



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103695558 B

(45) 授权公告日 2016. 01. 20

(21) 申请号 201310752451. 6

W0 2006/097899 A2, 2006. 08. 31, 第 213 段.

(22) 申请日 2008. 09. 29

审查员 马艳林

(30) 优先权数据

0719034. 1 2007. 09. 28 GB

(62) 分案原申请数据

200880110038. 7 2008. 09. 29

(73) 专利权人 凯杰曼彻斯特有限公司

地址 英国曼彻斯特

(72) 发明人 R·宝德 J·弗格逊 P·F·帕维托

N·J·德尔威尔 D·怀特科比

(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公

司 31100

代理人 余颖

(51) Int. Cl.

C12Q 1/68(2006. 01)

C12N 15/11(2006. 01)

(56) 对比文件

W0 2004048511 A2, 2004. 06. 10, 全文.

US 2004132050 A1, 2004. 07. 08, 全文.

权利要求书1页 说明书10页

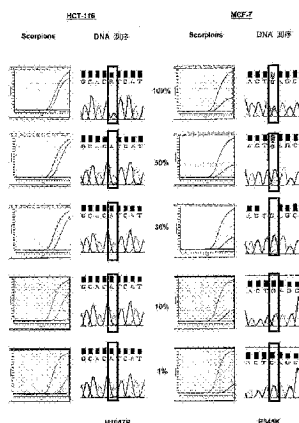
序列表8页 附图1页

(54) 发明名称

多核苷酸引物

(57) 摘要

含有以下引物序列之一或其互补序列的至少最后 6 个核苷酸的多核苷酸:SEQ. ID NO: 3-16, 18, 20-33, 35 或 37-39。



1. 核苷酸序列如 SEQ ID NO. 28 所示的第一引物用于制造 PCR 法检测 PIK3CA 基因中突变的试剂盒的用途, 所述试剂盒还包含第二引物, 所述第二引物在 PIK3CA 序列片段内的对应区域位于第一引物互补区的下游。

2. 如权利要求 1 所述的用途, 第二引物的序列如 SEQ ID NO. 35 所示。

3. 一种多核苷酸分子, 由 SEQ ID NO. 28 所示核苷酸序列构成。

4. 一种试剂盒, 含有至少两条引物, 其中, 第一引物的核苷酸序列如 SEQ ID NO. 28 所示, 第二引物在 PIK3CA 序列片段内的对应区域位于第一引物互补区的下游。

5. 如权利要求 4 所述的试剂盒, 所述第二引物的序列如 SEQ ID NO. 35 所示。

多核苷酸引物

[0001] 本申请是国际申请 PCT/GB2008/003306, 国际申请日 2008 年 9 月 29 日, 中国国家阶段申请号 200880110038.7 的发明专利申请的分案申请。

技术领域

[0002] 本发明涉及多核苷酸、含有多核苷酸的试剂盒, 以及在基因中检测突变存在与否的方法。

背景技术

[0003] 磷脂酰肌醇 3- 激酶 (PI3K) 是参与细胞信号传递的一大类脂质激酶。PI3K-AKT 途径在许多类肿瘤中被激活, 导致细胞生长、增殖和存活异常 (补充的 1 篇近期综述)。近来, 在人癌症中鉴定出了 1A 型 PI3K (PI3KCA) 催化亚基中的突变 [1]。这些突变在致癌作用中的确切作用仍然并没有被明确确定, 但随着许多靶向 PI3K 抑制剂的开发, 突变检测对于患者筛选来说变得日益重要。这些突变的检测中的技术难题来自于可能只包含少量突变序列的肿瘤活组织切片的限制。另外, 从石蜡包埋组织提取的 DNA 常常已被降解且质量很差。测序检测所需要的突变 DNA 的最低水平是 15-25%, 因此对于开发能在异源样品中检测少量突变的等位基因的灵敏的检测法以及进行所述检测法所需的产品具有迫切的需求。

[0004] 本发明试图满足该需求。

发明内容

[0005] 本发明提供了对肿瘤引起的 PIK3CA 突变的灵敏耐用的检测法。

[0006] 根据本发明的一个方面, 提供了一种多核苷酸, 其含有下列引物序列之一的至少最后 6 个核苷酸: SEQ. ID NO. 3-16, 18, 20-33, 35 或 37-39, 或其互补序列。也就是说, 所述多核苷酸含有下列引物序列之一 3' 末端的至少 6 个核苷酸: SEQ. ID NO. 3-16, 18, 20-33, 35 或 37-39, 或其互补序列。

[0007] 优选地, 所述多核苷酸包含下列引物序列之一、或其互补序列、或与其具有 80%、90%、95% 或 99% 序列一致性的序列 3' 末端 8、10、12、14、17、18 或 20 个核苷酸或整个序列的至少 75% 的核苷酸: SEQ ID NO. 3-16、18、20-33、35 或 37-39。

[0008] 在本发明的一些实施方式中, 提供了一种多核苷酸, 其包含以下引物序列之一 3' 末端 10 个核苷酸的至少 75% 的核苷酸: SEQ. ID NO. 3-16、18、20-33、35 或 37-39, 或其互补序列。

[0009] 通常, 所述多核苷酸短于 100 个核苷酸, 优选短于 80 个核苷酸, 更优选短于 60 个核苷酸, 更优选短于 40 个核苷酸, 更优选短于 30 个核苷酸。

[0010] 优选地, 所述多核苷酸还含有淬灭基团和荧光团。

[0011] 通常, 所述淬灭基团和荧光团由含有第一和第二区域的核苷酸尾序列隔开, 其中所述第一区域的核苷酸与第二区域的核苷酸互补但呈反向, 从而所述第一区域与第二区域的杂交导致所述淬灭基团与所述荧光团足够靠近, 以淬灭所述荧光团。

[0012] 优选地,所述尾序列还含有第三区域,其具有与 PIK3CA 基因的一个区域互补的序列。

[0013] 优选地,所述多核苷酸含有 SEQ ID NO:18 的 3' 末端的至少 6 个核苷酸,并且所述尾序列含有 SEQ. ID NO. 17。

[0014] 或者,所述多核苷酸含有 SEQ ID NO:35 的 3' 末端至少最后的核苷酸,并且所述尾序列含有 SEQ. ID NO. 34。

[0015] 或者,所述多核苷酸含有 SEQ ID NO:39 的 3' 末端至少最后的核苷酸,并且所述尾序列含有 SEQ. ID NO. 38。

[0016] 通常,所述淬灭基团含有 Dabcyl。

[0017] 优选地,所述荧光团含有 Hex, Fam 或 Rox。

[0018] 根据本发明的另一个方面,提供了一种含有本发明的至少两种多核苷酸的试剂盒。

[0019] 优选地,所述试剂盒含有包含 SEQ ID NO. 18 的多核苷酸和包含 SEQ ID NO. 3-16 之一的多核苷酸;或含有包含 SEQ ID NO. 35 的多核苷酸和包含 SEQ ID NO. 20-33 之一的多核苷酸;或含有包含 SEQ ID NO. 39 的多核苷酸和包含 SEQ ID NO. 37 的多核苷酸。

[0020] 通常,所述试剂盒还含有核苷三磷酸,聚合酶和 / 或缓冲液。

[0021] 根据本发明的另一个方面,提供了将本发明所述的多核苷酸或试剂盒,或含有 SEQ. ID NO. 3-16, 18, 20-33 或 35 或其互补序列 3' 末端 6 个核苷酸中的 4 或 5 个的多核苷酸用于检测含有 PIK3CA 基因的至少一个片段的核酸样品中的突变的用途。

[0022] 优选地,所述核酸样品中的 PIK3CA 基因所述片段长至少 10 个核苷酸,优选长 20 个核苷酸,更优选长 30 个核苷酸,和更优选长 40 个核苷酸。

[0023] 根据本发明的另一个方面,提供了一种检测 PIK3CA 基因中突变存在与否的方法,该方法包括以下步骤:

[0024] a) 混合含有 PIK3CA 基因的至少一个片段的核酸样品和一条多核苷酸,其含有下列引物序列之一或其互补序列 3' 末端至少 6 个核苷酸:SEQ ID NO. 3-16 或 20-33;和

[0025] b) 检测所述多核苷酸与所述核酸样品的杂交,其中杂交表示突变的存在。

[0026] 通常,所述多核苷酸含有下列引物序列之一:SEQ ID NO:3-16 或 20-33。

[0027] 优选地,该方法还在步骤 a) 前包括以下步骤:用热循环核酸扩增,优选 PCR 扩增 PIK3CA 基因所述片段的拷贝数。

[0028] 优选地,步骤 b) 包括用所述多核苷酸作为第一引物进行 DNA 聚合,并检测聚合的延伸产物。

[0029] 通常,步骤 b) 包括以下步骤:将所述核酸样品和多核苷酸与对应于所述多核苷酸互补区域下游的 PIK3CA 序列所述片段的一个区域的第二引物混合,并对该混合物进行 PCR。

[0030] 优选地,所述第二引物包含:SEQ. ID NO. 18, 并且所述多核苷酸包含 SEQ. ID NOS. 3-16 的 3' 末端 6 个核苷酸中的至少 4 或 5 个核苷酸;或所述第二引物包含 SEQ. ID NO. 35, 并且所述多核苷酸含有 SEQ. ID NOS. 20-33 的 3' 末端 6 个核苷酸中的至少 4 或 5 个核苷酸。

[0031] 另外,该方法还包含以下步骤:用对照引物对所述样品进行 PCR,并比较 PIK3CA 基

因的扩增和用所述多核苷酸和第二引物的扩增。

[0032] 优选地,所述对照引物含有 SEQ ID NO. 37 和 39。

[0033] 通常,所述多核苷酸含有淬灭基团和荧光团,并且其中步骤 b) 包括使所述混合物暴露于在不存在淬灭基团时荧光团对其响应的波长的光下,并检测在不存在淬灭基团的情况下荧光团发射波长处的光。

[0034] 优选 PIK3CA 基因是 GenBank 登录号 NM_006218 版本号 NM_006218.2GI:54792081 可获得的序列,该序列通过参考整合在本发明中。

[0035] 当说明书中提到一个参照序列“3' 末端 6 个核苷酸中至少 4 或 5 个”时,指所述参照序列的所述 6 个核苷酸中的任意一个或两个核苷酸可能缺失或被不同的核苷酸取代。当然,在一些实施方式中,该序列含有参照序列的全部 6 个核苷酸。

[0036] 在本说明书中,“ARMS”是例如 EP-A-0332435 中所公开的的扩增阻滞突变系统。

[0037] 当在本说明书中提到一种多核苷酸相对于参照多核苷酸的百分比时,这可以通过本领域已知的算法确定。

[0038] 例如,两条序列之间的相同性百分数可以采用默认参数用 BLASTP 算法 2.2.2 版 (Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schäffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, 和 David J. Lipman (1997), “缺口 BLAST 和 PSI-BLAST: 新一代蛋白质数据库检索程序”, 核酸研究 . 25:3389-3402) 加以确定。

附图说明

[0039] 图 1 显示了对含有突变 PIK3CA 基因的样品进行 Scorpions 检测和测序的结果。

[0040] 发明详述

[0041] 本发明的实施方式提供了可用于在含有核酸的样品中检测 PIK3CA 基因突变的检测法的多核苷酸引物。

[0042] 在具体实施方式中,所述多核苷酸引物是正向和反向引物,它们与 PIK3CA 基因杂交,从而发生 PCR 扩增。因此,所述正向引物与所述反向引物相反链的上游杂交,并且正向和反向引物共同确定了在 PCR 中扩增出的扩增子序列。选择正向引物序列,使其不与野生型序列互补,但能与突变 PIK3CA 序列杂交。

[0043] 为了检测样品中突变 PIK3CA 基因的存在,将引物与样品混合。然后在样品中加入 PCR 必需的试剂 (合适的核苷酸三磷酸、DNA 聚合酶和缓冲液),进行 PCR。如果样品含有正向引物能与之杂交的突变序列,那么在 PCR 过程中扩增出扩增子,从而表明样品中突变序列的存在。如果样品不含突变序列,那么正向引物与 PIK3CA 序列结合的效率低,因此几乎没有,或不存在扩增子序列的扩增。

[0044] 为了检测突变 E542K,所述正向引物序列可以是 SEQ ID NO. 3-9 之一,优选为 SEQ ID NO. 5。为了检测突变 E545K,所述正向引物序列可以是 SEQ ID NO. 10-16 之一,优选为 SEQ ID NO. 14。为了检测突变 H1047R,所述正向引物序列可以是 SEQ ID NO. 20-26 之一,优选为 SEQ ID NO. 21。为了检测突变 H1047L,所述正向引物序列可以是 SEQ ID NO. 27-33 之一,优选为 SEQ ID NO. 28。然而,应理解正向引物的精确序列不需要与这些序列相同,只要正向引物与突变序列比与野生序列的杂交更容易。在上述序列中,引物的最后 6 个核苷酸 (即 3' 末端的核苷酸) 提供了结合特异性,因此这些核苷酸必需与给定序列相同。

[0045] 为了检测样品中形成的扩增子的存在,反向引物在本发明实施方式中被称作“Scorpions”引物。Scorpions 引物在 WO-A-99/066071 中被详细描述,在此通过参考整合在本发明中。Scorpions 引物含有与一个基因(在本发明中为 PIK3CA)的第一靶序列互补的引物序列和一个尾序列,其包含与两个互补序列侧接的探针序列。在引物序列和尾序列之间提供了 DNA 聚合酶封闭部分(例如六甘醇(HEG)单体)。在尾序列的一端提供了荧光团,在尾序列的另一端提供了淬灭基团。使用时,Scorpions 引物的引物序列在正常方式的 PCR 中作为反向引物,并且因此整个 Scorpions 引物(包括尾序列)被掺入各扩增子。DNA 聚合酶封闭部分防止尾序列复制。因此,尾序列中互相互补的序列倾向互相杂交,使荧光团和淬灭基团靠近并防止荧光团发光。然而,如果扩增子含有与所述探针序列互补的第二靶序列,所述探针序列优先与第二靶序列结合,使互补序列分开。这导致荧光团和淬灭基团在空间上分开,从而使荧光团响应不同波长的入射光而发出一定波长的光。因此,Scorpions 引物能够轻易检测扩增子,并且避免假阳性结果(例如由引物二聚体引起的),因为只有扩增子含有第二靶序列时才会产生信号。

[0046] 所述荧光团可以是 Hex(4,7,2',4',5',7'-六氯-(3',6'-二特戊酰基荧光素基)-6-羧酰胺基己基]-1-0-(2-氰基乙基)-(N,N-二异丙基)-亚磷酰胺),Fam([(3',6'-二特戊酰基荧光素基)-6-羧酰胺基己基]-1-0-(2-氰基乙基)-(N,N-二异丙基)-亚磷酰胺)或 Rox(5,6-羧基-X-罗丹明)。所述淬灭基团可以是 Dabcyl(5'-二甲氧基三苯甲氧-5-[(N-4'-羧基-4-(二甲基氨基)-偶氮苯)-氨基己基-3-丙烯亚酰胺]-2'-脱氧尿苷-3'-[(2-氰基乙基)-(N,N-二异丙基)]-亚磷酰胺)。

[0047] 在本发明的实施方式中,提供了用于检测 E542K 和 E545K 突变的 Scorpions 引物,其中引物序列是 SEQ ID NO. 18,探针序列是 SEQ ID NO. 17。提供了用于检测 H1047R 和 H1047L 突变的 Scorpions 引物,其中引物序列是 SEQ ID NO. 35,探针序列是 SEQ ID NO. 34。

[0048] 然而应理解,使用 Scorpions 引物不是本发明必需的,也可使用其它检测扩增子合成的方法,例如 TaqManTM产物检测,如专利号 US-A-5487972 和 US-A-5210015 中所述。

[0049] 在一些实施方式中,还进行对照试验,以检测 PIK3CA 基因在样品中的总浓度。这是通过用确定 PIK3CA 基因中另一个区域内的扩增子的对照正向和反向引物进行单独 PCR 反应实现的。优选正向引物是 SEQ ID NO. 37,反向引物是 Scorpions 引物,其中引物序列是 SEQ ID NO. 39,探针序列是 SEQ ID NO. 38。然后将产生阈值数量的对照扩增子所需的 PCR 循环数与产生含有突变序列的扩增子阈值数的 PCR 循环数比较,以评估样品中 PIK3CA 基因的突变拷贝的比例。该对照试验通常与所述检测法分开进行。

[0050] 所述 PCR 检测优选以多重实时 PCR 检测的方式进行。

[0051] 核酸测试样品通常是血液、粪便、痰、结肠洗出液、支气管洗出液或其它体液样品,或从个体获得的组织。所述个体通常是人,优选智人(Homo sapiens)。应理解,测试样品同样可以是对应于所述测试样品中的序列的一个核酸序列。即,首先可以用任何常规技术,例如热循环核酸扩增,尤其是 PCR,或全基因组扩增(WGA)扩增样品核酸中的全部或部分区域,然后用于本发明的方法。

[0052] 可使用任何常用的用于聚合的酶,只要它不在任何显著的程度影响 DNA 聚合酶区分正常和突变模板序列的能力。常用的酶的例子包括没有显著 3'-5' 外切核酸酶活性的热稳定酶,例如 Taq DNA 聚合酶,尤其是“Ampli Taq Gold”TM DNA 聚合酶(PE Applied

Biosystems), Stoffel 片段, 或其它合适的 Taq 或 Tth (嗜热栖热菌 *Thermus thermophilus*) DNA 聚合酶的 N- 末端缺失修饰形式。

[0053] 在本发明的其它实施方式中, 提供了试剂盒, 其含有本发明的一种或多种多核苷酸和进行 PCR 反应所需的核苷酸三磷酸、DNA 聚合酶和缓冲液。优选试剂盒含有用于检测特定突变正向和反向引物, 以及正向和反向对照引物。

实施例

[0054] 材料和方法

[0055] 根据 PIK3CA 基因 (登录号: NM_006218) 中 4 种最常见的突变设计引物。设计 ARMS 引物以检测外显子 20 中的两个突变: H1047R 和 H1047L; 以及外显子 9 中的两个突变: E452K 和 E454K。对 PIK3CA 基因中的 cDNA2450 位设计对照引物。

[0056] 还设计了 Scorpions。为了实现在每个反应中进行多重试验, 用不同荧光团标记三个 Scorpion 引物。

[0057] 引物设计

[0058] 针对每个靶区域设计多个特异性的 ARMS 引物。E542K 和 E545K 突变的靶区域分别如下如 SEQ ID NO. 1 和 2 所示 (突变碱基在括弧中显示, 其中正常形式在前)。针对所述突变的正向引物也如下所示 (SEQ ID NO. 3-16)。为了增强对这些反应的特异性, 在接近 3'- 末端使用了额外的引物错配 (在引物序列中用下划线表示)。针对所述实验使用了优化引物 (E542K-2 和 E545K-4)。可与所述引物序列使用的 Scorpions 引物如 SEQ ID NO. 17 和 18 所示。Scorpions 引物和靶区域之间的对应区域用一致的高亮或下划线标出。

[0059] 外显子 9 区域

[0060] AACAGAGAATCTCCATTTTAGCACTTACCTGTGACTCCATAGAAAATCTTTCTCC

[0061] TGCTCAGTGATTT (C/T) AGAGAGAGGATCTCGTGAGAAAATTGCTTTGAGCTGTT

[0062] CTTTGTCAATTTCCCTTAATTCATTGTCTCTAGCTAGTCTGTTACTCTGTAAAATA

[0063] AAATAATATCTTATATA (SEQ ID NO. 1)

[0064] AACAGAGAATCTCCATTTTAGCACTTACCTGTGACTCCATAGAAAATCTTTCTCC

[0065] TGCT (C/T) AGTGATTTTCAGAGAGAGGATCTCGTGAGAAAATTGCTTTGAGCTGTT

[0066] CTTTGTCAATTTCCCTTAATTCATTGTCTCTAGCTAGTCTGTTACTCTGTAAAATA

[0067] AAATAATATCTTATATA (SEQ ID NO. 2)

[0068]

突变	引物序列	SEQ ID NO.
E542K-0	5'-CTTCTCCTGCTCAGTGATTTT-3'	3
E542K-1	5'-CTTCTCCTGCTCAGTGATTAT-3'	4
E542K-2	5'-CTTCTCCTGCTCAGTGATTCT-3'	5
E542K-3	5'-CTTCTCCTGCTCAGTGATTGT-3'	6
E542K-4	5'-CTTCTCCTGCTCAGTGATATT-3'	7
E542K-5	5'-CTTCTCCTGCTCAGTGATCTT-3'	8
E542K-6	5'-CTTCTCCTGCTCAGTGATGTT-3'	9
E545K-0	5'-ACTCCATAGAAAATCTTTCTCCTGCTT-3'	10
E545K-1	5'-ACTCCATAGAAAATCTTTCTCCTGCAT-3'	11
E545K-2	5'-ACTCCATAGAAAATCTTTCTCCTGCCT-3'	12
E545K-3	5'-ACTCCATAGAAAATCTTTCTCCTGCGT-3'	13
E545K-4	5'-ACTCCATAGAAAATCTTTCTCCTGATT-3'	14
E545K-5	5'-ACTCCATAGAAAATCTTTCTCCTGGTT-3'	15
E545K-6	5'-ACTCCATAGAAAATCTTTCTCCTGTTT-3'	16
外显子 9 scorpion	Hex-CGCGCTCGTGTAGAAATTGCTTTGAGC GCG-que-heg-CAATGAATTAAGGGAAAATG ACA	17 和 18

[0069] 外显子 20 区域

[0070] H1047R 和 H1047L 突变的靶区域如下如 SEQ ID NO:19 所示（突变碱基如括弧中所示，其中正常形式在前）。针对突变的正向引物也如下所示（SEQ ID NO. 20-33）。为了增强对这些反应的特异性，在接近 3' - 末端使用了额外的引物错配（如引物序列中下划线的所示）。针对所述实验使用了优化引物（H1047R-1 和 H1047L-1）。可与所述引物序列使用的 Scorpions 引物如 SEQ ID NO. 34 和 35 所示。Scorpions 引物和靶区域之间的对应区域用一致的高亮或下划线标出。

[0071] AGTGCAGTGTGGAATCCAGAGTGAGCTTTTCATTTTCTCAGTTATCTTTTCAGTTC

[0072] AATGCATGCTGTTTAATTGTGTGGAAGATCCAATCCATTTTTGTTGTCCAGCCAC

[0073] CATGA(T/C/A)GTGCATCATTCATTTGTTTCATGAAATACTCCAAAGCCTCTTGCTC

[0074] AGTTTTATCTAAGGCTAGGGTCTTTTGAATGTATGCAATGTCATCAAAAAGATTGT

[0075] AGTTCTGGCATTCCAGAGCCAAGCATCATTGAGAAAAGATTTATGAAGAGATTG

[0076] GCATGCTGTGAATAGCTAGATAAGCCTT (SEQ ID NO. 19)

[0077]

突变	引物序列	SEQ ID NO.
H1047R-0	5'-TGTTGTCCAGCCACCATGAC-3'	20
H1047R-1	5'-TGTTGTCCAGCCACCATGCC-3'	21
H1047R-2	5'-TGTTGTCCAGCCACCATGGC-3'	22
H1047R-3	5'-TGTTGTCCAGCCACCATGTC-3'	23
H1047R-4	5'-TGTTGTCCAGCCACCATAAC-3'	24
H1047R-5	5'-TGTTGTCCAGCCACCATCAC-3'	25
H1047R-6	5'-TGTTGTCCAGCCACCATTAC-3'	26
H1047L-0	5'-TGTTGTCCAGCCACCATGAA-3'	27
H1047L-1	5'-TGTTGTCCAGCCACCATGCA-3'	28
H1047L-2	5'-TGTTGTCCAGCCACCATGGA-3'	29
H1047L-3	5'-TGTTGTCCAGCCACCATGTA-3'	30
H1047L-4	5'-TGTTGTCCAGCCACCATAAA-3'	31
H1047L-5	5'-TGTTGTCCAGCCACCATCAA-3'	32
H1047L-6	5'-TGTTGTCCAGCCACCATTAA-3'	33
外显子 20 scorpion	Fam-CGCGGCATGAAATACTCCAAAGCCG CG-que-heg-CCCTAGCCTTAGATAAAACTG AGCAA	34 和 35

[0078] 对照引物

[0079] 对照引物如下所示。Scorpions 引物和靶区域之间的对应区域用一致的高亮或下划线标出。

[0080] AGGCTTGAAGAGTGTCTGAATTATGTCCTCTGCAAAAAGGCCACTGTGGTTGAAT

[0081] TGGGAGAACCCAGACATCATGTCTAGAGTTACTGTTTCAGAACAAATGAGATCATC

[0082] TTTAAAAATGGGGATGG (SEQ ID NO. 36)

[0083]

突变	引物序列	SEQ ID NO.
对照引物	5'-AGATGATCTCATTGTTCTGAAACAG-3'	37
对照 scorpion	Rox-CCGGCCAATTCAACCACAGTGGCCGG-que- heg-GGCTTGAAGAGTGTCTGAATTA	38 和 39

[0084] 所有引物由 Invitrogen 合成和提供。PCR 缓冲液、Taq 和镁由 Eurogentec 提供，dNTP 购自 Abgene Ltd。Scorpions 由 ATDBio 合成和提供。

[0085] 试验在包含一个对照检测和 2 个 ARMS 检测 (1x 外显子 9 和 1x 外显子 20) 的 2 个反应中多重进行。在含有 1xPCR 缓冲液、4.0mM MgCl₂、200 μM dNTP 混合物、0.25 μM 的各引物

(对照引物和 2 个 ARMS 引物) 以及 0.25 μ M 的各 Scorpion (对照 Scorpion (SEQ ID NO. 38 和 39)、外显子 20 Scorpion (SEQ ID NO. 34 和 35)、以及外显子 9 Scorpion (SEQ ID NO. 17 和 18)) 的 25 微升反应体系中进行试验。在各反应中加入 2.5 微升 DNA 模板。每次反应用 2.5 单位 Taq 聚合酶多重使用 (multiplex) H1047R 和 E542K 引物。每次反应用 3.0 单位 Taq 聚合酶多重使用 H1047L 和 E545K 引物。所用的 E542K 引物是 E542K-2 (SEQ ID NO. 5)。所用的 E545K 引物是 E545K-4 (SEQ ID NO. 14)。所用的 H1047R 引物是 H1047R-1 (SEQ ID NO. 21)。所用的 H1047L 引物是 H1047L-1 (SEQ ID NO. 28)。

[0086] 在所有的情况下,反应在下列条件下在 Stratagene Mx3000P 上扩增:95°C 10 分钟,然后是 45 轮的 90°C 30 秒和 60°C 1 分钟循环。

[0087] 根据 Higuchi 等 [2] 所述的方法构建携带点突变的 DNA 盒作为阳性对照。简单说,使用相应的外部和变构 (mutamer) 引物产生具有互补端的半个盒,每个半盒含有一个突变碱基。混合这些 PCR 产物,并用内部嵌套 (nested) 引物扩增。互补的半盒的自发引导和随后的扩增产生了具有突变碱基的终产物。对产物测序,以确定已建立了正确的序列。对每个感兴趣的突变重复该过程。将 DNA 盒与等量的基因组 DNA 混合,以产生 100% 阳性对照。

[0088] 实施例 1

[0089] 为了确定反应和引物的特异性,每个反应使用 5-50ng 基因组 DNA 进行各试验,以评估错配引物延伸导致的临界信号。对于每个反应,测定 Δ Ct 值 (对照 Ct- 突变 Ct) (C_t = 阈值循环)。对每个 DNA 浓度进行 6 次反应,并对各种情况重复三次,以确定截留 Δ Ct 值,在该值以下,任何扩增可被认为是由于存在突变序列而不是由于临界信号。截留 Δ Ct 值被确定为比每个试验的所有反应中的最小 Δ Ct 值小 1Ct。对于 H1047R 和 H1047L 试验,截留 Δ Ct 被定为 12,对于 E542K 试验,截留 Δ Ct 是 9,对于 E545K 试验,截留 Δ Ct 是 8。

[0090] 实施例 2

[0091] 为了评估试验的灵敏度,将 5 个突变 DNA 拷贝稀释于不同浓度的基因组 DNA 中,使得最终浓度为突变 DNA 相对于野生型 DNA 的 5, 2, 1, 0.5 和 0.1%。表 1 显示了 4 个 ARMS 试验的灵敏度。该表格显示了在野生型 DNA 背景下递减浓度的突变 DNA 的 Δ Ct 值。预定的截留 Δ Ct 如最后一栏所示。外显子 20 试验能够在仅占 0.1% 总 DNA 的情况下检测 5 个突变 DNA 拷贝 (在先前预定的截留 Δ Ct 下)。外显子 9 试验能够在仅占 1% 总 DNA 的情况下检测 5 个突变 DNA 拷贝,其中 Δ Ct 位于先前预定的截留值范围内) (表 1)。

[0092] 表 1:

[0093]

野生型 DNA / 反应 (拷贝)	突变型 DNA / 反应 (拷贝)	突变等 位基因 的相对 %	Δ CT				截留 Δ Ct	
			H1047L	H1047R	E542K	E545K		
100	5	5%	5.9	4.3	5.1	5.8		
250	5	2%	7.2	6.7	7.2	6.4	H1047L	12
500	5	1%	8.3	7.6	8.4	7.0	H1047R	12
1000	5	0.5%	9.3	9.0	10.2	8.1	E542K	9
5000	5	0.1%	11.5	10.5	12.1	10.1	E545K	8

[0094] 实施例 3

[0095] 用含有突变 H1047R (HCT-116) 和 E545K (MCF-7) 的细胞系的混合物比较 ARMS 试验与测序相比的相对灵敏度。两个细胞系对于突变都是杂合的。用 Samuels 等 [1] 所述的引物和 PCR 循环条件进行测序。ARMS 试验和测序在突变基因占总混合物 100%, 50%, 30%, 10% 和 1% 的浓度下进行。结果如图 1 所示, 其中“Scorpions”标题下所示的结果显示了在持续的 PCR 循环后扩增子拷贝数的增加 (使用对照引物和突变引物的结果用单独的线条表示)。在标题“DNA 测序”下所示的是对混合物中基因反向链测序的结果。当 H1047R 突变体少于 50% 的总混合物时, 测序不能检测其存在, 而当存在的 E545K 突变体少于 30% 的总混合物时, 也不能检测其存在。相反, 使用本发明引物的试验能检测以 1% 浓度存在的突变体。

[0096] 实施例 4

[0097] 对从通过 ARMS/Scorpion 检测对存在 PIK3CA 突变进行了评估的不同肿瘤类型的新鲜冷冻组织中提取的 DNA 进行该试验。总共从 279 个肿瘤样品中获得了 DNA。该试验在 49 个结肠癌样品中的 5 个 (10.2%), 49 个乳腺癌样品中的 19 个 (38.7%), 51 个肺癌样品中的 1 个 (1.9%), 和 34 个黑素瘤样品中的 1 个 (2.9%) 中报告了突变。在 50 个前列腺或 46 个卵巢癌样品中未检测到突变。在对于 PIK3CA 突变阳性的结肠样品中, 3 个是 H1047R, 1 个是 H1047L, 而 1 个是 E542K; 在对于 PIK3CA 阳性的乳腺癌样品中, 15 个是 H1047R, 1 个是 H1047L, 而 3 个是 E545K; 对于 PIK3CA 突变阳性的肺癌样品和黑素瘤样品中的两个突变都是 H1047R。测序仅仅鉴定出被检测出的 26 个突变中的 14 个 (53%)。测序检测出一乳腺癌标本中的突变, 它是 ARMS 试验并没有设计用于检测的 (c1634A>G; p E545G)。这不是新的突变, 且先前已经在乳腺癌和结肠癌中进行过描述 [3-5]。

[0098] 除了卵巢癌, 所分析的样品中 PIK3CA 突变的出现率与先前研究一致 [1, 3-9]。在卵巢癌中先前已经描述过 PIK3CA 突变, 但被认为可能与子宫内膜样和透明细胞癌有关 [8, 10]。所有在本研究中测试的卵巢癌都是严重腺癌, 这可能解释了为何不存在任何 PIK3CA 突变。

[0099] ARMS 试验明显在临床样品中鉴定了比直接测序所见更多的突变。细胞系混合物确定该试验比测序在检测感兴趣的 PI3KCA 突变中更灵敏。可能同时含有肿瘤和正常组织的临床样品的异源性意味着在一些情况下, 突变发生率将会比测序法可检测的低, 因此 ARMS

试验更适合临床应用。缺点是,仅有某些 ARMS 特异突变可被检测。然而在该系列的 279 个样品中,在 PI3KCA 基因的外显子 9 或 20 中仅检测出一个 ARMS 试验没有设计检测的突变。

[0100] 总的说,实施例显示了本发明提供了一种用于检测 PI3KCA 基因中 4 个最常见突变的灵敏的高通量的检测法。该检测法可用于少量 DNA,并可检测样品中低水平的突变 PIK3CA。

[0001]

序列表

<110> 凯杰曼彻斯特有限公司 (QIAGEN MANCHESTER LIMITED)

<120> 多核苷酸引物

<130> 101350F3 1PWCN

<150> GB0719034.1

<151> 2007-09-28

<160> 39

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 180

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> E542K靶区域

<400> 1

aacagagaat ctccatttta gcaattacct gtgactccat agaaaatctt tctcctgctc	60
agtgaattta gagagaggat ctcggtgtaga aattgctttg agctgttctt tgteattttc	120
cttaattca ttgtctctag ctagtctgtt actctgtaaa ataaaataat atcttatata	180

<210> 2

<211> 180

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> E545K靶区域

<400> 2

aacagagaat ctccatttta gcaattacct gtgactccat agaaaatctt tctcctgcty	60
agtgaattca gagagaggat ctcggtgtaga aattgctttg agctgttctt tgteattttc	120
cttaattca ttgtctctag ctagtctgtt actctgtaaa ataaaataat atcttatata	180

<210> 3

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> E542K-0正向引物

<400> 3

cttctcctg ctcaagtatt tt	22
-------------------------	----

<210> 4

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> E542K-1正向引物

<400> 4

[0002]

ctttctcctg ctcagtgatt at	22
<210> 5	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> E542K-2正向引物	
<400> 5	
ctttctcctg ctcagtgatt ct	22
<210> 6	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> E542K-3正向引物	
<400> 6	
ctttctcctg ctcagtgatt gt	22
<210> 7	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> E542K-4正向引物	
<400> 7	
ctttctcctg ctcagtgate tt	22
<210> 8	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> E542K-5正向引物	
<400> 8	
ctttctcctg ctcagtgatc tt	22
<210> 9	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> E542K-6正向引物	
<400> 9	
ctttctcctg ctcagtgatg tt	22
<210> 10	
<211> 27	

[0003]

<212>	DNA	
<213>	人工	
<220>		
<223>	E545K-0正向引物	
<400>	10	
	actccataga aaatctttct cctgctt	27
<210>	11	
<211>	27	
<212>	DNA	
<213>	人工	
<220>		
<223>	E545K-1正向引物	
<400>	11	
	actccataga aaatctttct cctgcat	27
<210>	12	
<211>	27	
<212>	DNA	
<213>	人工	
<220>		
<223>	E545K-2正向引物	
<400>	12	
	actccataga aaatctttct cctgcct	27
<210>	13	
<211>	27	
<212>	DNA	
<213>	人工	
<220>		
<223>	E545K-3正向引物	
<400>	13	
	actccataga aaatctttct cctgcgt	27
<210>	14	
<211>	27	
<212>	DNA	
<213>	人工	
<220>		
<223>	E454K-4正向引物	
<400>	14	
	actccataga aaatctttct cctgatt	27
<210>	15	
<211>	27	
<212>	DNA	
<213>	人工	
<220>		
<223>	E545K-5正向引物	
<400>	15	

[0004]

actccataga aaatctttct cctggtt	27
<210> 16	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> E545K-6正向引物	
<400> 16	
actccataga aaatctttct cctgttt	27
<210> 17	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> 外显子9 Scorpion	
<400> 17	
egcgctcgtg tagaaattgc ttgagcgcg	30
<210> 18	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> 外显子9 Scorpion 2	
<400> 18	
caatgaatta agggaaaatg aca	23
<210> 19	
<211> 300	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> H1047R和H1047L靶区域	
<400> 19	
agtgcagtgt ggaatccaga gtgagetttc atttctcag ttatcttttc agttcaatgc	60
atgctgttta attgtgtgga agatccaatc catttttgtt gtccagccac catgahgtgc	120
atcattcatt tgtttcatga aatactccaa agcctcttgc tcagttttat ctaaggetag	180
ggtctttcga atgiatgcaa tgtcatcaaa agattgtagt tctggcattc cagagccaag	240
catcattgag aaaagattta tgaagagatt ggcattgctgt cgaatagcta gataagcctt	300
<210> 20	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> H1047R-0正向引物	
<400> 20	
tgttgtccag ccaccatgac	20
<210> 21	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工	

[0005]

<220>	
<223> H1047R-1正向引物	
<400> 21	
tggtgtccag ccaccatgcc	20
<210> 22	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> H1047R-2正向引物	
<400> 22	
tggtgtccag ccaccatggc	20
<210> 23	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> H1047R-3正向引物	
<400> 23	
tggtgtccag ccaccatgtc	20
<210> 24	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> H1047R-4正向引物	
<400> 24	
tggtgtccag ccaccataac	20
<210> 25	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> H1047R-5正向引物	
<400> 25	
tggtgtccag ccaccatcac	20
<210> 26	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> H1047R-6正向引物	
<400> 26	
tggtgtccag ccaccattac	20

[0006]

<210>	27	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工	
<220>		
<223>	H1047L-0正向引物	
<400>	27	
	tgttgtccag ccaccatgaa	20
<210>	28	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工	
<220>		
<223>	H1047L-1正向引物	
<400>	28	
	tgttgtccag ccaccatgca	20
<210>	29	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工	
<220>		
<223>	H1047L-3正向引物	
<400>	29	
	tgttgtccag ccaccatgga	20
<210>	30	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工	
<220>		
<223>	H1047-3正向引物	
<400>	30	
	tgttgtccag ccaccatgta	20
<210>	31	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工	
<220>		
<223>	H1047L-4正向引物	
<400>	31	
	tgttgtccag ccaccataaa	20
<210>	32	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工	
<220>		
<223>	H1047L-5正向引物	

[0007]

<400> 32	
tggtgtccag ccaccatcaa	20
<210> 33	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> H1047L-6正向引物	
<400> 33	
tggtgtccag ccaccattaa	20
<210> 34	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> 外显子20 Scorpion	
<400> 34	
cgcggcatga aatactccaa agccgcg	27
<210> 35	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> 外显子20 Scorpion 2	
<400> 35	
ccctagcett agataaaaact gagcaa	26
<210> 36	
<211> 125	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> 对照靶区域	
<400> 36	
aggcttgaag agtgtcgaat tatgtcctct gcaaaaaggc cactgtggtt gaattgggag	60
aaccagaca teatgtcaga gttactgttt cagaacaatg agatcatcct taaaaatggg	120
gatgg	
125	
<210> 37	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> 对照引物	
<400> 37	
agatgatctc attgtttctga aacag	25

[0008]

<210> 38
<211> 26
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> 对照Scorpion

<400> 38
ccggccaatt caaccacagt ggccgg

26

<210> 39
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> 对照Scorpion 2

<400> 39
ggcctgaaga gtgtcgaatt a

21

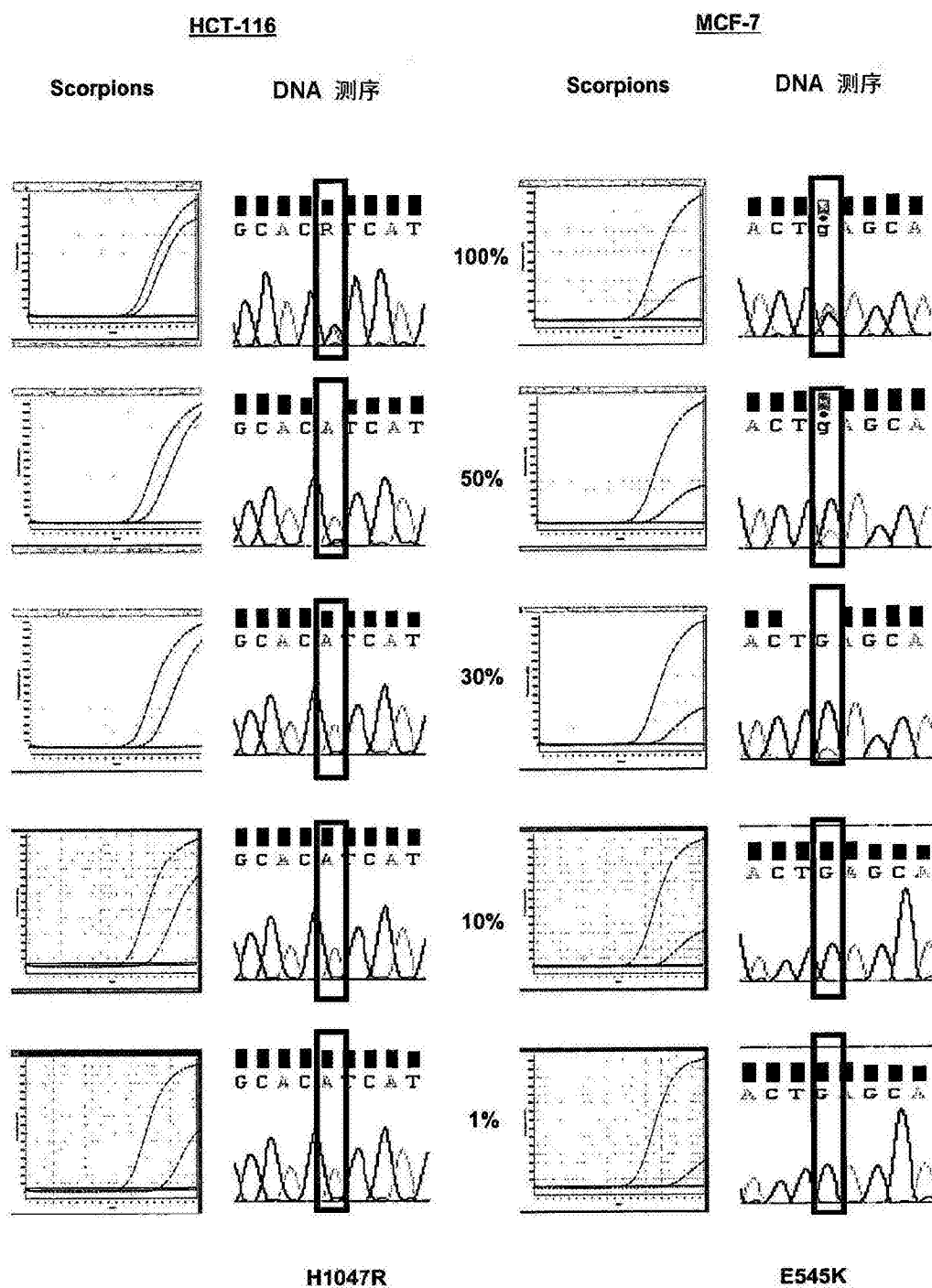


图 1