



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105745336 B

(45)授权公告日 2019.03.01

(21)申请号 201480064597.4

(22)申请日 2014.11.25

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 105745336 A

(43)申请公布日 2016.07.06

(30)优先权数据
61/909587 2013.11.27 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2016.05.26

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2014/075460 2014.11.25

(87)PCT国际申请的公布数据
W02015/078831 EN 2015.06.04

(73)专利权人 豪夫迈·罗氏有限公司
地址 瑞士巴塞尔

(72)发明人 N.舍恩布伦纳 A.古普塔 K.延森

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
72001
代理人 杜艳玲 黄希贵

(51)Int.Cl.
C12Q 1/6858(2018.01)

(56)对比文件
US 6120992 A,2000.09.19,
WO 02086196 A1,2002.10.31,
WO 2007084380 A2,2007.07.26,
CN 103215361 A,2013.07.24,

审查员 刘超

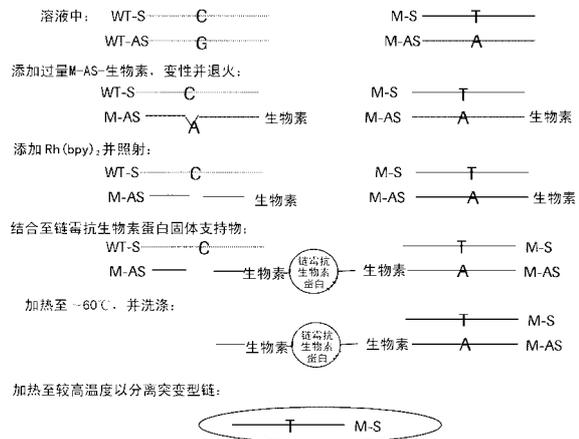
权利要求书3页 说明书10页
序列表2页 附图2页

(54)发明名称

用于从混合物富集突变核酸的方法

(57)摘要

由于非常过量的野生型DNA的同时存在,从生物样品检测罕见体细胞突变的存在经常是挑战性的。本发明描述了通过排除可扩增的野生型DNA而允许富集突变型DNA的方法。



1.寡核苷酸和错配嵌入化合物在制备用于从样品富集核酸混合物中的目标核酸的变体的方法的试剂盒中的用途,所述目标核酸以两种变体序列的形式存在,其中所述变体在单个核苷酸位置处不同,所述方法包括:

提供包括所述目标核酸的样品,其中待富集的变体在大量过量的另一种变体中以低丰度存在于所述样品中;

以超过所述目标核酸的摩尔的浓度提供与所述目标核酸的一条链互补的寡核苷酸,其中所述寡核苷酸与亲和标记附接,并且所述寡核苷酸在所述单个核苷酸位置处与待富集的变体完全匹配而在所述单个核苷酸位置处与所述另一种变体具有错配;

提供适合于所述寡核苷酸与所述目标核酸杂交的条件,以生成由所述寡核苷酸和所述目标核酸的一种变体的一条链组成的双链体多核苷酸;

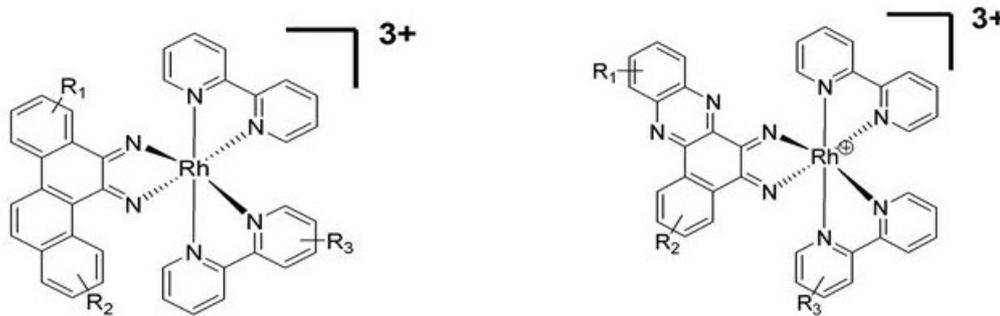
使所述双链体多核苷酸与优先仅结合至含有错配的双链体多核苷酸的错配嵌入化合物接触,其中所述化合物进一步能够用光催化在所述错配位点处切割所述双链体多核苷酸的一条链;

使所述双链体多核苷酸经受光照,导致产生切割和未切割的双链体多核苷酸两者;

将切割和未切割的双链体多核苷酸两者应用于亲和基质,所述亲和基质识别并结合至所述寡核苷酸上的亲和标记;

提供仅切割的双链体多核苷酸变性的条件并从所述亲和基质移除变性的单链;且

在使未切割的多核苷酸双链体变性的条件下提供缓冲液;并收集含有富集的目标核酸的变体的一条链的缓冲液,其中所述错配嵌入化合物是Rh(bpy)₂(chrysi)³⁺、Rh(bpy)₂(phzi)³⁺或它们的具有下式结构的类似物:



其中N表示氮,Rh表示铑,且R₁、R₂和R₃独立地选自氢、烷基、芳基、固体支持物和附接亲和标记的接头。

2.权利要求1的用途,其中待富集的变体是突变型等位基因,且所述另一种变体是野生型等位基因。

3.权利要求2的用途,其中所述突变型等位基因是突变型EGFR等位基因,且所述野生型等位基因是野生型EGFR等位基因。

4.权利要求2或3的用途,其进一步包括扩增和检测所述突变型等位基因的步骤。

5.寡核苷酸和错配嵌入化合物在制备用于从样品检测核酸混合物中的目标核酸的突变型等位基因的方法的试剂盒中的用途,其中所述突变型等位基因与野生型等位基因在单个核苷酸位置处不同并且其在大量过量的野生型等位基因中以低丰度存在于样品中,所述方法包括:

富集所述样品中的突变型等位基因,其中所述富集通过以下进行:

以超过所述目标核酸的摩尔的浓度提供与所述目标核酸的一条链互补的寡核苷酸,其中所述寡核苷酸与亲和标记衔接,且所述寡核苷酸在所述单个核苷酸位置处与所述突变型等位基因完全匹配而其在所述单个核苷酸位置处与野生型等位基因具有错配;

提供适合于所述寡核苷酸与所述目标核酸杂交的条件,以生成由所述寡核苷酸和所述突变型等位基因或所述野生型等位基因的一条链组成的双链体多核苷酸;

使所述双链体多核苷酸与能够仅结合至含有错配的双链体多核苷酸的错配嵌入化合物接触,其中所述化合物进一步能够用光催化在所述错配位点处切割所述双链体多核苷酸的一条链;

使所述双链体多核苷酸经受光照,导致产生切割和未切割的双链体多核苷酸两者;

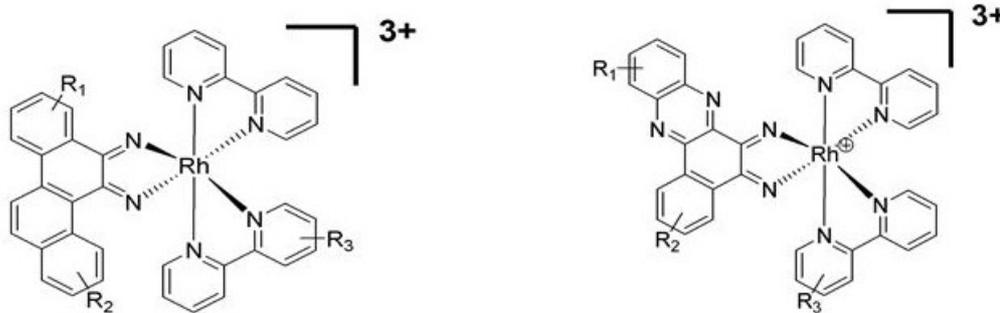
将切割和未切割的双链体多核苷酸两者应用于亲和基质,所述亲和基质识别并结合至所述寡核苷酸上的亲和标记;

提供仅切割的双链体多核苷酸变性的条件并从所述亲和基质移除变性的所述野生型等位基因的单链;

在使未切割的多核苷酸双链体变性的条件下提供缓冲液;并收集含有富集的目标核酸的突变型等位基因的一条链的缓冲液;

扩增所述富集的突变型等位基因;且

检测富集的扩增的突变型等位基因的产物或从富集的扩增的突变型等位基因产生的信号,其中所述错配嵌入化合物是 $\text{Rh}(\text{bpy})_2(\text{chrysi})^{3+}$ 、 $\text{Rh}(\text{bpy})_2(\text{phzi})^{3+}$ 或它们的具有下式结构的类似物:



其中N表示氮,Rh表示铑,且 R_1 、 R_2 和 R_3 独立地选自氢、烷基、芳基、固体支持物和衔接亲和标记的接头。

6. 权利要求5的用途,其中所述突变型等位基因是突变型EGFR等位基因,且所述野生型等位基因是野生型EGFR等位基因。

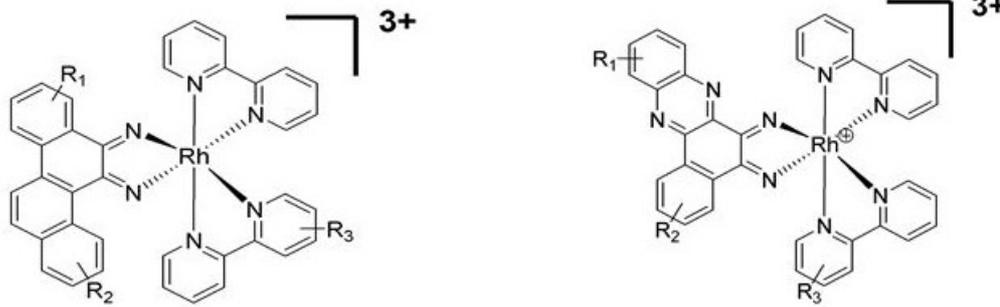
7. 权利要求5-6的用途,其中所述扩增步骤用等位基因特异性引物进行。

8. 用于从样品富集核酸混合物中的目标核酸的变体的反应混合物,其包含:

与所述目标核酸的一条链互补的寡核苷酸,其中所述目标核酸以在单个核苷酸位置处不同的两种变体序列的形式存在,其中所述寡核苷酸与亲和标记衔接,且所述寡核苷酸在所述单个核苷酸位置处与待富集的变体完全匹配而其在所述单个核苷酸位置处与另一种变体具有错配;和

优先仅结合至含有错配的双链体多核苷酸的错配嵌入化合物,其中所述化合物进一步能够用光催化在所述错配位点处切割所述双链体多核苷酸的一条链;其中所述错配嵌入化

合物是 $\text{Rh}(\text{bpy})_2(\text{chrysi})^{3+}$ 、 $\text{Rh}(\text{bpy})_2(\text{phzi})^{3+}$ 或它们的具有下式结构的类似物：

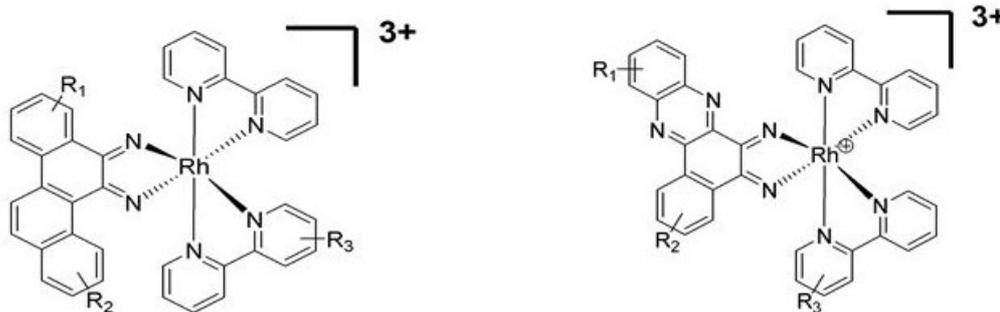


其中N表示氮,Rh表示铑,且 R_1 、 R_2 和 R_3 独立地选自氢、烷基、芳基、固体支持物和附接亲和标记的接头。

9. 用于从样品富集核酸混合物中的目标核酸的变体的试剂盒,其包含:

与所述目标核酸的一条链互补的寡核苷酸,其中所述目标核酸以在单个核苷酸位置处不同的两种变体序列的形式存在,其中所述寡核苷酸与亲和标记附接,且所述寡核苷酸在所述单个核苷酸位置处与待富集的变体完全匹配而其在所述单个核苷酸位置处与另一种变体具有错配;和

优先仅结合至含有错配的双链体多核苷酸的错配嵌入化合物,其中所述化合物进一步能够用光催化在所述错配位点处切割所述双链体多核苷酸的一条链;其中所述错配嵌入化合物是 $\text{Rh}(\text{bpy})_2(\text{chrysi})^{3+}$ 、 $\text{Rh}(\text{bpy})_2(\text{phzi})^{3+}$ 或它们的具有如下结构的类似物:



其中N表示氮,Rh表示铑,且 R_1 、 R_2 和 R_3 独立地选自氢、烷基、芳基、固体支持物和附接亲和标记的接头。

用于从混合物富集突变核酸的方法

发明领域

[0001] 本发明涉及核酸化学和核酸扩增的领域。具体地,本发明涉及使用可以检测核酸中的碱基对错配的化合物和方法富集低丰度突变型目标核酸。

[0002] 发明背景

[0003] 已知大多数人遗传疾病和癌症由核基因中的突变造成。通常,认为突变是遗传基因座处的特定多态变体。所述突变可以是单个核苷酸差异,经常被称作点突变。在细胞和组织水平,在特定遗传基因座处的多态性可以导致显著改变的细胞行为。然而,因为甚至相对小的细胞或组织样品可以含有数百万或数十亿含有该特定遗传基因座的DNA分子,在遗传基因座处的多态变体的范围和频率的表示需要检测潜在地以非常低频率存在的等位基因。在大多数情况下,由于非常过量的野生型DNA的同时存在,来自生物样品的罕见突变的存在检测提出了巨大的挑战。

[0004] 因此,本领域中需要选择性和准确地富集低拷贝突变型DNA的方法,使得它们的存在在进行扩增反应(诸如PCR)之后可以是可检测的。

[0005] 发明概述

[0006] 本发明涉及用于富集样品中的低丰度等位基因(例如突变型DNA)的方法,所述样品允许随后检测这样的等位基因。在第一方面,本发明涉及从样品富集核酸混合物中的目标核酸的变体的方法,所述目标核酸以两种变体序列的形式存在,其中所述变体在单个核苷酸位置处不同,所述方法包括,提供包括所述目标核酸的样品,其中待富集的变体在大量过量的其它变体中以低丰度存在于所述样品中;对于所述目标核酸摩尔过量的浓度提供与所述目标核酸的一条链互补的寡核苷酸,其中所述寡核苷酸与亲和标记附接且在所述单个核苷酸位置处与待富集的变体完全匹配且在所述单个核苷酸位置处与其它变体具有错配;提供适合于所述寡核苷酸与所述目标核酸杂交的条件,以生成由所述寡核苷酸和所述目标核酸的任一种变体的一条链组成的双链体多核苷酸;使所述双链体多核苷酸与优先仅结合至含有错配的双链体多核苷酸的错配嵌入化合物接触,其中所述化合物进一步能够用光催化在所述错配位点处切割所述双链体多核苷酸的一条链;使所述双链体多核苷酸经受光,导致产生切割和未切割的双链体多核苷酸两者;将切割和未切割的双链体多核苷酸两者应用于亲和基质,所述亲和基质识别并结合至所述寡核苷酸上的亲和标记;提供仅切割的双链体多核苷酸变性的条件并从所述亲和基质移除变性的单链;且在使未切割的多核苷酸双链体变性的条件下提供缓冲液;并收集含有富集的目标核酸的变体的一条链的缓冲液。在一个实施方案中,所述错配嵌入化合物是 $\text{Rh}(\text{bpy})_2(\text{chrysi})^{3+}$ 或 $\text{Rh}(\text{bpy})_2(\text{phzi})^{3+}$ 或它们各自的类似物。在另一个实施方案中,本发明涉及扩增并检测富集的目标核酸的变体的进一步步骤。

[0007] 在第二方面,本发明涉及用于从样品检测核酸混合物中的目标核酸的突变型等位基因的方法,其中所述突变型等位基因与野生型等位基因在单个核苷酸位置处不同,并且在大量过量的野生型等位基因间以低丰度存在于样品中,所述方法包括,富集所述样品中的突变型等位基因,其中所述富集通过以下进行:以对于所述目标核酸摩尔过量的浓度提

供与所述目标核酸的一条链互补的寡核苷酸,其中所述寡核苷酸与亲和标记附接且在所述单个核苷酸位置处与所述突变型等位基因完全匹配且在所述单个核苷酸位置处与野生型等位基因具有错配;提供适合于所述寡核苷酸与所述目标核酸杂交的条件,以生成由所述寡核苷酸和所述突变型等位基因或所述野生型等位基因的一条链组成的双链体多核苷酸;使所述双链体多核苷酸与优先仅结合至含有错配的双链体多核苷酸的错配嵌入化合物接触,其中所述化合物进一步能够用光催化在所述错配位点处切割所述双链体多核苷酸的一条链;使所述双链体多核苷酸经受光,导致产生切割和未切割的双链体多核苷酸两者;将切割和未切割的双链体多核苷酸两者应用于亲和基质,所述亲和基质识别并结合至所述寡核苷酸上的亲和标记;提供仅切割的双链体多核苷酸变性的条件并从所述亲和基质移除变性的所述野生型等位基因的单链;在使未切割的多核苷酸双链体变性的条件下提供缓冲液;并收集含有富集的目标核酸的突变型等位基因的一条链的缓冲液;扩增所述富集的突变型等位基因;且检测富集的扩增的突变型等位基因的产物或从富集的扩增的突变型等位基因生成的信号。在一个实施方案中,所述错配嵌入化合物是 $\text{Rh}(\text{bpy})_2(\text{chrysi})^{3+}$ 或 $\text{Rh}(\text{bpy})_2(\text{phzi})^{3+}$ 或它们各自的类似物。

[0008] 附图简述

[0009] 图1显示了基于铑的嵌入剂 $\text{Rh}(\text{bpy})_2(\text{chrysi})^{3+}$ (左)和 $\text{Rh}(\text{bpy})_2(\text{phzi})^{3+}$ (右)的结构,其中N表示氮,Rh表示铑,且 R_1 、 R_2 和 R_3 独立地选自氢、烷基、芳基、固体支持物和附接亲和标记的接头。

[0010] 图2显示本发明的用于富集突变型等位基因的单链的方法的图示。

[0011] 发明详述

[0012] 定义

[0013] 除非另外定义,在本文中使用的所有技术和科学术语具有本发明所属领域的技术人员通常理解的含义。以下参考文献给技术人员提供了在本发明中使用的许多术语的一般定义:Singleton等人, *Dictionary of Microbiology and Molecular Biology* (1994年第2版); *The Cambridge Dictionary of Science and Technology* (Walker编, 1988); *The Glossary of Genetics*, 第5版, R. Rieger等人(编), Springer Verlag (1991);和Hale & Marham, *The Harper Collins Dictionary of Biology* (1991)。本文中使用的以下术语具有归于它们的含义,除非另有说明。

[0014] 术语“核酸”是指核苷酸(例如,核糖核苷酸、脱氧核糖核苷酸、核苷酸类似物等)的聚合物,并且包含脱氧核糖核酸(DNA)、核糖核酸(RNA)、DNA-RNA杂交物、寡核苷酸、多核苷酸、适体、肽核酸(PNA)、PNA-DNA缀合物、PNA-RNA缀合物等,其包含以直链或支链方式共价连接在一起的核苷酸。核酸通常是单链的或双链的,并且通常含有磷酸二酯键,尽管在某些情况下,包括可以具有替代主链的核酸类似物,包括、例如,磷酰胺(Beaucage等人(1993) *Tetrahedron* 49(10):1925);硫代磷酸酯(phosphorothioate)(Mag等人(1991) *Nucleic Acids Res.* 19:1437;和美国专利号5,644,048)、二硫代磷酸酯(Briu等人(1989) *J. Am. Chem. Soc.* 111:2321)、0-甲基亚磷酰胺(0-methylphosphoroamidite)连接(参见Eckstein, *Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach*, Oxford University Press (1992))和肽核酸主链和连接(参见,Egholm (1992) *J. Am. Chem. Soc.* 114:1895)。其它类似物核酸包括具有带正电荷主链的类似物核酸(Denpcy等人

(1995) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:6097);具有非离子主链(美国专利号5,386,023、5,637,684、5,602,240、5,216,141和4,469,863)和非核糖主链的类似物核酸,包括在美国专利号5,235,033和5,034,506中描述的类似物核酸。含有一个或多个碳环糖的核酸也被包括在核酸的定义内(参见Jenkins等人(1995) Chem. Soc. Rev. 第169-176页),并且类似物也描述在例如Rawls, C & E News 1997年6月2日第35页中。可以完成核糖-磷酸主链的这些修饰,以促进额外部分(诸如标记)的添加或以改变这样的分子在生理环境中的稳定性和半衰期。

[0015] 除了通常在核酸中发现的天然存在的杂环碱基(例如,腺嘌呤、鸟嘌呤、胸腺嘧啶、胞嘧啶和尿嘧啶)以外,核苷酸类似物也可以包括非天然存在的杂环碱基,诸如在例如Seela等人(1999) Helv. Chim. Acta 82:1640中所述的那些。在核苷酸类似物中使用的某些碱基充当解链温度(T_m)改性剂。例如,这些中的一些包括7-脱氮嘌呤(例如,7-脱氮鸟嘌呤、7-脱氮腺嘌呤等)、吡唑并[3,4-d]嘧啶、丙炔基-dN(例如,丙炔基-dU、丙炔基-dC等)等。参见,例如,美国专利号5,990,303。其它代表性的杂环碱基包括,例如,次黄嘌呤、肌苷、黄嘌呤;2-氨基嘌呤、2,6-二氨基嘌呤、2-氨基-6-氯嘌呤、次黄嘌呤、肌苷和黄嘌呤的8-氮杂衍生物;腺嘌呤、鸟嘌呤、2-氨基嘌呤、2,6-二氨基嘌呤、2-氨基-6-氯嘌呤、次黄嘌呤、肌苷和黄嘌呤的7-脱氮-8-氮杂衍生物;6-氮杂胞苷;5-氟胞苷;5-氯胞苷;5-碘胞苷;5-溴胞苷;5-甲基胞苷;5-丙炔基胞苷;5-溴乙烯基尿嘧啶;5-氟尿嘧啶;5-氯尿嘧啶;5-碘尿嘧啶;5-溴尿嘧啶;5-三氟甲基尿嘧啶;5-甲氧基甲基尿嘧啶;5-乙炔基尿嘧啶;5-丙炔基尿嘧啶,等。

[0016] “核苷”是指包含与糖部分(核糖糖或脱氧核糖糖)、糖部分的衍生物、或糖部分的功能等同物(例如碳环)共价连接的碱基或碱性基团(其包含至少一个同素环、至少一个杂环、至少一个芳基等等)的核酸组分。例如,当核苷包括糖部分时,碱基通常连接至该糖部分的1'-位置。如上所述,碱基可以是天然存在的碱基或非天然存在的碱基。示例性的核苷包括核糖核苷、脱氧核糖核苷、双脱氧核糖核苷和碳环核苷。

[0017] “核苷酸”是指核苷的酯,例如,核苷的磷酸酯,其具有一个、两个、三个或更多个共价连接至核苷的糖部分的5'位置的磷酸酯基团。

[0018] 术语“多核苷酸”和“寡核苷酸”可互换使用。“寡核苷酸”是有时用于描述较短多核苷酸的术语。寡核苷酸可以包含与指定的核苷酸序列的区域对应的至少6个核苷酸,例如至少约10-12个核苷酸,或至少约15-30个核苷酸。

[0019] 术语“富集目标核酸序列变体”是指增加目标核酸序列的期望变体的量和增加样品中期望变体相对于不期望变体的比率。通常,待富集的期望变体在核酸样品中不如不期望变体那么普遍,且占目标核酸序列的所有变体的总量的小于50%。在许多情况下,期望变体表示突变型等位基因,且不期望变体表示野生型等位基因。

[0020] 如本文所使用的术语“野生型”是指这样的基因或等位基因:其当从天然存在的来源分离时,具有该基因或等位基因的特征。野生型基因或野生型等位基因是在群体中最经常观察到的基因或等位基因,且任意命名为所述基因或等位基因的“正常”或“野生型”形式。

[0021] 相反,术语“突变型”或“突变的”是指这样的基因或等位基因:其与野生型基因或等位基因相比表现出序列中的修饰。术语“突变”是指通常保守的核酸序列的核苷酸序列中

的变化,所述变化导致与正常的(未改变的)序列或野生型序列区分开的突变型的形成。突变通常可以分成两大类:即,碱基对取代(例如单个核苷酸取代)和移码突变。后者需要一个至几个核苷酸对的插入或缺失。

[0022] 术语“等位基因”是指相差仅一个或几个碱基的两个序列。

[0023] 术语“错配”DNA或“异源双链”DNA是指包括一个或多个错配碱基配对的DNA。错配碱基配对是指相对碱基的特定对,在DNA双链体的背景下,其无法形成氢键键合的碱基对(T与A,或G与C)之一。异源双链DNA包括这样的双链DNA:其中在一条链中的一个或多个碱基与或不与相对链中的一个或多个碱基互补,以及这样的双链DNA:其中任一条链的一个或多个碱基具有或不具有相对碱基,这归因于在一条链中与相对链相比的插入或缺失。相反,同源双链DNA是指这样的双链DNA:其中每条链是另一条链的完全互补物,且每个碱基与相对碱基形成氢键键合的碱基对。

[0024] 术语“分子结合伴侣”和“特异性结合伴侣”是指表现出特异性结合的分子对,通常是生物分子对。非限制性实例是受体和配体、抗体和抗原、生物素和抗生物素蛋白、和生物素和链霉抗生物素蛋白。还可以通过在如下所定义的“亲和标记”和“亲和基质”之间发生的结合来表示分子结合伴侣。

[0025] “亲和”标记是可以特异性结合其分子结合伴侣的分子。所述结合可以是通过共价键或非共价键(例如,离子键、氢键等)。如本文所使用的亲和标记(诸如生物素)可以选择性结合亲和基质,诸如链霉抗生物素蛋白包被的珠粒或颗粒。亲和标记可以在寡核苷酸的3'末端、5'末端或其内部位置附接至寡核苷酸。

[0026] 如本文所使用的“亲和基质”是指可以特异性结合其分子结合伴侣的、附接至固体支持物或固体基质(例如磁性胶乳颗粒、玻璃珠)的表面的分子。所述结合可以是通过共价键或非共价键。如本文所使用的亲和基质(诸如链霉抗生物素蛋白包被的磁性胶乳颗粒)可以选择性结合亲和标记,诸如生物素。

[0027] “烷基”是指直链的、支链的或环状的饱和的烃部分,并且包括所有位置异构体,例如,甲基、乙基、丙基、丁基、1-甲基丙基、2-甲基丙基、1,1-二甲基乙基、戊基、1-甲基丁基、2-甲基丁基、3-甲基丁基、2,2-二甲基丙基、1-乙基丙基、己基、1,1-二甲基丙基、1,2-二甲基丙基、1-甲基戊基、2-甲基戊基、3-甲基戊基、4-甲基戊基、1,1-二甲基丁基、1,2-二甲基丁基、1,3-二甲基丁基、2,2-二甲基丁基、2,3-二甲基丁基、3,3-二甲基丁基、1-乙基丁基、2-乙基丁基、1,1,2-三甲基丙基、1,2,2-三甲基丙基、1-乙基-1-甲基丙基和1-乙基-2-甲基丙基、正己基,环己基、正庚基、正辛基、2-乙基己基、正壬基、正癸基等。烷基通常包含约1-20个碳原子且更通常包含约2-15个碳原子。烷基可以是取代的或未取代的。

[0028] “芳基”是指来源于芳香族化合物的原子或部分的取代基团。示例性的芳基包括,例如,苯基等。芳基任选包括多个芳香环(例如,二苯基等)。此外,芳基可以是取代的或未取代的。

[0029] “PCR扩增”或简称的“PCR”是指这样的聚合酶链式反应:其涉及使用核酸序列作为模板,用于产生该序列的大量互补物。所述模板可以与具有与模板序列的一部分互补的序列的引物杂交,并与合适的反应混合物(包括dNTP和聚合酶)接触。通过聚合酶延伸引物,产生与初始模板互补的核酸。为了扩增双链核酸分子的两条链,使用两种引物,其各自可以具有与所述核酸链之一的一部分互补的序列。将核酸分子的链变性,例如通过加热,并重复该

过程,此时用在前步骤的新合成的链充当后续步骤中的模板。PCR扩增方案可以涉及变性反应、杂交反应和延伸反应的几个至许多循环,以产生足够量的目标核酸。

[0030] 术语“等位基因特异性引物”或“AS引物”是指这样的引物:其与目标序列的超过一种变体杂交,但能够区分目标序列的变体,因为仅对于所述变体之一,所述引物在合适条件下被核酸聚合酶有效地延伸。对于目标序列的其它变体,所述延伸是低效的、无效的或不可检测的。

[0031] 术语“通用引物”是指包括等位基因特异性引物的引物对中的第二引物。通用引物不是等位基因特异性的,即不会区分目标序列的变体,所述变体会被等位基因特异性引物区分。

[0032] 术语“互补的”或“互补性”用于指通过沃森-克里克碱基配对规则关联的多核苷酸的反平行链。术语“完全互补的”或“100%互补的”是指这样的互补序列:在反平行链之间具有所有碱基的沃森-克里克配对,即,在多核苷酸双链体中的任意两个碱基之间没有错配。然而,即使在没有完全互补性存在下,在反平行链之间也形成双链体。术语“部分互补的”或“不完全互补的”是指小于100%完全的、反平行的多核苷酸链之间的任何碱基比对(例如,在多核苷酸双链体中存在至少一个错配或未匹配的碱基)。部分互补链之间的双链体的稳定性通常低于完全互补链之间的双链体的稳定性。

[0033] 术语“样品”是指含有核酸或推测含有核酸的任何组合物。这包括从个体分离的组织或流体的样品,例如,皮肤、血浆、血清、脊髓液、淋巴液、滑液、尿、泪液、血细胞、器官和肿瘤,并且也指从取自个体的细胞建立的体外培养物的样品,包括福尔马林固定的石蜡包埋组织(FFPET)和从其分离的核酸。

[0034] 术语“一级序列”是指多核苷酸或寡核苷酸中的核苷酸的序列。核苷酸修饰诸如含氮碱基修饰、糖修饰或其它主链修饰不是一级序列的一部分。标记(诸如与寡核苷酸缀合的生色团)也不是一级序列的一部分。因此,两种寡核苷酸可以共有相同的一级序列,但是在修饰和标记方面存在差异。

[0035] 术语“引物”是指这样的寡核苷酸:其与目标核酸中的序列杂交,且能够充当沿着核酸的互补链合成(在适合于这样的合成的条件下)的起始点。如本文所使用的术语“探针”是指这样的寡核苷酸:其与目标核酸中的序列杂交,且通常被可检测地标记。探针可以具有修饰(诸如3'-端修饰,其使探针不可被核酸聚合酶延伸)和一个或多个生色团。具有相同序列的寡核苷酸可以在一个测定中充当引物和在不同的测定中充当探针。

[0036] 如本文所使用的术语“目标序列”、“目标核酸”或“目标”是指待扩增、检测或扩增并检测的核酸序列部分。

[0037] 术语“杂交的”和“杂交”是指两个核酸之间的碱基配对相互作用,其导致双链体的形成。不要求两个核酸在它们的全长上具有100%互补性以实现杂交。

[0038] 术语“选择性杂交”和“特异性杂交”是指核酸大部分(50%或更多的杂交分子)或几乎排它地(90%或更多的杂交分子)与存在于复杂混合物中的特定核酸的杂交,所述复杂混合物中也存在其它核酸。例如,在典型的PCR条件下,引物与目标核酸特异性杂交以排除也存在于溶液中的非目标核酸。特异性杂交的引物驱动目标核酸的扩增以产生目标核酸的扩增产物,所述扩增产物至少是最优势的扩增产物,且优选地是几乎排它的(例如,代表样品中的所有扩增产物的90%或更多)扩增产物。优选地,非特异性的扩增产物以使得其不可检

测的少量存在,或以使得可与特异性扩增产物容易辨别的少量检测到。类似地,探针与目标核酸特异性杂交以排除也存在于反应混合物中的非目标核酸。特异性杂交的探针允许目标核酸的特异性检测以产生可检测信号,所述信号至少是最优势的信号,且优选地是几乎排它的(例如,代表样品中的所有扩增产物的90%或更多)信号。

[0039] 对于开发可以增加的精确度和灵敏度检测与各种类型的癌症相关的罕见体细胞突变的新方法存在持续需求。在从外周体液(peripheral fluid)诸如血液、痰液和尿液检测癌症生物标志物的领域中存在对于更灵敏的检测方法的特别需求。在过去几年中,已经发表了许多研究,其已经清楚地确立基于血液的癌症生物标志物检测对于通过监测血液中的定义突变而预测治疗、治疗监测耐药性发展和肿瘤动力学和癌症复发的价值。此外,用于从外周生物体液检测突变的高度敏感的方法可能有一天会传递“液体活检”方法对于癌症筛选和早期癌症检测的希望。

[0040] 已经多年开发了许多方法以增加罕见突变检测的灵敏度。大多数方法已经通常集中于通过在通常被称为等位基因特异性PCR(AS-PCR)的PCR过程中采用基于引物或探针的区别而利用突变型和野生型之间的基于序列的差异。这些方法低至0.1-1%突变型水平的水平是成功的,但然后进一步改进受基于酶的限制或PCR误差的限制。由Bert Vogelstein倡导的数字PCR迄今已经是成功地增强罕见等位基因检测的灵敏度的最有希望的技术。这通过将样品分成数千个较小扩增反应而完成。该方法实际上稀释野生型DNA,并富集突变型与野生型的比率。目前提出的一种替代方法是使用预先样品制备方法,其富集突变型DNA,并由此降低下游测定中的检测的困难。

[0041] PCR,以其许多不同的方式,是强大的技术,其可以在大量背景DNA存在的情况下容易地逐个检测单拷贝的特定序列,条件是所需序列的性质与背景DNA足够不同。以下情况就是这样:例如,当试图从也含有过量的人基因组DNA的生物样本检测外源性致病序列的存在时。然而,当目的序列变得与背景DNA中存在的序列越来越类似时,问题变得越来越有挑战性,罕见体细胞突变的检测就是这样。通常,突变状态必须在还含有大量过量的野生型序列的样品中进行确定。这是有挑战性的,因为尽管用于突变检测的当前可用的方法对于突变型序列是选择性的,但它们的特异性不是绝对的,并且随着野生型与突变型的比率增加,区分突变型与野生型DNA变得越来越难。

[0042] 本发明中描述的方法基于使用庞大铈(III)络合物,如美国专利号6,031,098、美国专利号6,306,601、Nature Protocols 2:357-371, 2007中所公开,其中Barton等人描述了描述了错配特异性的、基于铈的嵌入剂的两个家族的合成和功能,所述嵌入剂基于一对庞大嵌入配体5,6-屈醌二亚胺(chrysi)和3,4-苯并[a]吩嗪醌二亚胺(phzi)以分别生成Rh(bpy)₂(chrysi)³⁺或Rh(bpy)₂(phzi)³⁺。这些化合物由于其将自身选择性插入由DNA双链体内的核苷酸错配产生的凸出部分(bulge)的能力而已知。结合的机制已经通过多种基于NMR和晶体学的研究进行评估,且结果已经是显著的。不像其中结合剂从大沟进入DNA双链体且嵌入碱基对之间的经典嵌入结合模式,这些新颖化合物进入DNA的小沟,插入庞大芳香族配体,并将错配碱基逐入大沟。光活化后,复合物促进在双链体内的单碱基错配位点处的直接链切断。位点特异性切割在纳摩尔浓度是明显的。迄今已经主要聚焦于这些铈化合物在单核苷酸多态性(SNP)的检测和新型化疗药中的用途(Boon, EM等人, Methods in Enzymology, 353:506-522, 2002, 美国专利号6,444,661, 美国专利号6,777,405)。

[0043] 在本发明中,为了富集罕见等位基因(例如罕见突变型等位基因)的目的,已经应用这些铈化合物。选择用于本研究的化合物的结构显示于图1,其中R1、R2、R3可以是H、烷基、芳基或固相或具有亲和标记(例如生物素)的接头。尽管先前已经显示所述化合物可以结合至错配的DNA双链体并催化光切割,但也已经显示,该光切割仅导致两条链的仅一条的切割。这在突变型DNA的富集应用中具有较小实用性,因为未切割的野生型链仍然存在,且可以作为用于扩增的模板发挥功能。

[0044] 本发明的总体策略图示表示于图2,并利用这些铈络合物化合物结合至目的碱基错配区域并在光活化后引起特定磷酸二酯键的切割的能力。根据此处描述的方法,提供这样的样品,其中目标核酸含有野生型等位基因(图2中显示为在有义链“WT-S”上具有“C”核苷酸且在反义链“WT-AS”上具有“G”核苷酸)和突变型等位基因(显示为在有义链“M-S”上具有“T”核苷酸和在反义链“M-AS”上具有“A”核苷酸)两者。

[0045] 接下来,相对于样品中的目标核酸的量过量地提供对应于期望被富集的突变型等位基因的一条链且包含亲和配体(例如生物素)的单链寡核苷酸(在图2中表示为M-AS-生物素)。(尽管图2显示对应于反义链且在其3'末端具有生物素标记的寡核苷酸,但该方法也可以用具有突变型等位基因的有义链的序列且在除了突变位点以外的任何位置处附接生物素标记的寡核苷酸来实施)。然后将该混合物首先加热,以变性所有双链样品DNA,然后冷却,以允许互补单链的退火。因为M-AS-生物素寡核苷酸以过量存在,所以几乎所有目标核酸(野生型等位基因WT-S和突变型等位基因M-S两者)的有义链将与该寡核苷酸杂交。尽管突变型有义链双链体将完全匹配,但野生型有义链将在突变的位置处具有单个碱基错配。

[0046] 然后将铈络合物(图2中表示为“Rh(bpy)₂”)添加至混合物。光活化后,含有错配的双链体将被切割,无论是在M-AS-生物素寡核苷酸(如图2中所示)还是在野生型有义链WT-S上,而M-AS-生物素寡核苷酸结合至突变型有义链M-S的双链体由于在突变位置处的完全匹配而将不被切割。使用寡核苷酸的亲和部分(图2中显示为生物素),所有寡核苷酸结合的序列(即野生型和突变型有义链)都捕获在固相上(图2中显示为链霉抗生物素蛋白包被的固体支持物),且洗掉所有过量野生型和突变型反义链。在下一步骤中,将固相置于适当缓冲液中,并升高温度,直至仅捕获的野生型有义链由于含切割双链体的较低解链温度而释放。然后将其洗掉,在支持物上仅留下突变型有义链。最后,通过温度或碱性pH洗脱步骤将突变型有义链回收于缓冲液中。

[0047] 尽管图2显示使用反义链寡核苷酸用于富集突变型有义链,但类似地,有义链寡核苷酸可用于富集突变型反义链。通常,选择哪条链用于寡核苷酸取决于铈络合物与错配位置的结合亲和力,其中热力学最不稳定的错配位点具有最高的结合亲和力(对于进一步细节,参见Jackson, B.A.和Barton, J.K., *Biochemistry* 39:6176-6182, 2000)。

[0048] 提供以下实施例和附图以帮助理解本发明,其真正范围在随附权利要求中记载。可以理解的是,在不偏离本发明的精神的情况下可以对所记载的程序进行修改。

实施例

[0049] 实施例1 使用单链寡核苷酸的对照实验

[0050] 以下实验用于通过使用亲和标记的反义链(AL-AS)寡核苷酸来在有义链野生型(WT-S)寡核苷酸存在的情况下富集有义链突变型(MU-S)寡核苷酸,所述亲和标记的反义链

(AL-AS)寡核苷酸与突变型寡核苷酸完全匹配且与野生型寡核苷酸具有一个碱基错配。所述寡核苷酸的序列如下(错配位点以粗体显示):

WT-S: 5'-CGTGCAGCTCATCACGCAGCTCATGCCCTT-3' (SEQ ID NO: 1)

[0051] MU-S: 5'-CGTGCAGCTCATCATGCAGCTCATGCCCTT-3' (SEQ ID NO: 2)

AL-AS: 5'-AAGGGCATGAGCTGCATGATGAGCTGCACG-生物素-3' (SEQ ID NO: 3)

[0052] 用10 μ l 150 mM甘氨酸(pH 9.5)、2 μ l 5M NaCl和55 μ l水制备反应混合物。向该溶液中添加10 μ l 10 μ M WT-S、10 μ l 10 μ M MU-S、和10 μ l 50 μ M AL-AS以及3 μ l 100 μ M Rh(bpy)₂(phzi)³⁺。将溶液涡旋并在室温下孵育5分钟。(最终浓度:15 μ M甘氨酸(pH 9.5)、100 μ M NaCl、1 μ M WT-S、1 μ M MU-S、5 μ M AL-AS和3 μ M Rh(bpy)₂phzi³⁺)。然后将反应混合物在Stratagene UV Stratalinker 1800中使用365nm灯泡照射30分钟,以切割含有错配的有义-反义双链体的一条链。

[0053] 将25 μ L 10 mg/mL Solulink链霉抗生物素蛋白磁珠的单独溶液用1mL 15 μ M甘氨酸(pH 9.5)缓冲液洗涤,并使用磁体将珠粒与上清液分离。将具有切割和未切割的寡核苷酸双链体的反应混合物添加至磁珠沉淀并混合。将所得混合物在室温下孵育30分钟。此后,将溶液加热至60 $^{\circ}$ C或加热至结合至切割的AL-AS链的未切割的WT-S链的(或结合至未切割的AL-AS链的切割的WT-S链的)确定的解链温度,磁性分离并去除上清液,使得仅未切割的MU-S链仍然结合至磁珠上的未切割的AL-AS链。MU-S链通过以下去除:用100 μ L 20 μ M NaOH处理磁珠,磁性分离溶液,并将上清液倾析至试管中用于进一步分析。

[0054] 实施例2 使用双链寡核苷酸的对照实验

[0055] 以下实验用于通过使用亲和标记的反义链(AL-AS)寡核苷酸来在有义链野生型(WT-S)寡核苷酸、反义链野生型(WT-AS)寡核苷酸和反义链突变型(MU-AS)寡核苷酸存在的情况下富集有义链突变型(MU-S)寡核苷酸,所述亲和标记的反义链(AL-AS)寡核苷酸具有与MU-AS寡核苷酸相同的序列且与WT-AS寡核苷酸具有一个碱基错配。所述寡核苷酸的序列如下(错配位点以粗体显示):

[0056]

WT-S: 5'-CGTGCAGCTCATCACGCAGCTCATGCCCTT-3' (SEQ ID NO: 1)

WT-AS: 5'-AAGGGCATGAGCTGCGTGATGAGCTGCACG-3' (SEQ ID NO: 4)

MU-S: 5'-CGTGCAGCTCATCATGCAGCTCATGCCCTT-3' (SEQ ID NO: 2)

MU-AS: 5'-AAGGGCATGAGCTGCATGATGAGCTGCACG-3' (SEQ ID NO: 5)

AL-AS: 5'-AAGGGCATGAGCTGCATGATGAGCTGCACG-生物素-3' (SEQ ID NO: 3)

[0057] 用10 μ l 150 mM甘氨酸(pH 9.5)和57 μ l水制备反应混合物。向该溶液中添加10 μ l 10 μ M WT-S和WT-AS的混合物、10 μ l 10 μ M MU-S和MU-AS的混合物以及10 μ l 100 μ M AL-AS。将所得溶液在95 $^{\circ}$ C下孵育5分钟以便将双链寡核苷酸解离为单链,然后将溶液冷却至室温,以

允许单链寡核苷酸重新退火。将3 μ L 100 μ M Rh (bpy)₂phzi³⁺添加至该溶液,将溶液涡旋,并在室温下孵育5分钟。(最终浓度:15 μ M甘氨酸(pH 9.5)、1 μ M WT-S、1 μ M WT-AS、1 μ M MU-S、1 μ M MU-AS、10 μ M AL-AS和3 μ M Rh (bpy)₂phzi³⁺)。然后将反应混合物在Stratagene UV Stratalinker 1800中使用365nm灯泡照射15分钟,以切割含有错配的有义-反义双链体的一条链。10倍浓度过量的AL-AS寡核苷酸用于增加大多数MU-S链将结合至AL-AS、而非MU-AS链的概率。

[0058] 将50 μ L 10 mg/mL Solulink链霉抗生物素蛋白磁珠的单独溶液用1mL 15 μ M甘氨酸(pH 9.5)缓冲液洗涤,并通过使用磁体将珠粒与上清液分离。将具有切割和未切割的寡核苷酸双链体的反应混合物添加至磁珠沉淀并混合。将所得混合物在室温下孵育30分钟。此后,将溶液加热至60 $^{\circ}$ C或加热至结合至切割的AL-AS链的未切割的WT-S链的(或结合至未切割的AL-AS链的切割的WT-S链的)确定的解链温度,磁性分离。用上清液去除所有WT-AS、MU-AS和WT-S链,使得仅未切割的MU-S链仍然结合至磁珠上的未切割的AL-AS链。MU-S链通过以下去除:用100 μ L 20 μ M NaOH处理磁珠,磁性分离溶液,并将上清液倾析至试管中用于进一步分析。

[0059] 实施例3 EGFR突变型DNA的富集和检测

[0060] 提供样品,从其中可以提取核酸混合物,例如,人基因组DNA。所述样品可以来自组织诸如皮肤、器官和肿瘤,或来自流体诸如血液、血浆、血清、尿,或来自含有或推测含有核酸的任何组合物。从该核酸混合物,感兴趣的目标基因,例如,人EGFR基因,可以含有特定变异诸如点突变,其以低丰度存在于所述基因(其可以是非突变型或野生型基因)的大量过量的其它变体中。与癌症的发展具有临床相关性的EGFR基因突变的一个实例是T790M突变。

[0061] 为了富集EGFR基因的低丰度T790M突变型等位基因,将过量的生物素标记的与T790M突变型等位基因的有义链互补且完全匹配的反义链寡核苷酸(BL-AS)添加至含有提取的基因组DNA的溶液。然后将该溶液在90 $^{\circ}$ C或更高的温度加热以变性双链基因组DNA,然后逐渐冷却至允许发生单DNA链的重退火的温度。在退火步骤过程中,BL-AS链可以和与其完全匹配的T790M突变型有义链且也与将在点突变位置处具有错配的野生型有义链形成双链体。

[0062] 然后将铈整合剂Rh (bpy)₂ (phzi)³⁺添加至溶液并进行孵育,使得所述整合剂可以仅在错配位置处结合至BL-AS:野生型有义链双链体。然后将反应混合物在Stratagene UV Stratalinker 1800中使用365nm灯泡照射15分钟,以切割BL-AS:野生型有义链双链体的一条链。接下来,添加包被链霉抗生物素蛋白的固体基质。这样的固体基质的实例可以是链霉抗生物素蛋白包被的磁性颗粒诸如来自Invitrogen的链霉抗生物素蛋白偶联的Dynabeads[®]、来自Promega的链霉抗生物素蛋白MagneSphere[®]顺磁颗粒、和来自Solulink的NanoLink[™]和MagnaLink[™]链霉抗生物素蛋白磁珠。孵育(例如40 $^{\circ}$ C持续1小时)之后,使用磁体分离颗粒并洗掉所有没有结合至颗粒的核酸,其包括突变型和野生型反义链和任何过量BL-AS。然后使用适当的洗脱缓冲液在对应于错配双链体的解链温度的温度下从磁性颗粒洗脱野生型有义链(其或在错配位点处切割或结合至切割的BL-AS寡核苷酸)。作为结果,仅T790M有义链通过杂交至未切割的生物素标记的T790M反义寡核苷酸而仍然结合至磁性颗粒。然后通过使颗粒经受高温或碱性pH条件,T790M有义链可以从BL-AS寡核苷酸解离,并收集用于针对检测的扩增反应中使用。

[0063] 尽管已经关于具体实施例详细描述了本发明,但对于本领域技术人员显而易见的是,可以在本发明的范围内进行各种修改。因此,本发明的范围不应通过本文所述的实施例、而应通过下面呈现的权利要求来限定。

[0001]	序列表	
[0002]	<110> Roche Diagnostics GmbH	
[0003]	F. Hoffmann-La Roche AG	
[0004]	Roche Molecular Systems, Inc.	
[0005]	<120> 用于从混合物富集突变核酸的方法	
[0006]	<130> P31873-WO-KOE	
[0007]	<150> USSN 61/909,587	
[0008]	<151> 2013-11-27	
[0009]	<160> 5	
[0010]	<170> PatentIn 版本 3.5	
[0011]	<210> 1	
[0012]	<211> 30	
[0013]	<212> DNA	
[0014]	<213> 人工序列	
[0015]	<220>	
[0016]	<223> 野生型有义寡核苷酸	
[0017]	<400> 1	
[0018]	cgtgcagctc atcacgcagc tcatgccctt	30
[0019]	<210> 2	
[0020]	<211> 30	
[0021]	<212> DNA	
[0022]	<213> 人工序列	
[0023]	<220>	
[0024]	<223> 突变型有义寡核苷酸	
[0025]	<400> 2	
[0026]	cgtgcagctc atcatgcagc tcatgccctt	30
[0027]	<210> 3	
[0028]	<211> 30	
[0029]	<212> DNA	
[0030]	<213> 人工序列	
[0031]	<220>	
[0032]	<223> 亲和标记的反义寡核苷酸	
[0033]	<220>	
[0034]	<221> 尚未归类的特征	
[0035]	<222> (30) .. (30)	
[0036]	<223> 生物素	
[0037]	<400> 3	
[0038]	aagggcatga gctgcatgat gagctgcacg	30

[0039]	<210>	4	
[0040]	<211>	30	
[0041]	<212>	DNA	
[0042]	<213>	人工序列	
[0043]	<220>		
[0044]	<223>	野生型反义寡核苷酸	
[0045]	<400>	4	
[0046]	aagggcatga gctgcgtgat gagctgcacg		30
[0047]	<210>	5	
[0048]	<211>	30	
[0049]	<212>	DNA	
[0050]	<213>	人工序列	
[0051]	<220>		
[0052]	<223>	突变型反义寡核苷酸	
[0053]	<400>	5	
[0054]	aagggcatga gctgcatgat gagctgcacg		30

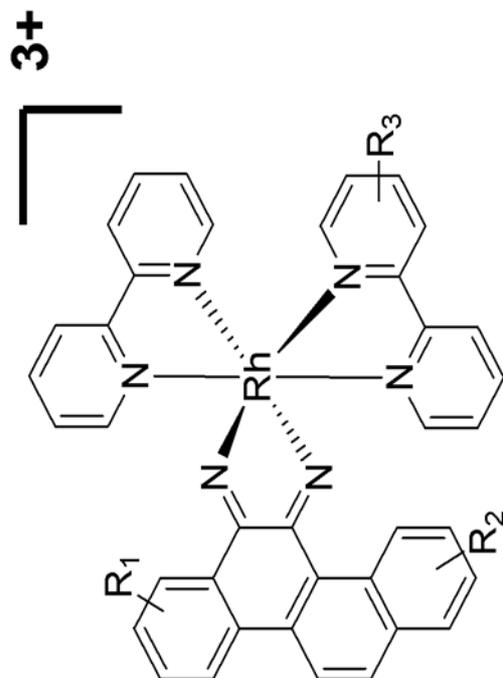
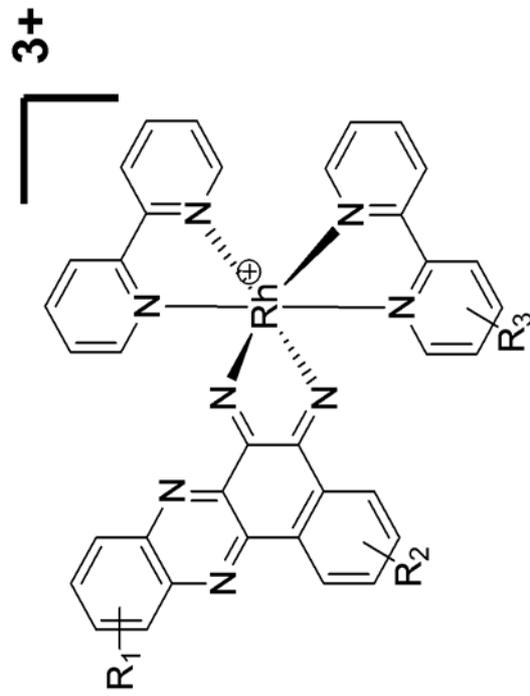


图 1

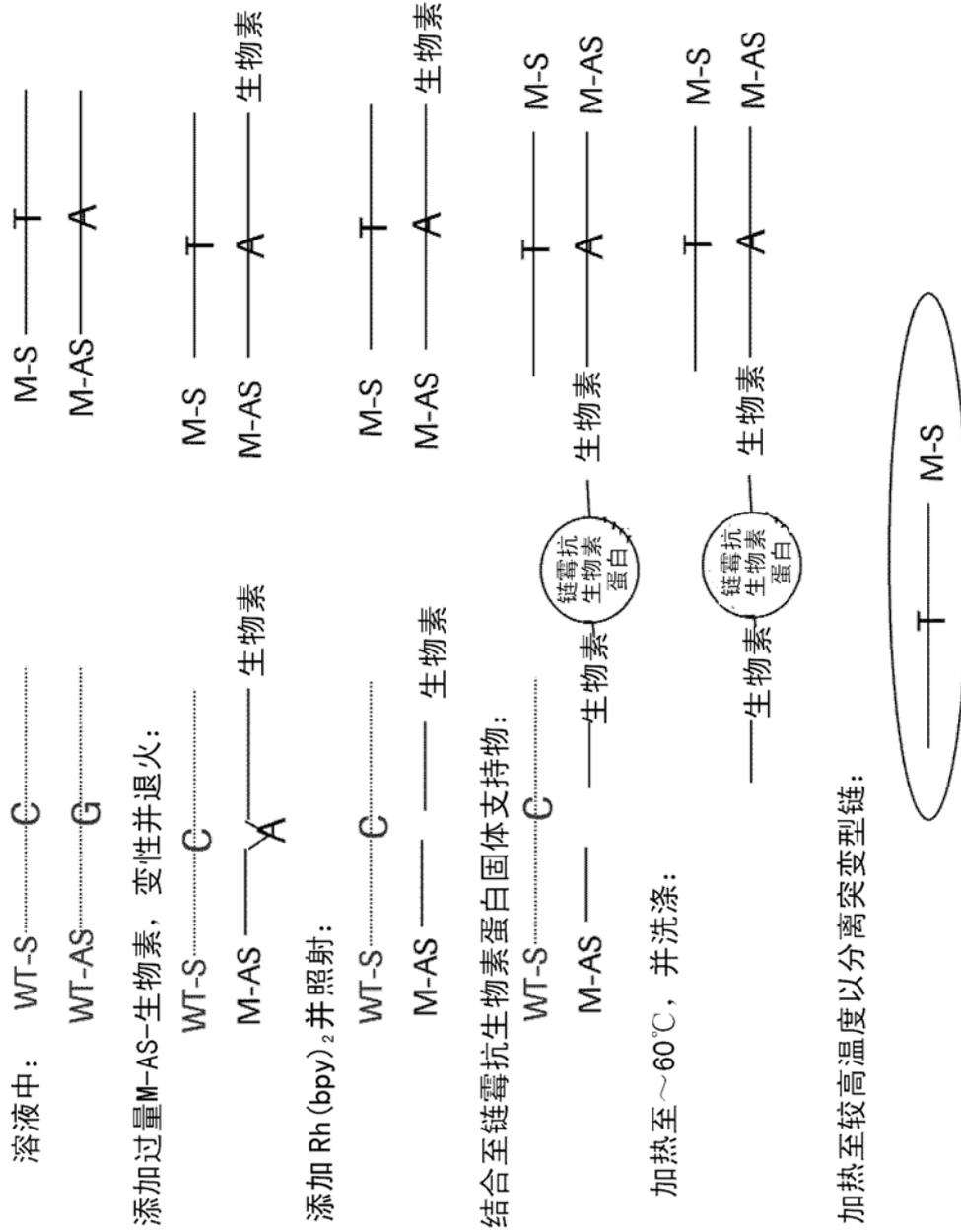


图 2