



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 119095987 A

(43) 申请公布日 2024. 12. 06

(21) 申请号 202380036464.5

(22) 申请日 2023.04.07

(30) 优先权数据

10-2022-0051454 2022.04.26 KR

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.10.25

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/KR2023/004709 2023.04.07

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/211003 K0 2023.11.02

(71) 申请人 乐彼代株式会社

地址 韩国

(72) 发明人 金永竣 金始初 河静实

(74) 专利代理机构 北京品源专利代理有限公司  
11332

专利代理师 刘明海 胡彬

(51) Int.Cl.

C12Q 1/6886 (2006.01)

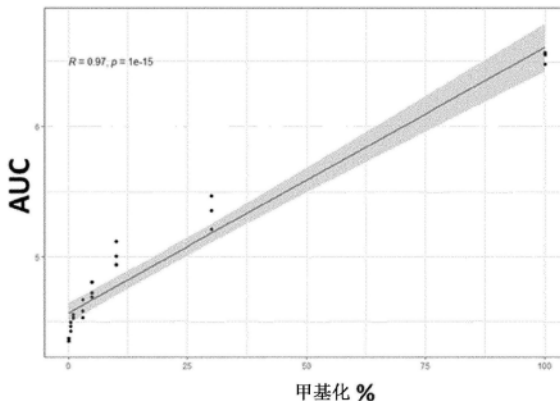
权利要求书3页 说明书16页  
序列表(电子公布) 附图12页

(54) 发明名称

用于测定核酸是否甲基化的组合物和用于测定核酸是否甲基化的方法

(57) 摘要

本申请涉及用于测定核酸是否甲基化的组合物和用于测定核酸是否甲基化的方法。



1. 一种用于测定待测核酸是否甲基化的组合物，包含用于扩增待测核酸的靶位点的引物组，其中所述引物组包含
  - (1) 甲基化正向引物、非甲基化正向引物和通用反向引物；或者
  - (2) 通用正向引物、甲基化反向引物和非甲基化反向引物，其中所述甲基化正向引物和所述甲基化反向引物包含CpG识别位点，所述CpG识别位点识别待测核酸的CpG序列，其中所述非甲基化正向引物和所述非甲基化反向引物包含TpG识别位点，所述TpG识别位点识别待测核酸的TpG序列，并且其中所述TpG序列是由待测核酸的CpG序列转化的。
2. 根据权利要求1所述的组合物，其中所述TpG序列被试剂转化，所述试剂将待测甲基化核酸和待测非甲基化核酸修饰成彼此不同。
3. 根据权利要求2所述的组合物，其中所述试剂将非甲基化的胞嘧啶残基转化为胸腺嘧啶。
4. 根据权利要求2所述的组合物，其中所述试剂是选自由亚硫酸、亚硫酸氢盐、氢亚硫酸盐和焦亚硫酸盐组成的组中的至少一种。
5. 根据权利要求1所述的组合物，其中所述CpG识别位点或TpG识别位点位于所述甲基化正向引物、甲基化反向引物、非甲基化正向引物或非甲基化反向引物的3'端40个碱基内。
6. 根据权利要求1所述的组合物，其中所述靶位点包含CpG序列。
7. 根据权利要求1所述的组合物，其中所述靶位点的大小为50至150bp。
8. 根据权利要求1所述的组合物，其中所述引物的大小包含15至40个碱基。
9. 根据权利要求1所述的组合物，其中普通反向引物或普通正向引物包含5个或更少的待测核酸的CpG或TpG识别位点。
10. 根据权利要求1所述的组合物，其中(1)的所述甲基化正向引物和非甲基化正向引物的T<sub>m</sub>差；或者(2)的所述甲基化反向引物和非甲基化反向引物的T<sub>m</sub>差为15°C或更低。
11. 根据权利要求1所述的组合物，其中所包含的
  - (1)的所述甲基化正向引物和非甲基化正向引物；或者
  - (2)的所述甲基化反向引物和非甲基化反向引物的浓度比为100:1至1:100。
12. 根据权利要求1所述的组合物，其中所述待测核酸包含在生物样品中。
13. 根据权利要求12所述的组合物，其中所述生物样品包含选自由血液、血清、组织、细胞、粪便和尿液组成的组中的至少一种。
14. 根据权利要求12所述的组合物，其中所述生物样品包含待测甲基化核酸和待测非甲基化核酸。
15. 根据权利要求14所述的组合物，其中所述待测甲基化核酸的浓度是所述待测非甲基化核酸浓度的75%或更低。
16. 根据权利要求1所述的组合物，其中所述待测核酸包括用于诊断癌症的生物标志物。
17. 根据权利要求16所述的组合物，其中所述癌症可以包括选自由肝癌、大肠癌、食道癌、胃癌、直肠癌、结直肠癌、口腔癌、咽癌、喉癌、肺癌、非小细胞肺癌、结肠癌、乳腺癌、宫颈

癌、子宫内膜癌、卵巢癌、前列腺癌、睾丸癌、膀胱癌、肾癌、肝癌、胰腺癌、胆道癌、骨癌、结缔组织癌、皮肤癌、黑色素瘤、脑癌、头颈癌、甲状腺癌、白血病、霍奇金病、淋巴瘤、泌尿道癌和多发性骨髓瘤血癌组成的组中的至少一种。

18. 根据权利要求1所述的组合物,其中所述靶位点是位于CpG岛中的生物标志物。

19. 一种测定待测核酸是否甲基化的方法,包括

将待测甲基化核酸和待测非甲基化核酸修饰成彼此不同的步骤,其中待测核酸包含在生物样品中;并且

通过用权利要求1至18中任一项所述的组合物处理生物样品来扩增靶位点的步骤。

20. 根据权利要求19所述的方法,其中所述修饰通过用试剂处理生物样品来进行,所述试剂将待测甲基化核酸和待测非甲基化核酸修饰成彼此不同。

21. 根据权利要求19所述的方法,其中所述生物样品是选自由血液、血清、组织、细胞、粪便和尿液组成的组中的至少一种。

22. 根据权利要求19所述的方法,进一步包括对待测核酸的甲基化水平的进行定量的步骤。

23. 根据权利要求22所述的方法,其中定量的步骤是通过比较所述生物样品、待测核酸100%甲基化的样品和待测核酸100%非甲基化的样品的标准化溶解曲线的AUC(曲线下面积)来对所述生物样品的甲基化水平进行定量。

24. 根据权利要求19所述的方法,进一步包括

获得所述生物样品的溶解曲线的步骤;

获得鉴定了待测核酸的甲基化比率的生物样品的标准化溶解曲线的步骤;并且

通过比较所述生物样品的溶解曲线和所述标准化溶解曲线来对所述生物样品的甲基化水平进行定量的步骤。

25. 根据权利要求19所述的方法,其中所述靶位点包括位于CpG岛中的生物标志物。

26. 一种用于提供用于诊断癌症的信息的方法,包括

将生物样品中包含的待测核酸中的待测甲基化核酸和待测非甲基化核酸修饰成彼此不同的步骤;

通过用根据权利要求1至18中任一项所述的组合物处理所述生物样品进行扩增的步骤;和

测定待测核酸是否甲基化的步骤,

其中所述待测核酸包括用于诊断癌症的生物标志物。

27. 根据权利要求26所述的方法,其中用于诊断癌症的生物标志物核酸在癌症患者中是甲基化的或非甲基化的。

28. 根据权利要求26所述的方法,进一步包括将待测核酸的甲基化水平与对照组的甲基化水平进行比较的步骤。

29. 根据权利要求26所述的方法,其中所述癌症包括选自由以下组成的组中的一种或多种:

肝癌、大肠癌、食道癌、胃癌、直肠癌、口腔癌、咽癌、喉癌、肺癌、结肠癌、乳腺癌、宫颈癌、子宫内膜癌、卵巢癌、前列腺癌、睾丸癌、膀胱癌、肾癌、肝癌、胰腺癌、骨癌、结缔组织癌、皮肤癌、脑癌、头颈癌、甲状腺癌、白血病、霍奇金病、淋巴瘤和多发性骨髓瘤血癌。

30. 根据权利要求26所述的方法,其中所述用于诊断癌症的生物标志物位于CpG岛中。
31. 一种用于确定待测核酸是否甲基化的试剂盒,其包含根据权利要求1至18中任一项所述的组合物。
32. 一种用于诊断癌症的组合物,其包含根据权利要求1至18中任一项所述的组合物,其中所述待测核酸包含癌症生物标志物。
33. 一种用于诊断癌症的试剂盒,其包含根据权利要求30所述的组合物。

## 用于测定核酸是否甲基化的组合物和用于测定核酸是否甲基化的方法

### 技术领域

[0001] 本申请涉及用于测定核酸是否甲基化的组合物和用于测定核酸是否甲基化的方法。

### 背景技术

[0002] 作为测量DNA样品甲基化水平的方法,有qMSP、MethyLight和MS-HRM等,并且所有的方法都被构建用于相对确定每个样品的甲基化水平。例如,qMSP法通过对相同量的DNA样品使用仅与甲基化(或非甲基化)模板结合的引物,并测量在样品中相应条件下扩增DNA产生的DNA量的PCR Cq值来测定甲基化水平。MethyLight法通过向qMSP中加入探针,在扩增的DNA中使扩增的DNA中与待测标志物特异性结合的DNA与所述探针结合,从而提高了测量的特异性。此外,MS-HRM法使用不论DNA样品的甲基化状态如何都能与模板结合的引物,并且根据通过在除了扩增产物的引物结合区域之外的区域中包含一定数量的CpG造成的温度升高来确认扩增产物的熔点差异的信号。

[0003] qMSP和MethyLight分析在引物设计上几乎没有限制,并且具有实验设计简单的优点,并且可以实现相对高的灵敏度。然而,需要额外的对照标志物分析来校正用于分析的样品量,并且使用结果来校正测量值,定量分析是间接的和限制性的,并且类型II错误的频率高。此外,特定模板的偏向性扩增具有降低特异性的缺点,因为它可能增加每个DNA样品的非特异性扩增的频率。在开发MethyLight作为弥补特异性的方法的情况下,还需要能够特异性结合扩增产物的荧光探针,这造成增加成本和增加分析测试设计难度的缺点。此外,在许多情况下,探针的特异性结合具有局限性,即很难分析非常少量的样品,因为这降低了PCR的扩增效率。

[0004] 在MS-HRM分析的情况下,由于甲基化和非甲基化核酸在同一试管中同时扩增,DNA样品的甲基化水平可以比MSP更直观地定量测量,而无需额外的对照标志物分析。然而,由于引物中不应包含CpG或引物设计中应包含非特异性碱基的设计限制,开发特异性分析方法并不容易。此外,在引物中不包含CpG的情况下,存在与甲基化链相比偏向结合非甲基化链的问题,并且由于样品验证结果的非甲基化偏向,可能发生类型I错误,并且在需要灵敏的甲基化异常测量的实验(如癌症诊断)中,存在实际样品中的甲基化比率测量值低或得到不准确结果的问题。

### 发明内容

[0005] **【技术问题】**

[0006] 本申请的一个实施方案是建立一种确定甲基化状态的方法,该方法弥补了常规实验验证方法的不足。根据本申请的实施方案的用于测定甲基化状态的方法可以测量相对甲基化比率,而无需在同一试管中分析对照标志物,无需使用干扰扩增效率的探针,并且具有高检测灵敏度。此外,为了测量生物样品如血液等中非常低比率的甲基化水平,可以调节甲

基化和非甲基化DNA的扩增效率。

[0007] 根据本申请一个实施方案的组合物和方法一起使用甲基化引物和非甲基化引物,因此这样不会产生非特异性扩增产物,并且即使在所需目标核酸以痕量存在的条件下也可以比常规的基于PCR的分析方法更灵敏地测量样品的甲基化水平。

[0008] 本申请的一个实施方案是提供用于测定待测核酸是否甲基化的组合物,和通过弥补常规DNA样品甲基化水平测量方法的不足,提供高灵敏度的测定待测核酸是否甲基化的方法。

[0009] 本申请的另一个实施方案是提供一种引物的设计策略和优化方法,其可以通用于各种DNA甲基化标志物。

[0010] 本申请的其他实施方案是提供一种用于诊断癌症的方法、一种用于提供用于诊断癌症的信息的方法、一种用于诊断癌症的组合物或一种用于诊断癌症的试剂盒,其测定生物样品(如血液)中存在的cfDNA(无细胞DNA)中的癌症患者中少量存在的ctDNA(循环肿瘤DNA)的DNA甲基化水平,所述测定在所述样品中通过半定量方法来进行,并基于此实现高灵敏度和特异性。

[0011] **【技术方案】**

[0012] 本申请的一个实施方案涉及用于测定待测核酸是否甲基化的组合物,其包含用于扩增待测核酸的靶位点的引物组。

[0013] 本申请的另一个实施方案涉及一种用于测定待测核酸是否甲基化的方法,该方法包括:在包含待测核酸的生物样品中,将甲基化的待测核酸和非甲基化的待测核酸修饰成彼此不同的步骤;和通过用所述组合物处理生物样品来扩增靶位点的步骤。

[0014] 在下文中,将更详细地描述本申请。

[0015] 本申请的一个实施方案涉及用于测量待测核酸的甲基化水平的新方法,所述方法弥补了用于测量待测核酸的甲基化水平的常规实验验证方法的不足。具体地,当设计MS-HRM引物时,使用包含CpG识别位点的甲基化引物,所述CpG识别位点识别引物中的CpG序列,并且为了防止仅扩增甲基化模板,同时使用用于扩增非甲基化模板的包含TpG识别位点的非甲基化引物,所述TpG识别位点识别TpG序列。然后,为了防止MS-HRM的相对低的灵敏度和包含TpG的引物的偏向性扩增,构建了通过调节PCR的引物退火步骤的温度来增加包含CpG的引物的结合机会和减少包含TpG的引物的结合机会的方法。

[0016] 在本说明书中,术语“甲基化”是指甲基连接到组成DNA的碱基上。例如,甲基化可能发生在特定基因或核酸的特定CpG位点的胞嘧啶中。

[0017] 在本说明书中,术语“是否甲基化”或“甲基化状态”是指在特定基因或核酸的特定CpG位点的胞嘧啶中是否甲基化。具体地说,它是指碱基序列中至少一个CpG二核苷酸的5-甲基胞嘧啶的存在或不存在。

[0018] 在本说明书中,术语“甲基化水平”或“甲基化程度”是指待测核酸的碱基序列中存在的甲基化的量。

[0019] 在本说明书中,术语“CpG位点”或“CpG序列”是指存在于特定基因或核酸的碱基序列中的CpG位点。基因是全部一系列组成单元的概念,所述组成单元是表达所必需的,并且彼此可操作地相互连接,并且可以包括启动子区、蛋白质编码区(开放阅读框,ORF)和终止子区。因此,CpG位点可以存在于相应基因的启动子区、蛋白质编码区(开放阅读框,ORF)或

终止子区等。例如,它可以是存在于基因启动子区的CpG位点。

[0020] 在本说明书中,术语“核酸”是聚合物形式的核苷酸,代表核糖核苷酸或脱氧核糖核苷酸,并且包括多核苷酸、寡核苷酸、寡聚物、寡聚体(oligos)、编码序列等含义。核酸的含义可以包括单链、双链或多链DNA或RNA、基因组DNA、cDNA、DNA-RNA杂合体,或嘌呤和嘧啶碱基,或具有其他天然、化学或生物化学修饰的、非天然或衍生的核苷酸碱基的聚合物。

[0021] 在本说明书中,当描述“包括”一种成分时,并不意味着排除其他成分,而是可以进一步包括其他成分,除非另外特别提到。

[0022] 在本说明书中,除非另有说明,核酸分别以5'至3'的方向从左至右书写。

[0023] 在本说明书中,单数包括复数对象,除非上下文另有明确说明。

[0024] 本申请的一个实施方案涉及用于测定待测核酸是否甲基化的组合物,其包含用于扩增待测核酸的靶位点的引物组,或包含该组合物的用于确定待测核酸是否甲基化的试剂盒。引物组可以包括正向引物和反向引物,并且正向引物和反向引物中的一个可以包括甲基化引物和非甲基化引物,并且另一个可以是通用引物。甲基化引物可以包含识别待测核酸的CpG序列的CpG识别位点,非甲基化引物可以包含识别待测核酸的TpG序列的TpG识别位点,并且TpG序列可以由待测核酸的CpG序列转换而来。通用引物是指无论待测核酸是否甲基化,都能特异性识别并结合待测核酸的引物。

[0025] 本申请的另一个实施方案涉及一种用于测定待测核酸是否甲基化的方法,该方法包括:将甲基化的待测核酸和非甲基化的待测核酸修饰成彼此不同的步骤,其中所述待测核酸包含于生物样品中;和通过用所述组合物处理生物样品来扩增靶位点的步骤。修饰步骤可以通过用试剂处理生物样品来进行,所述试剂将待测甲基化核酸和待测非甲基化核酸修饰成彼此不同。

[0026] 靶位点是测定待测核酸是否甲基化的感兴趣的位点,并且可以包含至少一个CpG序列。所述靶位点的大小可以是50至150bp、50至140bp、50至130bp、50至120bp、50至110bp、50至100bp、60至150bp、60至140bp、60至130bp、60至120bp、60至110bp或60至100bp。

[0027] 例如,所述靶位点可以包括生物标志物。具体地,所述生物标志物可以是甲基化生物标志物。所述甲基化生物标志物是指根据生物标志物是否被甲基化而显示出与特定疾病相关的生物标志物。更具体地,所述甲基化生物标志物是指依据在生物标志物的碱基序列中CG的C(胞嘧啶)上添加甲基(CH<sub>3</sub>)时发生的表观遗传变化从而显示与特定疾病相关的生物标志物。

[0028] 在本申请的一个实施方案中,所述靶位点可以包括存在于CpG岛中的生物标志物。根据本申请实施方案的引物组包括(1)甲基化正向引物、非甲基化正向引物和通用反向引物;或者(2)通用正向引物、甲基化反向引物和非甲基化反向引物,并且即使当难以制备通用引物时,例如当序列复杂性通过亚硫酸处理而降低时,或者当生物标志物存在于其中相邻位点一起发生变化的CpG岛中时,也可以准确地测定靶位点是否甲基化。具体地,在常规HRM分析方法中,当通过亚硫酸处理降低gDNA的序列复杂性并且非特异性反应频繁发生时,或者特别地,在CpG岛的情况下,当难以制备不含CpG的MIP(甲基化非依赖性引物;通用引物)时,分析会变得困难,但是本申请能够通过在一个方向的引物中同时使用甲基化引物和非甲基化引物来确保引物设计的自由度,并能够在诱导靶标的特异性结合的同时准确地测定靶位点是否被甲基化。

[0029] 所述甲基化引物,具体地,所述甲基化正向引物或甲基化反向引物,包含识别待测核酸的CpG序列的CpG识别位点,而所述非甲基化引物,具体地,所述非甲基化正向引物或非甲基化反向引物,包含识别待测核酸的TpG序列的TpG识别位点,在所述TpG序列中CpG序列被转换。所述TpG序列是用将待测甲基化核酸和待测非甲基化核酸修饰成彼此不同的试剂转化的CpG序列。例如,所述修饰剂可以将非甲基化的胞嘧啶残基转化为胸腺嘧啶。作为一个实例,所述修饰剂可以是选自由亚硫酸、亚硫酸氢盐(bisulfite)、氢亚硫酸盐(hydrogen sulfite)和焦亚硫酸盐组成的组中的至少一种。

[0030] 当用将待测甲基化核酸和待测非甲基化核酸修饰成彼此不同的试剂处理模板时,如果模板的CpG胞嘧啶被甲基化,则CpG胞嘧啶不会转化为胸腺嘧啶,如果CpG胞嘧啶未被甲基化,则CpG胞嘧啶会转化为胸腺嘧啶。

[0031] 所述甲基化引物的CpG识别位点可以识别待测甲基化核酸的CpG序列。例如,所述CpG识别位点可以包括CG序列。

[0032] 所述非甲基化引物的TpG识别位点可以识别TpG序列,所述TpG序列是由将待测甲基化核酸和待测非甲基化核酸修饰成彼此不同的试剂转化的待测非甲基化核酸的CpG序列。例如,所述TpG识别位点可以包含TG序列。

[0033] 所述CpG识别位点和TpG识别位点分别位于甲基化引物和非甲基化引物的3'末端附近,并且可以分别特异性地识别由将待测甲基化核酸和待测非甲基化核酸修饰成彼此不同的试剂转化的待测甲基化核酸和待测非甲基化核酸。例如,所述CpG识别位点和TpG识别位点可以位于甲基化引物和非甲基化引物的3'端的40、35、30、25、20、10、9、8、7、6、5、4、3或2个碱基内,或者位于其3'端。

[0034] 与甲基化引物相比,非甲基化引物具有较低的T<sub>m</sub>值,因此为了弥补这一点,通过非甲基化引物的5'末端添加核苷酸,可以类似地设计甲基化引物和非甲基化引物的T<sub>m</sub>。例如,通过在5'末端进一步包含核苷酸,所述非甲基化引物可以比甲基化引物具有更多的核苷酸。例如,与甲基化引物相比,所述非甲基化引物可以在5'末端进一步包含1至5、1至4、1至3、1至2或1个核苷酸。例如,甲基化引物和非甲基化引物之间的T<sub>m</sub>差异可以是15°C或更低、14°C或更低、13°C或更低、12°C或更低、11°C或更低、10°C或更低、9°C或更低、8°C或更低、7°C或更低、6°C或更低、5°C或更低、4°C或更低、3°C或更低、2°C或更低或1.5°C或更低。

[0035] 引物组包括正向引物和反向引物,当甲基化引物和非甲基化引物是正向引物时,反方向的引物是反向引物,当甲基化引物和非甲基化引物是反向引物时,反方向的引物是正向引物。所述反方向的引物是能够结合待测甲基化核酸和待测非甲基化核酸两者的通用引物。因此,所述反方向的引物(通用引物)可以不包含CpG结合位点,但是当由于待测核酸的结构而不可避免地在反方向的引物中包含CpG结合位点时,5'末端区域可以包含5个或更少、4个或更少、3个或更少、2个或更少、1至5个、1至4个、1至3个、1至2个,或者作为一个例子,1个CpG结合位点。然而,此时优选将反方向的引物设计成具有与甲基化引物和非甲基化引物相似的T<sub>m</sub>。

[0036] 所述甲基化引物、非甲基化引物和反方向的引物的大小可以包括15至40、15至35、15至30、15至25、18至40、18至35、18至30、18至25、20至40、20至35、20至30或20至25个碱基。

[0037] 所述甲基化引物、非甲基化引物和反方向的引物可以与待测核酸结合,所述待测核酸被将待测甲基化核酸和待测非甲基化核酸修饰成彼此不同的试剂转化,通过包含1个

或多个、2个或多个、或3个或多个非CpG胞嘧啶。

[0038] 所述甲基化引物、非甲基化引物和反方向的引物的 $T_m$ 可以是50至80°C、50至75°C、50至70°C、50至65°C、55至80°C、55至75°C、55至70°C、55至65°C、60至80°C、60至75°C、60至70°C或60至65°C。

[0039] 根据本申请的实施方案所述的组合物可以包含浓度比为100:1至1:100、100:1至1:50、100:1至1:20、100:1至1:10、100:1至1:5、100:1至1:1、100:1至小于1:1、100:1至1.3:1、100:1至1.5:1、100:1至2:1、100:1至2.5:1、100:1至3:1、100:1至3.5:1、100:1至4:1、50:1至1:100、50:1至1:50、50:1至1:20、50:1至1:10、50:1至1:5、50:1至1:1、50:1至小于1:1、50:1至1.3:1、50:1至1.5:1、50:1至2:1、50:1至2.5:1、50:1至3:1、50:1至3.5:1、50:1至4:1、10:1至1:100、10:1至1:50、10:1至1:20、10:1至1:10、10:1至1:5、10:1至1:1、10:1至小于1:1、10:1至1.3:1、10:1至1.5:1、10:1至2:1、10:1至2.5:1、10:1至3:1、10:1至3.5:1、10:1至4:1、5:1至1:100、5:1至1:50、5:1至1:20、5:1至1:10、5:1至1:5、5:1至1:1、5:1至小于1:1、5:1至1.3:1、5:1至1.5:1、5:1至2:1、5:1至2.5:1、5:1至3:1、5:1至3.5:1、5:1至4:1、4.5:1至1:100、4.5:1至1:50、4.5:1至1:20、4.5:1至1:10、4.5:1至1:5、4.5:1至1:1、4.5:1至小于1:1、4.5:1至1.3:1、4.5:1至1.5:1、4.5:1至2:1、4.5:1至2.5:1、4.5:1至3:1、4.5:1至3.5:1、或4.5:1至4:1的所述甲基化引物和非甲基化引物。

[0040] 例如,所述非甲基化引物的浓度可以是甲基化引物浓度的100%或更低,小于100%、99.99%或更低,99.95%或更低,99.9%或更低,99%或更低,98%或更低,97%或更低,96%或更低,95%或更低,90%或更低,85%或更低,80%或更低,75%或更低,70%或更低,65%或更低,60%或更低,55%或更低,50%或更低,40%或更低,30%或更低或者25%或更低。并且作为一个实例,它可以是50%或更低。

[0041] 根据本申请的实施方案所述的组合物和方法可以准确地测定待测核酸是否甲基化,而不使用检测扩增产物的荧光探针。因此,根据本申请实施方案所述的组合物可以不包含荧光探针。此外,根据本申请实施方案所述的方法可以不使用荧光探针。

[0042] 通过根据本申请实施方案所述的组合物和方法测定甲基化的待测核酸可以包含在生物样品中。所述生物样品可以包含选自由血液、血清、组织、细胞、粪便和尿液组成的组中的至少一种。

[0043] 根据本申请实施方案所述的组合物和方法可以高灵敏度地确定待测核酸是否被甲基化,即使当生物样品中待测甲基化核酸的浓度非常低时。

[0044] 例如,所述生物样品中待测定的甲基化核酸的浓度可以是100ng/ $\mu$ l或更少、90ng/ $\mu$ l或更少、80ng/ $\mu$ l或更少、70ng/ $\mu$ l或更少、60ng/ $\mu$ l或更少、50ng/ $\mu$ l或更少、40ng/ $\mu$ l或更少、30ng/ $\mu$ l或更少、20ng/ $\mu$ l或更少、15ng/ $\mu$ l或更少、10ng/ $\mu$ l或更少、9ng/ $\mu$ l或更少、8ng/ $\mu$ l或更少、7ng/ $\mu$ l或更少、6ng/ $\mu$ l或更少、5ng/ $\mu$ l或更少、4ng/ $\mu$ l或更少、3ng/ $\mu$ l或更少、2ng/ $\mu$ l或更少、1.5ng/ $\mu$ l或更少、1ng/ $\mu$ l或更少、0.5ng/ $\mu$ l或更少、0.4ng/ $\mu$ l或更少、0.3ng/ $\mu$ l或更少、0.2ng/ $\mu$ l或更少、0.1ng/ $\mu$ l或更少、0.05ng/ $\mu$ l或更少、0.04ng/ $\mu$ l或更少、0.03ng/ $\mu$ l或更少、0.02ng/ $\mu$ l或更少、0.01ng/ $\mu$ l或更少、0.009ng/ $\mu$ l或更少、0.008ng/ $\mu$ l或更少、0.007ng/ $\mu$ l或更少、0.006ng/ $\mu$ l或更少、或0.005ng/ $\mu$ l或更少。

[0045] 例如,所述生物样品包含待测甲基化核酸和待测非甲基化核酸,并且待测甲基化核酸的浓度可以是待测非甲基化核酸的浓度的75%或更少、70%或更少、60%或更少、50%

或更少、40%或更少、30%或更少、25%或更少、20%或更少、小于19%、18%或更少、15%或更少、10%或更少、5%或更少、4.5%或更少、4%或更少、3.5%或更低、3%或更少、2.5%或更少、2%或更少、1.5%或更少、1.4%或更少、1.3%或更少、1.2%或更少或者1.1%或更少。

[0046] 例如,所述生物样品包含待测甲基化核酸和待测非甲基化核酸,并且基于100%的待测甲基化核酸和待测非甲基化核酸的总链,其可以包含100%或更少、少于100%、99%或更少、95%或更少、90%或更少、85%或更少、80%或更少、75%或更少、70%或更少、65%或更少、60%或更少、55%或更少、50%或更少、45%或更少、40%或更少、35%或更少、30%或更少、25%或更少、20%或更少、15%或更少、10%或更少、少于10%、5%或更少、少于5%、4.5%或更少、4%或更少、3.5%或更少、3%或更少、2.5%或更少、2%或更少、1.5%或更少、1.4%或更少、1.3%或更少、1.2%或更少、1.1%或更少、或1%或更少的待测甲基化核酸。

[0047] 例如,生物样品可以包含20000条或更少、15000条或更少、10000条或更少、5000条或更少、4000条或更少、3000条或更少、2000条或更少、1000条或更少、500条或更少、400条或更少、300条或更少、200条或更少、150条或更少、100条或更少、90条或更少、80条或更少、70条或更少、60条或更少、50条或更少、40条或更少、30条或更少、20条或更少、10条或更少、9条或更少、8条或更少、7条或更少、6条或更少、5条或更少、4条或更少或者3条或更少的待测甲基化核酸。

[0048] 根据本申请的实施方案的用于确定待测核酸是否甲基化的方法可以进一步包括待测核酸的甲基化水平的定量步骤。定量步骤可以是通过比较生物样品、待测核酸100%甲基化的样品和待测核酸100%非甲基化的样品的溶解曲线的AUC(曲线下面积)来对生物样品的甲基化水平进行定量。

[0049] 具体地,所述定量步骤可以包括获得生物样品的溶解曲线的步骤;

[0050] 获得其中鉴定了待测核酸的甲基化比率的生物样品的标准化溶解曲线的步骤;以及通过比较生物样品的溶解曲线和标准化溶解曲线来定量生物样品的甲基化水平的步骤。所述生物样品的溶解曲线可以是标准化的溶解曲线。所述生物样品的溶解曲线可以通过HRM分析获得。待测核酸的甲基化比率可以在待测甲基化核酸和待测非甲基化核酸的含量比率获得。

[0051] 在本申请的其他实施方案中,所述待测核酸可以包括用于诊断癌症的生物标志物。具体地,所述待测核酸可以包括用于诊断癌症的生物标志物,例如,在癌症患者中特异性甲基化或非甲基化的标志物,并且待测核酸的靶位点可以是用于诊断癌症的生物标志物的位置。在这种情况下,其可用于诊断癌症,通过用根据本申请实施方案的组合物或方法来测定待测核酸是否被甲基化。

[0052] 因此,本申请的其他实施方案涉及用于诊断癌症的组合物或用于诊断癌症的试剂盒,其包含根据本申请的实施方案的用于测定待测核酸是否甲基化的组合物。

[0053] 此外,本申请的其他实施方案涉及用于诊断癌症的方法或用于提供用于诊断癌症的信息的方法,包括通过根据本申请的实施方案的用于测定待测核酸是否甲基化的方法来测定待测核酸是否甲基化的步骤。用于诊断癌症的方法或用于提供用于诊断癌症的信息的方法可以进一步包括将待测核酸的甲基化水平与对照组的甲基化水平进行比较的步骤。

[0054] 所述对照组是指从来源已知的生物样品中分离的核酸,并且可以使用来自无肝癌受试者(正常对照组)或肝癌受试者的所有样品。

[0055] 例如,在将源自无肝癌对象(正常对照组)的样品用作对照组的情况下,当待测核酸的甲基化水平高于从对照组分离的核酸的甲基化水平时,或者当生物样品中包含甲基化水平高于对照组的待测核酸时,其可以测定、诊断或者提供用于诊断的信息:即待测定核酸或生物样品所源自的生物体(例如,脊椎动物、哺乳动物、啮齿动物、山羊、鹿、猪、鸟、鸡、火鸡、牛、马、羊、鱼、灵长类动物,作为一个例子,人类)患有癌症。

[0056] 例如,在将源自患有肝癌的受试者的样品用作对照组的情况下,当待测核酸的甲基化水平与从对照组分离的核酸的甲基化水平相似,或者当生物样品中包含具有与对照组相似的甲基化水平的待测核酸时,其可以测定、诊断或者提供用于诊断的信息:即待测定核酸或生物样品所源自的生物体(例如,脊椎动物、哺乳动物、啮齿动物、山羊、鹿、猪、鸟、鸡、火鸡、牛、马、羊、鱼、灵长类动物,作为一个例子,人类)患有癌症。

[0057] 所述癌症可以包括选自由肝癌、大肠癌、食道癌、胃癌、直肠癌、结直肠癌、口腔癌、咽癌、喉癌、肺癌、非小细胞肺癌、结肠癌、乳腺癌、宫颈癌、子宫内膜癌、卵巢癌、前列腺癌、睾丸癌、膀胱癌、肾癌、肝癌、胰腺癌、胆道癌、骨癌、结缔组织癌、皮肤癌、黑色素瘤、脑癌、头颈癌、甲状腺癌、白血病、霍奇金病(Hodgkin disease)、淋巴瘤、泌尿道癌和多发性骨髓瘤血癌组成的组中的至少一种。

[0058] 所述肝癌可以是选自由肝细胞癌、肝细胞瘤、胆管癌、肝内胆管癌、肝母细胞瘤、肝肿瘤、肝血管肉瘤或转移性肝癌、模糊结节型HCC、乏血供型肝癌组成的组中的至少一种。

[0059] 本申请的其他实施方案涉及用于治疗癌症的方法,其包括通过根据本申请的实施方案的用于诊断癌症的组合物、用于诊断癌症的试剂盒、用于诊断癌症的方法或用于提供用于诊断癌症的信息的方法来治疗被确定患有癌症的受试者的步骤。所述治疗步骤可包括对受试者施用有效量的治疗剂、化学疗法、激素疗法、放射疗法、外科手术或其组合的步骤。

[0060] 所述治疗剂可以包括例如阿法替尼、AK105、安罗替尼、阿帕替尼、阿替利珠单抗、阿维鲁单抗、阿昔替尼、贝伐珠单抗、博舒替尼、BSC、卡博替尼、苹果酸卡博替尼(Cabozantinib-S-Malate)、卡瑞利珠单抗、卡奈替尼、卡铂、卡培他滨、塞来昔布、CC-122、CF102、克唑替尼、达沙替尼、多西他赛、多纳非尼、多韦替尼、多柔比星、度伐鲁单抗(Durvalumab)、EKB-569、恩曲替尼、表柔比星、厄洛替尼(erlotinib)、依托泊苷、依维莫司、FGF401、FOLF0X 4、福坦替尼(fostamatinib)、Galunisertib、吉非替尼、吉西他滨、IBI305、伊布替尼、伊马替尼、INC280、英菲格拉替尼(Infigratinib)、伊匹木单抗(Ipilimumab)、伊立替康、拉帕替尼、来氟米特、仑伐替尼、LY2875358、甲磺酸盐(Mesylate)、丝裂霉素C、MSC2156119J、来那替尼、尼洛替尼、尼达尼布(Nintedanib)、纳武利尤单抗(Nivolumab)、奥沙利铂、帕博西尼、帕比司他、帕唑帕尼、PDR001、帕博利珠单抗、佩米替尼、Pexavec、磷酸盐、雷莫芦单抗、瑞戈非尼、芦可替尼、司马沙尼、司美替尼、SGO-110、SHR-1210、信迪利单抗、索拉非尼、SU6656、舒尼替尼(sunitinib)、信迪利单抗、斯巴达珠单抗(spartalizumab)、舒尼替尼(sutent)、TACE、他喹莫德、替莫唑胺、替西罗莫司、替雷利珠单抗、Tivantinib、对甲苯磺酸盐(Tosylate)、特瑞普利单抗、西木单抗、凡德他尼、瓦他拉尼、XL888、Y90、其药学上可接受的盐或其组合。

[0061] **【有利效果】**

[0062] 本申请的实施方案可以通过弥补常规qMSP、MethyLight和MS-HRM分析方法的不足来构建新的实验验证方法的设计,并且可以通过液体活检来检测DNA甲基化标志物,并且具有比常规MS-HRM分析方法更高的灵敏度,并且可以定量甲基化水平。

[0063] 本申请的一个实施方案可以对含量极少的靶标(例如血液中存在的循环肿瘤DNA)以更灵敏的水平进行PCR,并且可以根据依赖于退火温度和引物的浓度比的用途通过调节甲基化引物和非甲基化引物与模板的结合程度来设计实验。

### 附图说明

[0064] 图1a至图1c是显示使用MIP(甲基化非依赖性引物)进行常规MS-HRM分析的实验结果的图。

[0065] 图2a至图2c是显示通过在引物的5'末端包含CpG以抑制在使用MIP的PCR扩增过程中发生的非甲基化偏向性扩增来尝试改进的结果的图。

[0066] 图3a和图3b是确认当使用用于MethyLight分析的荧光探针及类似物时干扰标志物扩增的现象的图。

[0067] 图4a至图4c是显示通过混合甲基化引物和非甲基化引物进行MS-HRM分析的结果的图。

[0068] 图5a是显示根据样品的甲基化比率的每个样品的溶解峰分布的图。

[0069] 图5b是显示根据样品的甲基化比率通过溶解曲线分析对每个样品进行HRM分析的结果的图。

[0070] 图6a是确认当甲基化引物和非甲基化引物在一个试管中混合使用时是否发生定量扩增的图。

[0071] 图6b是显示使用代表甲基化比率的mAUC(曲线下溶解曲线面积)确认甲基化比率测量准确性的结果的图。

[0072] 图6c是确认根据本申请的实施方案的用于确定甲基化状态的方法可以区分甲基化DNA浓度1%水平(3条甲基化DNA)和0%浓度,并且可以在其中非甲基化DNA以99%的浓度存在的样品中检测到1%的甲基化DNA的图。

[0073] 图7是确认根据甲基化引物和非甲基化引物的浓度比甲基化DNA的偏向性扩增是否发生的图。

[0074] 图8a和图8b是显示通过将根据本发明实例的用于测定甲基化状态的方法应用于实际血液来诊断癌症的初步临床结果的图。

### 具体实施方式

[0075] 在下文中,将通过以下实施例更详细地描述本申请。然而,这些实施例仅用于说明本发明,本申请的范围不受这些实施例的限制。

[0076] 对比例1. 常规MS-HRM分析方法的局限性

[0077] 作为待测核酸的实施例,具有SEQ ID NO:1序列的核酸被用于确认常规MS-HRM分析方法的局限性。SEQ ID NO:1的核酸序列是肝癌细胞中特异性甲基化的肝癌生物标志物。从肝癌细胞中分离的DNA可能包含SEQ ID NO:1的甲基化核酸,从其它细胞中分离的DNA可能包含SEQ ID NO:1的非甲基化核酸。包含SEQ ID NO:1的核酸的各种样品和对照样品如表

1所示制备,并用于实验。从Qiagen购买并使用样品编号2至4的样品,样品编号2是通过使用EpiTect亚硫酸氢盐试剂盒用亚硫酸处理样品编号3的gDNA将所有胞嘧啶转化为胸腺嘧啶,样品编号4是通过在使用SssI甲基化酶进行100%甲基化后,使用EpiTect亚硫酸氢盐试剂盒用亚硫酸转化处理样品编号3的gDNA将除CpG胞嘧啶之外的胞嘧啶转化为胸腺嘧啶。在PCR反应之前,用亚硫酸处理样品编号5至7的样品,并将非甲基化的胞嘧啶转化为胸腺嘧啶。

[0078] 【表1】

样品编号	样品名称	样品描述	甲基化与否
1	NTC	非模板对照	-
[0079] 2	EpiTect Unmet.	100%非甲基化样品	X
3	EpiTect gDNA	未经亚硫酸处理的样品	-
4	EpiTect Met.	100%甲基化样品	O
5	HEK293T	源自肾细胞的样品	X
[0080] 6	Huh-1	源自肝癌细胞的样品	O
7	BS PBMC (NC114)	源自血细胞的样品	X

[0081] 常规的MS-HRM分析使用不包含CpG和TpG识别位点的甲基化非依赖性引物(MIP),以便非选择性扩增甲基化核酸和用亚硫酸处理的非甲基化核酸。所用甲基化非依赖性引物的序列如下:

[0082] -正向:gTtgTatTatTtgTtaggggTtgT (SEQ ID NO:7)

[0083] -反向:ccacaAAacctccaAAcaAtAA (SEQ ID NO:8)

[0084] 通过混合表2的组分来制备MS-HRM Master Mix。表2中描述的剂量是一个样品所需的量,当测试多个样品时,制备并使用样品数+2水平的Master Mix (22 $\mu$ L/rxn)。

[0085] 【表2】

组分	体积
AccuPower <sup>®</sup> PCR Master Mix 2X (Bioneer)	12.5 $\mu$ L
EvaGreen <sup>®</sup> Dye 20X (Biotium)	1.25 $\mu$ L
[0086] 正向引物(10 $\mu$ M)	1 $\mu$ L
反向引物(10 $\mu$ M)	1 $\mu$ L
无核酸酶的水(NFW)	6.25 $\mu$ L

[0087] 将制备的Master Mix等分在96孔PCR板(Hard-Shell<sup>®</sup> PCR板, Biorad)的每个孔中,每个孔22 $\mu$ L。将根据表1的七种样品制备成具有0.33ng/ $\mu$ L的浓度,并等分在每个孔中,每个孔3 $\mu$ L,使得总DNA量为1ng。PCR反应使用CFX96Touch实时PCR检测系统(BioRad)在95 $^{\circ}$ C下进

行一次,持续5分钟,并重复进行以下的循环50次:95°C变性温度持续20秒、60°C加热和冷却温度持续30秒以及72°C延伸温度持续30秒。此外,在加热和冷却温度持续30秒后开始延伸温度之前,通过测量荧光来确认每个循环的荧光值。在完成PCR反应后,在72°C经历5分钟的稳定期后,进行熔解分析,该分析确认了扩增产物根据温度的升高的结合程度,并且通过以10秒的间隔测量荧光强度来进行HRM分析,同时温度以0.2°C的增量从65°C升高到95°C。

[0088] 确认PCR和HRM分析的荧光值,并确认熔解曲线或峰以确定每个样品的特征。此外,在完成PCR后,进行电泳并确认扩增产物的大小是由设计的引物准确产生的。

[0089] 如图1a所示,100%甲基化的待测核酸样品(EpiTect Met样品号4)和100%非甲基化的待测核酸样品(EpiTect Unmet;样品号2)的扩增几乎类似地显示。此外,它们在肝癌细胞(Huh-1;样品编号6)、肾细胞(Hek293T;样品编号5)和血细胞(PBMC;样品编号7)中以相似的效率扩增,并且通过PCR的荧光RFU值的增加确认了待测甲基化核酸和待测非甲基化核酸都被扩增。然而,存在通过MIP的结合发生的非特异性扩增的问题,即使在不应该被扩增的未用亚硫酸处理的对照组(EpiTect gDNA;样品编号3)和不含待测核酸的对照组(NTC;样品编号1)中。

[0090] 如图1b所示,通过高分辨率熔解曲线(HRM)分析,可以确认扩增的DNA是甲基化标志物、非甲基化标志物和非特异性MIP扩增的DNA。此外,如图1c所示的电泳结果,可以确认存在大量非特异性扩增的DNA。

[0091] 因此,常规MS-HRM分析方法的问题在于,基因组DNA序列通过用亚硫酸处理而简化,并且由于仅由腺嘌呤、鸟嘌呤和胸腺嘧啶组成的MIP引物序列的简单性而经常产生非特异性扩增产物,并且目标核酸的扩增受到限制。

[0092] 对比例2.使用添加了CpG识别位点的引物以防止非甲基化核酸的偏向性扩增的MS-HRM分析方法的局限性

[0093] 为了抑制在使用甲基化非依赖性引物的PCDR扩增过程中发生的非甲基化偏向性扩增,在引物的5'末端包含CpG序列以进行改进。将实施例1中使用的MIP引物改变为以下引物,通过相同的方法对表1的样品编号2、3、4和6的样品进行PCR,并进行HRM分析和电泳。所用引物的序列如下:

[0094] -正向:TTtCGgTtgTatTatTtgTTaggggT(SEQ ID NO:9)

[0095] -反向:AACGccccacaAAAcctccaAA(SEQ ID NO:10)

[0096] 如图2a所示,由于偏向性,所以通过在MIP的5'末端添加CpG使得甲基化的DNA可以更有利地扩增,结果证实100%甲基化的样品(EpiTect Met;样品编号4)和肝癌细胞DNA(Huh-1;样品编号6)被有效扩增,而非甲基化的DNA样品(EpiTect Unmet;样品编号2)和未用亚硫酸处理的对照组(EpiTect gDNA;样品编号3)没有扩增。然而,如图2b的HRM分析结果和图2c的电泳分析结果所示,在非甲基化的样品中发生了非特异性扩增。因此,当在通过甲基化而增加偏向性的条件下分析非甲基化的样品时,存在非特异性扩增非常高的问题。

[0097] 对比例3.使用荧光探针的MS-HRM分析方法的局限性

[0098] 当作为对比例1进行时,当使用用于Methylite分析的荧光探针及类似物时,确认了PCR扩增效率。作为对比例1,对肝癌样品(Huh-1;样品编号2)和100%甲基化的样品(EpiTect Met;样品编号1)进行MS-HRM的结果示于图3a中,而以荧光探针(ggTTCGTTaCGTtgTTTt;SEQ ID NO:11)代替表2的组成中的10μL NFW以同样方式进行的结

果示于图3b中。在每个实验中,未经亚硫酸处理的样品(EpiTect gDNA;样品编号3)作为对照组被使用。

[0099] 图3a是当没有添加特异性结合待测甲基化核酸的荧光探针时,测量扩增DNA量的结果(以PCR Cq值表示),图3b是通过添加所述荧光探针进行的结果。如图3b所示,由于荧光探针,Cq值增加了约4,因此存在扩增效率降低10至20倍的问题。

[0100] 实施例1.甲基化引物和非甲基化引物的制备

[0101] 制备用于确定具有SEQ ID NO:1序列的核酸是否甲基化的引物,作为待测核酸的实施例。SEQ ID NO:1的核酸序列如表3所示,靶位点用斜体表示,引物结合位点用下划线表示。在SEQ ID NO:1的序列中,CpG和非CpG胞嘧啶用大写字母书写,其他碱基用小写字母书写。在SEQ ID NO:1的序列中,CpG序列以粗体显示。

[0102] SEQ ID NO:1的甲基化核酸序列用亚硫酸处理后的核酸序列表示为SEQ ID NO:2,SEQ ID NO:1的非甲基化核酸序列用亚硫酸处理后的核酸序列表示为SEQ ID NO:3。在SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:3中,根据CpG胞嘧啶的甲基化状态,由于亚硫酸处理而出现差异的碱基用粗体表示。

[0103] 考虑到用亚硫酸处理后待转化模板的序列,正向或反向引物之一应在3'末端附近包含CpG或TpG序列,以便特异性结合甲基化模板或非甲基化模板之一。甲基化模板用亚硫酸处理后没有从CpG胞嘧啶转化为胸腺嘧啶而被保留下来,因此甲基化引物被设计成包含识别CpG序列的CpG识别位点,而非甲基化引物被设计成包含识别TpG序列的TpG识别位点。此时,由于特异性结合非甲基化模板的引物与特异性结合甲基化模板的引物相比具有较低的T<sub>m</sub>,为了弥补这一点,可以在5'末端添加核苷酸。与甲基化引物和非甲基化引物方向相反的引物被设计成无论甲基化链和非甲基化链的甲基化状态如何都能结合的引物。通过包含2个或多个非CpG胞嘧啶,所有引物均能够特异性结合亚硫酸转化的DNA链。

[0104] 正向引物设计成与SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的核酸序列中的第147-171位核酸结合,反向引物设计成与SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的核酸序列中的第206-229位核酸结合。SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的引物结合位点用下划线标出。

[0105] 制备了2种正向引物,即能够结合SEQ ID NO:2的核酸序列中第147-171位核酸的甲基化引物,和能够结合SEQ ID NO:3的核酸序列中第206-229位核酸的非甲基化引物。此时,反向引物是通用反向引物,能够结合亚硫酸处理的待测甲基化核酸和亚硫酸处理的待测非甲基化核酸两者。

[0106] 制造的引物的序列如表3所示。在甲基化引物和非甲基化引物的序列中,根据待测核酸是否甲基化而不同的序列用下划线标出。

[0107] 【表3】

[0108]

分类	序列(5'-> 3')	SEQ ID NO.
待测核酸	aggaaggaga <b>CG</b> gggtgg <b>CG</b> CCaaggaaggaggagaaaagg <b>CG</b> g <b>CCG</b> ag aaaaggaggagggCaaggggaagaggaaggg <b>CG</b> agggaggagCctgaggaga Ct <b>CGCCCG</b> gCtCaa <b>CCCCGaCGtCCGCGCCCCG</b> g <b>CCGCC</b> t gttggC <u>CatggCGggCtgggCtgggCtCCGCCGttCCCGtgtggCtg</u> g <b>CCGaggaCGaCCtCGgCtgCatCatCtgCCaggggCtgCtgaCtgg</b> <b>CCCGCCaCG</b> CtgCCctg <b>CG</b> gCCaCagCttCtg <b>CCGCCaCtgCCtg</b> gaggCCctgtgggg <b>CGCCCGCGaCGCCCGCCG</b> CtgggCCtgCC CCaCttg <b>CCGCC</b> aggg <b>CGCCCGCG</b> CagCag <b>CCGCaCtgCG</b> gaa gaaCa <b>CG</b> CtaCtgCaggaCctgg <b>CCGaCaagtaCCGCCGCGCCG</b> Ca <b>CGCG</b> agataCagg <b>CG</b> ggCt <b>CCGaCC</b> CtgCCCaCtgCCCCtgCC <b>CG</b> ggCtCCagttCCctCtCCag	1
亚硫酸处理的待测甲基化核酸	aggaaggaga <b>CG</b> gggtgg <b>CG</b> TTaaggaaggaggagaaaagg <b>CG</b> g <b>TCG</b> aga aaaggaggagggTaaggggaagaggaaggg <b>CG</b> agggaggagTTtgaggagaTt <b>CGTTCG</b> gTtTaaTTTCGa <b>CGtTCGCGTTTCG</b> g <b>TCGTT</b> tgttgg <b>I</b> <u>TatggCGggTTtgggTTtgggTtTCGTCGttTTCGtgtggTtgTCGag</u> ga <b>CGaTTtCGgTgTatTatTgTTaggggTgTtgaTtggTTCGTTaC</b> GTtgTTTtg <b>CG</b> gTTaTagTttTg <b>TCGTTaTgTTtggaggTTTt</b> gtggg g <b>CGTTCGCGaCGTTCGTCG</b> TgggTTtgTTTtaTtt <b>TCGTT</b> ag gg <b>CGTCGCG</b> TagTag <b>TCG</b> TaTTg <b>CG</b> gaagaaTa <b>CG</b> TtaTtTagga TTgg <b>TCGa</b> Taagta <b>TCGTCGCGTCG</b> Ta <b>CGCG</b> agataTagg <b>CG</b> gg Tt <b>TCGa</b> TTTtgTTTaTtgTTTtTgTT <b>CG</b> ggTtTTagtTTTtTtTag	2
亚硫酸处理的待测非甲基化核酸	aggaaggaga <b>TG</b> gggtgg <b>TG</b> TTaaggaaggaggagaaaagg <b>TG</b> g <b>TTG</b> aga aaaggaggagggTaaggggaagaggaaggg <b>TG</b> agggaggagTTtgaggagaTt <b>TGTTT</b> GgTtTaaTTTTGa <b>TGtTTGTGTTTTG</b> g <b>TTGTT</b> tgttgg <b>I</b>	3

[0109]	TatggTGggTTgggTTgggTtTTGTTGtTTTGtggTggTTGaggaTGaTTtTGgTtgTatTatTtgTTaggggTgTtgggTggTTTGTaTGtTtTgTGgTTaTagTtTgTTGTaTtgTTggaggTTTtgggggTGTTTGaTGTTTGTGtgggTTgTTTTaTtgTTGTTaggTGTTGTGTagTagTTGTaTTgTGgaagaaTaTGtaTgTaggaTTggTTGaTaagtaTTGTTGTGTTGTaTGTGagataTaggTGggTtTTGaTTtTgTTTaTgTTTTgTTTGggTtTtagtTTTTtTtag		
	正向甲基化引物	TTatggCGggTTgggTTgggTtT	4
	正向非甲基化引物	TTatggTGggTTgggTTgggTtT	5
	通用反向引物	caAcccctAAcaAatAatAcaAcC	6

[0110] 实施例2. 使用甲基化引物和非甲基化引物的MS-HRM

[0111] 使用实施例1中制造的引物进行MS-HRM分析。通过混合表4的组分来制备MS-HRM Master Mix。表4中描述的剂量是一个样品所需的量，当测试多个样品时，制备并使用样品数+2水平的Master Mix (22 $\mu$ L/rxn)。

[0112] 【表4】

组分	体积
AccuPower <sup>®</sup> PCR Master Mix 2X (Bioneer)	12.5 $\mu$ L
EvaGreen <sup>®</sup> Dye 20X (Biotium)	1.25 $\mu$ L
甲基化正向引物(10 uM)	1 $\mu$ L
非甲基化正向引物(10nM)	0.5 $\mu$ L
通用反向引物(10 uM)	1 $\mu$ L
无核酸酶的水(NFW):	5.75 $\mu$ L

[0114] 制备包含SEQ ID NO:1的核酸的各种样品和对照样品，如表5所示，并用于实验。

[0115] 【表5】

样品编号	样品名称	样品描述	甲基化与否
1	NTC	非模板对照	-
2	EpiTect gDNA	未经亚硫酸处理的样品	-
3	EpiTect Unmet. DNA	100%非甲基化样品	X
4	健康的PBMC	源自正常血细胞的样品	X
5	EpiTect Met.	100%甲基化样品	0
6	Huh-1	源自肝癌细胞的样品	0

[0117] 将制备的Master Mix等分在96孔PCR板(Hard-Shell®PCR板, Biorad)的每个孔中, 每个孔22 $\mu$ L。将根据表5的六种样品制备成具有0.33ng/ $\mu$ L的浓度, 并在每个孔中等分3 $\mu$ L, 使得总DNA量为1ng。

[0118] PCR反应使用CFX96 Touch实时PCR检测系统(BioRad)在95 $^{\circ}$ C下进行一次, 持续5分钟, 并且重复进行以下的循环50次: 95 $^{\circ}$ C变性温度持续20秒、60 $^{\circ}$ C加热和冷却温度持续30秒以及72 $^{\circ}$ C延伸温度持续30秒。此外, 在加热和冷却温度30秒后开始延伸温度之前, 通过测量荧光来确认每个循环的荧光值。在完成PCR反应后, 在72 $^{\circ}$ C经历5分钟的稳定期后, 进行熔解分析, 其根据温度的升高确认扩增产物的结合程度, 并且通过以10秒的间隔测量荧光强度来进行HRM分析, 同时温度以0.2 $^{\circ}$ C的增量从65 $^{\circ}$ C升高到95 $^{\circ}$ C。

[0119] 确认PCR和HRM分析的荧光值, 并确认熔解曲线或峰以测定每个样品的特征。此外, 在完成PCR后, 进行电泳并确认了扩增产物的大小是由设计的引物准确产生的。

[0120] 将甲基化引物和非甲基化引物同时加入到一个样品中, 在甲基化DNA和非甲基化DNA可以一起扩增的条件下扩增待测核酸。如图4a所示, 在亚硫酸处理的甲基化DNA(EpiTect Met和Huh-1)和非甲基化DNA(EpiTect UnMet和PBMC)中同样地发生了扩增, 而在对照样品(NTC和未经亚硫酸处理的EpiTect gDNA)中没有发生扩增。确认了在图4b的HRM分析结果和图4c的电泳分析结果中仅发生了特异性扩增。

[0121] 实施例3. 甲基化水平的检测限和定量

[0122] 为了确定样品甲基化比率的最小检测限, 通过混合PBMC(0.33ng/ $\mu$ L)和Huh-1(0.33ng/ $\mu$ L)制备甲基化比率为50%、25%、12.5%或6.25%的样品, 并且用于实验。将每个甲基化比率样品以3 $\mu$ L等分在每个孔中, 通过与实施例2相同的方法进行PCR反应和HRM分析, 并且结果显示在图5a和图5b中。

[0123] 图5a显示了在将亚硫酸处理的肝癌细胞DNA与亚硫酸处理的血细胞DNA以呈现的比例混合后, 通过引物混合MS-HRM方法分析1ng DNA而得到的每个样品的熔解峰分布。可以看出甲基化DNA的熔解峰和非甲基化DNA的熔解峰的大小和比例根据甲基化Huh-1 DNA的比例逐渐变化。

[0124] 图5b是示出通过熔解曲线分析的HRM分析结果的图。它表明熔解曲线的斜率随着肝癌细胞DNA的增加而缓慢增加, 并且位于非甲基化血细胞的斜率和100%甲基化肝癌细胞的斜率之间。因此, 可以计算熔解曲线的曲线下面积(AUC)来定量评估甲基化比率。具体地, 所述甲基化水平可以通过计算百分比来定量, 该百分比通过将未知样品和完全非甲基化对照组的熔解曲线的AUC值之差除以完全甲基化对照样品和完全非甲基化对照样品的熔解曲线的AUC值之差而获得。

[0125] 更具体地, 为了根据温度从总荧光值中去除指数型背景噪声, 在熔解温度( $T_m$ )以下和以上(每个TL、TR)的区间内选择MS-HRM荧光变化率保持恒定的温度, 并且从每个点的荧光变化率(dF/dT)估计指数型背景噪声的参数。通过从估计的参数计算的指数型背景噪声值将其从每个温度点的总荧光值中去除, 计算出与残留dsDNA的量成比例的荧光数据函数M(T)。对于M(T), 在[TL, TR]的温度区间中执行最小-最大归一化, 以根据温度的增加计算残留dsDNA比函数M1(T)。为了获得甲基化水平, 从每个样品计算[TL, TR]区间内M1(T)的曲线下面积(AUC)值S, 然后可以基于S值确定样品的甲基化水平。

[0126] 实施例4. 检测灵敏度

[0127] 由于血液中的ctDNA以非常低的浓度存在,为了确认根据本申请的实施方案的用于测定是否甲基化的方法是否可以用于基于实际血液测试的癌症诊断,确认了检测限。

[0128] 为了确认可以通过根据本申请的实施方案的用于测定是否甲基化的方法确认的最小DNA链,用NFW稀释PBMC和Huh-1 (50ng/3 $\mu$ L) 样品,以制备浓度为50、30、10、5、3、1、0.5、0.3、0.1、0.05或0.01ng/3 $\mu$ L的Huh-1样品。将每个浓度的样品在每个孔中等分3 $\mu$ L,通过与实施例2相同的方法进行PCR反应和HRM分析。

[0129] 使用0.01ng至50ng的5000倍差异量的亚硫酸处理的肝癌细胞DNA进行甲基化和非甲基化引物组合的MS-HRM分析,通过测量PCR Cq值分析待测扩增核酸的量,并显示在图6a中。如图6a所示,作为扩增同时增加DNA的结果,从使用0.01ng (3条链) DNA时的大约38的Cq值开始,增加到50ng (15200条链),结果表明Cq值的降低与DNA量的增加呈完全相同的关系。结果,可以看出使用甲基化引物和非甲基化引物的组合的MS-HRM分析有效地扩增了甚至0.01ng的DNA,并且在整个5000倍的宽区域中有效地扩增了它。

[0130] 图6b显示了使用显示甲基化比率的mAUC(曲线下溶解曲线面积)分析各种量的DNA时是否可以精确测量甲基化比率的结果。如图6b所示,AUC值的差异并不会依赖于各样品的量而变大,并且得到一致地确认,并且各样品的扩增产物均是待测核酸,并且可以测定每个样品的甲基化水平。因此,即使在包含至少3条待测核酸链的样品中,也可以测定待测核酸的甲基化状态。

[0131] 此外,为了确认根据本申请的实施方案的用于测定是否甲基化的方法能够在存在非甲基化DNA的环境中确定目标甲基化DNA的最小比率,通过连续稀释非甲基化DNA和甲基化DNA制备0、1、2、4、8、16、32、100%的样品,并进行MS-HRM分析,AUC值根据比率的变化相关性被确认并显示在图6c中。

[0132] 如图6c所示,作为在存在非甲基化DNA的条件下确认可检测的最小比率的结果,可以确认1%的甲基化DNA浓度(3条甲基化DNA)与0%的甲基化DNA浓度之间存在差异,并且即使在AUC值和甲基化DNA比率之间的相关性分析中也可以确认高R值。

[0133] 因此,证实了根据本申请的实施方案的用于确定是否甲基化的方法具有高检测灵敏度,即使在存在99%的非甲基化DNA的样品中,也能够检测1%的甲基化DNA。

[0134] 实施例6.通过非甲基化引物提高检测灵敏度

[0135] 为了确认非甲基化的引物是否提高了检测灵敏度,使用了Huh-1 6.25、25.0、50.0或100.0%的样品。如实施例5所述,在表3的组分中,将非甲基化正向引物的体积变为1、0.75、0.5或0.25 $\mu$ L,并且相应地,NFW体积变为5.25、5.50、5.75或6 $\mu$ L。

[0136] 确认了甲基化DNA是否根据甲基化引物和非甲基化引物的浓度比率发生偏向性扩增。在甲基化引物的量固定为0.4 $\mu$ M,并且非甲基化引物的量减少至0.4、0.3、0.2、0.1 $\mu$ M的条件下进行PCR。

[0137] 如图7所示,当甲基化肝癌细胞的DNA比例低至25%或更低,并且非甲基化引物的量为甲基化引物的50%或更低时,甲基化DNA的检测灵敏度进一步增加。

[0138] 因此,由于检测灵敏度通过组合使用甲基化引物和非甲基化引物而提高,可以确认低浓度的甲基化DNA(例如,cfDNA)是否甲基化。

[0139] 实施例7.测量血液中癌症生物标志物甲基化的癌症诊断

[0140] 进行了初步临床试验,以确认是否能够通过将使用甲基化引物和非甲基化引物的

组合的MS-HRM分析应用于实际血液来确定待测核酸的甲基化状态。

[0141] 从健康人群和肝癌患者提取10mL血液后,使用离心机(1900g,15分钟)分离血清。根据制造商建议的方法,使用MagListo™ cfDNA提取试剂盒(Bioneer)从分离的血清中提取cfDNA。对于提取的cfDNA,根据制造商建议的方法,使用EZ DNA Methylation-Lightning试剂盒(Zymo Research)进行亚硫酸转化用于MS-HRM分析。对于亚硫酸转化的cfDNA,通过接下来的工序进行MS-HRM分析。

[0142] 根据表3制备MS-HRM Master Mix,并且将制备的Master Mix等分在96孔PCR板(Hard-Shell® PCR板,Biorad)的每个孔中,每个孔22μL,并且通过与实施例2相同的方法进行PCR反应和HRM分析。确认用于PCR和HRM分析的荧光值,并确认熔解曲线或峰,从而测定健康人群和肝癌患者的甲基化水平。

[0143] 图8a是显示在从92名健康人群和119名肝癌患者收集2ml血液以分离血浆,并从中分离cfDNA并用亚硫酸处理后,使用约1ng的cfDNA进行引物组合MS-HRM的结果的图。健康人群(绿色)的分析结果呈现低温的熔解峰,其中全部为非甲基化的,而肝癌患者的血液样品(红色)呈现高温的熔解峰。

[0144] 图8b是显示对正常人群和肝癌患者的血液使用组合MS-HRM方法对SEQ ID NO:1的待测核酸进行熔解曲线分析所表示的实验结果的图。正常人群(绿色)是非甲基化的,因此扩增的DNA快速熔解并显示出较陡的曲线斜率,而肝癌患者血液样品(红色)包含癌症DNA,其由于甲基化的癌症DNA的扩增而具有高熔点,因此其显示出相对较缓的熔解曲线斜率。可以证实,约60%或更多的肝癌患者cfDNA比正常人群的cfDNA包含更高的甲基化DNA,因此,通过检测非常少量的核酸(如cfDNA),例如片段非常小的约100bp的甲基化cfDNA,可以有效地检测血液中存在的痕量甲基化标志物DNA。

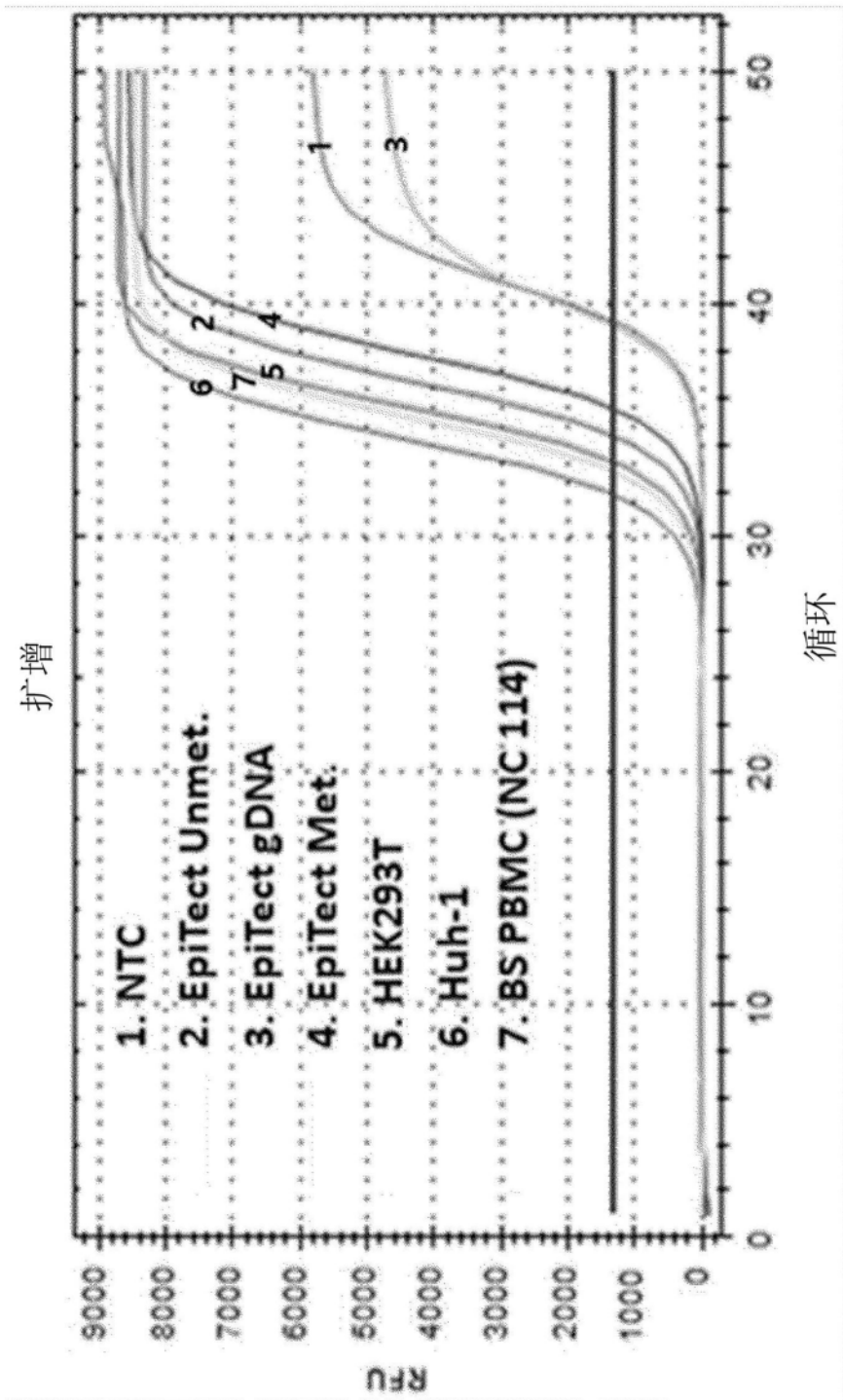


图1a

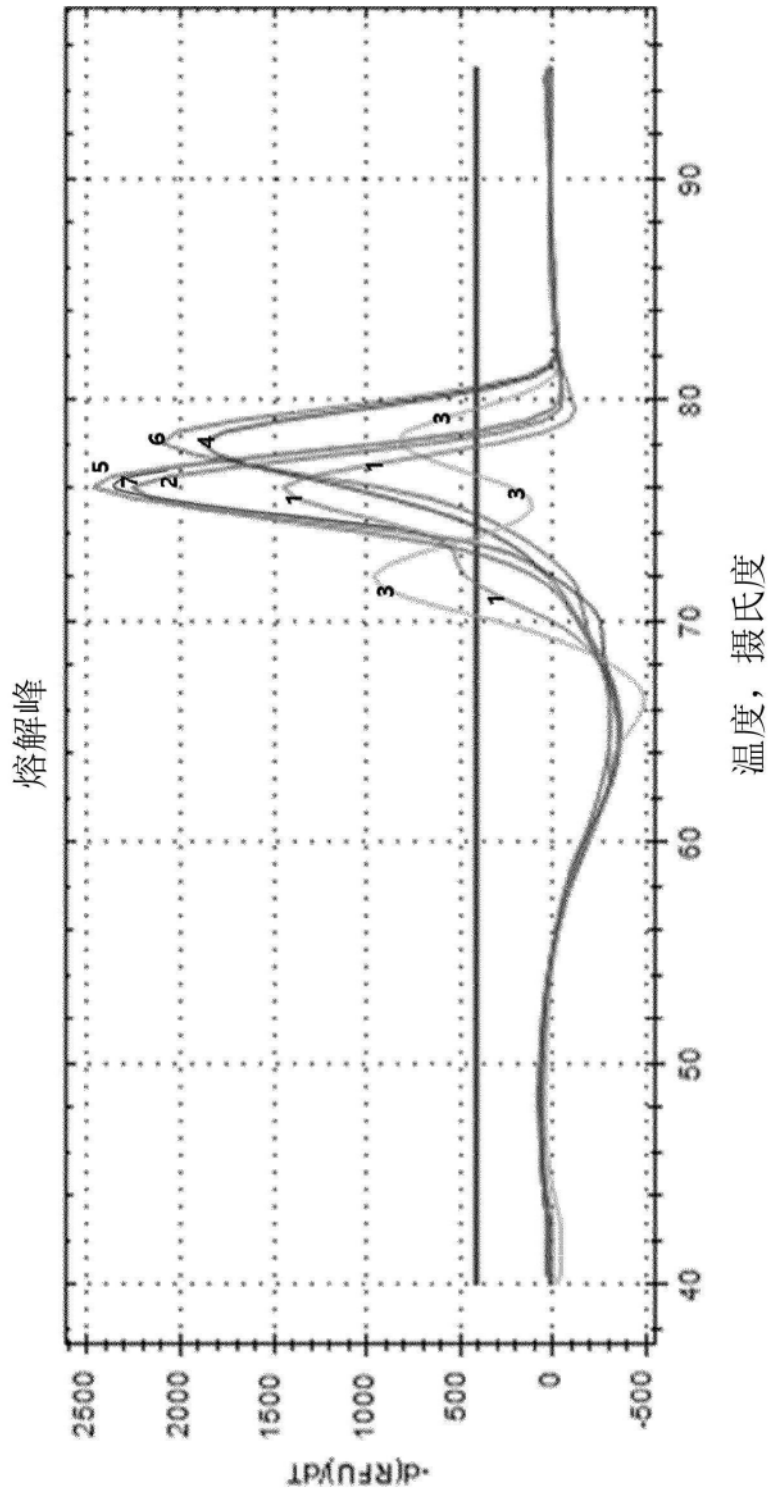


图1b

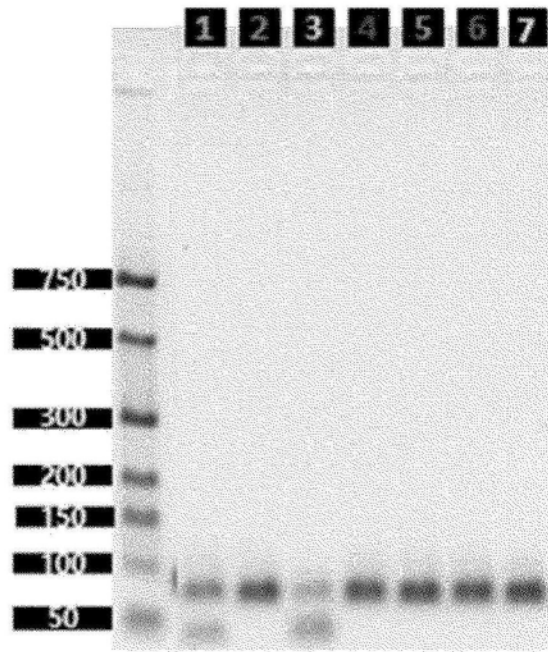


图1c

扩增

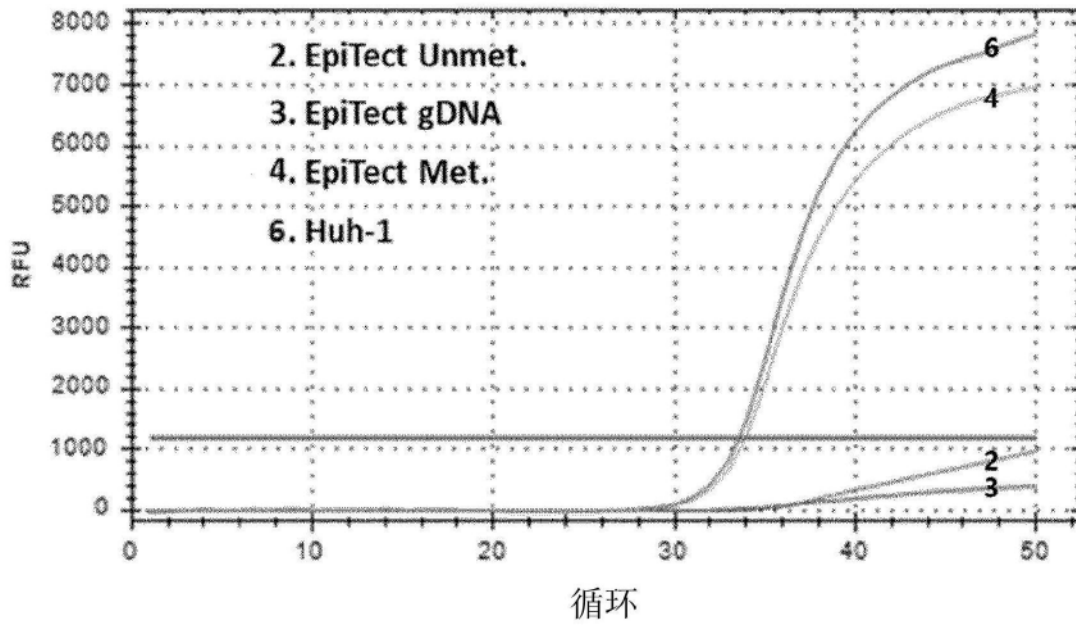


图2a

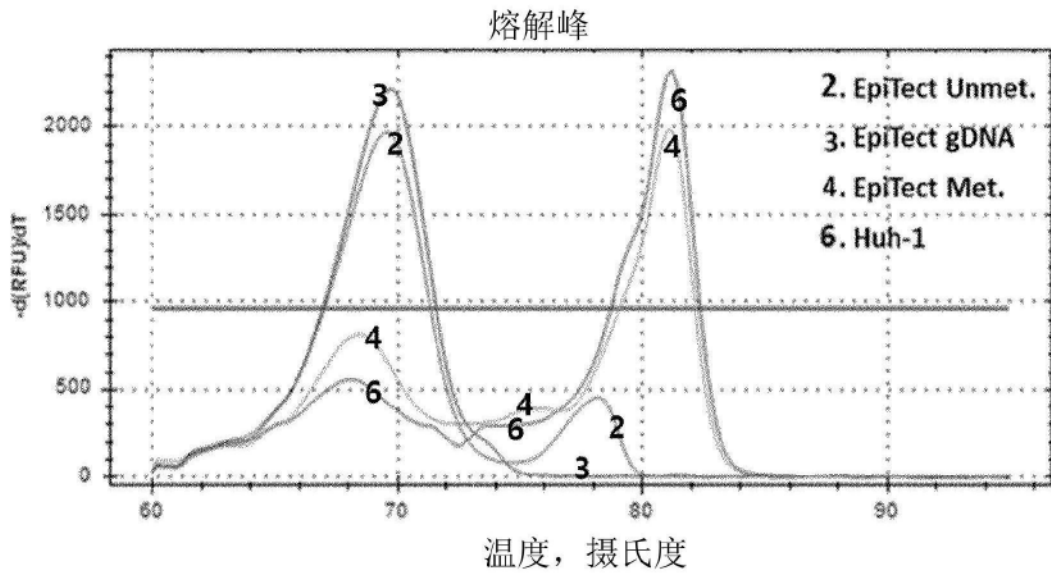


图2b

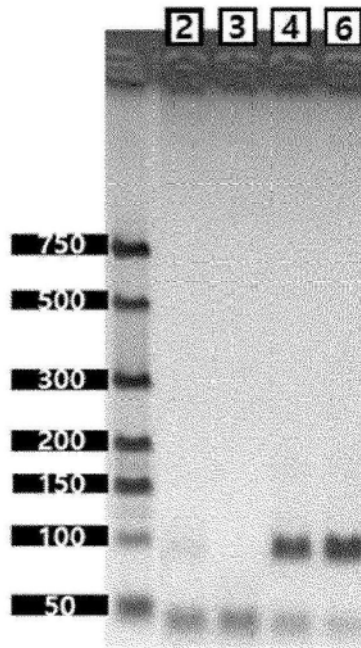


图2c

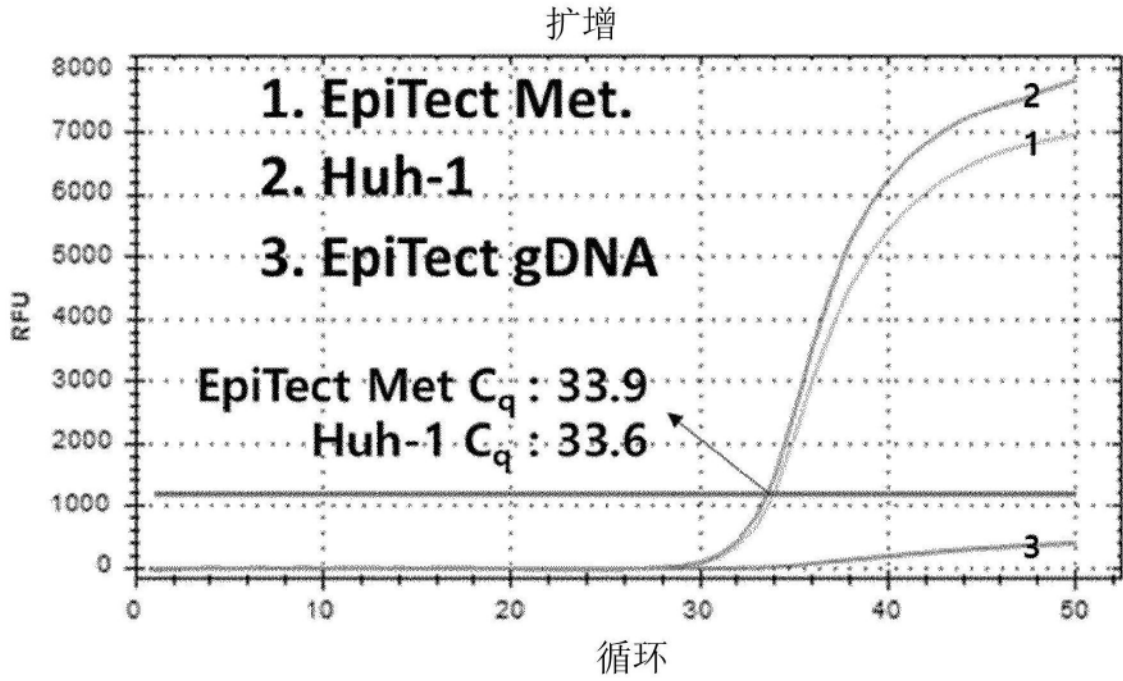


图3a

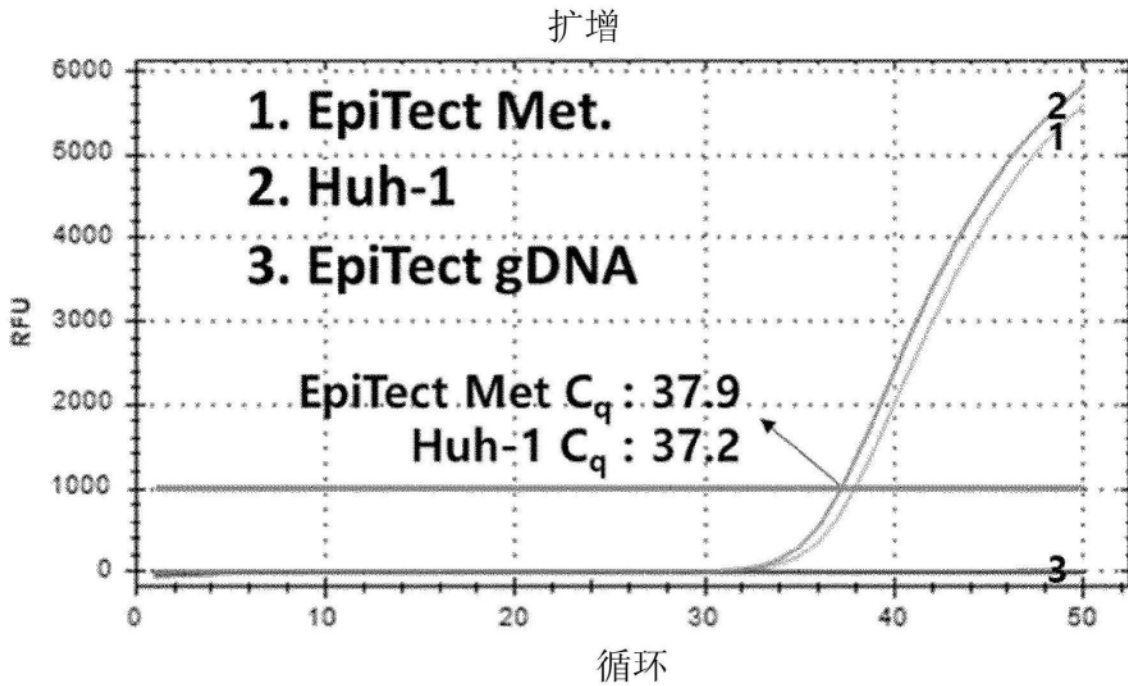


图3b

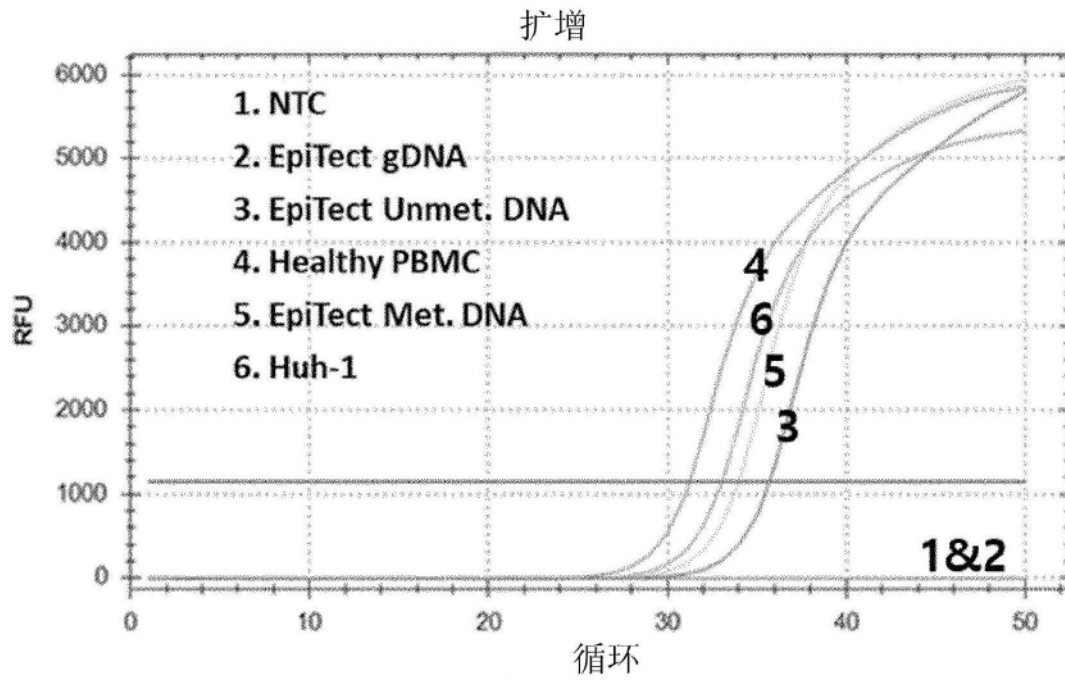


图4a

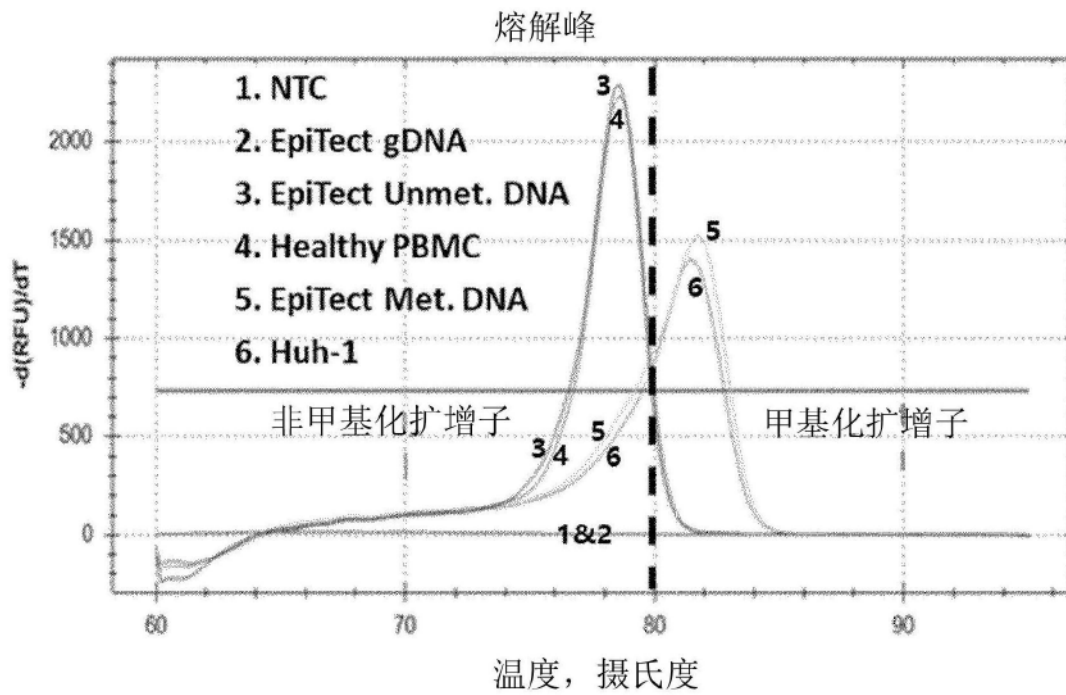


图4b

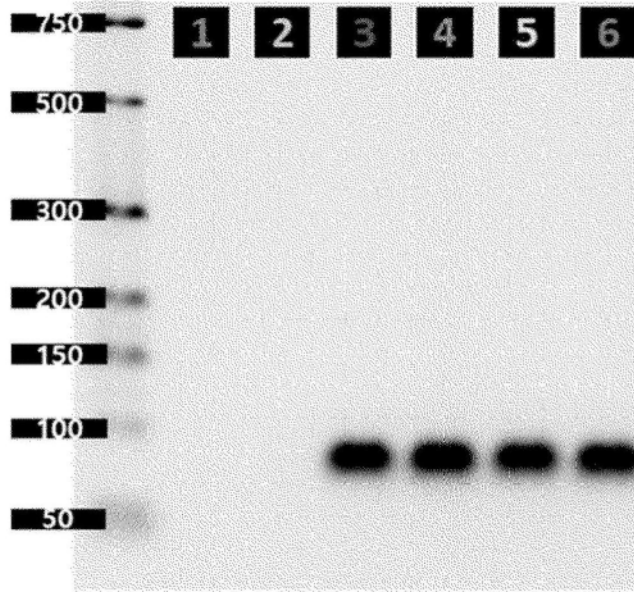


图4c

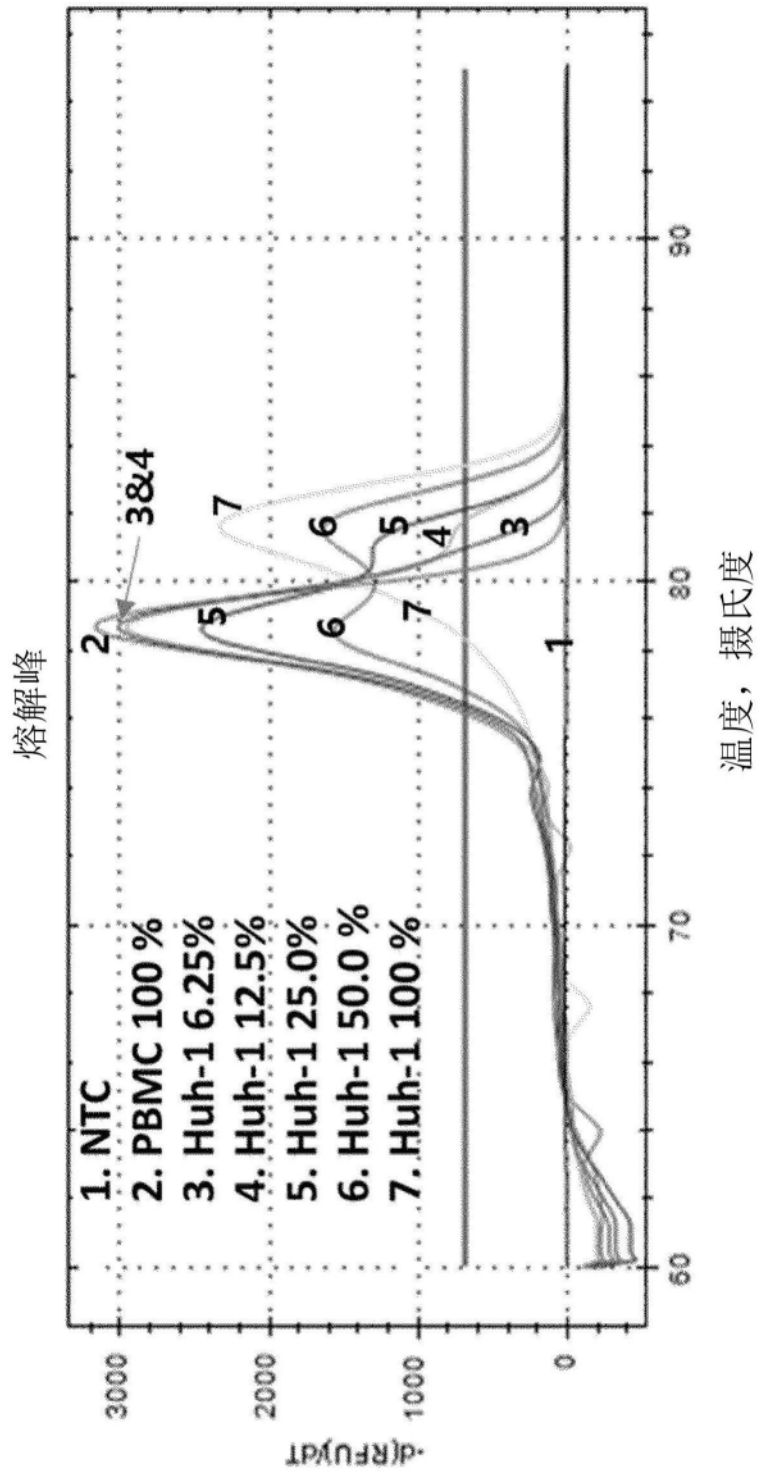


图5a

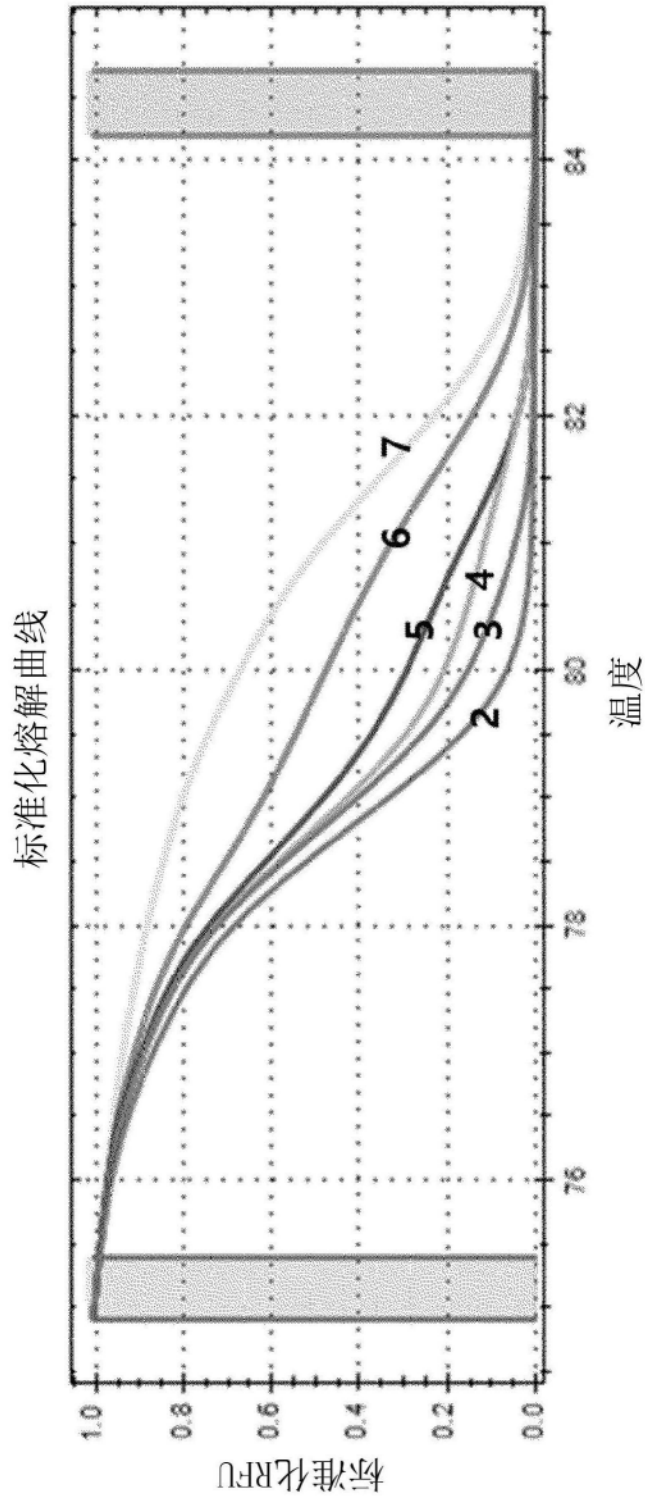


图5b

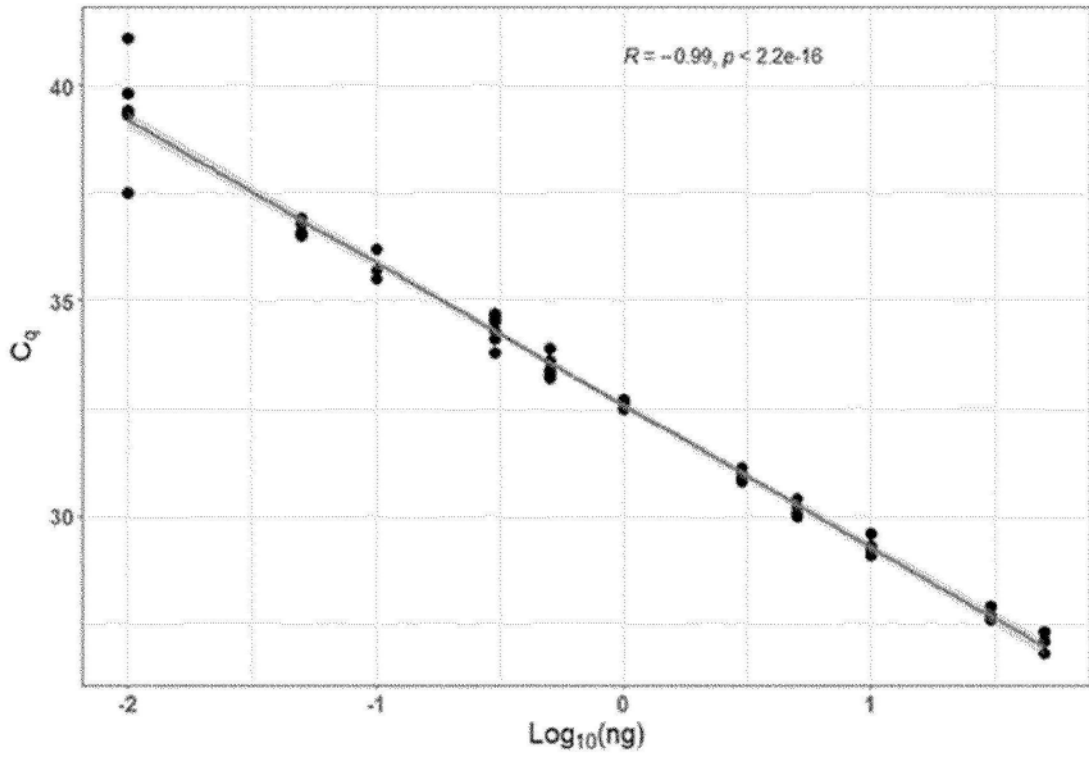


图6a

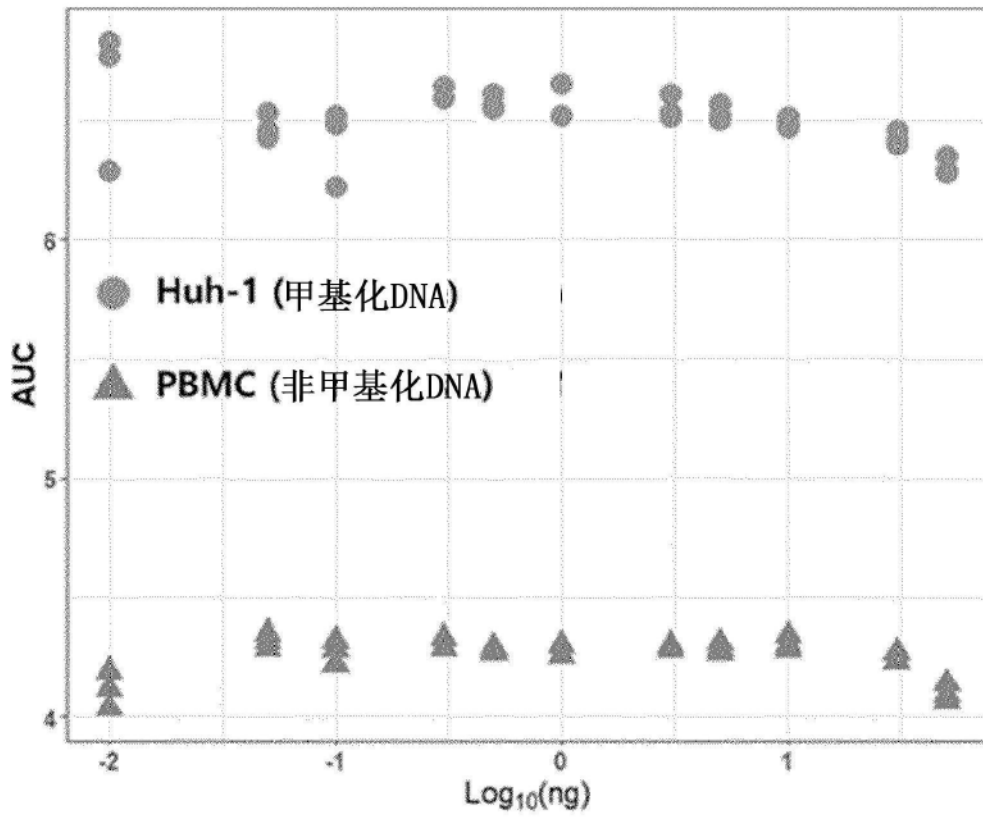


图6b

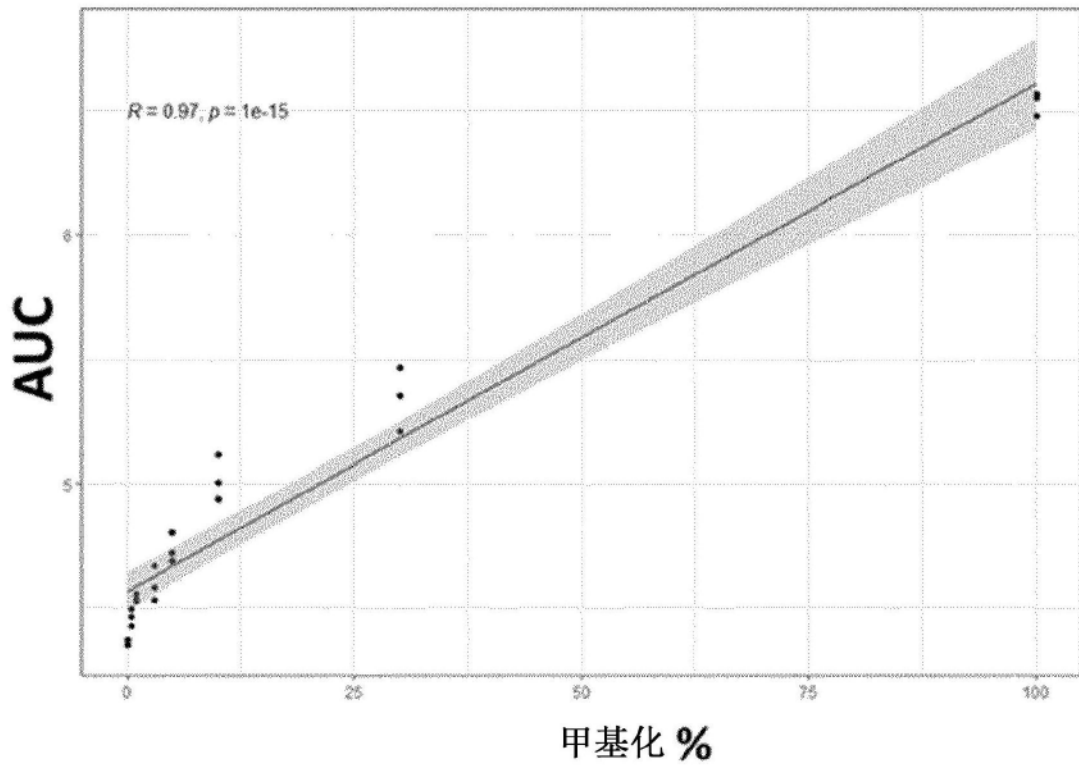


图6c

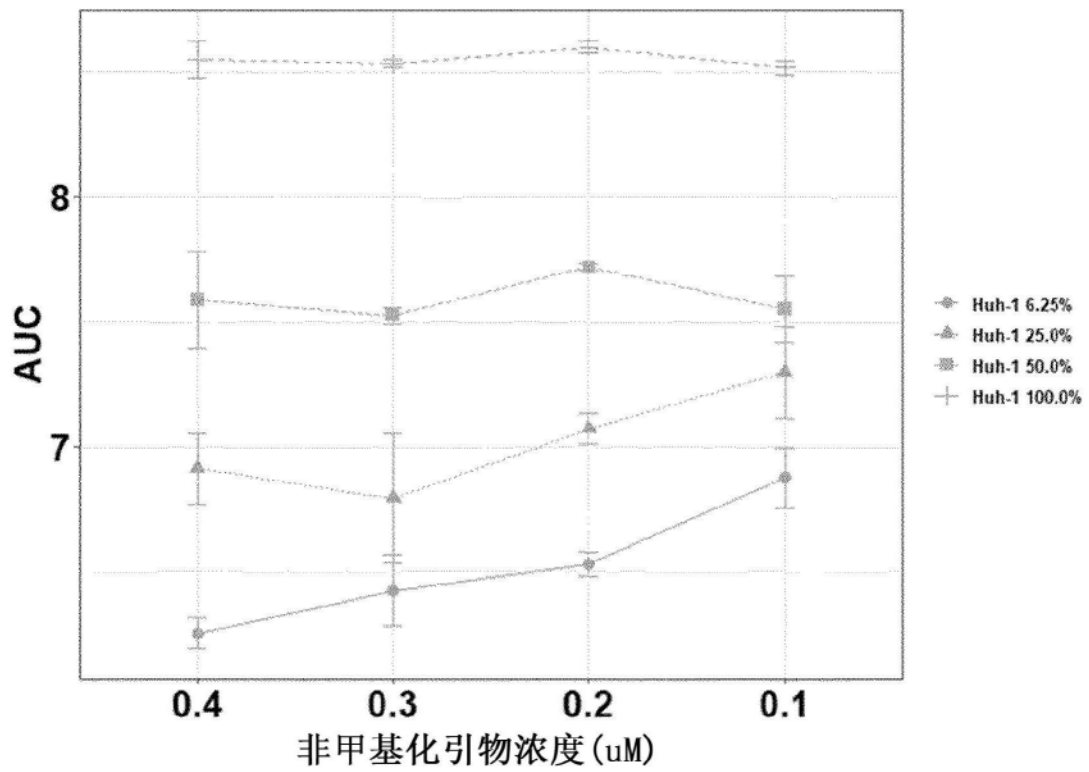


图7

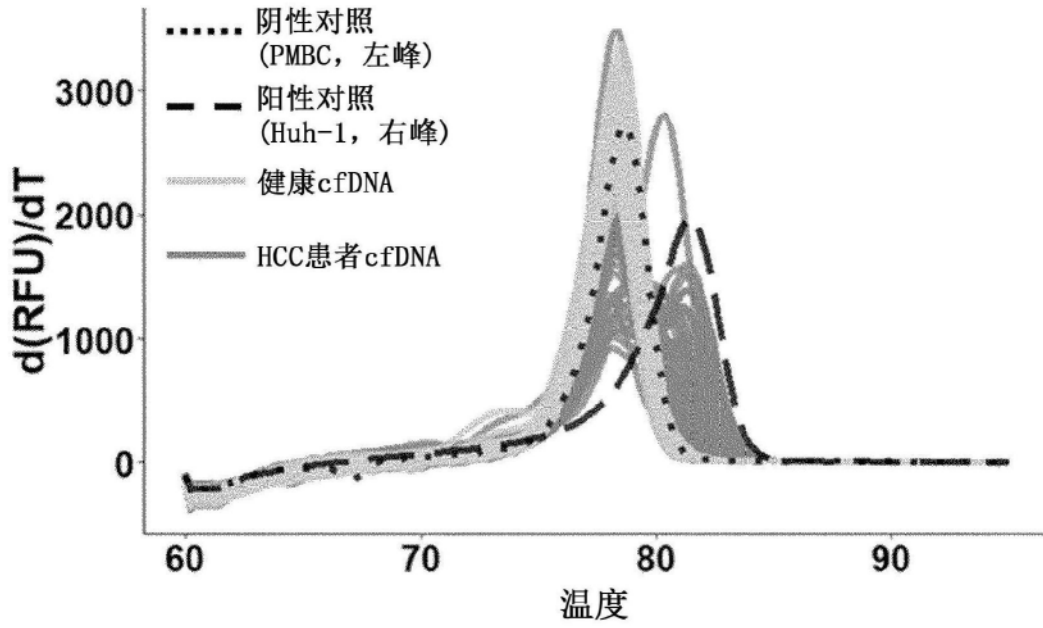


图8a

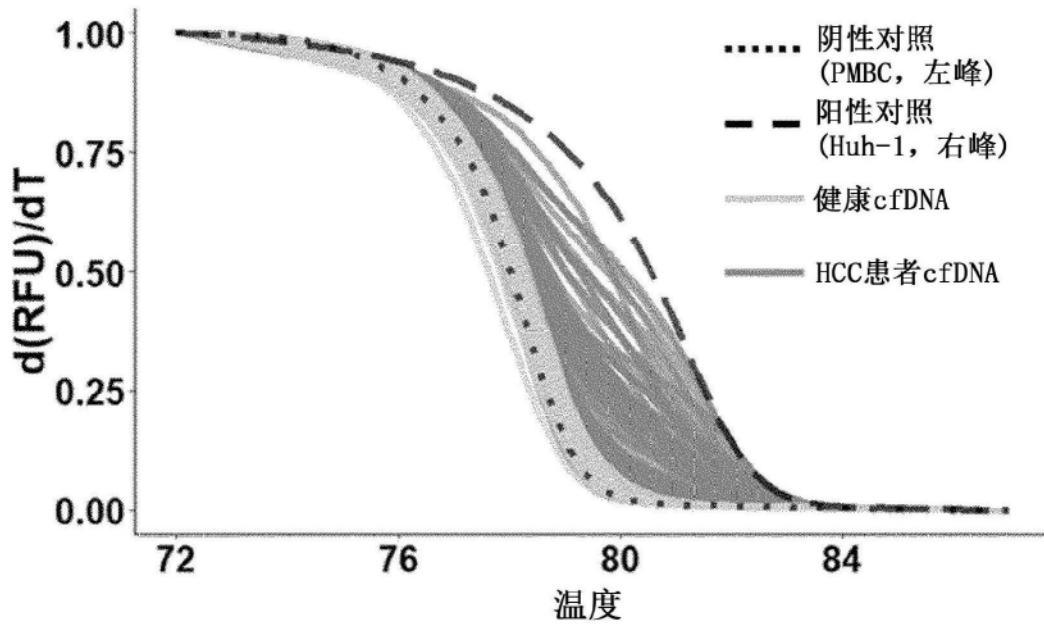


图8b