



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105283555 A

(43) 申请公布日 2016. 01. 27

(21) 申请号 201480013111. 4

(22) 申请日 2014. 10. 20

(30) 优先权数据

61/893, 283 2013. 10. 20 US

61/904, 141 2013. 11. 14 US

62/039, 905 2014. 08. 20 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2015. 09. 08

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2014/061435 2014. 10. 20

(87) PCT国际申请的公布数据

W02015/073163 EN 2015. 05. 21

(71) 申请人 特罗瓦基因公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 詹森·普尔 赛格·汉考克

卡伦纳·科斯科

弗拉达·梅尔尼科娃 彼得·裘槎

蒂姆·卢 马克·G·厄兰德

艾琳·萨穆埃尔兹

(74) 专利代理机构 北京安信方达知识产权代理

有限公司 11262

代理人 王玮玮 郑霞

(51) Int. Cl.

C12P 19/34(2006. 01)

C12Q 1/68(2006. 01)

C07H 21/04(2006. 01)

权利要求书2页 说明书24页 附图13页

(54) 发明名称

核酸序列的合成和富集

(57) 摘要

本公开内容涉及富集样品中相对于相应的非靶核酸序列或参考核酸序列以低丰度存在的靶核酸序列。特别地,该方法通过靶序列的数量级程度的富集允许显著更高水平的检测灵敏度。

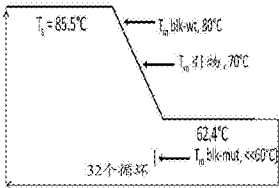
实施例1: 两步PCR(EGFR外显子19缺失)

步骤1:
选择性变性(T_d)

步骤2:
退火和延伸

Mut-mut同源
双链体变性,
而不破坏wt-
wt或blk-wt
双链体

阻碍物是互斥的野生型链。
引物退火至剩余的wt链和两条
突变链。
阻碍物不退火至被同链引物
占据的突变链。
在一条wt链和两条突变链性
上延伸。



1. 一种用于在疑似包含一个或更多个低丰度靶序列的核酸样品中富集靶核酸序列的方法,所述方法包括:

a. 制备反应混合物,所述反应混合物包含:参考序列、相对于所述混合物中的参考序列的量过量的阻断序列和疑似包含的一个或更多个靶序列,其中:

所述靶序列与所述参考序列至少 50% 同源;

所述阻断序列与所述参考序列的区域完全互补,所述参考序列的所述区域在所述靶序列之中或与所述靶序列重叠;

b. 使所述反应混合物经受两个或更多个循环的以下步骤:

i. 将所述反应混合物的温度加热至预选的变性温度 (T_{sd}),所述 T_{sd} 允许但不要求退火至参考序列的阻断物序列的变性,其中所述 T_{sd} 高于计算的参考序列-阻断物序列双链体的解链温度,和

ii. 将所述反应混合物的温度降低至延伸温度,所述延伸温度允许引物退火和一条或更多条引物从它的互补靶序列延伸以形成富集的靶序列。

2. 一种用于在疑似具有一个或更多个低丰度靶序列的样品中富集靶核酸序列的方法,所述方法包括:

a) 制备包括参考序列、过量的与所述参考序列完全互补的阻断序列和与所述靶序列的一个区域完全互补的引物对的反应混合物,其中所述靶序列具有与所述参考序列的至少 50% 的互补性,并使所述反应混合物经受两个或更多个循环的以下步骤:

i) 将所述反应混合物加热至足以允许同源双链化的参考序列和靶序列变性的第一温度;

ii) 将所述反应混合物冷却至允许优先形成参考-阻断物双链化序列的温度;

iii) 将所述反应混合物加热至选择性变性温度 (T_s) 以允许阻断物-靶双链化序列的变性;和

iv) 将所述反应混合物冷却至低于阻断物-参考序列、所述引物对和阻断物-突变序列的解链温度的温度以允许退火至所述靶序列的引物序列的延伸和靶序列相对于所述反应混合物中的参考序列的大量富集。

3. 如权利要求 1 或 2 所述的方法,其中所述参考阻断序列上的 3' 末端被阻断以阻止延伸。

4. 如权利要求 1 或 2 所述的方法,其中所述参考阻断序列上的 5' 末端包含阻止 Taq DNA 聚合酶的 5' 至 3' 核酸外切作用的核苷酸。

5. 如权利要求 1 或 2 所述的方法,其中所述参考阻断序列在所述参考序列的引物结合位点之间与所述参考序列的一条链完全互补,或重叠于任一所述引物结合位点处。

6. 如权利要求 1 或 2 所述的方法,其中所述参考阻断序列是由 40 个或更短长度的碱基对组成的短阻断物。

7. 如权利要求 1 或 2 所述的方法,其中所述引物序列具有比所述参考序列-阻断物序列的解链温度低的退火温度。

8. 如权利要求 1 或 2 所述的方法,其中所述选择性温度比所述参考序列-阻断物序列的解链温度的解链温度高约 5°C 或更多。

9. 如权利要求 1 所述的方法,其中所述靶序列是 EGFR 外显子 19 缺失,且所述选择性变

性温度比所述参考序列-阻断物序列的解链温度的解链温度高约 5℃或更多。

10. 如权利要求 9 所述的方法,其中所述选择性变性温度比所述参考序列-阻断物序列的解链温度的解链温度高约 5.5℃,且比所述引物序列的 T_m 高约 15.5℃。

11. 如权利要求 9 所述的方法,其中所述选择性变性温度低于所述参考序列-阻断物序列的解链温度的解链温度,且比所述引物序列的 T_m 高约 15.5℃。

12. 如权利要求 9 所述的方法,其中所述选择性变性温度比所述参考序列-阻断物序列的解链温度高约 5.5℃或解链温度,且高于所述引物序列的 T_m 。

13. 如权利要求 10 所述的方法,其中所述延伸温度是约 62.4℃或在约 61℃和约 64℃之间。

14. 如权利要求 1 或 2 所述的方法,其中参考:阻断物序列和阻断物:靶序列的解链温度之间的差异在约 5 至 14 摄氏度之间。

15. 如权利要求 1 或 2 所述的方法,其中所述参考序列是 KRAS 且参考:阻断物序列和阻断物:靶之间的解链温度的差是 -1.1℃。

16. 如权利要求 2 所述的方法,其中所述靶序列是 EGFR 外显子 20T790M,选择性变性温度比所述参考序列-阻断物序列的解链温度的解链温度高约 14.3℃或更多。

17. 如权利要求 12 所述的方法,其中所述选择性退火温度比所述参考序列-阻断物序列的解链温度的解链温度低约 2℃。

18. 如权利要求 12 所述的方法,其中所述延伸温度是约 62.4℃或在约 61℃和约 64℃之间。

如权利要求 1 或 2 所述的方法,其中所述突变等位基因选自由以下组成的组: BRAF;

KRAS;

EGFR;

NRAS;

C-MET;

HER-2;

HER-3;

PIK3CA; AKT-1; MAP2PK; ER; AR; FGFR1; FGFR2; FGFR3; KIT; PDGFR1; PDGFR2; PDGFR3; TP53; 和 SMAD1。

19. 如权利要求 1 或 2 所述的方法,其中在循环后,使用选自由以下组成的组的一种或更多种方法分析所述反应混合物的样品: MALDI-TOF、HR-Melting、双脱氧测序、单分子测序、焦磷酸测序、第二代高通量测序、SSCP、RFLP、dHPLC、CCM、数字 PCR 和定量-PCR。

核酸序列的合成和富集

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求 2013 年 10 月 20 日提交的美国临时申请号 61/893, 283、2013 年 11 月 14 日提交的美国临时申请号 61/904, 141 和 2014 年 8 月 20 日提交的美国临时申请号 62/039, 905 的权益, 其全部通过引用并入本文。

[0003] 本公开内容的领域

[0004] BRAF 和 KRAS 中的突变是赋予癌细胞存活和生长优势的遗传改变的实例。这样的遗传改变可用于靶向治疗的选择。但在受试者中, 这些改变的存在远超过未改变的野生型序列。

[0005] 本公开内容涉及合成和富集包含一个或更多个改变或突变的靶核酸序列; 靶序列以相对于生物样品中存在的高度相似的野生型序列低的丰度存在。靶核酸序列的优先和特异性富集提供以前没有实现的显著灵敏的检测水平。所公开的方法还允许定量检测靶序列。

[0006] 本公开内容的背景

[0007] 许多疾病且特别是癌症, 与基因突变诸如单点突变、少量碱基对插入 / 缺失等相关。几乎所有目前用于检测这些罕见的等位基因的方法依赖于聚合酶链式反应 (PCR)。然而, 基于 PCR 的方法的主要局限性是其低的灵敏度和优先扩增正常 (野生型) 序列, 因为正常 (野生型) 序列在样品内的相对丰度较大。通常, 直到突变等位基因呈现大于总等位基因的 5% -10% 时, 其才可能被检测到。因此, 当变体序列相对于非变体 (靶) 序列以低百分比存在时, 在野生型 DNA 序列的背景中检测基因突变的能力是有益且高度希望的。

[0008] 允许选择性扩增突变基因, 而不需要扩增后测序测定的改良的 PCR 方法已被描述。这样的方法包括 Restriction endonuclease-mediated selective PCR: a novel assay for the detection of K-ras mutations in clinical samples. Am J Pathol 153:373-379, Detection of tumor mutations in the presence of excess amounts of normal DNA. Nat Biotechnol 20:186-189; “locked nucleic acid” COLD-PCR (co-amplification at lower denaturation temperature PCR) (Li, J., 等人, 2008. Replacing PCR with COLD-PCR enriches variant DNA sequences and redefines the sensitivity of genetic testing. Nat Med 14:579-584.), US20130149695 (Method for detecting genetic mutation by using a blocking primer), US8623603 (Full cold-PCR enrichment with reference blocking sequence); USPN 8455190 (Enrichment of a target sequence); W02003072809 (Melting Temperature Dependent DNA Amplification) 以及其他文献。

[0009] COLD-PCR 技术的执行相对简单, 但具有低的扩增倍数 (3-100×) 和低的对于微小温度变化的灵敏度 (Li, J., 等人, 2008. Replacing PCR with COLD-PCR enriches variant DNA sequences and redefines the sensitivity of genetic testing. Nat Med 14:579-584, Luthra, R., 等人, 2009. COLD-PCR finds hot application in mutation analysis. Clin Chem 55:2077-2078)。其他方法, 诸如在 Molloy 等人 (W02003072809) 中

描述的方法需要使用较低的变性温度以选择性扩增靶序列。因此 Molloy 仅适用于具有比其野生型序列低的解链温度 (T_m) 的那些靶序列。

[0010] 癌性组织、循环细胞中的核酸和体液中存在的无细胞 (cf) 的核酸可有助于鉴定和选择患有与此类遗传改变相关的癌症或其他疾病的个体。BRAF 和 KRAS 中的突变是赋予癌细胞存活和生长优势的遗传改变的实例。这样的遗传改变可用于靶向治疗的选择。但在受试者中,这些改变的存在远超过未改变的野生型序列。

[0011] 参见,例如,Spindler 等人,2012;Benesova 等人,2013;Dawson 等人,2013;Forsheew 等人,2012;Shaw 等人,2012。一些数据表明,突变 DNA 在血液中的量与肿瘤负荷相关,且可用于确定抗性突变的出现 (Forsheew 等人,2012;Murtaza 等人,2013;Dawson 等人,2013;Diaz 等人,2012;Misale 等人,2012;Diehl 等人,2008)。

[0012] 存在对另外的方法的需要,通过这些方法可有效且容易地实现靶序列的更大灵敏度和/或富集。本发明解决了该需要。

[0013] 本公开内容的概述

[0014] 本公开内容部分地基于开发用于大量富集和检测低丰度核酸序列 (靶序列),诸如非正常存在于具有天然核酸、DNA、或 RNA 序列的背景的生物样品中的改变的、突变的、非野生型核酸序列或其他核酸的方法,所述方法利用更少的步骤并大大减少反应测定时间,同时仍顾及到检测低丰度核酸序列的更高数量级的灵敏度。开发该方法使得能够富集以短的、片断化形式存在的突变序列 (<50bp),且该方法还适于扩增片段化程度较小的序列 (>50bp)。本方法的应用允许在高的非靶核酸或野生型核酸背景中富集低丰度核酸序列,使得可在生物样品中检测到少至单拷贝的靶序列。富集基于靶序列量的相对增加,通过其相对于同一生物样品中存在的其他核酸的优先扩增和由此而来的显著更多 (700X - 10000X 倍以及更大的倍数) 的富集。

[0015] 在第一方面,本公开内容提供了用于在扩增反应混合物中富集靶核酸序列的方法。所述方法可包括

[0016] a) 制备包含核酸样品和过量的参考阻断核酸序列的扩增反应混合物,所述核酸样品包含参考 (任选地野生型) 序列并且至少被怀疑具有一个或多个与参考序列至少 50% 同源并且还可通过与参考序列相同的引物对扩增的靶 (任选地突变体) 序列,并且所述参考阻断核酸序列在参考序列的引物位点之间与参考序列的一条链的序列的至少一部分完全互补;

[0017] b) 将反应混合物的温度升至第一变性温度,所述第一变性温度高于参考序列的解链温度 (T_m) 且高于双链靶序列的解链温度 (T_m) 以形成变性的参考链和变性的靶链;

[0018] c) 降低反应混合物的温度以允许形成参考阻断序列和互补的参考链的双链体以及参考阻断序列和靶链的异源双链体;

[0019] d) 将反应混合物的温度升至临界温度 (T_c),所述临界温度足以允许参考阻断序列和靶链的所述异源双链体优先于参考阻断序列和参考链的双链体的变性的优先变性;

[0020] e) 降低反应混合物的温度以允许引物对退火至反应混合物中的变性的靶链和任何变性的参考链;

[0021] f) 将反应混合物的温度升至高于参考序列的解链温度 (T_m) 且高于双链靶序列的解链温度 (T_m) 以形成变性的参考链和变性的靶链的变性温度以在反应混合物中延伸退火

至所述变性的靶链和变性的参考链的引物；以及

[0022] g) 重复 c) 至 f) 两个或更多个循环以在反应混合物中相对于参考序列富集靶序列。

[0023] 进行小段 f) 中的升温无需保持任何一个温度作为用于延伸已退火的引物的独立“步骤”。换言之，在达到小段 e) 的温度后，反应混合物的温度继续增加，直到达到 f) 中的变性温度。任选地，小段 f) 的变性温度与 b) 中的变性温度相同。因此，在一些实施方案中，小段 f) 和 g) 中的操作被重复 b) 至 e) 两个或更多个循环以在反应混合物中相对于参考序列富集靶序列的操作代替。

[0024] 本公开内容还提供了基于扩增子和 / 或靶序列的动力学的允许两步骤、三步骤或四步骤扩增循环的等位基因特异性竞争循环测定 (ASCC) 设计，该方法减少了方法的反应时间，同时大量富集并检测被包含在高的非靶核酸序列背景中的低丰度核酸序列（靶序列）。

[0025] 本公开内容还提供了基于参考阻断物寡核苷酸和引物结合动力学的对于短扩增子 (<50bp)、还适合于大扩增子 (>50bp) 的等位基因特异性竞争循环测定 (ASCC) 设计。参考阻断物是短的阻断物序列，允许两步骤、三步骤或四步骤扩增循环，这减少了方法的反应时间，同时大量富集并检测被包含在高的非靶核酸序列背景中的低丰度核酸序列（靶序列）。

[0026] 本公开内容还部分地基于这样的发现，对于短扩增子，由于在具有可变序列的位置处的错配，可获得参考阻断物 - 参考序列的 T_m 和参考阻断物 - 靶序列的 T_m 之间的解链温度的显著差异。因此，本公开内容还提供了利用约 80bp 或更小、或约 60bp 或更小、或 40bp 或更少、或约 12bp 至 35bp 之间的长度的短参考阻断物富集和检测低丰度核酸序列（靶序列）的方法。此外，本公开内容提供了用于大量富集和检测具有更大丰度的非靶序列诸如天然的、野生型或参考序列的样品中存在的低丰度核酸序列（靶）的定量方法。

[0027] 大量富集的靶核酸序列可提供高的检测灵敏度以通过检测或定量突变核酸序列（例如，靶序列）的存在监测或检测患者的癌症。靶序列包括，例如，癌症相关的突变形式的 BRAF、EGFR、c-MET、HER-2、HER-3、NRAS、KRAS、PIK3CA、AKT-1、MAP2PK、ER、AR、FGFR1、FGFR2、FGFR3、KIT、PDGFR1、PDGFR2、PDGFR3、TP53、SMAD1 及其他基因。

[0028] 还包括使用无细胞 DNA (cfDNA) 的方法，该方法大量富集使用较低侵入性患者采样方法获得的样品中的低水平的靶序列。

[0029] 一方面，提供了用于在疑似包含一个或更多个低丰度靶序列的核酸样品中富集靶核酸序列的方法，该方法包括：

[0030] a. 制备反应混合物，所述反应混合物包括：参考序列、相对于混合物中参考序列的量过量的阻断序列，和疑似包含的一个或更多个靶序列，其中：

[0031] 靶序列与参考序列至少 50% 同源；

[0032] 阻断序列与参考序列的区域完全互补，参考序列的该区域在靶序列之中或与靶序列重叠；

[0033] b. 使反应混合物经受两个或更多个循环的下列步骤：

[0034] i. 将反应混合物的温度加热至预选的变性温度 (T_{sd})，允许但不要求退火至参考序列的阻断物序列的变性，其中所述 T_{sd} 高于所计算的参考序列 - 阻断物序列双链体的解链温度，和

[0035] ii. 将反应混合物的温度降低至延伸温度, 允许引物退火和一个或多个引物从它的互补靶序列延伸以形成富集的靶序列。

[0036] 另一方面, 提供了用于在疑似具有一个或多个低丰度靶序列的样品中富集靶核酸序列的方法, 该方法包括:

[0037] a) 制备包括参考序列、过量的与参考序列完全互补的阻断序列, 及与靶序列的一个区域完全互补的引物对的反应混合物, 其中所述靶序列具有与参考序列至少 50% 的互补性, 并使反应混合物经受两个或多个循环的下列步骤:

[0038] i) 选择高于靶序列的解链温度且低于参考序列同源双链体或阻断物 - 参考序列双链体的解链温度的选择性温度 (T_{sd}) 以允许靶序列同源双链体的变性; 以及

[0039] ii) 将反应混合物的温度降低至高于阻断物 - 靶双链体的解链温度的温度以允许引物: 靶序列的延伸和靶序列相对于反应混合物中的参考序列的富集。

[0040] 另一方面, 提供了用于在疑似具有一个或多个低丰度靶序列的样品中富集靶核酸序列的方法, 该方法包括:

[0041] a) 制备包括参考序列、过量的与参考序列完全互补的阻断序列, 及与靶序列的在参考序列之中或与参考序列重叠的区域完全互补的引物对的反应混合物, 其中所述靶序列具有与所述参考序列至少 50% 的互补性, 并使所述反应混合物经受两个或多个循环的下列步骤:

[0042] i) 将所述反应混合物加热至足以允许同源双链化的参考序列和靶序列变性的第一温度;

[0043] ii) 将所述反应混合物冷却至允许参考 - 阻断物双链化序列相对于靶 - 阻断物双链化序列优先形成的温度;

[0044] iii) 将所述反应混合物加热至选择性变性温度 (T_{sd}) 以允许阻断物 - 靶双链化序列的变性; 以及

[0045] iv) 将所述反应混合物冷却至低于所述阻断物 - 参考序列、引物对和阻断物 - 突变序列的解链温度的温度, 以允许退火至靶序列的引物序列的延伸, 并相对于所述反应混合物中的参考序列大量富集靶序列。

[0046] 任选地, 阻断物: 突变序列可具有比以上步骤 iv 的反应温度低的解链温度。

[0047] 另一方面, 提供了优化允许优先扩增低丰度靶序列并明显更多地富集低丰度靶序列的引物序列的设计的方法。还提供了用于扩增具有参考核酸、天然核酸或野生型核酸占多数的背景的样品中存在的低丰度靶序列的单链寡核苷酸 DNA 引物。

[0048] 在一个实施方案中, 对于选择性变性所选择的温度 (T_{sd}) 可以是靶序列的解链温度或高于靶序列的解链温度。

[0049] 在另一个实施方案中, 对于选择性变性所选择的温度 (T_{sd}) 可显著高于靶序列的解链温度。

[0050] 在另一个实施方案中, 对于选择性变性所选择的温度 (T_{sd}) 可低于靶序列的解链温度。

[0051] 参考阻断序列或短阻断序列可与变性的靶链的一部分互补, 该变性的靶链本身还与所使用的一条或两条引物的 3' 末端的至少一部分互补。

[0052] 参考阻断寡核苷酸可包括被阻断以抑制延伸的 3' - 末端。任选地, 同一寡核苷酸

的 5' 末端也可被阻断。作为非限制性实例,参考阻断寡核苷酸的链可包括包含阻止 Taq DNA 聚合酶的 5' 至 3' 核酸外切作用 (exonucleolysis) 的核苷酸的 5' - 末端。又在另外的实施方案中,参考阻断序列可以是单链核酸参考阻断序列;双链核酸参考阻断序列,其当反应混合物被加热至第一变性温度时变性以形成 b) 中的单链参考阻断序列;单链 DNA、RNA、肽核酸或锁核酸;或单链 DNA、RNA、肽核酸或锁核酸或另一种修饰的核苷酸之间的嵌合体。

[0053] 在一些个例中,参考阻断寡核苷酸可包含具有一个或多个具有被“锁”在 3' - 内构象 (endo conformation) 中的核糖部分的锁核酸 (LNA) 核苷酸的 DNA 残基。该 LNA 参考阻断寡核苷酸的用途可用于增加本公开内容的参考序列和靶序列的寡核苷酸的解链温度。

[0054] 在一些方面,参考阻断寡核苷酸可包含较短的碱基对序列,其中阻断寡核苷酸序列与野生型 (非靶) DNA 序列或等位基因互补或对于野生型 (非靶) DNA 序列或等位基因是特异的。该短序列寡核苷酸 (“短阻断物”) 可与正向链或反向链互补。任选地,该短阻断物具有约处于或高于其野生型寡核苷酸序列的解链温度的解链温度。任选地,阻断物序列与同链的引物序列可存在一些或部分重叠。任选地,该短序列阻断寡核苷酸可包含所期望的 LNA。该短序列优选地是约 80bp 的长度或更短、或约 60bp 的长度或更短、或约 40bp 的长度或更短,或在约 12bp 至约 60bp 之间的长度。

[0055] 在肽核酸或 LNA 的一些个例中,肽核酸或锁核苷酸在嵌合阻断寡核苷酸上的位置被选择成与疑似或已知存在突变的位置相匹配,从而增加参考阻断序列与靶链的异源双链体变性需要的温度和参考阻断序列与互补参考链的异源双链体变性需要的温度之间的差异。

[0056] 在其他实施方案中,参考阻断序列在参考序列的引物结合位点之间与参考序列的一条链完全互补,或在任一末端与引物结合位点重叠。在另外的实施方案中,参考阻断序列与参考序列等长或比参考序列短。又在另外的实施方案中,与引物对中的引物相比,参考阻断序列以摩尔过量存在于反应混合物中。在其他情形中,双链靶序列的解链温度大于或等于双链参考序列的解链温度。在另外的情形中, T_{sd} 被保持 1 秒至 60 秒的时间段。

[0057] 另一方面,所述方法包括使用包含核酸样品、过量的阻断核酸序列的反应混合物,所述核酸样品具有参考序列且疑似具有一个或多个与所述参考序列至少 50% 同源且还可通过与参考序列相同的引物对扩增的靶序列。另一方面,引物序列与参考序列互补,并且还包含标签序列以与随后的包括但不限于下一代测序的突变检测方法整合。

[0058] 本公开内容包括这类方法,其中先通过使反应混合物经历 PCR 扩增参考序列和靶序列,然后使反应混合物的至少一部分经历以上描述的富集方法。在一些个例中,第一 PCR 扩增可以是 10 个循环或更少、8 个循环或更少,或 6 个循环或更少。在其他个例中,第一 PCR 扩增可以是 10 个循环或更多。

[0059] 在另一个实施方案中,靶序列可以是具有受试者,诸如人患者中的纯合突变的序列。在一些个例中,参考序列和靶序列是 KRAS 序列,任选地是人 KRAS 序列。在其他实施方案中,靶序列可包含 BRAF 序列中的突变。在一些个例中,突变在人 BRAF 序列中。任选地,突变可以是本领域技术人员已知为 BRAF 氨基酸序列的位置 600 处的缬氨酸突变的 V600E、V600K、V600D、或 V600R 突变。

[0060] 在一个实施方案中,靶序列可以是以下基因的癌症相关的突变体序列: BRAF、EGFR、c-MET、HER-2、HER-3、NRAS、PIK3CA、KRAS、AKT-1、MAP2PK、ER、AR、FGFR1、FGFR2、FGFR3、

KIT、PDGFR1、PDGFR2、PDGFR3、TP53、SMAD1 或其他基因。

[0061] 另一方面,参考序列和靶序列是任选地从体液诸如尿液、血液、血清或血浆获得的无细胞 DNA (cfDNA)。

[0062] 在一些实施方案中,所公开的引物对是其中各自在其 3' 末端包含与双链体靶序列的一条链互补的序列的两条寡核苷酸引物。另外,所述寡核苷酸引物中的一条或两条均在其 5' 末端包含靶序列中不存在的异源序列。该异源序列可以是人工的、合成的、人造的、或来自对靶序列来讲是外源的来源。这样的引物的使用将靶序列转化为嵌合分子,该嵌合分子是人工的且是进行所公开的合成核酸分子的结果。

[0063] 在一些实施方案中,所公开的富集方法被用于测定包含参考序列的样品中靶序列的量的方法的一部分。该测定方法可包括在进行所公开的富集方法之后的评估或检测方法,作为非限制实例,诸如对来自受试者的样品和具有已知量的靶序列的一个或多个对照样品的测序或大规模并行序列以测量靶序列的量;然后通过与样品中的靶序列的一个或多个已知样品的测量值相比计算靶序列相对于一个或多个对照样品的量。在一些个例中,样品是尿液,且靶序列是 cfDNA。

[0064] 附图简述

[0065] 图 1 示出了本方法的一个实施方案。

[0066] 图 2 示出了本方法的一个实施方案。

[0067] 图 3 示出了本方法的一个实施方案。

[0068] 图 4 示出了解链温度曲线。

[0069] 图 5 示出不同阻断物的示例性动力学曲线。

[0070] 图 6 示出了用于证实单拷贝测定灵敏度的泊松分布。

[0071] 图 7 示出了对单拷贝 KRAS 测定灵敏度的演示。

[0072] 图 8 示出了低丰度靶序列的大量富集。

[0073] 图 9 提供了本方法的一个实施方案的示意图。

[0074] 图 10 提供了本方法的一个实施方案的示意图。

[0075] 图 11 示出了本方法的一个实施方案。

[0076] 图 12 示出了本方法的一个实施方案的临床应用。

[0077] 图 13 示出了本方法的一个实施方案的临床应用。

[0078] 发明详述

[0079] 本发明涉及用于从无细胞样品中高度富集低丰度靶核酸序列的方法、组合物、软件和试剂盒。所述方法部分地基于比以前的方法更有效、具有更少的步骤并需要更短的反应时间的核酸序列扩增方案。所公开的方法允许数量级 (700X - 1000X+) 更高的检测灵敏度同时保持靶特异性。与之前的方法不同,本文公开了采用优化的阻断物序列和引物设计以及需要少得多的循环步骤的方法。所提供的方法还允许检测更大范围的靶序列,并且不限于仅确定具有比参考序列的解链温度低的解链温度的那些低丰度靶序列。

[0080] 本发明可在多种样品类型上进行,诸如 cfDNA (尿液、血清、血浆)、CTC、体液 (唾液、痰、胰液、精液、脑脊髓液、泪液、粘液) 或组织活检物 (FNA、FFPE、TMA); 需要少量的组织或 DNA; 可量化; 具有多重优先富集所有突变的能力并检测扩增区域中的所有突变。本发明不限于检测等位基因特异性突变。

[0081] 如本文所用,术语“富集靶序列”或低丰度靶核酸的“富集”是指增加靶序列的量并增加靶序列相对于样品中相应参考序列的比。例如,当样品中靶序列与参考序列的比最初是 5%至 95%时,靶序列可在扩增反应中被优先扩增,以产生 99.99999%的最终比和 0.00001%的参考序列,或者靶序列可在扩增反应中被优先扩增,以在数量级上增加其在样品中的存在。例如,当扩增反应混合物的原始样品中可能存在靶序列的至少 1 条链时,在扩增之后,扩增反应混合物中将存在 100 至 11000 条或更多的靶序列的链,因此靶序列相对于原始样品中参考序列的量被富集 100X 到至少 11000X 或更多倍。

[0082] 如本文所用,术语“靶序列”是指核酸样品中处于低丰度或不如相应的参考序列普遍的核酸。靶序列将占样品中参考序列 + 靶序列的总量的不足 50%。靶序列可以是异常或突变的等位基因。例如,样品(例如组织、血液、血浆、尿液或其他体液)可包含许多正常细胞和很少或单个的癌细胞。正常细胞包含未突变的等位基因或野生型等位基因,而癌细胞包含体细胞突变和 / 或与它们的对应的未突变的等位基因或野生型等位基因相比的序列差异。在这种情况下,该突变体是靶序列而野生型序列是参考序列。如本文所用,“靶链”是指双链靶序列的核酸单链。

[0083] 靶序列必须与相应的参考序列至少 50%同源,但是必需在至少一个核苷酸处与参考序列不同。靶序列可用与参考序列的引物对相同的那些引物对通过 PCR 扩增,但不必受限于此。靶序列还可用于参考序列的引物对通过 PCR 扩增,只要选择的引物扩增包含靶序列的序列区域。

[0084] 如本文所用,术语“扩增子”是指为扩增产物的核酸。因此扩增子可与参考序列、靶序列或任何已经历扩增的核酸序列同源。通常,在反应样品内,扩增子序列的浓度将显著大于原始(模板)核酸序列的浓度。

[0085] 如本文所用,术语“参考序列”是指在核酸样品中比相应的靶序列更为普遍的核酸。参考序列占样品中总的参考序列 + 靶序列的超过 50%。优选地,参考序列以在 DNA 和 / 或 RNA 水平上比靶序列多 10×、15×、20×、25×、30×、35×、40×、45×、50×、60×、70×、80×、90×、100×、150×、200× 或更多的水平表达。如本文所用,“参考链”是指双链参考序列的核酸单链。

[0086] 如本文所用,术语“野生型”是指群体中某基因最常见的多核苷酸序列或等位基因。通常,会从正常细胞获得野生型等位基因。取决于从业者的特定目的或期望,参考序列通常是野生型序列。

[0087] 如本文所用,术语“突变的”是指核酸序列中的核苷酸变化(即,单个或多个碱基取代、缺失、或插入)。携带突变的核酸在序列上具有不同于相应的野生型多核苷酸序列的核酸序列的核酸序列(突变的等位基因)。本发明广泛涉及体细胞的突变和多态性。本发明的方法在选择性富集突变的等位基因方面是特别有用的,所述突变的等位基因包含约 1 和 10 个之间的核苷酸序列变化,但是即使对于更高数目的序列变化它仍是有用的。突变体等位基因通常将从患病组织或细胞中获得,并且与疾病状态相关。

[0088] 如本文所用的术语“解链温度”或“ T_m ”是指使多核苷酸与其互补序列解离。通常, T_m 可定义为双链核酸分子中的一半沃森 - 克里克碱基对发生破坏或解离(即,被“解链”),而另一半沃森 - 克里克碱基对在双链构象中保持完整的温度。换言之, T_m 被定义为两个互补序列的 50%核苷酸退火(双链)且 50%的核苷酸变性(单链)的温度。因此 T_m 定义了

从双链转变至单链核酸分子的（或者相反地，从单链转变至双链核酸分子）的中点。

[0089] “选择的变性温度”或“ T_{sd} ”是利用包括根据如本文公开的实施方案的一个方面的参数和计算的 T_m 的预选设计确定的温度。通常，在本文提供的方法中，选择的温度将是低于阻断物：参考序列的解链温度，或高于阻断物：参考序列的解链温度或约是阻断物：参考序列的解链温度的预选温度。

[0090] T_m 可通过许多方法来估计，例如通过按照 Wetmur 1991 的最近邻算法 (nearest-neighbor calculation) (Wetmur, J.G. 1991. DNA probes: applications of the principles of nucleic acid hybridization. Crit Rev Biochem Mol Biol 26:227-259)，和通过包括 Oligo™ 引物设计的商业化程序和互联网上可用的程序来估计。可选择地， T_m 可通过实际的实验来确定。例如，双链 DNA 结合染料或嵌入染料，诸如溴化乙锭或 SYBR-green (Molecular Probes) 可用于解链曲线测定，以确定核酸的实际 T_m 。用于确定核酸 T_m 的另外的方法是本领域熟知的。这些方法的一些被列于通过引用并入的发明人的标题为“Enrichment of a Target Sequence”的在先专利申请、国际申请号 PCT/US2008/009248，现为美国系列号 12/671, 295。

[0091] 如本文所用，“参考阻断序列”是工程化的单链或双链核酸序列，诸如寡核苷酸，且优选地具有小于靶序列的扩增部分的长度。在一个实施方案中，参考阻断序列是小于参考序列的扩增部分的、在该序列的每侧的几个碱基，使得引物不能恰当地结合参考序列。在另一个实施方案中，参考阻断序列可与引物结合位点重叠。任选地，阻断参考阻断序列的 3' OH 末端阻碍 DNA 聚合酶延伸。任选地，修饰 5' 末端以阻止 Taq DNA 聚合酶的 5' 至 3' 的核酸外切作用。当反应混合物经受临界温度“ T_c ”时，参考阻断序列还可采取保持其他与参考序列退火的形式，诸如单链 DNA、RNR、肽核酸 (PNA) 或锁核酸 (LNA)、或另一种修饰的核苷酸之间的嵌合体。

[0092] 在一个实施方案中，参考阻断序列中使用的 PNA 或 LNA 位于参考序列中的不同于靶序列中的核苷酸的核苷酸的侧翼和 / 或包括参考序列中的不同于靶序列中的核苷酸的核苷酸的位置。这种构造将增加参考阻断序列 - 参考序列和参考阻断序列 - 靶序列异源双链体的解链温度的差异以进一步有助于参考阻断序列 - 靶序列异源双链体在 T_{sd} 下的变性和靶序列的富集。此外，可向具有参考阻断序列的其他位置添加 PNA 或 LNA 修饰，以升高并调整参考阻断序列与参考序列及与靶序列的解链温度。

[0093] 如果一个或更多个修饰的核苷酸、LNA 或 PNA 存在于参考阻断序列中，则该修饰的核苷酸、LNA 或 PNA 的位置可被选择成与疑似存在突变（即，靶序列和参考序列之间的序列差异）的至少一个位置匹配。通过选择该位置将修饰的核苷酸并入参考阻断序列，参考阻断序列和互补参考链的双链体的变性所需要的温度与参考阻断序列和部分互补的靶序列的异源双链体的变性所需要的温度之间的差异被最大化。

[0094] “参考阻断”序列或“短阻断”序列或“阻断物”序列可与参考序列的一条链（在引物结合位点之间或与引物结合位点部分重叠）完全互补。参考阻断序列和短阻断序列比参考序列短。阻断物序列可超过引物的长度。例如，（取决于靶序列的长度）在阻断物序列完全沿正向或反向引物的长度延伸包括了一个被测序的区域并且包括与反向阻断物的重叠的个例中。例如：具有正向引物的 13 个碱基对的 KRAS 阻断物可以是，来自正向引物的 13 个核苷酸碱基 + 位于测序区域的 5 个碱基 + 与反向引物互补的至多 3bp。在该实例中，阻断

物可包括约 21 个碱基对的长度,整个长度具有较长的引物区域和较长的测序区域延伸。

[0095] 如本文所用,“短阻断序列”或“短阻断物”是具有 80bp 或更短的长度、或 60bp 或更短的长度,或 10bp 和 63bp 之间长度的参考阻断序列。短阻断物序列包括“热阻断物序列”或具有高于参考序列或 WT-WT 双链体核苷酸链的解链温度的解链温度的序列。优选地,当短阻断序列与参考序列双链化时,阻断物:参考序列将具有大于反应混合中包括的引物对的至少一条引物的解链温度的解链温度。

[0096] 参考阻断序列或短阻断序列还可被设计以允许扩增具有任何尺寸长度的片段(扩增子)。优选地,这样的阻断序列被设计以具有足以扩增短片段的核酸,诸如无细胞 DNA 样品中存在的那些片段化的 DNA 序列的长度。优选地,参考阻断序列被设计以允许在阻断序列-参考序列的解链温度和阻断序列-靶序列的解链温度与混合物中引物的解链温度之间的差异。当然,如对于本领域技术人员将是明显的,当方法的动力学部分地基于引物-阻断物的结合温度和靶核酸的天然变性的构象之间的关系时,参考阻断序列的长度没有最大值或上限。具有高的解链温度并以过多的量存在于反应混合中的阻断物允许实现它与参考核酸或野生型核酸序列的优先结合或退火。另外,当核酸序列错配引起靶:阻断物的解链温度降低或大幅降低时,这将导致不太有利的动力学或结合速率-相对于或与阻断物与靶序列结合/退火的动力学或速率相比,允许正向或反向引物优先与靶核酸序列退火。

[0097] “临界温度”或“ T_c ”是指低于参考序列的解链温度“ T_m ”的温度。在一些实施方案中, T_c 低于参考序列和靶序列二者的 T_m ($T_c < T_{ref}$ 或 T_{tgt})。临界温度利用了,在低于 T_m 的温度,双链靶序列和靶-参考序列 (bl:ref) 交叉杂交形成双链的 DNA 双链体以优先于参考/参考同源双链体变性这些异源双链体。当靶序列和参考序列交叉杂交时,沿短(例如, <200bp)的双链 DNA 序列的任何位置的一个或更多个单核苷酸错配的少量序列差异将产生对于该序列的解链温度 (T_m) 的可预测的变化 (Lipsky, R. H., 等人 (2001) Clin Chem, 47, 635-644; Liew, M., 等人 (2004) Clin Chem, 50, 1156-1164)。取决于准确的序列背景和错配的位置,预期解链温度变化 0.1°C -20°C。

[0098] “引物序列”包括 9-30bp、或 10-25bp、或 11-22bp 或 13-16bp 长度的核酸序列。引物序列是合成构建的核酸序列,其退火至靶和参考序列的相对链以在 PCR 反应期间形成扩增产物。靶和参考序列应为至少 25 个碱基以有助于引物附着。引物序列可包含标签或衔接物序列。衔接物是长度可为 15-30bp、或 20-25bp、或 18-23bp 的工程化核酸。引物对可被设计以具有低于反应的 T_{sd} 的 T_m 。如本文所用,“引物对”是指被设计以退火至互补核酸链并从互补核酸链延伸且可长达 45bp 的两条引物序列。

[0099] 如本文所用,“同源性”是指在两种聚合物分子,例如,两个多核苷酸或两个多肽之间的亚单位序列相似性。适合用于确定百分比序列同一性和序列相似性的算法的实例是 BLAST 和 BLAST 2.0 算法,其分别被描述于 Altschul 等人, Nuc. Acids Res. 25:3389-3402(1977) 和 Altschul 等人, J. Mol. Biol. 215:403-410(1990) 中。

[0100] 本公开内容提供了灵敏、容易且廉价的对来自受试者的样品的无细胞核酸中的基因改变的常规临床检测测试。在一些实施方案中,所述测试基于 KRAS 突变体检测。在其他实施方案中,所述测试可用于 BRAF 突变,诸如 BRAF V600E 突变或 EGFR 突变、c-met、MET、HER-2、HER-3、NRAS、PIK3CA 1047、KRAS 161H 以及其他基因突变。在其他实施方案中,基因改变可以是导致靶序列和相应的参考序列之间的差异的取代、插入、缺失或易位。

[0101] 除了本文所描述的特定突变以外,本公开内容提供了所公开的方法对于与野生型序列存在下的疾病或紊乱相关的任何细胞或线粒体突变的用途。在许多实施方案中,所公开的方法可在癌症,包括原发性癌症或已转移的癌症的病例中实施。在其他个例中,这些方法可用于恶性或非恶性肿瘤。

[0102] 癌症的非限制性实例包括,但不限于肾上腺皮质癌、肛门癌、胆管癌、膀胱癌、骨癌、脑或神经系统癌、乳腺癌、宫颈癌、结肠癌、直肠癌、结肠直肠癌、子宫内膜癌、食管癌、尤文家族肿瘤 (Ewing family of tumor)、眼癌、胆囊癌、胃肠道良性肿瘤性癌 (gastrointestinal carcinoid cancer)、胃肠道间质癌 (gastrointestinal stromal cancer)、霍奇金病、肠癌、卡波西肉瘤、肾癌、大肠癌、喉癌、下咽癌、喉和喉咽癌、白血病、急性淋巴细胞性白血病 (ALL)、急性髓性白血病 (AML)、慢性淋巴细胞白血病 (CLL)、慢性骨髓白血病 (CML)、慢性骨髓单核细胞性白血病 (CMML)、非 HCL 淋巴恶性肿瘤 (毛细胞变体、脾边缘区淋巴瘤 (SMZL)、脾弥漫红髓小 B 细胞淋巴瘤 (SDRPSBCL)、慢性淋巴细胞白血病 (CLL)、幼淋巴细胞白血病、低度淋巴瘤、系统性肥大细胞增多症、或脾淋巴瘤 / 不可分类的白血病 (SLLU)、肝癌、肺癌、非小细胞肺癌、小细胞肺癌、肺良性肿瘤、淋巴瘤、皮肤淋巴瘤、恶性间皮瘤、多发性骨髓瘤、鼻腔癌、副鼻窦癌、鼻腔和副鼻窦癌、鼻咽癌、神经母细胞瘤、非霍奇金氏淋巴瘤、口腔癌、口咽癌、口腔和口咽癌、骨肉瘤、卵巢癌、胰腺癌、阴茎癌、垂体瘤、前列腺癌、视网膜母细胞瘤、横纹肌肉瘤、唾液腺癌、肉瘤、成人软组织肉瘤、皮肤癌、基底细胞皮肤癌、鳞状细胞皮肤癌、基底和鳞状细胞皮肤癌、黑色素瘤、葡萄膜黑素瘤、胃癌、小肠癌、睾丸癌、胸腺癌、甲状腺癌、子宫肉瘤、子宫癌、阴道癌、外阴癌、瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症和肾母细胞瘤。

[0103] 非 HCL 淋巴恶性肿瘤的非限制性实例包括,但不限于毛细胞变体 (HCL-v)、脾边缘区淋巴瘤 (SMZL)、脾弥漫红髓小 B 细胞淋巴瘤 (SDRPSBCL)、脾白血病 / 不可分类的淋巴瘤 (SLLU)、慢性淋巴细胞白血病 (CLL)、幼淋巴细胞白血病、低度淋巴瘤、系统性肥大细胞增多症和脾淋巴瘤 / 不可分类的白血病 (SLLU)。

[0104] 如本文所用,“患者”包括哺乳动物。哺乳动物可以是例如,任何哺乳动物,例如,人、灵长类、鸟类、小鼠、大鼠、家禽、狗、猫、奶牛、马、山羊、骆驼、绵羊或猪。在许多个例中,所述哺乳动物是人类。

[0105] 在另外的实施方案中,公所开的方法被用于人类受试者,诸如经历与如本文描述的基因改变相关的疾病或紊乱的疗法或治疗的受试者,或被调查残留疾病或复发的受试者。受试者可以是任何年龄、性别或种族的任何个体。

[0106] 在许多个例中,来自受试者的且包含靶序列的样品是体液。体液的非限制性实例包括,但不限于,外周血、血清、血浆、尿液、痰、唾液、胰液、脑脊液、泪液、粘液、精液、淋巴液、羊水和脊髓液。本公开内容表明,可实现靶序列的大量 (100X-11000X 倍) 富集,从而允许可检测下至包含非靶核酸背景的生物样品中的单拷贝突变序列 (例如 EGFR 缺失、EGFR T790M、KRAS 单碱基取代)。本公开内容还表明,大规模并行测序可能是监测尿液 cfDNA 中 KRAS 基因的突变状态的有效工具。该测定是选择性的并且对于 KRAS 密码子 12 和 13 中的所有七个 KRAS 突变是高度特异性的。结果表明,可在其肿瘤组织包含 KRAS 突变的 9 个患者中的 8 个的尿液中检测到突变的 KRAS。在 8 个可检测的肿瘤样品中的 4 个中,所谓的核苷酸差异可突出这些样品的患者肿瘤异质性的差异。使用大规模并行 DNA 测序检测来自尿

液的无细胞 DNA 中的突变非侵入性地监测了患者对分子靶向疗法的应答、不应答和抗性机制的出现。

[0107] 如本文所用,术语“样品”是指可包含分析物的任何样品,对于该样品的分析物测定是期望的。在许多个例中,分析物是无细胞 (cf) 核酸分子,诸如编码完整的 BRAF 或其一部分的 DNA 或 cDNA 分子。术语“样品”包括核酸 (基因组 DNA、cDNA、RNA、mRNA) 样品。所述样品可以是生物样品,诸如生物流体或生物组织。生物流体的实例包括尿液、血液、血浆、血清、唾液、胰液、精液、粪便、痰、脑脊液、泪液、粘液、羊水等。生物组织是细胞,通常是特定类型的细胞与其细胞间物质的聚集物,所述聚集物形成人、动物、植物、细菌、真菌或病毒的一种结构化的物质,包括结缔组织、上皮组织、肌肉组织和神经组织。生物组织的实例还包括器官、肿瘤、淋巴结、动脉和单个的细胞。“样品”还包括体外细胞培养成分的样品、天然分离物 (诸如饮用水、海水、固体材料)、微生物样本或已“掺入”核酸示踪分子的样本。

[0108] 本发明的核酸序列可从基因组 DNA 扩增。基因组 DNA 可根据以下方法或替代方法从组织或细胞中分离。这些方法是本领域熟知的。可选择地,本发明的核酸序列可通过本领域熟知的方法从血液或另一种流体中分离。

[0109] 在一些实施方案中,所公开的富集方法被用于测定包含参考序列的样品中靶序列的量的方法的一部分。该富集方法还可与用于评估一个或更多个富集后突变的检测方法组合。该方法可包括进行公开的富集方法之后的另外的评估或检测方法,作为非限制性实例,诸如对来自受试者的样品和一个或更多个具有已知量的靶序列的对照样品测序或大规模并行序列以测量靶序列的量;然后通过样品中靶序列的一个或更多个已知样品的测量值比较计算靶序列和一个或更多个对照样品的量。所公开的方法可还包括使用选自以下的一种或更多种方法分析具有富集的靶序列的反应混合物: MALDI-TOF、HR-Melting、双脱氧测序、单分子测序、焦磷酸测序、第二代高通量测序、SSCP、RFLP、dHPLC、CCM、数字 PCR 和定量 PCR。这些分析技术可用于按照本文描述的检测合成的核酸内的特定靶 (突变体) 序列。在一些个例中,样品是尿,且靶序列是 cfDNA。

[0110] 对于本文描述的任何方法,本领域技术人员可确定对任何突变序列的 PCR 扩增有用的引物。在一些实施方案中,例如,如美国专利申请公布 US/2010/0068711 中描述的,PCR 扩增小于约 50 个核苷酸的序列。在其他实施方案中,例如,如美国专利 8,623,603 或美国临时专利申请号 62/039,905 中描述的,使用抑制野生型形式的基因扩增的阻断寡核苷酸进行 PCR。在一些实施方案中,如本领域已知的,一条或更多条引物包含外源序列或异源序列 (诸如衔接物或“标签”序列),使得所得的扩增分子具有非天然存在的序列。

[0111] 所公开的引物对是两条寡核苷酸引物,其中每条寡核苷酸引物在其 3' 末端包含与双链体靶序列的一条链互补的序列。另外,寡核苷酸引物中的一条或两条均在其 5' 末端包含靶序列中不存在的异源序列。所述异源序列可以是人工的、合成的、人造的、或来自对靶序列来讲是外源的来源。使用该引物的结果将靶序列转化为嵌合分子,所述嵌合分子是人工的并且是进行所公开的合成核酸分子的结果。引物可以是多达 45bp 或约 9-30、10-25、11-22 或 13-16bp 的长度。引物可包含衔接物序列。衔接物序列可以是约 15-30bp、20-25bp 或 18-23bp 的长度。

[0112] 在一个实施方案中,所描述的方法还可作为允许定量所检测的靶 (突变) 序列的定量测定进行。所述定量提供了基于来自评估的输出信号 (任选地作为百分比) 确定富集

之前计算的靶序列的输入百分比的手段。这可通过参照如图 12 中所示的那些拟合曲线的拟合曲线进行。结合包含已知量的靶序列 DNA 的一个或更多个对照反应来确定来自测试样品的评估的实际输出。来自测试样品和对照的输出与拟合曲线比较以内插或外推对测试样品计算的输入。这允许基于富集后检测定量测定富集前靶序列在样品中的量。

[0113] 对于 cf 核酸中基因改变（突变）的存在的检测限值可通过来自一个或更多个阴性对照（例如，来自健康对照受试者或已验证的细胞系）和多个患者样品的评估数据来确定。任选地，这些极限可部分地基于最小化假阴性的百分比作为来确定，最小化假阴性的百分比比最小化假阳性的百分比更重要。一组非限制性的针对 BRAF V600E 的阈值被定义为，对于无突变体存在或仅存在野生型的确定，cf 核酸样品中的突变小于约 0.05%；约 0.05% 至约 0.107% 的范围作为“分界线”，且大于约 0.107% 作为检测到突变。在其他实施方案中，针对未检测到突变的指定阈值被设定为相对于相应的野生型序列的突变的检测小于约 0.1%、小于约 0.15%、小于约 0.2%、小于约 0.3%、小于约 0.4%、小于约 0.5%、小于约 0.6%、小于约 0.7%、小于约 0.8%、小于约 0.9%、或小于约 1%。对于 KRAS 外显子 2 突变测定的一组非限制性阈值被定义为，对于突变的定量测定，小于 1 个拷贝的突变。

[0114] 已有的 PCR 富集方法

[0115] 已有的基于 PCR 的富集低丰度靶序列方法（例如，完整 COLD-PCR 或快速 COLD-PCR）采用标准扩增方案，并仅基于双链参考序列和双链靶序列之间的解链温度的理论差异。例如，在 Molloy 等人，国际申请公开号 WO/03/072809, Melting Temperature Dependent DNA Amplification 中，他们发现核酸的选择性扩增可通过改变变性温度来实现。该方法通过循环应用等同靶温度或高于靶温度但低于参考温度的变性温度优先扩增具有比参考序列的变性温度低的变性温度的序列（通常是突变序列）。在另一个实例中，例如，在 Makrigiorgos 等人的国际申请号 PCT/US2008/009248, 现为美国系列号 12/671, 295, FULL COLD-PCR 中，在被选择为“远高于”参考序列和靶序列的 T_m 的第一次变性后，反应混合物被冷却超过 8 分钟的时间，然后被孵育在“被选择为低于双链参考序列的解链温度但高于参考-靶异源双链体的较低解链温度的”临界变性温度 (T_c) 下（参见，发明描述）。关于快速 COLD-PCR，反应混合物未经历在高于参考序列的 T_m （例如，94°C）的温度下的第一次变性，而是相反，被孵育在临界变性温度（例如， $T_c = 83.5^\circ\text{C}$ ）下，临界变性温度被选择为 (a) 低于双链参考序列的解链温度但高于双链靶序列的较低的解链温度；或 (b) 低于参考序列和靶序列二者的 T_m ，同时仍产生参考序列和靶序列的变性程度之间的差异（参见，发明描述）。完整 COLD-PCR 被 Makrigiorgos 等人描述为“无效的”和“耗时的”，而快速 COLD-PCR 不能检测“具有等于或高于”野生型序列的 T_m 的突变体序列（参见，US20140106362, 发明背景）。在 Makrigiorgos 等人的美国专利号 8623603 和 US20140106362 中，（“Full cold-PCR enrichment with reference blocking sequence”）尝试解决完整 COLD-PCR 和快速 COLD-PCR 的问题，包括在反应混合物中使用“过量的参考阻断序列”以提高效率并减少循环时间。对于所有已有的富集方法，因为靶序列的解链温度 (T_m) 一定低于参考序列的解链温度 (T_m)，这些方法仅允许检测具有低于野生型 T_m 的 T_m 的那些突变序列。因此，这些已有的方法受限于这一条件：双链靶序列的 T_m 低于双链参考序列的 T_m 。即使在完整 cold PCR（其中异源双链体被特别地形成以产生将具有低于 WT:WT 同源双链体分子的 T_m 的 T_m 的双链分子）中，这也是事实。在本方法中，因为阻断物：参考序列可以是三种类型中的任何

一种（高于、低于或等于所述 T_m ），我们的方法是有效的，不依赖 PCR 产物的解链温度。利用阻断物和参考链或阻断物和靶链之间的短扩增子的结合动力学的有利的方面、不依赖已有方法的方面，富集变得不依赖解链温度。

[0116] 本公开内容提供了允许检测较大范围的靶序列且不限于只鉴定具有低于参考序列的解链温度的解链温度的那些靶序列的方法。

[0117] 本方法允许显著更多地富集（700X-1000X）样品，且特别是包含片段化的 DNA 和 / 或包含大多数的野生型或非靶序列的样品内的低丰度核酸序列。例如，高背景（例如，10,000 或更大）野生型分子中的单拷贝突变。在进行该方法后，靶分子对参考分子的比变得显著增加。

[0118] 速差动力学阻断物 (Fast/Differential Kinetic blocker)

[0119] 本文提供的方法采用多组利用特别设计的参考阻断物序列和引物序列的扩增循环。阻断物序列是具有与所选择的原始或野生型核苷酸序列的互补性的短核苷酸序列。任选地，所述短阻断物包括从业者预先决定或期望的 LNA。短阻断物序列可与正向链或反向链互补，优选地是基于此处和下文提供的设计方法预选的。如果期望的话，可存在阻断物序列与同链引物的重叠。

[0120] 本文描述的方法包括一组以上的扩增循环。一组扩增循环可包括 2 个或更多个扩增循环、3 个或更多个扩增循环、合适地 5 个或更多个扩增循环、合适地 7 个或更多个扩增循环、合适地 10 个或更多个扩增循环。一组扩增循环可包括 2-30 个循环、4-25 个循环、5-20 个循环、或 40 个或更多个循环。

[0121] 有了本文描述的速差动力学阻断方法 (fast or differential kinetic blocker method)，核酸样品中的靶序列和参考序列在被纳入所述方法之前可以通过预扩增方法诸如 PCR 扩增，但不是必需的。PCR 可通过使用高于参考序列的解链温度以使得参考序列和靶序列均被扩增的第一变性温度完成。还可使用包括过量阻断物的反应混合物。过量阻断物有助于阻止链结合，并进一步驱动选择性扩增过程。

[0122] 还可在采用本文描述的方法之后使用 PCR 以在富集程序后进一步扩增的样品中的核酸。本文描述的方法之后还可使用突变检测方法分析扩增反应混合物。本领域技术人员将理解，许多方法可用于分析样品的特定（即靶）核酸。这样的方法包括，但不限于，MALDI-TOF、HR-Melting、双脱氧测序、单分子测序、焦磷酸测序、第二代高通量测序、SSCP、RFLP、dHPLC、CCM、数字 PCR 和定量 -PCR。这些方法可用于检测代表参考序列的突变等位基因的、包括一个或更多个核苷酸的缺失、插入或改变的靶序列。

[0123] 本文描述的方法可在定量或实时 PCR 设备中进行。反应混合物可包含核酸检测试剂，诸如核酸检测染料（例如，SYBR Green）或标记的探针（例如，TaqMan 探针或标记有荧光标志物的其他寡核苷酸）。本文描述的方法还可用于富集两种或更多种不同的靶序列，且靶序列可以是可用相同引物对或用不同的引物对扩增的。这样的反应可包括多于一种核酸检测试剂。

[0124] 本领域技术人员将理解，对于不同的方案、条件以及从业者的目的，本文展示或提供的任何方法可以并且应当被优化。

[0125] 本公开内容的一部分还提供了用于进行所公开的方法的试剂盒。被包含在试剂盒中的多种化学试剂的实例是：被包装在合适的容器中的用于扩增靶核酸的一种或更多种靶

序列引物寡核苷酸、一种或更多种阻断物寡核苷酸、DNA 聚合酶、用于核酸扩增反应的缓冲溶液和对照试剂（例如，标准浓度的阳性和 / 或阴性对照靶核酸和阳性和 / 或阴性对照野生型或参考核酸）和 / 或使用试剂盒检测并任选地定量一种或更多种低丰度靶核酸的说明书。试剂盒还可包含多种化学试剂或器械，以及包括可与染料、标签、荧光标记或其他此类标志物反应的溶液和 / 或底物的检测单元；包含与核酸结合的染料的溶液。

[0126] 本发明的方法和试剂可方便地以试剂盒形式包装。这样的试剂盒可用于如本文所述的多种研究和诊断应用中。

[0127] 本领域技术人员可参考常规的参考文献的文本以获得对本文讨论的已知技术或等效技术的详细描述。这些文本包括 Ausubel 等人, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley 和 Sons, Inc(2005); Sambrook 等人, Molecular Cloning, A Laboratory Manual(第3版), Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York(2000); Coligan 等人, Current Protocols in Immunology, John Wiley&Sons, N.Y.; Enna 等人, Current Protocols in Pharmacology, John Wiley&Sons, N.Y.; Fingl 等人, The Pharmacological Basis of Therapeutics(1975), Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing 公司, Easton, PA, 第18版(1990)。当然, 这些文本还可在进行或使用本公开内容的方面时被参考。

[0128] 优选的实施方案被描述在以下的实施例中。通过考虑本文公开的说明书或本发明的实践, 落在本文的权利要求书的范围内的其他实施方案对于本领域技术人员将是明显的。本公开内容的其他特征和优势也将通过不同的实施例而变得明显。所提供的实施例展示了用于实践本公开内容的不同组分和方法。期望的是, 说明书连同实施例仅被认为是示例性的。本发明的技术范围并不限于这些实施例。

实施例

[0129] 实施例 1

[0130] 图 1 中提供了两步骤 PCR 富集测定 (EGFR 外显子 19 缺失) 的实例。在该测定中, 选择性变性步骤在退火步骤之前。当反应缓降至 62.4°C 的退火温度时, 先前的 PCR 循环中生成的任何互补的野生型链在引物退火之前结合阻断物。然后引物退火至互补的突变链并由于序列重叠而禁止任何阻断物结合该突变链的可能性。(对于大多数缺失, 任何阻断物结合突变体的可能性极低, 因为实际上存在极少的共同序列)。在该示例性测定中, 在预选的退火步骤 (62.4°C) 处, 阻断物: 靶和参考 (wt): 靶异源双链体的形成可能是非常低的 (低于可检测或可计算的水平), 因为仅较小百分比会是互补的。

[0131] 表 1

[0132] 缺失 - 特异性循环条件 (DSCC-3)

[0133]

步骤	温度	时间
	盖子 98°C	
第1阶段 (32个循环)	85.5°C	15s
	62.4°C	20s
	12°C	保持

[0134] 表 2

[0135]

第一轮ASCC循环条件			
阶段	步骤	温度	时间
初始变性	变性模板DNA	98℃	2 min
第1阶段 (5个循环)	变性DNA	98℃	10秒
	退火引物/延伸	60℃	20秒
第2阶段(30个循环)	变性DNA	98℃	10秒
	退火blk-wt、blk-mt; 引物保持未结合	70℃	30秒
	变性blk-wt、blk-mt	T _c	15秒
	退火wt-阻断物、引物、mt/阻断物、延伸	60℃	20秒

[0136] 表 3

[0137]

单独的MT c.2235_2249del15的通过输入富集的倍数和WT背景水平				
	10 ng背景	60 ng背景	180 ng背景	360 ng背景
10拷贝输入	8997	7826	3428	1878

[0138]

5拷贝输入	14172	5298	3838	1544
3拷贝输入	9056	11107	2424	2231

[0139] 表 4

[0140]

单突变的富集倍数	
输入	c2235_2249del15
500	687
100	1105
20	1047
10	945
3	722
1	1293

[0141] 表 5

[0142]

汇集的突变序列的富集倍数				
输入	c2235_2249	c2236_2250	c2240_2257	c2233_2247
500	472	525	350	406
100	863	1371	899	1187
20	1053	1189	701	1089
10	918	1318	456	749
3	1071	661	543	1423
1	567	232	353	1289

[0143] 实施例 2

[0144] 图 2 中提供了四步骤 PCR 富集测定 (EGFR 外显子 20T790M) 的示意性实例。在该测

定中, 98℃变性步骤确保所有双链体变性。在第二(任选的)步骤(70℃)期间, 形成阻断物-野生型双链体, 但形成很少的阻断物-突变体双链体(因为70℃高于阻断物-突变体的 T_m)。在步骤3-选择性变性处, 许多阻断物-野生型(连同可能存在的任何阻断物-突变体双链体)将变性。正如在两步骤PCR(实施例1)中一样, 当反应缓降至64.0℃的退火温度时, 互补的野生型链在引物退火之前被过量的阻断物结合。然后, 所述引物退火至互补的突变链并禁止阻断物结合该突变链的可能性。短的扩增子长度允许延伸, 而不需要另外的延长步骤。

[0145] EGFR T790M_T 的富集水平被提供在以下表6中。

[0146] 表6

[0147]

输入	EGFR T790M_T 的富集倍数
5	4714
50	1691
100	980

[0148] 实施例3

[0149] 图3提供了针对KRAS外显子2单碱基取代的四步骤PCR富集测定的实例。除了选择性变性步骤被选择为低于野生型-阻断物的 T_m 以外, 该测定以与实施例2相似的方式进行。阻断物-野生型 T_m 、引物-模板 T_m 和阻断物-突变体 T_m 之间的温度差异比实施例2中大的多, 导致更有效的富集。

[0150] 以上实施例展现了基于动力学设计的引物和阻断物序列(基于各种反应组分之间的关系)对于大量富集参考核酸背景中的低丰度靶序列的应用。

[0151] 实施例4

[0152] 基于动力学设计的阻断物和引物序列

[0153] 图4提供了通过图说明并展示对于阻断物-野生型模板($T_m = 80^\circ\text{C}$)、阻断物-突变体模板($T_m = 64^\circ\text{C}$)和引物-模板双链体($T_m = 69^\circ\text{C}$)的简化的解链温度曲线的示意图。所提供的曲线虽使用KRAS测定来说明-但原理是通用的。每个寡核苷酸具有大致S形(logistic)的解链温度曲线, 寡核苷酸的 T_m (在测定条件下)是平均50%的分子是单链, 而50%与其模板结合作为双链形成的温度。该过程是动态的, 因为每个分子在该温度下不断解链和再退火。可以看出, 在选择性变性温度下, 几乎100%的引物和阻断物-突变体模板双链体解离, 而约18%的阻断物-野生型双链体可保持完整。相反地, 等到温度缓降至69℃的引物 T_m 时, 几乎所有的野生型分子会结合阻断物, 而几乎所有的突变体分子将保持单链。由于在阻断物和与所述阻断物结合相同链的引物之间存在序列重叠, 所述引物将被极大地阻止与野生型结合。类似地, 等到温度缓降至64℃的阻断物-突变体模板的 T_m 时, 几乎所有的突变体序列将已经结合引物, 且因此相对地, 极少的阻断物能够结合突变体, 虽然60℃的“退火”温度低于阻断物-突变体模板的 T_m 。这些曲线是极为简单的, 因为其代表的是各种温度下的“平衡”的条件。解链和退火的动力学可能需要短的时间段(短至几秒钟), 以达到平衡, 且因此, 这些温度曲线实际上会表现出一定的滞后。

[0154] 当应用动力学考虑因素时,优选的预选引物的解链温度被设计以包括:

[0155] a) 低于阻断物 -wt 产物的解链温度;

[0156] b) 高于阻断物 - 突变体产物的解链温度;

[0157] c) 阻断物可与一条引物或两条引物重叠;

[0158] d) 阻断物不必具有与引物的重叠;和/或

[0159] d) 经验性获得的选择性变性 (Tsd) 可高于 (例如, EGFRdel 和 EGFR T790) 或低于 (例如, KRAS) 阻断物 -wt 产物的解链温度,但通常会高于允许引物退火至完全互补序列的温度。

[0160] 图 5 提供了说明当反应温度接近 78.9°C 的选择性变性温度时,结合靶序列的阻断物 (例如,具有 76°C 的 T_m 的野生型阻断物) 的百分比如何随时间变化的图。

[0161] 实施例 3

[0162] 单拷贝测定灵敏性的验证

[0163] 图 6 提供了正态分布直方图和泊松概率表。右边的表是泊松概率分布表。表的列是在不连续的区间内观察到的事件的数目。行是每个区间的事件平均数 (每区间 0.13 件事件、每区间 0.25 件事件,等)。表中的每个格是在单一区间内预期的事件平均数 (行) 一定时,观察到一定数目的事件 (列) 的概率。例如,关于癌症突变检测试验,如果我们预期每毫升 (区间) 检测到 2 个突变 DNA 链,则一毫升将具有 14% 的根本不包含突变 DNA 的几率。

[0164] 图 7 在来自包含 KRAS G12D 突变的癌症患者的生物流体样品中检测到曲线拟合和所述患者的计算的输入突变水平。富集的参考数据的原始数据绘图显示了最佳拟合至双曲线 (还称为饱和结合曲线或剂量响应曲线),显示出低水平突变物质的强烈的非线性富集。以总 DNA 的 0.2%、0.05%、0.01% 和 0.0% 的突变体 DNA 输入分别以总序列读段的百分比返回观察到的 18.25%、4.45%、1.84% 和 0.54% 的检测水平。

[0165] 实施例 4

[0166] RAS 测定的单拷贝灵敏性

[0167] 图 7 展示了验证靶 KRAS G12A 的单拷贝灵敏性的测定的理论和实验分布结果的一个实例。左边被分成 14 个描绘分布的子图。上面的一排分布示出了在每种分布上方标注的平均掺入式拷贝输入一定时,对于 20 次测量的理论预期。下面一排示出了实际的实验结果。每个子图的 x 轴是通过测定检测到的突变体序列读段 (对数标度 (log scale)) 的数目。每个子图的 y 轴是数据点沿 x 轴的密度测量,点越是密集在一起,密度越高。密度曲线下的面积是 1。由密度曲线表示的点的双峰分布提供了检测到的 (MT) 和未检测到的 (WT) 样品之间的直观切割点 (intuitive cutpoint) (蓝线)。每个子图中的数字指示 (20 个) 样品中被检测到的 (切割点右侧) 和未检测到的 (切割点左侧) 样品的数目。

[0168] 实施例 5

[0169] 在高的野生型 DNA 序列背景中检测 KRAS 突变

[0170] 图 8 提供了测定的结果,其中在用于反应样品中含 60ng 和 360ng 起始总核酸的背景水平下检测突变。在 60ng (17,400 个拷贝) 野生型基因组 DNA 或 360ng (104,400 个拷贝) 野生型基因组 DNA 的背景中检测 7 种突变体拷贝。该图被分为 7 个子图,每个子图示出了通过测定检测到的七种 KRAS 突变 (G12A、G12C、G12D、G12R、G12S、G12V、G13D) 中的一

种的结果。每个子图的 x 轴列出了所测试的三种样品类型：7 种突变体拷贝在 17,400 个野生型背景中、7 种突变体拷贝在 104,400 个野生型 DNA 背景中和单独的野生型 (17,400 个拷贝)。每个子图的 y 轴是通过测定检测到的突变体序列读段的数目 (对数标度)。

[0171] 实施例 6

[0172] 富集 PCR 与通过液滴数字 PCR 的突变检测的整合

[0173] 图 9 示出了用于与液滴数字 PCR (RainDance, Billerica, MA) 整合的 BRAF V600E 突变检测测定设计。第一步包括用 BRAF V600E 位点两侧的两条引物的预扩增, 其中两条引物均包含不互补的、与第二轮引物杂交的 5' 标签。互补阻断寡核苷酸抑制 wt BRAF 扩增, 在预扩增步骤中实现突变体 BRAF V600E 序列的富集。第二步需要分别使用 FAM (V600E BRAF) 和 VIC (wt BRAF) TaqMan 探针的双重 ddPCR 反应, 以使得能够差异化定量突变体与野生型。RainDrop ddPCR 仪 (RainDance ;Billerica, MA) 被用于 PCR 液滴分离、荧光读取和计数包含突变序列、wt 序列或未反应的探针的液滴。

[0174] 实施例 7

[0175] 与下一代测序的整合

[0176] 图 10 中提供了该方法与通过下一代测序方法的靶序列进一步检测的联合使用。

[0177] 图 10- 检测密码子 12 和 13 中的 KRAS 基因突变的超短测定 (ultra-short assay) 的设计。测定利用 31bp 的足迹, 包含特异性富集突变的 DNA 片段的预扩增步骤, 并检测外显子 2 区域中的至少 7 种不同的 KRAS 突变。野生型序列阻断物和突变特异性扩增提供了对突变的基因座的增加的特异性和富集。

[0178] 实施例 8

[0179] 图 11- 使用 MAD 得分确立检测截点 (cutoff)。垂直的虚线表示 2σ 的 z 得分截点。在健康对照 (灰色) 与来自结肠癌患者 (h.) 的突变检测结果中观察到的 KRAS G12V 靶 / 非靶比的 z 得分密度分布, 正向读段 (金色点) 和反向读段 (蓝色点)。

[0180] 图 12 提供了允许定量输入拷贝数目的方法的测定的结果。产生了对于每种突变从 5 个至 500 个输入突变体拷贝的不同水平的标准曲线。未知样品和标准样品均用相同方法富集。伴随测序, 大于截点值的突变体读段计数被绘制在其各自的标准曲线上以计算输入拷贝数。基于绘制到感兴趣的突变的标准曲线上, 计算未知样品的拷贝数输入。从左至右的图示出了放大至左侧 3000 个突变和右侧 30 个突变的相同数据, 在较低输入水平下显示优良的线性度。当突变体拷贝下降时, 曲线线性化并收紧以提供低突变负载下的更好的定量。

[0181] 实施例 9

[0182] 检测癌症患者中的 KRAS G12S

[0183] 图 13 示出了来自 Erdheim Chester Patient 癌症患者的液体样品中的 KRAS G12S 突变 DNA 的检测。在若干时间点从单个 Erdheim Chester 患者收集尿液和血液: 2013 年 11 月 13 (尿液和血液)、2014 年 4 月 22 (尿液) 和 2014 年 4 月 30 (血液)。在具有 20 个野生型标准对照 (STD_WT) 和 3 个非模板对照 (STD_NTC) 的同一运行中对提取自所有样品的 DNA 进行 KRAS 测定。y 轴是通过测定检测到的突变序列读段的数目 (对数标度)。

[0184] 实施例 11

[0185] 下文通过以下表 5 中列出的示例性靶特异性引物、表 6 中列出的示例性阻断物序

列、表 7 中列出的用于 EGFR 858 靶序列的靶特异性引物、和表 8 中列出的 EGFR T790M 的引物序列提供了该方法对于设计具有预选的解链温度的阻断物序列和引物序列的应用。

[0186] 表 5

[0187]

靶特异性引物						
正向引物						
	靶序列	靶-特异序列(正向)	寡核苷酸序列	标签名称	靶名称	寡核苷酸名称
1	ACACTGACG A-CATGGTTCT ACA	ACTGTCCAGC T-TTGTGCC	ACACTGACGAC A-TGGTTCTACA ACT-GTCCAGCT TTGTGCC	CS1	TP53	CS1-TP53-1-for
2	ACACTGACG	GATCATCATAG	ACACTGACGAC	CS1	TP53	CS1-TP53-2-for

[0188]

	A-CATGGTTCT AC-A	-GAGTTGCATT G-TTG	A-TGGTTCTACA GAT-CATCATAG GAGT-TGCATTG TTG			
反向引物						
	靶序列	靶-特异序列(正向)	寡核苷酸序列	标签名称	靶名称	寡核苷酸名称
1	TACGGTAGCA -GAGACTTGG T-CT	TCCTCTGCCT A-GGCGTT	TACGGTAGCAG A-GACTTGGTCT TCC-TCTGCCTA GGCGT-T	CS2	TP53	CS2-TP53-1-rev
2	TACGGTAGCA -GAGACTTGG T-CT	GAAATGTAAA T-GTGGAGCC AA-ACA	TACGGTAGCAG A-GACTTGGTCT GA-AATGTAAAT GTG-GAGCCAA ACA	CS2	TP53	CS2-TP53-2-rev

[0189] 表 6

[0190]

阻断物序列				
阻断物名称		序列	Exiqon Tm	
EGFRdel 阻断物 1		C3-CGGCCTCTTCATGC-C3	68C	
EGFRdel 阻断物 2		C3-CGGCCTCTTCATGC-PO4	72C	
EGFR L858 阻断物 1		C3-GATTTTGGGCTGGCC-C3	69C	
EGFR L858 阻断物 2		C3-TTTTGGGCTGGCCA-C3	71C	
EGFR T790 阻断物 1		C3-GCAGCTCATCACGC-C3	70C	
PIK3CA 545-6 阻断物 1		C3-AATCACTGAGCAGGA-C3	68C	
PIK3CA 1047 阻断物 1		C3-CCAGCCACCATGAT-C3	69C	
EGFR L858 阻断物 3		C3-GATTTTGGGCTGGCCAA-C3	72C	
其 他 (FL1 FL2)				
名称	寡核苷酸名称	序列(5'-3')		
FL1	CS1	ACACTGACGACATGGTTCT ACA	69C	
	CS2	TACGGTAGCAGAGACTTGG TCT	71C	
FL2	CS1rc	TGTAGAACCATGTCGTCAG TGT	69C	
	CS2rc	AGACCAAGTCTCTGCTACC	71C	

[0191]

		GTA		
除非指明, 所有 w/C3 间隔区在 5' 和 3' 末端				
HBV 1762				
HBV 1762 WT blk1		AGGTTAAAGGTCT	65	A{G}GT{T}{A}{A}{A}G{G}T{C}T
HBV 1762 WT blk2		AGGTTAAAGGTCT	65	AG{G}{T}{T}{A}{A}{A}G{G}{T}CT
HBV 1762 WT blk3		ACAAAGACCTTTAACC	68	A{C}{A}{A}{A}{G}{A}{C}{C}{T}TTAACC
HBV 1762 WT blk4		GTACAAAGACCTTTAACC	68	G{T}{A}{C}{A}{A}{A}{G}{A}{C}{C}{T}TTAACC
HBV 1762 WT blk5		GTACAAAGACCTTTAAC	68	G{T}A{C}AA{A}{G}A{C}{C}{T}T{T}AAC
HBV 1762 WT blk5	Metabion	ZNA4-A(pdC)AAAGA(pdC)(pdC)TTTAA(pdC)(pdC)-PO4	69.4 (MB)	无 5' 间隔区; 3' 磷酸酯
EGFR T790M				
EGFR T790M WT blk1		CATCACGCAGCTC	70	/5SpC3/CATCACGCAGCTC/3SpC3/ 指示 LNA, 下划线指示 T790M 突变
EGFR T790M WT blk2		TCATCACGCAGCT	69	
EGFR T790M WT blk3		TCATCACGCAGC	69	
EGFR T790M WT blk4		AGCTGCGTGATG	69	
EGFR T790M WT blk5		CTGCGTGATGAG	70	
EGFR T790M WT blk6		CTCATCACGCAGCT	80	
EGFR T790M WT blk7		CTCATCACGCAGCTC	79	/5SpC3/CTCATCACGCAGCTC/3SpC3/
EGFR T790M WT blk8		GAGCTGCGTGATGAG	81	/5SpC3/GAGCTGCGTGATGAG/3SpC3/
EGFR T790M WT blk9		GAGCTGCGTGATGA	81	/5SpC3/GAGCTGCGTGATGA/3SpC3/
EGFR T790M WT blk10	RS	GCA TGAGCTGCgTGATG	85	/5SpC3/GCATGAGCTGCgTGATG/3SpC3/
EGFR T790M WT blk11	FS	GCTCATCACGCAGCTC	87	/5SpC3/GCTCATCACGCAGCTC/3SpC3/
EGFR T790M WT blk12	FS	GTGCAGCTCATCACGCAGCTC	87	/5SpC3/GTGCAGCTCATCACGCAGCTC/3SpC3/
BRAF WT F blk 5				
BRAF WT F blk 5		GGTCTAGCTACAGTGAAA	79	/5SpC3/GGTCTAGCTACAGTGAAA/3SpC3/
BRAF WT R blk 7		CCATCGAGATTTCACTGT	81	/5SpC3/CCATCGAGATTTCACTGT/3SpC3/
EGFR L858 阻断物 4				
EGFR L858 阻断物 4		TTTTGGGCTGGCC	77	/5SpC3/TTTTGGGCTGGCC/3SpC3/
EGFR L858 阻断物 5		TTTTGGGCTGGCCA	79	/5SpC3/TTTTGGGCTGGCCA/3SpC3/
EGFR L858 阻断物 5		AGTTTGGCCAGCC	77	/5SpC3/AGTTTGGCCAGCC

[0192]

断物 6(rc)				GCC/3SpC3/
EGFR L858R 阻 断物 7(rc)		CAGTTTGGCCAGCCCA	79	/5SpC3/CAGTTTGGCC AGCCCA/3SpC3/
KRAS-Q61-BL K1		ctcCTCttgacctg	77	/5SpC3/ctcCTCttgacctg/3 SpC3/

[0193] 表 7

[0194]

EGFR 858		
引物	寡核苷酸名称	寡核苷酸序列
FP1	CS1-EGFR L858-6-for	ACACTGACGACATGGTTCTACACACAGATTTT GGGC
FP2	CS1-EGFR L858 FP2-12-for	ACACTGACGACATGGTTCTACACACAGATTTT GGGC
FP3	CS1-EGFR L858 FP3-13-for	ACACTGACGACATGGTTCTACATCACAGATTTT GGGC
FP4	CS1-EGFR-L858R-FP4-55-for	ACACTGACGACATGGTTCTACAGATCACAGAT TTTGGGC
FP5	CS1-EGFR-L858R-FP5-56-for	ACACTGACGACATGGTTCTACAAGATCACAGA TTTTGGG
FP6	CS1-EGFR-L858R-FP6-57-for	ACACTGACGACATGGTTCTACAAGATCACAGA TTTTGG
FP6b	EGFR-L858-FP6-81-F	ACACTGACGACATGGTTCTACAAGATCACAGA TTTIG
FP7	EGFR-L858-FP7-82-F	ACACTGACGACATGGTTCTACAGATCACAGAT TTTGG
FP8	EGFR-L858-FP8-83-F	ACACTGACGACATGGTTCTACAGTCAAGATCA CAGATTTT
FP9	CS1-EGFR-L858R-FP9-84-for	ACACTGACGACATGGTTCTACAGTCAAGATCA CAGATTTT
FP10	CS1-EGFR-L858R-FP10-85-for	ACACTGACGACATGGTTCTACATCAAGATCAC AGATTTT
RP1	EGFR-L858	TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTCGCACCCAGC AGTT
RP2	EGFR L858 RP2	TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTCGCACCCAGC AGT
RP3	EGFR L858 RP3	TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTGCACCCAGCA GTT
RP4	EGFR L858 RP4	TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTCGCACCCAGC AGT
RP5	EGFR-L858R-RP7	TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTCCGCACCCAG CAG
RP6	EGFR-L858R-RP8	TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTTCCGCACCC AGC
Blk1	EGFR L858 阻断物 1	C3-GATTTTGGGCTGGCC-C3
Blk2	EGFR L858 阻断物 2	C3-TTTTGGGCTGGCCA-C3
Blk3	EGFR L858 阻断物 3	C3-GATTTTGGGCTGGCCAA-C3
Blk4	EGFR L858 阻断物 4	/5SpC3/TTTTGGGCTGGCC/3SpC3/
Blk5	EGFR L858 阻断物 5	/5SpC3/TTTTGGGCTGGCCA/3SpC3/
Blk6	EGFR L858 阻断物 6(rc)	/5SpC3/AGTTTGGCCAGCC/3SpC3/
Blk7	EGFR L858 阻断物 7(rc)	/5SpC3/CAGTTTGGCCAGCCCA/3SpC3/
Blk8	EGFR-L858-Blk8-rc	/5SpC3/AGTTTGGCCaGCCCC/3SpC3/
Blk9	EGFR-L858-Blk9-rc	/5SpC3/AGTTTGGCCaGCCCC/3SpC3/

[0195]

Blk10	EGFR-L858-Blk10	/5SpC3/CAGTTTGGCCaGCCCC/3SpC3/
Blk11	EGFR-L858-Blk11	/5SpC3/TTTGGGCTGGCCAAA/3SpC3/
Blk12	EGFR-L858-Blk12	/5SpC3/ATTTTGGGCTGGCCA/3SpC3/
Blk13	EGFR-L858-Blk13	/5SpC3/GATTTTGGGCTGGCCA/3SpC3/

[0196] 表 8

[0197] EGFR T790M

[0198]

rs121434569 [智人(Homo sapiens)]		
tctgcctcacctCCACCGTGCAGCTCATCA C/T GCAGCTCATGCCCTtcggctgcctcctgga		
*787 G2361A		
	订购(EGT)	
CS1-EGFR T790M-For2-for	ACACTGACGACATGGTTCTACACCACCGTGCAGCTC	
CS2-EGFR T790M-Rev2-rev	TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTAGGGCATGAGCTGC	
CS1-EGFR T790M-For3-for	ACACTGACGACATGGTTCTACAACCTCCACCGTGCA	
CS2-EGFR T790M-Rev3-rev	TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTCGAAGGGCATGAGCTGC	
CS1-EGFR T790M-For4-for	ACACTGACGACATGGTTCTACACCACCGTGCAACTC	
CS1-EGFR T790M-Rev4-rev	TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTAGGGCATGAGCTGC	
EGFR T790 阻断物 1	C3-GCAGCTCATCACGC-C3	
EGFR T790 阻断物 2	C3-GCAGCTCATCACGC-C3	
EGFR T790 阻断物 3	C3-GCAGCTCATCACGC-C3	
EGFR T790 阻断物 4	C3-GCTCATCACGCAGC-C3	

实施例1: 两步骤PCR(EGFR外显子19缺失)

步骤1:
选择性变性(T_s)

Mut-mut同源
双链体变性,
而不破坏wt-
wt或blk-wt
双链体

步骤2:
退火和延伸

阻断物退火至互补的野生型链。
引物退火至剩余的wt链和两条
突变链。
阻断物不退火至被同链引物
占据的突变链。
在一条wt链和两条突变体链
上延伸。

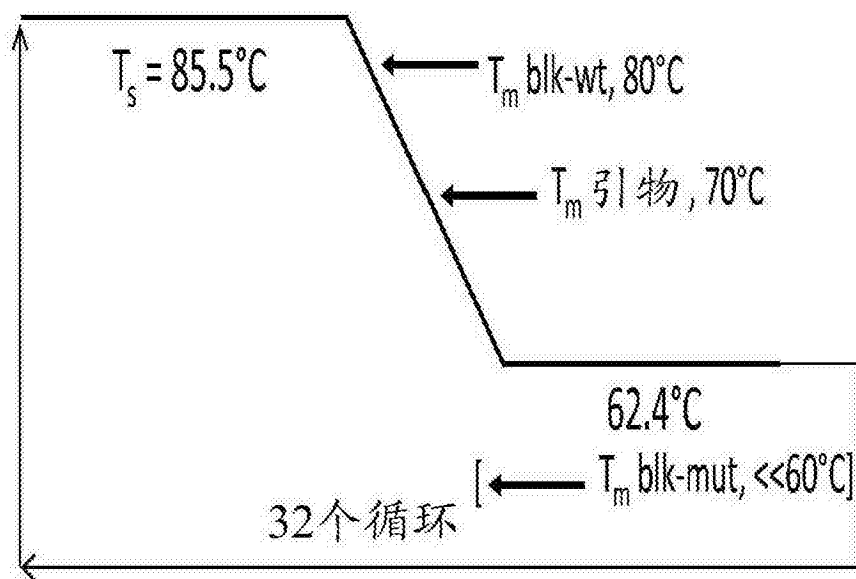


图 1

实施例2：四步骤PCR(EGFR外显子20 T790M)

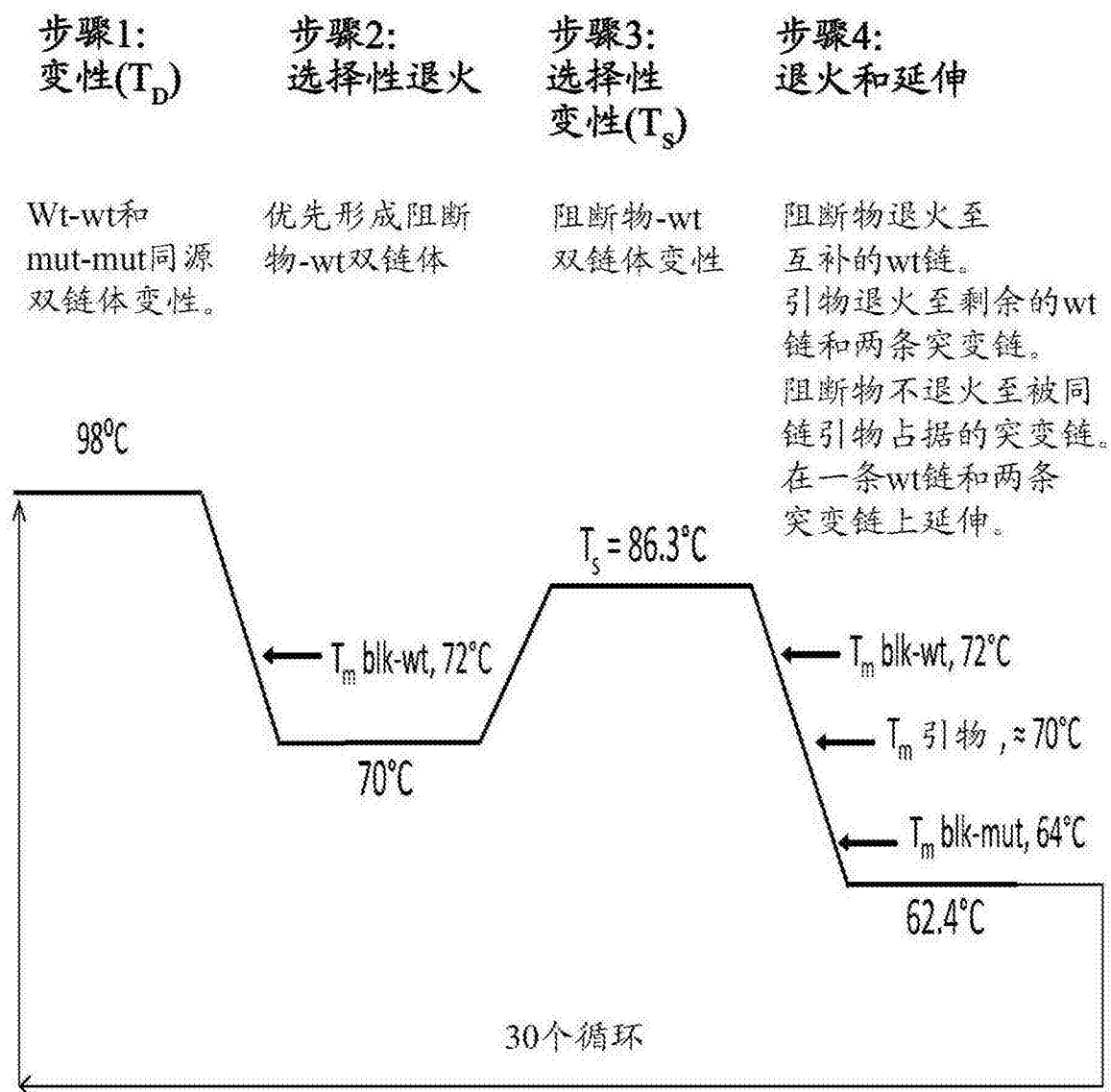


图 2

实施例3：四步骤PCR(KRAS外显子2单碱基取代)

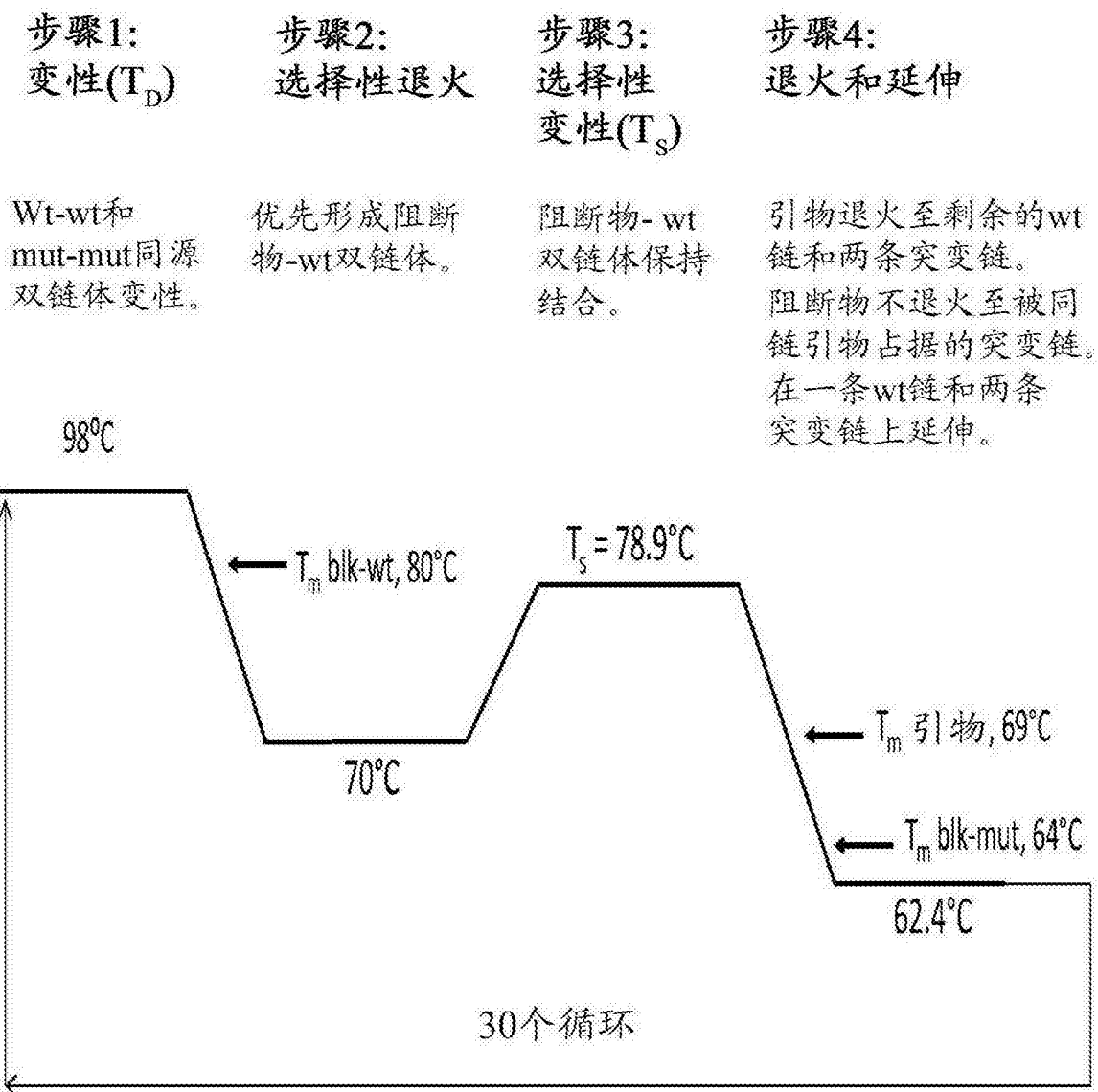


图 3

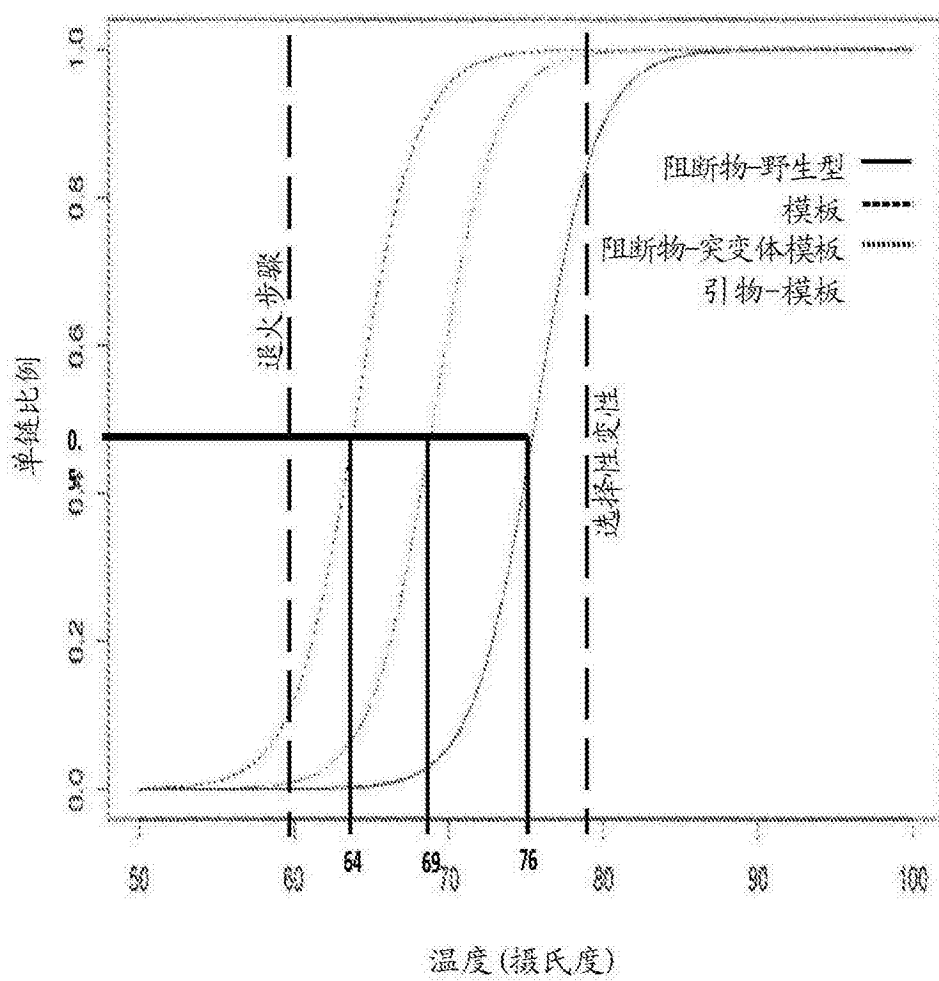


图 4

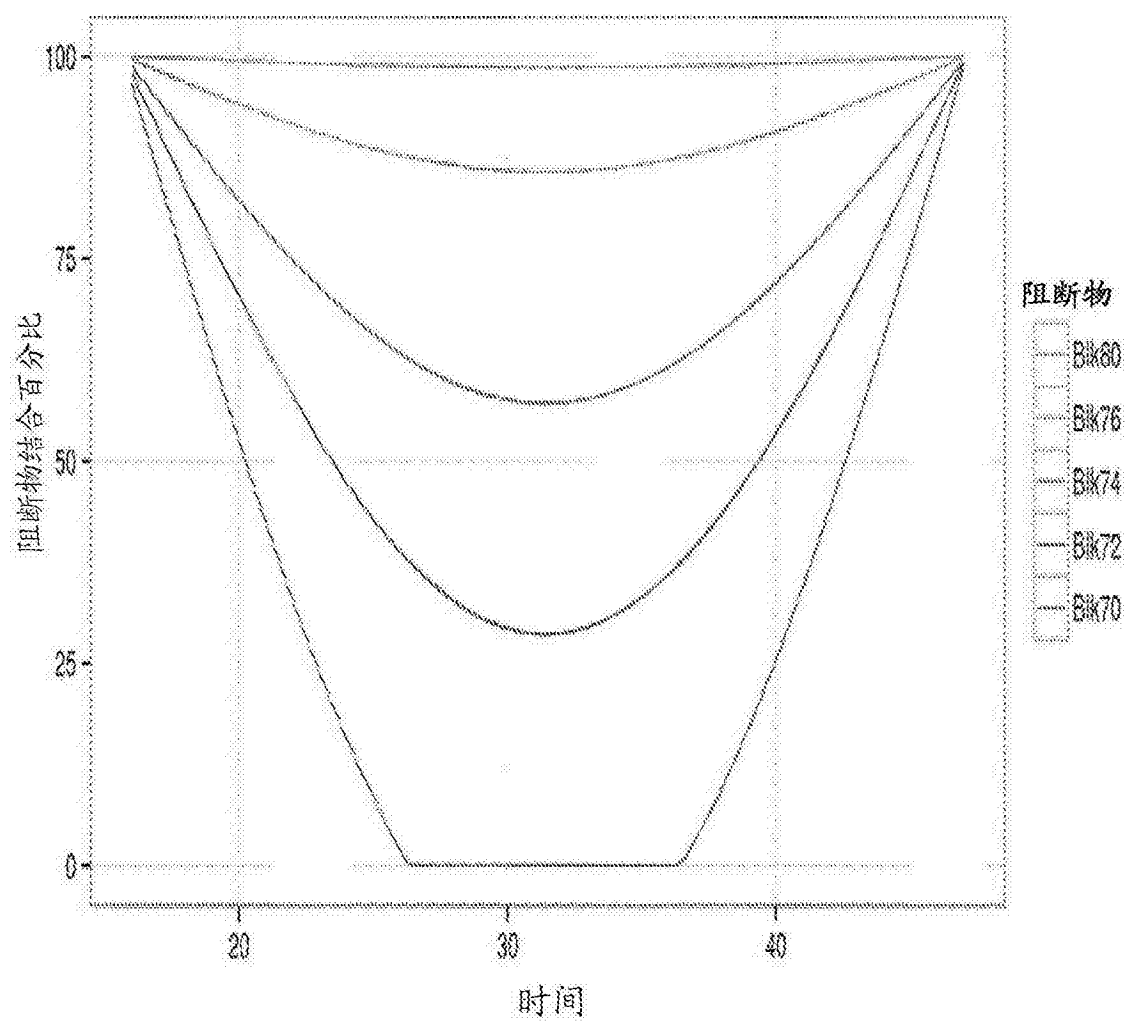
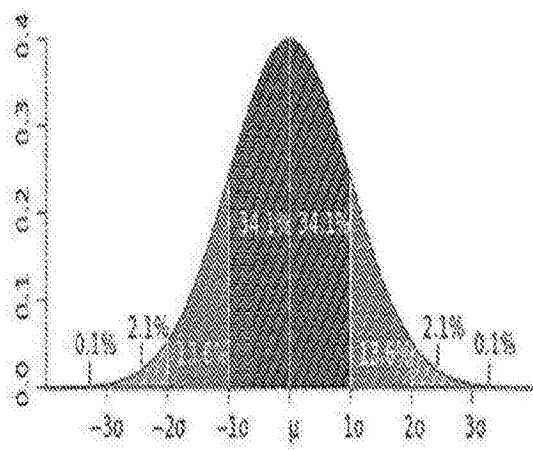


图 5



预期的/ 观察到的	0	1	2	3	4	5	6
0	100%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
0.13	88%	11%	1%	0%	0%	0%	0%
0.25	78%	19%	2%	0%	0%	0%	0%
0.5	61%	33%	8%	1%	0%	0%	0%
1	37%	37%	18%	6%	2%	0%	0%
2	14%	27%	27%	18%	9%	4%	1%
3	5%	15%	22%	22%	17%	10%	5%

图 6

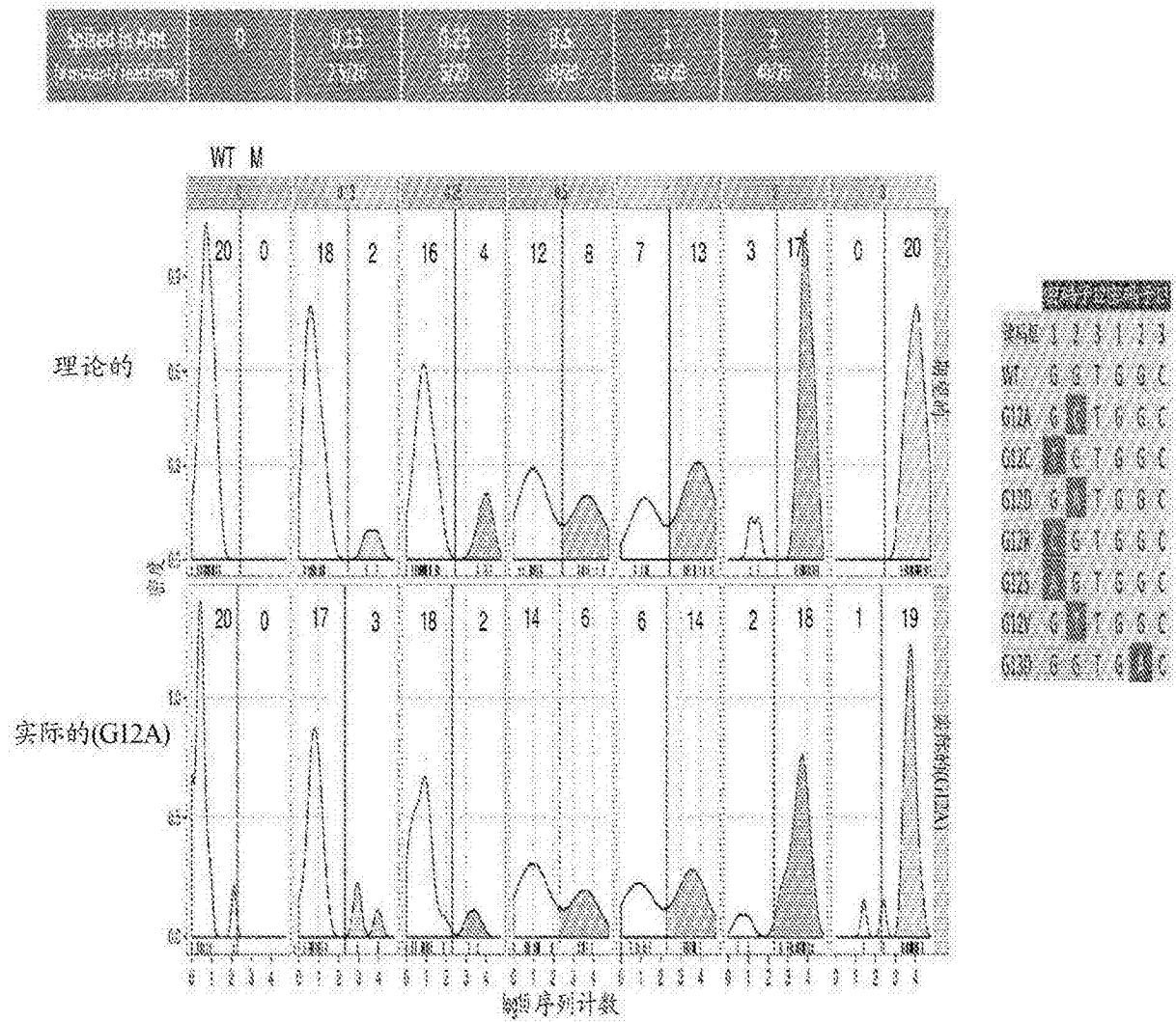


图 7

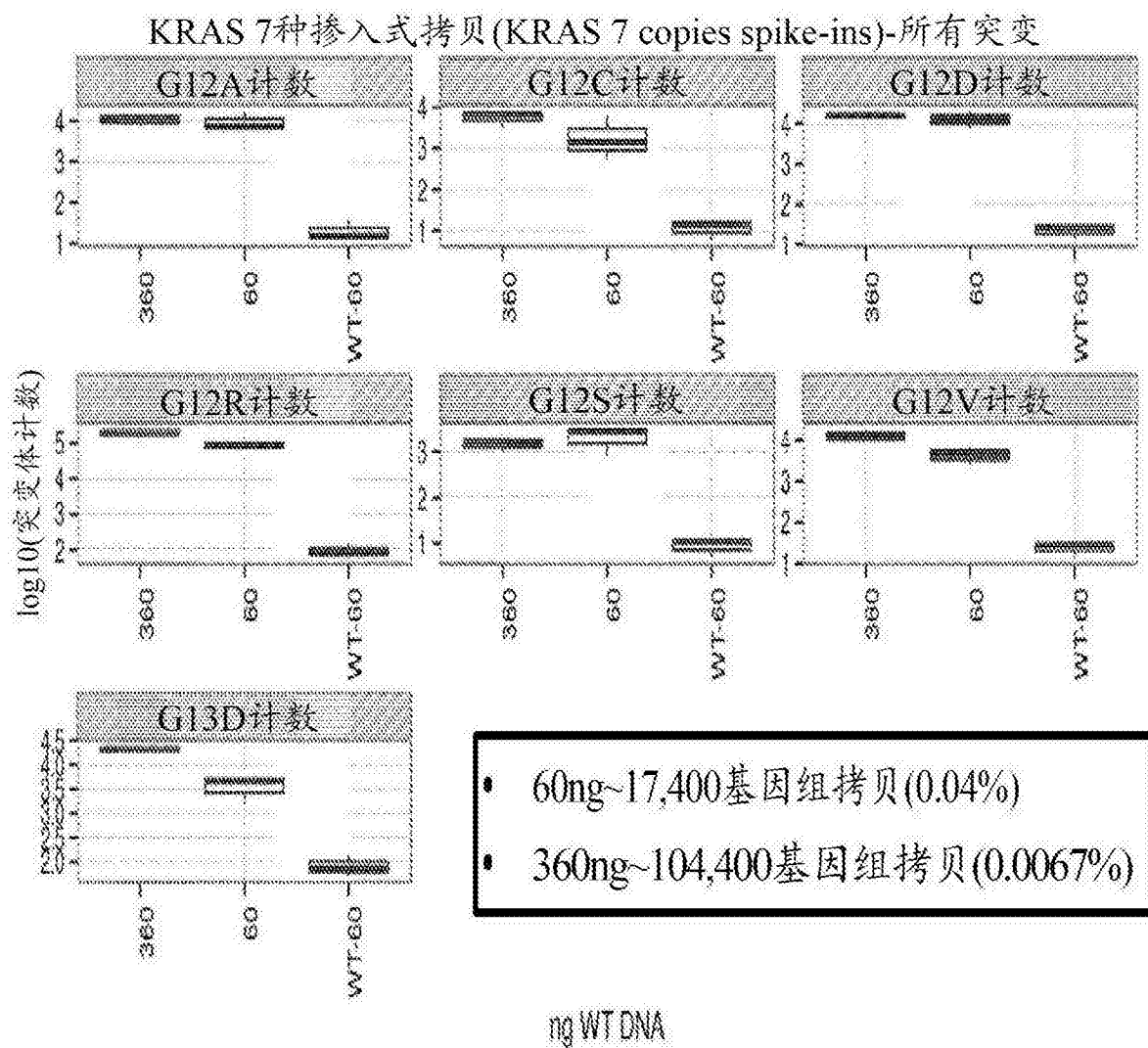


图 8

与液滴数字PCR整合的测定设计

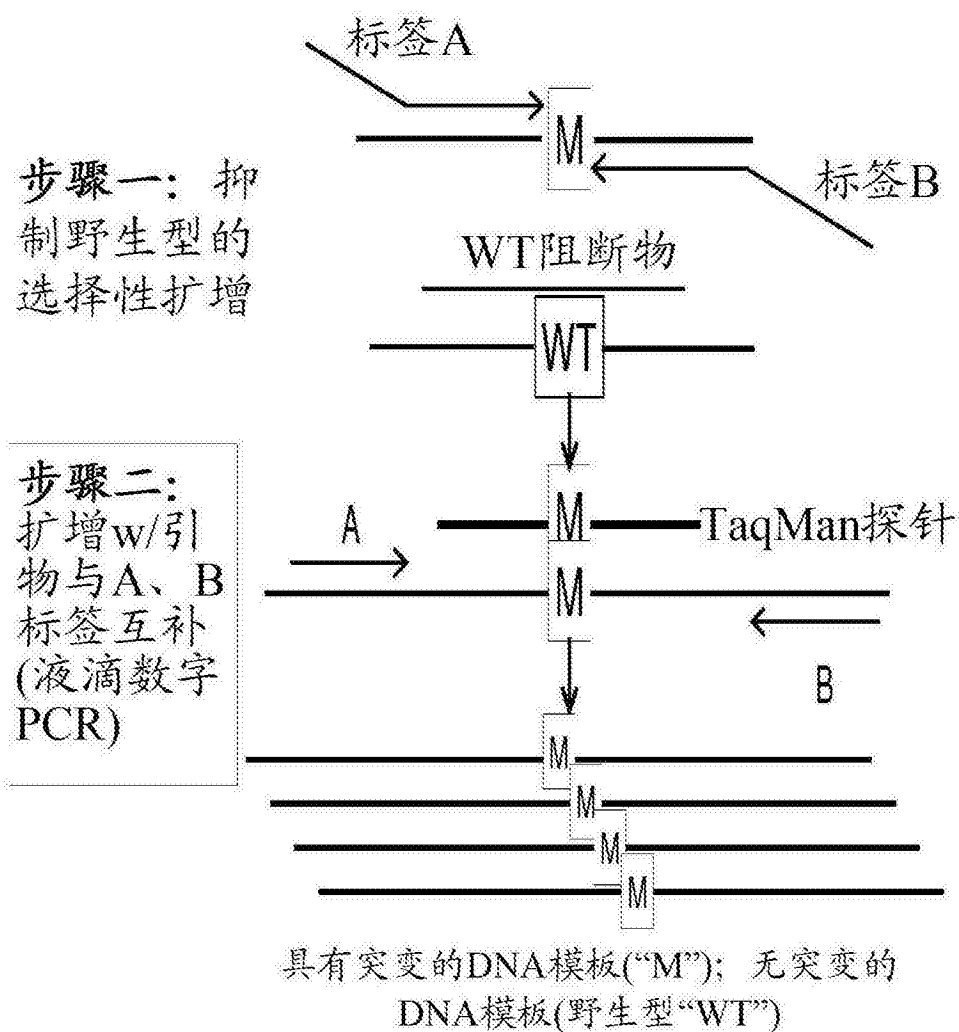


图 9

与下一代测序整合的测定设计

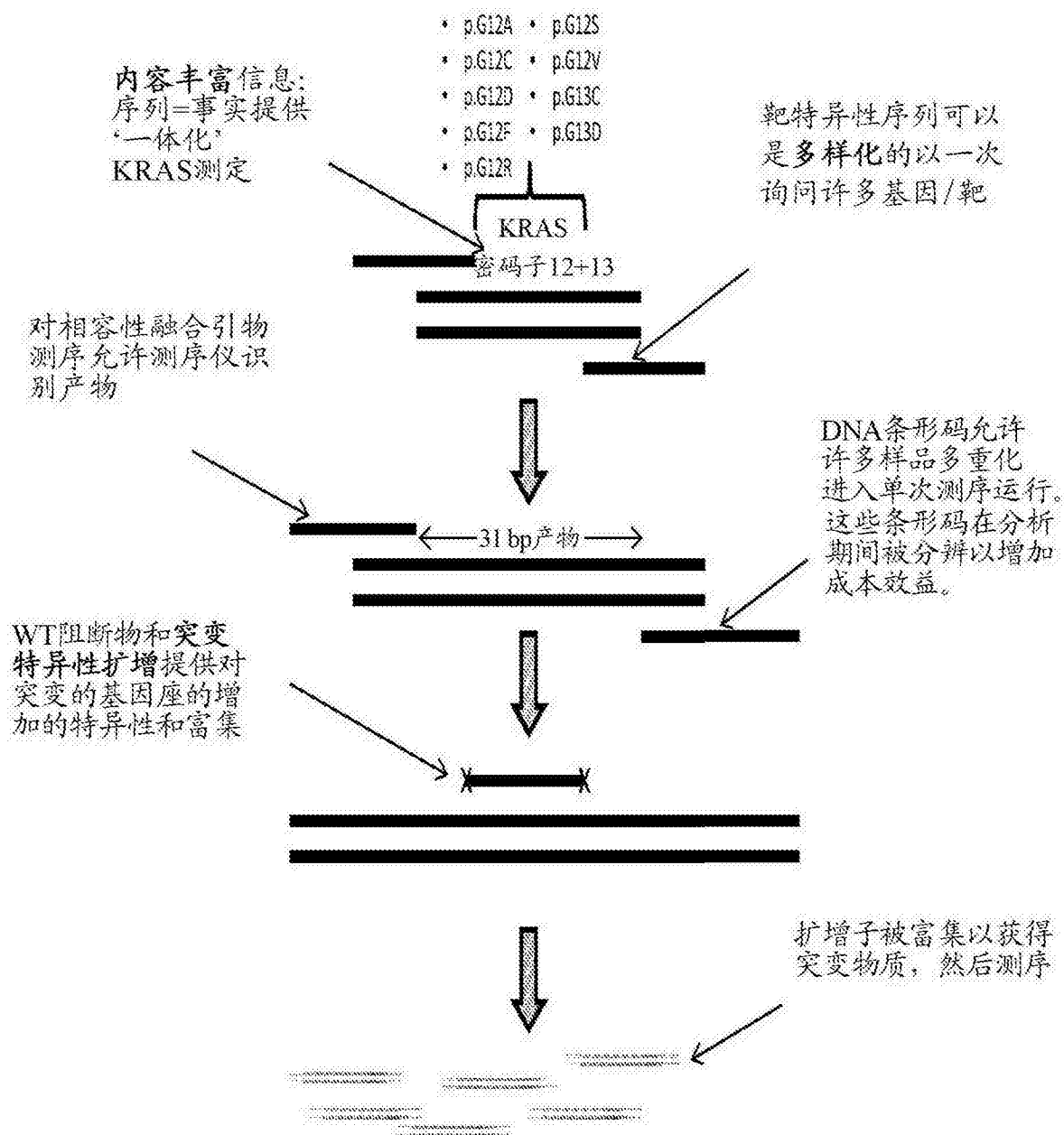


图 10

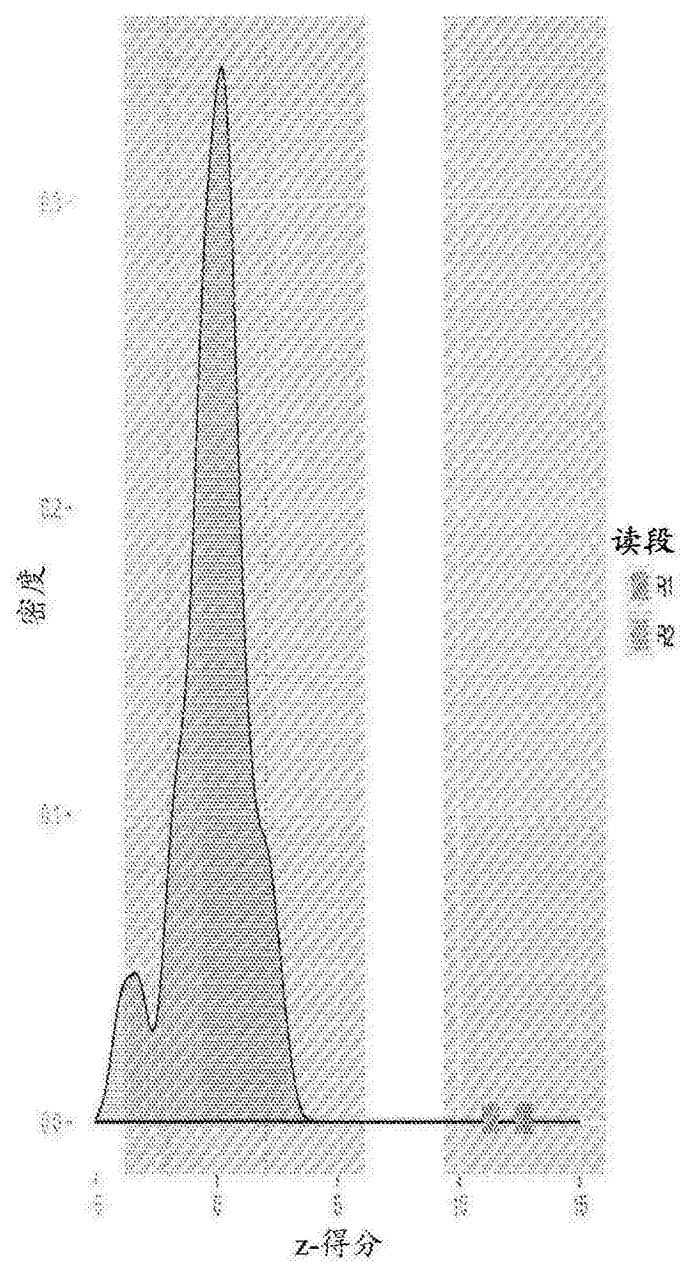


图 11

Erdheim Chester Patient – KRAS G12S

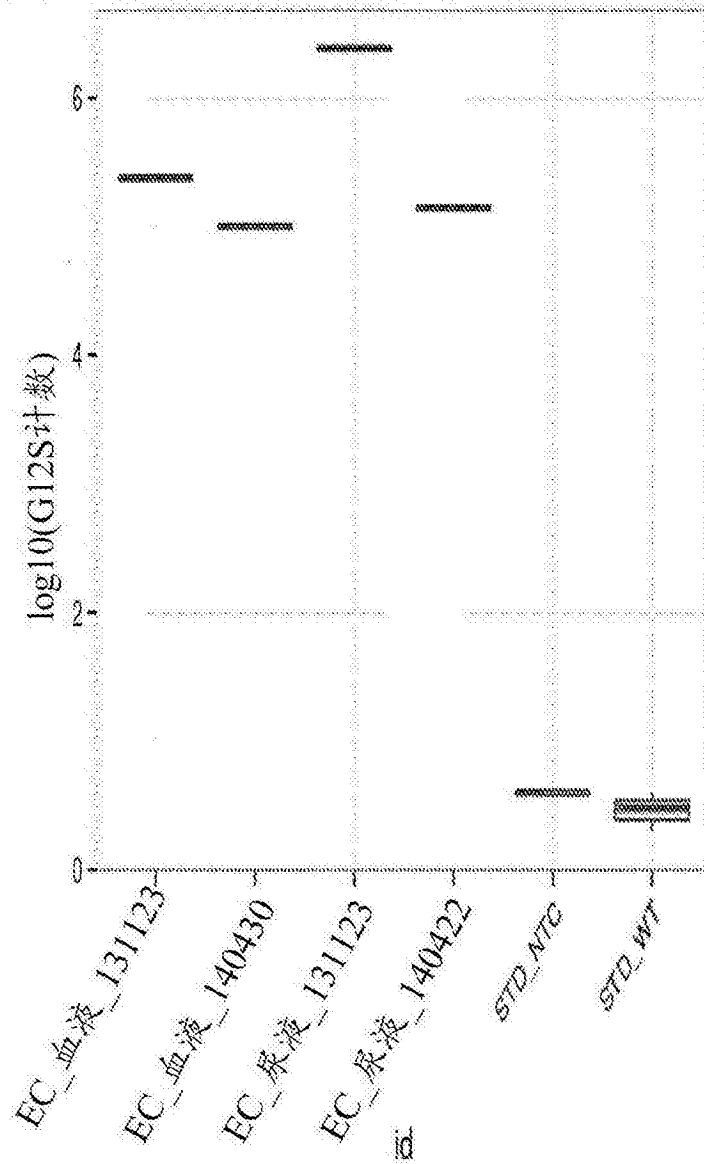


图 13