

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2015年12月3日 (03.12.2015)



(10) 国际公布号
WO 2015/180489 A1

- (51) 国际专利分类号:
C12Q 1/68 (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2015/000363
- (22) 国际申请日: 2015年5月27日 (27.05.2015)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
201410234740.1 2014年5月30日 (30.05.2014) CN
- (71) 申请人 (对除美国外的所有指定国): **嘉兴雅康博医学检验所有限公司 (JIAXING ACCB DIAGNOSTICS LTD.)** [CN/CN]; 中国浙江省嘉兴市南湖区亚太路705号1308室, Zhejiang 314006 (CN).
- (72) 发明人: 及
- (71) 申请人 (仅对美国): **莫敏俐 (MO, Minli)** [CN/CN]; 中国北京市海淀区永丰基地北清路103号C座207室, Beijing 100094 (CN)。 **李晖 (LI, Hui)** [CN/CN]; 中国北京市海淀区永丰基地北清路103号C座207室, Beijing 100094 (CN)。 **陈钊 (CHEN, Zhao)** [CN/CN]; 中国北京市海淀区永丰基地北清路103号C座207室, Beijing 100094 (CN)。 **丁凤 (DING, Feng)** [CN/CN]; 中国北京市海淀区永丰基地北清路103号C座207室, Beijing 100094 (CN)。 **李隽 (LI,**

Jun) [CN/CN]; 中国北京市海淀区永丰基地北清路103号C座207室, Beijing 100094 (CN)。

(81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

- 包括国际检索报告(条约第21条(3))。
- 包括说明书序列表部分(细则5.2(a))。

(54) Title: NRAS GENE MUTATION DETECTION KIT

(54) 发明名称: NRAS 基因突变检测试剂盒

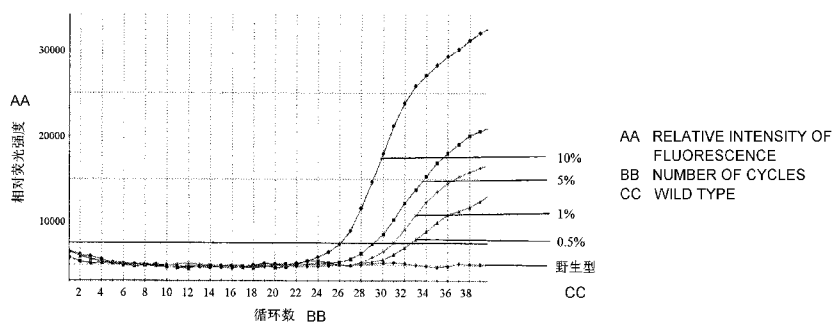


图 1 / FIG. 1

(57) Abstract: Disclosed is an NRAS gene mutation detection kit which can be used for detecting NRAS gene mutation associated with cancers. The kit comprises: (1) an internal reference detection reagent which comprises internal reference gene specific primers, an internal reference gene specific probe, and a dNTP solution; (2) an NRAS mutation detection reagent which comprises NRAS gene mutation type specific primers, an NRAS gene mutation type specific probe, internal control gene specific primers, an internal control gene specific probe, and a dNTP solution; (3) Taq DNA polymerases; and (4) an NRAS positive quality controller.

(57) 摘要: 本发明公开了一种 NRAS 基因突变检测试剂盒, 该试剂盒可用于检测与癌症有关的 NRAS 基因突变。所述试剂盒包含: (1) 内参检测试剂, 其包含内参基因特异性引物、内参基因特异性探针及 dNTP 溶液; (2) NRAS 突变检测试剂, 其包含 NRAS 基因突变型特异性引物、NRAS 基因突变型特异性探针、内控基因特异性引物、内控基因特异性探针及 dNTP 溶液; (3) Taq DNA 聚合酶; 和 (4) NRAS 阳性质控品。



WO 2015/180489 A1

NRAS 基因突变检测试剂盒

5

技术领域

本发明涉及基因突变检测。具体地说，本发明涉及 NRAS 基因突变检测试剂盒，该试剂盒可用于检测与癌症有关的 NRAS 基因突变。

背景技术

10

Ras 基因是一种原癌基因，最初从 Harvey, Kirsten 大鼠肉瘤病毒 (rat sarcoma) 中克隆所得，被称为 HRas 和 KRas^[1]。后来将人神经母细胞瘤 DNA 感染 NIH3T3 细胞时发现另一种相似的基因，被称为 NRas，三者是 Ras 基因家族最主要的成员^[2]。功能上 Ras 蛋白具有分子开关的作用，正常表达下，能够调控细胞生长。发生点突变，过表达或者基因易位等异常情况会导致细胞异常增殖，并最终引发肿瘤形成，超过 30% 的人类肿瘤存在 Ras 的突变^[3, 4]。现在研究最为深入的是 KRas，其过表达和突变普遍发生在甲状腺癌，乳腺癌等很多癌症中，在北美肺腺癌患者中，其突变率更是高达 25%。并且 KRas 还与 TKI 耐药有关，所以它成为很多肿瘤诊断和治疗的分子标志，在临床上发挥了重要意义^[5, 6]。作为 Ras 家族的另一成员，NRas 在结构和功能上都与 KRas 具有很多相似性，并随着近年研究的加深，逐渐成为继 KRas 之后另一个为临床病情评估和治疗提供重要依据的分子指标。

20

NRas 基因位于人类 1 号染色体短臂上(1p22-p32)，编码具有 189 个氨基酸 p21 蛋白^[7]。NRas 蛋白与 Ras 家族其他蛋白具有高达 85% 同源性，这些高度保守的结构域包括对蛋白功能发挥起着极其重要作用的鸟苷三磷酸(guanosine triphosphate, GTP)和效应分子的结合域以及将 NRas 蛋白定位于质膜上的法尼基转移酶作用位点—C 端的 CAAX 基序等^[8, 9]。所以功能上 NRas 也具有很多 RAS 家族蛋白共同的特征：位于细胞膜内侧，属于一种低分子量 G 蛋白，对鸟苷酸具有很强的亲和性并具有 GTPase 活力；具有 GTP 结合(Ras.GTP)及 GDP 结合(Ras.GDP)两种构象，在一定条件下二者可以发生互变；当 Ras 蛋白与

30

GDP 结合时为失活状态，与 GTP 结合时，为活化状态，激活下游信号通路，由此在信号传导中起着极为重要的开关作用^[10, 11]。NRAS 激活的下游信号通路也是现在研究最为明确的 RAS 信号通路：PTK(protein tyrosine kinase)-Grb2(growth factor receptor-bound protein2)-Ras-Raf -MAPK(mitogen activated protein kinase)-ERK (extracellular signal-regulated kinase)通路^[12]。当外源刺激如生长因子(EGF)等与胞膜受体(EGFR)结合，使受体上相应的酪氨酸激酶磷酸化，磷酸化的酪氨酸残基与 Grb2 的 SH2 区结合后，招募鸟氨酸交换因子(SOS)与 Grb2 的 SH3 区结合形成复合物 Grb2-SOS，该复合物与 Ras 结合并使 Ras-GDP 转变为 Ras-GTP，从而激活 Ras。激活后的 Ras 再激活下游 Raf 激酶，Raf 激酶磷酸化 MAPK，MAPK 激活 ERK。ERK 被激活后，转至细胞核内，直接激活 c-myc 各种转录因子，从而参与细胞生长，发育，分裂及分化等多种生理过程^[13]。当 NRas 发生突变时，会导致下游 Raf 以及 MAPK 等的异常激活从而在肿瘤恶变中起重要作用^[14]。

Ras 蛋白的突变主要发生在第 12,13,59 和 61 位密码子上，其中 12,61 位突变频率最高^[15]。在不同癌症中，突变类型不一样，非小细胞肺癌中，主要的突变为第 12 位密码子中的鸟嘌呤被胸腺嘧啶取代，而在结肠癌中同一位置主要是鸟嘌呤被腺嘌呤取代^[16]。NRas 突变主要发生在第 61 位密码子，并且在黑色素瘤中频率较高。Thoams 等人利用突变(mutation)和黑色素瘤(melanoma)为关键词在 pubmed 中检索分析了 1966 年-2006 年发表的文章，发现在表面扩散和结节性黑色素瘤中 NRas 的突变率高达 28%^[17]。Vikas 等人在 60 例原发性黑色素瘤中检测到 10 例(17%，10/60)NRas 的突变，且这些突变全部为 61 位密码子的突变^[18]。非常值得关注的是，近年 NRas 已被确认为肺癌发生的驱动基因。Kris 等在 2011 年 ASCO 上发表了来自 LCMC(NCI's Lung Cancer Mutation Consortium)的一项研究，对 1000 例肺腺癌标本中 KRas, EGFR, NRas 等 10 种驱动基因进行检测，全部患者为 IIIb 期/IV 期，并且有足够的组织标本。研究共入组 830 例患者，60%患者有驱动基因突变，其中 NRas 的突变率为 0.2%^[19, 20]。

由于 Ras 突变对肿瘤的影响大多集中在 Ras/Raf/MEK/ERK 通路

上，所以现在针对 Ras 突变的靶向抗肿瘤药物主要集中在对该信号通路中的不同节点的靶向干预上。已开发的药物包括对 Ras 膜结合和脂质修饰进行干扰的法尼基转移酶抑制剂(FTIs)，如替吡法尼(tipifarnib)等^[21]，针对 Raf 活化的 ATP 间接竞争剂索拉菲尼(sorafenib)^[22, 23]，针对 MEK 靶向干预的 CI-1040 和 AZD6244，其中后者已经进入临床试验^[24]。由于 ERK 是目前所知的 MEK 唯一的底物，通常被描述为 Ras 下游的单一通路，所以人们一般认为只要在 MEK 靶点进行抑制就等于阻断了变异 Ras 引起的 ERK 的活化，还可以避免其他通路干扰所导致的无效靶向影响^[9]。

需要特别指出的是，最新的研究表明，NRas 突变与肺癌治疗中的 TKI 耐药有关。与吉非替尼(gefitinib)敏感的 PC-9 细胞(PC-9/WT)相比，在产生吉非替尼耐药的 PC-9 细胞(PC-9/gef)中并未检测到 KRas, HER2 等 EGFR-TKIs 耐药基因，而发现了 NRas 的 61 位密码子突变。并且，在吉非替尼或 AZD6244/CI1040 单独用药均不能促使细胞凋亡的情况下，两者联合用药时则可以有效促进细胞凋亡^[25]。这些实验结果均表明，NRas 突变在肺癌治疗的 TKI 耐药中可能发挥着重要作用，这为肺癌检测与治疗提供了新的依据和可能。

总之，越来越多的证据显示，NRas 突变在人类黑色素瘤，肺癌等很多肿瘤的发生发展中具有重要意义。对其突变的检测可准确预测对应靶向药物治疗的有效性，便于临床用药选择，显著提高治疗效果，使患者最大程度受益；同时，还可以避免不合理用药造成的病人医疗费用负担及社会医疗资源浪费，减少不必要的时效损失以及经济损失。

发明内容

本发明针对以下检测位点设计了检测试剂盒：

表 1. 突变检测位点

编号	基因	突变位置	突变碱基	突变氨基酸
	内参基因 ACTB			
NM1	NRAS	12 密码子	34G>A	G12S
NM2	NRAS	12 密码子	35G>A	G12D
NM3	NRAS	13 密码子	38G>A	G13D

NM4	NRAS	61 密码子	181C>A	Q61K
NM5	NRAS	61 密码子	182A>T	Q61L
NM6	NRAS	61 密码子	182A>G	Q61R
NM7	NRAS	61 密码子	183A>T	Q61H

具体地说,本发明涉及一种 NRAS 基因突变检测试剂盒,其包含:

(1) 内参检测试剂,其包含内参基因特异性引物、内参基因特异性探针及 dNTP 溶液;

5 (2) NRAS 突变检测试剂,其包含 NRAS 基因突变型特异性引物、NRAS 基因突变型特异性探针、内控基因特异性引物、内控基因特异性探针及 dNTP 溶液;

(3) Taq DNA 聚合酶; 和

10 (4) NRAS 阳性质控品(PC),其包含内参基因、NRAS 基因突变型及内控基因片段。

更具体地说,上述试剂盒中所述内参检测试剂中内参基因特异性引物为 SEQ ID No: 1 和 SEQ ID No: 2; 所述内参检测试剂中内参基因特异性探针为 SEQ ID No: 16; 所述 NRAS 突变检测试剂中的 NRAS 基因突变型为 NM1,即 NRAS 基因 12 密码子 34G>A; NM2,即 NRAS 15 基因 12 密码子 35G>A; NM3,即 NRAS 基因 13 密码子 38G>A; NM4,即 NRAS 基因 61 密码子 181C>A; NM5,即 NRAS 基因 61 密码子 182A>T; NM6,即 NRAS 基因 61 密码子 182A>G; 或 NM7,即 NRAS 基因 61 密码子 183A>T。本发明的试剂盒可用于检测 NM1、NM2、NM3、NM4、NM5、NM6 和 NM7 中的至少一种突变。

20 所述 NRAS 突变检测试剂中 NRAS 基因突变型特异性引物其中所述 NRAS 突变检测试剂中 NRAS 基因突变型特异性引物如下: 针对 NM1 突变的引物为 SEQ ID No: 5 和 SEQ ID No: 8; 针对 NM2 突变的引物为 SEQ ID No: 6 和 SEQ ID No: 8; 针对 NM3 突变的引物为 SEQ ID No: 7 和 SEQ ID No: 8; 针对 NM4 突变的引物为 SEQ ID No: 9 和 SEQ ID No: 13; 针对 NM5 突变的引物为 SEQ ID No: 10 和 SEQ ID No: 13; 25 针对 NM6 突变的引物为 SEQ ID No: 11 和 SEQ ID No: 13; 针对 NM7 突变的引物为 SEQ ID No: 12 和 SEQ ID No: 13; 所述 NRAS 突变检测

试剂中 NRAS 基因突变型特异性探针选自 SEQ ID No: 14 或 SEQ ID No: 15; 所述 NRAS 突变检测试剂中内控基因特异性引物为 SEQ ID No: 3 和 SEQ ID No: 4; 所述 NRAS 突变检测试剂中内控基因特异性探针为 SEQ ID No: 17; 所述 dNTP 溶液的终浓度为 400 μ M; 所述内参基因序列为 SEQ ID No: 18; 所述内控基因序列为 SEQ ID No: 19; 所述 NRAS 基因序列为 SEQ ID No: 20 或 SEQ ID No: 21。

附图说明

图 1 显示 NM1 突变检测的结果, 其中野生型基因组 DNA 含量为 20ng/ μ l, 突变型基因组 DNA 含量为 10ng/ μ l, 并且分别含 10、5、1、0.5% 突变。

图 2 显示 NM2 突变检测的结果, 其中野生型基因组 DNA 含量为 20ng/ μ l, 突变型基因组 DNA 含量为 10ng/ μ l, 并且分别含 10、5、1、0.5% 突变。

图 3 显示 NM3 突变检测的结果, 其中野生型基因组 DNA 含量为 20ng/ μ l, 突变型基因组 DNA 含量为 10ng/ μ l, 并且分别含 10、5、1、0.5% 突变。

图 4 显示 NM4 突变检测的结果, 其中野生型基因组 DNA 含量为 20ng/ μ l, 突变型基因组 DNA 含量为 10ng/ μ l, 并且分别含 10、5、1、0.5% 突变。

图 5 显示 NM5 突变检测的结果, 其中野生型基因组 DNA 含量为 20ng/ μ l, 突变型基因组 DNA 含量为 10ng/ μ l, 并且分别含 10、5、1、0.5% 突变。

图 6 显示 NM6 突变检测的结果, 其中野生型基因组 DNA 含量为 20ng/ μ l, 突变型基因组 DNA 含量为 10ng/ μ l, 并且分别含 10、5、1、0.5% 突变。

图 7 显示 NM7 突变检测的结果, 其中野生型基因组 DNA 含量为 20ng/ μ l, 突变型基因组 DNA 含量为 10ng/ μ l, 并且分别含 10、5、1、0.5% 突变。

具体实施方式

1. 实验方法

采用实时荧光 PCR 技术。通过 ARMS (amplification refractory mutation system) 方法检测基因突变。即采用引物 3'端识别突变的方式，结合 TaqMan 探针水解发光检测基因突变。

试剂盒中含有内参基因检测，以及内控基因检测。内参基因 (Internal Reference, IR) 是区别于待检基因 NRAS 的管家基因。通过检测内参基因的扩增情况 (FAM 通道)，可分析待检 DNA 是否能被正常扩增，从而排除 DNA 纯度、浓度不佳，或者含有 PCR 抑制剂等造成 PCR 检测失败的原因。本试剂盒在 NRAS 基因各突变类型检测体系中同时设置了内控基因 (Internal Control, IC) 检测体系。两种体系在同一 PCR 管中同时进行反应。内控基因也是区别于待检基因 NRAS 的管家基因。将识别 NRAS 基因突变模板的探针修饰为 FAM 荧光基团，而将识别内控基因模板的探针修饰为 HEX 荧光基团。通过检测内控基因扩增情况 (HEX 通道)，可分析待检 DNA 是否能被正常扩增，从而排除漏加试剂或样本、样本含有 PCR 抑制剂等造成 PCR 检测失败的原因。

2. 试剂盒组成 (表 2):

名称	成份
IR 检测试剂	含内参基因 (区别于待检基因 NRAS 的管家基因) 特异性引物、探针及 dNTP 的溶液;
NRAS 突变检测试剂	含 NRAS 基因突变型、内控基因特异性引物、探针及 dNTP 的溶液
Taq DNA 聚合酶	Taq DNA 聚合酶
NRAS 阳性质控品 (PC)	含内参基因、NRAS 基因突变型及内控基因片段

2.1 IR、NM1~7 检测试剂、Taq DNA 聚合酶 (表 3):

原料名称	原料来源	检测体系中的终浓度
Taq 酶缓冲液	天根	1×
氯化镁	天根	3 mM
dNTP (含 dATP、dTTP、dCTP、dGTP)	天根	400 μ M
正向引物	生工	500 nM
反向引物	生工	500 nM
探针	生工	300 nM
Taq DNA 聚合酶	天根	0.05 / μ l

2.2 阳性质控品 PC:

人工克隆至 pMD18T 质粒上。

5

2.3 引物探针序列 (表 4):

分类	名称	序列 (5'-3')	SEQ ID No:
引物	IR-F	CAGATGTGGATCAGCAAGCA	1
	IR-R	CATAGTCCGCCTAGAAGCATT	2
	IC-F	GATCAGCAAGCAGGAGTAT	3
	IC-R	GGTGTAACGCAACTAAGTC	4
	NM1-F	GGTGGTGGTTGGAGCAA	5
	NM2-F	GTGGTGGTTGGAGCAGA	6
	NM3-F	GTGGTTGGAGCAGGTGA	7
	NM123-R	TCACCTCTATGGTGGGATCAT	8
	NM4-F	ATACTGGATACAGCTGGAA	9
	NM5-F	TACTGGATACAGCTGGACT	10
	NM6-F	TACTGGATACAGCTGGACG	11
	NM7-F	TACTGGATACAGCTGGACAT	12
	NM4567-R	CACAGAGGAAGCCTTCGCCT	13
探针	NM123-pb	AGCGCACTGACAATCCAGCTAATC (5'-FAM, 3'-BHQ1)	14
	NM4567-pb	AGAGTACAGTGCCATGAGAGACC (5'-FAM, 3'-BHQ1)	15
	IR-pb	ATGACGAGTCCGGCCCCTCCATC (5'-FAM, 3'-BHQ1)	16
	IC-pb	TAGTCCGCCTAGAAGCATTTC (5'-HEX, 3'-BHQ1)	17

NRAS 阳性质控品(PC)中的内参基因、内控基因片段可以从例如 NCBI 核苷酸数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>) 获得。例如, 通过检索号 NG_007992.1, 可以得到内参基因(IR)的扩增片段:

CAGATGTGGATCAGCAAGCAGGAGTATGACGAGTCCGGCCCCTCCATCGTCCACCGCAAATGCTTCTAGGCGGACTATG (SEQ ID No: 18)

以及内控基因(IC)的扩增片段

GATCAGCAAGCAGGAGTATGACGAGTCCGGCCCCTCCATCG
TCCACCGCAAATGCTTCTAGGCGGACTATGACTTAGTTGCGTTA
CACC (SEQ ID No: 19)。

5

由该数据库还可以得到含 12 和 13 密码子的 NRAS 的扩增片段:

GGTGGTGGTTGGAGCAGGTGGTGTTGGGAAAAGCGCACTGA
CAATCCAGCTAATCCAGAACCACTTTGTAGATGAATATGATCCC
ACCATAGAGGTGA (SEQ ID No: 20)

10

其中方框显示的是 12 和 13 密码子。

由该数据库还可以得到含 61 密码子的 NRAS 的扩增片段:

ATACTGGATACAGCTGGACAAGGAAGAGTACAGTGCCATGA
GAGACCAATACATGAGGACAGGCGAAGGCTTCCTCTGTG (SEQ
ID No: 21)

15

其中方框显示的是 61 密码子。

3. 实施例

3.1 特异性、灵敏度:

20

检测 20ng/μl 仅含 NRAS 野生型的基因组 DNA、10ng/μl 分别含 10、5、1、0.5% NRAS 突变的基因组 DNA (突变百分比 = 突变型/野生型 × 100%)。实验结果见图 1-7。

3.2 方法对比 (本发明试剂盒与测序法):

25

表 5. 本发明试剂盒与 Sanger 测序法检测结果四格表

		Sanger 测序法	
		阳性 (突变型)	阴性 (野生型)
本发明试剂盒	阳性 (突变型)	3	1
	阴性 (野生型)	0	196

其中肺癌、结直肠癌均为 100 例。

四格表法是本领域技术人员熟知的用于进行受试者工作特征 (Receiver operating characteristic, ROC) 分析的手段。

若将 Sanger 测序法作为检测基因突变的“金标准”，则由表 5 可以计算得到：NRAS 试剂盒的临床灵敏度=3/(3+0)=100%，临床特异性=196/(1+196)=99.5%，总体一致性=(3+196)/(3+196+1+0)=99.5%。由此可见，本发明的试剂盒具有很高的临床灵敏度、临床特异性、总体一致性。

另外，从四格表数据可见，Sanger 测序法阳性的样本，用定量 PCR (QPCR) 检测均为阳性，但用定量 PCR 检测为阳性的样本，可能用 Sanger 测序法检测为阴性，表明本发明的定量 PCR 试剂盒灵敏度较 Sanger 测序法的灵敏度高。

参考文献

- [1] Ellis R. W., DeFeo D., Furth M. E.等，小鼠细胞包含两个不同的 ras 基因 mRNA 物类，可被翻译为 p21 onc 蛋白，Mol Cell Biol, 1982, 2(11): 1339-1345。
- [2] Stacey D. W., Kung H. F., 通过微注射 Ha-ras p21 蛋白转化 NIH 3T3 细胞，Nature, 1984, 310(5977): 508-511。
- [3] Baines A. T., Xu D., Der C. J., 用于癌症治疗的 Ras 抑制：研究在继续，Future Med Chem, 2011, 3(14): 1787-1808。
- [4] Overmeyer J. H., Maltese W. A., 癌细胞中活化的 Ras 引发的死亡通路，Front Biosci (Landmark Ed), 2011, 16: 1693-1713。
- [5] Shigematsu H., Gazdar A. F., 肺癌中表皮生长因子受体信号通路的体细胞突变，Int J Cancer, 2006, 118(2): 257-262。
- [6] Eberhard D. A., Johnson B. E., Amler L. C.等，表皮生长因子受体和 KRAS 中的突变是单独实施化疗以及化疗与厄洛替尼联合施用的非小细胞肺癌患者的预测和预后指标，J Clin Oncol, 2005, 23(25): 5900-5909。
- [7] Rabin M., Watson M., Barker P. E.等，通过原位杂交将染色体 1 上的基因图谱 NRAS 转化至区域 p11----p13，Cytogenet Cell Genet, 1984,

- 38(1): 70-72。
- [8] Chetty R., Govender D., 本月基因: KRAS, *J Clin Pathol*, 2013, 66(7): 548-550。
- [9] 昌毓穗刘, 傅华群, 喻本桐, 邹书兵, 吴起才, 万力, 5 Ras/Raf/MEK/ERK 通路在食管癌药物靶向治疗中的作用[J]. *药学学报 Acta Pharmaceutica Sinica*, 2013, 48(5): 635-641。
- [10] Shih T. Y., Hattori S., Clanton D. J.等, p21 ras 蛋白的结构和功能, *Gene Amplif Anal*, 1986, 4: 53-72。
- [11] Lacal J. C., Anderson P. S., Aaronson S. A., Harvey ras p21 蛋白 10 缺失突变揭示了至少两个不同的区域对 GTP 结合和转化活性是绝对必要的, *EMBO J*, 1986, 5(4): 679-687。
- [12] Marais R., Marshall C. J., 通过 Ras 和 Raf 控制 ERK MAP 激酶级联, *Cancer Surv*, 1996, 27: 101-125。
- [13] Andresen B. T., Rizzo M. A., Shome K.等, 磷脂酸在调节 15 Ras/MEK/Erk 信号级联中的作用, *FEBS Lett*, 2002, 531(1): 65-68。
- [14] Bauer J, Curtin J. A., Pinkel D.等, Congenital 先天黑色素痣通常锚定 NRAS 突变而不是 BRAF 突变, *J Invest Dermatol*, 2007, 127(1): 179-182。
- [15] Smit V. T., Boot A. J., Smits A. M.等, 胰腺瘤中普遍存在 KRAS 20 密码子 12 突变, *Nucleic Acids Res*, 1988, 16(16): 7773-7782。
- [16] 何太平, 严卫红. Ras 信号通路转导[J]. *国外医学临床生物化学与检验学分册*, 2004, 25(1): 74-76。
- [17] Hocker T., Tsao H., 紫外辐射和黑素瘤: 报告的序列变体的系统性综述和分析, *Hum Mutat*, 2007, 28(6): 578-588。
- [18] Goel V. K., Lazar A. J., Warneke C. L.等, 原发性皮肤黑素瘤中 25 BRAF、NRAS 和 PTEN 突变的研究, *J Invest Dermatol*, 2006, 126(1): 154-160。
- [19] Kris MG J. B., Kwiatkowski D. G.等, 来自 1000 位肺腺癌患者的肿瘤样本中驱动突变(driver mutations)的鉴定, The NCI's Lung Cancer 30 Mutation Consortium (LCMC) *J Clin Oncol*, 2011, 29(18): abstract 7506。
- [20] 王敬慧, 张宗德, 张树才. 肺腺癌驱动基因研究相关进展[J]. 中

国肺癌杂志, 2013, 16(2): 91-96。

[21] Medeiros B. C., Landau H. J., Morrow M.等, 法呢基转移酶抑制剂替吡法尼是MDR1基因产物P-糖蛋白的强力抑制剂, 并且表现出抗人白血病细胞系的显著的细胞毒性协同作用, *Leukemia*, 2007, 21(4): 5 739-746。

[22] 蒋成英. Ras Raf MekErk 信号传导通路在肝细胞癌发生中的作用机制及在靶向治疗中的应用[J]. *中国肿瘤临床*, 2008, 35(23): 1377-1380。

[23] Keswani R.N., Chumsangsri A., Mustafi R.等, 索拉菲尼在巴雷特食管腺癌细胞系中抑制MAPK介导的增殖, *Dis Esophagus*, 2008, 21(6): 10 514-521。

[24] Martin T. D., Samuel J. C., Routh E. D.等, Ral GTPases 在直肠癌中的激活和作用, *Cancer Res*, 2011, 71(1): 206-215。

[25] Huang M. H., Lee J. H., Chang Y. J.等, 在具有获得性吉非替尼耐受的表皮生长因子受体突变肺癌细胞中 EK 抑制剂的抗逆性, *Mol Oncol*, 2013, 7(1): 112-120。 15

权 利 要 求 书

1. 一种 NRAS 基因突变检测试剂盒，其包含：

(1) 内参检测试剂，其包含内参基因特异性引物、内参基因特异性
5 探针及 dNTP 溶液，

其中所述内参基因特异性引物为 SEQ ID No: 1 和 SEQ ID No: 2，
所述内参基因特异性探针为 SEQ ID No: 16；

(2) NRAS 突变检测试剂，其包含 NRAS 基因突变型特异性引物、
NRAS 基因突变型特异性探针、内控基因特异性引物、内控基因特异
10 性探针及 dNTP 溶液，

其中所述 NRAS 基因突变型选自：

NM1，即 NRAS 基因 12 密码子 34G>A；

NM2，即 NRAS 基因 12 密码子 35G>A；

NM3，即 NRAS 基因 13 密码子 38G>A；

15 NM4，即 NRAS 基因 61 密码子 181C>A；

NM5，即 NRAS 基因 61 密码子 182A>T；

NM6，即 NRAS 基因 61 密码子 182A>G；和

NM7，即 NRAS 基因 61 密码子 183A>T；

针对 NM1 突变的所述 NRAS 基因突变型特异性引物为 SEQ ID No:
20 5 和 SEQ ID No: 8；

针对 NM2 突变的所述 NRAS 基因突变型特异性引物为 SEQ ID No:
6 和 SEQ ID No: 8；

针对 NM3 突变的所述 NRAS 基因突变型特异性引物为 SEQ ID No:
7 和 SEQ ID No: 8；

25 针对 NM4 突变的所述 NRAS 基因突变型特异性引物为 SEQ ID No:
9 和 SEQ ID No: 13；

针对 NM5 突变的所述 NRAS 基因突变型特异性引物为 SEQ ID No:
10 和 SEQ ID No: 13；

针对 NM6 突变的所述 NRAS 基因突变型特异性引物为 SEQ ID No:
30 11 和 SEQ ID No: 13；

针对 NM7 突变的所述 NRAS 基因突变型特异性引物为 SEQ ID No:

12 和 SEQ ID No: 13;

所述 NRAS 基因突变型特异性探针选自 SEQ ID No: 14 或 SEQ ID No: 15;

所述内控基因特异性引物为 SEQ ID No: 3 和 SEQ ID No: 4;

5 所述内控基因特异性探针为 SEQ ID No: 17;

(3) Taq DNA 聚合酶; 和

(4) NRAS 阳性质控品, 其包含内参基因、NRAS 基因突变型及内控基因片段,

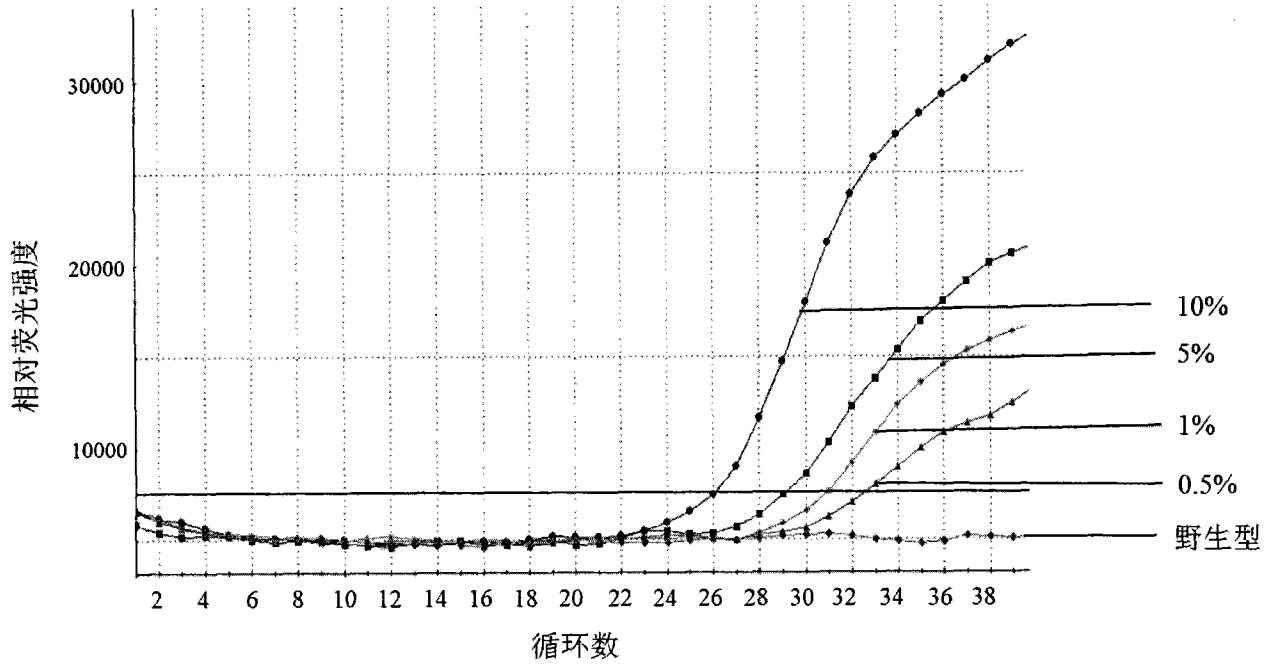
其中所述内参基因序列为 SEQ ID No: 18;

10 所述内控基因片段序列为 SEQ ID No: 19;

NRAS 基因序列为 SEQ ID No: 20 或 SEQ ID No: 21。

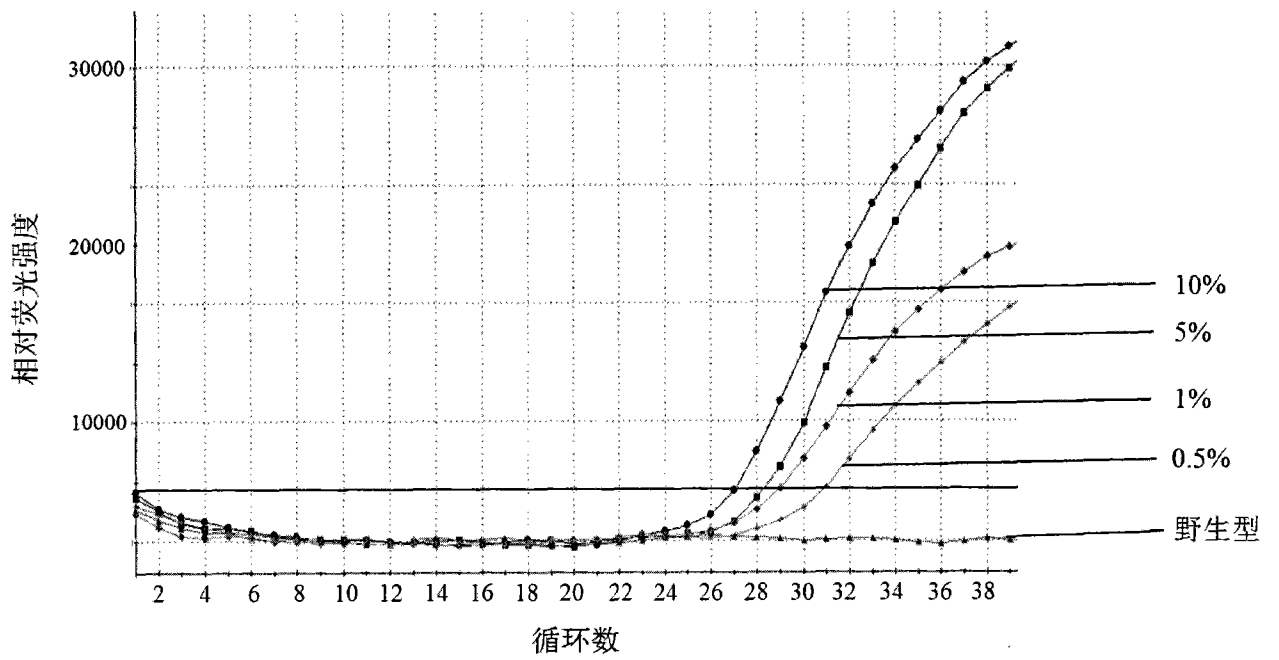
2. 权利要求 1 所述的试剂盒, 其中所述探针的 5'端连接 FAM 基团, 3'端连接 BHQ1 基团。

3. 权利要求 1 所述的试剂盒, 其中所述 dNTP 溶液的终浓度为
15 400 μ M。



5

图 1



10

图 2

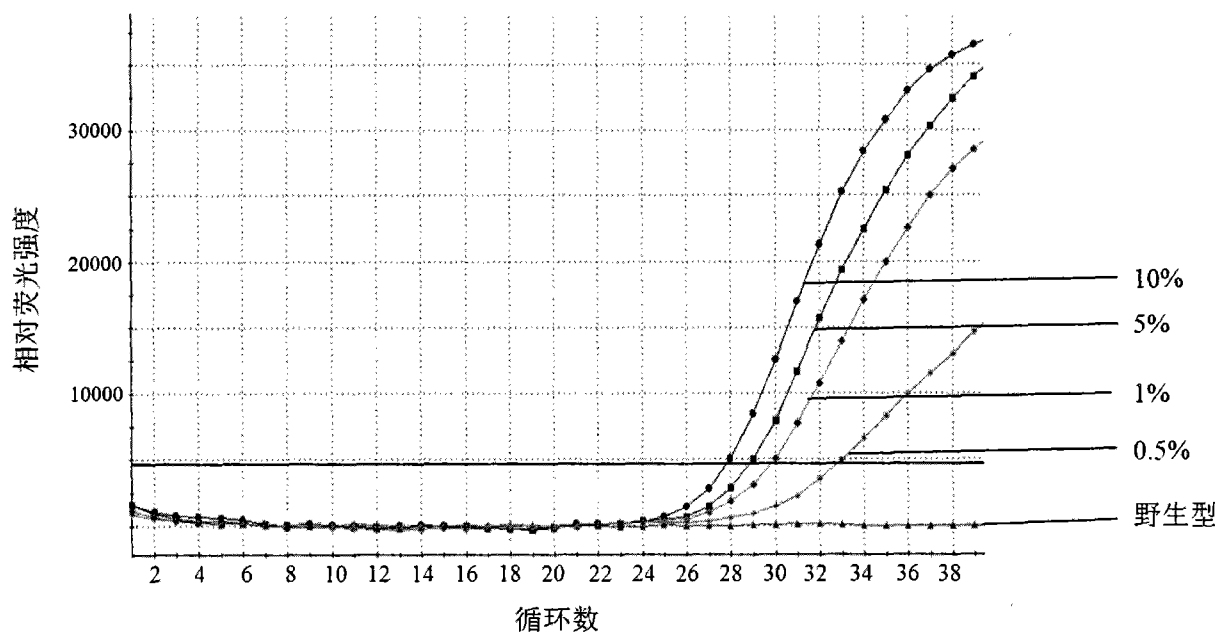


图 3

5

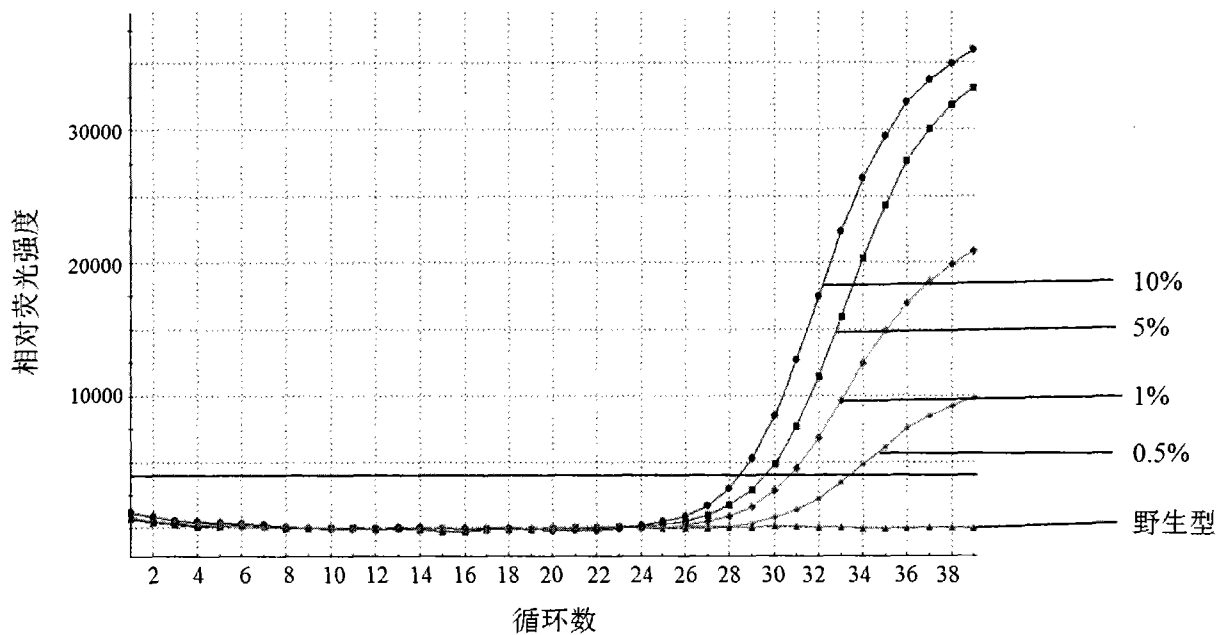


图 4

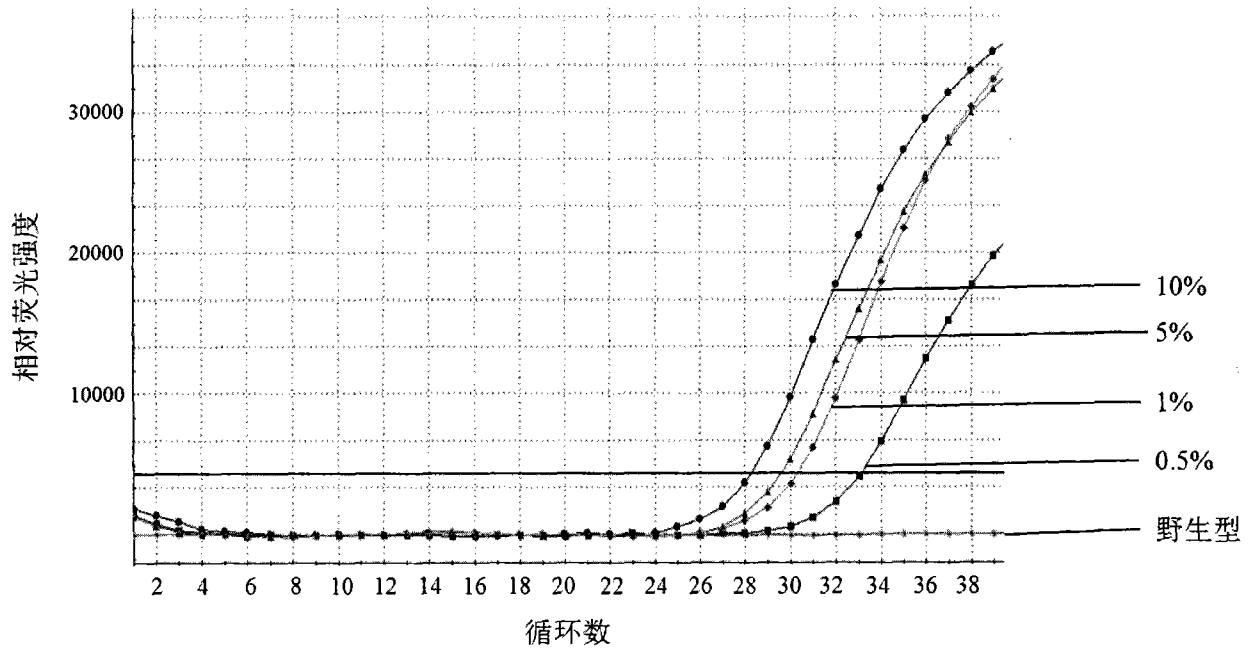


图 5

5

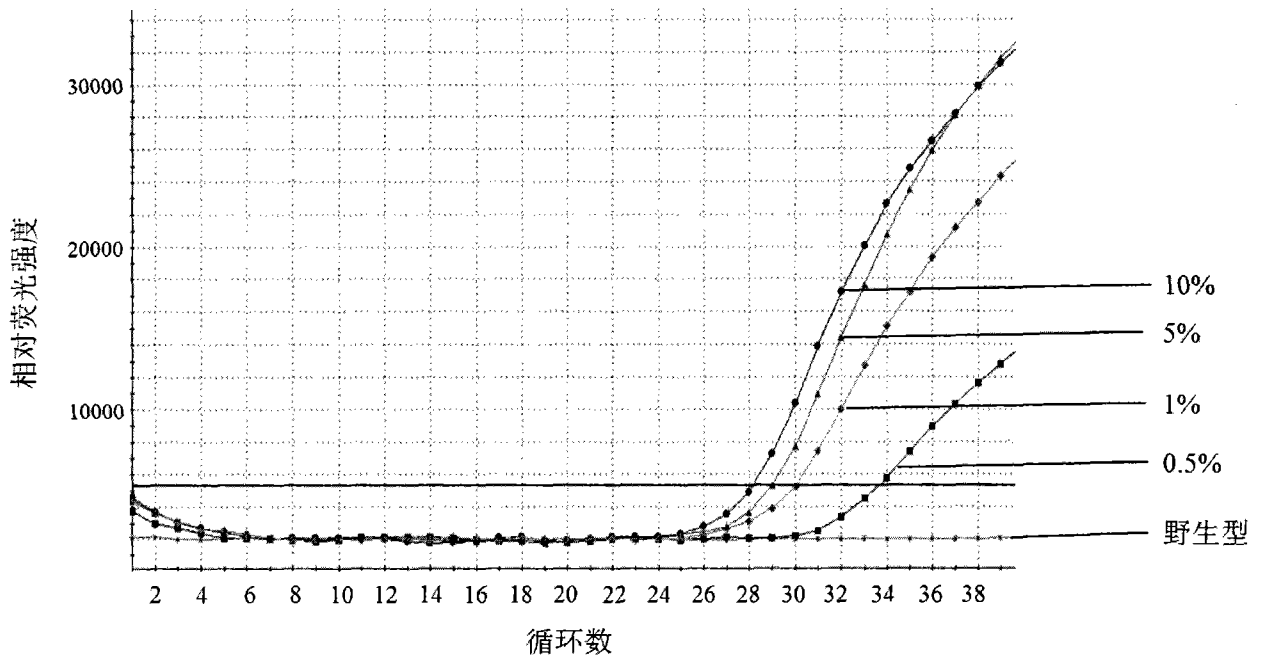


图 6

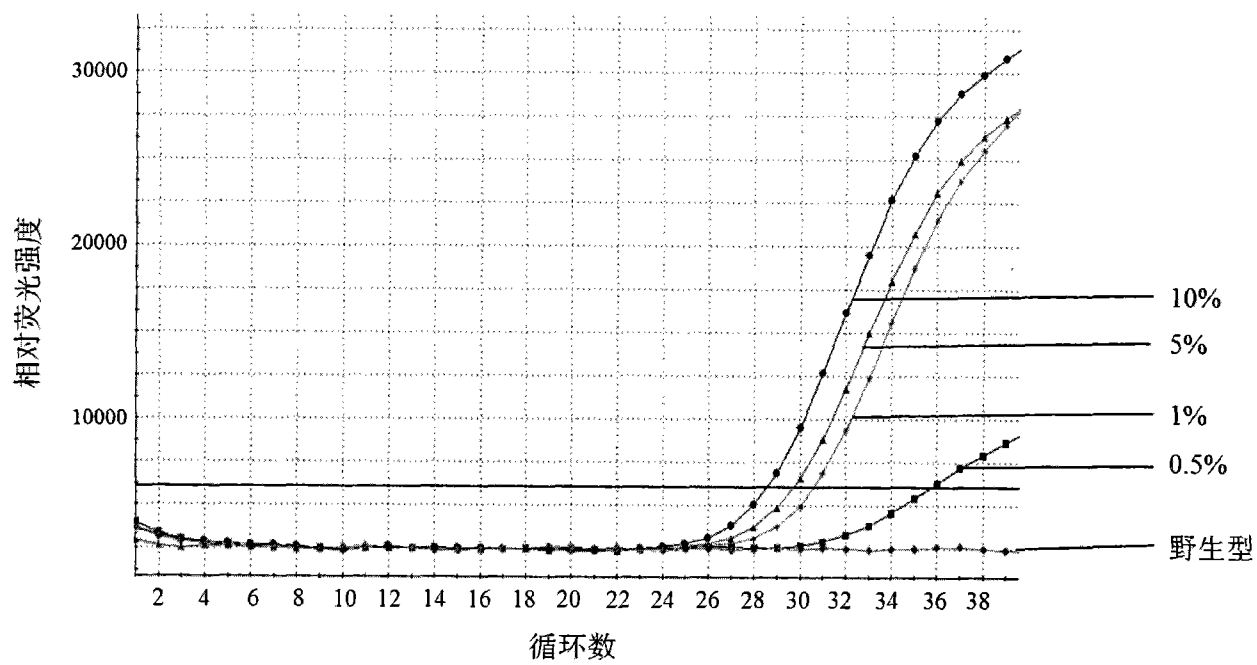


图 7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2015/000363

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12Q 1/68 (2006.01) i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNPAT, CNTXT, CPRSABS, CNABS, DWPI, SIPOABS, VEN, CJFD, CNKI, ISI Web of Knowledge, NCBI, Google Scholar: NRAS,
PCR, mutation, kit, sequence search based on SEQ ID Nos: 1-21

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN 104232750 A (JIAXING ACCB DIAGNOSTICS CO LTD) 24 December 2014 (24.12.2014) the whole document	1-3
A	CN 102676648 A (UNIV CHONGQING MEDICAL CHILDRENS HOSPITA) 19 September 2012 (19.09.2012) see the whole document	1-3
A	CN 103703013 A (SWIFT BIOSCIENCES INC.) 02 April 2014 (02.04.2014) the whole document	1-3
A	CN 102301005 A (LIFE TECHNOLOGIES CORP.) 28 December 2011 (28.12.2011) the whole document	1-3

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>“&” document member of the same patent family</p>
---	---

Date of the actual completion of the international search
25 June 2015

Date of mailing of the international search report
13 July 2015

Name and mailing address of the ISA
State Intellectual Property Office of the P. R. China
No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao
Haidian District, Beijing 100088, China
Facsimile No. (86-10) 62019451

Authorized officer

ZHANG, Yanxia
Telephone No. (86-10) 62089438

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2015/000363

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 104232750 A	24 December 2014	None	
CN 102676648 A	19 SEP tember 2012	None	
CN 103703013 A	02 April 2014	JP 2014507149 A	27 March 2014
		AC A 2826904 A1	23 August 2012
		AU 2012217788 A1	29 August 2013
		WO 2012112582 A3	14 November 2013
		WO 2012112582 A2	23 August 2012
		EP 2675921 A2	25 December 2013
		US 2014038185 A1	06 February 2014
		SG 192736 A1	30 SEP tember 2013
		EP 2675921 A4	03 December 2014
CN 102301005 A	28 December 2011	WO 2010080559 A3	28 October 2010
		EP 2376659 A2	19 October 2011
		WO 2010080559 A2	15 July 2010
		WO 2010077324 A3	28 October 2010
		WO 2010077324 A2	08 July 2010
		US 2010221717 A1	02 SEP tember 2010
		JP 2012511927 A	31 May 2012
		AC A 2747026 A1	08 July 2010
		EP 2376659 A4	23 January 2013

<p>A. 主题的分类</p> <p>C12Q 1/68(2006.01) i</p> <p>按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类</p>																	
<p>B. 检索领域</p> <p>检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)</p> <p>C12Q</p> <p>包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献</p> <p>在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))</p> <p>CNPAT, CNTXT, CPRSABS, CNABS, DWPI, SIPOABS, VEN, CJFD, CNKI, ISI Web of Knowledge, NCBI, Google Scholar: NRAS, 突变, 试剂盒, PCR, mutation, kit, 基于SEQ ID No: 1-21的序列检索</p>																	
<p>C. 相关文件</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>类型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>PX</td> <td>CN 104232750 A (嘉兴雅康博医学检验所有限公司) 2014年 12月 24日 (2014 - 12 - 24) 全文</td> <td>1-3</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 102676648 A (重庆医科大学附属儿童医院) 2012年 9月 19日 (2012 - 09 - 19) 全文</td> <td>1-3</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 103703013 A (威夫特生物科学公司) 2014年 4月 2日 (2014 - 04 - 02) 全文</td> <td>1-3</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 102301005 A (生命技术公司) 2011年 12月 28日 (2011 - 12 - 28) 全文</td> <td>1-3</td> </tr> </tbody> </table>			类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	PX	CN 104232750 A (嘉兴雅康博医学检验所有限公司) 2014年 12月 24日 (2014 - 12 - 24) 全文	1-3	A	CN 102676648 A (重庆医科大学附属儿童医院) 2012年 9月 19日 (2012 - 09 - 19) 全文	1-3	A	CN 103703013 A (威夫特生物科学公司) 2014年 4月 2日 (2014 - 04 - 02) 全文	1-3	A	CN 102301005 A (生命技术公司) 2011年 12月 28日 (2011 - 12 - 28) 全文	1-3
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求															
PX	CN 104232750 A (嘉兴雅康博医学检验所有限公司) 2014年 12月 24日 (2014 - 12 - 24) 全文	1-3															
A	CN 102676648 A (重庆医科大学附属儿童医院) 2012年 9月 19日 (2012 - 09 - 19) 全文	1-3															
A	CN 103703013 A (威夫特生物科学公司) 2014年 4月 2日 (2014 - 04 - 02) 全文	1-3															
A	CN 102301005 A (生命技术公司) 2011年 12月 28日 (2011 - 12 - 28) 全文	1-3															
<p><input type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。</p>																	
<p>* 引用文件的具体类型:</p> <table border="0"> <tr> <td>“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件</td> <td>“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件</td> </tr> <tr> <td>“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利</td> <td>“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性</td> </tr> <tr> <td>“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)</td> <td>“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性</td> </tr> <tr> <td>“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件</td> <td>“&” 同族专利的文件</td> </tr> <tr> <td>“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件</td> <td></td> </tr> </table>			“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件	“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件	“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利	“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性	“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)	“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性	“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件	“&” 同族专利的文件	“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件						
“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件	“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件																
“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利	“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性																
“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)	“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性																
“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件	“&” 同族专利的文件																
“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件																	
<p>国际检索实际完成的日期</p> <p>2015年 6月 25日</p>	<p>国际检索报告邮寄日期</p> <p>2015年 7月 13日</p>																
<p>ISA/CN的名称和邮寄地址</p> <p>中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN) 北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 中国</p> <p>传真号 (86-10)62019451</p>	<p>授权官员</p> <p>张艳霞</p> <p>电话号码 (86-10)62089438</p>																

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2015/000363

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	104232750	A	2014年 12月 24日	无			
CN	102676648	A	2012年 9月 19日	无			
CN	103703013	A	2014年 4月 2日	JP	2014507149	A	2014年 3月 27日
				CA	2826904	A1	2012年 8月 23日
				AU	2012217788	A1	2013年 8月 29日
				WO	2012112582	A3	2013年 11月 14日
				WO	2012112582	A2	2012年 8月 23日
				EP	2675921	A2	2013年 12月 25日
				US	2014038185	A1	2014年 2月 6日
				SG	192736	A1	2013年 9月 30日
				EP	2675921	A4	2014年 12月 3日
CN	102301005	A	2011年 12月 28日	WO	2010080559	A3	2010年 10月 28日
				EP	2376659	A2	2011年 10月 19日
				WO	2010080559	A2	2010年 7月 15日
				WO	2010077324	A3	2010年 10月 28日
				WO	2010077324	A2	2010年 7月 8日
				US	2010221717	A1	2010年 9月 2日
				JP	2012511927	A	2012年 5月 31日
				CA	2747026	A1	2010年 7月 8日
				EP	2376659	A4	2013年 1月 23日