



(10) 授权公告号 CN 110050075 B

(45) 授权公告日 2024. 04. 02

(21) 申请号 201780075515.X

D.T.米亚莫托 X.洪

(22) 申请日 2017.10.27

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

(65) 同一申请的已公布的文献号

专利代理师 易方方

申请公布号 CN 110050075 A

(43) 申请公布日 2019.07.23

(51) Int.Cl.

C12Q 1/6886 (2018.01)

(30) 优先权数据

62/413,952 2016.10.27 US

(56) 对比文件

WO 2016154600 A1, 2016.09.29

US 2014154681 A1, 2014.06.05

AU 2015268617 A1, 2016.01.07

US 2013065786 A1, 2013.03.14

US 2009118175 A1, 2009.05.07

WO 2012135397 A2, 2012.10.04

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2019.06.05

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2017/058855 2017.10.27

(87) PCT国际申请的公布数据

W02018/081625 EN 2018.05.03

柳慧星等. 雌激素受体阳性乳腺癌他莫昔芬耐药机制的研究进展.《肿瘤》.2015,第35卷(第09期),第1039-1044页.

(73) 专利权人 通用医疗公司

地址 美国马萨诸塞州

审查员 白晓岩

(72) 发明人 D.哈伯 S.马赫斯瓦兰

T.托多罗瓦 M.卡利尼奇

权利要求书2页 说明书36页

序列表95页 附图20页

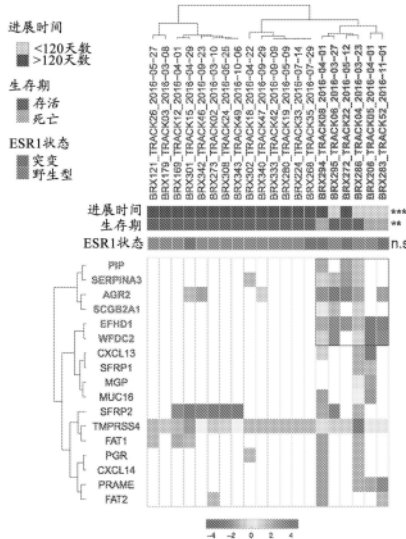
(54) 发明名称

用于确定特定癌症的癌症疗法的功效的血液样品的数字分析

(57) 摘要

本公开内容涉及用于分析受试者血液样品中的RNA以确定血液样品中一种或多种谱系标志物的表达水平的新测定方法,所述RNA来自例如循环肿瘤细胞(CTC)、肿瘤特异性外泌体或肿瘤特异性无细胞RNA,其中一种或多种特异性谱系标志物的表达水平可预测该受试者中特定抗癌治疗方案的无进展生存期和总生存期。

接受内分泌疗法的HR+患者,治疗3至4周



1. 探针和引物在制备用于在受试者中确定激素受体阳性 (“HR +”) 的乳腺癌的抗癌治疗方案的潜在功效的试剂盒中的用途, 其中所述探针和引物对应于 PIP、SERPINA3、AGR2、SCGB2A1、EFHD1 和 WFDC2 基因, 和其中确定所述潜在功效包括:

从在用抗癌治疗方案开始治疗受试者后 3-4 周收集的所述受试者的血液样品中分离循环肿瘤细胞 (CTC), 其中抗癌治疗方案包括靶向雌激素信号传导途径的药物; 将源自 CTC 的 RNA 转化为 cDNA;

将所述 cDNA 包封在单独的小滴中;

使用对每个小滴内对应于 PIP、SERPINA3、AGR2、SCGB2A1、EFHD1 和 WFDC2 基因中的每个的 cDNA 分子特异的探针和引物在报告基团的存在下扩增每个小滴中的 cDNA, 所述报告基团被配置成特异性结合 cDNA 分子, 所述 cDNA 分子对应于来自 CTC 的 PIP、SERPINA3、AGR2、SCGB2A1、EFHD1 和 WFDC2 基因中的每个而不是来自血液中其他细胞的 cDNA; 并且

测定血液样品中 CTC 中 PIP、SERPINA3、AGR2、SCGB2A1、EFHD1 和 WFDC2 基因中的每个的存在和表达水平,

其中 PIP、SERPINA3、AGR2、SCGB2A1、EFHD1 和 WFDC2 基因的表达水平预测所述抗癌治疗方案的受试者的无进展生存期和总生存期; 和

其中如果在用靶向雌激素信号传导途径的药物治疗开始后 3-4 周 PIP、SERPINA3、AGR2、SCGB2A1、EFHD1 和 WFDC2 基因的表达水平升高到高于通过评估没有癌症的健康供体确定的背景噪声水平, 则预测如果仅用靶向雌激素信号传导途径的药物治疗受试者将不会改善。

2. 根据权利要求 1 所述的用途, 其中通过将所述 PIP、SERPINA3、AGR2、SCGB2A1、EFHD1 和 WFDC2 基因中的所有的表达水平与针对特定癌症的特定抗癌治疗方案建立的参考标准进行比较, 确定受试者的特定抗癌治疗方案的潜在功效, 以确定在所述特定抗癌治疗方案下所述受试者是否会改善。

3. 根据权利要求 1 所述的用途, 其中所述药物包含 ER 抑制剂、选择性 ER 降解剂和芳香酶抑制剂, 其阻断雌激素的产生。

4. 根据权利要求 2 或 3 所述的用途, 其中所述受试者被进一步开具靶向雌激素-信号传导途径的药物和其他抗乳腺癌疗法的组合疗法。

5. 根据权利要求 1 至 3 中任一项所述的用途, 还包括在将源自 CTC 的 RNA 转化为 cDNA 之前减少产物的体积。

6. 根据权利要求 1 至 3 中任一项所述的用途, 还包括在包封所述 cDNA 分子之前从含有所述 cDNA 的溶液中除去污染物。

7. 根据权利要求 5 所述的用途, 其中将源自 CTC 的 RNA 转化为 cDNA 包括对来自 CTC 的分离的 RNA 分子进行逆转录聚合酶链反应。

8. 根据权利要求 1 至 3 中任一项所述的用途, 其中扩增每个小滴内的 cDNA 包括在每个小滴中进行 PCR。

9. 根据权利要求 1 至 3 中任一项所述的用途, 其中包封单个 cDNA 分子还包括将 PCR 试剂与所述 cDNA 分子包封在单个小滴中并形成至少 1000 个非水性液体小滴。

10. 根据权利要求 1 至 3 中任一项所述的用途, 其中所述报告基团包含荧光标记。

11. 根据权利要求 1 至 3 中任一项所述的用途, 其中探针和引物是:

(i) 由 SEQ ID NO:163 和 164 的序列组成的 PIP 引物, 以及由 SEQ ID NO:165 的序列组成

的PIP探针;或由SEQ ID NO: 404和405的序列组成的PIP引物,以及由SEQ ID NO: 368的序列组成的PIP探针;

(ii)由SEQ ID NO:190和191的序列组成的SERPINA3引物,以及由SEQ ID NO:192的序列组成的SERPINA3探针;

(iii)由SEQ ID NO:1和2的序列组成的AGR2引物,以及由SEQ ID NO:3的序列组成的AGR2探针;或由SEQ ID NO: 380和381的序列组成的AGR2引物,以及由SEQ ID NO: 356的序列组成的AGR2探针;

(iv)由SEQ ID NO:82和83的序列组成的SCGB2A1引物,以及由SEQ ID NO:84的序列组成的SCGB2A1探针;或由SEQ ID NO: 412和413的序列组成的SCGB2A1引物,以及由SEQ ID NO: 372的序列组成的SCGB2A1探针;

(v)由SEQ ID NO:386和387的序列组成的EFHD1引物,以及由SEQ ID NO:359的序列组成的EFHD1探针;和

(vi)由SEQ ID NO:422和423的序列组成的WFDC2引物,以及由SEQ ID NO: 377的序列组成的WFDC2探针。

12.根据权利要求1至3中任一项所述的用途,其中所述CTC源自转移性或原发性/局限性癌症。

13.根据权利要求3所述的用途,其中所述药物包括一种或多种包括他莫昔芬的ER抑制剂、包括氟维司群的选择性ER降解剂,和包括阿那曲唑、来曲唑和依西美坦中的一种或多种的芳香酶抑制剂。

14.根据权利要求4所述的用途,进一步包括对所述受试者施用靶向所述雌激素信号传导途径的药物和另一种抗乳腺癌疗法的组合疗法。

15.根据权利要求14所述的用途,其中所述组合疗法选自下组:内分泌疗法和CDK 4/6抑制剂;内分泌疗法和PI3K抑制剂;内分泌疗法和mTOR抑制剂;化疗和PARP抑制剂;以及化疗和HER2抑制剂。

用于确定特定癌症的癌症疗法的功效的血液样品的数字分析

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2016年10月27日提交的美国临时申请序列号62/413,952的优先权,其在此通过引用整体并入本文。

技术领域

[0003] 本发明涉及样品分析技术,更具体地涉及用于检测和分析来自癌细胞(例如血液样品)的核酸以确定在特定患者中哪种疗法最有效的方法和系统。

背景技术

[0004] 使用简单的血液检测或“液体活检”检测罕见循环肿瘤细胞(CTC)、外泌体和无细胞核酸(例如无细胞脱氧核糖核酸(DNA)或核糖核酸(RNA))存在的能力具有大大增强检测癌症的潜力,从而提供肿瘤细胞数量、遗传组成和药物反应参数的即时取样,而无需侵袭性肿瘤活检。因此,用于早期癌症检测的CTC、外泌体和无细胞DNA或RNA的检测具有彻底改变癌症治疗的潜力,使得能够在转移之前的阶段诊断侵袭性癌症,当期望治愈性治疗时。

[0005] 然而,CTC、外泌体和无细胞核酸非常罕见和/或很小和/或容易降解,因此识别、可视化、测量和评分这些与正常血液成分混合的罕见成分,甚至在采用已知的微流体装置或类似技术进行部分纯化后,仍然是一个重大挑战。例如,每毫升全血,在超过50亿个红细胞(RBC)和超过500万个白细胞(WBC)中仅有1至10个CTC(Plaks等,“Cancer Circulating Tumor Cells,”*Science*,341:1186;2013)。

[0006] 虽然外泌体不是那么罕见,但它们的直径仅为约30至100nm,使得它们难以在血液样品中分离和检测。由于体液(例如血液)的复杂性,外泌体与细胞和类似大小的颗粒的物理分离是具有挑战性的。使用差异超速离心和微过滤或梯度分离外泌体可以提高纯度。通过尺寸排阻色谱法单步分离细胞外囊泡已被证明提供了通过离心回收完整囊泡的效率更高,但是单独的基于尺寸的技术通常不能将外泌体与其他囊泡类型区分开。为了分离纯的外泌体群,需要基于物理(例如大小、密度)和生物化学参数(例如参与其生物发生的某些蛋白质的存在/不存在)的组合技术。分离源自肿瘤的外泌体的关键挑战是将它们与正常组织产生的外泌体分开。

[0007] 当使用无细胞RNA时,使抽血后释放细胞RNA最小化是重要的,因为无细胞RNA在血液中存在量少。因此,血液样品需要特殊操作和/或系统以避免细胞中核酸的降解或污染,并稳定无细胞RNA。

[0008] 此外,由于癌细胞之间甚至在患者个体中的高度异质性,以及在血流中循环的许多肿瘤细胞的不良生理状况,肿瘤细胞的抗体染色是高度可变的,其中许多肿瘤细胞已经开始经历程序性细胞死亡或失巢凋亡。此外,经抗体染色的肿瘤细胞的准确评分需要区分大量污染的白细胞,其中一些非特异性地与抗体试剂结合。因此,通过抗体染色仅可以稳健地鉴定候选肿瘤细胞的子集,并且尽管患有广泛转移性癌症,但多达一半的测试患者没有可检测出的细胞。

发明内容

[0009] 本公开内容涉及用于在标准血液样品中获得与肿瘤特异性RNA (例如来自罕见CTC、外泌体和/或无细胞RNA,) 相关的数据的最高可能灵敏度以预测哪些癌症疗法在给定患者中治疗特定检测癌症最有效的方法和用途。特别地,新方法不需要将CTC和/或外泌体与污染的WBC完全分离,而是可以在含有例如多达10,000个WBC或更多个的产物中可靠地检测少至一个CTC或外泌体。新的测定方法结合了(1)可以始终如一地获得完整CTC和来自血液的具有高质量RNA的外泌体的分离系统,以及(2)基于小滴的聚焦于健康患者血液不存在的每种肿瘤类型的特定癌症谱系的RNA标志物的数字聚合酶链式反应(PCR)测定。该新方法可以用于确定哪种治疗剂具有最高的有效治疗每位患者中发现的特定癌症类型的潜力。

[0010] 一般地,本公开内容涉及用于预测特定治疗方案(例如治疗剂)以超高灵敏度和特异性治疗给定受试者或患者中的特定癌症的功效的方法。新方法包括或由以下组成:从血液样品中获得肿瘤特异性RNA,以及确定哪一系列谱系标志物在血液样品的RNA中表达,其中表达水平或更具体的谱系标志物可预测特定抗癌治疗方案的无进展生存期和总生存期。例如,在一些实施方案中,所述方法可以包括或由以下组成:从患者的血液样品中分离循环肿瘤细胞(CTC);将来源于CTC的RNA转化为cDNA;将cDNA包封成单个小滴;在报告基因存在下在每个小滴中扩增cDNA,该报告基因被配置成特异性结合来自CTC的cDNA而不是来自血液中其他细胞的cDNA;以及确定哪一系列谱系标志物在血液样品的RNA中表达,其中一种或多种特异性谱系标志物的表达水平可预测特定抗癌治疗方案的无进展生存期、进展时间、总生存期或其他临床相关性终点。

[0011] 在一些实施方案中,通过将患者的一种或多种特异性谱系标志物的表达水平与针对特定抗癌的特定抗癌治疗方案建立的参考标准比较,确定特定抗癌治疗方案对患者特定癌症的潜在功效,以确定在特定抗癌治疗方案下是否会有有效地治疗患者。例如,在一些实施方案中,患者可能患有前列腺癌,如果在治疗开始之前测定的患者的特异性谱系标志物包括高于背景噪声水平(如通过评估没有癌症的健康供体确定的)的升高水平的FOLH1(PSMA)和HOXB13,则本文所述方法预测如果仅用阿比特龙(例如,ZYTIGA)治疗,则患者不会改善。在一些实施方案中,向该患者进一步开具阿比特龙和其他抗前列腺癌疗法的组合疗法。

[0012] 在另一些实施方案中,患者患有激素受体阳性(“HR+”)乳腺癌,如果在用靶向雌激素-信号传导途径的药物治疗后三至四周测定的患者特异性谱系标志物包括高于背景噪声水平(如通过评估没有癌症的健康供体所确定的)的升高水平的PIP、SERPINA3、AGR2、SCGB2A1、EFHD1和WFDC2基因中的一种或多种,例如一种、两种、三种、四种、五种或所有六种基因,则本文所述方法预测如果仅用靶向雌激素-信号传导途径的药物治疗,则患者将不会改善。例如,药物可以为例如ER抑制剂(例如他莫昔芬)、选择性ER降解剂(例如氟维司群)和芳香酶抑制剂(AI),其阻断雌激素的产生(例如,阿那曲唑、来曲唑和依西美坦)。该方法的结果可以帮助医疗保健提供者进一步向患者开具靶向雌激素-信号传导途径的药物和其他抗乳腺癌疗法的组合疗法。

[0013] 在多个实施方案中,所述方法可以包括使用循环肿瘤细胞(CTC)或外泌体或无细胞RNA的微流体分离,以及源自这些组分的RNA的数字检测。在一些实施方案中,RNA可以转化成cDNA并包封成单个小滴,用于在报告基因存在下扩增,该报告基因被配置成特异性结合来自CTC(或其他肿瘤RNA)的cDNA而不是来自其他非癌细胞的cDNA。

[0014] 本文所述的方法还可以包括在包封cDNA分子之前,在从含cDNA溶液中分离RNA和/或除去污染物之前减少产物的体积。

[0015] 在这种新方法的多个实施方案中,从经分离的RNA产生cDNA分子可以包括对经分离的RNA分子进行逆转录(RT)聚合酶链式反应(PCR),和/或在每个小滴内扩增cDNA分子可以包括在每个小滴中进行PCR。在这种新方法中,将单个cDNA分子和PCR试剂包封在单个小滴中可以包括形成至少1000滴非水性液体小滴,例如一种或多种碳氟化合物、氢氟烃、矿物油、硅油和烃油和/或一种或多种表面活性剂。每个小滴可以平均含有从CTC获得的一种靶cDNA分子。在一些实施方案中,报告基团可以为或包含荧光标记。

[0016] 在多个实施方案中,本文所述的方法包括使用探针和引物在每个小滴内扩增cDNA分子,所述探针和引物对应于选自本文表1中的癌症选择性基因列表的一种或多种基因。例如,所选基因可以包括前列腺癌选择性基因,例如AGR2、FOLH1、HOXB13、KLK2、KLK3、SCHLAP1、AMACR、AR变体(包括AR-V7、UGT2B15、STEAP2和TMPRSS2:ERG)中的任何一种或多种(如可以从表1中容易确定的)。在另一个实例中,ALDH1A3、CDH11、EGFR、FAT1、MET、PKP3、RND3、S100A2和STEAP2中的任何一种或多种对胰腺癌具有选择性。可以为表3中列出的其他类型的癌症生成类似的列表。

[0017] 在另一些实例中,所选基因包括表3中列出的乳腺癌选择性基因中的任何一种或多种。在另一些实例中,所选基因包括对肺癌、肝癌、前列腺癌、胰腺癌和黑素瘤中的一种或多种具有选择性的基因。例如,多重测定可以包括表3中列出的对特定类型癌症(例如乳腺癌、肺癌、前列腺癌、胰腺癌、肝癌和黑素瘤)具有选择性的所选基因中的2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12或甚至所有。通常,表1的1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12种或多种癌症选择性基因的引物和探针用于特定类型的癌症。所选基因的其他特定组合(这些基因的标志物)在以下实施例中被描述。

[0018] 在本文所述的方法中,CTC可以来自转移性或原发性/局限性癌症。

[0019] 本公开内容还提供了与表3中列出的一种或多种所选癌症基因相关的探针和引物用于扩增和检测从血液样品的循环肿瘤细胞(CTC)获得的cDNA分子,以及用于确定一系列谱系标志物中的哪一种在血液样品的CTC中表达的用途,其中一种或多种特异性谱系标志物的表达水平可预测特定抗癌治疗方案的无进展生存期和总生存期。

[0020] 如本文所用,术语“循环肿瘤细胞”(CTC)是指源自实体瘤(非血源性癌症)的癌细胞,其在患者血流中以非常罕见的数量存在(例如,在全血中约10,000,000个WBC中约1个CTC)。CTC可以来自转移性癌症和原发性/局限性癌症。

[0021] 如本文所用,“产物”是指例如在某种液体(例如缓冲液,如pluronic缓冲液)中的经分离的罕见细胞和其他污染的血细胞,例如红细胞、白细胞(例如白细胞),其例如采用本文所述的系统通过本文所述的方法加工得到的。一般产物可以仅含有约1至10个与500至2,500或更多个WBC混合的CTC,例如1000至2000个WBC的混合物中1至10个CTC。然而,本方法的检测限可以为10,000WBC中的约1个CTC。因此,尽管本方法可以达到500个WBC中约1个CTC的纯度水平,但是本方法不需要经高度纯化的CTC,这在一些已知的CTC分析方法中是必需的。

[0022] 聚合酶链式反应(PCR)是通过对小寡核苷酸引物进行连续退火和再退火来扩增已知DNA片段的方法,从而产生可检测的分子信号。

[0023] 逆转录(RT)-PCR是指使用逆转录从RNA模板产生互补c-DNA分子,从而使DNA聚合

酶链反应能够对RNA进行操作。本文公开的新方法的一个重要方面是来自全细胞CTC或者来自外泌体或无细胞RNA的高质量RNA的可用性,其不以可能破坏或降解RNA的方式裂解或处理。

[0024] 如本文所用,“阳性小滴”是经脂质包封的分子,其中用经标记的引物进行的PCR反应允许经PCR扩增的产物可视化。因此,使用荧光显微镜可以看到包含特定靶基因的单个模板cDNA分子的小滴,而“空白”或“阴性”小滴是不含靶cDNA的小滴。

[0025] 新的方法和系统提供了许多优点和益处。例如,当单独使用时,当前的方法和系统提供的结果比任何现有的已知系统更加准确和稳健。通过将来自单个CTC或外泌体的信号分解成数百或数千个明亮荧光小滴,每个来自单个cDNA分子,新的数字CTC测定能够实现显著的信号放大。鉴于选择和优化本文所述的生物标志物基因的严格标准,来自正常血细胞的背景信号在d-CTC中可忽略不计。因此,d-CTC能够使患有晚期癌症的患者获得极大的放大信号(接近100%的患有前列腺癌、肺癌、乳腺癌和肝癌的患者)。不仅具有阳性评分的患者的比例显著增加,而且高水平的信号使得能够在癌症治疗后肿瘤负荷下降时进行动态测量,并且甚至在治疗开始之前就能够准确预测特定疗法的临床结果。

[0026] 总之,这种新的微流体平台提供了流水化、高通量、快速(例如,每次运行3小时)且极高灵敏度的用于富集、检测和分析患者血液样品中CTC的方法。该平台提供丰富的临床可操作的信息,包括预测特定癌症疗法的临床结果。

[0027] 除非另外定义,否则本文使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域的普通技术人员通常理解的含义相同的含义。尽管与本文所述的那些类似或等同的方法和材料可以用于本发明的实践或测试,但下文描述了合适的方法和材料。本文提及的所有出版物、专利申请、专利和其他参考文献都通过引用整体并入本文。如果发生冲突,以本说明书(包括定义)为准。此外,材料、方法和实施例仅是说明性的而不是限制性的。

[0028] 通过以下详细描述和权利要求书,本发明的其他特征和优点将显而易见。

附图说明

[0029] 图1为微流体CTC分离模块(CTC-iChip)的示意图。

[0030] 图2为示出了从患者血液样品中获得完整CTC的一系列步骤的示意图,然后以信号强度图结束,该信号强度图示出了针对四种不同谱系特异性转录物多重化的d-CTC测定以检测掺入血液的前列腺癌细胞系(显示为FAM标记强度相对于HEX标记强度)。

[0031] 图3为单细胞RNA-seq数据,示出了从患有转移性前列腺癌的患者分离的白细胞(WBC)和单个前列腺CTC中的最终选择基因的表达。

[0032] 图4为示出了多重前列腺CTC测定结果的图,其提供了4种谱系特异性基因(TMPRSS2、KLK3、KLK2和FOLH1)和4种癌症特异性基因(FAT1、HOXB13、AGR2和STEAP2),并且示出了每个多重前列腺CTC测定中包含的基因列表以及每个基因的FAM/HEX比。

[0033] 图5为自动对阳性小滴信号进行分类的多类支持向量机(SVM)分类器模型。来自转移性前列腺癌患者、局限性前列腺癌患者和健康供体的CTC中的代表性多重ddPCR表达信号。

[0034] 图6为用于微量操作至健康供体全血中和使用CTC-iChip处理的不同数量的LNCaP细胞的d-CTC测定信号的图。

- [0035] 图7A至7D为示出了转移性患者和健康供体的基因的ddPCR表达信号的一系列图。
- [0036] 图7A为示出了从健康供体对照、局限性前列腺癌患者和转移性去势抗性前列腺癌(mCRPC)患者获得的血液中每个基因的d-CTC测定信号的热图。
- [0037] 图7B为示出了基于转移性患者中相对于健康供体的每个基因的ddPCR表达信号的相对信噪比而得出的加权前列腺CTC评分的图。
- [0038] 图7C、7D和7E分别为CTC ddPCR信号与CTC染色信号、ddPCR CTC信号与血清PSA,以及ddPCR CTC KLK3信号与血清PSA之间的关系图。
- [0039] 图8A至8F为前列腺CTC中AR-V7和TMPRSS2:ERG表达的ddPCR表达测定的分析测试和验证的一系列图和其他结果。
- [0040] 图8A为微量操作至健康供体全血中和使用CTC-iChip处理的不同数量的22Rv1细胞的AR-V7的ddPCR信号的条形图。
- [0041] 图8B为微量操作至健康供体全血中和使用CTC-iChip处理的不同数量的VCaP细胞的TMPRSS2:ERG的ddPCR信号的条形图。
- [0042] 图8C为示出了具有AR-V7和/或TMPRSS2-ERG ddPCR信号的转移性前列腺癌患者的ddPCR信号的结果的图。
- [0043] 图8D为示出了具有AR-V7和/或TMPRSS2-ERG ddPCR信号的健康供体的ddPCR信号的结果的图。
- [0044] 图8E为来自前列腺癌患者的前列腺癌活检或前列腺切除术组织的前列腺CTC与匹配档案FFPE样品中的TMPRSS2:ERG的ddPCR信号一致性。
- [0045] 图8F为来自前列腺癌患者的前列腺癌活检或前列腺切除术组织的前列腺CTC与匹配档案FFPE样品中的AR-V7的ddPCR信号一致性。
- [0046] 图9A至9B示出了对前列腺癌患者的一线阿比特龙疗法的前瞻性研究的结果。
- [0047] 图9A为患有mCRPC患者的一线治疗方案的阿比特龙前瞻性研究中CTC提取时间点的示意图。
- [0048] 图9B为在阿比特龙治疗的不同时间点下患者的数字CTC测定信号的热图。
- [0049] 图10A至10F为示出了数字CTC标志物的前瞻性评估结果的一系列Kaplan-Meier曲线。
- [0050] 图10A为在预处理(C1D1)和治疗12周(C4D1)时CTC中通过AR-V7状态的放射照相无进展生存期(R-PFS)的一组Kaplan-Meier曲线。
- [0051] 图10B为在预处理(C1D1)和治疗12周(C4D1)时CTC中通过AR-V7状态的总生存期(OS)的一组Kaplan-Meier曲线。
- [0052] 图10C为在预处理(C1D1)和治疗12周(C4D1)时CTC中HOXB13的放射学无进展生存期(R-PFS)的一对Kaplan-Meier曲线。
- [0053] 图10D为在预处理(C1D1)和处理12周(C4D1)时CTC中HOXB13的OS的一对Kaplan-Meier曲线。
- [0054] 图10E为在预处理(C1D1)和处理12周(C4D1)时CTC中FOLH1的R-PFS的一组Kaplan-Meier曲线。
- [0055] 图10F为在预处理(C1D1)和处理12周(C4D1)时CTC中FOLH1的OS的一系列Kaplan-Meier曲线。

[0056] 图11A至11D为示出了与内分泌抗性(“ER”)信号传导相关的抗性信号(RS)标志物的一系列图,该标志物识别接受内分泌治疗的高风险HR+患者并且是该类人群的OS和进展时间(“TTP”)的预后。

[0057] 图11A为在接受内分泌治疗的HR+患者中治疗3至4周时无标记的标志物表达聚类的示意图。一组标志物(红色)信号鉴定一组患者(蓝色)在120天内显著富集进展和差的生存期(p值信号示出了基于Fisher精确检验的显著性)。还指出了通过基因分型或ddPCR建立的每个患者的ESR1突变状态。

[0058] 图11B-1和B-2为示出了基于6种高风险基因的表达的元评分与多种的雌激素信号传导(11B-1)和内分泌抗性(11B-2)相关的GSEA信号之间的相关性的一对图。公开可用的数据集以红色十字表示。右边的虚线0.54表示多重比较中的中值相关性。基于100个随机组的6个基因的与元评分的相关性以蓝色圆圈信号。

[0059] 图11C-1和11C-2为在治疗3-4周时基于RS评分的接受内分泌疗法的HR+患者的OS(11C-1)和TTP(11C-2)的一对Kaplan-Meier曲线。各组以为275个转录物/ml分组;基于对数秩检验的p值。

[0060] 图11D-1和11D-2为描绘了基于ESR1突变存在的接受内分泌疗法的HR+患者中的OS(左)和TTP(右)的一对Kaplan-Meier曲线。基于对数秩检验的p值。

具体实施方案

[0061] 本公开内容涉及从来自血液样品癌细胞(例如,CTC)的RNA、来自血液样品癌细胞的外泌体或来自癌细胞的无细胞RNA中获得信息的方法和系统,以帮助预测特定抗癌方案是否有效治疗特定患者的特定类型癌症。这些方法和系统结合了分离技术与分析技术,其中分离技术为例如超高通量微流体技术(例如,负耗尽技术,如使用负造影细胞的耗尽来分离血液样品中未标记的CTC的那些技术),分析技术为例如聚焦于特异性癌症谱系RNA标志物的基于小滴的数字聚合酶链反应(PCR)测定。在PCT W02016154600中进一步详细描述了具体的测定方法,但不是本文所述的新的预测分析方法,其通过引用整体并入本文。

[0062] 该新方法包括通过以下进行的步骤:比较多种标志物的表达水平与参考标准,以及比较那些注定对特定癌症疗法有反应或可能具有癌症早期进展的患者的表达水平。这些测量结果可以在治疗前基线处提供信息,或者一旦开始治疗,它们可以通过连续血液监测出现。这些测量结果的价值在于提供有关特定治疗选择的信息。由于多种治疗选择适用于患有多种不同癌症的患者,因此有助于个性化和指导基于分子标志物的理性选择疗法的信息对于有效的癌症疗法是至关重要的。

[0063] 如下文更详细讨论的具体实例,在开始任何治疗之前具有升高水平的FOLH1(PSMA)和/或HOXB13的患有前列腺癌的患者(例如,每毫升高于2.5个转录物或其他预定阈值),如果仅用阿比特龙治疗(例如,ZYTIGA®),将不会变好。此类患者应考虑进行替代性非激素疗法(例如,紫杉烷化疗或放射性同位素疗法)、PARP抑制剂或目前正在开发的新型实验疗法,或在高复发风险的患者中进行测试的现有疗法组合。

[0064] 此外,除了本文所述之外的其他CTC分离技术也可以用于该新方法,只要它们提供细胞的部分纯化(例如,过滤、阳性肿瘤细胞选择),尽管RNA的质量和测定的灵敏度不如微流体技术。类似地,用于RNA的其他数字PCR技术能够检测谱系特异性引物,尽管基于小滴的

测定的灵敏度可能是最高的。

[0065] 测定方法的一般概念

[0066] 使用分离技术用于富集血液样品中的CTC,例如,使用超高通量微流体技术,例如在国际PCT申请W0 2015/058206和Ozkumur等Inertial Focusing for Tumor Antigen-Dependent and-Independent Sorting of Rare Circulating Tumor Cells,”*Sci.Transl.Med.*,5:179ra47(2013)中描述的被称为“CTC-iChip”。CTC-iChip使用CTC抗原非依赖性方法,其中血液样品中的WBC用磁珠标记,然后通过两个富集阶段处理样品。第一阶段使用确定性横向位移来移除小而柔韧的细胞/颗粒(RBC、血小板、未结合的磁珠和血浆),同时保留较大的细胞(CTC和WBC)。第二阶段使用惯性聚焦将所有细胞移动到狭窄的流体流中,然后使用磁场将经珠标记的WBC从聚焦流中拉出,留下经高度富集的CTC。来自10ml全血的CTC-iChip产物通常含有<500,000RBC、<5,000WBC和可变数量的CTC。

[0067] 一些分析技术进一步富集和分析例如从CTC-iChip获得的经分离的CTC,例如,使用小滴微流体。关于小滴微流体的一些基本信息一般地在Jeremy等“Ultrahigh-Throughput Screening in Drop-Based Microfluidics for Directed Evolution,”*Proc.Natl.Acad.Sci.USA*,107:4004(2010)被描述。

[0068] 如本文所用,在某些实施方案中,小滴微流体技术可以包括将单个细胞、RT-PCR试剂和裂解缓冲液封装到一般非水性液体小滴中(例如,碳氟化合物、氢氟烃、矿物油、硅油和烃油;表面活性剂也可以包含在非水液体中,例如Span80、Monolein/油酸、Tween20/80、SDS、正丁醇、ABIL EM90和磷脂),其大小例如体积约0.5pL至15nL,例如直径10至300 μm 、例如20至100 μm 、例如30至50 μm 、例如35 μm 。如在本公开内容中描述的新方法中所用的,这些技术还包括扩增小滴内的癌症特异性转录物以产生荧光信号,以及扩增阳性滴的分选。该方法导致纯CTC的分离,其可以被测序和分析以确定特定患者中特定抗癌疗法的潜在功效。

[0069] 由于CTC的高异质性,使用多重扩增来检测尽可能多的CTC是有用的。因此,代替在PCR混合物中使用一对引物,人们可以使用肿瘤特异性引物的组合来增加检测和分选CTC的可能性。关于使用PCR分选癌细胞的其他信息,参见,例如,Eastburn等,“Identification and genetic analysis of cancer cells with PCR-activated cell sorting,”*Nucleic Acids Research*,2014,第42卷,第16期,第128页。

[0070] 在新的测定方法中,裂解CTC以释放RNA分子,其代表在癌细胞中表达的基因。大多数是“谱系”特异性的,而不是癌症特异性的,例如任何前列腺细胞(无论是否癌症)表达这些标志物。然而,正常血细胞不会,并且信号来自在血流中循环的细胞的事实将其定义为异常信号。通过将RNA转化为cDNA,人们可以使用PCR扩增该谱系信号。非常灵敏的微滴式数字PCR用于允许将来自单个癌细胞的信号(即,成像测定中的一个信号)转换成数千个阳性免疫荧光小滴。多种高度策划的基因转录物的组合确保了癌症的高灵敏度和特异性,并且还允许功能性见解(如前列腺癌和乳腺癌中激素响应途径的状态)。

[0071] 如上所述,新的测定方法专注于高质量RNA而不是DNA的检测和分析。虽然在血浆和CTC中进行DNA突变检测已有相当多的工作,但本方法依赖于RNA标志物,原因如下:

[0072] 1.DNA突变不是肿瘤特异性的,并且健康个体在血液中具有一些未鉴定的癌细胞的发现是非常困难的临床情况。相反,通过选择肿瘤特异性RNA(例如,前列腺相对于肺),该新方法可以鉴定血液中癌细胞的来源。

[0073] 2. DNA突变是非常异质性的,并且除了许多癌症共有的一些复发突变之外,大多数基于血液的突变检测策略需要原发肿瘤中存在的现有突变知识(即,不适合筛选未知癌症)。相反,来自特定器官的所有肿瘤细胞在RNA水平表达共同的谱系标志物。因此,对于每种单独类型的癌症,在新方法中使用单一标志物混合物。

[0074] 3. 在转移建立之前,低水平的CTC被侵袭性癌症排出(即,基于血液的检测并不太晚),但血液中肿瘤细胞的存在意味着血管侵入(即侵袭性而非惰性癌症)。对于血浆DNA或血浆蛋白标志物不是这种情况,其从原发性肿瘤中的垂死细胞中泄漏,并不一定表示血管侵入。例如,血液中的血清PSA蛋白由良性前列腺细胞和原发性前列腺癌均排出。另一方面,表达PSA的CTC仅由侵袭性前列腺癌排出。

[0075] 4. 使用本文所述的新的数字评分技术对RNA的分析非常灵敏。然而,游离RNA在血流中降解,并且使用如本文所述的分离系统,例如微流体负耗尽系统(例如,CTC-Chip系统)是独特的,因为未经标记的肿瘤细胞具有可提取的高质量RNA。

[0076] 选择cDNA而不是DNA作为靶分子,不仅可以增强来自每个肿瘤细胞的信号,而且还可以特异性地靶向肿瘤细胞转录物,以排除白细胞(WBC)转录物。信号的增强是一个显著优势,因为它避免了将CTC分离到非常高的纯度水平。即,这使得含有一个或更多个“经分离的”CTC的产物能够获得稳健且可重复的结果,这些CTC仍被同一产物中数百或数千个污染的WBC(例如白细胞)包围。然而,在新方法中使用靶向由RNA制备的cDNA的策略允许新的测定方法被精确地定制,以与现有方法相比在最低水平的CTC纯度下获得最大特异性。

[0077] CTC-iChip技术通过微流体耗尽经抗体标记的白细胞来高效分离非造血细胞。CTC-iChip的这一特征提供了完整的来自肿瘤的RNA(水平远高于使用其他技术获得的水平),并且它独立于肿瘤细胞表面表位(在癌症中以及在个体癌症中的上皮细胞相对于间充质细胞亚型之间是高度异质的)。此外,甚至其抗体染色和选择对于成像分析而言不是最理想的前凋亡癌细胞可以提供可以使用本文所述的方法评分的肿瘤特异性RNA的源。由于所有这些原因,在将肿瘤特异性数字读取应用于产物之前,提供了来自完整CTC的高质量RNA的分离技术或系统(其中样品中发现的WBC与罕见CTC(例如微流体负耗尽系统,例如CTC-iChip)至少有一些减少)是重要的第一步隔离。

[0078] 基于小滴的异质混合物中极为罕见的分子的数字检测最初是为了在异质混合物中存在时低于检测水平的单个DNA分子的PCR扩增而开发的,但是当在PCR处理之前被隔离在脂质小滴中时容易被识别。基于小滴的数字PCR的基础技术(“微滴式数字PCR(ddPCR)”已经由RainDance和Bio-Rad商业化,其为靶分子的脂质包封然后进行PCR分析提供设备。使这成为可能的重要科学进步包括在哈佛大学的David Weitz和约翰霍普金斯大学的Bert Vogelstein实验室工作。例如,参见美国专利号6,767,512;7074367;8,535,889;8,841,071;9,074,242和美国公开申请号2014/0303005。还参见美国专利号9,068,181。

[0079] 然而,微滴式数字PCR本身在生物学上不重要,除非与生物材料源相结合,这对于本文所述的新方法是关键的。例如,谱系特异性RNA的检测(本文所述的检测策略的中心焦点)不区分正常前列腺上皮细胞和癌性前列腺细胞。因此,检测血液中前列腺衍生的转录物是没有意义的:它们存在于来自正常前列腺细胞或外泌体的碎片中。只有当与整个CTC(即血液中的完整CTC)的分离相结合时,ddPCR测定才能实现非凡的灵敏度和特异性。因此,这两种技术非常适合彼此,因为分离系统提供高质量的RNA,基于小滴的数字PCR测定专注于

新方法中的RNA标记。

[0080] 另一方面对于新测定方法的总体成功是重要的。如上所述,本文所述的新测定方法使用由总RNA制备的cDNA,但该用法的关键是鉴定对于每种类型的癌症具有肿瘤谱系特异性的适当生物标志物,但是它们是如此独特以至于完全不存在于正常血细胞中(即使具有ddPCR灵敏度)。对于本文所述的每种类型的癌症,多种靶RNA生物标志物的选择、测试和验证使得新测定方法成功。

[0081] 分析方法步骤

[0082] 新测定方法开始于使用分离系统(例如微流体负耗尽系统)分离部分纯的CTC,直至并包括通过微滴式数字PCR仪器的数据分析。有十个主要的测定步骤,其中一些是可选的,但通常提供更好的结果:

[0083] 1.从血液样品中分离出包含血液中的CTC和其他细胞的产物;例如从患者或受试者;

[0084] 2.减少含有罕见细胞的产物的体积(可选);

[0085] 3.从产物中分离核糖核酸(RNA)分子,例如通过细胞裂解,并在溶液中从经分离的RNA中产生cDNA分子;例如,通过RT-PCR从产物中含有的细胞释放RNA;

[0086] 4.清除在RT-PCR步骤中合成的cDNA(可选);

[0087] 5.使用基因特异性靶向预扩增探针预扩增cDNA,例如使用Fluidigm BioMark™嵌套PCR方法,或非特异性全转录组扩增,例如使用Clontech SMARTer™方法(任选);

[0088] 6.将cDNA分子包封在单个小滴中,例如与PCR试剂一起;

[0089] 7.在报告基团存在下扩增每个小滴内的cDNA分子,该报告基团被配置成特异性结合来自CTC的cDNA而不是来自其他细胞的cDNA,例如,使用PCR;

[0090] 8.检测含有报告基团的小滴(例如“阳性”小滴)作为小滴中的CTC中存在cDNA分子的指示;

[0091] 9.分析检测到的小滴中的CTC,例如,以确定患者或受试者中特定疾病的存在;以及

[0092] 10.检测癌细胞(例如CTC)中特定癌症特异性或谱系特异性基因的表达高于通过健康供体对照(设定在2.5的水平)确定的低背景水平,以确定是否特异性抗癌方案预期对特定患者的特定肿瘤有效。

[0093] 这些癌症特异性或谱系特异性基因的背景水平通过测量它们在许多没有癌症的患者的血液中的CTC(或外泌体)中的表达来确定(与针对给定类型的癌症的癌症患者年龄匹配)。然后通过许多患者的特定癌症疗法的开始和治疗期间监测其表达来评估这些癌症特异性或谱系特异性基因标志物的预测值,例如,6至12个月、15个月、18个月、21个月、24个月或更长时间,确定每个患者在每个时间段的无进展生存期和总生存期统计数据。然后将这些数据用于制备每个基因和每种抗癌治疗方案的参考标准,根据这些方案可以比较新的患者样品,以确定拟议的抗癌治疗方案是否可能对特定患者有效,如果是,与另一种潜在的治疗方案相比的有效程度。

[0094] 例如,在患有转移性去势抵抗性前列腺癌的患者中,本发明人已经发现,当用抗雄激素治疗时,与在其CTC中具有高表达水平的这两个基因(例如,高于2.5转录物/mL血液的水平)的患者相比,通过数字CTC定量测定法测量的那些在其CTC中没有可检测到的基因

HOXB13和FOLH1 (PSMA) 表达 (例如, 低于2.5转录物/mL血液的水平) 的患者具有更好的总生存期和无进展生存期。这些前列腺谱系标志物的表达在前列腺癌患者的血液中的外泌体和来自其他肿瘤的RNA中也是可检测的。

[0095] 如下文进一步详细描述, 新d-CTC测定方法的重要特征之一是仔细选择许多靶基因生物标志物 (和相应的引物), 其提供优异的灵敏度, 同时保持几乎完美的特异性。使用公开可用数据集和专有RNA-Seq CTC数据的生物信息学分析确定本文所述的靶基因生物标志物的独特列表 (下文, 表3)。非常谨慎地选择在白细胞的任何亚群中不表达的标志物, 但是在CTC中以足够高的频率和强度表达, 以在相当多的不同患者中提供可靠的信号。针对每种癌症类型 (例如, 前列腺癌、乳腺癌、黑素瘤、肺癌、胰腺癌等) 选择一组特异性标志物, 并且它们是可预测多种抗癌疗法的潜在功效的一组或更多组这些特异性标志物。

[0096] 来自CTC的mRNA的数字测量不仅提供了这些特定癌症的整体肿瘤负荷水平, 其是癌症活动和对特定疗法的反应或不反应的指标, 还提供与测试基因相关的特定信息。例如, 前列腺癌中的HOXB13和FOLH1是异常雄激素信号传导的标志物, 这是前列腺癌的一个关键特征, 其对抗雄激素疗法具有抗性。类似地, 在乳腺癌中, 对激素疗法的反应取决于雌激素受体途径的活性, 其可以使用RNA转录物在CTC或外泌体内测量。在经历癌症免疫疗法 (例如黑素瘤) 的患者中, CTC或相关血囊内的分化标志物的存在还可以指示激活免疫系统的独特基因组的表达, 并且因此预测对免疫治疗的反应或不反应。

[0097] 现在将更详细地描述测定方法的单个步骤。

[0098] 1. CTC分离

[0099] 患者血液通过CTC-iChip (例如1.3M或1.4.5T版本) 运行, 并将样品收集在冰上的15mL锥形管中。如前所述设计和制造CTC-iChips (Ozkumur等, “Inertial Focusing for Tumor Antigen-Dependent and-Independent Sorting of Rare Circulating Tumor Cells,” Science Translational Medicine, 5 (179): 179ra47 (DOI: 10.1126/scitranslmed.3005616) (2013))。

[0100] 使用批准的方案将血液样品 (每个癌症患者约20ml) 收集在EDTA管中。然后将这些样品与针对CD45 (R&D Systems) 和CD66b (AbD Serotec, 内部生物素化) 的生物素化抗体一起孵育, 然后与 **Dynabeads®MyOne®** 链霉抗生物素蛋白T1 (Invitrogen) 一起孵育以实现白细胞的磁性标记 (Ozkumur等, 2013)。

[0101] 然后通过CTC-iChip处理样品, CTC-iChip将血液成分 (红细胞和白细胞和血小板) 以及未经结合的珠从CTC中分离出来。将CTC收集在溶液中, 同时将红细胞、血小板、未经结合的珠和经标记的白细胞收集在废物室中。该过程是自动化的, 并在1小时内处理10ml血液。

[0102] 2. 含罕见细胞的产物的体积减少和储存

[0103] 为了完全裂解产物中分离的所有细胞, 优选将产物体积从几毫升的典型起始体积减少至约100 μ l的终体积。这可以通过例如离心产物及重悬于pluronic缓冲液中以准备细胞裂解物和产生cDNA来实现。此时, 可以通过添加RNAlater™ (ThermoFisher) 然后在液氮中快速冷冻并在-80℃下储存来处理样品以进行长期储存。

[0104] 3. 从产物的细胞中分离RNA和产生cDNA

[0105] RNA分离步骤对于从细胞中完全释放所有RNA分子以准备RT-PCR的过程是重要的。

可以使用一步试管内反应来最小化在标准转移步骤期间可能发生的细胞和RNA损失的风险。例如,人们可以使用InvitrogenSuperScriptIII®First-StrandSynthesisSupermix®用于qRT-PCR试剂盒,通过将RT-PCR mastermix直接添加到颗粒化产物中,移液以完全裂解并根据试剂盒方案进行反应靶向1:1RNA:cDNA比例。一旦合成了cDNA,就将RNA酶H应用于反应以除去任何剩余的RNA。或者,如果人们想要在后面的步骤中对样品进行全转录组预扩增,可以使用SMARTer™ Ultra Low Input RNA Kit方案合成cDNA,该方案使用专有的寡核苷酸和逆转录酶。

[0106] 4. 在RT-PCR期间合成的cDNA的清除

[0107] 该方法中另一个有用但可选的步骤包括从含cDNA的溶液中除去裂解试剂。一旦含cDNA的溶液转移到ddPCR仪器中,苛刻的洗涤剂的存在可以导致ddPCR方法中使用的小滴不稳定。可以例如通过使用固相可逆固定法 (SPRI) 来完成洗涤剂去除。该技术使用经包被的磁珠以首先结合特定大小范围的cDNA,然后除去含洗涤剂的上清液,最后洗脱纯cDNA用于输入ddPCR仪器。除了RT-PCR的清除之外,SPRI过程还完成了cDNA的大小选择,这减少了进入该过程的ddPCR阶段的非靶cDNA分子的数量,这反过来降低了背景和噪音。

[0108] 5. 预扩增

[0109] cDNA的预扩增是任选的步骤,这增加了可以在小滴PCR步骤中检测到的模板分子的数量,从而改善了信噪比并增强了阳性读取的置信度。这可以是用于检测在CTC中以低水平表达的标志物以及用于分析含极少量可能的凋亡CTC的样品的非常有效的方法,例如在早期检测转移前疾病的背景下。已经修改了这两种方法以应用于d-CTC测定的工作流程。基于Fluidigm BioMark™嵌套PCR方案的特异性靶向扩增(STA)依赖于使用专门设计用于扩增小滴PCR步骤中所用探针靶向区域的引物(参见表2)。仔细设计这些引物并与其各自的荧光探针一起进行测试,以确保有效和特异性扩增而不会增加健康对照中的噪音。或者,基于SMARTer™超低输入RNA试剂盒方案的全转录组扩增依赖于产物中每种转录物的扩增,包括在WBC中发现的转录物和在CTC中发现的转录物,使用随机引物。

[0110] 6. 在小滴中包封cDNA和PCR试剂

[0111] 一旦已合成cDNA并纯化了污染的洗涤剂,溶液中的cDNA分子和qPCR试剂的整个聚集体被分成许多微小的区室化反应,例如,通过小滴制造仪器,例如小滴发生器,如Biorad自动化小滴发生器,每个样品产生20,000个小滴。每个反应由极小的非水性液体小滴组成,例如油(PCR稳定的,例如来自供应商的专有配方),其包含具有基因特异性引物和寡核苷酸探针的Taqman型PCR试剂,以及少量样品。一旦完成小滴产生,样品由含有大量单个PCR反应的乳液组成。

[0112] 对于该步骤,人们可以使用PCR探针和相关引物用于下表1中列出的任何一种或两种或多种不同靶基因以进行肿瘤负荷的总体测定,例如,以单一或多重反应的方式确定肿瘤进展或对疗法的响应。因此,尽管在一些情况下,可以在每个小滴中包含来自表1的特定基因的单组PCR引物和探针,但是也可以使用针对每种引物/探针组的不同荧光探针(鉴于CTC中基因表达的异质性,以最大化肿瘤细胞的检测)将每个小滴中的两种或多种不同基因的PCR引物和探针多重化。还可以将针对每个小滴中靶向不同癌症类型的多个基因的PCR引物和探针多重化,从而能够在单个测定中广泛但特异性地检测多种肿瘤类型。

[0113] 7. 小滴包封的cDNA分子的PCR

[0114] 使用qPCR循环条件对整个乳液样品进行标准PCR循环。反应进行45个循环以确保绝大多数单个小滴-PCR体积达到终点。这很重要,因为尽管用Taqman型qPCR试剂进行反应并在qPCR条件下循环,但在PCR循环期间不会测量样品的荧光强度,而是在下一步骤中测量。

[0115] 8. 阳性小滴的检测

[0116] 由于在进行任何荧光测量之前,每个单独的分区PCR都完全达到终点,因此每个单独的小滴是完全荧光或根本不含荧光的小滴。这使得能够简单地列举所有阳性(荧光)和阴性(无荧光)小滴。

[0117] 9. 分析

[0118] 因为上游RT-PCR靶向1:1RNA:cDNA比例,所以每个阳性小滴应代表单个起始RNA转录物。这种解释取决于远远超过靶cDNA分子数量的单个小滴的数量。在新的方法中,在一个极端,我们考虑分离和裂解单个CTC的可能性,释放一些RNA转录物,然后将其1:1逆转录成cDNA,分配,PCR扩增和计数。

[0119] 我们估计,在中度表达的基因(例如前列腺癌细胞中的KLK3基因)的情况下,每个细胞含有大约80至120个拷贝的KLK3 mRNA。Biorad QX200 ddPCR系统产生20,000个小滴,确保对于少量经分离的CTC和中度表达的靶基因,每个小滴永远不会有超过一个靶cDNA分子。另一方面,在CTC的数量达到数十或数百的情况下,对于中度表达的基因,每个小滴可能存在多个拷贝的靶cDNA。在这种情况下,可以使用泊松统计来估计起始转录物的近似数量。

[0120] 10. 检测和确定抗癌方案的功效

[0121] 最后一步包括检测癌细胞(例如CTC)中特定癌症特异性或谱系特异性基因高于通过健康供体对照确定的低背景水平的表达(例如,设置每毫升血液2.5个转录物),以确定特定抗癌方案是否预期对该患者的特定肿瘤有效。

[0122] 这些癌症特异性或谱系特异性基因的背景水平通过测量它们在许多没有癌症的患者的血液中的CTC(或外泌体)中的表达来确定(与针对给定类型的癌症的癌症患者年龄匹配)。然后通过许多患者的特定癌症疗法的开始和治疗期间监测它们的表达来评估这些癌症特异性或谱系特异性基因标志物的预测值,例如,6至12个月、15个月、18个月、21个月、24个月或更长时间,确定每个患者在每个时间段的无进展生存期和总生存期统计数据。然后将这些数据用于制作每个基因和每种抗癌治疗方案的参考标准,根据这些方案可以比较新的患者样品,以确定拟议的抗癌治疗方案是否可能对特定患者有效,如果是,与另一种潜在的治疗方案相比的有效程度。

[0123] 例如,在患有转移性去势抵抗性前列腺癌(“CRPC”)的患者中,当用抗雄激素疗法治疗时,与具有高表达水平的这两种基因的患者(例如,高于2.5个转录物/mL血液)相比,那些不高度表达基因HOXB13和FOLH1(PSMA)的患者(例如,低于每毫升血液2.5个转录物的水平)具有更好的总生存期和无进展生存期。

[0124] 特别地,通过将活CTC的微流体富集与来自CTC的RNA的数字定量相结合,本文所述的新方法提供了对前列腺癌连续非侵袭性取样的高度灵敏性和特异性的测定。该方法克服了迄今为止CTC分析的主要限制,即基于显微镜的混合细胞群内多种免疫荧光偶联抗体染色的定量,其相关的校准和多个荧光参数阈值的要求,然后手动验证单个图像。基于序列的方法具有非凡的高灵敏度和特异性,易于多路复用以同时询问多个标志物,与传统的细

胞成像方法相比,提供了极大改善的信号。在针对前列腺癌早期复发的一线疗法的男性试验组中,我们证明了正常前列腺转录物和异常RNA产物的定量CTC测量在告知治疗选择方面的潜在效用。

[0125] 从概念上讲,将基于数字RNA的PCR输出应用于微流体CTC富集的细胞群体具有许多重要的优点。在血流中使用经纯化的完整CTC作为RNA的来源确保测量的信号来源于侵袭性癌细胞,而不是正常组织,因此它使得能够使用不是癌症独特的基于RNA的标志物。复发性癌症特异性标志物在前列腺癌中很少见,这限制了基于突变的血浆DNA测序的应用。除了基于谱系的RNA标志物外,异常雄激素受体(“AR”)剪接形式在获得的激素疗法抗性中的作用需要基于血液的RNA测量。在这种情况下,来自血液样品的正常造血细胞的微流体消耗在保持CTC内的RNA完整性方面特别有效,其不经历抗体操作或固定,因此为数字PCR定量提供了极好的信号。随着微流体CTC分离,前列腺谱系转录物和前列腺癌特异性转录物的CTC信号的数字评分可以容易地自动化以进行高通量分析,使其成为临床应用的现实工具。

[0126] 最近对转移性前列腺癌的多种有效治疗方式的发展带来了识别可预测反应标志物的需要。迄今为止,最重要的标志物集中在雄激素受体持续活动的证明,雄激素受体是许多治疗方式的目标。在一些情况下已经证明了基于分子成像的测量雄激素信号传导的策略,但是基于血液的采样的可用性将极大地增强这种监测的效用。我们之前曾报道,用于雄激素驱动蛋白PSA相对于雄激素抑制蛋白PSMA表达的CTC评分可以转化为雄激素受体诱导基因(“AR-on”)相对于雄激素抑制基因(“AR-off”)的基于CTC免疫荧光的信号。

[0127] 在未接受过治疗的患者中,几乎所有CTC都有AR-on信号,在开始雄激素剥夺疗法(“ADT”)后转换为AR-off。然而,患有CRPC的患者最常显示AR-on和AR-off蛋白质信号的同时表达,与异常AR信号传导一致。在这种情况下,非AR靶基因HOXB13和FOLH1(PSMA)的CTC衍生表达的预测值与经改变的AR信号传导一致。HOXB13中的种系突变与前列腺癌的易感性增加相关,并且该基因编码AR的转录共激活因子,AR是已知的分化较少的前列腺癌的标志物,其也与ER阳性乳腺癌中的激素疗法抗性相关。FOLH1是前列腺谱系的成熟标志物,通常通过雄激素信号传导抑制,但在CRPC中与PSA共表达。因此,这些标志物在前列腺CTC中的过表达识别癌症,其中经改变的AR信号传导途径在恶性增殖中具有显著作用,降低雄激素合成抑制剂阿比特龙的有效性。

[0128] AR-V7最近成为获得性雄激素途径独立性的易于测量的替代物,预测对三或四线阿比特龙或恩杂鲁胺疗法的抗性。关于AR-V7测量的预测值的不一致结果很可能是由于不同的CTC或基于外泌体的检测测定,以及它们在不同治疗和疾病进展阶段的患者中的应用。例如,在大型回顾性临床试验中,在四线治疗前,只有3%的患者可在CTC中检测到AR-V7。

[0129] 在治疗前和治疗期间应用高灵敏度数字CTC测定和患者的连续取样为AR-V7阳性的显著性提供了新视角。首先,我们注意到在第一次疾病复发时未经治疗的患者中检测到这种剪接变体本身并不表示对阿比特龙的抗性;然而,AR-V7在药物治疗中的持续存在或出现是对不良结果的高度预测。在这种情况下,药物灵敏度肿瘤细胞可能被抑制,AR-V7可能直接测量抗药性肿瘤群体的出现。

[0130] 第二,观察到经改变的AR信号传导的下游指示(HOXB13和FOLH1)比AR-V7更常见地升高,并且在预处理CTC标本中测量时更能预测不良结果,这表明AR-V7是限制AR靶向疗法功效的多种机制之一。最近在高风险前列腺癌的初始治疗中应用紫杉醇和亮丙瑞林联合治

疗显示了如本文所述的风险分层的效用,使得能够在晚期疾病中进行个体化治疗。

[0131] 相同的技术可以用于确定用于其他类型癌症(包括黑素瘤和乳腺癌)的不同疗法的预期功效。例如,如表1中针对黑素瘤所示,可以使用本文所述的测定和方法测试以下治疗、治疗类别和药物的实例在特定患者中的预期功效。类似地,表2显示了用于治疗乳腺癌的药物和药物组合,其可以使用本文所述的测定和方法在特定患者中测试功效。

[0132] 表1

黑色素瘤治疗方案	治疗类别	药物
BRAFV600E 抑制剂	靶向疗法	维罗非尼、达拉非尼、康奈非尼
MEK 抑制剂	靶向疗法	考比替尼、曲美替尼、Binimetinib
Anti - CTLA4 抗体	免疫疗法	伊匹单抗
Anti - PD1 抗体	免疫疗法	派姆单抗、纳武单抗
CDK4/CDK6 抑制剂	靶向疗法	哌柏西利

[0134] 表2

单一疗法:	组合疗法:
内分泌治疗(包括 ESR1 抑制剂, Aromatase 抑制剂, SERDS)	内分泌疗法+ CDK 4/6 抑制剂
化疗	内分泌疗法+ PI3K 抑制剂
HER2 抑制剂	内分泌疗法+ mTOR 抑制剂
PI3K 抑制剂	化疗+ PARP 抑制剂
免疫疗法	化疗+ HER2 抑制剂

[0136] 实现CTC的谱系特异性鉴定的新的基因组

[0137] 如上所述,在周围正常血细胞的背景下对癌细胞高度特异的基因转录物的鉴定是该新方法的核心。虽然已知许多基因在癌细胞中表达程度更高,但绝大多数这些基因在正常组织(包括血液)中通常也具有至少有限的表达。鉴于该测定所需的非凡灵敏度,正常血细胞中完全缺乏信号对于血流中肿瘤细胞的高可信度鉴定是必不可少的。

[0138] 首先通过分析以下数据来选择用于检测血液中CTC的候选肿瘤特异性转录物:来自乳腺癌、前列腺癌、肺癌、胰腺癌、肝癌和黑素瘤的公开可用基因表达数据集以及我们实验室产生的从乳腺癌、前列腺癌和胰腺癌患者以及这些癌症的小鼠模型分离的CTC的单细胞RNA-Seq数据。选择其表达限于肿瘤且血液成分中不存在或检测不到的转录物用于进一步的下流分析。在正常血细胞中证明和验证完全不存在表达(在最高水平的灵敏度下,即数字PCR测定)是重要的。通常,基于计算模型或RNASeq数据预测的仅约10%的候选基因在人血液样品中确实是阴性的。

[0139] 特别地,最初通过分析以前来自人乳腺癌、前列腺癌、肺癌、胰腺癌、肝细胞癌和黑素瘤的基因表达数据集(微阵列和RNA-Seq)来鉴定用于检测CTC的候选肿瘤特异性mRNA转录物。用于该分析的特定公开可用数据集包括癌症基因组图谱(TCGA)(癌症基因组图谱,可从tcga-data.nci.nih.gov/tcga/tcgaHome2.jsp在线获得)和癌细胞系百科全书(CCLE)

(可在**broadinstitute.org/ccle/home**在线获得;另见Barretina等,The Cancer Cell Line Encyclopedia enables predictive modelling of anticancer drug sensitivity,Nature 483:603-607 (2012))。此外,分析了从患有乳腺癌、前列腺癌和胰腺癌的人患者分离的CTC的单细胞RNA-seq基因表达数据(GEO登录号GSE51827、GSE60407和GSE67980)(Aceto等,Circulating tumor cell clusters are oligoclonal precursors of breast cancer metastasis,Cell,158:1110-1122 (2014);Ting等,Single-Cell RNASequencing Identifies Extracellular Matrix Gene Expression by Pancreatic Circulating Tumor Cells,Cell Rep,8:1905-1918 (2014)和Miyamoto等,RNA-Seq of single prostate CTCs implicates noncanonical Wnt signaling in antiandrogen resistance,Science 349:1351-1356 (2015))。然后将通过这些数据库鉴定的肿瘤特异性转录物与人白细胞RNA-Seq基因表达数据进行比较(GEO登录号GSE30811、GSE24759、GSE51808、GSE48060、GSE54514和GSE67980)。然后选择显示显著差异表达的转录物用于进一步的下游分析,即在肿瘤中高表达且在白细胞中表达低或不可检测。此外,进行文献检索以选择另外的候选肿瘤特异性转录物。针对每种类型的人癌症选择50至100个候选基因。

[0140] 对于每种特定癌症类型的每种候选基因,设计2至4组PCR引物以跨越靶转录物的区域。引物由IDT(Integrated DNA Technologies)合成,探针用FAM或HEX、ZEN和IABkFQ标记以产生靶向扩增子中间的探针。我们的PCR引物设计方法在人CTC中成功应用基于数字PCR的mRNA转录物检测所必需的独特特征包括以下:1) 鉴于细胞mRNA转录物从5'端降解的倾向,每个mRNA转录物的3'末端的特异性靶向,特别是在未固定的脆弱细胞(如CTC)中;2) 设计引物以产生跨越内含子的扩增子,以排除污染的基因组DNA的无意扩增,例如经富集的CTC混合物中过量的污染的白细胞;3) 鉴于在一些情况下关于特定剪接变体的临床相关性的不确定性,设计包括放大给定基因的多个剪接变体的引物。

[0141] 首先使用源自癌细胞系(代表乳腺癌、前列腺癌、肺癌、胰腺癌和肝癌和黑素瘤)的cDNA通过qRT-PCR测试引物的特异性。对于每种类型的人癌症,培养2至5个已建立的癌细胞系并用于初始测试以评估PCR引物性能并评估指定癌症中靶转录物的表达。为了提供特异性的初始测试,使用相同的引物来评估来自未诊断为癌症的健康个体的白细胞中的靶转录物的表达。在该测试阶段测试来自至少五个不同健康个体的白细胞(男性和女性个体的混合-这取决于癌症的类型;即候选前列腺癌和乳腺癌基因需要分别只使用男性或女性健康供体)。

[0142] 使用细胞制备管与肝素钠(CPT)(Becton,Dickinson,和Co.,NJ)按照产物插入说明书从全血中分离出健康个体的白细胞。使用标准方法对癌细胞系和经分离的白细胞进行RNA提取和第一链cDNA合成。使用qRT-PCR(细胞系cDNA作为阳性对照,来自健康供体的白细胞cDNA作为阴性对照,以及水作为另外的阴性对照)测试每个基因的表达特异性(对于每个基因使用2至4个不同的引物组)。然后基于qRT-PCR测试选择存在于癌细胞系中但白细胞中不存在的转录物用于通过微滴式数字PCR进一步验证。通过该测试阶段的选择标准是高度严格的,并且要求qRT-PCR信号存在于至少一种癌细胞系中,并且在所有测试的健康供体白细胞样品中不存在。

[0143] 使用微滴式数字PCR进一步验证通过qRT-PCR测试阶段的靶转录物和特异性引物对。对于该测试阶段,使用CTC-iChip(参见,例如,Ozkumur等,"Inertial focusing for

tumor antigen-dependent and-independent sorting of rare circulating tumor cells,"Sci Transl Med,5,179ra147 (2013)) 来处理健康个体捐赠的全血液样品。CTC-iChip从全血中进行红细胞、血小板和白细胞的负耗尽,并产生血液细胞中富含的且不表达白细胞标志物的样品产物,包括CTC(不应存在于健康个体中)。对于每个血液样品,向来自CTC-iChip的产物补充RNA稳定化溶液(RNAlater®,Life Technologies)并使用标准进行RNA提取和cDNA合成处理。然后根据所测试的特异性引物对,使用微滴式数字PCR(Biorad, CA)来定量每个样品中存在的转录物数量。在此测试阶段通过微滴式数字PCR评估的样品包括来自癌细胞系的cDNA、来自通过CTC-iChip处理的健康供体的白细胞cDNA(每个待测试的引物对至少4个健康个体)和水(作为阴性对照)。

[0144] 通过微滴式数字PCR测试的标准是严格的,包括:1) 癌细胞系中存在转录物信号(至少一个具有>10个阳性小滴的细胞系);2) 通过阳性和阴性(空)小滴之间的信号分离表示的优异的信噪比;3) 健康供体中的小滴信号极少或不存在(每个健康供体<3个小滴);4) 水中没有小滴信号(0个阳性小滴)。

[0145] 然后使在上述微滴式数字PCR测试中特异性地在细胞系中而不是在白细胞中扩增转录物的引物经历信号灵敏度的详细测试。使用单细胞显微操作,将精确数量的癌细胞(1、5、10、25和50个细胞)掺入健康个体捐赠的全血中,然后通过CTC-iChip进行处理。然后如上处理每个样品用于使用微滴式数字PCR进行测试,并评估灵敏度以确保信号足以满足期望的临床应用。

[0146] 使用qRT-PCR和微滴式数字PCR评估候选基因和引物的上述严格程序产生了由以下组成的最终引物列表:每种类型癌症的50至100个候选基因的初始列表的约10%(总共约400个初始候选基因)。然后使用在IRB批准的临床方案下采集的在MGH癌症中心接受癌症治疗的癌症患者捐赠的血液样品进一步评估这些引物在患者CTC中的信号。这部分评估的关键是与从未经诊断出癌症的健康个体采集的血液进行比较。下表3列出了迄今为止使用这些方法开发的用于使用微滴式数字PCR特异性检测来自患有前列腺癌、乳腺癌、肝细胞癌、胰腺癌、肺癌和黑素瘤癌症的患者的CTC的引物和探针。

[0147] 虽然可以使用每种癌症类型的单个基因,但每个组内存在多个基因对于灵敏度(在其表达模式中甚至在个体患者中CTC是异质性的)和特异性都是有用的(多个基因信号的检测增加了其代表真实癌症细胞特征的信心)。

[0148] 下表3提供的基因列表包括特定类型癌症特有的转录物(例如,前列腺或乳腺癌或肝癌的高度特异性标志物),以及几种癌症类型共有的基因(例如所有上皮癌类型)(因此可以作为泛癌标志物)和在某些条件下诱导的基因(例如,前列腺癌中的活性雄激素信号传导或乳腺癌中的活性雌激素信号传导)。因此,为每种类型的癌症分配了特定的基因组,其被设计用于针对给定癌症类型的最佳灵敏度、特异性和临床可操作信息。

[0149] 此外,表4中描述的引物被设计成预扩增表3中列出的一些基因,同时保持其高特异性。如果STA是一种选择方法,这些嵌套引物成为每个癌症组的附加组分。

[0150] 不同类型癌症的基因列表

[0151] 下表3提供了基因名称列表(具有(Genbank ID)和序列识别号(SEQ ID NO)),以及它们具有选择性的癌症类型(Br:乳腺,Lu:肺,Li:肝,Pr:前列腺,Panc:胰腺,Mel:黑色素瘤)。此外,针对每个基因(引物1和2)列出了优化的引物组,以及用于标记探针的荧光引物

探针(例如,6-FAMTM(蓝色荧光标记)或HEXTM(绿色荧光标记))的组成,以及用于数字PCR产物的最佳可视化的ZEN-31ABkFQ淬灭剂。

[0152] 表3

基因	疾病	Seq ID	引物2	Seq ID	引物1	Seq ID	探针
AGR2 (10551)	Br, Lu, Li, Pr	1	CTG ACA GTT AGA GCC GAT ATC AC	2	CAA TTC AGT CTT CAG CAA CTT GAG	3	/56-FAM/ATG CTT ACG /ZEN/AAC CTG CAG ATA CAG CTC /31ABkFQ/
ALDH1A3 (220)	Br, Lu, <u>Panc</u>	4	GGT GGC TTT AAA ATG TCA GGA A	5	TGT CGC CAA GTT TGA TGG T	6	/56-FAM/TTT TCA CTT /ZEN/CTG TGT ATT CGG CCA AAG C/31ABkFQ/
CADPS2 (93664)	Br, Li, Lu, Mel	7	CTC TGC ATT TTT GGA CAT AGG AG	8	GCC TTG CAC TTC CAT TAT GAC	9	/56-FAM/TCC GAC GTG /ZEN/GTA CTG TCA TTC ACC T/31ABkFQ/
CDH11 (1009)	Br, Lu, <u>Panc</u>	10	GAG GCC TAC ATT CTG AAC GC	11	GTG GTT CTT TCT TTT GCC TTC TC	12	/56-FAM/CAT CCT CGC /ZEN/CTG CAT CGT CAT TCT /31ABkFQ/
CDH3 (1001)	Br, Li, Mel	13	GTT TCA TCC TCC CTG TGC TG	14	GCT CCT TGA TCT TCC GCT TC	15	/56-FAM/CTG CTG GTG /ZEN/CTG CTT TTG TTG GT/31ABkFQ/
COL8A1 (1295)	Br, Lu	16	GAT GCC CCA CTT GCA GTA	17	CCT CGT AAA CTG GCT AAT GGT	18	/56-FAM/AGT ATC CAC /ZEN/ACC TAC CCC AAT ATA TGA AGG AAA /31ABkFQ/
EGFR (1956)	Br, Lu, Li, <u>Panc</u>	19	CTG CTG CCA CAA CCA GT	20	TTC ACA TCC ATC TGG TAC GTG	21	/56-FAM/CTG CCT GGT /ZEN/CTG CCG CAA ATT C/31ABkFQ/
FAT1 (2195)	Br, Lu, Li, Mel, Pr, <u>Panc</u>	22	GAT CCT TAT GCC ATC ACC GT	23	ATC AGC AGA GTC AAT CAG TGA G	24	/56-FAM/TCT TGT CAG /ZEN/CAG CGT TCC CGG /31ABkFQ/
FAT2 (2196)	Br, Lu	25	CCT GGA TGC TGA CAT TTC TGA	26	TCC TCC ACT CAT CTC CAA CT	27	/56-FAM/ACC TGC TAC /ZEN/ATC ACA GAG GGA GAC C/31ABkFQ/
FOLH1 (2346)	Pr	28	CAA TGT GAT AGG TAC TCT CAG AGG	29	TGT TCC AAA GCT CCT CAC AA	30	/56-FAM/ATG AAC AAC /ZEN/AGC TGC TCC ACT CTG A/31ABkFQ/
HOXB13 (261729)	Br, Lu, Pr	31	CAG CCA GAT GTG TTG CCA	32	CTG TAC GGA ATG CGT TTC TTG	33	/56-FAM/CAG CAT TTG /ZEN/CAG ACT CCA GCG G/31ABkFQ/
KLK2 (3817)	Pr	34	GCT GTG TAC AGT CAT GGA TGG	35	GTC TTC AGG CTC AAA CAG GT	36	/56-FAM/TGG CTA TTC /ZEN/TTC TTT AGG CAA TGG GCA /31ABkFQ/
KLK3 (354)	Pr	37	GTG TGC TGG ACG CTG GA	38	GTG ATA CCT TGA AGC ACA CCA TTA C	39	/56-FAM/AAA GCA CCT /ZEN/GCT CGG GTG ATT CT/31ABkFQ/
LSAMP (4045)	Mel	40	CAC ATT TGA GTG AAG CTT GTC G	41	GCG GAT GTC AAA CAA GTC AAG	42	/56-FAM/TCC AAG AGC /ZEN/AAT GAA GCC ACC ACA /31ABkFQ/
MAGEA6-RM1 (4105)	Mel	43	GAA GGA GAA GAT CTG CCA GTG	44	GCT GAC TCC TCT GCT CAA G	45	/56-FAM/TTG CCC TGA /ZEN/CCA GAG TCA TCA TGC /31ABkFQ/

[0153]

[0154]

基因	疾病	Seq ID	引物2	Seq ID	引物1	Seq ID	探针
MET (4233)	Br, Li, Lu, <u>Panc</u>	46	CCA GTA GCC TGA TTG TGC AT	47	TGT CAG TGA TTC TGT TCA AGG A	48	/56-FAM/AGT CAT AGG /ZEN/AAG AGG GCA TTT TGG TTG T/3IABkFQ/
MLANA (2315)	Mel	49	ACT CTT ACA CCA CGG CTG A	50	CCA TCA AGG CTC TGT ATC CAT	51	/56-FAM/AAG ACT CCC /ZEN/AGG ATC ACT GTC AGG A/3IABkFQ/
NPY1R (4886)	Br, Lu	52	GGA TCT GAG CAG GAG AAA TAC C	53	GAA TTC TTC ATT CCC TTG AAC TGA	54	/56-FAM/AGC AGG AGC /ZEN/GAA AAA GAC AAA TTC CAA AG/3IABkFQ/
OCLN (100506658)	Br, Lu, Li	55	AAG ATG GAC AGG TAT GAC AAG TC	56	ACT CTT TCC ACA TAG TCA GAT GG	57	/56-FAM/TGC AGA CAC /ZEN/ATT TTT AAC CCA CTC CTC G/3IABkFQ/
PDZRN3 (23024)	Mel	58	TGT CCT GGC TGT TCA TTC TG	59	TGG ATC CCT ATC TCT TGC CA	60	/56-FAM/AGC TCC TCC /ZEN/CTG TCC ATC TCC T/3IABkFQ/
PGR (5241)	Br	61	GGC AAT TGG TTT GAG GCA A	62	GGA CTG GAT AAA TGT ATT CAA GCA	63	/56-FAM/ACA AGA TCA /ZEN/TGC AAG TTA TCA AGA AGT TTT GTA AGT T/3IABkFQ/
PKP3 (11187)	Br, Li, Lu, <u>Panc</u>	64	CTG GTG GAG GAG AAC GG	65	GGT CGC TGG ATG AAA GGT T	66	/56-FAM/AGT GTC CGC /ZEN/AGC AGC TCG AA/3IABkFQ/
PMEL (6490)	Mel	67	CAG GCA TCG TCA GTT TCC T	68	ACA CAA TGG ATC TGG TGC TAA	69	/56-FAM/TTT GGC TGT /ZEN/GAT AGG TGC TTT GCT G/3IABkFQ/
PPL (5493)	Br, Lu, Li	70	GAG GAG AGA ATC AAC AAA CTG C	71	AGG TTC AGG TAC TCC TTC CAG	72	/56-FAM/AGG AAC TCC /ZEN/ATT GAG GCG CAC AT/3IABkFQ/
RXRG (6258)	Mel	73	ATA CTT CTG CTT GGT GTA GGC	74	AGC CAT TGT ACT CTT TAA CCC A	75	/56-FAM/CTC TGA GGT /ZEN/GGA GAC TCT GCG AGA /3IABkFQ/
RND3 (390)	Br, Lu, Li, <u>Mel, Panc</u>	76	CCG AGA ATT ACG TTC CTA CAG TG	77	GCG GAC ATT GTC ATA GTA AGG A	78	/56-FAM/ACG GCC AGT /ZEN/TTT GAA ATC GAC ACA C/3IABkFQ/
S100A2 (6273)	Br, Lu, Li, <u>Panc</u>	79	CTG CCT TGC TCT CCT TCC	80	CTT ACT CAG CTT GAA CTT GTC G	81	/56-FAM/ACC TGG TCT /ZEN/GCC ACA GAT CCA TG/3IABkFQ/
SCGB2A1 (4246)	Br	82	ACT TCC TTG ATC CCT GCC A	83	GTC TTT TCA ACC ATG TCC TCC A	84	/56-FAM/CCA TGA AGC /ZEN/TGC TGA TGG TCC TCA /3IABkFQ/
SFRP1 (6422)	Mel	85	CAA TGC CAC CGA AGC CT	86	CTT TTA TTT TCA TCC TCA GTG CAA AC	87	/56-FAM/TGT GAC AAC /ZEN/GAG TTG AAA TCT GAG GCC /3IABkFQ/
SOX10 (6663)	Mel	88	CTT GTC ACT TTC GTT CAG CAG	89	CTT CAT GGT GTG GGC TCA	90	/56-FAM/TTG TGC AGG /ZEN/TGC GGG TAC TGG /3IABkFQ/

基因	疾病	Seq ID	引物2	Seq ID	引物1	Seq ID	探针
SCHLAP1/SET4 (101669767)	Pr	91	TCC TTG GAT GAC TCT CCC TAC	92	AGA TAC CAC CTC CCT GAA GAA	93	/56-FAM/CCA ATG ATG /ZEN/AGG AGC GGG ATG GAG /3IABkFQ/
SCHLAP1 SET 5	Pr	94	AGA GGT TTA ATG GGC TCA CAG	95	CTC TGG TCT GTC GTC ATG TAA G	96	/56-FAM/ACA TGC CTT /ZEN/TCA CCT TCT CCA CCA /3IABkFQ/
AMACR (23600)	Pr	97	CAC ACC ACC ATA CCT GGA TAA T	97	TCA CTT GAG GCC AAG AGT TC	99	/56-FAM/AGA AAC GGA /ZEN/GGT CCA GCC AAG TTC /3IABkFQ/
AR Variant 7/SET1 (367)	Pr	100	CTT TCT TCA GGG TCT GGT CAT T	101	CTT GTC GTC TTC GGA AAT GTT ATG	102	/56-FAM/AAG CAG GGA /ZEN/TGA CTC TGG GAG AAA /3IABkFQ/
AR Variant 7 SET 3	Pr	103	GAG GCA AGT CAG CCT TTC T	104	TGT CCA TCT TGT CGT CTT CG	105	/56-FAM/TGA AGC AGG /ZEN/GAT GAC TCT GGG AGA /3IABkFQ/
AR Variant 12 SET 1	Pr	106	GCT CAC CAT GTG TGA CTT GA	107	TGG GAG AGA GAC AGC TTG TA	108	/56-FAM/TGA TTG CGA /ZEN/GAG AGC TGC ATC AGT /3IABkFQ/
AR Variant 12 SET 4	Pr	109	GAA AGT CCA CGC TCA CCA T	110	GCA GCC TTG CTC TCT AGC	111	/56-FAM/TGA TTG CGA /ZEN/GAG AGC TGC ATC AGT /3IABkFQ/
UGT2B15 SET 1 (7366)	Pr	112	CTC TGC ACA AAC TCT TCC ATT TC	113	TTT CCT CGC CCA TTC TTA CC	114	/56-FAM/TTG GCT GGT /ZEN/TTA CAG TGA AGT CCT CC/3IABkFQ/
UGT2B15 SET 5	PR	115	GGA AGG AGG GAA CAG AAA TCC	116	GTG AGC TAC TGG CTG AAC TAT T	117	/56-FAM/TGG CTA CAC /ZEN/ATT TGA GAA GAA TGG TGG A/3IABkFQ/
AFP SET 1 (174)	Li	118	AGG AGA TGT GCT GGA TTG TC	119	TCT GCA TGA ATT ATA CAT TGA CCA C	120	/56-FAM/AAT GCT GCA /ZEN/AAC TGA CCA CGC TG/3IABkFQ/
AFP SET 2	Li	121	ACT GCA GAG ATA AGT TTA GCT GAC	122	TCA CCA TTT TGC TTA CTT CCT TG	123	/56-FAM/TTG CCC AGT /ZEN/TTG TTC AAG AAG CCA C/3IABkFQ/

[0155]

基因	疾病	Seq ID	引物2	Seq ID	引物1	Seq ID	探针
STEAP2 (261729)	Br, Lu, Pr, Panc	124	CAT GTT GCC TAC AGC CTC T	125	TCT CCA AAC TTC TTC CTC ATT CC	126	/56-FAM/ACA TGG CTT /ZEN/ATC AGC AGG TTC ATG CA/3IABkFQ/
TEAD3 (7005)	Br, Lu, Li	127	GAA GAT CAT CCT GTC AGA CGA G	128	CTT CCG AGC TAG AAC CTG TAT G	129	/56-FAM/AGC GTG CAA /ZEN/TCA ACT CAT TTC GGC /3IABkFQ/
TFAP2C (7022)	Br, Lu, Mel	130	GAT CAG ACA GTC ATT CGC AAA G	131	GAC AAT CTT CCA GGG ACT GAG	132	/56-FAM/ACA GGG GAG /ZEN/GTT CAG AGG GTT CTT /3IABkFQ/
TMPRSS 2 (7113)	Pr	133	CCC AAC CCA GGC ATG ATG	134	TCA ATG AGA AGC ACC TTG GC	135	/56-FAM/ACC CGG AAA /ZEN/TCC AGC AGA GCT /3IABkFQ/
GPC3 (2719)	Li	136	TGC TGG AAT GGA CAA GAA CTC	137	GCT CAT GGA GAT TGA ACT GGT	138	/56-FAM/TCC TTG CTG /ZEN/CCT TTT GGC TGT ATC T/3IABkFQ/
ALB (219)	Li	139	CTT ACT GGC GTT TTC TCA TGC	140	CCA ACT CTT GTA GAG GTC TCA AG	141	/56-FAM/ACA TTT GCT /ZEN/GCC CAC TTT TCC TAG GT/3IABkFQ/
G6PC SET 1 (2538)	Li	142	GGA CCA GGG AAA GAT AAA GCC	143	GCA AGG TAG ATT CGT GAC AGA	144	/56-FAM/ACA GCC CAG /ZEN/AAT CCC AAC CAC AAA /3IABkFQ/
G6PC SET 2	Li	145	CAT TTT GTG GTT GGG ATT CTG G	146	GAT GCT GTG GAT GTG GCT	147	/56-FAM/CTG TCA CGA /ZEN/ATC TAC CTT GCT GCT CA/3IABkFQ/
PRAME (23532)	Mel	148	GCC TTG CAC TTC CAT TAT GAC	149	CTC TGC ATT TTT GGA CAT AGG AG	150	/56-FAM/CAA GCG TTG /ZEN/GAG GTC CTG AGG C/3IABkFQ/
AHSG (197)	Li	151	ATG TGG AGT TTA CAG TGT CTG G	152	AGC TTC TCA CTG AGT GTT GC	153	/56-FAM/CCA CAG AGG /ZEN/CAG CCA AGT GTA ACC /3IABkFQ/
GPR143 (4935)	Mel	154	ACG GCT CCC ATC CTC CT	155	CCA CTA TGT CAC CAT GTA CCT G	156	/56-FAM/TTT GCC ACG /ZEN/AGA ACC AGC AGC /3IABkFQ/
PTPRZ1 (5803)	Mel	157	TGC TCT GAC AAC CCT TAT GC	158	GGC TGA GGA TCA CTT TGT AGA	159	/56-FAM/AGG CCA GGA /ZEN/GTC TTT GCT GAC ATT /3IABkFQ/

基因	疾病	Seq ID	引物2	Seq ID	引物1	Seq ID	探针
MUC11 (118430)	Br	160	CAT CAG CAG GAC CAG TAG C	161	TGT CTG TGC TCC CTG ATC T	162	/56-FAM/ACT CCC AAG /ZEN/AGT ACC AGG ACT GCT /3IABkFQ/
PIP (5304)	Br	163	TCA TTT GGA CGT ACT GAC TTG G	164	CTT GCT CCA GCT CCT GTT C	165	/5HEX/CCT GCT CCT /ZEN/GGT TCT CTG CCT G/3IABkFQ/
PGR (5241)	Br	166	GGT GTT TGG TCT AGG ATG GAG	167	ACT GGG TTT GAC TTC GTA GC	168	/56-FAM/AGT GGG CAG /ZEN/ATG CTG TAT TTT GCA C/3IABkFQ/
TFAP2C (7022)	Br, Lu	169	GTG ACT CTC CTG ACA TCC TTA G	170	CCA TCT CAT TTC GTC CTC CAA	171	/56-FAM/TTC GGC TTC /ZEN/ACA GAC ATA GGC AAA GT/3IABkFQ/
SCGB2A1 (4246)	Br	172	ACT CTG AAA AAC TTT GGA CTG ATG	173	TCT AGC AAT CAA CAG ATG AGT TCT	174	/56-FAM/TAG CCC TCT /ZEN/GAG CCA AAC GCC /3IABkFQ/
FAT1 (2195)	Br, Lu, Pr	175	AGC TCC TTC CAG TCC GAA T	176	GTC TGC TCA TCA ATC ACC TCA	177	/56-FAM/ATC CCA GTG /ZEN/ATA CCC ATT GTC ATC GC/3IABkFQ/
FAT2 (2196)	Br, Lu, Pr	178	GGA CAG AGA GAA CAA GGA TGA AC	179	TGT GGG AGA ATA TAG GTG GAT TG	180	/56-FAM/TGG AGG TGA /ZEN/CTG TGC TGG ACA ATG /3IABkFQ/
RND3 (390)	Br, Lu	181	GCT TTG ACA TCA GTA GAC CAG AG	182	CTG TCC GCA GAT CAG ACT TG	183	/56-FAM/ACA GTG TCC /ZEN/TCA AAA AGT GGA AAG GTG A/3IABkFQ/
SFTPB (6439)	Lu	184	CCT GGA AAA TGG CCT CCT T	185	CAT TGC CTA CAG GAA GTC TGG	186	/56-FAM/CCG ATG ACC /ZEN/TAT GCC AAG AGT GTG AG/3IABkFQ/
SCGB3A2 (117156)	Lu	187	CCA GAG GTA AAG GTG CCA AC	188	TCC CAG ATA ACT GTC ATG AAG C	189	/56-FAM/AAG GCA GTA /ZEN/GCA GAG TAA CTA CAA AGG C/3IABkFQ/
SERPINA3 (12)	Br, Lu	190	CCT CAA ATA CAT CAA GCA CAG C	191	GGA AGC CTT CAC CAG CAA	192	/56-FAM/TAG CAG TCT /ZEN/CCC AGG TGG TCC A/3IABkFQ/
SFRP2 (6423)	Br, Lu	193	TTG CAG GCT TCA CAT ACC TT	194	GCC CGA CAT GCT TGA GT	195	/56-FAM/TTT CCC CCA /ZEN/GGA CAA CGA CCT TT/3IABkFQ/
CRABP2 (1382)	Br, Lu	196	CTC TTG CAG CCA TTC CTC TT	197	CCC TTA CCC CAG TCA CTT CT	198	/56-FAM/TTT CTT TGA /ZEN/CCT CTT CTC TCC TCC CCT /3IABkFQ/
AQP4 (361)	Lu	199	TGG ACA GAA GAC ATA CTC ATA AAG G	200	GGT GCC AGC ATG AAT CCC	201	/56-FAM/CCG ATC CTT /ZEN/TGG ACC TGC AGT TAT CA/3IABkFQ/
TMPS54 (56649)	Br, Lu	202	ATC TTC CCT CCA TTC TGC TTC	203	CAG TTC CCA CTC ACT TTC TCA G	204	/56-FAM/CTC ACT CCA /ZEN/GCC ACC CCA CTC /3IABkFQ/
GREM1 (26585)	Lu	205	TTT TGC ACC AGT CTC GCT T	206	GCC GCA CTG ACA GTA TGA G	207	/56-FAM/CCT ACA CGG /ZEN/TGG GAG CCC TG/3IABkFQ/

[0156]

基因	疾病	Seq ID	引物2	Seq ID	引物1	Seq ID	探针
FOX1 (2294)	Lu	208	CGA CTG CGA GTG ATA CCG	209	CTC TCC ACG CAC TCC CT	210	/56-FAM/CTG CAC CAG /ZEN/AAC AGC CAC AAC G/3IABkFQ/
NKX2-1 (7080)	Lu	211	TGC CGC TCA TGT TCA TGC	212	CAG GAC ACC ATG AGG AAC AG	213	/56-FAM/CCC GCC ATC /ZEN/TCC CGC TTC A/3IABkFQ/
NKX2-1 (7080)	Lu	214	AAG ATG TCA GAC ACT GAG AAC G	215	CGA AGC CCG ATG TGG TC	216	/56-FAM/ATG TCG ATG /ZEN/AGT CCA AAG CAC ACG A/3IABkFQ/
AFP (174)	Li	217	AGGAGATGTGCTGGATTGTC	218	TCTGCATGAATTATACATTGAC CAC	219	/56-FAM/AAT GCT GCA /ZEN/AAC TGA CCA CGC TG/3IABkFQ/
AHSG (197)	Li	220	ATGTGGAGTTACAGTGTCTG G	221	AGCTTCTCACTGAGTGTGTC	222	/56-FAM/CCA CAG AGG /ZEN/CAG CCA AGT GTA ACC /3IABkFQ/
ALB (213)	Li	223	GAG ATC TGC TTG AAT GTG CTG	224	CAA CAG AGG TTT TTC ACA GCA T	225	/56-FAM/AGA TAT ACT /ZEN/TGG CAA GGT CCG CCC /3IABkFQ/
ALB (213)	Li	226	CAT GGT AGG CTG AGA TGC TTT	227	GAC GAT AAG GAG ACC TGC TTT G	228	/56-FAM/ACT TGT TGC /ZEN/TGC AAG TCA AGC TGC /3IABkFQ/
ALB (213)	Li	229	GCG CAT TCT GGA ATT TGT ACT C	230	GCT ATG CCA AAG TGT TCG ATG	231	/56-FAM/ACC TCT TGT /ZEN/GGA AGA GCC TCA GAA /3IABkFQ/
APOH (350)	Li	232	TGA TGG ATA TTC TCT GGA TGG C	233	CCT GAA TCT TTA CTC TCT CTC CTT G	234	/56-FAM/CCA GTT TCC /ZEN/CAG TTT GGT ACA TTC TAT TTC C/3IABkFQ/
FABP1 (2168)	Li	235	GCA CTT CAA GTT CAC CAT CAC	236	ACC AGT TTA TTG TCA CCT TCC A	237	/56-FAM/AAC CAC TGT /ZEN/CTT GAC TTT CTC CCC TG/3IABkFQ/
FGB (2244)	Li	238	ACA TCT ATT ATT GCT ACT ATT GTG TGT T	239	TGG GAG CCT CTT CTC TCT TC	240	/56-FAM/ACC CTC CTC /ZEN/ATT GTC GTT GAC ACC /3IABkFQ/
FGG (2266)	Li	241	TTC ATT TGA TAA GCA CAC AGT CTG	242	ACC TTG AAC ATG GCA TAG TCT G	243	/56-FAM/TGC CAT TCC /ZEN/AGT CTT CCA GTT CCA C/3IABkFQ/
GPC3 (2719)	Li	244	AATCAGCTCCGCTTCCTTG	245	TGCTTATCTCGTTGTCCTCG	246	/56-FAM/TTC CAG GCG /ZEN/CAT CAT CCA CAT CC/3IABkFQ/
RBP4 (5950)	Li	247	CAG AAG CGC AGA AGA TTG TAA G	248	TCT TTC TGA TCT GCC ATC GC	249	/56-FAM/AGG CTG ATC /ZEN/GTC CAC AAC GGT T/3IABkFQ/
TF (7018)	Li	250	AGA AGC GAG TCC GAC TGT	251	CAC TGC ACA CCA TCT CAC A	252	/56-FAM/CCA GAC ACA /ZEN/GCC CCA GGA CG/3IABkFQ/

[0157] 注意,PRAME也被称为MAPE(在肿瘤中优先表达的黑素瘤抗原)、OIP4(Opa-相互作用蛋白OIP4)和CT130(癌/睾丸抗原130)。

[0158] 下表4列出了设计用于特异性预扩增表3中列出的引物靶向的区域的嵌套引物。

[0159] 表4

引物名称	Seq ID	嵌套正向引物	Seq ID	嵌套反向引物
FAT1	253	CAG ATG GAG GAG GAA GAT TCT G	254	GTA TAC TGC CTG GAG TTC TCT G
FAT2	255	CTG GTT CAG GTC TCC ATT ACA G	256	GCT GTG ACT CTG AGC AAG TA
AGR2	257	TGT CCT CCT CAA TCT GGT TTA TG	258	GAC AGA AGG GCT TGG AGA TTT
PKP3	259	CGG TGG CGT TGT AGA AGA T	260	AGA AGA TCT CTG CCT CCG A
RND3	261	CAA GAT AGT TGT GGT GGG AGA C	262	AGG GTC TCT GGT CTA CTG ATG
TFAP2C	263	TTTGGATTACCGCTTGGG	264	GACTCCAGTGTGGGAGAG
S100A2	265	GGG CCC ACA TAT AAA TCC TCA C	266	CTG CTG GTC ACT GTT CTC ATC
PRAME	267	CTTCGCGGTGTGGTGAA	268	GCTGTGTCTCCCGTCAAA
PIP	269	CTG GGA CAC ATT GCC TTC T	270	CCA CCA TGC ATT CTT TCA ATT CT
PGR	271	AAA CCC AGT TTG AGG AGA TGA G	272	CCC TGC CAA TAT CTT GGG TAA T
SCGB2A1	273	ACA GCA ACT TCC TTG ATC CC	274	GCG GCA TCA CTG TCT ATG AA
MUCL1	275	CCT TGC CTT CTC TTA GGC TTT	276	AGC AGT GGT TTC AGC ATC A
PGR	277	CAG ATA ACT CTC ATT CAG TAT TCT TGG	278	CTC TAA TGT AGC TTG ACC TCA TCT
TFAP2C	279	GAG AAG TTG GAC AAG ATT GGG	280	GCT GAG AAG TTC TGT GAA TTC TTT A
SCGB2A1	281	GTT TCC TCA ACC AGT CAC ATA GA	282	AGT TGT CTA GCA GTT TCC ACA TA

[0160]

[0161]

引物名称	Seq ID	嵌套正向引物	Seq ID	嵌套反向引物
FAT1	283	GGG AAA GCC TGT CTG AAG TG	284	TCG TAG CCT CCA GGG TAA TAG
FAT2	285	GTT ACA GGT CTC CTA TCT ACA GC	286	GCT CAG CCT CTC TGG AAG
RND3	287	CTC TCT TAC CCT GAT TCG GAT G	288	GGC GTC TGC CTG TGA TT
SFTPB	289	CCT GAG TTC TGG TGC CAA AG	290	GGG CAT GAG CAG CTT CAA
SCGB3A2	291	CCA CTG GCT TGG TGG ATT T	292	TCA ACA GAA ATG CCC AGA GTT
SERPINA3	293	CTT CTC CAG CTG GGC ATT	294	TGC TGT GGC AGC AGA TG
SFRP2	295	CGG TCA TGT CCG CCT TC	296	GCG TTT CCA TTA TGT CGT TGT C
CRABP2	297	CCC TCC TTC TAG GAT AGC G	298	AAC CCG GAA TGG GTG AT
AQP4	299	AAACGGACTGATGTCCTG	300	TGGACAGAAGACATACTCATAAAGG
TMPRSS4	301	CCCCTGCTTCAGGAAACATA	302	GTCAGACATCTTCCTCCATTC
GREM1	303	GCCGCACTGACAGTATGA	304	CAGAAGGAGCAGGACTGAAA
FOXF1	305	AGC GGC GCC TCT TAT ATC	306	GCG TTG AAA GAG AAG ACA AAC T
NKX2-1	307	CTA CTG CAA CGG CAA CCT	308	GGG CCA TGT TCT TGC TCA
NKX2-1	309	CAG ACT CGC TCG CTC ATT T	310	CCT CCA TGC CCA CTT TCT T
PIP	311	CCCAAGTCAGTACGTCAAAT	312	GCCTAATCCCGAATAACATCAAC
AGR2	313	GCT TTA AAG AAA GTG TTT GCT G	314	CTG TAT CTG CAG GTT CGT AAG

引物名称	Seq ID	嵌套正向引物	Seq ID	嵌套反向引物
SOX10	315	AAG TTC CCC GTG TGC ATC	316	CTC AGC CTC CTC GAT GAA
MAGEA6	317	GTGAGGAGGCAAGGTTCTG	318	GGCTCCAGAGAGGGTAGTT
TFAP2C	319	TTTGGATTACCGCTTGGG	320	GACTCCAGTGTGGGAGAG
PRAME	321	CTTCGCGGTGTGGTGAA	322	GCTGTGTCTCCGTCAAA
GPR143	323	ATC CTG CTG TAT CAC ATC ATG	324	CTG ACA GGT TTC AAA GAA CCT
PMEL	325	CCAGTGCCTTTGGTTGCT	326	CAAGAGCCAGATGGGCAAG
MLANA	327	TGCCAAGAGAAGATGCTCAC	328	CATTGAGTGCCAACATGAAGAC
PTPRZ1	329	AAG AAG CTG CCA ATA GGG AT	330	TGT CCA GAG AGG TGG ATG

[0162] CTC-芯片产物基因转录物的多重数字化分析

[0163] 为了改善从源自CTC的最小量RNA的肿瘤特异性mRNA的检测,我们建立了能够测试来自微量CTC-芯片产物的许多不同基因转录物的多重测定。这结合了使用多个独立基因的更高灵敏度/特异性与输入模板的量受限的事实(因此不应稀释成多个反应)。我们的测定包括每个反应4个基因,通过选择不同比例的荧光缀合引物,每个基因在二维空间中独特地分辨。因此,在单一反应中,我们可以独立测量4种基因转录物而无需稀释模板。对于不同的

癌症,我们已经进行了多达4种不同反应(即多达20种不同的基因转录物),并且通过应用嵌套RT-PCR数字测定,可以进行的反应数量没有限制。

[0164] 该多重策略在分析多种转录物之间实现理想的平衡(并因此确保抵抗癌细胞表达模式的异质性变化),但不通过进行多个独立的PCR反应来稀释输入材料。根据肿瘤类型和最佳信号所需的基因数量,我们开发了2至4种多重反应(每种多重反应检测4个基因)的测定。因此,在没有过度稀释输入模板的情况下,我们可以询问单个CTC的产物,以表达8至16个不同基因的任何地方。重要地,该测定能够添加来自所有这些基因的信号(即累积信号),同时还具有单独的基因结果(以优化单个基因水平的信号/噪音,并且还收集来自特定信号传导途径(每个基因都会询问-例如前列腺CTC中的雄激素信号传导)的信息)。

[0165] 为了在单个视图中显示多重反应的结果(并因此区分每个基因的扩增是分离的),我们改变了两种荧光探针(FAM(蓝色)和HEX(绿色))的浓度。通过这样做,每个单独的基因扩增反应具有反映基因特异性引物的组成的FAM/HEX信号的独特组合,并因此鉴定基因特异性PCR产物。在二维空间中,我们可以说明由单一多重反应产生的4种不同基因扩增产物的信号位置。当应用于使用小滴包封每个PCR反应的数字PCR时,该方法通过修改定量显示的阳性小滴的二进制信号幅度将靶标分离成单个簇。如所预测的,该方法允许多个基因的总信号的累积评分(例如,总共4重反应中的16个标志物),同时还保留量化来自每个单个基因靶标的信号的能力。

[0166] 实现特定抗癌治疗方案的潜在功效的谱系特异性预测的新基因组

[0167] 实际上,所有患有转移性前列腺癌的患者在雄激素剥夺疗法(ADT)后经历初始临床反应。随着肿瘤发展去势抵抗,半数患者在用强效雄激素合成抑制剂阿比特龙(例如ZYTIGA®)治疗后具有持续的第二缓解,而其他患者仅具有短暂的反应并且因此将受益于替代或组合疗法。为了测试来自CTC的信号是否提供ADT后抗雄激素疗法反应的预测标志物,我们前瞻性地评估了25例患有转移性CRPC的患者,这些患者在一线治疗期间开始使用阿比特龙疗法。

[0168] 值得注意,治疗前基线的CTC评分升高可预测早期进展,这种效果是由CTC中FOLH1(PSMA)和HOXB13的表达所驱动的。这些标志物都与异常雄激素受体(“AR”)信号传导有关,并且HOXB13与更具侵袭性的激素难治性前列腺癌有关。HOXB13和FOLH1 CTC的信号之间的相关性对于放射学无进展生存期(HOXB13, $P=0.015$; FOLH1, $P=0.015$)以及总生存期率(HOXB13, $P=0.017$; FOLH1, $P=0.017$)是明显的。相反,治疗前血清PSA蛋白水平与总生存期率降低相关,但它不表示无影像学无进展生存期或PSA进展,并且不再与治疗开始后的结果相关。

[0169] d-CTC检测方法的应用

[0170] 在手术切除或照射时上皮癌症的早期检测提供了最佳的治愈机会,并且在最小化癌症传播的情况下施用辅助化疗远比治疗既定转移性疾病在实现治愈上更有效。与早期检测同样重要的是选择适当的抗癌疗法。本文所述的新方法使用d-CTC测定方法不仅提供特定类型癌症的早期检测,而且与适当的参考标准组合,根据他或她的肿瘤基因表达谱,可以用于确定和比较不同治疗方案在特定患者中的预测功效。

[0171] 本文所述的d-CTC测定可以用于初始筛选和确定最佳治疗方案。使用本文所述的新d-CTC测定(其中每个CTC(无论完整或预凋亡程度)可以产生数百个分子信号)显著增强

了检测和监测患有已知癌症的患者的CTC的能力,并定量监测和分析他们对治疗干预措施的反应。除了通过分子标志物对细胞数进行评分之外,可以以相当的灵敏度实现突变的特异性询问或癌症相关的重排(例如,肺癌中的EML4-ALK)。

[0172] 如下文实施例中所讨论的,本文描述的新方法以前列腺癌做说明,其中分析证明了在治疗前基线的CTC评分升高可预测早期进展,这效果是由CTC内FOLH1 (PSMA) 和HOXB13的表达驱动的。

[0173] 实施例

[0174] 在以下实施例中进一步描述本发明,这些实施例不限制权利要求书中描述的本发明的范围。

[0175] 实施例1-材料和方法

[0176] 在下面的实施例组中使用以下材料和方法。

[0177] 数字CTC分析协议

[0178] 该实施例提供了可以用于本文所述方法的一般数字CTC测定方案。在下述实施例2中使用该一般方案的不同方面。

[0179] 1. 患者血液通过I-Chip (版本1.3M或1.4.5T) 运行。将样品收集在冰上的15mL锥形管中。

[0180] 2. 在4℃下旋转样品。将上清液倾析,并将SUPERase[™] In (DTT非依赖性RNA酶抑制剂)+**RNA Later®**稳定化溶液(通过抑制RNA酶阻止RNA降解)添加到沉淀中。将样品快速冷冻并在-80℃下放置,直至进一步处理。样品稳定在-80℃。

[0181] 3. 在下述实施例中使用两种不同的用于RNA纯化的处理方案进行cDNA合成。

[0182] 方法1

[0183] a. 将样品在冰上解冻。

[0184] b. 使用洗涤剂(NP40, Tween20)直接裂解样品。

[0185] c. 直接取出经裂解的样品用于cDNA合成(Superscript III)。

[0186] d. cDNA合成后,通过SPRI (Agencourt**AMPure®**XP珠)清除纯化样品以清除洗涤剂和任何<100bps的核苷酸。

[0187] 方法2

[0188] a. 将样品在冰上解冻。

[0189] b. 在RNeasy Qiagen MicroKit上处理样品。与传统的Qiagen建议相比,方法有一些细微的变化。使用更高体积的Buffer RLT (裂解缓冲液)以及更高的ETOH浓度。由于将**RNA Later®**添加到样品中,因此进行了这些修改。

[0190] c. cDNA合成后,通过SPRI (Agencourt AMPure XP珠子)清除纯化样品以清除洗涤剂和任何<100bps的核苷酸。

[0191] 4. cDNA (通过方法1或2合成)可以以两种不同的方式处理:

[0192] a. 直接使用cDNA用于ddPCR;或

[0193] b. 使用Fluidigm BioMark[™]嵌套PCR方法扩增cDNA (来自用于嵌套PCR的基因的引物已经预先验证)。稀释经扩增的cDNA。

[0194] 5. 添加cDNA (来自步骤4a或4b的)、用于探针的Biorad Supermix[™]和引物(对于目标基因;可以多路复用多达4种不同的引物(FAM和HEX)),总体积为22μl。

- [0195] 6.产生小滴(每孔约15,000至18,000个小滴)。
- [0196] 7.将小滴样品放入PCR仪器中。PCR条件与Biorad建议不同。我们使用步降而不是慢坡来确保所有小滴达到相同的温度。这与RainDance和Biorad使用的不同。通过步降而不是慢坡可以获得更好的结果(即,阳性、阴性小滴之间的更多信号和更多分离)。
- [0197] 8.PCR后,在ddPCR仪器中计数阳性小滴。
- [0198] 9.使用TIBCO®Spotfire®分析软件收集和分析数据。
- [0199] 试剂、试剂浓度和反应体积如下:
- [0200] 试剂:
- [0201] • 用于探针的Biorad ddPCR™Supermix(无dUTP)
 - [0202] • IDT引物/探针(20x或40x)
 - [0203] • cDNA(细胞系1ng/μl)
 - [0204] • 无核酸酶水
 - [0205] • Eppendorf半裙96孔板(仅这些板与仪器配合使用)
- [0206] 测试相关细胞系
- [0207] 每个单个反应:
- | | |
|----------------|--------|
| ddPCR Supermix | 11.0μl |
| 引物(20x) | 1.10μl |
| cDNA(1ng/μl) | 1.10μl |
| 水 | 8.80μl |
| 总计每孔 | 22.0μl |
- [0209] 将含有ddPCR supermix、cDNA和水的主混合物等分到孔中,并向每个孔中添加1.1 μl每种引物并充分混合。
- [0210] 患者样品
- [0211] 个体基因的每个反应
- | | |
|----------------|-----------------|
| ddPCR Supermix | 11.0μl |
| 引物(20x) | 1.1μl |
| cDNA(患者)高达 | 9.9μl(如果少,用水平衡) |
| 总计 | 22.0μl 每孔 |
- [0213] 多个基因的每个多重反应

	ddPCR Supermix	11.0μl
	引物 1 (40x)	55μl
	引物 2 (40x)	55μl
[0214]	引物 3 (40x)	55μl
	引物 4 (40x)	55μl
	<u>cDNA (患者)</u>	<u>8.8μl</u>
	总计每孔	22.0μl

[0215] 当针对基因特异性引物测试多个患者或针对多个基因多重化引物时,将包含 ddPCRsupermix和引物的主混合物等分到孔中,然后向每个孔中添加患者cDNA并充分混合。

[0216] 患者和临床标本

[0217] 诊断为前列腺癌的患者提供了两种机构审查委员会批准的方案之一,DF/HCC 05-300或DF/HCC 13-209的知情同意书。患者捐赠20mL血液用于CTC分析,包括患有转移性前列腺癌的患者和患有局限性前列腺癌的患者。在处理微滴式数字PCR之前,将来自患者的福尔马林固定的石蜡包埋的原发性肿瘤组织切片,并进行RNA提取(见下文)。

[0218] 循环肿瘤细胞分离

[0219] 如前所述,使用微流体CTC-iChip在白细胞耗尽后从新鲜全血中分离CTC。为了最大限度地回收具有高质量RNA的完整CTC,在从患者收集血液样品后4小时内处理血液样品。在实验室中接收新鲜血液样品后,CTC分离的总时间约为2.5小时。简而言之,将全血样品品掺入针对CD45 (R&D Systems,克隆2D1)、CD66b (AbD Serotec,克隆80H3) 和CD16 (Janssen Diagnostics) 的生物素化抗体,然后与Dynabeads MyOne链霉抗生物素蛋白T1 (Invitrogen) 一起孵育以实现磁性标记和白细胞的消耗。在用CTC-iChip处理全血并在冰上收集经富集的CTC产物后,将细胞以4750rpm离心并在 **RNAlater®** (Ambion) 存在下在液氮中快速冷冻以保持RNA完整性。

[0220] 微滴式数字PCR

[0221] 使用RNeasy Plus Micro Kit (Qiagen) 对CTC样品进行RNA提取,然后使用 SuperScript III First-Strand Synthesis System (Life Technologies) 进行逆转录。在96孔板中将cDNA和引物/探针与用于探针 (Bio-Rad) 的ddPCR Supermix组合,并加载到Bio-Rad的自动小滴发生器上。使用改进的45循环PCR扩增小滴,在变性和退火步骤之间降温70℃。热循环后,使用QX200小滴读数器系统 (Bio-Rad) 通过荧光检测经扩增的小滴。

[0222] 使用公众可用的数据库以及单细胞RNA-seq数据产生潜在基因候选物的列表。开发了用于验证这些基因的使用RT-PCR和ddPCR的两步法。在第一步中,使用ABI 7500和Bio-Rad CFX96实时PCR系统针对引物测试从健康供体白细胞和前列腺细胞系 (LNCaP、PC3、VCaP) 制备的cDNA。使用BD **Vacutainer®**CPT™细胞制备管从雄性健康供体分离白细胞。使用RNeasy Micro Kit (Qiagen) 从经分离的白细胞和前列腺癌细胞系中提取总RNA,并用 SuperScript III First-Strand Synthesis System (Life Technologies) 逆转录500ng。每个RT-PCR反应使用1ng总cDNA。在第二步中通过RT-PCR对健康供体白细胞中缺乏且在细胞系中表达的基因使用ddPCR进行进一步验证。使用ddPCR平台针对基因测试从健康供体雄

性和患者的CTC-iChip产物制备的cDNA。使用通过小滴计数确定的健康供体和患者之间的差异表达,来选择用于测定的基因(表5)。

[0223] 表5每个基因使用的最后引物和探针的序列

基因	正向 5'-3'	SEQ ID NO:
TMPRSS2	TCA ATG AGA AGC ACC TTG GC	SEQ ID NO:331
FAT1	ATC AGC AGA GTC AAT CAG TGA G	SEQ ID NO:332
KLK2	GTC TTC AGG CTC AAA CAG GT	SEQ ID NO:333
STEAP2	TCT CCA AAC TTC TTC CTC ATT CC	SEQ ID NO:334
KLK3	GTG TGC TGG ACG CTG GA	SEQ ID NO:335
HOXB13	CTG TAC GGA ATG CGT TTC TTG	SEQ ID NO:336
AGR2	CAA TTC AGT CTT CAG CAA CTT GAG	SEQ ID NO:337
FOLH1	TGT TCC AAA GCT CCT CAC AA	SEQ ID NO:338
基因	反向 5'-3'	
TMPRSS2	CCC AAC CCA GGC ATG ATG	SEQ ID NO:339
FAT1	GAT CCT TAT GCC ATC ACC GT	SEQ ID NO:340
KLK2	GCT GTG TAC AGT CAT GGA TGG	SEQ ID NO:341
STEAP2	CAT GTT GCC TAC AGC CTC T	SEQ ID NO:342
KLK3	GTG ATA CCT TGA AGC ACA CCA TTA C	SEQ ID NO:343
HOXB13	CAG CCA GAT GTG TTG CCA	SEQ ID NO:344
AGR2	CTG ACA GTT AGA GCC GAT ATC AC	SEQ ID NO:345
FOLH1	CAA TGT GAT AGG TAC TCT CAG AGG	SEQ ID NO:346
基因	探针 5'-3'	
TMPRSS2	ACC CGG AAA CC AGC AGA GCT	SEQ ID NO:347
FAT1	TCT TGT CAG CAG CGT TCC CGG	SEQ ID NO:348
KLK2	TGG CTA TTC TTC TTT AGG CAA TGG GCA	SEQ ID NO:349
STEAP2	ACA TGG CTT ATC AGC AGG TTC ATG CA	SEQ ID NO:350
KLK3	AAA GCA CCT GCT CGG GTG ATT CT	SEQ ID NO:351
HOXB13	CAG CAT TTG CAG ACT CCA GCG G	SEQ ID NO:352
AGR2	ATG CTT ACG AAC CTG CAG ATA CAG CTC	SEQ ID NO:353
FOLH1	ATG AAC AAC AGC TGC TCC ACT CTG A	SEQ ID NO:354

[0225] 细胞掺入(cell spiking)

[0226] 为了测试ddPCR测定的检测限,使用CTC-iChip进行一系列细胞掺入实验。使用10 μ m EppendorfTransferMan®NK2转移尖端将单个LNCaP细胞操作到Kolliphor P188缓冲液中,并掺入健康供体雄性血液中。如上所述,准备加标样品用于处理并通过CTC-iChip运行。从CTC-iChip产物制备并分离RNA和cDNA,并使用反应1和2在ddPCR上运行。

[0227] 实施例2-使用前列腺谱系转录物产生CTC数字信号

[0228] 鉴于基于荧光的成像和与污染的血细胞混合的CTC评分所固有的局限,我们测试了基于RNA的数字PCR定量是否可以提供更高的通量、更灵敏且更详细的读数。来自血液样品的造血细胞的微流体(CTC-iChip)耗尽实现了CTC的10⁴至10⁵倍纯化,每1mL经处理的全血中剩余约500个WBC。纯化的CTC中的高质量RNA允许应用新的高度稳健的数字小滴PCR技术,其中罕见的cDNA模板被包封在脂质小滴内,然后进行PCR扩增和阳性小滴的荧光评分。来自血液的CTC的微流体全细胞分离和来自CTC的转录物的基于RNA的数字PCR的组合(d-CTC测定)允许使用前列腺组织谱系特异性mRNA作为监测转移性前列腺癌的高度特异性标志物(图1)。

[0229] 为了测试该策略在前列腺CTC检测中的应用,我们首先确定了一组前列腺特异性转录物,其表达在正常造血细胞中几乎不存在,甚至在高灵敏度小滴-PCR扩增后也是如此。

我们选择了多种标志物,都可以解决前列腺癌细胞的已知异质性,以及允许询问细胞信号传导途径,包括雄激素受体活性。我们从单个前列腺CTC的RNA测序(Miyamoto等,Science 2015;349:1351-6。)以及公开可用的表达数据库中得到了初始的一组40个候选基因。

[0230] 鉴定出二十九种转录物在前列腺组织和/或前列腺癌中具有高水平的表达,但在正常血细胞中污染的微流体CTC-iChip产物没有可检测的RNA读数(图2和3)。针对一组8个基因优化了多个引物和条件,这些基因一起在与正常血细胞混合的罕见前列腺癌细胞中提供最强大的信号。这些基因包括雄激素应答转录物KLK3、KLK2和TMPRSS2;雄激素抑制的转录物FOLH1 (PSMA) 和HOXB13;和雄激素非依赖性转录物FAT1、AGR2和STEAP2。为了避免稀释罕见模板同时能够扩增多种标志物,我们设计了多重测定(每个反应有4个基因的2个反应),FAM和HEX荧光的不同相对比例,以确定经扩增的产物的特性(图4)。开发了一种多类支持向量机(SVM)分类器算法,以根据它们在FAM-HEX坐标系上的位置,自动对小滴进行分类(图5)。

[0231] 为了验证该测定,我们首先微量操作来自前列腺癌细胞系LNCaP的单个细胞,并将它们引入来自健康供体的2.5mL全血中,然后通过CTC-iChip和微滴式数字PCR定量进行处理。将单个LNCaP细胞引入对照血液样品中,产生150个阳性小滴($SD=65.3$),随着信号的逐渐增加,将3个、5个、10个和50个细胞掺入血液样品中(对于50个前列腺细胞输入, 5562 ± 1853 个小滴)(图6)。8个前列腺谱系转录物中的信号分布与LNCaP细胞输入数量的增加保持相当。

[0232] 实施例3-患有转移性前列腺癌患者的CTC评分

[0233] 我们在12位患有转移性前列腺癌的患者中测试了d-CTC检测策略,与8位患有局限性前列腺癌的患者,34位男性健康血液供体($19 > 50$ 岁; $15 < 50$ 岁)和5位女性对照进行了比较。所有8种标志物上观察到的信号示于图7A中。使用19位年龄匹配的男性对照(> 50 岁)和12位患有转移性前列腺癌的患者,我们为高于对照中值中值2个标准差的8个基因中的每一个建立了信号阈值,并给出了每个基因的不同信号强度。我们将这些中的每一个与CRPC患者和年龄匹配对照之间的中位差异成比例(参见实施例1),从而得到数字CTC评分。与0/34健康男性血液供体相比,11/12(92%)患有转移性前列腺癌的患者存在阳性数字CTC评分(图7B)。在这些严格的标准下,12位局限性前列腺癌患者中没有一人具有可检测的CTC评分(图7B)。有趣地,虽然我们在监测患有转移性前列腺癌的患者中建立了最高特异性的评分标准,但在一些患有局限性癌症的患者中存在低水平数字信号。在健康个体中,50岁的男性比 < 50 岁的男性具有更高的背景信号,并且在女性对照中几乎没有信号存在(图7B)。

[0234] 为了将数字CTC测定与更传统的基于免疫荧光的CTC检测进行比较,从25位患有mCRPC的患者中获得了治疗前血液样品,这些患者参加了在一线治疗方案的阿比特龙的前瞻性临床试验。通过CTC-iChip处理每个血液样品,并且在基于免疫荧光的显微镜评分与d-CTC测定之间平均分配输出。如预期的,微观评分和数字读数之间的一致性在具有大量CTC的样品中是明显的,但是d-CTC测定在识别低于显微镜检测的情况下更加灵敏,甚至使用复杂的基于多光谱荧光的成像。 $(R^2=0.01; P=0.6; \text{图7C})$ 。对于在一线治疗方案中具有mCRPC的患者,总数字CTC信号与血清PSA蛋白测量值中度相关($R^2=0.16; P=0.049$)(图7D)。血液样品中肿瘤来源的PSA蛋白水平也与来自CTC的KLK3 (PSA) mRNA的定量适度相关($R^2=0.18; P=0.038; \text{图7E}$)。综合考虑,这些观察结果表明,数字CTC评分测量了患有转移性前列腺癌

的患者的疾病负担,但通过将多个AR依赖性和独立转录物整合到血液中的侵袭性肿瘤细胞中,似乎提供了有关疾病状态的信息,这是非重叠的并且可能与血清PSA蛋白测量正交。

[0235] 实施例4-检测CTC中的AR-V7和TMPRSS2-ERG前列腺癌特异性转录物

[0236] 虽然复发性错义突变在前列腺癌中很罕见,但两种特异性RNA融合转录物是这种肿瘤类型的特征。为了补充CTC中基于前列腺谱系的转录物的定量,我们开发了针对50%病例中存在的TMPRSS2-ERG融合转录物和AR-V7 RNA剪接变体的小滴PCR测定,其构成了对抗雄激素治疗抗性的标志物。当应用于掺入对照血液样品中的前列腺细胞系然后进行CTC-iChip纯化时,两种测试都是高度特异性和灵敏的(图8A和8B)。当应用于患有转移性前列腺癌的男性的血液样品时,在他们的CTC中,13位(38%)mCRPC患者中的5位具有TMPRSS2-ERG易位,11位(85%)具有AR-V7剪接变异体,3位(23%)具有两种转录物(图8C)。来自12位年龄匹配的供体的血液样品对于两种转录物都是阴性的(图8D)。如预期的,其CTC为TMPRSS2-ERG阳性的男性具有档案原发性肿瘤,其基本上与该标志物一致(图8E)。相反,来自CTC的AR-V7信号实际上在匹配的原发性前列腺癌中不存在(图8F),与其作为在晚期CRPC背景中出现的标志物的表征一致。

[0237] 实施例5-对进行一线阿比特龙治疗的患者的前瞻性连续监测

[0238] 实际上,所有患有转移性前列腺癌的患者在雄激素剥夺疗法(ADT)后经历初始临床反应。随着肿瘤发展去势抵抗,半数患者在用强效雄激素合成抑制剂阿比特龙治疗后持续第二次缓解,而其他患者仅具有短的反应,因此将受益于替代疗法或联合疗法。为了测试来自CTC的信号是否提供ADT后抗雄激素治疗反应的预测标志物,我们前瞻性地评估了25例患有转移性CRPC的患者,这些患者在一线治疗方案期间开始使用阿比特龙治疗。

[0239] 我们首先在基线预处理时间点(C1D1),2周(C1D15)、4周(C2D1)、12周(C4D1)的治疗中时间点以及疾病进展和停止治疗时应用前列腺谱系CTC评分(图9A和9B)。值得注意的是,治疗前基线(C1D1)的CTC评分升高可预测早期进展,这种效果是由CTC中FOLH1(PSMA)和HOXB13的表达所驱动的。这两种标志物都与异常的雄激素受体信号传导有关,并且HOXB13与更具侵袭性的激素难治性前列腺癌有关。HOXB13和FOLH1 CTC的信号之间的相关性对于放射学进展(HOXB13, $P=0.015$;FOLH1, $P=0.015$)以及总生存期(HOXB13, $P=0.017$;FOLH1, $P=0.017$)是明显的。相反,治疗前血清PSA蛋白水平与总生存期率降低相关,但它不表示放射学进展或PSA进展,并且它不再与治疗开始后的结果相关。

[0240] 已经在二线或更高治疗方案下的患有转移性CRPC的患者中检测到AR-V7表达,并且已经显示当施用到患有这种晚期疾病的患者时预测对阿比特龙的获得性抗性。使用数字CTC测定,在预处理基线时间点测试的4/20患者中可检测到AR-V7。在该一线治疗方案中,AR-V7的定量检测不能预测放射学进展或总生存期。然而,对这些患者的连续监测表明AR-V7的预测值在前三个疗程中增加,在使用3个月时间点时对放射学进展($P=0.026$)和的总生存期率($P<0.001$)实现高预测值。该观察结果与开始抑制易感肿瘤细胞增殖的抗雄激素疗法一致,在早期复发的患者中出现AR-V7驱动的抗性疾病。与AR-V7相反,TMPRSS2-ERG易位不作为抗雄激素治疗的功能而富集,并且与获得性抗性无关。

[0241] AR-V7剪接变体测量与抗雄激素抗性相关的几种机制之一,而HOXB13和FOLH1的表达是异常雄激素信号传导的下游指标。因此,在我们预期的一线阿比特龙组中从患者抽取的预处理CTC中,我们比较了这些正交标志物的单独或组合的预测值(图10)。HOXB13或

FOLH1的阳性信号鉴定了8/11 (73%) 的患者继续进行早期放射学进展和5/6 (83%) 的患者具有缩短的总生存期(图10C至10F)。在同一时间点,AR-V7阳性鉴定了3/11 (27%) 的患者具有放射学进展和2/6 (33%) 的患者具有差的总生存期(图10A至10B)。所有AR-V7阳性患者也对HOXB13/FOLH1表达进行评分,因此组合这两种标志物并未单独提高HOXB13/FOLH1评分的预测值。与AR-V7阳性的3/8 (38%) 和3/5 (60%) 相比,在3个月的治疗时间点(C4D1),HOXB13/FOLH1评分鉴定了7/8 (88%) 的患者具有预定的放射学进展,5/5 (100%) 具有缩短的总生存期。总而言之,来自CTC的数字信号分析为首次复发去势抗性疾病的患者提供了一种新的且潜在有效的预测评估和疾病监测策略。

[0242] 实施例6-CTC中持久性雌激素受体信号传导鉴定对抗激素疗法具有抗性的转移性乳腺癌患者

[0243] 在患有激素受体阳性(“HR+”)疾病的患者中,当用靶向雌激素信号传导途径的药物(例如ER抑制剂(如他莫昔芬)、选择性ER降解剂(“SERD”,如氟维司群)和芳香酶抑制剂(AI)(其阻断雌激素(例如,阿那曲唑、来曲唑和依西美坦)的产生,例如与CDK4/6抑制剂组合)治疗时,与雌激素信号传导相关的六基因抗性信号(“RS”)的持续表达与不良结果相关,包括较短的进展时间(TTP)和较差的总生存期(OS) ($p=0.02$ (OS), $p=0.003$ (TTP))。

[0244] 只一半的RS评分高的患者存在ESR1突变,这表明其他药物难治性雌激素信号传导机制的参与。因此,CTC的数字RNA评分能够早期监测治疗反应,并提供对细胞内ER信号传导途径的药物作用的非侵袭性测量的潜力。

[0245] 患者

[0246] 患者通过机构审查委员会批准的CTC收集协议(DFHCC 05-300)同意。对于该测定的初始临床基准测试,从总共78个独特患者中收集10至20ml外周血(平均17ml),代表85个样品。这些包括来自23个I期、24个II期和8个III期独特患者的预处理样品,以及来自23个独特IV期患者的30个治疗中样品。从血库获得33个来自女性健康供体(HD)的样品(平均体积9ml)。

[0247] 为了确定通过乳腺CTC-ddPCR测定的CTC监测是否可预测治疗结果和总生存期,我们前瞻性地收集了开始新疗法(TRACK组)的转移性乳腺癌患者的治疗前和治疗3至4周的提取物。从52名患者中收集至少一份样品;50%的患者接受了某种形式的内分泌疗法,10%的患者接受了化疗,13%的患者接受了抗HER2疗法,而其余患者接受了不属于这些类别的任何疗法。为了验证在TRACK组的测定开发的初始阶段建立的测定检测特征,我们还在可疑的乳房X线照片发现后收集了来自10名具有阴性乳房活检的健康女性的样品。

[0248] 微流体CTC富集

[0249] 上面已经描述了通过负RBC、WBC和血小板的阴性选择来从全血富集CTC的CTC-iChip技术。简而言之,将8至20ml全血与针对WBC标志物CD45(R&D Systems,克隆2D1)、CD66b(AbD Serotec,克隆80H3)和CD16(Janssen Diagnostics)的生物素化抗体一起孵育。然后添加Dynabeads MyOne链霉抗生物素蛋白T1(Invitrogen)以标记WBC。随后将血液通过CTC-iChip喂养,其中通过基于尺寸的分选除去RBC和血小板,同时磁性耗尽WBC。将富含CTC的产物离心,在RNA-later后保存(Ambion)并快速冷冻以长期储存。

[0250] 标志物选择和CTC信号评分

[0251] 关于乳腺癌中表达但全血中不表达的标志物,通过文献检索和内部采选和公开可

用的数据集(包括 **GTeX®**和 **Oncomine®**) 选择17种乳腺CTC标志物(AGR2、CXCL13、CXCL14、EFHD1、FAT1、FAT2、MGP、MUC16、PGR、PIP、PRAME、SCGB2A1、SERPINA3、SFRP1、SFRP2、TMPRSS4、WFDC2)。最终乳腺癌测定中使用的特定基因和IDT探针列于表6中。

[0252] 表6

引物名称	Entrez 基因 ID	IDT DNA 测定	ddPCR 引物说明	ddPCR 引物 1	SEQ ID NO	ddPCR 引物 2	SEQ ID NO	ddPCR 探针
AGR2	10551	Hs.PT. 58.386 83802	HEX "第一" 探针	CTG ACA GTT AGA GCC GAT ATC AC	378	CAA TTC AGT CTT CAG CAA CTT GAG	379	/5HEX/ATG CTT ACG /ZEN/AAC CTG CAG ATA CAG CTC /3IABkFQ/ (SEQ ID NO:355)
AGR2	10551	HS.PT. 58.206 15543	FAM, "第二" 探针	GTT TGT CCT CCT CAA TCT GGT	380	GTG ATA TCG GCT CTA ACT GTC AG	381	/56-FAM/TGA CAA ACA /ZEN/CCT TTC TCC TGA TGG CC/3IABkFQ/(SEQ ID NO:356)
CXCL13	10563	Hs.PT. 58.458 01487	FAM 探针	TCA GCA GCC TCT CTC CA	382	GGG CAA GAT TTG AAT TCG ATC A	383	/56-FAM/TGT AGA TGT /ZEN/GTC CAA GAG AGC TCA GTC T/3IABkFQ/(SEQ ID NO:357)
CXCL14	9547	Hs.PT. 58.192 73291	FAM 探针	GCT ACA GCG ACG TGA AGA AG	384	GAC CTC GGT ACC TGG ACA	385	/56-FAM/AAA TGA AGC /ZEN/CAA AGT ACC CGC ACT G/3IABkFQ/(SEQ ID NO:358)
EFHD1	80303	Hs.PT. 58.275 34728	FAM 探针	TCG ATG TGG CCC TGG AG	386	TTC CGC TCA TCT TGC TCA G	387	/56-FAM/TCT TTG AAG /ZEN/CCA AGG TCC AAG CCT /3IABkFQ/(SEQ ID NO:359)
FA T1	2195	Hs.PT. 58.457 75110	HEX "第一" 探针	ATC AGC AGA GTC AAT CAG TGA G	388	GAT CCT TAT GCC ATC ACC GT	389	/5HEX/TCT TGT CAG /ZEN/CAG CGT TCC CGG /3IABkFQ/(SEQ ID NO:360)
FA T1	2195	HS.PT. 58.148 59907	FAM, "第二" 探针	AGC TCC TTC CAG TCC GAA T	390	GTC TGC TCA TCA ATC ACC TCA	391	/56-FAM/ATC CCA GTG /ZEN/ATA CCC ATT GTC ATC GC/3IABkFQ/(SEQ ID NO:361)
FA T2	2196	Hs.PT. 58.248 46942	HEX "第一" 探针	TCC TCC ACT CAT CTC CAA CT	392	CCT GGA TGC TGA CAT TTC TGA	393	/5HEX/ACC TGC TAC /ZEN/ATC ACA GAG GGA GAC C/3IABkFQ/(SEQ ID NO:362)
FA T2	2196	HS.PT. 58.383 2648	FAM, "第二" 探针	GGA CAG AGA GAA CAA GGA TGA AC	394	TGT GGG AGA ATA TAG GTG GAT TG	395	/56-FAM/TGG AGG TGA /ZEN/CTG TGC TGG ACA ATG /3IABkFQ/(SEQ ID NO:363)
MGP	4256	HS.PT. 58.635 768	FAM 探针	GGATTAAGT TCATAAGAT TCCATGCT	396	CTTCGGCTTT GATATCGTT TCAG	397	/56-FAM/CATGTGATT/ZEN/CCTGGGCA CGATGC/3IABkFQ/(SEQ ID NO:364)
MUC16	94025	Hs.PT. 58.354 3722	FAM 探针	GAC AAC AAC CAC CTT CAA TAC AC	398	AGA TCC AGG ACC GAT GGT T	399	/56-FAM/AGC CTC TTT /ZEN/ACT CCT CTG ACC ACA CC/3IABkFQ/(SEQ ID NO:365)
PGR	5241	Hs.PT. 58.156 6542	HEX "第一" 探针	GGA CTG GAT AAA TGT ATT CAA GCA	400	GGC AAT TGG TTT GAG GCA A	401	/5HEX/ACA AGA TCA /ZEN/TGC AAG TTA TCA AGA AGT TTT GTA AGT T/3IABkFQ/(SEQ ID NO:366)
PG	5241	Hs.Pt.5	FAM,	GGT GTT TGG	400	ACT GGG TTT	400	/56-FAM/AGT GGG CAG /ZEN/ATG

[0253]

[0254]

R		8.5045 8902	"第二" "探针"	TCT AGG ATG GAG	2	GAC TTC GTA GC	3	CTG TAT TTT GCA C/3IABkFQ/(SEQ ID NO:367)
PIP	5304	Hs.PT. 58.191 65954	FAM, "第二" "探针"	CAG TGC TTG CAG TTC AAA CAG	4 0 4	CCA GTA GAA GGT TTT TGG ATT GTC	4 0 5	/56-FAM/TGA GGT AAG /ZEN/TTT TAA CCA CCA TGC ATT CTT TC/3IABkFQ/(SEQ ID NO:368)
PIP	5304	Hs.PT. 58.398 68280	HEX " 第一" "探针"	TCA TTT GGA CGT ACT GAC TTG G	4 0 6	CTT GCT CCA GCT CCT GTT C	4 0 7	/5HEX/CCT GCT CCT /ZEN/GGT TCT CTG CCT G/3IABkFQ/(SEQ ID NO:369)
PR AM E	2353 2	Hs.PT. 58.452 81469	HEX " 第一" "探针"	GCA ACA AGT GAC TGA GAC CTA	4 0 8	GTC CAC ACA CTC ATG CTG AT	4 0 9	/5HEX/CAA GCG TTG /ZEN/GAG GTC CTG AGG C/3IABkFQ/(SEQ ID NO:370)
SC GB 2A 1	4246	Hs.PT. 58.864 035	HEX " 第一" "探针"	GTC TTT TCA ACC ATG TCC TCC A	4 1 0	ACT TCC TTG ATC CCT GCC A	4 1 1	/5HEX/CCA TGA AGC /ZEN/TGC TGA TGG TCC TCA /3IABkFQ/(SEQ ID NO:371)
SC GB 2A 1	4246	HS.PT. 58.255 26882	FAM, "第二" "探针"	ACT CTG AAA AAC TTT GGA CTG ATG	4 1 2	TCT AGC AAT CAA CAG ATG AGT TCT	4 1 3	/56-FAM/TAG CCC TCT /ZEN/GAG CCA AAC GCC /3IABkFQ/(SEQ ID NO:372)
SE RPI NA 3	12	Hs.PT. 58.155 80605	FAM 探针	CCT CAA ATA CAT CAA GCA CAG C	4 1 4	GGA AGC CTT CAC CAG CAA	4 1 5	/56-FAM/TAG CAG TCT /ZEN/CCC AGG TGG TCC A/3IABkFQ/(SEQ ID NO:373)
SF RP 1	6422	hs.pt.5 803842 9156	FAM 探针	GAG ATG CTT AAG TGT GAC AAG TTC	4 1 6	CCT CAG ATT TCA ACT CGT TGT C	4 1 7	/56-FAM/TGG AGG CTT /ZEN/CGG TGG CAT TGG /3IABkFQ/(SEQ ID NO:374)
SF RP 2	6423	Hs.PT. 58.207 05989	FAM 探针	TTG CAG GCT TCA CAT ACC TT	4 1 8	GCC CGA CAT GCT TGA GT	4 1 9	/56-FAM/TTT CCC CCA /ZEN/GGA CAA CGA CCT TT/3IABkFQ/(SEQ ID NO:375)
TM PR SS4	5664 9	Hs.PT. 58.316 1735	FAM 探针	ATC TTC CCT CCA TTC TGC TTC	4 2 0	CAG TTC CCA CTC ACT TTC TCA G	4 2 1	/56-FAM/CTC ACT CCA /ZEN/GCC ACC CCA CTC /3IABkFQ/(SEQ ID NO:376)
WF DC 2	1040 6	Hs.PT. 58.251 17187	FAM 探针	CCG ACA ACC TCA AGT GCT G	4 2 2	GCT GGG GAA AGT TAA TGT TCA C	4 2 3	/56-FAM/TGC TCT CTG /ZEN/CCC AAT GAT AAG GAG G/3IABkFQ/(SEQ ID NO:377)

[0255] 对于小组的初始体外测试和确定信号的线性,我们将增加数量的BRX-142细胞微量操作成4ml HD血液,并如上所述,使样品通过CTC-iChip。使用RNeasy®Micro Kit (Qiagen) 提取RNA,然后使用SMART-Seq v4超低输入RNA试剂盒(Clontech) 将其四分之一用于cDNA合成和扩增。为了确定测定的临床特异性和灵敏度,对来自健康供体和患者的CTC-iChip产物进行类似处理。在Biorad ddPCR系统上,使用预先设计的基于Taqman的qPCR测定(Invitrogen)和用于探针的ddPCR Supermix(无dUTP)

[0256] (Biorad) 进行ddPCR分析。对于用多个探针检测的标志物,使用平均转录物数量。

[0257] 为了归一化归一化样品中血液体积的差异,对每个ddPCR反应中使用的血液体积当量校正所有原始数据。为了进一步归一化归一化信号,建立了33个测试健康供体内每个标志物的表达的中值和双倍标准偏差。然后从每个患者中减去这两个值的乘积,并在该研究中分析健康供体样品。通过将样品中所有标志物的归一化表达相加而不另外称重来计算总CTC评分,并报告为使用的血液-体积当量的转录物/ml。

[0258] ESR1突变检测

[0259] 先前已经发表了针对L536R、Y537C、Y537N、Y537S和D538G ESR1突变的特异性探针。在合成序列上测试它们的扩增效率以及它们相应的野生型探针的扩增效率(数据未示出)。我们建立了Y537S通过微量操纵健康供体血液中增加数量的BRx-68细胞,然后如上所述的进行处理来检测来自富含CTC的IFD产物的cDNA中存在的突变能力。按照制造商的方案,采用SMART-Seq v4超低输入RNA试剂盒(Clontech) 使用1/3经提取的RNA进行18循环

WTA;每次反应使用1ul未经稀释的WTA产物。患者样品以相同方式处理;每个探针测试至少5个健康供体样品后,以100%建立探针特异性。在>3个阳性小滴处建立了出现ESR1突变的截止值。

[0260] 统计分析

[0261] 进行接受者-操作者曲线分析以确定每个标志物的特异性和灵敏度以及我们的初始测试组中不同癌症阶段的总CTC评分。使用ROCR包在R中进行分析。具体脚本可根据要求提供。进行Wilcoxon检验以确定AUC的显著性。使用一组新的健康供体和来自TRACK组的治疗前样品验证IV期癌症的特异性和灵敏度。

[0262] 为了确定高/低RS评分的治疗前分割点,使用留一切杰克刀的重新取样应用于Contal-0'Quigley的算法以得到使两个所得子组之间的总生存期差异最大化的分割点。结果组之间临床变量的比较基于对分类特征的Fisher精确检验和连续特征的精确Wilcoxon秩和检验。

[0263] 使用对数秩检验分析基于治疗期间CTC评分变化和RS评分的存活分析,因为这些比较中的亚组没有事件,阻止使用cox模型统计。使用Ward最小方差法进行治疗前和治疗3至4周样品的无监督聚类。

[0264] 结果

[0265] 为了在污染的正常血细胞的背景中开发RNA表达特征以检测乳腺癌细胞,如上所述,我们首先分析源自正常乳腺组织、乳腺癌和全血的RNA-Seq和微阵列基因表达数据集。我们最终选择了17种标志物,其表达在血细胞中几乎不存在,但在乳腺衍生组织中强烈表达。这些标志物包括乳腺谱系特异性转录物(PGR、SCGB2A1、PIP)和在乳腺癌中高表达的转录物(MGP、EFHD1),以及与内分泌信号传导有关的基因(SERPINA3、WFDC2)、内分泌抗药性有关的基因(AGR2)、癌症生长和转移有关的基因(MUC16、TMPRSS4)、细胞信号传导有关的基因(FAT1、FAT2、SFRP1、SFRP2)、上皮衍生细胞因子有关的基因(CXCL13、CXCL14)和癌胚抗原有关的基因(PRAME)。

[0266] 单细胞RNA测序揭示了15个单个CTC中17个标志物的高度但可变的表达,这些CTC作为单个细胞从乳腺癌患者的血液中分离出来;5个经类似分析的单个WBC具有这些基因的可忽略表达。与设计用于区分乳腺癌和正常乳腺组织的传统突变信号不同,CTC RNA信号小组旨在通知血液样品中非造血细胞来源组织的信息,有可能为乳腺癌诊断和监测提供可行的临床信息。

[0267] 为了询问与内分泌难治性疾病相关的子集的整体生物标志物小组,我们在患有HR+疾病的患者的子集中开始内分泌治疗后3至4周进行乳房测定成分的无监督聚类,推断治疗-诱导的表达变化可以区分来自无应答患者的反应。实际上,我们在抗性信号(RS)中鉴定了6个基因(PIP、SERPINA3、AGR2、SCGB2A1、EFHD1和WFDC2),其表达与快速疾病进展(120天内)和较差的存活相关(分别地, $p=0.0031$ 和 $p=0.0175$,Fisher精确检验)(图11A)。

[0268] 值得注意地,与TCGA数据库中的ER-肿瘤相比,所有6种RS转录物在ER+肿瘤中显著富集,表明其表达可能与雌激素信号传导有关。实际上,基于RS基因平均表达的元评分显示与来自分子信号数据库的Hallmark雌激素受体(晚期)基因信号基因信号在多个公开可用的基因表达数据集的高度显著相关性($R=0.70$; $p=1.7e-70$)。RS基因元评分还与涉及雌激素信号传导和内分泌抗性的多个其他MSigDB组相关,导致中值相关系数分别为0.54和

0.51 (图11B-1和11B-2)。在肿瘤难以进行内分泌疗法的女性的CTC中持续富集RS转录物表明这些药物未能在循环癌细胞内击中其靶标,如测量的。

[0269] 已经报道了在具有获得性激素疗法抗性的乳腺癌中激活编码ER的ESR1基因中的突变,并且认为其介导持久的与配体无关的ER信号传导。在我们的3至4周HR+患者组中,2/20名女性在临床护理过程中被诊断为基于肿瘤再活检的ESR1突变。参见下表7,其显示了在进行内分泌治疗的HR+患者和TNBC患者(阴性对照)中通过CTC-ddPCR和SNaPShot基因分型检测到的ESR1突变。

[0270] 然而,许多患者(8/20)仅对其原发性肿瘤进行了基因分型,而其他患者未进行基因分型(5/20)。为了无创地确定所有患者的ESR1突变状态,我们建立了使用来自CTC的RNA模板以及特异于L536R、Y537C、Y537N、Y537S和D538G的探针的特异性数字PCR突变测定,它们共同占ESR1突变的大部分(20,22)。通过将携带Y537S突变的单个细胞掺入血液样品中,然后进行微流体CTC分离并对来自产物的经全转录组扩增的cDNA进行ddPCR,来确认该测定的灵敏度和准确度。

[0271] 表7

样品	提取日期	通过CTC-64PCR检测到的突变	通过CTC-64PCR检测到的特异性ESR1突变	快照日期	快照位点	通过快照检测到的突变	通过快照检测到的特异性ESR1突变
----	------	-------------------	--------------------------	------	------	------------	-------------------

接受内分泌疗法的HR+患者

BRX121_J RACK28	2016-05-27			2013-08-26	原发性		
BRX188_J RACK12	2016-04-01			2013-05-23	原发性		
BRX178_J RACK08	2016-03-08			2014-11-04	转移性		
BRX208_J RACK06	2016-04-01			2015-06-19	原发性		
BRX224_J RACK38	2016-07-14			2015-08-07	转移性		
BRX288_J RACK36	2016-07-29	X	D538G	2015-12-22	原发性		
BRX272_J RACK22	2016-05-12	X	Y537N,D538G	2016-02-10	转移性		
BRX273_J RACK02	2016-03-10	NA		2013-02-04	原发性	NA	
BRX280_J RACK18	2016-05-09			NA	NA	NA	
BRX283_J RACK62	2016-11-01	X	Y537C	2016-01-19	原发性		
BRX288_J RACK04	2016-03-23			2016-02-08	原发性	NA	
BRX284_J RACK08	2016-04-01	X	L538R, Y537N	2016-02-05	转移性	X	L538R, Y537N
BRX295_J RACK08	2016-03-27			NA	NA	NA	
BRX301_J RACK16	2016-04-29			2014-10-31	转移性	X	L538Q*
BRX302_J RACK18	2016-04-22			NA	NA	NA	
BRX308_J RACK34	2016-05-25			2016-03-06	原发性		
BRX333_J RACK42	2016-09-09			NA	NA	NA	
BRX340_J RACK47	2016-09-29			NA	NA	NA	
BRX342_J RACK48	2016-09-23			2016-08-26	转移性		
BRX343_J RACK48	2016-10-06			2016-08-15	转移性		

[0272]

TNBC患者

	I	II	II	II	II
BRX187_J RACK01	2016-02-09			2015-09-24	转移性
BRX213_J RACK07	2016-03-03			NA	NA
BRX278_J RACK20	2016-04-14			2016-01-08	原发性
BRX281_J RACK26	2016-04-22			2016-03-06	转移性
BRX287_J RACK08	2016-03-08			2016-01-28	转移性
BRX288_J RACK17	2016-03-31			2016-02-09	转移性
BRX318_J RACK32	2016-05-24			2016-07-14	转移性
BRX330_J RACK38	2016-07-18			2015-10-13	转移性
BRX332_J RACK38	2016-07-27			2016-02-03	转移性
BRX337_J RACK41	2016-08-11			2016-08-11	原发性
BRX341_J RACK46	2016-08-25			2016-05-20	转移性
BRX345_J RACK60	2016-09-16			2016-05-19	转移性

[0273] 使用这种基于CTC的测定,发现我们的HR+组中的另外3位患者具有ESR1突变,导致总突变频率为5/20 (25%),这种患病率与先前对经重度治疗的转移性HR+乳腺癌的研究一致 (20) (表7)。有趣地,具有ESR1突变的病例与表达RS基因信号的病例重叠但不相同 (图11A)。

[0274] 在具有ESR1突变的5个病例中,3个病例具有反映持续性ER信号传导的RS基因信号,并且6个具有RS信号的女性中,3个具有ESR1突变。在我们的HR+组中,在内分泌疗法开始后3至4周的高RS评分是对差生存期和更快进展时间的高度预后 (图11C-1和11C-2)。相反,ESR1突变的存在显示出趋势,但没有达到预测不良结果的显著性 (图11D-1和11D-2)。RS表

达信号在治疗前基线的表达不能预测不良结果,这表明该信号仅在应答性和抗性患者之间作为显著变量出现,然后施用抑制易感癌细胞内ER信号传导的激素疗法。

[0275] 选择构成乳腺CTC信号的17个基因以包括来自多个组织的与癌症相关的转录物,其在污染的经富集的CTC产物的血细胞中不表达。因此,RS亚信号中包括的6个基因不代表权威ER靶标,但是它们的表达与ER信号传导和对内分泌疗法的抗性高度相关。它们在治疗开始后在CTC中的持续表达确定了对激素疗法反应大大降低并且治疗时总生存期缩短的女性。在激素疗法开始后3至4周出现该CTC信号的事实表明它可能反映了药物介导的对肿瘤细胞的影响。新的ER靶向疗法的开始应该抑制易感肿瘤细胞中的ER信号传导,而持续途径活性在癌细胞中仍然是明显的,其中药物未能击中其预期靶标。

[0276] 此外,在该研究中,ESR1突变以预期频率被注意到,但是它们对不良临床结果的预测不如通过CTC表达信号测量的持续性ER信号传导。

[0277] 其他实施方案

[0278] 应理解,虽然已经结合本发明的发明详述描述了本发明,但是前面的描述旨在说明而不是限制本发明的范围,本发明的范围由所附权利要求书的范围限定。其他方面、优点和修改在所附权利要求书的范围内。

序列表

	<110> 通用医疗公司	
	<120> 用于确定特定癌症的癌症疗法的功效的血液样品的数字分析	
	<130> 28970-0858W01	
	<140> PCT/US2017/058855	
	<141> 2017-10-27	
	<150> 62/413,952	
	<151> 2016-10-27	
	<160> 423	
	<170> PatentIn version 3.5	
	<210> 1	
	<211> 23	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工序列的说明：合成引物	
	<400> 1	
[0001]	ctgacagtta gagccgatat cac	23
	<210> 2	
	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工序列的说明：合成引物	
	<400> 2	
	caattcagtc ttcagcaact tgag	24
	<210> 3	
	<211> 18	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工序列的说明：合成探针	
	<400> 3	
	aacctgcaga tacagctc	18
	<210> 4	
	<211> 22	
	<212> DNA	

	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工序列的说明: 合成引物	
	<400> 4	
	ggtggcttta aaatgtcagg aa	22
	<210> 5	
	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工序列的说明: 合成引物	
	<400> 5	
	tgtcgccaag tttgatggt	19
	<210> 6	
	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
[0002]	<220>	
	<223> 人工序列的说明: 合成探针	
	<400> 6	
	ctgtgtattc ggccaaagc	19
	<210> 7	
	<211> 23	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工序列的说明: 合成引物	
	<400> 7	
	ctctgcattt ttggacatag gag	23
	<210> 8	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工序列的说明: 合成引物	
	<400> 8	
	gccttgcaact tccattatga c	21

	<210> 9 <211> 16 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <223> 人工序列的说明：合成探针 <400> 9 gtactgtcat tcacct	16
	<210> 10 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <223> 人工序列的说明：合成引物 <400> 10 gaggcctaca ttctgaacgc	20
[0003]	<210> 11 <211> 23 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <223> 人工序列的说明：合成引物 <400> 11 gtggttcttt cttttgcett etc	23
	<210> 12 <211> 15 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <223> 人工序列的说明：合成探针 <400> 12 ctgcatcgtc attct	15
	<210> 13 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <223> 人工序列的说明：合成引物 <400> 13	

	gtttcatcct ccctgtgctg	20
	<210> 14 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 人工序列的说明：合成引物	
	<400> 14 gctccttgat cttccgcttc	20
	<210> 15 <211> 14 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 人工序列的说明：合成探针	
	<400> 15 ctgcttttgt tggt	14
[0004]	<210> 16 <211> 18 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 人工序列的说明：合成引物	
	<400> 16 gatgccccac ttgcagta	18
	<210> 17 <211> 21 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 人工序列的说明：合成引物	
	<400> 17 cctcgtaaac tggctaattg t	21
	<210> 18 <211> 24 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220>	

	<223> 人工序列的说明：合成探针	
	<400> 18 acctacccca atatatgaag gaaa	24
	<210> 19 <211> 17 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 人工序列的说明：合成引物	
	<400> 19 ctgctgccac aaccagt	17
	<210> 20 <211> 21 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 人工序列的说明：合成引物	
	<400> 20 ttcacatcca tctggtacgt g	21
[0005]	<210> 21 <211> 13 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 人工序列的说明：合成探针	
	<400> 21 ctgccgcaaa ttc	13
	<210> 22 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 人工序列的说明：合成引物	
	<400> 22 gatccttatg ccatcaccgt	20
	<210> 23 <211> 22 <212> DNA	

	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工序列的说明: 合成引物	
	<400> 23	
	atcagcagag tcaatcagtg ag	22
	<210> 24	
	<211> 12	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工序列的说明: 合成探针	
	<400> 24	
	cagcgttccc gg	12
	<210> 25	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
[0006]	<220>	
	<223> 人工序列的说明: 合成引物	
	<400> 25	
	cctggatgct gacatttctg a	21
	<210> 26	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工序列的说明: 合成引物	
	<400> 26	
	tcctccactc atctccaact	20
	<210> 27	
	<211> 16	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工序列的说明: 合成探针	
	<400> 27	
	atcacagagg gagacc	16

	<210> 28 <211> 24 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <223> 人工序列的说明：合成引物 <400> 28 caatgtgata ggtactctca gagg	24
	<210> 29 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <223> 人工序列的说明：合成引物 <400> 29 tgttccaaag ctcctcaca	20
[0007]	<210> 30 <211> 16 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <223> 人工序列的说明：合成探针 <400> 30 agctgctcca ctctga	16
	<210> 31 <211> 18 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <223> 人工序列的说明：合成引物 <400> 31 cagccagatg tgttgcca	18
	<210> 32 <211> 21 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <223> 人工序列的说明：合成引物 <400> 32	

	ctgtacggaa tgcgtttctt g	21
	<210> 33 <211> 13 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 人工序列的说明：合成探针	
	<400> 33 cagactccag cgg	13
	<210> 34 <211> 21 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 人工序列的说明：合成引物	
	<400> 34 gctgtgtaca gtcattgatg g	21
[0008]	<210> 35 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 人工序列的说明：合成引物	
	<400> 35 gtcttcaggc tcaaacaggt	20
	<210> 36 <211> 18 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 人工序列的说明：合成探针	
	<400> 36 ttcttttaggc aatgggca	18
	<210> 37 <211> 17 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220>	

	<223> 人工序列的说明：合成引物 <400> 37 gtgtgctgga cgctgga	17
	<210> 38 <211> 25 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <223> 人工序列的说明：合成引物 <400> 38 gtgatacctt gaagcacacc attac	25
	<210> 39 <211> 14 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <223> 人工序列的说明：合成探针 <400> 39 gctcgggtga ttct	14
[0009]	<210> 40 <211> 22 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <223> 人工序列的说明：合成引物 <400> 40 cacatttgag tgaagcttgt cg	22
	<210> 41 <211> 21 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <223> 人工序列的说明：合成引物 <400> 41 gcggatgtca aacaagtcaa g	21
	<210> 42 <211> 15 <212> DNA	

	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工序列的说明：合成探针	
	<400> 42	
	aatgaagcca ccaca	15
	<210> 43	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工序列的说明：合成引物	
	<400> 43	
	gaaggagaag atctgccagt g	21
	<210> 44	
	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
[0010]	<220>	
	<223> 人工序列的说明：合成引物	
	<400> 44	
	gctgactcct ctgetcaag	19
	<210> 45	
	<211> 15	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工序列的说明：合成探针	
	<400> 45	
	ccagagtcac catgc	15
	<210> 46	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工序列的说明：合成引物	
	<400> 46	
	ccagtagcct gattgtgcat	20

[0011]	<210> 47	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工序列的说明：合成引物	
	<400> 47	
	tgtcagtgat tctgttcaag ga	22
	<210> 48	
	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工序列的说明：合成探针	
	<400> 48	
	aagaggcat tttggttgt	19
	<210> 49	
	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工序列的说明：合成引物	
	<400> 49	
	actcttacac cacggtga	19
	<210> 50	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工序列的说明：合成引物	
	<400> 50	
	ccatcaaggc tctgtatcca t	21
	<210> 51	
	<211> 16	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工序列的说明：合成探针	
	<400> 51	

	aggatcactg tcagga	16
	<210> 52	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工序列的说明：合成引物	
	<400> 52	
	ggatctgagc aggagaaata cc	22
	<210> 53	
	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工序列的说明：合成引物	
	<400> 53	
	gaattcttca ttcccttgaa ctga	24
[0012]	<210> 54	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工序列的说明：合成探针	
	<400> 54	
	gaaaaagaca aattccaaag	20
	<210> 55	
	<211> 23	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工序列的说明：合成引物	
	<400> 55	
	aagatggaca ggtatgacaa gtc	23
	<210> 56	
	<211> 23	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	

	<223> 人工序列的说明：合成引物	
	<400> 56 actctttcca catagtcaga tgg	23
	<210> 57 <211> 19 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 人工序列的说明：合成探针	
	<400> 57 atthttaacc cactcctcg	19
	<210> 58 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 人工序列的说明：合成引物	
	<400> 58 tgtcctggct gttcattctg	20
[0013]	<210> 59 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 人工序列的说明：合成引物	
	<400> 59 tggatcccta tctcttgcca	20
	<210> 60 <211> 13 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 人工序列的说明：合成探针	
	<400> 60 ctgtccatct cct	13
	<210> 61 <211> 19 <212> DNA	

	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工序列的说明：合成引物	
	<400> 61	
	ggcaattggt ttgaggcaa	19
	<210> 62	
	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工序列的说明：合成引物	
	<400> 62	
	ggactggata aatgtattca agca	24
	<210> 63	
	<211> 28	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
[0014]	<220>	
	<223> 人工序列的说明：合成探针	
	<400> 63	
	tgcaagttat caagaagttt tgtaagtt	28
	<210> 64	
	<211> 17	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工序列的说明：合成引物	
	<400> 64	
	ctggtggagg agaacgg	17
	<210> 65	
	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工序列的说明：合成引物	
	<400> 65	
	ggtcgctgga tgaaaggtt	19

	<210> 66	
	<211> 11	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工序列的说明：合成探针	
	<400> 66	
	agcagctcga a	11
	<210> 67	
	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工序列的说明：合成引物	
	<400> 67	
	caggcatcgt cagtttcct	19
	<210> 68	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
[0015]	<220>	
	<223> 人工序列的说明：合成引物	
	<400> 68	
	acacaatgga tctggtgcta a	21
	<210> 69	
	<211> 16	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工序列的说明：合成探针	
	<400> 69	
	gataggtgct ttgctg	16
	<210> 70	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工序列的说明：合成引物	
	<400> 70	

	gaggagagaa tcaacaaact gc	22
	<210> 71	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工序列的说明：合成引物	
	<400> 71	
	aggttcaggt actccttcca g	21
	<210> 72	
	<211> 14	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工序列的说明：合成探针	
	<400> 72	
	attgaggcgc acat	14
[0016]	<210> 73	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工序列的说明：合成引物	
	<400> 73	
	atacttctgc ttggtgtagg c	21
	<210> 74	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工序列的说明：合成引物	
	<400> 74	
	agccattgta ctctttaacc ca	22
	<210> 75	
	<211> 15	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	

	<220>		
	<223>	人工序列的说明：合成 探针	
	<400>	75 ggagactctg cgaga	15
	<210>	76	
	<211>	23	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	人工序列的说明：合成 引物	
	<400>	76 ccgagaatta cgttcctaca gtg	23
	<210>	77	
	<211>	22	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
[0017]	<220>		
	<223>	人工序列的说明：合成 引物	
	<400>	77 gcggacattg tcatagtaag ga	22
	<210>	78	
	<211>	16	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	人工序列的说明：合成 探针	
	<400>	78 tttgaaatcg acacac	16
	<210>	79	
	<211>	18	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	人工序列的说明：合成 引物	

	<p><400> 79 ctgccttgct ctccttcc</p>	18
	<p><210> 80 <211> 22 <212> DNA <213> 人工序列</p>	
	<p><220> <223> 人工序列的说明：合成 引物</p>	
	<p><400> 80 cttactcagc ttgaacttgt cg</p>	22
	<p><210> 81 <211> 14 <212> DNA <213> 人工序列</p>	
	<p><220> <223> 人工序列的说明：合成 探针</p>	
[0018]	<p><400> 81 gccacagatc catg</p>	14
	<p><210> 82 <211> 19 <212> DNA <213> 人工序列</p>	
	<p><220> <223> 人工序列的说明：合成 引物</p>	
	<p><400> 82 acttccttga tccctgcca</p>	19
	<p><210> 83 <211> 22 <212> DNA <213> 人工序列</p>	
	<p><220> <223> 人工序列的说明：合成 引物</p>	
	<p><400> 83 gtcttttcaa ccatgtcctc ca</p>	22
	<p><210> 84</p>	

	<p><211> 15 <212> DNA <213> 人工序列</p> <p><220> <223> 人工序列的说明：合成 探针</p> <p><400> 84 tgctgatggg cctca</p>	15
	<p><210> 85 <211> 17 <212> DNA <213> 人工序列</p> <p><220> <223> 人工序列的说明：合成 引物</p> <p><400> 85 caatgccacc gaagcct</p>	17
[0019]	<p><210> 86 <211> 26 <212> DNA <213> 人工序列</p> <p><220> <223> 人工序列的说明：合成 引物</p> <p><400> 86 cttttatctt catcctcagt gcaaac</p>	26
	<p><210> 87 <211> 18 <212> DNA <213> 人工序列</p> <p><220> <223> 人工序列的说明：合成 探针</p> <p><400> 87 gagttgaaat ctgaggcc</p>	18
	<p><210> 88 <211> 21 <212> DNA <213> 人工序列</p> <p><220></p>	

	<223> 人工序列的说明：合成引物	
	<400> 88 cttgtcactt tcgttcagca g	21
	<210> 89 <211> 18 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 人工序列的说明：合成引物	
	<400> 89 cttcatgggtg tgggctca	18
	<210> 90 <211> 12 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 人工序列的说明：合成探针	
[0020]	<400> 90 tgcgggtact gg	12
	<210> 91 <211> 21 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 人工序列的说明：合成引物	
	<400> 91 tccttggatg actctcccta c	21
	<210> 92 <211> 21 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 人工序列的说明：合成引物	
	<400> 92 agataccacc tccctgaaga a	21

	<p><210> 93 <211> 15 <212> DNA <213> 人工序列</p> <p><220> <223> 人工序列的说明：合成 探针</p> <p><400> 93 aggagcggga tggag</p>	15
	<p><210> 94 <211> 21 <212> DNA <213> 人工序列</p> <p><220> <223> 人工序列的说明：合成 引物</p> <p><400> 94 agaggtttaa tgggctcaca g</p>	21
[0021]	<p><210> 95 <211> 22 <212> DNA <213> 人工序列</p> <p><220> <223> 人工序列的说明：合成 引物</p> <p><400> 95 ctctggtctg tcgtcatgta ag</p>	22
	<p><210> 96 <211> 15 <212> DNA <213> 人工序列</p> <p><220> <223> 人工序列的说明：合成 探针</p> <p><400> 96 tcaccttctc cacca</p>	15
	<p><210> 97 <211> 22 <212> DNA</p>	

	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工序列的说明：合成引物	
	<400> 97 cacaccacca tacctggata at	22
	<210> 98	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工序列的说明：合成引物	
	<400> 98 tcacttgagg ccaagagttc	20
	<210> 99	
	<211> 15	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
[0022]	<220>	
	<223> 人工序列的说明：合成探针	
	<400> 99 ggtccagcca agttc	15
	<210> 100	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工序列的说明：合成引物	
	<400> 100 ctttcttcag ggtctggtea tt	22
	<210> 101	
	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工序列的说明：合成引物	

	<p><400> 101 cttgtcgtct tcggaaatgt tatg</p>	24
	<p><210> 102 <211> 15 <212> DNA <213> 人工序列</p>	
	<p><220> <223> 人工序列的说明：合成 探针</p>	
	<p><400> 102 tgactctggg agaaa</p>	15
	<p><210> 103 <211> 19 <212> DNA <213> 人工序列</p>	
	<p><220> <223> 人工序列的说明：合成 引物</p>	
[0023]	<p><400> 103 gaggcaagtc agcctttct</p>	19
	<p><210> 104 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列</p>	
	<p><220> <223> 人工序列的说明：合成 引物</p>	
	<p><400> 104 tgtccatctt gtcgtcttcg</p>	20
	<p><210> 105 <211> 15 <212> DNA <213> 人工序列</p>	
	<p><220> <223> 人工序列的说明：合成 探针</p>	
	<p><400> 105 gatgactctg ggaga</p>	15

	<p><210> 106 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列</p> <p><220> <223> 人工序列的说明：合成引物</p> <p><400> 106 gctcaccatg tgtgacttga</p>	20
	<p><210> 107 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列</p> <p><220> <223> 人工序列的说明：合成引物</p> <p><400> 107 tgggagagag acagcttgta</p>	20
[0024]	<p><210> 108 <211> 15 <212> DNA <213> 人工序列</p> <p><220> <223> 人工序列的说明：合成探针</p> <p><400> 108 gagagctgca tcagt</p>	15
	<p><210> 109 <211> 19 <212> DNA <213> 人工序列</p> <p><220> <223> 人工序列的说明：合成引物</p> <p><400> 109 gaaagtccac gctcaccat</p>	19
	<p><210> 110 <211> 18 <212> DNA <213> 人工序列</p>	

	<220>		
	<223>	人工序列的说明：合成引物	
	<400>	110 gcagccttgc tctctagc	18
	<210>	111	
	<211>	15	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	人工序列的说明：合成探针	
	<400>	111 gagagctgca tcagt	15
	<210>	112	
	<211>	23	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
[0025]	<223>	人工序列的说明：合成引物	
	<400>	112 ctctgcacaa actcttccat ttc	23
	<210>	113	
	<211>	20	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	人工序列的说明：合成引物	
	<400>	113 tttcctcgcc cattcttacc	20
	<210>	114	
	<211>	17	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	人工序列的说明：合成探针	
	<400>	114	

ttacagtgaa gtcctcc	17
<210> 115	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的说明：合成引物	
<400> 115	
ggaaggaggg aacagaaatc c	21
<210> 116	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的说明：合成引物	
<400> 116	
gtgagctact ggctgaacta tt	22
[0026]	
<210> 117	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的说明：合成探针	
<400> 117	
atttgagaag aatggtgga	19
<210> 118	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的说明：合成引物	
<400> 118	
aggagatgtg ctggattgtc	20
<210> 119	
<211> 25	

	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工序列的说明：合成引物	
	<400> 119	
	tctgcatgaa ttatacattg accac	25
	<210> 120	
	<211> 14	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工序列的说明：合成探针	
	<400> 120	
	aactgaccac gctg	14
	<210> 121	
	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
[0027]	<220>	
	<223> 人工序列的说明：合成引物	
	<400> 121	
	actgcagaga taagtttagc tgac	24
	<210> 122	
	<211> 23	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工序列的说明：合成引物	
	<400> 122	
	tcaccatttt gettacttcc ttg	23
	<210> 123	
	<211> 16	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工序列的说明：合成	

探针		
	<400> 123 ttgttcaaga agccac	16
	<210> 124 <211> 19 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 人工序列的说明：合成引物	
	<400> 124 catgttgcct acagcctct	19
	<210> 125 <211> 23 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 人工序列的说明：合成引物	
[0028]	<400> 125 tctccaaact tcttcctcat tcc	23
	<210> 126 <211> 17 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 人工序列的说明：合成探针	
	<400> 126 atcagcaggt tcatgca	17
	<210> 127 <211> 22 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 人工序列的说明：合成引物	
	<400> 127 gaagatcatc ctgtcagacg ag	22

	<p><210> 128 <211> 22 <212> DNA <213> 人工序列</p> <p><220> <223> 人工序列的说明：合成引物</p> <p><400> 128 cttccgagct agaacctgta tg</p>	22
	<p><210> 129 <211> 15 <212> DNA <213> 人工序列</p> <p><220> <223> 人工序列的说明：合成探针</p> <p><400> 129 tcaactcatt tcggc</p>	15
[0029]	<p><210> 130 <211> 22 <212> DNA <213> 人工序列</p> <p><220> <223> 人工序列的说明：合成引物</p> <p><400> 130 gatcagacag tcattcgcaa ag</p>	22
	<p><210> 131 <211> 21 <212> DNA <213> 人工序列</p> <p><220> <223> 人工序列的说明：合成引物</p> <p><400> 131 gacaatcttc cagggactga g</p>	21
	<p><210> 132 <211> 15 <212> DNA <213> 人工序列</p>	

	<220>		
	<223>	人工序列的说明：合成 探针	
	<400>	132 gttcagaggg ttctt	15
	<210>	133	
	<211>	18	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	人工序列的说明：合成 引物	
	<400>	133 cccaaccag gcatgatg	18
	<210>	134	
	<211>	20	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
[0030]	<220>		
	<223>	人工序列的说明：合成 引物	
	<400>	134 tcaatgagaa gcaccttggc	20
	<210>	135	
	<211>	12	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	人工序列的说明：合成 探针	
	<400>	135 tccagcagag ct	12
	<210>	136	
	<211>	21	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	人工序列的说明：合成 引物	

[0031]	<400> 136 tgctggaatg gacaagaact c	21
	<210> 137	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工序列的说明：合成 引物	
	<400> 137 gctcatggag attgaactgg t	21
	<210> 138	
	<211> 16	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工序列的说明：合成 探针	
	<400> 138 ccttttggct gtatct	16
	<210> 139	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工序列的说明：合成 引物	
	<400> 139 cttactggcg ttttctcatg c	21
	<210> 140	
	<211> 23	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工序列的说明：合成 引物	
	<400> 140 ccaactcttg tagaggtctc aag	23
	<210> 141	

	<p><211> 17 <212> DNA <213> 人工序列</p> <p><220> <223> 人工序列的说明：合成 探针</p> <p><400> 141 gccactttt cctaggt</p>	17
	<p><210> 142 <211> 21 <212> DNA <213> 人工序列</p> <p><220> <223> 人工序列的说明：合成 引物</p> <p><400> 142 ggaccaggga aagataaagc c</p>	21
[0032]	<p><210> 143 <211> 21 <212> DNA <213> 人工序列</p> <p><220> <223> 人工序列的说明：合成 引物</p> <p><400> 143 gcaaggtaga ttcgtgacag a</p>	21
	<p><210> 144 <211> 15 <212> DNA <213> 人工序列</p> <p><220> <223> 人工序列的说明：合成 探针</p> <p><400> 144 aatccaacc acaaa</p>	15
	<p><210> 145 <211> 22 <212> DNA <213> 人工序列</p> <p><220></p>	

	<223> 人工序列的说明：合成引物	
	<400> 145 cattttgtgg ttgggattct gg	22
	<210> 146 <211> 18 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 人工序列的说明：合成引物	
	<400> 146 gatgctgtgg atgtggct	18
	<210> 147 <211> 17 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 人工序列的说明：合成探针	
[0033]	<400> 147 atctaccttg ctgctca	17
	<210> 148 <211> 21 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 人工序列的说明：合成引物	
	<400> 148 gccttgact tccattatga c	21
	<210> 149 <211> 23 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 人工序列的说明：合成引物	
	<400> 149 ctctgcattt ttggacatag gag	23

	<p><210> 150 <211> 13 <212> DNA <213> 人工序列</p> <p><220> <223> 人工序列的说明：合成 探针</p> <p><400> 150 gaggtcctga ggc</p>	13
	<p><210> 151 <211> 22 <212> DNA <213> 人工序列</p> <p><220> <223> 人工序列的说明：合成 引物</p> <p><400> 151 atgtggagtt tacagtgtct gg</p>	22
[0034]	<p><210> 152 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列</p> <p><220> <223> 人工序列的说明：合成 引物</p> <p><400> 152 agcttctcac tgagtgttgc</p>	20
	<p><210> 153 <211> 15 <212> DNA <213> 人工序列</p> <p><220> <223> 人工序列的说明：合成 探针</p> <p><400> 153 cagccaagtg taacc</p>	15
	<p><210> 154 <211> 17 <212> DNA</p>	

	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工序列的说明：合成引物	
	<400> 154 acggctccca tcctcct	17
	<210> 155 <211> 22 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工序列的说明：合成引物	
	<400> 155 ccactatgtc accatgtacc tg	22
	<210> 156 <211> 12 <212> DNA <213> 人工序列	
[0035]	<220>	
	<223> 人工序列的说明：合成探针	
	<400> 156 agaaccagca gc	12
	<210> 157 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工序列的说明：合成引物	
	<400> 157 tgctctgaca acccttatgc	20
	<210> 158 <211> 21 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工序列的说明：合成引物	

	<p><400> 158 ggctgaggat cactttgtag a</p>	21
	<p><210> 159 <211> 15 <212> DNA <213> 人工序列</p>	
	<p><220> <223> 人工序列的说明：合成 探针</p>	
	<p><400> 159 gtctttgctg acatt</p>	15
	<p><210> 160 <211> 19 <212> DNA <213> 人工序列</p>	
	<p><220> <223> 人工序列的说明：合成 引物</p>	
[0036]	<p><400> 160 catcagcagg accagtagc</p>	19
	<p><210> 161 <211> 19 <212> DNA <213> 人工序列</p>	
	<p><220> <223> 人工序列的说明：合成 引物</p>	
	<p><400> 161 tgtctgtgct ccctgatct</p>	19
	<p><210> 162 <211> 15 <212> DNA <213> 人工序列</p>	
	<p><220> <223> 人工序列的说明：合成 探针</p>	
	<p><400> 162 agtaccagga ctgct</p>	15

	<p><210> 163 <211> 22 <212> DNA <213> 人工序列</p> <p><220> <223> 人工序列的说明：合成引物</p> <p><400> 163 tcatttggac gtactgactt gg</p>	22
	<p><210> 164 <211> 19 <212> DNA <213> 人工序列</p> <p><220> <223> 人工序列的说明：合成引物</p> <p><400> 164 cttgctccag ctctgttc</p>	19
[0037]	<p><210> 165 <211> 13 <212> DNA <213> 人工序列</p> <p><220> <223> 人工序列的说明：合成探针</p> <p><400> 165 ggttctctgc ctg</p>	13
	<p><210> 166 <211> 21 <212> DNA <213> 人工序列</p> <p><220> <223> 人工序列的说明：合成引物</p> <p><400> 166 ggtgtttggt ctaggatgga g</p>	21
	<p><210> 167 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列</p>	

	<220>		
	<223>	人工序列的说明：合成引物	
	<400>	167	
		actgggtttg acttcgtagc	20
	<210>	168	
	<211>	16	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	人工序列的说明：合成探针	
	<400>	168	
		atgctgtatt ttgcac	16
	<210>	169	
	<211>	22	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
[0038]	<223>	人工序列的说明：合成引物	
	<400>	169	
		gtgactctcc tgacatcctt ag	22
	<210>	170	
	<211>	21	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	人工序列的说明：合成引物	
	<400>	170	
		ccatctcatt tcgtectcca a	21
	<210>	171	
	<211>	17	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	人工序列的说明：合成探针	
	<400>	171	

acagacatag gcaaagt	17
<210> 172 <211> 24 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 人工序列的说明：合成引物	
<400> 172 actctgaaaa actttggact gatg	24
<210> 173 <211> 24 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 人工序列的说明：合成引物	
<400> 173 tctagcaatc aacagatgag ttct	24
[0039]	
<210> 174 <211> 12 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 人工序列的说明：合成探针	
<400> 174 gagccaaacg cc	12
<210> 175 <211> 19 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 人工序列的说明：合成引物	
<400> 175 agctccttcc agtccgaat	19
<210> 176 <211> 21	

	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工序列的说明：合成引物	
	<400> 176	
	gtctgctcat caatcacctc a	21
	<210> 177	
	<211> 17	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工序列的说明：合成探针	
	<400> 177	
	ataccattg tcatcgc	17
	<210> 178	
	<211> 23	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
[0040]	<220>	
	<223> 人工序列的说明：合成引物	
	<400> 178	
	ggacagagag aacaaggatg aac	23
	<210> 179	
	<211> 23	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工序列的说明：合成引物	
	<400> 179	
	tgtgggagaa tataggtgga ttg	23
	<210> 180	
	<211> 15	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工序列的说明：合成	

探针		
	<400> 180 ctgtgctgga caatg	15
	<210> 181 <211> 23 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 人工序列的说明：合成 引物	
	<400> 181 gctttgacat cagtagacca gag	23
	<210> 182 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 人工序列的说明：合成 引物	
[0041]	<400> 182 ctgtccgcag atcagacttg	20
	<210> 183 <211> 19 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 人工序列的说明：合成 探针	
	<400> 183 tcaaaaagtg gaaaggtga	19
	<210> 184 <211> 19 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 人工序列的说明：合成 引物	
	<400> 184 cctggaaaat ggcctcctt	19

	<p><210> 185 <211> 21 <212> DNA <213> 人工序列</p> <p><220> <223> 人工序列的说明：合成引物</p> <p><400> 185 cattgcctac aggaagtctg g</p>	21
	<p><210> 186 <211> 17 <212> DNA <213> 人工序列</p> <p><220> <223> 人工序列的说明：合成探针</p> <p><400> 186 tatgccaaga gtgtgag</p>	17
[0042]	<p><210> 187 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列</p> <p><220> <223> 人工序列的说明：合成引物</p> <p><400> 187 ccagaggtaa aggtgccaac</p>	20
	<p><210> 188 <211> 22 <212> DNA <213> 人工序列</p> <p><220> <223> 人工序列的说明：合成引物</p> <p><400> 188 tcccagataa ctgtcatgaa gc</p>	22
	<p><210> 189 <211> 19 <212> DNA <213> 人工序列</p>	

	<220>		
	<223>	人工序列的说明：合成 探针	
	<400>	189	
		gcagagtaac tacaaaggc	19
	<210>	190	
	<211>	22	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	人工序列的说明：合成 引物	
	<400>	190	
		cctcaaatac atcaagcaca gc	22
	<210>	191	
	<211>	18	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
[0043]	<220>		
	<223>	人工序列的说明：合成 引物	
	<400>	191	
		ggaagccttc accagcaa	18
	<210>	192	
	<211>	13	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	人工序列的说明：合成 探针	
	<400>	192	
		cccaggtggt cca	13
	<210>	193	
	<211>	20	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	人工序列的说明：合成 引物	

	<p><400> 193 ttgcaggctt cacatacctt</p>	20
	<p><210> 194 <211> 17 <212> DNA <213> 人工序列</p>	
	<p><220> <223> 人工序列的说明：合成引物</p>	
	<p><400> 194 gcccgacatg cttgagt</p>	17
	<p><210> 195 <211> 14 <212> DNA <213> 人工序列</p>	
	<p><220> <223> 人工序列的说明：合成探针</p>	
[0044]	<p><400> 195 ggacaacgac cttt</p>	14
	<p><210> 196 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列</p>	
	<p><220> <223> 人工序列的说明：合成引物</p>	
	<p><400> 196 ctcttgagc cattcctctt</p>	20
	<p><210> 197 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列</p>	
	<p><220> <223> 人工序列的说明：合成引物</p>	
	<p><400> 197 cccttaccac agtcacttct</p>	20
	<p><210> 198</p>	

	<p><211> 18 <212> DNA <213> 人工序列</p> <p><220> <223> 人工序列的说明：合成 探针</p> <p><400> 198 cctcttctct cctcccct</p>	18
	<p><210> 199 <211> 25 <212> DNA <213> 人工序列</p> <p><220> <223> 人工序列的说明：合成 引物</p> <p><400> 199 tggacagaag acatactcat aaagg</p>	25
[0045]	<p><210> 200 <211> 18 <212> DNA <213> 人工序列</p> <p><220> <223> 人工序列的说明：合成 引物</p> <p><400> 200 ggtgccagca tgaatccc</p>	18
	<p><210> 201 <211> 17 <212> DNA <213> 人工序列</p> <p><220> <223> 人工序列的说明：合成 探针</p> <p><400> 201 tggacctgca gttatca</p>	17
	<p><210> 202 <211> 21 <212> DNA <213> 人工序列</p> <p><220></p>	

	<223> 人工序列的说明：合成引物	
	<400> 202 atcttcctc cattctgett c	21
	<210> 203 <211> 22 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 人工序列的说明：合成引物	
	<400> 203 cagttccac tcactttctc ag	22
	<210> 204 <211> 12 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 人工序列的说明：合成探针	
[0046]	<400> 204 gccacccac tc	12
	<210> 205 <211> 19 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 人工序列的说明：合成引物	
	<400> 205 ttttgcacca gtctcgctt	19
	<210> 206 <211> 19 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 人工序列的说明：合成引物	
	<400> 206 gccgcactga cagtatgag	19

	<p><210> 207 <211> 11 <212> DNA <213> 人工序列</p> <p><220> <223> 人工序列的说明：合成 探针</p> <p><400> 207 tgggagccct g</p>	11
	<p><210> 208 <211> 18 <212> DNA <213> 人工序列</p> <p><220> <223> 人工序列的说明：合成 引物</p> <p><400> 208 cgactgcgag tgataccg</p>	18
[0047]	<p><210> 209 <211> 17 <212> DNA <213> 人工序列</p> <p><220> <223> 人工序列的说明：合成 引物</p> <p><400> 209 ctctccacgc actccct</p>	17
	<p><210> 210 <211> 13 <212> DNA <213> 人工序列</p> <p><220> <223> 人工序列的说明：合成 探针</p> <p><400> 210 aacagccaca acg</p>	13
	<p><210> 211 <211> 18 <212> DNA</p>	

	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工序列的说明：合成引物	
	<400> 211	
	tgccgctcat gttcatgc	18
	<210> 212	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工序列的说明：合成引物	
	<400> 212	
	caggacacca tgaggaaacag	20
	<210> 213	
	<211> 10	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
[0048]	<220>	
	<223> 人工序列的说明：合成探针	
	<400> 213	
	tcccgttca	10
	<210> 214	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工序列的说明：合成引物	
	<400> 214	
	aagatgtcag acactgagaa cg	22
	<210> 215	
	<211> 17	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工序列的说明：合成引物	

	<400> 215 cgaagcccga tgtggtc	17
	<210> 216 <211> 16 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 人工序列的说明：合成 探针	
	<400> 216 agtccaaagc acacga	16
	<210> 217 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 人工序列的说明：合成 引物	
[0049]	<400> 217 aggagatgtg ctggattgtc	20
	<210> 218 <211> 25 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 人工序列的说明：合成 引物	
	<400> 218 tctgcatgaa ttatacattg accac	25
	<210> 219 <211> 14 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 人工序列的说明：合成 探针	
	<400> 219 aactgaccac gctg	14

	<p><210> 220 <211> 22 <212> DNA <213> 人工序列</p> <p><220> <223> 人工序列的说明：合成引物</p> <p><400> 220 atgtggagtt tacagtgtct gg</p>	22
	<p><210> 221 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列</p> <p><220> <223> 人工序列的说明：合成引物</p> <p><400> 221 agcttctcac tgagtgttgc</p>	20
[0050]	<p><210> 222 <211> 15 <212> DNA <213> 人工序列</p> <p><220> <223> 人工序列的说明：合成探针</p> <p><400> 222 cagccaagtg taacc</p>	15
	<p><210> 223 <211> 21 <212> DNA <213> 人工序列</p> <p><220> <223> 人工序列的说明：合成引物</p> <p><400> 223 gagatctgct tgaatgtgct g</p>	21
	<p><210> 224 <211> 22 <212> DNA <213> 人工序列</p>	

	<220>		
	<223>	人工序列的说明：合成引物	
	<400>	224	
		caacagaggt ttttcacagc at	22
	<210>	225	
	<211>	15	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	人工序列的说明：合成探针	
	<400>	225	
		tggcaaggtc cgccc	15
	<210>	226	
	<211>	21	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
[0051]	<220>		
	<223>	人工序列的说明：合成引物	
	<400>	226	
		catggtaggc tgagatgctt t	21
	<210>	227	
	<211>	22	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	人工序列的说明：合成引物	
	<400>	227	
		gacgataagg agacctgctt tg	22
	<210>	228	
	<211>	15	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	人工序列的说明：合成探针	
	<400>	228	

tgcaagtcaa gctgc	15
<210> 229 <211> 22 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 人工序列的说明：合成引物	
<400> 229 gcgcattctg gaatttgtac tc	22
<210> 230 <211> 21 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 人工序列的说明：合成引物	
<400> 230 gctatgccaa agtggttcgat g	21
[0052]	
<210> 231 <211> 15 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 人工序列的说明：合成探针	
<400> 231 ggaagagcct cagaa	15
<210> 232 <211> 22 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 人工序列的说明：合成引物	
<400> 232 tgatggatat tctctggatg gc	22
<210> 233 <211> 25	

	<p><212> DNA <213> 人工序列</p> <p><220> <223> 人工序列的说明：合成引物</p> <p><400> 233 cctgaatctt tactctctct cttg</p>	25
	<p><210> 234 <211> 25 <212> DNA <213> 人工序列</p> <p><220> <223> 人工序列的说明：合成探针</p> <p><400> 234 cagtttggtta cattctatatt cttcc</p>	25
[0053]	<p><210> 235 <211> 21 <212> DNA <213> 人工序列</p> <p><220> <223> 人工序列的说明：合成引物</p> <p><400> 235 gcacttcaag ttcacatca c</p>	21
	<p><210> 236 <211> 22 <212> DNA <213> 人工序列</p> <p><220> <223> 人工序列的说明：合成引物</p> <p><400> 236 accagtttat tgtcaccttc ca</p>	22
	<p><210> 237 <211> 17 <212> DNA <213> 人工序列</p> <p><220> <223> 人工序列的说明：合成</p>	

探针		
	<400> 237 cttgactttc tcccctg	17
	<210> 238 <211> 28 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 人工序列的说明：合成 引物	
	<400> 238 acatctatta ttgctactat tgtgtgtt	28
	<210> 239 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 人工序列的说明：合成 引物	
[0054]	<400> 239 tgggagcctc ttctctcttc	20
	<210> 240 <211> 15 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 人工序列的说明：合成 探针	
	<400> 240 attgtcgttg acacc	15
	<210> 241 <211> 24 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 人工序列的说明：合成 引物	
	<400> 241 ttcatttgat aagcacacag tctg	24

	<p><210> 242 <211> 22 <212> DNA <213> 人工序列</p> <p><220> <223> 人工序列的说明：合成引物</p> <p><400> 242 accttgaaca tggcatagtc tg</p>	22
	<p><210> 243 <211> 16 <212> DNA <213> 人工序列</p> <p><220> <223> 人工序列的说明：合成探针</p> <p><400> 243 agtcttccag ttccac</p>	16
[0055]	<p><210> 244 <211> 19 <212> DNA <213> 人工序列</p> <p><220> <223> 人工序列的说明：合成引物</p> <p><400> 244 aatcagctcc gcttccttg</p>	19
	<p><210> 245 <211> 21 <212> DNA <213> 人工序列</p> <p><220> <223> 人工序列的说明：合成引物</p> <p><400> 245 tgcttatctc gttgtccttc g</p>	21
	<p><210> 246 <211> 14 <212> DNA <213> 人工序列</p>	

	<220>		
	<223>	人工序列的说明：合成 探针	
	<400>	246 catcatccac atcc	14
	<210>	247	
	<211>	22	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	人工序列的说明：合成 引物	
	<400>	247 cagaagcgca gaagattgta ag	22
	<210>	248	
	<211>	20	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
[0056]	<220>		
	<223>	人工序列的说明：合成 引物	
	<400>	248 tctttctgat ctgccatgcg	20
	<210>	249	
	<211>	13	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	人工序列的说明：合成 探针	
	<400>	249 gtccacaacg gtt	13
	<210>	250	
	<211>	18	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	人工序列的说明：合成 引物	

[0057]	<400> 250 agaagcgagt ccgactgt	18
	<210> 251 <211> 19 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 人工序列的说明：合成 引物	
	<400> 251 cactgcacac catctcaca	19
	<210> 252 <211> 11 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 人工序列的说明：合成 探针	
	<400> 252 gccccaggac g	11
	<210> 253 <211> 22 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 人工序列的说明：合成 引物	
	<400> 253 cagatggagg aggaagattc tg	22
	<210> 254 <211> 22 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 人工序列的说明：合成 引物	
	<400> 254 gtatactgcc tggagttctc tg	22
	<210> 255	

	<p><211> 22 <212> DNA <213> 人工序列</p> <p><220> <223> 人工序列的说明：合成引物</p> <p><400> 255 ctggttcagg tctccattac ag</p>	22
	<p><210> 256 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列</p> <p><220> <223> 人工序列的说明：合成引物</p> <p><400> 256 gctgtgactc tgagcaagta</p>	20
[0058]	<p><210> 257 <211> 23 <212> DNA <213> 人工序列</p> <p><220> <223> 人工序列的说明：合成引物</p> <p><400> 257 tgtcctcctc aatctggttt atg</p>	23
	<p><210> 258 <211> 21 <212> DNA <213> 人工序列</p> <p><220> <223> 人工序列的说明：合成引物</p> <p><400> 258 gacagaaggg cttggagatt t</p>	21
	<p><210> 259 <211> 19 <212> DNA <213> 人工序列</p> <p><220></p>	

	<223> 人工序列的说明：合成引物	
	<400> 259 cggtggcggtt gtagaagat	19
	<210> 260 <211> 19 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 人工序列的说明：合成引物	
	<400> 260 agaagatctc tgcctccga	19
	<210> 261 <211> 22 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 人工序列的说明：合成引物	
[0059]	<400> 261 caagatagtt gtggtgggag ac	22
	<210> 262 <211> 21 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 人工序列的说明：合成引物	
	<400> 262 agggtctctg gtctactgat g	21
	<210> 263 <211> 19 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 人工序列的说明：合成引物	
	<400> 263 tttggattta ccgcttggg	19

	<p><210> 264 <211> 18 <212> DNA <213> 人工序列</p> <p><220> <223> 人工序列的说明：合成引物</p> <p><400> 264 gactccagtg tgggagag</p>	18
	<p><210> 265 <211> 22 <212> DNA <213> 人工序列</p> <p><220> <223> 人工序列的说明：合成引物</p> <p><400> 265 gggccacat ataaatcctc ac</p>	22
[0060]	<p><210> 266 <211> 21 <212> DNA <213> 人工序列</p> <p><220> <223> 人工序列的说明：合成引物</p> <p><400> 266 ctgctgggtca ctgttctcat c</p>	21
	<p><210> 267 <211> 17 <212> DNA <213> 人工序列</p> <p><220> <223> 人工序列的说明：合成引物</p> <p><400> 267 cttcgcggtg tggtgaa</p>	17
	<p><210> 268 <211> 18 <212> DNA</p>	

	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工序列的说明：合成引物	
	<400> 268 gctgtgtctc ccgtcaaa	18
	<210> 269 <211> 19 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工序列的说明：合成引物	
	<400> 269 ctgggacaca ttgccttct	19
	<210> 270 <211> 23 <212> DNA <213> 人工序列	
[0061]	<220>	
	<223> 人工序列的说明：合成引物	
	<400> 270 ccaccatgca ttctttcaat tct	23
	<210> 271 <211> 22 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工序列的说明：合成引物	
	<400> 271 aaaccagtt tgaggagatg ag	22
	<210> 272 <211> 22 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工序列的说明：合成引物	

	<p><400> 272 ccctgccaat atcttgggta at</p>	22
	<p><210> 273 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列</p>	
	<p><220> <223> 人工序列的说明：合成 引物</p>	
	<p><400> 273 acagcaactt ccttgatccc</p>	20
	<p><210> 274 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列</p>	
	<p><220> <223> 人工序列的说明：合成 引物</p>	
[0062]	<p><400> 274 gcggcatcac tgtctatgaa</p>	20
	<p><210> 275 <211> 21 <212> DNA <213> 人工序列</p>	
	<p><220> <223> 人工序列的说明：合成 引物</p>	
	<p><400> 275 ccttgccctt tcttaggctt t</p>	21
	<p><210> 276 <211> 19 <212> DNA <213> 人工序列</p>	
	<p><220> <223> 人工序列的说明：合成 引物</p>	
	<p><400> 276 agcagtgggt tcagcatca</p>	19

	<p><210> 277 <211> 27 <212> DNA <213> 人工序列</p> <p><220> <223> 人工序列的说明：合成引物</p> <p><400> 277 cagataactc tcattcagta ttcttgg</p>	27
	<p><210> 278 <211> 24 <212> DNA <213> 人工序列</p> <p><220> <223> 人工序列的说明：合成引物</p> <p><400> 278 ctctaagtga gcttgacctc atct</p>	24
[0063]	<p><210> 279 <211> 21 <212> DNA <213> 人工序列</p> <p><220> <223> 人工序列的说明：合成引物</p> <p><400> 279 gagaagttgg acaagattgg g</p>	21
	<p><210> 280 <211> 25 <212> DNA <213> 人工序列</p> <p><220> <223> 人工序列的说明：合成引物</p> <p><400> 280 gctgagaagt tctgtgaatt ctta</p>	25
	<p><210> 281 <211> 23 <212> DNA <213> 人工序列</p>	

	<220>		
	<223>	人工序列的说明：合成引物	
	<400>	281	
		gtttcctcaa ccagtcacat aga	23
	<210>	282	
	<211>	23	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	人工序列的说明：合成引物	
	<400>	282	
		agttgtctag cagtttccac ata	23
	<210>	283	
	<211>	20	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
[0064]	<220>		
	<223>	人工序列的说明：合成引物	
	<400>	283	
		gggaaagcct gtctgaagtg	20
	<210>	284	
	<211>	21	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	人工序列的说明：合成引物	
	<400>	284	
		tcgtagcctc cagggtata g	21
	<210>	285	
	<211>	23	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	人工序列的说明：合成引物	
	<400>	285	

	gttacaggtc tcctatctac agc	23
	<210> 286 <211> 18 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 人工序列的说明：合成引物	
	<400> 286 gctcagcctc tctggaag	18
	<210> 287 <211> 22 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 人工序列的说明：合成引物	
	<400> 287 ctctcttacc ctgattcgga tg	22
[0065]	<210> 288 <211> 17 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 人工序列的说明：合成引物	
	<400> 288 ggcgtctgcc tgtgatt	17
	<210> 289 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 人工序列的说明：合成引物	
	<400> 289 cctgagttct ggtgcaaag	20
	<210> 290 <211> 18	

	<p><212> DNA <213> 人工序列</p> <p><220> <223> 人工序列的说明：合成引物</p> <p><400> 290 gggcatgagc agcttcaa</p>	18
	<p><210> 291 <211> 19 <212> DNA <213> 人工序列</p> <p><220> <223> 人工序列的说明：合成引物</p> <p><400> 291 ccactggctt ggtggattt</p>	19
[0066]	<p><210> 292 <211> 21 <212> DNA <213> 人工序列</p> <p><220> <223> 人工序列的说明：合成引物</p> <p><400> 292 tcaacagaaa tgcccagagt t</p>	21
	<p><210> 293 <211> 18 <212> DNA <213> 人工序列</p> <p><220> <223> 人工序列的说明：合成引物</p> <p><400> 293 cttctccagc tgggcatt</p>	18
	<p><210> 294 <211> 17 <212> DNA <213> 人工序列</p> <p><220> <223> 人工序列的说明：合成</p>	

引物		
	<400> 294 tgctgtggca gcagatg	17
	<210> 295 <211> 17 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 人工序列的说明：合成 引物	
	<400> 295 cggatcatgtc cgccttc	17
	<210> 296 <211> 22 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 人工序列的说明：合成 引物	
[0067]	<400> 296 gcgtttccat tatgtcggtg tc	22
	<210> 297 <211> 19 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 人工序列的说明：合成 引物	
	<400> 297 ccctccttct aggatagcg	19
	<210> 298 <211> 17 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 人工序列的说明：合成 引物	
	<400> 298 aaccggaat gggatgat	17

	<210> 299	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工序列的说明：合成引物	
	<400> 299	
	aaacggactg atgtcactgg	20
	<210> 300	
	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工序列的说明：合成引物	
	<400> 300	
	tggacagaag acatactcat aaagg	25
[0068]	<210> 301	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工序列的说明：合成引物	
	<400> 301	
	cccactgctt caggaaacat a	21
	<210> 302	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工序列的说明：合成引物	
	<400> 302	
	gtcagacatc ttccctccat tc	22
	<210> 303	
	<211> 18	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	

	<220>		
	<223>	人工序列的说明：合成引物	
	<400>	303	
		gccgcactga cagtatga	18
	<210>	304	
	<211>	20	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	人工序列的说明：合成引物	
	<400>	304	
		cagaaggagc aggactgaaa	20
	<210>	305	
	<211>	18	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
[0069]	<220>		
	<223>	人工序列的说明：合成引物	
	<400>	305	
		agcggcgcct cttatatc	18
	<210>	306	
	<211>	22	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	人工序列的说明：合成引物	
	<400>	306	
		gcgttgaaag agaagacaaa ct	22
	<210>	307	
	<211>	18	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	人工序列的说明：合成引物	

	<p><400> 307 ctactgcaac ggcaacct</p>	18
	<p><210> 308 <211> 18 <212> DNA <213> 人工序列</p>	
	<p><220> <223> 人工序列的说明：合成 引物</p>	
	<p><400> 308 gggccatgtt cttgctca</p>	18
	<p><210> 309 <211> 19 <212> DNA <213> 人工序列</p>	
	<p><220> <223> 人工序列的说明：合成 引物</p>	
[0070]	<p><400> 309 cagactcgct cgctcattt</p>	19
	<p><210> 310 <211> 19 <212> DNA <213> 人工序列</p>	
	<p><220> <223> 人工序列的说明：合成 引物</p>	
	<p><400> 310 cctccatgcc cactttctt</p>	19
	<p><210> 311 <211> 21 <212> DNA <213> 人工序列</p>	
	<p><220> <223> 人工序列的说明：合成 引物</p>	
	<p><400> 311 cccaagtcag tacgtccaaa t</p>	21
	<p><210> 312</p>	

	<p><211> 24 <212> DNA <213> 人工序列</p> <p><220> <223> 人工序列的说明：合成引物</p> <p><400> 312 gcctaattcc cgaataacat caac</p>	24
	<p><210> 313 <211> 22 <212> DNA <213> 人工序列</p> <p><220> <223> 人工序列的说明：合成引物</p> <p><400> 313 gctttaaaga aagtgtttgc tg</p>	22
[0071]	<p><210> 314 <211> 21 <212> DNA <213> 人工序列</p> <p><220> <223> 人工序列的说明：合成引物</p> <p><400> 314 ctgtatctgc aggttcgtaa g</p>	21
	<p><210> 315 <211> 18 <212> DNA <213> 人工序列</p> <p><220> <223> 人工序列的说明：合成引物</p> <p><400> 315 aagttccccg tgtgcatc</p>	18
	<p><210> 316 <211> 18 <212> DNA <213> 人工序列</p> <p><220></p>	

	<p><223> 人工序列的说明：合成引物</p> <p><400> 316 ctcagcctcc tcgatgaa</p>	18
	<p><210> 317 <211> 19 <212> DNA <213> 人工序列</p> <p><220> <223> 人工序列的说明：合成引物</p> <p><400> 317 gtgaggaggc aaggttctg</p>	19
	<p><210> 318 <211> 19 <212> DNA <213> 人工序列</p> <p><220> <223> 人工序列的说明：合成引物</p>	
[0072]	<p><400> 318 ggctccagag agggtagtt</p>	19
	<p><210> 319 <211> 19 <212> DNA <213> 人工序列</p> <p><220> <223> 人工序列的说明：合成引物</p> <p><400> 319 tttggattta ccgcttggg</p>	19
	<p><210> 320 <211> 18 <212> DNA <213> 人工序列</p> <p><220> <223> 人工序列的说明：合成引物</p> <p><400> 320 gactccagtg tgggagag</p>	18

	<p><210> 321 <211> 17 <212> DNA <213> 人工序列</p> <p><220> <223> 人工序列的说明：合成引物</p> <p><400> 321 cttcgcggtg tggtgaa</p>	17
	<p><210> 322 <211> 18 <212> DNA <213> 人工序列</p> <p><220> <223> 人工序列的说明：合成引物</p> <p><400> 322 gctgtgtctc ccgtcaaa</p>	18
[0073]	<p><210> 323 <211> 21 <212> DNA <213> 人工序列</p> <p><220> <223> 人工序列的说明：合成引物</p> <p><400> 323 atcctgctgt atcacatcat g</p>	21
	<p><210> 324 <211> 21 <212> DNA <213> 人工序列</p> <p><220> <223> 人工序列的说明：合成引物</p> <p><400> 324 ctgacaggtt tcaaagaacc t</p>	21
	<p><210> 325 <211> 18 <212> DNA</p>	

	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工序列的说明：合成引物	
	<400> 325	
	ccagtgcctt tggttgct	18
	<210> 326	
	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工序列的说明：合成引物	
	<400> 326	
	caagagccag atgggcaag	19
	<210> 327	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
[0074]	<220>	
	<223> 人工序列的说明：合成引物	
	<400> 327	
	tgccaagaga agatgctcac	20
	<210> 328	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工序列的说明：合成引物	
	<400> 328	
	cattgagtgc caacatgaag ac	22
	<210> 329	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工序列的说明：合成引物	

	<p><400> 329 aagaagctgc caataggat</p>	20
	<p><210> 330 <211> 18 <212> DNA <213> 人工序列</p>	
	<p><220> <223> 人工序列的说明：合成 引物</p>	
	<p><400> 330 tgtccagaga ggtggatg</p>	18
	<p><210> 331 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列</p>	
	<p><220> <223> 人工序列的说明：合成 引物</p>	
[0075]	<p><400> 331 tcaatgagaa gcaccttggc</p>	20
	<p><210> 332 <211> 22 <212> DNA <213> 人工序列</p>	
	<p><220> <223> 人工序列的说明：合成 引物</p>	
	<p><400> 332 atcagcagag tcaatcagtg ag</p>	22
	<p><210> 333 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列</p>	
	<p><220> <223> 人工序列的说明：合成 引物</p>	
	<p><400> 333 gtcttcaggc tcaaacaggt</p>	20

	<p><210> 334 <211> 23 <212> DNA <213> 人工序列</p> <p><220> <223> 人工序列的说明：合成引物</p> <p><400> 334 tctccaaact tcttcctcat tcc</p>	23
	<p><210> 335 <211> 17 <212> DNA <213> 人工序列</p> <p><220> <223> 人工序列的说明：合成引物</p> <p><400> 335 gtgtgctgga cgctgga</p>	17
[0076]	<p><210> 336 <211> 21 <212> DNA <213> 人工序列</p> <p><220> <223> 人工序列的说明：合成引物</p> <p><400> 336 ctgtacggaa tgcgtttctt g</p>	21
	<p><210> 337 <211> 24 <212> DNA <213> 人工序列</p> <p><220> <223> 人工序列的说明：合成引物</p> <p><400> 337 caattcagtc ttcagcaact tgag</p>	24
	<p><210> 338 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列</p>	

	<220>		
	<223>	人工序列的说明：合成引物	
	<400>	338	
		tgttcctcaaag ctcttcacaa	20
	<210>	339	
	<211>	18	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	人工序列的说明：合成引物	
	<400>	339	
		cccaacccag gcatgatg	18
	<210>	340	
	<211>	20	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
[0077]	<223>	人工序列的说明：合成引物	
	<400>	340	
		gatccttatg ccatcacctg	20
	<210>	341	
	<211>	21	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	人工序列的说明：合成引物	
	<400>	341	
		gctgtgtaca gtcattgatg g	21
	<210>	342	
	<211>	19	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	人工序列的说明：合成引物	
	<400>	342	

catgttgcct acagcctct	19
<210> 343 <211> 25 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 人工序列的说明：合成引物	
<400> 343 gtgatacctt gaagcacacc attac	25
<210> 344 <211> 18 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 人工序列的说明：合成引物	
<400> 344 cagccagatg tgttgcca	18
[0078]	
<210> 345 <211> 23 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 人工序列的说明：合成引物	
<400> 345 ctgacagtta gagccgatat cac	23
<210> 346 <211> 24 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 人工序列的说明：合成引物	
<400> 346 caatgtgata ggtactctca gagg	24
<210> 347 <211> 20	

	<212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 人工序列的说明：合成 探针	
	<400> 347 acccggaaac cagcagagct	20
	<210> 348 <211> 21 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 人工序列的说明：合成 探针	
	<400> 348 tcttgtcagc agcgttcccg g	21
	<210> 349 <211> 27 <212> DNA <213> 人工序列	
[0079]	<220> <223> 人工序列的说明：合成 探针	
	<400> 349 tggctattct tctttaggca atgggca	27
	<210> 350 <211> 26 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 人工序列的说明：合成 探针	
	<400> 350 acatggctta tcagcaggtt catgca	26
	<210> 351 <211> 23 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 人工序列的说明：合成	

探针		
	<400> 351 aaagcacctg ctcgggtgat tct	23
	<210> 352 <211> 22 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 人工序列的说明：合成 探针	
	<400> 352 cagcatttgc agactccagc gg	22
	<210> 353 <211> 27 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 人工序列的说明：合成 探针	
[0080]	<400> 353 atgcttacga acctgcagat acagctc	27
	<210> 354 <211> 25 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 人工序列的说明：合成 探针	
	<400> 354 atgaacaaca gctgctccac tctga	25
	<210> 355 <211> 18 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 人工序列的说明：合成 探针	
	<400> 355 aacctgcaga tacagctc	18

	<p><210> 356 <211> 17 <212> DNA <213> 人工序列</p> <p><220> <223> 人工序列的说明：合成 探针</p> <p><400> 356 cctttctcct gatggcc</p>	17
	<p><210> 357 <211> 19 <212> DNA <213> 人工序列</p> <p><220> <223> 人工序列的说明：合成 探针</p> <p><400> 357 gtccaagaga gctcagtct</p>	19
[0081]	<p><210> 358 <211> 16 <212> DNA <213> 人工序列</p> <p><220> <223> 人工序列的说明：合成 探针</p> <p><400> 358 caaagtaccc gcactg</p>	16
	<p><210> 359 <211> 15 <212> DNA <213> 人工序列</p> <p><220> <223> 人工序列的说明：合成 探针</p> <p><400> 359 ccaaggtcca agcct</p>	15
	<p><210> 360 <211> 12 <212> DNA <213> 人工序列</p>	

	<220>		
	<223>	人工序列的说明：合成 探针	
	<400>	360 cagcgttccc gg	12
	<210>	361	
	<211>	17	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	人工序列的说明：合成 探针	
	<400>	361 ataccattg tcatcgc	17
	<210>	362	
	<211>	16	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
[0082]	<220>		
	<223>	人工序列的说明：合成 探针	
	<400>	362 atcacagagg gagacc	16
	<210>	363	
	<211>	15	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	人工序列的说明：合成 探针	
	<400>	363 ctgtgctgga caatg	15
	<210>	364	
	<211>	14	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	人工序列的说明：合成 探针	

	<p><400> 364 cctgggcacg atgc</p>	14
	<p><210> 365 <211> 17 <212> DNA <213> 人工序列</p>	
	<p><220> <223> 人工序列的说明：合成 探针</p>	
	<p><400> 365 actcctctga ccacacc</p>	17
	<p><210> 366 <211> 28 <212> DNA <213> 人工序列</p>	
	<p><220> <223> 人工序列的说明：合成 探针</p>	
[0083]	<p><400> 366 tgcaagttat caagaagttt tgtaagtt</p>	28
	<p><210> 367 <211> 16 <212> DNA <213> 人工序列</p>	
	<p><220> <223> 人工序列的说明：合成 探针</p>	
	<p><400> 367 atgctgtatt ttgcac</p>	16
	<p><210> 368 <211> 23 <212> DNA <213> 人工序列</p>	
	<p><220> <223> 人工序列的说明：合成 探针</p>	
	<p><400> 368 ttttaaccac catgcattct ttc</p>	23
	<p><210> 369</p>	

	<p><211> 13 <212> DNA <213> 人工序列</p> <p><220> <223> 人工序列的说明：合成 探针</p> <p><400> 369 ggttctctgc ctg</p>	13
	<p><210> 370 <211> 13 <212> DNA <213> 人工序列</p> <p><220> <223> 人工序列的说明：合成 探针</p> <p><400> 370 gaggtcctga ggc</p>	13
[0084]	<p><210> 371 <211> 15 <212> DNA <213> 人工序列</p> <p><220> <223> 人工序列的说明：合成 探针</p> <p><400> 371 tgctgatggc cctca</p>	15
	<p><210> 372 <211> 12 <212> DNA <213> 人工序列</p> <p><220> <223> 人工序列的说明：合成 探针</p> <p><400> 372 gagccaaacg cc</p>	12
	<p><210> 373 <211> 13 <212> DNA <213> 人工序列</p> <p><220></p>	

	<p><223> 人工序列的说明：合成 探针</p> <p><400> 373 cccaggtggt cca</p>	13
	<p><210> 374 <211> 12 <212> DNA <213> 人工序列</p> <p><220> <223> 人工序列的说明：合成 探针</p> <p><400> 374 cgggtggcatt gg</p>	12
	<p><210> 375 <211> 14 <212> DNA <213> 人工序列</p> <p><220> <223> 人工序列的说明：合成 探针</p>	
[0085]	<p><400> 375 ggacaacgac cttt</p>	14
	<p><210> 376 <211> 12 <212> DNA <213> 人工序列</p> <p><220> <223> 人工序列的说明：合成 探针</p> <p><400> 376 gccacccac tc</p>	12
	<p><210> 377 <211> 16 <212> DNA <213> 人工序列</p> <p><220> <223> 人工序列的说明：合成 探针</p> <p><400> 377 cccaatgata aggagg</p>	16

	<p><210> 378 <211> 23 <212> DNA <213> 人工序列</p> <p><220> <223> 人工序列的说明：合成引物</p> <p><400> 378 ctgacagtta gagccgatat cac</p>	23
	<p><210> 379 <211> 24 <212> DNA <213> 人工序列</p> <p><220> <223> 人工序列的说明：合成引物</p> <p><400> 379 caattcagtc ttcagcaact tgag</p>	24
[0086]	<p><210> 380 <211> 21 <212> DNA <213> 人工序列</p> <p><220> <223> 人工序列的说明：合成引物</p> <p><400> 380 gtttgtcctc ctcaatctgg t</p>	21
	<p><210> 381 <211> 23 <212> DNA <213> 人工序列</p> <p><220> <223> 人工序列的说明：合成引物</p> <p><400> 381 gtgatatcgg ctctaactgt cag</p>	23
	<p><210> 382 <211> 17 <212> DNA</p>	

	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工序列的说明：合成引物	
	<400> 382	
	tcagcagcct ctctcca	17
	<210> 383	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工序列的说明：合成引物	
	<400> 383	
	gggcaagatt tgaattcgat ca	22
	<210> 384	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
[0087]	<220>	
	<223> 人工序列的说明：合成引物	
	<400> 384	
	gctacagcga cgtgaagaag	20
	<210> 385	
	<211> 18	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工序列的说明：合成引物	
	<400> 385	
	gacctcggtta cctggaca	18
	<210> 386	
	<211> 17	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工序列的说明：合成引物	

	<p><400> 386 tcgatgtggc cctggag</p>	17
	<p><210> 387 <211> 19 <212> DNA <213> 人工序列</p>	
	<p><220> <223> 人工序列的说明：合成 引物</p>	
	<p><400> 387 ttccgctcat cttgctcag</p>	19
	<p><210> 388 <211> 22 <212> DNA <213> 人工序列</p>	
	<p><220> <223> 人工序列的说明：合成 引物</p>	
[0088]	<p><400> 388 atcagcagag tcaatcagtg ag</p>	22
	<p><210> 389 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列</p>	
	<p><220> <223> 人工序列的说明：合成 引物</p>	
	<p><400> 389 gatccttatg ccatcaccgt</p>	20
	<p><210> 390 <211> 19 <212> DNA <213> 人工序列</p>	
	<p><220> <223> 人工序列的说明：合成 引物</p>	
	<p><400> 390 agctccttcc agtccgaat</p>	19

	<p><210> 391 <211> 21 <212> DNA <213> 人工序列</p> <p><220> <223> 人工序列的说明：合成引物</p> <p><400> 391 gtctgtcat caatcacctc a</p>	21
	<p><210> 392 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列</p> <p><220> <223> 人工序列的说明：合成引物</p> <p><400> 392 tcctccactc atctccaact</p>	20
[0089]	<p><210> 393 <211> 21 <212> DNA <213> 人工序列</p> <p><220> <223> 人工序列的说明：合成引物</p> <p><400> 393 cctggatgct gacatttctg a</p>	21
	<p><210> 394 <211> 23 <212> DNA <213> 人工序列</p> <p><220> <223> 人工序列的说明：合成引物</p> <p><400> 394 ggacagagag aacaaggatg aac</p>	23
	<p><210> 395 <211> 23 <212> DNA <213> 人工序列</p>	

	<220>		
	<223>	人工序列的说明：合成引物	
	<400>	395	
		tgtgggagaa tataaggtgga ttg	23
	<210>	396	
	<211>	26	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	人工序列的说明：合成引物	
	<400>	396	
		ggattaagtt cataagattc catgct	26
	<210>	397	
	<211>	23	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
[0090]	<223>	人工序列的说明：合成引物	
	<400>	397	
		cttcggcttt gatatcgttt cag	23
	<210>	398	
	<211>	23	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	人工序列的说明：合成引物	
	<400>	398	
		gacaacaacc accttcaata cac	23
	<210>	399	
	<211>	19	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	人工序列的说明：合成引物	
	<400>	399	

	agatccagga ccgatggtt	19
	<210> 400	
	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工序列的说明: 合成引物	
	<400> 400	
	ggactggata aatgtattca agca	24
	<210> 401	
	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工序列的说明: 合成引物	
	<400> 401	
	ggcaattggt ttgaggcaa	19
[0091]	<210> 402	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工序列的说明: 合成引物	
	<400> 402	
	ggtgtttggt ctaggatgga g	21
	<210> 403	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工序列的说明: 合成引物	
	<400> 403	
	actgggtttg acttcgtagc	20
	<210> 404	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	

	<223> 人工序列的说明：合成引物	
	<400> 404 cagtgcttgc agttcaaaca g	21
	<210> 405 <211> 24 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 人工序列的说明：合成引物	
	<400> 405 ccagtagaag gtttttggat tgtc	24
	<210> 406 <211> 22 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 人工序列的说明：合成引物	
[0092]	<400> 406 tcatttggac gtactgactt gg	22
	<210> 407 <211> 19 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 人工序列的说明：合成引物	
	<400> 407 cttgctccag ctcctgttc	19
	<210> 408 <211> 21 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 人工序列的说明：合成引物	
	<400> 408 gcaacaagtg actgagacct a	21
	<210> 409 <211> 20 <212> DNA	

	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工序列的说明: 合成引物	
	<400> 409	
	gtccacacac tcatgctgat	20
	<210> 410	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工序列的说明: 合成引物	
	<400> 410	
	gtcttttcaa ccatgtcctc ca	22
	<210> 411	
	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
[0093]	<220>	
	<223> 人工序列的说明: 合成引物	
	<400> 411	
	acttccttga tccctgcca	19
	<210> 412	
	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工序列的说明: 合成引物	
	<400> 412	
	actctgaaaa actttggact gatg	24
	<210> 413	
	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工序列的说明: 合成引物	
	<400> 413	
	tctagcaatc aacagatgag ttct	24

[0094]	<210> 414	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工序列的说明：合成引物	
	<400> 414	
	cctcaaatac atcaagcaca gc	22
	<210> 415	
	<211> 18	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工序列的说明：合成引物	
	<400> 415	
	ggaagccttc accagcaa	18
	<210> 416	
	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工序列的说明：合成引物	
	<400> 416	
	gagatgctta agtgtgacaa gttc	24
	<210> 417	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工序列的说明：合成引物	
	<400> 417	
	cctcagattt caactcgttg tc	22
	<210> 418	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工序列的说明：合成引物	
	<400> 418	

	ttgcaggctt cacatacctt	20
	<210> 419 <211> 17 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 人工序列的说明：合成引物	
	<400> 419 gcccgacatg cttgagt	17
	<210> 420 <211> 21 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 人工序列的说明：合成引物	
	<400> 420 atcttcctc cattctgett c	21
[0095]	<210> 421 <211> 22 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 人工序列的说明：合成引物	
	<400> 421 cagttcccac tcactttctc ag	22
	<210> 422 <211> 19 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 人工序列的说明：合成引物	
	<400> 422 ccgacaacct caagtgctg	19
	<210> 423 <211> 22 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 人工序列的说明：合成引物	
[0096]	<400> 423 gctggggaaa gttaatgttc ac	22

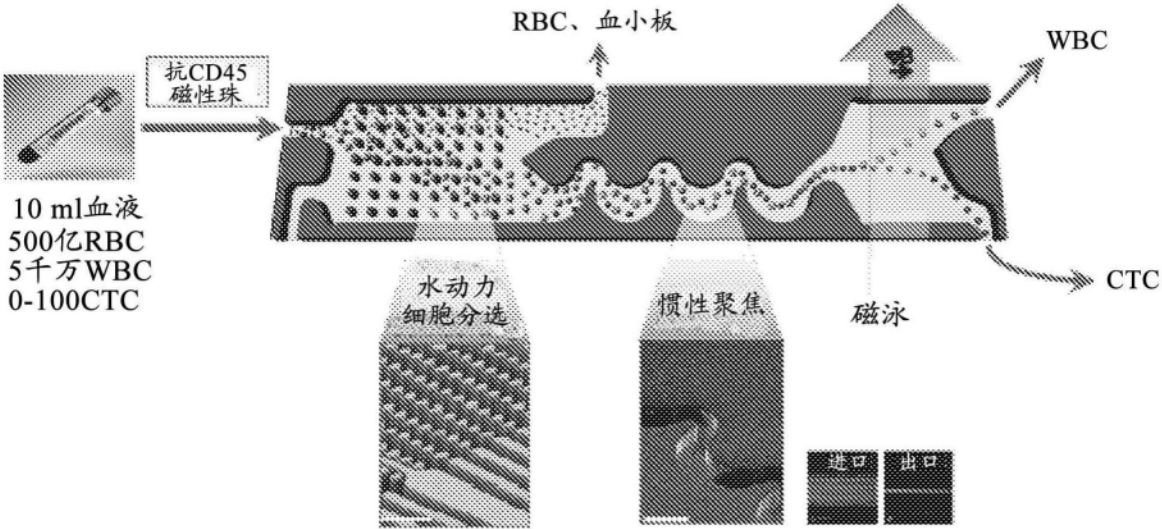


图1

多重前列腺CTC测定
4个谱系特异性基因
4个癌症特异性基因

反应1 (FAM/HEX)	反应2 (FAM/HEX)
TMPRSS2 (100/0)	KLK3 (100/0)
FAT1 (65/35)	HOXB13 (70/30)
KLK2 (40/60)	AGR2 (50/50)
STEAP2 (0/100)	FOLH1 (0/100)

图4

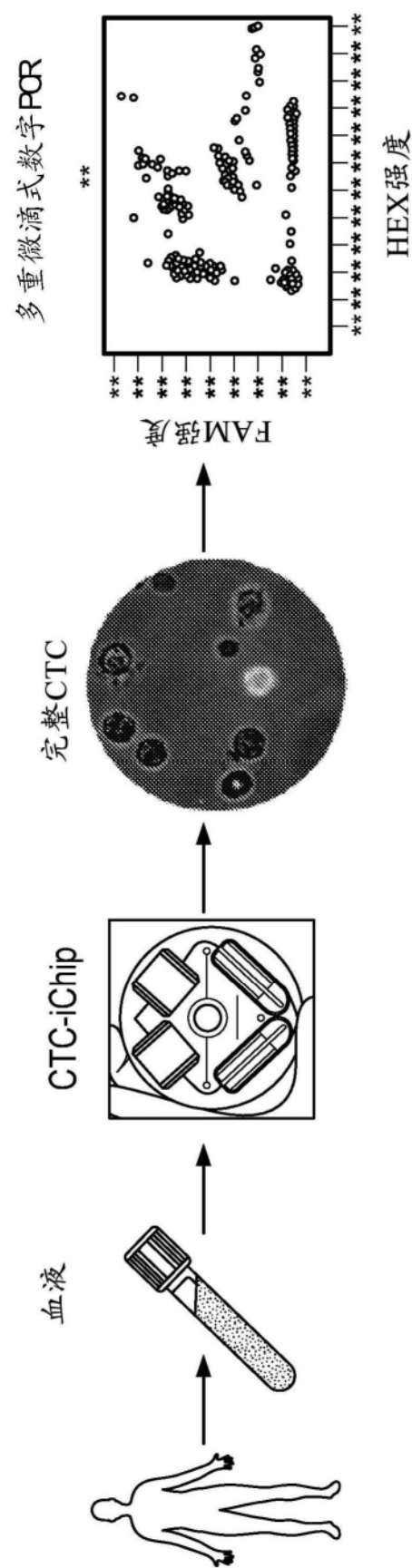


图2

RNA-Seq数据：患者的单个前列腺CTC

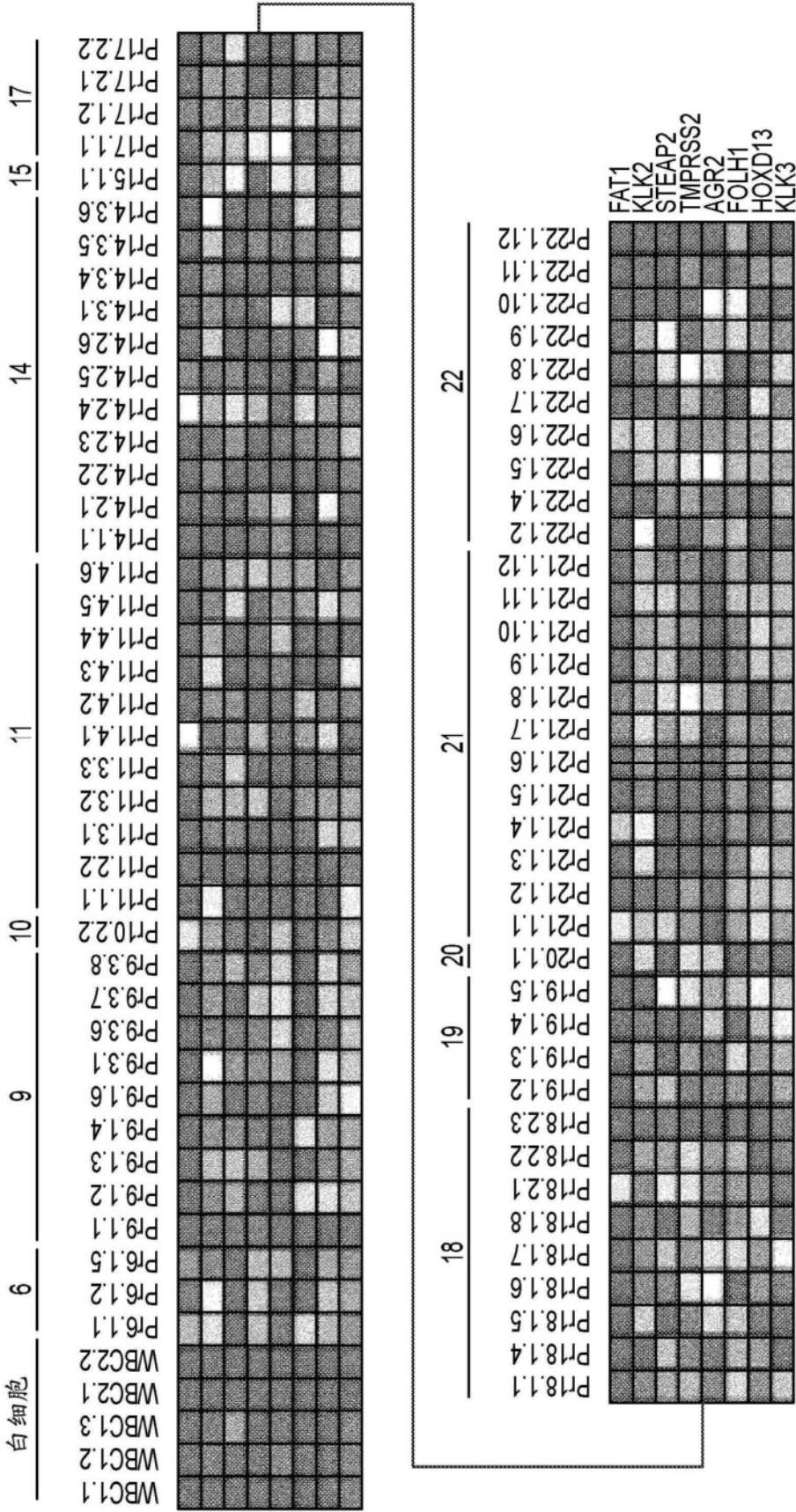


图3

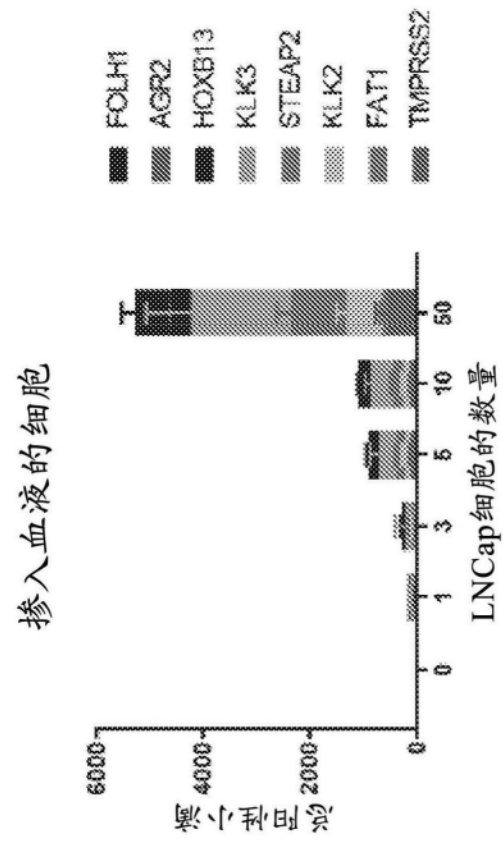


图6

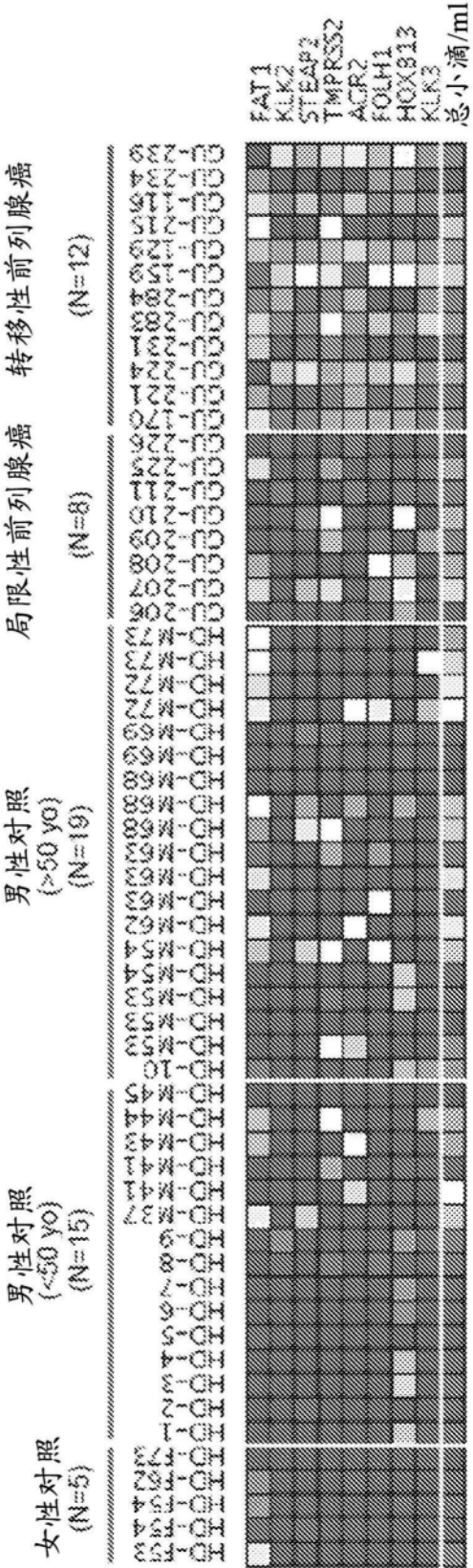


图7A

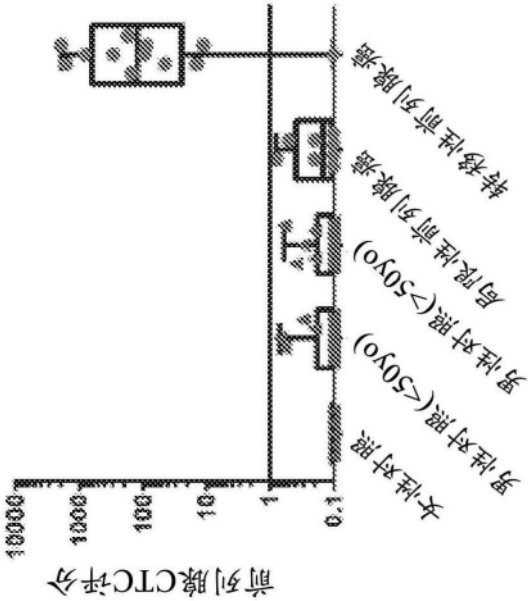


图7B

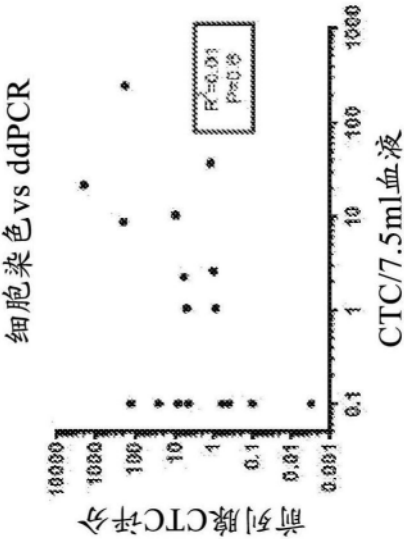


图7C

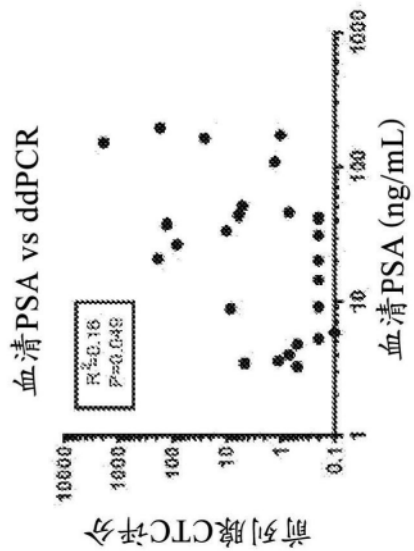


图7D

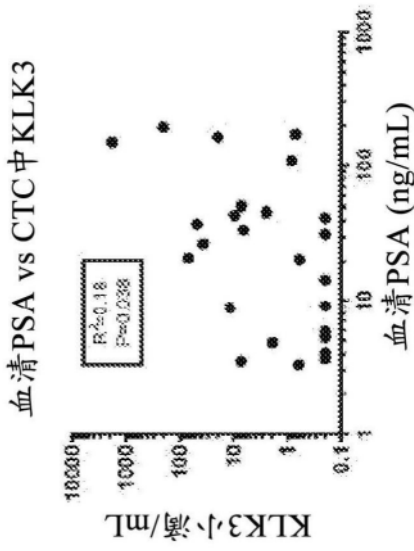


图7E

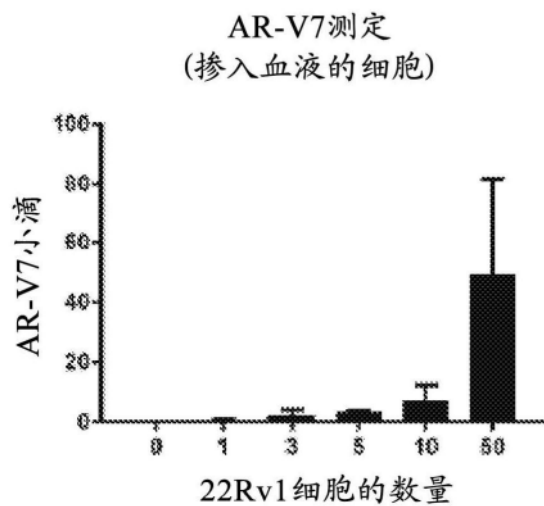


图8A

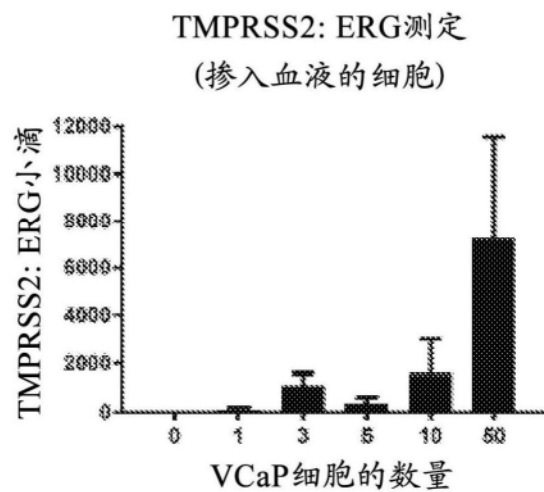


图8B

转移性前列腺癌患者

		AR-V7	
		-	+
TMPRSS2:ERG	-	0	8
	+	2	3

图8C

健康供体

		AR-V7	
		-	+
TMPRSS2:ERG	-	12	0
	+	0	0

图8D

CTC与匹配的档案活检之间的一致性

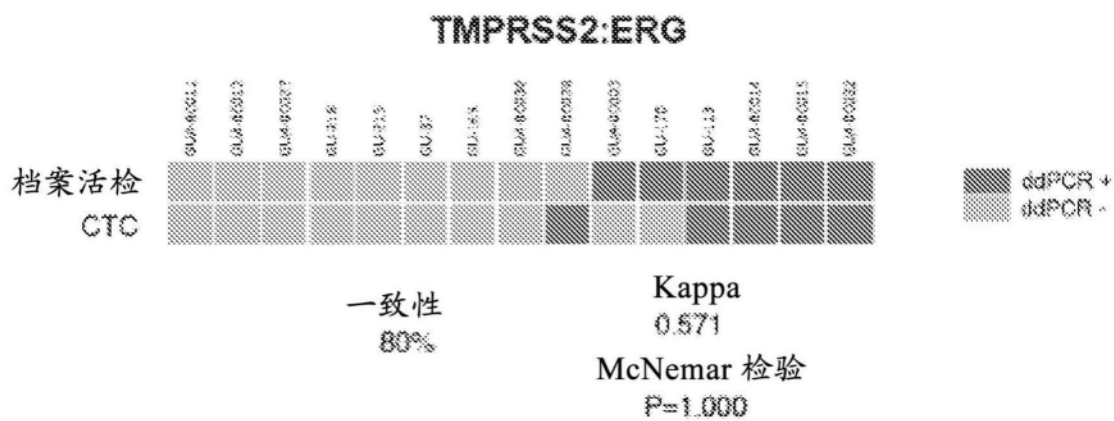


图8E

CTC与匹配的档案活检之间的一致性

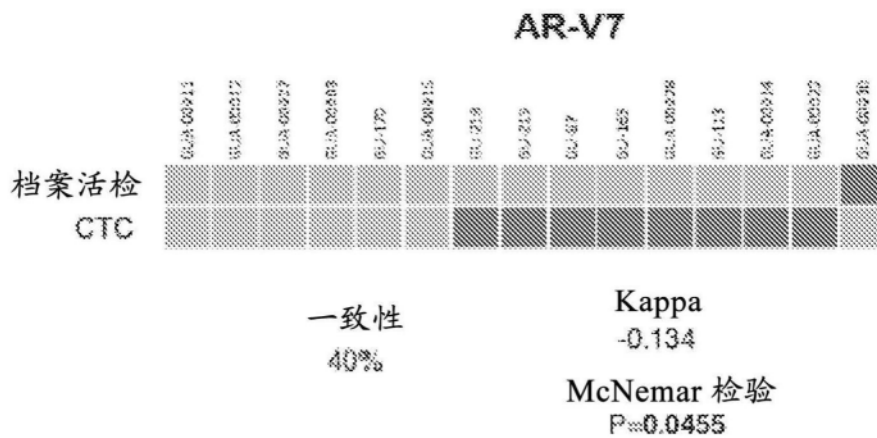


图8F

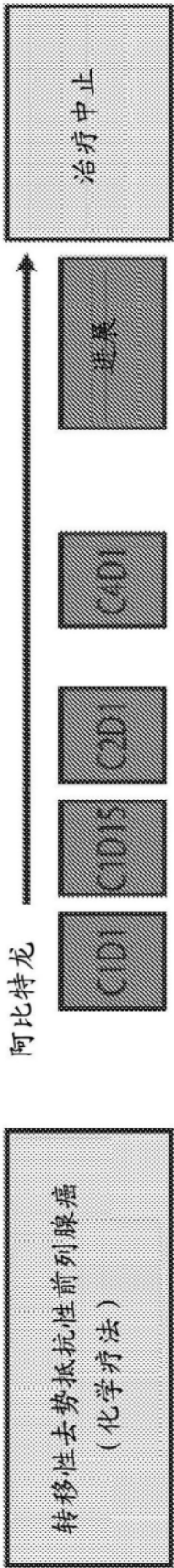


图9A

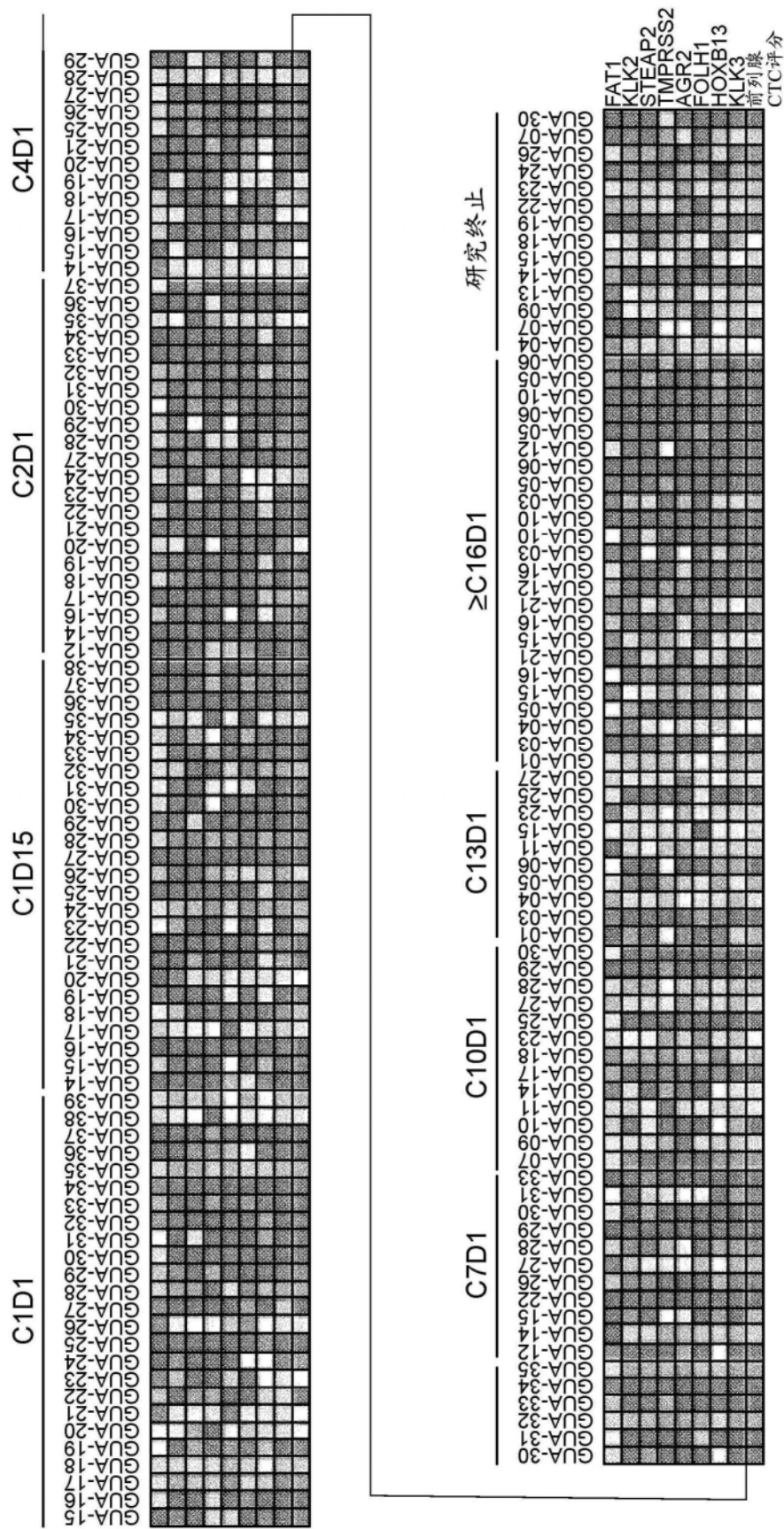


图9B

放射照相无进展生存期 (R-PFS)

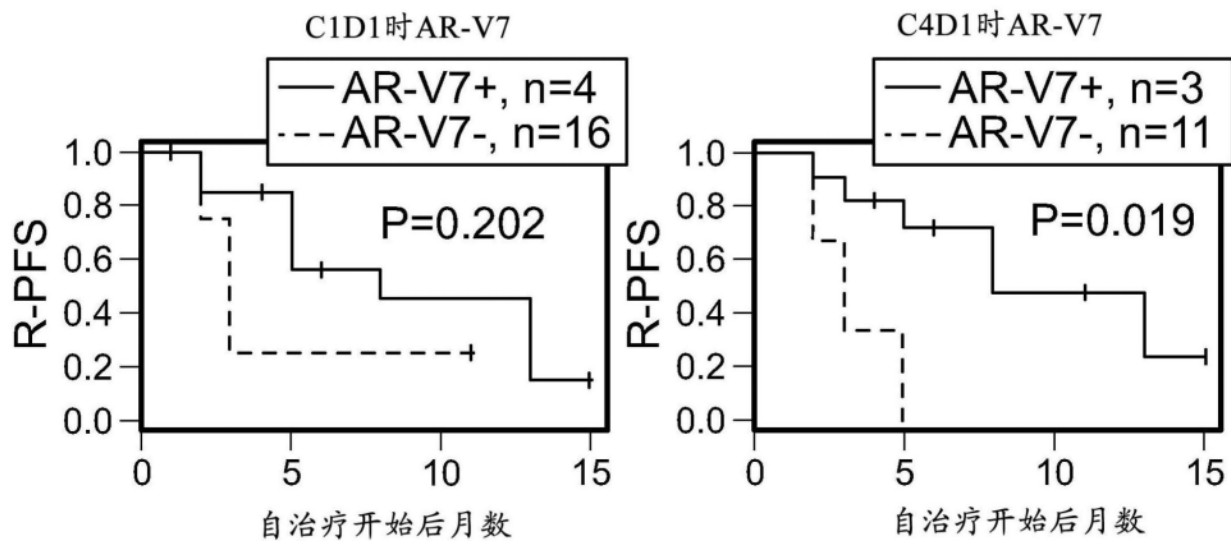


图10A

总体生存期 (OS)

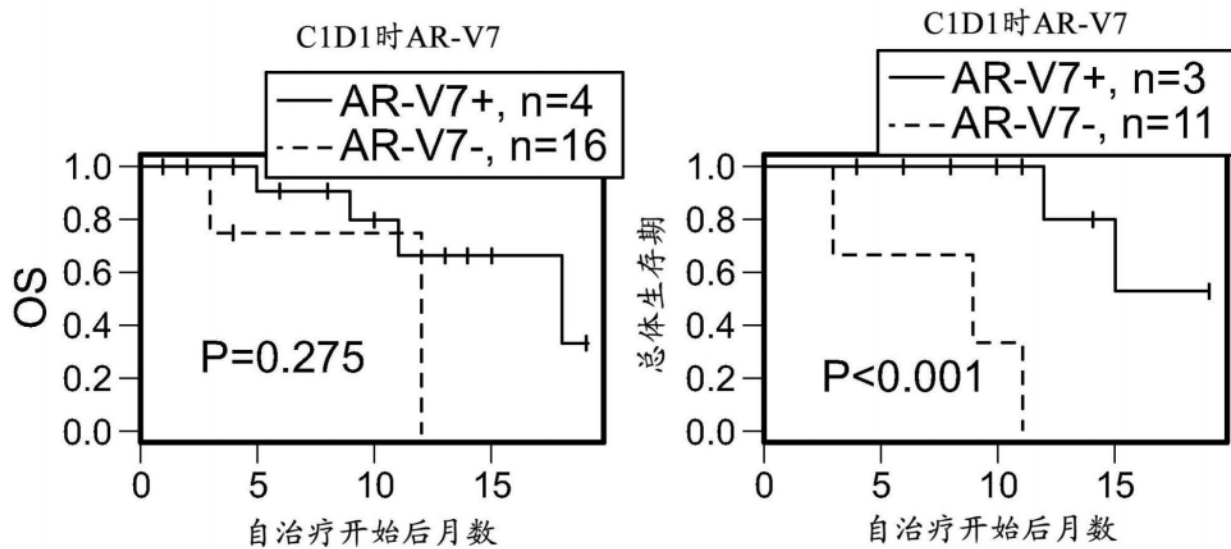


图10B

放射照相无进展生存期 (R-PFS)

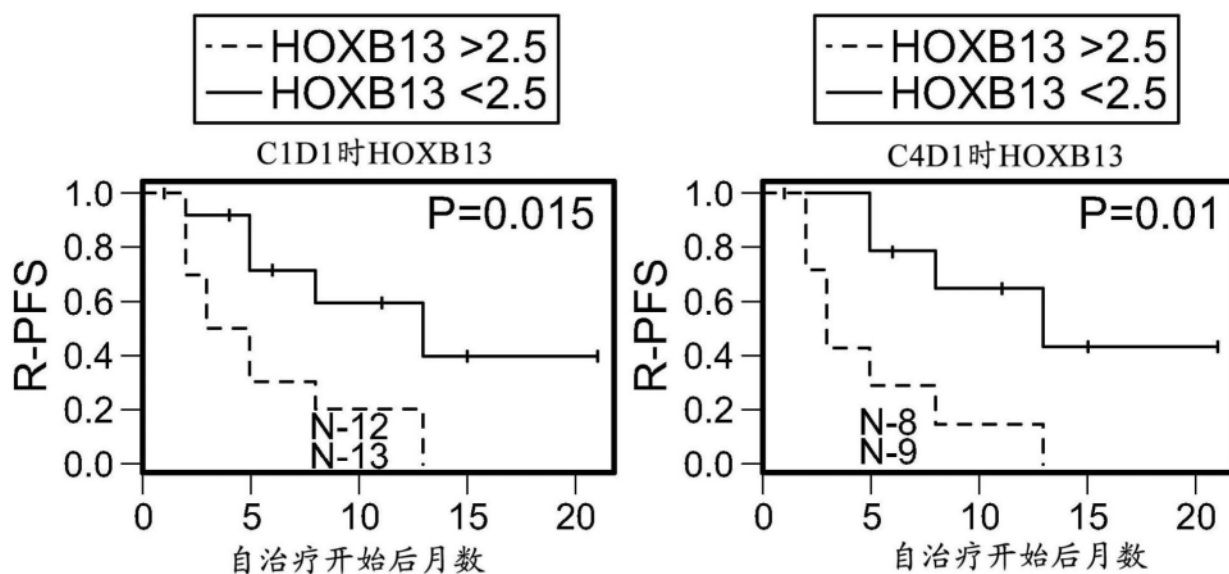


图10C

总体生存期 (OS)

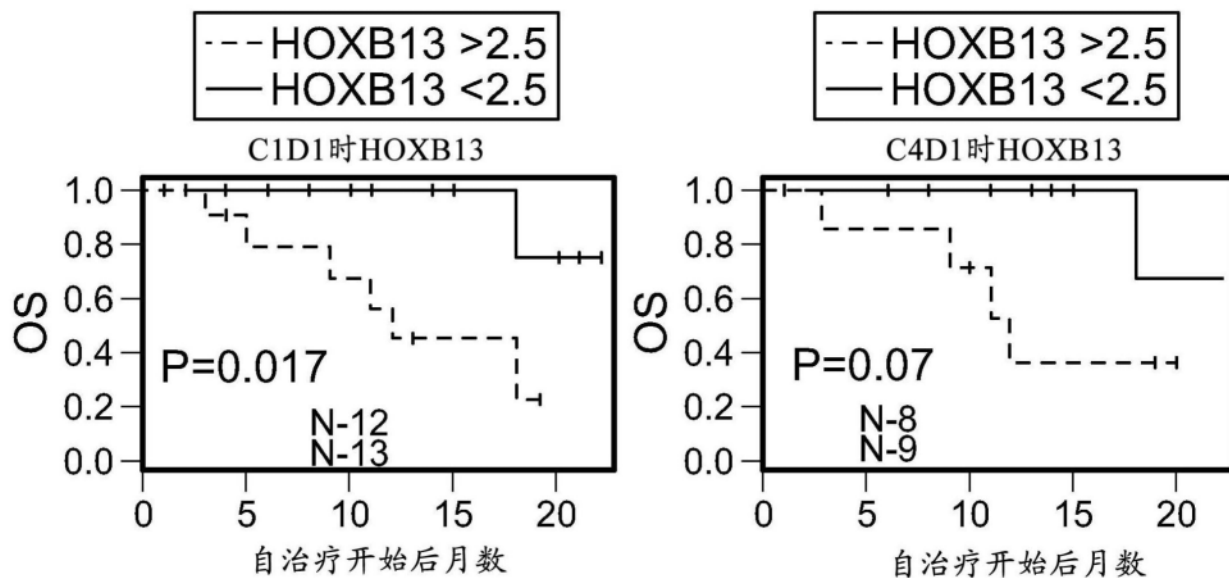


图10D

放射照相无进展生存期 (R-PFS)

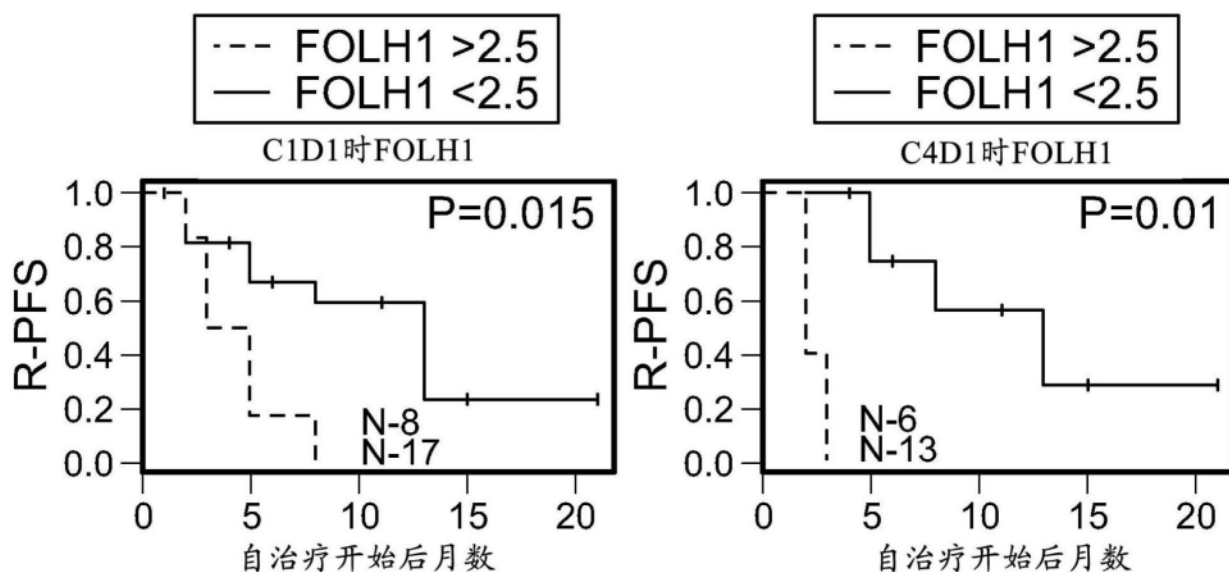


图10E

总体生存期 (OS)

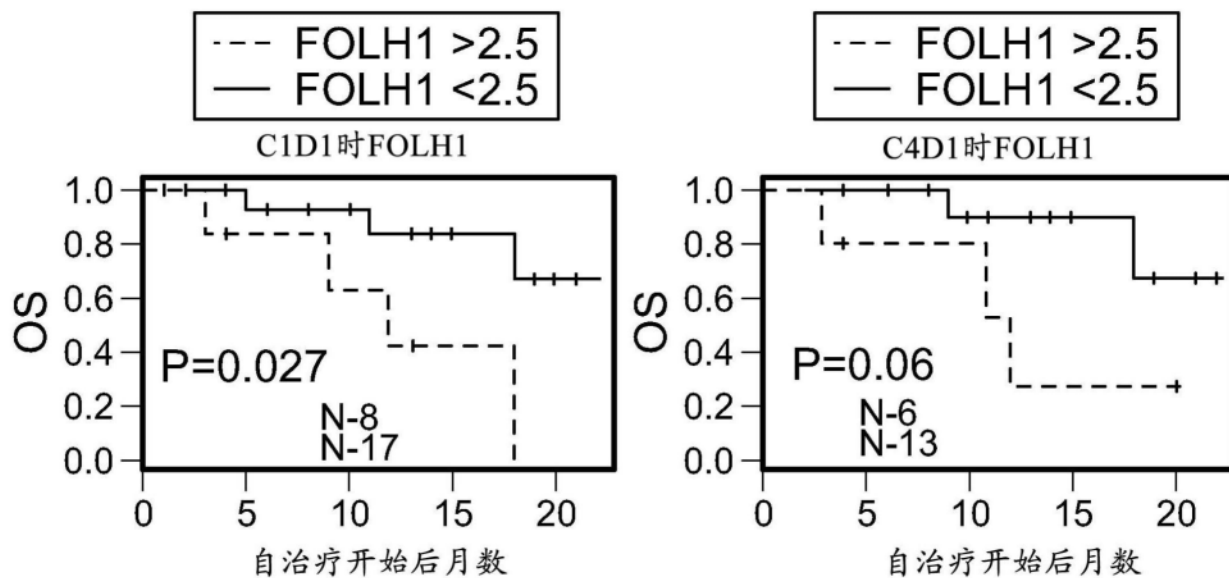


图10F

接受内分泌疗法的HR+患者，治疗3至4周

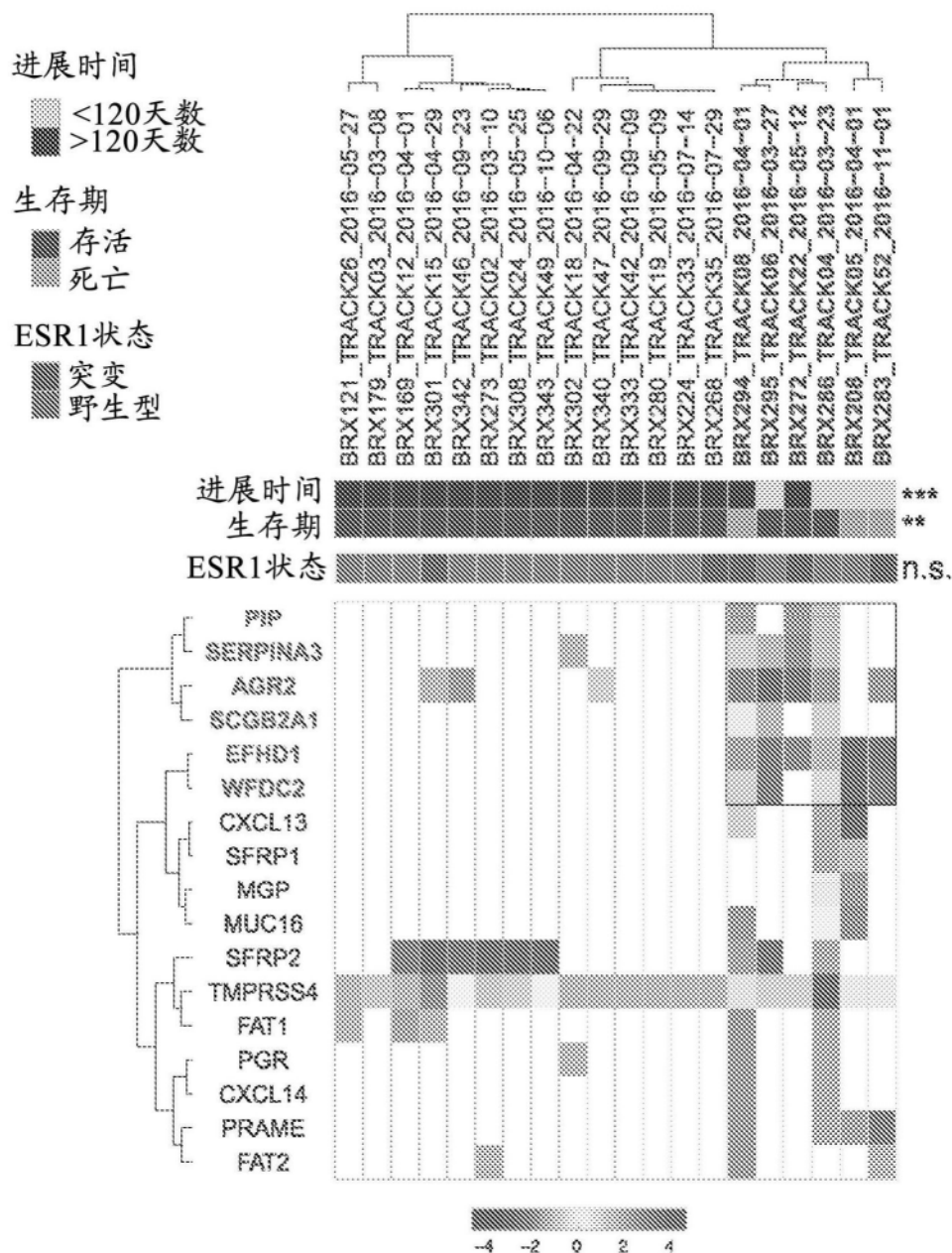


图11A

与雌激素信号传导信号的相关性

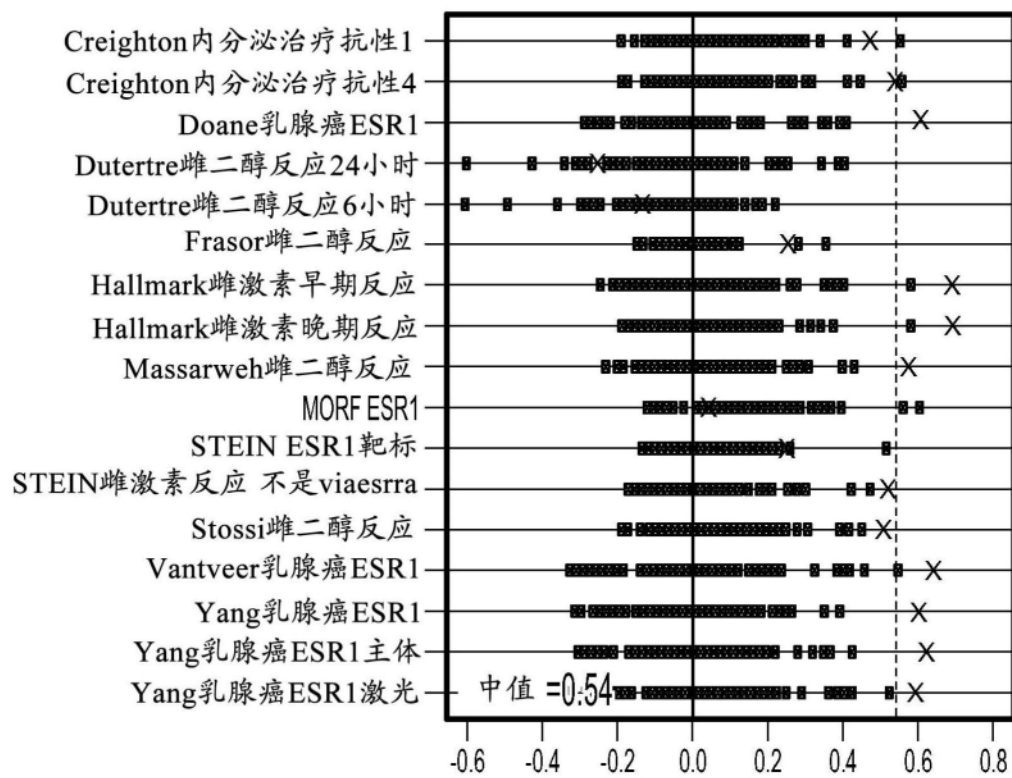


图11B-1

与雌激素信号传导信号的相关性

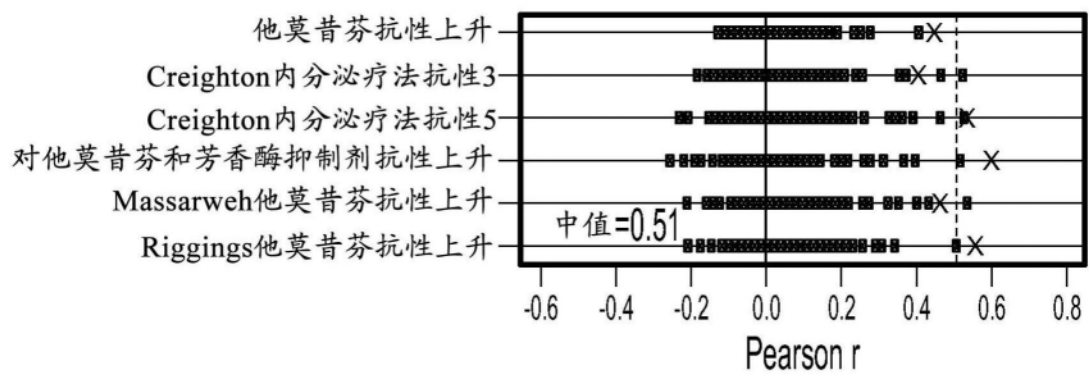


图11B-2

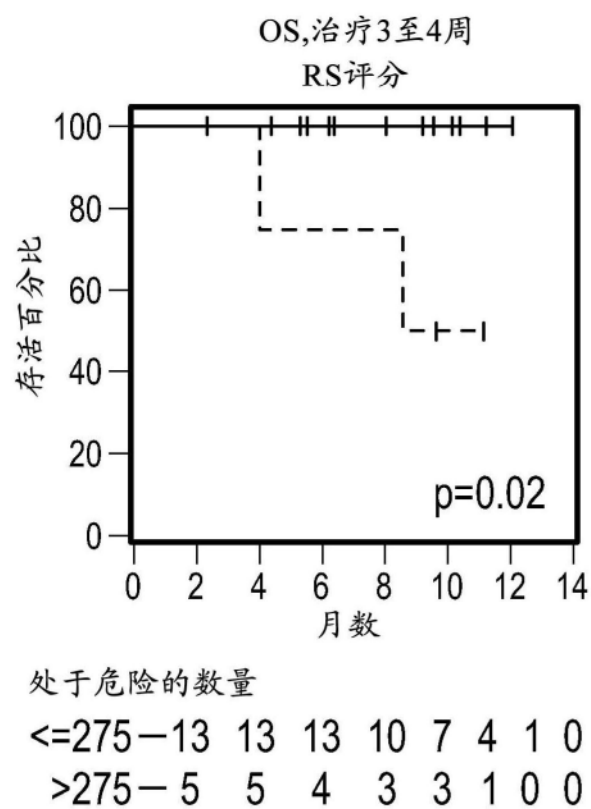
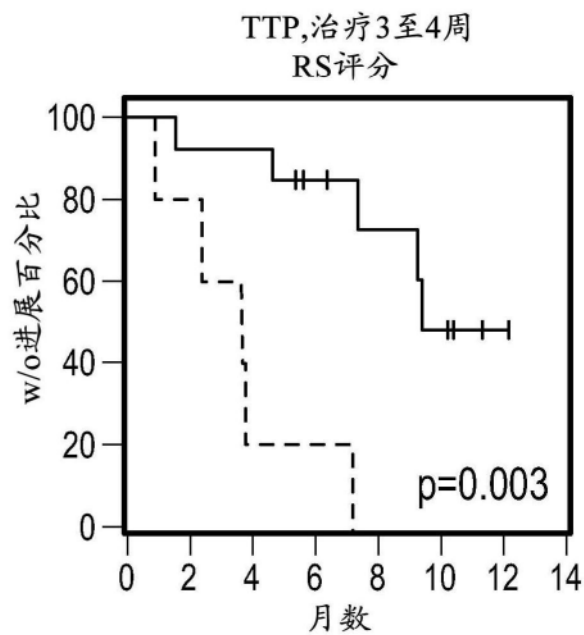


图11C-1

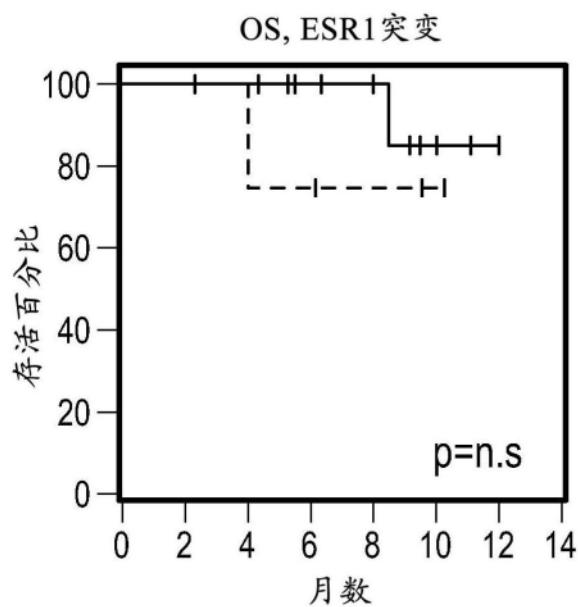


处于危险的数量

≤ 275 —13 12 12 9 6 4 1 0

>275 —5 4 1 1 0 0 0 0

图11C-2

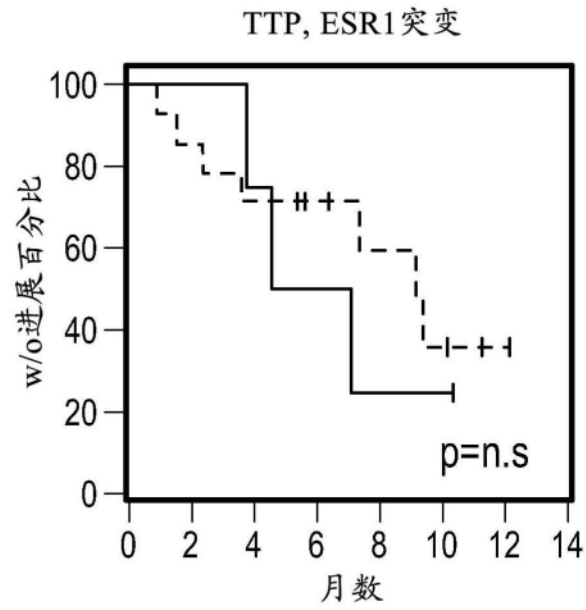


处于危险的数量

野生型—14 14 13 10 8 4 1 0

突变型—4 4 4 3 2 1 0 0

图11D-1



处于危险的数量

野生型—	14	12	10	8	5	3	1	0
突变型—	4	4	3	2	1	1	0	0

图11D-2