCTGCCTG
ACATCCACGGTGCAGCTGGTGACACAGCTTATGCCCTATGGCT
GCCTCTTAGACCATGTCCGGGAAAACCGCGGACGCCTGGGCTC
CCAGGACCTGCTGAACTGGTGTATGCAGATTGCCAAGGGGATG
AGCTACCTGGAGGATGTGCGGCTCGTACACAGGGACTTGGCCG
CTCGGAACGTGCTGGTCAAGAGTCCCAACCATGTCAAAATTAC
AGACTTCGGGCTGGCTCGGCTGCTGGACATTGACGAGACAGAG
TACCATGCAGATGGGGGCAAGGTGCCCATCAAGTGGATGGCG
CTGGAGTCCATTCTCCGCCGGCGGTTCACCCACCAGAGTGATG
TGTGGAGTTATGGTGTGACTGTGTGGGAGCTGATGACTTTTGG
GGCCAAACCTTACGATGGGATCCCAGCCCGGGAGATCCCTGAC
CTGCTGGAAAAGGGGGAGCGGCTGCCCCAGCCCCCCATCTGCA
CCATTGATGTCTACATGATCATGGTCAAATGTTGGATGATTGA
CTCTGAATGTCGGCCAAGATTCCGGGAGTTGGTGTCTGAATTC
TCCCGCATGGCCAGGGACCCCCAGCGCTTTGTGGTCATCCAGA
ATGAGGACTTGGGCCCAGCCAGTCCCTTGGACAGCACCTTCTA
CCGCTCACTGCTGGAGGACGATGACATGGGGGACCTGGTGGAT

GCTGAGGAGTATCTGGTACCCCAGCAGGGCTTCTTCTGTCCAG
ACCCTGCCCCGGGCGCTGGGGGCATGGTCCACCACAGGCACCG
CAGCTCATCTACCAGGAATATGTGA (SEQ ID NO:346)。在一些实施方案中,DNA突变导致根据SEQ ID NO:333或SEQ ID NO:346的A775或G776突变。例如,在一些实施方案中,HER2基因中的DNA突变编码或导致A775_G776insYVMA突变的HER2蛋白(编号根据SEQ ID NO:333)。这些DNA突变也在厂文的表A1中通过它们的核苷酸位置(而不是突变的多肽密码子)进行了描述。例如,在一些实施方案中,HER2基因中的DNA突变导致对应于SEQ ID NO:346的cDNA序列中的c.2324_2325ins12突变。

[0121] 在一些实施方案中,用于扩增HER2突变(例如,编码或导致A775G776insYVMA突变的HER2蛋白)的基因座的引物对分别包含序列ATGGCTGTGGTTTGTGATGGT(SEQ ID NO:414)和ACACCAGCCATCACGTAAGACA(SEQ ID NO:415)。

[0122] 示例性和非限制性DNA突变在下文的表A中提供。

[0123] 在一些实施方案中,本公开的方法包括扩增ALK基因中的一种或多种突变(例如,RNA突变)的基因座。ALK编码间变性淋巴瘤激酶,这是在人类癌症中频繁发生突变的受体酪氨酸激酶,也称为CD246、NBLST3或ALK酪氨酸激酶受体。在一些实施方案中,ALK基因是人ALK基因。在一些实施方案中,人ALK基因是指由NCBI EntrezGene ID No.238描述的基因,包括其突变体和变体。在其他实施方案中,ALK基因来自以下生物体之一:小鼠(参见例如NCBI Entrez Gene ID No.11682)、大鼠(参见例如NCBI Entrez Gene ID No.266802)、鱼(参见例如NCBI Entrez Gene ID No.563509)、牛(参见例如NCBIEntrez Gene ID No.536642)、鸡(参见例如NCBI Entrez Gene ID No.421297)或黑猩猩(参见例如NCBI Entrez Gene ID No.459127)。

[0124] 与癌症相关的多种ALK突变是已知的,并且可通过本文所述的方法合适地检测;参见例如Lovly,C.,L.Horn,W.Pao.2015.ALK in Non-Small Cell Lung Cancer(NSCLC)。www.mycancergenome.org/content/disease/lung-cancer/alk/的My Cancer Genome(9月29日更新)。2号染色体上的ALK基因编码参与细胞生长、转化和分化的受体酪氨酸激酶。ALK中的改变组成型地激活了调节JAK-STAT3、PI3K-AKT和RAS-MAPK通路并且在各种组织中驱动肿瘤发生的激酶。最常见的ALK改变是可通过荧光原位杂交(FISH)检测到的基因重排。除了融合之外,各种癌症还具有ALK中的功能突变增益,诸如F1174L、D1091N、I1250T和R1275。ALK重排的NSCLC占所有NSCLC的3%-7%。8%的ALK重排的NSCLC也是EGFR+或KRAS+突变的。在大约60%-70%的ALK+患者中,ALK重排与对克唑替尼(crizotinib)的响应相关。已知许多点突变(诸如F1174L)与对ALK抑制剂疗法的抗性有关。另外,ALK拷贝数增加以及其他驱动基因(诸如EGFR)中的激活突变可能是经受ALK抑制剂疗法的患者的获得性抗性机制。FDA批准的对ALK敏感的NSCLC药物包括塞瑞替尼(ceritinib)、艾乐替尼(alectinib)和克唑替尼。证据表明,对克唑替尼的不同主要响应取决于NSCLC中的ALK融合配偶体。热休克蛋白90(HSP90)抑制剂呈现出潜在的治疗路线,这是由于ALK融合(诸如EML4-ALK)对HSP90稳定性的依赖性。下一代药剂(诸如艾乐替尼)可挽救接受克唑替尼和塞瑞替尼治疗的ALK+患者的CNS转移。在本文所述的一些实施方案中,ALK突变是基于根据人ALK蛋白的所得氨基酸取代/缺失/移码/易位命名的,例如,如下列出:MGAIGLLWLLPLLLSTA

AVGSGMGTGQRAGSPAAGPPLQPREPLSYSRLQRKSLAVDFVVPS
LFRVYARDLLLPPSSSELKAGRPEARGSLALDCAPLLRLLGPAPGV
SWTAGSPAPAEARTLSRVLKGGSVRKLRRAKQLVLELGEEAILEG
CVGPPGEAAVGLLQFNLSELFSWWIRQGEGRLRIRLMPEKKASEV
GREGRLSAAIRASQPRLLFQIFGTGHSSLESPTNMPSPSPDYFTWN
LTWIMKDSFPFLSHRSRYGLECSFDFPCELEYSPPLHDLRNQSWS
WRRIPSEEASQMDLLDGPGAERSKEMPRGSFLLLNTSADSKHTILS
PWMRSSSEHCTLAVSVHRHLQPSGRYIAQLLPHNEAAREILLMPT

[0125]

PGKHGWTVLQGRIGRPDNPFRVALEYISSGNRSLSAVDFFALKNC
SEGTSPGSKMALQSSFTCWNGTVLQLGQACDFHQDCAQGEDESQ
MCRKLPVGFYCNFEDGFCGWTQGTLSPHTPQWQVRTLKDARFQ
DHQDHALLLSTTDVPASESATVTSATFPAPIKSSPCELRMSWLIRG
VLRGNVSLVLVENKTGKEQGRMVWHVAAYEGLSLWQWMVLPL
LDVSDRFWLQMVAWWGQGSRAIVAFDNISISLDCYLTISGEDKIL
QNTAPKSRNLFERNPNKELKPGENSPRQTPIFDPTVHWLFTTCGAS
GPHGPTQAQCNNAYQNSNLSVEVGSEGPLKGIQIWKVPATDTYSI
SGYGAAGGKGGKNTMMRSHGVSVLGIFNLEKDDMLYILVGQQG
EDACPSTNQLIQKVCIGENNVIEEEIRVNRSVHEWAGGGGGGGGA
TYVFKMKDGVPVPLIIAAGGGGRAYGAKTDTFHPERLENNSSVL
GLNGNSGAAGGGGGWNDNTSLLWAGKSLQEGATGGHSCPQAM
KKWGWETRGGFGGGGGGCSSGGGGGGYIGGNAASNNDPEMDG
EDGVSFISPLGILYTPALKVMEGHGEVNIKHYLNCSHCEVDECHM
DPESHKVICFCDHGTVLAEDGVSCIVSPTPEPHLPLSLILSVVTSAL
VAALVLAFSGIMIVYRRKHQELQAMQMELQSPEYKLSKLRTSTIM
TDYNPNYCFAGKTSSISDLKEVPRKNITLIRGLGHGAFGEVYEGQ
VSGMPNDPSPLQVAVKTLPEVCSEQDELDFLMEALIISKFNHQNIV
RCIGVSLQSLPRFILLELMAGGDLKSFLRETRPRPSQPSSLAMLDLL
HVARDIACGCQYLEENHFIHRDIAARNCLLTCPGPGRVAKIGDFG
MARDIYRASYYRKGGCAMLPVKWMPPEAFMEGIFTSKTDTWSF
GVLLWEIFSLGYMPYPSKSNQEVLEFVTSGGRMDPPKNCPGPVYR
IMTQCWQHQPEDRPNFAIILERIEYCTQDPDVINTALPIEYGPLVEE
EEKVPVRPKDPEGVPPLLVSQQAKREEERSPAAPPPLPTTSSGKAA
KKPTAAEISVRVPRGPAVEGGHVNMAFSQSNPPSELHKVHGSRN
KPTSLWNPTYGSWFTEKPTKKNNPIAKKEPHDRGNLGLEGSCTVP
PNVATGRLPGASLLLEPSSLTANMKEVPLFRLRHFPCGNVNYGYQ
QQGLPLEAATAPGAGHYEDTILKSKNSMNQPGP (SEQ ID NO:33
4)。示例性人 *ALK* cDNA 序列如下列出：ATGGGAGCCATCGGGCT
CCTGTGGCTCCTGCCGCTGCTGCTTTCCACGGCAGCTGTGGGCT

[0126]

CCGGGATGGGGACCGGCCAGCGCGCGGGCTCCCCAGCTGCGG
GGCCGCCGCTGCAGCCCCGGGAGCCACTCAGCTACTCGCGCCT
GCAGAGGAAGAGTCTGGCAGTTGACTTCGTGGTGCCCTCGCTC
TTCCGTGTCTACGCCCGGGACCTACTGCTGCCACCATCCTCCTC
GGAGCTGAAGGCTGGCAGGCCCGAGGCCCGCGGCTCGCTAGC
TCTGGACTGCGCCCCGCTGCTCAGGTTGCTGGGGCCGGCGCCG
GGGGTCTCCTGGACCGCCGGTTCACCAGCCCCGGCAGAGGCCC
GGACGCTGTCCAGGGTGCTGAAGGGCGGCTCCGTGCGCAAGCT
CCGGCGTGCCAAGCAGTTGGTGCTGGAGCTGGGCGAGGAGGC
GATCTTGGAGGGTTGCGTCGGGCCCCCCGGGGAGGCGGCTGTG
GGGCTGCTCCAGTTCAATCTCAGCGAGCTGTTCAGTTGGTGGA
TTCGCCAAGGCGAAGGGCGACTGAGGATCCGCCTGATGCCCGA
GAAGAAGGCGTCGGAAGTGGGCAGAGAGGGAAGGCTGTCCGC
GGCAATTCGCGCCTCCCAGCCCCGCCTTCTCTTCCAGATCTTCG
GGACTGGTCATAGCTCCTTGGAATCACCAACAAACATGCCTTC
TCCTTCTCCTGATTATTTTACATGGAATCTCACCTGGATAATGA
AAGACTCCTTCCCTTTCCTGTCTCATCGCAGCCGATATGGTCTG
GAGTGCAGCTTTGACTTCCCCTGTGAGCTGGAGTATTCCCCTCC
ACTGCATGACCTCAGGAACCAGAGCTGGTCCTGGCGCCGCATC
CCCTCCGAGGAGGCCTCCCAGATGGACTTGCTGGATGGGCCTG
GGGCAGAGCGTTCTAAGGAGATGCCCAGAGGCTCCTTTCTCCT
TCTCAACACCTCAGCTGACTCCAAGCACACCATCCTGAGTCCG
TGGATGAGGAGCAGCAGTGAGCACTGCACACTGGCCGTCTCGG
TGCACAGGCACCTGCAGCCCTCTGGAAGGTACATTGCCCAGCT
GCTGCCCCACAACGAGGCTGCAAGAGAGATCCTCCTGATGCCC
ACTCCAGGGAAGCATGGTTGGACAGTGCTCCAGGGAAGAATC
GGGCGTCCAGACAACCCATTTCGAGTGGCCCTGGAATACATCT
CCAGTGGAAACCGCAGCTTGTCTGCAGTGGACTTCTTTGCCCT
GAAGAACTGCAGTGAAGGAACATCCCCAGGCTCCAAGATGGC
CCTGCAGAGCTCCTTCACTTGTTGGAATGGGACAGTCCTCCAG

[0127]

CTTGGGCAGGCCTGTGACTTCCACCAGGACTGTGCCCAGGGAG
AAGATGAGAGCCAGATGTGCCGGAAACTGCCTGTGGGTTTTTA
CTGCAACTTTGAAGATGGCTTCTGTGGCTGGACCCAAGGCACA
CTGTCACCCCACACTCCTCAATGGCAGGTCAGGACCCTAAAGG
ATGCCCGGTTCCAGGACCACCAAGACCATGCTCTATTGCTCAG
TACCACTGATGTCCCCGCTTCTGAAAGTGCTACAGTGACCAGT
GCTACGTTTCCTGCACCGATCAAGAGCTCTCCATGTGAGCTCC
GAATGTCCTGGCTCATTCGTGGAGTCTTGAGGGGAAACGTGTC
CTTGGTGCTAGTGGAGAACAAAACCGGGAAGGAGCAAGGCAG
GATGGTCTGGCATGTCGCCGCCTATGAAGGCTTGAGCCTGTGG
CAGTGGATGGTGTTGCCTCTCCTCGATGTGTCTGACAGGTTCTG
GCTGCAGATGGTCGCATGGTGGGGACAAGGATCCAGAGCCAT
CGTGGCTTTTGACAATATCTCCATCAGCCTGGACTGCTACCTCA
CCATTAGCGGAGAGGACAAGATCCTGCAGAATACAGCACCCA
AATCAAGAAACCTGTTTGAGAGAAACCCAAACAAGGAGCTGA
AACCCGGGGAAAATTCACCAAGACAGACCCCCATCTTTGACCC
TACAGTTCATTGGCTGTTCACCACATGTGGGGCCAGCGGGCCC
CATGGCCCCACCCAGGCACAGTGCAACAACGCCTACCAGAACT
CCAACCTGAGCGTGGAGGTGGGGAGCGAGGGCCCCCTGAAAG
GCATCCAGATCTGGAAGGTGCCAGCCACCGACACCTACAGCAT
CTCGGGCTACGGAGCTGCTGGCGGGAAAGGCGGGAAGAACAC
CATGATGCGGTCCCACGGCGTGTCTGTGCTGGGCATCTTCAAC
CTGGAGAAGGATGACATGCTGTACATCCTGGTTGGGCAGCAGG
GAGAGGACGCCTGCCCCAGTACAAACCAGTTAATCCAGAAAG
TCTGCATTGGAGAGAACAATGTGATAGAAGAAGAAATCCGTGT
GAACAGAAGCGTGCATGAGTGGGCAGGAGGCGGAGGAGGAG
GGGGTGGAGCCACCTACGTATTTAAGATGAAGGATGGAGTGCC
GGTGCCCCTGATCATTGCAGCCGGAGGTGGTGGCAGGGCCTAC
GGGGCCAAGACAGACACGTTCCACCCAGAGAGACTGGAGAAT
AACTCCTCGGTTCTAGGGCTAAACGGCAATTCCGGAGCCGCAG

[0128]

GTGGTGGAGGTGGCTGGAATGATAACACTTCCTTGCTCTGGGC
CGGAAAATCTTTGCAGGAGGGTGCCACCGGAGGACATTCCTGC
CCCCAGGCCATGAAGAAGTGGGGGTGGGAGACAAGAGGGGGT
TTCGGAGGGGGTGGAGGGGGGTGCTCCTCAGGTGGAGGAGGC
GGAGGATATATAGGCGGCAATGCAGCCTCAAACAATGACCCC
GAAATGGATGGGGAAGATGGGGTTTCCTTCATCAGTCCACTGG
GCATCCTGTACACCCCAGCTTTAAAAGTGATGGAAGGCCACGG
GGAAGTGAATATTAAGCATTATCTAAACTGCAGTCACTGTGAG
GTAGACGAATGTCACATGGACCCTGAAAGCCACAAGGTCATCT
GCTTCTGTGACCACGGGACGGTGCTGGCTGAGGATGGCGTCTC
CTGCATTGTGTCACCCACCCCGGAGCCACACCTGCCACTCTCG
CTGATCCTCTCTGTGGTGACCTCTGCCCTCGTGGCCGCCCTGGT
CCTGGCTTTCTCCGGCATCATGATTGTGTACCGCCGGAAGCAC
CAGGAGCTGCAAGCCATGCAGATGGAGCTGCAGAGCCCTGAG
TACAAGCTGAGCAAGCTCCGCACCTCGACCATCATGACCGACT
ACAACCCCAACTACTGCTTTGCTGGCAAGACCTCCTCCATCAG
TGACCTGAAGGAGGTGCCGCGGAAAAACATCACCCTCATTCGG
GGTCTGGGCCATGGCGCCTTTGGGGAGGTGTATGAAGGCCAGG
TGTCCGGAATGCCCAACGACCCAAGCCCCCTGCAAGTGGCTGT
GAAGACGCTGCCTGAAGTGTGCTCTGAACAGGACGAACTGGAT
TTCCTCATGGAAGCCCTGATCATCAGCAAATTCAACCACCAGA
ACATTGTTCGCTGCATTGGGGTGAGCCTGCAATCCCTGCCCCG
GTTCATCCTGCTGGAGCTCATGGCGGGGGGAGACCTCAAGTCC
TTCCTCCGAGAGACCCGCCCTCGCCCGAGCCAGCCCTCCTCCCT
GGCCATGCTGGACCTTCTGCACGTGGCTCGGGACATTGCCTGT
GGCTGTCAGTATTTGGAGGAAAACCACTTCATCCACCGAGACA
TTGCTGCCAGAAACTGCCTCTTGACCTGTCCAGGCCCTGGAAG
AGTGGCCAAGATTGGAGACTTCGGGATGGCCCGAGACATCTAC
AGGGCGAGCTACTATAGAAAGGGAGGCTGTGCCATGCTGCCA
GTTAAGTGGATGCCCCCAGAGGCCTTCATGGAAGGAATATTCA

CTTCTAAAACAGACACATGGTCCTTTGGAGTGCTGCTATGGGA
AATCTTTTCTCTTGGATATATGCCATACCCCAGCAAAAGCAAC
CAGGAAGTTCTGGAGTTTGTCACCAGTGGAGGCCGGATGGACC
CACCCAAGAACTGCCCTGGGCCTGTATACCGGATAATGACTCA
GTGCTGGCAACATCAGCCTGAAGACAGGCCCAACTTTGCCATC
ATTTTGGAGAGGATTGAATACTGCACCCAGGACCCGGATGTAA
TCAACACCGCTTTGCCGATAGAATATGGTCCACTTGTGGAAGA
GGAAGAGAAAGTGCCTGTGAGGCCCAAGGACCCTGAGGGGGT
TCCTCCTCTCCTGGTCTCTCAACAGGCAAAACGGGAGGAGGAG
CGCAGCCCAGCTGCCCCACCACCTCTGCCTACCACCTCCTCTGG
CAAGGCTGCAAAGAAACCCACAGCTGCAGAGATCTCTGTTCGA
GTCCCTAGAGGGCCGGCCGTGGAAGGGGGACACGTGAATATG
GCATTCTCTCAGTCCAACCCTCCTTCGGAGTTGCACAAGGTCCA
CGGATCCAGAAACAAGCCCACCAGCTTGTGGAACCCAACGTAC
GGCTCCTGGTTTACAGAGAAACCCACCAAAAAGAATAATCCTA
TAGCAAAGAAGGAGCCACACGACAGGGGTAACCTGGGGCTGG
AGGGAAGCTGTACTGTCCCACCTAACGTTGCAACTGGGAGACT
TCCGGGGGCCTCACTGCTCCTAGAGCCCTCTTCGCTGACTGCCA
ATATGAAGGAGGTACCTCTGTTCAGGCTACGTCACTTCCCTTGT
GGGAATGTCAATTACGGCTACCAGCAACAGGGCTTGCCCTTAG
AAGCCGCTACTGCCCCTGGAGCTGGTCATTACGAGGATACCAT
TCTGAAAAGCAAGAATAGCATGAACCAGCCTGGGCCCTGA (SE

Q ID NO:347)。在一些实施方案中,RNA突变导致ALK基因座处的易位、基因重排或融合基因。在一些实施方案中,RNA突变导致ALK和EML4基因之间的融合。例如,在一些实施方案中,ALK基因中的RNA突变编码或导致E13;A20、E20;A20、E6a;A20、E6b;A20 ALK融合蛋白。如本文所用,融合基因(例如,涉及本文所述的融合基因的任何RNA突变)的名称可以互换使用以下格式:基因1E#:基因2E#(例如,EML E13:ALK E20)和基因1#;基因2#(例如,E13;A20),以指代基因和所涉及的相应基因外显子数。

[0129] 在一些实施方案中,用于扩增ALK突变(例如,编码或导致EML4:ALK融合蛋白)的基因座的引物对包含选自由以下组成的组的一个序列(例如,与融合基因的EML4特异性基因座杂交的序列):TATGGAGCAAAACTACTGTAGAGCC(SEQ ID NO:357)、CCAGCTACATCACACACCTTGACT(SEQ ID NO:358)、TAATACCAAAAGTTACCAAAACTGCA(SEQ ID NO:

359)、CAATCTCTGAAGATCATGTGGCC(SEQ ID NO:360)、CAAGTGGCACAGTGGTGGC(SEQ ID NO:361)和TAACTGGAGGAGGGAAAGACAGA(SEQ ID NO:362);和选自由以下组成的组的另一个序列(例如,与融合基因的ALK特异性基因座杂交的序列):AGTTGGGGTTGTAGTCGGTCAT(SEQ ID NO:363)和GAAGCCTCCCTGGATCTCC(SEQ ID NO:364)。

[0130] 在一些实施方案中,本公开的方法包括扩增ROS基因中的一种或多种突变(例如,RNA突变)的基因座。ROS编码c-ros原癌基因,这是在人类癌症中频繁发生突变的受体酪氨酸激酶,也称为ROS1、MCF3和c-ros-1。在一些实施方案中,ROS基因是人ROS基因。在一些实施方案中,人ROS基因是指由NCBI Entrez Gene ID No.6098描述的基因,包括其突变体和变体。在其他实施方案中,ROS基因来自以下生物体之一:小鼠(参见例如NCBI Entrez Gene ID No.19886)、大鼠(参见例如NCBI Entrez Gene ID No.25346)、鱼(参见例如NCBIEntrez Gene ID No.245951)、牛(参见例如NCBI Entrez Gene ID No.100336768)、鸡(参见例如NCBI Entrez Gene ID No.396192)或黑猩猩(参见例如NCBI Entrez Gene ID No.472108)。

[0131] 与癌症相关的多种ROS突变是已知的,并且可通过本文所述的方法合适地检测;参见例如Lovly,C.,L.Horn,W.Pao.2015.ROS1in Non-Small Cell Lung Cancer(NSCLC)。www.mycancergenome.org/content/disease/lung-cancer/ros1/的My Cancer Genome(11月17日更新)。已经在1%-2%的NSCLC中鉴定出许多可通过FISH检测到的ROS1融合:FIG-ROS1、SLC34A2-ROS1、CD74-ROS1、LRIG3-ROS1、KDELR2-ROS1和CCDC6-ROS1。ROS1重排具有共同的临床和组织学特性:从不或轻度吸烟史、女性、年轻和具有印戒细胞组织学的腺癌。ALK和ROS1融合肿瘤的无病生存期显著缩短,这并不意味着总体生存期短,因为患者对靶向疗法(诸如克唑替尼)有响应。三分之二的ROS1+患者对被批准用于NSCLC一线的克唑替尼有响应。克唑替尼抗性ROS1G2032R突变体对福瑞替尼(foretinib)和卡博替尼(cabozantinib)敏感。患者最终对克唑替尼和较晚世代疗法发展出继发性抗性。在44%的ALK和ROS1重排的克唑替尼抗性肿瘤中检测到EGFR磷酸化增加,这表明这种机制可能介导抗性。塞瑞替尼、ASP3026和布格替尼(brigatinib)表现出对ROS1激酶的活性,但无法抑制克唑替尼抗性ROS1。有多种多TKI正在评估对克唑替尼、塞瑞替尼和艾乐替尼的抗性:包括美瑞替尼(merestinib)、恩曲替尼(entrectinib)、TAE684和劳拉替尼(lorlatinib)。在本文所述的一些实施方案中,ROS突变是基于根据人ROS蛋白的所得氨基酸取代/缺失/移码/易位命名的,例如,如下列出:MKNIYCLIPKLVNFATLGCLWISVVQCTVL

NSCLKSCVTNLGQQLDLGTPHNLSEPCIQGCHFWNSVDQKNCAL
KCRESCEVGCSSAEGAYEEEVLENADLPTAPFASSIGSHNMTLRW
KSANFSGVKYIIQWKYAQLLGSWTYTKTVSRPSYVVKPLHPFTEY
IFRVVWIFTAQLQLYSPPSPSYRTHPHGVPETAPLIRNIESSSPDTVE
VSWDPPQFPGGPILGYNLRLISKNQKLDAGTQRTSFQFYSTLPNTI
YRFSIAAVNEVGEGPEAESSITTSSSAVQQEEQWLFLSRKTSLRKR
SLKHLVDEAHCLRLDAIYHNITGISVDVHQQIVYFSEGTLIWAKK
AANMSDVSDLRIFYRGSGLISSISIDWLYQRMYFIMDELVCVCDLE
NCSNIEEITPPSISAPQKIVADSYNGYVFYLLRDGIYRADLPVPSGR
CAEAVRIVESCTLKDFAIKPQAKRIIYFNDTAQVFMSTFLDGSASH
LILPRIPFADVKSFACENNDFLVTDGKVIFQQDALSFNEFIVGCDLS
HIEEFGFGNLVIFGSSSQLHPLPGRPQELSVLFGSHQALVQWKPPA
LAIGANVILISDIIELFELGPSAWQNWTYEVKVSTQDPPEVTHIFLN
ISGTMLNVPELQSAMKYKVSVRASSPKRPGPWSEPSVGTTLVPAS
EPPFIMAVKEDGLWSKPLNSFGPGEFLSSDIGNVSDMDWYNNSLY
YSDTKGDVFVWLLNGTDISENYHLPSIAGAGALAFEWLGHFLYW

[0132]

AGKTYVIQRQSVLTGHTDIVTHVKLLVNDMVVDSVGGYLYWTT
LYSVESTRLNGESSLVLQTQPWFSGKKVIALTLDLSDGLLYWLVQ
DSQCIHLYTAVLRGQSTGDTTITEFAAWSTSEISQNALMYYSGRLF
WINGFRIITTQEIGQKTSVSVLEPARFNQFTIIQTSLKPLPGNFSFTP
KVIPDSVQESSFRIEGNASSFQILWNGPPAVDWGVVFYSVEFSAHS
KFLASEQHSLPVFTVEGLEPYALFNLSVTPYTYWGKGPKTSLSLR
APETVPSAPENPRIFILPSGKCCNKNEVVVEFRWNKPKHENGVLT
KFEIFYNISNQSITNKTCEDWIAVNVTPSVMSFQLEGMSPRCFIAFQ
VRAFTSKGPGPYADVVKSTTSEINPFPHLITLLGNKIVFLDMDQNQ
VVWTFSAERVISAVCYTADNEMGYYAEGDSLFLLHLHNRSSSELF
QDSLVFDITVITIDWISRHLYFALKESQNGMQVFDVDLEHKVKYP
REVKIHNRNSTIISFSVYPLLSRLYWTEVSNFGYQMFYYSIISHTLH
RILQPTATNQQNKRNQCSCNVTEFELSGAMAIDTSNLEKPLIYFAK
AQEIWAMDLEGCQCWRVITVPAMLAGKTLVSLTVDGDLIYWIIT
AKDSTQIYQAKKGNGAIVSQVKALRSRHILAYSSVMQPFPDKAFL
SLASDTVEPTILNATNTSLTIRLPLAKTNLTWYGITSPTPTYLVYYA
EVNDRKNSSDLKYRILEFQDSIALIEDLQPFSTYMIQIAVKNYYSDP
LEHLPPGKEIWGKTKNGVPEAVQLINTTVRSDTSLIISWRESHKPN
GPKESVRYQLAISHLALIPETPLRQSEFPNGRLTLLVTRLSGGNIYV
LKVLACHSEEMWCTESHPVTVEMFNTPEKPYSLVPENTSLQFNW
KAPLNVNLIRFWVELQKWKYNEFYHVKTSCSQGPAYVCNITNLQ
PYTSYNVRVVVVYKTGENSTSLPESFKTKAGVPNKPGIPKLLEGS
KNSIQWEKAEDNGCRITYYILEIRKSTSNNLQNQNLRWKMTFNGS
CSSVCTWKSKNLKGIFQFRVVAANNLGFGEYSGISENIILVGDDF
WIPETSFILTIIVGIFLVVTIPLTFVWHRRLKNQKSAKEGVTVLINED
KELAELRGLAAGVGLANACYAIHTLPTQEEIENLPAFPREKLTLRL
LLGSGAFGEVYEGTAVDILGVGSGEIKVAVKTLKKGSTDQEKIEF
LKEAHLMSKFNHPNILKQLGVCLLNEPQYIILELMEGGDLLTYLR
KARMATFYGPLLTLVDLVDLCVDISKGCVYLERMHFIHRDLAAR
NCLVSVKDYTSPRIVKIGDFGLARDIYKNDYYRKRGEGLLPVRW

MAPESLMDGIFTTQSDVWSFGILIWEILTLGHQPYPAHSNLDVLN
YVQTGGRLEPPRNCPDDLWNLMTQCWAQEPDQRPTFHRIQDQLQ
LFRNFFLNSIYKSRDEANNSGVINESFEGEDGDVICLNSDDIMPVA
LMETKNREGLNYMVLATECGQGEEKSEGPLGSQESESCGLRKEE
KEPHADKDFCQEKQVAYCPSGKPEGLNYACLTHSGYGDGSD (SE
Q ID NO:335)。示例性人ROS cDNA序列如下列出：ATGAAGAA
CATTTACTGTCTTATTCCGAAGCTTGTCAATTTTGCAACTCTTG
GCTGCCTATGGATTTCTGTGGTGCAGTGTACAGTTTTAAATAGC
TGCCTAAAGTCGTGTGTAACTAATCTGGGCCAGCAGCTTGACC
TTGGCACACCACATAATCTGAGTGAACCGTGTATCCAAGGATG
TCACTTTTGGAACTCTGTAGATCAGAAAAACTGTGCTTTAAAG
TGTCGGGAGTCGTGTGAGGTTGGCTGTAGCAGCGCGGAAGGTG
CATATGAAGAGGAAGTACTGGAAAATGCAGACCTACCAACTG
CTCCCTTTGCTTCTTCCATTGGAAGCCACAATATGACATTACGA
TGGAAATCTGCAAACTTCTCTGGAGTAAAATACATCATTCAGT
GGAAATATGCACAACTTCTGGGAAGCTGGACTTATACTAAGAC
TGTGTCCAGACCGTCCTATGTGGTCAAGCCCCTGCACCCCTTCA
CTGAGTACATTTTCCGAGTGGTTTGGATCTTCACAGCGCAGCTG
CAGCTCTACTCCCCTCCAAGTCCCAGTTACAGGACTCATCCTCA
TGGAGTTCCTGAAACTGCACCTTTGATTAGGAATATTGAGAGC
TCAAGTCCCGACACTGTGGAAGTCAGCTGGGATCCACCTCAAT
TCCCAGGTGGACCTATTTTGGGTTATAACTTAAGGCTGATCAG
CAAAAATCAAAAATTAGATGCAGGGACACAGAGAACCAGTTT
CCAGTTTTACTCCACTTTACCAAATACTATCTACAGGTTTTCTA
TTGCAGCAGTAAATGAAGTTGGTGAGGGTCCAGAAGCAGAAT
CTAGTATTACCACTTCATCTTCAGCAGTTCAACAAGAGGAACA
GTGGCTCTTTTTATCCAGAAAAACTTCTCTAAGAAAGAGATCTT
TAAAACATTTAGTAGATGAAGCACATTGCCTTCGGTTGGATGC
TATATACCATAATATTACAGGAATATCTGTTGATGTCCACCAG
CAAATTGTTTATTTCTCTGAAGGAACTCTCATATGGGCGAAGA

[0133]

AGGCTGCCAACATGTCTGATGTATCTGACCTGAGAATTTTTTAC
AGAGGTTCAGGATTAATTTCTTCTATCTCCATAGATTGGCTTTA
TCAAAGAATGTATTTCATCATGGATGAACTGGTATGTGTCTGT
GATTTAGAGAACTGCTCAAACATCGAGGAAATTACTCCACCCT
CTATTAGTGCACCTCAAAAAATTGTGGCTGATTCATACAATGG
GTATGTCTTTTACCTCCTGAGAGATGGCATTTATAGAGCAGAC
CTTCCTGTACCATCTGGCCGGTGTGCAGAAGCTGTGCGTATTGT
GGAGAGTTGCACGTTAAAGGACTTTGCAATCAAGCCACAAGCC
AAGCGAATCATTTACTTCAATGACACTGCCCAAGTCTTCATGTC
AACATTTCTGGATGGCTCTGCTTCCCATCTCATCCTACCTCGCA
TCCCCTTTGCTGATGTGAAAAGTTTTGCTTGTGAAAACAATGAC
TTTCTTGTCACAGATGGCAAGGTCATTTTCCAACAGGATGCTTT
GTCTTTTAATGAATTCATCGTGGGATGTGACCTGAGTCACATA
GAAGAATTTGGGTTTGGTAACTTGGTCATCTTTGGCTCATCCTC
CCAGCTGCACCCTCTGCCAGGCCGCCCGCAGGAGCTTTCGGTG
CTGTTTGGCTCTCACCAGGCTCTTGTTCAATGGAAGCCTCCTGC
CCTTGCCATAGGAGCCAATGTCATCCTGATCAGTGATATTATTG
AACTCTTTGAATTAGGCCCTTCTGCCTGGCAGAACTGGACCTAT
GAGGTGAAAGTATCCACCCAAGACCCTCCTGAAGTCACTCATA
TTTTCTTGAACATAAGTGGAACCATGCTGAATGTACCTGAGCT
GCAGAGTGCTATGAAATACAAGGTTTCTGTGAGAGCAAGTTCT
CCAAAGAGGCCAGGCCCCTGGTCAGAGCCCTCAGTGGGTACTA
CCCTGGTGCCAGCTAGTGAACCACCATTTATCATGGCTGTGAA
AGAAGATGGGCTTTGGAGTAAACCATTAAATAGCTTTGGCCCA
GGAGAGTTCTTATCCTCTGATATAGGAAATGTGTCAGACATGG
ATTGGTATAACAACAGCCTCTACTACAGTGACACGAAAGGCGA
CGTTTTTGTGTGGCTGCTGAATGGGACGGATATCTCAGAGAAT
TATCACCTACCCAGCATTGCAGGAGCAGGGGCTTTAGCTTTTG
AGTGGCTGGGTCACTTTCTCTACTGGGCTGGAAAGACATATGT
GATACAAAGGCAGTCTGTGTTGACGGGACACACAGACATTGTT

[0134]

ACCCACGTGAAGCTATTGGTGAATGACATGGTGGTGGATTCAG
TTGGTGGATATCTCTACTGGACCACACTCTATTCAGTGGAAAG
CACCAGACTAAATGGGGAAAGTTCCCTTGTACTACAGACACAG
CCTTGGTTTTCTGGGAAAAAGGTAATTGCTCTAACTTTAGACCT
CAGTGATGGGCTCCTGTATTGGTTGGTTCAAGACAGTCAATGT
ATTCACCTGTACACAGCTGTTCTTCGGGGACAGAGCACTGGGG
ATACCACCATCACAGAATTTGCAGCCTGGAGTACTTCTGAAAT
TTCCCAGAATGCACTGATGTACTATAGTGGTCGGCTGTTCTGG
ATCAATGGCTTTAGGATTATCACAACTCAAGAAATAGGTCAGA
AAACCAGTGTCTCTGTTTTGGAACCAGCCAGATTTAATCAGTTC
ACAATTATTCAGACATCCCTTAAGCCCCTGCCAGGGAACTTTTC
CTTTACCCCTAAGGTTATTCCAGATTCTGTTCAAGAGTCTTCAT
TTAGGATTGAAGGAAATGCTTCAAGTTTTCAAATCCTGTGGAA
TGGTCCCCCTGCGGTAGACTGGGGTGTAGTTTTCTACAGTGTA
GAATTTAGTGCTCATTCTAAGTTCTTGGCTAGTGAACAACACTC
TTTACCTGTATTTACTGTGGAAGGACTGGAACCTTATGCCTTAT
TTAATCTTTCTGTCACTCCTTATACCTACTGGGGAAAGGGCCCC
AAAACATCTCTGTCACTTCGAGCACCTGAAACAGTTCCATCAG
CACCAGAGAACCCCAGAATATTTATATTACCAAGTGGAAAATG
CTGCAACAAGAATGAAGTTGTGGTGGAATTTAGGTGGAACAA
ACCTAAGCATGAAAATGGGGTGTTAACAAAATTTGAAATTTTC
TACAATATATCCAATCAAAGTATTACAAACAAAACATGTGAAG
ACTGGATTGCTGTCAATGTCACTCCCTCAGTGATGTCTTTTCAA
CTTGAAGGCATGAGTCCCAGATGCTTTATTGCCTTCCAGGTTAG
GGCCTTTACATCTAAGGGGCCAGGACCATATGCTGACGTTGTA
AAGTCTACAACATCAGAAATCAACCCATTTCCTCACCTCATAA
CTCTTCTTGGTAACAAGATAGTTTTTTTAGATATGGATCAAAAT
CAAGTTGTGTGGACGTTTTCAGCAGAAAGAGTTATCAGTGCCG
TTTGCTACACAGCTGATAATGAGATGGGATATTATGCTGAAGG
GGACTCACTCTTTCTTCTGCACTTGCACAATCGCTCTAGCTCTG

[0135]

AGCTTTTCCAAGATTCACTGGTTTTTGATATCACAGTTATTACA
ATTGACTGGATTTCAAGGCACCTCTACTTTGCACTGAAAGAAT
CACAAAATGGAATGCAAGTATTTGATGTTGATCTTGAACACAA
GGTGAAATATCCCAGAGAGGTGAAGATTCACAATAGGAATTC
AACAATAATTTCTTTTTCTGTATATCCTCTTTTAAGTCGCTTGTA
TTGGACAGAAGTTTCCAATTTTGGCTACCAGATGTTCTACTACA
GTATTATCAGTCACACCTTGCACCGAATTCTGCAACCCACAGC
TACAAACCAACAAAACAAAAGGAATCAATGTTCTTGTAATGTG
ACTGAATTTGAGTTAAGTGGAGCAATGGCTATTGATACCTCTA
ACCTAGAGAAACCATTGATATACTTTGCCAAAGCACAAGAGAT
CTGGGCAATGGATCTGGAAGGCTGTCAGTGTTGGAGAGTTATC
ACAGTACCTGCTATGCTCGCAGGAAAAACCCTTGTTAGCTTAA
CTGTGGATGGAGATCTTATATACTGGATCATCACAGCAAAGGA
CAGCACACAGATTTATCAGGCAAAGAAAGGAAATGGGGCCAT
CGTTTCCCAGGTGAAGGCCCTAAGGAGTAGGCATATCTTGGCT
TACAGTTCAGTTATGCAGCCTTTTCCAGATAAAGCGTTTCTGTC
TCTAGCTTCAGACACTGTGGAACCAACTATACTTAATGCCACT
AACACTAGCCTCACAATCAGATTACCTCTGGCCAAGACAAACC
TCACATGGTATGGCATCACCAGCCCTACTCCAACATACCTGGT
TTATTATGCAGAAGTTAATGACAGGAAAAACAGCTCTGACTTG
AAATATAGAATTCTGGAATTTCAGGACAGTATAGCTCTTATTG
AAGATTTACAACCATTTTCAACATACATGATACAGATAGCTGT
AAAAAATTATTATTCAGATCCTTTGGAACATTTACCACCAGGA
AAAGAGATTTGGGGAAAAACTAAAAATGGAGTACCAGAGGCA
GTGCAGCTCATTAATACAACTGTGCGGTCAGACACCAGCCTCA
TTATATCTTGGAGAGAATCTCACAAGCCAAATGGACCTAAAGA
ATCAGTCCGTTATCAGTTGGCAATCTCACACCTGGCCCTAATTC
CTGAAACTCCTCTAAGACAAAGTGAATTTCCAAATGGAAGGCT
CACTCTCCTTGTTACTAGACTGTCTGGTGGAAATATTTATGTGT
TAAAGGTTCTTGCCTGCCACTCTGAGGAAATGTGGTGTACAGA

[0136]

GAGTCATCCTGTCACTGTGGAAATGTTTAACACACCAGAGAAA
CCTTATTCCTTGGTTCCAGAGAACACTAGTTTGCAATTTAATTG
GAAGGCTCCATTGAATGTTAACCTCATCAGATTTTGGGTTGAG
CTACAGAAGTGGAAATACAATGAGTTTTACCATGTTAAAACTT
CATGCAGCCAAGGTCCTGCTTATGTCTGTAATATCACAAATCT
ACAACCTTATACTTCATATAATGTCAGAGTAGTGGTGGTTTATA
AGACGGGAGAAAATAGCACCTCACTTCCAGAAAGCTTTAAGA
CAAAAGCTGGAGTCCCAAATAAACCAGGCATTCCCAAATTACT
AGAAGGGAGTAAAAATTCAATACAGTGGGAGAAAGCTGAAGA
TAATGGATGTAGAATTACATACTATATCCTTGAGATAAGAAAG
AGCACTTCAAATAATTTACAGAACCAGAATTTAAGGTGGAAGA
TGACATTTAATGGATCCTGCAGTAGTGTTTGCACATGGAAGTC
CAAAAACCTGAAAGGAATATTTCAGTTCAGAGTAGTAGCTGCA
AATAATCTAGGGTTTGGTGAATATAGTGGAATCAGTGAGAATA
TTATATTAGTTGGAGATGATTTTTGGATACCAGAAACAAGTTTC
ATACTTACTATTATAGTTGGAATATTTCTGGTTGTTACAATCCC
ACTGACCTTTGTCTGGCATAGAAGATTAAAGAATCAAAAAAGT
GCCAAGGAAGGGGTGACAGTGCTTATAAACGAAGACAAAGAG
TTGGCTGAGCTGCGAGGTCTGGCAGCCGGAGTAGGCCTGGCTA
ATGCCTGCTATGCAATACATACTCTTCCAACCCAAGAGGAGAT
TGAAAATCTTCCTGCCTTCCCTCGGGAAAAACTGACTCTGCGTC
TCTTGCTGGGAAGTGGAGCCTTTGGAGAAGTGTATGAAGGAAC
AGCAGTGGACATCTTAGGAGTTGGAAGTGGAGAAATCAAAGT
AGCAGTGAAGACTTTGAAGAAGGGTTCCACAGACCAGGAGAA
GATTGAATTCCTGAAGGAGGCACATCTGATGAGCAAATTTAAT
CATCCCAACATTCTGAAGCAGCTTGGAGTTTGTCTGCTGAATG
AACCCCAATACATTATCCTGGAACTGATGGAGGGAGGAGACCT
TCTTACTTATTTGCGTAAAGCCCGGATGGCAACGTTTTATGGTC
CTTTACTCACCTTGGTTGACCTTGTAGACCTGTGTGTAGATATT
TCAAAAGGCTGTGTCTACTTGGAACGGATGCATTTCATTCACA

GGGATCTGGCAGCTAGAAATTGCCTTGTTTCCGTGAAAGACTA
TACCAGTCCACGGATAGTGAAGATTGGAGACTTTGGACTCGCC
AGAGACATCTATAAAAATGATTACTATAGAAAGAGAGGGGAA
GGCCTGCTCCCAGTTCGGTGGATGGCTCCAGAAAGTTTGATGG
ATGGAATCTTCACTACTCAATCTGATGTATGGTCTTTTGGAATT
CTGATTTGGGAGATTTTAACTCTTGGTCATCAGCCTTATCCAGC
TCATTCCAACCTTGATGTGTTAAACTATGTGCAAACAGGAGGG
AGACTGGAGCCACCAAGAAATTGTCCTGATGATCTGTGGAATT
TAATGACCCAGTGCTGGGCTCAAGAACCCGACCAAAGACCTAC
TTTTCATAGAATTCAGGACCAACTTCAGTTATTCAGAAATTTTT
TCTTAAATAGCATTTATAAGTCCAGAGATGAAGCAAACAACAG
TGGAGTCATAAATGAAAGCTTTGAAGGTGAAGATGGCGATGTG
ATTTGTTTGAATTCAGATGACATTATGCCAGTTGCTTTAATGGA
AACGAAGAACCGAGAAGGGTTAAACTATATGGTACTTGCTACA
GAATGTGGCCAAGGTGAAGAAAAGTCTGAGGGTCCTCTAGGCT
CCCAGGAATCTGAATCTTGTGGTCTGAGGAAAGAAGAGAAGG
AACCACATGCAGACAAAGATTTCTGCCAAGAAAAACAAGTGG
CTTACTGCCCTTCTGGCAAGCCTGAAGGCCTGAACTATGCCTGT
CTCACTCACAGTGGATATGGAGATGGGTCTGATTAA (SEQ ID
NO:348)。在一些实施方案中,RNA突变导致ROS基因座处的易位、重排或融合基因。在一些实施方案中,RNA突变导致ROS基因与选自由CD47和SLC34A2组成的组的基因之间的融合。例如,在一些实施方案中,ROS基因中的RNA突变编码或导致C6;R32或C6;R34CD74-ROS1融合蛋白或S4;R32或S4;R34 SLC34A2-ROS1融合蛋白、SD2;R32融合蛋白。

[0137] 在一些实施方案中,用于扩增ROS突变(例如,编码或导致C6;R32或C6;R34 CD74-ROS1融合蛋白)的基因座的引物对包含序列(例如,与融合基因的CD74特异性基因座杂交的序列):GGAGTGCCATCGCTGTTTGAAATGAGCAGGCACT(SEQ ID NO:19)和选自由以下组成的组的另一个序列(例如,与融合基因的ROS特异性基因座杂交的序列):AATTCAATACATACTATCAGCTTTCTCCCACTGTATTGAA(SEQ ID NO:39;针对外显子32融合)和AATATTTCTGGTACGAGTGGGATTGTAACAACCAGAAATA(SEQ ID NO:40;针对外显子34融合)。在一些实施方案中,用于扩增ROS突变(例如,编码或导致S4;R32或S4;R34 SLC34A2-ROS1融合蛋白)的基因座的引物对包含序列(例如,与融合基因的SLC34A2特异性基因座杂交的序列)
TACAGCCCTGGATATTCTTAGTAGCGC(SEQ ID NO:20)和选自由以下组成的组的另一个序列(例如,与融合基因的ROS特异性基因座杂交的序列):AATTCAATACATACTATCAGCTTTCTCCCACTGT

ATTGAA(SEQ ID NO:39;针对外显子32融合)和AATATTTCTGGTACGAGTGGGATTGTAACAACCAGAA ATA(SEQ ID NO:40;针对外显子34融合)。

[0138] 在一些实施方案中,本公开的方法包括扩增RET基因中的一种或多种突变(例如,RNA突变)的基因座。RET编码c-RET原癌基因,这是在人类癌症中频繁发生突变的受体酪氨酸激酶,也称为PTC、RET51、RET9、CDHF12、CDHR16、HSCR1、MEN2A、MEN2B、MTC1和RET-ELE1。在一些实施方案中,RET基因是人RET基因。在一些实施方案中,人RET基因是指由NCBI Entrez Gene ID No.5979描述的基因,包括其突变体和变体。在其他实施方案中,RET基因来自以下生物体之一:小鼠(参见例如NCBI Entrez Gene ID No.196713)、大鼠(参见例如NCBI Entrez Gene ID No.24716)、鱼(参见例如NCBI Entrez Gene ID No.30512)、牛(参见例如NCBI EntrezGene ID No.515924)、狗(参见例如NCBI Entrez Gene ID No.403494)或黑猩猩(参见例如NCBI Entrez Gene ID No.100612888)。

[0139] 与癌症相关的多种RET突变是已知的,并且可通过本文所述的方法合适地检测;参见例如Riely,G.2012.RET in Lung Cancer。www.mycancergenome.org/content/disease/lung-cancer/ret/的My CancerGenome(12月13日更新)。某些点突变破坏RET二聚反应的稳定性并且导致RET的组成型激活。在1%-2%的腺癌型NSCLC中发现RET基因融合,并且RET基因融合通常与EGFR、KRAS、ALK和ROS1中的突变互相排斥。具有NSCLC中的RET重排的患者往往更年轻(≤60)并且缺乏吸烟史。特定的RET突变(诸如V804)可能是对TKI(诸如凡德他尼、莫替沙尼(motesanib)和卡博替尼)不敏感,同时对其他药物(诸如舒尼替尼和普纳替尼(ponatinib))保持敏感性的原因。FDA批准的对RET敏感的药物包括瑞戈非尼、乐伐替尼(lenvatinib)、普纳替尼、卡博替尼、索拉非尼、舒尼替尼和凡德他尼。靶向RET或下游效应子RAF或MEK的小分子抑制剂因为它们在RET改变的癌症中的功效而正在开发中。在本文所述的一些实施方案中,RET突变是基于根据人RET蛋白的所得氨基酸取代/缺失/移码/易位命名的,例如,如下列出:MAKATSGAAGLRLLLLLLLPLLGKVALGLYFSR

DAYWEKLYVDQAAGTPLLYVHALRDAPEEVPSFRLGQHLYGTY
RTRLHENNWICIQEDTGLLYLNRSLDHSSWEKLSVRNRGFPLLTV
YLKVFLSPTSLREGECQWPGCARVYFSFFNTSFPACSSLKPRELCF
PETRPSFRIRENRPPGTFHQFRLLPVQFLCPNISVAYRLLEGEGLPF
RCAPDSLEVSTRWALDREQREKYELVAVCTVHAGAREEVVMVP
FPVTVYDEDDSAPTFPAGVDTASAVVEFKRKEDTVVATLRVFDA
DVVPASGELVRRYTSTLLPGDTWAQQTFRVEHWPNETSVQANGS
FVRATVHDYRLVLNRNLSISENRTMQLAVLVNDSDFQGPGAGVL
LLHFNVSVLPVSLHLPSTYSLSVSRRARRFAQIGKVCVENCQAFSG
INVQYKLHSSGANCSTLGVVTSAEDTSGILFVNDTKALRRPKCAE
LHYMVVATDQQTSRQAQAQLLVTVEGSYVAEEAGCPLSCAVSK
RRLECEECGGLGSPTGRCEWRQGDGKGITRNFSTCSPSTKTCPDG
HCDVVETQDINICPQDCLRGSIVGGHEPGEPRGIKAGYGTCNCFPE
EEKCFCEPEDIQDPLCDELCRTVIAAAVLFSFIVSVLLSAFCIHCYH
KFAHKPPISSAEMTFRRPAQAFPVSYSSSGARRPSLDSMENQVSVD
AFKILEDPKWEFPRKNLVLGKTLGEGEFGKVVKATAFHLKGRAG
YTTVAVKMLKENASPSELRDLLSEFNVLKQVNHPHVIKLYGACS
QDGPLLLIVEYAKYGSLRGFLRESRKVGPGYLGSGGSRNSSSLDH
PDERALTMGDLISFAWQISQGMQYLAEMKLVHRDLAARNILVAE
GRKMKISDFGLSRDVYEEDSYVKRSQGRIPVKWMAIESLFDHIYT
TQSDVWSFGVLLWEIVTLGGNPYPGIPPERLFNLLKTGHRMERPD
NCSEEMYRLMLQCWKQEPDKRPVFADISKDLEKMMVKRRDYLD
LAASTPSDSLIYDDGLSEEETPLVDCNNAPLPRALPSTWIENKLYG
RISHAFTRF (SEQ ID NO:336)。示例性人RET cDNA序列如下列出：
ATGGCGAAGGCGACGTCCGGTGCCGCGGGGCTGCGTCTGC

TGTTGCTGCTGCTGCTGCCGCTGCTAGGCAAAGTGGCATTGGG

CCTCTACTTCTCGAGGGATGCTTACTGGGAGAAGCTGTATGTG

GACCAGGCAGCCGGCACGCCCTTGCTGTACGTCCATGCCCTGC

GGGACGCCCCTGAGGAGGTGCCCAGCTTCCGCCTGGGCCAGCA

TCTCTACGGCACGTACCGCACACGGCTGCATGAGAACAACTGG

ATCTGCATCCAGGAGGACACCGGCCTCCTCTACCTTAACCGGA

GCCTGGACCATAGCTCCTGGGAGAAGCTCAGTGTCCGCAACCG

CGGCTTTCCCCTGCTCACCGTCTACCTCAAGGTCTTCCTGTCAC

CCACATCCCTTCGTGAGGGCGAGTGCCAGTGGCCAGGCTGTGC

CCGCGTATACTTCTCCTTCTTCAACACCTCCTTTCCAGCCTGCA

GCTCCCTCAAGCCCCGGGAGCTCTGCTTCCCAGAGACAAGGCC

CTCCTTCCGCATTCGGGAGAACCGACCCCCAGGCACCTTCCAC

CAGTTCCGCCTGCTGCCTGTGCAGTTCTTGTGCCCCAACATCAG

CGTGGCCTACAGGCTCCTGGAGGGTGAGGGTCTGCCCTTCCGC

TGCGCCCCGGACAGCCTGGAGGTGAGCACGCGCTGGGCCCTGG

ACCGCGAGCAGCGGGAGAAGTACGAGCTGGTGGCCGTGTGCA

CCGTGCACGCCGGCGCGCGCGAGGAGGTGGTGATGGTGCCCTT

CCCGGTGACCGTGTACGACGAGGACGACTCGGCGCCCACCTTC

CCCGCGGGCGTCGACACCGCCAGCGCCGTGGTGGAGTTCAAGC

GGAAGGAGGACACCGTGGTGGCCACGCTGCGTGTCTTCGATGC

AGACGTGGTACCTGCATCAGGGGAGCTGGTGAGGCGGTACAC

AAGCACGCTGCTCCCCGGGGACACCTGGGCCCAGCAGACCTTC

CGGGTGGAACACTGGCCCAACGAGACCTCGGTCCAGGCCAAC

[0140]

GGCAGCTTCGTGCGGGCGACCGTACATGACTATAGGCTGGTTC
TCAACCGGAACCTCTCCATCTCGGAGAACCGCACCATGCAGCT
GGCGGTGCTGGTCAATGACTCAGACTTCCAGGGCCCAGGAGCG
GGCGTCCTCTTGCTCCACTTCAACGTGTCGGTGCTGCCGGTCAG
CCTGCACCTGCCCAGTACCTACTCCCTCTCCGTGAGCAGGAGG
GCTCGCCGATTTGCCCAGATCGGGAAAGTCTGTGTGGAAAACT
GCCAGGCATTCAGTGGCATCAACGTCCAGTACAAGCTGCATTC
CTCTGGTGCCAACTGCAGCACGCTAGGGGTGGTCACCTCAGCC
GAGGACACCTCGGGGATCCTGTTTGTGAATGACACCAAGGCCC
TGCGGCGGCCCAAGTGTGCCGAACTTCACTACATGGTGGTGGC
CACCGACCAGCAGACCTCTAGGCAGGCCCAGGCCCAGCTGCTT
GTAACAGTGGAGGGGTCATATGTGGCCGAGGAGGCGGGCTGC
CCCCTGTCCTGTGCAGTCAGCAAGAGACGGCTGGAGTGTGAGG
AGTGTGGCGGCCTGGGCTCCCCAACAGGCAGGTGTGAGTGGA
GGCAAGGAGATGGCAAAGGGATCACCAGGAACTTCTCCACCT
GCTCTCCCAGCACCAAGACCTGCCCCGACGGCCACTGCGATGT
TGTGGAGACCCAAGACATCAACATTTGCCCTCAGGACTGCCTC
CGGGGCAGCATTGTTGGGGGACACGAGCCTGGGGAGCCCCGG
GGGATTAAAGCTGGCTATGGCACCTGCAACTGCTTCCCTGAGG
AGGAGAAGTGCTTCTGCGAGCCCGAAGACATCCAGGATCCACT
GTGCGACGAGCTGTGCCGCACGGTGATCGCAGCCGCTGTCCTC
TTCTCCTTCATCGTCTCGGTGCTGCTGTCTGCCTTCTGCATCCAC
TGCTACCACAAGTTTGCCCACAAGCCACCCATCTCCTCAGCTG
AGATGACCTTCCGGAGGCCCGCCCAGGCCTTCCCGGTCAGCTA
CTCCTCTTCCGGTGCCCGCCGGCCCTCGCTGGACTCCATGGAG
AACCAGGTCTCCGTGGATGCCTTCAAGATCCTGGAGGATCCAA
AGTGGGAATTCCCTCGGAAGAACTTGGTTCTTGGAAAAACTCT
AGGAGAAGGCGAATTTGGAAAAGTGGTCAAGGCAACGGCCTT
CCATCTGAAAGGCAGAGCAGGGTACACCACGGTGGCCGTGAA
GATGCTGAAAGAGAACGCCTCCCCGAGTGAGCTGCGAGACCT

GCTGTCAGAGTTCAACGTCCTGAAGCAGGTCAACCACCCACAT
GTCATCAAATTGTATGGGGCCTGCAGCCAGGATGGCCCGCTCC
TCCTCATCGTGGAGTACGCCAAATACGGCTCCCTGCGGGGCTT
CCTCCGCGAGAGCCGCAAAGTGGGGCCTGGCTACCTGGGCAGT
GGAGGCAGCCGCAACTCCAGCTCCCTGGACCACCCGGATGAGC
GGGCCCTCACCATGGGCGACCTCATCTCATTTGCCTGGCAGAT
CTCACAGGGGATGCAGTATCTGGCCGAGATGAAGCTCGTTCAT
CGGGACTTGGCAGCCAGAAACATCCTGGTAGCTGAGGGGCGG
AAGATGAAGATTTCGGATTTCGGCTTGTCCCGAGATGTTTATG
AAGAGGATTCCTACGTGAAGAGGAGCCAGGGTCGGATTCCAG
TTAAATGGATGGCAATTGAATCCCTTTTTGATCATATCTACACC
ACGCAAAGTGATGTATGGTCTTTTGGTGTCCTGCTGTGGGAGA
TCGTGACCCTAGGGGGAAACCCCTATCCTGGGATTCCTCCTGA
GCGGCTCTTCAACCTTCTGAAGACCGGCCACCGGATGGAGAGG
CCAGACAACTGCAGCGAGGAGATGTACCGCCTGATGCTGCAAT
GCTGGAAGCAGGAGCCGGACAAAAGGCCGGTGTTTGCGGACA
TCAGCAAAGACCTGGAGAAGATGATGGTTAAGAGGAGAGACT
ACTTGGACCTTGCGGCGTCCACTCCATCTGACTCCCTGATTTAT
GACGACGGCCTCTCAGAGGAGGAGACACCGCTGGTGGACTGT
AATAATGCCCCCCTCCCTCGAGCCCTCCCTTCCACATGGATTGA
AAACAAACTCTATGGTAGAATTTCCCATGCATTTACTAGATTCT
AG (SEQ ID NO:349)。在一些实施方案中,RNA突变导致RET基因座处的易位、重排或融合基因。在一些实施方案中,RNA突变导致RET基因与选自由KIF5B和CCDC6组成的组的基因之间的融合。例如,在一些实施方案中,RET基因中的RNA突变编码或导致K15;R11、K15;R12、K16;R12、K22;R11或K23;R12 KIF5B:RET融合蛋白。

[0141] 在一些实施方案中,用于扩增RET突变(例如,编码或导致K15;R11、K15;R12、K16;R12、K22;R12或K23;R12 KIF5B:RET融合基因)的基因座的引物对包含序列TTTCTGGTGCTATGAGGAAATGACCAACCACCAGA(SEQ ID NO:23)和GTGATCGCACAGTAGGACAGCGGCTGCGATC(SEQ ID NO:26)(例如,针对K15;R11 KIF5B.•RET融合基因);序列TTTCTGGTGCTATGAGGAAATGACCAACCACCAGA(SEQ ID NO:23)和GTGATCGCACAGTAGGACAGCGGCTGCGATC(SEQ ID NO:27)(例如,针对K15;R12 KIF5B:RET融合基因);序列AAGGAGTTAGCAGCATGTCAGC(SEQ ID NO:519)和GTGATCGCACAGTAGGACAGCGGCTGCGATC(SEQ ID NO:27)(例如,针针对K16;R12 KIF5B.•RET融合基因);序列AACTTCAGACTTTACACAACCTGC(SEQ ID NO:520)和

GTGATCGCACAGTAGGACAGCGGCTGCGATC(SEQ ID NO:27)(例如,针对K22;R12 KIF5B:RET融合基因);或序列ATTGATTCTGATGACACCGGA(SEQ ID NO:521)和GTGATCGCACAGTAGGACAGCGGCTGCGATC(SEQ ID NO:27)(例如,针对K23;R12 KIF5B:RET融合基因)。

[0142] 在一些实施方案中,本公开的方法包括扩增NTRK1基因中的一种或多种突变(例如,RNA突变)的基因座。NTRK1编码原肌球蛋白受体激酶A(TrkA),这是在人类癌症中频繁发生突变的受体酪氨酸激酶,也称为高亲和力神经生长因子受体、神经营养性酪氨酸激酶受体1型、TRK1转化酪氨酸激酶蛋白、MTC、TRK、TRKA、Trk-A和p140-TrkA。在一些实施方案中,NTRK1基因是人NTRK1基因。在一些实施方案中,人NTRK1基因是指由NCBI Entrez Gene ID No.4914描述的基因,包括其突变体和变体。在其他实施方案中,NTRK1基因来自以下生物体之一:小鼠(参见例如NCBI Entrez Gene ID No.18211)、大鼠(参见例如NCBI Entrez Gene ID No.59109)、鱼(参见例如NCBI Entrez Gene ID No.30546)、牛(参见例如NCBI Entrez Gene ID No.353111)、狗(参见例如NCBI Entrez Gene ID No.396337)或黑猩猩(参见例如NCBI Entrez Gene ID No.457408)。

[0143] 与癌症相关的多种NTRK1突变是已知的,并且可通过本文所述的方法合适地检测;参见例如Lovly,C.,R.Doebele.2014.NTRK1(TRKA)in Lung Cancer。www.mycancergenome.org/content/disease/lung-cancer/ntrk1/的My Cancer Genome(5月23日更新)。在本文所述的一些实施方案中,NTRK1突变是基于根据人NTRK1蛋白的所得氨基酸取代/缺失/移码/易位命名的,例如,如下列出:MKEAALICL

APSVPPILTVKSWDTMQLRAARSRCTNLLAASYIENQQHLQHLEL
RDLRGLGELRNLTIVKSGLRFVAPDAFHFTPRLSRLNLSFNALESL
SWKTVQGLSLQELVLSGNPLHCSCALRWLQRWEEEGLGGVPEQK
LQCHGQGPLAHMPNASCGVPTLKVQVPNASVDVGDDVLLRCQV
EGRGLEQAGWILTELEQSATVMKSGGLPSLGLTLANVTSDLNRK
NVTCWAENDVGRAEVSVQVNVSFPASVQLHTAVEMHHWCIPFS
VDGQPAPSLRWLFNGSVLNETSFIFTEFLEPAANETVRHGCLRLN
QPTHVNNGNYTLLAANPFGQASASIMAAFMDNPFEFNPEDPIPDT
NSTSGDPVEKKDETPFGVSVAVGLAVFACLFLSTLLLVLNKCGRR
NKFGINRPAVLAPEDGLAMSLHFMTLGGSSLSPTEGKGSGLQGHII
ENPQYFSDACVHHIKRRDIVLKWELGEGAFGKVFLAECHNLLPEQ
DKMLVAVKALKEASESARQDFQREAELLTMLQHQHIVRFFGVCT
EGRPLLMVFEYMRHGDLNRFLRSHGPDAKLLAGGEDVAPGPLGL
GQLLAVASQVAAGMVYLAGLHFVHRDLATRNCLVGQGLVVKIG
DFGMSRDIYSTDYYRVGGRTMLPIRWMPPESILYRKFTTESDVWS
FGVVLWEIFTYGKQPWYQLSNTEAIDCITQGRELERPRACPPEVY
AIMRGCWQREPQQRHSIKDVHARLQALAQAPPVYLDVLG (SEQ
ID NO:337)。示例性人NTRK1 cDNA序列如下列出：ATGAAGGA
GGCCGCCCTCATCTGCCTGGCACCCTCTGTACCCCCGATCTTGA
CGGTGAAGTCCTGGGACACCATGCAGTTGCGGGCTGCTAGATC
TCGGTGCACAAACTTGTTGGCAGCAAGCTACATCGAGAACCAG
CAGCATCTGCAGCATCTGGAGCTCCGTGATCTGAGGGGCCTGG
GGGAGCTGAGAAACCTCACCATCGTGAAGAGTGGTCTCCGTTT
CGTGGCGCCAGATGCCTTCCATTTCACTCCTCGGCTCAGTCGCC
TGAATCTCTCCTTCAACGCTCTGGAGTCTCTCTCCTGGAAAACT

[0144]

GTGCAGGGCCTCTCCTTACAGGAACTGGTCCTGTCGGGGAACC
CTCTGCACTGTTCTTGTGCCCTGCGCTGGCTACAGCGCTGGGAG
GAGGAGGGACTGGGCGGAGTGCCTGAACAGAAGCTGCAGTGT
CATGGGCAAGGGCCCCTGGCCCACATGCCCAATGCCAGCTGTG
GTGTGCCCACGCTGAAGGTCCAGGTGCCCAATGCCTCGGTGGA
TGTGGGGGACGACGTGCTGCTGCGGTGCCAGGTGGAGGGGCG
GGGCCTGGAGCAGGCCGGCTGGATCCTCACAGAGCTGGAGCA
GTCAGCCACGGTGATGAAATCTGGGGGTCTGCCATCCCTGGGG
CTGACCCTGGCCAATGTCACCAGTGACCTCAACAGGAAGAACG
TGACGTGCTGGGCAGAGAACGATGTGGGCCGGGCAGAGGTCT
CTGTTCAGGTCAACGTCTCCTTCCCGGCCAGTGTGCAGCTGCAC
ACGGCGGTGGAGATGCACCACTGGTGCATCCCCTTCTCTGTGG
ATGGGCAGCCGGCACCGTCTCTGCGCTGGCTCTTCAATGGCTC
CGTGCTCAATGAGACCAGCTTCATCTTCACTGAGTTCCTGGAG
CCGGCAGCCAATGAGACCGTGCGGCACGGGTGTCTGCGCCTCA
ACCAGCCCACCCACGTCAACAACGGCAACTACACGCTGCTGGC
TGCCAACCCCTTCGGCCAGGCCTCCGCCTCCATCATGGCTGCCT
TCATGGACAACCCTTTCGAGTTCAACCCCGAGGACCCCATCCC
TGACACTAACAGCACATCTGGAGACCCGGTGGAGAAGAAGGA
CGAAACACCTTTTGGGGTCTCGGTGGCTGTGGGCCTGGCCGTC
TTTGCCTGCCTCTTCCTTTCTACGCTGCTCCTTGTGCTCAACAA
ATGTGGACGGAGAAACAAGTTTGGGATCAACCGCCCGGCTGTG
CTGGCTCCAGAGGATGGGCTGGCCATGTCCCTGCATTTCATGA
CATTGGGTGGCAGCTCCCTGTCCCCCACCGAGGGCAAAGGCTC
TGGGCTCCAAGGCCACATCATCGAGAACCCACAATACTTCAGT
GATGCCTGTGTTCACCACATCAAGCGCCGGGACATCGTGCTCA
AGTGGGAGCTGGGGGAGGGCGCCTTTGGGAAGGTCTTCCTTGC
TGAGTGCCACAACCTCCTGCCTGAGCAGGACAAGATGCTGGTG
GCTGTCAAGGCACTGAAGGAGGCGTCCGAGAGTGCTCGGCAG
GACTTCCAGCGTGAGGCTGAGCTGCTCACCATGCTGCAGCACC

AGCACATCGTGCGCTTCTTCGGCGTCTGCACCGAGGGCCGCCC
CCTGCTCATGGTCTTTGAGTATATGCGGCACGGGGACCTCAAC
CGCTTCCTCCGATCCCATGGACCTGATGCCAAGCTGCTGGCTG
GTGGGGAGGATGTGGCTCCAGGCCCCCTGGGTCTGGGGCAGCT
GCTGGCCGTGGCTAGCCAGGTCGCTGCGGGGATGGTGTACCTG
GCGGGTCTGCATTTTGTGCACCGGGACCTGGCCACACGCAACT
GTCTAGTGGGCCAGGGACTGGTGGTCAAGATTGGTGATTTTGG
CATGAGCAGGGATATCTACAGCACCGACTATTACCGTGTGGGA
GGCCGCACCATGCTGCCCATTCGCTGGATGCCGCCCGAGAGCA
TCCTGTACCGTAAGTTCACCACCGAGAGCGACGTGTGGAGCTT
CGGCGTGGTGCTCTGGGAGATCTTCACCTACGGCAAGCAGCCC
TGGTACCAGCTCTCCAACACGGAGGCAATCGACTGCATCACGC
AGGGACGTGAGTTGGAGCGGCCACGTGCCTGCCCACCAGAGG
TCTACGCCATCATGCGGGGCTGCTGGCAGCGGGAGCCCCAGCA
ACGCCACAGCATCAAGGATGTGCACGCCCGGCTGCAAGCCCTG
GCCCAGGCACCTCCTGTCTACCTGGATGTCCTGGGCTAG (SEQ

ID NO:350)。在一些实施方案中,RNA突变导致NTRK1基因座处的易位、重排或融合基因。在一些实施方案中,RNA突变导致NTRK1和CD74基因之间的融合。例如,在一些实施方案中,NTRK1基因中的RNA突变编码或导致C8;N12 CD74:NTRK1融合蛋白。

[0145] 在一些实施方案中,用于扩增NTRK1突变(例如,编码或导致C8;N12 CD74:NTRK1融合蛋白)的基因座的引物对包含序列(例如,与融合基因的CD74特异性基因座杂交的序列)AGAAGACGTGACAG GAACTGGAGGACCCGTCTT(SEQ ID NO:30)和序列(例如,与融合基因的NTRK1特异性基因座杂交的序列)GGACGAAAATCCAGAC CCCAAAAGGTGTTTCGT(SEQ ID NO:32)。

[0146] 在一些实施方案中,本公开的方法包括扩增cMET基因中的一种或多种突变(例如,RNA突变)的基因座。cMET编码在人类癌症中频繁发生突变的酪氨酸蛋白激酶Met,其也称为肝细胞生长因子受体(HGFR)、AUTS9、RCCP2、DFNB97和OSFD。在一些实施方案中,cMET基因是人cMET基因。在一些实施方案中,人cMET基因是指由NCBI Entrez Gene ID No.4233描述的基因,包括其突变体和变体。在其他实施方案中,cMET基因来自以下生物体之一:小鼠(参见例如NCBI Entrez Gene ID No.17295)、大鼠(参见例如NCBI Entrez Gene ID No.24553)、鱼(参见例如NCBI Entrez Gene ID No.100150664)、牛(参见例如NCBI Entrez Gene ID No.280855)、狗(参见例如NCBI Entrez Gene ID No.396134)或黑猩猩(参见例如NCBI Entrez Gene ID No.463671)。

[0147] 与癌症相关的多种cMET突变是已知的,并且可通过本文所述的方法合适地检测;参见例如Lovly,C.,P.Paik.2017.MET Exon 14Skipping Mutations in Lung Cancer。

www.mycancergenome.org/content/disease/lung-cancer/met/343的My Cancer Genome(6月15日更新)。已经在细胞外结构域(残基52-496)、近膜结构域(残基956-1093)和酪氨酸激酶结构域(残基1096-1355)中注意到偶尔的MET中的突变。MET中最频繁观察到的验证的功能突变增益是Y1253D。MET基因的易位很少见,但已经在肺腺癌中注意到MET基因的易位。外显子14的跳读和近膜结构域的破坏激活NSCLC中的MET,并且对MET抑制剂敏感。MET在6%的sqNSCLC中扩增,并且在2.7%的肺癌中见到拷贝数增加。MET过表达和扩增通常与不良预后相关。测试MET突变可以用于确定患者对各种酪氨酸激酶抑制剂的敏感性。FDA批准的对MET敏感的药物包括卡博替尼和克唑替尼。在本文所述的一些实施方案中,cMET突变是基于根据人cMET蛋白的所得氨基酸取代/缺失/移码/易位命名的,例如,如下列出:

MKAPAVL

APGILVLLFTLVQRSNGECKEALAKSEMNVNMKYQLPNFTAETPI

QNVILHEHHIFLGATNYIYVLNEEDLQKVAEYKTGPVLEHPDCFP

CQDCSSKANLSGGVWKDNINMALVVDTYYDDQLISCGSVNRGT

CQRHVFPHNHTADIQSEVHCIFSPQIEEPSQCPDCVVSALGAKVLS

SVKDRFINFFVGNTINSSYFPDHPLHSISVRRLKETKDGFMFLTDQS

YIDVLPEFRDSYPIKYVHAFESNNFIYFLTVQRETLDAQTFHTRIIR
FCSINSGLHSYMEMPLECILTEKRKKRSTKKEVFNILQAAYVSKPG
AQLARQIGASLNDDILFGVFAQSKPDSAEPMDRSAMCAFPIKYVN
DFFNKIVNKNNVRCLQHFYGPNHEHCFNRTLLRNSSGCEARRDE
YRTEFTTALQRVDLFMGQFSEVLLTSISTFIKGDLTIANLGTSEGRF
MQVVVSRSGPSTPHVNFLLDSHPVSPEVIVEHTLNQNGYTLVITG
KKITKIPLNGLGCRHFQSCSQCLSAPPFVQCGWCHDKCVRSEECL
SGTWTQQICLPAIYKVFPNSAPLEGGTRLTICGWDFGFRRNNKFD
LKKTRVLLGNESCTLTLSESTMNTLKCTVGPAMNKHFNMSIIISNG
HGTTQYSTFSYVDPVITSISPKYGPMAGGTLLTLTGNYLNSGNSRH
ISIGGKTCTLKSVSNSILECYTPAQTISTEFAVKLKIDLANRETSIFS
YREDPIVYEIHPTKSFISGGSTITGVGKNLNSVSVPRMVINVHEAG
RNFTVACQHRSNSEIICCTTPSLQQLNLQLPLKTKAFFMLDGILSK
YFDLIYVHNPVFKPFEKPVMISMGNENVLEIKGNDIDPEAVKGEV
LKVGNKSCENIHLHSEAVLCTVPNDLLKLNSELNIEWKQAISSTVL
GKVIVQPDQNFTGLIAGVVSISTALLLLLGFFLWLKKRKQIKDLGS
ELVRYDARVHTPHLDRLVSARSVSPTTEMVSNESVDYRATFPEDQ
FPNSSQNGSCRQVQYPLTDMSPILTSGDSDISSPLLQNTVHIDLSAL
NPELVQAVQHVVIGPSSLIVHFNEVIGRGHFGCVYHGTLLDNDGK
KIHCAVKSLNRITDIGEVSQFLTEGIIMKDFSHPNVLSLLGICLRSE
GSPLVVLPYMKHGDLRNFIRNETHNPTVKDLIGFGLQVAKGMKY
LASKKFVHRDLAARNCMLDEKFTVKVADFGLARDMYDKEYYSV
HNKTGAKLPVKWMALESLQTQKFTTKSDVWSFGVLLWELMTRG
APPYPDVNTFDITVYLLQGRRLLQPEYCPDPLYEVMLKCWHPKA
EMRPSFSELVSRISAIFSTFIGEHYVHVNATYVNVKCVAPYPSLLSS
EDNADDEVDTRPASFWETS (SEQ ID NO:338)。示例性人cMET cDNA序列如下列出：ATGCCCAAGAAGAAGCCGACGCCCATCCA
GCTGAACCCGGCCCCCGACGGCTCTGCAGTTAACGGGACCAGC
TCTGCGGAGACCAACTTGGAGGCCTTGCAGAAGAAGCTGGAG
GAGCTAGAGCTTGATGAGCAGCAGCGAAAGCGCCTTGAGGCC

TTTCTTACCCAGAAGCAGAAGGTGGGAGAACTGAAGGATGAC
GACTTTGAGAAGATCAGTGAGCTGGGGGCTGGCAATGGCGGT
GTGGTGTTCAAGGTCTCCCACAAGCCTTCTGGCCTGGTCATGG
CCAGAAAGCTAATTCATCTGGAGATCAAACCCGCAATCCGGAA
CCAGATCATAAGGGAGCTGCAGGTTCTGCATGAGTGCAACTCT
CCGTACATCGTGGGCTTCTATGGTGCGTTCTACAGCGATGGCG
AGATCAGTATCTGCATGGAGCACATGGATGGAGGTTCTCTGGA
TCAAGTCCTGAAGAAAGCTGGAAGAATTCCTGAACAAATTTTA
GGAAAAGTTAGCATTGCTGTAATAAAAGGCCTGACATATCTGA
GGGAGAAGCACAAGATCATGCACAGAGATGTCAAGCCCTCCA
ACATCCTAGTCAACTCCCGTGGGGAGATCAAGCTCTGTGACTT
TGGGGTCAGCGGGCAGCTCATCGACTCCATGGCCAACTCCTTC
GTGGGCACAAGGTCCTACATGTCGCCAGAAAGACTCCAGGGG
ACTCATTACTCTGTGCAGTCAGACATCTGGAGCATGGGACTGT
CTCTGGTAGAGATGGCGGTTGGGAGGTATCCCATCCCTCCTCC
AGATGCCAAGGAGCTGGAGCTGATGTTTGGGTGCCAGGTGGA
AGGAGATGCGGCTGAGACCCCACCCAGGCCAAGGACCCCCGG
GAGGCCCCTTAGCTCATACGGAATGGACAGCCGACCTCCCATG
GCAATTTTTGAGTTGTTGGATTACATAGTCAACGAGCCTCCTCC
AAAACTGCCCAGTGGAGTGTTCAGTCTGGAATTTCAAGATTTT
GTGAATAAATGCTTAATAAAAAACCCCGCAGAGAGAGCAGAT
TTGAAGCAACTCATGGTTCATGCTTTTATCAAGAGATCTGATGC
TGAGGAAGTGGATTTTGCAGGTTGGCTCTGCTCCACCATCGGC
CTTAACCAGCCCAGCACACCAACCCATGCTGCTGGCGTCTAA
(SEQ ID NO:351)。在一些实施方案中,RNA突变导致cMET基因座处的一种或多种外显子的跳读和/或cMET基因座的扩增。在一些实施方案中,RNA突变导致cMET基因座处的外显子14跳读。

[0148] 在一些实施方案中,用于扩增cMET突变(例如,编码或导致cMET外显子14的跳读)的基因座的引物对包含序列GAATTTCACAGGATTGATTGCTGGTGTTGTCTC(SEQ ID NO:28)和GACAGTATTTTGCAGTAATGGACTGGATATATCAGA(SEQ ID NO:29)。

[0149] 在任何上述实施方案的一些实施方案中,第一引物(例如,用于生成cDNA的第一引物)包含5′修饰或标记,诸如生物素。

[0150] 示例性和非限制性的RNA突变在下文的表A2中提供。

[0151] 本公开的多重测定可包括检测两种或更多种上述突变的组合。例如,测定可包括检测上述的DNA突变中的两种或更多种和/或上述的RNA突变中的两种或更多种的组合。

[0152] 在一些实施方案中,本公开的方法还包括使用具有对应于阳性或阴性对照的标识符的微载体。

[0153] 在一些实施方案中,本公开的方法包括通过逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)由分离的RNA扩增阳性对照序列。阳性对照RNA序列可以是可能存在于给定类型的所有样品中的任何序列,例如来自获得样品的生物体的非突变或内源性基因序列。阳性对照表明,RNA(例如,人RNA)以足以检测的水平存在于样品中。与感兴趣的突变RNA序列一样,阳性对照序列通过以下方式检测:由分离的RNA生成对阳性对照序列具有特异性的cDNA(例如,通过使用对阳性对照序列具有特异性的第一引物)和使用对阳性对照序列具有特异性的cDNA通过PCR扩增对阳性对照序列具有特异性的DNA。将扩增的阳性对照基因序列与对阳性对照基因序列具有特异性的探针杂交(将对阳性对照基因序列具有特异性的探针与具有对应于阳性对照的标识符的微载体偶联)。然后检测扩增的阳性对照序列与对阳性对照基因序列具有特异性的探针的杂交存在或不存在(并且还检测具有对应于阳性对照的标识符的微载体的模拟代码)。

[0154] 在一些实施方案中,如厂文举例说明,阳性对照RNA序列包含次黄嘌呤磷酸核糖转移酶1(HPRT1)基因(例如,人HPRT1基因)的序列,次黄嘌呤磷酸核糖转移酶1也称为HGPRT或HPRT。在一些实施方案中,对阳性对照RNA序列具有特异性的引物对包含序列GGAAGATATAATTGACACTGGCAAAACA(SEQ ID NO:34)和ATTCATTATAGTCAAGGGCATATCC(SEQ ID NO:35)。

[0155] 阻断核酸

[0156] 在一些实施方案中,本公开的方法包括在一种或多种阻断核酸(例如,对应于每种感兴趣的DNA突变的野生型型式的阻断核酸)的存在下通过PCR扩增分离的DNA。有利地,阻断核酸防止野生型DNA基因座的扩增,从而提高检测DNA突变的灵敏度(参见图4和5)。在一些实施方案中,方法包括在至少七种阻断核酸的存在下通过PCR扩增分离的DNA,至少七种阻断核酸中的每一种都与对应于KRAS、NRAS、PIK3CA、BRAF、EGFR、AKT1、MEK1或HER2塞因中的DNA突变的野生型DNA基因座杂交(例如,每个基因至少一种阻断核酸)。

[0157] 在一些实施方案中,本公开的阻断核酸包含:与对应的野生型DNA基因座杂交的单链寡核苷酸和阻断从单链寡核苷酸延伸的3′末端部分,从而防止野生型DNA基因座的扩增。在一些实施方案中,3′末端部分包含一个或多个反向脱氧胸苷(invdT)。在某些实施方案中,3′末端部分包含三个连续的反向脱氧胸苷。

[0158] 在一些实施方案中,本公开的阻断核酸包含一种或多种经修饰的核苷酸。考虑了在一些或所有序列位置包含经修饰的核苷酸的寡核苷酸,并且所述寡核苷酸可具有特别有利于在PCR期间用作阻断核酸的改进的杂交性质。例如,已知使用锁核酸(LNA)部分或完全合成的寡核苷酸比仅使用常规核苷酸合成的对应寡核苷酸具有更高的热稳定性,从而提高了寡核苷酸:LNA双链体的解链温度,并且允许较短序列在热循环期间保持稳定杂交。参见Koshkin,A.A.等人(1998)Tetrahedron 54:3607-30。多种经修饰的核苷酸是已知的并且包括但不限于锁核酸(LNA)、肽核酸(PNA)、己糖核酸(HNA)、苏糖核酸(TNA)、乙二醇核酸(GNA)

和环己烯基核酸(CeNA)。对于示例性经修饰的核苷酸的更详细描述,参见例如Schmidt,M.(2010)BioEssays 32:322-31。

[0159] 在一些实施方案中,本公开的阻断核酸与对应于KRAS的G12或G13处的一种或多种DNA突变(例如,编码G12D、G12V或G12C突变的KRAS蛋白的DNA突变)的基因座的野生型KRAS基因座杂交。在一些实施方案中,阻断核酸包含序列TACGCCACCAGCT(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:281);TTGGAGCTGGTGGCGTA(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:282);GCTGGTGGCGTAGGCA(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:283);GCTGGTGGCGTAGGC(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:284);或TTGGAGCTGGTGGCGT(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:285);斜体的核酸表示锁核酸。在一些实施方案中,阻断核酸包含序列TACGCCACCAGCT(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:281);TTGGAGCTGGTGGCGTA(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:282);GCTGGTGGCGTAGGCA(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:283);GCTGGTGGGGTAGGC(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:284);或TTGGAGCTGGTGGCGT(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:285);带下划线的核酸表示锁核酸。在某些实施方案中,n为3。在一些实施方案中,阻断核酸包含SEQ ID NO:281-285的序列,但任选地包括不同模式或类型的经修饰的核苷酸。在一些实施方案中,阻断核酸包含SEQ ID NO:281-285的序列,但包括不同的3′末端部分。

[0160] 在一些实施方案中,本公开的阻断核酸与对应于NRAS的Q61处的一种或多种DNA突变(例如,编码Q61L突变的NRAS蛋白的DNA突变)的基因座的野生型NRAS基因座杂交。在一些实施方案中,阻断核酸包含序列CTCTTCTTGTCCAG(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:286);TCTTCTTGTCCAGCTGTATCC(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:287);TCTTGTCCAGCTGT(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:288);TCTTGTCCAGCTGTATC(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:289);或TCTTCTTGTCCAGCTG(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:290);斜体的核酸表示锁核酸。在一些实施方案中,阻断核酸包含序列CTCTTCTTGTCCAG(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:286);TCTTCTTGTCCAGCTGTATCC(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:287);TCTTGTCCAGCTGT(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:288);TCTTGTCCAGCTGTATC(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:289);或TCTTCTTGTCCAGCTG(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:290);带下划线的核酸表示锁核酸。在任何上述实施方案的一些实施方案中,n为1、2、3、4、5、6、7、8、9或10。在某些实施方案中,n为3。在一些实施方案中,阻断核酸包含SEQ ID NO:286-290的序列,但任选地包括不同模式或类型的经修饰的核苷酸。在一些实施方案中,阻断核酸包含SEQ ID NO:286-290的序列,但包括不同的3′末端部分。

[0161] 在一些实施方案中,本公开的阻断核酸与对应于PIK3CA的E542或E545处的一种或多种DNA突变(例如,编码E542K或E545K突变的PIK3CA蛋白的DNA突变)的基因座的野生型PIK3CA基因座杂交。在一些实施方案中,阻断核酸包含序列CTGAAATCACTGAGCAGG(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:291);TCTCTGAAATCACTGAGCAGG(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:292);TCTCTGAAATCACTGAGCAGG(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:293);TCTCTGAAATCACTGAGCAGG(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:294);或TCTCTGAATTCACTGAGCAGG(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:295);斜体的核酸表示锁核酸。在一些实施方案中,阻断核酸包含序列CTGAAATCACTGAGCAGG(invdT)$_n$,其中n为1、2或3

(SEQ ID NO:291);TCTCTGAAATCACTGAGCAGG(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:292);TCTCTGAAATCACTGAGCAGG(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:293);TCTCTGAAATCACTGAGCAGG(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:294);或TCTCTGAATTCACTGAGCAGG(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:295);带下划线的核酸表示锁核酸。在一些实施方案中,本公开的阻断核酸与对应于PIK3CA的H1047处的一种或多种DNA突变(例如,编码H1047R突变的PIK3CA蛋白的DNA突变)的基因座的野生型PIK3CA基因座杂交。在一些实施方案中,阻断核酸包含序列CACCATGATGTGCAT(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:296);CCACCATGATGTGCAT(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:297);CACCATGATGTGCAT(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:298);CCACCATGATGTGCATCA(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:299);或CATGATGTGCA(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:300);斜体的核酸表示锁核酸。在一些实施方案中,阻断核酸包含序列CACCATGATGTGCAT(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:296);CCACCATGATGTGCAT(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:297);CACCATGATGTGCAT(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:298);CCACCATGATGTGCATCA(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:299);或CATGATGTGCA(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:300);带下划线的核酸表示锁核酸。在任何上述实施方案的一些实施方案中,n为1、2、3、4、5、6、7、8、9或10。在某些实施方案中,n为3。在一些实施方案中,阻断核酸包含SEQ ID NO:291-300的序列,但任选地包括不同模式或类型的经修饰的核苷酸。在一些实施方案中,阻断核酸包含SEQ ID NO:291-300的序列,但包括不同的3′末端部分。

[0162] 在一些实施方案中,本公开的阻断核酸与对应于BRAF的V600处的一种或多种DNA突变(例如,编码V600E突变的BRAF蛋白的DNA突变)的基因座的野生型BRAF基因座杂交。在一些实施方案中,阻断核酸包含序列GAGATTTCACTGTAGC(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:301);GAGATTTCACTGTAGC(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:302);GAGATTTCACTGTAGC(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:303);GAGATTTCACTGTAGC(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:304);或GAGATTTCACTGTAGC(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:305);斜体的核酸表示锁核酸。在一些实施方案中,阻断核酸包含序列GAGATTTCACTGTAGC(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:301);GAGATTTCACTGTAGC(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:302);GAGATTTCACTGTAGC(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:303);GAGATTTCACTGTAGC(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:304);或GAGATTTCACTGTAGC(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:305);带下划线的核酸表示锁核酸。在任何上述实施方案的一些实施方案中,n为1、2、3、4、5、6、7、8、9或10。在某些实施方案中,n为3。在一些实施方案中,阻断核酸包含SEQ ID NO:301-305的序列,但任选地包括不同模式或类型的经修饰的核苷酸。在一些实施方案中,阻断核酸包含SEQ ID NO:301-305的序列,但包括不同的3′末端部分。

[0163] 在一些实施方案中,本公开的阻断核酸与对应于EGFR的G719处的一种或多种DNA突变(例如,编码G719A突变的EGFR蛋白的DNA突变)的基因座的野生型EGFR基因座杂交。在一些实施方案中,阻断核酸包含序列CGGAGCCCAGCACTTTGA(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:306);CGCACCGGAGCCCAGCACT(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:307);GAGCCCAGCAC(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:308);CGCACCGGAGCCCAGCAC(invdT)n,

其中n为1、2或3(SEQ ID NO:309);或CGCACCGGAGCCCAGCACTTA(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:310);斜体的核酸表示锁核酸。在一些实施方案中,阻断核酸包含序列CGGAGCCCAGCACTTTGA(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:306);CGCACCGGAGCCCAGCACT(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:307);GAGCCCAGCAC(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:308);CGCACCGGAGCCCAGCAC(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:309);或CGCACCGGAGCCCAGCACTTA(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:310);带下划线的核酸表示锁核酸。在一些实施方案中,本公开的阻断核酸与对应于EGFR的E746-A750处的一种或多种DNA突变(例如,编码E746_A750del突变的EGFR蛋白的DNA突变)的基因座的野生型EGFR基因座杂交。在一些实施方案中,阻断核酸包含序列CGGAGATGTTGCTTCTCTTAATTCC(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:311);CGGAGATGTTGCTTCTCT(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:312);GTTGCTTCTCTTAATTCC(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:313);ATGTTGCTTCTCT(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:314);或TTGCTTCTCTTA(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:315);斜体的核酸表示锁核酸。在一些实施方案中,阻断核酸包含序列CGGAGATGTTGCTTCTCTTAATTCC(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:311);CGGAGATGTTGCTTCTCT(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:312);GTTGCTTCTCTTAATTCC(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:313);ATGTTGCTTCTCT(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:314);或TTGCTTCTCTTA(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:315);带下划线的核酸表示锁核酸。在一些实施方案中,本公开的阻断核酸与对应于EGFR的T790、C797、S768、V769、H773或D770处的一种或多种DNA突变(例如,编码T790M、C797S、S768I、V769_D770insASV、H773_V774insH、D770_N771insG或D770_N771insSVD突变的EGFR蛋白的DNA突变)的基因座的野生型EGFR基因座杂交。在一些实施方案中,阻断核酸包含序列CATCACGCAGCTCATG(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:316);TGCAGCTCATCACGCAGC(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:317);TCATCACGCAGCTCAT(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:318);TCATCACGCAGC(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:319);或CTCATCACGCAGC(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:320);斜体的核酸表示锁核酸。在一些实施方案中,阻断核酸包含序列CATCACGCAGCTCATG(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:316);TGCAGCTCATCACGCAGC(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:317);TCATCACGCAGCTCAT(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:318);TCATCACGCAGC(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:319);或CTCATCACGCAGC(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:320);带下划线的核酸表示锁核酸。在任何上述实施方案的一些实施方案中,n为1、2、3、4、5、6、7、8、9或10。在某些实施方案中,n为3。在一些实施方案中,本公开的阻断核酸与对应于EGFR的L858或L861处的一种或多种DNA突变(例如,编码L858R突变的EGFR蛋白的DNA突变)的基因座的野生型EGFR基因座杂交。在一些实施方案中,阻断核酸包含序列CCAGCAGTTTGGCCAGCCCT(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:321);CCAGCAGTTTGGCCAGCCCT(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:322);CCAGCAGTTTGGCCAGCCCT(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:323);AGCAGTTTGGCCAGCC(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:324);或CCAGCAGTTTGGCCAGCCCT(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:325);斜体的核酸表示锁核酸。在一些实施方案中,阻断核酸包含序列CCAGCAGTTTGGCCAGCCCT(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:321);

CCAGCAGTTTGGCCAGCCCT(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:322);CCAGCAGTTTGGCCAGCCCT(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:323);AGCAGTTTGGCCAGCC(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:324);或CCAGCAGTTTGGCCAGCCCT(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:325);带下划线的核酸表示锁核酸。在一些实施方案中,本公开的阻断核酸与对应于EGFR的T790处的一种或多种DNA突变(例如,编码T790M突变的EGFR蛋白的DNA突变)的基因座的野生型EGFR基因座杂交。在一些实施方案中,阻断核酸包含序列CATCACGCAGC(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:365);CATCACGCAG(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:366);ATCACGCAGC(invdT)n,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:367);CATCACGCAGC(invdT)n,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:368);或CATCACGCAG(invdT)n,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:369);斜体的核酸表示锁核酸。在一些实施方案中,阻断核酸包含序列CATCACGCAGC(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:365);CATCACGCAG(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:366);ATCACGCAGC(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:367);CATCACGCAGC(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:368);或CATCACGCAG(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SE Q ID NO:369);带下划线的核酸表示锁核酸。在一些实施方案中,本公开的阻断核酸与对应于EGFR的C797处的一种或多种DNA突变(例如,编码C797S(T>A或G>C)突变的EGFR蛋白的DNA突变)的基因座的野生型EGFR基因座杂交。在一些实施方案中,阻断核酸包含序列GGCTGCCTCCTG(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:416);CGGCTGCCTCCTG(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:417);CGGCTGCCTCCTG(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:418);TCGGCTGCCTCCTG(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:419);或TCGGCTGCCTCCT(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:420);斜体的核酸表示锁核酸。在一些实施方案中,阻断核酸包含序列GGCTGCCTCCTG(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:416);CGGCTGCCTCCTG(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:417);CGGCTGCCTCCTG(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:418);TCGGCTGCCTCCTG(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:419);或TCGGCTGCCTCCT(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:420);带有下划线的核酸表示锁核酸。在任何上述实施方案的一些实施方案中,n为1、2、3、4、5、6、7、8、9或10。在某些实施方案中,n为3。在一些实施方案中,阻断核酸包含SEQ ID NO:306-325、365-369和416-420的序列,但任选地包括不同模式或类型的经修饰的核苷酸。在一些实施方案中,阻断核酸包含SEQ ID NO:306-325、365-369和416-420的序列,但包括不同的3′末端部分。

[0164] 在一些实施方案中,本公开的阻断核酸与对应于AKT1的E17处的一种或多种DNA突变(例如,编码E17K突变的AKT1蛋白的DNA突变)的基因座的野生型AKT1基因座杂交。在一些实施方案中,阻断核酸包含序列TGTACTCCCCTACA(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:382);GATGTACTCCCCT(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:383);ATGTACTCCCCTAC(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:384);GTACTCCCCTACA(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:385);或GATGTACTCCCCTACA(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:386);斜体的核酸表示锁核酸。在一些实施方案中,阻断核酸包含序列TGTACTCCCCTACA(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:382);GATGTACTCCCCT(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:383);ATGTACTCCCCTAC(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:384);GTACTCCCCTACA(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:385);或GATGTACTCCCCTACA(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:386);带下划线的核酸表示锁核酸。在任何上述实施方案的一些实施方案中,n为1、2、3、4、

5、6、7、8、9或10。在某些实施方案中，n为3。在一些实施方案中，阻断核酸包含SEQ ID NO：382-386的序列，但任选地包括不同模式或类型的经修饰的核苷酸。在一些实施方案中，阻断核酸包含SEQ ID NO:382-386的序列，但包括不同的3′末端部分。

[0165] 在一些实施方案中，本公开的阻断核酸与对应于MEK1的K57处的一种或多种DNA突变(例如，编码K57N突变的MEK1蛋白的DNA突变)的基因座的野生型MEK1基因座杂交。在一些实施方案中，阻断核酸包含序列TCTGCTTCTGGGTAAG(invdT)$_n$，其中n为1、2或3(SEQ ID NO：399)；TTCTGCTTCTGGGTAAGA(invdT)$_n$，其中n为1、2或3(SEQ ID NO:400)；CACCTTCTGCTTCTGGG(invdT)$_n$，其中n为1、2或3(SEQ ID NO:401)；TCTGCTTCTGGGTA(invdT)$_n$，其中n为1、2或3(SEQ ID NO:402)；或CACCTTCTGCTTCTGGGTAAGA(invdT)$_n$，其中n为1、2或3(SEQ ID NO:403)；斜体的核酸表示锁核酸。在一些实施方案中，阻断核酸包含序列TCTGCTTCTGGGTAAG(invdT)$_n$，其中n为1、2或3(SEQ ID NO:399)；TTCTGCTTCTGGGTAAGA(invdT)$_n$，其中n为1、2或3(SEQ ID NO:400)；CACCTTCTGCTTCTGGG(invdT)$_n$，其中n为1、2或3(SEQ ID NO:401)；TCTGCTTCTGGGTA(invdT)$_n$，其中n为1、2或3(SEQ ID NO:402)；或CACCTTCTGCTTCTGGGTAAGA(invdT)$_n$，其中n为1、2或3(SEQ ID NO:403)；带下划线的核酸表示锁核酸。在任何上述实施方案的一些实施方案中，n为1、2、3、4、5、6、7、8、9或10。在某些实施方案中，n为3。在一些实施方案中，阻断核酸包含SEQ ID NO:399-403的序列，但任选地包括不同模式或类型的经修饰的核苷酸。在一些实施方案中，阻断核酸包含SEQ ID NO:399-403的序列，但包括不同的3′末端部分。

[0166] 杂交

[0167] 在一些实施方案中，本公开的方法包括将扩增的DNA与一种或多种对本公开的DNA或RNA突变具有特异性的探针杂交。在一些实施方案中，方法包括将扩增的DNA与包含对KRAS、NRAS、PIK3CA、BRAF、EGFR、AKT1、MEK1和HER2基因中的每一个中的DNA突变具有特异性的一种或多种探针(例如，一种或多种表示每个基因中的突变的探针)的至少七种探针杂交和/或将扩增的DNA与包含对ALK、ROS、RET、NTRK1和cMET基因中的每一个中的RNA突变具有特异性的一种或多种探针(例如，一种或多种表示每个基因中的突变的探针)的至少五种探针杂交。

[0168] 如本文所用，探针可指代能够与感兴趣的DNA或RNA突变的基因座的至少一部分杂交的寡核苷酸。例如，探针可包括单链寡核苷酸，所述单链寡核苷酸能够与包括感兴趣的DNA突变的单链DNA模板或包括感兴趣的RNA突变的单链DNA模板(例如，由RNA生成并且随后由cDNA生成)的大部分或所有碱基对进行碱基配对。对于突变的特异性检测，探针能够与带有DNA或RNA突变的基因座杂交，但不能与对应的野生型基因座杂交(参见图4和5)。适用于探针与扩增的DNA的杂交的条件是本领域已知的(例如，如本文引用的材料中所提及的)并在下文中举例说明。

[0169] 在一些实施方案中，本公开的探针与本公开的编码的微载体偶联，例如，如第IV部分所述。用于将多核苷酸探针与微载体表面偶联的示例性方法是本领域已知的并且在第IV部分中提供。对于多重测定，每种类型的探针可以与具有对应于探针类型的特定标识符的微载体偶联。有利地，这允许用户将从探针检测到的信号与探针的身份相关联，从而实现利用多种探针的多重测定。在一些实施方案中，本公开的探针包含5′修饰，例如5′氨基修饰物C6。

[0170] 在一些实施方案中，本公开的探针包含(1)与感兴趣的DNA或RNA突变的基因座的至少一部分杂交的序列；和(2)一个或多个另外的核苷酸。可使用一个或多个另外的核苷酸以例如将探针与微载体表面偶联和/或提供间隔以减少杂交期间微载体表面和扩增的DNA之间的空间位阻。在一些实施方案中，一个或多个另外的核苷酸位于探针序列的5′端。在其他实施方案中，一个或多个另外的核苷酸位于探针序列的3′端。在一些实施方案中，一个或多个另外的核苷酸是腺嘌呤或胸腺嘧啶核苷酸。有利地，这降低了非特异性结合的亲和力。在一些实施方案中，本公开的探针在5′端包含1个或更多个、2个或更多个、3个或更多个、4个或更多个、5个或更多个、6个或更多个、7个或更多个或8个或更多个腺嘌呤或胸腺嘧啶核苷酸。在一些实施方案中，本公开的探针在5′端包含4个、5个、6个、7个或8个腺嘌呤或胸腺嘧啶核苷酸。在一些实施方案中，本公开的探针包含至少20个、至少24个、至少25个或至少30个总核苷酸。下文提供了示例性的探针序列。

[0171] 在一些实施方案中，使用一种或多种对如本文所述的KRAS基因中的DNA突变具有特异性的探针。例如；包含序列TAGTTGGAGC T(SEQ ID NO:38)、TGTGGTAGTTG(SEQ ID NO:40)、TGATGGCGTAG(SEQ ID NO:42)、TGGAGCTGATGGC(SEQ ID NO:44)或GCGTAGGCAAG(SEQ ID NO:46)的探针可以用于检测编码G12D突变的KRAS蛋白的突变；包含序列CTGTTGGCGTAGG(SEQ ID NO:48)、GTAGTTGGAGCTG(SEQ ID NO:50)、TGGAGCTGTTGGC(SEQ ID NO:52)、TTGTGGTAGTTGG(SEQ ID NO:54)或GGCGTAGGCAAGA(SEQ ID NO:56)的探针可以用于检测编码G12V突变的KRAS蛋白的突变；包含序列TAGTTGGAGCTT(SEQ IDNO:58)、GCGTAGGCAAGA(SEQ ID NO:60)、GGAGCTTGTGGC(SEQ ID NO:62)、TTGTGGCGTAGG(SEQ ID NO:64)和/或TGTGGTAGTTGG(SEQ ID NO:66)的探针可以用于检测编码G12C突变的KRAS蛋白的突变。如上文所述，在一些实施方案中，本公开的一种或多种探针可以在其5′端包含四个、五个、六个、七个或八个或更多个核苷酸(例如，腺嘌呤或胸腺嘧啶)。在某些实施方案中，包含序列TTTTTTTTTTTTAATAGTTGGAGCT(SEQ ID NO:39)、TTTTTTTTTTTTAATGTGGTAGTTG(SEQ ID NO:41)、TTTTTTTTTTTTAATGATGGCGTAG(SEQ ID NO:43)、TTTTTTTTTTTATGGAGCTGATGGC(SEQ ID NO:45)或TTTTTTTTTTTTAAGCGTAGGCAAG(SEQ ID NO:47)的探针可以用于检测编码G12D突变的KRAS蛋白的突变。在某些实施方案中，包含序列TTTTTTTTTTTACTGTTGGCGTAGG(SEQ ID NO:49)、TTTTTTTTTTTAGTAGTTGGAGCTG(SEQ ID NO:51)、TTTTTTTTTTTATGGAGCTGTTGGC(SEQ ID NO:53)、TTTTTTTTTTTATTGTGGTAGTTGG(SEQ ID NO:55)或TTTTTTTTTTTAGGCGTAGGCAAGA(SEQ ID NO:57)的探针可以用于检测编码G12V突变的KRAS蛋白的突变。在某些实施方案中，包含序列TTTTTTTTTTTAATAGTTGGAGCTT(SEQ ID NO:59)、TTTTTTTTTTTAAGCGTAGGCAAGA(SEQ ID NO:61)、TTTTTTTTTTTAAGGAGCTTGTGGC(SEQ ID NO:63)、TTTTTTTTTTAATTGTGGCGTAGG(SEQ ID NO:65)或TTTTTTTTTTTAATGTGGTAGTTGG(SEQ ID NO:67)的探针可以用于检测编码G12C突变的KRAS蛋白的突变。还考虑了包含这些序列但不包括5′腺嘌呤和/或胸腺嘧啶的探针。

[0172] 在某些实施方案中，包含序列TTTTTTTTTTTGACATACTGGATACAG(SEQ ID NO:69)、TTTTTTTTTTTACTGGATACAGCTGGA(SEQ ID NO:71)、TTTTTTTTTTTACTAGAAGAGTACAGT(SEQ ID NO:73)、TTTTTTTTTTTATACAGCTGGACTAGA(SEQ ID NO:75)或TTTTTTTTTTTGCTGGACTAGAAGAGT(SEQ ID NO:77)的探针可以用于检测编码Q61L(A＞T)突变的NRAS蛋白的突变。还考虑了包含这些序列但不包括5′腺嘌呤和/或胸腺嘧啶的探针。

[0173] 在一些实施方案中，使用一种或多种对如本文所述的BRAF基因中的DNA突变具有特异性的探针。例如，包含序列TTTGGTCTAGCTACAGA(SEQ ID NO:79)、CTACAGAGAAATCTCGA(SEQ ID NO:81)、GTGATTTTGGTCTAGCT(SEQ ID NO:83)或TCTAGCTACAGAGAAAT(SEQ ID NO:85)的探针可以用于检测编码V600E突变的BRAF蛋白的突变。如上文所述，在一些实施方案中，本公开的一种或多种探针可以在其5′端包含四个、五个、六个、七个或八个或更多个核苷酸(例如，腺嘌呤或胸腺嘧啶)。在某些实施方案中，包含序列TTTTTTAATTGAGAAATCTCGATGGAG(SEQ ID NO:78)、TTTTTTAATTTTTGGTCTAGCTACAGA(SEQ ID NO:80)、TTTTTTAATTCTACAGAGAAATCTCGA(SEQ ID NO:82)、TTTTTTAATTGTGATTTTGGTCTAGCT(SEQ ID NO:84)或TTTTTTAATTTCTAGCTACAGAGAAAT(SEQ ID NO:86)的探针可以用于检测编码V600E突变的BRAF蛋白的突变。还考虑了包含这些序列但不包括5′腺嘌呤和/或胸腺嘧啶的探针。

[0174] 在一些实施方案中，使用一种或多种对如本文所述的PIK3CA基因中的DNA突变具有特异性的探针。例如，包含序列GCTCAGTGATTTTAG(SEQ ID NO:87)、TGCTCAGTGATTTT(SEQ ID NO:89)、GCTCAGTGATTTTAG(SEQ ID NO:91)、CCTGCTCAGTGATTTTA(SEQ ID NO:93)或CTCAGTGATTTTAGA(SEQ ID NO:95)的探针可以用于检测编码E542K突变的PIK3CA蛋白的突变；包含序列TTCTCCTGCTTA(SEQ ID NO:97)、CTCCTGCTTAGT(SEQ ID NO:99)、TCTCCTGCTTAG(SEQ ID NO:101)、TCCTGCTTAGTG(SEQ ID NO:103)或CTCCTGCTTAGTGA(SEQ ID NO:105)的探针可以用于检测编码E545K突变的PIK3CA蛋白的突变；且/或包含序列GATGCACGTCATG(SEQ ID NO:107)、TGAATGATGCACG(SEQ ID NO:109)、TGATGCACGTC(SEQ ID NO:111)、AATGATGCACGTCA(SEQ ID NO:113)或AATGATGCACGTC(SEQ ID NO:115)的探针可以用于检测编码H1047R突变的PIK3CA蛋白的突变。如上文所述，在一些实施方案中，本公开的一种或多种探针可以在其5′端包含四个、五个、六个、七个或八个或更多个核苷酸(例如，腺嘌呤或胸腺嘧啶)。在某些实施方案中，包含序列TTTTTTTTTAGCTCAGTGATTTTAG(SEQ ID NO:88)、TTTTTTTTTGCTCAGTGATTTT(SEQ ID NO:90)、TTTTTTTTAGCTCAGTGATTTTAG(SEQ ID NO:92)、TTTTTTCCTGCTCAGTGATTTTA(SEQ ID NO:94)或TTTTTTTTTTCTCAGTGATTTTAGA(SEQ ID NO:96)的探针可以用于检测编码E542K突变的PIK3CA蛋白的突变。在某些实施方案中，包含序列TTTTTTTTTTTTCTCCTGCTTA(SEQ ID NO:98)、TTTTTTTTTTTTCTCCTGCTTAGT(SEQ ID NO:100)、TTTTTTTTTTATCTCCTGCTTAG(SEQ ID NO:102)、TTTTTTTTTTTTTTCCTGCTTAGTG(SEQ ID NO:104)或TTTTTTTTTTTTCTCCTGCTTAGTGA(SEQ ID NO:106)的探针可以用于检测编码E545K突变的PIK3CA蛋白的突变。在某些实施方案中。在某些实施方案中，包含序列TTTTTTTTTTTTTTGATGCACGTCATG(SEQ ID NO:108)、TTTTTTTTTTGAATGATGCACG(SEQ ID NO:110)、TTTTTTTTTTTTGATGCACGTC(SEQ ID NO:112)、TTTTTTTTTTTAATGATGCACGTCA(SEQ ID NO:114)或TTTTTTTTTTTAATGATGCACGTC(SEQ ID NO:116)的探针可以用于检测编码H1047R突变的PIK3CA蛋白的突变。还考虑了包含这些序列但不包括5′腺嘌呤和/或胸腺嘧啶的探针。

[0175] 在一些实施方案中，使用一种或多种对如本文所述的EGFR基因中的DNA突变具有特异性的探针。例如，包含序列ATGGCCATCTTGG(SEQ ID NO:421)、GGCCATCTTGGA(SEQ ID NO:423)、GATGGCCATCTTG(SEQ ID NO:425)、TGATGGCCATCTTG(SEQ ID NO:427)或TGGCCATCTTGG(SEQ ID NO:429)的探针可以用于检测编码S768I突变的EGFR蛋白的突变；包

含序列GTGATGGCCGG(SEQ ID NO:431)、TGATGGCCGGCG(SEQ ID NO:433)、GTGATGGCCGGCGT(SEQ ID NO:435)、GATGGCCGGCGT(SEQ ID NO:437)或GATGGCCCGCGTG(SEQ ID NO:439)的探针可以用于检测编码V769_D770insASV、D770_N771insSVD或V769_D770insASV突变的EGFR蛋白的突变;包含序列AACCCCCATCACGT(SEQ ID NO:441)、GACAACCCCCATCACG(SEQ ID NO:443)、CGTGGACAACCCCCATCA(SEQ ID NO:445)、CCCATCACGTGT(SEQ ID NO:447)或TGGACAACCCCCATCAC(SEQ ID NO:449)的探针可以用于检测编码H773 V774insH突变的EGFR蛋白的突变;包含序列GCCAGCGTGGACGG(SEQ ID NO:451)、CGTGGACGGTAACC(SEQ ID NO:453)、GACGGTAACCCCC(SEQ ID NO:455)、CCAGCGTGGACGGT(SEQ ID NO:457)或GCCAGCGTGGACGGTA(SEQ ID NO:459)的探针可以用于检测编码D770_N771insG突变的EGFR蛋白的突变;包含序列CCAGGAGGCTGCCG(SEQ ID NO:461)、CAGGAGGCTGCCGA(SEQ ID NO:463)、TCCAGGAGGCTGCC(SEQ ID NO:465)、CCAGGAGGCTGCC(SEQ ID NO:467)或CAGGAGGCTGCC(SEQ ID NO:469)的探针可以用于检测编码C797S(T>A)突变的EGFR蛋白的突变;包含序列CCAGGAGGGAGCC(SEQ ID NO:471)、CCAGGAGGGAGCCG(SEQ ID NO:473)、TCCAGGAGGGAGCC(SEQ ID NO:475)、CAGGAGGGAGCCG(SEQ ID NO:477)或CAGGAGGGAGCCGA(SEQ ID NO:479)的探针可以用于检测编码C797S(G>C)突变的EGFR蛋白的突变;包含序列TCAAAGTGCTGGCCTC(SEQ ID NO:117)、AGATCAAAGTGCTGGCCTCCG(SEQ ID NO:119)、AAAGTGCTGGCCT(SEQ ID NO:121)、AGTGCTGGCCT(SEQ ID NO:123)或AAGTGCTGGCCTC(SEQ ID NO:125)的探针可以用于检测编码G719A突变的EGFR蛋白的突变;包含序列AATCAAAACATCTCCGAAAG(SEQ ID NO:128)、CAAAACATCTCCG(SEQ ID NO:130)、AACATCTCCG(SEQ ID NO:132)、AAACATCTCCGAAAGCC(SEQ ID NO:134)、AATCAAGACATCTCCGA(SEQ ID NO:136)、GCAATCAAGACATCTCCGA(SEQ ID NO:138)、AATCAAGACATCTC(SEQ ID NO:140)、AATCAAGACATCTCCGAAAGC(SEQ ID NO:142)或CAAGACATCTCCGA(SEQ ID NO:144)的探针可以用于检测编码E746_A750del突变的EGFR蛋白的突变;且/或包含序列ATTTTGGGCGGGCC(SEQ ID NO:151)、TTGGGCGGGCCAAA(SEQ ID NO:153)、GCGGGCCAAACT(SEQ ID NO:155)、GGGCGGGCCAAACT(SEQ ID NO:157)或TGGGCGGGCCA(SEQ ID NO:159)的探针可以用于检测编码L858R突变的EGFR蛋白的突变。如上文所述,在一些实施方案中,本公开的一种或多种探针可以在其5′端包含四个、五个、六个、七个或八个或更多个核苷酸(例如,腺嘌呤或胸腺嘧啶)。在某些实施方案中,包含序列TTTTTTTTTTGAGATGCATGATGA(SEQ ID NO:352)、TTTTTTTTTGAGATGCATGATGAG(SEQ ID NO:353)、TTTTTTTATGAGATGCATGATGAG(SEQ ID NO:354)、TTTTTTTTTTGAGCTGCATGATGA(SEQ ID NO:355)或TTTTTTTCATGAGATGCATGATGA(SEQ ID NO:356)的探针可以用于检测编码T790M突变的EGFR蛋白的突变。在某些实施方案中,包含序列TTTTTTTTATGGCCATCTTGG(SEQ ID NO:422)、TTTTTTTTTAGGCCATCTTGGA(SEQ ID NO:424)、TTTTTTAGATGGCCATCTTG(SEQ ID NO:426)、TTTTTTTGATGGCCATCTTG(SEQ ID NO:428)或TTTTTTTTTTGGCCATCTTGG(SEQ ID NO:430)的探针可以用于检测编码S768I突变的EGFR蛋白的突变。在某些实施方案中,包含序列TTTTTTTTTTGTGATGGCCGG(SEQ ID NO:432)、TTTTTTTTTTTGATGGCCGGCG(SEQ ID NO:434)、TTTTTTTTTTGTGATGGCCGGCGT(SEQ ID NO:436)、TTTTTTTTTTTGATGGCCGGCGT(SEQ ID NO:438)或TTTTTTTTTTTGATGGCCCGCGTG(SEQ ID NO:440)的探针可以用于检测编码V769_D770insASV、D770_N771insSVD或V769_D770insASV突变的EGFR蛋白的突变。在某些实施方案中,包含序列TTTTTTTTTTAACCCCCATCACGT(SEQ ID NO:442)、

TTTTTTTTGACAACCCCCATCACG(SEQ ID NO:444)、TTTTCGTGGACAACCCCCATCA(SEQ ID NO:446)、TTTTTTTTTTTTCCCATCACGTGT(SEQ ID NO:448)或TTTTTTTTGGACAACCCCCATCAC(SEQ ID NO:450)的探针可以用于检测编码H773_V774insH突变的EGFR蛋白的突变。在某些实施方案中,包含序列TTTTTTTTTTTGCCAGCGTGGACGG(SEQ ID NO:452)、TTTTTTTTTTTCGTGGACGGTAACC(SEQ ID NO:454)、TTTTTTTTTTTGACGGTAACCCCC(SEQ ID NO:456)、TTTTTTTTTCCAGCGTGGACGGT(SEQ ID NO:458)或TTTTTTGCCAGCGTGGACGGTA(SEQ ID NO:460)的探针可以用于检测编码D770N771insG突变的EGFR蛋白的突变。在某些实施方案中,包含序列TTTTTTTTTTACCAGGAGGCTGCCG(SEQ ID NO:462)、TTTTTTTTTTACAGGAGGCTGCCGA(SEQ ID NO:464)、TTTTTTTTTTATCCAGGAGGCTGCC(SEQ ID NO:466)、TTTTTTTTTTACCAGGAGGCTGCC(SEQ ID NO:468)或TTTTTTTTTTACAGGAGGCTGCC(SEQ ID NO:470)的探针可以用于检测编码C797S(T>A)突变的EGFR蛋白的突变。在某些实施方案中,包含序列TTTTTTTTTTACCAGGAGGGAGCC(SEQ ID NO:472)、TTTTTTTTTTACCAGGAGGGAGCCG(SEQ ID NO:474)、TTTTTTTTTTTATCCAGGAGGGAGCC(SEQ ID NO:476)、TTTTTTTTTTACAGGAGGGAGCCG(SEQ ID NO:478)或TTTTTTTTTTACAGGAGGGAGCCGA(SEQ ID NO:480)的探针可以用于检测编码C797S(G>C)突变的EGFR蛋白的突变。在某些实施方案中,包含序列TTTTTTTTTTCAAAGTGCTGGCCTC(SEQ ID NO:118)、TTTTTAGATCAAAGTGCTGGCCTCCG(SEQ ID NO:120)、TTTTTTTTTTAAAGTGCTGGCCT(SEQ ID NO:122)、TTTTTTTTTTTTAGTGCTGGCCT(SEQ ID NO:124)或TTTTTTTTTTTAAGTGCTGGCCTC(SEQ ID NO:126)的探针可以用于检测编码G719A突变的EGFR蛋白的突变。在某些实施方案中,包含序列TTTTTTTTTAATCAAAACATCTCCG(SEQ ID NO:127)、TTTTTTTTAATCAAAACATCTCCGAAAG(SEQ ID NO:129)、TTTTTTTTTTACAAAACATCTCCG(SEQ ID NO:131)、TTTTTTTTTTTTTTTAACATCTCCG(SEQ ID NO:133)、TTTTTTTTTTTTTAAACATCTCCGAAAGCC(SEQ ID NO:135)、TTTTTTTAATCAAGACATCTCCGA(SEQ ID NO:1 37)、TTTTTGCAATCAAGACATCTCCGA(SEQ ID NO:139)、TTTTTTTAATCAAGACATCTC(SEQ ID NO:141)、TTTTTTTAATCAAGACATCTCCGAAAGC(SEQ ID NO:143)或TTTTTTTTTTCAAGACATCTCCGA(SEQ ID NO:145)的探针可以用于检测编码E746_A750del突变的EGFR蛋白的突变。在某些实施方案中,包含序列TTTTTTATTTTGGGCGGGCC(SEQ ID NO:152)、TTTTTTTAATTGGGCGGGCCAAA(SEQ ID NO:154)、TTTTTTAAAAAAGCGGGCCAAACT(SEQ ID NO:156)、TTTTTTTAAAAGGGCGGGCCAAACT(SEQ ID NO:158)或TTTTTTTAAATGGGCGGGCCA(SEQ ID NO:160)的探针可以用于检测编码L858R突变的EGFR蛋白的突变。在某些实施方案中。还考虑了包含这些序列但不包括5′腺嘌呤和/或胸腺嘧啶的探针。

[0176] 在一些实施方案中,使用一种或多种对如本文所述的AKT1基因中的DNA突变具有特异性的探针。例如,包含序列TGTAGGGAAGTACA(SEQ ID NO:370)、TCTGTAGGGAAGTAC(SEQ ID NO:372)、GTCTGTAGGGAAGTACAT(SEQ ID NO:374)、CCGCACGTCTGTAGGGA(SEQ ID NO:376)或ACGTCTGTAGGGAAGTA(SEQ ID NO:378)的探针可以用于检测编码E17K突变的AKT1蛋白的突变。如上文所述,在一些实施方案中,本公开的一种或多种探针可以在其5′端包含四个、五个、六个、七个或八个或更多个核苷酸(例如,腺嘌呤或胸腺嘧啶)。在某些实施方案中,包含序列TTTTTTTTTTTTTTGTAGGGAAGTACA(SEQ ID NO:371)、TTTTTTTTTTTTCTGTAGGGAAGTAC(SEQ ID NO:373)、TTTTTTTGTCTGTAGGGAAGTACAT(SEQ ID NO:375)、

TTTTTTTCCGCACGTCTGTAGGGA(SEQ ID NO:377)或TTTTTTTTACGTCTGTAGGGAAGTA(SEQ ID NO:379)的探针可以用于检测编码E17K突变的AKT1蛋白的突变。还考虑了包含这些序列但不包括5′腺嘌呤和/或胸腺嘧啶的探针。

[0177] 在一些实施方案中,使用一种或多种对如本文所述的MEK1基因中的DNA突变具有特异性的探针。例如,包含序列TTACCCAGAATCAGAA(SEQ ID NO:387)、CCAGAATCAGAAGGTG(SEQ ID NO:389)、TTCTTACCCAGAATCA(SEQ ID NO:391)、CCTTTCTTACCCAGAATC(SEQ ID NO:393)或CAGAATCAGAAGGTGG(SEQ ID NO:395)的探针可以用于检测编码K57N突变的MEK1蛋白的突变。如上文所述,在一些实施方案中,本公开的一种或多种探针可以在其5′端包含四个、五个、六个、七个或八个或更多个核苷酸(例如,腺嘌呤或胸腺嘧啶)。在某些实施方案中,包含序列TTTTTAAATTTACCCAGAATCAGAA(SEQ ID NO:388)、TTTTTAAATCCAGAATCAGAAGGTG(SEQ ID NO:390)、TTTTTAAATTTCTTACCCAGAATCA(SEQ ID NO:392)、TTTTTAAATCCTTTCTTACCCAGAATC(SEQ ID NO:394)或TTTTTAAATCAGAATCAGAAGGTGG(SEQ ID NO:396)的探针可以用于检测编码K57N突变的MEK1蛋白的突变。还考虑了包含这些序列但不包括5′腺嘌呤和/或胸腺嘧啶的探针。

[0178] 在一些实施方案中,使用一种或多种对如本文所述的HER2基因中的DNA突变具有特异性的探针。例如,包含序列ATACGTGATGTCTTAC(SEQ ID NO:404)、ACGTGATGGCTTACGT(SEQ ID NO:406)、AAGCATACGTGATGGCT(SEQ ID NO:408)、GCATACGTGATGGCTT(SEQ ID NO:410)或GCATACGTGATGGCTTA(SEQ ID NO:412)的探针可以用于检测编码A775_G776insYVMA突变的HER2蛋白的突变。如上文所述,在一些实施方案中,本公开的一种或多种探针可以在其5′端包含四个、五个、六个、七个或八个或更多个核苷酸(例如,腺嘌呤或胸腺嘧啶)。在某些实施方案中,包含序列TTTTTTTTTATACGTGATGTCTTAC(SEQ ID NO:405)、TTTTTTTTTTTACGTGATGGCTTACGT(SEQ ID NO:407)、TTTTTAAGCATACGTGATGGCT(SEQ ID NO:409)、TTTTTTTGCATACGTGATGGCTT(SEQ ID NO:411)或TTTTTTTGCATACGTGATGGCTTA(SEQ ID NO:413)的探针可以用于检测编码A775_G776insYVMA突变的HER2蛋白的突变。还考虑了包含这些序列但不包括5′腺嘌呤和/或胸腺嘧啶的探针。

[0179] 在一些实施方案中,使用一种或多种对如本文所述的ALK基因中的RNA突变(例如,导致EML4-ALK融合基因)具有特异性的探针。例如,包含序列AAAGGACCTAAAGTGT(SEQ ID NO:161)、CCTAAAGTGTACCGC(SEQ ID NO:163)、GGGAAAGGACCTAAAG(SEQ ID NO:165)、AGTGTACCGCCGGAA(SEQ ID NO:167)或TACCGCCGGAAGCACC(SEQ ID NO:169)的探针可以用于检测E13;A20ALK突变;包含序列GACTATGAAATATTGTAC(SEQ ID NO:171)、GAAATATTGTACTTGTAC(SEQ ID NO:173)、TATTGTACTTGTACCGCC(SEQ ID NO:175)、TGTACCGCCGGAAGCAC(SEQ ID NO:177)或CCGCCGGAAGCACCAGGA(SEQ ID NO:179)的探针可以用于检测E20;A20ALK突变;包含序列TGTCATCATCAACCAA(SEQ ID NO:181)、ATGTCATCATCAACC(SEQ ID NO:183)、GTGTACCGCCGGAAGC(SEQ ID NO:185)、TCAACCAAGTGTACCG(SEQ ID NO:187)、TACCGCCGGAAGCACCA(SEQ ID NO:189)、CGAAAAAAACAGCCAA(SEQ ID NO:191)、TCGCGAAAAAAACAGC(SEQ ID NO:193)、GTGTACCGCCGGAAGC(SEQ ID NO:195)、TACCGCCGGAAGCACC(SEQ ID NO:197)或ACAGCCAAGTGTACCG(SEQ ID NO:199)的探针可以用于检测E6;A20 ALK突变。如上文所述,在一些实施方案中,本公开的一种或多种探针可以在其5′端包含四个、五个、六个、七个或八

个或更多个核苷酸(例如,腺嘌呤或胸腺嘧啶)。在某些实施方案中,包含序列TTTTTTTTTTAAAGGACCTAAAGTGT(SEQ ID NO:162)、TTTTTTTTTTCCTAAAGTGTACCGC(SEQ ID NO:164)、TTTTTTTTTTGGGAAAGGACCTAAAG(SEQ ID NO:166)、TTTTTTTTTTAGTGTACCGCCGGAA(SEQ ID NO:168)或TTTTTTTTTTTACCGCCGGAAGCACC(SEQ ID NO:170)的探针可以用于检测E13;A20 ALK突变。在某些实施方案中,包含序列TTTTTTTTTTTTGACTATGAAATATTGTAC(SEQ ID NO:172)、TTTTTTTTTTTTGAAATATTGTACTTGTAC(SEQ ID NO:174)、TTTTTTTTTTTTTATTGTACTTGTACCGCC(SEQ ID NO:176)、TTTTTTTTTTTTTTGTACCGCCGGAAGCAC(SEQ ID NO:178)或TTTTTTTTTTTTCCGCCGGAAGCACCAGGA(SEQ ID NO:180)的探针可以用于检测E20;A20ALK突变。在某些实施方案中,包含序列TTTTTTTTTTTTTTTGTCATCATCAACCAA(SEQ ID NO:182)、TTTTTTTTTTTTTTATGTCATCATCAACC(SEQ ID NO:184、TTTTTTTTTTTTTTGTGTACCGCCGGAAGC(SEQ ID NO:186)、TTTTTTTTTTTTTTTCAACCAAGTGTACCG(SEQ ID NO:188)、TTTTTTTTTTTTTTTACCGCCGGAAGCACCA(SEQ ID NO:190)、TTTTTTTTTTTTTCGAAAAAAACAGCCAA(SEQ IDNO:192)、TTTTTTTTTTTTTTCGCGAAAAAAACAGC(SEQ ID NO:194)、TTTTTTTTTTTTTTGTGTACCGCCGGAAGC(SEQ ID NO:196)、TTTTTTTTTTTTTTACCGCCGGAAGCACC(SEQ ID NO:198)或TTTTTTTTTTTTTTACAGCCAAGTGTACCG(SEQ ID NO:200)的探针可以用于检测E6;A20 ALK突变。

[0180] 在一些实施方案中,使用一种或多种对如本文所述的ROS基因中的RNA突变(例如,导致CD74-ROS或SLC34A2-ROS融合基因)具有特异性的探针。例如,包含序列ACTGACGCTCCACCGAAA(SEQ ID NO:201)、CCACTGACGCTCCACCGA(SEQ ID NO:203)、GCTGGAGTCCCAAATAAAC(SEQ ID NO:205)、GGAGTCCCAAATAAACCAG(SEQ ID NO:207)、CACCGAAAGCTGGAGTCCC(SEQ ID NO:209)、CCGAAAGATGATTTT(SEQ ID NO:211)、GACGCTCCACCGAAA(SEQ ID NO:213)、ACTGACGCTCCACCGA(SEQ ID NO:215)、GATGATTTTTGGATA(SEQ ID NO:217)或TGATTTTTGGATACCA(SEQ ID NO:219)的探针可以用于检测CD74-ROS突变;且/或包含序列AGCGCCTTCCAGCTGGTTGGA(SEQ ID NO:221)、CTGGTTGGAGCTGGAGTCCC(SEQ ID NO:223)、AGTAGCGCCTTCCAGCTGGTTG(SEQ ID NO:225)、GCTGGAGTCCCAAATAAACCA(SEQ ID NO:227)、GGAGTCCCAAATAAACCAGG(SEQ ID NO:229)、GCGCCTTCCAGCTGGTTG(SEQ ID NO:231)、GTAGCGCCTTCCAGCTGGT(SEQ ID NO:233)、TGGTTGGAGATGATTTTT(SEQ ID NO:235)、GATGATTTTTGGATACCAG(SEQ ID NO:237)或TGATTTTTGGATACCA(SEQ ID NO:239)的探针可以用于检测编码SLC34A2-ROS突变的突变。如上文所述,在一些实施方案中,本公开的一种或多种探针可以在其5′端包含四个、五个、六个、七个或八个或更多个核苷酸(例如,腺嘌呤或胸腺嘧啶)。在某些实施方案中,包含序列TTTTTTTTTTTACTGACGCTCCACCGAAA(SEQ ID NO:202)、TTTTTTTTTTTCCACTGACGCTCCACCGA(SEQ ID NO:204)、TTTTTTTTTTTGCTGGAGTCCCAAATAAAC(SEQ ID NO:206)、TTTTTTTTTTTGGAGTCCCAAATAAACCAG(SEQ ID NO:208)、TTTTTTTTTTTCACCGAAAGCTGGAGTCCC(SEQ ID NO:210)、TTTTTTTTTTTTCCGAAAGATGATTTT(SEQ ID NO:212)、TTTTTTTTTTTTGACGCTCCACCGAAA(SEQ ID NO:214)、TTTTTTTTTTTTACTGACGCTCCACCGA(SEQ ID NO:216)、TTTTTTTTTTTTGATGATTTTTGGATA(SEQ ID NO:218)或TTTTTTTTTTTTTGATTTTTGGATACCA(SEQ ID NO:220)的探针可以用于检测CD74-ROS突变。在某些实施方案中,包含序列TTTTTTTTTTTTAGCGCCTTCCAGCTGGTTGGA(SEQ ID NO:222)、TTTT

TTTTTTTTCTGGTTGGAGCTGGAGTCCC(SEQ ID NO:224)、TTTTTTTTTTTTAGTAGCGCCTTCCAGCTGGTTG(SEQ ID NO:226)、TTTTTTTTTTTTGCTGGAGTCCCAAATAAACCA(SEQ ID NO:228)、TTTTTTTTTTTTGGAGTCCCAAATAAACCAGG(SEQ ID NO:230)、TTTTTTTTTTGCGCCTTCCAGCTGGTTG(SEQ ID NO:232)、TTTTTTTTTTTGTAGCGCCTTCCAGCTGGT(SEQ ID NO:234)、TTTTTTTTTTTGGTTGGAGATGATTTTT(SEQ ID NO:236)、TTTTTTTTTTGATGATTTTTGGATACCAG(SEQ ID NO:238)或TTTTTTTTTTTTGATTTTTGGATACCA(SEQ ID NO:240)的探针可以用于检测SLC34A2-ROS突变。还考虑了包含这些序列但不包括5′腺嘌呤和/或胸腺嘧啶的探针。

[0181] 在一些实施方案中,使用一种或多种对如本文所述的RET基因中的RNA突变(例如,导致KIF5B-RET融合基因)具有特异性的探针。例如,包含序列GTGGGAAATAATGATGTAAA(SEQ ID NO:241)、CTGTGGGAAATAATGATGTA(SEQ ID NO:243)、GATCCACTGTGCGACGAGCT(SEQ ID NO:245)、TGATGTAAAGATCCACTGTG(SEQ ID NO:247)或TCCACTGTGCGACGAGCTGT(SEQ ID NO:249)的探针可以用于检测K15;R11 KIF5B-RET突变;包含序列TGGGAAATAATGATGTAAA(SEQ ID NO:251)、CTGTGGGAAATAATGATGTA(SEQ ID NO:253)、GGAGGATCCAAAGTGGGAAT(SEQ ID NO:255)、GGATCCAAAGTGGGAATT(SEQ ID NO:257)或ATGATGTAAAGGAGGATCC(SEQ ID NO:259)的探针可以用于检测K15;R12KIF5B-RET突变;包含序列CTTCGTATCTCTCAAGAGGAT(SEQ ID NO:481)、GTATCTCTCAAGAGGATCCAA(SEQ ID NO:483)、TTCGTATCTCTCAAGAG(SEQ ID NO:485)、TCAAGAGGATCCAAA(SEQ ID NO:487)或TCTCTCAAGAGG(SEQ ID NO:489)的探针可以用于检测K16;R12 KIF5B-RET突变;包含序列GTTAAAAAGGAGGATCCAA(SEQ ID NO:491)、ACAAGAGTTAAAAAGGAGGA(SEQ ID NO:493)、AAGAGTTAAAAAGGAGGATC(SEQ ID NO:495)、AAAAGGAGGATCCAAAG(SEQ ID NO:497)或AAGGAGGATCCAAAGTG(SEQ ID NO:499)的探针可以用于检测K22;R12KIF5B-RET突变;且/或包含序列AAACAGGAGGATCCAAA(SEQ ID NO:501)、AAGTGCACAAACAGGAGG(SEQ ID NO:503)、GTGCACAAACAGGAGGATC(SEQ ID NO:505)、CACAAACAGGAGGAT(SEQ ID NO:507)或AACAGGAGGATCCAAA(SEQ ID NO:509)的探针可以用于检测K23;R12 KIF5B-RET突变。如上文所述,在一些实施方案中,本公开的一种或多种探针可以在其5′端包含四个、五个、六个、七个或八个或更多个核苷酸(例如,腺嘌呤或胸腺嘧啶)。在某些实施方案中,包含序列TTTTTTTTTTGTGGGAAATAATGATGTAAA(SEQ ID NO:242)、TTTTTTTTTTCTGTGGGAAATAATGATGTA(SEQ ID NO:244)、TTTTTTTTTTGATCCACTGTGCGACGAGCT(SEQ ID NO:246)、TTTTTTTTTTTGATGTAAAGATCCACTGTG(SEQ ID NO:248)或TTTTTTTTTTTCCACTGTGCGACGAGCTGT(SEQ ID NO:250)的探针可以用于检测K15;R11 KIF5B-RET突变。在某些实施方案中,包含序列TTTTTTTTTTGGGAAATAATGATGTAAA(SEQ ID NO:252)、TTTTTTTTTCTGTGGGAAATAATGATGTA(SEQ ID NO:254)、TTTTTTTTTGGAGGATCCAAAGTGGGAAT(SEQ ID NO:256)、TTTTTTTTTGGATCCAAAGTGGGAATT(SEQ ID NO:258)或TTTTTTTTTATGATGTAAAGGAGGATCC(SEQ ID NO:260)的探针可以用于检测K15;R12 KIF5B-RET突变。在某些实施方案中,包含序列TTTTTTTTTCTTCGTATCTCTCAAGAGGAT(SEQ ID NO:482)、TTTTTTTTGTATCTCTCAAGAGGATCCAA(SEQ ID NO:484)、TTTTTTTTTTCGTATCTCTCAAGAG(SEQ ID NO:486)、TTTTTTTTTTCAAGAGGATCCAAA(SEQ ID NO:488)或TTTTTTTTTCTCTCAAGAGG(SEQ ID NO:490)的探针可以用于检测K16;R12KIF5B-RET突变。在某些实施方案中,包含序列TTTTTTTTTGTTAAAAAGGAGGATCCAA(SEQ ID NO:492)、TTTTTTTTACAAGAGTTAAAAAGGAGGA(SEQ ID NO:494)、TTATTATTAAGAGTTAAAAAGGAGGATC(SEQ

ID NO:811)、TTTTTTTTAAAAGGAGGATCCAAAG(SEQ ID NO:498)或TTTTTTTTAAGGAGGATCCAAAGTG(SEQ ID NO:500)的探针可以用于检测K22;R12KIF5B-RET突变。在某些实施方案中,包含序列TTTTTTTTAAACAGGAGGATCCAAA(SEQ ID NO:502)、TTTTTATTAAGTGCACAAACAGGAGG(SEQ ID NO:504)、TATTATTATGTGCACAAACAGGAGGATC(SEQ ID NO:506)、TATTTTTTCACAAACAGGAGGAT(SEQ ID NO:508)或TTTTATTTAACAGGAGGATCCAAA(SEQ ID NO:510)的探针可以用于检测K23;R12 KIF5B-RET突变。还考虑了包含这些序列但不包括5′腺嘌呤和/或胸腺嘧啶的探针。

[0182] 在一些实施方案中,使用一种或多种对如本文所述的NTRK1基因中的RNA突变(例如,导致CD74-NTRK1融合基因)具有特异性的探针。在某些实施方案中,包含序列CAGGATCTGGGCCCAGACA(SEQ ID NO:261)、GATCTGGGCCCAGACACTA(SEQ ID NO:263)、CCAGACACTAACAGCACAT(SEQ ID NO:265)、GGGCCCAGACACTAACAGC(SEQ ID NO:267)或CTAACAGCACATCTGGAGA(SEQ ID NO:269)的探针可以用于检测CD74-NTRK1突变。如上文所述,在一些实施方案中,本公开的一种或多种探针可以在其5′端包含四个、五个、六个、七个或八个或更多个核苷酸(例如,腺嘌呤或胸腺嘧啶)。在某些实施方案中,包含序列TTTTTTTTTTACAGGATCTGGGCCCAGACA(SEQ ID NO:262)、TTTTTTTTTTAGATCTGGGCCCAGACACTA(SEQ ID NO:264)、TTTTTTTTTTACCAGACACTAACAGCACAT(SEQ ID NO:266)、TTTTTTTTTTAGGGCCCAGACACTAACAGC(SEQ ID NO:268)或TTTTTTTTTTTACTAACAGCACATCTGGAGA(SEQ ID NO:270)的探针可以用于检测CD74-NTRK1突变。

[0183] 在一些实施方案中,使用一种或多种对如本文所述的cMET基因中的RNA突变(例如,导致外显子14的跳读)具有特异性的探针。在某些实施方案中,包含序列AGAAAGCAAATTAAAGAT(SEQ ID NO:271)、AGCAAATTAAAGATCAG(SEQ ID NO:273)、AAATTAAAGATCAGTTTC(SEQ ID NO:275)、AGATCAGTTTCCTAATTC(SEQ ID NO:277)或AAGATCAGTTTCCTAATT(SEQ ID NO:279)的探针可以用于检测cMET外显子14跳读突变。如上文所述,在一些实施方案中,本公开的一种或多种探针可以在其5′端包含四个、五个、六个、七个或八个或更多个核苷酸(例如,腺嘌呤或胸腺嘧啶)。在某些实施方案中,包含序列TTTTTTTTTTAGAAAGCAAATTAAAGAT(SEQ ID NO:272)、TTTTTTTTTTAGCAAATTAAAGATCAG(SEQ ID NO:274)、TTTTTTTTTTAAATTAAAGATCAGTTTC(SEQ ID NO:276)、TTTTTTTTTTAGATCAGTTTCCTAATTC(SEQ ID NO:278)或TTTTTTTTTTAAGATCAGTTTCCTAATT(SEQ ID NO:280)的探针可以用于检测cMET外显子14跳读突变。还考虑了包含这些序列但不包括5′腺嘌呤和/或胸腺嘧啶的探针。

[0184] 应当理解,上述引物、阻断核酸和探针可以在本公开的方法和试剂盒中以任意数量或组合进行组合。厂文更详细地描述了示例性和非限制性试剂盒。

[0185] 检测

[0186] 在一些实施方案中,本公开的方法包括检测扩增的DNA与本公开的探针的杂交存在或不存在。扩增的DNA与探针之一之间的杂交表明对应于扩增的DNA中的探针的DNA或RNA突变的存在。本文描述并举例说明了示例性杂交条件和检测技术。在一些实施方案中,使用5X SSPE缓冲液进行杂交。

[0187] 在一些实施方案中,使用检测试剂标记扩增的DNA或cDNA,并且通过与微载体缔合的检测试剂的信号来测量杂交,例如在洗涤步骤之后以减少或消除非特异性结合。在一些

实施方案中，本公开的引物对包含与检测试剂偶联的一种或两种引物。因此，在使用标记的引物进行PCR扩增之后，用检测试剂标记扩增的DNA。在一些实施方案中，检测试剂可以是基于荧光的，包括但不限于藻红蛋白(PE)、蓝色荧光蛋白、绿色荧光蛋白、黄色荧光蛋白、青色荧光蛋白及其衍生物。在其他实施方案中，检测试剂可以是基于放射性同位素的，包括但不限于用^{32}P、^{33}P、^{22}Na、^{36}Cl、^{2}H、^{3}H、^{35}S和^{123}I标记的分子。在其他实施方案中，检测试剂是基于光的，包括但不限于荧光素酶(例如，基于化学发光的)、辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶及其衍生物。在一些实施方案中，扩增的DNA可以在与微载体组合物接触之前用检测试剂标记。在一些实施方案中，检测试剂在靠近探针时发射信号，例如，与Förster共振能量转移(FRET)一样。多种核酸标记技术是本领域已知的；参见例如Gibriel，A.A.Y.(2012)Briefings in Functional Genomics 11:311-8。

[0188] 在一些实施方案中，检测试剂可以是荧光检测试剂。在一些实施方案中，检测扩增的DNA与探针的杂交存在或不存在通过荧光显微术(例如，荧光显微镜或读板器)执行。在一些实施方案中，检测试剂可以是基于比色的。在一些实施方案中，检测试剂可以是基于发光的。在一些实施方案中，检测扩增的DNA与探针的杂交存在或不存在通过发光显微术(例如，发光显微镜或读板器)执行。

[0189] 在一些实施方案中，检测试剂包含可以通过添加与信号发射实体(例如，如上所述)缀合的第二试剂检测到的标签或其他部分。例如，在一些实施方案中，检测试剂包含生物素(例如引物，诸如可以在5′端用生物素标记的反向或反义引物)。因此，在一些实施方案中，检测存在或不存在杂交可以包括，在杂交和任选的洗涤之后，将微载体与缀合至信号发射实体的第二试剂接触并检测来自与微载体缔合的信号发射实体的信号(例如，在任选的洗涤之后)。例如，如果检测试剂包含生物素，则可以将微载体与缀合至信号发射实体(诸如藻红蛋白(PE))的链霉亲和素接触，并且可以检测来自信号发射实体的信号。

[0190] 根据特定的检测试剂，可以使用多种技术来检测扩增的DNA与探针的杂交。例如，如果检测试剂包括荧光检测试剂，则检测扩增的DNA的杂交存在或不存在可以包括荧光检测试剂的荧光成像。

[0191] 在一些实施方案中，检测可以包括一个或多个洗涤步骤例如以减少污染物、去除与探针、DNA和/或微载体表面非特异性结合的任何物质等。在一些实施方案中，磁性分离步骤可用于洗涤含有本公开的磁性层或材料的微载体。在其他实施方案中，可使用本领域已知的其他分离步骤。

[0192] 在一些实施方案中，本公开的方法包括检测扩增的DNA与每次测定每个探针总共约1个至约1000个微载体的杂交存在或不存在。在一些实施方案中，本公开的方法包括检测扩增的DNA与测定盘的每个孔每个探针总共约1个至约1000个微载体的杂交存在或不存在。在一些实施方案中，本公开的方法包括检测扩增的DNA与每次测定每个探针至少约50个微载体的杂交存在或不存在。在一些实施方案中，本公开的方法包括检测扩增的DNA与测定板的每个孔每个探针至少约50个微载体的杂交存在或不存在。在一些实施方案中，本公开的微载体包含以1μM的浓度与其偶联的探针。

[0193] 在一些实施方案中，本公开的方法包括检测编码的微载体的标识符。例如，在一些实施方案中，可以获得编码的微载体的标识符的图像并对其进行解码以鉴定微载体及其对应的探针。在一些实施方案中，标识符检测步骤可以在杂交检测步骤之后发生。在一些实施

方案中，标识符检测步骤可以在杂交检测步骤之前发生。在一些实施方案中，标识符检测步骤可以与杂交检测步骤同时发生。在一些实施方案中，在杂交检测步骤和标识符检测步骤之后，本公开的方法还包括将检测到的微载体的标识符与检测到的扩增的DNA与对应于微载体的探针的杂交存在或不存在相关联。

[0194] 本文描述了多种微载体编码方案。在一些实施方案中，检测编码的微载体的标识符包括对微载体的数字条形码进行成像。在一个实施方案中，编码的微载体包含具有一系列交替的透光和不透明部分的主体，具有相对宽度条形码图像(例如，一系列表示“0”代码的窄狭缝和表示“1”代码的宽狭缝，或反之亦然)。当用光束照射微载体时，基于透射峰的“总强度”或来自狭缝的透射峰的“带宽”，数字条形码0或1可以由线形扫描相机、影像截取卡和数字信号处理器确定。在一个实施方案中，具有一系列窄带和宽带的条形码图案为0和1提供了明确的信号和区分。狭缝在托盘上的位置将确定哪些位是最低有效位(LSB)和最高有效位(MSB)。LSB将放置在更靠近托盘边缘的位置，以将其与另一个较长端处的MSB区分开来。

[0195] 在一些实施方案中，检测编码的微载体的标识符包括对微载体的标识符进行成像，例如通过对标识符进行明场成像，诸如使用本公开的模拟代码。

[0196] 考虑了多种解码技术。在一些实施方案中，使用模拟形状识别来检测标识符以鉴定标识符(例如，模拟编码的标识符)。从概念上说，这种解码可能涉及例如对每种微载体的模拟代码进行成像(例如，在溶液或样品中)、将每个图像与模拟代码库进行比较、以及将每个图像与来自库的图像进行匹配，从而肯定地鉴定代码。任选地，如本文所述，当使用包括方向指示符(例如，不对称)的微载体时，解码还可包括旋转每个图像以与特定方向对齐的步骤(部分基于例如方向指示符)。例如，如果方向指示符包括间隙，则可以旋转图像直到间隙达到预定位置或方向(例如，图像的0°位置)。

[0197] 各种形状识别软件、工具和方法是本领域已知的。此类API和工具的实例包括但不限于Microsoft® Research FaceSDK、OpenBR、来自ReKognition的Face and Scene Recognition、Betaface API和各种ImageJ插件。在一些实施方案中，模拟形状识别可包括但不限于图像处理步骤，诸如前景提取、形状检测、阈值化(例如，自动或手动图像阈值化)等。

[0198] 本领域的技术人员将理解，本文所述的方法和微载体可适用于各种成像设备，包括但不限于显微镜、读板器等。在一些实施方案中，解码标识符(例如，模拟代码)可以包括通过使光穿过基本透明的部分(例如，微载体和/或周围溶液的基本透明的聚合物层)来照射微载体。然后，光可能无法穿过或以较低强度或其他明显差异穿过微载体的基本不透明的部分(例如，基本不透明的层)以生成对应于标识符的模拟编码的光图案。即，成像光的图案可对应于微载体的基本透明/基本不透明区域的图案，从而产生模拟代码标识符的图像。此成像可包括以下步骤，包括但不限于捕获图像、阈值化图像、以及期望实现标识符的更准确、精确或稳健的标识符成像的任何其他图像处理步骤。

[0199] 任何类型的光学显微术都可用于本公开的方法，包括但不限于以下中一种或多种：明场显微术、暗场显微术、相差显微术、微分干涉相差(DIC)显微术、Nomarski干涉相差(NIC)显微术、Nomarski显微术、霍夫曼调制相差(HMC)显微术或荧光显微术。在某些实施方案中，可使用明场显微术对标识符进行解码，并且可使用荧光显微术检测杂交。

[0200] 在一些实施方案中，解码标识符还可包括使用模拟形状识别来将模拟编码的图像与模拟代码匹配。在一些实施方案中，图像可与预定阈值内的模拟代码(例如，来自图像文件库的图像文件，每个图像文件对应于独特的二维形状/模拟代码)匹配，例如，所述阈值容许图像与示例模拟代码图像之间的预定偏差或失配量。这样的阈值可以凭经验确定，并且可自然地基于用于模拟代码的特定类型的二维形状和潜在二维形状的组之间的变化程度。

[0201] 适用于本公开的方法的微载体及其任选方面的示例性和非限制性描述在下文提供。

[0202] IV.编码的微载体

[0203] 本文提供了适用于分析物检测(例如，多重分析物检测)的编码的微载体。本文考虑、描述和举例说明了编码的微载体的多种配置。如本文所用，“编码的”微载体可指代具有对应于与其偶联的探针的身份的标识符的微载体。这使得使用微载体的测定的数据能够与探针的身份相关联，从而允许在单个多重测定中使用多种微载体，因为任何单个微载体的结果都可以与其探针的身份相关联。下文描述了示例性类型的标识符，包括数字条形码和模拟代码。描述于国际公开号WO2016198954中的任何微载体(或其配置或特征)可用于本文所述的方法和试剂盒。

[0204] 在一些方面，本公开的方法和试剂盒使用数字条形码标识符。例如，在一些实施方案中，编码的微载体包含：第一光致聚合物层；第二光致聚合物层；以及介于第一层和第二层之间的中间层。在一些实施方案中，中间层具有表示限定在其上的标识符的编码图案，其中中间层部分基本地可透光并且部分基本地不透光，从而表示对应于微载体的代码，其中微载体的最外表面包含光致抗蚀剂光致聚合物，并且光致抗蚀剂光致聚合物被对DNA突变具有特异性的探针官能化，并且其中微载体具有大约与水相同的密度。示例性微载体描述可参见例如美国专利号7,858,307；7,871,770；8,148,139；8,232,092；和9,255,922；以及美国PG公开号US2009/201504、2011/0007955和2012/0088691。

[0205] 在一个实施方案中，本公开的数字编码的微载体包括具有一系列交替的透光和不透明部分的主体，其相对位置、宽度和/或间距类似于1D或2D条形码图像(例如，一系列表示“0”代码的窄狭缝(例如，宽度约1微米至5微米)和表示“1”代码的宽狭缝(例如，宽度约1微米至10微米)，或反之亦然，以形成二进制代码)。在一个实施方案中，微载体的尺寸被定尺寸并配置为150×50×10μm，或成比例地更小，以及约2.5μm的狭缝宽度。这种微载体上的每个数字条形码最多可以由14个狭缝(或位)组成，从而允许16,384个独特代码。在一个实施方案中，编码的微载体的主体可被配置为具有至少两个在相对几何形状和/或尺寸方面不同的正交横截面。此外，横截面的几何形状可以是对称的或非对称的、和/或规则的或不规则的形状。在一个实施方案中，编码的微载体的最长正交轴小于1mm。在一个实施方案中，编码的微载体设置有反射薄膜，(例如，用金属薄膜镀覆或涂覆编码的微载体，或提供金属薄膜的中间层)以提高图像识别的对比度和光学效率以进行解码。通过适当地修改上述工艺，一个替代实施方案可包括作为夹在两个聚合物层之间的层的金属层。对于此实施方案，可以使微载体的两个暴露的平坦表面的表面条件相同，以提供相似的表面涂层和固定条件。另一个实施方案是用聚合物或功能分子(诸如本公开的探针)涂覆微载体；因此，整个微载体具有相同的分子固定条件。

[0206] 在一些方面，本公开的方法和试剂盒使用模拟代码标识符。例如，在一些实施方案

中，本公开的方法和试剂盒使用编码的微载体，其包含：具有第一表面和第二表面的基本透明聚合物层，第一表面和第二表面彼此平行；基本不透明层，其中基本不透明聚合物层附接到基本透明聚合物层的第一表面并且包围基本透明聚合物层的中心部分，并且其中基本不透明聚合物层包含表示模拟代码的二维形状；和本公开的对DNA或RNA突变具有特异性的探针，其中探针在基本透明聚合物层的至少中心部分中与基本透明聚合物层的第一表面和第二表面中的至少一个偶联。模拟代码表示标识符。因此，微载体含有至少两层：一层是基本透明的，并且另一层是基本不透明的、表示模拟代码标识符的二维形状。

[0207] 有利地，这些微载体可采用多种二维形状，同时仍保持一致的整体形式(例如，基本透明聚合物层的周边)以实现包括例如整体尺寸、物理性质和/或溶液行为的方面的一致性。这有利于例如允许不同种类的微载体之间的更大的一致性(即，每种都具有由透明聚合物层提供的相同的周边形状)。此类型的微载体的实例及其方面在图1A-2C中说明。

[0208] 图1A和1B示出了示例性微载体100的两个视图。微载体100是直径约50μm并且厚度约10μm的圆盘。图1A提供了看盘的圆形面的微载体100的视图，而图1B示出了与图1A所示表面正交的微载体100的侧视图。示出了微载体100的两种组分。首先，基本透明聚合物层102提供了微载体的主体。如本文所述，层102可例如使用诸如SU-8的聚合物来产生。

[0209] 基本不透明聚合物层104附接到层102的表面。虽然图1B所示的微载体100的横截面示出了层104的不连续视图，但图1A所示的视图说明了层104的形状类似于具有多个齿的圆形齿轮。这些齿轮齿的形状、数量、尺寸和间距构成二维形状，并且可修改齿轮齿的这些方面中的一个或多个以产生用于模拟编码的多个二维形状。有利地，层104的轮齿的外侧边缘装配在层102的周边内。这允许多种模拟代码，每种代码表示一种微载体的独特标识符，同时在多种微载体之间保持一致的整体形状。换句话说，多个种类群体内的每种微载体可具有不同的二维齿轮形状(即，模拟代码)，但每种微载体将具有相同的周边，从而导致物理性质(例如，尺寸、形状、溶液行为等)的更大的一致性。如本文所述，层104可例如使用聚合物(诸如与染料混合的SU-8)或使用黑色矩阵抗蚀剂来产生。这仅仅是示例性形状；其他形状在上文中有所描述并且例如在图2A-2C中示出。

[0210] 层104围绕层102的中心部分106。探针偶联到层102的一个或两个表面(即，上/下表面)上的至少中心部分106。有利地，这允许对中心部分106进行成像，而没有任何由层104导致的干扰的可能性。

[0211] 图1C和1D示出了使用微载体100进行分析物检测的示例性测定。图1C示出了微载体100可包括在至少中心部分106中与一个或多个表面偶联的探针108。微载体100与含有扩增的DNA 110的溶液接触，所述溶液在接触微载体100之前已经变性，并且与探针108杂交。如上所述，扩增的DNA 110与检测试剂偶联。在此实例中，检测试剂是生物素(例如，由使用生物素标记的引物扩增DNA导致)。因此，扩增的DNA 110包括DNA 110a(例如，包含本文所述的突变的基因座)和生物素110b。图1C说明了捕获扩增的DNA 110的单个微载体种类(即，微载体100)，但在多重测定中使用了多个微载体种类，每个种类具有识别指定DNA突变的特定探针。

[0212] 图1D说明了用于“读取”微载体100的示例性过程。此过程包括可同时或分别完成的两个步骤。首先，检测探针108对扩增的DNA110的杂交。在图1D所示的实例中，第二检测试剂114(例如，与PE缀合的链霉亲和素)经由生物素：链霉亲和素相互作用与扩增的DNA110结

合。不与偶联至微载体100的探针杂交的扩增的DNA可能在检测之前已被洗掉，使得仅检测到与微载体100结合的DNA。当被PE的激发谱内的波长的光116激发时，第二检测试剂114的PE部分发射光118(例如，光子)。光118可通过任何合适的检测装置(诸如荧光显微镜、读板器等)来检测。

[0213] 此外，读取微载体100的独特标识符。在图1D所示的实例中，光112用于照射含有微载体100的场(在一些实施方案中，光112可以具有与光116和118不同的波长)。当光112照射含有微载体100的场时，它穿过基本透明聚合物层102但被基本透明聚合物层104阻挡，如图1D所示。这生成了可以例如通过光学显微术(例如，使用微分干涉相差显微术或DIC显微术)成像的光图案。此光图案基于微载体100的二维形状(即，模拟代码)。标准图像识别技术可用于解码微载体100的图像表示的模拟代码。

[0214] 如下文更详细描述的，分析物检测和标识符成像步骤可以任何顺序发生或同时发生。有利地，图1D所示的两个检测步骤可在一个成像设备上完成。作为一个实例，能够使用荧光和光(例如，明场)显微术的显微镜可用于量化与微载体100结合的扩增的DNA 110的量(例如，如通过检测试剂114检测到的)和对由层102和104产生的模拟代码进行成像。这允许以更少的器械要求实现更有效的测定过程。

[0215] 在一些实施方案中，微载体还包括磁性的基本不透明层，所述磁性的基本不透明层附接到基本透明聚合物层的表面，包围基本透明聚合物层的中心部分。在一些实施方案中，磁性的基本不透明层位于基本不透明聚合物层和基本透明聚合物层的中心部分之间。

[0216] 在一些实施方案中，微载体还包括对齐并附接到第一基本透明聚合物层的第二基本透明聚合物层。在一些实施方案中，第一和第二基本透明聚合物层各自具有中心部分，并且第一和第二基本透明聚合物层的中心部分是对齐的。在一些实施方案中，微载体还包括磁性的基本不透明层，其包围第一和第二基本透明聚合物层的中心部分。在一些实施方案中，磁性的基本不透明层附接到第一和第二基本透明聚合物层之间。在一些实施方案中，磁性的基本不透明层位于基本不透明聚合物层与第一和第二基本透明聚合物层的中心部分之间。

[0217] 在一些实施方案中，微载体还包括用于定向基本透明聚合物层的模拟代码的定向指示器。微载体的任何通过成像(例如，显微形式或本文所述的其他成像形式)和/或通过图像识别软件可见和/或可检测的特征可充当定向指示器。定向指示器可充当例如图像识别算法的参考点以将模拟代码的图像定向成一致的方向(即，基本不透明聚合物层的形状)。有利地，这简化了图像识别，因为算法只需要将特定模拟代码的图像与相同方向的模拟代码的库进行比较，而不需要与包括所有可能方向的所有模拟代码的库进行比较。在一些实施方案中，定向指示器包括基本不透明聚合物层的轮廓的不对称性。例如，定向指示器可包括微载体轮廓(例如，如图2C所示的代码环中的不连续性所说明的)的可见特征，诸如不对称性。

[0218] 本文所述的任何微载体可包括下文描述的特征、元素或方面中的一种或多种。此外，下文描述的特征、元素或方面中的一种或多种可根据微载体的实施方案采用不同的特性，例如，如上所述。

[0219] 在一些实施方案中，本发明的聚合物包含环氧基聚合物。用于制造本文所述的组合物的合适的环氧基聚合物包括但不限于由Hexion Specialty Chemicals，Inc.

(Columbus,OH)提供的环氧树脂的EPON™家族和由Dow Chemical Company (Midland,MI)提供的任何数量的环氧树脂。合适的聚合物的许多实例是本领域普遍已知的,包括但不限于SU-8、EPON 1002F、EPON 165/154和聚(甲基丙烯酸甲酯)/聚(丙烯酸)嵌段共聚物(PMMA-co-PAA)。对于另外的聚合物,参见例如Warad,IC Packaging:Package Construction Analysis in Ultra Small IC Packaging,LAP LAMBERT Academic Publishing(2010);The Electronic Packaging Handbook,CRC Press(Blackwell编辑),(2000);和Pecht等人,Electronic Packaging Materials and Their Properties,CCR Press,第1版(1998)。这些类型的材料具有在水性环境中不溶胀的优点,这确保了在微载体群内保持一致的微载体尺寸和形状。在一些实施方案中,基本透明聚合物是光致抗蚀剂聚合物。在一些实施方案中,环氧基聚合物是环氧基负性近UV光致抗蚀剂。在一些实施方案中,环氧基聚合物是SU-8。

[0220] 在一些实施方案中,基本不透明聚合物是本文所述的与一种或多种不透明或有色染料混合的聚合物(例如,SU-8)。在其他实施方案中,基本不透明聚合物是黑色矩阵抗蚀剂。可以使用本领域已知的任何黑色矩阵抗蚀剂;参见例如美国专利号8,610,848的示例性黑色矩阵抗蚀剂及其相关方法。在一些实施方案中,黑色矩阵抗蚀剂可以是用黑色颜料着色的光致抗蚀剂,例如,作为黑色矩阵的一部分在LCD的滤色器上图案化。黑色矩阵抗蚀剂可包括但不限于由Toppan Printing Co.(Tokyo)、Tokyo OHKA Kogyo(Kawasaki)和Daxin Materials Corp.(Taichung City,Taiwan)出售的那些。

[0221] 如上所述,本公开的微载体还可包括磁性层,其可采用如本文所述的多种形状。在一些实施方案中,磁性层可以是基本不透明层。在一些实施方案中,磁性层可包含磁性材料。本公开的磁性层可由任何合适的磁性材料(诸如具有顺磁性、铁磁性或亚铁磁性的材料)制成。磁性材料的实例包括但不限于铁、镍、钴和一些稀土金属(例如,钆、镝、钕等),以及它们的合金。在一些实施方案中,磁性材料包括镍,包括但不限于元素镍和磁性镍合金,诸如阿尔尼科合金和坡莫合金。在本公开的微载体中包括磁性层可能有利于例如促进磁性分离,磁性分离可用于洗涤、收集和以其他方式操纵一种或多种微载体。

[0222] 在一些实施方案中,本公开的微载体可以编码有构成二维形状的基本不透明层。例如,如上所述,二维形状可构成与微载体的基本透明层相反的基本不透明层的形状,或者它可以构成微载体本身的形状(例如,周边)。即,代码是基本不透明层本身的形状(例如,而不是由微载体层表面上的荧光或其他可见部分生成的代码)。可使用可以涵盖多种可分辨的和与众不同的变体的任何二维形状。在一些实施方案中,二维形状包括线性、圆形、椭圆形、矩形、四边形或更高的多边形方面、元素和/或形状中的一种或多种。在一些实施方案中,二维形状可使用本公开的磁性的基本不透明层来产生。在一些实施方案中,模拟代码包含一种或多种形成连续或不连续的环(例如,围绕微载体的中心部分)的重叠或部分重叠的弧形元素。

[0223] 图2A说明了模拟编码方案的三个示例性实施方案:微载体200、202和204。重要的是,如上所述,使用模拟图像识别可获得更复杂的编码方案,从而极大地扩展了潜在独特代码的数量。在一些实施方案中,基本不透明聚合物层的二维形状包括一个或多个围绕基本透明聚合物层的中心部分的环。在一些实施方案中,一个或多个环中的至少一个包括不连续性。使用一个或多个环(例如,两个环)形成的、具有不同数量和配置的不连续性的示例性

且非限制性的二维形状2B中说明。图2B说明了代码的10个示例性实施方案，尤其是关于形状的数量(例如，与代码ZN_10中的七种不同的形状相比，代码ZN_3中的两种不同的形状)和/或形状的尺寸(例如，代码ZN_2中的大、小和中等尺寸的形状)。

[0224] 在一些实施方案中，模拟代码包含一种或多种形成连续或不连续的环(例如，围绕微载体的中心部分)的重叠或部分重叠的弧形元素。通过对微载体进行成像(例如，通过光学显微术)来解码二维形状，使得代码的图像由图案形成，所述图案由穿过基本透明的磁性聚合物层的光和被阻挡穿过基本不透明层的光生成。由形成不连续环的重叠弧形元素制成的二维形状的非限制性实例在图2C中说明。

[0225] 在一些实施方案中，微载体的直径小于约200μm。例如，在一些实施方案中，微载体的直径小于约200μm、小于约180μm、小于约160μm、小于约140μm、小于约120μm、小于约100μm、小于小于约80μm、小于约60μm、小于约40μm或小于约20μm。

[0226] 在一些实施方案中，微载体的直径为约180μm、约160μm、约140μm、约120μm、约100μm、约90μm、约80μm、约70μm、约60μm、约50μm、约40μm、约30μm、约20μm或约10μm。在某些实施方案中，微载体的直径为约60μm。

[0227] 在一些实施方案中，微载体的厚度小于约50μm。例如，在一些实施方案中，微载体的厚度小于约70μm、约60μm、约50μm、约40μm、约30μm、小于约25μm、小于约20μm、小于约15μm、小于约10μm或小于约5μm。在一些实施方案中，微载体的厚度小于约以下厚度中的任一种(以μm计)：70、65、60、55、50、45、40、35、30、25、20、15、10、9、8、7、6、5、4、3、或2。在一些实施方案中，微载体的厚度大于约以下厚度中的任一种(以μm计)：1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、或65。即，微载体的厚度可以是具有70、65、60、55、50、45、40、35、30、25、20、15、10、9、8、7、6、5、4、3或2的上限和1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60或65的独立选择的下限的任何厚度范围(以μm计)，其中下限低于上限。

[0228] 在一些实施方案中，微载体的厚度为约50μm、约45μm、约40μm、约35μm、约30μm、约25μm、约20μm、约19μm、约18μm、约17μm、约16μm、约15μm、约14μm、约13μm、约12μm、约11μm、约10μm、约9μm、约8μm、约7μm、约6μm、约5μm、约4μm、约3μm、约2μm、或约1μm。在某些实施方案中，微载体的厚度为约10μm。

[0229] 可使用多种技术将本公开的探针与编码的微载体偶联。在一些实施方案中，探针偶联到微载体的表面(在一些实施方案中，在微载体表面的至少中心部分中)。在一些实施方案中，探针可偶联到聚合物层的第一或第二表面中的一个或两个。在一些实施方案中，聚合物包含环氧基聚合物或含有环氧基团。

[0230] 在一些实施方案中，探针可以化学连接至微载体。在其他实施方案中，探针可以物理地吸附到微载体表面。在一些实施方案中，探针和微载体表面之间的连接键可以是共价键。在其他实施方案中，探针和微载体表面之间的连接键可以是非共价键，包括但不限于盐桥或其他离子键、一种或多种氢键、疏水相互作用、范德华力、伦敦色散力、机械键、一种或多种卤素键、亲金性、嵌入或堆叠。

[0231] 在一些实施方案中，偶联探针涉及使聚合物与光酸发生剂和光反应以生成交联聚合物。在一些实施方案中，光具有激活光酸发生剂的波长，例如UV或近UV光。光酸发生剂可从Sigma-Aldrich(St.Louis)和BASF(Ludwigshafen)商购获得。可使用本领域已知的任何

合适的光酸发生剂,包括但不限于三苯基或三芳基锍六氟锑酸盐;三芳基锍六氟磷酸盐;三苯基锍全氟-1-丁磺酸盐;三苯基锍三氟甲磺酸盐;三(4-叔丁基苯基)锍全氟-1-丁磺酸盐或三氟甲磺酸盐;含有双(4-叔丁基苯基)碘鎓的光酸发生剂,诸如双(4-叔丁基苯基)碘鎓全氟-1-丁磺酸盐、对甲苯磺酸盐和三氟甲磺酸盐;Boc-甲氧基苯基二苯基锍三氟甲磺酸盐;(叔丁氧基羰基甲氧基萘基)-二苯基锍三氟甲磺酸盐;(4-叔丁基苯基)二苯基锍三氟甲磺酸盐;二苯基碘鎓六氟磷酸盐、硝酸盐、全氟-1-丁磺酸盐、三氟甲磺酸盐或对甲苯磺酸盐;(4-氟苯基)二苯基锍三氟甲磺酸盐;N-羟基萘酰亚胺三氟甲磺酸盐;N-羟基-5-降冰片烯-2,3-二酰亚胺全氟-1-丁磺酸盐;(4-碘苯基)二苯基锍三氟甲磺酸盐;(4-甲氧基苯基)二苯基锍三氟甲磺酸盐;2-(4-甲氧基苯乙烯基)-4,6-双(三氯甲基)-1,3,5-三嗪;(4-甲基苯基)二苯基锍三氟甲磺酸盐;(4-甲硫基苯基)甲基苯基锍三氟甲磺酸盐;(4-苯氧基苯基)二苯基锍三氟甲磺酸盐;(4-苯硫基苯基)二苯锍三氟甲磺酸盐;或描述于product-finder.basf.com/group/corporate/product-finder/de/literature-document:/Brand+Irgacure-Brochure--Photoacid+Generator+Selection+Guide-English.pdf.中的任何光酸发生剂。在一些实施方案中,光酸发生剂是含锍光酸发生剂。

[0232] 在一些实施方案中,偶联探针涉及使交联聚合物的环氧化物与官能团(诸如胺、羧基、硫醇等)反应。或者,可以将表面上的环氧基团氧化成羟基,羟基随后用作水溶性聚合物(诸如聚(丙烯酸))的接枝聚合的引发位点。然后使用聚(丙烯酸)中的羧基与捕获剂中的氨基或羟基形成共价键。例如,在某些实施方案中,使用聚(丙烯酸)中的羧基与探针中的氨基形成共价键。

[0233] 在一些实施方案中,偶联探针涉及使交联聚合物的环氧化物与含有胺和羧基的化合物反应。在一些实施方案中,化合物的胺与环氧化物反应以形成化合物偶联的交联聚合物。不希望受理论的限制,认为探针可在聚合物交联之前与聚合物偶联;然而,这可能会降低所得表面的一致性。可使用具有伯胺和羧基的任何化合物。化合物可包括但不限于甘氨酸、氨基十一烷酸、氨基己酸、丙烯酸、2-羧乙基丙烯酸、4-乙烯基苯甲酸、3-丙烯酰胺基-3-甲基-1-丁酸、甲基丙烯酸缩水甘油酯等。在一些实施方案中,化合物偶联的交联聚合物的羧基与探针的胺(例如,伯胺)反应以将捕获剂偶联至基本透明聚合物。

[0234] 用于制备本文所述的任何编码的微载体的方法在国际公开号WO2016198954中更详细的描述。

[0235] V.试剂盒

[0236] 本文还提供了含有本公开的多种微载体的试剂盒或制品。这些试剂盒或制品尤其可用于进行多重测定,诸如本文所述的示例性多重测定(参见例如,上文第III部分)。本文所述的任何微载体(参见例如,上文第IV部分)可用于本公开的试剂盒或制品

[0237] 在一些实施方案中,本公开的试剂盒或制品包括至少七种编码的微载体。在一些实施方案中,七种编码的微载体中的每一种都包含(i)探针,其对KRAS、PIK3CA、BRAF、EGFR、AKT1、MEK1或HER2基因中的DNA突变具有特异性,与微载体偶联;(ii)对应于探针的标识符。在一些实施方案中,试剂盒包括:包含对KRAS基因中的DNA突变具有特异性的探针的至少一种微载体、包含对PIK3CA基因中的DNA突变具有特异性的探针的至少一种微载体、包含对BRAF基因中的DNA突变具有特异性的探针的至少一种微载体、包含对EGFR基因中的DNA突变具有特异性的探针的至少一种微载体、包含对AKT1基因中的DNA突变具有特异性的探针的

至少一种微载体、包含对MEK1基因中的DNA突变具有特异性的探针的至少一种微载体、包含对HER2基因中的DNA突变具有特异性的探针的至少一种微载体。即，KRAS、NRAS、PIK3CA、BRAF、EGFR、AKT1、MEK1和HER2基因中的每一种在试剂盒中由具有对基因中的突变具有特异性的探针的微载体表示。示例性KRAS、NRAS、PIK3CA、BRAF、EGFR、AKT1、MEK1和HER2基因和突变在上文有所描述。在一些实施方案中，KRAS、NRAS、PIK3CA、BRAF、EGFR、AKT1、MEK1和HER2基因是人基因。在一些实施方案中，试剂盒包括具有探针的微载体，所述探针适用于检测以下突变中的每一种(例如，对于试剂盒中的每种突变，具有至少一种微载体+探针种类)：编码G12D和G12V突变的KRAS蛋白的DNA突变；编码E542K、E545K和H1047R突变的PIK3CA蛋白的DNA突变；编码V600E突变的BRAF蛋白的DNA突变；编码G719A、E746_A750del、T790M、C797S(T>A和/或G>C)、S768I、V769_D770insASV、H773_V774insH、D770_N771insSVD和L858R突变的EGFR蛋白的DNA突变；编码E17K突变的AKT1蛋白的DNA突变；编码K57N突变的MEK1蛋白的DNA突变；和编码A775_G776insYVMA突变的HER2蛋白的DNA突变。本文所述(例如，在第III部分中)的任何探针可包括在试剂盒中，例如偶联至编码的微载体。在一些实施方案中，试剂盒还包括对应于一种或多种RNA突变的一种或多种微载体、探针和/或引物，例如，如下文所述。

[0238] 在一些实施方案中，试剂盒还包括至少七种阻断核酸。在一些实施方案中，所述至少七种阻断核酸与对应于KRAS、NRAS、PIK3CA、BRAF、EGFR、AKT1、MEK1和HER2基因中的每一个中的DNA突变的野生型DNA基因座杂交。阻断核酸的示例性描述在第III部分中提供。

[0239] 在一些实施方案中，试剂盒还包括一种或多种例如用于扩增感兴趣的DNA突变的基因座的引物对。在一些实施方案中，试剂盒包括对KRAS、NRAS、PIK3CA、BRAF、EGFR、AKT1、MEK1和HER2基因中的每一个中的一种或多种DNA突变的基因座具有特异性的引物对，例如，至少七种引物对。引物对的示例性描述在第III部分中提供。

[0240] 在一些实施方案中，本公开的试剂盒或制品包括：(a)多种探针，其中所述多种探针中的每一种与微载体偶联，所述微载体具有对应于与其偶联的所述探针的独特标识符，所述多种探针包括：第一探针，其包含选自由以下组成的组的序列：TAGTTGGAGCT(SEQ ID NO:38)、TGTGGTAGTTG(SEQ ID NO:40)、TGATGGCGTAG(SEQ ID NO:42)、TGGAGCTGATGGC(SEQ ID NO:44)和GCGTAGGCAAG(SEQ ID NO:46)；第二探针，其包含选自由以下组成的组的序列：CTGTTGGCGTAGG(SEQ ID NO:48)、GTAGTTGGAGCTG(SEQ ID NO:50)、TGGAGCTGTTGGC(SEQ ID NO:52)、TTGTGGTAGTTGG(SEQ ID NO:54)和GGCGTAGGCAAGA(SEQ ID NO:56)；第三探针，其包含选自由以下组成的组的序列：TAGTTGGAGCTT(SEQ ID NO:58)、GCGTAGGCAAGA(SEQ ID NO:60)、GGAGCTTGTGGC(SEQ ID NO:62)、TTGTGGCGTAGG(SEQ ID NO:64)和TGTGGTAGTTGG(SEQ ID NO:66)；第四探针，其包含选自由以下组成的组的序列：GCTCAGTGATTTTAG(SEQ ID NO:87)、TGCTCAGTGATTTT(SEQ ID NO:89)、GCTCAGTGATTTTAG(SEQ ID NO:91)、CCTGCTCAGTGATTTTA(SEQ ID NO:93)和CTCAGTGATTTTAGA(SEQ ID NO:95)；第五探针，其包含选自由以下组成的组的序列：TTCTCCTGCTTA(SEQ ID NO:97)、CTCCTGCTTAGT(SEQ ID NO:99)、TCTCCTGCTTAG(SEQ ID NO:101)、TCCTGCTTAGTG(SEQ ID NO:103)和CTCCTGCTTAGTGA(SEQ ID NO:105)；第六探针，其包含选自由以下组成的组的序列：GATGCACGTCATG(SEQ ID NO:107)、TGAATGATGCACG(SEQ ID NO:109)、TGATGCACGTC(SEQ ID NO:111)、AATGATGCACGTCA(SEQ ID NO:113)和AATGATGCACGTC(SEQ ID NO:115)；第七探针，其包含选

自由以下组成的组的序列:TTTGGTCTAGCTACAGA(SEQ ID NO:79)、CTACAGAGAAATCTCGA(SEQ ID NO:81)、GTGATTTTGGTCTAGCT(SEQ ID NO:83)和TCTAGCTACAGAGAAAT(SEQ ID NO:85);第八探针,其包含选自由以下组成的组的序列:TCAAAGTGCTGGCCTC(SEQ ID NO:117)、AGATCAAAGTGCTGGCCTCCG(SEQ ID NO:119)、AAAGTGCTGGCCT(SEQID NO:121)、AGTGCTGGCCT(SEQ ID NO:123)和AAGTGCTGGCCTC(SEQ ID NO:125);第九探针,其包含选自由以下组成的组的序列:AATCAAAACATCTCCGAAAG(SEQ ID NO:128)、CAAAACATCTCCG(SEQ ID NO:130)、AACATCTCCG(SEQ ID NO:132)和AAACATCTCCGAAAGCC(SEQ ID NO:134);第十探针,其包含选自由以下组成的组的序列:AATCAAGACATCTCCGA(SEQ ID NO:136)、GCAATCAAGACATCTCCGA(SEQ ID NO:138)、AATCAAGACATCTC(SEQ ID NO:140)、AATCAAGACATCTCCGAAAGC(SEQ ID NO:142)和CAAGACATCTCCGA(SEQ ID NO:144);第十一探针,其包含选自由以下组成的组的序列:CCAGGAGGCTGCCG(SEQ ID NO:461)、CAGGAGGCTGCCGA(SEQ ID NO:463)、TCCAGGAGGCTGCC(SEQ ID NO:465)、CCAGGAGGCTGCC(SEQ ID NO:467)和CAGGAGGCTGCC(SEQ ID NO:469);第十三探针,其包含选自由以下组成的组的序列:CCAGGAGGGAGCC(SEQ ID NO:471)、CCAGGAGGGAGCCG(SEQ ID NO:473)、TCCAGGAGGGAGCC(SEQ ID NO:475)、CAGGAGGGAGCCG(SEQ ID NO:477)和CAGGAGGGAGCCGA(SEQ ID NO:479);第十四探针,其包含选自由以下组成的组的序列:ATGGCCATCTTGG(SEQ ID NO:421)、GGCCATCTTGGA(SEQ ID NO:423)、GATGGCCATCTTG(SEQ ID NO:425)、TGATGGCCATCTTG(SEQ ID NO:427)和TGGCCATCTTGG(SEQ ID NO:429);第十五探针,其包含选自由以下组成的组的序列:GTGATGGCCGG(SEQ ID NO:431)、TGATGGCCGGCG(SEQ ID NO:433)、GTGATGGCCGGCGT(SEQ ID NO:435)、GATGGCCGGCGT(SEQ ID NO:437)和GATGGCCCGCGTG(SEQ ID NO:439);第十六探针,其包含选自由以下组成的组的序列:AACCCCCATCACGT(SEQ ID NO:441)、GACAACCCCCATCACG(SEQ ID NO:443)、CGTGGACAACCCCCATCA(SEQID NO:445)、CCCATCACGTGT(SEQ ID NO:447)和TGGACAACCCCCATCAC(SEQ ID NO:449);第十七探针,其包含选自由以下组成的组的序列:GCCAGCGTGGACGG(SEQ ID NO:451)、CGTGGACGGTAACC(SEQ ID NO:453)、GACGGTAACCCCC(SEQ ID NO:455)、CCAGCGTGGACGGT(SEQ ID NO:457)和GCCAGCGTGGACGGTA(SEQ ID NO:459);第十八探针,其包含选自由以下组成的组的序列:ATTTTGGGCGGGCC(SEQ ID NO:151)、TTGGGCGGGCCAAA(SEQ ID NO:153)、GCGGGCCAAACT(SEQ ID NO:155)、GGGCGGGCCAAACT(SEQ ID NO:157)和TGGGCGGGCCA(SEQ ID NO:159);第十九探针,其包含选自由以下组成的组的序列:TGTAGGGAAGTACA(SEQ ID NO:370)、TCTGTAGGGAAGTAC(SEQ ID NO:372)、GTCTGTAGGGAAGTACAT(SEQ ID NO:374)、CCGCACGTCTGTAGGGA(SEQ ID NO:376)和ACGTCTGTAGGGAAGTA(SEQ ID NO:378);第二十探针,其包含选自由以下组成的组的序列:TTACCCAGAATCAGAA(SEQ ID NO:387)、CCAGAATCAGAAGGTG(SEQ ID NO:389)、TTCTTACCCAGAATCA(SEQ ID NO:391)、CCTTTCTTACCCAGAATC(SEQ ID NO:393)和CAGAATCAGAAGGTGG(SEQ ID NO:395);和第二十一探针,其包含选自由以下组成的组的序列:ATACGTGATGTCTTAC(SEQ ID NO:404)、ACGTGATGGCTTACGT(SEQ ID NO:406)、AAGCATACGTGATGGCT(SEQ ID NO:408)、GCATACGTGATGGCTT(SEQ ID NO:410)和GCATACGTGATGGCTTA(SEQ ID NO:412);(b)多种引物对,所述多种引物对包括:第一引物对,其包含序列GTACTGGTGGAGTATTTGATAGTG(SEQ ID NO:1)和CGTCAAGGCACTCTTGCCTAC(SEQ ID NO:2);第二引物对,其包含序列CAATTTCTACAAGAGATCCTCTCTCT(SEQ ID NO:5)和

CTCCATTTTAGCACTTACCTGTGAC(SEQ ID NO:6);第三引物对,其包含序列ACCCTAGCCTTAGATAAAACTGAGC(SEQ ID NO:7)和TTTGTTGTCCAGCCACCATGA(SEQ ID NO:8);第四引物对,其包含序列ATAGCCTCAATTCTTACCATCCACAAAATG(SEQ ID NO:9)和CAGATATATTTCTTCATGAAGACCTCACAGTAA(SEQ ID NO:10);第五引物对,其包含序列CTTGTGGAGCCTCTTACACCC(SEQ ID NO:11)和TGCCGAACGCACCGGA(SEQ ID NO:12);第六引物对,其包含序列GCCAGTTAACGTCTTCCTTCTC(SEQ ID NO:13)和ATCGAGGATTTCCTTGTTGGCTT(SEQ ID NO:14);第七引物对,其包含序列CCTCCACCGTGCAGATCATC(SEQ ID NO:15)和TTCCCTGATTACCTTTGCGAT(SEQ ID NO:16);第八引物对,其包含序列CCACACTGACGTGCCTCT(SEQ ID NO:511)和GCACACGTAGGGGTTGTCCAAGA(SEQ ID NO:512);第九引物对,其包含序列CCACACTGACGTGCCTCT(SEQ ID NO:513)和GTACACGCTGGCCACGCCG(SEQ ID NO:514);第十引物对,其包含序列CCACACTGACGTGCCTCT(SEQ ID NO:515)和CAGGCGGCACACGTGAT(SEQ ID NO:516);第十一引物对,其包含序列CCACACTGACGTGCCTCT(SEQ ID NO:517)和AGGCGGCACACGTGCGGGTTAC(SEQ ID NO:518);第十二引物对,其包含序列GGAGGACCGTCGCTTGG(SEQ ID NO:17)和TCTTTCTCTTCCGCACCCAG(SEQ ID NO:18);第十三引物对,其包含序列GAGGGTCTGACGGGTAGAGTG(SEQ ID NO:380)和TGGCCGCCAGGTCTTGATGTA(SEQ ID NO:381);第十四引物对,其包含序列CTTGATGAGCAGCAGCGAAA(SEQ ID NO:397)和CCTTCAGTTCTCCCACCTTCTG(SEQ ID NO:398);第十五引物对,其包含序列ATGGCTGTGGTTTGTGATGGT(SEQ ID NO:414)和ACACCAGCCATCACGTAAGACA(SEQ ID NO:415);和(c)多种阻断核酸,所述多种阻断核酸包括:第一阻断核酸,其包含选自由以下组成的组的序列:TACGCCACCAGCT(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:281);TTGGAGCTGGTGGCGTA(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:282);GCTGGTGGCGTAGGCA(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:283);GCTGGTGGCGTAGGC(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:284);和TTGGAGCTGGTGGCGT(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:285);第二阻断核酸,其包含选自由以下组成的组的序列:CTGAAATCACTGAGCAGG(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:291);TCTCTGAAATCACTGAGCAGG(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:292);TCTCTGAAATCACTGAGCAGG(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:293);TCTCTGAAATCACTGAGCAGG(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:294);和TCTCTGAATTCACTGAGCAGG(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:295);第三阻断核酸,其包含选自由以下组成的组的序列:CACCATGATGTGCAT(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:296);CCACCATGATGTGCAT(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:297);CACCATGATGTGCAT(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:298);CCACCATGATGTGCATCA(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:299);和CATGATGTGCA(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:300);第四阻断核酸,其包含选自由以下组成的组的序列:GAGATTTCACTGTAGC(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:301);GAGATTTCACTGTAGC(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:302);GAGATTTCACTGTAGC(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:303);GAGATTTCACTGTAGC(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:304);和GAGATTTCACTGTAGC(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:305);第五阻断核酸,其包含选自由以下组成的组的序列:CGGAGCCCAGCACTTTGA(invdT)n,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:306);CGCACCGGAGCCCAGCACT(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:307);GAGCCCAGCAC(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID

NO:308);CGCACCGGAGCCCAGCAC(invdT)n,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:309);或CGCACCGGAGCCCAGCACTTA(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:310);第六阻断核酸,其包含选自由以下组成的组的序列:CGGAGATGTTGCTTCTCTTAATTCC(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:311);CGGAGATGTTGCTTCTCT(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:312);GTTGCTTCTCTTAATTCC(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:313);ATGTTGCTTCTCT(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:314);和TTGCTTCTCTTA(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:315);第七阻断核酸,其包含选自由以下组成的组的序列:CATCACGCAGCTCATG(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:316);TGCAGCTCATCACGCAGC(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:317);TCATCACGCAGCTCAT(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:318);TCATCACGCAGC(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:319);和CTCATCACGCAGC(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:320);第八阻断核酸,其包含选自由以下组成的组的序列:CCAGCAGTTTGGCCAGCCCT(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:321);CCAGCAGTTTGGCCAGCCCT(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:322);CCAGCAGTTTGGCCAGCCCT(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:323);AGCAGTTTGGCCAGCC(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:324);和CCAGCAGTTTGGCCAGCCCT(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:325);第九阻断核酸,其包含选自由以下组成的组的序列:TGTACTCCCCTACA(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:382);GATGTACTCCCCT(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:383);ATGTACTCCCCTAC(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NOO:384);GTACTCCCCTACA(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:385);和GATGTACTCCCCTACA(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:386);和第十阻断核酸,其包含选自由以下组成的组的序列:TCTGCTTCTGGGTAAG(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:399);TTCTGCTTCTGGGTAAGA(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:400);CACCTTCTGCTTCTGGG(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:401);TCTGCTTCTGGGTA(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:402);和CACCTTCTGCTTCTGGGTAAGA(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:403);斜体的核酸表示锁核酸。

[0241] 在一些实施方案中,本公开的试剂盒或制品包含至少五种编码的微载体。在一些实施方案中,七种编码的微载体中的每一种都包含(i)探针,其对ALK、ROS、RET、NTRK1或cMET基因中的RNA突变具有特异性,与微载体偶联;(ii)对应于探针的标识符。在一些实施方案中,试剂盒包括:包含对ALK基因中的DNA突变具有特异性的探针的至少一种微载体、包含对ROS基因中的DNA突变具有特异性的探针的至少一种微载体、包含对RET基因中的DNA突变具有特异性的探针的至少一种微载体、包含对NTRK1基因中的DNA突变具有特异性的探针的至少一种微载体、包含对cMET基因中的DNA突变具有特异性的探针的至少一种微载体。即,ALK、ROS、RET、NTRK1和cMET基因中的每一种在试剂盒中由具有对基因中的突变具有特异性的探针的微载体表示。示例性ALK、ROS、RET、NTRK1和cMET基因和突变在上文有所描述。在一些实施方案中,ALK、ROS、RET、NTRK1和cMET基因是人基因。在一些实施方案中,试剂盒包括具有探针的微载体,所述探针适用于检测以下突变中的每一种(例如,对于试剂盒中的每种突变,具有至少一种微载体+探针种类):E13;A20、E20;A20和E6;A20ALKRNA突变;C6;R32、C6;R34、S4;R32和S4;R34ROS RNA突变;K15;R11、K15;R12、K16;R12、K22;R12和K23;R12RETRNA突变;C8;N12 NTRK1 RNA突变;和外显子14跳读cMETRNA突变。本文所述(例如,在第

III部分中)的任何探针可包括在试剂盒中,例如偶联至编码的微载体。在一些实施方案中,试剂盒还包括对应于一种或多种DNA突变的一种或多种微载体、探针和/或引物,例如,如上文所述。

[0242] 在一些实施方案中,试剂盒还包括至少五种阻断核酸。在一些实施方案中,所述至少七种阻断核酸与对应于ALK、ROS、RET、NTRK1和cMET基因中的每一种中的RNA突变的野生型DNA基因座(例如,经由cDNA的PCR扩增由RNA扩增)杂交。阻断核酸的示例性描述在第III部分中提供。

[0243] 在一些实施方案中,试剂盒还包括一种或多种例如用于扩增感兴趣的RNA突变的基因座的引物对。在一些实施方案中,试剂盒包括对ALK、ROS、RET、NTRK1和cMET基因中的每一个中的一种或多种RNA突变的基因座具有特异性的引物对,例如,至少五种引物对(例如,用于生成cDNA的第一引物和用于与第一引物组合由cDNA PCR扩增DNA的第二引物)。引物对的示例性描述在第III部分中提供。

[0244] 在一些实施方案中,本公开的试剂盒或制品包括:(a)多种探针,其中所述多种探针中的每一种与微载体偶联,所述微载体具有对应于与其偶联的所述探针的独特标识符,所述多种探针包括:第一探针,其包含选自由以下组成的组的序列:AAAGGACCTAAAGTGT(SEQ ID NO:161)、CCTAAAGTGTACCGC(SEQ ID NO:163)、GGGAAAGGACCTAAAG(SEQ ID NO:165)、AGTGTACCGCCGGAA(SEQ ID NO:167)和TACCGCCGGAAGCACC(SEQ ID NO:169);第二探针,其包含选自由以下组成的组的序列:GACTATGAAATATTGTAC(SEQ ID NO:171)、GAAATATTGTACTTGTAC(SEQ ID NO:173)、TATTGTACTTGTACCGCC(SEQ ID NO:175)、TGTACCGCCGGAAGCAC(SEQ ID NO:177)和CCGCCGGAAGCACCAGGA(SEQ ID NO:179);第三探针,其包含选自由以下组成的组的序列:TGTCATCATCAACCAA(SEQ ID NO:181)、ATGTCATCATCAACC(SEQ ID NO:183)、GTGTACCGCCGGAAGC(SEQ ID NO:185)、TCAACCAAGTGTACCG(SEQ ID NO:187)和TACCGCCGGAAGCACCA(SEQ ID NO:189);第四探针,其包含选自由以下组成的组的序列:CGAAAAAAACAGCCAA(SEQ ID NO:191)、TCGCGAAAAAAACAGC(SEQ ID NO:193)、GTGTACCGCCGGAAGC(SEQ ID NO:195)、TACCGCCGGAAGCACC(SEQ ID NO:197)和ACAGCCAAGTGTACCG(SEQ ID NO:199);第五探针,其包含选自由以下组成的组的序列:ACTGACGCTCCACCGAAA(SEQ ID NO:201)、CCACTGACGCTCCACCGA(SEQ ID NO:203)、GCTGGAGTCCCAAATAAAC(SEQ ID NO:205)、GGAGTCCCAAATAAACCAG(SEQ ID NO:207)和CACCGAAAGCTGGAGTCCC(SEQ ID NO:209);第六探针,其包含选自由以下组成的组的序列:CCGAAAGATGATTTT(SEQ ID NO:211)、GACGCTCCACCGAAA(SEQ ID NO:213)、ACTGACGCTCCACCGA(SEQ ID NO:215)、GATGATTTTTGGATA(SEQ ID NO:217)和TGATTTTTGGATACCA(SEQ ID NO:219);第七探针,其包含选自由以下组成的组的序列:AGCGCCTTCCAGCTGGTTGGA(SEQ ID NO:221)、CTGGTTGGAGCTGGAGTCCC(SEQ ID NO:223)、AGTAGCGCCTTCCAGCTGGTTG(SEQ ID NO:225)、GCTGGAGTCCCAAATAAACCA(SEQ ID NO:227)和GGAGTCCCAAATAAACCAGG(SEQ ID NO:229);第八探针,其包含选自由以下组成的组的序列:GCGCCTTCCAGCTGGTTG(SEQ ID NO:231)、GTAGCGCCTTCCAGCTGGT(SEQ ID NO:233)、TGGTTGGAGATGATTTTT(SEQ ID NO:235)、GATGATTTTTGGATACCAG(SEQ ID NO:237)和TGATTTTTGGATACCA(SEQ ID NO:239);第九探针,其包含选自由以下组成的组的序列:GTGGGAAATAATGATGTAAA(SEQ ID NO:241)、CTGTGGGAAATAATGATGTA(SEQ ID NO:243)、

GATCCACTGTGCGACGAGCT(SEQ ID NO:245)、TGATGTAAAGATCCACTGTG(SEQ ID NO:247)和TCCACTGTGCGACGAGCTGT(SEQ ID NO:249);第十探针,其包含选自由以下组成的组的序列:TGGGAAATAATGATGTAAA(SEQ ID NO:251)、CTGTGGGAAATAATGATGTA(SEQ ID NO:253)、GGAGGATCCAAAGTGGGAAT(SEQ ID NO:255)、GGATCCAAAGTGGGAATT(SEQ ID NO:257)和ATGATGTAAAGGAGGATCC(SEQ ID NO:259);第十一探针,其包含选自由以下组成的组的序列:CTTCGTATCTCTCAAGAGGAT(SEQ ID NO:481)、GTATCTCTCAAGAGGATCCAA(SEQ ID NO:483)、TTCGTATCTCTCAAGAG(SEQ ID NO:485)、TCAAGAGGATCCAAA(SEQ ID NO:487)和TCTCTCAAGAGG(SEQ ID NO:489);第十二探针,其包含选自由以下组成的组的序列:GTTAAAAAGGAGGATCCAA(SEQ ID NO:491)、ACAAGAGTTAAAAAGGAGGA(SEQ ID NO:493)、AAGAGTTAAAAAGGAGGATC(SEQ ID NO:495)、AAAAGGAGGATCCAAAG(SEQ ID NO:497)和AAGGAGGATCCAAAGTG(SEQ ID NO:499);第十三探针,其包含选自由以下组成的组的序列:AAACAGGAGGATCCAAA(SEQ ID NO:501)、AAGTGCACAAACAGGAGG(SEQ ID NO:503)、GTGCACAAACAGGAGGATC(SEQ ID NO:505)、CACAAACAGGAGGAT(SEQ ID NO:507)和AACAGGAGGATCCAAA(SEQ ID NO:509);第十四探针,其包含选自由以下组成的组的序列:CAGGATCTGGGCCCAGACA(SEQ ID NO:261)、GATCTGGGCCCAGACACTA(SEQ ID NO:263)、CCAGACACTAACAGCACAT(SEQ ID NO:265)、GGGCCCAGACACTAACAGC(SEQ ID NO:267)和CTAACAGCACATCTGGAGA(SEQ ID NO:269);和第十五探针,其包含选自由以下组成的组的序列:AGAAAGCAAATTAAAGAT(SEQ ID NO:271)、AGCAAATTAAAGATCAG(SEQ ID NO:273)、AAATTAAAGATCAGTTTC(SEQ ID NO:275)、AGATCAGTTTCCTAATTC(SEQ ID NO:277)和AAGATCAGTTTCCTAATT(SEQ ID NO:279);和(b)多种引物,所述多种引物包含以下序列中的每一个(每个序列具有至少一个单独的、相应的引物)AGTTGGGGTTGTAGTCGGTCAT(SEQ ID NO:363)、AGCCTCCCTGGATCTCC(SEQ ID NO:364)、TATGGAGCAAAACTACTGTAGAGCC(SEQ ID NO:357)、CCAGCTACATCACACACCTTGACT(SEQ ID NO:358)、TAATACCAAAAGTTACCAAAACTGCA(SEQ ID NO:359)、GGAGTGCCATCGCTGTTTGAAATGAGCAGGCACT(SEQ ID NO:19)、TACAGCCCTGGATATTCTTAGTAGCGC(SEQ ID NO:20)、GTGATCGCACAGTAGGACAGCGGCTGCGATC(SEQ ID NO:26)、CTCTAGGAGATATCATTCCAAATTCGCCTTCTCCTAG(SEQ ID NO:27)、TTTCTGGTGCTATGAGGAAATGACCAACCACCAGA(SEQ ID NO:23)、AAGGAGTTAGCAGCATGTCAGC(SEQ ID NO:519)、AACTTCAGACTTTACACAACCTGC(SEQ ID NO:520)、ATTGATTCTGATGACACCGGA(SEQ ID NO:521)、GGACGAAAATCCAGACCCCAAAAGGTGTTTCGT(SEQ ID NO:32)、CATTGGGTGACATCAGGGAGCTGCCACCCAA(SEQ ID NO:33)、AGAAGACGTGACAGGAACTGGAGGACCCGTCTT(SEQ ID NO:30)、GACAGTATTTTGCAGTAATGGACTGGATATATCAGA(SEQ ID NO:29)和GAATTTCACAGGATTGATTGCTGGTGTTGTCTC(SEQ ID NO:28)。

[0245] 应当理解,本公开的试剂盒可以包括适用于检测本公开的一种或多种DNA突变和/或一种或多种RNA突变的各种微载体/探针、引物和/或阻断核酸。此类试剂盒的非限制性实例在下文有所描述,但考虑用于检测本公开的任何DNA/RNA突变的任何试剂可以以任何数量或组合组合。

[0246] 在一些实施方案中,本公开的试剂盒或制品包括:(a)多种探针,其中所述多种探针中的每一种与微载体偶联,所述微载体具有对应于与其偶联的所述探针的独特标识符,所述多种探针包括:第一探针,其包含序列TTTTTTTTTTTTAATAGTTGGAGCT(SEQ ID NO:39);第二探针,其包含序列TTTTTTTTTTTAGGCGTAGGCAAGA(SEQ ID NO:57);第三探针,其包含序

列TTTTTTTTTTTAAGGAGCTTGTGGC(SEQ ID NO:63)；第四探针，其包含序列TTTTTTTCCTGCTCAGTGATTTTA(SEQ ID NO:94)；第五探针，其包含序列TTTTTTTTTTTATCTCCTGCTTAG(SEQ ID NO:102)；第六探针，其包含序列TTTTTTTTTTTTAATGATGCACGTCA(SEQ ID NO:114)；第七探针，其包含序列TTTTTTAATTCTACAGAGAAATCTCGA(SEQ ID NO:82)；第八探针，其包含序列TTTTTTTTTTTTTAGTGCTGGCCT(SEQ ID NO:124)；第九探针，其包含序列TTTTTTTTTTTACAAAACATCTCCG(SEQ ID NO:131)；第十探针，其包含序列TTTTTTTTAATCAAGACATCTC(SEQ ID NO:141)；第十一探针，其包含序列TTTTTTTTCATGAGATGCATGATGA(SEQ ID NO:356)；第十二探针，其包含序列TTTTTTTTTTTACAGGAGGCTGCCGA(SEQ ID NO:464)；第十三探针，其包含序列TTTTTTTTTTTACAGGAGGGAGCCG(SEQ ID NO:478)；第十四探针，其包含序列TTTTTTTAGATGGCCATCTTG(SEQ ID NO:426)；第十五探针，其包含序列TTTTTTTTTTTGTGATGGCCGG(SEQ ID NO:432)；第十六探针，其包含序列TTTTTTTTGGACAACCCCCATCAC(SEQ ID NO:450)；第十七探针，其包含序列TTTTTTTGCCAGCGTGGACGGTA(SEQ ID NO:460)；第十八探针，其包含序列TTTTTTTTAAATGGGCGGGCCA(SEQ ID NO:160)；第十九探针，其包含序列TTTTTTTTTTTTTTGTAGGGAAGTACA(SEQ ID NO:371)；第二十探针，其包含序列TTTTTAAATCAGAATCAGAAGGTGG(SEQ ID NO:396)；第二十探针，其包含序列TTTTTAAATCAGAATCAGAAGGTGG(SEQ ID NO:396)；第二十一探针，其包含序列TTTTTTTTTTTACGTGATGGCTTACGT(SEQ ID NO:407)；第二十二探针，其包含序列TTTTTTTTTTAGTGTACCGCCGGAA(SEQ ID NO:168)；第二十三探针，其包含序列TTTTTTTTTTTTGACTATGAAATATTGTAC(SEQ ID NO:172)；第二十四探针，其包含序列TTTTTTTTTTTTTTTACCGCCGGAAGCACCA(SEQ ID NO:190)；第二十五探针，其包含序列TTTTTTTTTTTTTGTGTACCGCCGGAAGC(SEQ ID NO:196)；第二十六探针，其包含序列TTTTTTTTTTTGCTGGAGTCCCAAATAAAC(SEQ ID NO:206)；第二十七探针，其包含序列TTTTTTTTTTTGACGCTCCACCGAAA(SEQ ID NO:214)；第二十八探针，其包含序列TTTTTTTTTTTTGGAGTCCCAAATAAACCAGG(SEQ ID NO:230)；第二十九探针，其包含序列TTTTTTTTTTGATGATTTTTGGATACCAG(SEQ ID NO:238)；第三十探针，其包含序列TTTTTTTTTTGTGGGAAATAATGATGTAAA(SEQ ID NO:242)；第三十一探针，其包含序列TTTTTTTTTCTGTGGGAAATAATGATGTA(SEQ ID NO:254)；第三十二探针，其包含序列TTTTTTTTTTCTCTCAAGAGG(SEQ ID NO:490)；第三十三探针，其包含序列TTTTTTTTAAGGAGGATCCAAAGTG(SEQ ID NO:500)；第三十四探针，其包含序列TTTTTTTTAAACAGGAGGATCCAAA(SEQ ID NO:502)；第三十五探针，其包含序列TTTTTTTTTTACCAGACACTAACAGCACAT(SEQ ID NO:266)；第三十六探针，其包含序列TTTTTTTTTTAGAAAGCAAATTAAAGAT(SEQ ID NO:272)；(b)多种引物对，所述多种引物对包括：第一引物对，其包含序列GTACTGGTGGAGTATTTGATAGTG(SEQ ID NO:1)和CGTCAAGGCACTCTTGCCTAC(SEQ ID NO:2)；第二引物对，其包含序列CAATTTCTACAAGAGATCCTCTCTCT(SEQ ID NO:5)和CTCCATTTTAGCACTTACCTGTGAC(SEQ ID NO:6)；第三引物对，其包含序列ACCCTAGCCTTAGATAAAACTGAGC(SEQ ID NO:7)和

TTTGTTGTCCAGCCACCATGA(SEQ ID NO:8);第四引物对,其包含序列ATAGCCTCAATTCTTACCATCCACAAAATG(SEQ ID NO:9)和CAGATATATTTCTTCATGAAGACCTCACAGTAA(SEQ ID NO:10);第五引物对,其包含序列CTTGTGGAGCCTCTTACACCC(SEQ ID NO:11)和TGCCGAACGCACCGGA(SEQ ID NO:12);第六引物对,其包含序列GCCAGTTAACGTCTTCCTTCTC(SEQ ID NO:13)和ATCGAGGATTTCCTTGTTGGCTT(SEQ ID NO:14);第七引物对,其包含序列CCTCCACCGTGCAGATCATC(SEQ ID NO:15)和TTCCCTGATTACCTTTGCGAT(SEQ ID NO:16);第八引物对,其包含序列CCACACTGACGTGCCTCT(SEQ ID NO:511)和GCACACGTAGGGGTTGTCCAAGA(SEQ ID NO:512);第九引物对,其包含序列CCACACTGACGTGCCTCT(SEQ ID NO:513)和GTACACGCTGGCCACGCCG(SEQ ID NO:514);第十引物对,其包含序列CCACACTGACGTGCCTCT(SEQ ID NO:515)和CAGGCGGCACACGTGAT(SEQ ID NO:516);第十一引物对,其包含序列CCACACTGACGTGCCTCT(SEQ ID NO:517)和AGGCGGCACACGTGCGGGTTAC(SEQ ID NO:518);第十二引物对,其包含序列GGAGGACCGTCGCTTGG(SEQ ID NO:17)和TCTTTCTCTTCCGCACCCAG(SEQ ID NO:18);第十三引物对,其包含序列GAGGGTCTGACGGGTAGAGTG(SEQ ID NO:380)和TGGCCGCCAGGTCTTGATGTA(SEQ ID NO:381);第十四引物对,其包含序列CTTGATGAGCAGCAGCGAAA(SEQ ID NO:397)和CCTTCAGTTCTCCCACCTTCTG(SEQ ID NO:398);第十五引物对,其包含序列ATGGCTGTGGTTTGTGATGGT(SEQ ID NO:414)和ACACCAGCCATCACGTAAGACA(SEQ ID NO:415);第十六引物对,其包含序列AGTTGGGGTTGTAGTCGGTCAT(SEQ ID NO:363)和TATGGAGCAAAACTACTGTAGAGCC(SEQ ID NO:357);第十七引物对,其包含序列AGTTGGGGTTGTAGTCGGTCAT(SEQ ID NO:363)和CCAGCTACATCACACACCTTGACT(SEQ ID NO:358);第十八引物对,其包含序列AGTTGGGGTTGTAGTCGGTCAT(SEQ ID NO:363)和TAATACCAAAAGTTACCAAAACTGCA(SEQ ID NO:359);第十九引物对,其包含序列GGAGTGCCATCGCTGTTTGAAATGAGCAGGCACT(SEQ ID NO:19);第二十引物对,其包含序列GGAGTGCCATCGCTGTTTGAAATGAGCAGGCACT(SEQ ID NO:19);第二十一引物对,其包含序列TACAGCCCTGGATATTCTTAGTAGCGC(SEQ ID NO:20);第二十二引物对,其包含序列TACAGCCCTGGATATTCTTAGTAGCGC(SEQ ID NO:20);第二十三引物对,其包含序列GTGATCGCACAGTAGGACAGCGGCTGCGATC(SEQ ID NO:26)和TTTCTGGTGCTATGAGGAAATGACCAACCACCAGA(SEQ ID NO:23);第二十四引物对,其包含序列CTCTAGGAGATATCATTCCAAATTCGCCTTCTCCTAG(SEQ ID NO:27)和TTTCTGGTGCTATGAGGAAATGACCAACCACCAGA(SEQ ID NO:23);第二十五引物对,其包含序列CTCTAGGAGATATCATTCCAAATTCGCCTTCTCCTAG(SEQ ID NO:27)和AAGGAGTTAGCAGCATGTCAGC(SEQ ID NO:519);第二十六引物对,其包含序列CTCTAGGAGATATCATTCCAAATTCGCCTTCTCCTAG(SEQ ID NO:27)和AACTTCAGACTTTACACAACCTGC(SEQ ID NO:520);第二十七引物对,其包含序列CTCTAGGAGATATCATTCCAAATTCGCCTTCTCCTAG(SEQ ID NO:27)和ATTGATTCTGATGACACCGGA(SEQ ID NO:521);第二十八引物对,其包含序列GGACGAAAATCCAGACCCCAAAAGGTGTTTCGT(SEQ ID NO:32)和AGAAGACGTGACAGGAACTGGAGGACCCGTCTT(SEQ ID NO:30);第二十九引物对,其包含序列GACAGTATTTTGCAGTAATGGACTGGATATATCAGA(SEQ ID NO:29)和GAATTTCACAGGATTGATTGCTGGTGTTGTCTC(SEQ ID NO:28);和(c)多种阻断核酸,所述多种阻断核酸包括:第一阻断核酸,其包含序列TTGGAGCTGGTGGCGT(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:285);第二阻断核酸,其包含序列CTGAAATCACTGAGCAGG(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:291);第三阻断核酸,其包含序列CCACCATGATGTGCATCA

(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:299);第四阻断核酸,其包含序列GAGATTTCACTGTAGC(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:301);第五阻断核酸,其包含序列CGCACCGGAGCCCAGCACTTA(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:310);第六阻断核酸,其包含序列CGGAGATGTTGCTTCTCT(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ IDNO:312);第七阻断核酸,其包含序列TGCAGCTCATCACGCAGC(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:317);第八阻断核酸,其包含序列CCAGCAGTTTGGCCAGCCCT(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:322);第九阻断核酸,其包含序列GATGTACTCCCCT(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:383);和第十阻断核酸,其包含序列CACCTTCTGCTTCTGGGTAAGA(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:403)。

[0247] 在一些实施方案中,本公开的试剂盒或制品包括:(a)多种探针,其中所述多种探针中的每一种与微载体偶联,所述微载体具有对应于与其偶联的所述探针的独特标识符,所述多种探针包括:第一探针,其包含序列TTTTTTTTTTTTAATGATGGCGTAG(SEQ ID NO:43);第二探针,其包含序列TTTTTTTTTTTAGTAGTTGGAGCTG(SEQ ID NO:51);第三探针,其包含序列TTTTTTTTTTTAATTGTGGCGTAGG(SEQ ID NO:65);第四探针,其包含序列TTTTTTTTTAGCTCAGTGATTTTAG(SEQ ID NO:88);第五探针,其包含序列TTTTTTTTTTTTTTTCCTGCTTAGTG(SEQ ID NO:104);第六探针,其包含序列TTTTTTTTTTTTTGATGCACGTC(SEQ ID NO:112);第七探针,其包含序列TTTTTTAATTGAGAAATCTCGATGGAG(SEQ ID NO:78);第八探针,其包含序列TTTTTTAGATCAAAGTGCTGGCCTCCG(SEQ ID NO:120);第九探针,其包含序列TTTTTTTTTTTTTTAAACATCTCCGAAAGCC(SEQ ID NO:135);第十探针,其包含序列TTTTTTTTTTTCAAGACATCTCCGA(SEQ ID NO:145);第十一探针,其包含序列TTTTTTTTTTGAGATGCATGATGA(SEQ ID NO:352);第十二探针,其包含序列TTTTTTTTTTTACAGGAGGCTGCC(SEQ ID NO:470);第十三探针,其包含序列TTTTTTTTTTTACCAGGAGGGAGCCG(SEQ ID NO:474);第十四探针,其包含序列TTTTTTTTTATGGCCATCTTGG(SEQ ID NO:422);第十五探针,其包含序列TTTTTTTTTTTTGATGGCCCGCGTG(SEQ ID NO:440);第十六探针,其包含序列TTTTTTTTTTTCCCATCACGTGT(SEQ ID NO:448);第十七探针,其包含序列TTTTTTTTTTGACGGTAACCCCC(SEQ ID NO:456);第十八探针,其包含序列TTTTTTTATTTTGGGCGGGCC(SEQ ID NO:152);第十九探针,其包含序列TTTTTTTTTTTCTGTAGGGAAGTAC(SEQ ID NO:373);第二十探针,其包含序列TTTTAAATTTCTTACCCAGAATCA(SEQ ID NO:392);第二十一探针,其包含序列TTTTAAGCATACGTGATGGCT(SEQ ID NO:409);第二十二探针,其包含序列TTTTTTTTTGGGAAAGGACCTAAAG(SEQ ID NO:166);第二十三探针,其包含序列TTTTTTTTTTTCCGCCGGAAGCACCAGGA(SEQ ID NO:180);第二十四探针,其包含序列TTTTTTTTTTTTTGTGTACCGCCGGAAGC(SEQ ID NO:186);第二十五探针,其包含序列TTTTTTTTTTTTCGAAAAAAACAGCCAA(SEQ ID NO:192);第二十六探针,其包含序列TTTTTTTTTTACTGACGCTCCACCGAAA(SEQ ID NO:202);第二十七探针,其包含序列TTTTTTTTTTGACGCTCCACCGAAA(SEQ ID NO:214);第二十八探针,其包含序列TTTTTTTTTTTAGCGCCTTCCAGCTGGTTGGA(SEQ ID NO:222);第二十九探针,其包含序列TTTTTTTTTTGATTTTGGATACCA(SEQ ID NO:240);第三十探针,其包含序列

TTTTTTTTTTTCCACTGTGCGACGAGCTGT(SEQ ID NO:250);第三十一探针,其包含序列TTTTTTTTTGGATCCAAAGTGGGAATT(SEQ ID NO:258);第三十二探针,其包含序列TTTTTTTTTTCAAGAGGATCCAAA(SEQ ID NO:488);第三十三探针,其包含序列TTTTTTTTACAAGAGTTAAAAAGGAGGA(SEQ ID NO:494);第三十四探针,其包含序列TTTTTATTAAGTGCACAAACAGGAGG(SEQ ID NO:504);第三十五探针,其包含序列TTTTTTTTTTACTAACAGCACATCTGGAGA(SEQ ID NO:270);第三十六探针,其包含序列TTTTTTTTTTAGATCAGTTTCCTAATTC(SEQ ID NO:278);(b)多种引物对,所述多种引物对包括:第一引物对,其包含序列GTACTGGTGGAGTATTTGATAGTG(SEQ ID NO:1)和CGTCAAGGCACTCTTGCCTAC(SEQ ID NO:2);第二引物对,其包含序列CAATTTCTACAAGAGATCCTCTCTCT(SEQ ID NO:5)和CTCCATTTTAGCACTTACCTGTGAC(SEQ ID NO:6);第三引物对,其包含序列ACCCTAGCCTTAGATAAAACTGAGC(SEQ ID NO:7)和TTTGTTGTCCAGCCACCATGA(SEQ ID NO:8);第四引物对,其包含序列ATAGCCTCAATTCTTACCATCCACAAAATG(SEQ ID NO:9)和CAGATATATTTCTTCATGAAGACCTCACAGTAA(SEQ ID NO:10);第五引物对,其包含序列CTTGTGGAGCCTCTTACACCC(SEQ ID NO:11)和TGCCGAACGCACCGGA(SEQ ID NO:12);第六引物对,其包含序列GCCAGTTAACGTCTTCCTTCTC(SEQ ID NO:13)和ATCGAGGATTTCCTTGTTGGCTT(SEQ ID NO:14);第七引物对,其包含序列CCTCCACCGTGCAGATCATC(SEQ ID NO:15)和TTCCCTGATTACCTTTGCGAT(SEQ ID NO:16);第八引物对,其包含序列CCACACTGACGTGCCTCT(SEQ ID NO:511)和GCACACGTAGGGGTTGTCCAAGA(SEQ ID NO:512);第九引物对,其包含序列CCACACTGACGTGCCTCT(SEQ ID NO:513)和GTACACGCTGGCCACGCCG(SEQ ID NO:514);第十引物对,其包含序列CCACACTGACGTGCCTCT(SEQ ID NO:515)和CAGGCGGCACACGTGAT(SEQ ID NO:516);第十一引物对,其包含序列CCACACTGACGTGCCTCT(SEQ ID NO:517)和AGGCGGCACACGTGCGGGTTAC(SEQ ID NO:518);第十二引物对,其包含序列GGAGGACCGTCGCTTGG(SEQ ID NO:17)和TCTTTCTCTTCCGCACCCAG(SEQ ID NO:18);第十三引物对,其包含序列GAGGGTCTGACGGGTAGAGTG(SEQ ID NO:380)和TGGCCGCCAGGTCTTGATGTA(SEQ ID NO:381);第十四引物对,其包含序列CTTGATGAGCAGCAGCGAAA(SEQ ID NO:397)和CCTTCAGTTCTCCCACCTTCTG(SEQ ID NO:398);第十五引物对,其包含序列ATGGCTGTGGTTTGTGATGGT(SEQ ID NO:414)和ACACCAGCCATCACGTAAGACA(SEQ ID NO:415);第十六引物对,其包含序列AGTTGGGGTTGTAGTCGGTCAT(SEQ ID NO:363)和TATGGAGCAAAACTACTGTAGAGCC(SEQ ID NO:357);第十七引物对,其包含序列AGTTGGGGTTGTAGTCGGTCAT(SEQ ID NO:363)和CCAGCTACATCACACACCTTGACT(SEQ ID NO:358);第十八引物对,其包含序列AGTTGGGGTTGTAGTCGGTCAT(SEQ ID NO:363)和TAATACCAAAAGTTACCAAAACTGCA(SEQ ID NO:359);第十九引物对,其包含序列GGAGTGCCATCGCTGTTTGAAATGAGCAGGCACT(SEQ ID NO:19);第二十引物对,其包含序列GGAGTGCCATCGCTGTTTGAAATGAGCAGGCACT(SEQ ID NO:19);第二十一引物对,其包含序列TACAGCCCTGGATATTCTTAGTAGCGC(SEQ ID NO:20);第二十二引物对,其包含序列TACAGCCCTGGATATTCTTAGTAGCGC(SEQ ID NO:20);第二十三引物对,其包含序列GTGATCGCACAGTAGGACAGCGGCTGCGATC(SEQ ID NO:26)和TTTCTGGTGCTATGAGGAAATGACCAACCACCAGA(SEQ ID NO:23);第二十四引物对,其包含序列CTCTAGGAGATATCATTCCAAATTCGCCTTCTCCTAG(SEQ ID NO:27)和TTTCTGGTGCTATGAGGAAATGACCAACCACCAGA(SEQ ID NO:23);

第二十五引物对,其包含序列CTCTAGGAGATATCATTCCAAATTCGCCTTCTCCTAG(SEQ ID NO:27)和AAGGAGTTAGCAGCATGTCAGC(SEQ ID NO:519);第二十六引物对,其包含序列CTCTAGGAGATATCATTCCAAATTCGCCTTCTCCTAG(SEQ ID NO:27)和AACTTCAGACTTTACACAACCTGC(SEQ ID NO:520);第二十七引物对,其包含序列CTCTAGGAGATATCATTCCAAATTCGCCTTCTCCTAG(SEQ ID NO:27)和ATTGATTCTGATGACACCGGA(SEQ ID NO:521);第二十八引物对,其包含序列GGACGAAAATCCAGACCCCAAAAGGTGTTTCGT(SEQ ID NO:32)和AGAAGACGTGACAGGAACTGGAGGACCCGTCTT(SEQ ID NO:30);第二十九引物对,其包含序列GACAGTATTTTGCAGTAATGGACTGGATATATCAGA(SEQ ID NO:29)和GAATTTCACAGGATTGATTGCTGGTGTTGTCTC(SEQ ID NO:28);和(c)多种阻断核酸,所述多种阻断核酸包括:第一阻断核酸,其包含序列TTGGAGCTGGTGGCGTA(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:282);第二阻断核酸,其包含序列TCTCTGAAATCACTGAGCAGG(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:294);第三阻断核酸,其包含序列CCACCATGATGTGCAT(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:297);第四阻断核酸,其包含序列GAGATTTCACTGTAGC(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:305);第五阻断核酸,其包含序列CGCACCGGAGCCCAGCAC(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:309);第六阻断核酸,其包含序列GTTGCTTCTCTTAATTCC(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:313);第七阻断核酸,其包含序列CTCATCACGCAGC(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:320);第八阻断核酸,其包含序列CCAGCAGTTTGGCCAGCCCT(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:325);第九阻断核酸,其包含序列GATGTACTCCCCTACA(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:386);和第十阻断核酸,其包含序列CACCTTCTGCTTCTGGG(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:401)。

[0248] 在一些实施方案中,本公开的试剂盒或制品包括:(a)多种探针,其中所述多种探针中的每一种与微载体偶联,所述微载体具有对应于与其偶联的所述探针的独特标识符,所述多种探针包括:第一探针,其包含序列TTTTTTTTTTTATGGAGCTGATGGC(SEQ ID NO:45);第二探针,其包含序列TTTTTTTTTTTATGGAGCTGTTGGC(SEQ ID NO:53);第三探针,其包含序列TTTTTTTTTTTAAGGAGCTTGTGGC(SEQ ID NO:63);第四探针,其包含序列TTTTTTTTTTTCTCAGTGATTTTAGA(SEQ ID NO:96);第五探针,其包含序列TTTTTTTTTTTTCTCCTGCTTAGT(SEQ ID NO:100);第六探针,其包含序列TTTTTTTTTTTTAATGATGCACGTC(SEQ ID NO:116);第七探针,其包含序列TTTTTTAATTTCTAGCTACAGAGAAAT(SEQ ID NO:86);第八探针,其包含序列TTTTTTTTTTCAAAGTGCTGGCCTC(SEQ ID NO:118);第九探针,其包含序列TTTTTTTTTAATCAAAACATCTCCG(SEQ ID NO:127);第十探针,其包含序列TTTTTTTTAATCAAGACATCTCCGA(SEQ ID NO:137);第十一探针,其包含序列TTTTTTTTTTGAGATGCATGATGAG(SEQ ID NO:353);第十二探针,其包含序列TTTTTTTTTTTACCAGGAGGCTGCC(SEQ ID NO:468);第十三探针,其包含序列TTTTTTTTTTTACCAGGAGGGAGCC(SEQ ID NO:472);第十四探针,其包含序列TTTTTTTTTTAGGCCATCTTGGA(SEQ ID NO:424);第十五探针,其包含序列TTTTTTTTTTTGTGATGGCCGGCGT(SEQ ID NO:436);第十六探针,其包含序列TTTTTTTTTTTAACCCCCATCACGT(SEQ ID NO:442);第十七探针,其包含序列TTTTTTTTTTTCGTGGACGGTAACC(SEQ ID NO:454);第十八探针,其包含序列TTTTTTTAAAAAAGCGGGCCAAACT(SEQ ID NO:156);第十九探针,其包含序列

TTTTTTTTACGTCTGTAGGGAAGTA(SEQ ID NO:379);第二十探针,其包含序列TTTTTAAATTTACCCAGAATCAGAA(SEQ ID NO:388);第二十一探针,其包含序列TTTTTTTTTATACGTGATGTCTTAC(SEQ ID NO:405);第二十二探针,其包含序列TTTTTTTTTTCCTAAAGTGTACCGC(SEQ ID NO:164);第二十三探针,其包含序列TTTTTTTTTTTTTATTGTACTTGTACCGCC(SEQ ID NO:176);第二十四探针,其包含序列TTTTTTTTTTTTTTTCAACCAAGTGTACCG(SEQ ID NO:188);第二十五探针,其包含序列TTTTTTTTTTTTTTTACAGCCAAGTGTACCG(SEQ ID NO:200);第二十六探针,其包含序列TTTTTTTTTTTCACCGAAAGCTGGAGTCCC(SEQ ID NO:210);第二十七探针,其包含序列TTTTTTTTTTTTCCGAAAGATGATTTT(SEQ ID NO:212);第二十八探针,其包含序列TTTTTTTTTTTTCTGGTTGGAGCTGGAGTCCC(SEQ ID NO:224);第二十九探针,其包含序列TTTTTTTTTTTGGTTGGAGATGATTTTT(SEQ ID NO:236);第三十探针,其包含序列TTTTTTTTTTTGATGTAAAGATCCACTGTG(SEQ ID NO:248);第三十一探针,其包含序列TTTTTTTTTATGATGTAAAGGAGGATCC(SEQ ID NO:260);第三十二探针,其包含序列TTTTTTTTTGTATCTCTCAAGAGGATCCAA(SEQ ID NO:484);第三十岁探针,其包含序列TTATTATTAAGAGTTAAAAAGGAGGATC(SEQ ID NO:811);第三十四探针,其包含序列TATTATTATGTGCACAAACAGGAGGATC(SEQ ID NO:506);第三十五探针,其包含序列TTTTTTTTTTAGGGCCCAGACACTAACAGC(SEQ ID NO:268);第三十六探针,其包含序列TTTTTTTTTTAAATTAAAGATCAGTTTC(SEQ ID NO:276);(b)多种引物对,所述多种引物对包括:第一引物对,其包含序列GTACTGGTGGAGTATTTGATAGTG(SEQ ID NO:1)和CGTCAAGGCACTCTTGCCTAC(SEQ ID NO:2);第二引物对,其包含序列CAATTTCTACAAGAGATCCTCTCTCT(SEQ ID NO:5)和CTCCATTTTAGCACTTACCTGTGAC(SEQ ID NO:6);第三引物对,其包含序列ACCCTAGCCTTAGATAAAACTGAGC(SEQ ID NO:7)和TTTGTTGTCCAGCCACCATGA(SEQ ID NO:8);第四引物对,其包含序列ATAGCCTCAATTCTTACCATCCACAAAATG(SEQ ID NO:9)和CAGATATATTTCTTCATGAAGACCTCACAGTAA(SEQ ID NO:10);第五引物对,其包含序列CTTGTGGAGCCTCTTACACCC(SEQ ID NO:11)和TGCCGAACGCACCGGA(SEQ ID NO:12);第六引物对,其包含序列GCCAGTTAACGTCTTCCTTCTC(SEQ ID NO:13)和ATCGAGGATTTCCTTGTTGGCTT(SEQ ID NO:14);第七引物对,其包含序列CCTCCACCGTGCAGATCATC(SEQ ID NO:15)和TTCCCTGATTACCTTTGCGAT(SEQ ID NO:16);第八引物对,其包含序列CCACACTGACGTGCCTCT(SEQ ID NO:511)和GCACACGTAGGGGTTGTCCAAGA(SEQ ID NO:512);第九引物对,其包含序列CCACACTGACGTGCCTCT(SEQ ID NO:513)和GTACACGCTGGCCACGCCG(SEQ ID NO:514);第十引物对,其包含序列CCACACTGACGTGCCTCT(SEQ ID NO:515)和CAGGCGGCACACGTGAT(SEQ ID NO:516);第十一引物对,其包含序列CCACACTGACGTGCCTCT(SEQ ID NO:517)和AGGCGGCACACGTGCGGGTTAC(SEQ ID NO:518);第十二引物对,其包含序列GGAGGACCGTCGCTTGG(SEQ ID NO:17)和TCTTTCTCTTCCGCACCCAG(SEQ ID NO:18);第十三引物对,其包含序列GAGGGTCTGACGGGTAGAGTG(SEQ ID NO:380)和TGGCCGCCAGGTCTTGATGTA(SEQ ID NO:381);第十四引物对,其包含序列CTTGATGAGCAGCAGCGAAA(SEQ ID NO:397)和CCTTCAGTTCTCCCACCTTCTG(SEQ ID NO:398);第十五引物对,其包含序列ATGGCTGTGGTTTGTGATGGT(SEQ ID NO:414)和ACACCAGCCATCACGTAAGACA(SEQ ID NO:415);第十六引物对,其包含序列

AGTTGGGGTTGTAGTCGGTCAT(SEQ ID NO:363)和TATGGAGCAAAACTACTGTAGAGCC(SEQ ID NO:357);第十七引物对,其包含序列AGTTGGGGTTGTAGTCGGTCAT(SEQ ID NO:363)和CCAGCTACATCACACACCTTGACT(SEQ ID NO:358);第十八引物对,其包含序列AGTTGGGGTTGTAGTCGGTCAT(SEQ ID NO:363)和TAATACCAAAAGTTACCAAAACTGCA(SEQ ID NO:359);第十九引物对,其包含序列GGAGTGCCATCGCTGTTTGAAATGAGCAGGCACT(SEQ ID NO:19);第二十引物对,其包含序列GGAGTGCCATCGCTGTTTGAAATGAGCAGGCACT(SEQ ID NO:19);第二十一引物对,其包含序列TACAGCCCTGGATATTCTTAGTAGCGC(SEQ ID NO:20);第二十二引物对,其包含序列TACAGCCCTGGATATTCTTAGTAGCGC(SEQ ID NO:20);第二十三引物对,其包含序列GTGATCGCACAGTAGGACAGCGGCTGCGATC(SEQ ID NO:26)和TTTCTGGTGCTATGAGGAAATGACCAACCACCAGA(SEQ ID NO:23);第二十四引物对,其包含序列CTCTAGGAGATATCATTCCAAATTCGCCTTCTCCTAG(SEQ ID NO:27)和TTTCTGGTGCTATGAGGAAATGACCAACCACCAGA(SEQ ID NO:23);第二十五引物对,其包含序列CTCTAGGAGATATCATTCCAAATTCGCCTTCTCCTAG(SEQ ID NO:27)和AAGGAGTTAGCAGCATGTCAGC(SEQ ID NO:519);第二十六引物对,其包含序列CTCTAGGAGATATCATTCCAAATTCGCCTTCTCCTAG(SEQ ID NO:27)和AACTTCAGACTTTACACAACCTGC(SEQ ID NO:520);第二十七引物对,其包含序列CTCTAGGAGATATCATTCCAAATTCGCCTTCTCCTAG(SEQ ID NO:27)和ATTGATTCTGATGACACCGGA(SEQ ID NO:521);第二十八引物对,其包含序列GGACGAAAATCCAGACCCCAAAAGGTGTTTCGT(SEQ ID NO:32)和AGAAGACGTGACAGGAACTGGAGGACCCGTCTT(SEQ ID NO:30);第二十九引物对,其包含序列GACAGTATTTTGCAGTAATGGACTGGATATATCAGA(SEQ ID NO:29)和GAATTTCACAGGATTGATTGCTGGTGTTGTCTC(SEQ ID NO:28);和(c)多种阻断核酸,所述多种阻断核酸包括:第一阻断核酸,其包含序列TACGCCACCAGCT(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:281);第二阻断核酸,其包含序列TCTCTGAAATCACTGAGCAGG(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:293);第三阻断核酸,其包含序列CACCATGATGTGCAT(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:296);第四阻断核酸,其包含序列GAGATTTCACTGTAGC(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:303);第五阻断核酸,其包含序列GAGCCCAGCAC(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:308);第六阻断核酸,其包含序列CGGAGATGTTGCTTCTCTTAATTCC(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:311);第七阻断核酸,其包含序列CATCACGCAGCTCATG(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:316);第八阻断核酸,其包含序列CCAGCAGTTTGGCCAGCCCT(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:321);第九阻断核酸,其包含序列TGTACTCCCCTACA(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:382);和第十阻断核酸,其包含序列TCTGCTTCTGGGTAAG(invdT)$_n$,其中n为1、2或3(SEQ ID NO:399)。

[0249] 在一些实施方案中,试剂盒包括具有对应于阳性对照的标识符的微载体和对阳性对照DNA序列具有特异性的引物对,对阳性对照基因序列具有特异性的探针偶联至所述微载体。例如,在一些实施方案中,阳性对照RNA序列包含人次黄嘌呤磷酸核糖转移酶1(HPRT1)基因的序列。在一些实施方案中,对阳性对照RNA序列具有特异性的引物对包含序列GGAAGATATAATTGACACTGGCAAAACA(SEQ ID NO:34)和ATTCATTATAGTCAAGGGCATATCC(SEQ ID NO:35)。在一些实施方案中,每种探针偶联至本公开的具有独特标识符的微载体。在一些实施方案中,试剂盒包括本公开的具有对应于阴性对照的标识符的微载体,例如,具有不与扩增的DNA杂交的探针的微载体。

[0250] 在一些实施方案中,试剂盒包括引物对,所述对中的一个或两个引物用检测试剂

标记，例如，如上文所述。在一些实施方案中，检测试剂包括荧光检测试剂。在一些实施方案中，检测试剂包含生物素，并且试剂盒包括与信号发射实体缀合的链霉亲和素(例如，与藻红蛋白缀合的链霉亲和素)。

[0251] 在一些实施方案中，试剂盒或制品还可包括本公开的一种或多种检测试剂以检测与第一微载体结合的第一分析物的量和与第二微载体结合的第二分析物的量。在一些实施方案中，用于第一分析物的检测试剂可以与用于第二分析物的检测试剂相同。在其他实施方案中，用于第一分析物的检测试剂可以与用于第二分析物的检测试剂不同。

[0252] 在一些实施方案中，试剂盒或制品还可包括使用试剂盒或制品来检测本公开的一种或多种DNA或RNA突变的说明书。这些说明书可用于例如以本文描述的任何方法使用试剂盒或制品。

[0253] 在一些实施方案中，试剂盒或制品还可包括一种或多种检测试剂(例如，如上所述，诸如与PE缀合的链霉亲和素)，以及适用于将检测试剂与一种或多种分析物偶联或适用于将检测试剂与识别分析物的一种或多种大分子偶联的任何说明书或试剂。试剂盒或制品还可包括用于在测定(例如，多重测定)中使用微载体的任何附加组分，包括但不限于板(例如，96孔微板或其他相似的微板)、培养皿、显微镜载玻片或其他合适的测定容器；非暂态计算机可读存储介质(例如，含有用于模拟形状或代码识别的软件和/或其他指令)；洗涤剂；缓冲液；板封口机；混合容器；稀释剂或储存溶液；等。

[0254] 在一些实施方案中，本公开的探针可偶联至与本公开的微载体，例如本文所述的微载体和/或通过本文所述的任何方法产生的微载体。本文所述的任何探针可用于本公开的方法和/或微载体。

[0255] 实施例

[0256] 通过参考以下实施例将更完全地理解本发明。然而，它们不应解释为限制本发明的范围。应当理解，本文所述的实施例和实施方案仅用于说明性目的，并且将向本领域技术人员提出根据所述实施例和实施方案的各种修改或变化，并且所述各种修改或变化包括在本申请的精神和范围内以及所附权利要求的范围内。

[0257] 实施例1：使用编码的微载体对肺癌相关突变进行多重检测

[0258] 如上所述，使用从血液或组织样品中分离的DNA和RNA对癌症相关DNA突变和RNA变体进行的多重筛查表示用于早期检测的非侵入性方法。以下实施例描述了用于多重筛查以鉴定与肺癌相关的各种重要DNA突变和RNA变体的基于微载体的方法的验证。

[0259] 材料和方法

[0260] 样品制备

[0261] 用于测试使用编码的微载体的DNA突变和RNA变体检测的方法的流程图在图3中提供。使用标准技术从表C所述的质粒或如表B所述的K562细胞中分离DNA。根据制造商的说明书，使用NanoDrop™ UV-Vis分光光度计(Thermo Scientific)或Qubit®荧光计(Thermo Scientific)对DNA进行定量。用于所有实验的提取的DNA的浓度为≥12.5ng/μL。为了测试使用编码的微载体的RNA变体检测，在使用标准技术进行培养24小时后，从转染有表D所述的质粒的HEK293细胞中分离RNA。

[0262] 在这些实验中检测到的突变在表A1和A2中提供。

[0263] 对于DNA突变的检测限(LOD)测试，从K562细胞中提取DNA用作“野生型”DNA。使用

带有突变的KRAS、NRAS、PIK3CA、BRAF、EGFR、AKT1、MEK1或HER2序列的质粒获得具有各种感兴趣的突变之一的DNA。将野生型和突变DNA混合并稀释以实现12.5ng/μL的总DNA浓度，其中比率为1％突变DNA与99％野生型DNA。用于实验的每个DNA样品的浓度在下文的表B和C中示出。

[0264] 对于RNA变体的检测限(LOD)测试，使用带有ALK、ROS、RET、NTRK1或cMET的RNA变体的序列的质粒获得RNA。

[0265] 表B.野生型DNA.

[0266]

WT	WT DNA 原液		WT DNA 500ng/μl			WT DNA 100ng/μl		
细胞系	突变%	浓度	原液	最终	Tris	100ng/μl	最终	Tris
		(ng/μl)	体积	体积		体积	体积	
K562	-	1208	207.0	500	293.0	100	1000	900

[0267]

[0268] 聚合酶链反应(PCR)

[0269] 使用突变富集PCR由上文制备的DNA样品选择性地扩增具有感兴趣突变的多核苷酸。使用具有3′反向dT核苷酸的锁核酸(LNA)来阻断野生型DNA序列的扩增，从而富集感兴趣的突变。简而言之，在PCR反应中包括阻断核酸以阻断野生型基因座的扩增。阻断核酸与野生型基因座的有义链杂交并防止由有义链扩增的引物延伸，如图4所示。与具有标准核酸的寡核苷酸相比，使用LNA是因为杂交更稳定。存在于样品中的突变基因座的任何拷贝都可以通过PCR扩增而不受阻断核酸的干扰，因为它不与突变序列杂交(图5)。使用了以下引物对：SEQ ID NO:1和2、3和4、5和6、7和8、9和10、11和12、13和14、15和16、17和18。使用了以下阻断核酸：SEQ ID NO:281、286、293、296、303、308、311、316、321和365。

[0270] 将每个样品涡旋混合，然后离心沉淀并保持在冰上。PCR反应如下进行。对于每个样品，根据表D和E中列出的量执行两次PCR反应。每个PCR反应包括4μL的12.5ng/μL提取的DNA，总共50ng DNA。一旦在PCR管中生成PCR反应混合物，就通过轻敲将管混合，短暂离心沉淀，并置入热循环仪中。PCR热循环条件如下表F所述。升温速率为1℃/秒。

[0271] 为了由上文制备的RNA样品选择性地扩增具有感兴趣的RNA变体的多核苷酸，首先通过逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)由分离的RNA生成cDNA，然后通过突变富集PCR进一步扩增cDNA。PCR热循环条件如下表G所述。升温速率为5℃/秒。使用了以下引物：SEQ ID NO:19-37。

[0272] 表D.PCR反应1.

[0273]

PCR 反应 1	
材料	每次反应的体积(μL)
反应混合物 1	11
引物混合物 1	5
提取的 DNA/PC/NC	4
总计	20

[0274]

[0275] 表E.PCR反应2.

[0276]

PCR 反应 2	
材料	每次反应的体积(μL)
反应混合物 2	11
引物混合物 2	5
提取的 DNA/PC/NC	4
总计	20

[0277] 表F.DNA突变的PCR条件.

[0278]

步骤	温度	时间	循环	升温速率
变性前保持	95℃	5 分钟	1	1℃/s
变性	95℃	20 秒	38 个循环	
LNA 阻断	70℃	20 秒		
退火	55℃	20 秒		
延伸	60℃	25 秒		
储存	4℃	∞		

[0279] 表G.RNA变体的PCR条件.

[0280]

步骤	温度	时间	循环	升温速率
cDNA 合成(RT)	55℃	15 分钟	1	5℃/s
变性前保持	95℃	2 分钟	1	
变性	95℃	15 秒	45	
退火	60℃	30 秒		
延伸	72℃	30 秒		
储存	4℃	∞	∞	

[0281] 杂交

[0282] PCR扩增子与微载体的捕获剂探针序列杂交。探针被设计为与突变体序列而不是野生型序列杂交,从而允许特异性检测突变体DNA或RNA变体。与使用结合野生型序列的阻断核酸组合,此策略使测定能够检测突变体DNA,即使存在的拷贝数比对应的野生型基因座低得多时也是如此(参见图4和5)。以下探针用于DNA:SEQ ID NO:45、53、63、75、86、96、100、116、118、127、137、353和156。以下探针用于RNA:SEQ ID NO:164、176188、200、210、212、224、236、248、260、268和276。

[0283] 简而言之,将编码的微载体(每个单独地对表A1和A2所示的突变或RNA变体具有特异性)汇集到96孔板的单个孔中。通过涡旋将微载体溶液混合10秒,然后将20μL微载体溶液添加到96孔板的每个孔中。每4个孔再涡旋一次原液微载体溶液以确保悬浮液均匀。将100μL杂交缓冲液(5X SSPE缓冲液)添加到每个孔中。将PCR产物离心沉淀并通过加热至95℃保持5分钟变性,然后冷却至4℃。将10μL变性PCR产物1或10μL变性PCR产物2添加到每个孔中。

通过在37℃下以1200rpm摇动20分钟来混合测定板。然后用1X洗涤缓冲液洗涤孔。

[0284] 为了检测,将50μL缀合链霉亲和素的藻红蛋白(SA-PE)溶液添加到每个孔中,并在37℃下以1200rpm再次摇动板10分钟。然后再次洗涤孔。然后对每个孔进行模拟图像解码和荧光检测。

[0285] 结果

[0286] 使用具有对表A中列出的突变或RNA变体中的每一种具有特异性的探针的微载体来检测上述LOD测试测定中的突变DNA或RNA变体的存在。这些实验的结果在图7A-7C(DNA)和图8A和8B(RNA)中示出。基于微载体的测定以成对的方式对每种突变进行验证,每次测定使用一种探针和一种突变的DNA序列或一种RNA变体序列。列表明样品中存在哪些突变的DNA序列或RNA变体序列。行表明哪些探针与用于这些测定的微载体偶联。对于DNA突变,作为阴性对照,使用不具有探针的“空白”微载体。对于阳性对照DNA,扩增人IGF DNA并且使用对扩增的序列具有特异性的探针来进行检测。

[0287] 图7A-7C报告了每个DNA实验获得的荧光信号(以任意单位计,AU)。如所示,在突变的DNA序列和探针失配的几乎所有情况下,没有检测到荧光,这表明探针和DNA之间缺乏杂交。KRASDNA与KRAS G12D探针和NRAS Q61L探针微弱地交叉反应,但产生的荧光信号比各自相应的KRAS或NRAS DNA样品低得多。相反,当每种突变的DNA序列与适当的、偶联微载体的探针混合时,通过强荧光信号检测到杂交。

[0288] 使用野生型DNA未检测到除阳性对照之外的信号,这表明LNA寡核苷酸有效地阻断了野生型DNA扩增和/或探针序列有效地消除了野生型DNA的杂交。

[0289] 对于RNA变体检测,作为阴性对照,使用不具有探针的“空白”微载体。对于阳性对照,逆转录、扩增人HPRT1 RNA并且使用对扩增的序列具有特异性的探针来进行检测。

[0290] 图8A和8B报告了每个实验获得的荧光信号(以任意单位计,AU)。如所示,在RNA变体的cDNA序列与探针失配的几乎所有情况下,没有检测到荧光,这表明探针和cDNA之间缺乏杂交。ALK-v3a的cDNA与ALK-v3b探针较弱地交叉反应,并且ALK-v3b的cDNA与ALK-v3a探针较弱地交叉反应,但产生的荧光信号比各自相应的变体低得多。这可能是由于两种变体之间的序列相似性导致的。相反,当RNA变体的每种cDNA序列与适当的、偶联微载体的探针混合时,通过强荧光信号检测到杂交。

[0291] 这些结果证明,可灵敏地和准确地检测单个感兴趣的突变,即使野生型DNA的存在量比感兴趣的突变序列大几个数量级也是如此。有利地,串联的若干突变的多重检测导致更大的置信度和保真度,因为每个基因的检测充当所有其他基因的内部对照。这些结果表明了使用具有寡核苷酸探针的编码的微载体用于鉴定来自人样品的重要的癌症相关突变的快速多重策略。

[0292] 实施例2:使用编码的微载体从血液样品中多重检测肺癌相关突变

[0293] 之前的实施例证明了使用具有寡核苷酸探针的编码的微载体进行基于分离的DNA或RNA样品来多重检测癌症相关突变。以下的实施例证明了这种使用从血液样品中提取的DNA和RNA的方法的功效。

[0294] 材料和方法

[0295] 血浆总RNA和血浆细胞游离DNA(cfDNA)的分离

[0296] 图6示出了从血液样品中分离血浆总RNA和血浆cfDNA的过程(还可参见Best,M.G.

等人(2015)Cancer Cell 28:666-676)。为了分离血浆总RNA,将全血收集在紫盖的BD真空采血管或细胞游离DNA BCT(含有EDTA抗凝剂)中。管在室温下储存并且在1小时内处理。通过在室温下以200g离心20分钟来去除细胞和聚集体,从而产生富含总RNA的血浆。将富含总RNA的血浆转移到15ml锥形管(A管)中,不移取上清液或使用移液管尖端接触红细胞。将富含总RNA的血浆在室温下以100g离心20分钟,并且将上清液转移到第二锥形管(B管)中。B管中的上清液在室温下以360g进一步离心20分钟。去除上清液,并将其转移到第三锥形管(C管)中。将30μL RNA稳定缓冲液添加到B管中的富含总RNA的沉淀中,并且在4℃下孵育过夜,之后在-80℃下冷冻以备将来使用。

[0297] 将C管中的上清液等分到1.5mL或2mL管中,并在室温下以16,000g离心10分钟。将来自每个管的含有cfDNA的上清液转移到15mL锥形管中。对于cfDNA的提取,根据制造商方案使用以下商业试剂盒:Promega-Maxwell RSC ccfDNA血浆试剂盒、Thermo-MagMAX核酸分离试剂盒、Catchgene-Catch-cfDNA血清/血浆试剂盒、Qiagen-QIAamp循环核酸试剂盒。

[0298] 分离富含cfDNA的血浆

[0299] 为了仅分离富含cfDNA的血浆,将全血以1,600g离心10分钟。将上层血浆转移到1.5mL或2mL管中并且以16,000g离心10分钟。将所得上层血浆转移到15mL锥形管中,并且在-80℃下冷冻以备将来使用。

[0300] 血浆总RNA的提取

[0301] 富含总RNA的样品在4℃下解冻5-10分钟,溶解在1mL RNA分离缓冲液中,并且在室温下在通风柜下放置10分钟。将200μL氯仿添加到每个管中,然后涡旋15-30秒并且在室温下放置2-3分钟。然后在4℃下将管以12,000g离心15分钟。然后将含有RNA分离缓冲液和氯仿混合物的水相(上层相)转移到不同的管中。为了最大限度地减少污染DNA的残留,不转移界面上方约3mm-4mm的水相。将500μL异丙醇(冷却至-20℃)与RNA分离缓冲液和氯仿混合物一起添加到每个管中。将管倒置以混合,并且在-20℃下放置一小时。然后在4℃下将样品以12,000g离心15分钟,去除所有液体并添加1mL新鲜制备的RNA洗涤缓冲液。在4℃下以7,500g离心10分钟后,去除所有液体,并且通过将管置于通风柜中5分钟并打开盖子来干燥沉淀。当RNA沉淀变干时,添加40μL RNA洗脱缓冲液以溶解RNA,并且将溶液涡旋并保持在冰上。

[0302] 根据以下比例使用上文分离的DNA来产生PCR反应。如实施例1中所述生成引物混合物。

[0303] 表G.PCR反应1.

[0304]

PCR 反应 1	

[0305]

材料	每次反应的体积 (μL)
反应混合物 1	10
引物混合物 1	10
提取的 DNA/PC/NC	20
总计	40

[0306] 表H.PCR反应2.

[0307]

PCR 反应 2	
材料	每次反应的体积(μL)
反应混合物 2	10
引物混合物 2	10
提取的 DNA/PC/NC	20
总计	40

[0308] 其他PCR条件(例如,热循环)、杂交条件和检测如实施例1中所述。

[0309] 结果

[0310] 在图9A中,与本文所述的微载体方法(LCP)相比,从福尔马林固定的、石蜡包埋(FFPE)样品中获得RNA,并且通过下一代测序(NGS)检测所选择的突变。在图9B中,与本文所述的微载体方法(LCP)相比,从胸腔积液或从血清样品中的cfDNA中获得DNA,并通过ddPCR或下一代测序(NGS)检测所选择的突变。这些结果证明了使用本文所述的方法成功地多重测定来自患者样品的DNA和RNA中的多个癌症相关突变。

[0311] 接下来,将通过本文所述的微载体方法检测的肺癌组(LCP)的性能与数字PCR(ddPCR)的性能进行比较。使用从III期非小细胞肺癌患者中获得的组织样品(FFPE样品)对这些方法进行了比较。用于此比较研究的ddPCR测定仅检测到EGFR基因中的突变。

[0312] 通过ddPCR测试了9个样品的EGFR基因中的突变。结果如表I所示。这些结果表明,LCP方法能够与参考ddPCR方法检测相同的突变,同时还能正确地检测野生型(WT)EGFR基因。

[0313] 表I.

[0314]

参考方法	**样品编号**	**肺癌组-FFPE (DNA)**	**外部第三方单基因测试结果****
		EGFR	
数字 PCR EGFR (仅)	**1**	WT	WT
	2	p.L747_T751del	L747_T751del
	3	WT	WT
	4	p.L858R	L858R
	5	p.E746_A750del	E746_A750del
	6	p.L858R	L858R
	7	p.E746_A750del	E746_A750del
	8	WT	WT
	9	WT	WT

[0315] 还将LCP组与如上所述检测来自41个患者样品的EGFR、KRAS和BRAF基因中的突变的、基于RT-PCR的方法进行比较(表J)。这些结果证实,与现有的RT-PCR方法相比,LCP方法能够正确地鉴定这些基因中的特定突变和野生型序列。

[0316] 表J.

[0317]

参考方法	样品编号	肺癌组-FFPE (DNA)			外部第三方 RT-PCR 测试结果
		EGFR	KRAS	BRAF	
RT-PCR EGFR KRAS BRAF	1	WT	WT	V600E1	BRAF
	2	WT	WT	V600E1	BRAF
	3	WT	G12V	WT	KRAS
	4	WT	WT	WT	EGFR ex19 [1]
	5	WT	WT	WT	KRAS 146 [1]
	6	p.L747_P753>S	WT	WT	EGFR ex19
	7	WT	Q61K	WT	KRAS 61
	8	WT	WT	WT	KRAS 146 [1]
	9	L858R	WT	WT	EGFR L858R
	10	WT	WT	V600E1	BRAF V600E1
	11	WT	G12C	WT	KRAS G12C
	12	WT	G12V	WT	KRAS G12V
	13	WT	G12V	WT	KRAS G12V

[0318]

	14	WT	G12C	WT	KRAS G12C
	15	p.E746_A750del	WT	WT	EGFR E746_A750del
	16	G719A	WT	WT	EGFR G719A
RT-PCR 仅 EGFR	17	WT	N/A	N/A	WT
	18	WT	N/A	N/A	WT
	19	外显子 19 del (E746_A750 del)	N/A	N/A	外显子 19 del
	20	WT	N/A	N/A	WT
	21	WT	N/A	N/A	WT
	22	外显子 19 del (L747_P753>S)	N/A	N/A	外显子 19 del
	23	WT	N/A	N/A	WT
	24	外显子 19 del (E746_A750 del)	N/A	N/A	外显子 19 del
	25	WT	N/A	N/A	WT
	26	外显子 19 del (L747_P753>S)	N/A	N/A	外显子 19 del
	27	WT	N/A	N/A	外显子 20 Ins
	28	WT	N/A	N/A	WT
	29	WT	N/A	N/A	WT
RT-PCR 仅 EGFR	30	WT	N/A	N/A	WT
	31	WT	N/A	N/A	外显子 19 mut [1]
	32	WT	N/A	N/A	WT
	33	WT	N/A	N/A	WT
	34	WT	N/A	N/A	WT
	35	外显子 19 del	N/A	N/A	外显子 19 del
	36	L858R	N/A	N/A	L858R
	37	外显子 19 del	N/A	N/A	外显子 19 del
	38	WT	N/A	N/A	WT
	39	WT	N/A	N/A	WT
	40	WT	N/A	N/A	WT
	41	WT	N/A	N/A	WT

[0319] [1]这些目标不包括在用于此测试中的肺癌组的型式中，从而导致结果不一致。

[0320] 还将LCP组与如上所述检测来自7个患者样品的EGFR、KRAS、NRAS、PIK3CA和BRAF基因中的突变的、基于NGS的方法进行比较(表K)。这些结果再次证实，与突变的NGS检测相比，LCP方法能够正确地鉴定这些基因中的特定突变和野生型序列。

[0321] 表K.

[0322]

参考方法	样品编号	肺癌组-FFPE (DNA)					外部第三方 NGS 测试结果**
		EGFR	KRAS	NRAS	PIK3CA	BRAF	
NGS	53	WT	WT	WT	WT	V600E	V600E
	54	WT	WT	WT	WT	WT	WT
	55	WT	WT	WT	WT	WT	WT
	56	WT	G12D (1833)	WT	WT	WT	WT
	57	WT	G12C	WT	WT	WT	G12C
	58	WT	WT	WT	WT	WT	WT
	59	WT	G12V	WT	WT	WT	G12V

[0323] 还将如上所述的使用LCP进行的突变的RNA检测与RNA突变的NGS检测进行比较。从来自14位III期肺癌患者的FFPE样品中提取RNA，并通过NGS或LCP方法分析ALK、ROS1、RET、NTRK1或cMET中的基因重排。如表L所示，LCP能够检测到NGS检测到的所有突变。此外，LCP能够鉴定NGS无法检测到的RET和cMET中的重排，这可能是由于LCP的灵敏度更高(NGS检测限约为250个拷贝，而LCP的检测限小于10)。

[0324] 表L.

[0325]

参考方法	样品编号	肺癌组-FFPE (RNA)					外部第三方 NGS 测试结果**
		ALK	ROS1	RET	NTRK1	cMET	
NGS	1	v1	WT	WT	WT	WT	EML4-ALK+
	2	v1	WT	WT	WT	WT	EML4-ALK+
	3	v1	WT	WT	WT	WT	EML4-ALK+
	4	v1	WT	WT	WT	WT	EML4-ALK+
	5	WT	WT	WT	WT	WT	WT
	6	v1	WT	WT	WT	WT	EML4-ALK+
	7	v1	WT	WT	WT	WT	EML4-ALK+
	8	v1	WT	WT	WT	WT	EML4-ALK+
	9	WT	CD74-ROS1	WT	WT	WT	ROS1+
	10	v1	WT	WT	WT	WT	EML4-ALK+
	11	WT	WT	CCDC-RET	WT	WT	WT[a]
	12	WT	WT	WT	WT	cMET 外显子 14 跳读	WT[a]
	13	v1	WT	WT	WT	WT	EML4-ALK+
	14	v1	WT	WT	WT	WT	EML4-ALK+

[0326]

[0327] [a]NGS对CCDC-RET和cMET外显子14跳读变体的检测限约为250个拷贝，不如肺癌组的检测限(LoD＜10个拷贝)。

[0328] 为了将LCP应用于液体活检样品，使用从胸腔积液中提取的DNA或从血浆/血清中提取的细胞游离DNA(cfDNA)，针对ddPCR方法测试了LCP的性能。在22个样品中检测到EGFR和BRAF中的突变(表M)。使用ddPCR方法的测试结果由外部第三方提供，并且报告了每种突变的级分丰度(FA％＝#突变的拷贝/(#突变的拷贝+野生型拷贝))。使用ddPCR方法作为比

较,因为它被称为用于对单重突变进行绝对定量的方法。

[0329] 表M.

[0330]

参考方法	样品类型	样品编号	肺癌组	外部第三方单基因测试结果**
			EGFR	
数字 PCR EGFR (仅)	胸腔积液 (DNA)	1	T790M	EGFR T790M & L747_751>P [a]
		2	WT	WT
		3	WT	WT
数字 PCR EGFR (仅)	cfDNA (血清) (DNA)	4	p.L747_P753>S, T790M	L747_P753>S & T790M
		5	p.E746_A750del	E746_A750del & T790M
		6	p.L747_T751del	L747_T751del
		7	WT	WT
		8	WT	WT
数字 PCR BRAF (仅)	cfDNA (血清) (DNA)	9	V600E	V600E (29.1%)
		10	WT	V600E (2.4%)
		11	V600E	V600E (17%)
		12	V600E	V600E (31.3%)
		13	WT	V600E (0.7%)
		14	V600E	V600E (4%)
		15	V600E	V600E (2.4%)
		16	V600E	V600E (1%)
		17	WT	V600E (1.7%)
		18	V600E	V600E (8%)

[0331]

		19	V600E	V600E (26.5%)
		20	V600E	V600E (1.7%)
		21	V600E	V600E (17%)
		22	V600E	V600E (4.3%)

[0332] [a]L747-751>P不是肺癌组中的目标。

[0333] 还将使用液体活检样品的LCP性能与使用5个患者样品的、用于检测来自血清的cfDNA中的EGFR、KRAS、NRAS、PIK3CA和BRAF中的突变的NGS进行比较(表N)。

[0334] 表N.

[0335]

参考方法	样品类型	样品编号	肺癌组 - cfDNA(血清)(DNA)					外部第三方单基因测试结果**
			EGFR	KRAS	NRAS	PIK3CA	BRAF	
NGS	cfDNA(血清)(DNA)	1	WT	G13D	WT	H1047R	WT	KRAS G13D/PIK3CA H1047R
		2	WT	WT	WT	WT	WT	KRAS G13D/PIK3CA E545K
		3	WT	WT	WT	E545K	WT	PIK3CA E545K
		4	WT	Q61H	WT	WT	WT	KRAS Q61H
		5	WT	Q61H	WT	WT	WT	KRAS Q61H

[0336] 总而言之,与标准方法相比,这些结果验证了LCP方法在检测来自组织样品和液体活检两者的各种DNA和RNA突变中的用途。

[0337] 实施例3:证明了使用编码的微载体多重检测来自血液和组织样品的肺癌相关突变的临床试验数据

[0338] 将上述LCP方法与用于检测癌症相关突变的其他方法进行了比较,使用来自I期或II期肺癌患者的液体活检(血液样品)或组织样品。

[0339] 第一,将LCP方法与从Oncomine肺部细胞游离总核酸研究测定(目录号A35864;Thermo Fisher Scientific,Inc.)获得的结果进行比较,所述测定是一种基于NGS的方法。此测定法用于检测从全血的血浆级分中分离的肺肿瘤来源的细胞游离DNA和RNA(细胞游离总核酸;cfTNA)。使用Oncomine测定或本文所述的综合肺癌组(LCP)方法分析20个液体活检(血液样品)的肺癌相关突变。如图10A所示,来自20个样品的结果几乎匹配。

[0340] 第二,将LCP方法与从若干基于PCR的、用于检测EGFR、KRAS或PIK3CA中的突变的方法获得的结果进行比较。对于EGFR,使用了cobas® EGFR突变测试v2(目录号07248563190;Roche Molecular Diagnostics),这是一种基于实时PCR的方法。cobas® EGFR突变测试v2测定用于鉴定EGFR的外显子18、19、20和21中的42种突变,包括T790M突变。还将结果与以下旨在检测KRAS或PIK3CA中的突变的基于数字PCR(dPCR)的方法进行了比较:Bio-Rad® ddPCR™ KRAS G12/G13筛查试剂盒(目录号1863506;Bio-Rad)、用于PIK3CA p.E545K突变的Bio-Rad® PrimePCR™ ddPCR™ PIK3CA突变检测测定试剂盒(目录号1863132;Bio-Rad)、Bio-Rad® ddPCR™突变检测测定(目录号10042964;Bio-Rad)和用于PIK3CA突变的TaqMan™液体活检dPCR测定(目录号A44177;Applied Biosystems/ThermoFisher Scientific)。DNA从20个组织样品(福尔马林固定的、石蜡包埋的肿瘤组织,FFPET)中获得,并且用于使用上文的基于PCR的测定或本文所述的综合肺癌组(LCP)方法检测EGFR、KRAS或PIK3CA中的肺癌相关突变。如图10B所示,来自20个样品的结果几乎匹配,并且成功证明了LCP方法的可行性。

[0341] 最后,将LCP方法与从Illumina® AmpliSeq™聚焦组(目录号20019164;

Illumina)获得的结果进行比较，Illumina® AmpliSeq™聚焦组是一种基于NGS的、用于对已知与实体瘤相关的基因进行生物标志物分析的靶向重测序测定。RNA从20个组织样品中获得，并且用于使用Illumina® AmpliSeq™聚焦组或本文所述的综合肺癌组(LCP)方法检测肺癌相关突变。如图10C所示，来自20个样品的结果几乎匹配。

[0342] 总而言之，与其他基于NGS或PCR的方法相比，这些结果验证了LCP方法在使用组织样品或液体活检来检测来自DNA和RNA的各种突变中的使用。

[0343] 尽管为了清楚理解的目的已经通过说明和实例的方式对前述发明进行了一些详细的描述，但是所述描述和实例不应解释为限制本发明的范围。本文引用的所有专利和科学文献的公开内容均明确地引用方式整体并入本文。

[0344]

表 A1. DNA 突变.

频率	DNA 突变										
	基因	外显子	结构域	氨基酸变化	核苷酸变化	COSMIC 数	My Cancer Genome 中的每个突变基因的频率	来自 COSMIC 的肺样品中的突变样品	每个中的百分比	总计%	每个基因中的总突变
15-25%	KRAS	外显子 2	GTP 结合	G12D	c.34G>C (GGT>CGT)	518	17%	1277	19.76%	78.87%	6461
				G12V	c.34G>T (GGT>TGT)	516	20%	1478	22.88%		
				G12C	c.35G>A (GGT>GAT)	521	42%	2341	36.23%		
1%	NRAS	外显子 3	GTP 结合	Q61L (A>T)	c.182A>T (CAA>CTA)	583	25~50%	26	29.21%	29.21%	89
1-3%	PIK3CA	外显子 9	螺旋	E542K	c.1624G>A	760	8.9%	26	9.67%	43.87%	269
				E545K	c.1633G>A	763	26.7%	69	25.65%		
		外显子 20	激酶	H1047R	c.3140A>G	775	12.9%	23	8.55%		
1-3%	BRAF	外显子 15	激酶	V600E1	c.1799T>A	476	55%	127	43.34%	43.34%	293
	EGFR	外显子 18	激酶	G719A	c.2156G>C	6239	0.60%	56	0.73%	0.73%	7700
		外显子 19		E746_A750del	c.2235_2249del15	6223	48%	1034	13.43%	19.70%	
				E746_A750del	c.2236_2250del15	6225		483	6.27%		
		外显子 20		T790M	c.2369C>T	6240	<5%	300	3.90%	5.04%	
				C797S T>A	c.2389T>A	649393 7	-	1	0.01%		
				C797S G>C	c.2390G>C	594566 4	-	2	0.03%		

[0345]

			S768I	c.2303G>T	6241	1.5~3%	41	0.53%			
			V769_D770insASV	c.2307_2308ins9GCCAGCGTG	12376	4~9.2%	10	0.13%			
			H773_V774insH	c.2319_2320insCAC	12377		6	0.08%			
			D770_N771insG	c.2310_2311insGGT	12378		8	0.10%			
			D770_N771insSVD	2311_2312ins9GCGTGGACA	13428		19	0.25%			
			p.V769_D770insASV	2309_2310AC>CCAGCGTGGAT	13558		1	0.01%			
		外显子 21	p.L858R (T>G)	c.2573T>G	6224	43%	2334	30.31%	30.31%		
1%	AKT1	外显子 4	普列克底物蛋白同源性	E17K	33765	88%	16	61.54%	61.54%	26	
1%	MEK1	外显子 2	α 螺旋	K57N	1235478		7	25.00%	25.00%	28	
2~4%	HER2	外显子 20	激酶	p.Ala775_Gly776insYVMA	20959	83~100%	47	28.14%	28.14%	167	

表 A2. RNA 突变.

频率	基因	RNA 变体								
		融合名称	最终名称	肺癌中的数量	变体总数	%	覆盖	突变样品	测试样品	肺癌中的百分比
3-7%	ALK	V1	E13;A20	175	387	45.22%	91.73%	355	9765	3.64%
		V2	E20;A20	51		13.18%				
		V3a	E6a;A20	98		25.32%				

[0346]

		V3b	E6b;A20	31			8.01%			
1~2%	ROS	CD74-ROS1	C6;R32	3	36		8.3%	100.00%	36	1678	2.15%
			C6;R34	33			91.7%				
		SLC34A2-ROS1	S4;R32	6	9		66.7%	77.8%	7	1322	0.53%
			S4;R34	1			11.1%				
1~2%	RET	KIF5B-RET	K15;R11	1	59		1.7%	91.5%	54	4009	1.35%
			K15;R12	36			61.0%				
			K16;R12	12			20.3%				
			K22;R12	3			5.1%				
			K23;R12	2			3.4%				
1~5%	NTRK1	CD74-NTRK1	C8;N12	1	1		100.0%	100.0%	COSMIC 中无记录		-
4%	cMET	cMET 外显子 14 跳读	-								4%
										总计	12%

序列表
<110> 博铼生技股份有限公司
<120> 用于检测肺癌中的DNA突变的图像区分多重测定
<130> 69550-20013.40
<140> 尚未分配
<141> 同时随同提交
<150> US 62/958,599
<151> 2020-01-08
<160> 521
<170> FastSEQ for Windows Version 4.0
<210> 1
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 1
gtactggtgg agtatttgat agtg 24
<210> 2
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 2
cgtcaaggca ctcttgccta c 21
<210> 3
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 3
ccacaccccc aggattctt 19
<210> 4
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成构建体
<400> 4
ttggtctctc atggcactgt actc 24
<210> 5
<211> 26
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 5
caatttctac aagagatcct ctctct 26
<210> 6
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 6
ctccatttta gcacttacct gtgac 25
<210> 7
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 7
accctagcct tagataaaac tgagc 25
<210> 8
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 8
tttgttgtcc agccaccatg a 21
<210> 9
<211> 30
<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 9
atagcctcaa ttcttaccat ccacaaaatg 30
<210> 10
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 10
cagatatatt tcttcatgaa gacctcacag taa 33
<210> 11
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 11
cttgtggagc ctcttacacc c 21
<210> 12
<211> 16
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 12
tgccgaacgc accgga 16
<210> 13
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 13
gccagttaac gtcttccttc tc 22
<210> 14
<211> 23

<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 14
atcgaggatt tccttgttgg ctt 23
<210> 15
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 15
cctccaccgt gcagatcatc 20
<210> 16
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 16
ttccctgatt acctttgcga t 21
<210> 17
<211> 17
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 17
ggaggaccgt cgcttgg 17
<210> 18
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 18
tctttctctt ccgcacccag 20
<210> 19

<211> 34
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 19
ggagtgccat cgctgtttga aatgagcagg cact 34
<210> 20
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 20
tacagccctg gatattctta gtagcgc 27
<210> 21
<211> 40
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 21
aattcaatac atactatcag ctttctccca ctgtattgaa 40
<210> 22
<211> 40
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 22
aatatttctg gtacgagtgg gattgtaaca accagaaata 40
<210> 23
<211> 35
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 23
tttctggtgc tatgaggaaa tgaccaacca ccaga 35

<210> 24
<211> 39
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 24
cttcagtttg catgatagag ctggagacct acaaactga 39
<210> 25
<211> 37
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 25
tatttcatct gatacgaacc tgggactgaa gatgaaa 37
<210> 26
<211> 31
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 26
gtgatcgcac agtaggacag cggctgcgat c 31
<210> 27
<211> 37
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 27
ctctaggaga tatcattcca aattcgcctt ctcctag 37
<210> 28
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 28

gaatttcaca ggattgattg ctggtgttgt ctc 33

<210> 29

<211> 36

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 29

gacagtattt tgcagtaatg gactggatat atcaga 36

<210> 30

<211> 33

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 30

agaagacgtg acaggaactg gaggacccgt ctt 33

<210> 31

<211> 33

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 31

gagctgctac ctacagcagg ttgaaggagc agc 33

<210> 32

<211> 33

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 32

ggacgaaaat ccagacccca aaaggtgttt cgt 33

<210> 33

<211> 31

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 33
cattgggtga catcagggag ctgccaccca a 31
<210> 34
<211> 28
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 34
ggaagatata attgacactg gcaaaaca 28
<210> 35
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 35
attcattata gtcaagggca tatcc 25
<210> 36
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 36
aagtatgcta cacccgtttg atta 24
<210> 37
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 37
cgctctggct aaaagtccat 20
<210> 38
<211> 11
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>

<223> 合成构建体
<400> 38
tagttggagc t 11
<210> 39
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 39
ttttttttt ttaatagttg gagct 25
<210> 40
<211> 11
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 40
tgtggtagtt g 11
<210> 41
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 41
ttttttttt ttaatgtggt agttg 25
<210> 42
<211> 11
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 42
tgatggcgta g 11
<210> 43
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成构建体
<400> 43
tttttttttt ttaatgatgg cgtag 25
<210> 44
<211> 13
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 44
tggagctgat ggc 13
<210> 45
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 45
tttttttttt tatggagctg atggc 25
<210> 46
<211> 11
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 46
gcgtaggcaa g 11
<210> 47
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 47
tttttttttt ttaagcgtag gcaag 25
<210> 48
<211> 13
<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 48
ctgttggcgt agg 13
<210> 49
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 49
ttttttttt tactgttggc gtagg 25
<210> 50
<211> 13
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 50
gtagttggag ctg 13
<210> 51
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 51
ttttttttt tagtagttgg agctg 25
<210> 52
<211> 13
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 52
tggagctgtt ggc 13
<210> 53
<211> 25

<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 53
ttttttttttt tatggagctg ttggc 25
<210> 54
<211> 13
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 54
ttgtggtagt tgg 13
<210> 55
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 55
ttttttttttt tattgtggta gttgg 25
<210> 56
<211> 13
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 56
ggcgtaggca aga 13
<210> 57
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 57
ttttttttttt taggcgtagg caaga 25
<210> 58

<211> 12
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 58
tagttggagc tt 12
<210> 59
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 59
ttttttttt taatagttgg agctt 25
<210> 60
<211> 12
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 60
gcgtaggcaa ga 12
<210> 61
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 61
ttttttttt taagcgtagg caaga 25
<210> 62
<211> 12
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 62
ggagcttgtg gc 12

<210> 63
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 63
tttttttttt taaggagctt gtggc 25
<210> 64
<211> 12
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 64
ttgtggcgta gg 12
<210> 65
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 65
tttttttttt taattgtggc gtagg 25
<210> 66
<211> 12
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 66
tgtggtagtt gg 12
<210> 67
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 67

tttttttttt taatgtggta gttgg 25

<210> 68

<211> 16

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 68

gacatactgg atacag 16

<210> 69

<211> 27

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 69

tttttttttt tgacatactg gatacag 27

<210> 70

<211> 16

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 70

actggataca gctgga 16

<210> 71

<211> 27

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 71

tttttttttt tactggatac agctgga 27

<210> 72

<211> 16

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 72
actagaagag tacagt 16
<210> 73
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 73
ttttttttt tactagaaga gtacagt 27
<210> 74
<211> 16
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 74
atacagctgg actaga 16
<210> 75
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 75
ttttttttt tatacagctg gactaga 27
<210> 76
<211> 16
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 76
gctggactag aagagt 16
<210> 77
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>

<223> 合成构建体
<400> 77
tttttttttt tgctggacta gaagagt 27
<210> 78
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 78
tttttaatt gagaaatctc gatggag 27
<210> 79
<211> 17
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 79
tttggtctag ctacaga 17
<210> 80
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 80
tttttaatt tttggtctag ctacaga 27
<210> 81
<211> 17
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 81
ctacagagaa atctcga 17
<210> 82
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成构建体
<400> 82
tttttaatt ctacagagaa atctcga 27
<210> 83
<211> 17
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 83
gtgattttgg tctagct 17
<210> 84
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 84
tttttaatt gtgattttgg tctagct 27
<210> 85
<211> 17
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 85
tctagctaca gagaaat 17
<210> 86
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 86
tttttaatt tctagctaca gagaaat 27
<210> 87
<211> 15
<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 87
gctcagtgat tttag 15
<210> 88
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 88
ttttttttta gctcagtgat tttag 25
<210> 89
<211> 14
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 89
tgctcagtga tttt 14
<210> 90
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 90
tttttttttt gctcagtgat ttt 23
<210> 91
<211> 15
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 91
gctcagtgat tttag 15
<210> 92
<211> 25

<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 92
tttttttta gctcagtgat tttag 25
<210> 93
<211> 17
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 93
cctgctcagt gatttta 17
<210> 94
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 94
tttttttcct gctcagtgat ttta 24
<210> 95
<211> 15
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 95
ctcagtgatt ttaga 15
<210> 96
<211> 26
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 96
ttttttttt tctcagtgat tttaga 26
<210> 97

<211> 12
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 97
ttctcctgct ta 12
<210> 98
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 98
ttttttttt tttctcctgc tta 23
<210> 99
<211> 12
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 99
ctcctgctta gt 12
<210> 100
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 100
ttttttttt tttctcctgc ttagt 25
<210> 101
<211> 12
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 101
tctcctgctt ag 12

<210> 102
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 102
ttttttttttt tatctcctgc ttag 24
<210> 103
<211> 12
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 103
tcctgcttag tg 12
<210> 104
<211> 26
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 104
ttttttttttt tttttcctgc ttagtg 26
<210> 105
<211> 14
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 105
ctcctgctta gtga 14
<210> 106
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 106

ttttttttttt tttctcctgc ttagtga 27

<210> 107

<211> 13

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 107

gatgcacgtc atg 13

<210> 108

<211> 28

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 108

ttttttttttt tttttgatgc acgtcatg 28

<210> 109

<211> 13

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 109

tgaatgatgc acg 13

<210> 110

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 110

ttttttttttt tgaatgatgc acg 23

<210> 111

<211> 11

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 111
tgatgcacgt c 11
<210> 112
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 112
ttttttttt tttgatgcac gtc 23
<210> 113
<211> 14
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 113
aatgatgcac gtca 14
<210> 114
<211> 26
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 114
ttttttttt ttaatgatgc acgtca 26
<210> 115
<211> 13
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 115
aatgatgcac gtc 13
<210> 116
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>

<223> 合成构建体
<400> 116
tttttttttt ttaatgatgc acgtc 25
<210> 117
<211> 16
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 117
tcaaagtgct ggcctc 16
<210> 118
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 118
tttttttttt caaagtgctg gcctc 25
<210> 119
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 119
agatcaaagt gctggcctcc g 21
<210> 120
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 120
ttttttagat caaagtgctg gcctccg 27
<210> 121
<211> 13
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成构建体
<400> 121
aaagtgctgg cct 13
<210> 122
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 122
ttttttttt taaagtgctg gcct 24
<210> 123
<211> 11
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 123
agtgctggcc t 11
<210> 124
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 124
ttttttttt tttagtgctg gcct 24
<210> 125
<211> 13
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 125
aagtgctggc ctc 13
<210> 126
<211> 25
<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 126
tttttttttt ttaagtgctg gcctc 25
<210> 127
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 127
tttttttta atcaaaacat ctccg 25
<210> 128
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 128
aatcaaaaca tctccgaaag 20
<210> 129
<211> 29
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 129
tttttttta atcaaaacat ctccgaaag 29
<210> 130
<211> 13
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 130
caaaacatct ccg 13
<210> 131
<211> 25

<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 131
ttttttttt tacaaaacat ctccg 25
<210> 132
<211> 10
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 132
aacatctccg 10
<210> 133
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 133
ttttttttt tttttaacat ctccg 25
<210> 134
<211> 17
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 134
aaacatctcc gaaagcc 17
<210> 135
<211> 31
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 135
ttttttttt ttttaaacat ctccgaaagc c 31
<210> 136

<211> 17
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 136
aatcaagaca tctccga 17
<210> 137
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 137
tttttttaa tcaagacatc tccga 25
<210> 138
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 138
gcaatcaaga catctccga 19
<210> 139
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 139
tttttgcaa tcaagacatc tccga 25
<210> 140
<211> 14
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 140
aatcaagaca tctc 14

<210> 141
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 141
tttttttaa tcaagacatc tc 22
<210> 142
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 142
aatcaagaca tctccgaaag c 21
<210> 143
<211> 29
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 143
tttttttaa tcaagacatc tccgaaagc 29
<210> 144
<211> 14
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 144
caagacatct ccga 14
<210> 145
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 145

tttttttttt tcaagacatc tccga 25

<210> 146

<211> 14

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 146

gagatgcatg atga 14

<210> 147

<211> 16

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 147

tgagatgcat gatgag 16

<210> 148

<211> 17

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 148

atgagatgca tgatgag 17

<210> 149

<211> 15

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 149

tgagctgcat gatga 15

<210> 150

<211> 17

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 150
catgagatgc atgatga 17
<210> 151
<211> 14
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 151
attttgggcg ggcc 14
<210> 152
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 152
ttttttatt ttgggcgggc c 21
<210> 153
<211> 14
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 153
ttgggcgggc caaa 14
<210> 154
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 154
tttttttaa ttgggcgggc caaa 24
<210> 155
<211> 12
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>

<223> 合成构建体
<400> 155
gcgggccaaa ct 12
<210> 156
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 156
ttttttaaa aaagcgggcc aaact 25
<210> 157
<211> 14
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 157
gggcgggcca aact 14
<210> 158
<211> 26
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 158
tttttttaa aagggcgggc caaact 26
<210> 159
<211> 11
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 159
tgggcgggcc a 11
<210> 160
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成构建体
<400> 160
tttttttaa atgggcgggc ca 22
<210> 161
<211> 16
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 161
aaaggaccta aagtgt 16
<210> 162
<211> 26
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 162
ttttttttt aaaggaccta aagtgt 26
<210> 163
<211> 15
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 163
cctaaagtgt accgc 15
<210> 164
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 164
ttttttttt cctaaagtgt accgc 25
<210> 165
<211> 16
<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 165
gggaaaggac ctaaag 16
<210> 166
<211> 26
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 166
ttttttttt gggaaaggac ctaaag 26
<210> 167
<211> 15
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 167
agtgtaccgc cggaa 15
<210> 168
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 168
ttttttttt agtgtaccgc cggaa 25
<210> 169
<211> 16
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 169
taccgccgga agcacc 16
<210> 170
<211> 26

<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 170
tttttttttt taccgccgga agcacc 26
<210> 171
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 171
gactatgaaa tattgtac 18
<210> 172
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 172
tttttttttt ttgactatga aatattgtac 30
<210> 173
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 173
gaaatattgt acttgtac 18
<210> 174
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 174
tttttttttt ttgaaatatt gtacttgtac 30
<210> 175

<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 175
tattgtactt gtaccgcc 18
<210> 176
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 176
ttttttttt tttattgtac ttgtaccgcc 30
<210> 177
<211> 17
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 177
tgtaccgccg gaagcac 17
<210> 178
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 178
ttttttttt ttttgtaccg ccggaagcac 30
<210> 179
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 179
ccgccggaag caccagga 18

<210> 180
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 180
tttttttttt ttccgccgga agcaccagga 30
<210> 181
<211> 16
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 181
tgtcatcatc aaccaa 16
<210> 182
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 182
tttttttttt tttttgtcat catcaaccaa 30
<210> 183
<211> 15
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 183
atgtcatcat caacc 15
<210> 184
<211> 29
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 184

ttttttttttt ttttatgtca tcatcaacc 29

<210> 185

<211> 16

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 185

gtgtaccgcc ggaagc 16

<210> 186

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 186

ttttttttttt ttttgtgtac cgccggaagc 30

<210> 187

<211> 16

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 187

tcaaccaagt gtaccg 16

<210> 188

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 188

ttttttttttt tttttcaacc aagtgtaccg 30

<210> 189

<211> 17

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 189
taccgccgga agcacca 17
<210> 190
<211> 31
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 190
ttttttttt tttttaccgc cggaagcacc a 31
<210> 191
<211> 16
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 191
cgaaaaaaac agccaa 16
<210> 192
<211> 29
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 192
ttttttttt tttcgaaaaa aacagccaa 29
<210> 193
<211> 16
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 193
tcgcgaaaaa aacagc 16
<210> 194
<211> 29
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>

<223> 合成构建体
<400> 194
ttttttttttt ttttcgcgaa aaaaacagc 29
<210> 195
<211> 16
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 195
gtgtaccgcc ggaagc 16
<210> 196
<211> 29
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 196
ttttttttttt tttgtgtacc gccggaagc 29
<210> 197
<211> 16
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 197
taccgccgga agcacc 16
<210> 198
<211> 29
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 198
ttttttttttt ttttaccgcc ggaagcacc 29
<210> 199
<211> 16
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成构建体
<400> 199
acagccaagt gtaccg 16
<210> 200
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 200
tttttttttt ttttacagcc aagtgtaccg 30
<210> 201
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 201
actgacgctc caccgaaa 18
<210> 202
<211> 29
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 202
tttttttttt tactgacgct ccaccgaaa 29
<210> 203
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 203
ccactgacgc tccaccga 18
<210> 204
<211> 29
<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 204
tttttttttt tccactgacg ctccaccga 29
<210> 205
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 205
gctggagtcc caaataaac 19
<210> 206
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 206
tttttttttt tgctggagtc ccaaataaac 30
<210> 207
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 207
ggagtcccaa ataaaccag 19
<210> 208
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 208
tttttttttt tggagtccca aataaaccag 30
<210> 209
<211> 19

<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 209
caccgaaagc tggagtccc 19
<210> 210
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 210
ttttttttt tcaccgaaag ctggagtccc 30
<210> 211
<211> 15
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 211
ccgaaagatg atttt 15
<210> 212
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 212
ttttttttt ttccgaaaga tgatttt 27
<210> 213
<211> 15
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 213
gacgctccac cgaaa 15
<210> 214

<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 214
ttttttttt ttgacgctcc accgaaa 27
<210> 215
<211> 16
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 215
actgacgctc caccga 16
<210> 216
<211> 28
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 216
ttttttttt ttactgacgc tccaccga 28
<210> 217
<211> 15
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 217
gatgattttt ggata 15
<210> 218
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 218
ttttttttt ttgatgattt ttggata 27

<210> 219
<211> 16
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 219
tgatttttgg atacca 16
<210> 220
<211> 28
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 220
ttttttttt tttgattttt ggatacca 28
<210> 221
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 221
agcgccttcc agctggttgg a 21
<210> 222
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 222
ttttttttt ttagcgcctt ccagctggtt gga 33
<210> 223
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 223

ctggttggag ctggagtccc 20

<210> 224

<211> 32

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 224

tttttttttt ttctggttgg agctggagtc cc 32

<210> 225

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 225

agtagcgcct tccagctggt tg 22

<210> 226

<211> 34

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 226

tttttttttt ttagtagcgc cttccagctg gttg 34

<210> 227

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 227

gctggagtcc caaataaacc a 21

<210> 228

<211> 33

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 228
ttttttttttt ttgctggagt cccaaataaa cca 33
<210> 229
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 229
ggagtcccaa ataaaccagg 20
<210> 230
<211> 32
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 230
ttttttttttt ttggagtccc aaataaacca gg 32
<210> 231
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 231
gcgccttcca gctggttg 18
<210> 232
<211> 28
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 232
ttttttttttt gcgccttcca gctggttg 28
<210> 233
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>

<223> 合成构建体
<400> 233
gtagcgcctt ccagctggt 19
<210> 234
<211> 29
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 234
ttttttttt gtagcgcctt ccagctggt 29
<210> 235
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 235
tggttggaga tgattttt 18
<210> 236
<211> 28
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 236
ttttttttt tggttggaga tgattttt 28
<210> 237
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 237
gatgattttt ggataccag 19
<210> 238
<211> 29
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成构建体
<400> 238
ttttttttt gatgattttt ggataccag 29
<210> 239
<211> 16
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 239
tgatttttgg atacca 16
<210> 240
<211> 26
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 240
ttttttttt tgatttttgg atacca 26
<210> 241
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 241
gtgggaaata atgatgtaaa 20
<210> 242
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 242
ttttttttt gtgggaaata atgatgtaaa 30
<210> 243
<211> 20
<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 243
ctgtgggaaa taatgatgta 20
<210> 244
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 244
ttttttttt ctgtgggaaa taatgatgta 30
<210> 245
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 245
gatccactgt gcgacgagct 20
<210> 246
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 246
ttttttttt gatccactgt gcgacgagct 30
<210> 247
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 247
tgatgtaaag atccactgtg 20
<210> 248
<211> 30

<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 248
tttttttttt tgatgtaaag atccactgtg 30
<210> 249
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 249
tccactgtgc gacgagctgt 20
<210> 250
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 250
tttttttttt tccactgtgc gacgagctgt 30
<210> 251
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 251
tgggaaataa tgatgtaaa 19
<210> 252
<211> 28
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 252
tttttttttt gggaaataat gatgtaaa 28
<210> 253

<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 253
ctgtgggaaa taatgatgta 20
<210> 254
<211> 29
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 254
ttttttttc tgtgggaaat aatgatgta 29
<210> 255
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 255
ggaggatcca aagtgggaat 20
<210> 256
<211> 29
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 256
ttttttttg gaggatccaa agtgggaat 29
<210> 257
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 257
ggatccaaag tgggaatt 18

<210> 258
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 258
ttttttttg gatccaaagt gggaatt 27
<210> 259
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 259
atgatgtaaa ggaggatcc 19
<210> 260
<211> 28
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 260
ttttttttta tgatgtaaag gaggatcc 28
<210> 261
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 261
caggatctgg gcccagaca 19
<210> 262
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 262

ttttttttttt acaggatctg ggcccagaca 30

<210> 263

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 263

gatctgggcc cagacacta 19

<210> 264

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 264

ttttttttttt agatctgggc ccagacacta 30

<210> 265

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 265

ccagacacta acagcacat 19

<210> 266

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 266

ttttttttttt accagacact aacagcacat 30

<210> 267

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 267
gggcccagac actaacagc 19
<210> 268
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 268
ttttttttt agggcccaga cactaacagc 30
<210> 269
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 269
ctaacagcac atctggaga 19
<210> 270
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 270
ttttttttt actaacagca catctggaga 30
<210> 271
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 271
agaaagcaaa ttaaagat 18
<210> 272
<211> 28
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>

<223> 合成构建体
<400> 272
tttttttttt agaaagcaaa ttaaagat 28
<210> 273
<211> 17
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 273
agcaaattaa agatcag 17
<210> 274
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 274
tttttttttt agcaaattaa agatcag 27
<210> 275
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 275
aaattaaaga tcagtttc 18
<210> 276
<211> 28
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 276
tttttttttt aaattaaaga tcagtttc 28
<210> 277
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成构建体
<400> 277
agatcagttt cctaattc 18
<210> 278
<211> 28
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 278
ttttttttt agatcagttt cctaattc 28
<210> 279
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 279
aagatcagtt tcctaatt 18
<210> 280
<211> 28
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 280
ttttttttt aagatcagtt tcctaatt 28
<210> 281
<211> 16
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<220>
<221> misc_feature
<222> 14, 15, 16
<223> n=反向脱氧胸苷
<220>

<221> misc_feature
<222> 15, 16
<223> 可存在或不存在
<400> 281
tacgccacca gctnnn 16
<210> 282
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<220>
<221> misc_feature
<222> 18, 19, 20
<223> n=反向脱氧胸苷
<220>
<221> misc_feature
<222> 19, 20
<223> 可存在或不存在
<400> 282
ttggagctgg tggcgtannn 20
<210> 283
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<220>
<221> misc_feature
<222> 17, 18, 19
<223> n=反向脱氧胸苷
<220>
<221> misc_feature
<222> 18, 19
<223> 可存在或不存在
<400> 283
gctggtggcg taggcannn 19
<210> 284
<211> 18

<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<220>
<221> misc_feature
<222> 16, 17, 18
<223> n=反向脱氧胸苷
<220>
<221> misc_feature
<222> 17, 18
<223> 可存在或不存在
<400> 284
gctggtggcg taggcnnn 18
<210> 285
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<220>
<221> misc_feature
<222> 17, 18, 19
<223> n=反向脱氧胸苷
<220>
<221> misc_feature
<222> 18, 19
<223> 可存在或不存在
<400> 285
ttggagctgg tggcgtnnn 19
<210> 286
<211> 17
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<220>
<221> misc_feature
<222> 15, 16, 17

<223> n=反向脱氧胸苷
<220>
<221> misc_feature
<222> 16, 17
<223> 可存在或不存在
<400> 286
ctcttcttgt ccagnnn 17
<210> 287
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<220>
<221> misc_feature
<222> 22, 23, 24
<223> n=反向脱氧胸苷
<220>
<221> misc_feature
<222> 23, 24
<223> 可存在或不存在
<400> 287
tcttcttgtc cagctgtatc cnnn 24
<210> 288
<211> 17
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<220>
<221> misc_feature
<222> 15, 16, 17
<223> n=反向脱氧胸苷
<220>
<221> misc_feature
<222> 16, 17
<223> 可存在或不存在
<400> 288
tcttgtccag ctgtnnn 17

<210> 289
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<220>
<221> misc_feature
<222> 18, 19, 20
<223> n=反向脱氧胸苷
<220>
<221> misc_feature
<222> 19, 20
<223> 可存在或不存在
<400> 289
tcttgtccag ctgtatcnnn 20
<210> 290
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<220>
<221> misc_feature
<222> 17, 18, 19
<223> n=反向脱氧胸苷
<220>
<221> misc_feature
<222> 18, 19
<223> 可存在或不存在
<400> 290
tcttcttgtc cagctgnnn 19
<210> 291
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<220>

<221> misc_feature
<222> 19, 20, 21
<223> n=反向脱氧胸苷
<220>
<221> misc_feature
<222> 20, 21
<223> 可存在或不存在
<400> 291
ctgaaatcac tgagcaggnn n 21
<210> 292
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<220>
<221> misc_feature
<222> 22, 23, 24
<223> n=反向脱氧胸苷
<220>
<221> misc_feature
<222> 23, 24
<223> 可存在或不存在
<400> 292
tctctgaaat cactgagcag gnnn 24
<210> 293
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<220>
<221> misc_feature
<222> 22, 23, 24
<223> n=反向脱氧胸苷
<220>
<221> misc_feature
<222> 23, 24
<223> 可存在或不存在

<400> 293
tctctgaaat cactgagcag gnnn 24
<210> 294
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<220>
<221> misc_feature
<222> 22, 23, 24
<223> n=反向脱氧胸苷
<220>
<221> misc_feature
<222> 23, 24
<223> 可存在或不存在
<400> 294
tctctgaaat cactgagcag gnnn 24
<210> 295
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<220>
<221> misc_feature
<222> 22, 23, 24
<223> n=反向脱氧胸苷
<220>
<221> misc_feature
<222> 23, 24
<223> 可存在或不存在
<400> 295
tctctgaatt cactgagcag gnnn 24
<210> 296
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>

<223> 合成构建体
<220>
<221> misc_feature
<222> 16, 17, 18
<223> n=反向脱氧胸苷
<220>
<221> misc_feature
<222> 17, 18
<223> 可存在或不存在
<400> 296
caccatgatg tgcatnnn 18
<210> 297
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<220>
<221> misc_feature
<222> 17, 18, 19
<223> n=反向脱氧胸苷
<220>
<221> misc_feature
<222> 18, 19
<223> 可存在或不存在
<400> 297
ccaccatgat gtgcatnnn 19
<210> 298
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<220>
<221> misc_feature
<222> 16, 17, 18
<223> n=反向脱氧胸苷
<220>
<221> misc_feature

<222> 17, 18
<223> 可存在或不存在
<400> 298
caccatgatg tgcatnnn 18
<210> 299
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<220>
<221> misc_feature
<222> 19, 20, 21
<223> n=反向脱氧胸苷
<220>
<221> misc_feature
<222> 20, 21
<223> 可存在或不存在
<400> 299
ccaccatgat gtgcatcann n 21
<210> 300
<211> 14
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<220>
<221> misc_feature
<222> 12, 13, 14
<223> n=反向脱氧胸苷
<220>
<221> misc_feature
<222> 13, 14
<223> 可存在或不存在
<400> 300
catgatgtgc annn 14
<210> 301
<211> 19
<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<220>
<221> misc_feature
<222> 17, 18, 19
<223> n=反向脱氧胸苷
<220>
<221> misc_feature
<222> 18, 19
<223> 可存在或不存在
<400> 301
gagatttcac tgtagcnnn 19
<210> 302
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<220>
<221> misc_feature
<222> 17, 18, 19
<223> n=反向脱氧胸苷
<220>
<221> misc_feature
<222> 18, 19
<223> 可存在或不存在
<400> 302
gagatttcac tgtagcnnn 19
<210> 303
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<220>
<221> misc_feature
<222> 17, 18, 19
<223> n=反向脱氧胸苷

<220>
<221> misc_feature
<222> 18, 19
<223> 可存在或不存在
<400> 303
gagatttcac tgtagcnnn 19
<210> 304
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<220>
<221> misc_feature
<222> 17, 18, 19
<223> n=反向脱氧胸苷
<220>
<221> misc_feature
<222> 18, 19
<223> 可存在或不存在
<400> 304
gagatttcac tgtagcnnn 19
<210> 305
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<220>
<221> misc_feature
<222> 17, 18, 19
<223> n=反向脱氧胸苷
<220>
<221> misc_feature
<222> 18, 19
<223> 可存在或不存在
<400> 305
gagatttcac tgtagcnnn 19
<210> 306

<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<220>
<221> misc_feature
<222> 19, 20, 21
<223> n=反向脱氧胸苷
<220>
<221> misc_feature
<222> 20, 21
<223> 可存在或不存在
<400> 306
cggagcccag cactttgann n 21
<210> 307
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<220>
<221> misc_feature
<222> 20, 21, 22
<223> n=反向脱氧胸苷
<220>
<221> misc_feature
<222> 21, 22
<223> 可存在或不存在
<400> 307
cgcaccggag cccagcactn nn 22
<210> 308
<211> 14
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<220>
<221> misc_feature

<222> 12, 13, 14
<223> n=反向脱氧胸苷
<220>
<221> misc_feature
<222> 13, 14
<223> 可存在或不存在
<400> 308
gagcccagca cnnn 14
<210> 309
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<220>
<221> misc_feature
<222> 19, 20, 21
<223> n=反向脱氧胸苷
<220>
<221> misc_feature
<222> 20, 21
<223> 可存在或不存在
<400> 309
cgcaccggag cccagcacnn n 21
<210> 310
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<220>
<221> misc_feature
<222> 22, 23, 24
<223> n=反向脱氧胸苷
<220>
<221> misc_feature
<222> 23, 24
<223> 可存在或不存在
<400> 310

cgcaccggag cccagcactt annn 24

<210> 311

<211> 28

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<220>

<221> misc_feature

<222> 26, 27, 28

<223> n=反向脱氧胸苷

<220>

<221> misc_feature

<222> 27, 28

<223> 可存在或不存在

<400> 311

cggagatgtt gcttctctta attccnnn 28

<210> 312

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<220>

<221> misc_feature

<222> 19, 20, 21

<223> n=反向脱氧胸苷

<220>

<221> misc_feature

<222> 20, 21

<223> 可存在或不存在

<400> 312

cggagatgtt gcttctctnn n 21

<210> 313

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<220>
<221> misc_feature
<222> 19, 20, 21
<223> n=反向脱氧胸苷
<220>
<221> misc_feature
<222> 20, 21
<223> 可存在或不存在
<400> 313
gttgcttctc ttaattccnn n 21
<210> 314
<211> 16
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<220>
<221> misc_feature
<222> 14, 15, 16
<223> n=反向脱氧胸苷
<220>
<221> misc_feature
<222> 15, 16
<223> 可存在或不存在
<400> 314
atgttgcttc tctnnn 16
<210> 315
<211> 15
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<220>
<221> misc_feature
<222> 13, 14, 15
<223> n=反向脱氧胸苷
<220>
<221> misc_feature
<222> 14, 15

<223> 可存在或不存在
<400> 315
ttgcttctct tannn 15
<210> 316
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<220>
<221> misc_feature
<222> 17, 18, 19
<223> n=反向脱氧胸苷
<220>
<221> misc_feature
<222> 18, 19
<223> 可存在或不存在
<400> 316
catcacgcag ctcatgnnn 19
<210> 317
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<220>
<221> misc_feature
<222> 19, 20, 21
<223> n=反向脱氧胸苷
<220>
<221> misc_feature
<222> 20, 21
<223> 可存在或不存在
<400> 317
tgcagctcat cacgcagcnn n 21
<210> 318
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成构建体
<220>
<221> misc_feature
<222> 17, 18, 19
<223> n=反向脱氧胸苷
<220>
<221> misc_feature
<222> 18, 19
<223> 可存在或不存在
<400> 318
tcatcacgca gctcatnnn 19
<210> 319
<211> 15
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<220>
<221> misc_feature
<222> 13, 14, 15
<223> n=反向脱氧胸苷
<220>
<221> misc_feature
<222> 14, 15
<223> 可存在或不存在
<400> 319
tcatcacgca gcnnn 15
<210> 320
<211> 16
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<220>
<221> misc_feature
<222> 14, 15, 16
<223> n=反向脱氧胸苷
<220>

<221> misc_feature
<222> 15, 16
<223> 可存在或不存在
<400> 320
ctcatcacgc agcnnn 16
<210> 321
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<220>
<221> misc_feature
<222> 21, 22, 23
<223> n=反向脱氧胸苷
<220>
<221> misc_feature
<222> 22, 23
<223> 可存在或不存在
<400> 321
ccagcagttt ggccagccct nnn 23
<210> 322
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<220>
<221> misc_feature
<222> 21, 22, 23
<223> n=反向脱氧胸苷
<220>
<221> misc_feature
<222> 22, 23
<223> 可存在或不存在
<400> 322
ccagcagttt ggccagccct nnn 23
<210> 323
<211> 23

<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<220>
<221> misc_feature
<222> 21, 22, 23
<223> n=反向脱氧胸苷
<220>
<221> misc_feature
<222> 22, 23
<223> 可存在或不存在
<400> 323
ccagcagttt ggccagccct nnn 23
<210> 324
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<220>
<221> misc_feature
<222> 17, 18, 19
<223> n=反向脱氧胸苷
<220>
<221> misc_feature
<222> 18, 19
<223> 可存在或不存在
<400> 324
agcagtttgg ccagccnnn 19
<210> 325
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<220>
<221> misc_feature
<222> 21, 22, 23

<223> n=反向脱氧胸苷
<220>
<221> misc_feature
<222> 22, 23
<223> 可存在或不存在
<400> 325
ccagcagttt ggccagccct nnn 23
<210> 326
<211> 188
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)
<400> 326

Met	Thr	Glu	Tyr	Lys	Leu	Val	Val	Val	Gly	Ala	Gly	Gly	Val	Gly	Lys
1				5				10						15	
Ser	Ala	Leu	Thr	Ile	Gln	Leu	Ile	Gln	Asn	His	Phe	Val	Asp	Glu	Tyr
			20					25					30		
Asp	Pro	Thr	Ile	Glu	Asp	Ser	Tyr	Arg	Lys	Gln	Val	Val	Ile	Asp	Gly
		35					40					45			
Glu	Thr	Cys	Leu	Leu	Asp	Ile	Leu	Asp	Thr	Ala	Gly	Gln	Glu	Glu	Tyr
	50					55					60				
Ser	Ala	Met	Arg	Asp	Gln	Tyr	Met	Arg	Thr	Gly	Glu	Gly	Phe	Leu	Cys
65					70					75					80
Val	Phe	Ala	Ile	Asn	Asn	Thr	Lys	Ser	Phe	Glu	Asp	Ile	His	His	Tyr
				85					90					95	
Arg	Glu	Gln	Ile	Lys	Arg	Val	Lys	Asp	Ser	Glu	Asp	Val	Pro	Met	Val
			100					105					110		
Leu	Val	Gly	Asn	Lys	Cys	Asp	Leu	Pro	Ser	Arg	Thr	Val	Asp	Thr	Lys
		115					120					125			
Gln	Ala	Gln	Asp	Leu	Ala	Arg	Ser	Tyr	Gly	Ile	Pro	Phe	Ile	Glu	Thr
	130					135					140				
Ser	Ala	Lys	Thr	Arg	Gln	Gly	Val	Asp	Asp	Ala	Phe	Tyr	Thr	Leu	Val
145					150					155					160
Arg	Glu	Ile	Arg	Lys	His	Lys	Glu	Lys	Met	Ser	Lys	Asp	Gly	Lys	Lys
				165					170					175	
Lys	Lys	Lys	Lys	Ser	Lys	Thr	Lys	Cys	Val	Ile	Met				
			180					185							

<210> 327
<211> 189
<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 327

Met Thr Glu Tyr Lys Leu Val Val Val Gly Ala Gly Gly Val Gly Lys
1 5 10 15
Ser Ala Leu Thr Ile Gln Leu Ile Gln Asn His Phe Val Asp Glu Tyr
20 25 30
Asp Pro Thr Ile Glu Asp Ser Tyr Arg Lys Gln Val Val Ile Asp Gly
35 40 45
Glu Thr Cys Leu Leu Asp Ile Leu Asp Thr Ala Gly Gln Glu Glu Tyr
50 55 60
Ser Ala Met Arg Asp Gln Tyr Met Arg Thr Gly Glu Gly Phe Leu Cys
65 70 75 80
Val Phe Ala Ile Asn Asn Ser Lys Ser Phe Ala Asp Ile Asn Leu Tyr
85 90 95
Arg Glu Gln Ile Lys Arg Val Lys Asp Ser Asp Asp Val Pro Met Val
100 105 110
Leu Val Gly Asn Lys Cys Asp Leu Pro Thr Arg Thr Val Asp Thr Lys
115 120 125
Gln Ala His Glu Leu Ala Lys Ser Tyr Gly Ile Pro Phe Ile Glu Thr
130 135 140
Ser Ala Lys Thr Arg Gln Gly Val Glu Asp Ala Phe Tyr Thr Leu Val
145 150 155 160
Arg Glu Ile Arg Gln Tyr Arg Met Lys Lys Leu Asn Ser Ser Asp Asp
165 170 175
Gly Thr Gln Gly Cys Met Gly Leu Pro Cys Val Val Met
180 185

<210> 328

<211> 1068

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 328

Met Pro Pro Arg Pro Ser Ser Gly Glu Leu Trp Gly Ile His Leu Met
1 5 10 15
Pro Pro Arg Ile Leu Val Glu Cys Leu Leu Pro Asn Gly Met Ile Val
20 25 30
Thr Leu Glu Cys Leu Arg Glu Ala Thr Leu Ile Thr Ile Lys His Glu
35 40 45
Leu Phe Lys Glu Ala Arg Lys Tyr Pro Leu His Gln Leu Leu Gln Asp
50 55 60

Glu Ser Ser Tyr Ile Phe Val Ser Val Thr Gln Glu Ala Glu Arg Glu
65 70 75 80
Glu Phe Phe Asp Glu Thr Arg Arg Leu Cys Asp Leu Arg Leu Phe Gln
85 90 95
Pro Phe Leu Lys Val Ile Glu Pro Val Gly Asn Arg Glu Glu Lys Ile
100 105 110
Leu Asn Arg Glu Ile Gly Phe Ala Ile Gly Met Pro Val Cys Glu Phe
115 120 125
Asp Met Val Lys Asp Pro Glu Val Gln Asp Phe Arg Arg Asn Ile Leu
130 135 140
Asn Val Cys Lys Glu Ala Val Asp Leu Arg Asp Leu Asn Ser Pro His
145 150 155 160
Ser Arg Ala Met Tyr Val Tyr Pro Pro Asn Val Glu Ser Ser Pro Glu
165 170 175
Leu Pro Lys His Ile Tyr Asn Lys Leu Asp Lys Gly Gln Ile Ile Val
180 185 190
Val Ile Trp Val Ile Val Ser Pro Asn Asn Asp Lys Gln Lys Tyr Thr
195 200 205
Leu Lys Ile Asn His Asp Cys Val Pro Glu Gln Val Ile Ala Glu Ala
210 215 220
Ile Arg Lys Lys Thr Arg Ser Met Leu Leu Ser Ser Glu Gln Leu Lys
225 230 235 240
Leu Cys Val Leu Glu Tyr Gln Gly Lys Tyr Ile Leu Lys Val Cys Gly
245 250 255
Cys Asp Glu Tyr Phe Leu Glu Lys Tyr Pro Leu Ser Gln Tyr Lys Tyr
260 265 270
Ile Arg Ser Cys Ile Met Leu Gly Arg Met Pro Asn Leu Met Leu Met
275 280 285
Ala Lys Glu Ser Leu Tyr Ser Gln Leu Pro Met Asp Cys Phe Thr Met
290 295 300
Pro Ser Tyr Ser Arg Arg Ile Ser Thr Ala Thr Pro Tyr Met Asn Gly
305 310 315 320
Glu Thr Ser Thr Lys Ser Leu Trp Val Ile Asn Ser Ala Leu Arg Ile
325 330 335
Lys Ile Leu Cys Ala Thr Tyr Val Asn Val Asn Ile Arg Asp Ile Asp
340 345 350
Lys Ile Tyr Val Arg Thr Gly Ile Tyr His Gly Gly Glu Pro Leu Cys
355 360 365
Asp Asn Val Asn Thr Gln Arg Val Pro Cys Ser Asn Pro Arg Trp Asn

370 375 380
Glu Trp Leu Asn Tyr Asp Ile Tyr Ile Pro Asp Leu Pro Arg Ala Ala
385 390 395 400
Arg Leu Cys Leu Ser Ile Cys Ser Val Lys Gly Arg Lys Gly Ala Lys
405 410 415
Glu Glu His Cys Pro Leu Ala Trp Gly Asn Ile Asn Leu Phe Asp Tyr
420 425 430
Thr Asp Thr Leu Val Ser Gly Lys Met Ala Leu Asn Leu Trp Pro Val
435 440 445
Pro His Gly Leu Glu Asp Leu Leu Asn Pro Ile Gly Val Thr Gly Ser
450 455 460
Asn Pro Asn Lys Glu Thr Pro Cys Leu Glu Leu Glu Phe Asp Trp Phe
465 470 475 480
Ser Ser Val Val Lys Phe Pro Asp Met Ser Val Ile Glu Glu His Ala
485 490 495
Asn Trp Ser Val Ser Arg Glu Ala Gly Phe Ser Tyr Ser His Ala Gly
500 505 510
Leu Ser Asn Arg Leu Ala Arg Asp Asn Glu Leu Arg Glu Asn Asp Lys
515 520 525
Glu Gln Leu Lys Ala Ile Ser Thr Arg Asp Pro Leu Ser Glu Ile Thr
530 535 540
Glu Gln Glu Lys Asp Phe Leu Trp Ser His Arg His Tyr Cys Val Thr
545 550 555 560
Ile Pro Glu Ile Leu Pro Lys Leu Leu Leu Ser Val Lys Trp Asn Ser
565 570 575
Arg Asp Glu Val Ala Gln Met Tyr Cys Leu Val Lys Asp Trp Pro Pro
580 585 590
Ile Lys Pro Glu Gln Ala Met Glu Leu Leu Asp Cys Asn Tyr Pro Asp
595 600 605
Pro Met Val Arg Gly Phe Ala Val Arg Cys Leu Glu Lys Tyr Leu Thr
610 615 620
Asp Asp Lys Leu Ser Gln Tyr Leu Ile Gln Leu Val Gln Val Leu Lys
625 630 635 640
Tyr Glu Gln Tyr Leu Asp Asn Leu Leu Val Arg Phe Leu Leu Lys Lys
645 650 655
Ala Leu Thr Asn Gln Arg Ile Gly His Phe Phe Phe Trp His Leu Lys
660 665 670
Ser Glu Met His Asn Lys Thr Val Ser Gln Arg Phe Gly Leu Leu Leu
675 680 685

Glu Ser Tyr Cys Arg Ala Cys Gly Met Tyr Leu Lys His Leu Asn Arg
690 695 700
Gln Val Glu Ala Met Glu Lys Leu Ile Asn Leu Thr Asp Ile Leu Lys
705 710 715 720
Gln Glu Lys Lys Asp Glu Thr Gln Lys Val Gln Met Lys Phe Leu Val
725 730 735
Glu Gln Met Arg Arg Pro Asp Phe Met Asp Ala Leu Gln Gly Phe Leu
740 745 750
Ser Pro Leu Asn Pro Ala His Gln Leu Gly Asn Leu Arg Leu Glu Glu
755 760 765
Cys Arg Ile Met Ser Ser Ala Lys Arg Pro Leu Trp Leu Asn Trp Glu
770 775 780
Asn Pro Asp Ile Met Ser Glu Leu Leu Phe Gln Asn Asn Glu Ile Ile
785 790 795 800
Phe Lys Asn Gly Asp Asp Leu Arg Gln Asp Met Leu Thr Leu Gln Ile
805 810 815
Ile Arg Ile Met Glu Asn Ile Trp Gln Asn Gln Gly Leu Asp Leu Arg
820 825 830
Met Leu Pro Tyr Gly Cys Leu Ser Ile Gly Asp Cys Val Gly Leu Ile
835 840 845
Glu Val Val Arg Asn Ser His Thr Ile Met Gln Ile Gln Cys Lys Gly
850 855 860
Gly Leu Lys Gly Ala Leu Gln Phe Asn Ser His Thr Leu His Gln Trp
865 870 875 880
Leu Lys Asp Lys Asn Lys Gly Glu Ile Tyr Asp Ala Ala Ile Asp Leu
885 890 895
Phe Thr Arg Ser Cys Ala Gly Tyr Cys Val Ala Thr Phe Ile Leu Gly
900 905 910
Ile Gly Asp Arg His Asn Ser Asn Ile Met Val Lys Asp Asp Gly Gln
915 920 925
Leu Phe His Ile Asp Phe Gly His Phe Leu Asp His Lys Lys Lys Lys
930 935 940
Phe Gly Tyr Lys Arg Glu Arg Val Pro Phe Val Leu Thr Gln Asp Phe
945 950 955 960
Leu Ile Val Ile Ser Lys Gly Ala Gln Glu Cys Thr Lys Thr Arg Glu
965 970 975
Phe Glu Arg Phe Gln Glu Met Cys Tyr Lys Ala Tyr Leu Ala Ile Arg
980 985 990
Gln His Ala Asn Leu Phe Ile Asn Leu Phe Ser Met Met Leu Gly Ser

995 1000 1005

Gly Met Pro Glu Leu Gln Ser Phe Asp Asp Ile Ala Tyr Ile Arg Lys
1010 1015 1020

Thr Leu Ala Leu Asp Lys Thr Glu Gln Glu Ala Leu Glu Tyr Phe Met
1025 1030 1035 1040

Lys Gln Met Asn Asp Ala His His Gly Gly Trp Thr Thr Lys Met Asp
1045 1050 1055

Trp Ile Phe His Thr Ile Lys Gln His Ala Leu Asn
1060 1065

<210> 329

<211> 766

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 329

Met Ala Ala Leu Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ala Glu Pro Gly Gln
1 5 10 15

Ala Leu Phe Asn Gly Asp Met Glu Pro Glu Ala Gly Ala Gly Ala Gly
20 25 30

Ala Ala Ala Ser Ser Ala Ala Asp Pro Ala Ile Pro Glu Glu Val Trp
35 40 45

Asn Ile Lys Gln Met Ile Lys Leu Thr Gln Glu His Ile Glu Ala Leu
50 55 60

Leu Asp Lys Phe Gly Gly Glu His Asn Pro Pro Ser Ile Tyr Leu Glu
65 70 75 80

Ala Tyr Glu Glu Tyr Thr Ser Lys Leu Asp Ala Leu Gln Gln Arg Glu
85 90 95

Gln Gln Leu Leu Glu Ser Leu Gly Asn Gly Thr Asp Phe Ser Val Ser
100 105 110

Ser Ser Ala Ser Met Asp Thr Val Thr Ser Ser Ser Ser Ser Ser Leu
115 120 125

Ser Val Leu Pro Ser Ser Leu Ser Val Phe Gln Asn Pro Thr Asp Val
130 135 140

Ala Arg Ser Asn Pro Lys Ser Pro Gln Lys Pro Ile Val Arg Val Phe
145 150 155 160

Leu Pro Asn Lys Gln Arg Thr Val Val Pro Ala Arg Cys Gly Val Thr
165 170 175

Val Arg Asp Ser Leu Lys Lys Ala Leu Met Met Arg Gly Leu Ile Pro
180 185 190

Glu Cys Cys Ala Val Tyr Arg Ile Gln Asp Gly Glu Lys Lys Pro Ile

195 200 205

Gly Trp Asp Thr Asp Ile Ser Trp Leu Thr Gly Glu Glu Leu His Val

210 215 220

Glu Val Leu Glu Asn Val Pro Leu Thr Thr His Asn Phe Val Arg Lys

225 230 235 240

Thr Phe Phe Thr Leu Ala Phe Cys Asp Phe Cys Arg Lys Leu Leu Phe

245 250 255

Gln Gly Phe Arg Cys Gln Thr Cys Gly Tyr Lys Phe His Gln Arg Cys

260 265 270

Ser Thr Glu Val Pro Leu Met Cys Val Asn Tyr Asp Gln Leu Asp Leu

275 280 285

Leu Phe Val Ser Lys Phe Phe Glu His His Pro Ile Pro Gln Glu Glu

290 295 300

Ala Ser Leu Ala Glu Thr Ala Leu Thr Ser Gly Ser Ser Pro Ser Ala

305 310 315 320

Pro Ala Ser Asp Ser Ile Gly Pro Gln Ile Leu Thr Ser Pro Ser Pro

325 330 335

Ser Lys Ser Ile Pro Ile Pro Gln Pro Phe Arg Pro Ala Asp Glu Asp

340 345 350

His Arg Asn Gln Phe Gly Gln Arg Asp Arg Ser Ser Ser Ala Pro Asn

355 360 365

Val His Ile Asn Thr Ile Glu Pro Val Asn Ile Asp Asp Leu Ile Arg

370 375 380

Asp Gln Gly Phe Arg Gly Asp Gly Gly Ser Thr Thr Gly Leu Ser Ala

385 390 395 400

Thr Pro Pro Ala Ser Leu Pro Gly Ser Leu Thr Asn Val Lys Ala Leu

405 410 415

Gln Lys Ser Pro Gly Pro Gln Arg Glu Arg Lys Ser Ser Ser Ser Ser

420 425 430

Glu Asp Arg Asn Arg Met Lys Thr Leu Gly Arg Arg Asp Ser Ser Asp

435 440 445

Asp Trp Glu Ile Pro Asp Gly Gln Ile Thr Val Gly Gln Arg Ile Gly

450 455 460

Ser Gly Ser Phe Gly Thr Val Tyr Lys Gly Lys Trp His Gly Asp Val

465 470 475 480

Ala Val Lys Met Leu Asn Val Thr Ala Pro Thr Pro Gln Gln Leu Gln

485 490 495

Ala Phe Lys Asn Glu Val Gly Val Leu Arg Lys Thr Arg His Val Asn

500 505 510

Ile Leu Leu Phe Met Gly Tyr Ser Thr Lys Pro Gln Leu Ala Ile Val
515 520 525
Thr Gln Trp Cys Glu Gly Ser Ser Leu Tyr His His Leu His Ile Ile
530 535 540
Glu Thr Lys Phe Glu Met Ile Lys Leu Ile Asp Ile Ala Arg Gln Thr
545 550 555 560
Ala Gln Gly Met Asp Tyr Leu His Ala Lys Ser Ile Ile His Arg Asp
565 570 575
Leu Lys Ser Asn Asn Ile Phe Leu His Glu Asp Leu Thr Val Lys Ile
580 585 590
Gly Asp Phe Gly Leu Ala Thr Val Lys Ser Arg Trp Ser Gly Ser His
595 600 605
Gln Phe Glu Gln Leu Ser Gly Ser Ile Leu Trp Met Ala Pro Glu Val
610 615 620
Ile Arg Met Gln Asp Lys Asn Pro Tyr Ser Phe Gln Ser Asp Val Tyr
625 630 635 640
Ala Phe Gly Ile Val Leu Tyr Glu Leu Met Thr Gly Gln Leu Pro Tyr
645 650 655
Ser Asn Ile Asn Asn Arg Asp Gln Ile Ile Phe Met Val Gly Arg Gly
660 665 670
Tyr Leu Ser Pro Asp Leu Ser Lys Val Arg Ser Asn Cys Pro Lys Ala
675 680 685
Met Lys Arg Leu Met Ala Glu Cys Leu Lys Lys Lys Arg Asp Glu Arg
690 695 700
Pro Leu Phe Pro Gln Ile Leu Ala Ser Ile Glu Leu Leu Ala Arg Ser
705 710 715 720
Leu Pro Lys Ile His Arg Ser Ala Ser Glu Pro Ser Leu Asn Arg Ala
725 730 735
Gly Phe Gln Thr Glu Asp Phe Ser Leu Tyr Ala Cys Ala Ser Pro Lys
740 745 750
Thr Pro Ile Gln Ala Gly Gly Tyr Gly Ala Phe Pro Val His
755 760 765

<210> 330
<211> 1210
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)
<400> 330

Met Arg Pro Ser Gly Thr Ala Gly Ala Ala Leu Leu Ala Leu Leu Ala
1 5 10 15

Ala Leu Cys Pro Ala Ser Arg Ala Leu Glu Glu Lys Lys Val Cys Gln
20 25 30
Gly Thr Ser Asn Lys Leu Thr Gln Leu Gly Thr Phe Glu Asp His Phe
35 40 45
Leu Ser Leu Gln Arg Met Phe Asn Asn Cys Glu Val Val Leu Gly Asn
50 55 60
Leu Glu Ile Thr Tyr Val Gln Arg Asn Tyr Asp Leu Ser Phe Leu Lys
65 70 75 80
Thr Ile Gln Glu Val Ala Gly Tyr Val Leu Ile Ala Leu Asn Thr Val
85 90 95
Glu Arg Ile Pro Leu Glu Asn Leu Gln Ile Ile Arg Gly Asn Met Tyr
100 105 110
Tyr Glu Asn Ser Tyr Ala Leu Ala Val Leu Ser Asn Tyr Asp Ala Asn
115 120 125
Lys Thr Gly Leu Lys Glu Leu Pro Met Arg Asn Leu Gln Glu Ile Leu
130 135 140
His Gly Ala Val Arg Phe Ser Asn Asn Pro Ala Leu Cys Asn Val Glu
145 150 155 160
Ser Ile Gln Trp Arg Asp Ile Val Ser Ser Asp Phe Leu Ser Asn Met
165 170 175
Ser Met Asp Phe Gln Asn His Leu Gly Ser Cys Gln Lys Cys Asp Pro
180 185 190
Ser Cys Pro Asn Gly Ser Cys Trp Gly Ala Gly Glu Glu Asn Cys Gln
195 200 205
Lys Leu Thr Lys Ile Ile Cys Ala Gln Gln Cys Ser Gly Arg Cys Arg
210 215 220
Gly Lys Ser Pro Ser Asp Cys Cys His Asn Gln Cys Ala Ala Gly Cys
225 230 235 240
Thr Gly Pro Arg Glu Ser Asp Cys Leu Val Cys Arg Lys Phe Arg Asp
245 250 255
Glu Ala Thr Cys Lys Asp Thr Cys Pro Pro Leu Met Leu Tyr Asn Pro
260 265 270
Thr Thr Tyr Gln Met Asp Val Asn Pro Glu Gly Lys Tyr Ser Phe Gly
275 280 285
Ala Thr Cys Val Lys Lys Cys Pro Arg Asn Tyr Val Val Thr Asp His
290 295 300
Gly Ser Cys Val Arg Ala Cys Gly Ala Asp Ser Tyr Glu Met Glu Glu
305 310 315 320
Asp Gly Val Arg Lys Cys Lys Lys Cys Glu Gly Pro Cys Arg Lys Val

325 330 335
Cys Asn Gly Ile Gly Ile Gly Glu Phe Lys Asp Ser Leu Ser Ile Asn
340 345 350
Ala Thr Asn Ile Lys His Phe Lys Asn Cys Thr Ser Ile Ser Gly Asp
355 360 365
Leu His Ile Leu Pro Val Ala Phe Arg Gly Asp Ser Phe Thr His Thr
370 375 380
Pro Pro Leu Asp Pro Gln Glu Leu Asp Ile Leu Lys Thr Val Lys Glu
385 390 395 400
Ile Thr Gly Phe Leu Leu Ile Gln Ala Trp Pro Glu Asn Arg Thr Asp
405 410 415
Leu His Ala Phe Glu Asn Leu Glu Ile Ile Arg Gly Arg Thr Lys Gln
420 425 430
His Gly Gln Phe Ser Leu Ala Val Val Ser Leu Asn Ile Thr Ser Leu
435 440 445
Gly Leu Arg Ser Leu Lys Glu Ile Ser Asp Gly Asp Val Ile Ile Ser
450 455 460
Gly Asn Lys Asn Leu Cys Tyr Ala Asn Thr Ile Asn Trp Lys Lys Leu
465 470 475 480
Phe Gly Thr Ser Gly Gln Lys Thr Lys Ile Ile Ser Asn Arg Gly Glu
485 490 495
Asn Ser Cys Lys Ala Thr Gly Gln Val Cys His Ala Leu Cys Ser Pro
500 505 510
Glu Gly Cys Trp Gly Pro Glu Pro Arg Asp Cys Val Ser Cys Arg Asn
515 520 525
Val Ser Arg Gly Arg Glu Cys Val Asp Lys Cys Asn Leu Leu Glu Gly
530 535 540
Glu Pro Arg Glu Phe Val Glu Asn Ser Glu Cys Ile Gln Cys His Pro
545 550 555 560
Glu Cys Leu Pro Gln Ala Met Asn Ile Thr Cys Thr Gly Arg Gly Pro
565 570 575
Asp Asn Cys Ile Gln Cys Ala His Tyr Ile Asp Gly Pro His Cys Val
580 585 590
Lys Thr Cys Pro Ala Gly Val Met Gly Glu Asn Asn Thr Leu Val Trp
595 600 605
Lys Tyr Ala Asp Ala Gly His Val Cys His Leu Cys His Pro Asn Cys
610 615 620
Thr Tyr Gly Cys Thr Gly Pro Gly Leu Glu Gly Cys Pro Thr Asn Gly
625 630 635 640

Pro Lys Ile Pro Ser Ile Ala Thr Gly Met Val Gly Ala Leu Leu Leu
645 650 655
Leu Leu Val Val Ala Leu Gly Ile Gly Leu Phe Met Arg Arg Arg His
660 665 670
Ile Val Arg Lys Arg Thr Leu Arg Arg Leu Leu Gln Glu Arg Glu Leu
675 680 685
Val Glu Pro Leu Thr Pro Ser Gly Glu Ala Pro Asn Gln Ala Leu Leu
690 695 700
Arg Ile Leu Lys Glu Thr Glu Phe Lys Lys Ile Lys Val Leu Gly Ser
705 710 715 720
Gly Ala Phe Gly Thr Val Tyr Lys Gly Leu Trp Ile Pro Glu Gly Glu
725 730 735
Lys Val Lys Ile Pro Val Ala Ile Lys Glu Leu Arg Glu Ala Thr Ser
740 745 750
Pro Lys Ala Asn Lys Glu Ile Leu Asp Glu Ala Tyr Val Met Ala Ser
755 760 765
Val Asp Asn Pro His Val Cys Arg Leu Leu Gly Ile Cys Leu Thr Ser
770 775 780
Thr Val Gln Leu Ile Thr Gln Leu Met Pro Phe Gly Cys Leu Leu Asp
785 790 795 800
Tyr Val Arg Glu His Lys Asp Asn Ile Gly Ser Gln Tyr Leu Leu Asn
805 810 815
Trp Cys Val Gln Ile Ala Lys Gly Met Asn Tyr Leu Glu Asp Arg Arg
820 825 830
Leu Val His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Val Leu Val Lys Thr Pro
835 840 845
Gln His Val Lys Ile Thr Asp Phe Gly Leu Ala Lys Leu Leu Gly Ala
850 855 860
Glu Glu Lys Glu Tyr His Ala Glu Gly Gly Lys Val Pro Ile Lys Trp
865 870 875 880
Met Ala Leu Glu Ser Ile Leu His Arg Ile Tyr Thr His Gln Ser Asp
885 890 895
Val Trp Ser Tyr Gly Val Thr Val Trp Glu Leu Met Thr Phe Gly Ser
900 905 910
Lys Pro Tyr Asp Gly Ile Pro Ala Ser Glu Ile Ser Ser Ile Leu Glu
915 920 925
Lys Gly Glu Arg Leu Pro Gln Pro Pro Ile Cys Thr Ile Asp Val Tyr
930 935 940
Met Ile Met Val Lys Cys Trp Met Ile Asp Ala Asp Ser Arg Pro Lys

945 950 955 960
Phe Arg Glu Leu Ile Ile Glu Phe Ser Lys Met Ala Arg Asp Pro Gln
965 970 975
Arg Tyr Leu Val Ile Gln Gly Asp Glu Arg Met His Leu Pro Ser Pro
980 985 990
Thr Asp Ser Asn Phe Tyr Arg Ala Leu Met Asp Glu Glu Asp Met Asp
995 1000 1005
Asp Val Val Asp Ala Asp Glu Tyr Leu Ile Pro Gln Gln Gly Phe Phe
1010 1015 1020
Ser Ser Pro Ser Thr Ser Arg Thr Pro Leu Leu Ser Ser Leu Ser Ala
1025 1030 1035 1040
Thr Ser Asn Asn Ser Thr Val Ala Cys Ile Asp Arg Asn Gly Leu Gln
1045 1050 1055
Ser Cys Pro Ile Lys Glu Asp Ser Phe Leu Gln Arg Tyr Ser Ser Asp
1060 1065 1070
Pro Thr Gly Ala Leu Thr Glu Asp Ser Ile Asp Asp Thr Phe Leu Pro
1075 1080 1085
Val Pro Glu Tyr Ile Asn Gln Ser Val Pro Lys Arg Pro Ala Gly Ser
1090 1095 1100
Val Gln Asn Pro Val Tyr His Asn Gln Pro Leu Asn Pro Ala Pro Ser
1105 1110 1115 1120
Arg Asp Pro His Tyr Gln Asp Pro His Ser Thr Ala Val Gly Asn Pro
1125 1130 1135
Glu Tyr Leu Asn Thr Val Gln Pro Thr Cys Val Asn Ser Thr Phe Asp
1140 1145 1150
Ser Pro Ala His Trp Ala Gln Lys Gly Ser His Gln Ile Ser Leu Asp
1155 1160 1165
Asn Pro Asp Tyr Gln Gln Asp Phe Phe Pro Lys Glu Ala Lys Pro Asn
1170 1175 1180
Gly Ile Phe Lys Gly Ser Thr Ala Glu Asn Ala Glu Tyr Leu Arg Val
1185 1190 1195 1200
Ala Pro Gln Ser Ser Glu Phe Ile Gly Ala
1205 1210

<210> 331
<211> 480
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)
<400> 331
Met Ser Asp Val Ala Ile Val Lys Glu Gly Trp Leu His Lys Arg Gly

1 5 10 15
Glu Tyr Ile Lys Thr Trp Arg Pro Arg Tyr Phe Leu Leu Lys Asn Asp
20 25 30
Gly Thr Phe Ile Gly Tyr Lys Glu Arg Pro Gln Asp Val Asp Gln Arg
35 40 45
Glu Ala Pro Leu Asn Asn Phe Ser Val Ala Gln Cys Gln Leu Met Lys
50 55 60
Thr Glu Arg Pro Arg Pro Asn Thr Phe Ile Ile Arg Cys Leu Gln Trp
65 70 75 80
Thr Thr Val Ile Glu Arg Thr Phe His Val Glu Thr Pro Glu Glu Arg
85 90 95
Glu Glu Trp Thr Thr Ala Ile Gln Thr Val Ala Asp Gly Leu Lys Lys
100 105 110
Gln Glu Glu Glu Glu Met Asp Phe Arg Ser Gly Ser Pro Ser Asp Asn
115 120 125
Ser Gly Ala Glu Glu Met Glu Val Ser Leu Ala Lys Pro Lys His Arg
130 135 140
Val Thr Met Asn Glu Phe Glu Tyr Leu Lys Leu Leu Gly Lys Gly Thr
145 150 155 160
Phe Gly Lys Val Ile Leu Val Lys Glu Lys Ala Thr Gly Arg Tyr Tyr
165 170 175
Ala Met Lys Ile Leu Lys Lys Glu Val Ile Val Ala Lys Asp Glu Val
180 185 190
Ala His Thr Leu Thr Glu Asn Arg Val Leu Gln Asn Ser Arg His Pro
195 200 205
Phe Leu Thr Ala Leu Lys Tyr Ser Phe Gln Thr His Asp Arg Leu Cys
210 215 220
Phe Val Met Glu Tyr Ala Asn Gly Gly Glu Leu Phe Phe His Leu Ser
225 230 235 240
Arg Glu Arg Val Phe Ser Glu Asp Arg Ala Arg Phe Tyr Gly Ala Glu
245 250 255
Ile Val Ser Ala Leu Asp Tyr Leu His Ser Glu Lys Asn Val Val Tyr
260 265 270
Arg Asp Leu Lys Leu Glu Asn Leu Met Leu Asp Lys Asp Gly His Ile
275 280 285
Lys Ile Thr Asp Phe Gly Leu Cys Lys Glu Gly Ile Lys Asp Gly Ala
290 295 300
Thr Met Lys Thr Phe Cys Gly Thr Pro Glu Tyr Leu Ala Pro Glu Val
305 310 315 320

Leu Glu Asp Asn Asp Tyr Gly Arg Ala Val Asp Trp Trp Gly Leu Gly
325 330 335
Val Val Met Tyr Glu Met Met Cys Gly Arg Leu Pro Phe Tyr Asn Gln
340 345 350
Asp His Glu Lys Leu Phe Glu Leu Ile Leu Met Glu Glu Ile Arg Phe
355 360 365
Pro Arg Thr Leu Gly Pro Glu Ala Lys Ser Leu Leu Ser Gly Leu Leu
370 375 380
Lys Lys Asp Pro Lys Gln Arg Leu Gly Gly Gly Ser Glu Asp Ala Lys
385 390 395 400
Glu Ile Met Gln His Arg Phe Phe Ala Gly Ile Val Trp Gln His Val
405 410 415
Tyr Glu Lys Lys Leu Ser Pro Pro Phe Lys Pro Gln Val Thr Ser Glu
420 425 430
Thr Asp Thr Arg Tyr Phe Asp Glu Glu Phe Thr Ala Gln Met Ile Thr
435 440 445
Ile Thr Pro Pro Asp Gln Asp Asp Ser Met Glu Cys Val Asp Ser Glu
450 455 460
Arg Arg Pro His Phe Pro Gln Phe Ser Tyr Ser Ala Ser Gly Thr Ala
465 470 475 480

<210> 332
<211> 393
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)
<400> 332

Met Pro Lys Lys Lys Pro Thr Pro Ile Gln Leu Asn Pro Ala Pro Asp
1 5 10 15
Gly Ser Ala Val Asn Gly Thr Ser Ser Ala Glu Thr Asn Leu Glu Ala
20 25 30
Leu Gln Lys Lys Leu Glu Glu Leu Glu Leu Asp Glu Gln Gln Arg Lys
35 40 45
Arg Leu Glu Ala Phe Leu Thr Gln Lys Gln Lys Val Gly Glu Leu Lys
50 55 60
Asp Asp Asp Phe Glu Lys Ile Ser Glu Leu Gly Ala Gly Asn Gly Gly
65 70 75 80
Val Val Phe Lys Val Ser His Lys Pro Ser Gly Leu Val Met Ala Arg
85 90 95
Lys Leu Ile His Leu Glu Ile Lys Pro Ala Ile Arg Asn Gln Ile Ile
100 105 110

Arg Glu Leu Gln Val Leu His Glu Cys Asn Ser Pro Tyr Ile Val Gly
115 120 125
Phe Tyr Gly Ala Phe Tyr Ser Asp Gly Glu Ile Ser Ile Cys Met Glu
130 135 140
His Met Asp Gly Gly Ser Leu Asp Gln Val Leu Lys Lys Ala Gly Arg
145 150 155 160
Ile Pro Glu Gln Ile Leu Gly Lys Val Ser Ile Ala Val Ile Lys Gly
165 170 175
Leu Thr Tyr Leu Arg Glu Lys His Lys Ile Met His Arg Asp Val Lys
180 185 190
Pro Ser Asn Ile Leu Val Asn Ser Arg Gly Glu Ile Lys Leu Cys Asp
195 200 205
Phe Gly Val Ser Gly Gln Leu Ile Asp Ser Met Ala Asn Ser Phe Val
210 215 220
Gly Thr Arg Ser Tyr Met Ser Pro Glu Arg Leu Gln Gly Thr His Tyr
225 230 235 240
Ser Val Gln Ser Asp Ile Trp Ser Met Gly Leu Ser Leu Val Glu Met
245 250 255
Ala Val Gly Arg Tyr Pro Ile Pro Pro Pro Asp Ala Lys Glu Leu Glu
260 265 270
Leu Met Phe Gly Cys Gln Val Glu Gly Asp Ala Ala Glu Thr Pro Pro
275 280 285
Arg Pro Arg Thr Pro Gly Arg Pro Leu Ser Ser Tyr Gly Met Asp Ser
290 295 300
Arg Pro Pro Met Ala Ile Phe Glu Leu Leu Asp Tyr Ile Val Asn Glu
305 310 315 320
Pro Pro Pro Lys Leu Pro Ser Gly Val Phe Ser Leu Glu Phe Gln Asp
325 330 335
Phe Val Asn Lys Cys Leu Ile Lys Asn Pro Ala Glu Arg Ala Asp Leu
340 345 350
Lys Gln Leu Met Val His Ala Phe Ile Lys Arg Ser Asp Ala Glu Glu
355 360 365
Val Asp Phe Ala Gly Trp Leu Cys Ser Thr Ile Gly Leu Asn Gln Pro
370 375 380
Ser Thr Pro Thr His Ala Ala Gly Val
385 390

<210> 333
<211> 1055
<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 333

Met Glu Leu Ala Ala Leu Cys Arg Trp Gly Leu Leu Leu Ala Leu Leu
1 5 10 15
Pro Pro Gly Ala Ala Ser Thr Gln Val Cys Thr Gly Thr Asp Met Lys
20 25 30
Leu Arg Leu Pro Ala Ser Pro Glu Thr His Leu Asp Met Leu Arg His
35 40 45
Leu Tyr Gln Gly Cys Gln Val Val Gln Gly Asn Leu Glu Leu Thr Tyr
50 55 60
Leu Pro Thr Asn Ala Ser Leu Ser Phe Leu Gln Asp Ile Gln Glu Val
65 70 75 80
Gln Gly Tyr Val Leu Ile Ala His Asn Gln Val Arg Gln Val Pro Leu
85 90 95
Gln Arg Leu Arg Ile Val Arg Gly Thr Gln Leu Phe Glu Asp Asn Tyr
100 105 110
Ala Leu Ala Val Leu Asp Asn Gly Asp Pro Leu Asn Asn Thr Thr Pro
115 120 125
Val Thr Gly Ala Ser Pro Gly Gly Leu Arg Glu Leu Gln Leu Arg Ser
130 135 140
Leu Thr Glu Ile Leu Lys Gly Gly Val Leu Ile Gln Arg Asn Pro Gln
145 150 155 160
Leu Cys Tyr Gln Asp Thr Ile Leu Trp Lys Asp Ile Phe His Lys Asn
165 170 175
Asn Gln Leu Ala Leu Thr Leu Ile Asp Thr Asn Arg Ser Arg Ala Cys
180 185 190
His Pro Cys Ser Pro Met Cys Lys Gly Ser Arg Cys Trp Gly Glu Ser
195 200 205
Ser Glu Asp Cys Gln Ser Leu Thr Arg Thr Val Cys Ala Gly Gly Cys
210 215 220
Ala Arg Cys Lys Gly Pro Leu Pro Thr Asp Cys Cys His Glu Gln Cys
225 230 235 240
Ala Ala Gly Cys Thr Gly Pro Lys His Ser Asp Cys Leu Ala Cys Leu
245 250 255
His Phe Asn His Ser Gly Ile Cys Glu Leu His Cys Pro Ala Leu Val
260 265 270
Thr Tyr Asn Thr Asp Thr Phe Glu Ser Met Pro Asn Pro Glu Gly Arg
275 280 285
Tyr Thr Phe Gly Ala Ser Cys Val Thr Ala Cys Pro Tyr Asn Tyr Leu

290 295 300
Ser Thr Asp Val Gly Ser Cys Thr Leu Val Cys Pro Leu His Asn Gln
305 310 315 320
Glu Val Thr Ala Glu Asp Gly Thr Gln Arg Cys Glu Lys Cys Ser Lys
325 330 335
Pro Cys Ala Arg Val Cys Tyr Gly Leu Gly Met Glu His Leu Arg Glu
340 345 350
Val Arg Ala Val Thr Ser Ala Asn Ile Gln Glu Phe Ala Gly Cys Lys
355 360 365
Lys Ile Phe Gly Ser Leu Ala Phe Leu Pro Glu Ser Phe Asp Gly Asp
370 375 380
Pro Ala Ser Asn Thr Ala Pro Leu Gln Pro Glu Gln Leu Gln Val Phe
385 390 395 400
Glu Thr Leu Glu Glu Ile Thr Gly Tyr Leu Tyr Ile Ser Ala Trp Pro
405 410 415
Asp Ser Leu Pro Asp Leu Ser Val Phe Gln Asn Leu Gln Val Ile Arg
420 425 430
Gly Arg Ile Leu His Asn Gly Ala Tyr Ser Leu Thr Leu Gln Gly Leu
435 440 445
Gly Ile Ser Trp Leu Gly Leu Arg Ser Leu Arg Glu Leu Gly Ser Gly
450 455 460
Leu Ala Leu Ile His His Asn Thr His Leu Cys Phe Val His Thr Val
465 470 475 480
Pro Trp Asp Gln Leu Phe Arg Asn Pro His Gln Ala Leu Leu His Thr
485 490 495
Ala Asn Arg Pro Glu Asp Glu Cys Val Gly Glu Gly Leu Ala Cys His
500 505 510
Gln Leu Cys Ala Arg Gly His Cys Trp Gly Pro Gly Pro Thr Gln Cys
515 520 525
Val Asn Cys Ser Gln Phe Leu Arg Gly Gln Glu Cys Val Glu Glu Cys
530 535 540
Arg Val Leu Gln Gly Leu Pro Arg Glu Tyr Val Asn Ala Arg His Cys
545 550 555 560
Leu Pro Cys His Pro Glu Cys Gln Pro Gln Asn Gly Ser Val Thr Cys
565 570 575
Phe Gly Pro Glu Ala Asp Gln Cys Val Ala Cys Ala His Tyr Lys Asp
580 585 590
Pro Pro Phe Cys Val Ala Arg Cys Pro Ser Gly Val Lys Pro Asp Leu
595 600 605

Ser Tyr Met Pro Ile Trp Lys Phe Pro Asp Glu Glu Gly Ala Cys Gln
610 615 620
Pro Cys Pro Ile Asn Cys Thr His Ser Cys Val Asp Leu Asp Asp Lys
625 630 635 640
Gly Cys Pro Ala Glu Gln Arg Ala Ser Pro Leu Thr Ser Ile Ile Ser
645 650 655
Ala Val Val Gly Ile Leu Leu Val Val Val Leu Gly Val Val Phe Gly
660 665 670
Ile Leu Ile Lys Arg Arg Gln Gln Lys Ile Arg Lys Tyr Thr Met Arg
675 680 685
Arg Leu Leu Gln Glu Thr Glu Leu Val Glu Pro Leu Thr Pro Ser Gly
690 695 700
Ala Met Pro Asn Gln Ala Gln Met Arg Ile Leu Lys Glu Thr Glu Leu
705 710 715 720
Arg Lys Val Lys Val Leu Gly Ser Gly Ala Phe Gly Thr Val Tyr Lys
725 730 735
Gly Ile Trp Ile Pro Asp Gly Glu Asn Val Lys Ile Pro Val Ala Ile
740 745 750
Lys Val Leu Arg Glu Asn Thr Ser Pro Lys Ala Asn Lys Glu Ile Leu
755 760 765
Asp Glu Ala Tyr Val Met Ala Gly Val Gly Ser Pro Tyr Val Ser Arg
770 775 780
Leu Leu Gly Ile Cys Leu Thr Ser Thr Val Gln Leu Val Thr Gln Leu
785 790 795 800
Met Pro Tyr Gly Cys Leu Leu Asp His Val Arg Glu Asn Arg Gly Arg
805 810 815
Leu Gly Ser Gln Asp Leu Leu Asn Trp Cys Met Gln Ile Ala Lys Gly
820 825 830
Met Ser Tyr Leu Glu Asp Val Arg Leu Val His Arg Asp Leu Ala Ala
835 840 845
Arg Asn Val Leu Val Lys Ser Pro Asn His Val Lys Ile Thr Asp Phe
850 855 860
Gly Leu Ala Arg Leu Leu Asp Ile Asp Glu Thr Glu Tyr His Ala Asp
865 870 875 880
Gly Gly Lys Val Pro Ile Lys Trp Met Ala Leu Glu Ser Ile Leu Arg
885 890 895
Arg Arg Phe Thr His Gln Ser Asp Val Trp Ser Tyr Gly Val Thr Val
900 905 910
Trp Glu Leu Met Thr Phe Gly Ala Lys Pro Tyr Asp Gly Ile Pro Ala

915 920 925
Arg Glu Ile Pro Asp Leu Leu Glu Lys Gly Glu Arg Leu Pro Gln Pro
930 935 940
Pro Ile Cys Thr Ile Asp Val Tyr Met Ile Met Val Lys Cys Trp Met
945 950 955 960
Ile Asp Ser Glu Cys Arg Pro Arg Phe Arg Glu Leu Val Ser Glu Phe
965 970 975
Ser Arg Met Ala Arg Asp Pro Gln Arg Phe Val Val Ile Gln Asn Glu
980 985 990
Asp Leu Gly Pro Ala Ser Pro Leu Asp Ser Thr Phe Tyr Arg Ser Leu
995 1000 1005
Leu Glu Asp Asp Asp Met Gly Asp Leu Val Asp Ala Glu Glu Tyr Leu
1010 1015 1020
Val Pro Gln Gln Gly Phe Phe Cys Pro Asp Pro Ala Pro Gly Ala Gly
1025 1030 1035 1040
Gly Met Val His His Arg His Arg Ser Ser Ser Thr Arg Asn Met
1045 1050 1055

<210> 334
<211> 1620
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)
<400> 334
Met Gly Ala Ile Gly Leu Leu Trp Leu Leu Pro Leu Leu Leu Ser Thr
1 5 10 15
Ala Ala Val Gly Ser Gly Met Gly Thr Gly Gln Arg Ala Gly Ser Pro
20 25 30
Ala Ala Gly Pro Pro Leu Gln Pro Arg Glu Pro Leu Ser Tyr Ser Arg
35 40 45
Leu Gln Arg Lys Ser Leu Ala Val Asp Phe Val Val Pro Ser Leu Phe
50 55 60
Arg Val Tyr Ala Arg Asp Leu Leu Leu Pro Pro Ser Ser Ser Glu Leu
65 70 75 80
Lys Ala Gly Arg Pro Glu Ala Arg Gly Ser Leu Ala Leu Asp Cys Ala
85 90 95
Pro Leu Leu Arg Leu Leu Gly Pro Ala Pro Gly Val Ser Trp Thr Ala
100 105 110
Gly Ser Pro Ala Pro Ala Glu Ala Arg Thr Leu Ser Arg Val Leu Lys
115 120 125
Gly Gly Ser Val Arg Lys Leu Arg Arg Ala Lys Gln Leu Val Leu Glu

130 135 140

Leu Gly Glu Glu Ala Ile Leu Glu Gly Cys Val Gly Pro Pro Gly Glu
145 150 155 160

Ala Ala Val Gly Leu Leu Gln Phe Asn Leu Ser Glu Leu Phe Ser Trp
165 170 175

Trp Ile Arg Gln Gly Glu Gly Arg Leu Arg Ile Arg Leu Met Pro Glu
180 185 190

Lys Lys Ala Ser Glu Val Gly Arg Glu Gly Arg Leu Ser Ala Ala Ile
195 200 205

Arg Ala Ser Gln Pro Arg Leu Leu Phe Gln Ile Phe Gly Thr Gly His
210 215 220

Ser Ser Leu Glu Ser Pro Thr Asn Met Pro Ser Pro Ser Pro Asp Tyr
225 230 235 240

Phe Thr Trp Asn Leu Thr Trp Ile Met Lys Asp Ser Phe Pro Phe Leu
245 250 255

Ser His Arg Ser Arg Tyr Gly Leu Glu Cys Ser Phe Asp Phe Pro Cys
260 265 270

Glu Leu Glu Tyr Ser Pro Pro Leu His Asp Leu Arg Asn Gln Ser Trp
275 280 285

Ser Trp Arg Arg Ile Pro Ser Glu Glu Ala Ser Gln Met Asp Leu Leu
290 295 300

Asp Gly Pro Gly Ala Glu Arg Ser Lys Glu Met Pro Arg Gly Ser Phe
305 310 315 320

Leu Leu Leu Asn Thr Ser Ala Asp Ser Lys His Thr Ile Leu Ser Pro
325 330 335

Trp Met Arg Ser Ser Ser Glu His Cys Thr Leu Ala Val Ser Val His
340 345 350

Arg His Leu Gln Pro Ser Gly Arg Tyr Ile Ala Gln Leu Leu Pro His
355 360 365

Asn Glu Ala Ala Arg Glu Ile Leu Leu Met Pro Thr Pro Gly Lys His
370 375 380

Gly Trp Thr Val Leu Gln Gly Arg Ile Gly Arg Pro Asp Asn Pro Phe
385 390 395 400

Arg Val Ala Leu Glu Tyr Ile Ser Ser Gly Asn Arg Ser Leu Ser Ala
405 410 415

Val Asp Phe Phe Ala Leu Lys Asn Cys Ser Glu Gly Thr Ser Pro Gly
420 425 430

Ser Lys Met Ala Leu Gln Ser Ser Phe Thr Cys Trp Asn Gly Thr Val
435 440 445

Leu Gln Leu Gly Gln Ala Cys Asp Phe His Gln Asp Cys Ala Gln Gly
450 455 460
Glu Asp Glu Ser Gln Met Cys Arg Lys Leu Pro Val Gly Phe Tyr Cys
465 470 475 480
Asn Phe Glu Asp Gly Phe Cys Gly Trp Thr Gln Gly Thr Leu Ser Pro
485 490 495
His Thr Pro Gln Trp Gln Val Arg Thr Leu Lys Asp Ala Arg Phe Gln
500 505 510
Asp His Gln Asp His Ala Leu Leu Leu Ser Thr Thr Asp Val Pro Ala
515 520 525
Ser Glu Ser Ala Thr Val Thr Ser Ala Thr Phe Pro Ala Pro Ile Lys
530 535 540
Ser Ser Pro Cys Glu Leu Arg Met Ser Trp Leu Ile Arg Gly Val Leu
545 550 555 560
Arg Gly Asn Val Ser Leu Val Leu Val Glu Asn Lys Thr Gly Lys Glu
565 570 575
Gln Gly Arg Met Val Trp His Val Ala Ala Tyr Glu Gly Leu Ser Leu
580 585 590
Trp Gln Trp Met Val Leu Pro Leu Leu Asp Val Ser Asp Arg Phe Trp
595 600 605
Leu Gln Met Val Ala Trp Trp Gly Gln Gly Ser Arg Ala Ile Val Ala
610 615 620
Phe Asp Asn Ile Ser Ile Ser Leu Asp Cys Tyr Leu Thr Ile Ser Gly
625 630 635 640
Glu Asp Lys Ile Leu Gln Asn Thr Ala Pro Lys Ser Arg Asn Leu Phe
645 650 655
Glu Arg Asn Pro Asn Lys Glu Leu Lys Pro Gly Glu Asn Ser Pro Arg
660 665 670
Gln Thr Pro Ile Phe Asp Pro Thr Val His Trp Leu Phe Thr Thr Cys
675 680 685
Gly Ala Ser Gly Pro His Gly Pro Thr Gln Ala Gln Cys Asn Asn Ala
690 695 700
Tyr Gln Asn Ser Asn Leu Ser Val Glu Val Gly Ser Glu Gly Pro Leu
705 710 715 720
Lys Gly Ile Gln Ile Trp Lys Val Pro Ala Thr Asp Thr Tyr Ser Ile
725 730 735
Ser Gly Tyr Gly Ala Ala Gly Gly Lys Gly Gly Lys Asn Thr Met Met
740 745 750
Arg Ser His Gly Val Ser Val Leu Gly Ile Phe Asn Leu Glu Lys Asp

755 760 765

Asp Met Leu Tyr Ile Leu Val Gly Gln Gln Gly Glu Asp Ala Cys Pro
770 775 780

Ser Thr Asn Gln Leu Ile Gln Lys Val Cys Ile Gly Glu Asn Asn Val
785 790 795 800

Ile Glu Glu Glu Ile Arg Val Asn Arg Ser Val His Glu Trp Ala Gly
805 810 815

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ala Thr Tyr Val Phe Lys Met Lys Asp
820 825 830

Gly Val Pro Val Pro Leu Ile Ile Ala Ala Gly Gly Gly Gly Arg Ala
835 840 845

Tyr Gly Ala Lys Thr Asp Thr Phe His Pro Glu Arg Leu Glu Asn Asn
850 855 860

Ser Ser Val Leu Gly Leu Asn Gly Asn Ser Gly Ala Ala Gly Gly Gly
865 870 875 880

Gly Gly Trp Asn Asp Asn Thr Ser Leu Leu Trp Ala Gly Lys Ser Leu
885 890 895

Gln Glu Gly Ala Thr Gly Gly His Ser Cys Pro Gln Ala Met Lys Lys
900 905 910

Trp Gly Trp Glu Thr Arg Gly Gly Phe Gly Gly Gly Gly Gly Gly Cys
915 920 925

Ser Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly Tyr Ile Gly Gly Asn Ala Ala Ser
930 935 940

Asn Asn Asp Pro Glu Met Asp Gly Glu Asp Gly Val Ser Phe Ile Ser
945 950 955 960

Pro Leu Gly Ile Leu Tyr Thr Pro Ala Leu Lys Val Met Glu Gly His
965 970 975

Gly Glu Val Asn Ile Lys His Tyr Leu Asn Cys Ser His Cys Glu Val
980 985 990

Asp Glu Cys His Met Asp Pro Glu Ser His Lys Val Ile Cys Phe Cys
995 1000 1005

Asp His Gly Thr Val Leu Ala Glu Asp Gly Val Ser Cys Ile Val Ser
1010 1015 1020

Pro Thr Pro Glu Pro His Leu Pro Leu Ser Leu Ile Leu Ser Val Val
1025 1030 1035 1040

Thr Ser Ala Leu Val Ala Ala Leu Val Leu Ala Phe Ser Gly Ile Met
1045 1050 1055

Ile Val Tyr Arg Arg Lys His Gln Glu Leu Gln Ala Met Gln Met Glu
1060 1065 1070

Leu Gln Ser Pro Glu Tyr Lys Leu Ser Lys Leu Arg Thr Ser Thr Ile
1075 1080 1085
Met Thr Asp Tyr Asn Pro Asn Tyr Cys Phe Ala Gly Lys Thr Ser Ser
1090 1095 1100
Ile Ser Asp Leu Lys Glu Val Pro Arg Lys Asn Ile Thr Leu Ile Arg
1105 1110 1115 1120
Gly Leu Gly His Gly Ala Phe Gly Glu Val Tyr Glu Gly Gln Val Ser
1125 1130 1135
Gly Met Pro Asn Asp Pro Ser Pro Leu Gln Val Ala Val Lys Thr Leu
1140 1145 1150
Pro Glu Val Cys Ser Glu Gln Asp Glu Leu Asp Phe Leu Met Glu Ala
1155 1160 1165
Leu Ile Ile Ser Lys Phe Asn His Gln Asn Ile Val Arg Cys Ile Gly
1170 1175 1180
Val Ser Leu Gln Ser Leu Pro Arg Phe Ile Leu Leu Glu Leu Met Ala
1185 1190 1195 1200
Gly Gly Asp Leu Lys Ser Phe Leu Arg Glu Thr Arg Pro Arg Pro Ser
1205 1210 1215
Gln Pro Ser Ser Leu Ala Met Leu Asp Leu Leu His Val Ala Arg Asp
1220 1225 1230
Ile Ala Cys Gly Cys Gln Tyr Leu Glu Glu Asn His Phe Ile His Arg
1235 1240 1245
Asp Ile Ala Ala Arg Asn Cys Leu Leu Thr Cys Pro Gly Pro Gly Arg
1250 1255 1260
Val Ala Lys Ile Gly Asp Phe Gly Met Ala Arg Asp Ile Tyr Arg Ala
1265 1270 1275 1280
Ser Tyr Tyr Arg Lys Gly Gly Cys Ala Met Leu Pro Val Lys Trp Met
1285 1290 1295
Pro Pro Glu Ala Phe Met Glu Gly Ile Phe Thr Ser Lys Thr Asp Thr
1300 1305 1310
Trp Ser Phe Gly Val Leu Leu Trp Glu Ile Phe Ser Leu Gly Tyr Met
1315 1320 1325
Pro Tyr Pro Ser Lys Ser Asn Gln Glu Val Leu Glu Phe Val Thr Ser
1330 1335 1340
Gly Gly Arg Met Asp Pro Pro Lys Asn Cys Pro Gly Pro Val Tyr Arg
1345 1350 1355 1360
Ile Met Thr Gln Cys Trp Gln His Gln Pro Glu Asp Arg Pro Asn Phe
1365 1370 1375
Ala Ile Ile Leu Glu Arg Ile Glu Tyr Cys Thr Gln Asp Pro Asp Val

1380 1385 1390

Ile Asn Thr Ala Leu Pro Ile Glu Tyr Gly Pro Leu Val Glu Glu Glu

1395 1400 1405

Glu Lys Val Pro Val Arg Pro Lys Asp Pro Glu Gly Val Pro Pro Leu

1410 1415 1420

Leu Val Ser Gln Gln Ala Lys Arg Glu Glu Glu Arg Ser Pro Ala Ala

1425 1430 1435 1440

Pro Pro Pro Leu Pro Thr Thr Ser Ser Gly Lys Ala Ala Lys Lys Pro

1445 1450 1455

Thr Ala Ala Glu Ile Ser Val Arg Val Pro Arg Gly Pro Ala Val Glu

1460 1465 1470

Gly Gly His Val Asn Met Ala Phe Ser Gln Ser Asn Pro Pro Ser Glu

1475 1480 1485

Leu His Lys Val His Gly Ser Arg Asn Lys Pro Thr Ser Leu Trp Asn

1490 1495 1500

Pro Thr Tyr Gly Ser Trp Phe Thr Glu Lys Pro Thr Lys Lys Asn Asn

1505 1510 1515 1520

Pro Ile Ala Lys Lys Glu Pro His Asp Arg Gly Asn Leu Gly Leu Glu

1525 1530 1535

Gly Ser Cys Thr Val Pro Pro Asn Val Ala Thr Gly Arg Leu Pro Gly

1540 1545 1550

Ala Ser Leu Leu Leu Glu Pro Ser Ser Leu Thr Ala Asn Met Lys Glu

1555 1560 1565

Val Pro Leu Phe Arg Leu Arg His Phe Pro Cys Gly Asn Val Asn Tyr

1570 1575 1580

Gly Tyr Gln Gln Gln Gly Leu Pro Leu Glu Ala Ala Thr Ala Pro Gly

1585 1590 1595 1600

Ala Gly His Tyr Glu Asp Thr Ile Leu Lys Ser Lys Asn Ser Met Asn

1605 1610 1615

Gln Pro Gly Pro

1620

<210> 335

<211> 2347

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 335

Met Lys Asn Ile Tyr Cys Leu Ile Pro Lys Leu Val Asn Phe Ala Thr

1 5 10 15

Leu Gly Cys Leu Trp Ile Ser Val Val Gln Cys Thr Val Leu Asn Ser

20 25 30

Cys Leu Lys Ser Cys Val Thr Asn Leu Gly Gln Gln Leu Asp Leu Gly
35 40 45
Thr Pro His Asn Leu Ser Glu Pro Cys Ile Gln Gly Cys His Phe Trp
50 55 60
Asn Ser Val Asp Gln Lys Asn Cys Ala Leu Lys Cys Arg Glu Ser Cys
65 70 75 80
Glu Val Gly Cys Ser Ser Ala Glu Gly Ala Tyr Glu Glu Glu Val Leu
85 90 95
Glu Asn Ala Asp Leu Pro Thr Ala Pro Phe Ala Ser Ser Ile Gly Ser
100 105 110
His Asn Met Thr Leu Arg Trp Lys Ser Ala Asn Phe Ser Gly Val Lys
115 120 125
Tyr Ile Ile Gln Trp Lys Tyr Ala Gln Leu Leu Gly Ser Trp Thr Tyr
130 135 140
Thr Lys Thr Val Ser Arg Pro Ser Tyr Val Val Lys Pro Leu His Pro
145 150 155 160
Phe Thr Glu Tyr Ile Phe Arg Val Val Trp Ile Phe Thr Ala Gln Leu
165 170 175
Gln Leu Tyr Ser Pro Pro Ser Pro Ser Tyr Arg Thr His Pro His Gly
180 185 190
Val Pro Glu Thr Ala Pro Leu Ile Arg Asn Ile Glu Ser Ser Ser Pro
195 200 205
Asp Thr Val Glu Val Ser Trp Asp Pro Pro Gln Phe Pro Gly Gly Pro
210 215 220
Ile Leu Gly Tyr Asn Leu Arg Leu Ile Ser Lys Asn Gln Lys Leu Asp
225 230 235 240
Ala Gly Thr Gln Arg Thr Ser Phe Gln Phe Tyr Ser Thr Leu Pro Asn
245 250 255
Thr Ile Tyr Arg Phe Ser Ile Ala Ala Val Asn Glu Val Gly Glu Gly
260 265 270
Pro Glu Ala Glu Ser Ser Ile Thr Thr Ser Ser Ser Ala Val Gln Gln
275 280 285
Glu Glu Gln Trp Leu Phe Leu Ser Arg Lys Thr Ser Leu Arg Lys Arg
290 295 300
Ser Leu Lys His Leu Val Asp Glu Ala His Cys Leu Arg Leu Asp Ala
305 310 315 320
Ile Tyr His Asn Ile Thr Gly Ile Ser Val Asp Val His Gln Gln Ile
325 330 335

Val Tyr Phe Ser Glu Gly Thr Leu Ile Trp Ala Lys Lys Ala Ala Asn
340 345 350
Met Ser Asp Val Ser Asp Leu Arg Ile Phe Tyr Arg Gly Ser Gly Leu
355 360 365
Ile Ser Ser Ile Ser Ile Asp Trp Leu Tyr Gln Arg Met Tyr Phe Ile
370 375 380
Met Asp Glu Leu Val Cys Val Cys Asp Leu Glu Asn Cys Ser Asn Ile
385 390 395 400
Glu Glu Ile Thr Pro Pro Ser Ile Ser Ala Pro Gln Lys Ile Val Ala
405 410 415
Asp Ser Tyr Asn Gly Tyr Val Phe Tyr Leu Leu Arg Asp Gly Ile Tyr
420 425 430
Arg Ala Asp Leu Pro Val Pro Ser Gly Arg Cys Ala Glu Ala Val Arg
435 440 445
Ile Val Glu Ser Cys Thr Leu Lys Asp Phe Ala Ile Lys Pro Gln Ala
450 455 460
Lys Arg Ile Ile Tyr Phe Asn Asp Thr Ala Gln Val Phe Met Ser Thr
465 470 475 480
Phe Leu Asp Gly Ser Ala Ser His Leu Ile Leu Pro Arg Ile Pro Phe
485 490 495
Ala Asp Val Lys Ser Phe Ala Cys Glu Asn Asn Asp Phe Leu Val Thr
500 505 510
Asp Gly Lys Val Ile Phe Gln Gln Asp Ala Leu Ser Phe Asn Glu Phe
515 520 525
Ile Val Gly Cys Asp Leu Ser His Ile Glu Glu Phe Gly Phe Gly Asn
530 535 540
Leu Val Ile Phe Gly Ser Ser Ser Gln Leu His Pro Leu Pro Gly Arg
545 550 555 560
Pro Gln Glu Leu Ser Val Leu Phe Gly Ser His Gln Ala Leu Val Gln
565 570 575
Trp Lys Pro Pro Ala Leu Ala Ile Gly Ala Asn Val Ile Leu Ile Ser
580 585 590
Asp Ile Ile Glu Leu Phe Glu Leu Gly Pro Ser Ala Trp Gln Asn Trp
595 600 605
Thr Tyr Glu Val Lys Val Ser Thr Gln Asp Pro Pro Glu Val Thr His
610 615 620
Ile Phe Leu Asn Ile Ser Gly Thr Met Leu Asn Val Pro Glu Leu Gln
625 630 635 640
Ser Ala Met Lys Tyr Lys Val Ser Val Arg Ala Ser Ser Pro Lys Arg

645 650 655

Pro Gly Pro Trp Ser Glu Pro Ser Val Gly Thr Thr Leu Val Pro Ala
660 665 670

Ser Glu Pro Pro Phe Ile Met Ala Val Lys Glu Asp Gly Leu Trp Ser
675 680 685

Lys Pro Leu Asn Ser Phe Gly Pro Gly Glu Phe Leu Ser Ser Asp Ile
690 695 700

Gly Asn Val Ser Asp Met Asp Trp Tyr Asn Asn Ser Leu Tyr Tyr Ser
705 710 715 720

Asp Thr Lys Gly Asp Val Phe Val Trp Leu Leu Asn Gly Thr Asp Ile
725 730 735

Ser Glu Asn Tyr His Leu Pro Ser Ile Ala Gly Ala Gly Ala Leu Ala
740 745 750

Phe Glu Trp Leu Gly His Phe Leu Tyr Trp Ala Gly Lys Thr Tyr Val
755 760 765

Ile Gln Arg Gln Ser Val Leu Thr Gly His Thr Asp Ile Val Thr His
770 775 780

Val Lys Leu Leu Val Asn Asp Met Val Val Asp Ser Val Gly Gly Tyr
785 790 795 800

Leu Tyr Trp Thr Thr Leu Tyr Ser Val Glu Ser Thr Arg Leu Asn Gly
805 810 815

Glu Ser Ser Leu Val Leu Gln Thr Gln Pro Trp Phe Ser Gly Lys Lys
820 825 830

Val Ile Ala Leu Thr Leu Asp Leu Ser Asp Gly Leu Leu Tyr Trp Leu
835 840 845

Val Gln Asp Ser Gln Cys Ile His Leu Tyr Thr Ala Val Leu Arg Gly
850 855 860

Gln Ser Thr Gly Asp Thr Thr Ile Thr Glu Phe Ala Ala Trp Ser Thr
865 870 875 880

Ser Glu Ile Ser Gln Asn Ala Leu Met Tyr Tyr Ser Gly Arg Leu Phe
885 890 895

Trp Ile Asn Gly Phe Arg Ile Ile Thr Thr Gln Glu Ile Gly Gln Lys
900 905 910

Thr Ser Val Ser Val Leu Glu Pro Ala Arg Phe Asn Gln Phe Thr Ile
915 920 925

Ile Gln Thr Ser Leu Lys Pro Leu Pro Gly Asn Phe Ser Phe Thr Pro
930 935 940

Lys Val Ile Pro Asp Ser Val Gln Glu Ser Ser Phe Arg Ile Glu Gly
945 950 955 960

Asn Ala Ser Ser Phe Gln Ile Leu Trp Asn Gly Pro Pro Ala Val Asp
965 970 975
Trp Gly Val Val Phe Tyr Ser Val Glu Phe Ser Ala His Ser Lys Phe
980 985 990
Leu Ala Ser Glu Gln His Ser Leu Pro Val Phe Thr Val Glu Gly Leu
995 1000 1005
Glu Pro Tyr Ala Leu Phe Asn Leu Ser Val Thr Pro Tyr Thr Tyr Trp
1010 1015 1020
Gly Lys Gly Pro Lys Thr Ser Leu Ser Leu Arg Ala Pro Glu Thr Val
1025 1030 1035 1040
Pro Ser Ala Pro Glu Asn Pro Arg Ile Phe Ile Leu Pro Ser Gly Lys
1045 1050 1055
Cys Cys Asn Lys Asn Glu Val Val Val Glu Phe Arg Trp Asn Lys Pro
1060 1065 1070
Lys His Glu Asn Gly Val Leu Thr Lys Phe Glu Ile Phe Tyr Asn Ile
1075 1080 1085
Ser Asn Gln Ser Ile Thr Asn Lys Thr Cys Glu Asp Trp Ile Ala Val
1090 1095 1100
Asn Val Thr Pro Ser Val Met Ser Phe Gln Leu Glu Gly Met Ser Pro
1105 1110 1115 1120
Arg Cys Phe Ile Ala Phe Gln Val Arg Ala Phe Thr Ser Lys Gly Pro
1125 1130 1135
Gly Pro Tyr Ala Asp Val Val Lys Ser Thr Thr Ser Glu Ile Asn Pro
1140 1145 1150
Phe Pro His Leu Ile Thr Leu Leu Gly Asn Lys Ile Val Phe Leu Asp
1155 1160 1165
Met Asp Gln Asn Gln Val Val Trp Thr Phe Ser Ala Glu Arg Val Ile
1170 1175 1180
Ser Ala Val Cys Tyr Thr Ala Asp Asn Glu Met Gly Tyr Tyr Ala Glu
1185 1190 1195 1200
Gly Asp Ser Leu Phe Leu Leu His Leu His Asn Arg Ser Ser Ser Glu
1205 1210 1215
Leu Phe Gln Asp Ser Leu Val Phe Asp Ile Thr Val Ile Thr Ile Asp
1220 1225 1230
Trp Ile Ser Arg His Leu Tyr Phe Ala Leu Lys Glu Ser Gln Asn Gly
1235 1240 1245
Met Gln Val Phe Asp Val Asp Leu Glu His Lys Val Lys Tyr Pro Arg
1250 1255 1260
Glu Val Lys Ile His Asn Arg Asn Ser Thr Ile Ile Ser Phe Ser Val

1265 1270 1275 1280
Tyr Pro Leu Leu Ser Arg Leu Tyr Trp Thr Glu Val Ser Asn Phe Gly
1285 1290 1295
Tyr Gln Met Phe Tyr Tyr Ser Ile Ile Ser His Thr Leu His Arg Ile
1300 1305 1310
Leu Gln Pro Thr Ala Thr Asn Gln Gln Asn Lys Arg Asn Gln Cys Ser
1315 1320 1325
Cys Asn Val Thr Glu Phe Glu Leu Ser Gly Ala Met Ala Ile Asp Thr
1330 1335 1340
Ser Asn Leu Glu Lys Pro Leu Ile Tyr Phe Ala Lys Ala Gln Glu Ile
1345 1350 1355 1360
Trp Ala Met Asp Leu Glu Gly Cys Gln Cys Trp Arg Val Ile Thr Val
1365 1370 1375
Pro Ala Met Leu Ala Gly Lys Thr Leu Val Ser Leu Thr Val Asp Gly
1380 1385 1390
Asp Leu Ile Tyr Trp Ile Ile Thr Ala Lys Asp Ser Thr Gln Ile Tyr
1395 1400 1405
Gln Ala Lys Lys Gly Asn Gly Ala Ile Val Ser Gln Val Lys Ala Leu
1410 1415 1420
Arg Ser Arg His Ile Leu Ala Tyr Ser Ser Val Met Gln Pro Phe Pro
1425 1430 1435 1440
Asp Lys Ala Phe Leu Ser Leu Ala Ser Asp Thr Val Glu Pro Thr Ile
1445 1450 1455
Leu Asn Ala Thr Asn Thr Ser Leu Thr Ile Arg Leu Pro Leu Ala Lys
1460 1465 1470
Thr Asn Leu Thr Trp Tyr Gly Ile Thr Ser Pro Thr Pro Thr Tyr Leu
1475 1480 1485
Val Tyr Tyr Ala Glu Val Asn Asp Arg Lys Asn Ser Ser Asp Leu Lys
1490 1495 1500
Tyr Arg Ile Leu Glu Phe Gln Asp Ser Ile Ala Leu Ile Glu Asp Leu
1505 1510 1515 1520
Gln Pro Phe Ser Thr Tyr Met Ile Gln Ile Ala Val Lys Asn Tyr Tyr
1525 1530 1535
Ser Asp Pro Leu Glu His Leu Pro Pro Gly Lys Glu Ile Trp Gly Lys
1540 1545 1550
Thr Lys Asn Gly Val Pro Glu Ala Val Gln Leu Ile Asn Thr Thr Val
1555 1560 1565
Arg Ser Asp Thr Ser Leu Ile Ile Ser Trp Arg Glu Ser His Lys Pro
1570 1575 1580

Asn Gly Pro Lys Glu Ser Val Arg Tyr Gln Leu Ala Ile Ser His Leu
1585 1590 1595 1600
Ala Leu Ile Pro Glu Thr Pro Leu Arg Gln Ser Glu Phe Pro Asn Gly
1605 1610 1615
Arg Leu Thr Leu Leu Val Thr Arg Leu Ser Gly Gly Asn Ile Tyr Val
1620 1625 1630
Leu Lys Val Leu Ala Cys His Ser Glu Glu Met Trp Cys Thr Glu Ser
1635 1640 1645
His Pro Val Thr Val Glu Met Phe Asn Thr Pro Glu Lys Pro Tyr Ser
1650 1655 1660
Leu Val Pro Glu Asn Thr Ser Leu Gln Phe Asn Trp Lys Ala Pro Leu
1665 1670 1675 1680
Asn Val Asn Leu Ile Arg Phe Trp Val Glu Leu Gln Lys Trp Lys Tyr
1685 1690 1695
Asn Glu Phe Tyr His Val Lys Thr Ser Cys Ser Gln Gly Pro Ala Tyr
1700 1705 1710
Val Cys Asn Ile Thr Asn Leu Gln Pro Tyr Thr Ser Tyr Asn Val Arg
1715 1720 1725
Val Val Val Val Tyr Lys Thr Gly Glu Asn Ser Thr Ser Leu Pro Glu
1730 1735 1740
Ser Phe Lys Thr Lys Ala Gly Val Pro Asn Lys Pro Gly Ile Pro Lys
1745 1750 1755 1760
Leu Leu Glu Gly Ser Lys Asn Ser Ile Gln Trp Glu Lys Ala Glu Asp
1765 1770 1775
Asn Gly Cys Arg Ile Thr Tyr Tyr Ile Leu Glu Ile Arg Lys Ser Thr
1780 1785 1790
Ser Asn Asn Leu Gln Asn Gln Asn Leu Arg Trp Lys Met Thr Phe Asn
1795 1800 1805
Gly Ser Cys Ser Ser Val Cys Thr Trp Lys Ser Lys Asn Leu Lys Gly
1810 1815 1820
Ile Phe Gln Phe Arg Val Val Ala Ala Asn Asn Leu Gly Phe Gly Glu
1825 1830 1835 1840
Tyr Ser Gly Ile Ser Glu Asn Ile Ile Leu Val Gly Asp Asp Phe Trp
1845 1850 1855
Ile Pro Glu Thr Ser Phe Ile Leu Thr Ile Ile Val Gly Ile Phe Leu
1860 1865 1870
Val Val Thr Ile Pro Leu Thr Phe Val Trp His Arg Arg Leu Lys Asn
1875 1880 1885
Gln Lys Ser Ala Lys Glu Gly Val Thr Val Leu Ile Asn Glu Asp Lys

1890 1895 1900

Glu Leu Ala Glu Leu Arg Gly Leu Ala Ala Gly Val Gly Leu Ala Asn

1905 1910 1915 1920

Ala Cys Tyr Ala Ile His Thr Leu Pro Thr Gln Glu Glu Ile Glu Asn

1925 1930 1935

Leu Pro Ala Phe Pro Arg Glu Lys Leu Thr Leu Arg Leu Leu Leu Gly

1940 1945 1950

Ser Gly Ala Phe Gly Glu Val Tyr Glu Gly Thr Ala Val Asp Ile Leu

1955 1960 1965

Gly Val Gly Ser Gly Glu Ile Lys Val Ala Val Lys Thr Leu Lys Lys

1970 1975 1980

Gly Ser Thr Asp Gln Glu Lys Ile Glu Phe Leu Lys Glu Ala His Leu

1985 1990 1995 2000

Met Ser Lys Phe Asn His Pro Asn Ile Leu Lys Gln Leu Gly Val Cys

2005 2010 2015

Leu Leu Asn Glu Pro Gln Tyr Ile Ile Leu Glu Leu Met Glu Gly Gly

2020 2025 2030

Asp Leu Leu Thr Tyr Leu Arg Lys Ala Arg Met Ala Thr Phe Tyr Gly

2035 2040 2045

Pro Leu Leu Thr Leu Val Asp Leu Val Asp Leu Cys Val Asp Ile Ser

2050 2055 2060

Lys Gly Cys Val Tyr Leu Glu Arg Met His Phe Ile His Arg Asp Leu

2065 2070 2075 2080

Ala Ala Arg Asn Cys Leu Val Ser Val Lys Asp Tyr Thr Ser Pro Arg

2085 2090 2095

Ile Val Lys Ile Gly Asp Phe Gly Leu Ala Arg Asp Ile Tyr Lys Asn

2100 2105 2110

Asp Tyr Tyr Arg Lys Arg Gly Glu Gly Leu Leu Pro Val Arg Trp Met

2115 2120 2125

Ala Pro Glu Ser Leu Met Asp Gly Ile Phe Thr Thr Gln Ser Asp Val

2130 2135 2140

Trp Ser Phe Gly Ile Leu Ile Trp Glu Ile Leu Thr Leu Gly His Gln

2145 2150 2155 2160

Pro Tyr Pro Ala His Ser Asn Leu Asp Val Leu Asn Tyr Val Gln Thr

2165 2170 2175

Gly Gly Arg Leu Glu Pro Pro Arg Asn Cys Pro Asp Asp Leu Trp Asn

2180 2185 2190

Leu Met Thr Gln Cys Trp Ala Gln Glu Pro Asp Gln Arg Pro Thr Phe

2195 2200 2205

His Arg Ile Gln Asp Gln Leu Gln Leu Phe Arg Asn Phe Phe Leu Asn
2210 2215 2220
Ser Ile Tyr Lys Ser Arg Asp Glu Ala Asn Asn Ser Gly Val Ile Asn
2225 2230 2235 2240
Glu Ser Phe Glu Gly Glu Asp Gly Asp Val Ile Cys Leu Asn Ser Asp
2245 2250 2255
Asp Ile Met Pro Val Ala Leu Met Glu Thr Lys Asn Arg Glu Gly Leu
2260 2265 2270
Asn Tyr Met Val Leu Ala Thr Glu Cys Gly Gln Gly Glu Glu Lys Ser
2275 2280 2285
Glu Gly Pro Leu Gly Ser Gln Glu Ser Glu Ser Cys Gly Leu Arg Lys
2290 2295 2300
Glu Glu Lys Glu Pro His Ala Asp Lys Asp Phe Cys Gln Glu Lys Gln
2305 2310 2315 2320
Val Ala Tyr Cys Pro Ser Gly Lys Pro Glu Gly Leu Asn Tyr Ala Cys
2325 2330 2335
Leu Thr His Ser Gly Tyr Gly Asp Gly Ser Asp
2340 2345

<210> 336
<211> 1072
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)
<400> 336
Met Ala Lys Ala Thr Ser Gly Ala Ala Gly Leu Arg Leu Leu Leu Leu
1 5 10 15
Leu Leu Leu Pro Leu Leu Gly Lys Val Ala Leu Gly Leu Tyr Phe Ser
20 25 30
Arg Asp Ala Tyr Trp Glu Lys Leu Tyr Val Asp Gln Ala Ala Gly Thr
35 40 45
Pro Leu Leu Tyr Val His Ala Leu Arg Asp Ala Pro Glu Glu Val Pro
50 55 60
Ser Phe Arg Leu Gly Gln His Leu Tyr Gly Thr Tyr Arg Thr Arg Leu
65 70 75 80
His Glu Asn Asn Trp Ile Cys Ile Gln Glu Asp Thr Gly Leu Leu Tyr
85 90 95
Leu Asn Arg Ser Leu Asp His Ser Ser Trp Glu Lys Leu Ser Val Arg
100 105 110
Asn Arg Gly Phe Pro Leu Leu Thr Val Tyr Leu Lys Val Phe Leu Ser
115 120 125

Pro Thr Ser Leu Arg Glu Gly Glu Cys Gln Trp Pro Gly Cys Ala Arg
130 135 140
Val Tyr Phe Ser Phe Phe Asn Thr Ser Phe Pro Ala Cys Ser Ser Leu
145 150 155 160
Lys Pro Arg Glu Leu Cys Phe Pro Glu Thr Arg Pro Ser Phe Arg Ile
165 170 175
Arg Glu Asn Arg Pro Pro Gly Thr Phe His Gln Phe Arg Leu Leu Pro
180 185 190
Val Gln Phe Leu Cys Pro Asn Ile Ser Val Ala Tyr Arg Leu Leu Glu
195 200 205
Gly Glu Gly Leu Pro Phe Arg Cys Ala Pro Asp Ser Leu Glu Val Ser
210 215 220
Thr Arg Trp Ala Leu Asp Arg Glu Gln Arg Glu Lys Tyr Glu Leu Val
225 230 235 240
Ala Val Cys Thr Val His Ala Gly Ala Arg Glu Glu Val Val Met Val
245 250 255
Pro Phe Pro Val Thr Val Tyr Asp Glu Asp Asp Ser Ala Pro Thr Phe
260 265 270
Pro Ala Gly Val Asp Thr Ala Ser Ala Val Val Glu Phe Lys Arg Lys
275 280 285
Glu Asp Thr Val Val Ala Thr Leu Arg Val Phe Asp Ala Asp Val Val
290 295 300
Pro Ala Ser Gly Glu Leu Val Arg Arg Tyr Thr Ser Thr Leu Leu Pro
305 310 315 320
Gly Asp Thr Trp Ala Gln Gln Thr Phe Arg Val Glu His Trp Pro Asn
325 330 335
Glu Thr Ser Val Gln Ala Asn Gly Ser Phe Val Arg Ala Thr Val His
340 345 350
Asp Tyr Arg Leu Val Leu Asn Arg Asn Leu Ser Ile Ser Glu Asn Arg
355 360 365
Thr Met Gln Leu Ala Val Leu Val Asn Asp Ser Asp Phe Gln Gly Pro
370 375 380
Gly Ala Gly Val Leu Leu Leu His Phe Asn Val Ser Val Leu Pro Val
385 390 395 400
Ser Leu His Leu Pro Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Val Ser Arg Arg Ala
405 410 415
Arg Arg Phe Ala Gln Ile Gly Lys Val Cys Val Glu Asn Cys Gln Ala
420 425 430
Phe Ser Gly Ile Asn Val Gln Tyr Lys Leu His Ser Ser Gly Ala Asn

435 440 445

Cys Ser Thr Leu Gly Val Val Thr Ser Ala Glu Asp Thr Ser Gly Ile

450 455 460

Leu Phe Val Asn Asp Thr Lys Ala Leu Arg Arg Pro Lys Cys Ala Glu

465 470 475 480

Leu His Tyr Met Val Val Ala Thr Asp Gln Gln Thr Ser Arg Gln Ala

485 490 495

Gln Ala Gln Leu Leu Val Thr Val Glu Gly Ser Tyr Val Ala Glu Glu

500 505 510

Ala Gly Cys Pro Leu Ser Cys Ala Val Ser Lys Arg Arg Leu Glu Cys

515 520 525

Glu Glu Cys Gly Gly Leu Gly Ser Pro Thr Gly Arg Cys Glu Trp Arg

530 535 540

Gln Gly Asp Gly Lys Gly Ile Thr Arg Asn Phe Ser Thr Cys Ser Pro

545 550 555 560

Ser Thr Lys Thr Cys Pro Asp Gly His Cys Asp Val Val Glu Thr Gln

565 570 575

Asp Ile Asn Ile Cys Pro Gln Asp Cys Leu Arg Gly Ser Ile Val Gly

580 585 590

Gly His Glu Pro Gly Glu Pro Arg Gly Ile Lys Ala Gly Tyr Gly Thr

595 600 605

Cys Asn Cys Phe Pro Glu Glu Glu Lys Cys Phe Cys Glu Pro Glu Asp

610 615 620

Ile Gln Asp Pro Leu Cys Asp Glu Leu Cys Arg Thr Val Ile Ala Ala

625 630 635 640

Ala Val Leu Phe Ser Phe Ile Val Ser Val Leu Leu Ser Ala Phe Cys

645 650 655

Ile His Cys Tyr His Lys Phe Ala His Lys Pro Pro Ile Ser Ser Ala

660 665 670

Glu Met Thr Phe Arg Arg Pro Ala Gln Ala Phe Pro Val Ser Tyr Ser

675 680 685

Ser Ser Gly Ala Arg Arg Pro Ser Leu Asp Ser Met Glu Asn Gln Val

690 695 700

Ser Val Asp Ala Phe Lys Ile Leu Glu Asp Pro Lys Trp Glu Phe Pro

705 710 715 720

Arg Lys Asn Leu Val Leu Gly Lys Thr Leu Gly Glu Gly Glu Phe Gly

725 730 735

Lys Val Val Lys Ala Thr Ala Phe His Leu Lys Gly Arg Ala Gly Tyr

740 745 750

Thr Thr Val Ala Val Lys Met Leu Lys Glu Asn Ala Ser Pro Ser Glu
755 760 765
Leu Arg Asp Leu Leu Ser Glu Phe Asn Val Leu Lys Gln Val Asn His
770 775 780
Pro His Val Ile Lys Leu Tyr Gly Ala Cys Ser Gln Asp Gly Pro Leu
785 790 795 800
Leu Leu Ile Val Glu Tyr Ala Lys Tyr Gly Ser Leu Arg Gly Phe Leu
805 810 815
Arg Glu Ser Arg Lys Val Gly Pro Gly Tyr Leu Gly Ser Gly Gly Ser
820 825 830
Arg Asn Ser Ser Ser Leu Asp His Pro Asp Glu Arg Ala Leu Thr Met
835 840 845
Gly Asp Leu Ile Ser Phe Ala Trp Gln Ile Ser Gln Gly Met Gln Tyr
850 855 860
Leu Ala Glu Met Lys Leu Val His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Ile
865 870 875 880
Leu Val Ala Glu Gly Arg Lys Met Lys Ile Ser Asp Phe Gly Leu Ser
885 890 895
Arg Asp Val Tyr Glu Glu Asp Ser Tyr Val Lys Arg Ser Gln Gly Arg
900 905 910
Ile Pro Val Lys Trp Met Ala Ile Glu Ser Leu Phe Asp His Ile Tyr
915 920 925
Thr Thr Gln Ser Asp Val Trp Ser Phe Gly Val Leu Leu Trp Glu Ile
930 935 940
Val Thr Leu Gly Gly Asn Pro Tyr Pro Gly Ile Pro Pro Glu Arg Leu
945 950 955 960
Phe Asn Leu Leu Lys Thr Gly His Arg Met Glu Arg Pro Asp Asn Cys
965 970 975
Ser Glu Glu Met Tyr Arg Leu Met Leu Gln Cys Trp Lys Gln Glu Pro
980 985 990
Asp Lys Arg Pro Val Phe Ala Asp Ile Ser Lys Asp Leu Glu Lys Met
995 1000 1005
Met Val Lys Arg Arg Asp Tyr Leu Asp Leu Ala Ala Ser Thr Pro Ser
1010 1015 1020
Asp Ser Leu Ile Tyr Asp Asp Gly Leu Ser Glu Glu Glu Thr Pro Leu
1025 1030 1035 1040
Val Asp Cys Asn Asn Ala Pro Leu Pro Arg Ala Leu Pro Ser Thr Trp
1045 1050 1055
Ile Glu Asn Lys Leu Tyr Gly Arg Ile Ser His Ala Phe Thr Arg Phe

1060 1065 1070

<210> 337

<211> 760

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 337

Met Lys Glu Ala Ala Leu Ile Cys Leu Ala Pro Ser Val Pro Pro Ile
1 5 10 15
Leu Thr Val Lys Ser Trp Asp Thr Met Gln Leu Arg Ala Ala Arg Ser
20 25 30
Arg Cys Thr Asn Leu Leu Ala Ala Ser Tyr Ile Glu Asn Gln Gln His
35 40 45
Leu Gln His Leu Glu Leu Arg Asp Leu Arg Gly Leu Gly Glu Leu Arg
50 55 60
Asn Leu Thr Ile Val Lys Ser Gly Leu Arg Phe Val Ala Pro Asp Ala
65 70 75 80
Phe His Phe Thr Pro Arg Leu Ser Arg Leu Asn Leu Ser Phe Asn Ala
85 90 95
Leu Glu Ser Leu Ser Trp Lys Thr Val Gln Gly Leu Ser Leu Gln Glu
100 105 110
Leu Val Leu Ser Gly Asn Pro Leu His Cys Ser Cys Ala Leu Arg Trp
115 120 125
Leu Gln Arg Trp Glu Glu Glu Gly Leu Gly Gly Val Pro Glu Gln Lys
130 135 140
Leu Gln Cys His Gly Gln Gly Pro Leu Ala His Met Pro Asn Ala Ser
145 150 155 160
Cys Gly Val Pro Thr Leu Lys Val Gln Val Pro Asn Ala Ser Val Asp
165 170 175
Val Gly Asp Asp Val Leu Leu Arg Cys Gln Val Glu Gly Arg Gly Leu
180 185 190
Glu Gln Ala Gly Trp Ile Leu Thr Glu Leu Glu Gln Ser Ala Thr Val
195 200 205
Met Lys Ser Gly Gly Leu Pro Ser Leu Gly Leu Thr Leu Ala Asn Val
210 215 220
Thr Ser Asp Leu Asn Arg Lys Asn Val Thr Cys Trp Ala Glu Asn Asp
225 230 235 240
Val Gly Arg Ala Glu Val Ser Val Gln Val Asn Val Ser Phe Pro Ala
245 250 255
Ser Val Gln Leu His Thr Ala Val Glu Met His His Trp Cys Ile Pro

260 265 270

Phe Ser Val Asp Gly Gln Pro Ala Pro Ser Leu Arg Trp Leu Phe Asn

275 280 285

Gly Ser Val Leu Asn Glu Thr Ser Phe Ile Phe Thr Glu Phe Leu Glu

290 295 300

Pro Ala Ala Asn Glu Thr Val Arg His Gly Cys Leu Arg Leu Asn Gln

305 310 315 320

Pro Thr His Val Asn Asn Gly Asn Tyr Thr Leu Leu Ala Ala Asn Pro

325 330 335

Phe Gly Gln Ala Ser Ala Ser Ile Met Ala Ala Phe Met Asp Asn Pro

340 345 350

Phe Glu Phe Asn Pro Glu Asp Pro Ile Pro Asp Thr Asn Ser Thr Ser

355 360 365

Gly Asp Pro Val Glu Lys Lys Asp Glu Thr Pro Phe Gly Val Ser Val

370 375 380

Ala Val Gly Leu Ala Val Phe Ala Cys Leu Phe Leu Ser Thr Leu Leu

385 390 395 400

Leu Val Leu Asn Lys Cys Gly Arg Arg Asn Lys Phe Gly Ile Asn Arg

405 410 415

Pro Ala Val Leu Ala Pro Glu Asp Gly Leu Ala Met Ser Leu His Phe

420 425 430

Met Thr Leu Gly Gly Ser Ser Leu Ser Pro Thr Glu Gly Lys Gly Ser

435 440 445

Gly Leu Gln Gly His Ile Ile Glu Asn Pro Gln Tyr Phe Ser Asp Ala

450 455 460

Cys Val His His Ile Lys Arg Arg Asp Ile Val Leu Lys Trp Glu Leu

465 470 475 480

Gly Glu Gly Ala Phe Gly Lys Val Phe Leu Ala Glu Cys His Asn Leu

485 490 495

Leu Pro Glu Gln Asp Lys Met Leu Val Ala Val Lys Ala Leu Lys Glu

500 505 510

Ala Ser Glu Ser Ala Arg Gln Asp Phe Gln Arg Glu Ala Glu Leu Leu

515 520 525

Thr Met Leu Gln His Gln His Ile Val Arg Phe Phe Gly Val Cys Thr

530 535 540

Glu Gly Arg Pro Leu Leu Met Val Phe Glu Tyr Met Arg His Gly Asp

545 550 555 560

Leu Asn Arg Phe Leu Arg Ser His Gly Pro Asp Ala Lys Leu Leu Ala

565 570 575

Gly Gly Glu Asp Val Ala Pro Gly Pro Leu Gly Leu Gly Gln Leu Leu
580 585 590
Ala Val Ala Ser Gln Val Ala Ala Gly Met Val Tyr Leu Ala Gly Leu
595 600 605
His Phe Val His Arg Asp Leu Ala Thr Arg Asn Cys Leu Val Gly Gln
610 615 620
Gly Leu Val Val Lys Ile Gly Asp Phe Gly Met Ser Arg Asp Ile Tyr
625 630 635 640
Ser Thr Asp Tyr Tyr Arg Val Gly Gly Arg Thr Met Leu Pro Ile Arg
645 650 655
Trp Met Pro Pro Glu Ser Ile Leu Tyr Arg Lys Phe Thr Thr Glu Ser
660 665 670
Asp Val Trp Ser Phe Gly Val Val Leu Trp Glu Ile Phe Thr Tyr Gly
675 680 685
Lys Gln Pro Trp Tyr Gln Leu Ser Asn Thr Glu Ala Ile Asp Cys Ile
690 695 700
Thr Gln Gly Arg Glu Leu Glu Arg Pro Arg Ala Cys Pro Pro Glu Val
705 710 715 720
Tyr Ala Ile Met Arg Gly Cys Trp Gln Arg Glu Pro Gln Gln Arg His
725 730 735
Ser Ile Lys Asp Val His Ala Arg Leu Gln Ala Leu Ala Gln Ala Pro
740 745 750
Pro Val Tyr Leu Asp Val Leu Gly
755 760

<210> 338
<211> 1390
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)
<400> 338

Met Lys Ala Pro Ala Val Leu Ala Pro Gly Ile Leu Val Leu Leu Phe
1 5 10 15
Thr Leu Val Gln Arg Ser Asn Gly Glu Cys Lys Glu Ala Leu Ala Lys
20 25 30
Ser Glu Met Asn Val Asn Met Lys Tyr Gln Leu Pro Asn Phe Thr Ala
35 40 45
Glu Thr Pro Ile Gln Asn Val Ile Leu His Glu His His Ile Phe Leu
50 55 60
Gly Ala Thr Asn Tyr Ile Tyr Val Leu Asn Glu Glu Asp Leu Gln Lys
65 70 75 80

Val Ala Glu Tyr Lys Thr Gly Pro Val Leu Glu His Pro Asp Cys Phe
85 90 95
Pro Cys Gln Asp Cys Ser Ser Lys Ala Asn Leu Ser Gly Gly Val Trp
100 105 110
Lys Asp Asn Ile Asn Met Ala Leu Val Val Asp Thr Tyr Tyr Asp Asp
115 120 125
Gln Leu Ile Ser Cys Gly Ser Val Asn Arg Gly Thr Cys Gln Arg His
130 135 140
Val Phe Pro His Asn His Thr Ala Asp Ile Gln Ser Glu Val His Cys
145 150 155 160
Ile Phe Ser Pro Gln Ile Glu Glu Pro Ser Gln Cys Pro Asp Cys Val
165 170 175
Val Ser Ala Leu Gly Ala Lys Val Leu Ser Ser Val Lys Asp Arg Phe
180 185 190
Ile Asn Phe Phe Val Gly Asn Thr Ile Asn Ser Ser Tyr Phe Pro Asp
195 200 205
His Pro Leu His Ser Ile Ser Val Arg Arg Leu Lys Glu Thr Lys Asp
210 215 220
Gly Phe Met Phe Leu Thr Asp Gln Ser Tyr Ile Asp Val Leu Pro Glu
225 230 235 240
Phe Arg Asp Ser Tyr Pro Ile Lys Tyr Val His Ala Phe Glu Ser Asn
245 250 255
Asn Phe Ile Tyr Phe Leu Thr Val Gln Arg Glu Thr Leu Asp Ala Gln
260 265 270
Thr Phe His Thr Arg Ile Ile Arg Phe Cys Ser Ile Asn Ser Gly Leu
275 280 285
His Ser Tyr Met Glu Met Pro Leu Glu Cys Ile Leu Thr Glu Lys Arg
290 295 300
Lys Lys Arg Ser Thr Lys Lys Glu Val Phe Asn Ile Leu Gln Ala Ala
305 310 315 320
Tyr Val Ser Lys Pro Gly Ala Gln Leu Ala Arg Gln Ile Gly Ala Ser
325 330 335
Leu Asn Asp Asp Ile Leu Phe Gly Val Phe Ala Gln Ser Lys Pro Asp
340 345 350
Ser Ala Glu Pro Met Asp Arg Ser Ala Met Cys Ala Phe Pro Ile Lys
355 360 365
Tyr Val Asn Asp Phe Phe Asn Lys Ile Val Asn Lys Asn Asn Val Arg
370 375 380
Cys Leu Gln His Phe Tyr Gly Pro Asn His Glu His Cys Phe Asn Arg

385 390 395 400
Thr Leu Leu Arg Asn Ser Ser Gly Cys Glu Ala Arg Arg Asp Glu Tyr
405 410 415
Arg Thr Glu Phe Thr Thr Ala Leu Gln Arg Val Asp Leu Phe Met Gly
420 425 430
Gln Phe Ser Glu Val Leu Leu Thr Ser Ile Ser Thr Phe Ile Lys Gly
435 440 445
Asp Leu Thr Ile Ala Asn Leu Gly Thr Ser Glu Gly Arg Phe Met Gln
450 455 460
Val Val Val Ser Arg Ser Gly Pro Ser Thr Pro His Val Asn Phe Leu
465 470 475 480
Leu Asp Ser His Pro Val Ser Pro Glu Val Ile Val Glu His Thr Leu
485 490 495
Asn Gln Asn Gly Tyr Thr Leu Val Ile Thr Gly Lys Lys Ile Thr Lys
500 505 510
Ile Pro Leu Asn Gly Leu Gly Cys Arg His Phe Gln Ser Cys Ser Gln
515 520 525
Cys Leu Ser Ala Pro Pro Phe Val Gln Cys Gly Trp Cys His Asp Lys
530 535 540
Cys Val Arg Ser Glu Glu Cys Leu Ser Gly Thr Trp Thr Gln Gln Ile
545 550 555 560
Cys Leu Pro Ala Ile Tyr Lys Val Phe Pro Asn Ser Ala Pro Leu Glu
565 570 575
Gly Gly Thr Arg Leu Thr Ile Cys Gly Trp Asp Phe Gly Phe Arg Arg
580 585 590
Asn Asn Lys Phe Asp Leu Lys Lys Thr Arg Val Leu Leu Gly Asn Glu
595 600 605
Ser Cys Thr Leu Thr Leu Ser Glu Ser Thr Met Asn Thr Leu Lys Cys
610 615 620
Thr Val Gly Pro Ala Met Asn Lys His Phe Asn Met Ser Ile Ile Ile
625 630 635 640
Ser Asn Gly His Gly Thr Thr Gln Tyr Ser Thr Phe Ser Tyr Val Asp
645 650 655
Pro Val Ile Thr Ser Ile Ser Pro Lys Tyr Gly Pro Met Ala Gly Gly
660 665 670
Thr Leu Leu Thr Leu Thr Gly Asn Tyr Leu Asn Ser Gly Asn Ser Arg
675 680 685
His Ile Ser Ile Gly Gly Lys Thr Cys Thr Leu Lys Ser Val Ser Asn
690 695 700

Ser Ile Leu Glu Cys Tyr Thr Pro Ala Gln Thr Ile Ser Thr Glu Phe
705 710 715 720
Ala Val Lys Leu Lys Ile Asp Leu Ala Asn Arg Glu Thr Ser Ile Phe
725 730 735
Ser Tyr Arg Glu Asp Pro Ile Val Tyr Glu Ile His Pro Thr Lys Ser
740 745 750
Phe Ile Ser Gly Gly Ser Thr Ile Thr Gly Val Gly Lys Asn Leu Asn
755 760 765
Ser Val Ser Val Pro Arg Met Val Ile Asn Val His Glu Ala Gly Arg
770 775 780
Asn Phe Thr Val Ala Cys Gln His Arg Ser Asn Ser Glu Ile Ile Cys
785 790 795 800
Cys Thr Thr Pro Ser Leu Gln Gln Leu Asn Leu Gln Leu Pro Leu Lys
805 810 815
Thr Lys Ala Phe Phe Met Leu Asp Gly Ile Leu Ser Lys Tyr Phe Asp
820 825 830
Leu Ile Tyr Val His Asn Pro Val Phe Lys Pro Phe Glu Lys Pro Val
835 840 845
Met Ile Ser Met Gly Asn Glu Asn Val Leu Glu Ile Lys Gly Asn Asp
850 855 860
Ile Asp Pro Glu Ala Val Lys Gly Glu Val Leu Lys Val Gly Asn Lys
865 870 875 880
Ser Cys Glu Asn Ile His Leu His Ser Glu Ala Val Leu Cys Thr Val
885 890 895
Pro Asn Asp Leu Leu Lys Leu Asn Ser Glu Leu Asn Ile Glu Trp Lys
900 905 910
Gln Ala Ile Ser Ser Thr Val Leu Gly Lys Val Ile Val Gln Pro Asp
915 920 925
Gln Asn Phe Thr Gly Leu Ile Ala Gly Val Val Ser Ile Ser Thr Ala
930 935 940
Leu Leu Leu Leu Leu Gly Phe Phe Leu Trp Leu Lys Lys Arg Lys Gln
945 950 955 960
Ile Lys Asp Leu Gly Ser Glu Leu Val Arg Tyr Asp Ala Arg Val His
965 970 975
Thr Pro His Leu Asp Arg Leu Val Ser Ala Arg Ser Val Ser Pro Thr
980 985 990
Thr Glu Met Val Ser Asn Glu Ser Val Asp Tyr Arg Ala Thr Phe Pro
995 1000 1005
Glu Asp Gln Phe Pro Asn Ser Ser Gln Asn Gly Ser Cys Arg Gln Val

1010 1015 1020

Gln Tyr Pro Leu Thr Asp Met Ser Pro Ile Leu Thr Ser Gly Asp Ser
1025 1030 1035 1040

Asp Ile Ser Ser Pro Leu Leu Gln Asn Thr Val His Ile Asp Leu Ser
1045 1050 1055

Ala Leu Asn Pro Glu Leu Val Gln Ala Val Gln His Val Val Ile Gly
1060 1065 1070

Pro Ser Ser Leu Ile Val His Phe Asn Glu Val Ile Gly Arg Gly His
1075 1080 1085

Phe Gly Cys Val Tyr His Gly Thr Leu Leu Asp Asn Asp Gly Lys Lys
1090 1095 1100

Ile His Cys Ala Val Lys Ser Leu Asn Arg Ile Thr Asp Ile Gly Glu
1105 1110 1115 1120

Val Ser Gln Phe Leu Thr Glu Gly Ile Ile Met Lys Asp Phe Ser His
1125 1130 1135

Pro Asn Val Leu Ser Leu Leu Gly Ile Cys Leu Arg Ser Glu Gly Ser
1140 1145 1150

Pro Leu Val Val Leu Pro Tyr Met Lys His Gly Asp Leu Arg Asn Phe
1155 1160 1165

Ile Arg Asn Glu Thr His Asn Pro Thr Val Lys Asp Leu Ile Gly Phe
1170 1175 1180

Gly Leu Gln Val Ala Lys Gly Met Lys Tyr Leu Ala Ser Lys Lys Phe
1185 1190 1195 1200

Val His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Cys Met Leu Asp Glu Lys Phe
1205 1210 1215

Thr Val Lys Val Ala Asp Phe Gly Leu Ala Arg Asp Met Tyr Asp Lys
1220 1225 1230

Glu Tyr Tyr Ser Val His Asn Lys Thr Gly Ala Lys Leu Pro Val Lys
1235 1240 1245

Trp Met Ala Leu Glu Ser Leu Gln Thr Gln Lys Phe Thr Thr Lys Ser
1250 1255 1260

Asp Val Trp Ser Phe Gly Val Leu Leu Trp Glu Leu Met Thr Arg Gly
1265 1270 1275 1280

Ala Pro Pro Tyr Pro Asp Val Asn Thr Phe Asp Ile Thr Val Tyr Leu
1285 1290 1295

Leu Gln Gly Arg Arg Leu Leu Gln Pro Glu Tyr Cys Pro Asp Pro Leu
1300 1305 1310

Tyr Glu Val Met Leu Lys Cys Trp His Pro Lys Ala Glu Met Arg Pro
1315 1320 1325

Ser Phe Ser Glu Leu Val Ser Arg Ile Ser Ala Ile Phe Ser Thr Phe
1330 1335 1340
Ile Gly Glu His Tyr Val His Val Asn Ala Thr Tyr Val Asn Val Lys
1345 1350 1355 1360
Cys Val Ala Pro Tyr Pro Ser Leu Leu Ser Ser Glu Asp Asn Ala Asp
1365 1370 1375
Asp Glu Val Asp Thr Arg Pro Ala Ser Phe Trp Glu Thr Ser
1380 1385 1390

<210> 339
<211> 859
<212> DNA
<213> 智人(Homo sapiens)
<400> 339
tgtgctcgga gctcgatttt cctaggcggc ggccgcggcg gcggaggcag cagcggcggc 60
ggcagtggcg gcggcgaagg tggcggcggc tcggccagta ctcccggccc ccgccatttc 120
ggactgggag cgagcgcggc gcaggcactg aaggcggcgg cggggccaga ggctcagcgg 180
ctcccaggcc tgctgaaaat gactgaatat aaacttgtgg tagttggagc tggtggcgta 240
ggcaagagtg ccttgacgat acagctaatt cagaatcatt ttgtggacga atatgatcca 300
acaatagagg attcctacag gaagcaagta gtaattgatg gagaaacctg tctcttggat 360
attctcgaca cagcaggtca agaggagtac agtgcaatga gggaccagta catgaggact 420
ggggagggct ttctttgtgt atttgccata aataatacta aatcatttga agatattcac 480
cattatagag aacaaattaa aagagttaag gactctgaag atgtacctat ggtcctagta 540
ggaaataaat gtgatttgcc ttctagaaca gtagacacaa aacaggctca ggacttagca 600
agaagttatg gaattccttt tattgaaaca tcagcaaaga caagacagag agtggaggat 660
gctttttata cattggtgag agagatccga caatacagat tgaaaaaaat cagcaaagaa 720
gaaaagactc ctggctgtgt gaaaattaaa aaatgcatta taatgtaatc tgggtgttga 780
tgatgccttc tatacattag ttcgagaaat tcgaaaacat aaagaaaaga tgagcaaaga 840
tggtaaaaag aagaaaaag 859
<210> 340
<211> 570
<212> DNA
<213> 智人(Homo sapiens)
<400> 340
atgactgagt acaaactggt ggtggttgga gcaggtggtg ttgggaaaag cgcactgaca 60
atccagctaa tccagaacca ctttgtagat gaatatgatc ccaccataga ggattcttac 120
agaaaacaag tggttataga tggtgaaacc tgtttgttgg acatactgga tacagctgga 180
caagaagagt acagtgccat gagagaccaa tacatgagga caggcgaagg cttcctctgt 240
gtatttgcca tcaataatag caagtcattt gcggatatta acctctacag ggagcagatt 300
aagcgagtaa aagactcgga tgatgtacct atggtgctag tgggaaacaa gtgtgatttg 360

ccaacaagga cagttgatac aaaacaagcc cacgaactgg ccaagagtta cgggattcca 420
ttcattgaaa cctcagccaa gaccagacag ggtgttgaag atgctttta cacactggta 480
agagaaatac gccagtaccg aatgaaaaaa ctcaacagca gtgatgatgg gactcagggt 540
tgtatgggat tgccatgtgt ggtgatgtaa 570

<210> 341
<211> 3207
<212> DNA
<213> 智人(Homo sapiens)
<400> 341

atgcctccac gaccatcatc aggtgaactg tggggcatcc acttgatgcc cccaagaatc 60
ctagtagaat gtttactacc aaatggaatg atagtgactt tagaatgcct ccgtgaggct 120
acattaataa ccataaagca tgaactattt aaagaagcaa gaaaataccc cctccatcaa 180
cttcttcaag atgaatcttc ttacattttc gtaagtgtta ctcaagaagc agaaagggaa 240
gaatttttg atgaaacaag acgactttgt gaccttcggc tttttcaacc ctttttaaaa 300
gtaattgaac cagtaggcaa ccgtgaagaa aagatcctca atcgagaaat tggttttgct 360
atcggcatgc cagtgtgtga atttgatatg gttaaagatc cagaagtaca ggacttccga 420
agaaatattc tgaacgtttg taaagaagct gtggatctta gggacctcaa ttcacctcat 480
agtagagcaa tgtatgtcta tcctccaaat gtagaatctt caccagaatt gccaaagcac 540
atatataata aattagataa agggcaaata atagtggtga tctgggtaat agtttctcca 600
aataatgaca agcagaagta tactctgaaa atcaaccatg actgtgtacc agaacaagta 660
attgctgaag caatcaggaa aaaaactcga agtatgttgc tatcctctga acaactaaaa 720
ctctgtgttt tagaatatca gggcaagtat attttaaaag tgtgtggatg tgatgaatac 780
ttcctagaaa aatatcctct gagtcagtat aagtatataa gaagctgtat aatgcttggg 840
aggatgccca atttgatgtt gatggctaaa gaaagccttt attctcaact gccaatggac 900
tgttttacaa tgccatctta ttccagacgc atttccacag ctacaccata tatgaatgga 960
gaaacatcta caaaatccct ttgggttata aatagtgcac tcagaataaa aattctttgt 1020
gcaacctacg tgaatgtaaa tattcgagac attgataaga tctatgttcg aacaggtatc 1080
taccatggag gagaaccctt atgtgacaat gtgaacactc aaagagtacc ttgttccaat 1140
cccaggtgga atgaatggct gaattatgat atatacattc ctgatcttcc tcgtgctgct 1200
cgactttgcc tttccatttg ctctgttaaa ggccgaaagg gtgctaaaga ggaacactgt 1260
ccattggcat ggggaaatat aaacttgttt gattacacag acactctagt atctggaaaa 1320
atggctttga atctttggcc agtacctcat ggattagaag atttgctgaa ccctattggt 1380
gttactggat caaatccaaa taaagaaact ccatgcttag agttggagtt tgactggttc 1440
agcagtgtgg taaagttccc agatatgtca gtgattgaag agcatgccaa ttggtctgta 1500
tcccgagaag caggatttag ctattcccac gcaggactga gtaacagact agctagagac 1560
aatgaattaa gggaaaatga caaagaacag ctcaaagcaa tttctacacg agatcctctc 1620
tctgaaatca ctgagcagga gaaagatttt ctatggagtc acagacacta ttgtgtaact 1680
atccccgaaa ttctacccaa attgcttctg tctgttaaat ggaattctag agatgaagta 1740
gcccagatgt attgcttggt aaaagattgg cctccaatca aacctgaaca ggctatggaa 1800

cttctggact gtaattaccc agatcctatg gttcgaggtt ttgctgttcg gtgcttggaa 1860
aaatatttaa cagatgacaa actttctcag tatttaattc agctagtaca ggtcctaaaa 1920
tatgaacaat atttggataa cttgcttgtg agatttttac tgaagaaagc attgactaat 1980
caaaggattg ggcacttttt cttttggcat ttaaaatctg agatgcacaa taaaacagtt 2040
agccagaggt ttggcctgct tttggagtcc tattgtcgtg catgtgggat gtatttgaag 2100
cacctgaata ggcaagtcga ggcaatggaa aagctcatta acttaactga cattctcaaa 2160
caggagaaga aggatgaaac acaaaaggta cagatgaagt ttttagttga gcaaatgagg 2220
cgaccagatt tcatggatgc tctacagggc tttctgtctc ctctaaaccc tgctcatcaa 2280
ctaggaaacc tcaggcttga agagtgtcga attatgtcct ctgcaaaaag gccactgtgg 2340
ttgaattggg agaacccaga catcatgtca gagttactgt ttcagaacaa tgagatcatc 2400
tttaaaaatg gggatgattt acggcaagat atgctaacac ttcaaattat tcgtattatg 2460
gaaaatatct ggcaaaatca aggtcttgat cttcgaatgt taccttatgg ttgtctgtca 2520
atcggtgact gtgtgggact tattgaggtg gtgcgaaatt ctcacactat tatgcaaatt 2580
cagtgcaaag gcggcttgaa aggtgcactg cagttcaaca gccacacact acatcagtgg 2640
ctcaaagaca agaacaaagg agaaatatat gatgcagcca ttgacctgtt tacacgttca 2700
tgtgctggat actgtgtagc taccttcatt ttgggaattg gagatcgtca caatagtaac 2760
atcatggtga aagacgatgg acaactgttt catatagatt ttggacactt tttggatcac 2820
aagaagaaaa aatttggtta taaacgagaa cgtgtgccat ttgttttgac acaggatttc 2880
ttaatagtga ttagtaaagg agcccaagaa tgcacaaaga caagagaatt tgagaggttt 2940
caggagatgt gttacaaggc ttatctagct attcgacagc atgccaatct cttcataaat 3000
cttttctcaa tgatgcttgg ctctggaatg ccagaactac aatcttttga tgacattgca 3060
tacattcgaa agaccctagc cttagataaa actgagcaag aggctttgga gtatttcatg 3120
aaacaaatga atgatgcaca tcatggtggc tggacaacaa aaatggattg gatcttccac 3180
acaattaaac agcatgcatt gaactga 3207

<210> 342
<211> 2301
<212> DNA
<213> 智人(Homo sapiens)
<400> 342

atggcggcgc tgagcggtgg cggtggtggc ggcgcggagc cgggccaggc tctgttcaac 60
ggggacatgg agcccgaggc cggcgccggc gccggcgccg cggcctcttc ggctgcggac 120
cctgccattc cggaggaggt gtggaatatc aaacaaatga ttaagttgac acaggaacat 180
atagaggccc tattggacaa atttggtggg gagcataatc caccatcaat atatctggag 240
gcctatgaag aatacaccag caagctagat gcactccaac aaagagaaca acagttattg 300
gaatctctgg ggaacggaac tgatttttct gtttctagct ctgcatcaat ggataccgtt 360
acatcttctt cctcttctag cctttcagtg ctaccttcat ctctttcagt ttttcaaaat 420
cccacagatg tggcacggag caaccccaag tcaccacaaa aacctatcgt tagagtcttc 480
ctgcccaaca aacagaggac agtggtacct gcaaggtgtg gagttacagt ccgagacagt 540
ctaaagaaag cactgatgat gagaggtcta atcccagagt gctgtgctgt ttacagaatt 600

caggatggag agaagaaacc aattggttgg gacactgata tttcctggct tactggagaa 660
gaattgcatg tggaagtgtt ggagaatgtt ccacttacaa cacacaactt tgtacgaaaa 720
acgtttttca ccttagcatt ttgtgacttt tgtcgaaagc tgcttttcca gggtttccgc 780
tgtcaaacat gtggttataa atttcaccag cgttgtagta cagaagttcc actgatgtgt 840
gttaattatg accaacttga tttgctgttt gtctccaagt tctttgaaca ccacccaata 900
ccacaggaag aggcgtcctt agcagagact gccctaacat ctggatcatc cccttccgca 960
cccgcctcgg actctattgg gccccaaatt ctcaccagtc cgtctccttc aaaatccatt 1020
ccaattccac agcccttccg accagcagat gaagatcatc gaaatcaatt tgggcaacga 1080
gaccgatcct catcagctcc caatgtgcat ataaacacaa tagaacctgt caatattgat 1140
gacttgatta gagaccaagg atttcgtggt gatggaggat caaccacagg tttgtctgct 1200
acccccccctg cctcattacc tggctcacta actaacgtga aagccttaca gaaatctcca 1260
ggacctcagc gagaaaggaa gtcatcttca tcctcagaag acaggaatcg aatgaaaaca 1320
cttggtagac gggactcgag tgatgattgg gagattcctg atgggcagat tacagtggga 1380
caaagaattg gatctggatc atttggaaca gtctacaagg gaaagtggca tggtgatgtg 1440
gcagtgaaaa tgttgaatgt gacagcacct acacctcagc agttacaagc cttcaaaaat 1500
gaagtaggag tactcaggaa aacacgacat gtgaatatcc tactcttcat gggctattcc 1560
acaaagccac aactggctat tgttacccag tggtgtgagg gctccagctt gtatcaccat 1620
ctccatatca ttgagaccaa atttgagatg atcaaactta tagatattgc acgacagact 1680
gcacagggca tggattactt acacgccaag tcaatcatcc acagagacct caagagtaat 1740
aatatatttc ttcatgaaga cctcacagta aaaataggtg attttggtct agctacagtg 1800
aaatctcgat ggagtgggtc ccatcagttt gaacagttgt ctggatccat tttgtggatg 1860
gcaccagaag tcatcagaat gcaagataaa aatccataca gctttcagtc agatgtatat 1920
gcatttggaa ttgttctgta tgaattgatg actggacagt taccttattc aaacatcaac 1980
aacagggacc agataatttt tatggtggga cgaggatacc tgtctccaga tctcagtaag 2040
gtacggagta actgtccaaa agccatgaag agattaatgg cagagtgcct caaaaagaaa 2100
agagatgaga gaccactctt tccccaaatt ctcgcctcta ttgagctgct ggcccgctca 2160
ttgccaaaaa ttcaccgcag tgcatcagaa ccctccttga atcgggctgg tttccaaaca 2220
gaggatttta gtctatatgc ttgtgcttct ccaaaaacac ccatccaggc agggggatat 2280
ggtgcgtttc ctgtccactg a 2301

<210> 343
<211> 3633
<212> DNA
<213> 智人(Homo sapiens)
<400> 343

atgcgaccct ccgggacggc cggggcagcg ctcctggcgc tgctggctgc gctctgcccg 60
gcgagtcggg ctctggagga aaagaaagtt tgccaaggca cgagtaacaa gctcacgcag 120
ttgggcactt ttgaagatca ttttctcagc ctccagagga tgttcaataa ctgtgaggtg 180
gtccttggga atttggaaat tacctatgtg cagaggaatt atgatctttc cttcttaaag 240
accatccagg aggtggctgg ttatgtcctc attgccctca acacagtgga gcgaattcct 300

ttggaaaacc tgcagatcat cagaggaaat atgtactacg aaaattccta tgccttagca 360
gtcttatcta actatgatgc aaataaaacc ggactgaagg agctgcccat gagaaattta 420
caggaaatcc tgcatggcgc cgtgcggttc agcaacaacc ctgccctgtg caacgtggag 480
agcatccagt ggcgggacat agtcagcagt gactttctca gcaacatgtc gatggacttc 540
cagaaccacc tgggcagctg ccaaaagtgt gatccaagct gtcccaatgg gagctgctgg 600
ggtgcaggag aggagaactg ccagaaactg accaaaatca tctgtgccca gcagtgctcc 660
gggcgctgcc gtggcaagtc ccccagtgac tgctgccaca accagtgtgc tgcaggctgc 720
acaggccccc gggagagcga ctgcctggtc tgccgcaaat tccgagacga agccacgtgc 780
aaggacacct gccccccact catgctctac aaccccacca cgtaccagat ggatgtgaac 840
cccgagggca aatacagctt tggtgccacc tgcgtgaaga agtgtccccg taattatgtg 900
gtgacagatc acggctcgtg cgtccgagcc tgtggggccg acagctatga gatggaggaa 960
gacggcgtcc gcaagtgtaa gaagtgcgaa gggccttgcc gcaaagtgtg taacggaata 1020
ggtattggtg aatttaaaga ctcactctcc ataaatgcta cgaatattaa acacttcaaa 1080
aactgcacct ccatcagtgg cgatctccac atcctgccgg tggcatttag gggtgactcc 1140
ttcacacata ctcctcctct ggatccacag gaactggata ttctgaaaac cgtaaaggaa 1200
atcacagggt ttttgctgat tcaggcttgg cctgaaaaca ggacggacct ccatgccttt 1260
gagaacctag aaatcatacg cggcaggacc aagcaacatg gtcagttttc tcttgcagtc 1320
gtcagcctga acataacatc cttgggatta cgctccctca aggagataag tgatggagat 1380
gtgataattt caggaaacaa aaatttgtgc tatgcaaata caataaactg gaaaaaactg 1440
tttgggacct ccggtcagaa aaccaaaatt ataagcaaca gaggtgaaaa cagctgcaag 1500
gccacaggcc aggtctgcca tgccttgtgc tcccccgagg gctgctgggg cccggagccc 1560
agggactgcg tctcttgccg gaatgtcagc cgaggcaggg aatgcgtgga caagtgcaac 1620
cttctggagg gtgagccaag ggagtttgtg gagaactctg agtgcataca gtgccaccca 1680
gagtgcctgc ctcaggccat gaacatcacc tgcacaggac ggggaccaga caactgtatc 1740
cagtgtgccc actacattga cggcccccac tgcgtcaaga cctgcccggc aggagtcatg 1800
ggagaaaaca acaccctggt ctggaagtac gcagacgccg gccatgtgtg ccacctgtgc 1860
catccaaact gcacctacgg atgcactggg ccaggtcttg aaggctgtcc aacgaatggg 1920
cctaagatcc cgtccatcgc cactgggatg gtgggggccc tcctcttgct gctggtggtg 1980
gccctgggga tcggcctctt catgcgaagg cgccacatcg ttcggaagcg cacgctgcgg 2040
aggctgctgc aggagaggga gcttgtggag cctcttacac ccagtggaga agctcccaac 2100
caagctctct tgaggatctt gaaggaaact gaattcaaaa agatcaaagt gctgggctcc 2160
ggtgcgttcg gcacggtgta taagggactc tggatcccag aaggtgagaa agttaaaatt 2220
cccgtcgcta tcaaggaatt aagagaagca acatctccga aagccaacaa ggaaatcctc 2280
gatgaagcct acgtgatggc cagcgtggac aacccccacg tgtgccgcct gctgggcatc 2340
tgcctcacct ccaccgtgca gctcatcacg cagctcatgc ccttcggctg cctcctggac 2400
tatgtccggg aacacaaaga caatattggc tcccagtacc tgctcaactg gtgtgtgcag 2460
atcgcaaagg gcatgaacta cttggaggac cgtcgcttgg tgcaccgcga cctggcagcc 2520
aggaacgtac tggtgaaaac accgcagcat gtcaagatca cagatttgg gctggccaaa 2580
ctgctgggtg cggaagagaa agaataccat gcagaaggag gcaaagtgcc tatcaagtgg 2640

atggcattgg aatcaatttt acacagaatc tatacccacc agagtgatgt ctggagctac 2700
ggggtgactg tttgggagtt gatgaccttt ggatccaagc catatgacgg aatccctgcc 2760
agcgagatct cctccatcct ggagaaagga gaacgcctcc ctcagccacc catatgtacc 2820
atcgatgtct acatgatcat ggtcaagtgc tggatgatag acgcagatag tcgcccaaag 2880
ttccgtgagt tgatcatcga attctccaaa atggcccgag acccccagcg ctaccttgtc 2940
attcaggggg atgaaagaat gcatttgcca agtcctacag actccaactt ctaccgtgcc 3000
ctgatggatg aagaagacat ggacgacgtg gtggatgccg acgagtacct catcccacag 3060
cagggcttct tcagcagccc ctccacgtca cggactcccc tcctgagctc tctgagtgca 3120
accagcaaca attccaccgt ggcttgcatt gatagaaatg ggctgcaaag ctgtcccatc 3180
aaggaagaca gcttcttgca gcgatacagc tcagacccca caggcgcctt gactgaggac 3240
agcatagacg acaccttcct cccagtgcct gaatacataa accagtccgt tcccaaaagg 3300
cccgctggct ctgtgcagaa tcctgtctat cacaatcagc ctctgaaccc cgcgcccagc 3360
agagacccac actaccagga cccccacagc actgcagtgg gcaaccccga gtatctcaac 3420
actgtccagc ccacctgtgt caacagcaca ttcgacagcc ctgcccactg ggcccagaaa 3480
ggcagccacc aaattagcct ggacaaccct gactaccagc aggacttctt tcccaaggaa 3540
gccaagccaa atggcatctt taagggctcc acagctgaaa atgcagaata cctaagggtc 3600
gcgccacaaa gcagtgaatt tattggagca tga 3633

<210> 344
<211> 1443
<212> DNA
<213> 智人(Homo sapiens)
<400> 344

atgagcgacg tggctattgt gaaggagggt tggctgcaca aacgagggga gtacatcaag 60
acctggcggc cacgctactt cctcctcaag aatgatggca ccttcattgg ctacaaggag 120
cggccgcagg atgtggacca acgtgaggct cccctcaaca acttctctgt ggcgcagtgc 180
cagctgatga agacggagcg gccccggccc aacaccttca tcatccgctg cctgcagtgg 240
accactgtca tcgaacgcac cttccatgtg gagactcctg aggagcggga ggagtggaca 300
accgccatcc agactgtggc tgacggcctc aagaagcagg aggaggagga gatggacttc 360
cggtcgggct cacccagtga caactcaggg gctgaagaga tggaggtgtc cctggccaag 420
cccaagcacc gcgtgaccat gaacgagttt gagtacctga agctgctggg caagggcact 480
ttcggcaagg tgatcctggt gaaggagaag gccacaggcc gctactacgc catgaagatc 540
ctcaagaagg aagtcatcgt ggccaaggac gaggtggccc acacactcac cgagaaccgc 600
gtcctgcaga actccaggca ccccttcctc acagccctga agtactcttt ccagacccac 660
gaccgcctct gctttgtcat ggagtacgcc aacgggggcg agctgttctt ccacctgtcc 720
cgggagcgtg tgttctccga ggaccgggcc cgcttctatg gcgctgagat tgtgtcagcc 780
ctggactacc tgcactcgga gaagaacgtg gtgtaccggg acctcaagct ggagaacctc 840
atgctggaca aggacgggca cattaagatc acagacttcg ggctgtgcaa ggaggggatc 900
aaggacggtg ccaccatgaa gacctttgc ggcacacctg agtacctggc ccccgaggtg 960
ctggaggaca atgactacgg ccgtgcagtg gactggtggg ggctgggcgt ggtcatgtac 1020

gagatgatgt gcggtcgcct gcccttctac aaccaggacc atgagaagct ttttgagctc 1080
atcctcatgg aggagatccg cttcccgcgc acgcttggtc ccgaggccaa gtccttgctt 1140
tcagggctgc tcaagaagga ccccaagcag aggcttggcg ggggctccga ggacgccaag 1200
gagatcatgc agcatcgctt ctttgccggt atcgtgtggc agcacgtgta cgagaagaag 1260
ctcagcccac ccttcaagcc ccaggtcacg tcggagactg acaccaggta ttttgatgag 1320
gagttcacgg cccagatgat caccatcaca ccacctgacc aagatgacag catggagtgt 1380
gtggacagcg agcgcaggcc ccacttcccc cagttctcct actcggccag cggcacggcc 1440
tga 1443

<210> 345
<211> 1182
<212> DNA
<213> 智人(Homo sapiens)
<400> 345
atgcccaaga agaagccgac gcccatccag ctgaacccgg cccccgacgg ctctgcagtt 60
aacgggacca gctctgcgga gaccaacttg gaggccttgc agaagaagct ggaggagcta 120
gagcttgatg agcagcagcg aaagcgcctt gaggcctttc ttacccagaa gcagaaggtg 180
ggagaactga aggatgacga ctttgagaag atcagtgagc tgggggctgg caatggcggt 240
gtggtgttca aggtctccca caagccttct ggcctggtca tggccagaaa gctaattcat 300
ctggagatca aacccgcaat ccggaaccag atcataaggg agctgcaggt tctgcatgag 360
tgcaactctc cgtacatcgt gggcttctat ggtgcgttct acagcgatgg cgagatcagt 420
atctgcatgg agcacatgga tggaggttct ctggatcaag tcctgaagaa agctggaaga 480
attcctgaac aaattttagg aaaagttagc attgctgtaa taaaaggcct gacatatctg 540
agggagaagc acaagatcat gcacagagat gtcaagccct ccaacatcct agtcaactcc 600
cgtggggaga tcaagctctg tgactttggg gtcagcgggc agctcatcga ctccatggcc 660
aactccttcg tgggcacaag gtcctacatg tcgccagaaa gactccaggg gactcattac 720
tctgtgcagt cagacatctg gagcatggga ctgtctctgg tagagatggc ggttgggagg 780
tatcccatcc ctcctccaga tgccaaggag ctggagctga tgtttgggtg ccaggtggaa 840
ggagatgcgg ctgagacccc acccaggcca aggacccccg ggaggcccct tagctcatac 900
ggaatggaca gccgacctcc catggcaatt tttgagttgt tggattacat agtcaacgag 960
cctcctccaa aactgcccag tggagtgttc agtctggaat ttcaagattt tgtgaataaa 1020
tgcttaataa aaaaccccgc agagagagca gatttgaagc aactcatggt tcatgctttt 1080
atcaagagat ctgatgctga ggaagtggat tttgcaggtt ggctctgctc caccatcggc 1140
cttaaccagc ccagcacacc aacccatgct gctggcgtct aa 1182

<210> 346
<211> 3168
<212> DNA
<213> 智人(Homo sapiens)
<400> 346
atggagctgg cggccttgtg ccgctggggg ctcctcctcg ccctcttgcc ccccggagcc 60

gcgagcaccc aagtgtgcac cggcacagac atgaagctgc ggctccctgc cagtcccgag 120
acccacctgg acatgctccg ccacctctac cagggctgcc aggtggtgca gggaaacctg 180
gaactcacct acctgcccac caatgccagc ctgtccttcc tgcaggatat ccaggaggtg 240
cagggctacg tgctcatcgc tcacaaccaa gtgaggcagg tcccactgca gaggctgcgg 300
attgtgcgag gcacccagct ctttgaggac aactatgccc tggccgtgct agacaatgga 360
gacccgctga acaataccac ccctgtcaca ggggcctccc caggaggcct gcgggagctg 420
cagcttcgaa gcctcacaga gatcttgaaa ggaggggtct tgatccagcg gaacccccag 480
ctctgctacc aggacacgat tttgtggaag gacatcttcc acaagaacaa ccagctggct 540
ctcacactga tagacaccaa ccgctctcgg gcctgccacc cctgttctcc gatgtgtaag 600
ggctcccgct gctggggaga gagttctgag gattgtcaga gcctgacgcg cactgtctgt 660
gccggtggct gtgcccgctg caaggggcca ctgcccactg actgctgcca tgagcagtgt 720
gctgccggct gcacgggccc caagcactct gactgcctgg cctgcctcca cttcaaccac 780
agtggcatct gtgagctgca ctgcccagcc ctggtcacct acaacacaga cacgtttgag 840
tccatgccca atcccgaggg ccggtataca ttcggcgcca gctgtgtgac tgcctgtccc 900
tacaactacc tttctacgga cgtgggatcc tgcaccctcg tctgccccct gcacaaccaa 960
gaggtgacag cagaggatgg aacacagcgg tgtgagaagt gcagcaagcc ctgtgcccga 1020
gtgtgctatg gtctgggcat ggagcacttg cgagaggtga gggcagttac cagtgccaat 1080
atccaggagt ttgctggctg caagaagatc tttgggagcc tggcatttct gccggagagc 1140
tttgatgggg acccagcctc caacactgcc ccgctccagc cagagcagct ccaagtgttt 1200
gagactctgg aagagatcac aggttaccta tacatctcag catggccgga cagcctgcct 1260
gacctcagcg tcttccagaa cctgcaagta atccggggac gaattctgca caatggcgcc 1320
tactcgctga ccctgcaagg gctgggcatc agctggctgg ggctgcgctc actgagggaa 1380
ctgggcagtg gactggccct catccaccat aacacccacc tctgcttcgt gcacacggtg 1440
ccctgggacc agctctttcg gaacccgcac caagctctgc tccacactgc caaccggcca 1500
gaggacgagt gtgtgggcga gggcctggcc tgccaccagc tgtgcgcccg agggcactgc 1560
tggggtccag ggcccaccca gtgtgtcaac tgcagccagt tccttcgggg ccaggagtgc 1620
gtggaggaat gccgagtact gcaggggctc cccagggagt atgtgaatgc caggcactgt 1680
ttgccgtgcc accctgagtg tcagccccag aatggctcag tgacctgttt tggaccggag 1740
gctgaccagt gtgtggcctg tgcccactat aaggaccctc ccttctgcgt ggcccgctgc 1800
cccagcggtg tgaaacctga cctctcctac atgcccatct ggaagtttcc agatgaggag 1860
ggcgcatgcc agccttgccc catcaactgc acccactcct gtgtggacct ggatgacaag 1920
ggctgccccg ccgagcagag agccagccct ctgacgtcca tcatctctgc ggtggttggc 1980
attctgctgg tcgtggtctt gggggtggtc tttgggatcc tcatcaagcg acggcagcag 2040
aagatccgga agtacacgat gcggagactg ctgcaggaaa cggagctggt ggagccgctg 2100
acacctagcg gagcgatgcc caaccaggcg cagatgcgga tcctgaaaga gacggagctg 2160
aggaaggtga aggtgcttgg atctggcgct tttggcacag tctacaaggg catctggatc 2220
cctgatgggg agaatgtgaa aattccagtg gccatcaaag tgttgaggga aaacacatcc 2280
cccaaagcca acaaagaaat cttagacgaa gcatacgtga tggctggtgt gggctcccca 2340
tatgtctccc gccttctggg catctgcctg acatccacgg tgcagctggt gacacagctt 2400

atgccctatg gctgcctctt agaccatgtc cgggaaaacc gcggacgcct gggctcccag 2460
gacctgctga actggtgtat gcagattgcc aaggggatga gctacctgga ggatgtgcgg 2520
ctcgtacaca gggacttggc cgctcggaac gtgctggtca agagtcccaa ccatgtcaaa 2580
attacagact tcgggctggc tcggctgctg gacattgacg agacagagta ccatgcagat 2640
gggggcaagg tgcccatcaa gtggatggcg ctggagtcca ttctccgccg gcggttcacc 2700
caccagagtg atgtgtggag ttatggtgtg actgtgtggg agctgatgac ttttggggcc 2760
aaaccttacg atgggatccc agcccgggag atccctgacc tgctggaaaa gggggagcgg 2820
ctgccccagc cccccatctg caccattgat gtctacatga tcatggtcaa atgttggatg 2880
attgactctg aatgtcggcc aagattccgg gagttggtgt ctgaattctc ccgcatggcc 2940
agggaccccc agcgctttgt ggtcatccag aatgaggact tgggcccagc cagtcccttg 3000
gacagcacct tctaccgctc actgctggag gacgatgaca tgggggacct ggtggatgct 3060
gaggagtatc tggtacccca gcagggcttc ttctgtccag accctgcccc gggcgctggg 3120
ggcatggtcc accacaggca ccgcagctca tctaccagga atatgtga 3168

<210> 347
<211> 4863
<212> DNA
<213> 智人(Homo sapiens)
<400> 347

atgggagcca tcgggctcct gtggctcctg ccgctgctgc tttccacggc agctgtgggc 60
tccgggatgg ggaccggcca gcgcgcgggc tccccagctg cggggccgcc gctgcagccc 120
cgggagccac tcagctactc gcgcctgcag aggaagagtc tggcagttga cttcgtggtg 180
ccctcgctct tccgtgtcta cgcccgggac ctactgctgc caccatcctc ctcggagctg 240
aaggctggca ggcccgaggc ccgcggctcg ctagctctgg actgcgcccc gctgctcagg 300
ttgctggggc cggcgccggg ggtctcctgg accgccggtt caccagcccc ggcagaggcc 360
cggacgctgt ccagggtgct gaagggcggc tccgtgcgca agctccggcg tgccaagcag 420
ttggtgctgg agctgggcga ggaggcgatc ttggagggtt gcgtcgggcc ccccggggag 480
gcggctgtgg ggctgctcca gttcaatctc agcgagctgt tcagttggtg gattcgccaa 540
ggcgaagggc gactgaggat ccgcctgatg cccgagaaga aggcgtcgga agtgggcaga 600
gagggaaggc tgtccgcggc aattcgcgcc tcccagcccc gccttctctt ccagatcttc 660
gggactggtc atagctcctt ggaatcacca acaaacatgc cttctccttc tcctgattat 720
tttacatgga atctcacctg gataatgaaa gactccttcc ctttcctgtc tcatcgcagc 780
cgatatggtc tggagtgcag ctttgacttc ccctgtgagc tggagtattc ccctccactg 840
catgacctca ggaaccagag ctggtcctgg cgccgcatcc cctccgagga ggcctcccag 900
atggacttgc tggatgggcc tggggcagag cgttctaagg agatgcccag aggctccttt 960
ctccttctca acacctcagc tgactccaag cacaccatcc tgagtccgtg gatgaggagc 1020
agcagtgagc actgcacact ggccgtctcg gtgcacaggc acctgcagcc ctctggaagg 1080
tacattgccc agctgctgcc ccacaacgag gctgcaagag agatcctcct gatgcccact 1140
ccagggaagc atggttggac agtgctccag ggaagaatcg ggcgtccaga caacccattt 1200
cgagtggccc tggaatacat ctccagtgga aaccgcagct tgtctgcagt ggacttcttt 1260

gccctgaaga actgcagtga aggaacatcc ccaggctcca agatggccct gcagagctcc 1320
ttcacttgtt ggaatgggac agtcctccag cttgggcagg cctgtgactt ccaccaggac 1380
tgtgcccagg gagaagatga gagccagatg tgccggaaac tgcctgtggg tttttactgc 1440
aactttgaag atggcttctg tggctggacc caaggcacac tgtcacccca cactcctcaa 1500
tggcaggtca ggaccctaaa ggatgcccgg ttccaggacc accaagacca tgctctattg 1560
ctcagtacca ctgatgtccc cgcttctgaa agtgctacag tgaccagtgc tacgtttcct 1620
gcaccgatca agagctctcc atgtgagctc cgaatgtcct ggctcattcg tggagtcttg 1680
aggggaaacg tgtccttggt gctagtggag aacaaaaccg ggaaggagca aggcaggatg 1740
gtctggcatg tcgccgccta tgaaggcttg agcctgtggc agtggatggt gttgcctctc 1800
ctcgatgtgt ctgacaggtt ctggctgcag atggtcgcat ggtggggaca aggatccaga 1860
gccatcgtgg cttttgacaa tatctccatc agcctggact gctacctcac cattagcgga 1920
gaggacaaga tcctgcagaa tacagcaccc aaatcaagaa acctgtttga gagaaaccca 1980
aacaaggagc tgaaacccgg ggaaaattca ccaagacaga cccccatctt tgaccctaca 2040
gttcattggc tgttcaccac atgtggggcc agcgggcccc atggccccac ccaggcacag 2100
tgcaacaacg cctaccagaa ctccaacctg agcgtggagg tggggagcga gggccccctg 2160
aaaggcatcc agatctggaa ggtgccagcc accgacacct acagcatctc gggctacgga 2220
gctgctggcg ggaaaggcgg gaagaacacc atgatgcggt cccacggcgt gtctgtgctg 2280
ggcatcttca acctggagaa ggatgacatg ctgtacatcc tggttgggca gcagggagag 2340
gacgcctgcc ccagtacaaa ccagttaatc cagaaagtct gcattggaga gaacaatgtg 2400
atagaagaag aaatccgtgt gaacagaagc gtgcatgagt gggcaggagg cggaggagga 2460
gggggtggag ccacctacgt atttaagatg aaggatggag tgccggtgcc cctgatcatt 2520
gcagccggag gtggtggcag ggcctacggg gccaagacag acacgttcca cccagagaga 2580
ctggagaata actcctcggt tctagggcta aacggcaatt ccggagccgc aggtggtgga 2640
ggtggctgga atgataacac ttccttgctc tgggccggaa aatctttgca ggagggtgcc 2700
accggaggac attcctgccc ccaggccatg aagaagtggg ggtgggagac aagagggggt 2760
ttcggagggg gtggaggggg gtgctcctca ggtggaggag gcggaggata tataggcggc 2820
aatgcagcct caaacaatga ccccgaaatg gatggggaag atggggtttc cttcatcagt 2880
ccactgggca tcctgtacac cccagcttta aaagtgatgg aaggccacgg ggaagtgaat 2940
attaagcatt atctaaactg cagtcactgt gaggtagacg aatgtcacat ggaccctgaa 3000
agccacaagg tcatctgctt ctgtgaccac gggacggtgc tggctgagga tggcgtctcc 3060
tgcattgtgt cacccacccc ggagccacac ctgccactct cgctgatcct ctctgtggtg 3120
acctctgccc tcgtggccgc cctggtcctg gctttctccg gcatcatgat tgtgtaccgc 3180
cggaagcacc aggagctgca agccatgcag atggagctgc agagccctga gtacaagctg 3240
agcaagctcc gcacctcgac catcatgacc gactacaacc ccaactactg ctttgctggc 3300
aagacctcct ccatcagtga cctgaaggag gtgccgcgga aaaacatcac cctcattcgg 3360
ggtctgggcc atggcgcctt tggggaggtg tatgaaggcc aggtgtccgg aatgcccaac 3420
gacccaagcc ccctgcaagt ggctgtgaag acgctgcctg aagtgtgctc tgaacaggac 3480
gaactggatt tcctcatgga agccctgatc atcagcaaat tcaaccacca gaacattgtt 3540
cgctgcattg gggtgagcct gcaatccctg ccccggttca tcctgctgga gctcatggcg 3600

gggggagacc tcaagtcctt cctccgagag acccgccctc gcccgagcca gccctcctcc 3660
ctggccatgc tggaccttct gcacgtggct cgggacattg cctgtggctg tcagtatttg 3720
gaggaaaacc acttcatcca ccgagacatt gctgccagaa actgcctctt gacctgtcca 3780
ggccctggaa gagtggccaa gattggagac ttcgggatgg cccgagacat ctacagggcg 3840
agctactata gaaagggagg ctgtgccatg ctgccagtta agtggatgcc cccagaggcc 3900
ttcatggaag gaatattcac ttctaaaaca gacacatggt cctttggagt gctgctatgg 3960
gaaatctttt ctcttggata tatgccatac cccagcaaaa gcaaccagga agttctggag 4020
tttgtcacca gtggaggccg gatggaccca cccaagaact gccctgggcc tgtataccgg 4080
ataatgactc agtgctggca acatcagcct gaagacaggc ccaactttgc catcattttg 4140
gagaggattg aatactgcac ccaggacccg gatgtaatca acaccgcttt gccgatagaa 4200
tatggtccac ttgtggaaga ggaagagaaa gtgcctgtga ggcccaagga ccctgagggg 4260
gttcctcctc tcctggtctc tcaacaggca aaacgggagg aggagcgcag cccagctgcc 4320
ccaccacctc tgcctaccac ctcctctggc aaggctgcaa agaaacccac agctgcagag 4380
atctctgttc gagtccctag agggccggcc gtggaagggg gacacgtgaa tatggcattc 4440
tctcagtcca accctccttc ggagttgcac aaggtccacg gatccagaaa caagcccacc 4500
agcttgtgga acccaacgta cggctcctgg tttacagaga aacccaccaa aaagaataat 4560
cctatagcaa agaaggagcc acacgacagg ggtaacctgg ggctggaggg aagctgtact 4620
gtcccaccta acgttgcaac tgggagactt ccgggggcct cactgctcct agagccctct 4680
tcgctgactg ccaatatgaa ggaggtacct ctgttcaggc tacgtcactt cccttgtggg 4740
aatgtcaatt acggctacca gcaacagggc ttgcccttag aagccgctac tgcccctgga 4800
gctggtcatt acgaggatac cattctgaaa agcaagaata gcatgaacca gcctgggccc 4860
tga 4863

<210> 348
<211> 7044
<212> DNA
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 348
atgaagaaca tttactgtct tattccgaag cttgtcaatt ttgcaactct tggctgccta 60
tggatttctg tggtgcagtg tacagtttta aatagctgcc taaagtcgtg tgtaactaat 120
ctgggccagc agcttgacct tggcacacca cataatctga gtgaaccgtg tatccaagga 180
tgtcactttt ggaactctgt agatcagaaa aactgtgctt taaagtgtcg ggagtcgtgt 240
gaggttggct gtagcagcgc ggaaggtgca tatgaagagg aagtactgga aaatgcagac 300
ctaccaactg ctccctttgc ttcttccatt ggaagccaca atatgacatt acgatggaaa 360
tctgcaaact tctctggagt aaaatacatc attcagtgga aatatgcaca acttctggga 420
agctggactt atactaagac tgtgtccaga ccgtcctatg tggtcaagcc cctgcacccc 480
ttcactgagt acattttccg agtggtttgg atcttcacag cgcagctgca gctctactcc 540
cctccaagtc ccagttacag gactcatcct catggagttc ctgaaactgc acctttgatt 600
aggaatattg agagctcaag tcccgacact gtggaagtca gctgggatcc acctcaattc 660
ccaggtggac ctattttggg ttataactta aggctgatca gcaaaaatca aaaattagat 720

gcagggacac agagaaccag tttccagttt tactccactt taccaaatac tatctacagg 780
ttttctattg cagcagtaaa tgaagttggt gagggtccag aagcagaatc tagtattacc 840
acttcatctt cagcagttca acaagaggaa cagtggctct ttttatccag aaaaacttct 900
ctaagaaaga gatctttaaa acatttagta gatgaagcac attgccttcg gttggatgct 960
atataccata atattacagg aatatctgtt gatgtccacc agcaaattgt ttatttctct 1020
gaaggaactc tcatatgggc gaagaaggct gccaacatgt ctgatgtatc tgacctgaga 1080
atttttaca gaggttcagg attaatttct tctatctcca tagattggct ttatcaaaga 1140
atgtatttca tcatggatga actggtatgt gtctgtgatt tagagaactg ctcaaacatc 1200
gaggaaatta ctccaccctc tattagtgca cctcaaaaaa ttgtggctga ttcatacaat 1260
gggtatgtct tttacctcct gagagatggc atttatagag cagaccttcc tgtaccatct 1320
ggccggtgtg cagaagctgt gcgtattgtg gagagttgca cgttaaagga ctttgcaatc 1380
aagccacaag ccaagcgaat catttacttc aatgacactg cccaagtctt catgtcaaca 1440
tttctggatg gctctgcttc ccatctcatc ctacctcgca tccccttttgc tgatgtgaaa 1500
agttttgctt gtgaaaacaa tgactttctt gtcacagatg gcaaggtcat tttccaacag 1560
gatgctttgt cttttaatga attcatcgtg ggatgtgacc tgagtcacat agaagaattt 1620
gggtttggta acttggtcat ctttggctca tcctcccagc tgcaccctct gccaggccgc 1680
ccgcaggagc tttcggtgct gtttggctct caccaggctc ttgttcaatg gaagcctcct 1740
gcccttgcca taggagccaa tgtcatcctg atcagtgata ttattgaact ctttgaatta 1800
ggcccttctg cctggcagaa ctggacctat gaggtgaaag tatccaccca agaccctcct 1860
gaagtcactc atattttctt gaacataagt ggaaccatgc tgaatgtacc tgagctgcag 1920
agtgctatga aatacaaggt ttctgtgaga gcaagttctc caaagaggcc aggcccctgg 1980
tcagagccct cagtgggtac taccctggtg ccagctagtg aaccaccatt tatcatggct 2040
gtgaaagaag atgggctttg gagtaaacca ttaaatagct ttggcccagg agagttctta 2100
tcctctgata taggaaatgt gtcagacatg gattggtata acaacagcct ctactacagt 2160
gacacgaaag gcgacgtttt tgtgtggctg ctgaatggga cggatatctc agagaattat 2220
cacctaccca gcattgcagg agcaggggct ttagcttttg agtggctggg tcactttctc 2280
tactgggctg gaaagacata tgtgatacaa aggcagtctg tgttgacggg acacacagac 2340
attgttaccc acgtgaagct attggtgaat gacatggtgg tggattcagt tggtggatat 2400
ctctactgga ccacactcta ttcagtggaa agcaccagac taaatgggga aagttccctt 2460
gtactacaga cacagccttg gttttctggg aaaaaggtaa ttgctctaac tttagacctc 2520
agtgatgggc tcctgtattg gttggttcaa gacagtcaat gtattcacct gtacacagct 2580
gttcttcggg gacagagcac tggggatacc accatcacag aatttgcagc ctggagtact 2640
tctgaaattt cccagaatgc actgatgtac tatagtggtc ggctgttctg gatcaatggc 2700
tttaggatta tcacaactca agaaataggt cagaaaacca gtgtctctgt tttggaacca 2760
gccagattta atcagttcac aattattcag acatccctta agcccctgcc agggaacttt 2820
tcctttaccc ctaaggttat tccagattct gttcaagagt cttcatttag gattgaagga 2880
aatgcttcaa gttttcaaat cctgtggaat ggtccccctg cggtagactg gggtgtagtt 2940
ttctacagtg tagaatttag tgctcattct aagttcttgg ctagtgaaca acactcttta 3000
cctgtattta ctgtggaagg actggaacct tatgccttat ttaatctttc tgtcactcct 3060

tatacctact ggggaaaggg ccccaaaaca tctctgtcac ttcgagcacc tgaaacagtt 3120
ccatcagcac cagagaaccc cagaatattt atattaccaa gtggaaaatg ctgcaacaag 3180
aatgaagttg tggtggaatt taggtggaac aaacctaagc atgaaaatgg ggtgttaaca 3240
aaatttgaaa ttttctacaa tatatccaat caaagtatta caaacaaaac atgtgaagac 3300
tggattgctg tcaatgtcac tccctcagtg atgtctttc aacttgaagg catgagtccc 3360
agatgcttta ttgccttcca ggttagggcc tttacatcta aggggccagg accatatgct 3420
gacgttgtaa agtctacaac atcagaaatc aacccatttc ctcacctcat aactcttctt 3480
ggtaacaaga tagttttttt agatatggat caaaatcaag ttgtgtggac gttttcagca 3540
gaaagagtta tcagtgccgt ttgctacaca gctgataatg agatgggata ttatgctgaa 3600
ggggactcac tctttcttct gcacttgcac aatcgctcta gctctgagct tttccaagat 3660
tcactggttt ttgatatcac agttattaca attgactgga tttcaaggca cctctacttt 3720
gcactgaaag aatcacaaaa tggaatgcaa gtatttgatg ttgatcttga acacaaggtg 3780
aaatatccca gagaggtgaa gattcacaat aggaattcaa caataatttc tttttctgta 3840
tatcctcttt taagtcgctt gtattggaca gaagtttcca attttggcta ccagatgttc 3900
tactacagta ttatcagtca caccttgcac cgaattctgc aacccacagc tacaaaccaa 3960
caaaacaaaa ggaatcaatg ttcttgtaat gtgactgaat ttgagttaag tggagcaatg 4020
gctattgata cctctaacct agagaaacca ttgatatact ttgccaaagc acaagagatc 4080
tgggcaatgg atctggaagg ctgtcagtgt tggagagtta tcacagtacc tgctatgctc 4140
gcaggaaaaa cccttgttag cttaactgtg gatggagatc ttatatactg gatcatcaca 4200
gcaaaggaca gcacacagat ttatcaggca aagaaaggaa atggggccat cgtttcccag 4260
gtgaaggccc taaggagtag gcatatcttg gcttacagtt cagttatgca gccttttcca 4320
gataaagcgt ttctgtctct agcttcagac actgtggaac caactatact taatgccact 4380
aacactagcc tcacaatcag attacctctg gccaagacaa acctcacatg gtatggcatc 4440
accagcccta ctccaacata cctggtttat tatgcagaag ttaatgacag gaaaaacagc 4500
tctgacttga aatatagaat tctggaattt caggacagta tagctcttat tgaagattta 4560
caaccatttt caacatacat gatacagata gctgtaaaaa attattattc agatcctttg 4620
gaacatttac caccaggaaa agagatttgg ggaaaaacta aaaatggagt accagaggca 4680
gtgcagctca ttaatacaac tgtgcggtca gacaccagcc tcattatatc ttggagagaa 4740
tctcacaagc caaatggacc taaagaatca gtccgttatc agttggcaat ctcacacctg 4800
gccctaattc ctgaaactcc tctaagacaa agtgaatttc caaatggaag gctcactctc 4860
cttgttacta gactgtctgg tggaaatatt tatgtgttaa aggttcttgc ctgccactct 4920
gaggaaatgt ggtgtacaga gagtcatcct gtcactgtgg aaatgtttaa cacaccagag 4980
aaaccttatt ccttggttcc agagaacact agtttgcaat ttaattggaa ggctccattg 5040
aatgttaacc tcatcagatt ttgggttgag ctacagaagt ggaaatacaa tgagttttac 5100
catgttaaaa cttcatgcag ccaaggtcct gcttatgtct gtaatatcac aaatctacaa 5160
ccttatactt catataatgt cagagtagtg gtggtttata agacgggaga aaatagcacc 5220
tcacttccag aaagctttaa gacaaaagct ggagtcccaa ataaaccagg cattcccaaa 5280
ttactagaag ggagtaaaaa ttcaatacag tgggagaaag ctgaagataa tggatgtaga 5340
attacatact atatccttga gataagaaag agcacttcaa ataatttaca gaaccagaat 5400

ttaaggtgga agatgacatt taatggatcc tgcagtagtg tttgcacatg gaagtccaaa 5460
aacctgaaag gaatatttca gttcagagta gtagctgcaa ataatctagg gtttggtgaa 5520
tatagtggaa tcagtgagaa tattatatta gttggagatg atttttggat accagaaaca 5580
agtttcatac ttactattat agttggaata tttctggttg ttacaatccc actgaccttt 5640
gtctggcata gaagattaaa gaatcaaaaa agtgccaagg aaggggtgac agtgcttata 5700
aacgaagaca aagagttggc tgagctgcga ggtctggcag ccggagtagg cctggctaat 5760
gcctgctatg caatacatac tcttccaacc caagaggaga ttgaaaatct tcctgccttc 5820
cctcgggaaa aactgactct gcgtctcttg ctgggaagtg gagcctttgg agaagtgtat 5880
gaaggaacag cagtggacat cttaggagtt ggaagtggag aaatcaaagt agcagtgaag 5940
actttgaaga agggttccac agaccaggag aagattgaat tcctgaagga ggcacatctg 6000
atgagcaaat ttaatcatcc caacattctg aagcagcttg gagtttgtct gctgaatgaa 6060
ccccaataca ttatcctgga actgatggag ggaggagacc ttcttactta tttgcgtaaa 6120
gcccggatgg caacgtttta tggtccttta ctcaccttgg ttgaccttgt agacctgtgt 6180
gtagatattt caaaaggctg tgtctacttg gaacggatgc atttcattca cagggatctg 6240
gcagctagaa attgccttgt ttccgtgaaa gactatacca gtccacggat agtgaagatt 6300
ggagactttg gactcgccag agacatctat aaaaatgatt actatagaaa gagaggggaa 6360
ggcctgctcc cagttcggtg gatggctcca gaaagtttga tggatggaat cttcactact 6420
caatctgatg tatggtcttt tggaattctg atttgggaga ttttaactct tggtcatcag 6480
ccttatccag ctcattccaa ccttgatgtg ttaaactatg tgcaaacagg agggagactg 6540
gagccaccaa gaaattgtcc tgatgatctg tggaatttaa tgacccagtg ctgggctcaa 6600
gaacccgacc aaagacctac ttttcataga attcaggacc aacttcagtt attcagaaat 6660
tttttcttaa atagcattta taagtccaga gatgaagcaa acaacagtgg agtcataaat 6720
gaaagctttg aaggtgaaga tggcgatgtg atttgtttga attcagatga cattatgcca 6780
gttgctttaa tggaaacgaa gaaccgagaa gggttaaact atatggtact tgctacagaa 6840
tgtggccaag gtgaagaaaa gtctgagggt cctctaggct cccaggaatc tgaatcttgt 6900
ggtctgagga aagaagagaa ggaaccacat gcagacaaag atttctgcca agaaaaacaa 6960
gtggcttact gcccttctgg caagcctgaa ggcctgaact atgcctgtct cactcacagt 7020
ggatatggag atgggtctga ttaa 7044

<210> 349
<211> 3219
<212> DNA
<213> 智人(Homo sapiens)
<400> 349
atggcgaagg cgacgtccgg tgccgcgggg ctgcgtctgc tgttgctgct gctgctgccg 60
ctgctaggca aagtggcatt gggcctctac ttctcgaggg atgcttactg ggagaagctg 120
tatgtggacc aggcagccgg cacgcccttg ctgtacgtcc atgccctgcg ggacgcccct 180
gaggaggtgc ccagcttccg cctgggccag catctctacg gcacgtaccg cacacggctg 240
catgagaaca actggatctg catccaggag gacaccggcc tcctctacct taaccggagc 300
ctggaccata gctcctggga gaagctcagt gtccgcaacc gcggctttcc cctgctcacc 360

gtctacctca aggtcttcct gtcacccaca tcccttcgtg agggcgagtg ccagtggcca 420
ggctgtgccc gcgtatactt ctccttcttc aacacctcct ttccagcctg cagctccctc 480
aagccccggg agctctgctt cccagagaca aggccctcct tccgcattcg ggagaaccga 540
cccccaggca ccttccacca gttccgcctg ctgcctgtgc agttcttgtg ccccaacatc 600
agcgtggcct acaggctcct ggagggtgag ggtctgccct tccgctgcgc cccggacagc 660
ctggaggtga gcacgcgctg ggccctggac cgcgagcagc gggagaagta cgagctggtg 720
gccgtgtgca ccgtgcacgc cggcgcgcgc gaggaggtgg tgatggtgcc cttcccggtg 780
accgtgtacg acgaggacga ctcggcgccc accttccccg cgggcgtcga caccgccagc 840
gccgtggtgg agttcaagcg gaaggaggac accgtggtgg ccacgctgcg tgtcttcgat 900
gcagacgtgg tacctgcatc aggggagctg gtgaggcggt acacaagcac gctgctcccc 960
ggggacacct gggcccagca gaccttccgg gtggaacact ggcccaacga gacctcggtc 1020
caggccaacg gcagcttcgt gcgggcgacc gtacatgact ataggctggt tctcaaccgg 1080
aacctctcca tctcggagaa ccgcaccatg cagctggcgg tgctggtcaa tgactcagac 1140
ttccagggcc caggagcggg cgtcctcttg ctccacttca acgtgtcggt gctgccggtc 1200
agcctgcacc tgcccagtac ctactccctc tccgtgagca ggagggctcg ccgatttgcc 1260
cagatcggga aagtctgtgt ggaaaactgc caggcattca gtggcatcaa cgtccagtac 1320
aagctgcatt cctctggtgc caactgcagc acgctagggg tggtcacctc agccgaggac 1380
acctcgggga tcctgtttgt gaatgacacc aaggccctgc ggcggcccaa gtgtgccgaa 1440
cttcactaca tggtggtggc caccgaccag cagacctcta ggcaggccca ggcccagctg 1500
cttgtaacag tggaggggtc atatgtggcc gaggaggcgg gctgcccccc gtcctgtgca 1560
gtcagcaaga gacggctgga gtgtgaggag tgtggcggcc tgggctcccc aacaggcagg 1620
tgtgagtgga ggcaaggaga tggcaaaggg atcaccagga acttctccac ctgctctccc 1680
agcaccaaga cctgccccga cggccactgc gatgttgtgg agacccaaga catcaacatt 1740
tgccctcagg actgcctccg gggcagcatt gttgggggac acgagcctgg ggagccccgg 1800
gggattaaag ctggctatgg cacctgcaac tgcttccctg aggaggagaa gtgcttctgc 1860
gagcccgaag acatccagga tccactgtgc gacgagctgt gccgcacggt gatcgcagcc 1920
gctgtcctct tctccttcat cgtctcggtg ctgctgtctg ccttctgcat ccactgctac 1980
cacaagtttg cccacaagcc acccatctcc tcagctgaga tgaccttccg gaggcccgcc 2040
caggccttcc cggtcagcta ctcctcttcc ggtgcccgcc ggccctcgct ggactccatg 2100
gagaaccagg tctccgtgga tgccttcaag atcctggagg atccaaagtg ggaattccct 2160
cggaagaact tggttcttgg aaaaactcta ggagaaggcg aatttggaaa agtggtcaag 2220
gcaacggcct tccatctgaa aggcagagca gggtacacca cggtggccgt gaagatgctg 2280
aaagagaacg cctccccgag tgagctgcga gacctgctgt cagagttcaa cgtcctgaag 2340
caggtcaacc acccacatgt catcaaattg tatggggcct gcagccagga tggcccgctc 2400
ctcctcatcg tggagtacgc caaatacggc tccctgcggg gcttcctccg cgagagccgc 2460
aaagtggggc ctggctacct gggcagtgga ggcagccgca actccagctc cctggaccac 2520
ccggatgagc gggccctcac catgggcgac ctcatctcat ttgcctggca gatctcacag 2580
gggatgcagt atctggccga gatgaagctc gttcatcggg acttggcagc cagaaacatc 2640
ctggtagctg aggggcggaa gatgaagatt tcggatttcg gcttgtcccg agatgtttat 2700

gaagaggatt cctacgtgaa gaggagccag ggtcggattc cagttaaatg gatggcaatt 2760
gaatcccttt ttgatcatat ctacaccacg caaagtgatg tatggtcttt tggtgtcctg 2820
ctgtgggaga tcgtgaccct agggggaaac ccctatcctg ggattcctcc tgagcggctc 2880
ttcaaccttc tgaagaccgg ccaccggatg gagaggccag acaactgcag cgaggagatg 2940
taccgcctga tgctgcaatg ctggaagcag gagccggaca aaaggccggt gtttgcggac 3000
atcagcaaag acctggagaa gatgatggtt aagaggagag actacttgga ccttgcggcg 3060
tccactccat ctgactccct gatttatgac gacggcctct cagaggagga gacaccgctg 3120
gtggactgta ataatgcccc cctccctcga gccctccctt ccacatggat tgaaaacaaa 3180
ctctatggta gaatttccca tgcatttact agattctag 3219

<210> 350
<211> 2283
<212> DNA
<213> 智人(Homo sapiens)
<400> 350

atgaaggagg ccgccctcat ctgcctggca ccctctgtac ccccgatctt gacggtgaag 60
tcctgggaca ccatgcagtt gcgggctgct agatctcggt gcacaaactt gttggcagca 120
agctacatcg agaaccagca gcatctgcag catctggagc tccgtgatct gaggggcctg 180
ggggagctga gaaacctcac catcgtgaag agtggtctcc gtttcgtggc gccagatgcc 240
ttccatttca ctcctcggct cagtcgcctg aatctctcct tcaacgctct ggagtctctc 300
tcctggaaaa ctgtgcaggg cctctcctta caggaactgg tcctgtcggg gaaccctctg 360
cactgttctt gtgccctgcg ctggctacag cgctgggagg aggagggact gggcggagtg 420
cctgaacaga agctgcagtg tcatgggcaa gggcccctgg cccacatgcc caatgccagc 480
tgtggtgtgc ccacgctgaa ggtccaggtg cccaatgcct cggtggatgt gggggacgac 540
gtgctgctgc ggtgccaggt ggaggggcgg ggcctggagc aggccggctg gatcctcaca 600
gagctggagc agtcagccac ggtgatgaaa tctgggggtc tgccatccct ggggctgacc 660
ctggccaatg tcaccagtga cctcaacagg aagaacgtga cgtgctgggc agagaacgat 720
gtgggccggg cagaggtctc tgttcaggtc aacgtctcct tcccggccag tgtgcagctg 780
cacacggcgg tggagatgca ccactggtgc atccccttct ctgtggatgg gcagccggca 840
ccgtctctgc gctggctctt caatggctcc gtgctcaatg agaccagctt catcttcact 900
gagttcctgg agccggcagc caatgagacc gtgcggcacg ggtgtctgcg cctcaaccag 960
cccacccacg tcaacaacgg caactacacg ctgctggctg ccaacccctt cggccaggcc 1020
tccgcctcca tcatggctgc cttcatggac aacccctttcg agttcaaccc cgaggacccc 1080
atccctgaca ctaacagcac atctggagac ccggtggaga agaaggacga aacacctttt 1140
ggggtctcgg tggctgtggg cctggccgtc tttgcctgcc tcttcctttc tacgctgctc 1200
cttgtgctca acaaatgtgg acggagaaac aagtttggga tcaaccgccc ggctgtgctg 1260
gctccagagg atgggctggc catgtccctg catttcatga cattgggtgg cagctccctg 1320
tcccccaccg agggcaaagg ctctgggctc caaggccaca tcatcgagaa cccacaatac 1380
ttcagtgatg cctgtgttca ccacatcaag cgccgggaca tcgtgctcaa gtgggagctg 1440
ggggagggcg cctttgggaa ggtcttcctt gctgagtgcc acaacctcct gcctgagcag 1500

gacaagatgc tggtggctgt caaggcactg aaggaggcgt ccgagagtgc tcggcaggac 1560
ttccagcgtg aggctgagct gctcaccatg ctgcagcacc agcacatcgt gcgcttcttc 1620
ggcgtctgca ccgagggccg ccccctgctc atggtctttg agtatatgcg gcacggggac 1680
ctcaaccgct tcctccgatc ccatggacct gatgccaagc tgctggctgg tggggaggat 1740
gtggctccag gccccctggg tctggggcag ctgctggccg tggctagcca ggtcgctgcg 1800
gggatggtgt acctggcggg tctgcatttt gtgcaccggg acctggccac acgcaactgt 1860
ctagtgggcc agggactggt ggtcaagatt ggtgattttg gcatgagcag ggatatctac 1920
agcaccgact attaccgtgt gggaggccgc accatgctgc ccattcgctg gatgccgccc 1980
gagagcatcc tgtaccgtaa gttcaccacc gagagcgacg tgtggagctt cggcgtggtg 2040
ctctgggaga tcttcaccta cggcaagcag ccctggtacc agctctccaa cacggaggca 2100
atcgactgca tcacgcaggg acgtgagttg gagcggccac gtgcctgccc accagaggtc 2160
tacgccatca tgcggggctg ctggcagcgg gagccccagc aacgccacag catcaaggat 2220
gtgcacgccc ggctgcaagc cctggcccag gcacctcctg tctacctgga tgtcctgggc 2280
tag 2283

<210> 351
<211> 4227
<212> DNA
<213> 智人(Homo sapiens)
<400> 351

atgaaggccc ccgctgtgct tgcacctggc atcctcgtgc tcctgtttac cttggtgcag 60
aggagcaatg gggagtgtaa agaggcacta gcaaagtccg agatgaatgt gaatatgaag 120
tatcagcttc ccaacttcac cgcggaaaca cccatccaga atgtcattct acatgagcat 180
cacattttcc ttggtgccac taactacatt tatgttttaa atgaggaaga ccttcagaag 240
gttgctgagt acaagactgg gcctgtgctg gaacacccag attgtttccc atgtcaggac 300
tgcagcagca aagccaattt atcaggaggt gtttggaaag ataacatcaa catggctcta 360
gttgtcgaca cctactatga tgatcaactc attagctgtg gcagcgtcaa cagagggacc 420
tgccagcgac atgtctttcc ccacaatcat actgctgaca tacagtcgga ggttcactgc 480
atattctccc cacagataga agagcccagc cagtgtcctg actgtgtggt gagcgccctg 540
ggagccaaag tcctttcatc tgtaaaggac cggttcatca acttctttgt aggcaatacc 600
ataaattctt cttatttccc agatcatcca ttgcattcga tatcagtgag aaggctaaag 660
gaaacgaaag atggttttat gtttttgacg gaccagtcct acattgatgt tttacctgag 720
ttcagagatt cttaccccat taagtatgtc catgcctttg aaagcaacaa ttttatttac 780
ttcttgacgg tccaaaggga aactctagat gctcagactt ttcacacaag aataatcagg 840
ttctgttcca taaactctgg attgcattcc tacatggaaa tgcctctgga gtgtattctc 900
acagaaaaga gaaaaaagag atccacaaag aaggaagtgt ttaatatact tcaggctgcg 960
tatgtcagca agcctggggc ccagcttgct agacaaatag gagccagcct gaatgatgac 1020
attcttttcg gggtgttcgc acaaagcaag ccagattctg ccgaaccaat ggatcgatct 1080
gccatgtgtg cattccctat caaatatgtc aacgacttct tcaacaagat cgtcaacaaa 1140
aacaatgtga gatgtctcca gcatttttac ggacccaatc atgagcactg ctttaatagg 1200

acacttctga gaaattcatc aggctgtgaa gcgcgccgtg atgaatatcg aacagagttt 1260
accacagctt tgcagcgcgt tgacttattc atgggtcaat tcagcgaagt cctcttaaca 1320
tctatatcca ccttcattaa aggagacctc accatagcta atcttgggac atcagagggt 1380
cgcttcatgc aggttgtggt ttctcgatca ggaccatcaa cccctcatgt gaattttctc 1440
ctggactccc atccagtgtc tccagaagtg attgtggagc atacattaaa ccaaaatggc 1500
tacacactgg ttatcactgg gaagaagatc acgaagatcc cattgaatgg cttgggctgc 1560
agacatttcc agtcctgcag tcaatgcctc tctgccccac cctttgttca gtgtggctgg 1620
tgccacgaca aatgtgtgcg atcggaggaa tgcctgagcg ggacatggac tcaacagatc 1680
tgtctgcctg caatctacaa ggttttccca aatagtgcac cccttgaagg agggacaagg 1740
ctgaccatat gtggctggga ctttggattt cggaggaata ataaatttga tttaaagaaa 1800
actagagttc tccttggaaa tgagagctgc accttgactt taagtgagag cacgatgaat 1860
acattgaaat gcacagttgg tcctgccatg aataagcatt tcaatatgtc cataattatt 1920
tcaaatggcc acgggacaac acaatacagt acattctcct atgtggatcc tgtaataaca 1980
agtatttcgc cgaaatacgg tcctatggct ggtggcactt tacttacttt aactggaaat 2040
tacctaaaca gtgggaattc tagacacatt tcaattggtg gaaaaacatg tactttaaaa 2100
agtgtgtcaa acagtattct tgaatgttat accccagccc aaaccatttc aactgagttt 2160
gctgttaaat tgaaaattga cttagccaac cgagagacaa gcatcttcag ttaccgtgaa 2220
gatcccattg tctatgaaat tcatccaacc aaatctttta ttagtacttg gtggaaagaa 2280
cctctcaaca ttgtcagttt tctattttgc tttgccagtg gtgggagcac aataacaggt 2340
gttgggaaaa acctgaattc agttagtgtc ccgagaatgg tcataaatgt gcatgaagca 2400
ggaaggaact ttacagtggc atgtcaacat cgctctaatt cagagataat ctgttgtacc 2460
actccttccc tgcaacagct gaatctgcaa ctccccctga aaaccaaagc ctttttcatg 2520
ttagatggga tcctttccaa atactttgat ctcatttatg tacataatcc tgtgtttaag 2580
ccttttgaaa agccagtgat gatctcaatg ggcaatgaaa atgtactgga aattaaggga 2640
aatgatattg accctgaagc agttaaaggt gaagtgttaa aagttggaaa taagagctgt 2700
gagaatatac acttacattc tgaagccgtt ttatgcacgg tccccaatga cctgctgaaa 2760
ttgaacagcg agctaaatat agagtggaag caagcaattt cttcaaccgt ccttggaaaa 2820
gtaatagttc aaccagatca gaatttcaca ggattgattg ctggtgttgt ctcaatatca 2880
acagcactgt tattactact tgggtttttc ctgtggctga aaaagagaaa gcaaattaaa 2940
gatctgggca gtgaattagt tcgctacgat gcaagagtac acactcctca tttggatagg 3000
cttgtaagtg cccgaagtgt aagcccaact acagaaatgg tttcaaatga atctgtagac 3060
taccgagcta cttttccaga agatcagttt cctaattcat ctcagaacgg ttcatgccga 3120
caagtgcagt atcctctgac agacatgtcc cccatcctaa ctagtgggga ctctgatata 3180
tccagtccat tactgcaaaa tactgtccac attgacctca gtgctctaaa tccagagctg 3240
gtccaggcag tgcagcatgt agtgattggg cccagtagcc tgattgtgca tttcaatgaa 3300
gtcataggaa gagggcattt tggttgtgta tatcatggga ctttgttgga caatgatggc 3360
aagaaaattc actgtgctgt gaaatccttg aacagaatca ctgacatagg agaagtttcc 3420
caatttctga ccgagggaat catcatgaaa gattttagtc atcccaatgt cctctcgctc 3480
ctgggaatct gcctgcgaag tgaagggtct ccgctggtgg tcctaccata catgaaacat 3540

ggagatcttc gaaatttcat tcgaaatgag actcataatc caactgtaaa agatcttatt 3600
ggctttggtc ttcaagtagc caaaggcatg aaatatcttg caagcaaaaa gtttgtccac 3660
agagacttgg ctgcaagaaa ctgtatgctg gatgaaaaat tcacagtcaa ggttgctgat 3720
tttggtcttg ccagagacat gtatgataaa gaatactata gtgtacacaa caaaacaggt 3780
gcaaagctgc cagtgaagtg gatggctttg gaaagtctgc aaactcaaaa gtttaccacc 3840
aagtcagatg tgtggtcctt tggcgtgctc ctctgggagc tgatgacaag aggagcccca 3900
ccttatcctg acgtaaacac ctttgatata actgtttact tgttgcaagg gagaagactc 3960
ctacaacccg aatactgccc agacccctta tatgaagtaa tgctaaaatg ctggcaccct 4020
aaagccgaaa tgcgcccatc cttttctgaa ctggtgtccc ggatatcagc gatcttctct 4080
actttcattg gggagcacta tgtccatgtg aacgctactt atgtgaacgt aaaatgtgtc 4140
gctccgtatc cttctctgtt gtcatcagaa gataacgctg atgatgaggt ggacacacga 4200
ccagcctcct tctgggagac atcatag 4227

<210> 352
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 352
ttttttttt tgagatgcat gatga 25

<210> 353
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 353
ttttttttt gagatgcatg atgag 25

<210> 354
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 354
tttttttat gagatgcatg atgag 25

<210> 355
<211> 25
<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 355
ttttttttt tgagctgcat gatga 25
<210> 356
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 356
tttttttca tgagatgcat gatga 25
<210> 357
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 357
tatggagcaa aactactgta gagcc 25
<210> 358
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 358
ccagctacat cacacacctt gact 24
<210> 359
<211> 26
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 359
taataccaaa agttaccaaa actgca 26
<210> 360
<211> 23

<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 360
caatctctga agatcatgtg gcc 23
<210> 361
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 361
caagtggcac agtggtggc 19
<210> 362
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 362
taactggagg agggaaagac aga 23
<210> 363
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 363
agttggggtt gtagtcggtc at 22
<210> 364
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 364
gaagcctccc tggatctcc 19
<210> 365

<211> 14
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<220>
<221> misc_feature
<222> 12, 13, 14
<223> n=反向脱氧胸苷
<220>
<221> misc_feature
<222> 13, 14
<223> 可存在或不存在
<400> 365
catcacgcag cnnn 14
<210> 366
<211> 13
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<220>
<221> misc_feature
<222> 11, 12, 13
<223> n=反向脱氧胸苷
<220>
<221> misc_feature
<222> 12, 13
<223> 可存在或不存在
<400> 366
catcacgcag nnn 13
<210> 367
<211> 13
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<220>
<221> misc_feature

<222> 11, 12, 13
<223> n=反向脱氧胸苷
<220>
<221> misc_feature
<222> 12, 13
<223> 可存在或不存在
<400> 367
atcacgcagc nnn 13
<210> 368
<211> 14
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<220>
<221> misc_feature
<222> 12, 13, 14
<223> n=反向脱氧胸苷
<220>
<221> misc_feature
<222> 13, 14
<223> 可存在或不存在
<400> 368
catcacgcag cnnn 14
<210> 369
<211> 13
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<220>
<221> misc_feature
<222> 11, 12, 13
<223> n=反向脱氧胸苷
<220>
<221> misc_feature
<222> 12, 13
<223> 可存在或不存在
<400> 369

catcacgcag nnn 13

<210> 370

<211> 14

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 370

tgtagggaag taca 14

<210> 371

<211> 27

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 371

ttttttttt ttttgtaggg aagtaca 27

<210> 372

<211> 15

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 372

tctgtaggga agtac 15

<210> 373

<211> 26

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 373

ttttttttt ttctgtaggg aagtac 26

<210> 374

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 374
gtctgtaggg aagtacat 18
<210> 375
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 375
tttttttgtc tgtagggaag tacat 25
<210> 376
<211> 17
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 376
ccgcacgtct gtaggga 17
<210> 377
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 377
ttttttccg cacgtctgta ggga 24
<210> 378
<211> 17
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 378
acgtctgtag ggaagta 17
<210> 379
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>

<223> 合成构建体
<400> 379
tttttttac gtctgtaggg aagta 25
<210> 380
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 380
gagggtctga cgggtagagt g 21
<210> 381
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 381
tggccgccag gtcttgatgt a 21
<210> 382
<211> 17
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<220>
<221> misc_feature
<222> 15, 16, 17
<223> n=反向脱氧胸苷
<220>
<221> misc_feature
<222> 16, 17
<223> 可存在或不存在
<400> 382
tgtactcccc tacannn 17
<210> 383
<211> 16
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成构建体
<220>
<221> misc_feature
<222> 14, 15, 16
<223> n=反向脱氧胸苷
<220>
<221> misc_feature
<222> 15, 16
<223> 可存在或不存在
<400> 383
gatgtactcc cctnnn 16
<210> 384
<211> 17
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<220>
<221> misc_feature
<222> 15, 16, 17
<223> n=反向脱氧胸苷
<220>
<221> misc_feature
<222> 16, 17
<223> 可存在或不存在
<400> 384
atgtactccc ctacnnn 17
<210> 385
<211> 16
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<220>
<221> misc_feature
<222> 14, 15, 16
<223> n=反向脱氧胸苷
<220>

<221> misc_feature
<222> 15, 16
<223> 可存在或不存在
<400> 385
gtactcccct acannn 16
<210> 386
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<220>
<221> misc_feature
<222> 17, 18, 19
<223> n=反向脱氧胸苷
<220>
<221> misc_feature
<222> 18, 19
<223> 可存在或不存在
<400> 386
gatgtactcc cctacannn 19
<210> 387
<211> 16
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 387
ttacccagaa tcagaa 16
<210> 388
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 388
tttttaaatt tacccagaat cagaa 25
<210> 389
<211> 16

<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 389
ccagaatcag aaggtg 16
<210> 390
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 390
tttttaaatc cagaatcaga aggtg 25
<210> 391
<211> 16
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 391
ttcttaccca gaatca 16
<210> 392
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 392
tttttaaatt tcttacccag aatca 25
<210> 393
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 393
cctttcttac ccagaatc 18
<210> 394

<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 394
tttttaaatc ctttcttacc cagaatc 27
<210> 395
<211> 16
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 395
cagaatcaga aggtgg 16
<210> 396
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 396
tttttaaatc agaatcagaa ggtgg 25
<210> 397
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 397
cttgatgagc agcagcgaaa 20
<210> 398
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 398
ccttcagttc tcccaccttc tg 22

<210> 399
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<220>
<221> misc_feature
<222> 17, 18, 19
<223> n=反向脱氧胸苷
<220>
<221> misc_feature
<222> 18, 19
<223> 可存在或不存在
<400> 399
tctgcttctg ggtaagnnn 19
<210> 400
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<220>
<221> misc_feature
<222> 19, 20, 21
<223> n=反向脱氧胸苷
<220>
<221> misc_feature
<222> 20, 21
<223> 可存在或不存在
<400> 400
ttctgcttct gggtaagann n 21
<210> 401
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<220>

<221> misc_feature
<222> 18, 19, 20
<223> n=反向脱氧胸苷
<220>
<221> misc_feature
<222> 19, 20
<223> 可存在或不存在
<400> 401
caccttctgc ttctgggnnn 20
<210> 402
<211> 17
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<220>
<221> misc_feature
<222> 15, 16, 17
<223> n=反向脱氧胸苷
<220>
<221> misc_feature
<222> 16, 17
<223> 可存在或不存在
<400> 402
tctgcttctg ggtannn 17
<210> 403
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<220>
<221> misc_feature
<222> 23, 24, 25
<223> n=反向脱氧胸苷
<220>
<221> misc_feature
<222> 24, 25
<223> 可存在或不存在

<400> 403
caccttctgc ttctgggtaa gannn 25
<210> 404
<211> 16
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 404
atacgtgatg tcttac 16
<210> 405
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 405
ttttttttta tacgtgatgt cttac 25
<210> 406
<211> 16
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 406
acgtgatggc ttacgt 16
<210> 407
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 407
tttttttttt tacgtgatgg cttacgt 27
<210> 408
<211> 17
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>

<223> 合成构建体
<400> 408
aagcatacgt gatggct 17
<210> 409
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 409
tttttaagca tacgtgatgg ct 22
<210> 410
<211> 16
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 410
gcatacgtga tggctt 16
<210> 411
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 411
ttttttgca tacgtgatgg ctt 23
<210> 412
<211> 17
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 412
gcatacgtga tggctta 17
<210> 413
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成构建体
<400> 413
tttttttgca tacgtgatgg ctta 24
<210> 414
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 414
atggctgtgg tttgtgatgg t 21
<210> 415
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 415
acaccagcca tcacgtaaga ca 22
<210> 416
<211> 15
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<220>
<221> misc_feature
<222> 13, 14, 15
<223> n=反向脱氧胸苷
<220>
<221> misc_feature
<222> 14, 15
<223> 可存在或不存在
<400> 416
ggctgcctcc tgnnn 15
<210> 417
<211> 16
<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<220>
<221> misc_feature
<222> 14, 15, 16
<223> n=反向脱氧胸苷
<220>
<221> misc_feature
<222> 15, 16
<223> 可存在或不存在
<400> 417
cggctgcctc ctgnnn 16
<210> 418
<211> 16
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<220>
<221> misc_feature
<222> 14, 15, 16
<223> n=反向脱氧胸苷
<220>
<221> misc_feature
<222> 15, 16
<223> 可存在或不存在
<400> 418
cggctgcctc ctgnnn 16
<210> 419
<211> 17
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<220>
<221> misc_feature
<222> 15, 16, 17
<223> n=反向脱氧胸苷

<220>
<221> misc_feature
<222> 16, 17
<223> 可存在或不存在
<400> 419
tcggctgcct cctgnnn 17
<210> 420
<211> 16
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<220>
<221> misc_feature
<222> 14, 15, 16
<223> n=反向脱氧胸苷
<220>
<221> misc_feature
<222> 15, 16
<223> 可存在或不存在
<400> 420
tcggctgcct cctnnn 16
<210> 421
<211> 13
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 421
atggccatct tgg 13
<210> 422
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 422
ttttttttta tggccatctt gg 22
<210> 423

<211> 12
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 423
ggccatcttg ga 12
<210> 424
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 424
ttttttttt aggccatctt gga 23
<210> 425
<211> 13
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 425
gatggccatc ttg 13
<210> 426
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 426
ttttttaga tggccatctt g 21
<210> 427
<211> 14
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 427
tgatggccat cttg 14

<210> 428
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 428
tttttttga tggccatctt g 21
<210> 429
<211> 12
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 429
tggccatctt gg 12
<210> 430
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 430
ttttttttt tggccatctt gg 22
<210> 431
<211> 11
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 431
gtgatggccg g 11
<210> 432
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 432

tttttttttt tgtgatggcc gg 22

<210> 433

<211> 12

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 433

tgatggccgg cg 12

<210> 434

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 434

tttttttttt tttgatggcc ggcg 24

<210> 435

<211> 14

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 435

gtgatggccg gcgt 14

<210> 436

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 436

tttttttttt tgtgatggcc ggcgt 25

<210> 437

<211> 12

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 437
gatggccggc gt 12
<210> 438
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 438
ttttttttt tttgatggcc ggcgt 25
<210> 439
<211> 13
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 439
gatggcccgc gtg 13
<210> 440
<211> 26
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 440
ttttttttt tttgatggcc cgcgtg 26
<210> 441
<211> 14
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 441
aacccccatc acgt 14
<210> 442
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>

<223> 合成构建体
<400> 442
ttttttttt taacccccat cacgt 25
<210> 443
<211> 16
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 443
gacaaccccc atcacg 16
<210> 444
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 444
tttttttga caaccccat cacg 24
<210> 445
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 445
cgtggacaac ccccatca 18
<210> 446
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 446
ttttcgtgga caaccccat ca 22
<210> 447
<211> 12
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成构建体
<400> 447
cccatcacgt gt 12
<210> 448
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 448
ttttttttt ttcccatcac gtgt 24
<210> 449
<211> 17
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 449
tggacaaccc ccatcac 17
<210> 450
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 450
tttttttgg acaaccccca tcac 24
<210> 451
<211> 14
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 451
gccagcgtgg acgg 14
<210> 452
<211> 25
<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 452
ttttttttttt tgccagcgtg gacgg 25
<210> 453
<211> 14
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 453
cgtggacggt aacc 14
<210> 454
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 454
ttttttttttt tcgtggacgg taacc 25
<210> 455
<211> 13
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 455
gacggtaacc ccc 13
<210> 456
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 456
ttttttttttt tgacggtaac cccc 24
<210> 457
<211> 14

<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 457
ccagcgtgga cggt 14
<210> 458
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 458
ttttttttt ccagcgtgga cggt 24
<210> 459
<211> 16
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 459
gccagcgtgg acggta 16
<210> 460
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 460
ttttttgcc agcgtggacg gta 23
<210> 461
<211> 14
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 461
ccaggaggct gccg 14
<210> 462

<211> 26
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 462
tttttttttt taccaggagg ctgccg 26
<210> 463
<211> 14
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 463
caggaggctg ccga 14
<210> 464
<211> 26
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 464
tttttttttt tacaggaggc tgccga 26
<210> 465
<211> 14
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 465
tccaggaggc tgcc 14
<210> 466
<211> 26
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 466
tttttttttt tatccaggag gctgcc 26

<210> 467
<211> 13
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 467
ccaggaggct gcc 13
<210> 468
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 468
ttttttttt taccaggagg ctgcc 25
<210> 469
<211> 12
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 469
caggaggctg cc 12
<210> 470
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 470
ttttttttt tacaggaggc tgcc 24
<210> 471
<211> 13
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 471

ccaggaggga gcc 13
<210> 472
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 472
ttttttttt taccaggagg gagcc 25
<210> 473
<211> 14
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 473
ccaggaggga gccg 14
<210> 474
<211> 26
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 474
ttttttttt taccaggagg gagccg 26
<210> 475
<211> 14
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 475
tccaggaggg agcc 14
<210> 476
<211> 26
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体

<400> 476
tttttttttt tatccaggag ggagcc 26
<210> 477
<211> 13
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 477
caggagggag ccg 13
<210> 478
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 478
tttttttttt tacaggaggg agccg 25
<210> 479
<211> 14
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 479
caggagggag ccga 14
<210> 480
<211> 26
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 480
tttttttttt tacaggaggg agccga 26
<210> 481
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>

<223> 合成构建体
<400> 481
cttcgtatct ctcaagagga t 21
<210> 482
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 482
ttttttttc ttcgtatctc tcaagaggat 30
<210> 483
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 483
gtatctctca agaggatcca a 21
<210> 484
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 484
ttttttttg tatctctcaa gaggatccaa 30
<210> 485
<211> 17
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 485
ttcgtatctc tcaagag 17
<210> 486
<211> 26
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成构建体
<400> 486
ttttttttt tcgtatctct caagag 26
<210> 487
<211> 15
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 487
tcaagaggat ccaaa 15
<210> 488
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 488
ttttttttt caagaggatc caaa 24
<210> 489
<211> 12
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 489
tctctcaaga gg 12
<210> 490
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 490
ttttttttt ctctcaagag g 21
<210> 491
<211> 19
<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 491
gttaaaaagg aggatccaa 19
<210> 492
<211> 28
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 492
ttttttttg ttaaaaagga ggatccaa 28
<210> 493
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 493
acaagagtta aaaaggagga 20
<210> 494
<211> 28
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 494
ttttttttac aagagttaaa aaggagga 28
<210> 495
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 495
aagagttaaa aaggaggatc 20
<210> 496
<211> 28

<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 496
ttattattaa gagttaaaaa ggaggatc 28
<210> 497
<211> 17
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 497
aaaaggagga tccaaag 17
<210> 498
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 498
ttttttttaa aaggaggatc caaag 25
<210> 499
<211> 17
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 499
aaggaggatc caaagtg 17
<210> 500
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 500
ttttttttaa ggaggatcca aagtg 25
<210> 501

<211> 17
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 501
aaacaggagg atccaaa 17
<210> 502
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 502
tttttttaa acaggaggat ccaaa 25
<210> 503
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 503
aagtgcacaa acaggagg 18
<210> 504
<211> 26
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 504
tttttattaa gtgcacaaac aggagg 26
<210> 505
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 505
gtgcacaaac aggaggatc 19

<210> 506
<211> 28
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 506
tattattatg tgcacaaaca ggaggatc 28
<210> 507
<211> 15
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 507
cacaaacagg aggat 15
<210> 508
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 508
tatttttca caaacaggag gat 23
<210> 509
<211> 16
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 509
aacaggagga tccaaa 16
<210> 510
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 510

ttttatttaa caggaggatc caaa 24

<210> 511

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 511

ccacactgac gtgcctct 18

<210> 512

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 512

gcacacgtag gggttgtcca aga 23

<210> 513

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 513

ccacactgac gtgcctct 18

<210> 514

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 514

gtacacgctg gccacgccg 19

<210> 515

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 515
ccacactgac gtgcctct 18
<210> 516
<211> 17
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 516
caggcggcac acgtgat 17
<210> 517
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 517
ccacactgac gtgcctct 18
<210> 518
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 518
aggcggcaca cgtgcgggtt ac 22
<210> 519
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 519
aaggagttag cagcatgtca gc 22
<210> 520
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>

<223> 合成构建体

<400> 520

aacttcagac tttacacaac ctgc 24

<210> 521

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 521

attgattctg atgacaccgg a 21

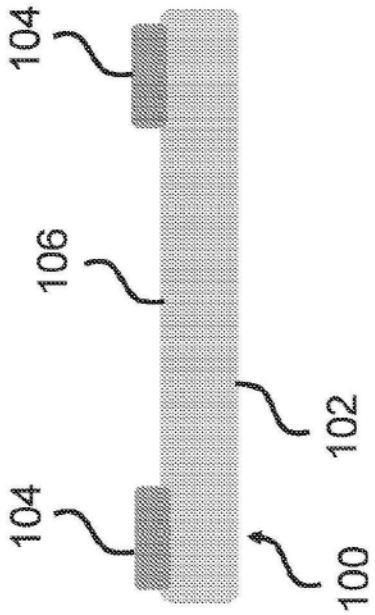


图 1B

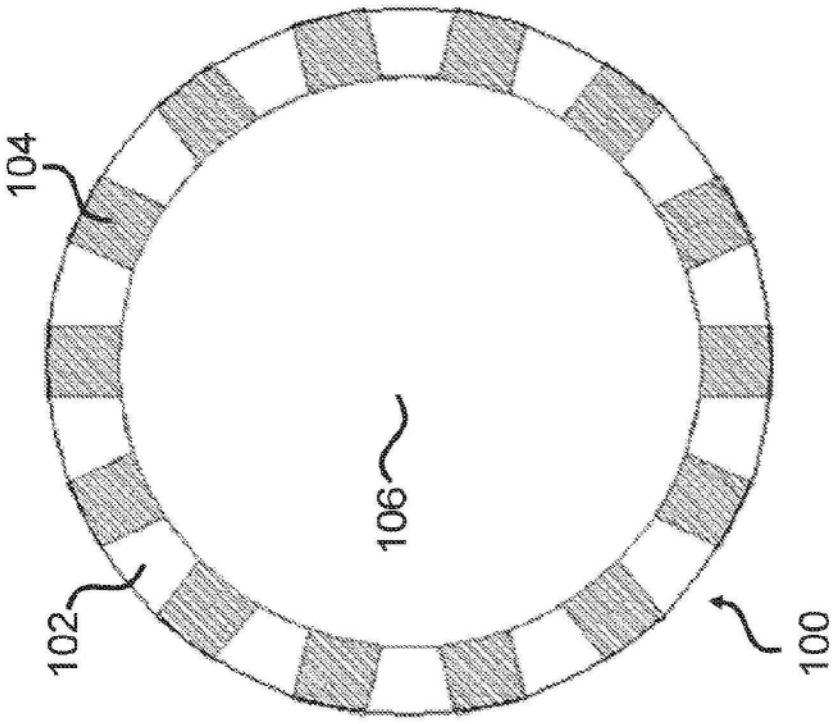


图 1A

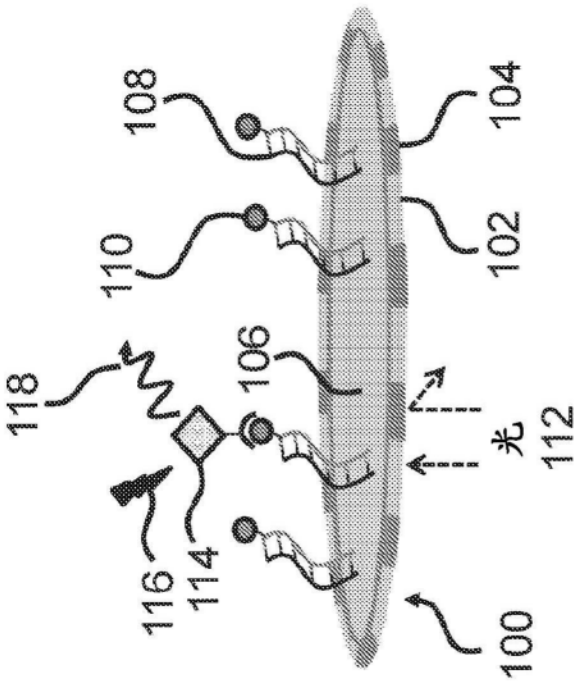

108
104
110
102
118
106
光
112
116
114
100

图 1D

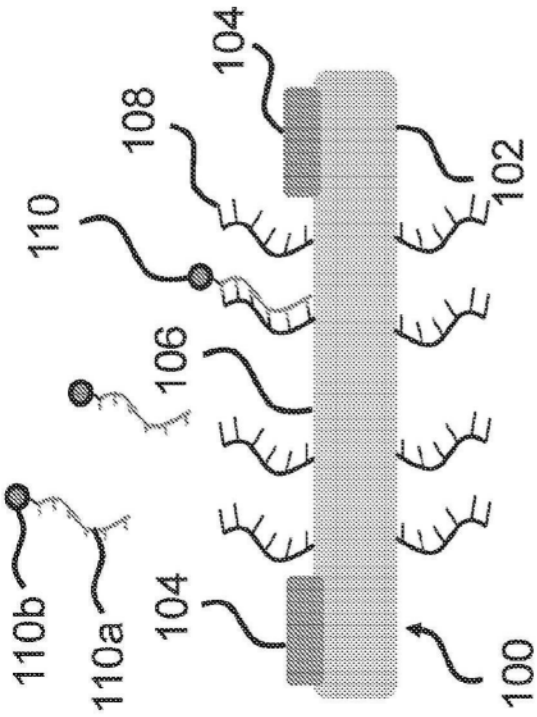

104
108
102
110
106
110b
110a
104
100

图 1C

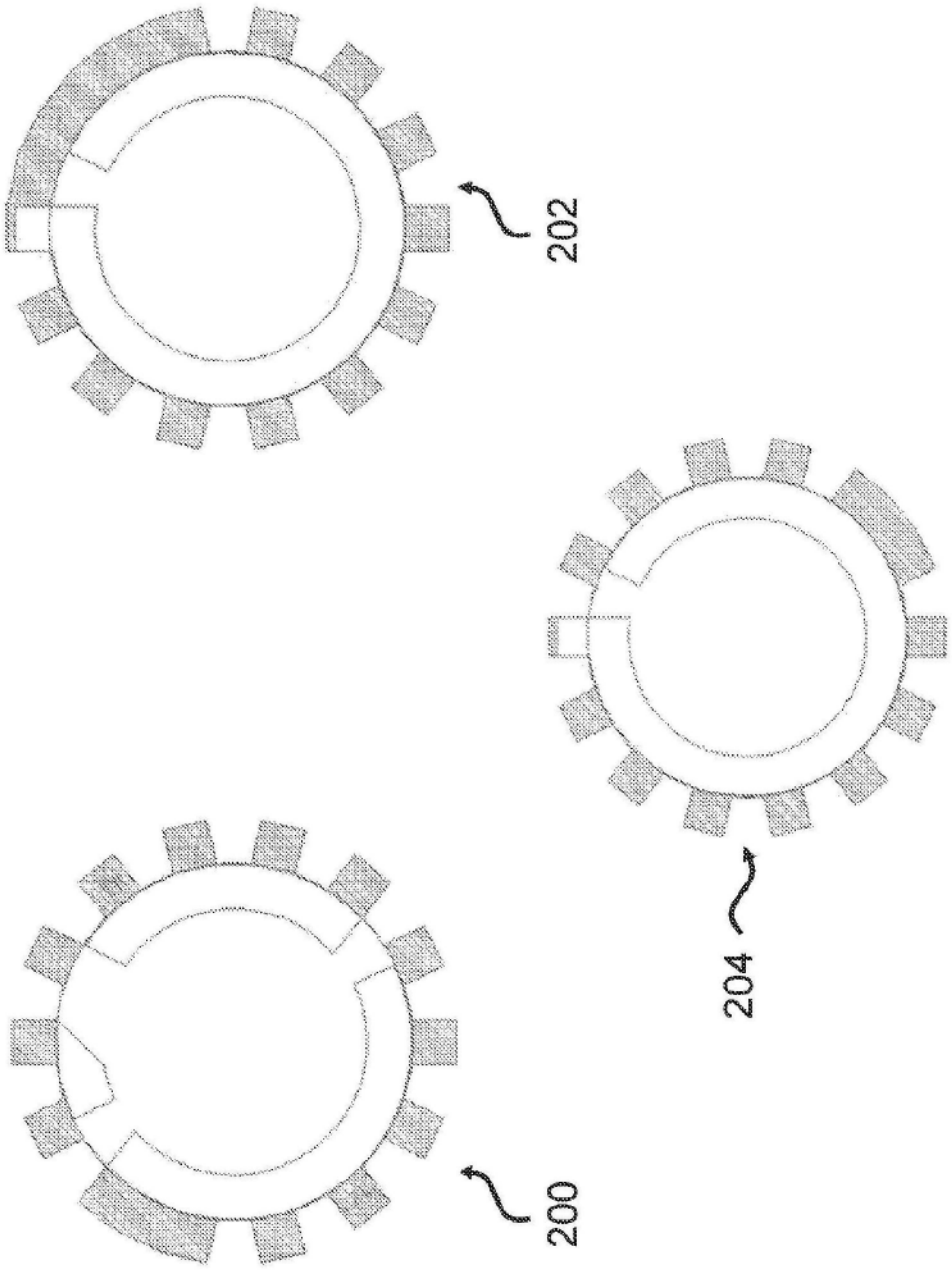


图2A

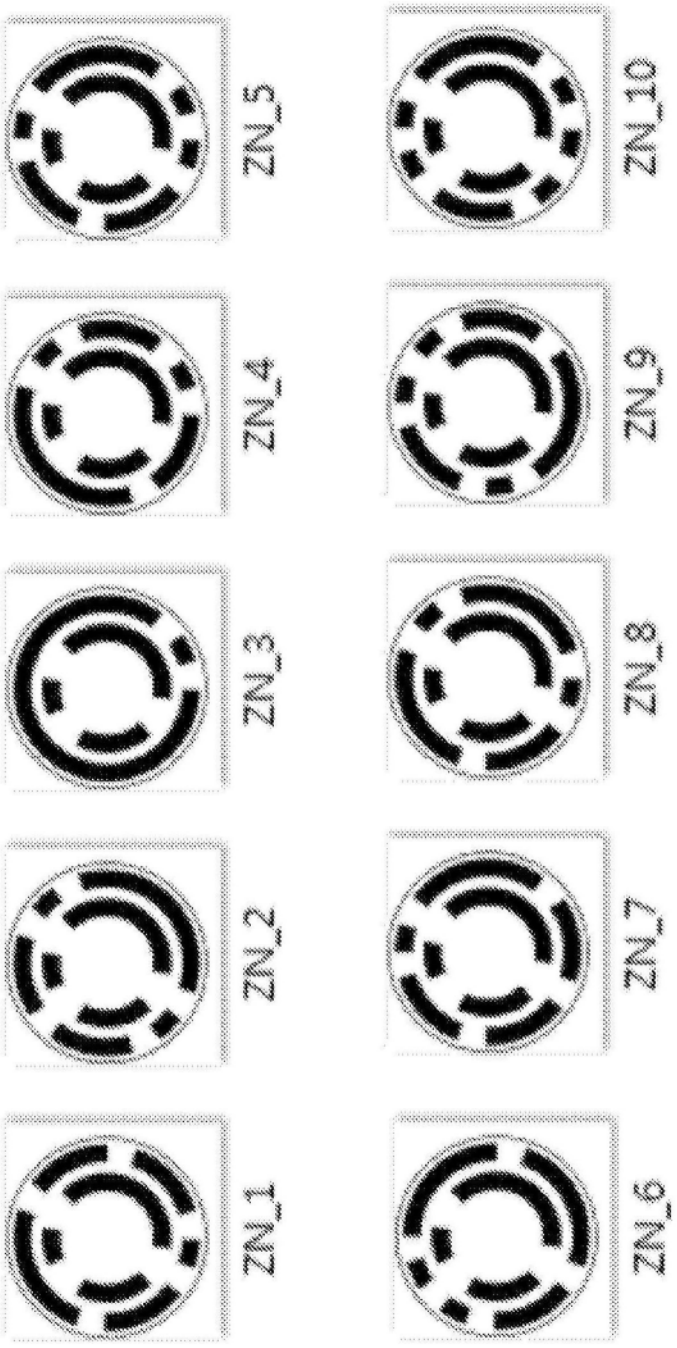


图2B

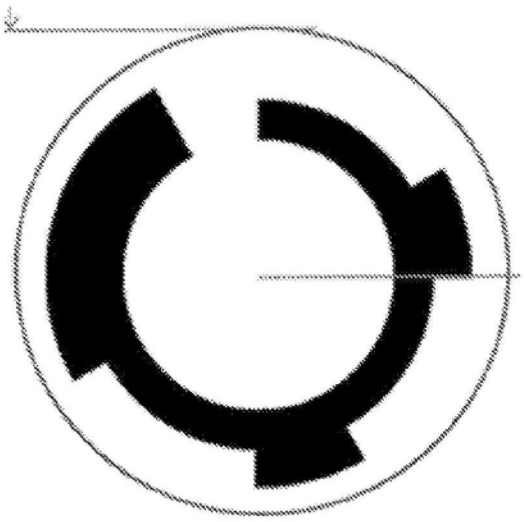


图2C

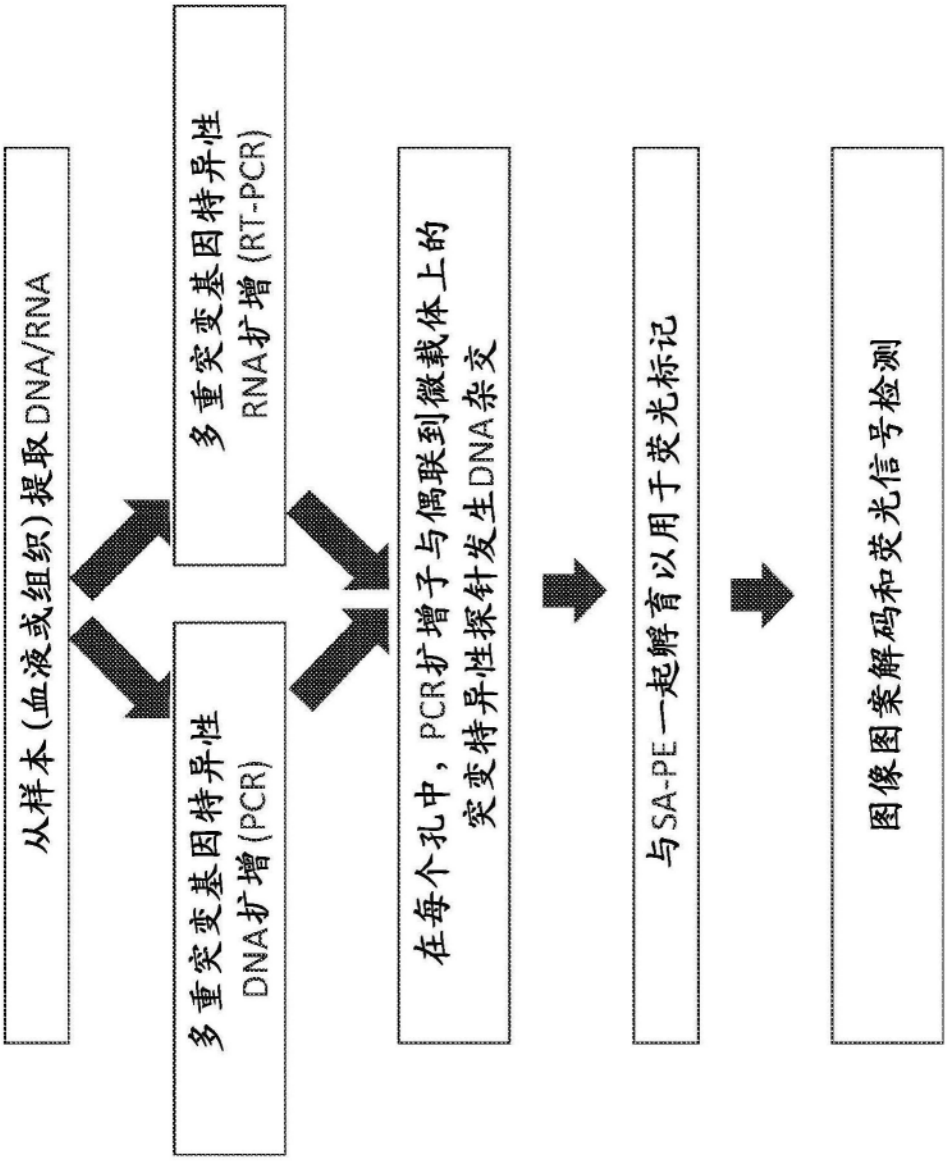

从样本(血液或组织)提取DNA/RNA
多重突变基因特异性
DNA扩增(PCR)
多重突变基因特异性
RNA扩增(RT-PCR)
在每个孔中，PCR扩增子与偶联到微载体上的
突变特异性探针发生DNA杂交
与SA-PE一起孵育以用于荧光标记
图像图案解码和荧光信号检测

图3

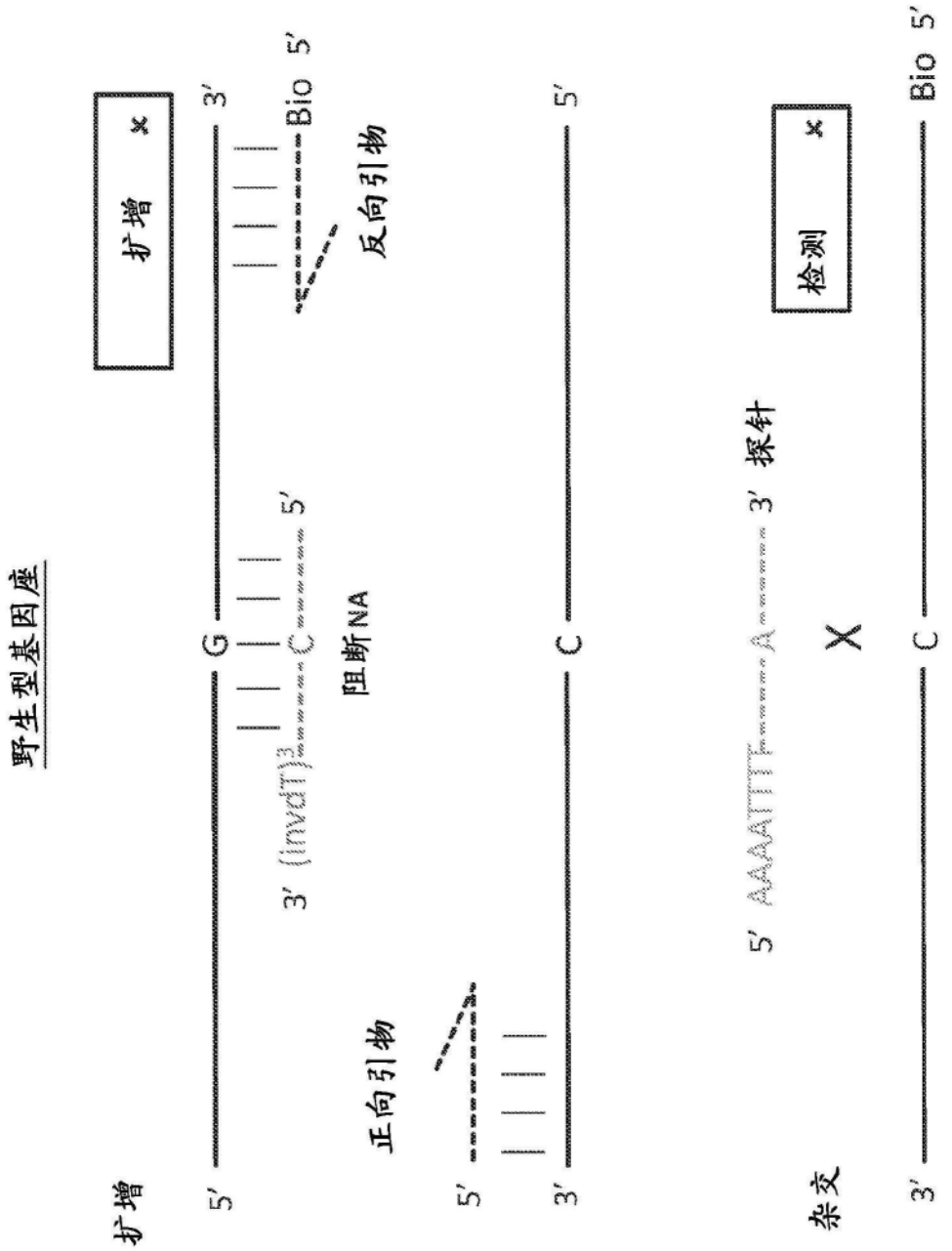

野生型基因座
扩增
扩增
5′
3′
G
C
3′
5′
Bio
5′
阻断NA
反向引物
正向引物
5′
3′
C
5′
5′ AAAATTT 3′ 探针
检测
X
杂交
3′
C
Bio
5′

图4

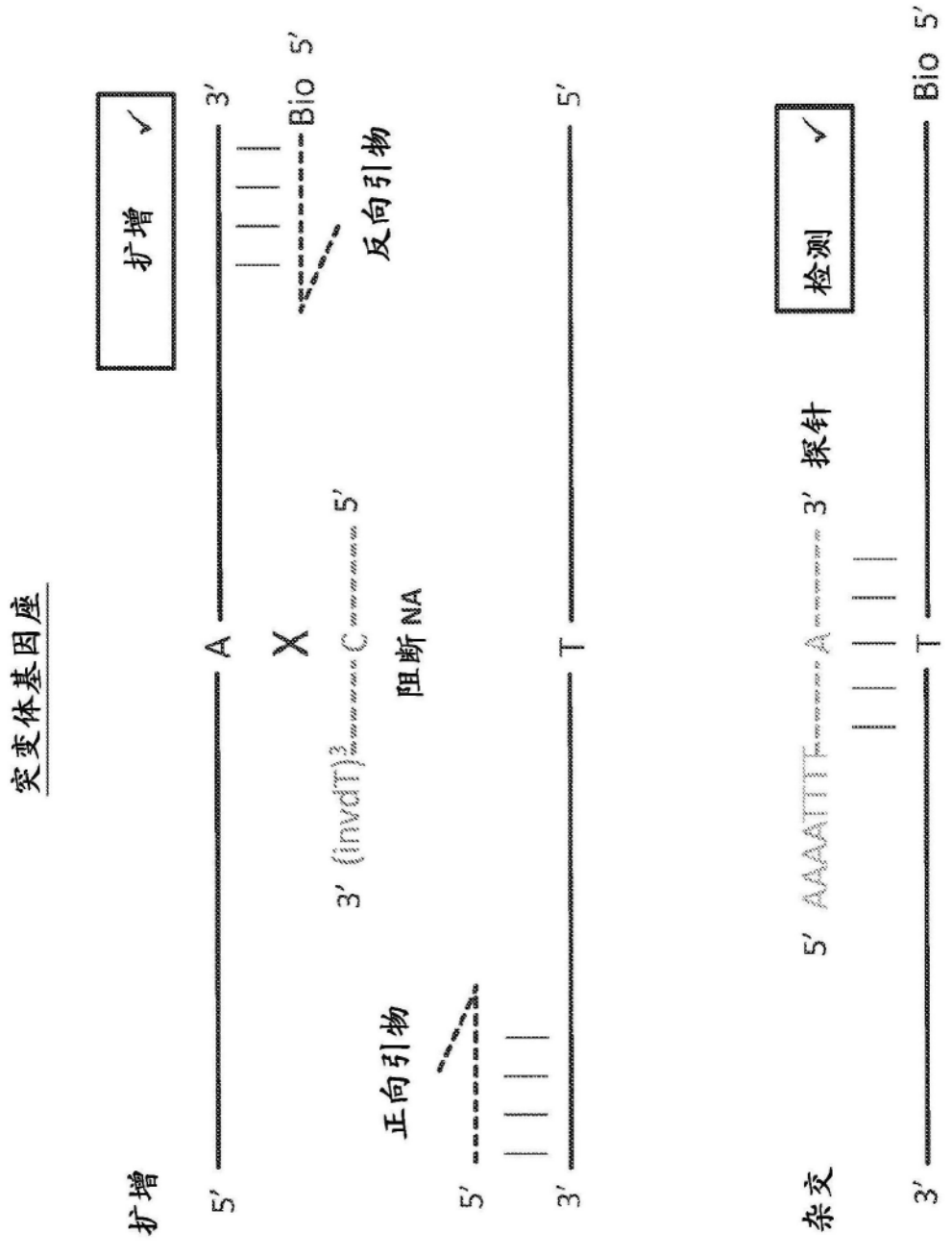

突变体基因座
扩增
扩增
5′
A
3′
Bio 5′
反向引物
X
3′ (invdT)3……C……5′
阻断NA
正向引物
5′
T
3′
杂交
5′ AAAATTT……A……3′ 探针
检测
3′
T
Bio 5′

图5

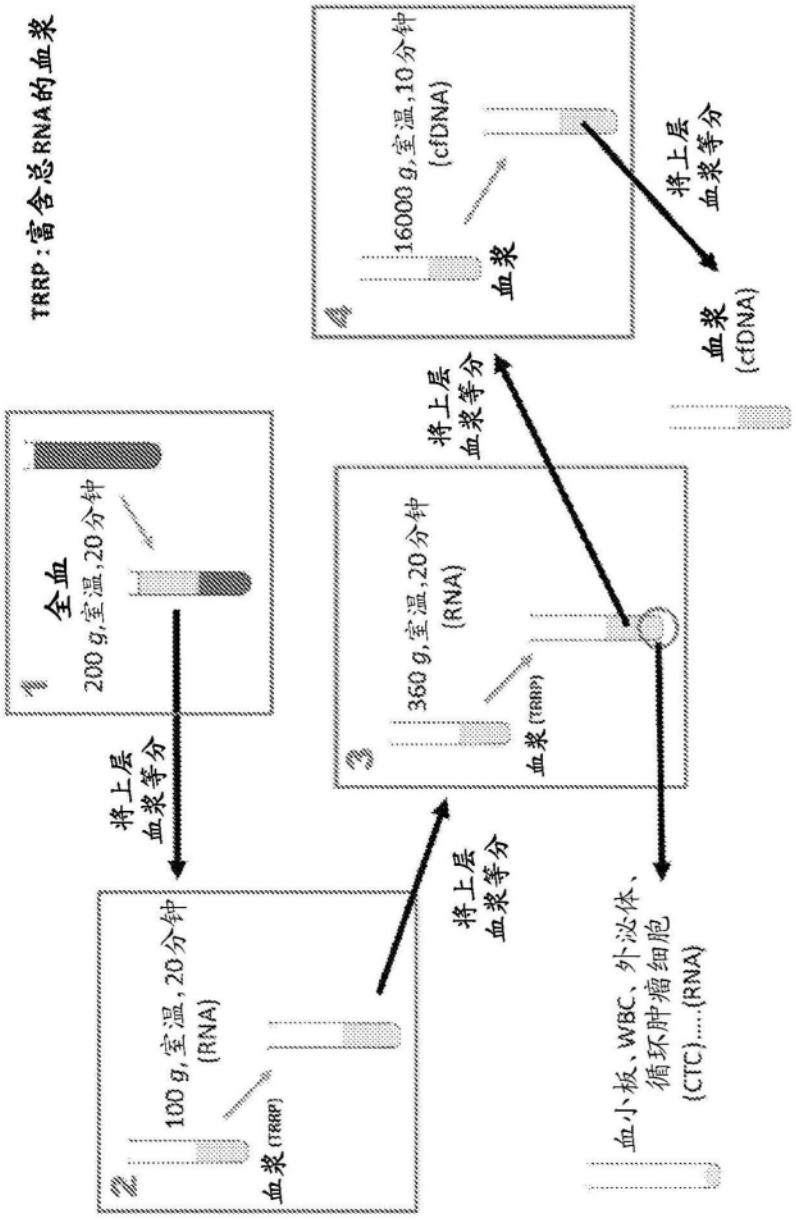
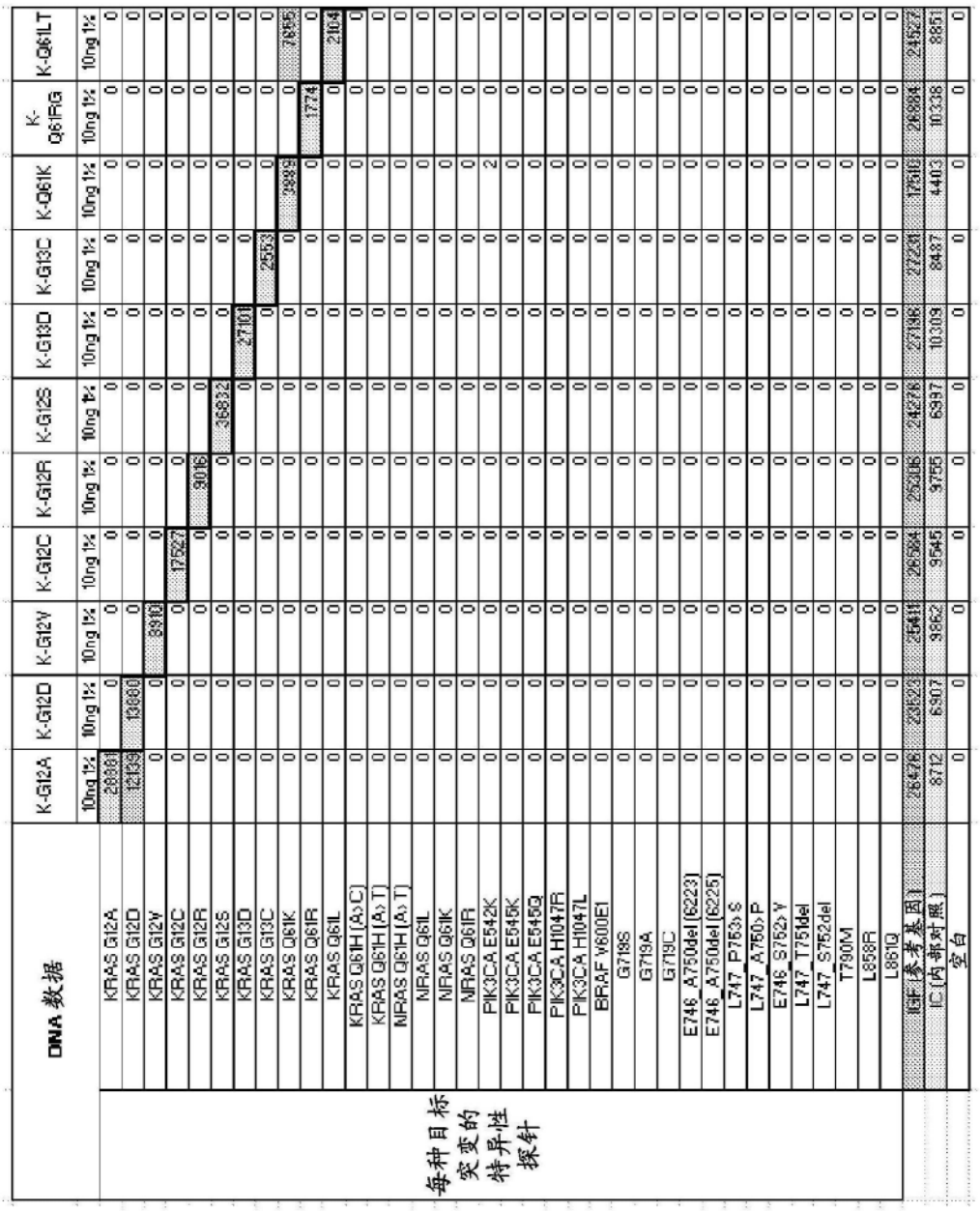
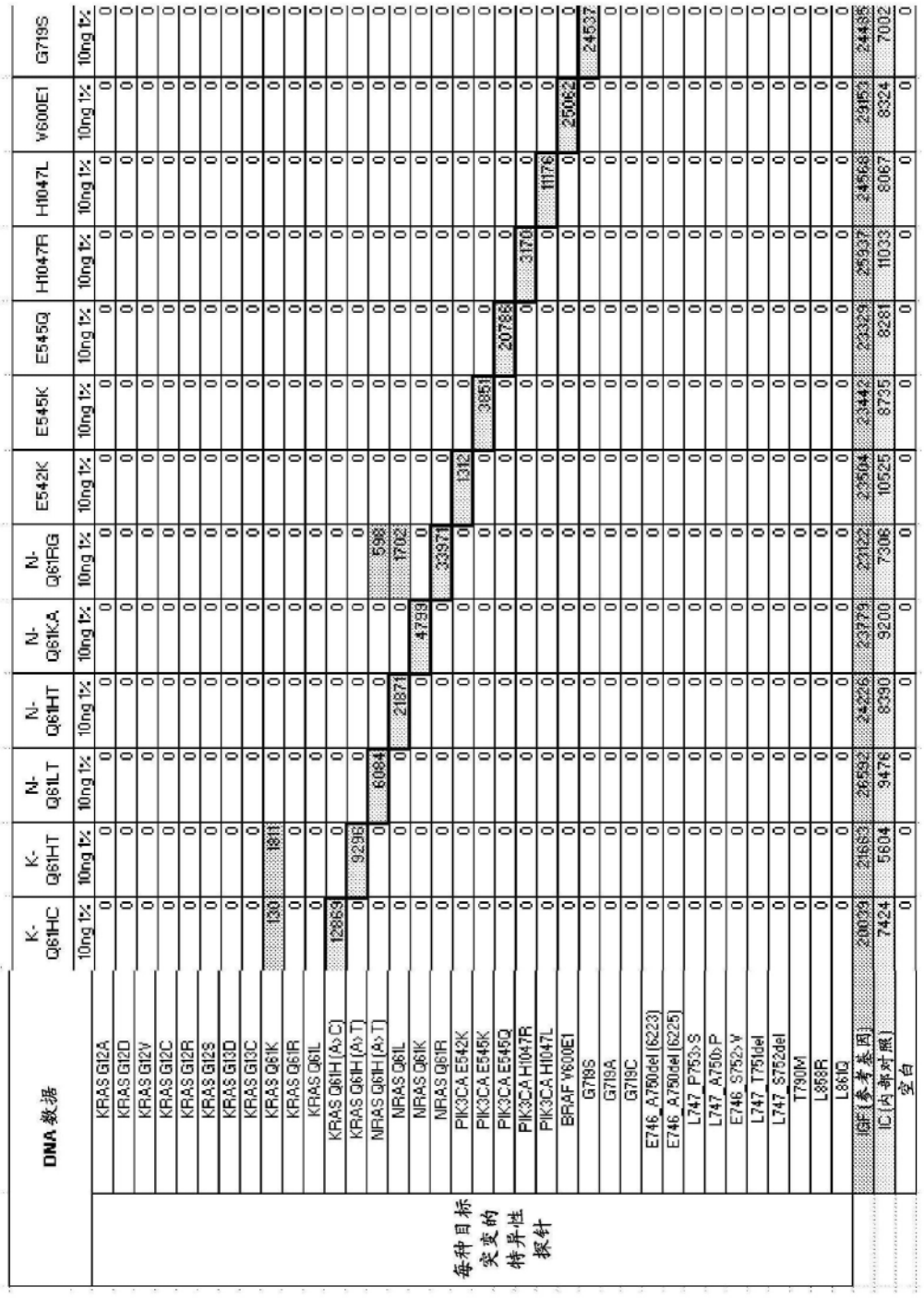

TRRP：富含总RNA的血浆
1
全血
200 g,室温,20分钟
将上层血浆等分
2
100 g,室温,20分钟
(RNA)
血浆(TRRP)
将上层血浆等分
3
360 g,室温,20分钟
(RNA)
血浆(TRRP)
将上层血浆等分
4
16000 g,室温,10分钟
(cfDNA)
血浆
将上层血浆等分
血浆
(cfDNA)
血小板、WBC、外泌体、
循环肿瘤细胞
(CTC).....(RNA)

图6



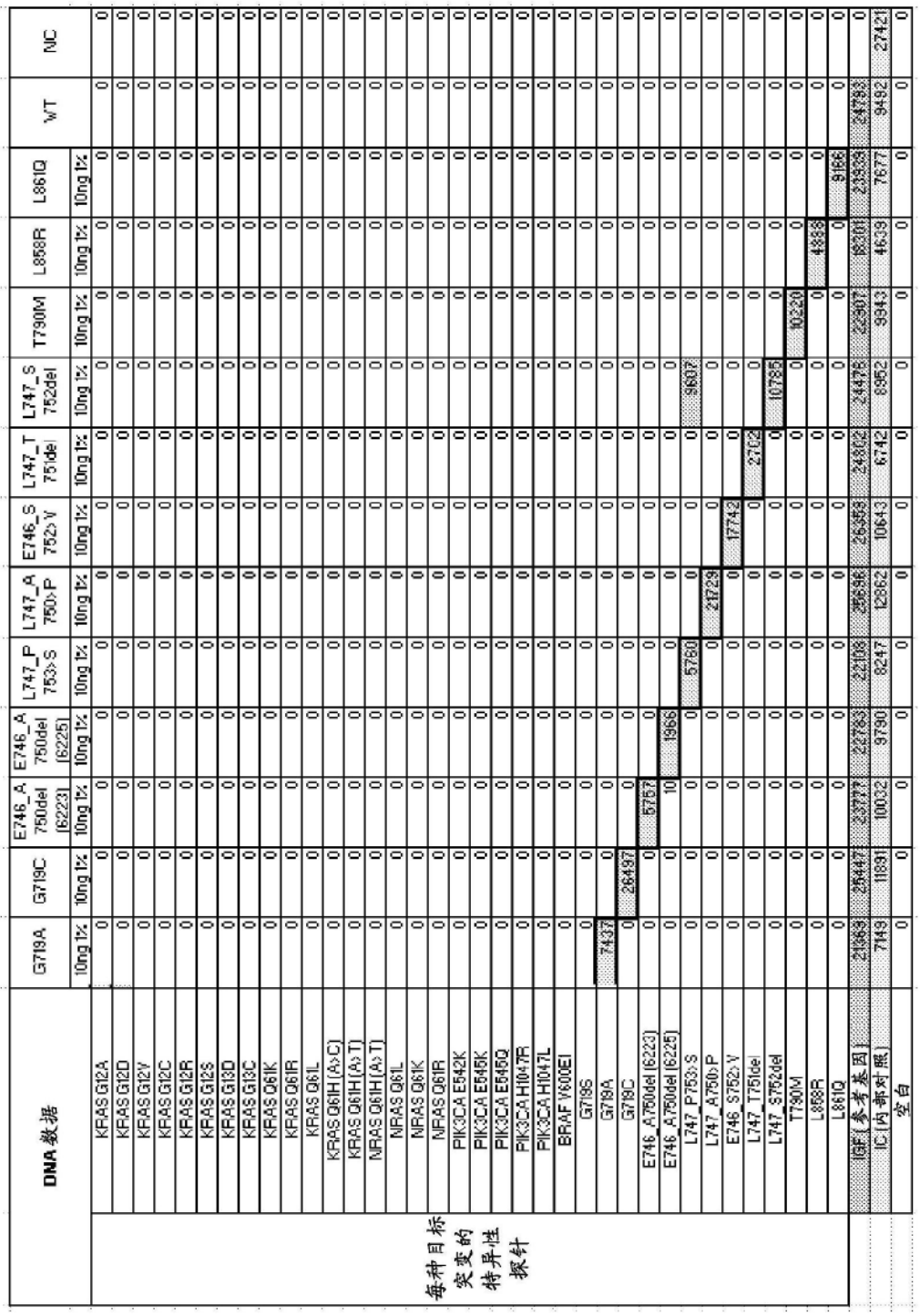
	DNA 数据	K-G12A	K-G12D	K-G12V	K-G12C	K-G12R	K-G12S	K-G13D	K-G13C	K-Q61K	K-Q61RG	K-Q61LT
		10ng 1%	10ng 1%	10ng 1%	10ng 1%	10ng 1%	10ng 1%	10ng 1%	10ng 1%	10ng 1%	10ng 1%	10ng 1%
每种目标突变的特异性探针	KRAS G12A	28881	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	KRAS G12D	12139	13880	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	KRAS G12V	0	0	8910	0	0	0	0	0	0	0	0
	KRAS G12C	0	0	0	17527	0	0	0	0	0	0	0
	KRAS G12R	0	0	0	0	9016	0	0	0	0	0	0
	KRAS G12S	0	0	0	0	0	36832	0	0	0	0	0
	KRAS G13D	0	0	0	0	0	0	27101	0	0	0	0
	KRAS G13C	0	0	0	0	0	0	0	2553	0	0	0
	KRAS Q61K	0	0	0	0	0	0	0	0	39939	0	7855
	KRAS Q61R	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1774	0
	KRAS Q61L	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2104
	KRAS Q61H (A>C)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	KRAS Q61H (A>T)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	NRAS Q61H (A>T)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	NRAS Q61L	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	NRAS Q61K	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	NRAS Q61R	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	PIK3CA E542K	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0
	PIK3CA E545K	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	PIK3CA E545Q	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	PIK3CA H1047R	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	PIK3CA H1047L	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	BRAF V600E1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	G719S	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	G719A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	G719C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	E746_A750del (6223)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	E746_A750del (6225)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	L747_P753>S	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	L747_A750>P	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	E746_S752>V	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	L747_T751del	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	L747_S752del	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	T790M	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	L858R	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	L861Q	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	IGF (参考基因)	26476	23523	25411	26384	25306	24276	27196	27231	17610	26884	24527
	IC (内部对照)	8712	6907	3862	9545	3755	6397	10309	8487	4403	10338	8851
	空白	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

图7A



	DNA 数据	K-Q61HC	K-Q61HT	N-Q61LT	N-Q61HT	N-Q61K.A.	N-Q61RG	E542K	E545K	E545Q	H1047R	H1047L	V600E1	G719S
		10ng 1%	10ng 1%	10ng 1%	10ng 1%	10ng 1%	10ng 1%	10ng 1%	10ng 1%	10ng 1%	10ng 1%	10ng 1%	10ng 1%	10ng 1%
每种目标突变的特异性探针	KRAS G12A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	KRAS G12D	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	KRAS G12V	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	KRAS G12C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	KRAS G12R	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	KRAS G12S	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	KRAS G13D	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	KRAS G13C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	KRAS Q61K	1301	1811	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	KRAS Q61R	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	KRAS Q61L	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	KRAS Q61H (A>C)	128659	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	KRAS Q61H (A>T)	0	9296	0	0	0	598	0	0	0	0	0	0	0
	NRAS Q61H (A>T)	0	0	6084	0	0	1702	0	0	0	0	0	0	0
	NRAS Q61L	0	0	0	21871	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	NRAS Q61K	0	0	0	0	4799	0	0	0	20788	3170	0	0	0
	NRAS Q61R	0	0	0	0	0	33971	0	0	0	0	11176	0	0
	PIK3CA E542K	0	0	0	0	0	0	1312	0	0	0	0	25062	0
	PIK3CA E545K	0	0	0	0	0	0	0	3851	0	0	0	0	24537
	PIK3CA E545Q	0	0	0	0	0	0	0	0	20788	3170	0	0	0
	PIK3CA H1047R	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3170	0	0	0
	PIK3CA H1047L	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	11176	0	0
	BRAF V600E1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	25062	0
	G719S	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	24537
	G719A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	G719C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	E746_A750del (6223)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	E746_A750del (6225)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	L747_P753>S	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	L747_A750>P	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	E746_S752>V	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	L747_T751del	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	L747_S752del	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	T790M	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	L858R	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	L861Q	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	IGF (参考基因)	200039	21663	26592	24226	23729	22122	23504	23442	23329	25937	24568	23152	24436
	IC (内部对照)	7424	5604	9476	8390	9200	7306	10525	8735	8281	11033	8067	8324	7002
	空白	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

图7B



	DNA数据	G719A	G719C	E746_A750del (6223)	E746_A750del (6225)	L747_P753>S	L747_A750>P	E746_S752>V	L747_T751del	L747_S752del	T790M	L858R	L861Q	WT	NC
		10ng 1%	10ng 1%	10ng 1%	10ng 1%	10ng 1%	10ng 1%	10ng 1%	10ng 1%	10ng 1%	10ng 1%	10ng 1%	10ng 1%		
每种目标突变的特异性探针	KRAS G12A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	KRAS G12D	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	KRAS G12V	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	KRAS G12C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	KRAS G12R	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	KRAS G12S	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	KRAS G13D	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	KRAS G13C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	KRAS Q61K	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	KRAS Q61R	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	KRAS Q61L	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	KRAS Q61H (A>C)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	KRAS Q61H (A>T)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	NRAS Q61H (A>T)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	NRAS Q61L	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	NRAS Q61K	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	NRAS Q61R	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	PIK3CA E542K	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	PIK3CA E545K	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	PIK3CA E545Q	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	PIK3CA H1047R	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	PIK3CA H1047L	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	BRAF V600E	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	G719S	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	G719A	7437	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	G719C	0	26497	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	E746_A750del (6223)	0	0	5757	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	E746_A750del (6225)	0	0	10	1966	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	L747_P753>S	0	0	0	0	5760	0	0	0	9607	0	0	0	0	0
	L747_A750>P	0	0	0	0	0	21729	0	0	0	0	0	0	0	0
	E746_S752>V	0	0	0	0	0	0	17742	0	0	0	0	0	0	0
	L747_T751del	0	0	0	0	0	0	0	2762	0	0	0	0	0	0
	L747_S752del	0	0	0	0	0	0	0	0	10785	0	0	0	0	0
	T790M	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10220	0	0	0	0
	L858R	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4883	0	0	0
	L861Q	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9166	0	0
	IGF(参考基因)	21863	25447	23777	22763	22103	25686	26458	24362	24475	22907	18201	23339	24793	0
	IC(内部对照)	7149	11891	10032	9790	8247	12862	10643	6742	8952	9343	4639	7677	9492	27421
	空白	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

图7C

测试的RNA样品(全部是50个拷贝)

每种RNA变体的特异性探针	RNA数据	V1	V2	V3a	V3b	V4	V5a	V5b	V"5"
	ALK-v1	10564	0	0	0	0	0	0	0
	ALK-v2	0	4779	0	0	0	0	0	0
	ALK-v3a	0	0	19800	2098	0	0	0	0
	ALK-v3b	0	0	6685	22407	0	0	0	0
	ALK-v4	0	0	0	0	42886	0	0	0
	ALK-v5a	0	0	0	0	0	14097	0	0
	ALK-v5b	0	0	0	0	0	0	28481	0
	ALK-v"5"	0	0	0	0	0	0	0	6117
	CD74-ROS1{C6R32}	0	0	0	0	0	0	0	0
	CD74-ROS1{C6R34}	0	0	0	0	0	0	0	0
	SLC34A2-ROS1{S14R32}	0	0	0	0	0	0	0	0
	SLC34A2-ROS1{S14R34}	0	0	0	0	0	0	0	0
	KIF5B-RET{K15R11}	0	0	0	0	0	0	0	0
	KIF5B-RET{K15R12}	0	0	0	0	0	0	0	0
	TRIM33-RET	0	0	0	0	0	0	0	0
	CCDC6-RET	0	0	0	0	0	0	0	0
	CD74-NTRK1	0	0	0	0	0	0	0	0
	MPRIP-NTRK1	0	0	0	0	0	0	0	0
	cMET外显子14跳读	0	0	0	0	0	0	0	0
	HPRT1{参考基因}	16624	14832	16336	16671	15996	16124	15891	16471
	IC{内部对照}	3108	3623	3819	2349	1196	2250	3824	4004
	空白	0	0	0	0	0	0	0	0

图8A

测试的RNA样品(全部是50个拷贝)

每种RNA变体的特异性探针	RNA 数据	CD74-ROS1{C6R32}	CD74-ROS1{C6R34}	SLC34A2-ROS1{SL4R32}	SLC34A2-ROS1{SL4R34}	KIF5B-RET{K15R11}	KIF5B-RET{K15R12}	TRIM33-RET	CCDC6-RET	CD74-NTRK1	MPRIP-NTRK1	cMET外显子14跳读
	ALK-v1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	ALK-v2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	ALK-v3a	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	ALK-v3b	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	ALK-v4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	ALK-v5a	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	ALK-v5b	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	ALK-v"5"	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	CD74-ROS1{C6R32}	1535	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	CD74-ROS1{C6R34}	0	4994	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	SLC34A2-ROS1{SL4R32}	0	0	1513	0	0	0	0	0	0	0	0
	SLC34A2-ROS1{SL4R34}	0	0	0	12583	0	0	0	0	0	0	0
	KIF5B-RET{K15R11}	0	0	0	0	23643	0	0	0	0	0	0
	KIF5B-RET{K15R12}	0	0	0	0	0	15595	0	0	0	0	0
	TRIM33-RET	0	0	0	0	0	0	31729	0	0	0	0
	CCDC6-RET	0	0	0	0	0	0	0	15514	0	0	0
	CD74-NTRK1	0	0	0	0	0	0	0	0	12261	0	0
	MPRIP-NTRK1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2156	0
	cMET外显子14跳读	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7947
	HPRT1{参考基因}	16060	15652	16356	17566	14888	14490	16780	14521	14422	12846	13833
	IC{内部对照}	4780	3521	3347	4236	3047	3313	935	5860	4539	2006	3716
	空白	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

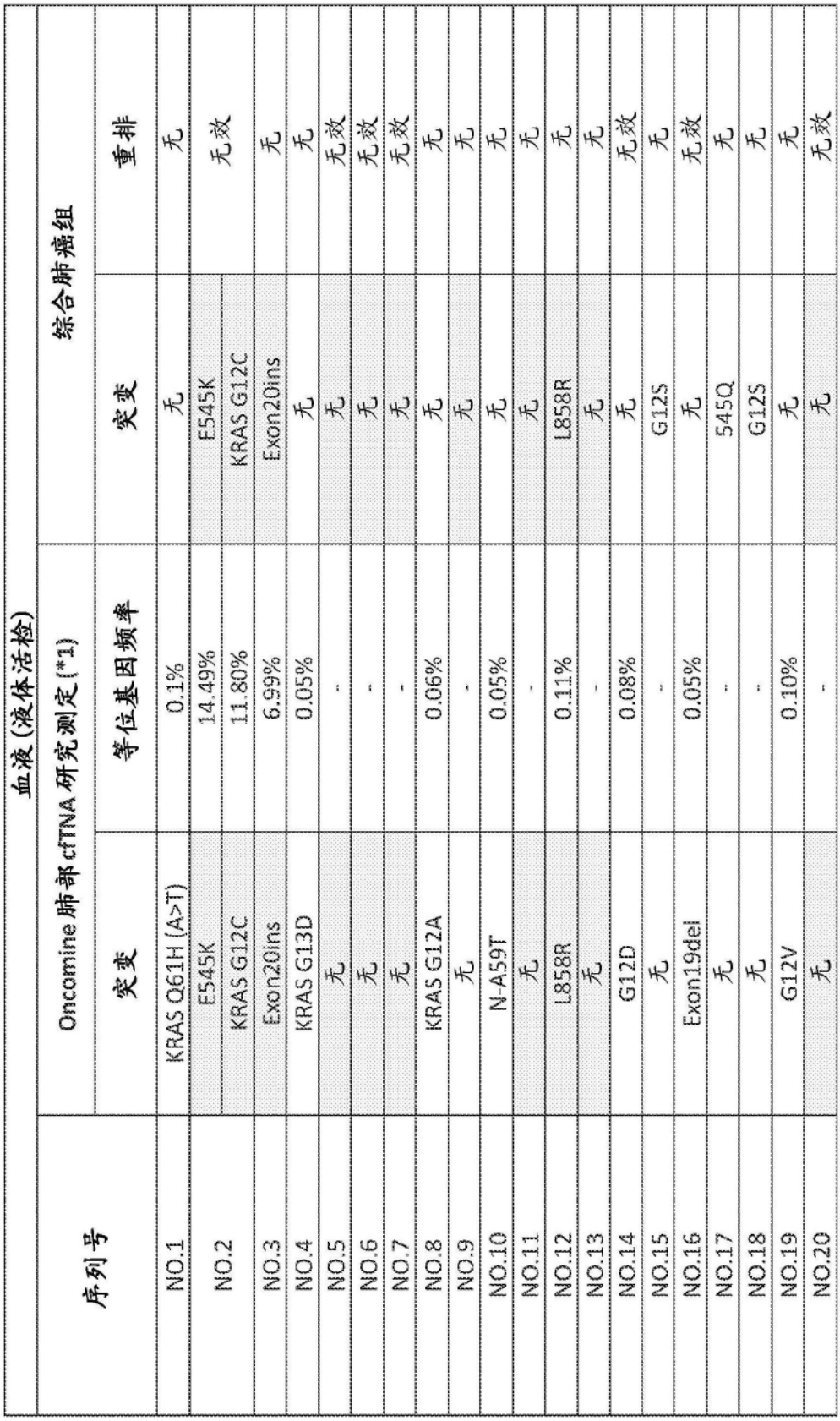
图8B

样品编号	样品类型	NGS结果	LCP结果
1	FFPE	v1	EML4-ALK+
2		v1	EML4-ALK+
3		v1	EML4-ALK+
4		v1	EML4-ALK+
5		WT	WT
6		v1	EML4-ALK+
7		v1	EML4-ALK+
8		v1	EML4-ALK+
9		WT	ROS1+
10		v1	EML4-ALK+
11		CCDC-RET	WT
12		cMET跳读	WT
13		v1	EML4-ALK+
14		v1	EML4-ALK+

图9A

样品编号	样品类型	ddPCR或NGS结果	LCP结果
1	胸腔积液	T790M	T790M
2		WT	WT
3		WT	WT
4	cfDNA(血清)	p.L747_P753>S, T790M	L747_P753>S & T790M
5		p.E746_A750del	E746_A750del & T790M
6		p.L747_T751del	L747_T751del
7		WT	WT
8		WT	WT
9	cfDNA(血清)	V600E (29.1%)	V600E
10		V600E (2.4%)	WT
11		V600E (17%)	V600E
12		V600E (31.3%)	V600E
13		V600E (0.7%)	WT
14		V600E (4%)	V600E
15		V600E (2.4%)	V600E
16		V600E (1%)	V600E
17		V600E (1.7%)	WT
18		V600E (8%)	V600E
19		V600E (26.5%)	V600E
20		V600E (1.7%)	V600E
21		V600E (17%)	V600E
22		V600E (4.3%)	V600E
23	cfDNA(血清)	G13D, H1047R	G13D, H1047R
24		G13D, E545K	WT
25		E545K	E545K
26		Q61H	Q61H
27		Q61H	Q61H

图9B



血液(液体活检)					
序列号	Oncomine 肺部 cfTNA 研究测定(*1)		综合肺癌组		
	突变	等位基因频率	突变	重排	
NO.1	KRAS Q61H (A>T)	0.1%	无	无	
NO.2	E545K	14.49%	E545K	无效	
	KRAS G12C	11.80%	KRAS G12C		
NO.3	Exon20ins	6.99%	Exon20ins	无	
NO.4	KRAS G13D	0.05%	无	无	
NO.5	无	-	无	无效	
NO.6	无	-	无	无效	
NO.7	无	-	无	无效	
NO.8	KRAS G12A	0.06%	无	无	
NO.9	无	-	无	无	
NO.10	N-A59T	0.05%	无	无	
NO.11	无	-	无	无	
NO.12	L858R	0.11%	L858R	无	
NO.13	无	-	无	无	
NO.14	G12D	0.08%	无	无效	
NO.15	无	-	G12S	无	
NO.16	Exon19del	0.05%	无	无效	
NO.17	无	-	545Q	无	
NO.18	无	-	G12S	无	
NO.19	G12V	0.10%	无	无	
NO.20	无	-	无	无效	

图10A

组织 - DNA					
序列号	Cobas (*2)	dPCR (*3)	综合肺癌组		
	EGFR	KRAS, PIK3CA	EGFR突变	突变	
NO.1	无	KRAS, 2.4%	无	G12A	
NO.2	Exon19del	还没有	Exon19del (6223)	E545K E545Q	
NO.3	无	KRAS, 0.2%	无	G12V	
NO.4	Exon20ins		Exon20ins (12376)	无	
NO.5	L858R		L858R	无	
NO.6	Exon19del		Exon19del (6254)	无	
NO.7	无	PIK3CA, 0.21%	无	H1047L	
NO.8	无		无	E545Q	
NO.9	Exon19del		Exon19del (6223)	无	
NO.10	还没有		L858R	无	
NO.11	还没有	KRAS, 2.4%	无	G12A	
NO.12	无	PIK3CA, 0.2%	无	H1047R	
NO.13	L858R		L858R	无	
NO.14	Exon19del		Exon19del (6223)	无	
NO.15	还没有	PIK3CA, 0.04%	无	H1047L	
NO.16	Exon19del		Exon19del (6225)	无	
NO.17	未包括		Del24	无	
NO.18	还没有	KRAS, 27%	无	G12D	
NO.19	L858R		L858R	无	
NO.20	Exon19del		Exon19del (12384)	无	

图10B

组织 - RNA			
序列号	illumina 聚焦组的 Ampliseq (*4)		综合肺癌组
	重排		重排
1	无		无
2	无		无
3	无		无
4	无		无
5	无		无
6	无		无
7	还没有		cMETex14跳读
8	还没有		无
9	还没有		无
10	还没有		还没有
11	还没有		无
12	cMETex14跳读		cMETex14跳读
13	cMETex14跳读		cMETex14跳读
14	无		无
15	无		无
16	还没有		无
17	无		无
18	无		无
19	无		无
20	还没有		无

图10C