



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 105779436 A

(43)申请公布日 2016.07.20

(21)申请号 201610128465.4

(51)Int.Cl.

(22)申请日 2010.07.16

C12N 15/10(2006.01)

(30)优先权数据

C12Q 1/68(2006.01)

61/226,106 2009.07.16 US

C12N 15/63(2006.01)

61/226,025 2009.07.16 US

(62)分案原申请数据

201080041496.7 2010.07.16

(71)申请人 总医院有限公司

地址 美国马萨诸塞州

(72)发明人 雷莱塔·M·鲁索

凯文·C·米兰达 约翰·斯科格

(74)专利代理机构 北京康信知识产权代理有限
责任公司 11240

代理人 沈敬亭 徐丽华

权利要求书1页 说明书24页

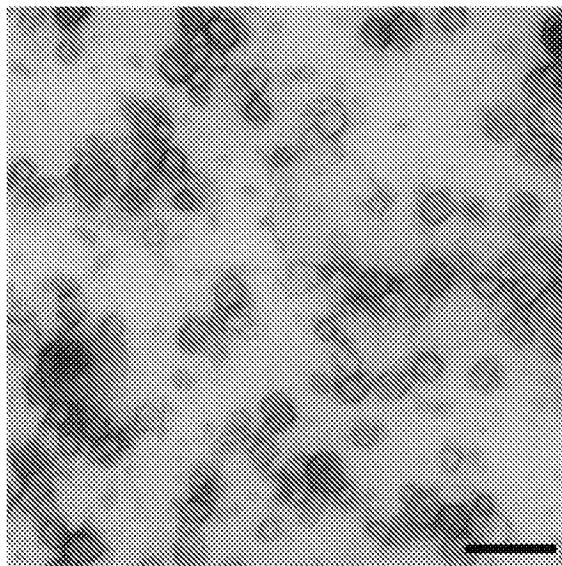
序列表7页 附图54页

(54)发明名称

核酸分析

(57)摘要

本发明提供了核酸分析。本发明公开了从生物样品中提取高质量核酸的方法。通过本文所述的方法获得的提取物的特征是高产率和高完整性,使得所提取核酸对优选高质量核酸提取物的各种应用有用,所述的应用为,例如对医学病况的诊断、预后或治疗评价。



1. 一种来自一个或多个分离自真核生物样品的微泡的核酸提取物,其中,可在所述提取物中检测到18S rRNA和28S rRNA。

2. 一种来自一个或多个分离自真核生物样品的微泡的核酸图谱,其中可在所述图谱中检测到18S rRNA和28S rRNA。

3. 一种评价来自分离自真核生物样品的微泡的核酸提取物质量的方法,包括以下步骤:

(a)从微泡中提取RNA;和

(b)通过测定所述提取物中的18S rRNA和28S rRNA量来测量RNA的质量。

4. 一种从生物样品中获取核酸的方法,包括以下步骤:

(a)获取生物样品;

(b)在所述生物样品上执行提取促进操作;和

(c)从所述生物样品中提取核酸。

5. 一种用于从微泡中获取核酸的试剂盒,其在一个或多个容器中包含:

(a)核酸提取促进剂;

(b)DNA酶、RNA酶,或二者;和

(c)裂解缓冲液。

6. 一种分析来自微泡的RNA的方法,包括以下步骤:

(a)获取微泡样品;

(b)用DNA酶处理所述样品以除去所有或基本上所有位于所述样品中微泡的表面外或表面上的任何DNA;

(c)从所述样品中提取RNA;和

(d)分析所提取的RNA。

7. 一种用于诊断、监测、或治疗受试者的方法,包括以下步骤:

(a)从受试者的尿样中分离出微泡组分;

(b)检测所述微泡组分中是否存在生物标记;

其中,所述生物标记选自下组:(i)核酸类物质,(ii)核酸表达水平,(iii)核酸变体、和(iv)前述中任何一种的任意组合;而且

其中,所述生物标记与疾病或其他医学病况的存在与否、或治疗选择方案的可行性相关联。

8. 一种包含与选自SEQ ID NO:1-29的第二核苷酸序列有至少90%同一性的第一核苷酸序列的分离多核苷酸分子。

9. 一种包含根据权利要求8所述的分离核酸分子的载体。

10. 一种包含根据权利要求8所述的分离核酸分子的宿主细胞。

核酸分析

[0001] 本申请是申请日为2010年7月16日,申请号为201080041496.7,发明名称为“核酸分析”的发明专利申请的分案申请。

[0002] 相关申请的参考

[0003] 本申请要求于2009年7月16日提交的美国临时申请61,226,025和61,226,106的优先权,它们的全文通过引用方式结合于本文。

技术领域

[0004] 本发明涉及人或其他动物受试者的核酸分析的总体领域,特别是来自生物样品,特别是微泡的高质量核酸的获取和分析。

背景技术

[0005] 细胞脱落的小微泡称为“外来体(exosome)”(Thery等人,2002)。有报告表明外来体直径约为30-100nm,许多不同类型的细胞在正常和病理状态下都可以脱落外来体(Thery等人,2002)。外来体通常由晚期内涵体膜向内内陷和夹断形成。这导致载满小脂质双层囊泡(直径为~40-100nm)的多泡体(MVB)形成,每个小脂质双层囊泡都含有母细胞的细胞质样品(Stoorvogel等人,2002)。MVB与细胞膜的融合导致这些外来体从细胞中释放出来,并递送到血液、尿或其他体液中。

[0006] 另一类源自细胞的囊泡称为“脱落微泡”(Cocucci等人,2009)。由细胞质膜直接出芽形成的这些微泡的尺寸比外来体的尺寸更不均匀,并且像外来体一样,也包含母细胞的细胞质样品。外来体和脱落微泡可以利用超速离心和超滤分离技术共分离,因此统称为微泡。

[0007] 最新研究揭示微泡内的核酸具有作为生物标记的作用。例如,Skog等人除了描述其他内容之外,还描述了从GBM患者血清中的微泡提取的核酸在医疗诊断、预后和治疗评价中的用途(Skog等人,2008)。从微泡提取的核酸的使用被认为潜在地避开活检需要,强调了微泡生物学的巨大诊断潜力(Skog等人,2008)。

[0008] 在核酸生物标记的研究和开发以及工业应用中,希望以一致且可靠的方式从生物样品中提取高质量核酸。本发明提供了来自微泡和其他生物样品的高质量核酸提取物组成、制取此种提取物的方法,和在各种应用中使用这些高质量核酸的方法。

发明内容

[0009] 在一个方面,本发明是来自一个或多个分离自真核生物样品的微泡的新核酸提取物,其中可在该提取物中检测到18S rRNA和28S rRNA。优选地,可在该新提取物中检测到的18S rRNA与28S rRNA的定量比率在约1:1~约1:2的范围内,优选为约1:2。可从中获取该新提取物的生物样品包括,尤其是任何体液,优选尿、血清或血浆,优选来自哺乳动物,特别是人。对于蛋白质浓度低于10mg/ml的体液样品,如尿,该新核酸提取物可进一步包含RNA完整性(在所有情况下,如在Agilent BioAnalyzer或其等效物上获得的)大于或等于5的核酸提

取物,和/或可以进一步包含来自20ml生物样品的大于或等于50pg/ml的核酸产量。类似地,对于蛋白质浓度大于10mg/ml的体液样品,如血清或血浆,该新核酸提取物可以进一步包含大于或等于3的RNA完整性,和/或可以进一步包含来自1ml生物样品的大于或等于50pg/ml的核酸产量。

[0010] 在另一个方面,本发明是来自一个或多个分离自真核生物样品的微泡的新核酸图谱,其中可在该图谱中检测到18S rRNA和28S rRNA。优选地,可在该新图谱中检测到的18S rRNA与28S rRNA的定量比率在约1:1~约1:2的范围内,并优选为约1:2。可从中获取该新图谱的生物样品包括,尤其是任何体液,优选尿、血清或血浆,优选来自哺乳动物,特别是人。对于蛋白质浓度低于10mg/ml的体液样品,如尿,该新图谱可进一步包含大于或等于5的RNA完整性,和/或可以进一步包含来自20ml生物样品的大于或等于50pg/ml的核酸产量。类似地,对于蛋白质浓度大于10mg/ml的体液样品,如血清或血浆,该新图谱可以进一步包含大于或等于3的RNA完整性,和/或可以进一步包含来自1ml生物样品的大于或等于50pg/ml的核酸产量。

[0011] 在又一个方面,本发明是评价来自分离自真核生物样品的微泡的核酸提取物质量的方法,其包含以下步骤:(a)从微泡中提取RNA;和(b)通过测定提取物中的18S rRNA和28S rRNA量来测量RNA的质量。优选地,在该新方法中测定的18S rRNA与28S rRNA的定量比率在约1:1~约1:2的范围内,优选为约1:2。该新方法可以在其上执行的生物样品包括,尤其是任何体液,优选尿、血清或血浆,优选来自哺乳动物,特别是人。对于蛋白质浓度低于10mg/ml的体液样品,如尿,该新方法可以进一步产生具有大于或等于5的RNA完整性的核酸提取物,和/或可以进一步产生来自20ml生物样品的大于或等于50pg/ml的核酸产量。类似地,对于蛋白质浓度大于10mg/ml的体液样品,如血清或血浆,该新方法可以进一步产生具有大于或等于3的RNA完整性的核酸提取物,和/或可以进一步产生来自1ml生物样品的大于或等于50pg/ml的核酸产量。

[0012] 在进一步方面,本发明是从生物样品中获取核酸的方法,其包含以下步骤:(a)获取生物样品;(b)在该生物样品上执行提取促进操作;和(c)从该生物样品中提取核酸。该提取促进操作由以下步骤组成:(a)向该生物样品中添加一种或多种促进剂;或(b)在提取核酸之前执行一个或多个促进步骤;或(c)添加促进剂和促进步骤相结合。该促进剂可以包括:(i)RNA酶抑制剂;(ii)蛋白酶;(iii)还原剂;(iv)诱饵底物(decoy substrate),如合成RNA;(v)可溶性受体;(vi)小干扰RNA;(vii)RNA结合分子,如抗-RNA抗体、伴侣蛋白,或RNA酶抑制蛋白;(ix)RNA酶变性物质,如高渗透压溶液或去污剂。该提取促进步骤可以包括:(x)洗涤;(xi)对样品中的RNA酶进行粗细分选;(xii)通过物理变化,如通过降低温度,或执行冷冻/解冻循环使RNA酶变性。该新方法可以在包括尤其是任何体液,优选尿、血清或血浆,优选来自哺乳动物,特别是人的生物样品上执行。在一个实施例中,从该生物样品获取衍生物,并在提取核酸之前对该衍生物执行提取促进操作。优选地,该衍生物是来自生物样品的微泡组分。在一个实施例中,该微泡组分通过过滤浓缩技术获得,但也可以利用其他已知分离技术。在本发明方法的进一步方面,在该衍生物执行促进提取操作之前,可以用核糖核酸酶、脱氧核糖核酸酶、或它们的组合对它进行处理。在一些方面,该提取促进操作包括在提取核酸之前在该生物样品中,或在该衍生物中加入RNA酶抑制剂;优选该RNA酶抑制剂在样品等于或大于1 μ l时具有大于0.027AU(1X)的浓度;可替换地,在样品等于或大于1 μ l

时具有大于或等于0.135AU(5X)的浓度;可替换地,在样品等于或大于1 μ l时具有大于或等于0.27AU(10X)的浓度;可替换地,在样品等于或大于1 μ l时具有大于或等于0.675AU(25X)的浓度;可替换地,在样品等于或大于1 μ l时具有大于或等于1.35AU(50X)的浓度,其中该1X蛋白酶浓度涉及这样的酶解条件,其中利用0.027AU或更多蛋白酶处理从1 μ l或更多体液中分离的微泡;5X蛋白酶浓度涉及这样的酶解条件,其中利用0.135AU或更多蛋白酶处理从1 μ l或更多体液中分离的微泡;10X蛋白酶浓度涉及这样的酶解条件,其中利用0.27AU或更多蛋白酶处理从1 μ l或更多体液中分离的微泡;25X蛋白酶浓度涉及这样的酶解条件,其中利用0.675AU或更多蛋白酶处理从1 μ l或更多体液中分离的微泡;50X蛋白酶浓度涉及这样的酶解条件,其中利用1.35AU或更多蛋白酶处理从1 μ l或更多体液中分离的微泡。优选地,该RNA酶抑制剂是蛋白酶。

[0013] 在又一个方面,本发明是用于从微泡中获取核酸的新试剂盒,其在一个或多个容器中包含:(a)核酸提取促进剂;(b)DNA酶、RNA酶,或二者;和(c)裂解缓冲液。该新试剂盒可以进一步包含使用该试剂盒的说明书。在本发明的新试剂盒中,该核酸提取促进剂可以包括:混合或单独的(a)RNA酶抑制剂、(b)蛋白酶、(c)还原剂、(d)诱饵底物、(e)可溶性受体、(f)小干扰RNA、(g)RNA结合分子、(h)RNA酶变性物质,或(i)任何前述试剂的组合物。

[0014] 在又一个方面,本发明是分析来自微泡的RNA的新方法,其包含以下步骤:(a)获取微泡样品;(b)用DNA酶处理该样品从而除去所有或基本所有位于该样品中微泡的表面外或表面上的任何DNA;(c)从该样品中提取RNA;和(d)分析所提取的RNA。该新方法可以在生物样品上执行,该生物样品包括尤其是任何体液,优选尿、血清或血浆,优选来自哺乳动物,特别是人。

[0015] 在进一步方面,本发明是用于诊断、监测,或治疗受试者的新方法,该方法包括以下步骤:(a)从受试者的尿样中分离出微泡组分;(b)监测该微泡组分中是否存在生物标记;其中该生物标记选自:(i)核酸类物质,(ii)核酸表达水平,(iii)核酸变体,和(iv)前述中任何一种的任何组合;而且其中该生物标记与疾病或其他医学病况的存在与否,或治疗选择方案的可行性相关联。在一些方面,该生物标记是mRNA转录物;例如,该mRNA转录物可以选自:NPHS2(podocin(在足细胞裂孔隔膜处足突质膜上有特异表达的寡聚体))、LGALS1(半乳糖凝集素-1)、HSPG2(硫酸肝素蛋白多糖)、CUBN(吞饮受体)、LRP2(兆蛋白)、AQP1(水通道蛋白1)、CA4(碳酸酐酶4)、CLCN5(氯离子通道蛋白5)、BDKRB1(缓激肽B1受体)、CALCR(降钙素受体)、SCNN1D(阿米洛利敏感钠通道 δ 亚基)、SLC12A3(噻嗪类敏感性氯化钠协同转运蛋白)、AQP2(水通道蛋白2)、ATP6V1B1(V-ATP酶B1亚基)、SLC12A1(经由RiboAmped mRNA RT-PCR的肾特异Na-K-Cl同向转运体);更优选的,该mRNA转录物是AQP2(水通道蛋白2)或ATP6V1B1(V-ATP酶B1亚基)。在新方法的进一步方面,该生物标记和疾病或其他医学病况选自:(a)NPHS2(podocin)和肾小球疾病,如激素耐药型肾病综合征;(b)如Imerslund-Gräsbeck综合征(维生素B12选择性吸收障碍综合征)中的CUBN(吞饮受体)和蛋白尿;以及(c)AQP2(水通道蛋白2)和尿崩症。

[0016] 在又一个方面,本发明是包含与选自SEQ ID NOS:1-29的第二核苷酸序列有至少90%同一性的第一核苷酸序列的分离多核苷酸分子;包含选自SEQ ID NOS:1-29的核苷酸序列片段的分离多核苷酸;或包含具有与SEQ ID NOS:1-29的任何一个中的任何13-核苷酸序列相同的至少13个核苷酸的序列的分离多核苷酸。特别地,前述多核苷酸分子可以是脱

氧核糖核苷酸或核糖核苷酸。在其他方面,本发明是包含前述分离核酸分子中任何一种的载体。在又一些其他方面,本发明是包含前述载体中的任何一种或前述分离核酸中任何一种的宿主细胞。

[0017] 在进一步方面,本发明是评估来自生物样品的核酸提取物质量的新方法,该方法包含:(a)提供生物样品;(b)从该生物样品中获取核酸提取物;(c)测量提取物中包含具有选自SEQ NOS:1-29的核苷酸序列的片段的多核苷酸分子的量;和(d)将该多核苷酸分子的量与标准物进行比较从而评估核酸提取物的质量。该新方法可以在任何生物样品上执行,例如,体液,特别是尿、血清或血浆,优选来自哺乳动物如人。这种新方法可以结合前述新核酸提取物或新提取方法中的任何一种使用。特别地,用于评估核酸提取物质量的标准物,可以通过测量来自5个以上的生物样品的核酸提取物中包含具有选自SEQ NOS:1-29的核苷酸序列的片段的多核苷酸分子的量获得。

附图说明

[0018] 图1,画面a~f是尿多泡体的电子显微镜图片。多泡体(MVB)可以在肾单位和集合导管的各个区域中识别到(见箭头)。Podo-足状突细胞,PT-近端小管,TDL-细下降枝(thin descending limb),TAL-粗上升枝(thick ascending limb),CD-PC-集合导管主细胞,CD-IC-集合导管闰细胞。定标线条=对于a、c、d、e、f为200nm;对于b为500nm。

[0019] 图2是分离的尿微泡的电子显微镜图片。人尿微泡经由差速超离心分离并利用磷钨酸作为着色剂经由TEM成像。定标线条=200nm。

[0020] 图3是描述利用100kDa MWC0过滤器方法产生的RNA图谱的图表。利用Agilent BioAnalyzer产生该图表。

[0021] 图4是描述利用超速离心方法产生的RNA图谱的图表。利用Agilent BioAnalyzer产生该图表。

[0022] 图5是描述利用x300g旋转、x17,000g旋转,和0.8 μ m过滤的三步预处理方法(A),或用仅0.8 μ m过滤(B)的一步预处理方法产生的RNA图谱的两个图表,其中在每种情况下在处理后就紧接着进行超速离心。利用Agilent BioAnalyzer产生该图表。

[0023] 图6是描述利用x300g旋转、x17,000g旋转,和0.8 μ m过滤的三步预处理方法(A),或用仅0.8 μ m过滤(B)的一步预处理方法产生的RNA图谱的两个图表,在每种情况下在处理后就紧接着进行过滤浓缩。利用Agilent BioAnalyzer产生该图表。

[0024] 图7是描述利用提取促进操作从尿中提取核酸的新方法的流程图。

[0025] 图8是描述利用使用5X与10X浓缩的蛋白酶的方法产生的RNA图谱的两个图表。通过过滤浓缩器从20ml尿样中分离出微泡。表A表示利用5X蛋白酶获得的图谱。表B表示利用10X蛋白酶获得的图谱。1X蛋白酶浓度涉及这样的酶解条件涉及这样的酶解条件,其中利用0.027AU或更多蛋白酶处理从1 μ l或更多体液中分离的微泡。5X蛋白酶浓度涉及这样的酶解条件涉及这样的酶解条件,其中利用0.135AU或更多蛋白酶处理从1 μ l或更多体液中分离的微泡。1mAU是每分钟释放相当于1 μ mol酪氨酸的folin阳性氨基酸和肽的蛋白酶活性。

[0026] 图9是描述利用使用25X与50X浓缩的蛋白酶的方法产生的RNA图谱的两个图表。通过过滤浓缩器从40ml尿样中分离出微泡。表A表示利用25X蛋白酶获得的图谱。表B表示利用50X蛋白酶获得的图谱。1X蛋白酶是指0.027AU。1mAU是每分钟释放相当于1 μ mol酪氨酸的

folin阳性氨基酸和肽的蛋白酶活性。

[0027] 图10是描述黑素瘤血清,样品1的RNA图谱的图表。利用使用RNA酶抑制剂,Suprase-In(Ambion公司)的方法从1ml血清中提取RNA。RNA酶抑制剂的最终浓度为1.6单位/ μ l微泡悬浮缓冲液。

[0028] 图11是描述黑素瘤血清,样品2的RNA图谱的图表。利用使用RNA酶抑制剂,Suprase-In(Ambion公司)的方法从1ml血清中提取RNA。RNA酶抑制剂的最终浓度为1.6单位/ μ l微泡悬浮缓冲液。

[0029] 图12是描述黑素瘤血清,样品3的RNA图谱的图表。利用使用RNA酶抑制剂,Suprase-In(Ambion公司)的方法从1ml血清中提取RNA。RNA酶抑制剂的最终浓度为1.6单位/ μ l微泡悬浮缓冲液。

[0030] 图13是描述黑素瘤血清,样品4的RNA图谱的图表。利用使用RNA酶抑制剂,Suprase-In(Ambion公司)的方法从1ml血清中提取RNA。RNA酶抑制剂的最终浓度为1.6单位/ μ l微泡悬浮缓冲液。

[0031] 图14是描述黑素瘤血清,样品5的RNA图谱的图表。利用使用RNA酶抑制剂,Suprase-In(Ambion公司)的方法从1ml血清中提取RNA。RNA酶抑制剂的最终浓度为3.2单位/ μ l微泡悬浮缓冲液。

[0032] 图15是描述黑素瘤血清,样品6的RNA图谱的图表。利用使用RNA酶抑制剂,Suprase-In(Ambion公司)的方法从1ml血清中提取RNA。RNA酶抑制剂的最终浓度为3.2单位/ μ l微泡悬浮缓冲液。

[0033] 图16是描述正常血清,样品7的RNA图谱的图表。利用使用RNA酶抑制剂,Suprase-In(Ambion公司)的方法从1ml血清中提取RNA。RNA酶抑制剂的最终浓度为1.6单位/ μ l微泡悬浮缓冲液。

[0034] 图17是描述正常血清,样品8的RNA图谱的图表。利用使用RNA酶抑制剂,Suprase-In(Ambion公司)的方法从1ml血清中提取RNA。RNA酶抑制剂的最终浓度为1.6单位/ μ l微泡悬浮缓冲液。

[0035] 图18是描述正常血清,样品9的RNA图谱的图表。利用使用RNA酶抑制剂,Suprase-In(Ambion公司)的方法从1ml血清中提取RNA。RNA酶抑制剂的最终浓度为1.6单位/ μ l微泡悬浮缓冲液。

[0036] 图19是描述正常血清,样品10的RNA图谱的图表。利用使用RNA酶抑制剂,Suprase-In(Ambion公司)的方法从1ml血清中提取RNA。RNA酶抑制剂的最终浓度为1.6单位/ μ l微泡悬浮缓冲液。

[0037] 图20是描述正常血清,样品11的RNA图谱的图表。利用使用RNA酶抑制剂,Suprase-In(Ambion公司)的方法从1ml血清中提取RNA。RNA酶抑制剂的最终浓度为3.2单位/ μ l微泡悬浮缓冲液。

[0038] 图21是描述正常血清,样品12的RNA图谱的图表。利用使用RNA酶抑制剂,Suprase-In(Ambion公司)的方法从1ml血清中提取RNA。RNA酶抑制剂的最终浓度为3.2单位/ μ l微泡悬浮缓冲液。

[0039] 图22是描述利用提取促进操作从生物样品中提取核酸的新方法的流程图。

[0040] 图23A和B以及图23C和D是描述利用带有或不带有DNA酶处理的方法产生的RNA图

谱的两个图表。在裂解和核酸提取之前通过DNA酶消化从尿样分离的微泡颗粒,除去未位于微泡内的DNA。A-使用RNeasy Micro试剂盒不经过DNA酶消化产生的图谱。B-使用RNeasy Micro试剂盒经过DNA酶消化产生的图谱。C-使用MirVana试剂盒不经过DNA酶消化产生的图谱。D-使用MirVana试剂盒经过DNA酶消化产生的图谱。注意箭头指示的小RNA峰高和面积的变化。D揭示,在基于苯酚/氯仿的提取之后,一些DNA被带入该样品中。

[0041] 图24A和B以及图24C是描述利用带有或不带有DNA酶处理的方法产生的RNA图谱的两个图表。在裂解和核酸提取之前通过DNA酶消化从尿样分离的微泡颗粒,除去未位于微泡内的DNA。A-不经过DNA酶消化产生的图谱。B-经过DNA酶消化产生的图谱。C-表现出可以与源自血清的微泡共分离的“凋亡小体”样梯状物的假凝胶。

[0042] 图25是描述利用带有或不带有RNA酶处理的方法产生的RNA图谱的两个图表。在裂解和核酸提取之前通过RNA酶消化从尿样分离的微泡颗粒,除去未位于微泡内的RNA。A-不经过RNA酶消化产生的图谱。B-经过RNA酶消化产生的图谱。

[0043] 图26是描述从尿微泡和大鼠肾组织产生的RNA图谱的两个图表。A-来自大鼠肾组织的图谱。B-来自尿微泡的图谱。

[0044] 图27是利用可以使小RNA提取物富集的方法从尿微泡和大鼠肾组织产生的RNA图谱的两个图表。A-来自大鼠肾组织的图谱。B-来自尿微泡的图谱。

[0045] 图28是描述经过或不经过DNA酶处理,从已除去而且通过分离技术未捕获到微泡的全尿产生的RNA图谱的两个图表。A-不经过DNA酶处理从全尿分离的核酸。B-经过DNA酶处理从全尿分离的核酸。

[0046] 图29是描述从尿微泡产生的RNA图谱的两个图表。A-不经过DNA酶处理从尿微泡分离的核酸。B-经过DNA酶处理从尿微泡分离的核酸。

[0047] 图30是描述由从在300g旋转期间形成的颗粒中提取的核酸产生的RNA图谱的两个图表。A-不经过DNA酶处理从300g旋转颗粒中分离的核酸。B-经过DNA酶处理从300g旋转颗粒中分离的核酸。

[0048] 图31是描述由从在17,000g旋转期间形成的颗粒中提取的核酸产生的RNA图谱的两个图表。A-不经过DNA酶处理从17,000g旋转颗粒产生的核酸图谱。B-经过DNA酶处理从17,000g旋转颗粒产生的核酸图谱。

[0049] 图32是描述由经过或不经过微泡内RNA酶消化,在微泡裂解之前外部经受RNA酶和DNA酶消化的微泡产生的RNA图谱的两个图表。A-不经过微泡内RNA酶消化产生的核酸图谱。B-经过微泡内RNA酶消化产生的核酸图谱。

[0050] 图33是描述由经过或不经过微泡内DNA酶消化,在微泡裂解之前外部经受RNA酶和DNA酶消化的微泡产生的RNA图谱的两个图表。A-不经过微泡内DNA酶消化产生的核酸图谱。B-经过微泡内DNA酶消化产生的核酸图谱。在图表B上,紧接在20秒之后的峰相比图表A中的匹配峰减小。这种减小表明,外来体内存在少量的DNA酶可消化物质。

[0051] 图34-A)是通过尿微泡的RT-PCR分析,经BioAnalyzer产生的“假凝胶”图谱,其中可以明确鉴定出RiboAmp扩增的 β -肌动蛋白和GAPDH的mRNA转录物;B)示出强调它的六个功能不同的区域的肾单位和集合导管。1.肾小球;2.近端小管;3.细下降枝;4.髓质粗上升枝;5.远曲小管;6.集合导管。

[0052] 图35表示通过来自尿微泡的RiboAmped mRNA的RT-PCR分析检测到的,经

BioAnalyzer产生的假凝胶图谱,其中可以鉴定出来自肾单位和集合导管的区域1和2的mRNA转录物编码特异基因,具体地:1.肾小球:NPHS2-podocin(在足细胞裂孔隔膜处足突质膜上有特异表达的寡聚体),LGALS1-半乳糖凝集素-1,HSPG2-硫酸乙酰肝素蛋白多糖。2.近端小管:CUBN-吞饮受体,LRP2-兆蛋白,AQP1-水通道蛋白1,CA4-碳酸酐酶4,CLCN5-氯离子通道蛋白5。

[0053] 图36表示通过来自尿微泡的RiboAmped mRNA的RT-PCR分析检测到的,经BioAnalyzer产生的假凝胶图谱,其中可以鉴定出来自肾单位和集合导管的区域3-6的mRNA转录物编码特异基因,具体地:3.细下降枝:BDKRB1-缓激肽B1受体。4.髓质粗上升枝:CALCR-降钙素受体,SCNN1D-阿米洛利敏感钠通道 δ 亚基。5.远曲小管:SLC12A3-噻嗪类敏感性氯化钠协同转运蛋白。6.集合导管:AQP2-水通道蛋白2,ATP6V1B1-vATPase B1亚基,SLC12A1-肾特异Na-K-Cl同向转运体。

[0054] 图37-A)是描述通过RT-PCR分析检测到的,V-ATPase B1KO(B1-/-)和野生型(B1+/+)小鼠中V-ATPase B1亚基和AQP2mRNA的表达的两个BioAnalyzer假凝胶图谱;B)是描述通过实时PCR分析检测到的,V-ATPase B1KO(B1-/-)和野生型(B1+/+)小鼠尿微泡和肾细胞中V-ATPase B2亚基的表达的两个图表。“NS”-没有统计学意义。

[0055] 图38是描述由尿微泡产生的RNA图谱的三个图表。在使微泡膜破裂用于核酸提取之前,未洗涤尿微泡或未用任何提取促进剂对它进行处理。三个样品用于这组提取中。该图谱分别在图A、B和C中示出。

[0056] 图39是描述由尿微泡产生的RNA图谱的三个图表。在使微泡膜破裂用于核酸提取之前,未洗涤尿微泡但用RNA酶抑制剂,RNase-In(Promega)对它进行处理。三个样品用于这组提取中。该图谱分别在图A、B和C中示出。

[0057] 图40是描述由尿微泡产生的RNA图谱的三个图表。在使微泡膜破裂用于核酸提取之前,洗涤尿微泡但未用任何RNA酶抑制剂对它进行处理。三个样品用于这组提取中。该图谱分别在图A、B和C中示出。

[0058] 图41是描述由尿微泡产生的RNA图谱的三个图表。在使微泡膜破裂用于核酸提取之前,洗涤尿微泡并用RNA酶抑制剂对它进行处理。三个样品用于这组提取中。该图谱分别在图A、B和C中示出。

[0059] 图42是在从尿微泡提取的RNA的深度测序分析中存在500个以上的转录物结果数(“尖峰(spike)”)的染色体区域的列表。该数字表示,每个染色体区域的起点和终点。例如,“chr1.-1.91625366.91625741”是指91625366和91625741号核苷酸之间的人染色体1上的区域。也指出相应的SEQ ID NO。

[0060] 图43是在PCR反应中用于扩增所指出的10个染色体区域中的序列的引物列表。例如,“chr1.-1.91625366.91625741”是指91625366和91625741号核苷酸之间的人染色体1上的区域。用于扩增这个区域的引物对是“tccagctcacgttccctatt 1L和ccaggtggggagtttgact 1R”。引物从左到右由5'伸展到3'。

[0061] 图44是描述10个富含尖峰的染色体区域PCR扩增结果的两个BioAnalyzer假凝胶图谱。每幅图顶部处的泳道编号对应于图43所示的染色体区域的编号。在A中,来自尿微泡的核酸提取物用作PCR模板。在B中,来自肾组织的核酸提取物用作PCR模板。

[0062] 图45-73是描述29个染色体区域中的尖峰的图表。该区域在每个图表的顶部指出。

例如,图46中的图表指出区域“chr1.-1.91625366.91625741”,其是91625366和91625741号核苷酸之间的人染色体1上的区域。

具体实施方式

[0063] 微泡由真核细胞脱落或从质膜中出芽到细胞外面。这些膜囊泡的直径是不均匀的,其尺寸为约10nm至约5000nm。由细胞内多泡体胞吐释放的小微泡(直径为约10至1000nm,更经常为约10至200nm)在本领域中称为“外来体(exosomes)”。本文描述的组合物、方法和用途同样适用于所有尺寸,优选10至800nm,更优选10至200nm的微泡。

[0064] 在一些文献中,术语“外来体”也称为含有参与mRNA降解和核仁小RNA(snoRNA)、核内小RNA(snRNA)和核糖体RNA(rRNA)加工的核糖核酸外切酶的蛋白质复合体(Liu等人,2006;van Dijk等人,2007)。此种蛋白质复合体不具有膜,并且不是这里使用的那些术语,“微泡”或“外来体”。

[0065] 本发明部分地基于这一发现:不利因素可以阻止生物样品中核酸的有效提取,新的意料不到的药剂和步骤可以用于缓和或除去该不利因素,从而显著提高所提取核酸的质量。因此,本发明的一方面是从生物样品提取高质量核酸的新方法。通过本文描述的新方法获得的高质量提取物的特征是高产量和高完整性,使得所提取核酸对优选高质量核酸提取物的各种应用都有用。

[0066] 概括地说,该新方法包括,例如以下步骤:获取生物样品,缓和或除去阻止生物样品中核酸的有效提取的不利因素,和从生物样品中提取核酸,任选地接着进行核酸分析。

[0067] 可适用的生物样品包括,例如,细胞、一组细胞、细胞片段、包括例如微泡的细胞产物、细胞培养物、来自受试者的身体组织,或体液。该体液可以是受试者身体的任何地方,优选外周区分离的液体,包括但不限于血液、血浆、血清、尿、痰、脊髓液、胸膜液、乳头抽吸液、淋巴液、呼吸道、肠道和泌尿生殖道的液体、泪液、唾液、母乳、淋巴系统液、精液、脑脊液、器官系统内液体(intra-organ system fluid)、腹水、肿瘤囊液、羊水及其组合。

[0068] 生物样品有时可以来自受试者。术语“受试者”倾向于包括显示出或预料具有微泡的所有动物。在特定实施例中,该受试者是哺乳动物,人或非人灵长类动物、狗、猫、马、牛,其他农场动物,或啮齿动物(例如,小鼠、大鼠、豚鼠等)。术语“受试者”和“个体”在本文可以互换地使用。

[0069] 在执行缓和或除去不利影响的步骤之前、之后或同时,可以任选地对生物样品进行加工从而获取生物样品衍生物。该生物样品衍生物可以是细胞、细胞碎片、膜囊泡、或微泡。

[0070] 在获得生物样品衍生物如微泡之前有时对生物样品进行预加工。在一些情况下,该预加工步骤是优选的。例如,可以预加工尿样从而获得尿微泡。该预加工可以通过本领域中已知的技术如低速离心和预过滤完成。例如,尿样可以经受300g的第一离心步骤从而除去该样品中的大颗粒。尿样可以经受17,000g的第二离心步骤从而除去该样品中较小的颗粒。在第二离心步骤之后,尿样可以进一步经受预过滤步骤,例如,0.8 μ m预过滤步骤。替换地,尿样可以通过预过滤步骤进行预加工,而不需经受该离心步骤中的一个或多个。

[0071] 可以从生物样品获得膜囊泡,例如微泡。在一些情况下,此种分离可以在一些情况下在不预加工生物样品的情况下执行。在其他情况下,此种分离可以在预加工生物样品之

后执行。该分离步骤对于来自生物样品的高质量核酸提取物可能是有利的。例如,该分离可以产生这些优点,如:1)存在选择性地分析疾病或肿瘤特异性核酸的可能,通过将疾病或肿瘤特异性微泡与流体样品内其他微泡分离可以获得该核酸;2)所获得的核酸与直接从流体样品提取核酸获得的产量/完整性相比,具有显著较高的产量和较高的完整性;3)可量测性,例如,从而检测以低水平表达的核酸,可以通过使来自更大体积血清的更多微泡成粒增大灵敏度;4)核酸较纯,因为在核酸提取步骤之前从微泡颗粒中除去了蛋白质和脂质、死细胞的碎片,以及其他潜在污染物和PCR抑制剂;和5)核酸提取方法方面的选择更多,因为微泡颗粒比起始血清的体积小得多,使得利用小容积列过滤器从这些微泡颗粒中提取核酸成为可能。

[0072] 从生物样品中分离微泡的方法在本领域中是已知的。例如,差速离心方法描述在Raposo等人(Raposo等人,1996)的论文、Skog等人(Skog等人,2008)的论文和Nilsson等人(Nilsson等人,2009)的论文中。阴离子交换和/或凝胶渗透色谱的方法描述在美国专利第6,899,863号和第6,812,023号中。蔗糖密度梯度或细胞器电泳的方法描述在美国专利第7,198,923号中。磁性活化细胞分选(MACS)的方法描述在Taylor和Gercel-Taylor(Taylor和Gercel-Taylor,2008)的论文中。纳米膜超滤浓缩方法描述在Cheruvanky等人(Cheruvanky等人,2007)的论文中。进一步地,可以通过新开发的使用独特微流体平台高效选择性地分离肿瘤来源的微泡的微芯片技术,从受试者的体液中鉴定和分离微泡(Chen等人)。前述参考文献中的每篇都通过引用合并在此,用于教导这些方法。

[0073] 在本文描述的方法的一个实施例中,在从体液分离的微泡中,对起源于特定细胞类型,例如,肺、胰腺、胃、小肠、膀胱、肾、卵巢、睾丸、皮肤、结直肠、乳房、前列腺、脑、食道、肝、胎盘、胎儿细胞的那些进行富集。因为该微泡通常携带来自它们的供体细胞的表面分子如抗原,表面分子可以用于鉴定、分离和/或富集来自特定供体细胞类型的微泡(Al-Nedawi等人,2008;Taylor和Gercel-Taylor,2008)。以这种方式,可以对起源于不同细胞群体的微泡中的核酸含量进行分析。例如,肿瘤(恶性及非恶性)微泡携带与肿瘤关联的表面抗原,并可以通过与这些特异性肿瘤关联的表面抗原检测、分离和/或富集。在一个实例中,该表面抗原是上皮细胞粘附分子(EpCAM),其对来自肺癌、结直肠癌、乳腺癌、前列腺癌、头部和颈部癌、和肝起源的微泡具有特异性,但对血液细胞起源的微泡没有特异性(Balzar等人,1999;Went等人,2004)。在另一个实例中,该表面抗原是CD24,CD24是对尿微泡具有特异性的糖蛋白(Keller等人,2007)。在又一个实例中,该表面抗原选自一组分子,如CD70、癌胚抗原(CEA)、EGFR、EGFRvIII,和其他变体、Fas配体、TRAIL、铁传递蛋白受体、p38.5、p97和HSP72。另外,肿瘤特异性微泡的特征是缺少表面标记,如CD80和CD86。

[0074] 特定细胞类型的微泡分离可以通过,例如使用对期望表面抗原特异的抗体、适配体、适配体类似物或分子印迹聚合物完成。在一个实施例中,该表面抗原是对癌症类型特异的。在另一个实施例中,该表面抗原是对细胞类型特异的,该细胞类型不一定是癌性的。基于细胞表面抗原的微泡分离方法的一个实例提供在美国专利第7,198,923号中。如美国专利第5,840,867号和第5,582,981号、W0/2003/050290以及Johnson等人(Johnson等人,2008)的出版物中描述的,适配体及其类似物特异性地结合表面分子,并可以用作重新获得细胞类型特异性的微泡的分离工具。分子印迹聚合物也特异性地识别表面分子,如美国专利第6,525,154号、第7,332,553号和第7,384,589号以及Bossi等人(Bossi等人,2007)的出

出版物中描述的,并且是重新获得和分析细胞类型特异性微泡的工具。前述参考文献中的每篇均通过引用合并在此,用于教导这些方法。

[0075] 在期望生物衍生物是膜囊泡如微泡的情况下,有时执行除去未位于微泡内的核酸的步骤。除去核酸的方法在本领域中是众所周知的。例如,为了从样品中除去此种核酸,可以执行酶消化步骤。此种酶可以是催化核糖核酸酶消化的核糖核酸酶类型,或催化脱氧核糖核酸酶消化的脱氧核糖核酸酶类型。

[0076] 在本发明的一个方面,该新核酸提取方法包括除去或缓和阻止生物样品中核酸的高质量提取的不利因素的步骤。此种不利因素是多种多样的,因为不同生物样品可以包含各个种类的此类不利因素。在一些生物样品中,诸如过多微泡外(extra-microvesicle)DNA的因素可能会影响来自此种样品的核酸提取物的质量,污染从微泡内提取的DNA。在其他样品中,诸如过多内源性RNA酶的因素可能会影响来自此种样品的核酸提取物质量。许多药剂和方法可以用于除去这些不利因素。这些方法和药剂统称为“提取促进操作(extraction enhancement operation)”。

[0077] 在一些情况下,提取促进操作可以包括向生物样品或向衍生物中添加核酸提取促进剂。为了除去诸如内源性RNA酶的不利因素,这里定义的此种提取促进剂可以包括,但不限于,市售RNA酶抑制剂如Superase-In(Ambion Inc.)、RNaseIN(Promega Corp.)或以类似方式起作用的其他药剂、蛋白酶、还原剂、诱饵底物如合成RNA、可结合RNA酶的可溶性受体、小干扰RNA(siRNA),RNA结合分子如抗-RNA抗体或伴侣蛋白,RNA酶变性物质如高渗透压溶液、去污剂或它们的组合。这些促进剂可以各种方式发挥作用,例如,但不限于,通过抑制RNA酶活性(例如,RNA酶抑制剂),通过蛋白质中普遍存在的降解(例如,蛋白酶),或通过结合并保护RNA的伴侣蛋白(例如,RNA-结合蛋白)。在所有情况下,此种提取促进剂可以除去或缓和生物样品的一些或全部不利因素,这些不利因素否则将会阻止或干扰生物样品中核酸的高质量提取。

[0078] 在其他情况下,该提取促进操作可以包含,执行一个或多个加工步骤。此种加工包括充分或基本上全面地洗涤样品的含核酸组分,如微泡;对该生物样品的RNA酶进行尺寸分选(size separation);通过各种技术使生物样品中的蛋白质变性,该技术包括,但不限于,产生特定pH条件、温度条件(例如,降低或较低温度的维持)、冷冻/解冻循环,及它们的组合。

[0079] 本文描述的提取促进操作的使用的一个惊人表现是,检测微泡的核酸提取物中是否存在显著量核糖体RNA(rRNA)的能力。目前没有任何现有研究可以证明在微泡核酸提取物中检测到18S rRNA和28S rRNA。相反,现有研究认为,微泡的核酸提取物中不存在或仅存在很少的rRNA(Skog等人,2008;Taylor和Gercel-Taylor,2008;Valadi等人,2007)。

[0080] 在本发明另一方面,提取促进操作的执行将可以改进所提取RNA在RNA完整性(RNA质量完整性指数,RIN)方面的质量。RNA完整性(RIN),由Agilent Technologies(<http://www.chem.agilent.com/en-us/products/instruments/lab-on-a-chip/pages/gp14975.aspx>,2010年7月15日访问)设计,是设计用于评价总RNA样品完整性的软件工具的产物。该软件自动地给真核生物的总RNA样品分配完整性。利用这个工具,样品完整性不由18S和28S核糖体条带的比率决定,而由RNA样品的整个电泳迹线(trace)决定。这包括降解产物的存在与否。分配的RIN不依赖于样品浓度、仪器、和分析人员,可以用作RNA完整性的

标准物。

[0081] 在本发明的又一个方面,提取促进操作的执行将可以提高所提取核酸的量或产量。例如,利用如本文描述的提取促进操作,可以从20ml低蛋白生物样品如尿中获得大于或等于50pg/ml的核酸产量。可替换地,可以从1ml高蛋白生物样品如血清或血浆中获得大于或等于50pg/ml的核酸产量。

[0082] 通过本文描述的方法获得的新的质量核酸提取物可以表现出,检测到的,优选约1:1~约1:2,更优选约1:2比率的18S rRNA和28S rRNA的组合物;对于低蛋白生物样品的大于或等于5的RNA完整性,或对于高蛋白生物样品的大于或等于3的RNA完整性;和来自20ml低蛋白生物样品或1ml高蛋白生物样品的大于或等于50pg/ml的核酸产量。

[0083] 高质量RNA提取物是非常理想的,因为RNA降解会严重地影响所提取RNA,如在基因表达和mRNA分析,以及非编码RNA如小RNA和微RNA分析中的下游评估。本文描述的新方法使得人们能够从生物样品如微泡中提取高质量核酸,以便可以准确地分析外来体内的基因表达和突变水平。在一个实施例中,例如,当增大用作提取促进剂的蛋白酶浓度(5X,10X)时,从尿微泡中分离的RNA量和完整性显著增大。

[0084] 本发明的另一个方面提供了从生物样品如尿中提取高质量小RNA的方法。小RNA,如miRNA在核酸提取过程中特别易于降解和损失。在这里公开的新方法中,利用高浓度的蛋白酶除去或缓和阻止小RNA的高质量提取的不利因素。在一个实施例中,提取核酸,特别是小RNA的方法使用25X和50X蛋白酶作为提取促进剂,可以获得显著增大的量的小RNA。如本文使用的,诸如5X、10X、25X和50X的表达是指是市售核酸提取试剂盒如QIAamp MinElute Virus Spin试剂盒中目前使用或推荐的蛋白酶活性水平的5倍、10倍等。

[0085] 当影响提取的不利因素已除去或缓和时,可以利用本领域众所周知的许多程序从生物样品中分离核酸分子。本领域技术人员将可以选择适合于特定核酸样品的特定分离程序。提取方法的实施例提供在本文的实施例部分中。在一些情况下,利用一些技术,也可以在不从微泡中提取的情况下分析核酸。

[0086] 在一个实施例中,可以直接分析所提取的包括DNA和/或RNA在内的核酸,无需扩增步骤。直接分析可以利用不同方法执行,包括,但不限于,纳米链(nanostring)技术。Nanostring技术使人们能够通过将彩色编码的荧光指示剂附着于每种靶分子上来鉴定和量化生物样品中的各个靶分子。这种途径与通过扫描条形码测量库存的概念类似。指示剂可以由允许高度多重分析的数百种或甚至数千种不同的编码制成。该技术描述在Geiss等人(Geiss等人,2008)的出版物中,并通过引用合并在此用于教导。

[0087] 在另一个实施例中,在分析微泡的核酸之前对它进行扩增可能是有利的或其他期望的。核酸扩增方法在本领域中是常用的且是共知的,本文描述了它的许多实例。需要时,可以这样执行扩增,以便它是定量的。定量扩增将允许定量地确定各种核酸的相对量从而产生如下面描述的图谱。

[0088] 在一个实例中,所提取的核酸是RNA。然后,在进一步扩增RNA之前,优选将它逆转录成互补DNA(cDNA)。此种逆转录可以单独执行或与扩增步骤结合执行。将逆转录和扩增步骤结合的方法的一个实例是逆转录聚合酶链反应(RT-PCR),其可以进一步修改成定量的,例如美国专利第5,639,606号中描述的定量RT-PCR,该专利通过引用合并在此用于教导。

[0089] 核酸扩增方法包括,但不限于,聚合酶链反应(PCR)(美国专利第5,219,727号)及

其变体如原位聚合酶链反应(美国专利第5,538,871号)、定量聚合酶链反应(美国专利第5,219,727号)、巢式聚合酶链反应(美国专利第5,556,773号)、自主序列复制及其变体(Guatelli等人,1990)、转录扩增系统及其变体(Kwoh等人,1989)、Qb复制酶及其变体(Miele等人,1983)、冷PCR(Li等人,2008),或任何其他核酸增殖方法,核酸扩增方法之后是所扩增分子利用本领域技术人员众所周知的技术的检测。如果此种分子以非常少的数目存在,则尤其有用的是设计用于检测核酸分子的那些检测方案。前述参考文献合并在此,用于教导这些方法。

[0090] 存在于微泡中的核酸的分析是定量和/或定性的。对于定量分析,微泡内感兴趣的特定核酸的量(表达水平),不论相对量或绝对量,都可以利用本领域已知的方法(下文描述的)测量。对于定性分析,微泡内感兴趣的特定核酸种类,不论野生型或其变体,都可以利用本领域已知的方法鉴定。

[0091] 这里公开的本发明也包括来自微泡的核酸提取物作为新物质组成,其中可在该提取物中检测到18S rRNA和28S rRNA。此种核酸提取可以利用本发明公开的新核酸提取方法完成。生物样品中微泡的高质量核酸提取在许多情况下都是期望的。在一些情况下,组织样品不容易取得(easily accessible)。例如,脑肿瘤样品不经过脑手术通常无法获得。相反,来自脑肿瘤患者血清的微泡样品容易取得。为了分析脑肿瘤细胞中的核酸,分析脑肿瘤细胞分泌的血清微泡中的核酸比较容易。所以,在用组织细胞分泌的微泡中的核酸代替来自组织细胞的核酸的情况下,期望获得这样的高质量核酸,其像从组织细胞直接获得的那些一样,包含可检测的质控物(quality controls),如18S rRNA和28S rRNA。在其他情况下,高质量小RNA是期望的。本文公开的核酸提取物包含此种高质量小RNA,以及18S rRNA和28S rRNA。此种高质量小RNA对于准确评估用于各种目的核酸,例如,特定miRNA的表达水平是重要的。

[0092] 本文公开的本发明进一步包括来自生物样品中微泡的核酸的新的的高质量图谱。此种图谱通过分析包含18S rRNA和28S rRNA的核酸提取物产生。此种图谱可以利用本文公开的新方法获得。高质量核酸图谱是许多应用,如作为医学病况或疗法选择的标记的应用所高度期望的。期望此种图谱在不同样品之间是一致的。此种一致性在不存在高质量核酸提取物的情况下几乎无法获得。在本发明的一个实施例中,核酸图谱可以通过分析这些起源的细胞分泌的微泡中的核酸来获得。此种微泡可以从容易取得的生物样品,例如尿、血清或血浆中分离出来。此种核酸图谱可以包括小RNA、信使RNA、微RNA、非编码RNA或其组合。在本发明的进一步实施例中,此种核酸图谱可以与其他生物标记结合从而更准确地获得某些结果。

[0093] 核酸图谱,例如可以是遗传畸变的集合,该集合在本文用于指微泡内的核酸量以及核酸变体。具体地,遗传畸变包括,但不限于,基因(例如,致癌基因)或一组基因的过表达、基因(例如,肿瘤抑制基因如p53或RB)或一组基因的低表达、基因或一组基因的替换剪接变体的产生、基因拷贝数变异(CNV)(例如,DNA双微体)(Hahn,1993)、核酸修饰(例如,甲基化、乙酰化和磷酸化)、单核苷酸多态性(SNP)、染色体重排(例如,倒置、缺失和重复),以及基因或一组基因的突变(插入、缺失、复制、错义、无义、同义或任何其他核苷酸改变),这种突变在许多情况下最终会影响基因产物的活性和功能,导致替换的转录剪接变体形成和/或导致基因表达水平改变。

[0094] 此种遗传畸变可以通过技术人员已知的多种技术确定。例如,核酸表达水平、替换剪接变体、染色体重排和基因拷贝数可以通过微阵列技术(美国专利第6,913,879号、第7,364,848号、第7,378,245号、第6,893,837号和第6,004,755号)和定量PCR确定。特别地,拷贝数变化可以利用Illumina Infinium II全基因组基因分型分析或Agilent Human Genome CGH Microarray(Steemers等人,2006)检测。核酸修饰可以通过例如美国专利第7,186,512号和专利申请W0/2003/023065中描述的方法分析。特别地,甲基化图谱可以通过Illumina DNA Methylation OMA003Cancer Panel测定。SNP和突变可以通过利用等位基因特异性探针进行的杂交、酶突变检测、不匹配异源双链的化学裂解(Cotton等人,1998)、不匹配碱基的核糖核酸酶裂解(Myers等人,1985)、质谱(美国专利第6,994,960号、第7,074,563号和第7,198,893号)、核酸测序、单链构象多态性(SSCP)(Orita等人,1989)、变性梯度凝胶电泳(DGGE)(Fischer和Lerman,1979a;Fischer和Lerman,1979b)、温度梯度凝胶电泳(TGGE)(Fischer和Lerman,1979a;Fischer和Lerman,1979b)、限制性片段长度多态性(RFLP)(Kan和Dozy,1978a;Kan和Dozy,1978b)、寡核苷酸连接测定法(OLA)、等位基因特异性PCR(ASPCR)(美国专利第5,639,611号)、连接酶链反应(LCR)及其变体(Abravaya等人,1995;Landegren等人,1988;Nakazawa等人,1994)、流式细胞仪异源双链分析(W0/2006/113590)及其组合/修饰检测。特别地,基因表达水平可以通过基因表达(SAGE)技术(Velculescu等人,1995)的系列分析测定。一般而言,分析遗传畸变的方法在许多出版物中有报道,不限于本文引用的那些,是技术人员可以获得的。适当的分析方法取决于分析的具体目标、患者的状况/病史,以及待检测、监测或治疗的特定癌症(或多种特定癌症)、疾病或其他医学病况。前述参考文献合并在此用于教导这些方法。

[0095] 应当理解,本发明不限于本文描述的特定方法、方案和试剂,它们是可以改变的。本文使用的术语仅为了描述特定实施例,并不是要限制本发明范围,本发明范围仅由权利要求限定。

[0096] 本发明公开的主题的实施例在下面给出。本发明公开的主题的其他特征、目的和优点可以明显地从详细说明、附图、实施例和权利要求中看出。可以利用基本类似于或等价于本文描述的方法、设备和材料的那些方法、设备和材料实施或测试本发明公开的主题。下面描述示例方法、设备、用途和材料。

[0097] 尿中的微泡

[0098] 实施例1:肾细胞含有多泡体

[0099] 为了检查肾细胞是否脱落微泡,我们使用透射电子显微镜(TEM)测定肾细胞是否含有可产生微泡的多泡体。通过利用2.0%的在0.1M pH为7.4的二甲胍酸钠缓冲液(Electron Microscopy Sciences,PA)中的戊二醛进行血管内灌注来固定大鼠肾,并进一步将肾切片在4℃下固定过夜。该样品切片用0.1M二甲胍酸钠缓冲液冲洗,室温下经1.0%的二甲胍酸盐缓冲液中的四氧化锇后固定1h,再次用缓冲液冲洗,然后用蒸馏水(dH₂O)冲洗并整块(en bloc)在室温下在2.0%乙酸铀酰水溶液中染色1小时。该样品用蒸馏水冲洗,通过梯度乙醇脱水至100%。通过将样品整夜浸泡在1:1的Epon:乙醇溶液中而完成该样品的Epon树脂(Ted Pella,CA)浸润。第二日将该样品放在新鲜Epon中数小时并于60℃下在Epon中包埋过夜。在Reichert Ultracut E ultramicrotome上切割薄片,收集在聚乙烯醇缩甲醛(formvar)包覆网上,用乙酸铀酰和柠檬酸铅染色。在80kV的JEOL JEM 1011透

射电子显微镜下检查样品。使用AMT(Advanced Microscopy Techniques,MA)数字成像系统收集图像。如图1所示,在大鼠肾组织细胞中看到MVB的透射电子显微镜(TEM)图像。可以在肾单位和集合导管的各个区域中鉴定到多泡体(MVB),该区域包括足状突细胞、近端小管、细下降枝、粗上升枝、集合导管主细胞,和集合导管闰细胞。这证明了,肾单位的各个区域以及集合导管的闰细胞和主细胞中确实可以释放外来体。

[0100] 实施例2:尿中存在微泡

[0101] 为了检查微泡本身,我们通过TEM检查了人尿微泡。根据Massachusetts General Hospital批准的IRB准则获取人尿。然后通过由三个步骤组成的方法预加工该尿:于4℃在300g下离心该尿10分钟、于4℃在17,000g下离心上清液20分钟,并通过0.8μm过滤器(硝酸纤维素膜过滤装置,Nalgene,NY)过滤上清液。可替换地,可以通过一步过滤,直接通过0.8μm过滤器过滤预加工尿,不执行任何预离心步骤。然后,在任一情况下,都将滤液在4℃下在118,000g下超速离心70分钟,除去上清液,在PBS中洗涤含微泡颗粒,于4℃在118,000g下再造粒70分钟。

[0102] 也可以利用过滤浓缩代替离心来从预加工样品中分离出微泡。根据制造商说明书调制过滤浓缩器(100kDa MWC0)(Millipore,MA)。将预加工滤液加入到过滤浓缩器中,于RT在4,000g下离心4分钟。包括15ml PBS洗涤步骤。

[0103] 按1:1比例用4%的在dH₂O中的多聚甲醛固定微泡颗粒。用滴管吸取十(10)μl滴剂到formvar包覆的200目金网中,1分钟后抽出。用dH₂O滴剂冲洗样品2次。施加含水的2.0%磷钨酸(PTA)(10μl)10秒,抽出并用dH₂O冲洗一次。在80kV的JEOL JEM 1011透射电子显微镜下检查样品。利用AMT(Advanced Microscopy Techniques,MA)数字成像系统收集图像。如图2所示,该颗粒确实富含微泡。在TEM图像中该微泡有时聚集在一起或仍然是单个的。

[0104] 从生物样品提取核酸的改进方法

[0105] 实施例3:过滤浓缩器可代替超速离心用于微泡分离

[0106] 我们在这里证明了,类似于超速离心方法,过滤浓缩器也可以产生用于提取RNA的有活力(viable)微泡。我们按照实施例2详细描述,通过于4℃在300g下离心10分钟,于4℃在17,000g离心20分钟,然后通过0.8μm过滤器过滤,预加工75ml尿。然后通过100kDa MWC0过滤浓缩器(Millipore,MA)和通过超速离心分离微泡,这两种方法都分别利用RNA酶消化,并利用和不利用DNA酶消化除去微泡外核酸污染。如图3和图4所示,该超速离心方法和过滤浓缩方法从75ml尿样中获得相似的RNA浓缩物,其中超速离心(图4)为 $410 \pm 28 \text{ pg}/\mu\text{l}$,过滤浓缩器(图3)为 $381 \pm 47 \text{ pg}/\mu\text{l}$ (平均值 $\pm$ SD)。这两个产量之间没有统计显著性差异。这些数据证明,过滤浓缩器的使用是使RNA分析用尿微泡溶胶化的可靠方法。

[0107] 实施例4:仅用0.8um预过滤步骤预处理样品的方法足以用于微泡分离

[0108] 进一步,我们发现在300g和17,000g下的低速离心步骤可以除去,因为仅用0.8um预过滤步骤预加工尿的方法与包括低速离心步骤的方法的效果一样。如图5和图6所示,利用低速离心连同0.8um预过滤的方法产生的核酸图谱(A)与仅用0.8um预过滤的方法产生的图谱(B)相同。

[0109] 实施例5:利用包括除去或缓和不利因素的方法从尿微泡中提取核酸

[0110] 我们利用微泡中核酸提取的改进方法。在这个方法中,我们在使微泡膜破裂之前除去了对高质量核酸提取不利的因素。如图7所示,通过经由0.8μm过滤器膜110过滤预加工

尿样100。然后通过超速离心或通过过滤浓缩分离滤液中的微泡120,细节类似于实施例2中描述的那些。然后使所分离的微泡经受RNA酶和/或DNA酶消化从而除去未包含在微泡内部的核酸130。具体地,将该微泡重悬在1 μ l/ml在PBS中的RNA酶A(无DNA酶和蛋白酶)(Fermentas,MD)中,在37 $^{\circ}$ C下温育1小时。为了执行DNA酶I消化,将该颗粒重悬在500 μ l PBS和稀释(根据制造商说明书)在RDD缓冲液中的DNA酶I(无RNA酶)(Qiagen,CA)中,在室温下温育10分钟。使该样品在PBS中在118,000g下再造粒70分钟。为了执行经由过滤浓缩器分离的微泡的RNA酶A和DNA酶I消化,使用相同浓度的RNA酶和DNA酶,在过滤浓缩器中进行温育。然后执行提取促进140的步骤,例如,单独或与蛋白酶处理结合的利用15ml PBS进行的三个重悬/洗涤步骤。微泡分离之后,用核酸酶消化并用蛋白酶处理,提取核酸150。根据制造商说明书利用RNeasy Micro试剂盒(Qiagen,CA)提取RNA。简言之,使用350 μ l RLT缓冲液(带有10 μ l β -巯基乙醇/ml RLT)裂解外来体,使用16 μ l无核酸酶的水进行洗脱。RNeasy Plus Micro试剂盒(Qiagen,CA)设计用于除去基因组DNA(gDNA),根据制造商说明书执行,并用16 μ l无核酸酶的水洗脱。为了使用RNeasy Micro试剂盒或RNeasy Plus Micro试剂盒分离小RNA,根据制造商说明书执行miRNA分离方法。使用Agilent BioAnalyzer(Agilent,CA)在RNA Pico 6000芯片(Agilent,CA)上分析分离的RNA 160,该Agilent BioAnalyzer可以产生该样品的电泳图和相应的“假凝胶”。

[0111] 如图8和图9所示,当在使微泡膜破裂之前用来处理微泡的蛋白酶增多时,从尿微泡提取的RNA质量(就产量和完整性而言)增大。在图8中,利用上面的改进方法从20ml尿中的微泡中提取核酸,但使用Qiagen Qiamin elute virus spin试剂盒执行RNA提取。利用过滤浓缩对该尿样品进行浓缩并用200 μ l PBS洗脱。这里,我们将1X蛋白酶定义为0.027AU;5X蛋白酶定义为0.135AU;10X蛋白酶定义为0.27AU;25X蛋白酶定义为0.675AU;50X定义为1.35AU。当蛋白酶浓度从5X(A)增大到10X(B)时,观察到具有更大完整性的18S rRNA和28S rRNA峰。同样地,如图9所示,在较高的蛋白酶浓度,25X(A)和50X(B)下,除了小/miRNA水平增大之外,我们还观察到具有更高完整性的18S rRNA和28S rRNA。这些数据表明,加入蛋白酶可以增大18S rRNA和28S rRNA的产量和完整性以及增多小RNA和微RNA。我们推测,蛋白酶的作用可能是由于它具有消化掉RNA酶和其他抑制因素的能力引起。

[0112] 增加洗涤微泡多次的步骤也显著改进了从尿微泡提取的核酸质量。该洗涤步骤可以有效地除去阻止尿微泡的高质量核酸提取的不利因素。按照上面的方法,但作一些修改,将各20ml尿样品用于四组核酸提取测试。对于第1组,分离的微泡直接用于核酸提取,而没有进行任何干预步骤。对于第2组,在核酸提取之前用RNA酶抑制剂处理微泡。对于第3组,在核酸提取之前,洗涤微泡,但未用任何RNA酶抑制剂处理。对于第4组,在核酸提取之前,洗涤微泡,并用RNA酶抑制剂处理。如图38所示,对于第1组测试,所提取核酸的质量非常差,其中RIN为 3.63 ± 2.3 ,RNA浓度为 101.3 ± 27.6 pg/ μ l。对于第2组测试(图39),所提取核酸的质量大致类似于1组测试中的,其中RIN为 1.83 ± 2.2 ,RNA浓度为 101.6 ± 88 pg/ μ l。对于第3组测试(图40),所提取核酸的质量显著改进,其中RIN为 9.2 ± 0.0 ,RNA浓度为 347.7 ± 97.7 pg/ μ l。对于4组测试(图41),所提取核酸的质量类似于第3组中的,其中RIN为 7.43 ± 0.2 ,RNA浓度为 346.3 ± 32.7 pg/ μ l。这些数据表明,要是没有洗涤步骤,来自微泡的提取物质量将会不一致,相比在核酸提取之前洗涤微泡的情况下的那些提取物具有相对较高的变化。

[0113] 实施例6:RNA酶抑制剂在血清微泡的核酸提取中的应用

[0114] 利用上面的改进方法,也可以从血清微泡中获取高质量核酸提取物。这里,我们获得来自黑素瘤的血清和正常患者血清,并使用RNA酶抑制剂鸡尾酒SUPERase-In™(Ambion Inc.)通过重悬处理微泡颗粒。在一批试验中,我们从一式四份的1ml黑素瘤血清样品分离出微泡,并用最终浓度为1.6单位/ μ l的SUPERase-In处理该微泡。该微泡分离方法是超速离心,在室温下用DNA酶处理该微泡颗粒20分钟。如图10-13所示,来自四个黑素瘤血清样品的RNA提取物质量低下而且不一致,RNA产量为543pg/ μ l、607pg/ μ l、1084pg/ μ l、1090pg/ μ l,通过28s/18s比率估计RNA完整性分别为1.7、1.8、1.3和0.6。在另一批试验中,我们从一式两份的1ml黑素瘤血清样品中分离出微泡,并用最终浓度为3.2单位/ μ l的SUPERase-In处理该微泡。如图14和图15所示,来自经3.2单位SUPERase-In/ μ l处理的两个黑素瘤血清样品的RNA提取物质量一般优于经1.6单位SUPERase-In/ μ l处理的那些的RNA提取物质量。该两个黑素瘤血清样品的RNA产量为3433pg/ μ l和781pg/ μ l,28S/18S比率分别为1.4和1.5。

[0115] 进一步,我们测试了在1.6单位SUPERase-In/ μ l的情况下的一式四份的1ml正常血清样品,和在3.2单位SUPERase-In/ μ l的情况下的一式两份的1ml正常血清样品。如图16-图19所示,在1.6单位SUPERase-In/ μ l的情况下的RNA提取物质量低下,RNA产量为995pg/ μ l、1257pg/ μ l、1027pg/ μ l和1206pg/ μ l,28S/18S比率分别为1.3、1.6、1.6、1.8。相比之下,如图20和图21所示,在3.2单位SUPERase-In/ μ l的情况下的RNA提取物质量得到提高,RNA产率为579pg/ μ l和952pg/ μ l,28S/18S比率为1.6和2.3。

[0116] 实施例7:提取促进剂在来自生物样品的核酸提取物中的应用

[0117] 在实施例3和实施例4中,我们的测试结果表明,利用提取促进剂处理可以提高来自微泡的RNA提取物质量。期望此种提取促进剂将对其他生物样品有类似作用。如图22所示,本发明的核酸提取新方法将需要对生物样品执行提取促进操作的步骤。此种方法可以在下面设想的核酸提取实验中举例说明。医生为患者开出肿瘤标记测试。然后从该患者抽取5ml血。有时对血样200进行预加工从而得到血清。然后执行促进操作210,例如,在该血清中加入合适量的提取促进剂,并将该混合物在37℃下温育30分钟。然后利用常规提取方法如实施例5中详细描述,从经处理血清中提取核酸220,并利用Agilent BioAnalyzer进行分析230。期望此种提取可以从生物样品中获得高质量核酸。

[0118] 来自尿微泡的核酸用作生物标记

[0119] 实施例8:尿微泡被游离的微泡外非细胞DNA污染

[0120] 我们将尿样分成两个25ml完全一样的样品,并通过上面详细描述的差速离心从该两个子样品中分离出微泡。在一个子样品中,我们用DNA酶处理该微泡,并如上详细描述的,从经处理微泡中提取核酸。在另一个子样品中,我们没有用DNA酶处理该微泡,并从未经处理的微泡中提取核酸。如图23A和B以及图23C和D所示,游离的微泡外非细胞DNA使分离的尿微泡受到污染。当使用RNeasy micro试剂盒提取核酸(图23A和B)时,结果显示在未经处理的样品(A)中看到的核酸比在经处理样品(B)中看到的核酸多,因为(A)中的峰一般高于(B)中的峰。

[0121] 在另一个测试中,我们使用血清样品代替尿样进行类似的测试。如图24A和B以及图24C所示,游离的微泡外非细胞DNA也使得分离的血清微泡受到污染。在未经DNA酶处理的样品(A)中看到的核酸比在经DNA酶处理的样品(B)中看到的核酸多,因为(A)中的峰一般高于(B)中的峰。类似地,当使用MirVana试剂盒提取核酸时,如图23C和D所示,结果也显示,在

未经处理的样品(C)中看到的核酸比在经处理样品(D)中看到的核酸多,因为(C)中的峰一般高于(D)中的峰。未经处理的样品中的多余核酸有可能来自于DNA酶易感的“凋亡小体”,因为看到DNA酶易感的“凋亡小体”-样梯状物,如图24C中的假凝胶中所示的。在尿和血清样品中,游离的微泡外非细胞DNA的量在不同受试者之间有所不同,但这种DNA的大小在大约25~1500个碱基对的范围内。

[0122] 实施例9:尿微泡大多没有被游离的微泡外非细胞RNA污染

[0123] 我们将尿样分成两个25ml完全一样的样品,并通过上面详细描述的差异离心从这两个子样品中分离出微泡。在一个子样品中,我们用RNA酶处理该微泡,并如上详细描述的,从经处理微泡中提取核酸。在另一个子样品中,我们没有用RNA酶处理该微泡,并从未经处理的微泡中提取核酸。如图25所示,分离的尿微泡几乎没有被游离的微泡外非细胞RNA所污染。未经RNA酶处理的样品(A)的曲线大部分与RNA酶处理的样品(B)的曲线重叠,表明不存在与分离的微泡关联的游离的微泡外非细胞RNA。这可能是由于尿中存在的核糖核酸酶引起的。

[0124] 实施例10:Agilent BioAnalyzer测得尿微泡和肾细胞中的核酸图谱相似

[0125] 我们从尿微泡和肾(肾脏)组织中提取了核酸,并将它们的图谱加以比较。从尿微泡中提取核酸的方法详细描述在实施例5中。经由RNeasy Mini试剂盒和RNeasy Plus试剂盒对大鼠肾脏样品进行加工。为了测定大鼠肾脏样品中的小RNA量,还根据制造商说明书利用miRNA分离方法通过该两个试剂盒对它们进行加工。

[0126] 如图26所示,它们的图谱(A-肾脏,B-微泡)非常相似,包括18S rRNA峰和28S rRNA峰的存在和完整性。此种18S rRNA和28S rRNA峰在先前报道的血清来源或细胞培养基来源的微泡中未曾看到。

[0127] 除了rRNA峰相似之外,尿微泡还含有与从肾细胞获得的小RNA图谱相似的小RNA图谱。如图27所示,尿微泡(B)和肾组织(A)都含有小RNA(约25-200个碱基对)并共有相似的样式。

[0128] 这些数据表明,利用本发明公开的新核酸提取方法时,可以利用尿微泡中的图谱检查该微泡起源的肾细胞中的图谱。

[0129] 实施例11:尿微泡与全尿中的RNA图谱不同

[0130] 我们发现,尿微泡中的RNA图谱与全尿中的那些不同。我们将75ml一式两份尿样用于测试。首先于4℃在300g下预处理该尿10分钟,于4℃在17,000g下离心上清液20分钟,并通过0.8μm过滤器(硝酸纤维素膜过滤装置,Nalgene,NY)过滤上清液,接着进行实施例5中详细描述的步骤,如此从尿微泡中分离出RNA。根据制造商说明书利用ZR尿RNA分离试剂盒(Zymo Research,CA)从全尿中分离出RNA。为了从经Zymo加工的样品中除去DNA,将洗脱的RNA重悬在350μl RLT缓冲液中,通过利用DNA酶除去关联DNA的RNeasy Plus Micro试剂盒进行加工,并用16μl无核酸酶的水洗脱。

[0131] 如图28所示,在不使用DNA酶时利用ZR尿RNA分离试剂盒可以分离出大量核酸(A)。但该图谱似乎宽广,缺少18S rRNA和28S rRNA峰。进一步地,当使用DNA酶时该图谱发生显著地变化(B),表明该提取物的大部分在性质上为DNA。相比之下,如图29所示,来自相同尿样品的微泡的RNA图谱一般与来自全尿提取物的图谱有着很大的不同。在该微泡图谱中,存在18S rRNA和28S rRNA峰。另外,来自微泡的RNA比来自全尿的RNA丰富。当将未经DNA酶处

理的图谱(A)与经过DNA酶处理的图谱(B)相比较时,可以看出来自微泡的提取物的DNA酶消化没有显著影响rRNA峰。来自300g颗粒(图30)和17,000g颗粒(图31)的RNA图谱类似于来自全尿提取物的RNA图谱。在这两种图谱中,当将未经DNA酶处理的图谱(A)与经过DNA酶处理的图谱(B)相比较时,可以看出在DNA酶处理之后该峰显著降低。这些数据表明DNA是该提取物中的主要物质,并且检测不到18S rRNA和28S rRNA峰。因此,结合实施例10中的数据,可以看出来自尿微泡的RNA图谱比来自全尿的图谱更类似于肾细胞图谱。进一步地,来自微泡的RNA提取物的完整性比来自全尿的至少强10倍。

[0132] 实施例12:尿微泡含有RNA和DNA

[0133] 通过首先用RNA酶和DNA酶处理该颗粒从而除去游离的微泡外非细胞污染,接着在基于柱的核酸分离期间使微泡内核酸经受RNA酶和/或DNA酶消化,我们确定了尿微泡是否含有RNA、DNA或二者。与未经RNA酶消化的核酸图谱(A)相比,RNA酶消化(B)几乎完全破坏了核酸图谱(图32)。这些数据表明,RNA是微泡内最丰富的核酸。如图33所示,在用DNA酶对RNA酶处理的样品进行柱上消化之后(B),与进一步DNA酶消化之前的峰(A)相比,在内部进一步DNA酶消化之后仅20s之后的峰减小。这种减小证明,微泡内存在少量的DNA酶可消化物质,优选DNA。

[0134] 实施例13:尿微泡含有来自肾单位和集合导管各个区域的mRNA转录物编码特异基因

[0135] 如实施例10所示,通过Agilent BioAnalyzer测得,尿微泡和肾细胞中的核酸图谱相似。这里我们进一步证明,微泡含有来自肾单位和集合导管各个区域的mRNA转录物编码特异基因。从来自2个人受试者(年龄为23至32岁)的200ml尿中分离出尿微泡,在外来体裂解和RNA提取之前用RNA酶和DNA酶对它进行消化,如实施例5中详细描述。利用RiboAmp (Molecular Devices, CA)对所提取的RNA进行两轮mRNA扩增。对于核糖扩增(riboamplification),对于第一轮体外转录步骤,将样品在42℃下温育4小时,而对于第二轮体外转录步骤,将样品在42℃下温育6小时。在65℃下使扩增的RNA变性5分钟,并按Qiagen Omniscript方案(Qiagen, CA)中描述的进行第一链cDNA合成。在所有样品中都识别到GAPDH和β-肌动蛋白基因(图34-A)。我们检查了肾单位和集合导管各个区域所特有的15个转录物(图34-B)。这些包括与各种肾病有关的蛋白质和受体,包括来自肾小球的podocin、来自近端小管的吞饮受体和来自集合导管的水通道蛋白2。

[0136] 对于人样品,所使用的PCR引物为ACTB UTR,

[0137] 正向5'-GAAGTCCCTTGCCATCCTAA-3',

[0138] 反向5'-GCTATCACCTCCCCTGTGTG-3';

[0139] GAPDH EX,正向5'-ACACCCACTCCTCCACCTTT-3',

[0140] 反向5'-TGCTGTAGCCAAATTCGTTG-3';

[0141] NPHS2UTR,正向5'-AACTTGGTTCAGATGTCCCTTT-3',

[0142] 反向5'-CAATGATAGGTGCTTGTAGGAAG-3';

[0143] LGALS1EX,正向5'-GGAAGTGTTCAGAGGTGTG-3',

[0144] 反向5'-TTGATGGCCTCCAGGTTG-3';

[0145] HSPG2UTR,5'-AAGGCAGGACTCACGACTGA-3',

[0146] 反向5'-ATGGCACTTGAGCTGGATCT-3';

- [0147] CUBN EX, 正向5'-CAGCTCTCCATCCTCTGGAC-3',
- [0148] 反向5'-CCGTGCATAATCAGCATGAA-3';
- [0149] LRP2EX, 正向5'-CAAAATGGAATCTCTTCAAACG-3',
- [0150] 反向5'-GTCGCAGCAACACTTTCCTT-3';
- [0151] AQP1UTR, 正向5'-TTACGCAGGTATTTAGAAGCAGAG-3',
- [0152] 反向5'-AGGGAATGGAGAAGAGAGTGTG-3';
- [0153] CA4UTR, 正向5'-ATGATGGCTCACTTCTGCAC-3',
- [0154] 反向5'-TCATGCCTAAAGTCCACCT-3';
- [0155] CLCN5EX, 正向5'-GTGCCTGGTTACACACAACG-3',
- [0156] 反向5'-AGGATCTTGGTTCGCCATCT-3';
- [0157] BDKRB1UTR, 正向5'-GTGGTTGCCTTCTGGTCT-3',
- [0158] 反向5'-ATGAAGTCCTCCCAAAGCA-3';
- [0159] CALCR UTR, 正向5'-ATTTTGCCACTGCCTTTCAG-3',
- [0160] 反向5'-ATTTTCTCTGGGTGCGCTAA-3';
- [0161] SCNN1D UTR, 正向5'-GCGGTGATGTACCCATGCT-3',
- [0162] 反向5'-CTGAGGTGGCTAGGCTTGA-3';
- [0163] SLC12A3EX, 正向5'-AGAACAGAGTCAAGTCCCTTCG-3',
- [0164] 反向5'-TATGGGCAAAGTGATGACGA-3';
- [0165] AQP2UTR, 正向5'-GCAGTTCCTGGCATCTCTTG-3',
- [0166] 反向5'-GCCTTTGTCCTTCCCTAACCC-3';
- [0167] ATP6V1B1EX, 正向5'-AGGCAGTAGTTGGGGAGGAG-3',
- [0168] 反向5'-CGAGCGTTCTCGTAGGG-3';
- [0169] SLC12A1EX, 正向5'-CAGATGCAGAACTGGAAGCA-3',
- [0170] 反向5'-GGAAGGCTCAGGACAATGAG-3'。“UTR”是指设计在UTR中的引物,“EX”是指跨外显子设计的引物。该PCR方案为94℃5分钟;94℃40s;55℃30s;65℃1分钟,30个循环;以及68℃4分钟。对于小鼠样品,所用的引物为:AQP2:正向5'-GCCACCTCCTTGGGATCTATT-3',反向5'-TCATCAAACCTTGCCAGTGACAAC-3';
- [0171] V-ATPase B1亚基:正向5'-CTGGCACTGACCACGGCTGAG-3',
- [0172] 反向5'-CCAGCCTGTGACTGAGCCCTG-3'。该PCR方案为94℃5分钟;94℃40s,55℃30s,65℃1分钟,30个循环;和68℃4分钟。
- [0173] 如图34,组A所示,容易在BioAnalyzer产生的4个人受试者尿微泡的假凝胶中,检测到RiboAmp扩增的β-肌动蛋白和GAPDH的mRNA转录物。为了清楚起见,在图34,组B中示出肾单位和集合导管的六个区域。通过来自尿外来体的RiboAmped mRNA的RT-PCR分析,还容易检测该六个区域中的下列转录物:区域1肾小球:NPHS2-podocin、LGALS1-半乳糖凝集素-1、和HSPG2-硫酸乙酰肝素蛋白多糖(图35);区域2近端小管:CUBN-吞饮受体、,LRP2-兆蛋白、AQP1-水通道蛋白1、CA4-碳酸酐酶4、和CLCN5-氯离子通道蛋白5(图35);区域3细下降枝:BDKRB1-缓激肽B1受体(图36);区域4髓质粗上升枝:CALCR-降钙素受体、和SCNN1D-阿米洛利敏感钠通道δ亚基(图36);区域5远曲小管:SLC12A3-噻嗪类敏感性氯化钠协同转运蛋白(图36);区域6集合导管:AQP2-水通道蛋白2、ATP6V1B1-vATPase B1亚基、和SLC12A1-肾

特异Na-K-Cl同向转运体(图36)。

[0174] 因此,可以识别到来自所检查的所有肾区的mRNA转录物,表明肾单位和集合导管的所有区域都释放含有mRNA的微泡,并且微泡可以是肾病的核酸生物标记的新非侵入性来源。

[0175] 实施例14:尿微泡内一些mRNA转录物对肾细胞有特异性

[0176] 如果利用微泡中的核酸非侵入性地检查导致疾病的肾基因,则微泡中的转录物要对肾细胞有特异性。这里,我们证明mRNA转录物对肾细胞有特异性。我们使用缺乏V-ATP酶B1亚基的基因敲除小鼠。V-ATPase B1的缺乏可以导致小鼠肾性酸中毒(Finberg KE, Wagner CA, Bailey MA, et al., The B1-subunit of the H(+)ATPase is required for maximal urinary acidification. Proc Natl Acad Sci USA 102:13616-13621, 2005)。

[0177] 所有动物实验都是根据Massachusetts General Hospital批准的动物道德准则执行的。V-ATPase B1亚基基因敲除动物已被描述(Finberg KE, Wagner CA, Bailey MA, 等人. The B1-subunit of the H(+)ATPase is required for maximal urinary acidification. Proc Natl Acad Sci USA 102:13616-13621, 2005)。为了收集尿,将2个组(n=4只动物,每组)中的动物关在代谢笼中72小时(也可以通过每个笼子关一只动物来获得充足RNA),收集尿用于上面针对人尿描述的微泡分离和分析。为了提取肾,使用戊巴比妥钠(Nembutal)(Abbott Laboratories, IL)(65mg/kg体重,腹膜内注射)使动物麻醉,立即取出肾脏并冷冻在液氮中。在液体氮气浴中使用杵和研钵碾碎冷冻的肾脏,将其重悬在RNAlater(Qiagen, CA)中,并以1ml等分试样储存在-80℃下。为了提取RNA,在冰上使该等分试样解冻,在350μl RLT缓冲液(带有10μlβ-巯基乙醇/ml RLT)中使50μ裂解。通过包括DNA消化步骤的RNeasy Mini试剂盒(Qiagen, CA)对小鼠肾脏样品进行加工。

[0178] 为了执行实时PCR分析,使从小鼠尿微泡提取的RNA在65℃下变性5分钟,并按Qiagen Sensiscript方案(Qiagen, MD)中描述的执行第一链cDNA合成。为了执行Sensiscript逆转录,使用最终浓度为1μM(Applied Biosystems, CA)的寡-dT引物。根据使用14个预扩增循环的制造指南(Applied Biosystems, CA),在TaqMan PreAmp Master Mix试剂盒中使用所得cDNA。然后用1X TE缓冲液(Promega, WI)稀释预扩增产物。然后根据Taqman Preamplification指南(Applied Biosystems, CA)将所得cDNA用作实时PCR模板。在SmartSpec 3000(Bio-Rad, CA)上测量小鼠肾RNA浓度,并将所有样品稀释至90ng/μl。使小鼠肾RNA在65℃下变性5分钟,并按Qiagen Omniscript方案(Qiagen, MD)中描述的执行第一链cDNA合成。在执行Omniscript逆转录时,使用最终浓度为1μM(Applied Biosystems, CA)的寡-dT引物,然后在随后的实时PCR反应中每孔使用1μl所得cDNA。该实时PCR反应利用TaqMan Gene Expression Master Mix and Expression Assays(Mouse GAPD Part Number 4352339E和小鼠Atp6v1b2分析id Mm00431996_mH)在ABI 7300 Real Time PCR System(Applied Biosystems, CA)上进行。

[0179] 我们从基因敲除小鼠的肾组织和尿微泡中提取RNA。我们利用RT-PCR检查了V-ATP酶B1亚基和水通道蛋白2(AQP2)mRNA的表达。如图37,组A所示,在双突变小鼠(B1-/-)的肾脏和尿微泡样品中都没有检测到V-ATPase B1亚基转录物,这与这些小鼠中的V-ATPase B1亚基基因被敲除的事实吻合。相反,野生型小鼠(B1+/+)的肾脏和微泡样品中存在V-ATP酶B1亚基转录物。在B1基因敲除或野生型小鼠的肾和微泡样品中容易检测到AQP2mRNA,这是

期望的,因为V-ATP酶B1亚基缺失没有影响AQP2的表达。进一步地,如图37,组B所示,B1基因敲除小鼠的微泡中V-ATPase B2亚基的表达水平与野生小鼠的微泡中的水平没有统计学差异。基因敲除小鼠的肾脏细胞中V-ATPase B2亚基的表达水平与野生型小鼠的肾脏细胞中的水平也是如此。因此,肾脏细胞中存在的转录物可以在该肾脏细胞分泌的尿微泡中检测到,而肾脏细胞中不存在的转录物无法在该肾脏细胞分泌的尿微泡中检测到。因此,尿微泡中的转录物对肾细胞具有特异性,并且是肾细胞转录物的非侵入性生物标记。

[0180] 实施例15:尿微泡含有非编码RNA转录物

[0181] 分离尿微泡,根据实施例5中详细描述的上面的方法提取核酸。我们对尿微泡RNA进行深度测序,发现在某些染色体上存在表现出极端转录(extreme transcription)的随机区。当对转录物数目与染色体上的位置进行作图时,这些转录物以“尖峰”形式出现。这些转录物比众所周知的内源性标记如GAPDH或肌动蛋白更丰富地表达,一般位于染色体的非编码区中。这些尖峰序列的相对高水平表达揭示,这些序列也可以在染色体激活和细胞调控方面发挥重要作用。

[0182] 我们识别出存在500个以上的尖峰的29个区域。该29个区域在图42中示出,对应于SEQ ID NO.1-29。所绘制的这29个区域中的尖峰在图45-图73中示出。最高度表达的尖峰转录物序列的PCR分析证明,它们确实存在于人尿微泡和人肾细胞中,表明这些序列不是深度测序的人工产物。用于扩增10个此种尖峰丰富区域的引物在图43中示出。根据下面方案执行PCR:起始在95℃下变性8分钟;由95℃变性40秒、55℃退火30秒和65℃延伸1分钟三个步骤组成的30个循环;最终在68℃下延伸5分钟;以及在用BioAnalyzer分析该反应之前保持在4℃下。如图44所示,使用模板,在人尿微泡(A)和人肾细胞(B)中,这10个区域中每个的扩增都给出现阳性结果,表明这些尖峰转录物确实存在于微泡和人肾细胞中。

[0183] 这些丰富的尖峰转录物可以用于评估来自生物样品的核酸提取物质量。例如,该尖峰转录物中任一种的量都可以代替普通标记如GAPDH或ACTIN多核苷酸分子,用于评估来自尿微泡的核酸质量。尿微泡中GAPDH或ACTIN RNA的量非常低,以至于需要额外扩增步骤如RiboAMP来测量它们的量。相比之下,尖峰转录物中任一种的量非常高,以至于不需要额外扩增步骤。因此,这些尖峰转录物的使用可以使核酸提取物质量的评估更高效且更简单。因此,本文描述的本发明另一方面是评估来自生物样品,如人尿样品的核酸提取物质量的新方法。该方法可以通过以下操作完成:通过从生物样品中提取核酸,测量尖峰转录物中任一种的量,和将该量与已针对特定生物样品确定的标准进行比较。此种标准可以是,例如,从10个正常人尿样中提取的此类尖峰转录物的平均量,可由经验丰富的生物技术人员确立。

[0184] 虽然本发明是参考某些实施例公开的,但在不偏离由所附权利要求限定的本发明范围的情况下可以对所描述的实施例作出许多修改、更改和改变。因此,本发明不限于所描述的实施例,本发明覆盖由权利要求及其等价形式的语言限定的全部范围。

[0185] 参考文献:

[0186] Abravaya,K.,J.J.Carrino,S.Muldoon,and H.H.Lee.1995.Detection of point mutations with a modified ligase chain reaction(Gap-LCR).Nucleic Acids Res.23:675-82.

[0187] Al-Nedawi,K.,B.Meehan,J.Micallef,V.Lhotak,L.May,A.Guha,and

- J.Rak.2008.Intercellular transfer of the oncogenic receptor EGFRvIII by microvesicles derived from tumour cells.Nat Cell Biol.10:619-24.
- [0188] Balzar,M.,M.J.Winter,C.J.de Boer,and S.V.Litvinov.1999.The biology of the 17-1A antigen(Ep-CAM).J Mol Med.77:699-712.
- [0189] Bossi,A.,F.Bonini,A.P.Turner,and S.A.Piletsky.2007.Molecularly imprinted polymers for the recognition of proteins:the state of the art.Biosens Bioelectron.22:1131-7.
- [0190] Chen,C.,J.Skog,C.H.Hsu,R.T.Lessard,L.Balaj,T.Wurdinger,B.S.Carter,X.O.Breakefield,M.Toner,and D.Irimia.Microfluidic isolation and transcriptome analysis of serum microvesicles.Lab Chip.10:505-11.
- [0191] Cheruvanky,A.,H.Zhou,T.Pisitkun,J.B.Kopp,M.A.Knepper,P.S.Yuen,and R.A.Star.2007.Rapid isolation of urinary exosomal biomarkers using a nanomembrane ultrafiltration concentrator.Am J Physiol Renal Physiol.292:F1657-61.
- [0192] Cocucci,E.,G.Racchetti,and J.Meldolesi.2009.Shedding microvesicles: artefacts no more.Trends Cell Biol.19:43-51.
- [0193] Cotton,R.G.,N.R.Rodrigues,and R.D.Campbell.1988.Reactivity of cytosine and thymine in single-base-pair mismatches with hydroxylamine and osmium tetroxide and its application to the study of mutations.Proc Natl Acad Sci U S A.85:4397-401.
- [0194] Fischer,S.G.,and L.S.Lerman.1979a.Length-independent separation of DNA restriction fragments in two-dimensional gel electrophoresis.Cell.16:191-200.
- [0195] Fischer,S.G.,and L.S.Lerman.1979b.Two-dimensional electrophoretic separation of restriction enzyme fragments of DNA.Methods Enzymol.68:183-91.
- [0196] Geiss,G.K.,R.E.Bumgarner,B.Birditt,T.Dahl,N.Dowidar,D.L.Dunaway,H.P.Fell,S.Ferree,R.D.George,T.Grogan,J.J.James,M.Maysuria,J.D.Mitton,P.Oliveri,J.L.Osborn,T.Peng,A.L.Ratcliffe,P.J.Webster,E.H.Davidson,and L.Hood.2008.Direct multiplexed measurement of gene expression with color-coded probe pairs.Nat Biotechnol.26:317-25.
- [0197] Guatelli,J.C.,K.M.Whitfield,D.Y.Kwoh,K.J.Barringer,D.D.Richman,and T.R.Gingeras.1990.Isothermal,in vitro amplification of nucleic acids by a multienzyme reaction modeled after retroviral replication.Proc Natl Acad Sci USA.87:1874-8.
- [0198] Hahn,P.J.1993.Molecular biology of double-minute chromosomes.Bioessays.15:477-84.Johnson,S.,D.Evans,S.Laurenson,D.Paul,A.G.Davies,P.K.Ferrigno,and C.Walti.2008.Surface-immobilized peptide aptamers as probe molecules for protein detection.Anal Chem.80:978-83.
- [0199] Kan,Y.W.,and A.M.Dozy.1978a Antenatal diagnosis of sickle-cell

anaemia by D.N.A.analysis of amniotic-fluid cells.Lancet.2:910-2.

[0200] Kan,Y.W.,and A.M.Dozy.1978b.Polymorphism of DNA sequence adjacent to human beta-globin structural gene:relationship to sickle mutation.Proc Natl Acad Sci USA.75:5631-5.

[0201] Keller,S.,C.Rupp,A.Stoeck,S.Runz,M.Fogel,S.Lugert,H.D.Hager,M.S.Abel-Bakky,P.Gutwein,and P.Altevogt.2007.CD24 is a marker of exosomes secreted into urine and amniotic fluid.Kidney Int.72:1095-102.

[0202] Kwoh,D.Y.,G.R.Davis,K.M.Whitfield,H.L.Chappelle,L.J.DiMichele,and T.R.Gingeras.1989.Transcription-based amplification system and detection of amplified human immunodeficiency virus type 1 with a bead-based sandwich hybridization format.Proc Natl Acad Sci U S A.86:1173-7.

[0203] Landegren,U.,R.Kaiser,J.Sanders,and L.Hood.1988.A ligase-mediated gene detection technique.Science.241:1077-80.

[0204] Li,J.,L.Wang,H.Mamon,M.H.Kulke,R.Berbeco,and G.M.Makrigiorgos.2008.Replacing PCR with COLD-PCR enriches variant DNA sequences and redefines the sensitivity of genetic testing.Nat Med.14:579-84.

[0205] Liu,Q.,J.C.Greimann,and C.D.Lima.2006.Reconstitution,activities,and structure of the eukaryotic RNA exosome.Cell.127:1223-37.

[0206] Miele,E.A.,D.R.Mills,and F.R.Kramer.1983.Autocatalytic replication of a recombinant RNA.J Mol Biol.171:281-95.

[0207] Myers,R.M.,Z.Larin,and T.Maniatis.1985.Detection of single base substitutions by ribonuclease cleavage at mismatches in RNA:DNA duplexes.Science.230:1242-6.

[0208] Nakazawa,H.,D.English,P.L.Randell,K.Nakazawa,N.Martel,B.K.Armstrong,and H.Yamasaki.1994.UV and skin cancer:specific p53 gene mutation in normal skin as a biologically relevant exposure measurement.Proc Natl Acad Sci USA.91:360-4.

[0209] Nilsson,J.,J.Skog,A.Nordstrand,V.Baranov,L.Mincheva-Nilsson,X.O.Breakefield,and A.Widmark.2009.Prostate cancer-derived urine exosomes:a novel approach to biomarkers for prostate cancer.Br J Cancer.100:1603-7.

[0210] Orita,M.,H.Iwahana,H.Kanazawa,K.Hayashi,and T.Sekiya.1989.Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms.Proc Natl Acad Sci USA.86:2766-70.

[0211] Raposo,G.,H.W.Nijman,W.Stoorvogel,R.Liejendekker,C.V.Harding,C.J.Melief,and H.J.Geuze.1996.B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles.J Exp Med.183:1161-72.

[0212] Skog,J.,T.Wurdinger,S.van Rijn,D.H.Meijer,L.Gainche,M.Sena-Esteves,W.T.Curry,Jr.,B.S.Carter,A.M.Krichevsky,and X.O.Breakefield.2008.Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and

provide diagnostic biomarkers. *Nat Cell Biol.*10:1470-6.

[0213] Steemers, F. J., W. Chang, G. Lee, D. L. Barker, R. Shen, and K. L. Gunderson. 2006. Whole-genome genotyping with the single-base extension assay. *Nat Methods.*3:31-3.

[0214] Stoorvogel, W., M. J. Kleijmeer, H. J. Geuze, and G. Raposo. 2002. The biogenesis and functions of exosomes. *Traffic.*3:321-30.

[0215] Taylor, D. D., and C. Gercel-Taylor. 2008. MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer. *Gynecol Oncol.*110:13-21.

[0216] Thery, C., L. Zitvogel, and S. Amigorena. 2002. Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nat Rev Immunol.*2:569-79.

[0217] Valadi, H., K. Ekstrom, A. Bossios, M. Sjostrand, J. J. Lee, and J. O. Lotvall. 2007. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol.*9:654-9.

[0218] van Dijk, E. L., G. Schilders, and G. J. Puijn. 2007. Human cell growth requires a functional cytoplasmic exosome, which is involved in various mRNA decay pathways. *RNA.*13:1027-35.

[0219] Velculescu, V. E., L. Zhang, B. Vogelstein, and K. W. Kinzler. 1995. Serial analysis of gene expression. *Science.*270:484-7.

[0220] Went, P. T., A. Lugli, S. Meier, M. Bendi, M. Mirlacher, G. Sauter, and S. Dirnhofer. 2004. Frequent EpCam protein expression in human carcinomas. *Hum Pathol.*35:122-8.

序列表

<110> 总医院有限公司 (THE GENERAL HOSPITAL CORPORATION)

<120> 核酸分析

<130> PW50022NPA-2

<140> PCT/US2010/042365

<141> 2010-07-16

<150> US 61/226,025

<151> 2009-07-16

<150> US 61/226,106

<151> 2009-07-16

<160> 29

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 376

<212> DNA

<213> HOMO SAPIENS

<400> 1

tcatttccgg ggacagtgc aggtggggag ttgactggg gctgtacacc tgtcaaacgg 60
taacgcaggt gtctaagge gagtcaggg aggacagaaa cctcccgtag agcagaaggg 120
caaaagctcg cttgatcttg attttcagta cgaatacaga ccgtgaaagc ggggcctcac 180
gatccttctg accttttggg ttttaagcag gaggtgtcag aaaagttacc acagggataa 240
ctggccttgig gggcccaagc gttcatagcg acgtcgttt ttgatccttc gatgtcggct 300
[0001] cttcctaica ttgtgaagca gaattcacca agcgttggat tgttcaccca ctaataggga 360
acgtgagctg gaggtt 376

<210> 2

<211> 378

<212> DNA

<213> HOMO SAPIENS

<400> 2

gaacctccag ctcacgttcc ctattagtag gtaacaate caacgcttgg tgaattctgc 60
ttcacaatga taggaagagc cgacatcgaa ggatcaaaaa gcgacgtgc tatgaacgt 120
tgcccgccac aagccagtta tccctgtggt aacttttctg acacctctct cttaaaaccc 180
aaaaggctcag aaggatcgtg aggccccgct ttcacggtct gtattcgtac tgaaaatcaa 240
gatcaagega gcttttgcgc ttctgtctca cgggaggttt ctgtctctcc tgagctcgcc 300
ttaggacacc tgcgttacgc ttgtacaggt gtacagcccc agtcaaaact cccacctggc 360
actgtccccg gaaatgat 378

<210> 3

<211> 226

<212> DNA

<213> HOMO SAPIENS

<400> 3

gatccgcccac cgggttgaat cctccgggag gactgcgcgg acctgaccca tttaaccttt 60
aacgggttca cgcctcttg taetctctct tcaaagttct tttaaccttt cccttaaggt 120
acctgttgac taicggctct gtgccgtat ttagccttaa atggagtta ccacccgctt 180

	ttggctgcat tccaagcaa cccgactcct ggaagaccg ggccaa	226
	<210> 4	
	<211> 223	
	<212> DNA	
	<213> HOMO SAPIENS	
	<400> 4	
	ttggccggg tcttcagga gtcgggttc ttgggaatgc agcccaagc ggttggtaaa	60
	ctccatttaa ggctaaatac cggcacgaga ccgatatga acaagtaccg taagggaag	120
	tigaaaagaa ctttgaagag agagtacaag agggcgigaa accgitaaga ggtaaatggg	180
	tcaggtccgc gcagtcggc cggaggatc aaccgggtg cgg	223
	<210> 5	
	<211> 107	
	<212> DNA	
	<213> HOMO SAPIENS	
	<400> 5	
	gtggggaacc tggcgtaaa ccaticgtag aegacttgc ttgggtcgg ggttcgtac	60
	gtagcagagc agctccctcg ctgcgatca tgaagatca gatctcc	107
	<210> 6	
	<211> 160	
	<212> DNA	
	<213> HOMO SAPIENS	
	<400> 6	
	cgcagaccg ctgggggtc ggttaactag ttacgatgc agagtctgt tegtatcgg	60
[0002]	aattaacag acaaatgct ccaccaacta agaacggcca tgcaccacca cccacggaat	120
	cgagaaagag ctatcaatct gtcaatcctg tcgtaaatc	160
	<210> 7	
	<211> 105	
	<212> DNA	
	<213> HOMO SAPIENS	
	<400> 7	
	agatctgact ttcaatagat cgcagcgagg gagctgtct gctacgtac aaaccccgac	60
	ccagaagcaa gtgtctacg aatgggttag cggcaggtc ccac	105
	<210> 8	
	<211> 159	
	<212> DNA	
	<213> HOMO SAPIENS	
	<400> 8	
	gatttacgga caggattgac agattgatag ctctttctcg attccgtgg tgggtgtgca	60
	tggccgttct tagttgtgg agcgattgt ctggttaatt ccgataacga acgagactct	120
	ggcatgctaa ctagttacgc gacccccgag cgggtctgc	159
	<210> 9	
	<211> 271	
	<212> DNA	
	<213> HOMO SAPIENS	
	<400> 9	
	aacactcagc taagagcatc gagggggcgc caagaggcaa ggagcgggga cgggcagtgg	60
	ctgcctcat ggcggactgc ccgccgctc ccaagatcca actaggagct ttttaactgc	120

	agcaacttta atafacgcta ttggagctgg aattaccgcg gctgctggca ctaaacttgc	180
	ccctccaatgg atcttcgtta aaggatttaa agtggactca ttccaattac aggacctcga	240
	aagagtcctg tattgttatg tttcatcact a	271
	<210> 10	
	<211> 143	
	<212> DNA	
	<213> HOMO SAPIENS	
	<400> 10	
	gtccctctta atcatggcct cagttccata aaccaacaaa atagaaccgc ggtccctattc	60
	cattattcct agctgcggta tccaggcggc ttggacctgc ttgtaacct ctaatttttt	120
	caaagtaaac gccttgggcc gcg	143
	<210> 11	
	<211> 212	
	<212> DNA	
	<213> HOMO SAPIENS	
	<400> 11	
	ccacgtaggg taggcacacg ctgagccagt cagtgtagcg cgcgtgcagt cccggacatc	60
	taagggaafc acagatctgt tattgctcaa ttctgggtgg ctgaaggcca ctgtccctc	120
	taagaagtig ggggacgccg accgctcggg ggtcacgtaa ctagttagca tgccagagtc	180
	tcgttggtta ttggaattaa ccagacaaat ca	212
[0003]	<210> 12	
	<211> 588	
	<212> DNA	
	<213> HOMO SAPIENS	
	<400> 12	
	tagtgatgaa acataacaat acaggactct ttcgaggtec tgtaattgga atgagtcac	60
	tttaaatcct ttaacgaaga tccattggag ggcaagttaa gtgccagcag ccgcgtaat	120
	tecagctcca atagegtata ttaaagttgc tgcagttaaa aagctcctag ttggatcttg	180
	ggagcggggc ggcagtcgc catgaggcga gccactgcc gtccccgcc cttgectctt	240
	ggcgccctct cgatgctctt agctgagtgt tccgcggccc aaagcgitta ctttgaaaaa	300
	attagagtgt tcaaagcagg tccaagccgc ctggataccg cagctaggaa taatggaata	360
	ggaccgcggt tctattttgt tggtttatgg aactgaggcc atgattaaga gggacagctg	420
	ggggcatttg tattgcaaccg ctagagggtga aattcttggc ccggcgcagt ttggaccaga	480
	gtgaaagcat ttgccaagaa tgttttcatt aatcaagaat gaaagtcgga ggttcgaaga	540
	cgatcagata ccgtggtagt tctgaccata aacgatgccg actggcaa	588
	<210> 13	
	<211> 137	
	<212> DNA	
	<213> HOMO SAPIENS	
	<400> 13	
	gatttgtctg gtttaattcca ataaccaacg agactctgac atgctaacfa gttacgtgac	60
	ccccgagcgg tcggcgtccc ccaacttctt agagggacaa gtggccttca gccacccgaa	120
	attgagcaat aacagat	137

	<210> 14	
	<211> 266	
	<212> DNA	
	<213> HOMO SAPIENS	
	<400> 14	
	agaatccccg ccccgcggtg gggcgcgga aatgtggcgt acggaagacc caetccccgg	60
	cgcgcctegt gtggggccca agtccttcig atcgaggccc gcgacctcag atcagacgtg	120
	gcgaccgcgt gaatttaagc atatttgtca gcggaggaaa agaaactaac caggattccc	180
	tcagtaatgg cgagtgaaca gggaagagcc cagcgccgaa tccccgccc gcggtggggc	240
	gcgggaaatg tggcgtacgg aaaaaat	266
	<210> 15	
	<211> 167	
	<212> DNA	
	<213> HOMO SAPIENS	
	<400> 15	
	atttttcgt acgccacatt tcccgcgcc caccgcggg cggggattcg gcgctgggct	60
	ettccctgtt cactegcent tactgaggga atcctggta gtttctttc ctcgctgac	120
	aaatatgctt aaattcagcg ggtcgccacg tctgatctga ggtcgcg	167
	<210> 16	
	<211> 171	
	<212> DNA	
	<213> HOMO SAPIENS	
[0004]	<400> 16	
	tgaactgtgg cgatggccgg gtafgggct gatgtccag tgccatccat tticagggt	60
	agttgattcg gcaggtgagt tgttacacac tccttagtgg attctgactt ccattgccac	120
	cgtcctgctg tctatatcaa ccaacacctt ttciggggtc tgatgagcga g	171
	<210> 17	
	<211> 164	
	<212> DNA	
	<213> HOMO SAPIENS	
	<400> 17	
	ctcgtcatc agaccccaga aaaggigtig gttgatatac acagcaggac ggtggccatg	60
	gaagtcagaa tccaactaagg agtgigttaac aactcacctg ccgaatcaac tagccctgaa	120
	aatggatggc actggagcat caggcccata cccggccatc gccat	164
	<210> 18	
	<211> 121	
	<212> DNA	
	<213> HOMO SAPIENS	
	<400> 18	
	cttggataaa tggaatagga ccacagttct attttgttg ttttcggaac tgaggccatg	60
	attaagaggg acggccgggg gcattcatat tgcaccgcta gaggtgaaat tcttgactg	120
	g	121
	<210> 19	
	<211> 97	
	<212> DNA	
	<213> HOMO SAPIENS	

[0005]	<400> 19	
	gtgcagatct tggtagtagt agcaaatctt caaatgagaa ctttgaaggc cgaagtggag	60
	aagggttcca tgtgaacagc agttgaacat ggggtccc	97
	<210> 20	
	<211> 245	
	<212> DNA	
	<213> HOMO SAPIENS	
	<400> 20	
	atgccagtt ggcatcggtt atggteggaa ttacaacggt atctgategt cttcgaacct	60
	ccgactttcg ttattgatta atgaaaacat tcttggcaaa tgccttcgct ctggtctaaa	120
	ctgccagttc aagaatttca cctctagcgg tgcaatatga atgccccgg ccgtccctct	180
	taatcatggc ctcatgtccg aaacccaaca aaatagaact gtggtectat tccattattc	240
	caagc	245
	<210> 21	
	<211> 95	
	<212> DNA	
	<213> HOMO SAPIENS	
	<400> 21	
	gggacccatg ttcaactgct gtacacatgg aaccttctc caettcggcc ttcaagttc	60
	tcatttgaaa atttgcctact accaccaaga tctgc	95
	<210> 22	
	<211> 216	
	<212> DNA	
	<213> HOMO SAPIENS	
	<400> 22	
	tttgctgag gcccggcgtt tggcgccaga agcgagagcc cctcagggtt cgcceccccc	60
	cctcaccggg tcagtgaana aacgacaga gtagtggtat ttacccggcg gcccgagggg	120
	ccggcagacc ccgcccggg cccctcggg ggacaccggg gggcgccggg ggccicccac	180
	ttattctaca cctctcagct ctcttcaccg tgccag	216
	<210> 23	
	<211> 229	
	<212> DNA	
	<213> HOMO SAPIENS	
	<400> 23	
	gcttgactct agtcggcac ggtgaagaga cgtgagaggt gtgaataag tgggaggecc	60
	ccggcgcgcc ccggtgtccc cgcgagggtt ccaggcgagg gtctgcgggc cctgcgggcc	120
	gcccgtgaaa taccactact ctgactgttt ttccactgac ccggtgaggg gggggggcga	180
	gccttgaggg gtctcgtctt ctggcgccaa ggcgcggccc gcacgcaaa	229
	<210> 24	
	<211> 592	
	<212> DNA	
	<213> HOMO SAPIENS	
	<400> 24	
	tctacctacc taccctgttg atctgccag tagcatatgc ttgtctcaaa gattaagcca	60
	tgcattgcta agtacgcac gccggtacag tgaacctggc aatggctcat taaatcagtt	120
	atggttccct tggctgctcg ctctctctct acttgataa ctgtggtaat tctagagcta	180

	atacatgccg acgggcgctg acccccttcg cgggggggat gcgtgcattt atcagatcaa	240
	aaccaacecg gtcagccctt ctccggcccc ggccgggggg cgggcgcagg cggttttgt	300
	gactctagat aacctcgggc tgatcgacg cccccgtgg cggcgacgac ccattcgaac	360
	gtctgcctta tcaactttcg atggtagtcg ccgtgcctac catggtgacc acgggtgacg	420
	gggaatcagg gticgattcc ggagaggag cctgagaaac ggctaccaca tccaaggaag	480
	gcagcaggcg cgcaaattac ccacitccga cccgggagg tagtgacgaa aaataacaat	540
	acaggactct ttcgaggccc tgtaattgga atgagtcac tttaaatcta at	592
	<210> 25	
	<211> 670	
	<212> DNA	
	<213> HOMO SAPIENS	
	<400> 25	
	atttaaagtg gactcatfcc aattacaggg cctcgaaaga gtctgtatt gttatitttc	60
	gtactactct ccccggttcg ggagtgggta atttgcgcgc ctgtgcctt ccttgatgt	120
	ggtagccgtt tctcaggctc cctcctcgga atcgaaacct gatccccgt caccctggc	180
	caccatggta ggcacggcga ctaccatcga aagttgatag ggcagacgtt cgaatgggtc	240
	gtcgcgccca cggggggcgt gcgacagcc cgaggttacc tagagtcacc aaagccgcgc	300
	gcgccgcccc cccggccggg gccggagagg ggcagaccgg gttggtttg atctgataaa	360
	tgcacgcata ccccccgga agggggtcag cgcccgtcgg catgtattag ctctagaatt	420
	accacagtta tccaagttag agaggagcga gcgaccaaag gaaaccatac tgatttaatg	480
[0006]	agccattcgc agtttactg taccggccgt gcgtacttag acatgcattg cttaatcttt	540
	gagacaagca tatgctactg gcaggatcaa ccaggtaggt aggtagagcg cggcgaggcc	600
	ccgacgcggc cggacggccg gccggggggc ctgcgagga cgggcccggc gccccgcaag	660
	cgaggaggac	670
	<210> 26	
	<211> 210	
	<212> DNA	
	<213> HOMO SAPIENS	
	<400> 26	
	gtgttgagat ttacaccctc tccccggat tttaaggge cagcgagagc tcaccggatg	60
	ccgccagaac cgcgacgctt tccaaggcac gggccctctt ctggggcga acccattcca	120
	gggcgccttg ccttcacaa agaaaagaga actctccccg gggtcccgcc cggcttctcc	180
	gggatcggte acgttacgc actggaagaa	210
	<210> 27	
	<211> 207	
	<212> DNA	
	<213> HOMO SAPIENS	
	<400> 27	
	ttcttcagat gegtaacgt gaccgatccc ggagaagccg gcgggagccc cggggagagt	60
	tctcttttct ttgtgaaggc caggcgcccc tggaaatgggt tcgccccgag agaggggccc	120
	gtgcccttga aagcgtcgcg gttctggcgg catccggtga gcctctcgctg gcccttgaaa	180
	atccggggga gagggtgtaa atctcaa	207

	<210> 28	
	<211> 94	
	<212> DNA	
	<213> HOMO SAPIENS	
	<400> 28	
	ccgaaggtag tgagttatct caattgattg ttacacagtc gttacagatc gaactecttg	60
	ttctactctt tcccccttc tcaactactgc actt	94
[0007]		
	<210> 29	
	<211> 99	
	<212> DNA	
	<213> HOMO SAPIENS	
	<400> 29	
	gtcaagtgca gtagtgagaa ggggggaaag agtagaaca ggagttcgat ctgtaactga	60
	ctgtgaacaa tcaattigaga taactcacta ccttcggac	99

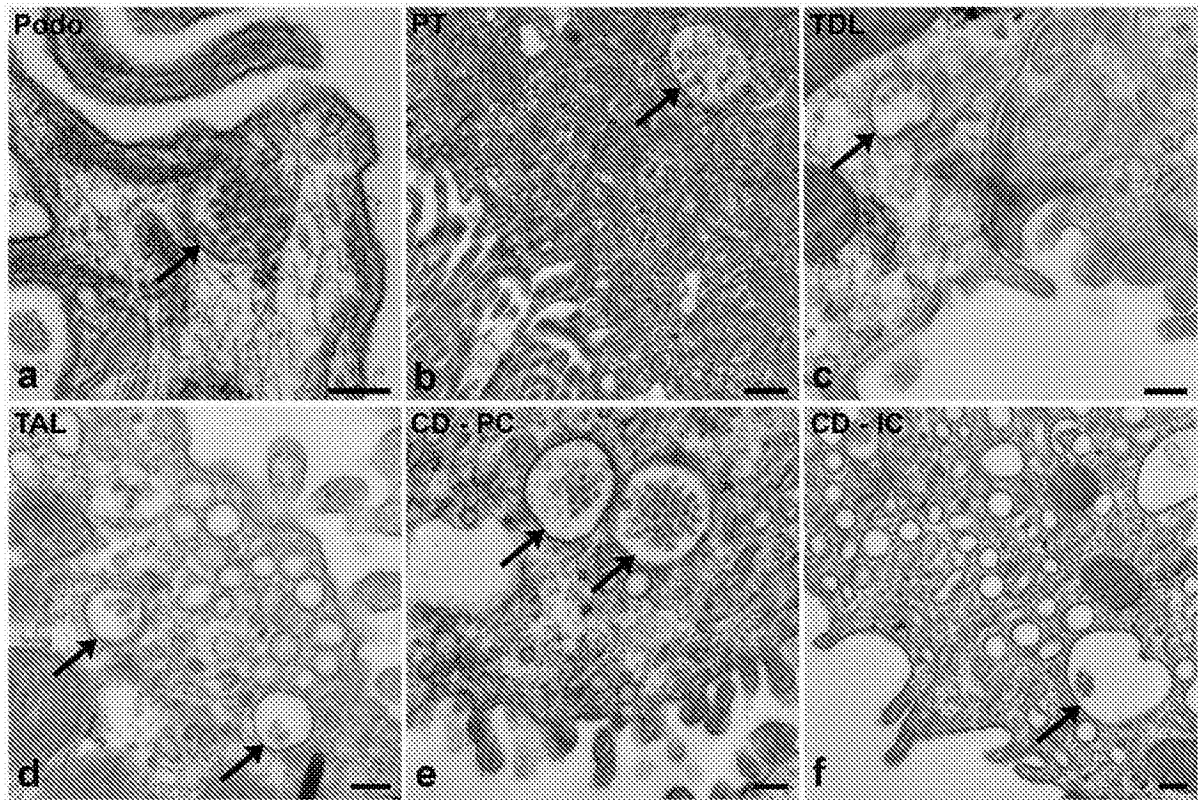


图1

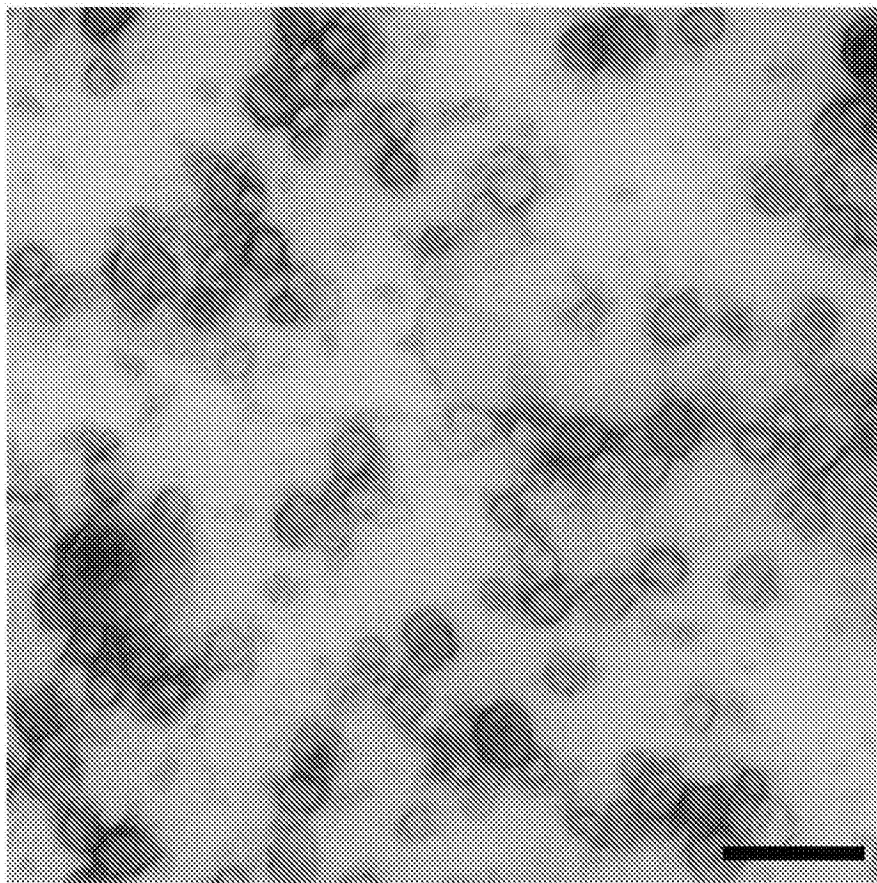


图2

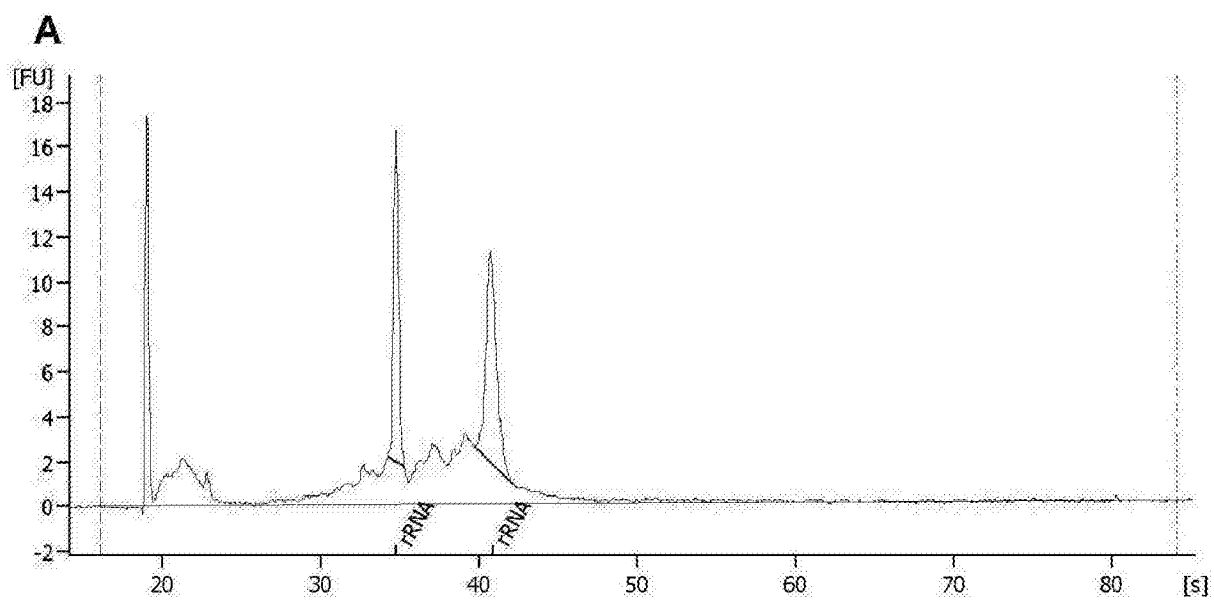


图3

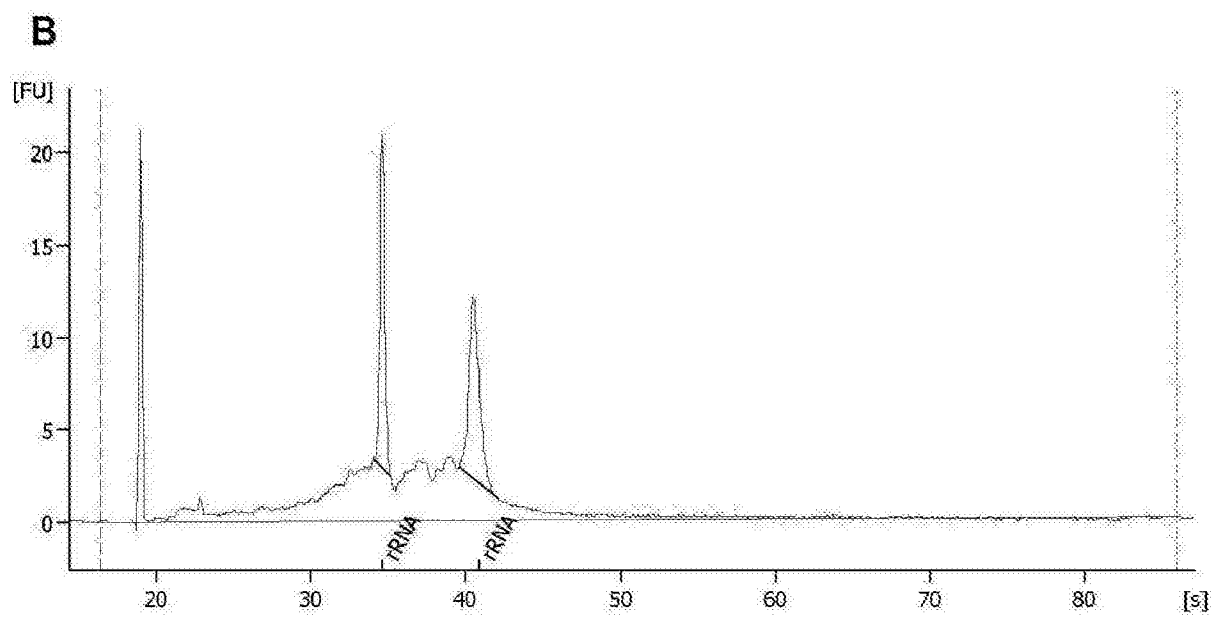


图4

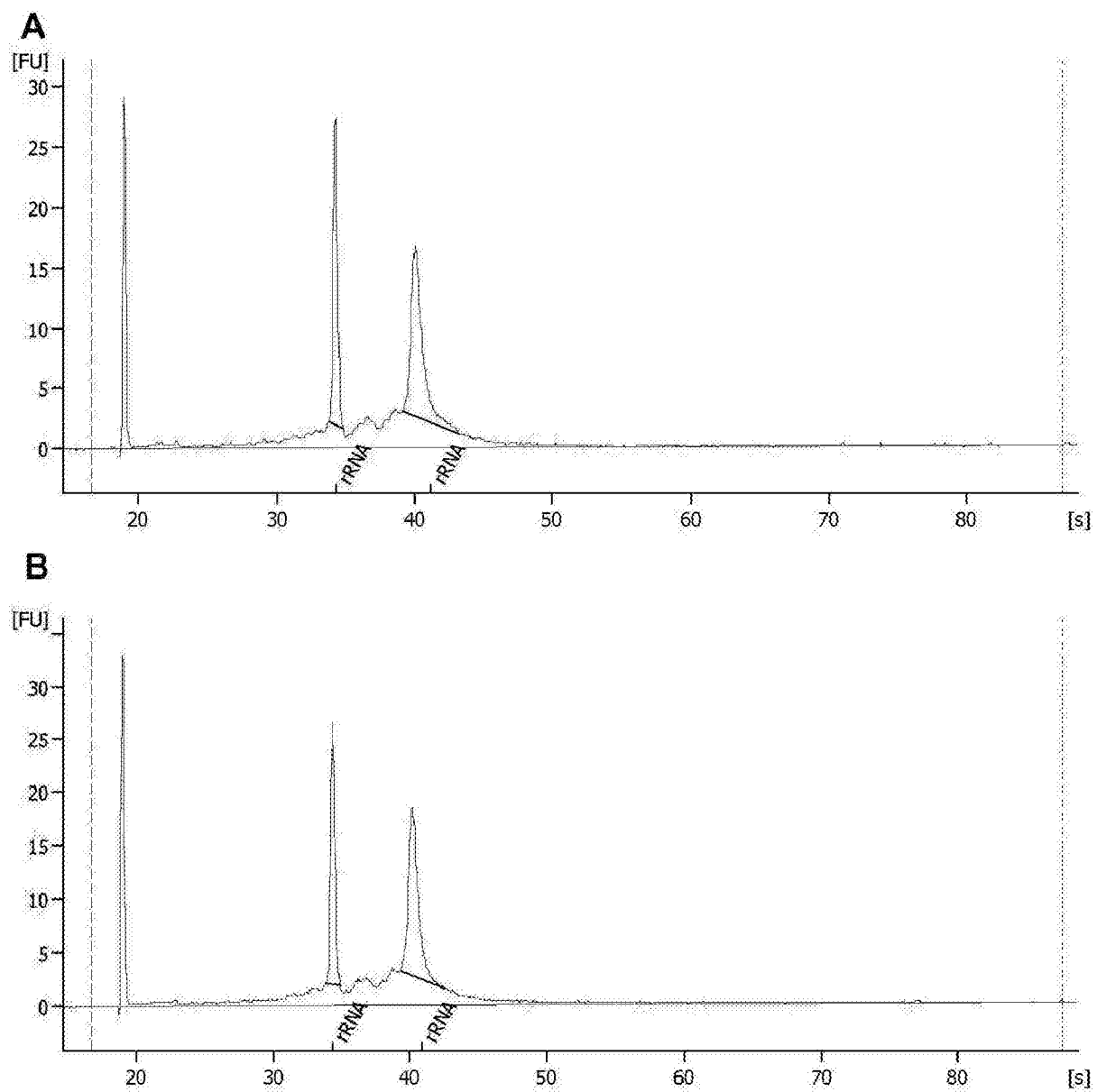


图5

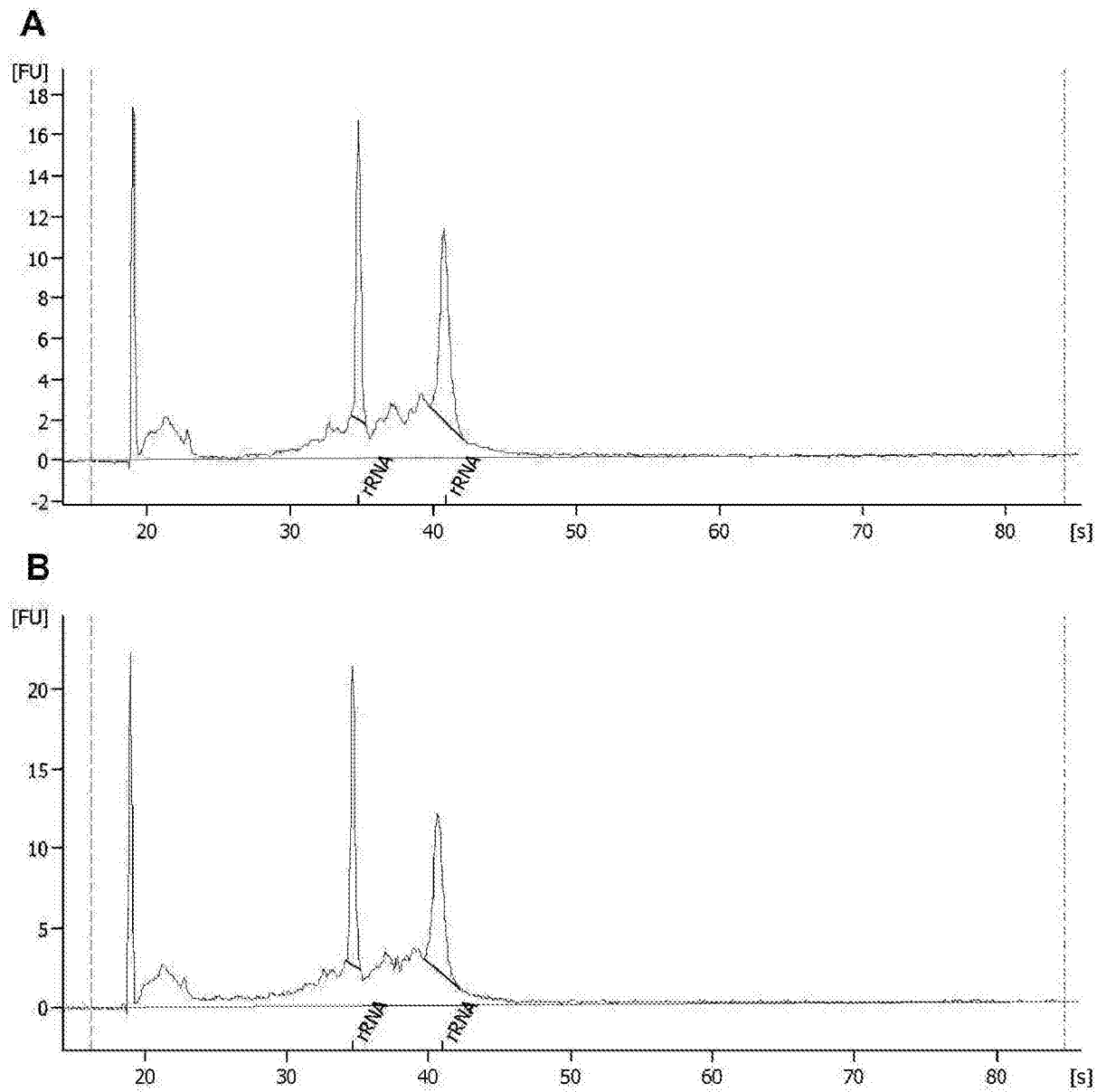


图6

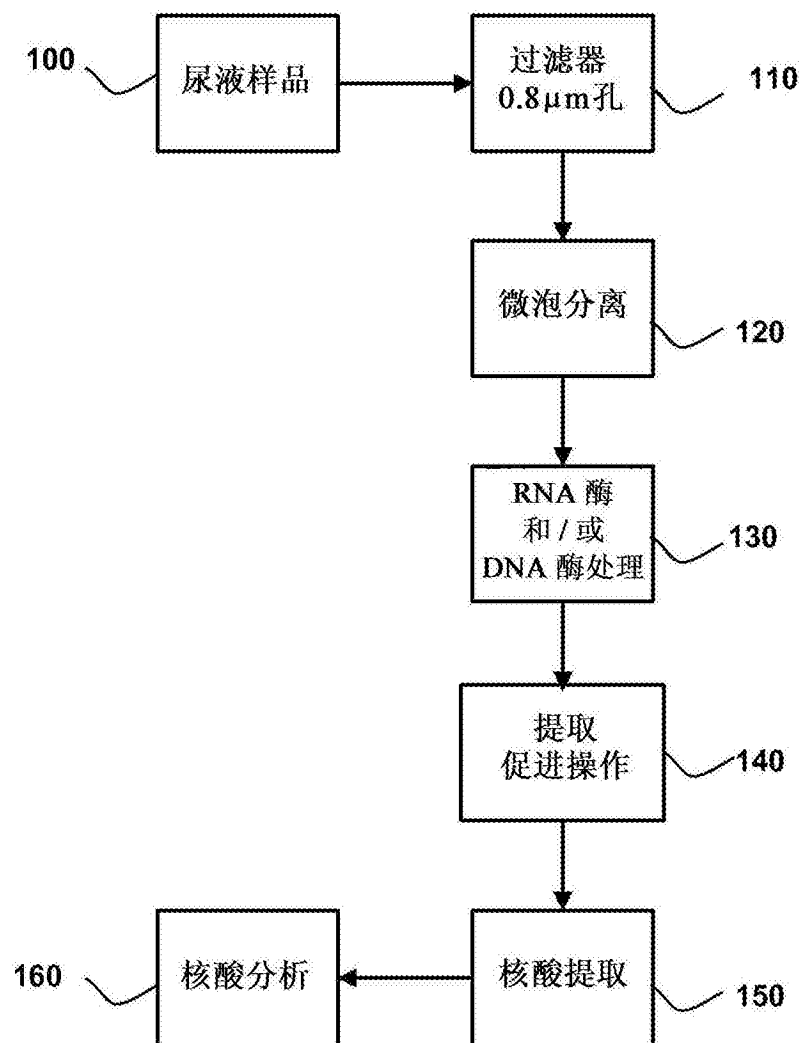


图7

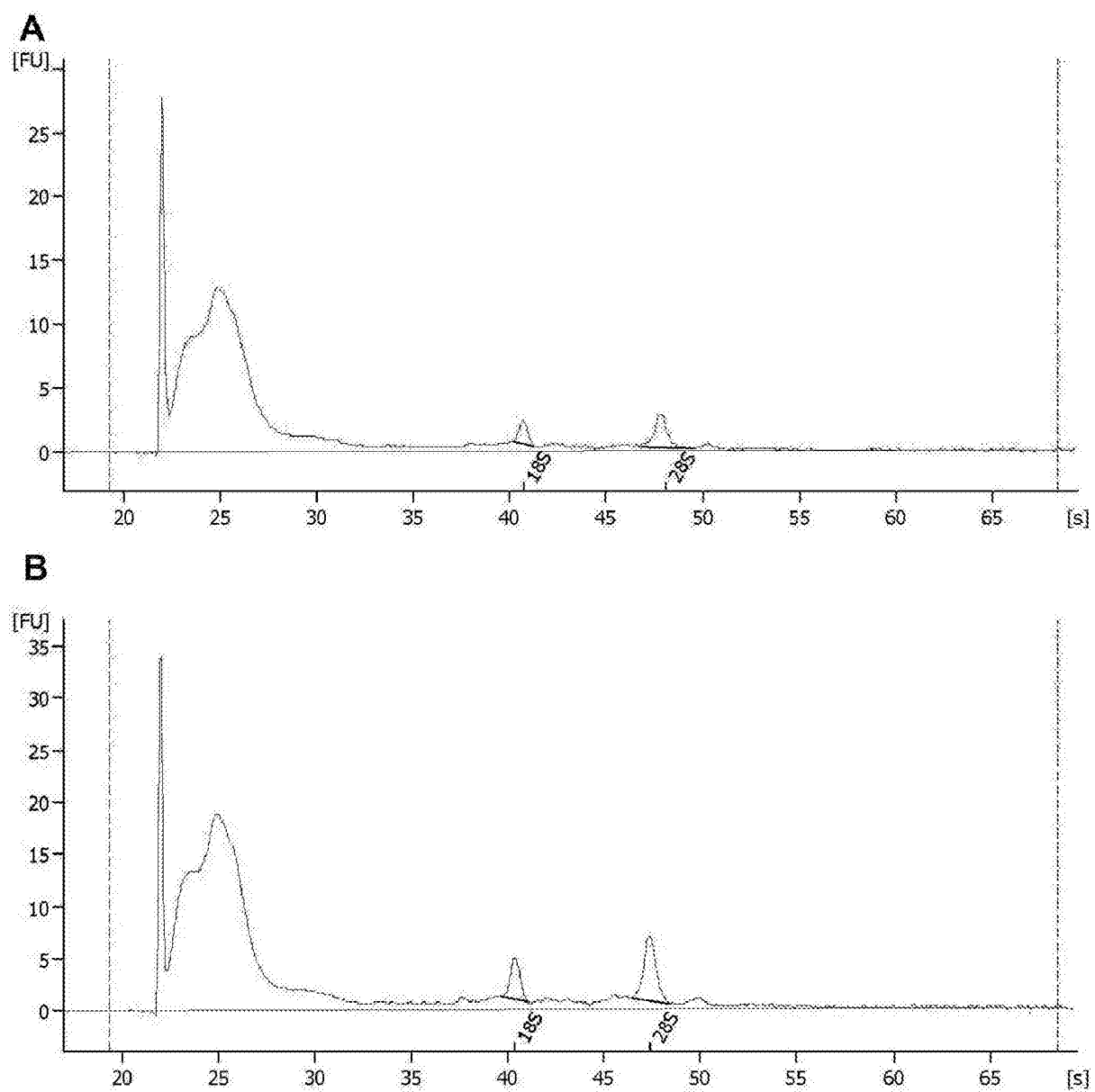


图8

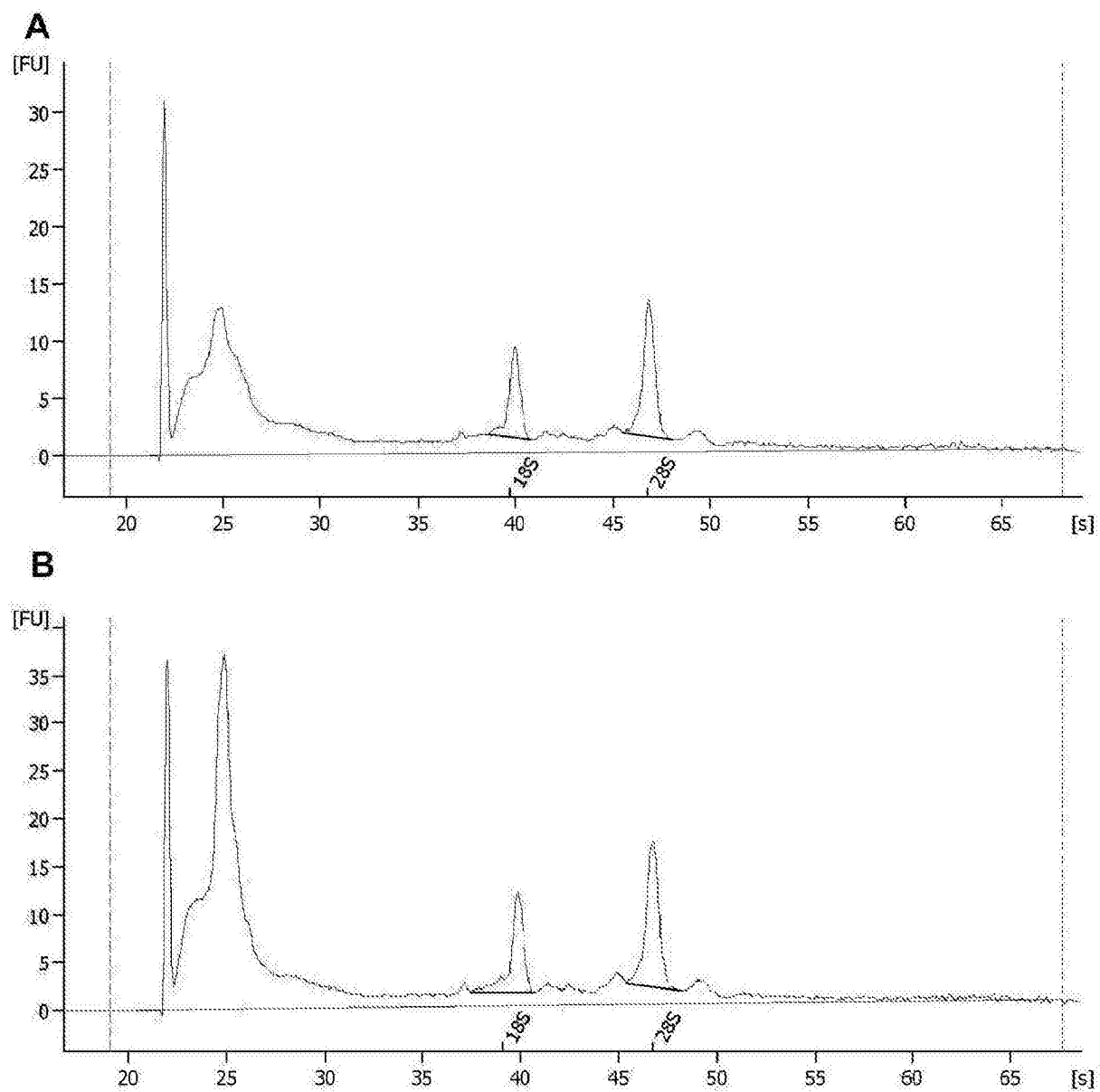


图9

样品 1

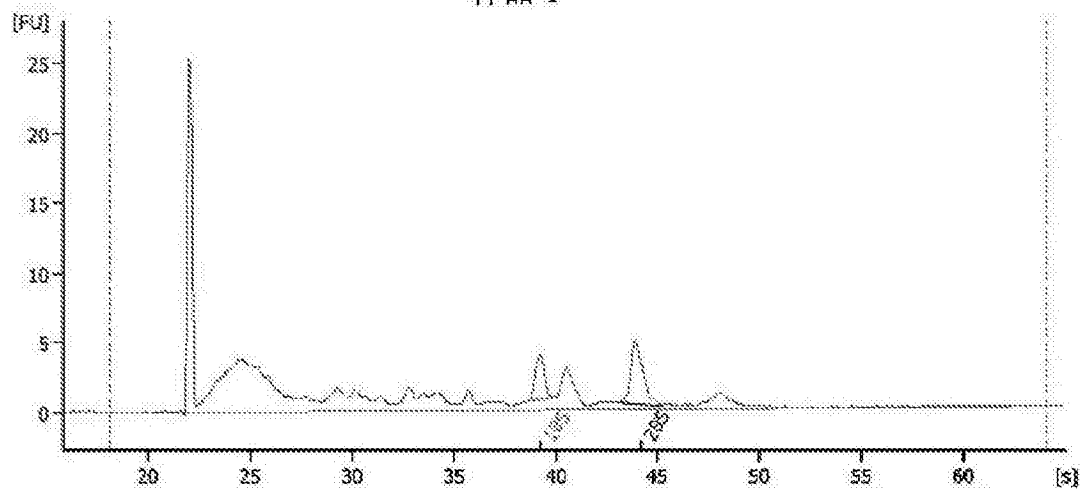


图10

样品 2

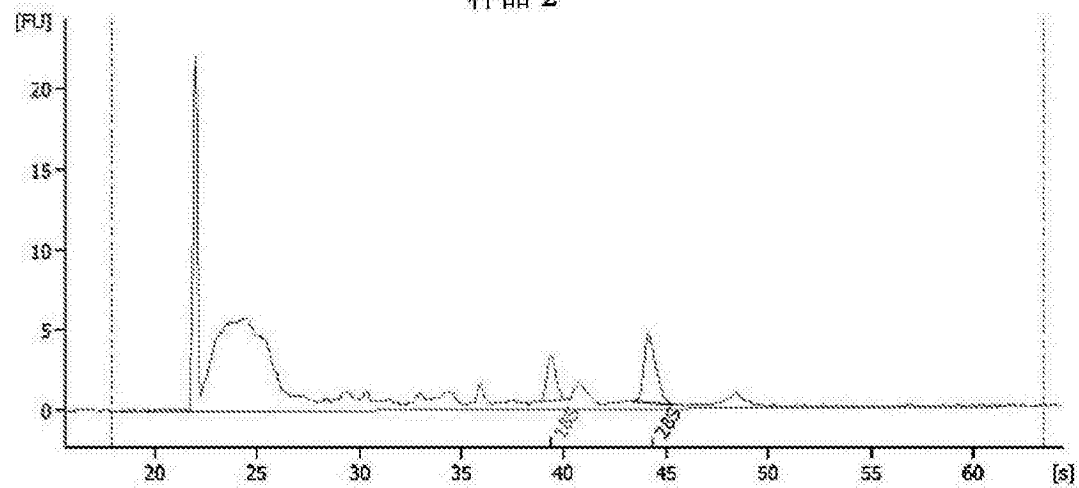


图11

样品 3

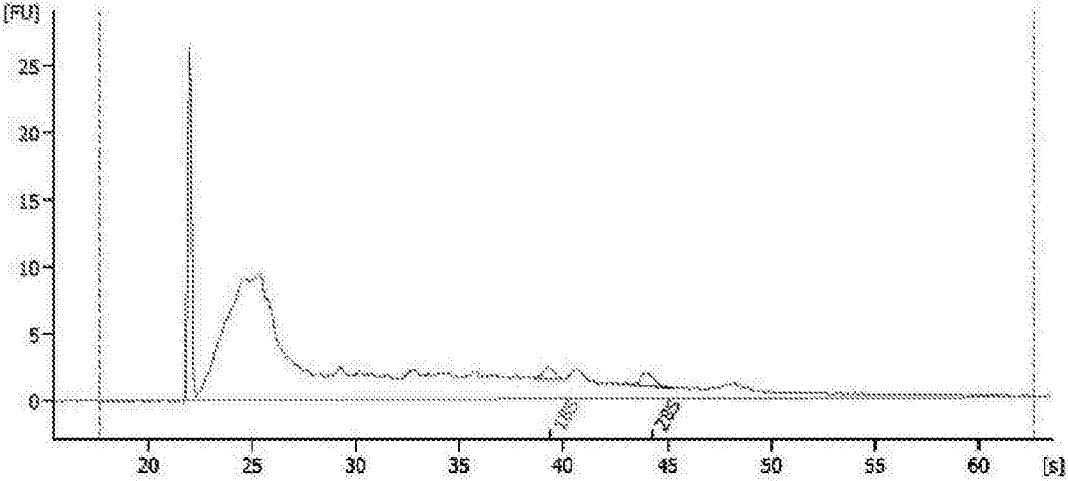


图12

样品 4

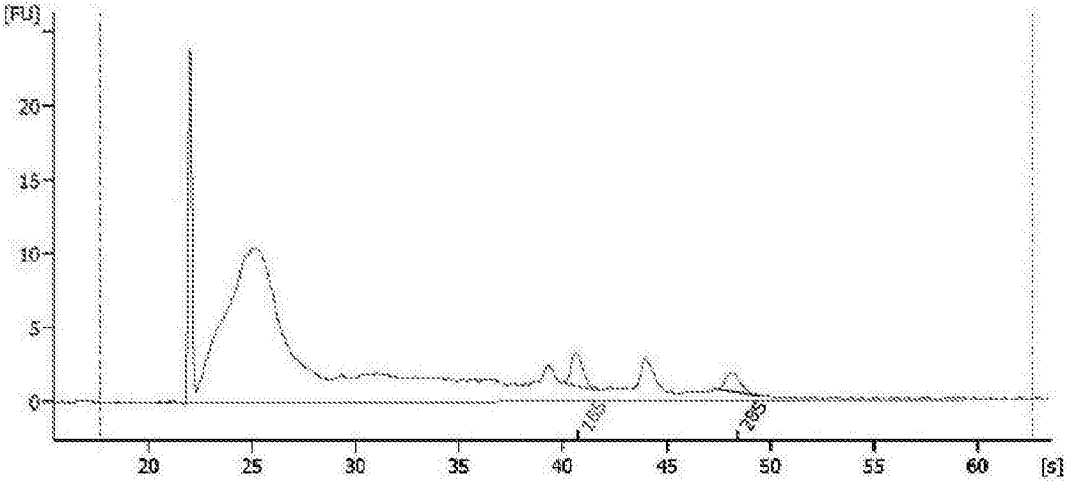


图13

样品 5

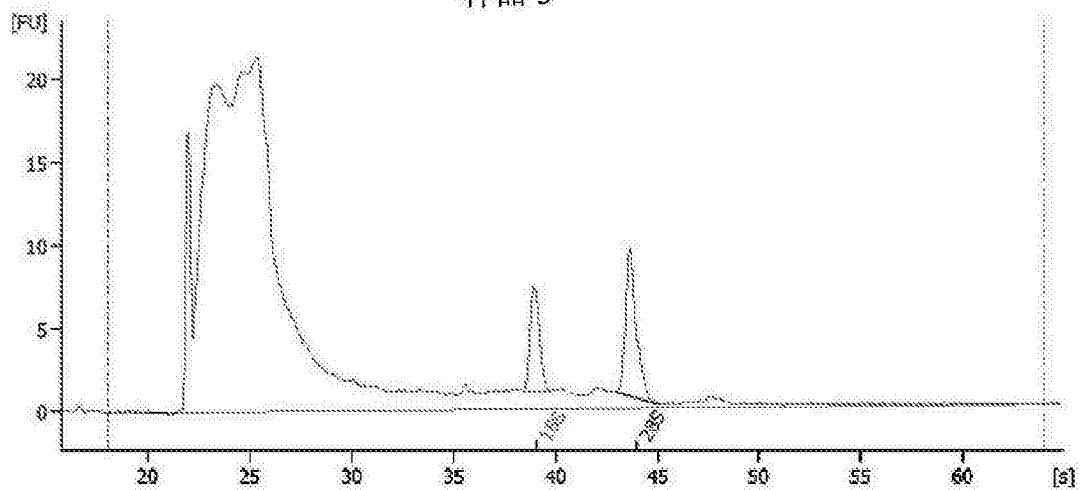


图14

样品 6

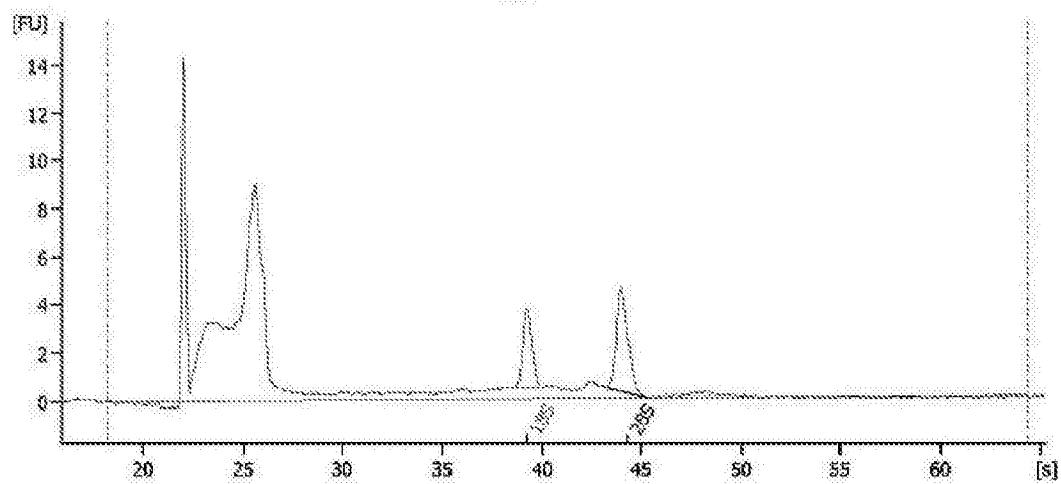


图15

样品 7

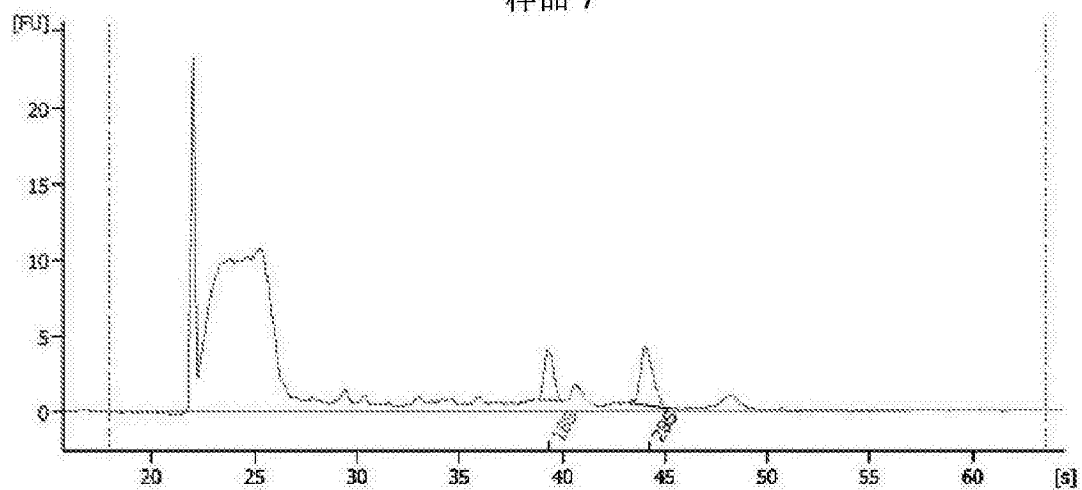


图16

样品 8

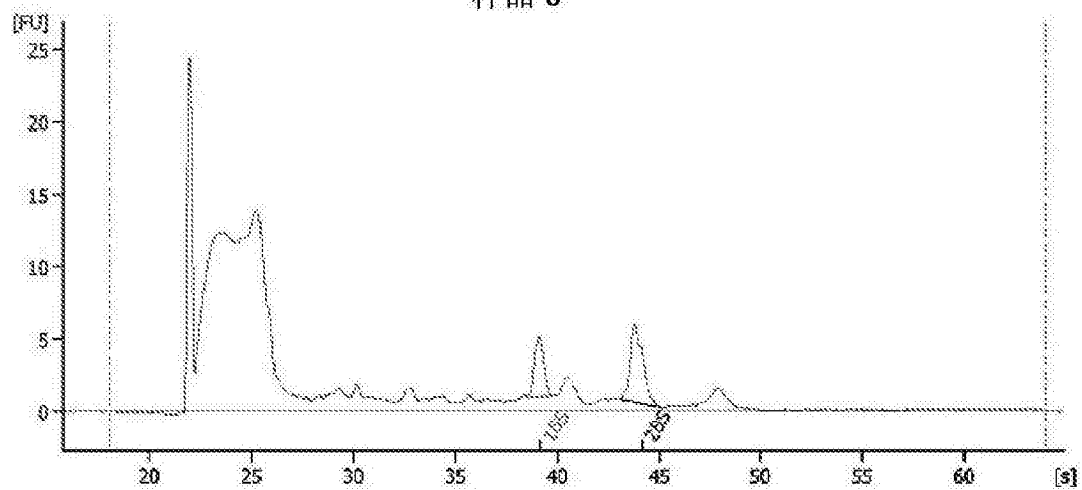


图17

样品 9

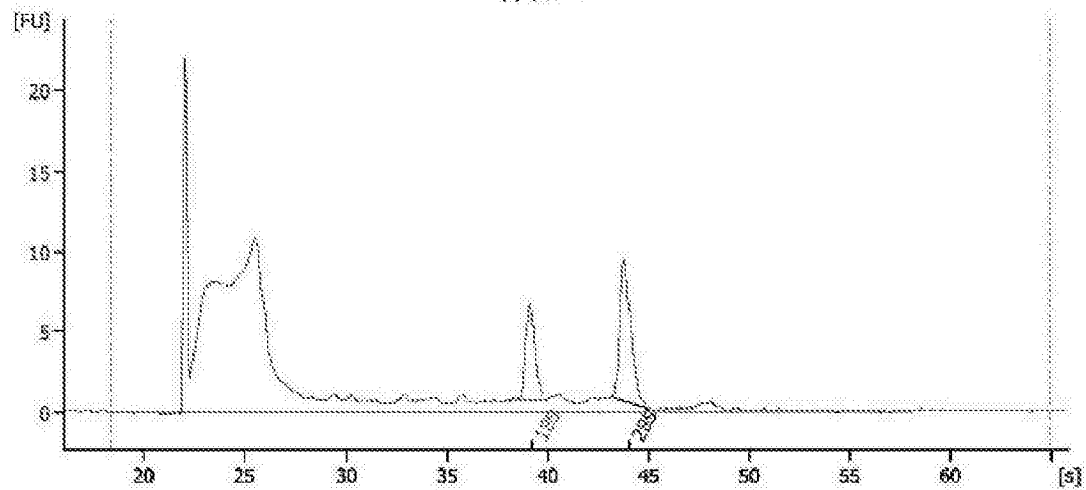


图18

样品 10

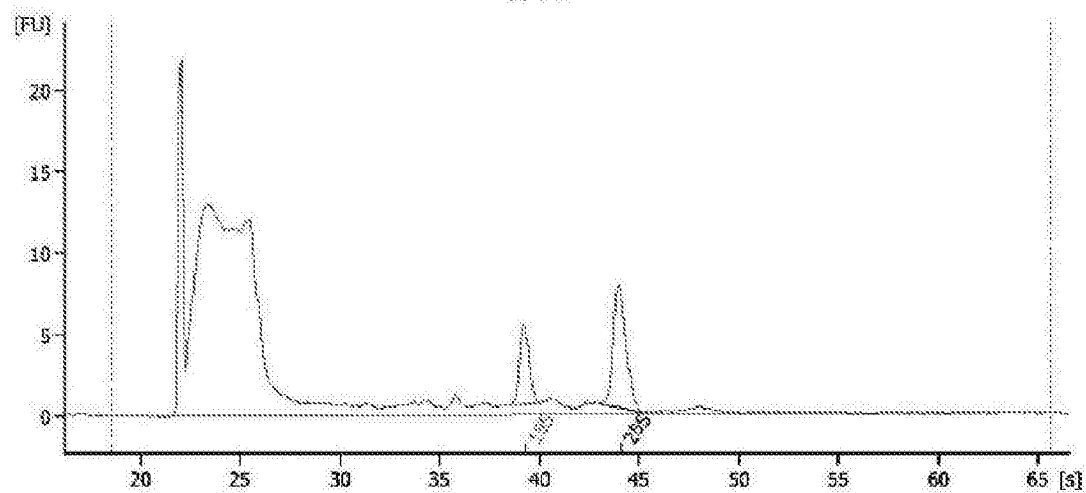


图19

样品 11

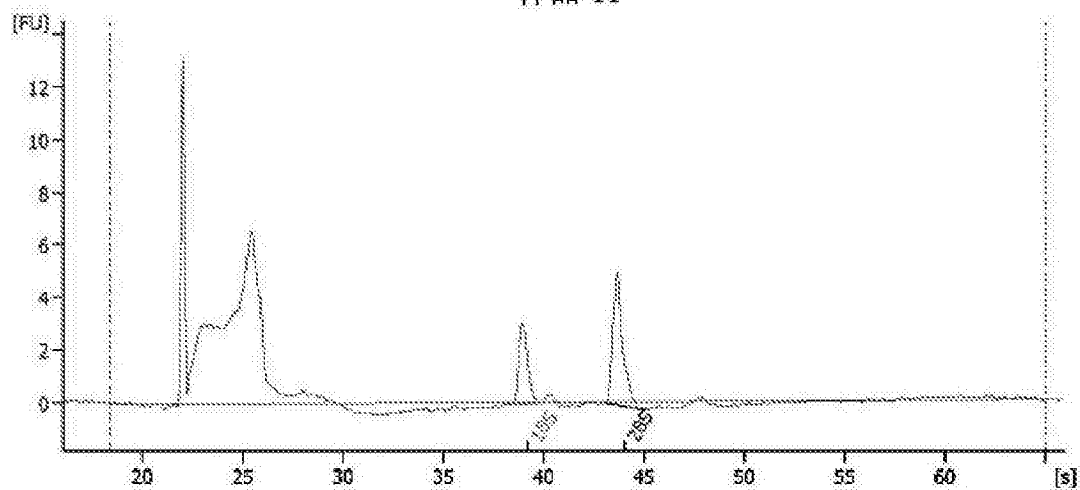


图20

样品 12

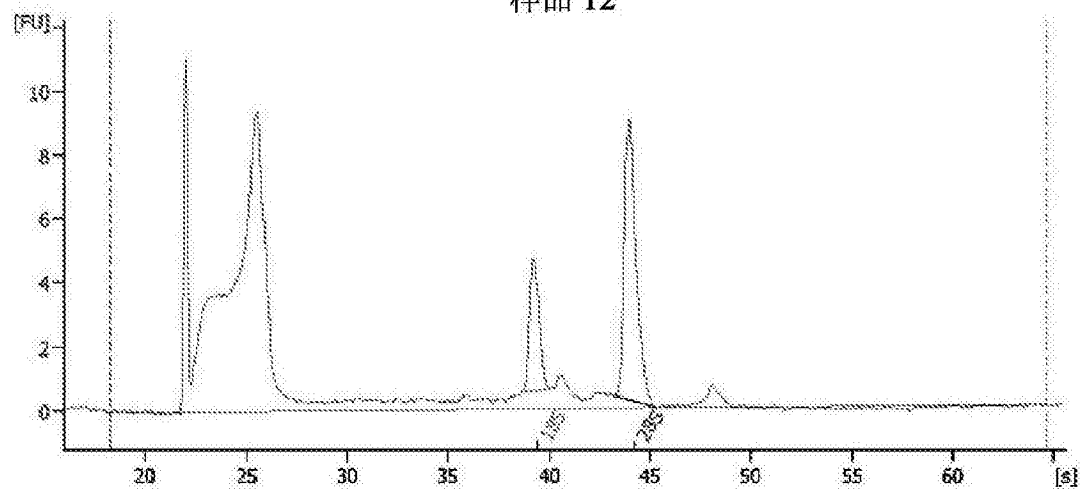


图21

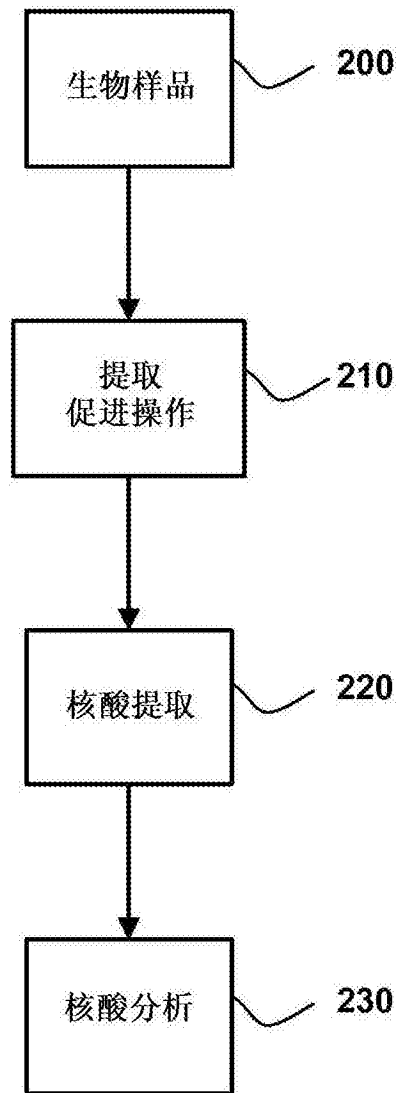


图22

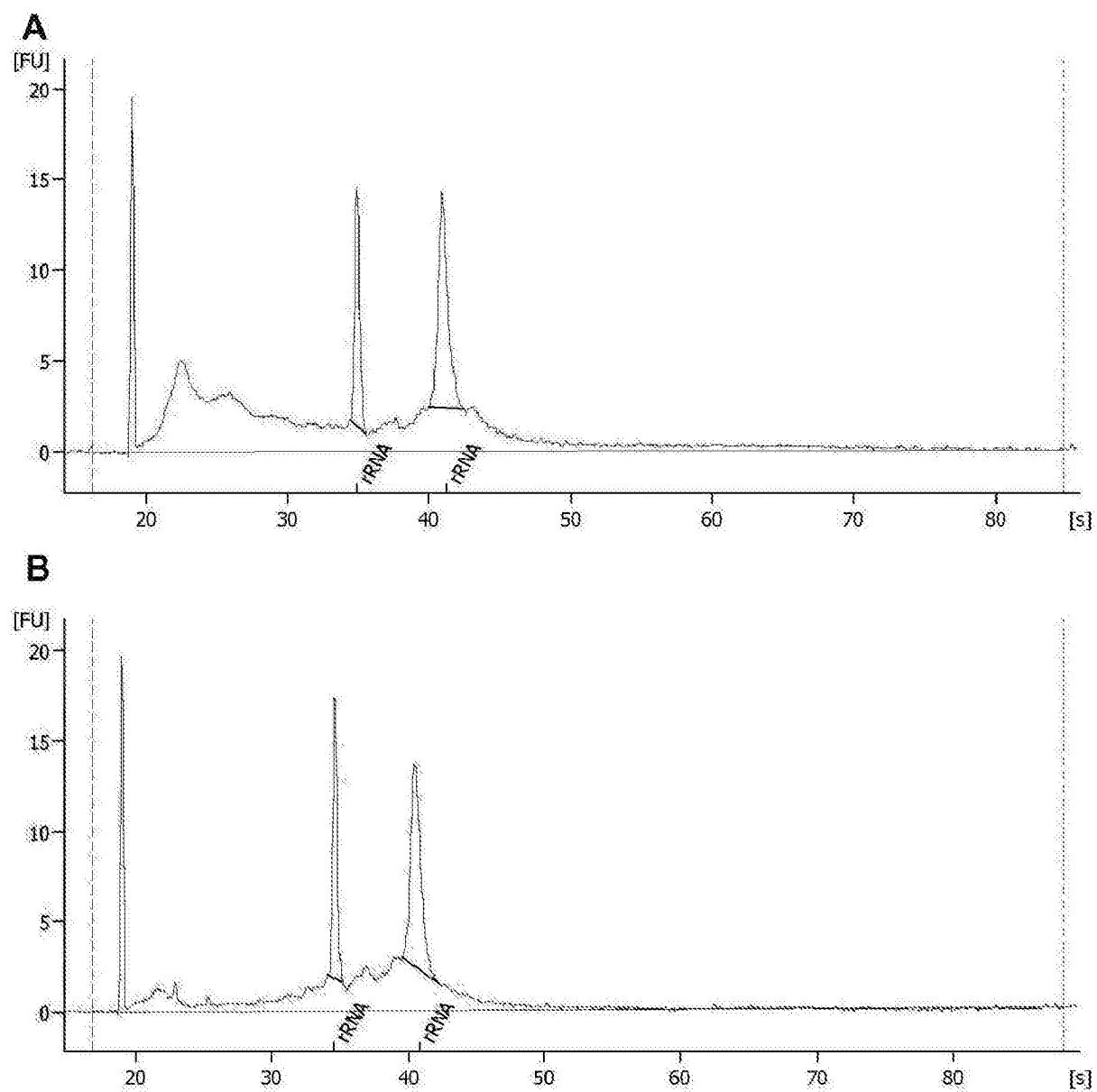


图23A和B

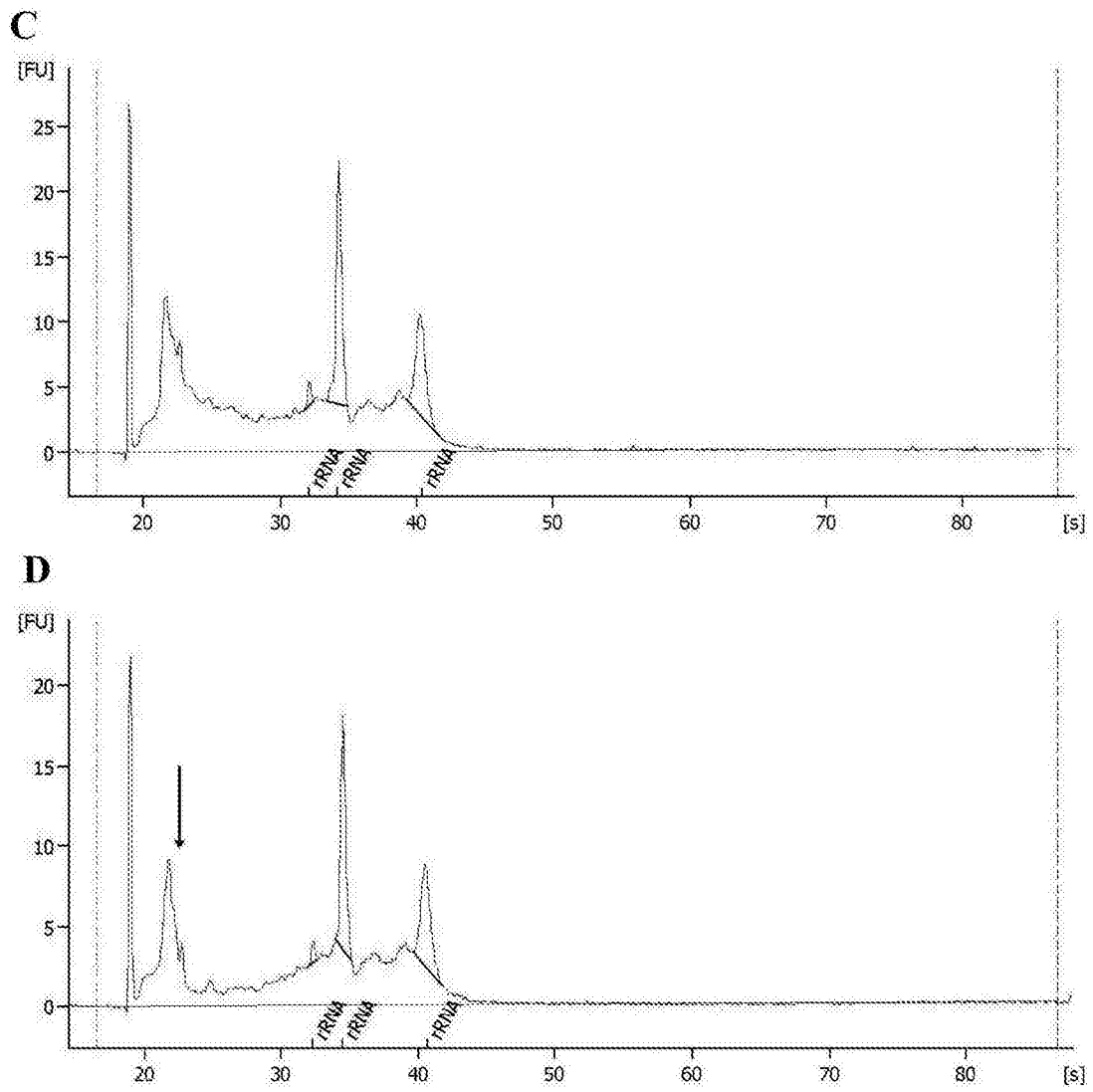


图23C和D

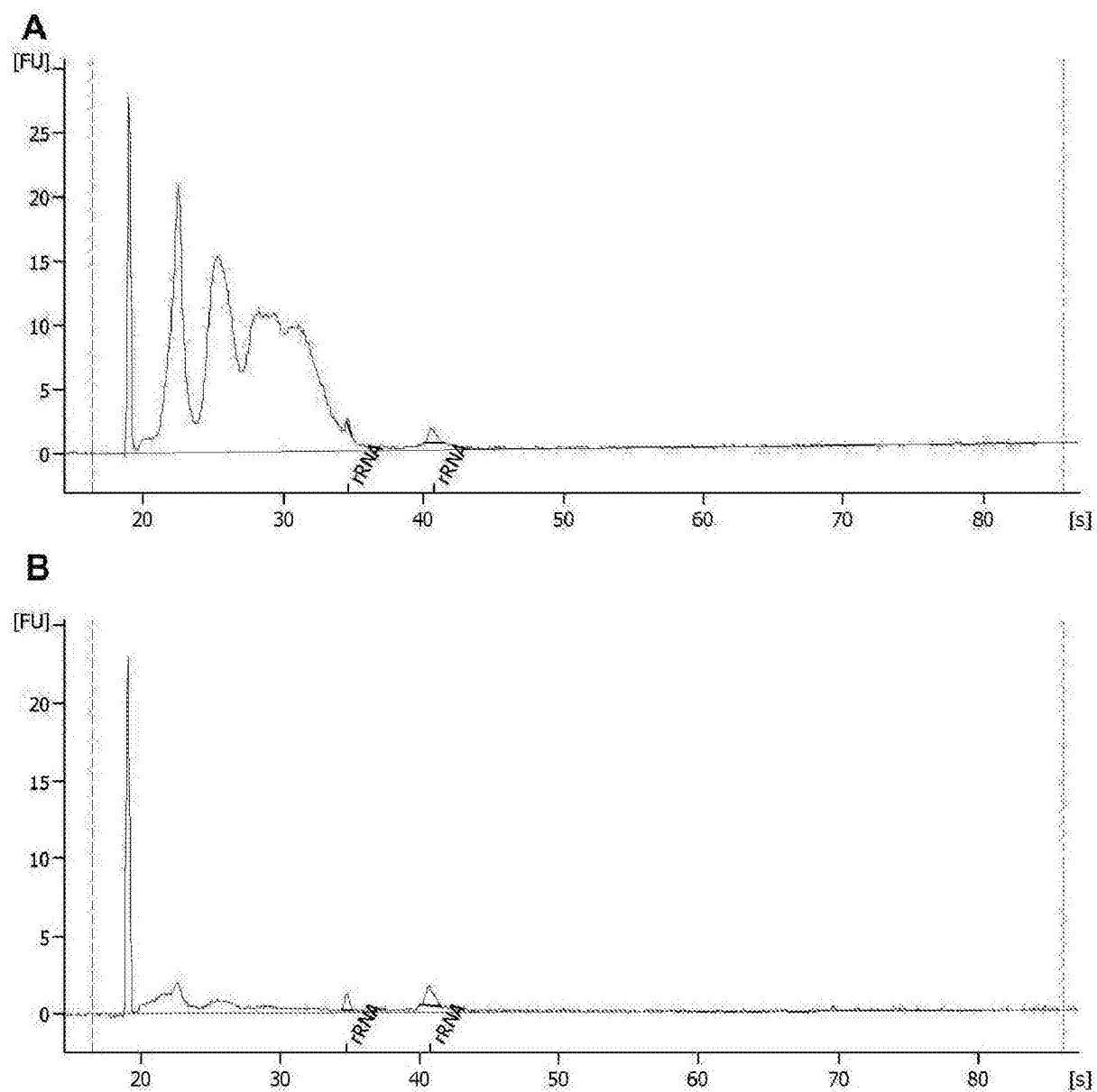


图24A和B

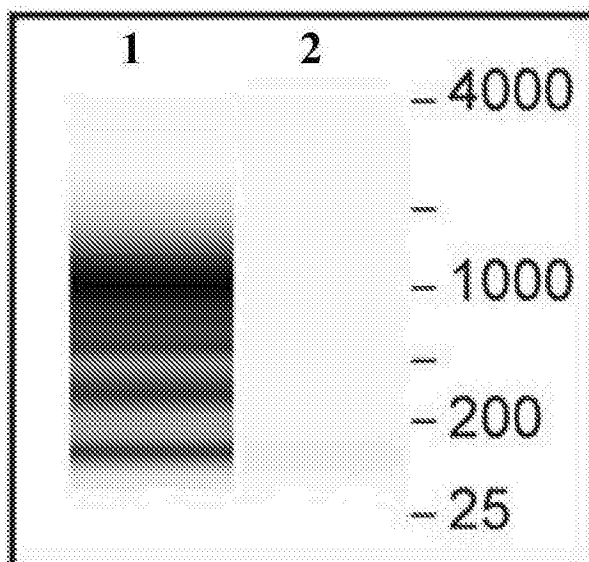


图24C

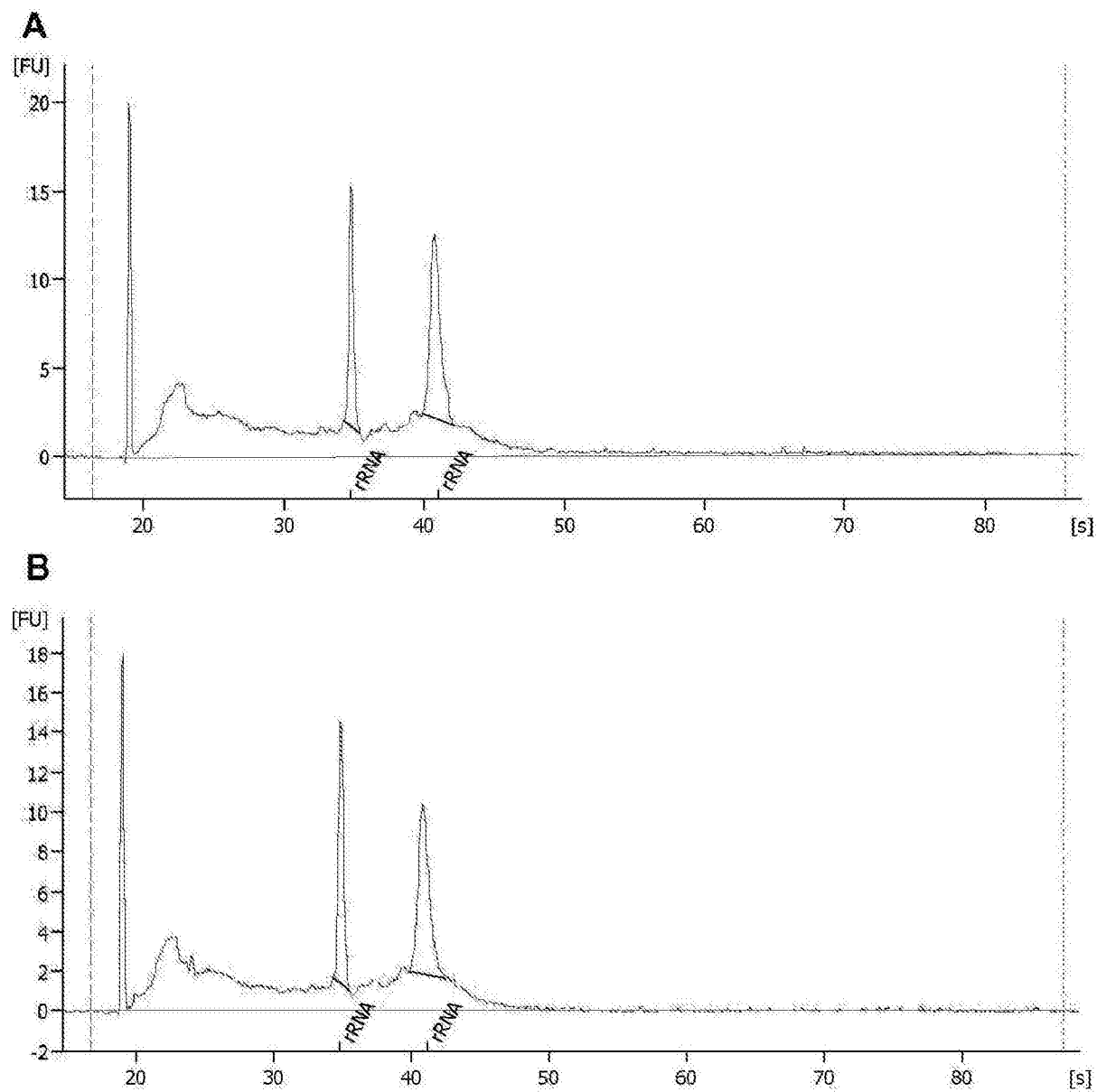


图25

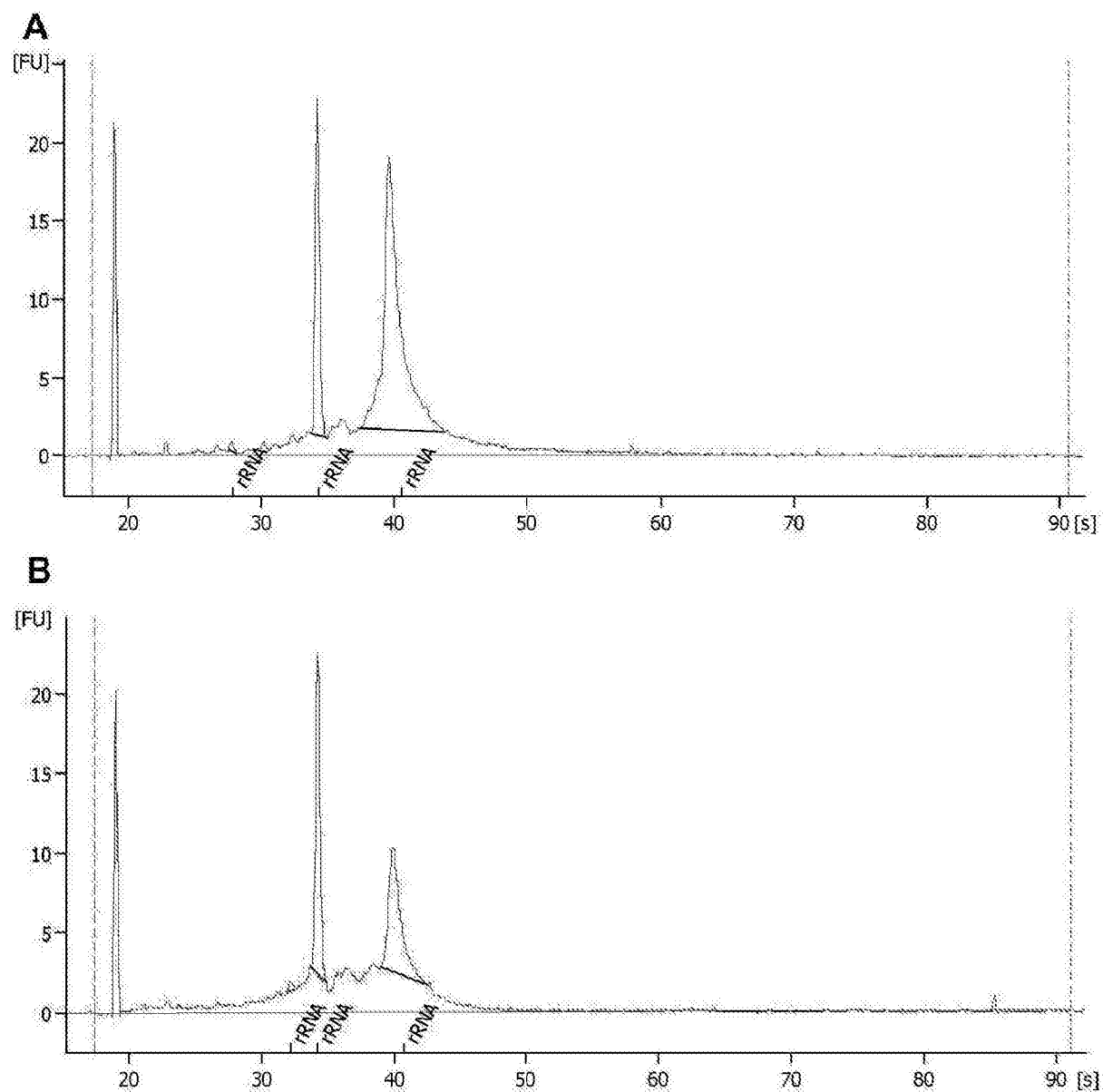


图26

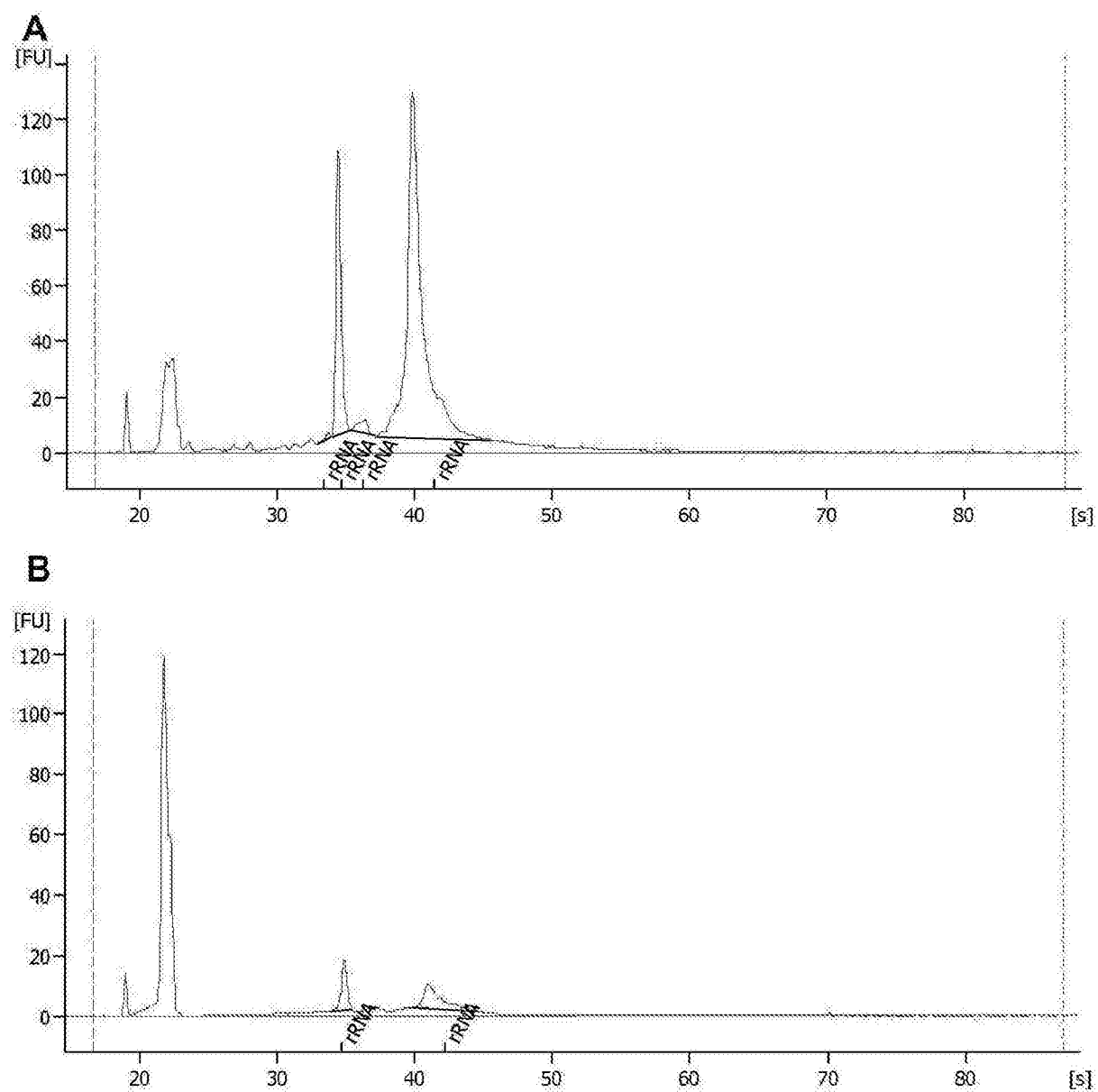


图27

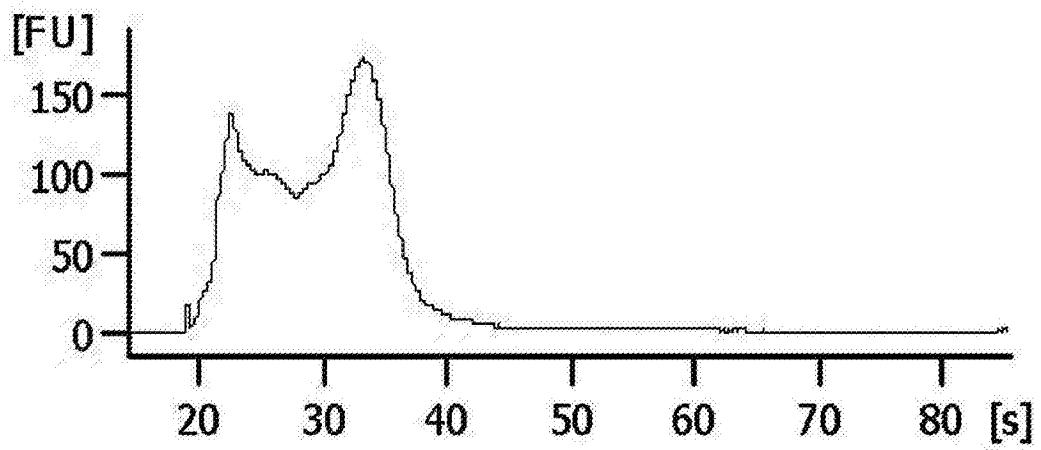
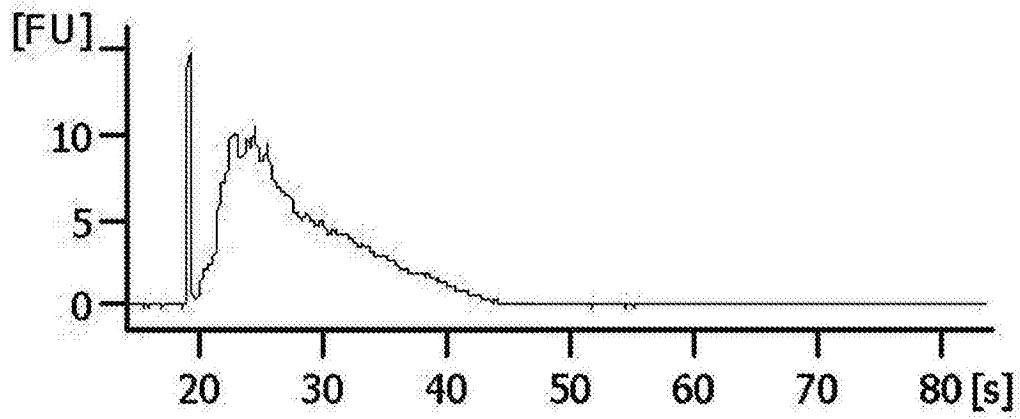
A**B**

图28

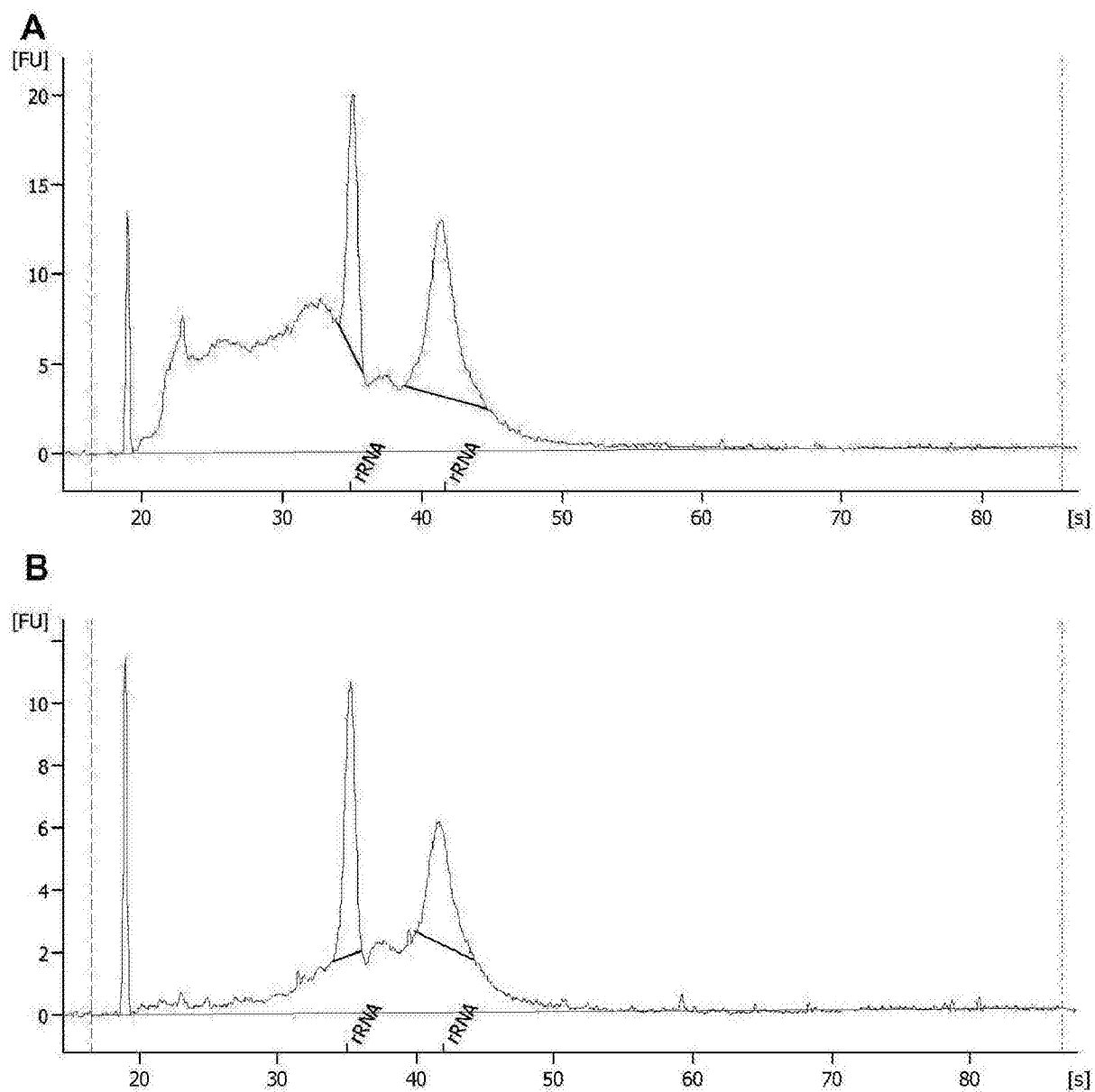


图29

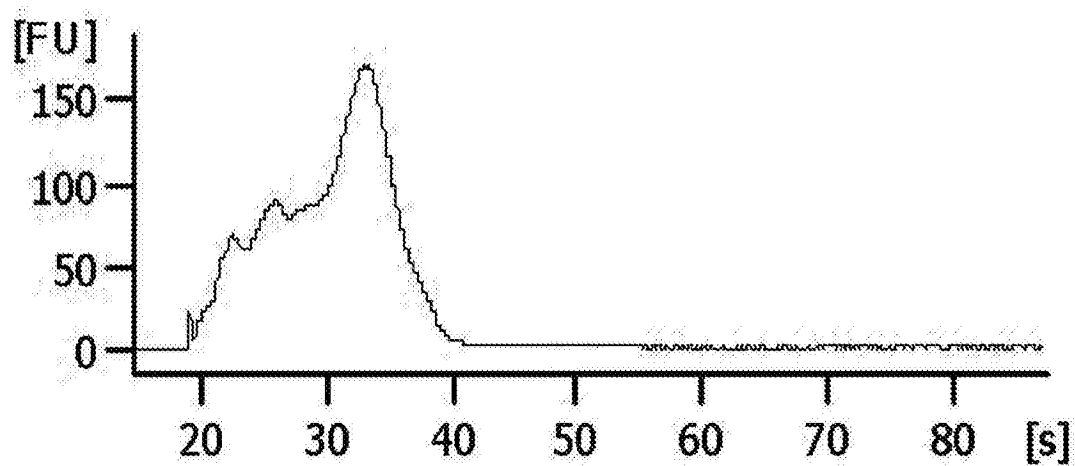
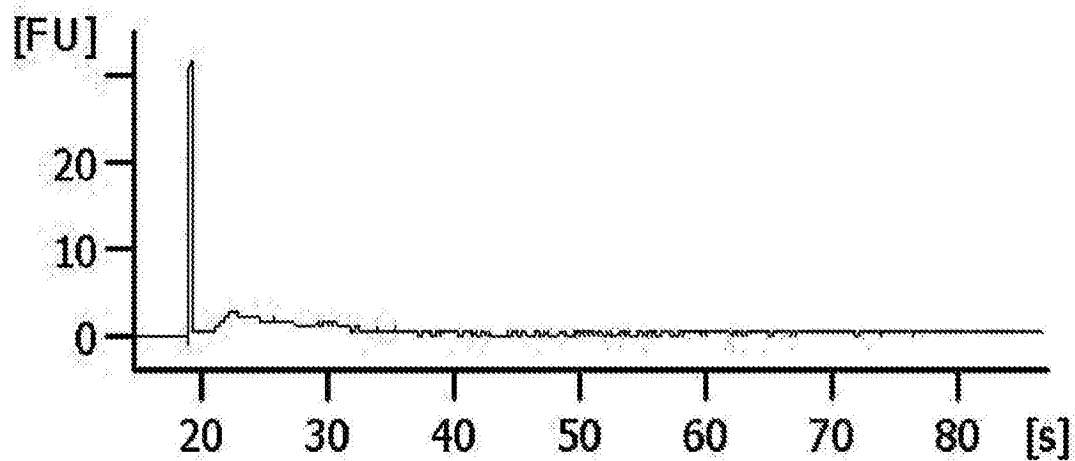
A**B**

图30

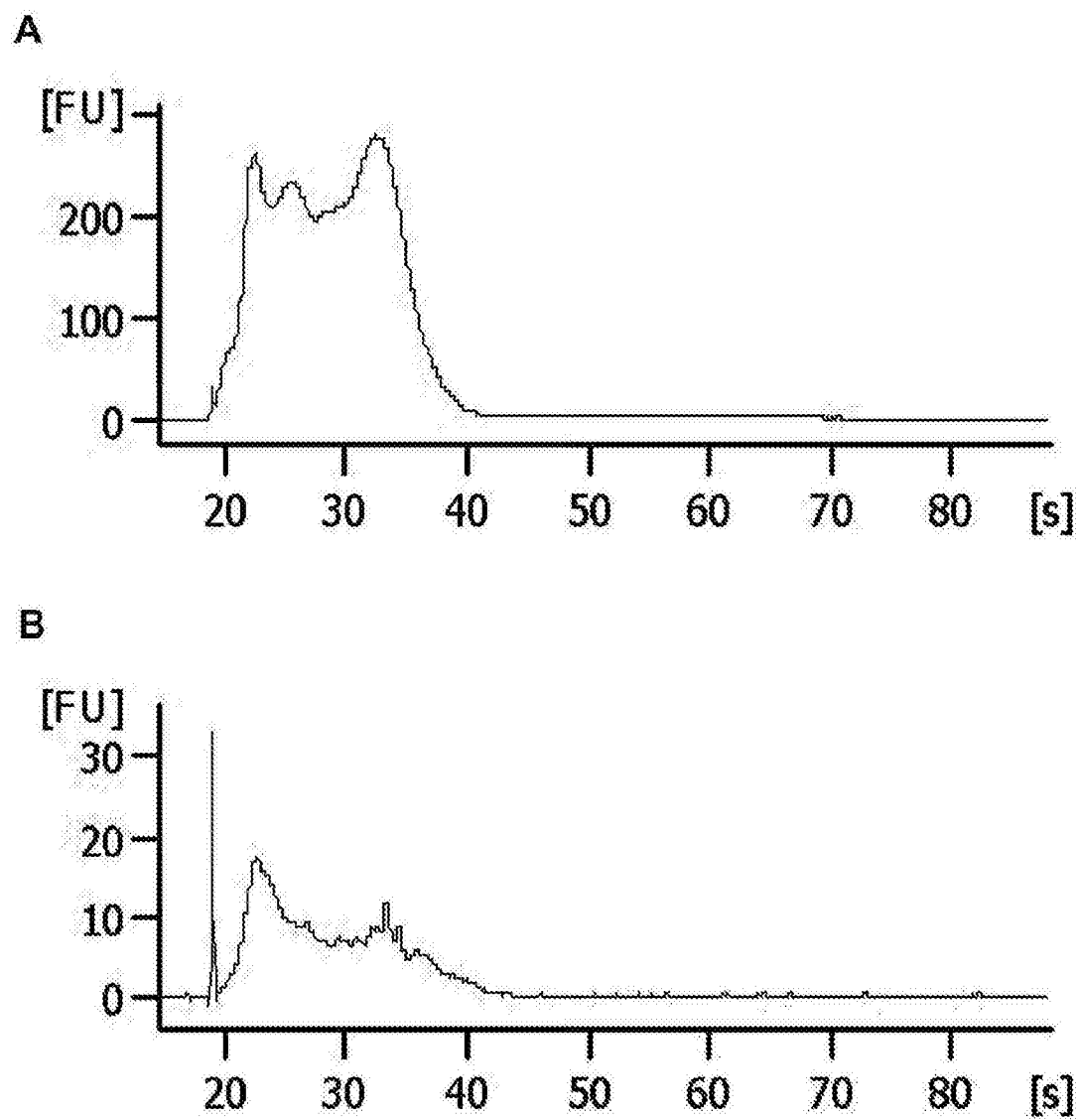


图31

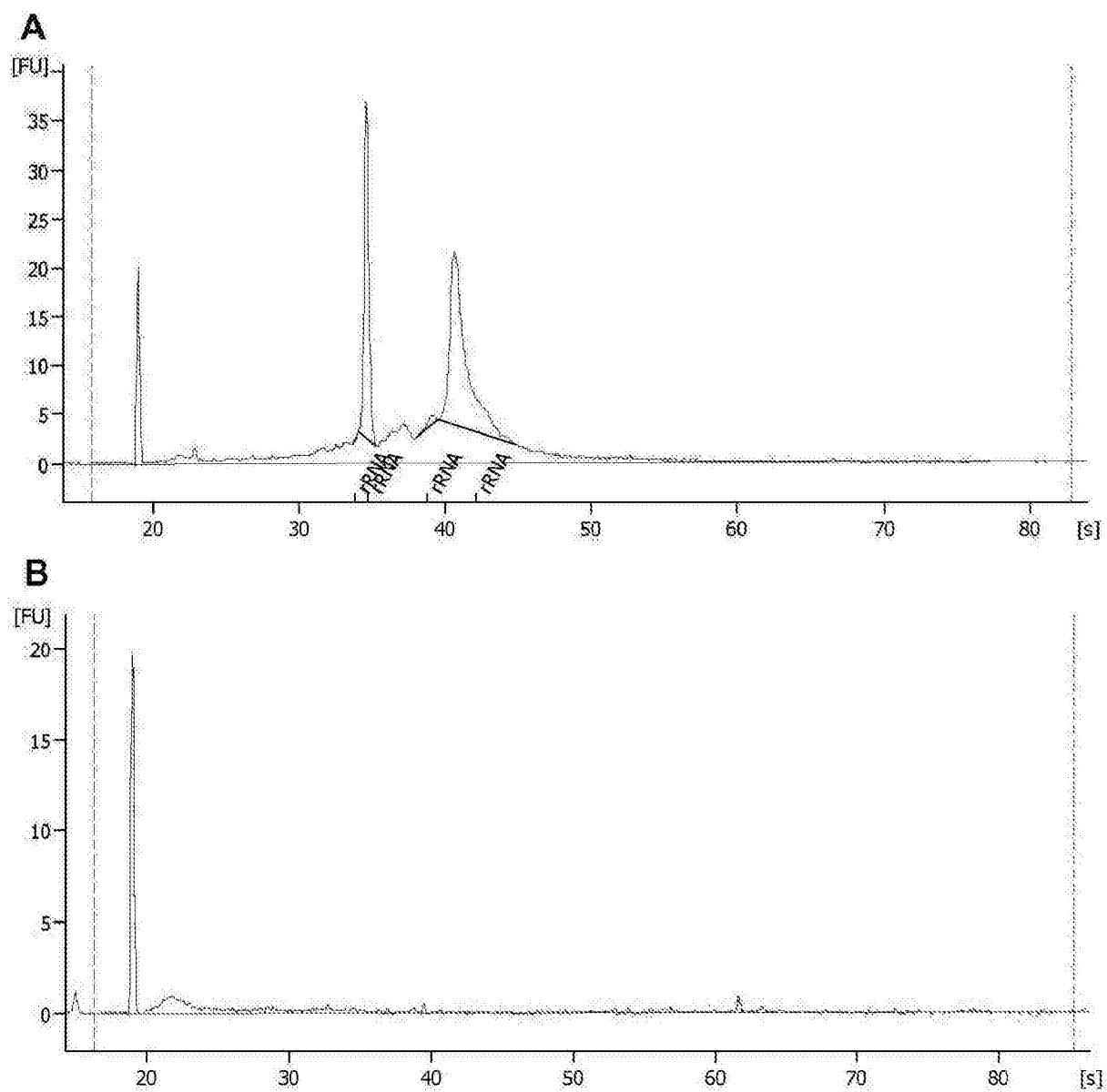


图32

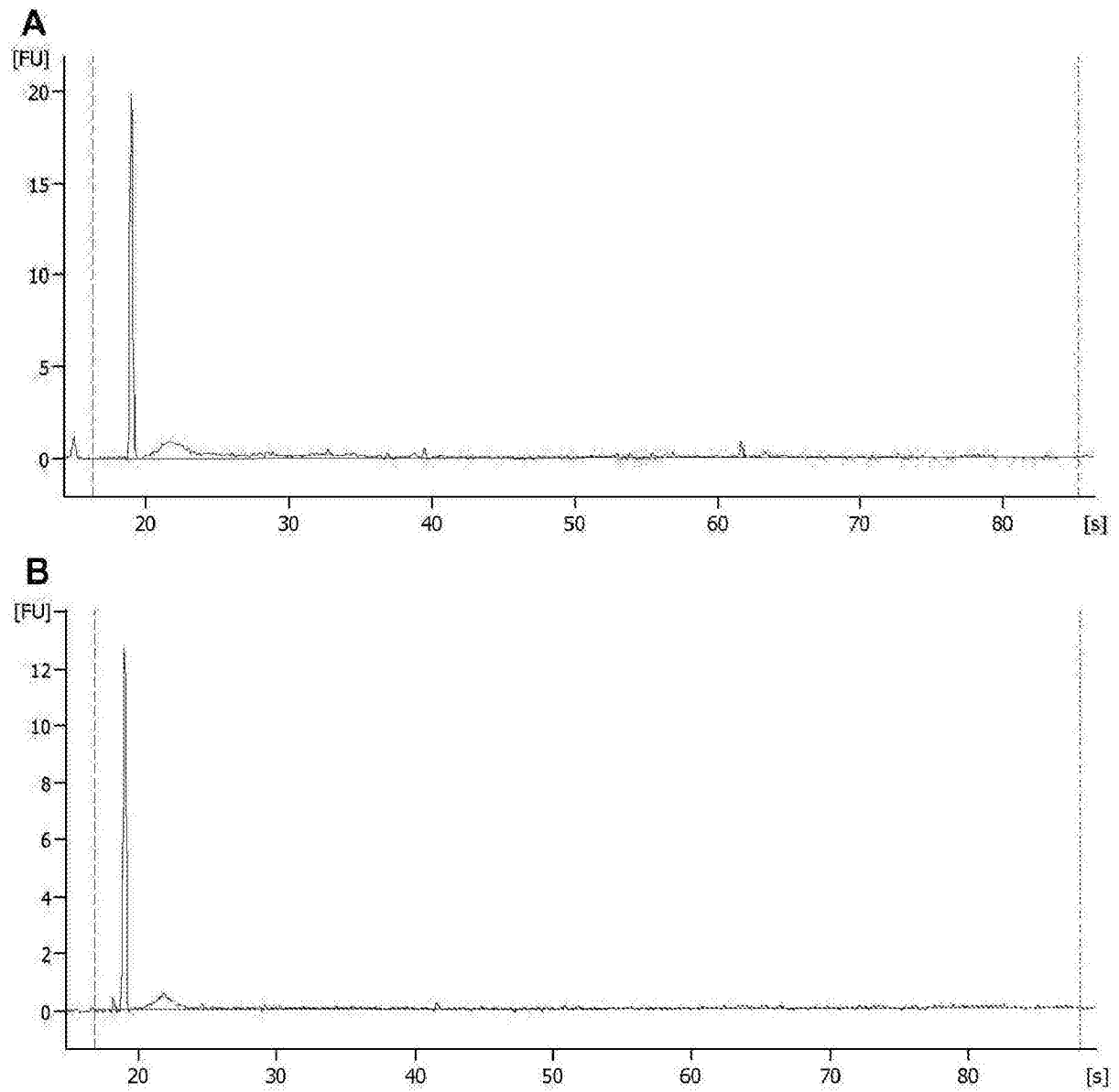


图33

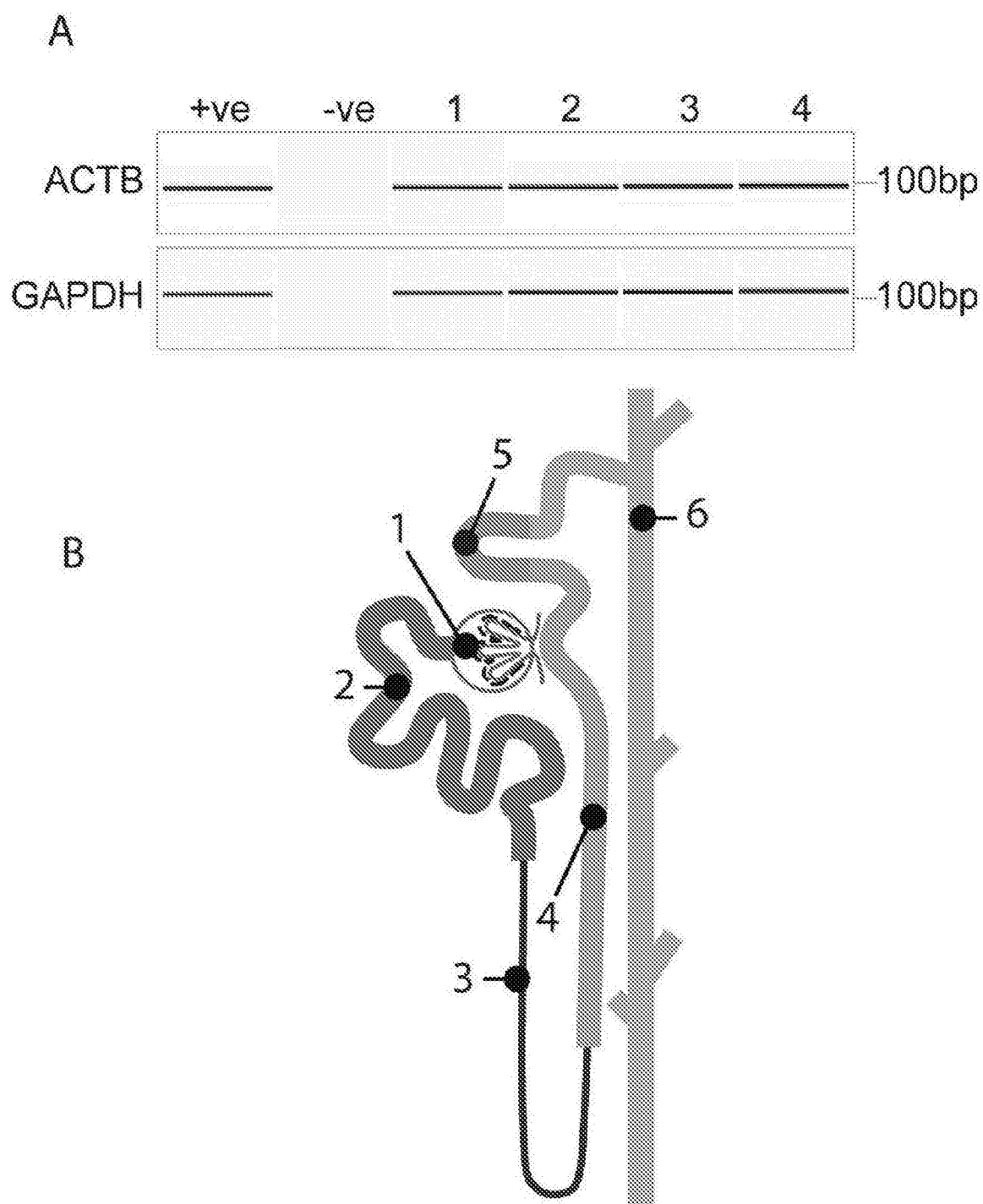


图34

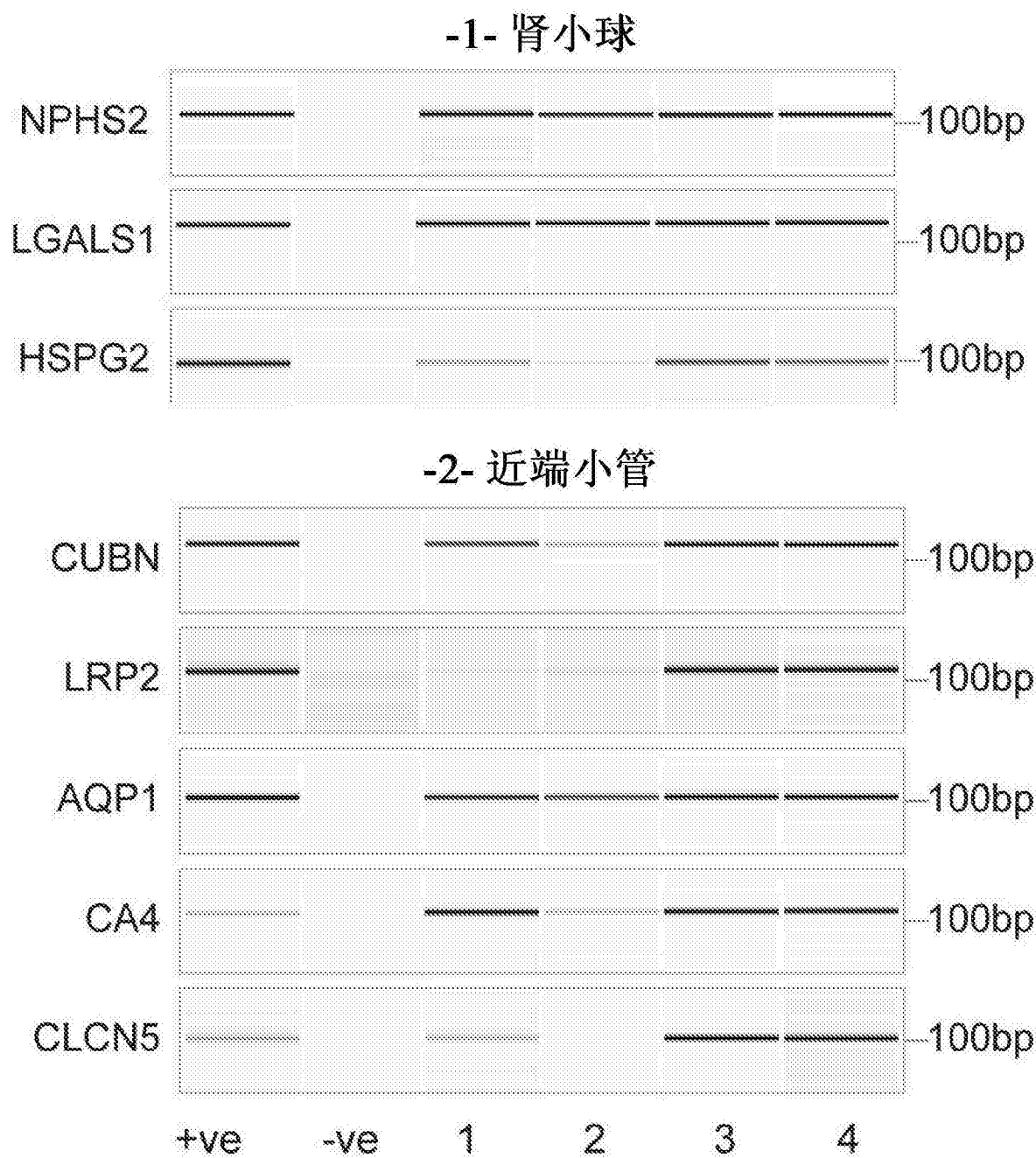


图35

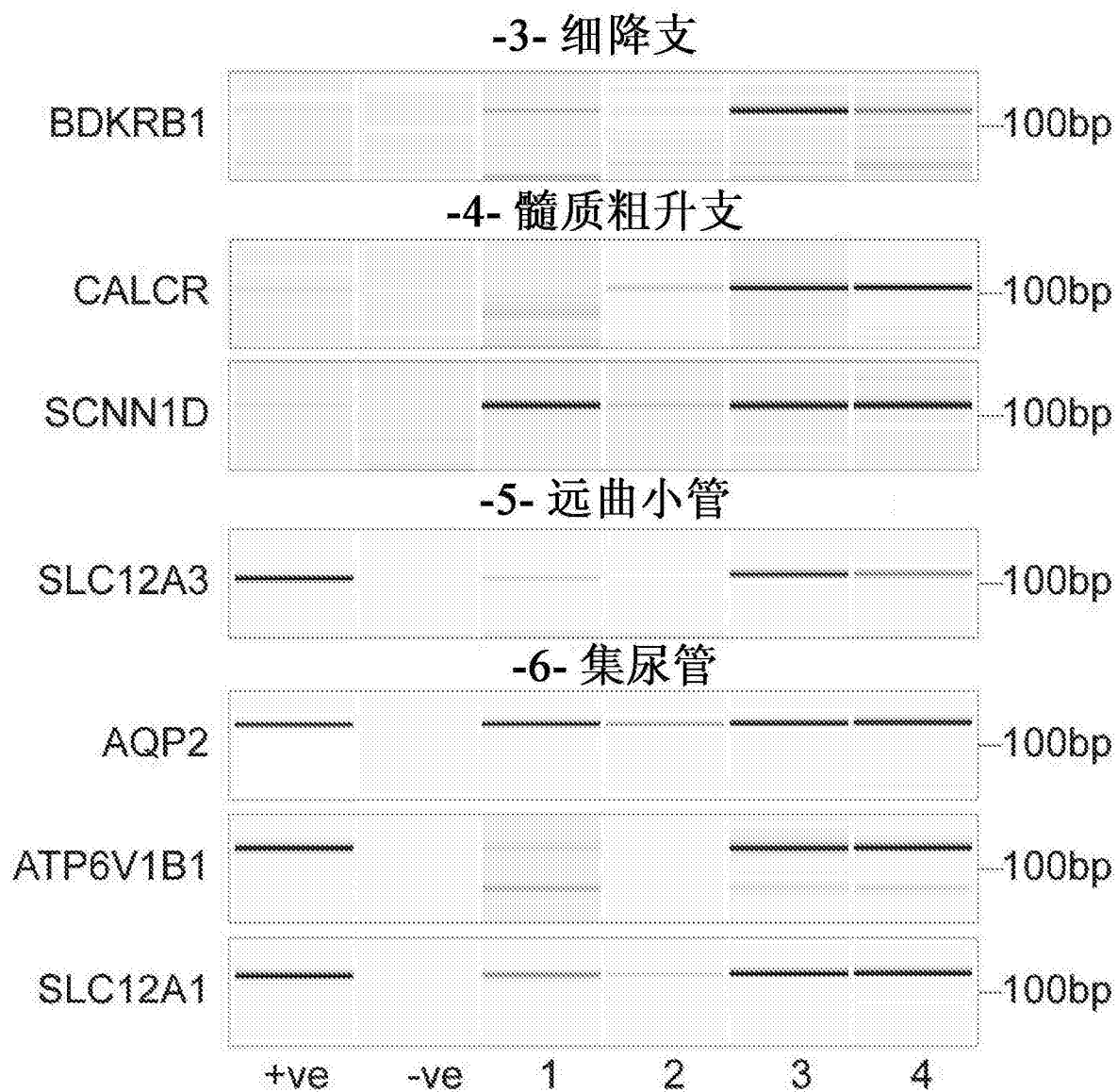


图36

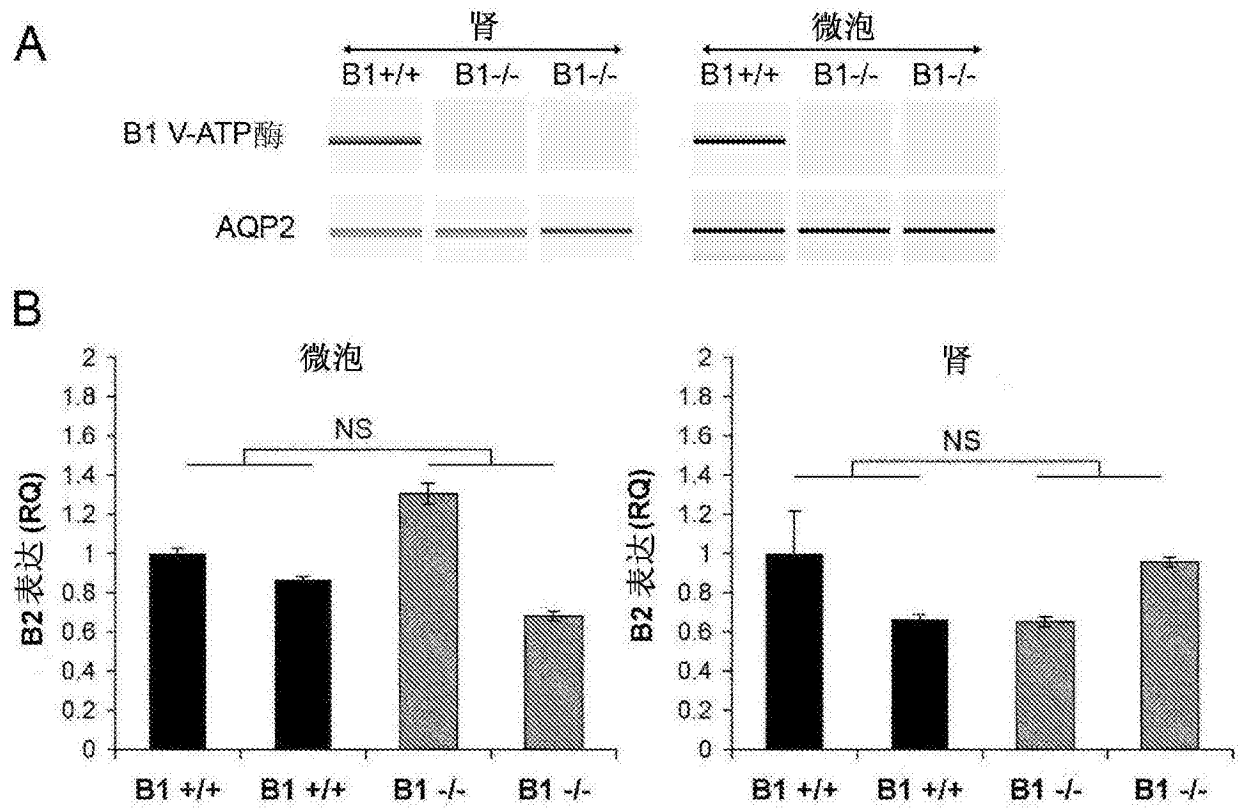


图37

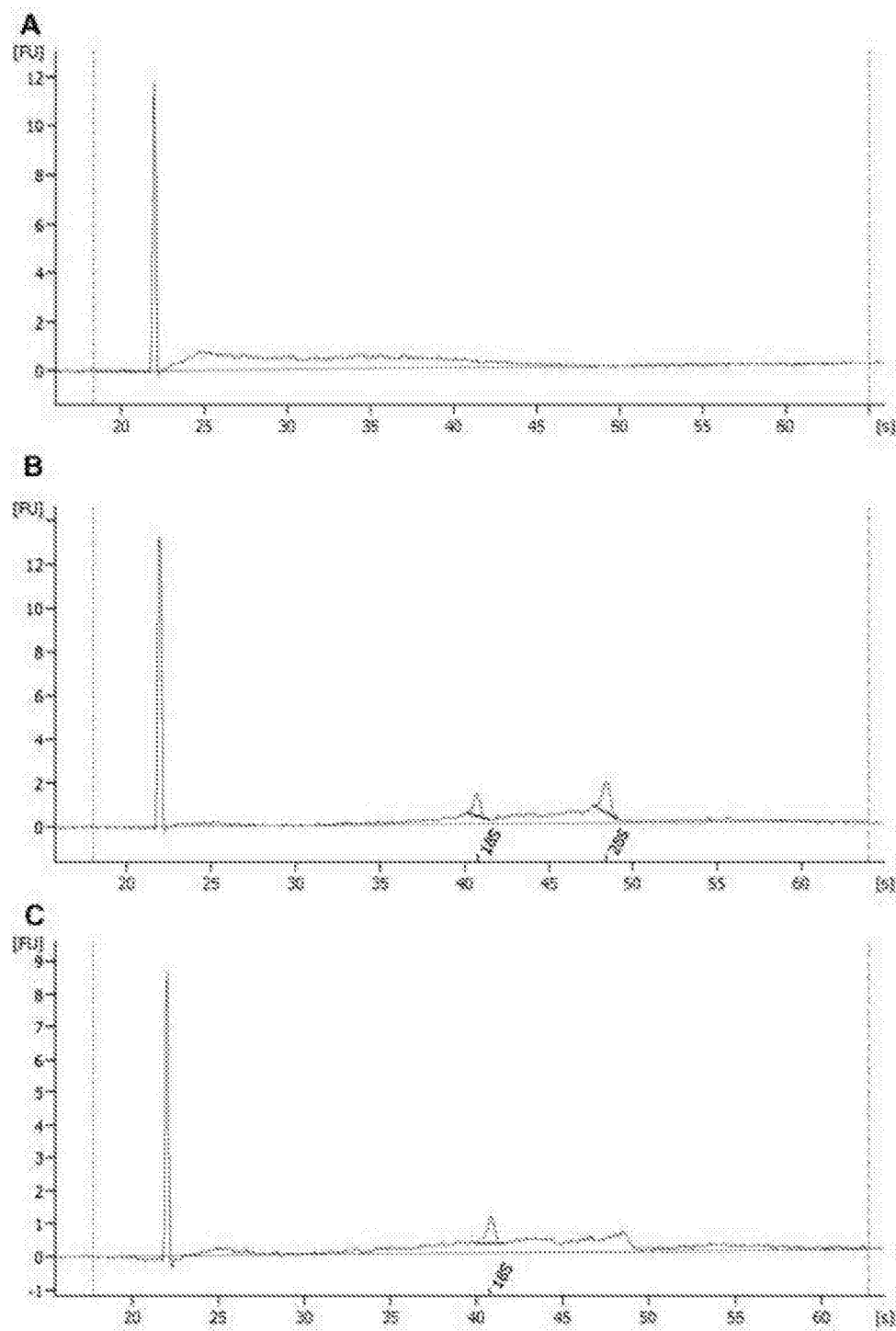


图38

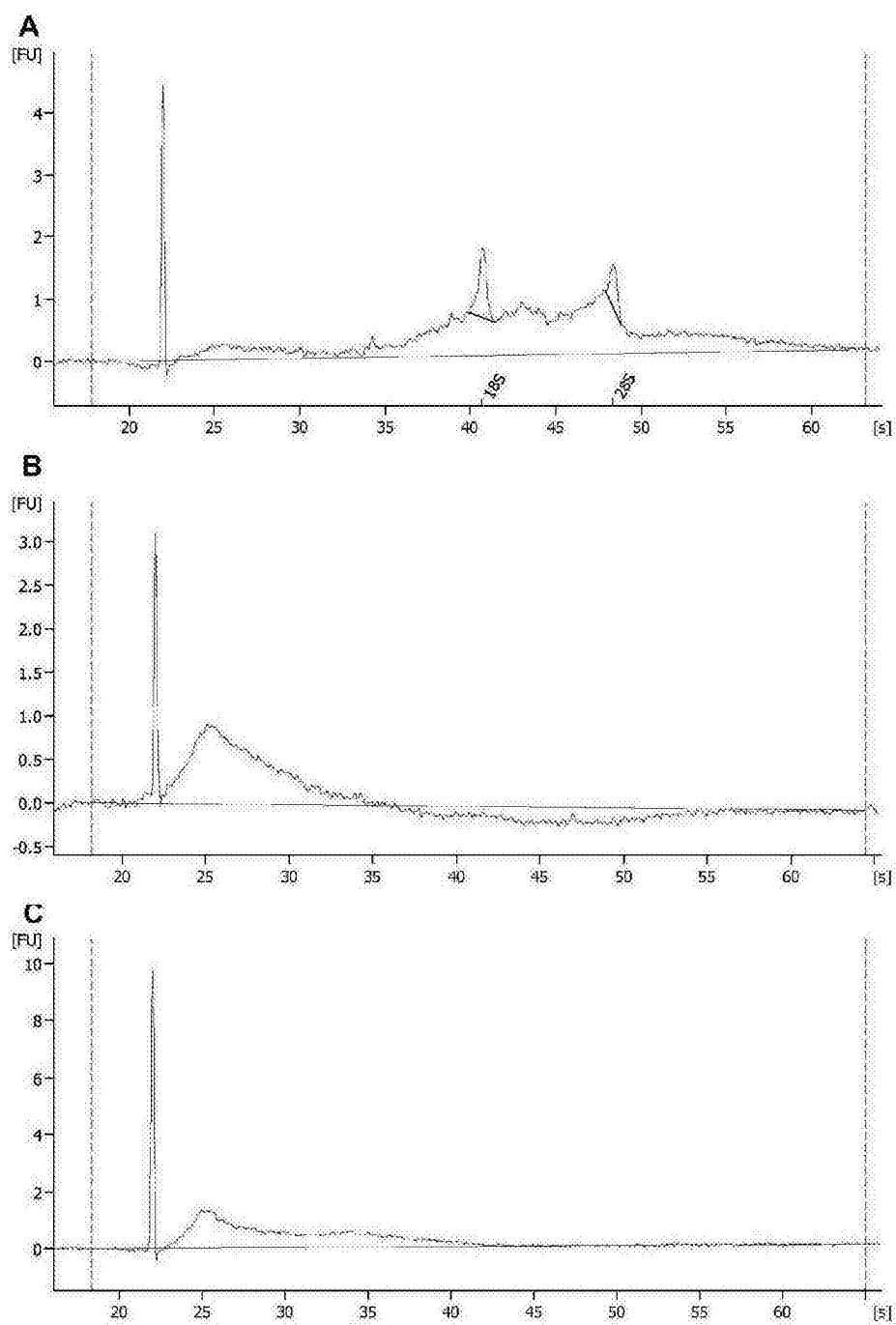


图39

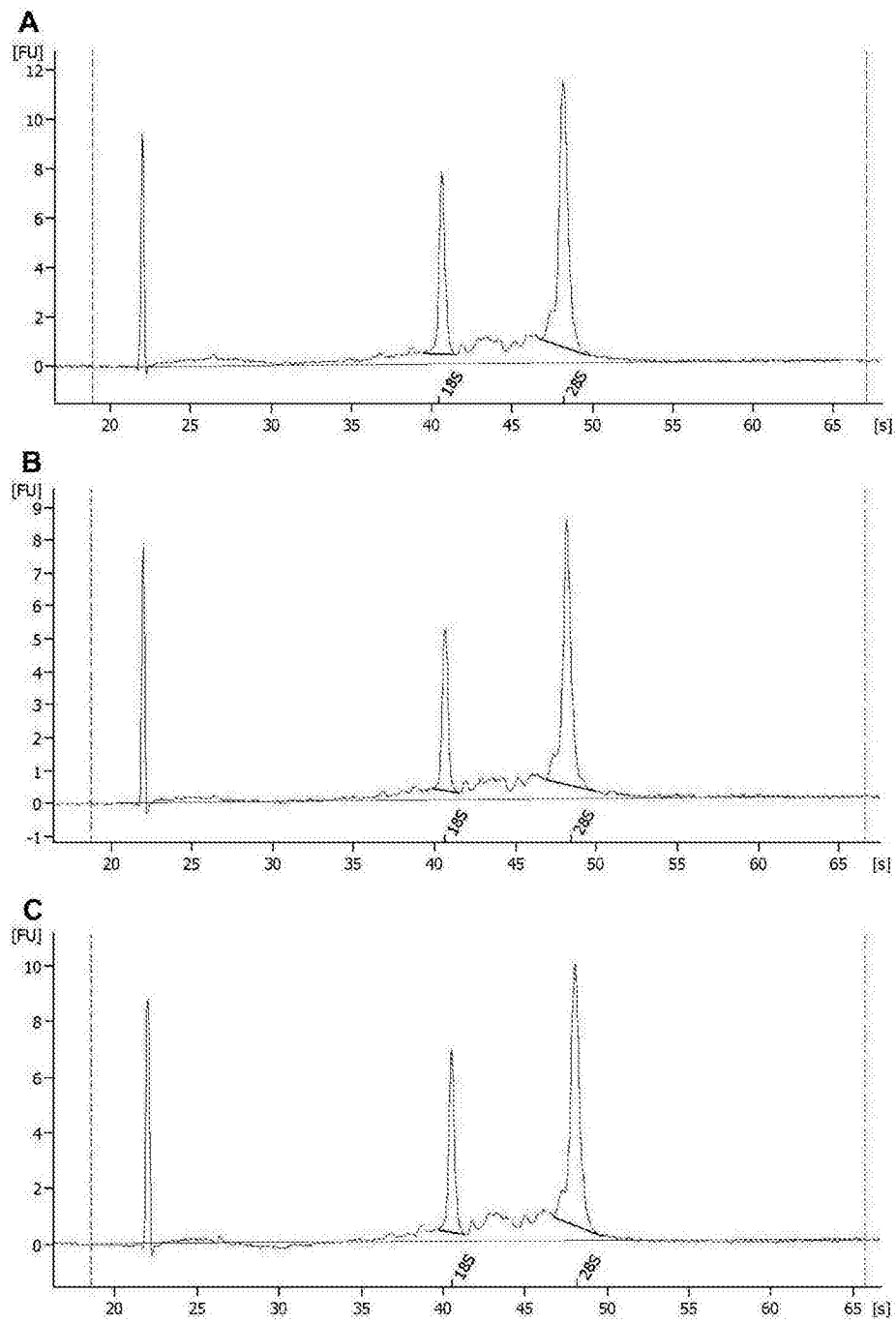


图40

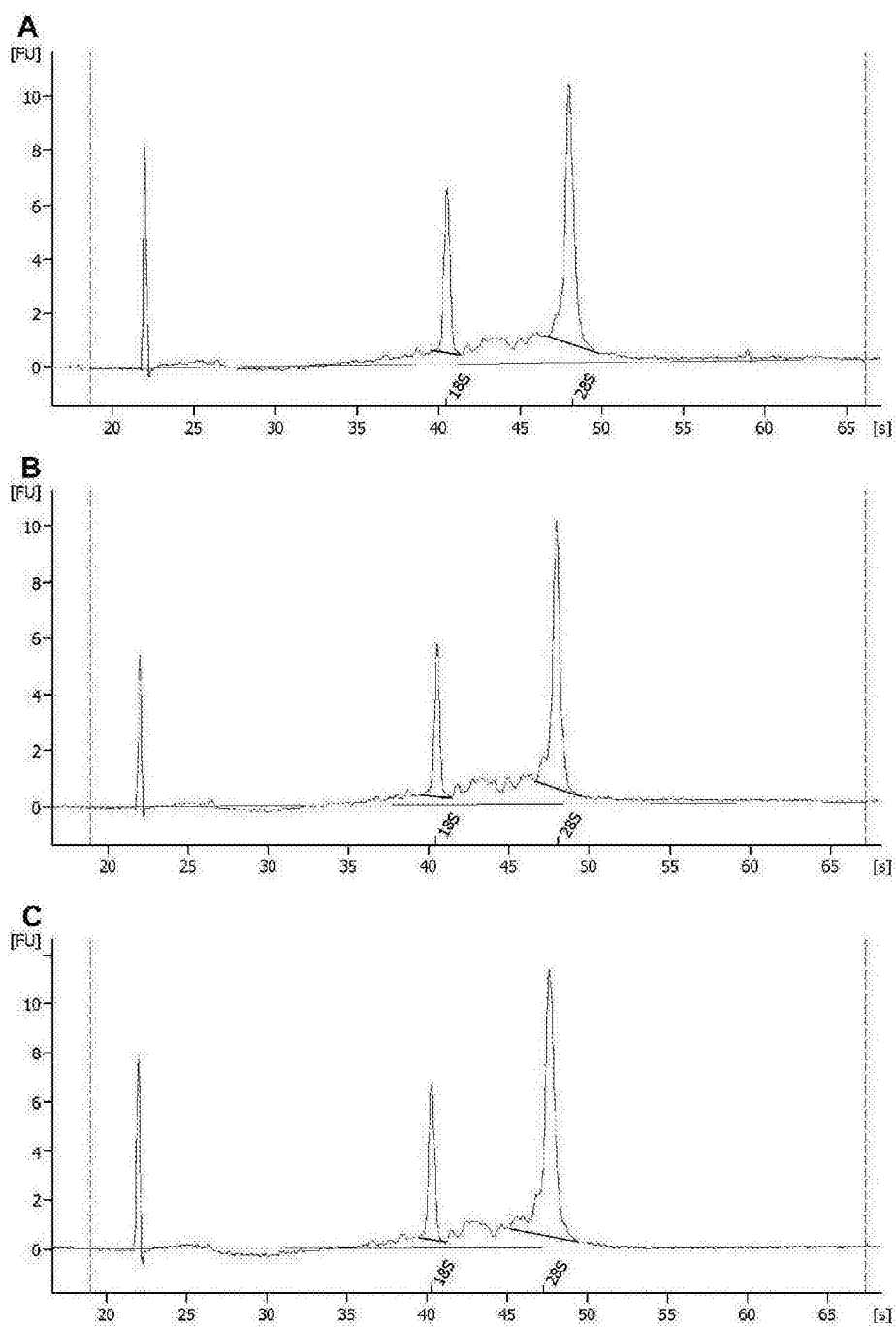


图41

染色体区域	SEQ ID NO.
chr1.-1.91625366.91625741	1
chr1.1.91625365.91625742	2
chr11.-1.84872657.84872882	3
chr11.1.84872657.84872879	4
chr12.-1.126216420.126216526	5
chr12.-1.20595620.20595779	6
chr12.1.126216422.126216526	7
chr12.1.20595620.20595778	8
chr16.-1.33870510.33870780	9
chr16.-1.33870782.33870924	10
chr16.-1.33871356.33871567	11
chr16.1.33870510.33871097	12
chr16.1.33871357.33871493	13
chr17.-1.30502222.30502487	14
chr17.1.30502222.30502388	15
chr19.-1.40758344.40758514	16
chr19.1.40758344.40758507	17
chr2.-1.132729275.132729395	18
chr2.-1.132755094.132755190	19
chr2.1.132729152.132729396	20
chr2.1.132755094.132755188	21
chr23.-1.108184279.108184494	22
chr23.1.108184266.108184494	23
chr42.-1.1677545.1678136	24
chr42.1.1677550.1678219	25
chr5.-1.71182494.71182703	26
chr5.1.71182494.71182700	27
chr7.-1.148315173.148315266	28
chr7.1.148315170.148315268	29

图42

1	chr1.-1.91625366.91625741
	tccagctcacgttcctatt 1L; ccaggtggggagtttgact 1R
2	chr11.-1.84872657.84872882
	gctaaataccggcacgagac 2L; ggtttcacgccctctgtac 2R
3	chr12.-1.126216420.126216526
	ggcgctaaaccattcgtaga 3L; ggagatctgactttcaatagatcg
4	chr12.-1.20595620.20595779
	cggacaggattgacagattg 4L; tctcgttcgttatcggaatt 4R
5	chr16.-1.33870510.33871097
	ttggagggcaagtttagtgc 5L; cagtcggcatcgtttatggt 5R
6	chr16.-1.33871357.33871493
	tccaataaccaacgagactctg 6L; gaaggccacttgcctcta 6R
7	chr17.-1.30502222.30502388
	ttttccgtacgccacattt 7L; ttccctcagtaatggcgagt 7R
8	chr19.-1.40758344.40758514
	tcatcagaccccagaaaagg 8L; gattcggcaggtgagttgtt 8R
9	chr2.-1.132729275.132729395
	tctagcggtgcaatatgaatg 9L; ctgggaataatggaataggaccac
10	chr2.-1.132755094.132755190
	ggacccatgttcaactgctg 10L; cagatcttggtgtagtagcaaa 10R

图43

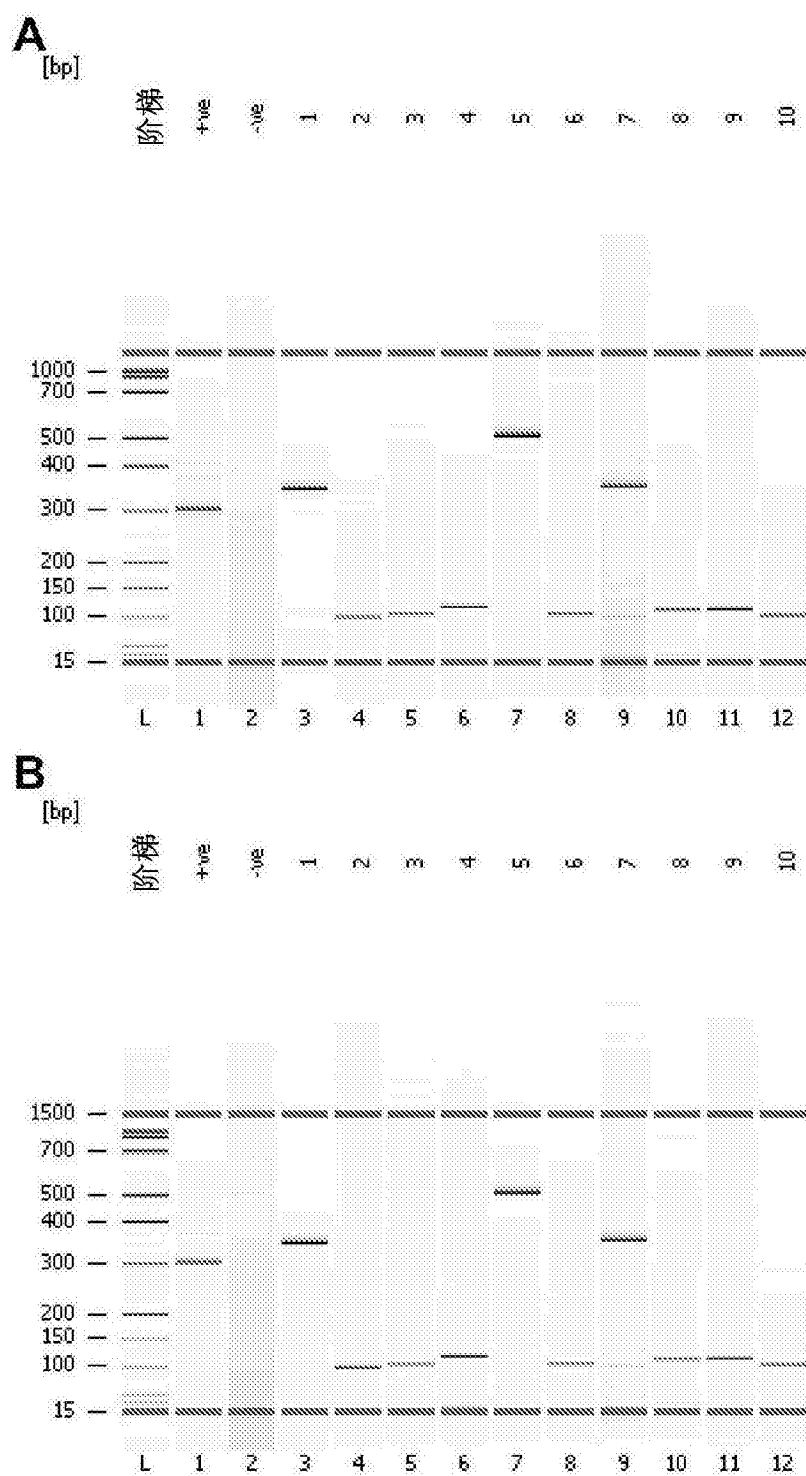


图44

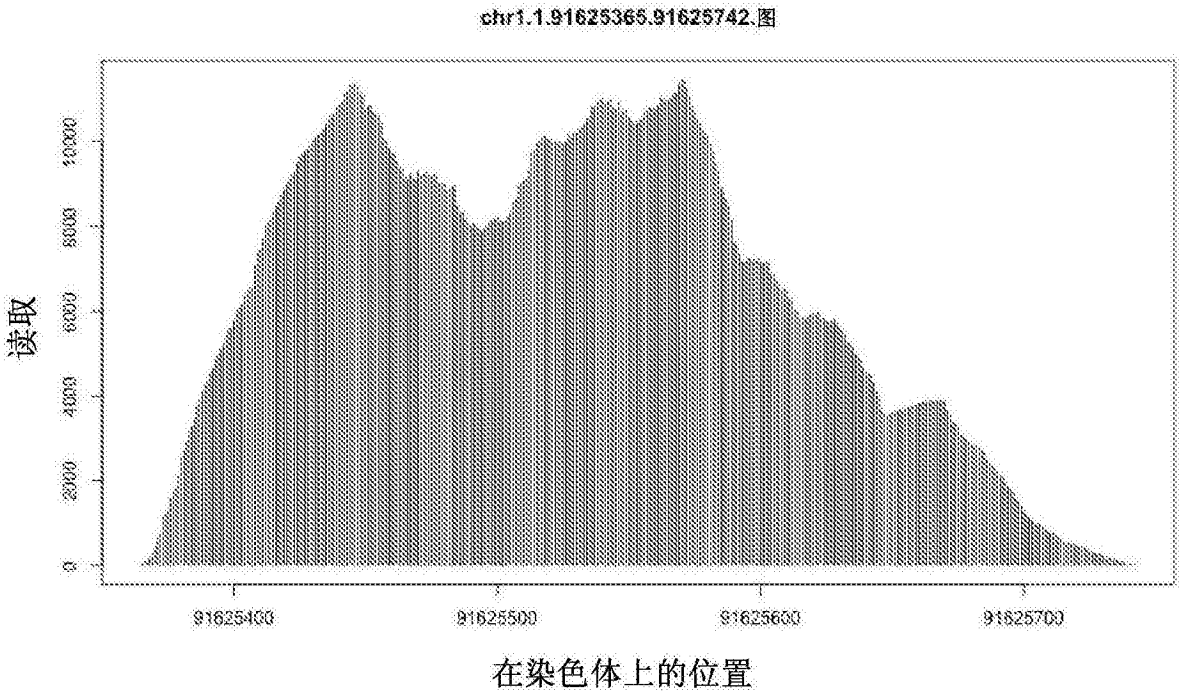


图45

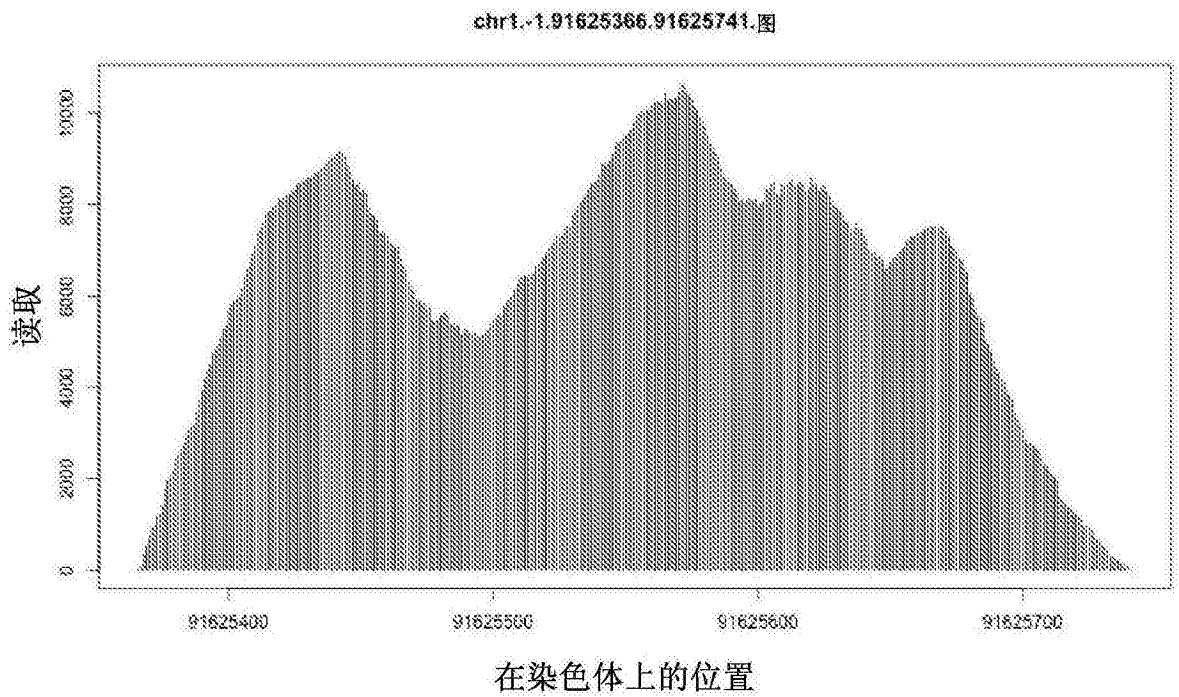


图46

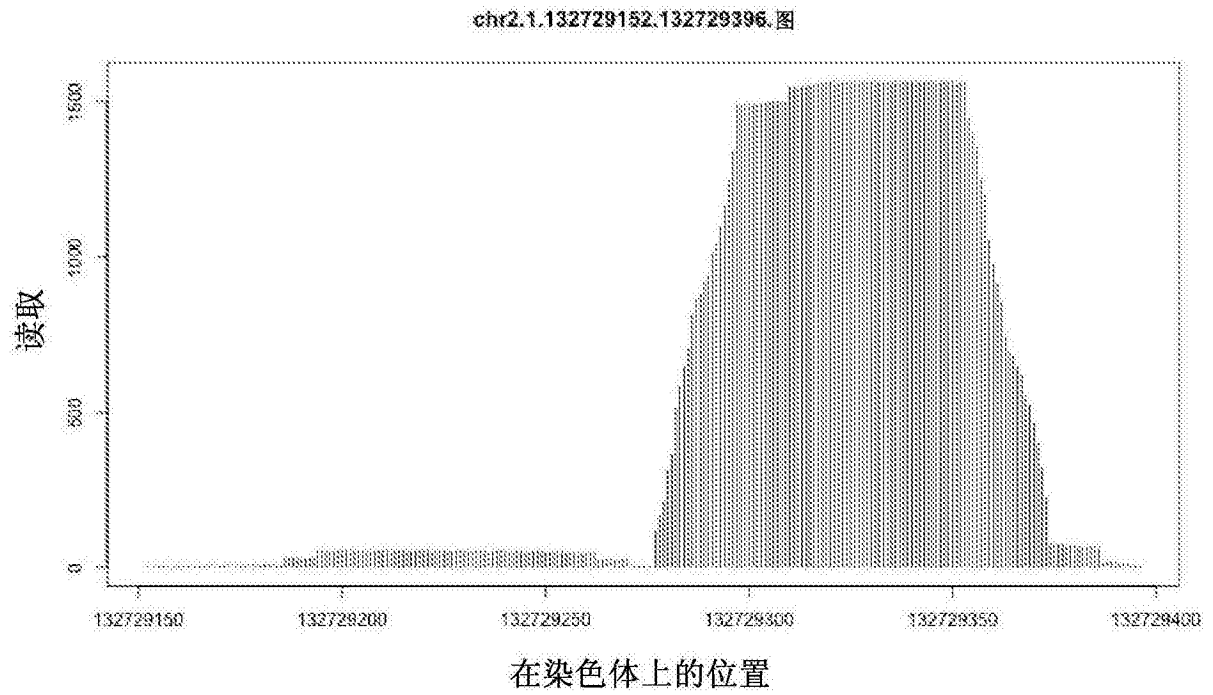


图47

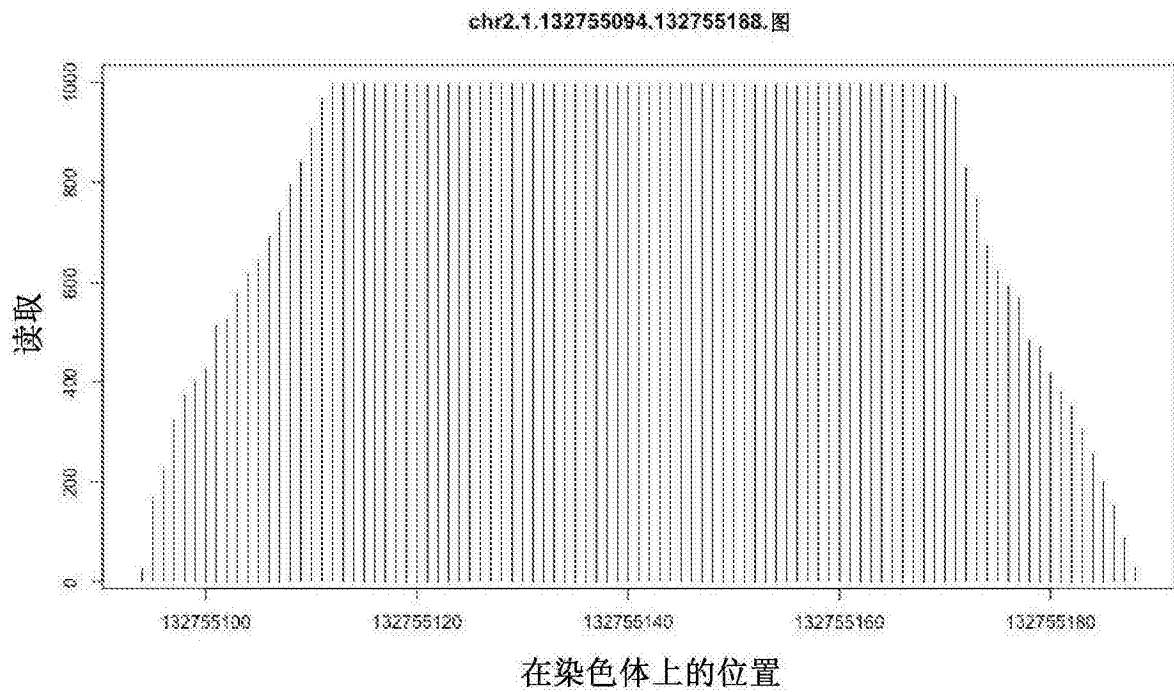


图48

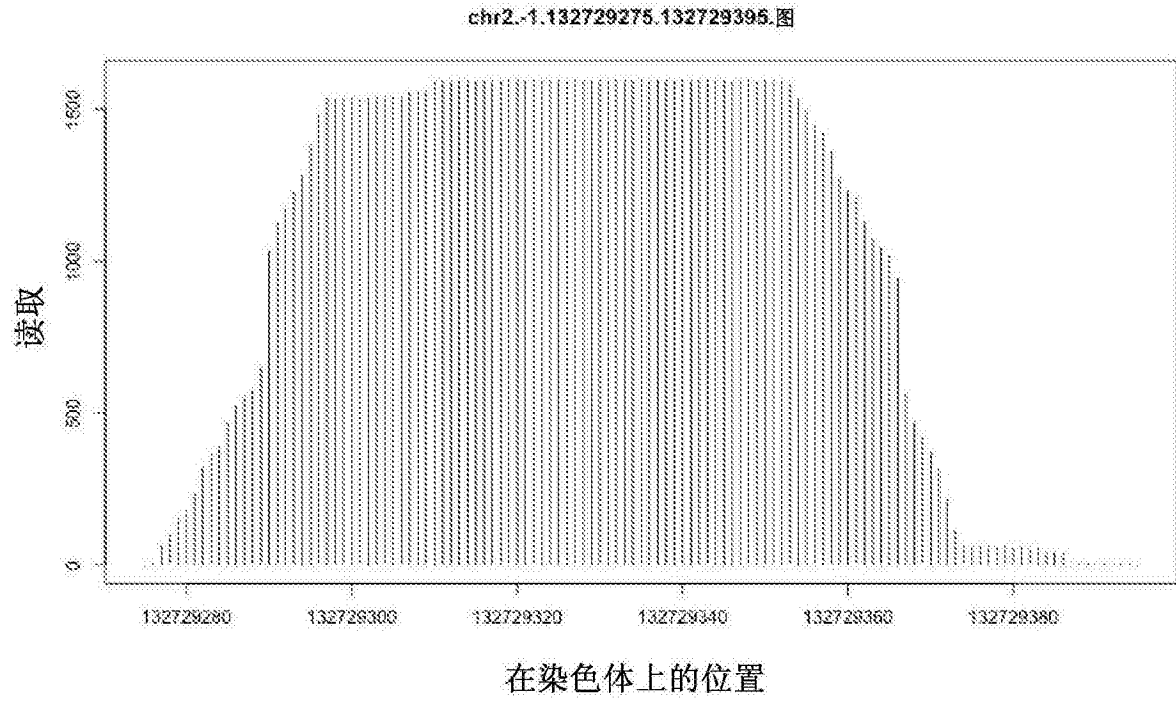


图49

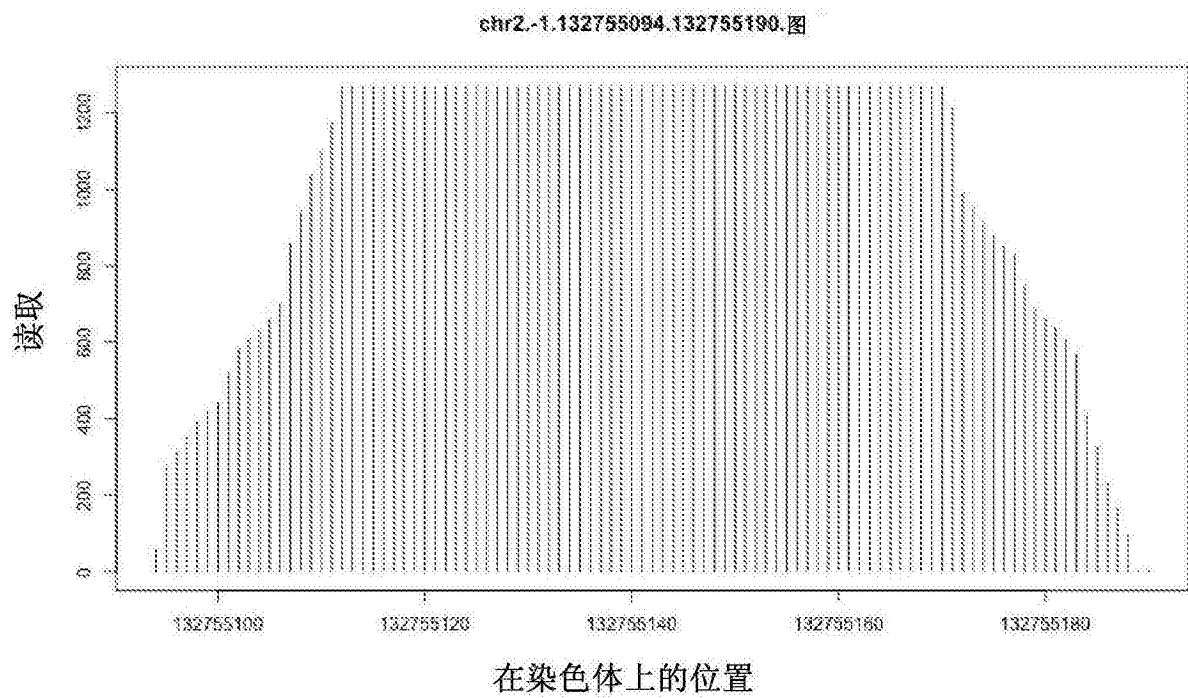


图50

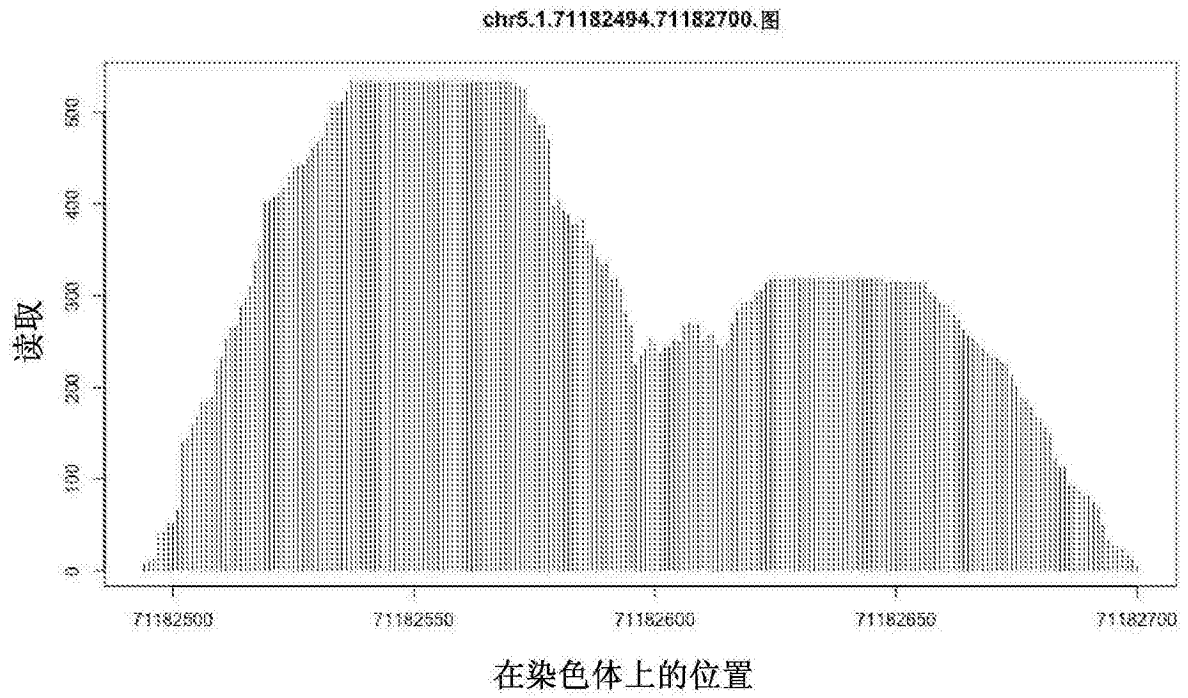


图51

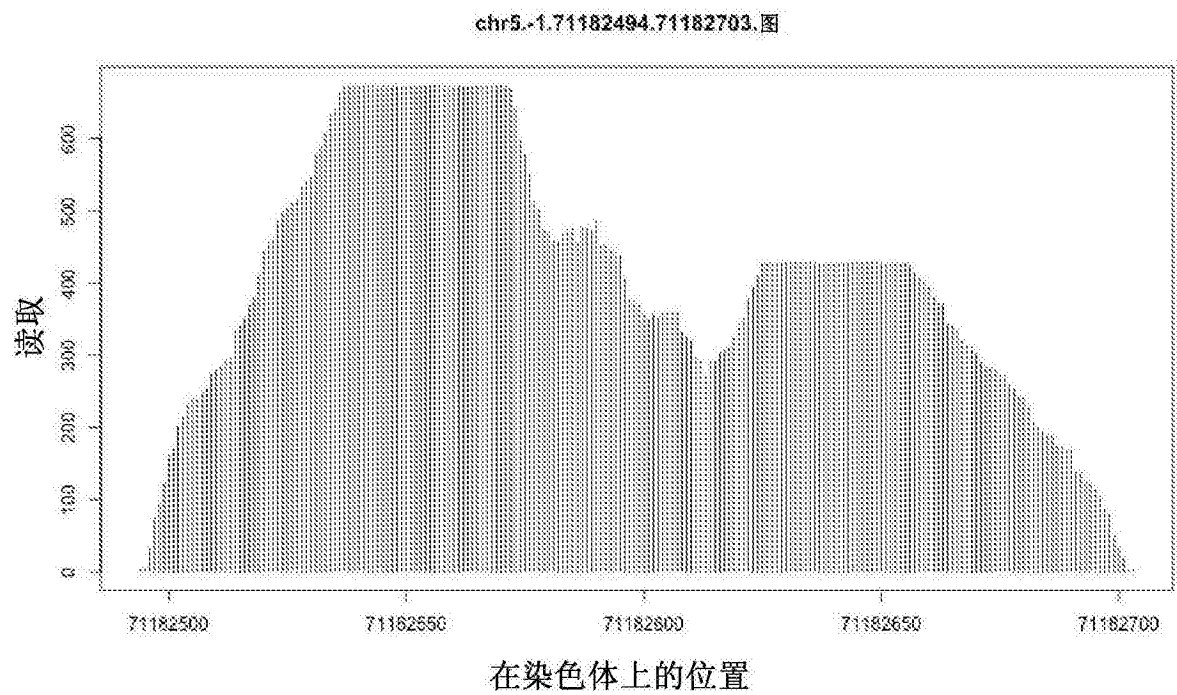


图52

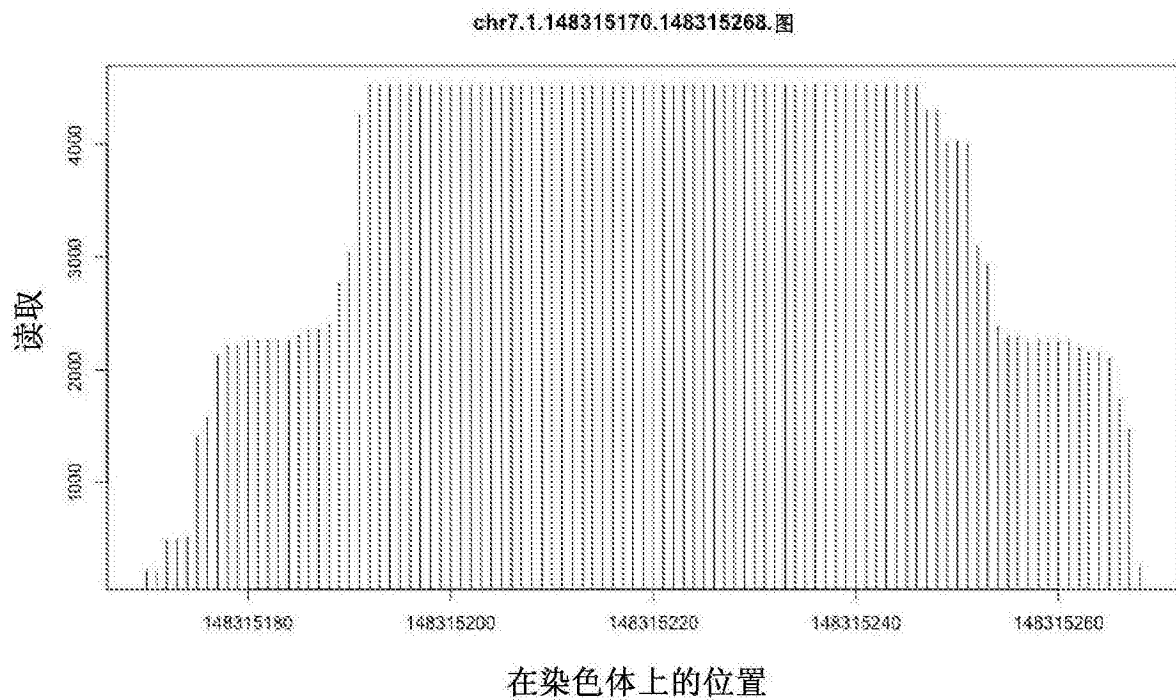


图53

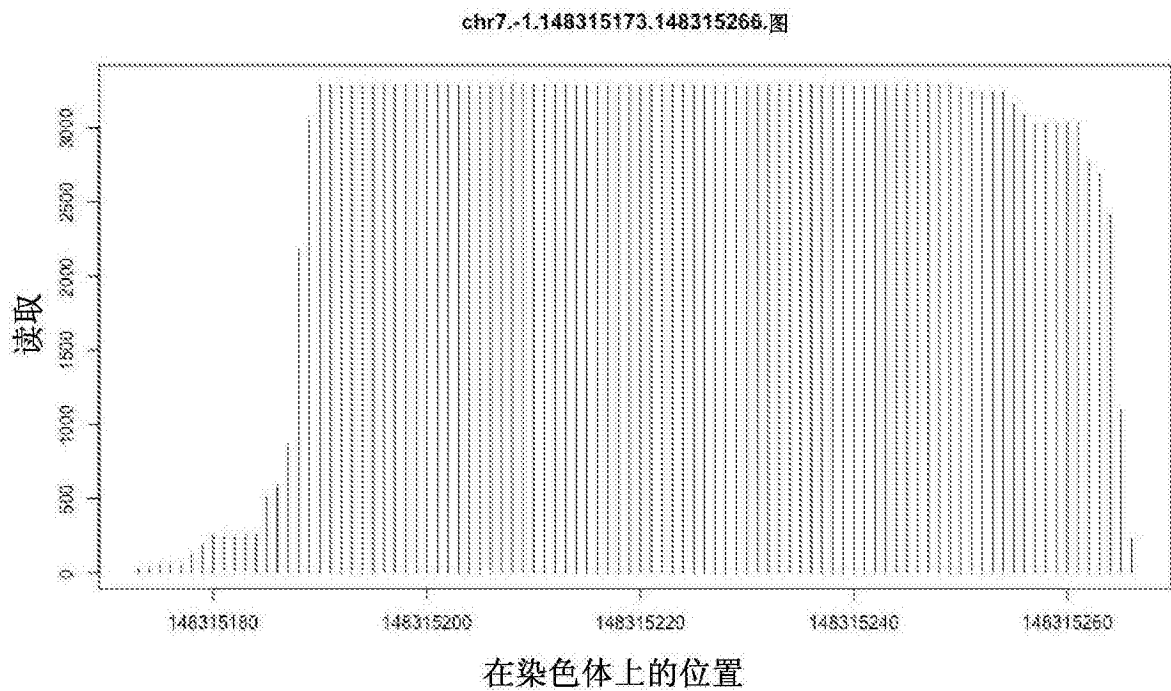


图54

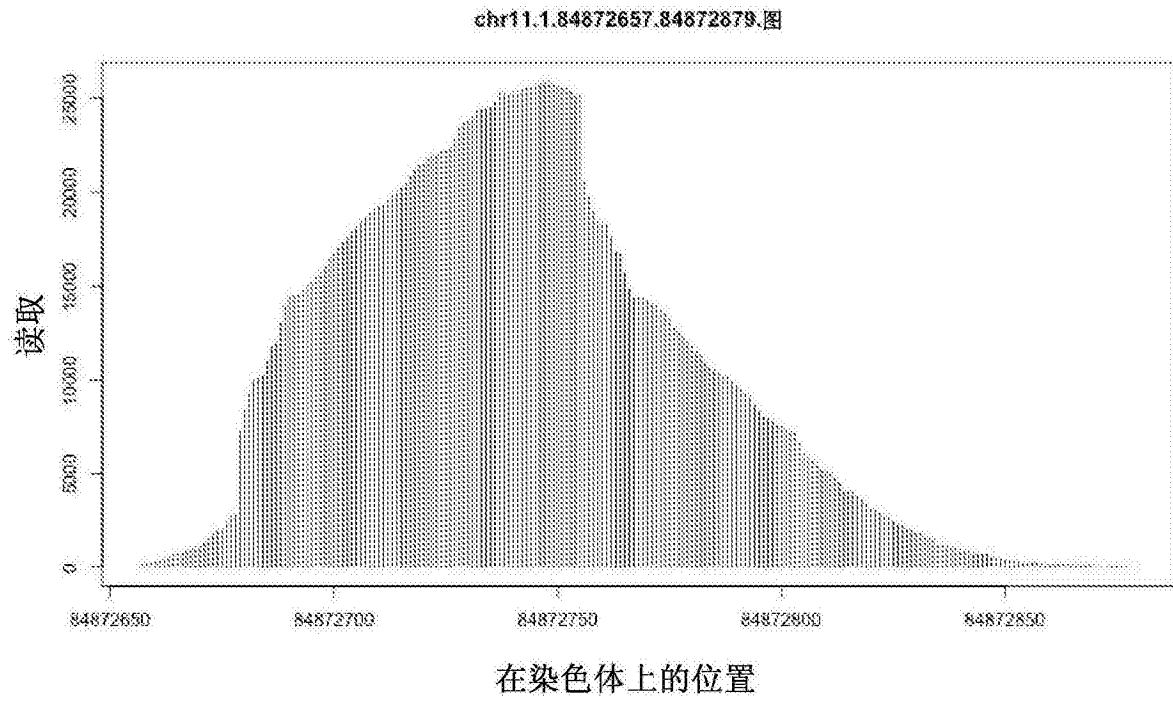


图55

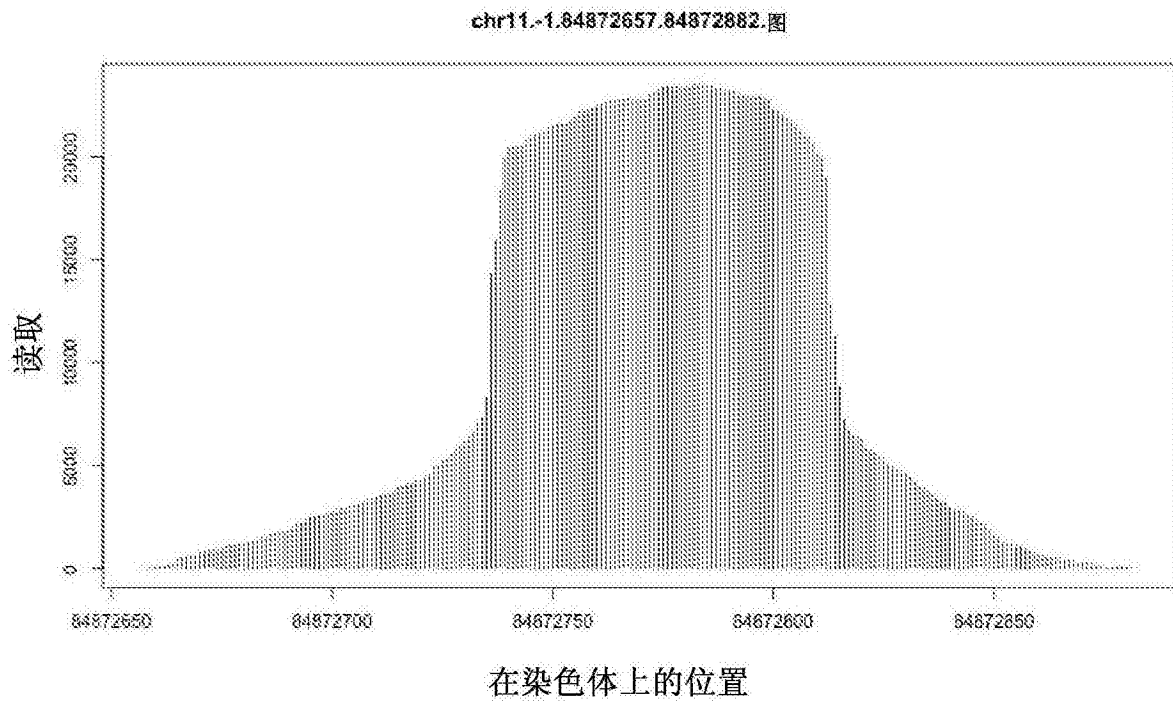


图56

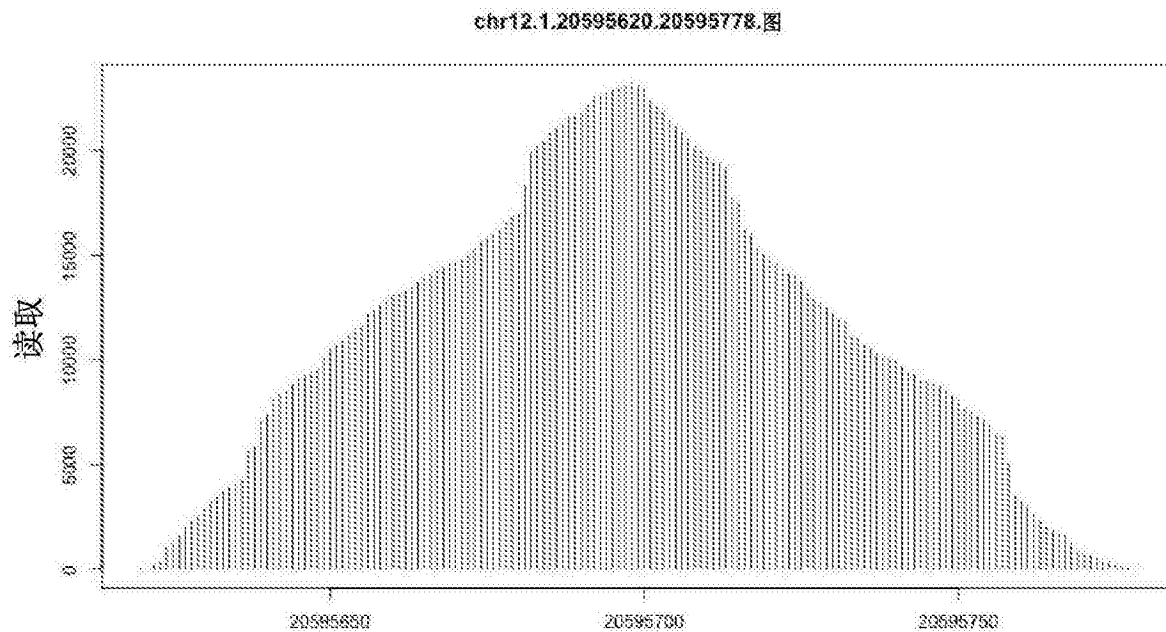


图57

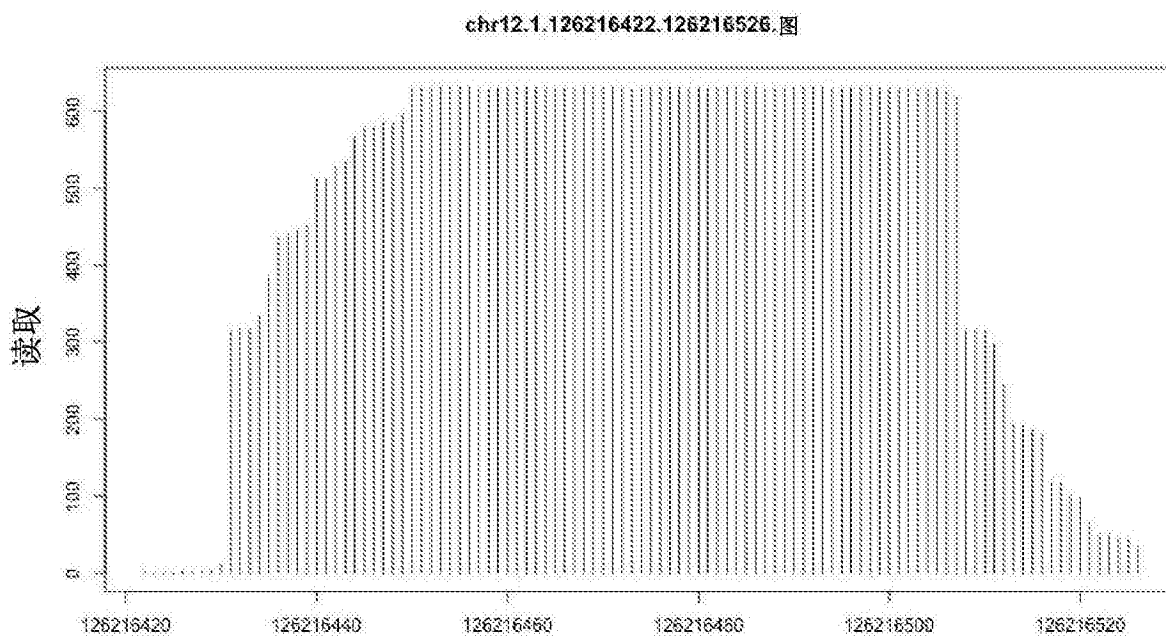


图58

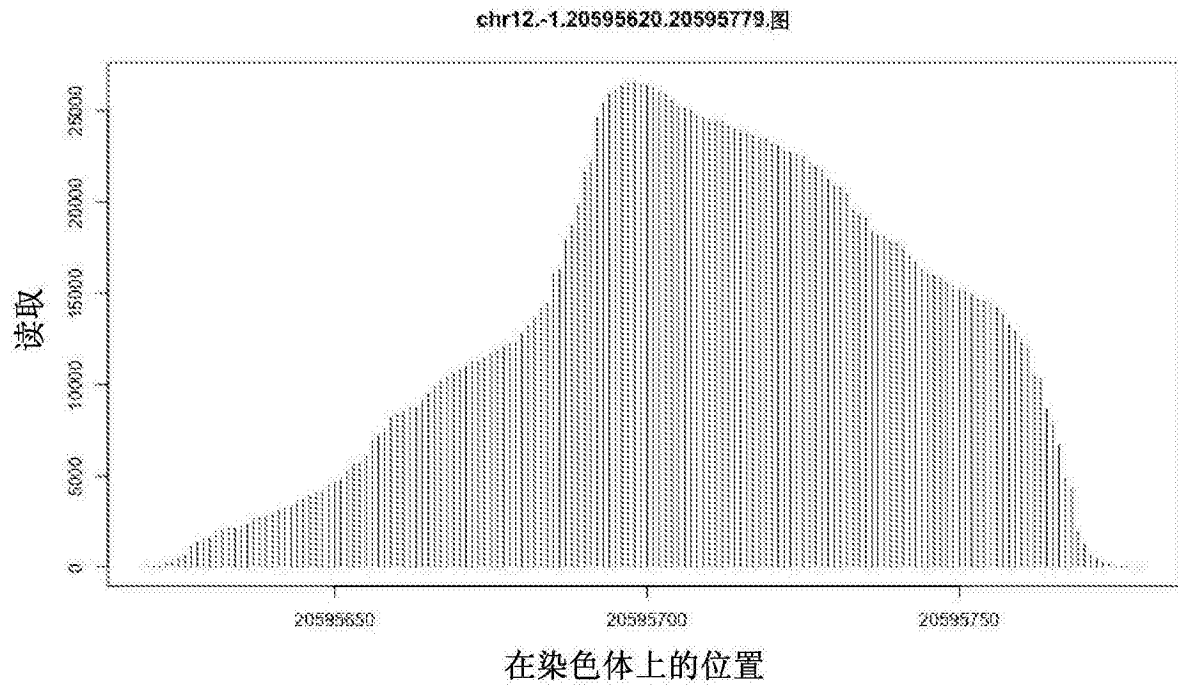


图59

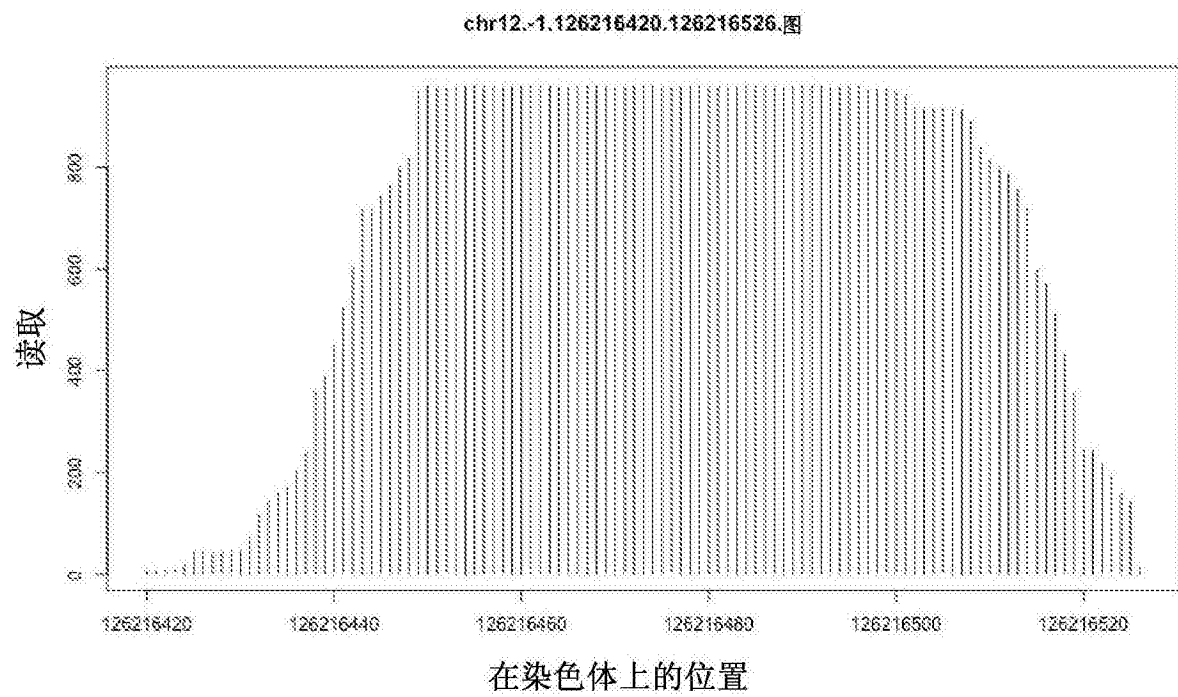


图60

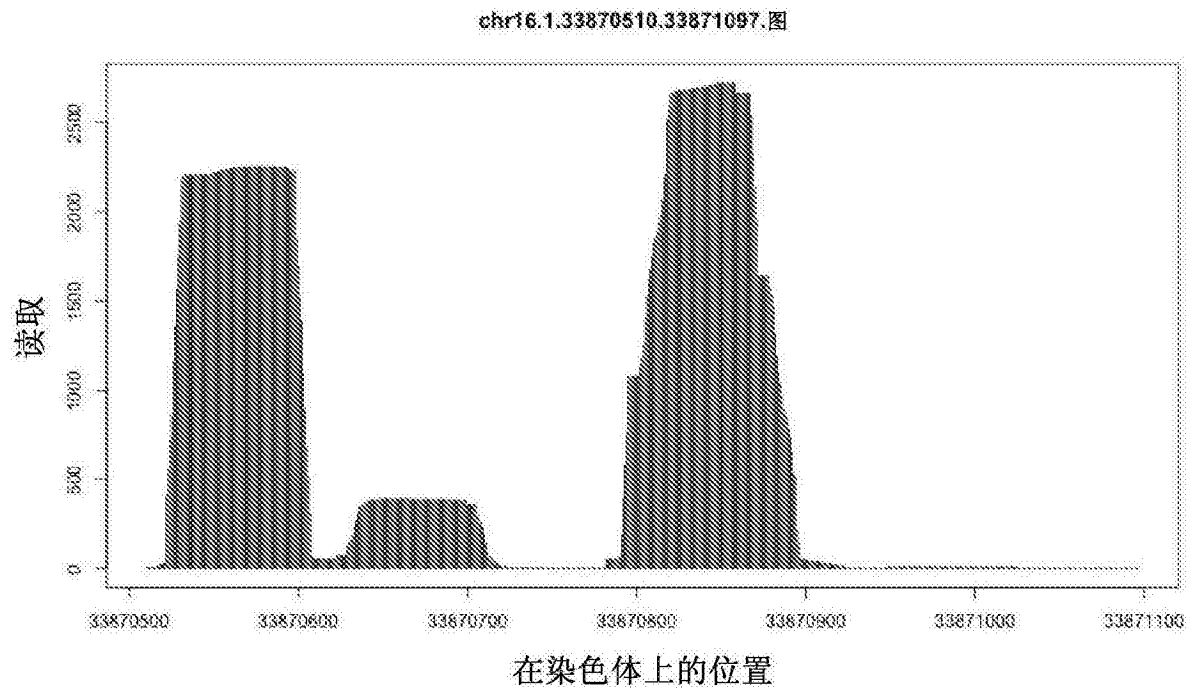


图61

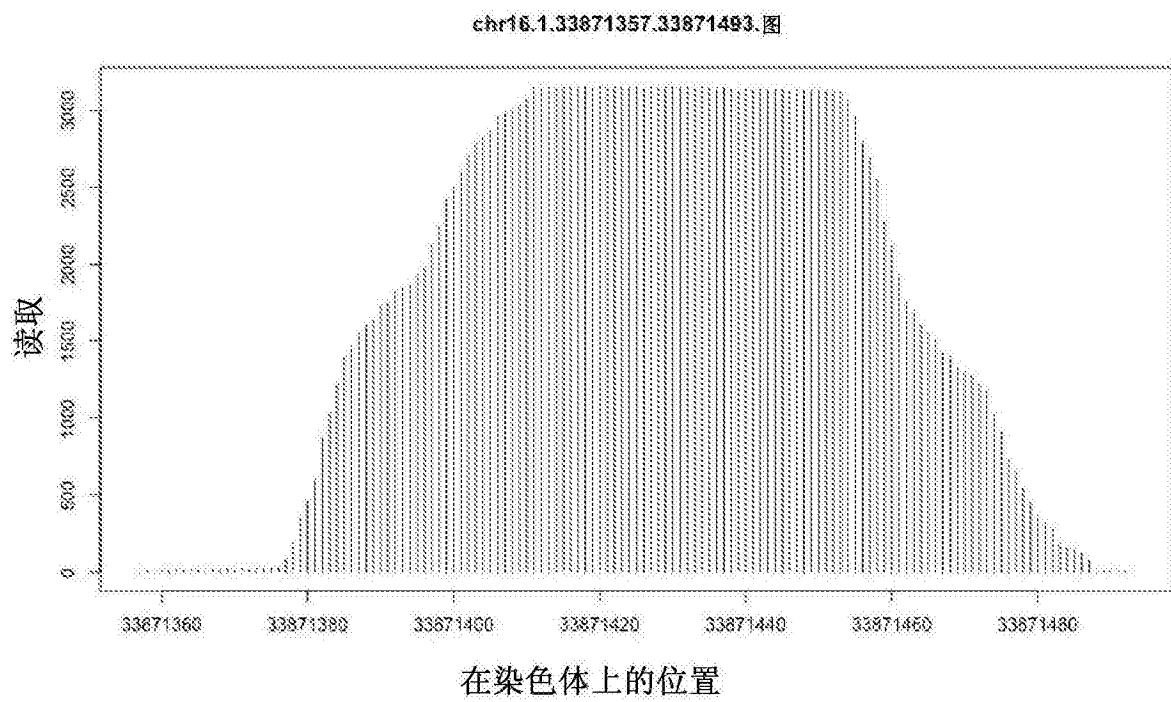


图62

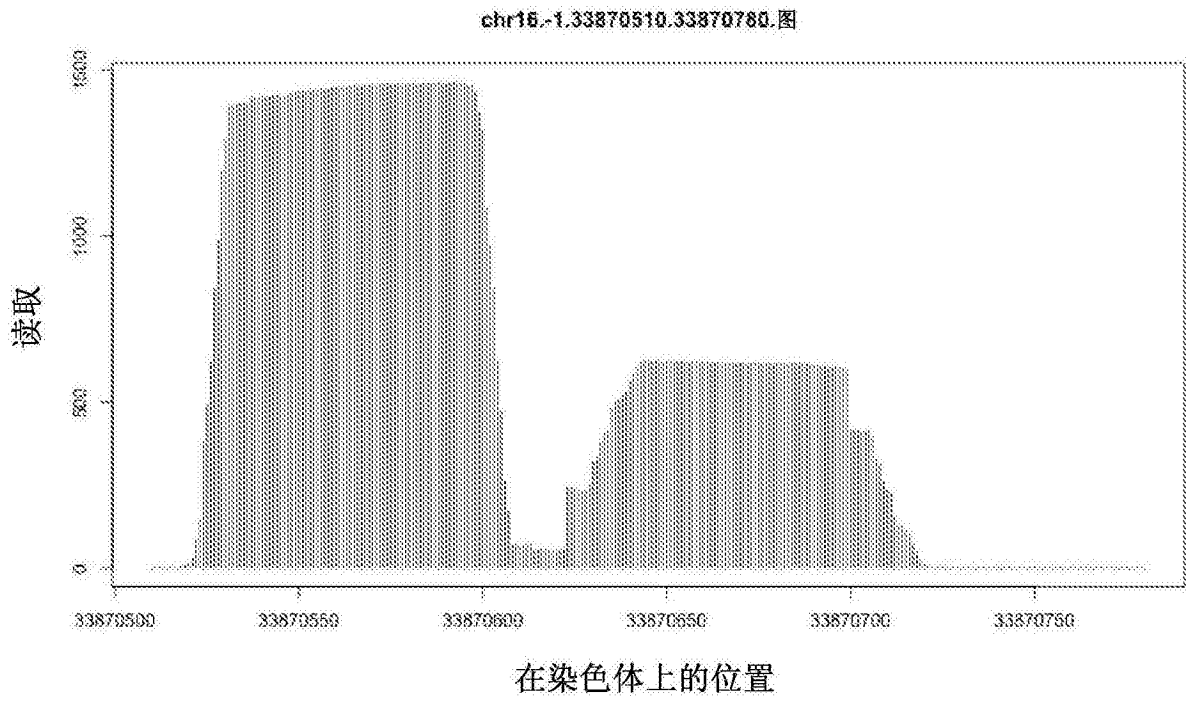


图63

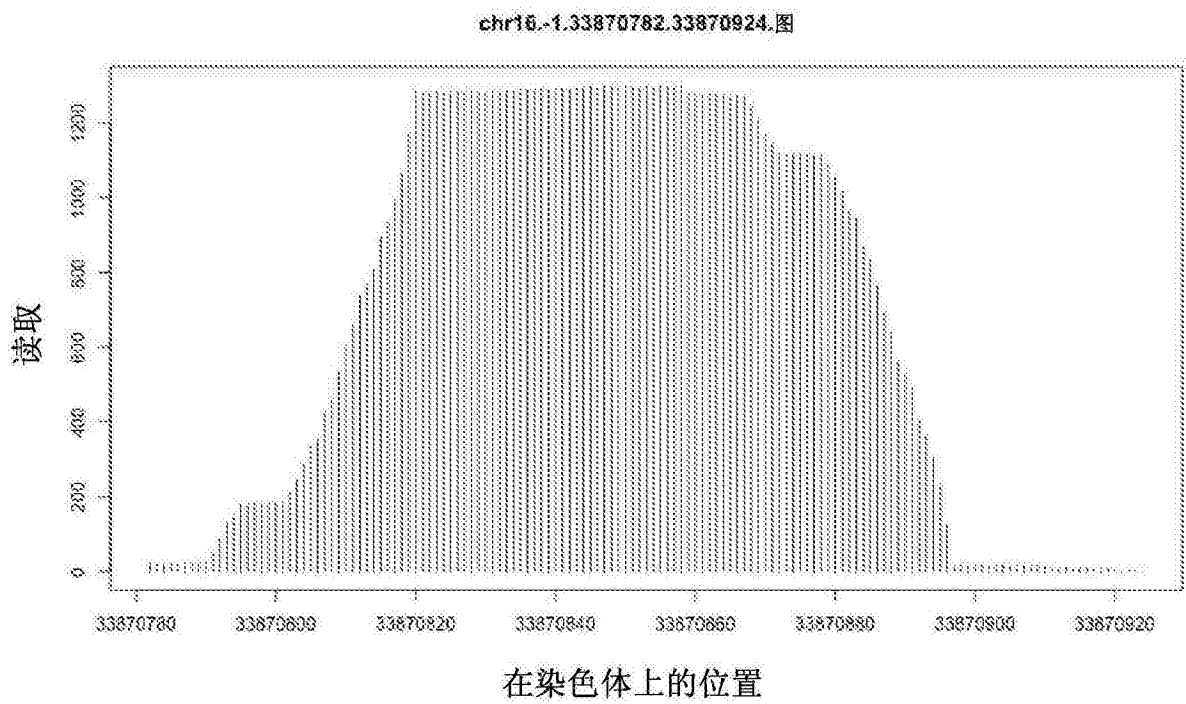


图64

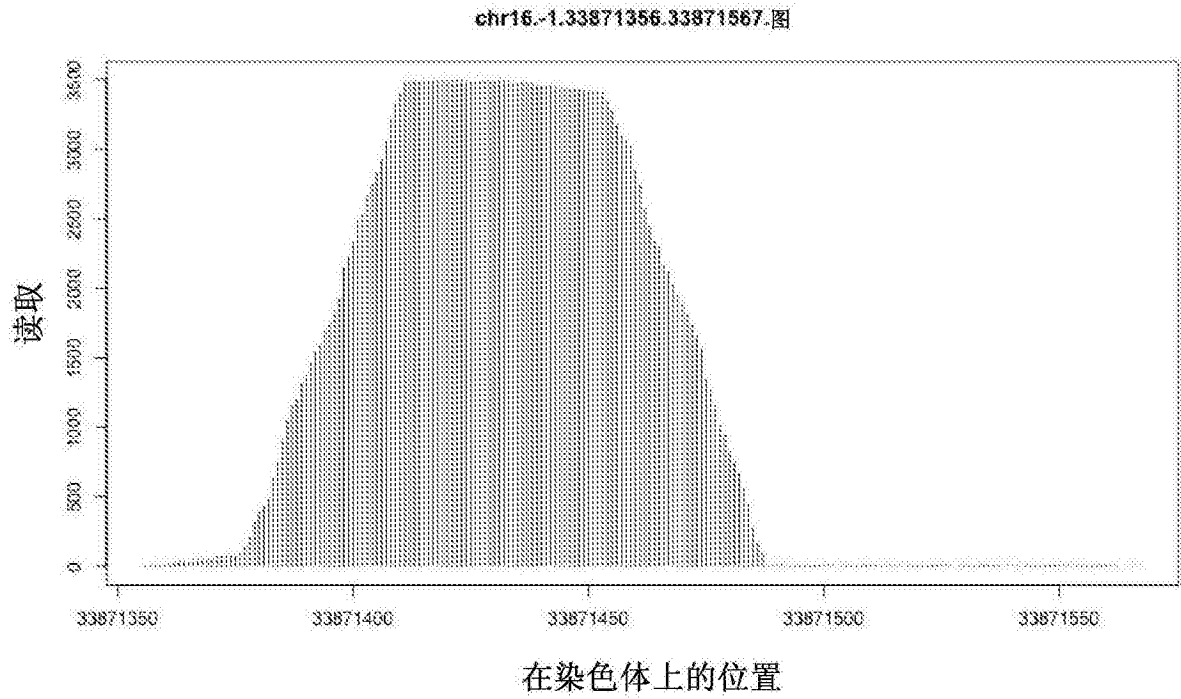


图65

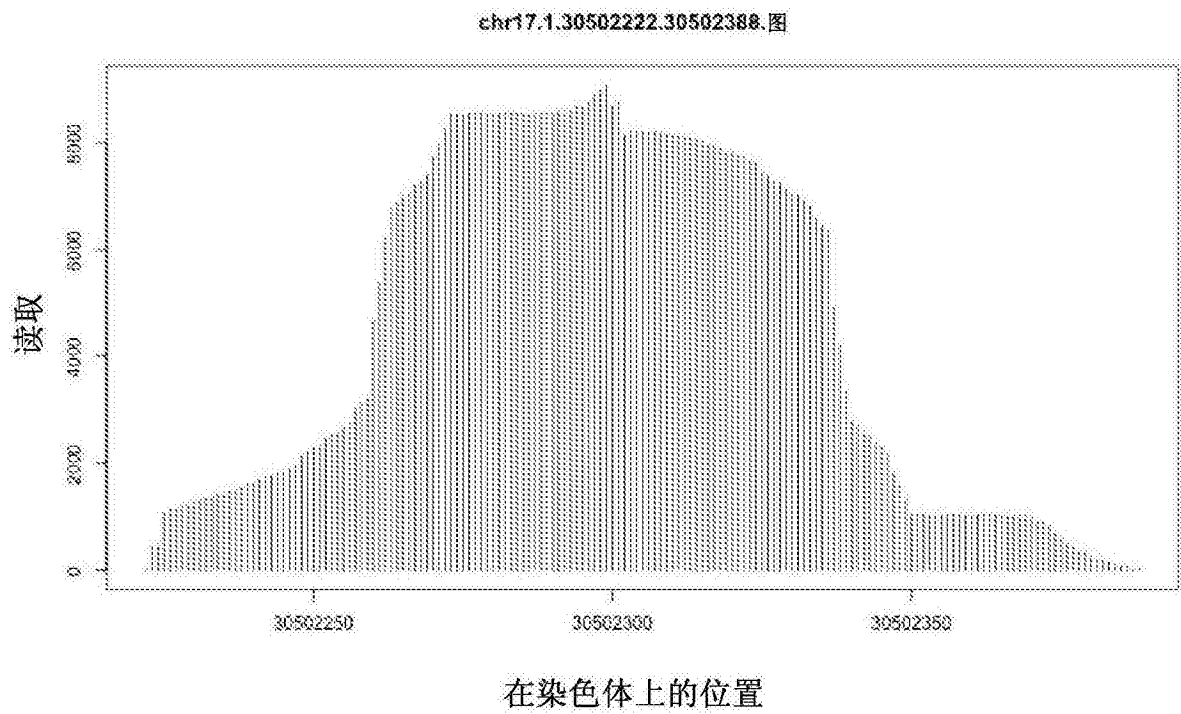


图66

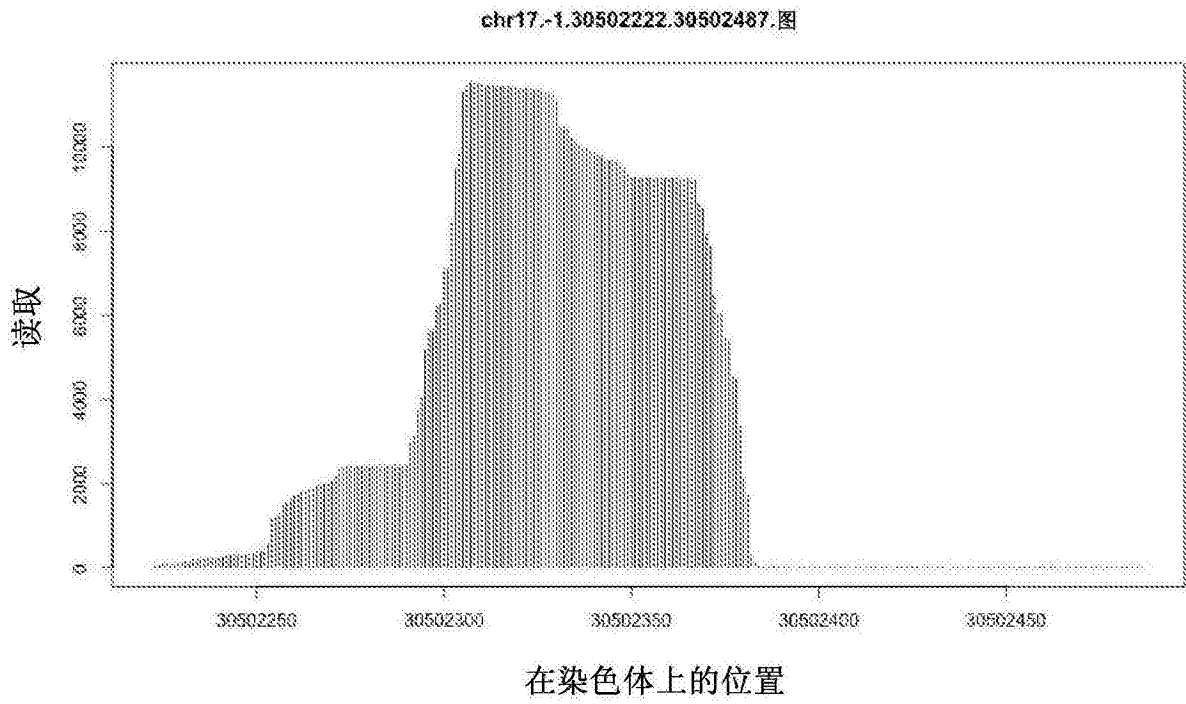


图67

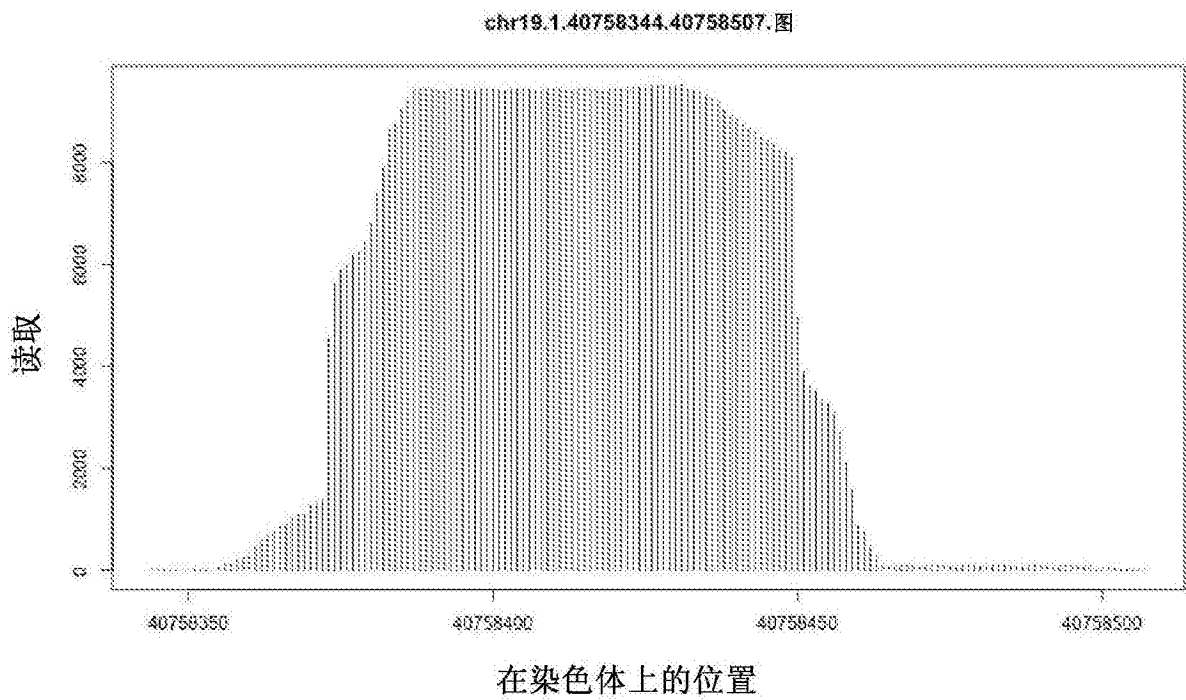


图68

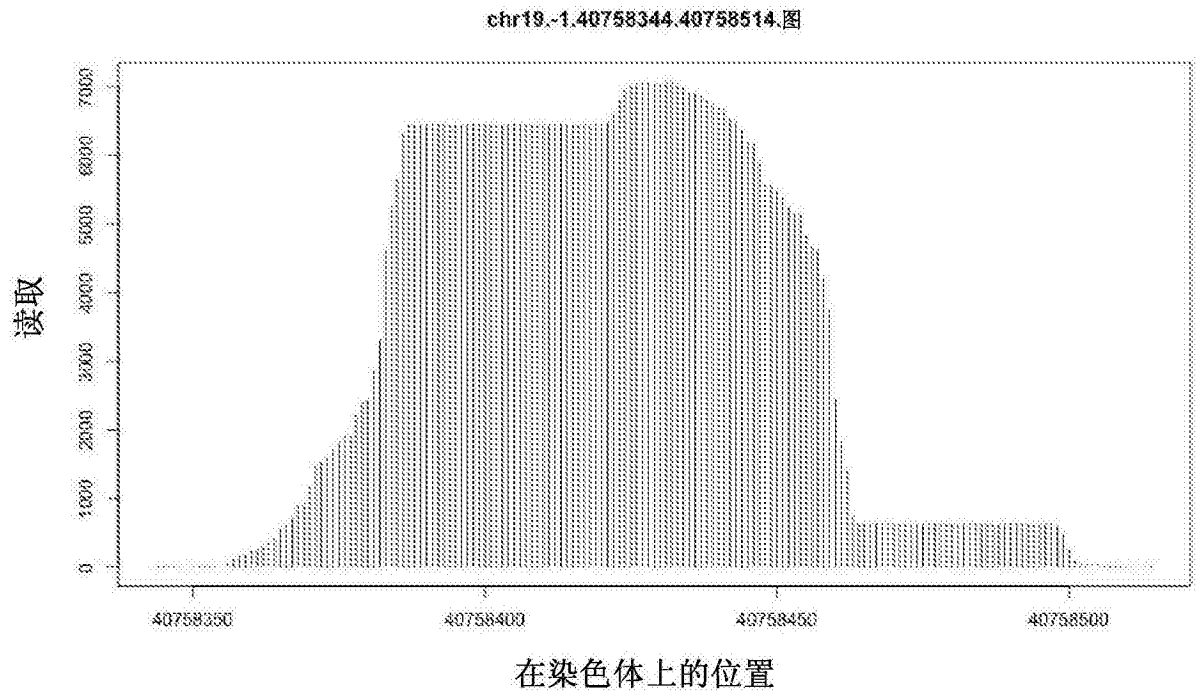


图69

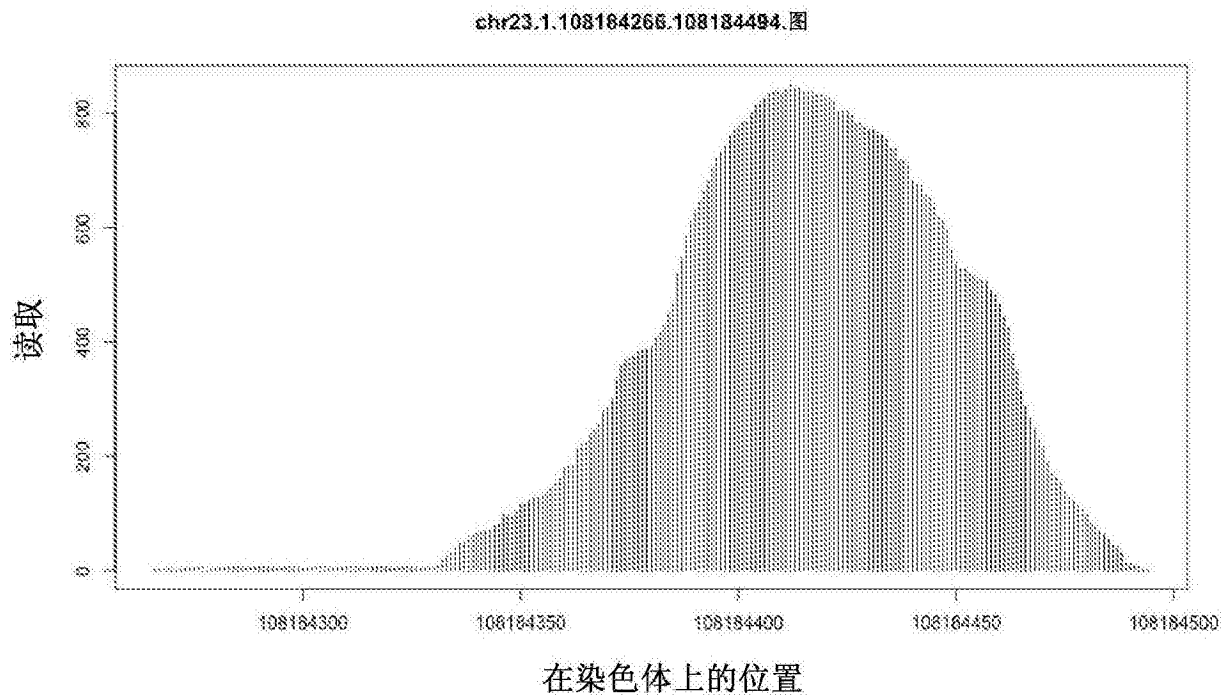


图70

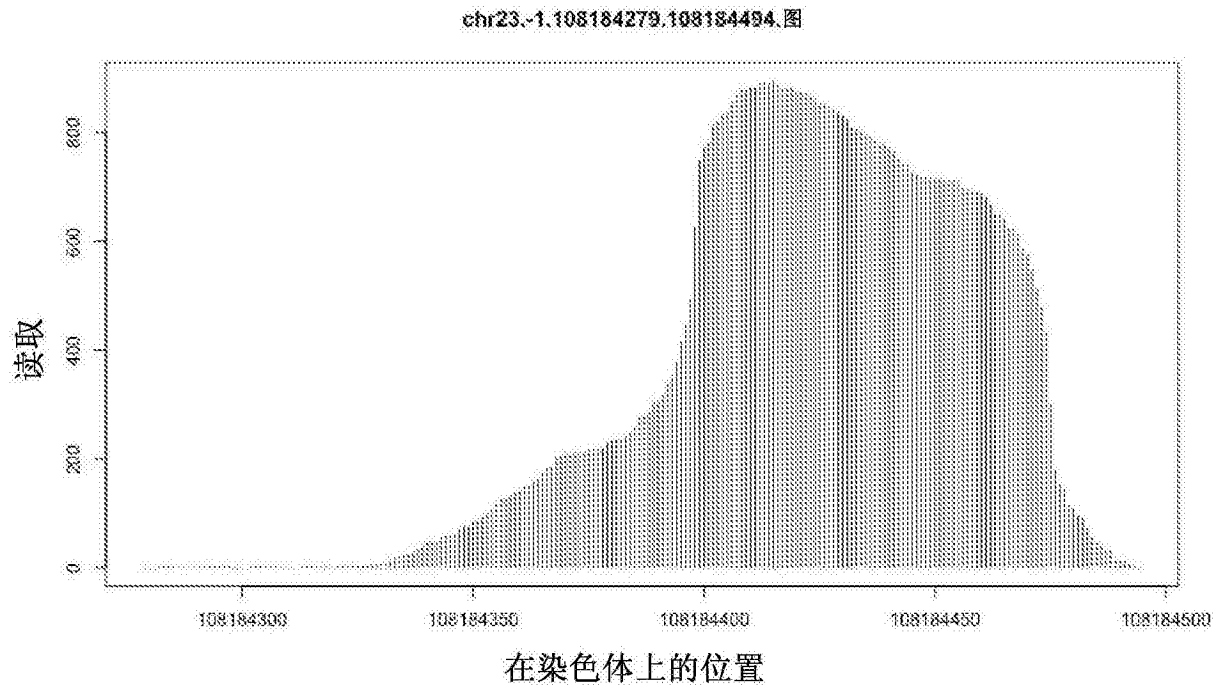


图71

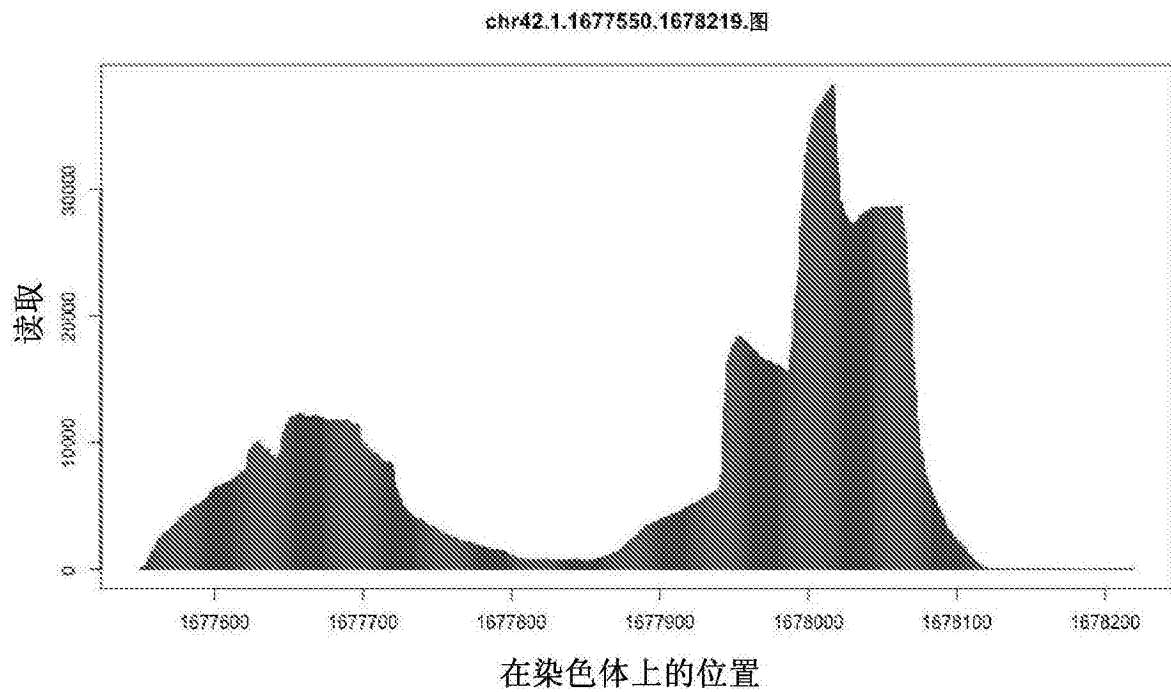


图72

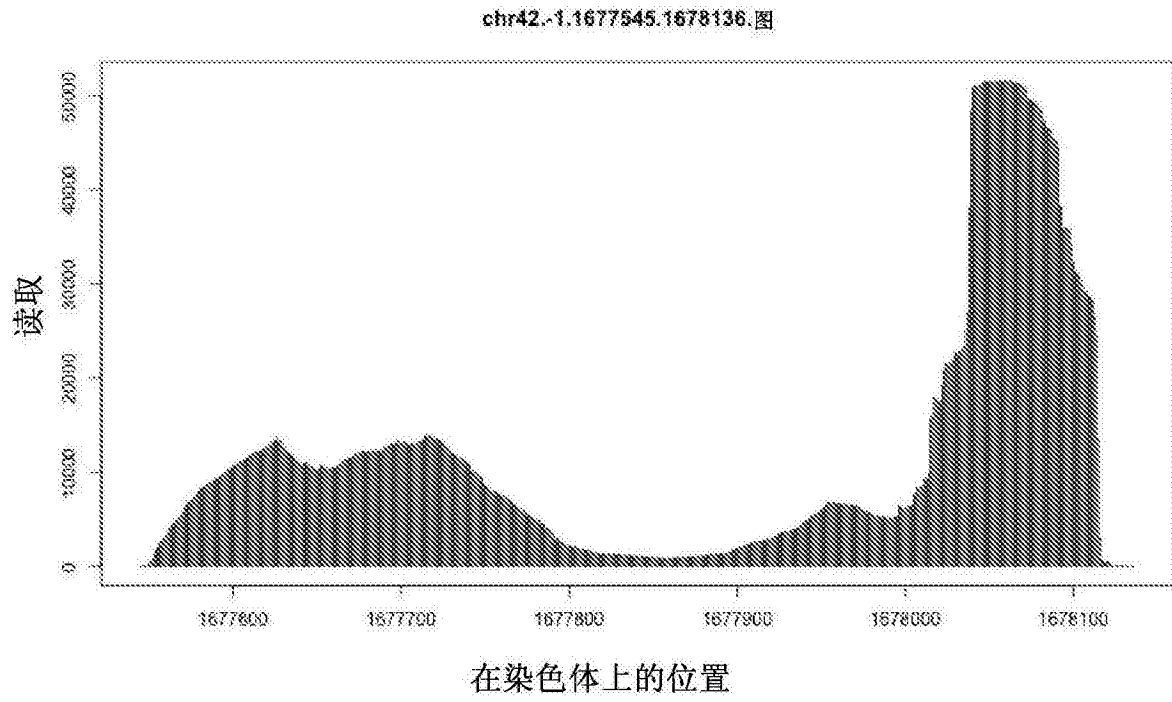


图73