



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106414738 A

(43)申请公布日 2017. 02. 15

(21)申请号 201580020715.6

(22)申请日 2015.06.23

(30)优先权数据

62/016312 2014.06.24 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2016.10.20

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2015/037268 2015.06.23

(87)PCT国际申请的公布数据

W02015/200377 EN 2015.12.30

(71)申请人 雅培分子公司

地址 美国伊利诺伊州

(72)发明人 S.Y.侯 A.H.夏 X.陈

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

代理人 梁谋 黄希贵

(51)Int.Cl.

C12N 15/11(2006.01)

C12Q 1/68(2006.01)

权利要求书5页 说明书43页

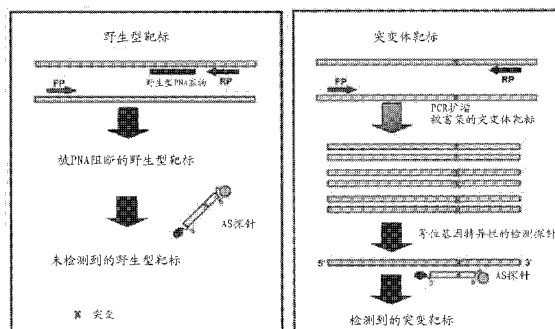
序列表13页 附图3页

(54)发明名称

人KRAS中单核苷酸多态性的检测

(57)摘要

本文中公开了用于检测KRAS基因中的单核苷酸多态性(SNP)的引物和探针。这些引物和探针可以用在鉴别KRAS基因中的一种或多种SNP的存在与否的方法中。这些引物和探针还可以用在预测有此需要的受试者对癌症疗法的应答的方法中。所述引物和探针还可以用在为有此需要的受试者选择癌症疗法的方法中。



1. 一种引物,其包含选自SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:47和SEQ ID NO:48的核苷酸序列。

2. 一种引物集合,其包含

- (a) 选自SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:7和SEQ ID NO:43的正向引物;
- (b) 选自SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:11和SEQ ID NO:48的反向引物;和
- (c) 选自SEQ ID NO:52和SEQ ID NO:56的肽核酸寡聚体。

3. 根据权利要求2所述的引物集合,其中所述引物集合选自:

- (a) SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:6和SEQ ID NO:52;
- (b) SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:48和SEQ ID NO:52;
- (c) SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:52和SEQ ID NO:56;
- (d) SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:52和SEQ ID NO:56;
- (e) SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:11和SEQ ID NO:56;和
- (f) SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:48和SEQ ID NO:56。

4. 一种探针,其包含选自SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:50和SEQ ID NO:51的核苷酸序列。

5. 根据权利要求4所述的探针,所述探针还包含可检测标记。

6. 根据权利要求5所述的探针,其中所述可检测标记是荧光标记。

7. 根据权利要求6所述的探针,其中所述荧光标记选自FAM、NED、Cy5和VIC。

8. 根据权利要求6所述的探针,所述探针还包含猝灭剂部分。

9. 一种引物和探针集合,其包含

- (a) 一种或多种选自SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8和SEQ ID NO:9的正向引物;
- (b) 一种或多种选自SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11和SEQ ID NO:12的反向引物;
- (c) 一种或多种选自SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:41和SEQ ID NO:42的探针;和

(d) 一种或多种选自SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:56和SEQ ID NO:57的肽核酸寡聚体。

10. 根据权利要求9所述的引物和探针集合, 其中所述一种或多种探针包含可检测标记。

11. 根据权利要求10所述的引物和探针集合, 其中所述可检测标记是荧光标记。

12. 根据权利要求11所述的引物和探针集合, 其中所述荧光标记选自FAM、NED、Cy5和VIC。

13. 根据权利要求11所述的引物和探针集合, 其中所述一种或多种探针还包含猝灭剂部分。

14. 根据权利要求9所述的引物和探针集合, 其还包含内部对照集合, 所述内部对照集合包含

(a) 正向引物, 其含有SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:44或SEQ ID NO:45所示的核苷酸序列;

(b) 反向引物, 其含有SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:47或SEQ ID NO:48所示的核苷酸序列; 和

(c) 探针, 其含有SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:50或SEQ ID NO:51所示的核苷酸序列。

15. 根据权利要求14所述的引物和探针集合, 其中所述包含SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:50或SEQ ID NO:51所示的核苷酸序列的探针还包含可检测标记。

16. 根据权利要求15所述的引物和探针集合, 其中所述可检测标记是荧光标记。

17. 根据权利要求15所述的引物和探针集合, 其中所述包含SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:50或SEQ ID NO:51所示的核苷酸序列的探针还包含猝灭剂部分。

18. 根据权利要求14所述的引物和探针集合, 其中所述引物和探针集合选自:

(a) SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:30和SEQ ID NO:51;

(b) SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:20和SEQ ID NO:51; 和

(c) SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:56、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:40和SEQ ID NO:51。

19. 一种鉴别一种或多种单核苷酸多态性 (SNP) 在v-Ki-ras2 Kirsten大鼠肉瘤病毒癌基因同系物 (KRAS) 中的存在与否的方法, 所述方法包括:

(a) 形成反应混合物, 其包含

(i) 得自受试者的样品, 其中所述样品疑似含有KRAS靶序列, 和

(ii) 权利要求9的引物和探针集合;

(b) 使所述反应混合物处于足以形成一种或多种扩增子的条件; 和

(c) 检测所述一种或多种扩增子。

20. 根据权利要求19所述的方法, 其中所述反应混合物还包含内部对照, 所述内部对照包含

(a) 正向引物, 其包含SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:44或SEQ ID NO:45所示的核苷酸序

列;

(b) 反向引物,其包含SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:47或SEQ ID NO:48所示的核苷酸序列;和

(c) 探针,其含有SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:50或SEQ ID NO:51所示的核苷酸序列。

21. 根据权利要求20所述的方法,所述方法还包括确定循环数目的差异(Δ CN),其中所述 Δ CN是与含有SNP的扩增子有关的循环数目和与从内部对照产生的扩增子有关的循环数目之间的差异。

22. 根据权利要求21所述的方法,其中如果 Δ CN小于截止值,那么SNP存在于KRAS中。

23. 根据权利要求19所述的方法,所述方法还包括基于步骤(c)中的检测来鉴别一种或多种SNP在KRAS中的存在。

24. 根据权利要求23所述的方法,其中所述一种或多种SNP选自G12C、G12R、G12S、G12D、G12A、G12V、G13D、G13C和Q61H。

25. 根据权利要求19所述的方法,其中权利要求9所述的引物和探针集合的一种或多种探针包含可检测标记。

26. 根据权利要求25所述的方法,其中所述可检测标记是荧光标记。

27. 根据权利要求26所述的方法,其中权利要求9所述的引物和探针集合的一种或多种探针还包含猝灭剂部分。

28. 根据权利要求26所述的方法,其中所述可检测标记选自FAM、Cy5、NED和VIC。

29. 根据权利要求26所述的方法,其中检测包括测量由所述可检测标记产生的荧光信号。

30. 根据权利要求20所述的方法,其中根据权利要求9所述的引物和探针集合是选自以下的引物和探针集合:

(a) SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:27和SEQ ID NO:30;

(b) SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:16和SEQ ID NO:20;和

(c) SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:56、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:38和SEQ ID NO:40。

31. 根据权利要求19所述的方法,其中所述样品得自受试者的癌性组织。

32. 根据权利要求31所述的方法,其中所述癌性组织是来自结直肠癌或非小细胞肺癌的组织。

33. 根据权利要求31所述的方法,其中所述样品是从固定的福尔马林石蜡包埋的样品提取的核酸。

34. 根据权利要求33所述的方法,其中所述核酸是基因组DNA。

35. 根据权利要求19所述的方法,其中所述样品是血液样品、血清样品或血浆样品。

36. 根据权利要求19所述的方法,其中所述样品是循环肿瘤DNA(ctDNA)。

37. 根据权利要求19所述的方法,其中形成反应混合物包括形成三种反应混合物,每种反应混合物包含所述得自受试者的样品和权利要求9的引物和探针集合。

38. 根据权利要求37所述的方法,其中

(a) 第一反应混合物包含所述得自受试者的样品、正向引物SEQ ID NO:2、反向引物SEQ ID NO:6、肽核酸寡聚体SEQ ID NO:52;和探针SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:27和SEQ ID NO:30;

(b) 第二反应混合物包含所述得自受试者的样品、正向引物SEQ ID NO:2、反向引物SEQ ID NO:6、肽核酸寡聚体SEQ ID NO:52;和探针SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:16和SEQ ID NO:20;和

(c) 第三反应混合物包含所述得自受试者的样品、正向引物SEQ ID NO:2、反向引物SEQ ID NO:6、正向引物SEQ ID NO:7、反向引物SEQ ID NO:11、肽核酸寡聚体SEQ ID NO:52、肽核酸寡聚体SEQ ID NO:56和探针SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:38和SEQ ID NO:40。

39. 根据权利要求38所述的方法,其中第一、第二和第三反应混合物中的每一种还包含内部对照,所述内部对照包含

(a) 正向引物,其含有SEQ ID NO:43所示的核苷酸序列;

(b) 反向引物,其含有SEQ ID NO:48所示的核苷酸序列;和

(c) 探针,其含有SEQ ID NO:51所示的核苷酸序列。

40. 一种为有此需要的受试者选择癌症疗法的方法,所述方法包括

(a) 形成反应混合物,其包含

(i) 得自受试者的样品,其中所述样品疑似含有KRAS靶序列,和

(ii) 权利要求9的引物和探针集合;

(b) 使所述反应混合物处于足以形成一种或多种扩增子的条件;

(c) 检测所述一种或多种扩增子;

(d) 鉴别v-Ki-ras2Kirsten大鼠肉瘤病毒癌基因同系物(KRAS)中的一种或多种单核苷酸多态性(SNP);和

(e) 基于在步骤(d)中鉴别的一种或多种SNP,为所述受试者选择癌症疗法。

41. 根据权利要求40所述的方法,其中所述样品得自受试者的癌性组织。

42. 根据权利要求41所述的方法,其中所述癌性组织是来自结直肠癌或非小细胞肺癌的组织。

43. 根据权利要求41所述的方法,其中所述样品是从固定的福尔马林石蜡包埋的样品提取的核酸。

44. 根据权利要求43所述的方法,其中所述核酸是基因组DNA。

45. 根据权利要求40所述的方法,其中所述样品是血液样品、血清样品或血浆样品。

46. 根据权利要求40所述的方法,其中所述样品是循环肿瘤DNA(ctDNA)。

47. 根据权利要求40所述的方法,其中所述反应混合物还包含内部对照,所述内部对照包含

(a) 正向引物,其含有SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:44或SEQ ID NO:45所示的核苷酸序列;

(b) 反向引物,其含有SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:47或SEQ ID NO:48所示的核苷酸序列;和

(c) 探针,其含有SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:50或SEQ ID NO:51所示的核苷酸序列。

48. 根据权利要求47所述的方法, 其中鉴别包括确定循环数目的差异 (Δ CN), 其中所述 Δ CN是与含有SNP的扩增子有关的循环数目和与从内部对照产生的扩增子有关的循环数目之间的差异。

49. 根据权利要求48所述的方法, 其中如果 Δ CN小于截止值, 那么SNP存在于KRAS中。

50. 根据权利要求40所述的方法, 其中所述一种或多种SNP选自G12C、G12R、G12S、G12D、G12A、G12V、G13D、G13C、Q61H和它们的任意组合。

51. 根据权利要求40所述的方法, 其中权利要求9所述的引物和探针集合中的一种或多种探针包含可检测标记。

52. 根据权利要求51所述的方法, 其中所述可检测标记是荧光标记。

53. 根据权利要求52所述的方法, 其中所述荧光标记选自FAM、Cy5、NED和VIC。

54. 根据权利要求52所述的方法, 其中权利要求9所述的引物和探针集合中的一种或多种探针还包含猝灭剂部分。

55. 根据权利要求52所述的方法, 其中检测包括测量由所述可检测标记产生的荧光信号。

56. 根据权利要求40所述的方法, 其中选择包括, 当一种或多种SNP被鉴别为从KRAS缺失时, 给所述受试者施用靶向表皮生长因子受体 (EGFR) 的治疗。

57. 根据权利要求40所述的方法, 其中选择包括, 当一种或多种SNP被鉴别为存在于KRAS中时, 不给所述受试者施用靶向表皮生长因子受体 (EGFR) 的治疗。

58. 根据权利要求40所述的方法, 其中选择包括, 当一种或多种SNP被鉴别为存在于KRAS中时, 给所述受试者施用除了靶向表皮生长因子受体 (EGFR) 的治疗以外的疗法。

人KRAS中单核苷酸多态性的检测

技术领域

[0001] 本发明涉及人KRAS中的单核苷酸多态性 (SNP), 涉及鉴别一种或多种SNP在人KRAS中的存在与否的方法, 涉及选择癌症疗法的方法, 和涉及预测对癌症疗法的应答的方法。

背景技术

[0002] 基因v-Ki-ras2 Kirsten大鼠肉瘤病毒癌基因同系物 (KRAS) 与多种癌症 (例如, 结肠直肠癌和非小细胞肺癌) 有关。具体地, 癌症可能与KRAS基因的密码子12、13和61中的突变 (即单核苷酸多态性 (SNP)) 有关。这些SNP可以指示遭受癌症的受试者对一种或多种癌症疗法的应答性。该预测又辅助癌症疗法的选择以施用给受试者。

[0003] 本发明的用于检测这些SNP的测定包括基于扩增的测定, 其能够检测两个反应混合物中的多种SNP。但是, 这样的测定不会鉴别存在的具体突变, 而是仅仅检测任何突变是否存在。如果鉴别SNP的同一性存在与否失败, 那么这些测定不允许使用者预测遭受癌症的受试者对一种或多种癌症疗法的应答, 由此阻碍用于所述受试者的癌症疗法的选择。其它基于扩增的测定鉴别具体的SNP, 但是为此目的, 每个SNP需要一个反应混合物, 且因而, 需要较大样品输入。用于诊断测试的样品通常具有小尺寸, 且因此, 较大样品在一个测定中的应用会限制在另一个测定中测试另外标志物的能力。

[0004] 因此, 需要开发这样的方法: 其用小量样品输入来检测和鉴别KRAS基因中的多种SNP以促进受试者对一种或多种癌症疗法的应答的预测。KRAS基因的特定SNP的鉴别将进一步允许从业人员为受试者选择适当的癌症疗法。

[0005] 发明概述

本发明涉及一种引物, 其包含选自SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:47和SEQ ID NO:48的核苷酸序列。

[0006] 本发明还涉及一种引物集合, 其包含 (a) 选自SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:7和SEQ ID NO:43的正向引物; (b) 选自SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:11和SEQ ID NO:48的反向引物; 和 (c) 选自SEQ ID NO:52和SEQ ID NO:56的肽核酸寡聚体。所述引物集合可以选自: (a) SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:6和SEQ ID NO:52; (b) SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:48和SEQ ID NO:52; (c) SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:52和SEQ ID NO:56; (d) SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:52和SEQ ID NO:56; (e) SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:11和SEQ ID NO:56; 和 (f) SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:48和SEQ ID NO:56。

[0007] 本发明还涉及一种探针, 其包含选自SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26、SEQ ID

NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:50和SEQ ID NO:51的核苷酸序列。所述探针可以包含与可检测标记组合的选自SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:50和SEQ ID NO:51的核苷酸序列。所述可检测标记可以是荧光标记。所述荧光标记可以选自FAM、NED、Cy5和VIC。所述探针还可以包含猝灭剂部分。

[0008] 本发明还涉及一种探针，其还可以包含与可检测标记组合的选自SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:50和SEQ ID NO:51的核苷酸序列，其中所述可检测标记可以是荧光标记。所述荧光标记可以选自FAM、NED、Cy5和VIC。

[0009] 本发明还涉及一种探针，其包含选自SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:50和SEQ ID NO:51的核苷酸序列。所述探针还可以包含与可检测标记和猝灭剂部分组合的选自SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:50和SEQ ID NO:51的核苷酸序列。所述可检测标记可以是荧光标记。所述荧光标记可以选自FAM、NED、Cy5和VIC。

[0010] 本发明还涉及一种引物和探针集合，其包含：(a) 一种或多种选自SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8和SEQ ID NO:9的正向引物；(b) 一种或多种选自SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11和SEQ ID NO:12的反向引物；(c) 一种或多种选自SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26、SEQ ID

NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:41和SEQ ID NO:42的探针；和(d)一种或多种选自SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:56和SEQ ID NO:57的肽核酸寡聚体。

[0011] 所述一种或多种探针可以选自：SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:41和SEQ ID NO:42，且还包含可检测标记。所述可检测标记可以是荧光标记。所述荧光标记可以选自FAM、NED、Cy5和VIC。所述一种或多种探针可以选自：SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:41和SEQ ID NO:42，且还包含可检测标记，且还可以包含猝灭剂部分。

[0012] 所述引物和探针集合还可以包含内部对照集合，其包含：(a) 正向引物，其包含SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:44或SEQ ID NO:45所示的核苷酸序列；(b) 反向引物，其包含SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:47或SEQ ID NO:48所示的核苷酸序列；和(c) 探针，其包含SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:50或SEQ ID NO:51所示的核苷酸序列。包含SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:50或SEQ ID NO:51所示的核苷酸序列的探针还可以包含可检测标记。所述可检测标记可以是荧光标记。包含SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:50或SEQ ID NO:51所示的核苷酸序列的探针还可以包含猝灭剂部分。

[0013] 所述引物和探针集合可以选自：(a) SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:30和SEQ ID NO:51；(b) SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:20和SEQ ID NO:51；和(c) SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:56、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:40和SEQ ID NO:51。

[0014] 本发明还涉及一种引物和探针集合，其包含：(a) 一种或多种选自SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8和SEQ ID NO:9的正向引物；(b) 一种或多种选自SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11和SEQ ID NO:12的反向引物；(c) 一种或多种选自SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:38、SEQ ID

NO:39、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:41和SEQ ID NO:42的探针；和(d)一种或多种选自SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:56和SEQ ID NO:57的肽核酸寡聚体。在所述引物和探针集合中，所述一种或多种探针可以包含可检测标记。该可检测标记可以是荧光标记，其中所述荧光标记选自FAM、NED、Cy5和VIC。在所述引物和探针集合中，所述一种或多种探针还可以包含猝灭剂部分。

[0015] 本发明还涉及一种引物和探针集合，其包含：(a)一种或多种选自SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8和SEQ ID NO:9的正向引物；(b)一种或多种选自SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11和SEQ ID NO:12的反向引物；(c)一种或多种选自SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:41和SEQ ID NO:42的探针；和(d)一种或多种选自SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:56和SEQ ID NO:57的肽核酸寡聚体。该引物和探针集合还可以包含内部对照集合，其包含：(a)正向引物，其含有SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:44或SEQ ID NO:45所示的核苷酸序列；(b)反向引物，其含有SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:47或SEQ ID NO:48所示的核苷酸序列；和(c)探针，其含有SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:50或SEQ ID NO:51所示的核苷酸序列。该引物和探针集合可以选自：(a)SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:30和SEQ ID NO:51；(b)SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:20和SEQ ID NO:51；和(c)SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:56、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:40和SEQ ID NO:51。

[0016] 本发明还涉及一种引物和探针集合，其包含：(a)一种或多种选自SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8和SEQ ID NO:9的正向引物；(b)一种或多种选自SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11和SEQ ID NO:12的反向引物；(c)一种或多种选自SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:41和SEQ ID NO:42的探针；和(d)一种或多种选自SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:56和SEQ ID NO:57的肽核酸寡聚体。该引物和探针集合还可以包含内部对照集合，其包含：(a)正向引物，其含有SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:44或SEQ ID NO:45所示的核苷酸序列；(b)反向引物，其含有SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:47或SEQ ID NO:48所示的核苷酸序列；和(c)探针，其含有SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:50或SEQ ID NO:51所示的核苷酸序列。在该引物和探针集合中，含有SEQ ID

NO:49、SEQ ID NO:50或SEQ ID NO:51所示的核苷酸序列的探针还可以包含可检测标记。在该引物和探针集合中,含有SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:50或SEQ ID NO:51所示的核苷酸序列的探针还可以包含猝灭剂部分。在该引物和探针集合中,所述一种或多种探针还可以包含可检测标记。

[0017] 本发明还涉及鉴别一种或多种单核苷酸多态性(SNP)在v-Ki-ras2 Kirsten大鼠肉瘤病毒癌基因同系物(KRAS)中的存在与否的方法,所述方法包括:(a)形成反应混合物,其包含(i)得自受试者的样品,其中所述样品疑似含有KRAS靶序列,和(ii)一种引物和探针集合,其包含:a.一种或多种选自SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8和SEQ ID NO:9的正向引物;b.一种或多种选自SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11和SEQ ID NO:12的反向引物;c.一种或多种选自SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:41和SEQ ID NO:42的探针;和d.一种或多种选自SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:56和SEQ ID NO:57的肽核酸寡聚体;(b)使所述反应混合物处于足以形成一种或多种扩增子的条件;和(c)检测所述一种或多种扩增子。

[0018] 所述反应混合物还可以包含内部对照,所述内部对照包含:(a)正向引物,其含有SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:44或SEQ ID NO:45所示的核苷酸序列;(b)反向引物,其含有SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:47或SEQ ID NO:48所示的核苷酸序列;和(c)探针,其含有SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:50或SEQ ID NO:51所示的核苷酸序列。

[0019] 所述鉴别方法还可以包括确定循环数目的差异(Δ CN)。所述 Δ CN可以是与含有SNP的扩增子有关的循环数目和与从内部对照产生的扩增子有关的循环数目之间的差异。如果 Δ CN小于截止值,那么SNP可以存在于KRAS中。

[0020] 所述鉴别方法还可以包括基于在上面步骤(c)中描述的检测鉴别一种或多种SNP在KRAS中的存在。

[0021] 在该方法中,所述一种或多种SNP可以选自G12C、G12R、G12S、G12D、G12A、G12V、G13D、G13C和Q61H。

[0022] 在该方法中,所述引物和探针集合的一种或多种探针可以包含可检测标记。所述可检测标记可以是荧光标记。所述可检测标记可以选自FAM、Cy5、NED和VIC。权利要求的引物和探针集合的一种或多种探针还可以包含猝灭剂部分。

[0023] 在该方法中,检测可以包括测量由所述可检测标记产生的荧光信号。

[0024] 在该方法中,权利要求的引物和探针集合可以是选自以下的引物和探针集合:(a) SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:27和SEQ ID NO:30;(b) SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:16和SEQ ID NO:20;和(c) SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:56、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:38和SEQ ID NO:40。

[0025] 在该方法中,所述样品可以得自受试者的癌性组织。所述癌性组织可以是来自结

直肠癌或非小细胞肺癌的组织。所述样品可以是固定的福尔马林石蜡包埋的样品提取的核酸。所述核酸可以是基因组DNA。

[0026] 在该方法中,所述样品可以是血液样品、血清样品或血浆样品。所述样品可以是循环肿瘤DNA (ctDNA)。

[0027] 在该方法中,形成反应混合物可以包括形成三种反应混合物,每种反应混合物包含所述得自受试者的样品以及所述引物和探针集合。第一反应混合物可以包含所述得自受试者的样品、正向引物SEQ ID NO:2、反向引物SEQ ID NO:6、肽核酸寡聚体SEQ ID NO:52;和探针SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:27和SEQ ID NO:30。第二反应混合物可以包含所述得自受试者的样品、正向引物SEQ ID NO:2、反向引物SEQ ID NO:6、肽核酸寡聚体SEQ ID NO:52;和探针SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:16和SEQ ID NO:20。第三反应混合物可以包含所述得自受试者的样品、正向引物SEQ ID NO:2、反向引物SEQ ID NO:6、正向引物SEQ ID NO:7、反向引物SEQ ID NO:11、肽核酸寡聚体SEQ ID NO:52、肽核酸寡聚体SEQ ID NO:56和探针SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:38和SEQ ID NO:40。

[0028] 第一、第二和第三反应混合物中的每一种还可以包含内部对照,所述内部对照包含(a)正向引物,其含有SEQ ID NO:43所示的核苷酸序列;(b)反向引物,其含有SEQ ID NO:48所示的核苷酸序列;和(c)探针,其含有SEQ ID NO:51所示的核苷酸序列。

[0029] 本发明还涉及鉴别一种或多种单核苷酸多态性(SNP)在v-Ki-ras2 Kirsten大鼠肉瘤病毒癌基因同系物(KRAS)中的存在与否的方法,所述方法包括:(a)形成反应混合物,其包含(i)得自受试者的样品,其中所述样品疑似含有KRAS靶序列,和(ii)一种引物和探针集合,其包含:a.一种或多种选自SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8和SEQ ID NO:9的正向引物;b.一种或多种选自SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11和SEQ ID NO:12的反向引物;c.一种或多种选自SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:41和SEQ ID NO:42的探针;和d.一种或多种选自SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:56和SEQ ID NO:57的肽核酸寡聚体;(b)使所述反应混合物处于足以形成一种或多种扩增子的条件;和(c)检测所述一种或多种扩增子。在该鉴别方法中,所述反应混合物还可以包含内部对照,所述内部对照包含(a)正向引物,其含有SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:44或SEQ ID NO:45所示的核苷酸序列;(b)反向引物,其含有SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:47或SEQ ID NO:48所示的核苷酸序列;和(c)探针,其含有SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:50或SEQ ID NO:51所示的核苷酸序列。该鉴别方法还可以包括确定循环数目的差异(Δ CN)。所述 Δ CN可以是与含有SNP的扩增子有关的循环数目和与从内部对照产生的扩增子有关的循环数目之间的差异。如果 Δ CN小于截止值,那么SNP可以存在于KRAS中。

[0030] 本发明还涉及鉴别一种或多种单核苷酸多态性(SNP)在v-Ki-ras2 Kirsten大鼠肉瘤病毒癌基因同系物(KRAS)中的存在与否的方法,所述方法包括:(a)形成反应混合物,其包含(i)得自受试者的样品,其中所述样品疑似含有KRAS靶序列,和(ii)一种引物和探针

集合,其包含:a. 一种或多种选自SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8和SEQ ID NO:9的正向引物;b. 一种或多种选自SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11和SEQ ID NO:12的反向引物;c. 一种或多种选自SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:41和SEQ ID NO:42的探针;和d. 一种或多种选自SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:56和SEQ ID NO:57的肽核酸寡聚体;(b)使所述反应混合物处于足以形成一种或多种扩增子的条件;和(c)检测所述一种或多种扩增子。该鉴别方法还可以包括基于步骤(c)中的检测来鉴别一种或多种SNP在KRAS中的存在。所述一种或多种SNP可以选自G12C、G12R、G12S、G12D、G12A、G12V、G13D、G13C和Q61H。

[0031] 本发明还涉及鉴别一种或多种单核苷酸多态性(SNP)在v-Ki-ras2 Kirsten大鼠肉瘤病毒癌基因同系物(KRAS)中的存在与否的方法,所述方法包括:(a)形成反应混合物,其包含(i)得自受试者的样品,其中所述样品疑似含有KRAS靶序列,和(ii)一种引物和探针集合,其包含:a. 一种或多种选自SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8和SEQ ID NO:9的正向引物;b. 一种或多种选自SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11和SEQ ID NO:12的反向引物;c. 一种或多种选自SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:41和SEQ ID NO:42的探针;和d. 一种或多种选自SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:56和SEQ ID NO:57的肽核酸寡聚体;(b)使所述反应混合物处于足以形成一种或多种扩增子的条件;和(c)检测所述一种或多种扩增子。在该鉴别方法中,所述引物和探针集合的一种或多种探针可以包含可检测标记。所述可检测标记是荧光标记。在该鉴别方法中,所述引物和探针集合的一种或多种探针还可以包含猝灭剂部分。在该鉴别方法中,检测可以包括测量由所述可检测标记产生的荧光信号。

[0032] 本发明还涉及鉴别一种或多种单核苷酸多态性(SNP)在v-Ki-ras2 Kirsten大鼠肉瘤病毒癌基因同系物(KRAS)中的存在与否的方法,所述方法包括:(a)形成反应混合物,其包含(i)得自受试者的样品,其中所述样品疑似含有KRAS靶序列,和(ii)一种引物和探针集合,其包含:a. 一种或多种选自SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8和SEQ ID NO:9的正向引物;b. 一种或多种选自SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11和SEQ ID NO:12的反向引物;c. 一种或多种选自SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29、SEQ ID

NO:30、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:41和SEQ ID NO:42的探针；和d. 一种或多种选自SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:56和SEQ ID NO:57的肽核酸寡聚体；(b) 使所述反应混合物处于足以形成一种或多种扩增子的条件；和(c) 检测所述一种或多种扩增子。在该鉴别方法中，形成反应混合物可以包括形成三种反应混合物，每种反应混合物包含所述得自受试者的样品以及所述引物和探针集合。在该鉴别方法中，第一反应混合物可以包含所述得自受试者的样品、正向引物SEQ ID NO:2、反向引物SEQ ID NO:6、肽核酸寡聚体SEQ ID NO:52；和探针SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:27和SEQ ID NO:30。在该鉴别方法中，第二反应混合物可以包含所述得自受试者的样品、正向引物SEQ ID NO:2、反向引物SEQ ID NO:6、肽核酸寡聚体SEQ ID NO:52；和探针SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:16和SEQ ID NO:20。在该鉴别方法中，第三反应混合物可以包含所述得自受试者的样品、正向引物SEQ ID NO:2、反向引物SEQ ID NO:6、正向引物SEQ ID NO:7、反向引物SEQ ID NO:11、肽核酸寡聚体SEQ ID NO:52、肽核酸寡聚体SEQ ID NO:56和探针SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:38和SEQ ID NO:40。第一、第二和第三反应混合物中的每一种还可以包含内部对照，所述内部对照包含(a) 正向引物，其含有SEQ ID NO:43所示的核苷酸序列；(b) 反向引物，其含有SEQ ID NO:48所示的核苷酸序列；和(c) 探针，其含有SEQ ID NO:51所示的核苷酸序列。

[0033] 本发明还涉及用于为有此需要的受试者选择癌症疗法的方法，所述方法包括：(a) 形成反应混合物，其包含(i) 得自受试者的样品，其中所述样品疑似含有KRAS靶序列，和(ii) 一种引物和探针集合，其包含：a. 一种或多种选自SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8和SEQ ID NO:9的正向引物；b. 一种或多种选自SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11和SEQ ID NO:12的反向引物；c. 一种或多种选自SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:41和SEQ ID NO:42的探针；和d. 一种或多种选自SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:56和SEQ ID NO:57的肽核酸寡聚体；(b) 使所述反应混合物处于足以形成一种或多种扩增子的条件；(c) 检测所述一种或多种扩增子；(d) 鉴别v-Ki-ras2 Kirsten大鼠肉瘤病毒癌基因同系物(KRAS)中的一种或多种单核苷酸多态性(SNP)；和(e) 基于在步骤(d)中鉴别的一种或多种SNP，为所述受试者选择癌症疗法。

[0034] 在该选择癌症疗法的方法中，所述样品可以得自受试者的癌性组织。所述癌性组织可以是来自结直肠癌或非小细胞肺癌的组织。所述样品可以是来自固定的福尔马林石蜡埋埋的样品提取的核酸。所述核酸可以是基因组DNA。

[0035] 在该选择癌症疗法的方法中，所述样品可以是血液样品、血清样品或血浆样品。所述样品可以是循环肿瘤DNA(ctDNA)。

[0036] 在该选择癌症疗法的方法中，所述反应混合物还可以包含内部对照，所述内部对照包含(a) 正向引物，其含有SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:44或SEQ ID NO:45所示的核苷酸序

列；(b) 反向引物，其含有SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:47或SEQ ID NO:48所示的核苷酸序列；和(c) 探针，其含有SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:50或SEQ ID NO:51所示的核苷酸序列。

[0037] 在该选择癌症疗法的方法中，鉴别可以包括确定循环数目的差异(Δ CN)。所述 Δ CN可以是与含有SNP的扩增子有关的循环数目和与从内部对照产生的扩增子有关的循环数目之间的差异。如果 Δ CN小于截止值，那么SNP可以存在于KRAS中。所述一种或多种SNP可以选自G12C、G12R、G12S、G12D、G12A、G12V、G13D、G13C、Q61H和它们的任意组合。

[0038] 在该选择癌症疗法的方法中，所述引物和探针集合的一种或多种探针可以包含可检测标记。所述可检测标记可以是荧光标记。所述荧光标记可以选自FAM、Cy5、NED和VIC。所述引物和探针集合中的一种或多种探针还可以包含猝灭剂部分。在该选择癌症疗法的方法中，检测可以包括测量由所述可检测标记产生的荧光信号。

[0039] 在该选择癌症疗法的方法中，选择可以包括，当一种或多种SNP被鉴别为从KRAS缺失时，给所述受试者施用靶向表皮生长因子受体(EGFR)的治疗。选择可以包括，当一种或多种SNP被鉴别为存在于KRAS中时，不给所述受试者施用靶向表皮生长因子受体(EGFR)的治疗。选择可以包括，当一种或多种SNP被鉴别为存在于KRAS中时，给所述受试者施用除了靶向表皮生长因子受体(EGFR)的治疗以外的疗法。

[0040] 本发明还涉及用于为有此需要的受试者选择癌症疗法的方法，所述方法包括：(a) 形成反应混合物，其包含(i) 得自受试者的样品，其中所述样品疑似含有KRAS靶序列，和(ii) 一种引物和探针集合，其包含：a. 一种或多种选自SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8和SEQ ID NO:9的正向引物；b. 一种或多种选自SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11和SEQ ID NO:12的反向引物；c. 一种或多种选自SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:41和SEQ ID NO:42的探针；和d. 一种或多种选自SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:56和SEQ ID NO:57的肽核酸寡聚体；(b) 使所述反应混合物处于足以形成一种或多种扩增子的条件；(c) 检测所述一种或多种扩增子；(d) 鉴别v-Ki-ras2 Kirsten大鼠肉瘤病毒癌基因同系物(KRAS)中的一种或多种单核苷酸多态性(SNP)；和(e) 基于在步骤(d)中鉴别的一种或多种SNP，为所述受试者选择癌症疗法。在该选择癌症疗法的方法中，所述反应混合物还可以包含内部对照，所述内部对照包含(a) 正向引物，其含有SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:44或SEQ ID NO:45所示的核苷酸序列；(b) 反向引物，其含有SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:47或SEQ ID NO:48所示的核苷酸序列；和(c) 探针，其含有SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:50或SEQ ID NO:51所示的核苷酸序列。在该选择癌症疗法的方法中，鉴别可以包括确定循环数目的差异(Δ CN)。所述 Δ CN可以是与含有SNP的扩增子有关的循环数目和与从内部对照产生的扩增子有关的循环数目之间的差异。如果 Δ CN小于截止值，那么SNP可以存在于KRAS中。所述一种或多种SNP可以选自G12C、G12R、G12S、G12D、G12A、G12V、G13D、G13C、Q61H和它们的任意组合。在该选择癌症疗法的方法中，所述样品可以得自受试者的癌性组织。所述癌性组织可以是来自结直肠癌或非小细胞肺癌的组织。所

述样品可以是固定的福尔马林石蜡包埋的样品提取的核酸。所述核酸可以是基因组DNA。在该选择癌症疗法的方法中,所述样品可以是血液样品、血清样品或血浆样品。所述样品可以是循环肿瘤DNA(ctDNA)。

[0041] 本发明还涉及用于为有此需要的受试者选择癌症疗法的方法,所述方法包括:(a)形成反应混合物,其包含(i)得自受试者的样品,其中所述样品疑似含有KRAS靶序列,和(ii)一种引物和探针集合,其包含:a.一种或多种选自SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8和SEQ ID NO:9的正向引物;b.一种或多种选自SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11和SEQ ID NO:12的反向引物;c.一种或多种选自SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:41和SEQ ID NO:42的探针;和d.一种或多种选自SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:56和SEQ ID NO:57的肽核酸寡聚体;(b)使所述反应混合物处于足以形成一种或多种扩增子的条件;(c)检测所述一种或多种扩增子;(d)鉴别v-Ki-ras2 Kirsten大鼠肉瘤病毒癌基因同系物(KRAS)中的一种或多种单核苷酸多态性(SNP);和(e)基于在步骤(d)中鉴别的一种或多种SNP,为所述受试者选择癌症疗法。在该选择癌症疗法的方法中,所述引物和探针集合的一种或多种探针可以包含可检测标记。所述可检测标记可以是荧光标记。所述引物和探针集合中的一种或多种探针还可以包含猝灭剂部分。在该选择癌症疗法的方法中,检测可以包括测量由所述可检测标记产生的荧光信号。选择可以包括,当一种或多种SNP被鉴别为从KRAS缺失时,给所述受试者施用靶向表皮生长因子受体(EGFR)的治疗;当一种或多种SNP被鉴别为存在于KRAS中时,不给所述受试者施用靶向表皮生长因子受体(EGFR)的治疗;或,当一种或多种SNP被鉴别为存在于KRAS中时,给所述受试者施用除了靶向表皮生长因子受体(EGFR)的治疗以外的疗法。所述一种或多种SNP可以选自G12C、G12R、G12S、G12D、G12A、G12V、G13D、G13C、Q61H和它们的任意组合。

附图说明

[0042] 图1显示了阐明突变体KRAS序列的选择性扩增和检测的示意图。

[0043] 图2显示了阐明三种反应混合物的示意图,所述三种反应混合物通过本文描述的方法形成,并用于检测KRAS基因中的九种不同SNP,即G12S、G12C、G12R、G12V、G12D、G12A、G13D、G13C和Q61H(即,Q61Ha和Q61Hb)。

[0044] 图3显示的表列出了用于标记的探针的检测的荧光通道,其中的每一种检测图2的SNP中的一种。内部对照探针也被标记,且因而是可检测的。因此,将四个荧光通道用于每种反应混合物,因为在每种反应混合物中,每个探针含有一个不同标记,例外是,用于检测Q61Ha和Q61Hb的探针含有与这些产生相同氨基酸置换(即Q61H)的突变相同的标记。具体地,四个通道检测来自标记NED、FAM、VIC和Cy5的荧光。

[0045] 详细描述

本发明涉及用于在有此需要的受试者中鉴别一种或多种SNP在KRAS中的存在与否的引

物和探针。所述一种或多种SNP可以存在于KRAS基因的密码子12、13和/或61中。

[0046] KRAS中的一种或多种SNP可以与癌症(例如,但不限于,结直肠癌(CRC)和非小细胞肺癌(NSCLC))有关。KRAS中的一种或多种SNP的存在与否可以指示遭受癌症(例如,CRC或NSCLC)的受试者对特定癌症疗法或治疗的应答,且因而辅助用于所述受试者的癌症疗法的选择。

[0047] 本发明还涉及鉴别KRAS中的一种或多种SNP的存在与否的方法。该方法包括从受试者得到样品,其中所述样品疑似含有KRAS靶序列。所述KRAS靶序列可以是野生型KRAS序列、突变体KRAS序列或它们的组合。所述鉴别方法提供选择性扩增,并从而提供了突变体KRAS序列的富集。该选择性扩增提供了以下有利性能:需要更少样品用于检测KRAS中的一种或多种SNP,且具有更少由野生型KRAS序列的扩增引起的干扰或噪音。

[0048] 所述鉴别方法还提供了多种SNP(诸如至多10种、9种、8种、7种、6种、5种、4种、3种、2种或1种SNP)的同时扩增、检测和鉴别。这又提供了在突变体KRAS序列的选择性扩增提供的富集下用少量样品输入确定约98%、约97%、约96%、约95%、约94%、约93%、约92%、约91%或约90%的KRAS中的与CRC和NSCLC有关的突变的存在与否的有利能力。在某些实施方案中,所述方法提供100 ng或10ng或1ng或1μg或10μg或100μg KRAS靶序列中至少约2%KRAS突变的灵敏度。所述方法还在一种或多种SNP的存在与否的检测中提供了100%再现性。所述方法还不会与污染和/或干扰物质(诸如微生物、血红蛋白、甘油三酯、坏死组织、同源序列、诸如此类,它们可能存在于得自受试者的样品中)交叉反应,也不会受其干扰。

[0049] 因此,所述鉴别方法实现了在单个测定中检测KRAS中与CRC和NSCLC有关的几乎所有突变的显著技术效果。所述鉴别方法还实现了鉴别哪些突变不存在和哪些突变存在于给定受试者的KRAS基因中的显著技术效果。知道哪些突变存在于或不存在于KRAS基因中允许所述方法的使用者预测遭受CRC或NSCLC的受试者对给定治疗的应答。该预测又允许使用者选择和施用如下面更详细地描述的适当治疗。

[0050] 1. 定义

除非另有定义,在本文中使用的所有技术和科学术语具有本领域普通技术人员通常理解的相同含义。在冲突的情况下,以本文件(包括定义)为准。下面描述了优选的方法和材料,尽管与本文描述的那些类似或等同的方法和材料可以用于实践或测试本发明。本文中提及的所有出版物、专利申请、专利和其它参考文献通过引用整体并入。本文中公开的材料、方法和实施例仅仅是示例性的,且无意成为限制性的。

[0051] 本文中使用的术语“包含”、“包括”、“具有”、“有”、“可以”、“含有”、及其变体意图是末端开放的过渡短语、术语或词语,其不排除另外动作或结构的可能性。单数形式“一个/种”、“且”和“所述”包括复数所指,除非上下文另外清楚地指明。本公开内容也预见到“包含”本文呈现的实施方案或元件、“由其组成”和“基本上由其组成”的其它实施方案,不论是否明确地阐述。

[0052] 本文中使用的术语“约”表示从所述值大约±10%变化。应当理解,这样的变化总是被包括在本文中提供的任意给定值中,无论是否具体提及它。

[0053] 本文中使用的术语“荧光团”或“荧光标记”是指能够发光的任意合适的部分。所述光可以化学地、生物地、响应于激发光子或从任意其它合适的原因产生。优选地,荧光团是为了经由连接部分连接至本文描述的探针的核酸而衍生化的荧光有机染料。当使用核糖基

或脱氧核糖基聚合物将核苷碱基连接在一起时,所述染料可以有利地衍生化以连接至所述聚合物的末端3'碳或末端5'碳。

[0054] 本文中使用的术语“高亲和力核酸类似物”是指与具有相同碱基序列的未修饰的核酸相比以更高亲和力与互补核酸(诸如脱氧核糖核酸(DNA))杂交的经修饰的核酸。高亲和力核酸包括、但不限于锁核酸(LNA)、肽核酸(PNA)、己糖醇核酸(HNA)、氨基磷酸酯等。

[0055] 本文中使用的术语“杂交”是指通过两个单链核酸之间的互补碱基配对形成双链体结构。杂交可以发生在准确互补的核酸链之间或含有低数目错配的互补核酸链之间。

[0056] 本文中使用的术语“KRAS靶序列”或“KRAS靶核酸序列”是指包括KRAS基因的密码子12、密码子13、密码子61、密码子117或密码子146或它们的任意组合的核酸或其补体,其使用本文描述的引物和/或探针中的一种或多种进行扩增、检测或二者。另外,尽管术语靶序列有时表示双链核酸序列,但是靶序列也可以是单链的。在其中靶序列是双链的情况下,本发明的引物可以扩增靶序列的两条链。可以选择对特定生物体或多或少具有特异性的靶序列。例如,所述靶序列可以对整个属、对超过一个属、对一个种或亚种、血清群、auxotrope、血清型、菌株、分离物或其它生物体子集具有特异性。

[0057] 本文中使用的术语“标记”是指这样的任何部分:其可以基于所述部分的固有化学性质或它与另一个分子反应的能力而产生可检测信号。标记的例子包括、但不限于放射性的、荧光的或化学发光的分子或酶。标记也包括对容易检测的其它分子(诸如生物素-抗生物素蛋白系统和抗原-抗体系统)具有亲和力的分子。

[0058] 本文中使用的术语“锁核酸(LNA)”是指其特征存在于存在一个或多个单体的核酸类似物(嘌呤和/或嘧啶碱基的聚合物),所述单体是具有添加至核糖环的额外2H—O、4H—C—亚甲基桥的构象上受限制的核苷酸类似物。LNA已经被定义为具有一个或多个2H—O、4H—C—亚甲基—(D-呋喃核糖基)核苷酸单体的寡核苷酸。LNA对外切核酸酶和热具有抗性。

[0059] 术语“核酸”、“核酸序列”、“多核苷酸”和“寡核苷酸”是指核糖核酸(RNA)、脱氧核糖核酸(DNA)、修饰的RNA或DNA、或RNA或DNA模拟物(例如,蛋白核酸(PNA))的核酸聚合物,及其衍生物,及其变体。因而,多核苷酸包括由天然存在的核苷碱基、糖和共价核苷间(主链)键组成的聚合物以及具有类似地起作用的非天然存在的部分的聚合物。寡核苷酸通常是约10个至约160或200个核苷酸的短多核苷酸。

[0060] 这些术语“核酸”、“核酸序列”、“多核苷酸”和“寡核苷酸”也表示引物、可检测的寡核苷酸或探针、和寡聚体,不论长度,且包括多脱氧核糖核苷酸、多核糖核苷酸和修饰的/未修饰的嘌呤/嘧啶碱基的任意其它N-糖苷。例子包括单链DNA(ssDNA)、双链DNA(dsDNA)、单链RNA(ssRNA)和双链RNA(dsRNA)。这样的分子可以包含磷酸二酯键或经修饰的键,包括、但不限于,磷酸三酯、氨基磷酸酯、硅氧烷、碳酸酯、羧甲基酯、乙酰亚胺酸酯(acetamidate)、氨基甲酸酯、硫醚、桥连的氨基磷酸酯、桥连的亚甲基膦酸酯、硫代磷酸酯、甲基膦酸酯、二硫代磷酸酯、桥连的硫代磷酸酯或砷键和它们的组合。这样的分子可以包含腺嘌呤、鸟嘌呤、胸腺嘧啶、胞嘧啶和/或尿嘧啶、以及其它经修饰的、非标准的或衍生化的碱基。可选地或额外地,这样的分子可以包含一个或多个经修饰的糖部分。

[0061] 本文中使用的术语“肽核酸(PNA)”是指这样的合成DNA类似物:其中正常的磷酸二酯主链被N-(2-氨基乙基)甘氨酸链或其它可选的氨基酸链替换。它的核苷碱基以相同的A-T(U)和G-C方式补充DNA或RNA(Nielsen, 等人, Science 254: 1497-1500 (1991);

Hanvey, 等人, Science 258: 1481-1485 (1992);和Egholm, 等人, Nature 365: 566-568 (1993)。所述人工主链使PNA对核酸酶具有抗性。根据本领域已知的方法可以合成PNA (参见,例如,Hyrup, 等人, Bioorg. Med. Chem. 4: 5-23 (1996);国际专利申请公开号WO 92/20702和92/20703;和美国专利号5,539,082,为了它们关于这方面的教导,它们的内容都通过引用并入本文)。两个重要特征使PNA成为特定等位基因的优良PCR夹。它不可充当聚合的引物。它不可充当Taq聚合酶的外切核酸酶活性的底物。另外,完美匹配的PNA-DNA双链体的解链温度高于相同长度的DNA-DNA双链体的解链温度;因而,所述PNA-DNA双链体是更稳定的。PNA-DNA杂合物中的单个错配会造成约10-18℃的解链温度的下降(Kyger, 等人, Anal. Biochem. 260: 142-148 (1998))。因此,在适当的温度范围内,PNA可以特异性地阻断引物/可检测的寡核苷酸退火或完美匹配的模板上的链延长,而不会干扰具有错配碱基的模板上的反应(Sun, 等人, Nat. Biotechnol. 20: 186-189 (2002);Thiede, 等人, Nucleic Acids Res. 24: 983-984 (1996);和Taback, 等人, Int. J. Cancer 111: 409-414 (2004)),其被称作PNA介导的PCR夹(Orum, 等人, Nucleic Acids Res. 21: 5332-5336 (1993))。完美匹配的和错配的杂合物之间的解链温度的大差异使得PNA成为点突变的良好传感器(参见,例如,Karadag, 等人, Nucleic Acids Res. 32: e63 (2004);Taback, 等人(2004), 出处同上;Hancock, 等人, Clin. Chem. 48: 2155-2163 (2002);Takiya, 等人, Biosci. Biotechnol. Biochem. 68: 360-368 (2004);Kirishima, 等人, J. Hepatol. 37: 259-265 (2002);和Ohishi, 等人, J. Med. Virol. 72: 558-565 (2004))。美国专利申请公开号2004/0014105公开了以低丰度存在于样品中的多核苷酸的选择性富集的方法。所述方法使用酶不可延长的核碱基寡聚体(例如,PNA)作为PCR夹以选择性地阻断以高丰度存在于样品中的多核苷酸的聚合酶活性,由此导致在样品中不太丰富的物质的富集。“PNA”可以包括PNA夹。夹通过PNA和DNA引物或探针之间对共同靶位的物理竞争而工作,由此干扰引物延伸。

[0062] 本文中关于核酸序列使用的术语“核酸序列同一性百分比(%)”是指,在比对序列且如果必要的话引入缺口以达到最大序列同一性百分比以后,候选序列中与目标序列中的核苷酸等同的核苷酸的百分比。用于确定核酸序列同一性百分比的目的的比对可以在本领域技术内的不同方式实现,例如,使用公众可得到的计算机软件诸如BLAST、BLAST-2、ALIGN或Megaalign (DNASTAR) 软件。本领域技术人员可以确定用于测量比对的适当参数,包括达到在被对比的序列的全长上的最大比对所需的任何算法。

[0063] 当比对核苷酸序列时,相对于、关于或针对给定核酸序列D的给定核酸序列C的核酸序列同一性百分比(其可以可选地用短语表示为具有或包括相对于、关于或针对给定核酸序列D的特定核酸序列同一性百分比的给定核酸序列C)可以如下计算:

$$\text{核酸序列同一性百分比} = W/Z * 100$$

其中

W是通过序列比对程序或算法的C和D比对评分为等同匹配的核苷酸的数目

且

Z是D中的核苷酸的总数。

[0064] 当核酸序列C的长度不等于核酸序列D的长度时,C与D的核酸序列同一性百分比将不等于D与C的核酸序列同一性百分比。

[0065] 与第二多核苷酸具有序列同一性的第一多核苷酸是指,与第二多核苷酸具有至少约60%核酸序列同一性或至少约61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%核酸序列同一性的第一多核苷酸。

[0066] 本文中使用的术语“聚合酶链式反应(PCR)”是指制备DNA序列的拷贝的方法。该方法采用热循环(即,分别对DNA加热和冷却进行变性(或解链)和复制的循环)。使用引物(其为含有与要复制的DNA序列互补的序列的短DNA片段)和热稳定的DNA聚合酶(诸如得自水生栖热菌(*Thermus aquaticus*)的DNA聚合酶,其被称作Taq聚合酶)来选择DNA序列并拷贝它(参见,例如,美国专利号4,683,195、4,800,195和4,965,188,为了它们关于这方面的教导,它们都通过引用并入本文)。利用重复循环,制备的拷贝用作产生其它拷贝的模板(即,链式反应)。PCR技术包括、但不限于:标准PCR等位基因-特异性的PCR、装配PCR、不对称的PCR、数字PCR、热启动PCR、序列间-特异性的PCR、反向PCR、连接介导的PCR、甲基化-特异性的PCR、微小引物PCR、嵌套PCR、重叠延伸PCR、实时PCR、反转录-PCR、固相PCR、热不对称的交错PCR和降落PCR。

[0067] 本文中使用的术语“引物”是指开始模板依赖性的核酸合成的寡核苷酸。在有核酸模板、核苷三磷酸前体、聚合酶和辅因子存在下,在合适的温度和pH条件下,所述引物可以通过聚合酶对核苷酸的添加而在它的3'端处延伸以产生引物延伸产物。所述引物的长度可以随采用的特定条件和扩增的目的而变化。例如,为诊断目的用于扩增的引物通常具有约15至约35个核苷酸的长度。所述引物必须与期望的模板具有足够的互补性以提供期望的延伸产物的合成。换言之,所述引物必须能够以足以在适当的并列连接中提供引物的3'羟基部分的方式与期望的模板链退火用于开始聚合酶的合成。所述引物不一定是期望的模板的精确补体。例如,非互补的核苷酸序列可以存在于在其它方面互补的引物的5'末端处。可选地,非互补的碱基可以散布在寡核苷酸引物内,前提条件是,所述引物序列与期望的模板链的序列具有足够的互补性,以提供模板-引物复合物用于延伸产物的合成。

[0068] 本文中使用的术语“探针”或“引物”是指这样的多核苷酸:其具有至少8个核苷酸、至少10个核苷酸、至少15个核苷酸、至少20个核苷酸或至少25个核苷酸的长度,并由于探针或引物中的至少一个序列与靶区域中的序列的互补性而与靶序列形成杂合结构。探针的多核苷酸区域可以由DNA和/或RNA和/或合成的核苷酸类似物组成。优选地,所述探针不含有与在聚合酶链式反应中用于激发靶序列的一个或多个序列互补的序列。引物和探针在合适的条件下选择性地与靶序列杂交。可以检测所述探针。在某些实施方案中,所述引物和/或探针可以含有一种或多种高亲和力核酸类似物。

[0069] 本文中使用的术语“特异性地杂交”是指核酸(或其类似物)诸如引物或探针与另一个核酸特异性地结合的能力。

[0070] 本文中使用的术语“受试者”是指哺乳动物、鸟或爬行动物。所述受试者可以是牛、马、狗、猫或灵长类动物。所述受试者可以是人。所述受试者可以是活的或死的。

[0071] 本文中使用的术语“严谨的”或“序列-特异性的”杂交条件是指其中完全互补的核酸链将优先杂交的条件。严谨杂交条件是本领领域众所周知的。严谨条件是序列依赖性的,且在不同的情况下将是不同的。通常,将严谨条件选择为比在确定的pH和离子强度条件下特定序列的热熔点(T_m)低约5°C,在此时50%的碱基对发生解离。

[0072] 本文中使用的术语“基本上互补的”是指除了微小的错配区域以外互补的序列。通常,长度为约15个核苷酸的核酸中错配的总数是约3个核苷酸或更少。

[0073] 本文中使用的术语“靶序列”和“靶区域”是指要检测、或者检测并分析的核酸区域,且其包含目标多态位点。

[0074] 本文中使用的术语“测试样品”、“生物样品”、“患者样品”或“样品”是指取自受试者的样品或生物流体,其中所述样品可以含有KRAS靶序列。测试样品可以取自任何来源,例如,组织、血液、血浆、唾液、痰、粘液、汗液、尿、尿道拭子、宫颈拭子、泌尿生殖器或肛门拭子、结膜拭子、眼透镜流体、脑脊液等。测试样品可以(i)以从来源得到的状态直接使用,或(ii)在预处理以改变样品的特性以后使用。因而,可以如下预处理测试样品:例如,从血液制备血浆或血清,破碎细胞或病毒颗粒,从固体材料制备液体,稀释粘稠的流体,过滤液体,添加试剂,纯化核酸等。在某些实施方案中,所述样品可以是福尔马林固定的石蜡包埋(FFPE)的组织。在其它实施方案中,所述样品可以是从小于FFPE组织提取或得到的核酸(例如,DNA和/或RNA)。在其它实施方案中,所述样品可以是从小于血液、血浆或另一种体液提取或得到的核酸(例如,DNA和/或RNA)。

[0075] 本文中使用的术语“治疗”可互换地是指逆转、减轻或抑制这样的术语适用的疾病的进展、或这样的疾病的一种或多种症状。取决于受试者的状况,该术语也表示预防疾病,且包括预防疾病的发作,或预防与疾病有关的症状。治疗可以以急性或慢性方式执行。该术语也表示,在罹患疾病之前,减轻疾病的严重程度或与这样的疾病有关的症状。“预防”也表示阻止具有与这样的疾病有关的一种或多种症状的疾病的复发。“治疗”和“治疗上”表示如上面所定义的“治疗”的治疗动作。

[0076] 在本文中使用的术语仅用于描述特定实施方案的目的,且不会在其它方面意图是限制性的。就本文中列举的数字范围而言,明确地预见到具有相同精确度的在二者之间的每个插入数字。例如,就6-9的范围而言,除了6和9以外还预见到数字7和8,且就范围6.0-7.0而言,明确地预见到数字6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9和7.0。

[0077] 2. 鉴别KRAS中的单核苷酸多态性的方法

本文提供了在有此需要的受试者中鉴别在v-Ki-ras2 Kirsten大鼠肉瘤病毒癌基因同系物(KRAS)中的一种或多种单核苷酸多态性(SNP)的方法。所述鉴别方法确定KRAS中的一种或多种SNP的存在与否。如下面更详细地描述的,KRAS中的一种或多种SNP可以与癌症(例如,但不限于,结直肠癌(CRC)和非小细胞肺癌(NSCLC))有关。KRAS中的一种或多种SNP的存在与否可以指示遭受癌症(例如,CRC或NSCLC)的受试者对特定癌症疗法或治疗的应答,且因而辅助用于所述受试者的癌症疗法的选择。

[0078] 所述鉴别方法将KRAS中的一种SNP与KRAS中的另一种SNP区分开。所述鉴别方法将KRAS中的SNP与KRAS中的野生型序列区分开。所述鉴别方法提供在100 ng、10 ng、1 ng、1 μg、10 μg或100 μg KRAS靶序列中的至少约0.01%、0.05%、0.1%、0.5%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%或10%KRAS突变的灵敏度。所述鉴别方法提供在10 ng KRAS靶序列中的至少约0.01%、0.05%、0.1%、0.5%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%或10%KRAS突变的灵敏度。在某些实施方案中,所述方法提供在10 ng KRAS靶序列中的至少约2%KRAS突变的灵敏度。

[0079] 所述鉴别方法是可再现的。所述鉴别方法在一种或多种SNP的存在与否的检测中提供至少约90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%再现性。在某些实施方案

中,所述鉴别方法在一种或多种SNP的存在与否的检测中提供100%再现性。

[0080] 所述鉴别方法对检测靶向的一种或多种SNP是特异性的,由此避免与污染和/或干扰物质(诸如诸如微生物、血红蛋白、甘油三酯、坏死组织、诸如此类,它们可能存在于得自受试者的样品中)的交叉反应性或其干扰。所述鉴别方法对检测靶向的KRAS中的一种或多种SNP是特异性的,且因而,不会与KRAS的同系物(例如,hRAS和nRAS)和KRAS假基因KRAS1P交叉反应。

[0081] 所述方法包括从受试者得到样品,其中所述样品可以包括或不包括KRAS靶序列。如下面更详细地描述的,所述KRAS靶序列可以是野生型KRAS序列、突变体KRAS序列或它们的组合。

[0082] 所述方法还包括测量或检测KRAS中的一种或多种SNP。测量或检测可以包括形成如下面更详细地描述的反应混合物。所述反应混合物可以包括用于扩增KRAS靶序列(或其部分)的引物和肽核酸(PNA)寡聚体。所述PNA寡聚体阻止野生型KRAS序列的扩增,由此允许突变体KRAS序列的选择性扩增。该选择性扩增会富集扩增的突变体KRAS序列。因此,突变体KRAS序列(如果存在于样品中的话)被选择性地扩增(且从而富集),无论从其得到所述样品的受试者对于KRAS中的一种或多种SNP而言是杂合的还是纯合的。该选择性扩增也会提供以下有利性能:需要更少样品用于检测KRAS中的一种或多种SNP,且具有更少由野生型KRAS序列的扩增引起的干扰或噪音。

[0083] 所述反应混合物还可以包括内部对照。所述反应混合物还可以包括一种或多种探针,每种探针允许KRAS中的不同SNP的独立检测,且从而允许所述SNP的鉴别。所述一种或多种探针可以如下面更详细地描述地可检测地标记。

[0084] 所述方法还包括:使所述反应混合物处于足以形成一种或多种扩增子的条件,所述扩增子含有KRAS中的一种或多种SNP。所述方法还包括用一种或多种探针检测所述一种或多种扩增子,其中检测给出KRAS中的一种或多种SNP的存在的信号。没有检测给出KRAS中的一种或多种SNP的不存在的信号。检测可以与KRAS中的特定SNP比对。

[0085] 有利地,所述一种或多种探针可以各自独立地用不同标记进行标记,由此允许KRAS中的超过一种SNP的检测,并从而允许其鉴别。在某些实施方案中,检测各个密码子内的不同突变(其中所述不同突变产生相同氨基酸置换)的探针可以含有相同标记。具体地,多种SNP(例如,1种、2种、3种、4种、5种、6种、7种、8种、9种、10种、11种、12种、13种、14种、15种、16种、17种、18种、19种、20种或更多种SNP)可以以与本文描述的鉴别方法同时的方式检测和鉴别。这会提供在突变体KRAS序列的选择性扩增提供的富集下用少量样品输入(诸如1 ng、10 ng、100 ng或1 μ g)确定约98%、约97%、约96%、约95%、约94%、约93%、约92%、约91%、约90%的KRAS中分别与CRC和NSCLC有关的突变的存在与否的有利能力。因此,所述鉴别KRAS中的一种或多种SNP的方法会实现检测KRAS中与CRC和NSCLC有关的几乎所有突变的显著技术效果。所述鉴别方法还会实现鉴别哪些突变不存在和哪些突变存在于给定受试者的KRAS基因中的显著技术效果。知道哪些突变存在于或不存在于KRAS基因中允许所述方法的使用者预测遭受CRC或NSCLC的受试者对给定治疗的应答。该预测又允许使用者选择和施用如下面更详细地描述的适当治疗。

[0086] a. KRAS基因中的SNP

所述方法鉴别一种或多种SNP在基因v-Ki-ras2 Kirsten大鼠肉瘤病毒癌基因同系物

(KRAS) 中的存在与否。KRAS 编码在 GTP-结合的活性构象和 GDP-结合的无活性构象之间循环的小 GTP 酶。由 KRAS 编码的 GTP 酶也是促分裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 信号传递途径的一个成员,其调节细胞增殖和分化。具体地,KRAS 被源自细胞表面受体酪氨酸激酶 (RTK) 的上游信号(例如,表皮生长因子受体 (EGFR)) 活化。KRAS 的活性构象通过活化下游迅速地加速的纤维肉瘤 (RAF) 激酶(例如,B-RAF) 而传送所述信号。

[0087] 抑制 GTP 水解的 KRAS 中的突变是致癌的,因为这些突变诱导组成活性的 KRAS 构象。这些活化突变主要位于 KRAS 基因的密码子 12、13 和 61 内,且可以是 SNP。在 KRAS 基因的外显子 2 的密码子 12 和 13 以及外显子 3 的 61 中可能存在多达 18 个氨基酸变化。密码子 12 和 13 位于 KRAS 基因的外显子 2 中,而密码子 61 位于 KRAS 基因的外显子 3 中。如下面更详细地描述的,在几种癌症中发现了 KRAS 中的活化突变,所述癌症包括、例如结直肠癌 (CRC) 和非小细胞肺癌 (NSCLC)。具体地,在密码子 12、13 和 61 中可能的 18 种氨基酸变化中,这些癌症中大于 98% 的鉴别的 KRAS 突变是 G12D、G12A、G12V、G12S、G12C、G12R、G13D、G13C 或 Q61H。另外,位于 KRAS 基因的密码子 117 和 146 中的突变是致癌的。在 KRAS 基因的密码子 117 和 146 中可能存在多达四种致癌的氨基酸变化(参见下面表 1),且可以与上面讨论的和下面在表 1 中显示的 KRAS 基因的密码子 12、13 和/或 61 中的突变变化相组合)。

[0088] 因此,KRAS 中的一种或多种 SNP 可以与癌症(例如,但不限于,结直肠癌 (CRC) 和非小细胞肺癌 (NSCLC)) 有关。如在下面更详细地描述的,KRAS 中的一种或多种 SNP 的存在与否可以指示遭受癌症(例如,CRC 或 NSCLC) 的受试者对特定癌症疗法或治疗的应答。

[0089] 可以在外显子 2、外显子 3、外显子 2 和外显子 3、或 KRAS 基因的另一个部分中发现一种或多种 SNP。可以在 KRAS 基因的密码子 12、13、61、117 和/或 146 中发现一种或多种 SNP。所述一种或多种 SNP 可以是下面表 1 中列出的 SNP 中的一种或多种。在某些实施方案中,所述一种或多种 SNP 可以是 G12S、G12C、G12R、G12V、G12D、G12A、G13D、G13C、Q61H (即,Q61Ha 或 Q61Hb) 中的一种或多种。

[0090] 所述一种或多种 SNP 可以是下面表 1 中列出的 SNP 的任意组合。在某些实施方案中,所述一种或多种 SNP 可以是 G12S、G12C、G12R、G12V、G12D、G12A、G13D、G13C、Q61H (即,Q61Ha 或 Q61Hb) 的任意组合。

[0091] 表 1

突变	序列*
野生型- 密码子 12 和 13	GGTGGC
G12D	GATGGC
G12V	GTTGGC
G13D	GGTGAC
G12C	TGTGGC
G12S	AGTGGC
G12A	GCTGGC
G12R	CGTGGC
G13C	GGTTGC
G13R	GGTCGC
G13S	GGTAGC

G13A	GGT <u>G</u> CC
G13V	GGT <u>G</u> TC
野生型- 密码子61	CAA或CAG
Q61H	CAC或CAT (在本文中分别也被称作“Q61Ha”或“Q61Hb”)**
Q61L	CT <u>A</u>
Q61R	CG <u>A</u>
Q61K	<u>A</u> AA
Q61P	<u>C</u> CA
Q61E	<u>G</u> AA
野生型- 密码子117	AAA
K117N	AAC或AA <u>T</u>
野生型- 密码子146	GCA
A146P	<u>C</u> CA
A146T	<u>A</u> CA
A146V	<u>G</u> TA

*下划线标记了导致氨基酸序列中的对应突变(即,置换)的单核苷酸多态性。

** Q61Ha或Q61Hb可以导致Q61H突变。

[0092] (1) 与癌症有关的SNP

KRAS基因中的一种或多种SNP可以与癌细胞、癌性组织、癌症、赘生物、肿瘤和/或转移性癌症有关。具体地,上述KRAS基因中的一种或多种SNP可以与一种或多种癌症有关。所述一种或多种癌症可以是,但不限于结直肠癌(CRC)和非小细胞肺癌(NSCLC)。

[0093] 35%的结直肠癌或肿瘤包括KRAS基因中的突变。16%的非小细胞肺癌或肿瘤包括KRAS基因中的突变。下面的表2显示了每种SNP在鉴别的癌症中的发生。

[0094] 具体地,在上面表1中列出的SNP中的一种或多种的存在与否允许本文描述的鉴别方法的使用者预测遭受CRC或NSCLC的受试者对给定治疗的应答。该预测又允许使用者选择和施用如下面更详细地描述的适当治疗。

[0095] 在某些实施方案中,SNP G12S、G12C、G12R、G12V、G12D、G12A、G13D、G13C和Q61H中的一种或多种的存在与否允许本文描述的鉴别方法的使用者预测遭受CRC或NSCLC的受试者对给定治疗的应答。该预测又允许使用者选择和施用如下面更详细地描述的适当治疗。

[0096] 表2

突变	在CRC中的发生百分比	在NSCLC中的发生百分比
G12D	33.99	17.47
G12V	22.03	20.05
G13D	19.21	2.55
G12C	8.22	41.29
G12S	5.97	4.10
G12A	6.12	6.68
G12R	1.23	2.07
G13C	0.51	2.70

G13R	0.25	0.11
G13S	0.06	0.22
G13A	0.09	0.07
G13V	0.12	0.07
Q61H	0.52	0.48
Q61L	0.18	0.30
Q61R	0.14	0.33
Q61K	0.07	0.18
Q61P	0.00	0.07
Q61E	0.01	0.15

[0097] (2) *KRAS*靶序列

所述方法可以包括*KRAS*靶序列的扩增。所述*KRAS*靶序列可以存在于DNA、RNA或cDNA内。所述DNA可以是基因组DNA或循环肿瘤DNA (ctDNA)。在某些实施方案中,所述DNA、RNA或cDNA可以在血液、血浆或其它体液内循环或在血液、血浆或其它体液中发现。

[0098] 所述*KRAS*靶序列可以存在于得自上述样品的DNA、RNA或cDNA内。所述*KRAS*靶序列可以存在于DNA内,所述DNA得自来自癌症或肿瘤的组织或细胞。所述*KRAS*靶序列可以存在于基因组DNA内,所述基因组DNA得自来自癌症或肿瘤的组织或细胞。所述*KRAS*靶序列可以存在于基因组DNA内,所述基因组DNA得自或提取自固定的福尔马林石蜡包埋的 (FFPE) 癌症或肿瘤组织。所述*KRAS*靶序列可以存在于基因组DNA内,所述基因组DNA得自来自结直肠癌或肿瘤的组织或细胞。所述*KRAS*靶序列可以存在于基因组DNA内,所述基因组DNA得自来自非小细胞肺癌或肿瘤的组织或细胞。所述*KRAS*靶序列可以存在于*KRAS*序列的外显子2 (下面讨论的第一扩增子) 和/或外显子3 (下面讨论的第二扩增子) 内。

[0099] 所述*KRAS*靶序列可以是野生型*KRAS*序列、突变体*KRAS*序列或它们的组合。所述野生型*KRAS*序列不含有上述SNP中的一种或多种。所述突变体*KRAS*序列可以含有上述SNP中的一种或多种。

[0100] (a) 用于扩增*KRAS*基因的外显子2的引物

所述*KRAS*靶序列可以是*KRAS*基因的外显子2 (或其部分)。因此,所述方法可以包括一对用于扩增*KRAS*基因的外显子2 (或其部分) 的引物。该引物对与*KRAS*基因的外显子2内所含的核酸序列特异性地杂交。所述引物对包括用于产生第一扩增子的第一正向引物和第一反向引物 (即,在本文中分别也被称作“外显子2正向引物”和“外显子2反向引物”)。所述第一扩增子可以包括SNP G12S、G12C、G12R、G12V、G12D、G12A、G13C、G13D中的一种或多种或它们的任意组合。所述第一扩增子可以与在下面更详细地描述的第二扩增子和/或第三扩增子同时产生。

[0101] 所述第一正向引物可以包括或具有如在SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3中所示的核酸序列 (参见下面表3)。所述第一反向引物可以包括或具有如在SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:6中所示的核酸序列 (参见下面表3)。

表 3

引物	序列(5' 至 3')	SEQ ID NO:
第一正向引物(即, 外显子 2 正向引物)	TGTGACATGTTCTAATATAGTCACATT	SEQ ID NO:1
	GTGTGACATGTTCTAATATAGTCACATT	SEQ ID NO:2
	GTGTGACATGTTCTAATATAGTCACA	SEQ ID NO:3
第一反向引物(即, 外显子 2 反向引物)	GTATCGTCAAGGCACTCTTGC	SEQ ID NO:4
	GTTCTCACGGAACTGCTATGT	SEQ ID NO:5
	GTATCGTCAAGGCACTCGTGC	SEQ ID NO:6

[0102] (b) 用于扩增KRAS基因的外显子3的引物

所述KRAS靶序列可以是KRAS基因的外显子3 (或其部分)。因此,所述方法可以包括一对用于扩增KRAS基因的外显子3 (或其部分)的引物。该引物对与KRAS基因的外显子3内所含的核酸序列特异性地杂交。所述引物对包括用于产生第二扩增子的第二正向引物和第二反向引物(即,在本文中分别也被称作“外显子3正向引物”和“外显子3反向引物”)。所述第二扩增子可以包括SNP Q61H。所述第二扩增子可以与第一扩增子和/或第三扩增子同时产生。

[0103] 所述第二正向引物可以包括或具有如在SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8或SEQ ID NO:9中所示的核酸序列(参见下面表4)。所述第二反向引物可以包括或具有如在SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11或SEQ ID NO:12中所示的核酸序列(参见下面表4)。

表 4

引物	序列(5' 至 3')	SEQ ID NO:
第二正向引物(即, 外显子 3 正向引物)	CAGACTGTGTTTCTCCCTTCTCAGG	SEQ ID NO:7
	CAGACTGTGTTTCTCCCTTCTCA	SEQ ID NO:8
	CAGACTGTGTTTCTCCCTTCTCAG	SEQ ID NO:9
第二反向引物(即, 外显子 3 反向引物)	CTGGTCCCTCATTCGCACTGT	SEQ ID NO:10
	CTGGTCCCTCATTCGCACTGT	SEQ ID NO:11
	TACTGGTCCCTCATTCGCACT	SEQ ID NO:12

[0104] (3) 用于检测SNP的探针

所述方法包括用于检测如上所述的KRAS基因中的一种或多种SNP的一种或多种探针。所述一种或多种探针可以与第一扩增子或第二扩增子特异性地杂交。所述一种或多种探针可以含有标记,其中每种探针含有不同标记,由此允许每种探针的独立检测。在下面更详细地描述了所述标记。在某些实施方案中,检测各个密码子内的不同突变(其中所述不同突变导致相同氨基酸置换)的探针可以含有相同标记,由此允许与特定氨基酸置换有关的每种探针的独立检测。

[0105] 如上所述,所述第一扩增子可以包括SNP G12S、G12C、G12R、G12V、G12D、G12A、G13C、G13D中的一种或多种或它们的任意组合。因此,与第一扩增子特异性地杂交的一种或多种探针可以包括当SNP G12S存在于第一扩增子中时与第一扩增子特异性地杂交的探针(即,在本文中也称作“G12S探针”),当SNP G12C存在于第一扩增子中时与第一扩增子特异性地杂交的探针(在本文中也称作“G12C探针”),当SNP G12R存在于第一扩增子中时与第一扩增子特异性地杂交的探针(即,在本文中也称作“G12R探针”),当SNP G12V存在于第一扩增子中时与第一扩增子特异性地杂交的探针(即,在本文中也称作“G12V探针”),当SNP G12D存在于第一扩增子中时与第一扩增子特异性地杂交的探针(即,在本文中也称作“G12D探针”),当SNP G12A存在于第一扩增子中时与第一扩增子特异性地杂交的探针

(即,在本文中也称作“G12A探针”),当SNP G13C存在于第一扩增子中时与第一扩增子特异性地杂交的探针(即,在本文中也称作“G13C探针”),当SNP G13D存在于第一扩增子中时与第一扩增子特异性地杂交的探针(在本文中也称作“G13D探针”),或它们的任意组合。

[0106] 所述G12S探针可以包括或具有如在SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23或SEQ ID NO:24中所示的核酸序列(参见下面表5)。所述G12C探针可以包括或具有如在SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26或SEQ ID NO:27中所示的核酸序列(参见下面表5)。所述G12R探针可以包括或具有如在SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29或SEQ ID NO:30中所示的核酸序列(参见下面表5)。所述G12V探针可以包括或具有如在SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20或SEQ ID NO:21中所示的核酸序列(参见下面表5)。所述G12D探针可以包括或具有如在SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14或SEQ ID NO:15中所示的核酸序列(参见下面表5)。所述G12A探针可以包括或具有如在SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17或SEQ ID NO:18中所示的核酸序列(参见下面表5)。所述G13C探针可以包括或具有如在SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:35或SEQ ID NO:36中所示的核酸序列(参见下面表5)。所述G13D探针可以包括或具有如在SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:32或SEQ ID NO:33中所示的核酸序列(参见下面表5)。

[0107] 如上所述,所述第二扩增子可以包括SNP Q61H。因此,与第二扩增子特异性地杂交的一种或多种探针可以包括当SNP Q61Ha存在于第二扩增子中时与第二扩增子特异性地杂交的探针(即,在本文中也称作“Q61Ha探针”),当SNP Q61Hb存在于第二扩增子中时与第二扩增子特异性地杂交的探针(即,在本文中也称作“Q61Hb探针”),或它们的组合。

[0108] 所述Q61Ha探针可以包括或具有如在SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:38或SEQ ID NO:39中所示的核酸序列(参见下面表5)。所述Q61Hb探针可以包括或具有如在SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:41或SEQ ID NO:42中所示的核酸序列(参见下面表5)。

表 5

探针	序列(5'至 3')	SEQ ID NO:
G12D 探针	TACGCCATCAGCTC	SEQ ID NO:13
	CTACGCCATCAGCT	SEQ ID NO:14
	CTACGCCATCAGCTC	SEQ ID NO:15
G12A 探针	CCAGCAGCTCCAA	SEQ ID NO:16
	CGCCAGCAGCTCC	SEQ ID NO:17
	TACGCCAGCAGCT	SEQ ID NO:18
G12V 探针	TACGCCAACAGCTC	SEQ ID NO:19
	CTACGCCAACAGCT	SEQ ID NO:20
	CTACGCCAACAGCTC	SEQ ID NO:21
G12S 探针	TACGCCACTAGCTC	SEQ ID NO:22
	CTACGCCACTAGCT	SEQ ID NO:23
	CTACGCCACTAGCTC	SEQ ID NO:24
G12C 探针	CTACGCCACAAGCT	SEQ ID NO:25
	CTACGCCACAAGCTC	SEQ ID NO:26
	TACGCCACAAGCTC	SEQ ID NO:27
G12R 探针	CTACGCCACGAGCT	SEQ ID NO:28
	CTACGCCACGAGCTC	SEQ ID NO:29
	TACGCCACGAGCTC	SEQ ID NO:30
G13D 探针	TACGTCACCAGCTC	SEQ ID NO:31
	ACGTCACCAGCTCC	SEQ ID NO:32
	ACGTCACCAGCTCC	SEQ ID NO:33
G13C 探针	CGCAACCAGCTCCA	SEQ ID NO:34
	ACGCAACCAGCTCCA	SEQ ID NO:35
	ACGCAACCAGCTCC	SEQ ID NO:36
Q61H _a 探针	TCCTCGTGACCTGC	SEQ ID NO:37
	CCTCGTGACCTGCT	SEQ ID NO:38
	CTCCTCGTGACCTG	SEQ ID NO:39
Q61H _b 探针	CTCATGACCTGCTG	SEQ ID NO:40
	ACTCCTCATGACCG	SEQ ID NO:41
	TACTCCTCATGACC	SEQ ID NO:42

[0109] b. 内部对照 (IC)

所述方法还包括反应混合物中的内部对照,其形成在下面更详细地描述。所述内部对照是不具有已知的突变发生的*KRAS*基因的一部分。所述内部对照指示条件是否足以在反应混合物中发生扩增,且因而指示扩增的效率。所述内部对照还指示*KRAS*靶序列是否存在于得自受试者的样品中。所述内部对照还指示如下面更详细地描述的可扩增的*KRAS*靶序列的总量,且因而指示反应混合物中的*KRAS*靶序列的输入量。另外,如果在扩增之前从样品提取*KRAS*靶序列,所述内部对照可以指示提取的效率。

[0110] 所述内部对照包括一对用于产生第三扩增子的引物和用于检测第三扩增子的探针(在本文中也被称作“内部对照探针”或“IC探针”)。第三扩增子的形成不会干扰上述第一扩增子和/或第二扩增子的形成。另外,所述第三扩增子可以与第一和/或第二扩增子的检测同时检测。

[0111] (1) 用于内部对照 (IC) 的引物

所述内部对照包括用于产生第三扩增子的引物对。该引物对与不具有已知的突变发生的*KRAS*基因的一部分内所含的核酸序列特异性地杂交。因此,第三扩增子的形成独立于上述第一和第二扩增子的形成,且因而不会干扰第一和第二扩增子的形成。

[0112] 该引物对包括用于产生第三扩增子的第三正向引物和第三反向引物(即,在本文

中分别也被称作“IC正向引物”和“IC反向引物”)。该第三扩增子可以与第二扩增子和/或第一扩增子同时产生。所述第三正向引物可以包括或具有如在SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:44或SEQ ID NO:45中所示的核酸序列(参见下面表6)。所述第三反向引物可以包括或具有如在SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:47或SEQ ID NO:48中所示的核酸序列(参见下面表6)。

表 6

引物	序列(5'至3')	SEQ ID NO:
第三正向引物(即, IC 正向引物)	ATTAATGAAATTTGTTACCTGTACACATGA	SEQ ID NO:43
	TAATGAAATTTGTTACCTGTACACATGA	SEQ ID NO:44
	ATTAATGAAATTTGTTACCTGTACACATG	SEQ ID NO:45
第三反向引物(即, IC 反向引物)	ATGTTTTCGAATTTCICGAACCTAATGT	SEQ ID NO:46
	ATGTTTTCGAATTTCICGAACCTAATGTAT	SEQ ID NO:47
	ATGTTTTCGAATTTCICGAACCTAATGTA	SEQ ID NO:48

[0113] (2) 内部对照探针

所述内部对照还包括IC探针,其与第三扩增子特异性地杂交。所述IC探针可以含有标记,所述标记不同于用于上述一种或多种探针(即,G12S探针、G12C探针、G12R探针、G12V探针、G12D探针、G12A探针、G13C探针、G13D探针、Q61Ha探针和/或Q61Hb探针)的标记,由此允许IC探针以及与第一或第二扩增子特异性地杂交的一种或多种探针的独立和同时检测。所述IC探针可以包括或具有如在SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:50或SEQ ID NO:51中所示的核酸序列(参见下面表7)。

表 7

探针	序列(5'至3')	SEQ ID NO:
IC 探针	GCCATCGTATATATTCACATT	SEQ ID NO:49
	CCATCGTATATATTCACATTGA	SEQ ID NO:50
	CCATCGTATATATTCACATT	SEQ ID NO:51

[0114] c. PNA寡聚体

所述方法包括PNA寡聚体用于阻断野生型KRAS序列的扩增,由此允许突变体KRAS序列的选择性扩增和富集的使用。所述PNA寡聚体与野生型KRAS序列互补且因而与其选择性地杂交。具体地,所述PNA寡聚体与野生型KRAS序列中的核酸序列选择性地杂交,所述核酸序列位于第一或第二正向引物或者第一或第二反向引物与KRAS靶序列选择性地杂交的地方的下游(图1)。这样,PNA寡聚体阻断第一或第二正向引物或者第一或第二反向引物的延伸。例如,如在图1中所示,PNA寡聚体阻断反向引物的延伸,但是,应当理解,PNA寡聚体可以设计成与KRAS靶序列的任一个链杂交,且因而阻断从正向引物或反向引物的延伸。

[0115] PNA寡聚体阻断引物延伸,因为从PNA和靶序列(例如,DNA)的互补链形成的双链体具有比对应的DNA:DNA双链体更大的热稳定性,且因而不会被延伸聚合酶容易地移动。但是,PNA:DNA双链体可以通过单个错配而失稳且被延伸聚合酶移动。因此,当KRAS靶序列是野生型KRAS序列时,PNA寡聚体与野生型KRAS序列选择性地杂交,形成PNA:DNA双链体,且延伸被阻止,由此阻断或阻止从野生型KRAS序列形成扩增子。

[0116] 当KRAS靶序列是突变体KRAS序列时,在PNA:DNA双链体中发生一个或多个错配,由此使PNA:DNA双链体失稳。延伸可以通过失稳的双链体进行,从而导致从突变体KRAS序列产生扩增子。

[0117] 因此,PNA寡聚体会提供突变体KRAS序列的选择性扩增,并从而提供突变体KRAS序

列的富集。因此,突变体*KRAS*序列(如果存在于样品中的话)被选择性地扩增(且因而富集),无论从其得到样品的受试者就*KRAS*中的一种或多种SNP而言是杂合的还是纯合的。该选择性扩增还会提供以下有利性能:需要更少样品用于检测*KRAS*中的一种或多种SNP,且具有更少由野生型*KRAS*序列的扩增引起的干扰或噪音。该减少的干扰又会促进*KRAS*基因中的多种SNP(例如,1种、2种、3种、4种、5种、6种、7种、8种、9种、10种、11种、12种、13种、14种、15种、16种、17种、18种、19种、20种或更多种SNP)的同时检测和鉴别。该同时检测和鉴别会实现以下显著技术效果:检测*KRAS*中与CRC和NSCLC有关的几乎所有突变,并鉴别这些突变中的哪些不存在和/或存在于给定受试者的*KRAS*基因中。

[0118] PNA寡聚体可以与上述第一扩增子选择性地杂交。PNA寡聚体可以与上述第二扩增子选择性地杂交。PNA寡聚体可以是两种PNA寡聚体,其中的一种与第一扩增子选择性地杂交,且其中的另一种与第二扩增子选择性地杂交。

[0119] PNA寡聚体可以包括或具有如SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:56或SEQ ID NO:57所示的序列(参见下面表8)。具有SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:53或SEQ ID NO:54所示的序列的PNA寡聚体可以与第一扩增子(即,*KRAS*基因的外显子2的扩增区域)选择性地杂交,且因而,在本文中也可以被称作“外显子2 PNA寡聚体”。具有SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:56或SEQ ID NO:57所示的序列的PNA寡聚体可以与第二扩增子(即,*KRAS*基因的外显子3的扩增区域)选择性地杂交,且因而,在本文中也可以被称作“外显子3 PNA寡聚体”。

表 8

PNA 寡聚体	序列(N-端至 C-端)	SEQ ID NO:
外显子 2 PNA 寡聚体	CCTACGCCACCAGCTCC	SEQ ID NO:52
	TGCCTACGCCACCAGC	SEQ ID NO:53
	GCCTACGCCACCAGC	SEQ ID NO:54
外显子 3 PNA 寡聚体	ACTCCTCTTGACCTGCT	SEQ ID NO:55
	CTCCTCTTGACCTGCTGTG	SEQ ID NO:56
	ACTCCTCTTGACCTGCTG	SEQ ID NO:57

[0120] d. 引物和探针集合

所述鉴别方法可以利用引物和/或探针集合中的上述引物、探针和PNA寡聚体的任意组合。所述引物集合可以包括、但不限于,(1) SEQ ID NO:2和6;(2) SEQ ID NO:7和11;(3) SEQ ID NO:43和48;(4) SEQ ID NO:2、6、7和11;(5) SEQ ID NO:2、6、7、11、43和48;(6) SEQ ID NO:7、11、43和48;和(7) SEQ ID NO:2、6、43和48。在某些实施方案中,所述引物集合还可以包括SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:56或SEQ ID NO:52和56。

[0121] 所述引物和探针集合可以包括、但不限于,(1) SEQ ID NO:2、6、43、48、22、27、30和51;(2) SEQ ID NO:2、6、43、48、13、16、20和51;和(3) SEQ ID NO:2、6、7、11、43、48、31、34、38、40和51。所述引物和探针集合还可以包括SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:56或SEQ ID NO:52和56。

[0122] 在其它实施方案中,所述引物和探针集合可以包括,但是仍然不限于,(1) SEQ ID NO:2、6、43、48、13、16、20、22、27、30和51;(2) SEQ ID NO:2、6、43、48、13、16、20、22、27、30、31、34和51 (3) SEQ ID NO:2、6、7、11、43、48、13、16、20、22、27、30、31、34、38、40和51。所述引物和探针集合还可以包括SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:56或SEQ ID NO:52和56。

[0123] 在某些实施方案中,所述引物和探针集合可以包括在表3、4、5、6、7和8中的上述引

物、探针和PNA寡聚体的任意组合。

[0124] e. 引物的化学修饰

所述鉴别KRAS中的一种或多种SNP的方法可以使用上述引物的化学修饰形式,例如,以改善与KRAS靶序列杂交的效率。例如,因为在物种之间在保守区中的变异(由于在第三个位置中的密码子摆动)经常发生在DNA三联体的第三个位置,所以可以修饰上述引物,使得与该位置对应的核苷酸是可以结合超过一种核苷酸的“通用碱基”。例如,肌苷(I)结合尿苷(U)、胞嘧啶(C)或腺嘌呤(A),鸟嘌呤(G)结合U或C,且U结合A或G。通用碱基的其它例子包括硝基咪唑诸如5-硝基咪唑或3-硝基吡咯,退化核苷酸dP或dK,含有5-硝基咪唑的无环核苷类似物,或嘌呤类似物1-(2-脱氧-β-D-呋喃核糖基)-咪唑-4-甲酰胺。

[0125] 在另一个实施方案中,为了补偿“摆动”碱基的稍微更弱的结合,可以设计引物,使得每个三联体的第一个和第二个位置被以比未修饰的核苷酸更大的亲和力结合的核苷酸类似物占据。这些类似物的例子包括结合胸腺嘧啶的2,6-二氨基嘌呤,结合腺嘌呤的丙炔T,和结合鸟嘌呤的丙炔C和吩噻嗪(包括G-夹)。丙炔基化的嘧啶描述在美国专利号5,645,985、5,830,653和5,484,908中,每篇专利的整个内容通过引用并入本文。吩噻嗪描述在美国专利号5,502,177、5,763,588和6,005,096中,每篇专利的整个内容通过引用并入本文。G-夹描述在美国专利号6,007,992和6,028,183中,每篇专利的整个内容通过引用并入本文。

[0126] f. 标记

所述鉴别KRAS中的一种或多种SNP的方法可以使用上述探针的标记来促进它们的检测(即,所述探针被可检测地标记)。所述鉴别方法还可以使用与该标记(当它是荧光标记时)组合的猝灭剂,如下面关于上述探针更详细地描述的。

[0127] 通过标记检测领域中的技术人员已知的光谱、光化学、生化、免疫化学或化学方式,可以检测所述标记。所述标记可以是荧光团或荧光标记、化学发光标记、或对另一个分子具有亲和力的另一个部分。其它有用的标记包括染料,诸如荧光染料,放射性标记,诸如³²P,电子致密试剂,酶,诸如过氧化物酶或碱性磷酸酶,生物素,或可得到其抗血清或单克隆抗体的半抗原和蛋白。

[0128] 可以选择不同颜色的荧光团,使得反应混合物中的每种探针可以被清楚地检测。例如,可以使用下述荧光团的组合(但不限于):FAMTM (Life Technologies, Carlsbad, California), VIC[®] (Life Technologies, Carlsbad, California), Cy[®] 5 (Molecular Probes, Inc., Eugene, Oregon), NEDTM (Life Technologies, Carlsbad, California), 7-氨基-4-甲基香豆素-3-乙酸(AMCA), Texas RedTM (Molecular Probes, Inc., Eugene, Oregon), 5-(和-6)-羧基-X-罗丹明, 丽丝胺罗丹明B, 5-(和-6)-羧基荧光素, 荧光素-5-异硫氰酸酯(FITC), 7-二乙基氨基香豆素-3-甲酸, 四甲基罗丹明-5-(和-6)-异硫氰酸酯, 5-(和-6)-羧基四甲基罗丹明, 7-羟基香豆素-3-甲酸, 6-[荧光素5-(和-6)-羧基酰氨基]己酸, N-(4,4-二氟-5,7-二甲基-4-硼杂-3a,4a-二氮杂-3-引达省丙酸,曙红-5-异硫氰酸酯,藻红-5-异硫氰酸酯, CascadeTM blue acetylazide (Molecular Probes, Inc., Eugene, Oregon), 紫色/蓝色染料(Emmax 375-491 nm) 7-甲氧基香豆素-3-羧基, AMCA-X (7-氨基香豆素-X), 6-MI或6-MAP (6-甲基-8-(2-脱氧-β-D-呋喃核糖基)异黄嘌呤);绿色/黄色染料(Emmax 492-585 nm) DTAF (4,6-二氯三嗪

基)氨基荧光素, 6-FAM (荧光素, 6-羧基荧光素), 丹磺酰基-X (6-((5-二甲基氨基萘-1-磺酰基)氨基)己酸酯, 6-JOE (6-羧基-4',5'-二氯-2',7'-二甲氧基荧光素), HEX (六氯荧光素), BODIPY-TMR-X (四甲基罗丹明替代物), PyMPO (1-(3-羧基苄基)-4-(5-(4-甲氧基苄基)噁唑-2-基)吡啶鎓溴化物), TAMRA-X (6-(四甲基罗丹明-5(6)-甲酰氨基)己酸酯); 橙色染料 (Emmax 586-647 nm) 罗丹明衍生物 BODIPY 576/589, BODIPY 581/591, ROX (羧基罗丹明), VIC (Applied Biosystems Inc., Foster City, Calif.), NED (Applied Biosystems Inc., Foster City, Calif.) 和红色染料 (Emmax 647-700 nm) 如羧基萘并荧光素。

[0129] 在某些实施方案中, 用于标记反应混合物中的探针的荧光团的组合可以是 FAMTM (Life Technologies, Carlsbad, California), VIC[®] (Life Technologies, Carlsbad, California), Cy[®] 5 (Molecular Probes, Inc., Eugene, Oregon), 和 NEDTM (Life Technologies, Carlsbad, California), 使得反应混合物中的每种探针提供在 KRAS 基因中的它的对应 SNP 的独特检测和鉴别。

[0130] 具有荧光性能的其他分子也是合适的标记。例如, 蛋白如藻红蛋白 (一种 240 千道尔顿 (kDa) 蛋白) 表现出稳健的荧光性能。具有荧光性能的其他标记可以包括量子点、纳米晶体和有关的半导体荧光团。

[0131] 通过任意合适的检测荧光的方式检测荧光标记。这样的技术是本领域众所周知的。

[0132] 荧光团或荧光标记可以与猝灭剂 (在本文中也称作“猝灭剂部分”) 组合使用。本文中使用的猝灭剂是在测量信号的波长减少由荧光团发出的光的部分, 或者是用于转换由核酸探针的荧光团发出的光的波长的荧光部分。在本发明的上下文中合适的猝灭剂包括 (但不限于) DABCYL (4-(4'-二甲基氨基苯基偶氮基) 苯甲酸), QSY-7 (9-[2-[[4-[(2,5-二氧代-1-吡咯烷基) 氧基] 羰基]-1-哌啶基] 磺酰基] 苯基)-3,6-双(甲基苯基氨基)), BHQ-1, BHQ-2, BHQ-3 (Biosearch Technologies Inc., 2003, 目录号 BG5-5041T, BG5-5042T, 和 BG5-5043T) 和 TAMRA ((6-四甲基罗丹明-5(6)-甲酰氨基) 己酸酯)。另外, 猝灭剂可以是有机染料, 其可以是或不是荧光的, 取决于本发明的实施方案。

[0133] 在某些实施方案中, 所述标记可以是化学发光的标记。例如, 化学发光的标记可以是, 但不限于, 吖啶鎓化合物。吖啶鎓化合物可以包括吖啶鎓-9-甲酰胺和吖啶鎓-9-甲酸芳基酯。这样的化合物描述在, 例如, 美国专利号 5,783,699 中, 其整个内容特此通过引用并入。

[0134] 探针还可以间接地用生物素 (biotin) 或地高辛 (digoxigenin) 标记, 或用放射性同位素诸如 ³²P 和 ³H 标记, 尽管然后需要第二种检测分子或进一步加工来检测探针。例如, 用生物素间接地标记的探针可以通过缀合至可检测的标志物的抗生物素蛋白来检测。例如, 抗生物素蛋白可以缀合至酶标志物诸如碱性磷酸酶或辣根过氧化物酶。使用酶的底物和/或催化剂, 可以在标准比色测量反应中检测酶标志物。碱性磷酸酶的催化剂包括 5-溴-4-氯-3-吲哚基磷酸酯和硝基蓝四氮唑。二氨基苯甲酸酯可以用作辣根过氧化物酶的催化剂。

[0135] g. 阳性和阴性对照

所述鉴别方法可以采用阳性和阴性对照来促进样品制备、扩增和检测的监测, 它们都在下面更详细地描述。监测还可以包括监测污染。

[0136] 在某些实施方案中,可以设计阳性对照以产生和检测反应混合物中的每个引物对的扩增子。例如,阳性对照可以包括编码内部对照的质粒以及编码一种或多种SNP的一个或多个质粒。另外,如果在一种或多种探针内含有荧光标记,那么阳性对照还可以包括至少一个阳性信号在用于监测扩增的每个荧光通道中的产生。

[0137] 可以设计阴性对照以产生和检测第三扩增子(即,内部对照的扩增),但是不会产生和检测与一种或多种SNP对应的扩增子。例如,阴性对照可以包括编码内部对照的质粒。

[0138] h. 样品制备

所述鉴别KRAS中的一种或多种SNP的方法可以包括从受试者得到样品。在所述鉴别方法中,在形成下述反应混合物之前,可以任选地处理、加工或制备所述得自受试者的样品。这样的处理可以包括、但不限于,稀释、超滤、提取、沉淀、透析、酶消化和匀浆化。此外,如果这样的处理方法与样品一起采用,这样的处理方法具有以与在未处理的样品(例如,即,没有进行任何这样的处理方法的样品)中成比例的浓度保留在样品中的KRAS靶序列。

[0139] 例如,使用本领域已知的任意合适的方法,可以制备用于扩增测定的样品。理想地,所述方法提取和浓缩核酸。所述方法还理想地使KRAS靶序列可用于扩增,并从提取物除去扩增的潜在抑制剂。

[0140] 在某些实施方案中,所述KRAS靶序列可以是DNA。使用例如得自Qiagen Inc. (Valencia, Calif.)的DNeasy DNA分离试剂盒、QIAamp DNA血液试剂盒或PAXgene血液DNA试剂盒,或本领域普通技术人员已知的其它方法,可以从外周血分离DNA。使用DNeasy DNA分离试剂盒,也可以得到来自其它组织样品的DNA。还可以使用任意其它DNA提取和纯化技术,包括从苯酚-氯仿提取至自动化磁珠核酸捕获系统的液体-液体和固相技术。可以将RNA分离和反转录,并可以将得到的cDNA扩增(例如,如在例如美国专利号5,310,652、5,322,770、5,561,058、5,641,864和5,693,517中描述的反转录聚合酶链式反应(RT-PCR))。

[0141] 在其它实施方案中,可以从固定的福尔马林石蜡包埋的(FFPE)组织提取DNA。因此,样品制备试剂盒的另一个例子是可得自Qiagen的QIAamp DNA FFPE组织试剂盒。

[0142] 在其它实施方案中,Abbott mSample Preparation SystemDNA (4×24 preps; Abbott)试剂捕获核酸并除去未结合的样品组分。在裂解步骤中包括蛋白水解酶K以消化与样品结合的蛋白。将结合的核酸洗脱并转移至96-孔深板。然后使核酸准备好扩增。在某些实施方案中,将无关的DNA序列(其充当内部对照(IC)以证实所述过程已经针对每个样品正确地进行)引入样品制备操作中并与校准物、对照和样本一起加工。

[0143] 在某些实施方案中,如果KRAS靶序列是RNA,那么可以使用反转录产生cDNA。然后可以在如下所述的反应混合物中扩增该cDNA。

[0144] 在某些实施方案中,自动化样品制备系统(诸如设计成使用磁性微粒方法进行核酸纯化的自动化样品制备系统)的应用可以是优选的。自动化样品制备系统的一个例子是m2000sp,其可得自Abbott Laboratories, Abbott Park, Ill。可选地,样品可以使用m24sp自动化样品制备系统(Abbott)来制备或手工地制备。自动化样品制备比手工制备优选,因为它是更一致的。

[0145] i. 形成反应混合物

所述鉴别KRAS中的一种或多种SNP的方法包括形成反应混合物。所述反应混合物包含疑似含有KRAS靶序列的样品、用于产生第一和/或第二扩增子的引物、用于检测KRAS基因中

的一种或多种SNP的一种或多种探针、PNA寡聚体和内部对照。所述反应混合物在形成后放在如下面更详细地描述的足以扩增核酸序列的条件下。

[0146] 形成反应混合物可以包括形成一种或多种反应混合物。形成反应混合物可以包括形成1种、2种、3种、4种、5种、6种、7种、8种、9种、10种、11种、12种、13种、14种、15种、16种、17种、18种、19种、20种、或更多种反应混合物。每种反应混合物可以含有用于产生第一和/或第二扩增子的引物和用于检测KRAS基因中的一种或多种SNP的一种或多种探针的不同组合。这些不同组合导致各种反应混合物中的独特SNP集合的检测。每个独特SNP集合可以包括重叠SNP,使得单个扩增子的产生允许检测多种SNP的存在与否。例如,第一扩增子的产生允许检测重叠SNP G12C、G12R、G12S、G12D、G12A和G12V的存在与否。在另一个实施例中,第一扩增子的产生允许检测重叠SNP G13D和D13C的存在与否。

[0147] 所述反应混合物还可以包括核酸扩增试剂。所述核酸扩增试剂可以包括具有聚合酶活性的酶(例如,DNA聚合酶)、酶辅因子诸如镁或锰、盐和烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD)和脱氧核苷酸三磷酸(dNTP),即dATP、dGTP、dCTP和dTTP。在某些情况下,所述核酸扩增试剂可以包括核糖核苷三磷酸。

[0148] (1) 用于检测和鉴别KRAS基因中的九种SNP的三种反应混合物

作为形成一种或多种反应混合物的一个非限制性实施例,形成反应混合物可以包括形成三种反应混合物,即第一反应混合物、第二反应混合物和第三反应混合物。这三种反应混合物会促进来自所述得自受试者的样品的KRAS基因中的九种不同SNP的同时扩增、检测和鉴别。该同时扩增、检测和鉴别会实现以下显著技术效果:检测KRAS中与CRC和NSCLC有关的几乎所有突变,和鉴别这些突变中的哪些不存在和/或存在于给定受试者的KRAS基因中。

[0149] 所述第一反应混合物可以包括疑似含有KRAS靶序列的样品、用于产生第一扩增子的引物、用于检测KRAS基因中的三种SNP的三种探针、外显子2 PNA寡聚体和内部对照。所述第一反应混合物还可以包括上述的核酸扩增试剂。在某些实施方案中,所述第一反应混合物可以包括G12C探针、G12R探针和G12S探针。每种探针以及IC探针可以具有不同标记,由此允许每种探针的独立和同时检测,且因而允许SNP G12C、G12R和G12S中的每一种的独立和同时检测(图2和3)。在某些实施方案中(如在图2和3中所示),所述IC探针可以含有标记NEDTM (Life Technologies, Carlsbad, California),所述G12S探针可以含有标记Cy[®] 5 (Molecular Probes, Inc., Eugene, Oregon),所述G12C探针可以含有标记FAMTM (Life Technologies, Carlsbad, California),且所述G12R探针可以含有标记VIC[®] (Life Technologies, Carlsbad, California)。在其它实施方案中,当每种探针含有荧光标记时,每种探针还可以含有猝灭剂,其可以是,例如,但不限于,用于与FAM和VIC荧光标记一起使用的BHQ1,和用于与Quasara、Q670和NED荧光标记一起使用的BHQ2。

[0150] 所述第二反应混合物可以包括疑似含有KRAS靶序列的样品、用于产生第一扩增子的引物、用于检测KRAS基因中的三种SNP的三种探针(其中所述三种探针不同于所述第一反应混合物中的三种探针)、外显子2 PNA寡聚体和内部对照。所述第二反应混合物还可以包括上述的核酸扩增试剂。在某些实施方案中,所述第二反应混合物可以包括G12D探针、G12A探针和G12V探针。每种探针以及IC探针可以具有不同标记,由此允许每种探针的独立和同时检测,且因而允许SNP G12D、G12A和G12V中的每一种的独立和同时检测(图2和3)。在某些实施方案中(如在图2和3中所示),所述IC探针可以含有标记NEDTM (Life Technologies,

Carlsbad, California), 所述G12D探针可以含有标记FAMTM (Life Technologies, Carlsbad, California), 所述G12A探针可以含有标记VIC® (Life Technologies, Carlsbad, California), 且所述G12V探针可以含有标记Cy® 5 (Molecular Probes, Inc., Eugene, Oregon)。在其它实施方案中, 当每种探针含有荧光标记时, 每种探针还可以含有猝灭剂, 其可以是, 例如, 但不限于, 用于与FAM和VIC荧光标记一起使用的BHQ1, 和用于与Quasara、Q670和NED荧光标记一起使用的BHQ2。

[0151] 所述第三反应混合物可以包括疑似含有KRAS靶序列的样品、用于产生第一扩增子的引物、用于产生第二扩增子的引物、用于检测KRAS基因中的四种SNP的四种探针(其中所述四种探针不同于第一和第二反应混合物中的探针)、外显子2 PNA寡聚体、外显子3 PNA寡聚体和内部对照。所述第三反应混合物还可以包括上述的核酸扩增试剂。在某些实施方案中, 所述第三反应混合物可以包括G13D探针、G13C探针、Q61Ha探针和Q61Hb探针。每种探针以及IC探针可以具有不同标记, 由此允许每种探针的独立和同时检测, 且因而允许SNP G13D、G13C和Q61H中的每一种的独立和同时检测。在某些实施方案中, 所述Q61Ha探针和Q61Hb探针可以含有相同标记, 因而两种探针提供相同SNP(即Q61H)的检测。在某些实施方案中(如在图2和3中所示), 所述IC探针可以含有标记NEDTM (Life Technologies, Carlsbad, California), 所述G13D探针可以含有标记FAMTM (Life Technologies, Carlsbad, California), 所述G13C探针可以含有标记VIC® (Life Technologies, Carlsbad, California), 所述Q61Ha探针可以含有标记Cy® 5 (Molecular Probes, Inc., Eugene, Oregon), 且所述Q61Hb探针可以含有标记Cy® 5 (Molecular Probes, Inc., Eugene, Oregon)。在其它实施方案中, 当每种探针含有荧光标记时, 每种探针还可以含有猝灭剂, 其可以是, 例如, 但不限于, 用于与FAM和VIC荧光标记一起使用的BHQ1, 和用于与Quasar、Q670和NED荧光标记一起使用的BHQ2。

[0152] j. 扩增

在形成上述反应混合物以后, 使所述反应混合物处于足以扩增核酸序列的条件(即, 扩增条件)。这些扩增条件使得产生与靶序列互补的核酸序列的至少一个拷贝(如果所述靶序列存在于样品中)。因此, 使所述反应混合物处于扩增条件可以在检测步骤之前或同时重复任意合适的次数。例如, 通过使所述反应混合物热循环10-100次(或更多), 通常约20至约60次, 且更通常约25至约45次。

[0153] 所述扩增条件可以包括促进一个或多个核酸序列的退火和延伸的那些条件。这样的退火以相当可预测的方式依赖于几个参数, 包括温度、离子强度、序列长度、互补性和核酸序列的G:C含量。例如, 降低互补核酸序列的环境的温度会促进退火。通常, 诊断应用使用比解链温度 T_m 低约2°C至约18°C(例如, 约10°C)的杂交(即, 退火)温度。离子强度也影响 T_m 。典型的盐浓度依赖于阳离子的性质和化合价, 但是容易被本领域技术人员理解。类似地, 高G:C含量和增加的序列长度会稳定双链体形成和增加 T_m 。

[0154] 最后, 可以选择接近或在引物的 T_m 的杂交温度。因而, 得到特定引物对或引物集合的合适杂交条件是在PCR领域的普通技术内。

[0155] 可以如本领域已知地进行扩增, 诸如通过使用m2000rt仪器(Abbott Molecular Inc., Des Plaines, Ill.)。在有脱氧核苷酸三磷酸(dNTP)和活化剂(例如, 镁或锰)存在下由DNA聚合酶或逆转录酶扩增靶核酸(例如, DNA、RNA或二者)。在PCR扩增过程中, 使用高

温来分离双链DNA的链。当将反应混合物冷却至可以发生DNA退火的温度时,分析物-特异性的、单链的DNA寡核苷酸引物会结合分析物DNA。所述引物被DNA聚合酶延伸,由此产生分析物DNA的短靶段的精确拷贝。DNA聚合酶可以是,但不需要是,已经在它的活性部位被使它无活性的分子修饰的嗜热酶。当在PCR开始之前加热酶时,抑制性分子从酶切掉,由此使它重新获得它的活性。以此方式,酶仅仅在发生特异性DNA-DNA相互作用的温度具有活性。这会极大地减少非特异性的PCR人造品,诸如引物二聚体。在每轮热循环过程中,扩增产物(即,扩增子)在高温解离成单链,从而允许随着温度降低发生引物退火和延伸。通过高温和低温之间的重复循环,实现靶标的指数扩增。*KRAS*靶序列的扩增以产生第一、第二和/或第三扩增子同时发生。

[0156] 扩增操作是本领域众所周知的,且包括聚合酶链式反应(PCR)、实时PCR、定量PCR、PNA夹介导的PCR、转录介导的扩增(TMA)、滚环扩增、基于核酸序列的扩增(NASBA)、连接酶链式反应和链置换扩增(SDA)。本领域技术人员理解,对于在某些扩增技术中的应用,所述引物可能需要被修饰。例如,SDA引物通常包含在5'末端附近的另外核苷酸,其构成限制性内切核酸酶的识别位点。对于NASBA,所述引物可以包括在5'末端附近的另外核苷酸,其构成RNA聚合酶启动子。如此修饰的多核苷酸被认为是在本发明范围内。

[0157] 扩增以后,可能合乎需要的是,将扩增产物与靶序列和多余的引物分离以确定是否发生特异性扩增。可以使用标准方法通过琼脂糖、琼脂糖-丙烯酰胺或聚丙烯酰胺凝胶电泳实现分离(参见,例如,Sambrook, 等人, *Molecular Cloning*, Fritsch和Maniatis, 编, Cold Spring Harbor Lab. Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989))。可选地,可以使用色谱法实现分离。色谱法的例子包括吸附色谱法、分配色谱法、离子交换色谱法和分子筛色谱法,且色谱技术的类型的例子包括柱、纸、薄层和气相色谱法(参见,例如, Freifelder, *Physical Biochemistry Applications to Biochemistry and Molecular Biology*, 第2版, Wm. Freeman & Co., New York, N.Y. (1982))。

[0158] k. 检测

所述鉴别方法还包括检测*KRAS*中的一种或多种SNP。该检测步骤包括检测或测量第一扩增子和/或第二扩增子和第三扩增子。

[0159] 如上所述,反应混合物中的每种探针可以含有不同标记,且因而可以明显地检测。在某些实施方案中,检测该相同氨基酸置换(除了各个密码子中的不同的核苷酸变化)的探针可以含有相同标记。该独特检测又会提供一种或多种SNP在*KRAS*基因中的缺失或存在的鉴别。检测可以与扩增同时。因此,在单一反应混合物中,可以使用1种、2种、3种、4种、5种、6种、7种、8种、9种、10种、11种、12种、13种、14种、15种、16种、17种、18种、19种、20种、或更多种不同的探针,每种探针含有不同标记,由此允许每种探针的独特检测。该独特检测又会提供在单一反应混合物中鉴别1种、2种、3种、4种、5种、6种、7种、8种、9种、10种、11种、12种、13种、14种、15种、16种、17种、18种、19种、20种、或更多种SNP在*KRAS*基因中的缺失或存在。

[0160] 在某些实施方案中,可以在实时PCR测定中组合扩增和检测。当使用实时PCR时,可检测地标记的探针允许仅在探针与它的互补核酸序列选择性地杂交以后的检测,由此实现同时扩增和检测。当可检测地标记的探针在扩增过程中存在于反应混合物中时,所述可检测地标记的探针应当在促进扩增的条件下是稳定的,应当不会干扰扩增,应当在扩增条件下结合它的靶序列,且仅在结合它的靶序列以后发射信号。在这点上特别适合的可检测地

标记的探针的例子包括分子信标可检测的寡核苷酸、TAQMAN®可检测的寡核苷酸、和直链可检测的寡核苷酸,诸如Abravaya, 等人(美国专利申请公开号2005/0227257)描述的那些。可检测地标记的探针可以形成分子信标的环区域,所述环区域是单独的或与茎区域的组成部分进一步组合。所述可检测地标记的探针也可以用作直链可检测的寡核苷酸,其具有在一个末端的荧光团(例如,FAM)和在另一个末端的高效猝灭剂,诸如Black Hole Quencher (BHQ®; BioSearch Technologies, Inc., Novato, Calif.)。

[0161] 如果需要的话,可以将疑似含有KRAS靶序列或可检测地标记的探针的样品固定化在固体支持物上以促进检测。利用固体支持物的测定形式的例子包括斑点印迹形式和逆向斑点印迹形式(参见,例如,美国专利号5,310,893、5,451,512、5,468,613和5,604,099,它们都为了它们关于这方面的教导特别地通过引用并入本文)。

[0162] 在其它实施方案中,可以通过显影来检测扩增。例如,用溴化乙锭染色的凝胶可以用紫外线显影。用放射性同位素标记的扩增产物可以通过暴露x-射线胶片并显影而显影,而用荧光测量标记来标记的扩增产物可以通过使扩增产物遇到刺激波谱而显影。一种优选的扩增显影方法是与扩增产物杂交的、标记的可检测的寡核苷酸的应用。还可以使用手工柱,诸如可得自Qiagen的手工柱。

[0163] 在其它实施方案中,基于二脱氧测序的方法和寡核苷酸-长度产物的Pyrosequencing™也可以用于检测扩增的核酸。Kobayashi, 等人, Mol. Cell. Detectable oligonucleotides 9: 175-182 (1995))描述了另一种测序方法。

[0164] 1. Δ CN的确定

所述鉴别方法还包括确定每种反应混合物的循环数目的差异(Δ CN)。 Δ CN是KRAS突变体序列的扩增的循环数目(CN)和内部对照的扩增的CN之间的差异。针对固定截止值评价每种SNP的 Δ CN值,其中如果 Δ CN小于固定截止值,那么检测到各个SNP。每个固定截止值是正在检测的SNP和在各个探针上所含的标记的组合所独有的。因此,给定的SNP的 Δ CN越小,SNP存在于KRAS靶序列中的可能性越大(即,更高的百分比)。

[0165] 在某些实施方案中,如果检测到超过一种SNP,将具有最小相对 Δ CN的SNP报告为检测到,因为KRAS基因中的突变是“驱动器(driver)”突变。这样的驱动器突变会驱动癌发生,且因而,在超过一个突变的原发肿瘤内不存在选择性优点。因此,如果原发肿瘤含有在KRAS基因中的突变,经常预见到一种突变或SNP。

[0166] 但是,不应当认为所述鉴别方法限于检测KRAS基因中的仅一种SNP。在某些实施方案中,可能合乎需要的是,将所有具有小于对应固定截止值的各个 Δ CN的SNP报告为检测到。报告可以包括检测到的SNP的排序顺序,其中具有最小相对 Δ CN的SNP排在第一,且具有最大相对 Δ CN的SNP排在最后,由此给所述鉴别方法的使用者提供KRAS基因中的检测到的SNP的排序列表。

[0167] 在某些实施方案中,在反应混合物中不可检测到SNP,即,任何给定SNP的 Δ CN不小于各个固定截止值。当内部对照的扩增(即,第三扩增子的检测)指示足够的KRAS靶序列存在于反应混合物中以检测低百分比SNP时,确定这是真实的或准确的阴性结果。另一方面,如果内部对照的扩增(即,第三扩增子的检测)指示存在于反应混合物中的KRAS靶序列不足以检测低百分比SNP,那么阴性结果可以是假阴性结果,由此指示所述鉴别方法的使用者应当用预期会提供更大可扩增的量的KRAS靶序列的样品重复所述方法。因此,内部对照的扩

增(即,第三扩增子的产生和检测)会确定存在于反应混合物中的可扩增的KRAS靶序列的量,且因而指示反应混合物和扩增条件是否足够敏感以允许准确报告在KRAS基因中没有检测到SNP。

[0168] 3. 选择癌症疗法的方法

本文提供了为有此需要的受试者选择癌症疗法或治疗的方法。所述方法可以应用上述鉴别KRAS中的一种或多种SNP的存在与否的方法来为受试者选择治疗。在选择后,所述方法还可以包括给所述受试者施用所述治疗。

[0169] 如果检测到KRAS中的一种或多种SNP,那么在某些实施方案中,所述选择方法的使用者可以选择不靶向表皮生长因子受体(EGFR)的疗法。选择可以包括,当一种或多种SNP被鉴别为存在于KRAS中时,给所述受试者施用除了靶向表皮生长因子受体(EGFR)的治疗以外的疗法。

[0170] 如上所述,EGFR在MAPK信号传递途径中在KRAS的上游起作用,并且KRAS基因中的一种或多种SNP使得KRAS具有组成活性。因此,在CRC和NSCLC中,如果一种或多种SNP存在于KRAS基因中,靶向EGFR的疗法具有更低的有效性,因为鉴于突变体KRAS的组成活性,MAPK途径的下游部分不被EGFR疗法抑制。在某些实施方案中,所述选择方法可以包括,当本文描述的方法检测到KRAS中的一种或多种SNP时,不给所述受试者施用靶向EGFR的疗法。

[0171] 如果没有检测到KRAS中的一种或多种SNP,那么在某些实施方案中,选择方法的使用者可以选择靶向EGFR的疗法作为所述受试者的癌症疗法。因此,在某些实施方案中,选择方法可以包括,当本文描述的方法没有检测到KRAS中的一种或多种SNP时,给所述受试者施用靶向EGFR的疗法。

[0172] 4. 预测对癌症疗法的应答的方法

本文还提供了在有此需要的受试者中预测对癌症疗法或治疗的应答的方法。所述方法可以应用上述鉴别一种或多种SNP在KRAS中的存在与否的方法以预测所述受试者对给定的癌症疗法的应答。

[0173] 在某些实施方案中,如果将一种或多种SNP鉴别为存在于所述受试者的KRAS基因中,这会允许所述方法的使用者预测所述受试者可能具有降低的对靶向EGFR的疗法做出应答的可能性。因此,可以给含有一种或多种SNP的受试者施用不会靶向EGFR的疗法。

[0174] 在其它实施方案中,如果没有将一种或多种SNP鉴别为存在于所述受试者的KRAS基因中,这会允许所述方法的使用者预测所述受试者可能具有增加的对靶向EGFR的疗法做出应答的可能性。因此,可以给不含有一种或多种SNP的受试者施用靶向EGFR的疗法。

[0175] 5. 试剂盒

本文还提供了用于与本文中公开的方法一起使用的试剂盒。所述试剂盒可以包括本文描述的引物、探针、PNA寡聚体和内部对照,其中的每一种可以被包含在单个容器内或以任意组合组合在一个或多个容器中。所述试剂盒还可以包括上述的阳性和阴性对照。所述试剂盒还可以包括上述的核酸扩增试剂。所述试剂盒还可以包括从使用者观点看可能合乎需要的其它物质,诸如缓冲剂、稀释剂、标准品和/或在样品处理、洗涤或进行本文描述的方法的任意其它步骤中有用的其它物质。

[0176] 根据本公开内容的试剂盒优选地包括关于执行本发明的方法的使用说明。在本公开内容的试剂盒中包括的使用说明可以附着于包装材料,或可以作为包装说明书来包括。

尽管使用说明通常是书写或打印的材料,它们不限于此。本公开内容预见到能够存储这样的使用说明并将它们传递给最终使用者的任何介质。这样的介质包括、但不限于电子存储介质(例如,磁盘、磁带、筒、芯片)、光学介质(例如,CD ROM)等。本文中使用的术语“使用说明”可以包括提供使用说明的因特网站点的地址。

[0177] 本发明具有由下述非限制性实施例例证的多个方面。

[0178] 6. 实施例

实施例1

用于实施例2-8的材料和方法

样本收集. 从人NSCLC组织、CRC组织或下面详细说明了的细胞系制备固定的福尔马林石蜡包埋的(FFPE)切片(5-10微米)。对于安放在载玻片上的FFPE切片,将切片刮离载玻片(例如,使用解剖刀或单刃剃刀片)并转移至带标记的试管用于如下所述的DNA提取。对于没有安放在载玻片上的FFPE切片,将切片转移至带标记的试管用于如下所述的DNA提取。在每个试管中的总组织面积是至少4 mm²。

[0179] **仪器.** 使用得自Abbott Laboratories的*m2000rt*仪器进行实时PCR。

[0180] **来自FFPE样品的基因组DNA提取.** 按照生产商的使用说明,使用TargetPrep DNA FFPE样品制备试剂盒I和II (Abbott Laboratories),从FFPE样品提取基因组DNA。简而言之,将FFPE样品使用二甲苯或Hemo-De脱石蜡,并然后在含有蛋白水解酶K的裂解溶液1中温育以释放DNA。在升高的温度的温育步骤会部分地逆转释放的核酸的福尔马林交联,从而改善DNA收率和质量。然后将裂解物与裂解缓冲液2和乙醇混合以提供DNA的适当结合条件,随后将样品应用于DNA Elution Spin Column,在此处DNA结合至硅胶膜。将结合的DNA用洗涤缓冲液1洗涤,并然后用洗涤缓冲液2洗涤以除去杂质。将结合的DNA用洗脱缓冲液洗脱,并然后用于PCR扩增。

[0181] **扩增和检测.** 将扩增试剂组合成3个独特的主混合物。在96-孔光学反应板中将纯化的DNA样品与每个主混合物组合(即,每个样品3个PCR孔)。用光学膜密封板以后,然后将板转移至*m2000rt*仪器进行KRAS突变的扩增和检测。下面提供了关于扩增和检测的其它细节。

[0182] 第一主混合物含有在下面表9中显示的试剂。表9也显示了每种试剂的最终反应浓度。

[0183] 表9

试剂	最终反应浓度
G12S探针 (SEQ ID NO:22)	0.20 μM
G12C探针 (SEQ ID NO:27)	0.20 μM
G12R探针 (SEQ ID NO:30)	0.20 μM
外显子2正向引物 (SEQ ID NO:2)	0.50 μM
外显子2反向引物 (SEQ ID NO:6)	0.50 μM
外显子2 PNA寡聚体 (SEQ ID NO:52)	0.80 μM
IC正向引物 (SEQ ID NO:43)	0.25 μM
IC反向引物 (SEQ ID NO:48)	0.25 μM
IC探针 (SEQ ID NO:51)	0.10 μM

缓冲液*	1X
ROX参照	0.06 μ M
dNTP	0.80 mM
活化试剂 (MgCl ₂) **	7 mM
热稳定的耐热性DNA聚合酶	11单位/反应

*所述缓冲液适合用于利用引物、探针和内部对照的PCR测定。

**所述活化试剂是在含有MgCl₂和Tris的缓冲液中。MgCl₂是DNA聚合酶的辅因子。

[0184] 第二主混合物含有在下面表10中显示的试剂。表10也显示了每种试剂的最终反应浓度。

[0185] 表10

试剂	最终反应浓度
G12D探针 (SEQ ID NO:13)	0.20 μ M
G12A探针 (SEQ ID NO:16)	0.20 μ M
G12V探针 (SEQ ID NO:20)	0.20 μ M
外显子2正向引物 (SEQ ID NO:2)	0.50 μ M
外显子2反向引物 (SEQ ID NO:6)	0.50 μ M
外显子2 PNA寡聚体 (SEQ ID NO:52)	0.80 μ M
IC正向引物 (SEQ ID NO:43)	0.25 μ M
IC反向引物 (SEQ ID NO:48)	0.25 μ M
IC探针 (SEQ ID NO:51)	0.10 μ M
缓冲液*	1X
ROX参照	0.06 μ M
dNTP	0.80 mM
活化试剂 (MgCl ₂) **	7 mM
热稳定的耐热性DNA聚合酶	11单位/反应

*所述缓冲液适合用于利用引物、探针和内部对照的PCR测定。

**所述活化试剂是在含有MgCl₂和Tris的缓冲液中。MgCl₂是DNA聚合酶的辅因子。

[0186] 第三主混合物含有在下面表11中显示的试剂。表11也显示了每种试剂的最终反应浓度。

[0187] 表11

试剂	最终反应浓度
G13D探针 (SEQ ID NO:31)	0.20 μ M
Q61Ha探针 (SEQ ID NO:38)	0.20 μ M
Q61Hb探针 (SEQ ID NO:40)	0.20 μ M
G13C探针 (SEQ ID NO:34)	0.20 μ M
外显子3正向引物 (SEQ ID NO:7)	0.50 μ M
外显子3反向引物 (SEQ ID NO:11)	0.50 μ M
外显子3 PNA寡聚体 (SEQ ID NO:56)	1.20 μ M
外显子2正向引物 (SEQ ID NO:2)	0.50 μ M

外显子2反向引物 (SEQ ID NO:6)	0.50 μ M
外显子2 PNA寡聚体 (SEQ ID NO:52)	0.80 μ M
IC正向引物 (SEQ ID NO:43)	0.25 μ M
IC反向引物 (SEQ ID NO:48)	0.25 μ M
IC探针 (SEQ ID NO:51)	0.10 μ M
缓冲液*	1X
ROX参照	0.06 μ M
dNTP	0.80 mM
活化试剂 (MgCl ₂) **	7 mM
热稳定的耐热性DNA聚合酶	11单位/反应

*所述缓冲液适合用于利用引物、探针和内部对照的PCR测定。

**所述活化试剂是在含有MgCl₂和Tris的缓冲液中。MgCl₂是DNA聚合酶的辅因子。

[0188] 另外,在每个运行中包括阳性和阴性对照试剂,并在所述方法的DNA提取、扩增和检测步骤中处理以评估运行有效性。具体地,阴性对照试剂包括在 6.67×10^5 拷贝/mL的水平编码内部对照的质粒和含有载体DNA的TE缓冲液。内部对照是不具有已知的突变发生的KRAS基因区域。阳性对照试剂包括编码内部对照的质粒(以 6.67×10^5 拷贝/mL的水平存在)、两个编码靶向的SNP的质粒(每个在 1.00×10^5 拷贝/mL,其中一个质粒编码G12R和G12D,且另一个质粒编码G13D和Q61Ha)和含有载体DNA的TE缓冲液。因此,阳性对照试剂在每个反应产生每个引物对的扩增子,且在每个荧光通道中的至少一个阳性信号用于监测所述方法中的扩增。阳性和阴性对照试剂用于监测样品制备、扩增和检测以及污染。

[0189] 在m2000rt仪器上的循环条件如下面表12中所示。取样是快速的,体积设定为50 μ l,且反应体积为80 μ l。

[0190] 表12

步骤数目	循环数目	温度	时间
1	1	93.5°C	10 分钟
2	1	73.5°C	10 分钟
3	3	92°C 73.5°C 61°C	15 秒 30 秒 60 秒
4	45	92°C *61°C	15 秒 90 秒

* 在该步骤中在每个循环处进行实时荧光测量。

[0191] 每种探针含有下面表13所示的5' 荧光标记和3' 猝灭剂部分,由此允许在光学反应板的各个孔中每种探针的独立检测。该独立检测又会提供检测和鉴别每种SNP(当存在于KRAS基因中时)的能力。

[0192] 具体地,在光学反应板的任何给定孔内,每种探针含有不同的荧光团,且通过m2000rt仪器上的独特荧光通道来检测。该设置允许在光学读数板的单个孔中同时扩增和

检测内部对照和三种突变(如果存在的话)中的任一个(即, SNP)。因此, 每个患者3个反应的设置允许检测KRAS基因中的九种独立SNP。

[0193] 表13

探针	5' 荧光标记	3' 猝灭剂部分
G12D探针 (SEQ ID NO:13)	FAM	BHQ1
G12A探针 (SEQ ID NO:16)	VIC	BHQ1
G12V探针 (SEQ ID NO:20)	Quasar	BHQ2
G12S探针 (SEQ ID NO:22)	Quasar	BHQ2
G12C探针 (SEQ ID NO:27)	FAM	BHQ1
G12R探针 (SEQ ID NO:30)	VIC	BHQ1
G13D探针 (SEQ ID NO:31)	FAM	BHQ1
G13C探针 (SEQ ID NO:34)	VIC	BHQ1
Q61Ha探针 (SEQ ID NO:38)	Quasar	BHQ2
Q61Hb探针 (SEQ ID NO:40)	Q670	BHQ2
IC探针 (SEQ ID NO:51)	NED	BHQ2

[0194] 实施例2

突变包含性

评价了上述方法将G12D、G12A、G12V、G12S、G12C、G12R、G13D和G13C彼此区分开和与G12、G13、G13A、G13V、G13S和G13R区分开、以及将Q61H与Q61、Q61P、Q61E、Q61K、Q61L和Q61R区分开的能力。一式三份测试了KRAS野生型人细胞系DNA或以每个单倍体基因组一个拷贝的频率用含有列出的突变的质粒掺合 (spike) 的KRAS野生型人细胞系DNA。如在下面表14中所示, 在每种情况下准确地确定每种突变的存在与否。因此, 上述方法准确地鉴别出每种靶向的SNP, 且没有检测出检测未靶向的SNP或野生型序列。

[0195] 表14

测定靶标	KRAS 突变 ^{a,b}	报告的结果	解释
靶向	G12D (<u>GAT</u>)	G12D	检测到的突变
	G12A (<u>GCT</u>)	G12A	检测到的突变
	G12V (<u>GTT</u>)	G12V	检测到的突变
	G12S (<u>AGT</u>)	G12S	检测到的突变
	G12C (<u>TGT</u>)	G12C	检测到的突变
	G12R (<u>CGT</u>)	G12C	检测到的突变
	G13D (<u>GAC</u>)	G13D	检测到的突变
	G13C (<u>TGC</u>)	G13C	检测到的突变
	Q61Ha (<u>CAC</u>)	Q61H	检测到的突变
	Q61Hb (<u>CAT</u>)	Q61H	检测到的突变
未靶向	G12 (<u>GGT</u>)	未检测到	未检测到
	G13 (<u>GGC</u>)	未检测到	未检测到
	Q61 (<u>CAA</u>)	未检测到	未检测到
	Q61 (<u>CAG</u>)	未检测到	未检测到
	G13A (<u>GCC</u>)	未检测到	未检测到
	G13V (<u>GTC</u>)	未检测到	未检测到
	G13S (<u>AGC</u>)	未检测到	未检测到
	G13R (<u>CGC</u>)	未检测到	未检测到
	Q61P (<u>CCA</u>)	未检测到	未检测到
	Q61E (<u>GAA</u>)	未检测到	未检测到
	Q61K (<u>AAA</u>)	未检测到	未检测到
	Q61L (<u>CTA</u>)	未检测到	未检测到
	Q61R (<u>CGA</u>)	未检测到	未检测到

^a KRAS突变(具有突变体核苷酸的密码子标有下划线)。

^b G12、G13和Q61代表野生型。

[0196] 实施例3

FFPE (固定的-福尔马林石蜡包埋的) 切片类型

关于与安装和未安装在载玻片上的FFPE切片一起使用,进一步评价了上述方法。具体地,用共计50个FFPE样品(即,22个CRC样本、24个NSCLC样本和4个细胞系样品)评价了以下切片类型之间的一致:(1)安装在载玻片上的FFPE切片,和(2)未安装在载玻片上的FFPE切片。每个FFPE细胞系样品由含有特定KRAS突变(G12R、G12D、G13C或Q61H)的细胞系和KRAS野生型细胞系的混合物组成。将细胞系样品混合以产生5%突变细胞系频率,并随后在福尔马林中固定并包埋在石蜡中。如在表15中所示,50个样品中的30个具有对于两种切片类型而言“检测到的突变”的解释。50个样品中的20个具有对于两种切片类型而言“未检测到”的解释。这些结果证实了切片类型(即,安装在载玻片上的FFPE切片和未安装在载玻片上的FFPE切片)之间的100% (50/50) 总一致。因此,这些数据也证实,上述方法没有区分安装在载玻片上的FFPE切片和未安装在载玻片上的FFPE切片。

表 15

		未安装在载玻片上的 FFPE 切片	
		检测到的突变	未检测到
安装在载玻片上的 FFPE 切片	检测到的突变	30	0
	未检测到	0	20

[0197] 实施例4

分析灵敏度

上述方法还关于分析灵敏度进行了评价。具体地,从KRAS突变体和野生型FFPE细胞系提取DNA并纯化。给每个KRAS突变体DNA纯化物掺合KRAS野生型DNA纯化物以实现在10 ng可扩增的基因组DNA中4.0%或在2 ng可扩增的基因组DNA中8.0%的突变频率。随后将每个10 ng掺合物稀释以产生具有4.0%、2.0%、1.0%、0.5%和0.25%的突变频率的集合。随后将每个2 ng掺合物稀释以产生具有8.0%、4.0%、2.0%、1.0%和0.5%的突变频率的集合。对于每个集合,使用两批扩增试剂和3 *m2000rt* 仪器执行共6个运行。在每个运行中包括每个集合的8个重复,从而产生每个集合的共48个测试。

[0198] 每个10 ng集合和每个2 ng集合的检测百分比分别显示在下面表16和17中。使用概率单位数据分析来确定在10 ng或2 ng可扩增的基因组DNA中具有95%概率的突变百分比检测,并显示在下面表18中。这些数据证实,所述方法的分析灵敏度在10 ng可扩增的基因组DNA中为2%KRAS突变。

[0199] 表16

	突变百分比(%)				
突变	4.0	2.0	1.0	0.5	0.25
G12C	98	100	85	40	13
G12S	100	100	94	44	17
G12R	100 ^a	100	96	83	52
G12D	100	100	100	96	48
G12V	100	100	98	79	38
G12A	100	100	100	98 ^a	65
G13C	100	100	100	100	92
G13D	100	100	94	56	23
Q61H ^a	100	100	100	100	90
Q61H ^b	100	100	100	60	17

^a Q61H密码子CAC

^b Q61H密码子CAT

^c 从分析排除了一个具有无效结果的副本。

[0200] 表17

	突变百分比(%)				
突变	8.0	4.0	2.0	1.0	0.5
G12C	98	100	98	71	54
G12S	100	100	79	10	2
G12R	100	100	100	90	56
G12D	100	100	100	58	31
G12V	100	100	98	83	60
G12A	100	100	100	100	85
G13C	100	100	100	92	85
G13D	100	98	71	29	6
Q61H ^a	100	100	96	85	63
Q61H ^b	100	98	94	33	10

^a Q61H密码子CAC

^b Q61H密码子CAT。

[0201] 表18

	可扩增的基因组 DNA	
突变	10 ng	2 ng
G12C	1.7%	1.9%
G12S	1.2%	2.8%
G12R	0.9%	1.2%
G12D	0.5%	1.9%
G12V	0.8%	1.6%
G12A	0.4%	0.5%
G13C	0.3%	1.0%
G13D	1.1%	3.7%
Q61H ^a	0.3%	1.7%
Q61H ^b	0.9%	2.7%

^a Q61H密码子CAC

^b Q61H密码子CAT。

[0202] 实施例5

再现性

还评价了上述方法的再现性。使用CRC和NSCLC样本的FFPE匀浆物的11-成员集合证实了再现性。该研究的结果显示在下面表19中。

[0203] 集合成员01-09代表靶向的KRAS突变。集合成员10和11代表KRAS野生型。该研究也包括4个低阳性的样品(即,集合成员01、05、08和09),它们靶向小于或等于10 ng的基因组DNA输入和小于或等于5%的突变百分比。使用三个扩增试剂批次/仪器/操作人员完成了研究,每个集合成员2个样品制备,且每天2次m2000rt仪器运行持续6天。

[0204] 所述方法具有对于组合的所有集合成员、重复、操作人员、试剂批次、仪器和天数而言100%(791/791)的总一致,对于“未检测到”集合成员而言100%(144/144)的一致,和对于“检测到的突变”集合成员而言100%(647/647)的一致。因此,这些数据证实,上述方法产

生了可再现的结果,即在100%再现性比率。

[0205] 表19

集合成员	预期的结果	FFPE 肿瘤类型	有效结果	检测到的突变	未检测到	%一致*	下边界单侧95%一致
01	检测到的突变(G12C)	NSCLC	72	72	0	100	95.9
02	检测到的突变(G12S)	CRC	72	72	0	100	95.9
03	检测到的突变(G12R)	NSCLC	71 ^b	71	0	100	95.9
04	检测到的突变(G12D)	CRC	72	72	0	100	95.9
05	检测到的突变(G12V)	CRC	72	72	0	100	95.9
06	检测到的突变(G12A)	CRC	72	72	0	100	95.9
07	检测到的突变(G13D)	CRC	72	72	0	100	95.9
08	检测到的突变(Q61H)	NSCLC	72	72	0	100	95.9
09	检测到的突变(G13C)	NSCLC	72	72	0	100	95.9
10	未检测到	NSCLC	72	0	72	100	95.9
11	未检测到	CRC	72	0	72	100	95.9

^a来自具有列出预期的KRAS突变的有效结果的集合成员01-09的重复,并且认为“检测到的突变”的解释是一致的。来自具有有效结果的集合成员10和11的重复,并且认为“未检测到”的解释是一致的。

^b从分析排除了一个具有无效结果的重复。

[0206] 实施例6

与参考方法的关联

将上述方法与另一种检测SNP的方法(即2X双向Sanger测序)进行了对比。使用TargetPrep DNA FFPE样品制备试剂盒I和II处理了81个NSCLC和97个CRC FFPE样本。通过上述方法和2X双向Sanger测序测试了相同的含有DNA的洗脱液。如果通过两种方法检测到相同突变,认为突变检测是正一致。对于NSCLC、CRC和组合的NSCLC和CRC,所述一致分别显示在下面表20、21和22中。

[0207] 对于NSCLC样本,上述方法和2X双向Sanger测序之间的总一致是95.1%(77/81),具有92.9%(13/14)的正一致。在被发现为正一致的13个突变中,观察到下述突变(实例):G12C (6)、G12D (1)、G12V (2)、G13D (1)、G13C (1)和Q61H (2)。

[0208] 对于CRC样本,上述方法和2X双向Sanger测序之间的总一致是86.6%(84/97),具有97.6%(41/42)的正一致。在被发现为正一致的41个突变中,观察到下述突变(实例):G12S (1)、G12C (1)、G12D (12)、G12V (9)、G13D (15)和Q61H (3)。

[0209] 对于组合的NSCLC和CRC样本,上述方法和2X双向Sanger测序之间的总一致是90.4%(161/178),具有96.4%(54/56)的正一致。在被发现为正一致的54个突变中,观察到下述突变(实例):G12S (1)、G12C (7)、G12D (13)、G12V (11)、G13D (16)、G13C (1)和Q61H (5)。

[0210] 总之,这些数据证实了上述方法和2X双向Sanger测序之间86%或更高的总一致和92%或更高的正一致。

[0211] 表20

		2X 双向 Sanger 测序	
		检测到的突变	未检测到
上述方法	检测到的突变	13	3 ^a
	未检测到	1 ^b	64

^a双向Sanger测序具有在FFPE样本中大约20%突变含量的检测限度。通过Qiagen *therascreen* RGQ PCR证实了每个突变的存在和身份。

^b通过2X双向Sanger测序鉴别出的突变是G13D。使用Ion AmpliSeq Cancer Hotspot Panel v2的样本下一代测序指示在密码子12、13和61处的野生型序列。还通过Qiagen *therascreen* RGQ PCR证实了突变的缺失。

[0212] 表21

		2X 双向 Sanger 测序	
		检测到的突变	未检测到
上述方法	检测到的突变	41	12 ^a
	未检测到	1 ^b	43

^a双向Sanger测序具有在FFPE样本中大约20%突变含量的检测限度。通过使用Ion AmpliSeq Cancer Hotspot Panel v2的下一代测序证实了2个具有Q61H突变的样本。10个样本具有密码子12或13突变。通过Qiagen *therascreen* RGQ PCR证实了9个突变的存在和身份。通过Qiagen *therascreen* RGQ PCR证实了剩余突变的存在;但是,突变身份不同(通过本文描述的方法鉴别的G12A突变和通过Qiagen *therascreen* RGQ PCR鉴别的G12S突变)。

^b通过2X双向Sanger测序鉴别的突变是G13D。使用Ion AmpliSeq Cancer Hotspot Panel v2的样本下一代测序指示在密码子12、13和61处的野生型序列。还通过Qiagen *therascreen* RGQ PCR证实了突变的缺失。

[0213] 表22

		2X 双向 Sanger 测序	
		检测到的突变	未检测到
上述方法	检测到的突变	54	15 ^a
	未检测到	2 ^b	107

^a双向Sanger测序具有在FFPE样本中大约20%突变含量的检测限度。通过使用Ion AmpliSeq Cancer Hotspot Panel v2的下一代测序证实了2个具有Q61H突变的样本。13个样本具有密码子12或13突变。通过Qiagen *therascreen* RGQ PCR证实了12个突变的存在和身份。通过Qiagen *therascreen* RGQ PCR证实了剩余突变的存在;但是,突变身份不同(通

过本文描述的方法鉴别的G12A突变和通过Qiagen *therascreen* RGQ PCR鉴别的G12S突变)。

^b对于每个样本,通过2X双向Sanger测序鉴别的突变是G13D。使用Ion AmpliSeq Cancer Hotspot Panel v2的每个样本的下一代测序指示在每个样本中在密码子12、13和61处的野生型序列。还通过Qiagen *therascreen* RGQ PCR证实了每个样本中突变的缺失。

[0214] 实施例7

分析特异性

还针对它的分析特异性评价了上述方法。使用人胎盘衍生出的DNA(其含有KRAS同系物hRAS和nRAS以及KRAS假基因KRAS1P)评价了分析特异性。在25 ng的基因组DNA输入一式三份地测试了人胎盘衍生出的DNA,且没有观察到交叉反应性。

[0215] 另外,在上述方法中针对潜在交叉反应性评价了四种肺相关的微生物和三种结肠相关的微生物(参见下表23)。在样品处理的裂解步骤中以 10^6 个集落形成单位(CFU)或 10^6 个基因组拷贝将每种微生物加入KRAS突变阴性的样品中,并一式三份地测试。用测试过的任何微生物没有观察到交叉反应性。

[0216] 另外,针对微生物的干扰评价了KRAS突变-阳性的样品。以2%拷贝频率将KRAS突变体质粒加入10 ng KRAS野生型人细胞系DNA中,并在有每个样品输入 10^6 个CFU或 10^6 个基因组拷贝的每种微生物存在下通过所述方法一式三份地测试。没有微生物干扰KRAS突变检测。

[0217] 总之,这些数据证实,上述方法没有与KRAS同系物或假基因交叉反应,且因而,所述方法对KRAS是特异性的。通过与可能污染得自受试者的样品的微生物的交叉反应性的缺乏和所述微生物的干扰的缺乏,进一步证实了该方法的特异性。

[0218] 表23

微生物	有关的器官	样品类型	每个样品输出的靶浓度
粪拟杆菌(<i>Bacteroides caccae</i>)	结肠	培养的微生物	10^6 CFU
中间普雷沃氏菌(<i>Prevotella intermedia</i>)	结肠	纯化的核酸	10^6 基因组拷贝
大肠杆菌(<i>Escherichia coli</i>)	结肠	纯化的核酸	10^6 基因组拷贝
金黄色葡萄球菌(<i>Staphylococcus aureus</i>)	肺	纯化的核酸	10^6 基因组拷贝
铜绿假单胞菌(<i>Pseudomonas aeruginosa</i>)	肺	纯化的核酸	10^6 基因组拷贝
肺炎克雷伯氏菌(<i>Klebsiella pneumonia</i>)	肺	纯化的核酸	10^6 基因组拷贝
烟曲霉(<i>Aspergillus fumigatus</i>)	肺	纯化的核酸	10^6 基因组拷贝

[0219] 实施例8

潜在干扰物质

还评价了上述方法对可能存在于临床样本中的高水平的物质的干扰的敏感性。用在样品处理的裂解步骤处添加的血红蛋白、甘油三酯和坏死组织测试了KRAS突变阴性的样品(即,KRAS野生型FFPE人细胞系)和KRAS突变阳性的样品(即,与产生2%突变含量的KRAS突变体FFPE人细胞系混合的KRAS野生型FFPE人细胞系)。

[0220] 对于突变阴性的样品和突变阳性的样品,在至多4 g/L血红蛋白(2X Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)推荐的浓度)、至多74 mM甘油三酯(2X CLSI推荐的高浓度)存在下和在具有70%坏死区域的人CRC FFPE组织的另外10微米切片存在下,没有观察到报告的干扰和突变检测结果中的干扰。因此,这些结果证实,血红蛋白、甘

油三酯和坏死组织的存在(和高水平)不会干扰上述方法。

[0221] 应当理解,前述详细描述和附随实施例仅仅是示例性的,且不应用作对本发明的范围的限制,所述范围仅由所附权利要求和它们的等同方案限定。

[0222] 本领域技术人员会明白对公开的实施方案的不同变化和修改。可以做出这样的变化和修改而不脱离其精神和范围,所述变化和修改包括、但不限于与化学结构、取代基、衍生物、中间体、合成、组合物、制剂或本发明的使用方法有关的那些。

序列表

	<110> Abbott Molecular Inc.	
	<120> 人KRAS中单核苷酸多态性的检测	
	<130> 12336W001	
	<140> 新PCT国际专利申请	
	<141> 2015-06-23	
	<150> US 62/016,312	
	<151> 2014-06-24	
	<160> 57	
	<170> PatentIn 3.5版	
	<210> 1	
	<211> 27	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的寡核苷酸	
[0001]	<400> 1 tgtgacatgt tctaataatag tcacatt	27
	<210> 2	
	<211> 28	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的寡核苷酸	
	<400> 2 gtgtgacatg ttctaataata gtcacatt	28
	<210> 3	
	<211> 26	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的寡核苷酸	
	<400> 3 gtgtgacatg ttctaataata gtcaca	26
	<210> 4	
	<211> 21	

	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的寡核苷酸	
	<400> 4	
	gtatcgtcaa ggcactcttg c	21
	<210> 5	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的寡核苷酸	
	<400> 5	
	gttctcaegg aactgctatg t	21
	<210> 6	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
[0002]	<220>	
	<223> 合成的寡核苷酸	
	<400> 6	
	gtatcgtcaa ggcactcgtg c	21
	<210> 7	
	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的寡核苷酸	
	<400> 7	
	cagactgtgt ttctcccttc tcagg	25
	<210> 8	
	<211> 23	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的寡核苷酸	
	<400> 8	
	cagactgtgt ttctcccttc tea	23

[0003]	<210>	9	
	<211>	24	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	合成的寡核苷酸	
	<400>	9	
		cagactgtgt ttctcccttc tcag	24
	<210>	10	
	<211>	20	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	合成的寡核苷酸	
	<400>	10	
		ctggtccttc attgcactgt	20
	<210>	11	
	<211>	20	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	合成的寡核苷酸	
	<400>	11	
		ctggtccttc attgcactgt	20
	<210>	12	
	<211>	20	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	合成的寡核苷酸	
	<400>	12	
		tactggtcctc tcattgcact	20
	<210>	13	
	<211>	14	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>		

	<223> 合成的寡核苷酸	
	<400> 13 tacgccatca gctc	14
	<210> 14 <211> 14 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成的寡核苷酸	
	<400> 14 ctacgccatc agct	14
	<210> 15 <211> 15 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成的寡核苷酸	
[0004]	<400> 15 ctacgccatc agctc	15
	<210> 16 <211> 13 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成的寡核苷酸	
	<400> 16 ccagcagctc caa	13
	<210> 17 <211> 13 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成的寡核苷酸	
	<400> 17 cgccagcagc tcc	13
	<210> 18 <211> 13	

	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的寡核苷酸	
	<400> 18	
	tacgccagca gct	13
	<210> 19	
	<211> 14	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的寡核苷酸	
	<400> 19	
	tacgccaaca gctc	14
	<210> 20	
	<211> 14	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
[0005]	<220>	
	<223> 合成的寡核苷酸	
	<400> 20	
	ctacgccaac agct	14
	<210> 21	
	<211> 15	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的寡核苷酸	
	<400> 21	
	ctacgccaac agctc	15
	<210> 22	
	<211> 14	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的寡核苷酸	
	<400> 22	
	tacgccacta gctc	14

[0006]	<210>	23	
	<211>	14	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	合成的寡核苷酸	
	<400>	23	
	ctacgccact agct		14
	<210>	24	
	<211>	15	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	合成的寡核苷酸	
	<400>	24	
	ctacgccact agctc		15
	<210>	25	
	<211>	14	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	合成的寡核苷酸	
	<400>	25	
	ctacgccaca agct		14
	<210>	26	
	<211>	15	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	合成的寡核苷酸	
	<400>	26	
	ctacgccaca agctc		15
	<210>	27	
	<211>	14	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		

	<223> 合成的寡核苷酸	
	<400> 27 tacgccacaa gctc	14
	<210> 28 <211> 14 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成的寡核苷酸	
	<400> 28 ctacgccacg agct	14
	<210> 29 <211> 15 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成的寡核苷酸	
[0007]	<400> 29 ctacgccacg agctc	15
	<210> 30 <211> 14 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成的寡核苷酸	
	<400> 30 tacgccacga gctc	14
	<210> 31 <211> 14 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成的寡核苷酸	
	<400> 31 tacgtcacca gctc	14
	<210> 32 <211> 14	

	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的寡核苷酸	
	<400> 32	
	acgtcaccag ctcc	14
	<210> 33	
	<211> 14	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的寡核苷酸	
	<400> 33	
	acgtcaccag ctcc	14
	<210> 34	
	<211> 14	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
[0008]	<220>	
	<223> 合成的寡核苷酸	
	<400> 34	
	cgcaaccage tcca	14
	<210> 35	
	<211> 15	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的寡核苷酸	
	<400> 35	
	acgcaaccag ctcca	15
	<210> 36	
	<211> 14	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的寡核苷酸	
	<400> 36	
	acgcaaccag ctcc	14

	<210> 37	
	<211> 14	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的寡核苷酸	
	<400> 37	
	tcctcgtgac ctgc	14
	<210> 38	
	<211> 14	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的寡核苷酸	
	<400> 38	
	cctcgtgacc tgct	14
[0009]	<210> 39	
	<211> 14	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的寡核苷酸	
	<400> 39	
	ctcctcgtga cctg	14
	<210> 40	
	<211> 14	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的寡核苷酸	
	<400> 40	
	ctcatgacct gctg	14
	<210> 41	
	<211> 14	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	

	<223> 合成的寡核苷酸	
	<400> 41 actcctcatg accg	14
	<210> 42 <211> 14 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成的寡核苷酸	
	<400> 42 tactcctcat gacc	14
	<210> 43 <211> 30 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成的寡核苷酸	
[0010]	<400> 43 attaatgaaa tttgttacct gtacacatga	30
	<210> 44 <211> 28 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成的寡核苷酸	
	<400> 44 taatgaaatt tgttacctgt acacatga	28
	<210> 45 <211> 29 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成的寡核苷酸	
	<400> 45 attaatgaaa tttgttacct gtacacatg	29
	<210> 46 <211> 27	

	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的寡核苷酸	
	<400> 46	
	atgttttcga atttctcgaa ctaatgt	27
	<210> 47	
	<211> 29	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的寡核苷酸	
	<400> 47	
	atgttttcga atttctcgaa ctaatgtat	29
	<210> 48	
	<211> 28	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
[0011]	<220>	
	<223> 合成的寡核苷酸	
	<400> 48	
	atgttttcga atttctcgaa ctaatgta	28
	<210> 49	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的寡核苷酸	
	<400> 49	
	gccatcgtat atattcacat t	21
	<210> 50	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的寡核苷酸	
	<400> 50	
	ccatcgtata tattcacatt ta	22

[0012]	<210>	51	
	<211>	20	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	合成的寡核苷酸	
	<400>	51	
		ccatcgtata tattcacatt	20
	<210>	52	
	<211>	17	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	合成的寡核苷酸	
	<400>	52	
		cctacgccac cagctcc	17
	<210>	53	
	<211>	16	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	合成的寡核苷酸	
	<400>	53	
		tgctacgcc accagc	16
	<210>	54	
	<211>	15	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	合成的寡核苷酸	
	<400>	54	
		gcctacgcca ccagc	15
	<210>	55	
	<211>	17	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>		
	<400>	55	

	<223> 合成的寡核苷酸	
	<400> 55 actcctcttg acctget	17
	<210> 56 <211> 19 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成的寡核苷酸	
[0013]	<400> 56 ctcctcttga cctgetgtg	19
	<210> 57 <211> 18 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成的寡核苷酸	
	<400> 57 actcctcttg acctgetg	18

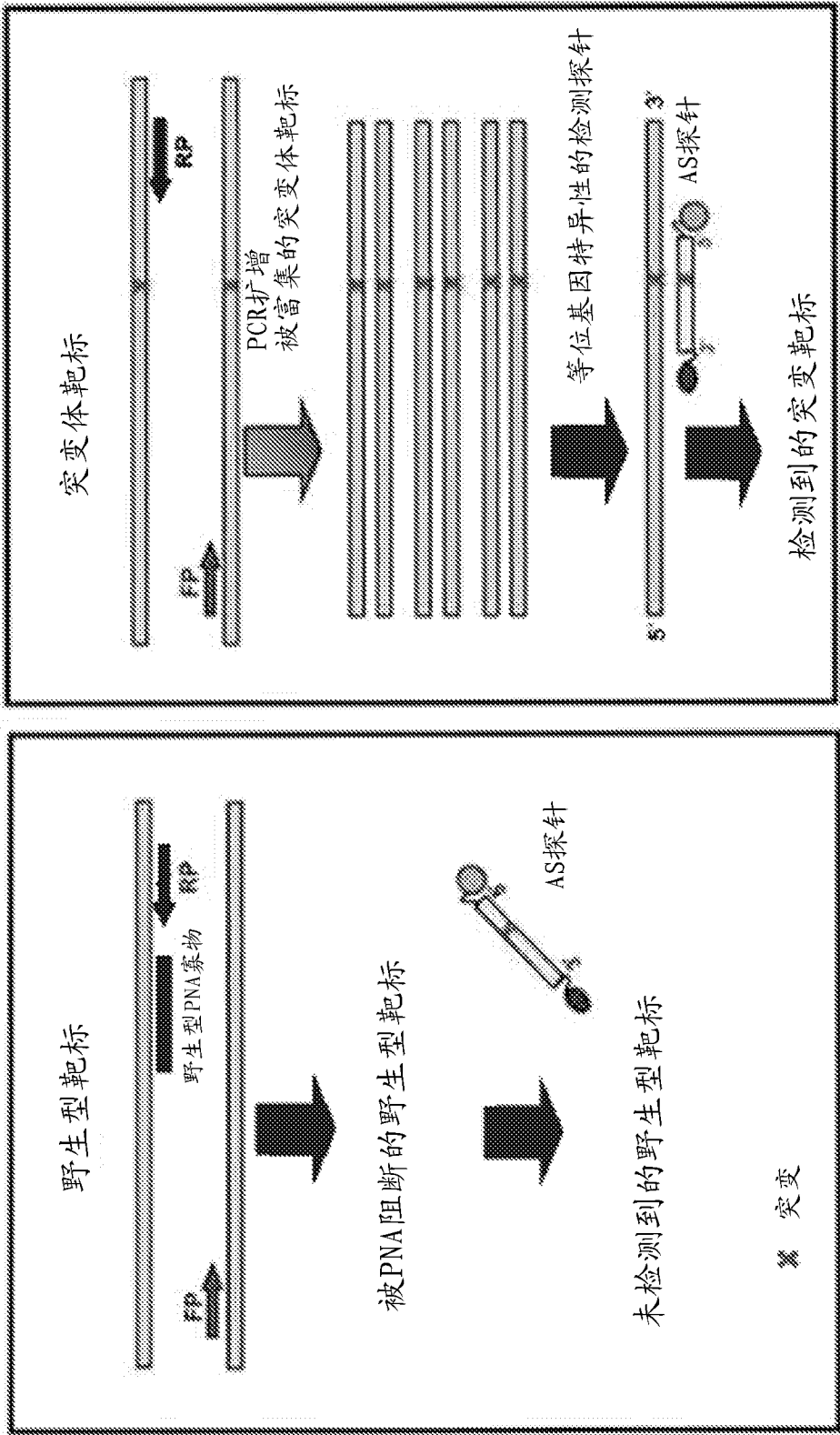
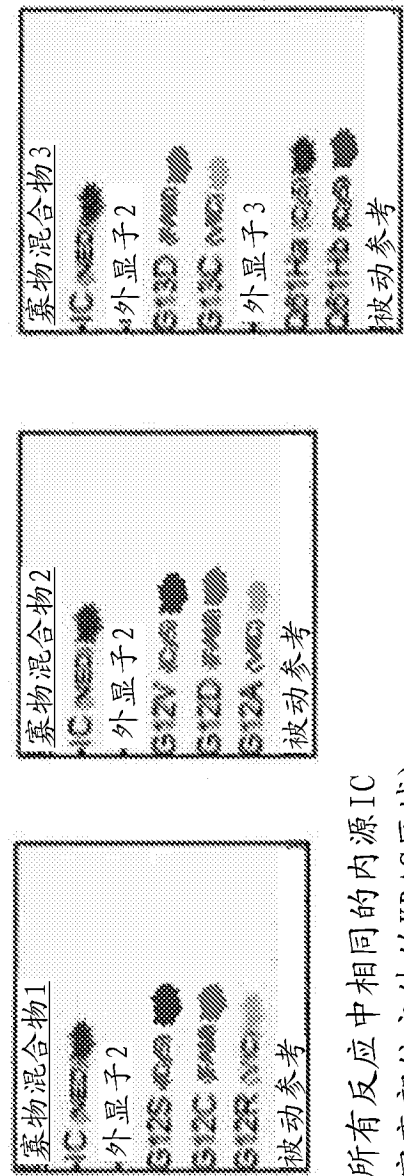


图 1

- 扩增（引物）
- 具有野生型阻断的普通激发
- 检测（探针）
- 突变体等位基因特异性的-允许多路化用于单个突变调用
- 对每个患者样品进行 (3) 反应和 (3) 每个反应查询的突变



• 在所有反应中相同的内源IC
(在突变部位之外的KRAS区域)

图 2

荧光 通道	反应1	反应2	反应3
FAM	G12C	G12D	G13D
VIC	G12R	G12A	G13C
Cy5	G12S	G12V	Q61H

图 3