



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107922941 A

(43)申请公布日 2018.04.17

(21)申请号 201680048155.X

(22)申请日 2016.06.14

(30)优先权数据

62/175,916 2015.06.15 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2018.02.13

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2016/037422 2016.06.14

(87)PCT国际申请的公布数据

W02016/205233 EN 2016.12.22

(71)申请人 塞弗德公司

地址 美国加利福尼亚州

(72)发明人 E·W·赖 A·科尔维 R·范阿塔

R·希古奇 A·加尔

K·考克蒙德

(74)专利代理机构 北京北翔知识产权代理有限公司 11285

代理人 张广育 冯冲

(51)Int.Cl.

C12N 15/10(2006.01)

C12Q 1/686(2018.01)

B01L 3/00(2006.01)

权利要求书13页 说明书80页 附图37页

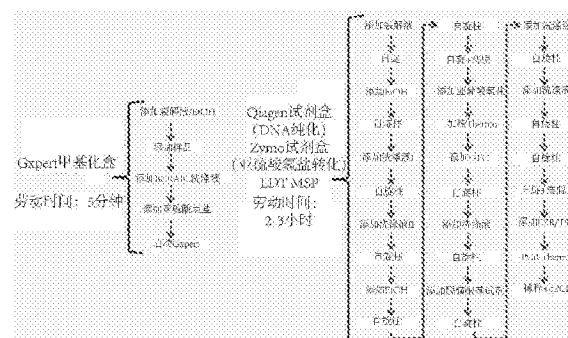
(54)发明名称

在自动化反应盒中DNA甲基化的整合的纯化和测量以及突变和/或mRNA表达水平的共同测量

(57)摘要

在各实施方案中,提供了测定DNA的甲基化的方法。在一个说明性但非限制性的实施方案中,所述方法包括:i)使包含核酸的生物样品与包含第一柱或滤器的第一基质材料接触,其中所述基质材料结合/或过滤所述样品中的核酸,从而纯化DNA;ii)从所述第一基质材料上洗脱结合的DNA并使DNA变性以产生洗脱的变性DNA;iii)在亚硫酸氢盐离子的存在下加热洗脱的DNA以产生脱氨基的核酸;iv)使所述脱氨基的核酸与包含第二柱的第二基质材料接触以将所述脱氨基的核酸与所述第二基质材料结合;v)将结合的脱氨基的核酸脱磷酸基和/或通过所述脱氨基的核酸与碱性溶液接触来使所述核酸同时洗脱和脱磷酸基以产生亚硫酸氢盐转化的核酸;vi)从所述第二基质材料上洗脱所述亚硫酸氢盐转化的核酸;和vii)在所述亚硫酸氢盐转化的核酸上进行甲基化特异性PCR和/或核酸测序和/或高分

辨率熔解分析(HRM)以测定所述核酸的甲基化,其中至少步骤iv)至vi)在单个反应盒中进行。



1. 一种测定核酸的甲基化状态的方法,所述方法包括:
 - i) 使包含核酸的生物样品与包含第一柱或滤器的第一基质材料接触,其中所述基质材料结合和/或过滤所述样品中的核酸,从而纯化DNA;
 - ii) 从所述第一基质材料上洗脱结合的DNA并使DNA变性以产生洗脱的变性DNA;
 - iii) 在亚硫酸氢盐试剂的存在下加热洗脱的DNA以产生脱氨基的核酸;
 - iv) 使所述脱氨基的核酸与包含第二柱的第二基质材料接触以使所述脱氨基的核酸与所述第二基质材料结合;
 - v) 将结合的脱氨基的核酸脱磺酸基和/或通过将所述脱氨基的核酸与碱性溶液接触来同时使所述核酸洗脱并脱磺酸基以产生转化的(例如亚硫酸氢盐转化的)核酸;
 - vi) 从所述第二基质材料上洗脱所述亚硫酸氢盐转化的核酸;和
 - vii) 在所述转化的核酸上进行甲基化特异性PCR和/或核酸测序和/或高分辨率熔解分析(HRM)以测定所述核酸的甲基化,其中至少步骤iv)至vi)在单个反应盒中进行。
2. 权利要求1的方法,其中:
 - 至少步骤iv)至vi)在单个反应盒中进行;或
 - 至少步骤iii)至vi)在单个反应盒中进行;或
 - 至少步骤ii)至vi)在单个反应盒中进行;或
 - 至少步骤i)至vi)在单个反应盒中进行。
3. 权利要求1-2中任一项的方法,其中在相同的反应盒中进行步骤vii。
4. 权利要求1-3中任一项的方法,其中:
 - 所述第一基质材料和所述第二基质材料是形成相同柱的相同材料;或
 - 所述第一基质材料和所述第二基质材料形成不同的柱。
5. 权利要求1-4中任一项的方法,其中当进行所述甲基化特异性PCR时,是在所述盒中进行。
6. 权利要求1-5中任一项的方法,其中当进行所述核酸测序时,是在所述盒中或与所述盒偶联的装置中进行。
7. 权利要求1-6中任一项的方法,其中所述盒包括含有所述第一基质材料的柱、样品接收室、温度控制的通道或室、多个包含试剂和/或缓冲液的室,并且其中在使用时所述室中的至少一个包含脱磺酸基/洗脱缓冲液,并且其中所述盒任选地包括含有所述第二基质材料的第二柱。
8. 权利要求7的方法,其中,在使用时,所述室中的至少一个包含提供亚硫酸氢盐离子的试剂。
9. 权利要求7-8中任一项的方法,其中所述第二柱不存在。
10. 权利要求7-9中任一项的方法,其中所述温度控制的通道或室包括热循环通道或室。
11. 权利要求7-10中任一项的方法,其中所述盒包括含有一种或多种试剂的一个或多个室,所述试剂选自甲基化特异性PCR引物、甲基化特异性PCR探针、PCR酶和PCR反应缓冲液。
12. 权利要求11的方法,其中所述盒包括:
 - 含有一种或多种引物和探针的一个或多个室,所述引物和探针用于检测亚硫酸氢盐转

化的DNA的正向链的甲基化;和/或

含有一种或多种引物和探针的一个或多个室,所述引物和探针用于检测亚硫酸氢盐转化的DNA的反向链的甲基化。

13. 权利要求7-12中任一项的方法,其中所述样品接收室、所述柱、所述多个室、和当存在时,所述温度控制的通道或室和/或热循环通道或室,选择性地处于流体连通中。

14. 权利要求13的方法,其中所述样品接收室、所述柱、所述多个室、和当存在时,所述热循环通道或室,通过微流体通道和阀选择性地处于流体连通中。

15. 权利要求13的方法,其中所述样品接收室、所述柱、所述多个室、和当存在时,所述热循环通道或室或进入所述热循环通道或室的端口,排列在中央阀的周围并且选择性地处于与所述中央阀中的通道的流体连通中,其中配置所述中央阀以适应柱塞,所述柱塞能够将流体引入或引出与所述中央阀处于流体连通的室。

16. 权利要求7-15中任一项的方法,其中所述盒在使用时包括:

包含样品的第一室;

包含硫氰酸胍-乙醇 (GTC-EtOH) 溶液的第二室;

包含亚硫酸氢盐试剂的第三室;

包含缓冲液的第四室;

包含冲洗溶液的第五室;和

包含洗脱/脱磺酸基试剂的第六室。

17. 权利要求16的方法,其中所述第一室包含GTC-EtOH-Tween萃取/沉淀试剂中的所述样品。

18. 权利要求16-17中任一项的方法,其中:

在将所述样品放置在所述盒中时或接近将所述样品放置在所述盒中时添加GTC-ETOH-Tween缓冲液;和/或

在将所述样品放置在所述盒中时或接近将所述样品放置在所述盒中时添加亚硫酸氢盐试剂。

19. 权利要求16-17中任一项的方法,其中:

将GTC-ETOH-Tween缓冲液作为所述盒的组分提供;和/或

将亚硫酸氢盐试剂作为所述盒的组分提供。

20. 权利要求7-19中任一项的方法,其中所述盒包括含有PCR引物和/或探针和/或PCR酶的第七室。

21. 权利要求20的方法,其中将所述PCR引物和/或探针和/或酶作为珠提供。

22. 权利要求1-21中任一项的方法,其中所述生物样品包括:

一种或多种选自细胞、组织的样品;和/或

包含核酸的生物液体和/或选自全血液、血浆、血清、唾液、粘液、尿、痰和脑脊髓液生物液体;和/或

选自组织样品、福尔马林固定石蜡包埋的 (FFPE) 组织、新鲜冷冻组织、细针抽吸物 (FNA) 和组织芯活检的样品。

23. 权利要求1-22中任一项的方法,其中:

所述方法包括使所述生物样品与裂解溶液接触;和/或

所述方法包括在所述样品接收室中提供所述样品并使所述样品与萃取/沉淀溶液接触。

24. 权利要求1-23中任一项的方法,其中所述亚硫酸氢盐离子作为选自偏亚硫酸氢钠、亚硫酸氢钾、亚硫酸氢铯、亚硫酸氢铵和DABSO的化合物提供。

25. 权利要求1-24中任一项的方法,其中:

所述洗脱结合的DNA包括使用pH大于约pH 10.5或大于约pH 12的碱性溶液使所述DNA洗脱和变性;和/或

所述用亚硫酸氢盐离子孵育洗脱的DNA以产生脱氨基的核酸包括将浓缩的亚硫酸氢盐溶液中的DNA转移到所述盒中的温度控制的通道或室(例如热循环通道或室)并加热所述混合物;和/或

所述使所述脱氨基的核酸与第二基质材料接触包括将DNA-亚硫酸氢盐溶液和GTC-EtOH混合并将所述溶液分配到所述第二基质材料上;和/或

所述将结合的脱氨基的核酸脱磺酸基包括使用高pH脱磺酸基缓冲液从所述第二柱洗脱DNA并孵育所述溶液。

26. 权利要求1-25中任一项的方法,其中在用亚硫酸氢盐离子孵育之后,用缓冲液洗涤所述温度控制的通道或室以除去残余的亚硫酸氢盐并中和pH。

27. 权利要求26的方法,其中所述温度控制的通道或室充分地不含有亚硫酸氢盐离子以允许在所述通道或室中进行PCR。

28. 权利要求1-27中任一项的方法,其中进行甲基化特异性PCR以测定靶核酸序列的甲基化。

29. 权利要求28的方法,其中:

使用特异性针对甲基化序列的引物和/或特异性针对未甲基化的序列的引物进行甲基化特异性PCR(MSP);和/或

使用特异性针对亚硫酸氢盐转化的甲基化序列和/或未甲基化的序列的引物来进行TaqMan PCR反应。

30. 权利要求28的方法,其中所述甲基化特异性PCR包括MethyLight方案。

31. 权利要求28-30中任一项的方法,其中所述MSP使用一种或多种为扩增的甲基化序列的标记物的荧光探针和/或一种或多种为扩增的未甲基化的序列的标记物的荧光探针。

32. 权利要求31的方法,其中所述荧光探针包括荧光报告染料和淬灭剂染料,其中所述探针在经Taq DNA聚合酶的5'至3'核酸酶活性裂解时提供信号。

33. 权利要求31-32中任一项的方法,其中通过分别特异性针对目的扩增区域中不同的甲基化区域的多个探针的组合信号来确定甲基化信号;和/或

通过特异性针对目的扩增区域中相同甲基化区域的多个探针来确定甲基化信号。

34. 权利要求31-32中任一项的方法,其中通过目的扩增区域中的单一探针来确定甲基化信号。

35. 权利要求31-34中任一项的方法,其中所述探针以单路或多路运行。

36. 权利要求31-35中任一项的方法,其中多个探针作为巢式PCR反应运行。

37. 权利要求1-36中任一项的方法,其中:

针对作为对照的未转化的DNA,进行PCR;和/或

针对作为对照的未转化的DNA,进行PCR。

38. 权利要求1-37中任一项的方法,其中亚硫酸氢盐反应和PCR反应,或脱磺酸基反应和PCR反应,或亚硫酸氢盐反应、脱磺酸基反应和PCR反应全部在相同的反应管或室中进行。

39. 权利要求1-38中任一项的方法,其中所述使包含核酸的生物样品与第一基质材料接触包括使含有RNA的样品与所述第一基质材料接触,其中所述基质材料结合所述RNA,从而纯化所述RNA。

40. 权利要求39的方法,其中所述方法包括从所述基质材料上洗脱所述RNA,基本上独立于DNA。

41. 权利要求39-40中任一项的方法,其中:

所述RNA被洗脱并贮存在室中;和/或

在所述RNA上进行逆转录(RT)并进行qRT-PCR以测定靶RNA序列的水平。

42. 权利要求40-41中任一项的方法,其中将所述RNA部分用于从所述第二基质材料上洗脱亚硫酸氢盐转化的核酸并与亚硫酸氢盐转化的DNA混合,或与被洗脱的亚硫酸氢盐转化的DNA混合。

43. 权利要求42的方法,其中在与亚硫酸氢盐转化的DNA结合之前或之后对所述RNA进行RT。

44. 权利要求42-43中任一项的方法,其中针对混合物中的RT RNA进行qRT-PCR以测定靶RNA序列的水平,并对所述混合物进行甲基化特异性PCR以测定靶DNA序列的甲基化。

45. 权利要求1-44中任一项的方法,其中测定选自以下的基因的启动子区的甲基化:MGMT、RASSF1A、ADAMTS1、BNC1、HIST1H3C、HOXB4、RASGRF2、TM6SF1和AKR1B1。

46. 权利要求39-45中任一项的方法,其中测定甲基转移酶的RNA表达水平。

47. 一种用于测定核酸的甲基化状态的盒,所述盒包括:包含第一基质材料的柱、样品接收室、温度控制的通道或室、多个包含试剂和/或缓冲液的室,使用时至少一个所述室包含亚硫酸氢盐试剂,并且至少一个所述室包含脱磺酸基/洗脱缓冲液,并且其中所述盒任选地包括含有所述第二基质材料的第二柱。

48. 权利要求47的盒,其中所述盒在使用时包括含有试剂的室,所述试剂包含硫氰酸胍乙醇(GTC-EtOH)。

49. 权利要求47-48中任一项的盒,其中所述第二柱不存在。

50. 权利要求47-49中任一项的盒,其中所述温度控制的通道或室是热循环通道或室。

51. 权利要求47-50中任一项的盒,其中所述亚硫酸氢盐试剂包括选自亚硫酸氢铵、偏亚硫酸氢钠、亚硫酸氢钾、亚硫酸氢铯和DABSO的化合物。

52. 权利要求47-51中任一项的盒,其中所述盒包括一个或多个含有一种或多种试剂的室,所述试剂选自甲基化特异性PCR引物、甲基化特异性PCR探针、PCR酶和PCR反应缓冲液。

53. 权利要求52的盒,其中所述盒包含至少两个室,所述室包含一种或多种选自甲基化特异性PCR引物、甲基化特异性PCR探针、PCR酶和PCR反应缓冲液的试剂。

54. 权利要求47-53中任一项的盒,其中:

所述盒包含至少一个室,所述室包含用于检测转化的DNA的正向链的甲基化的引物和探针;和/或

所述盒包含至少一个室,所述室包含用于检测转化的DNA的反向链的甲基化的引物和

探针。

55. 权利要求52-54中任一项的盒,其中所述PCR引物和/或探针和/或酶作为珠提供。

56. 权利要求47-55中任一项的盒,其中所述样品接收室、所述柱、所述多个室以及所述温度控制的加热通道或室选择性地处于流体连通中。

57. 权利要求56的盒,其中所述样品接收室、所述柱、所述多个室,以及所述温度控制的通道或室通过微流体通道和阀选择性地处于流体连通中。

58. 权利要求56的盒,其中所述样品接收室、所述柱、所述多个室,以及所述温度控制的通道或室或进入所述温度控制的通道或室的端口排列在中央阀的周围并且选择性地处于与所述中央阀中的通道的流体连通中,其中配置所述中央阀以适应柱塞,所述柱塞能够将流体引入或引出与所述中央阀处于流体连通的室。

59. 权利要求47-58中任一项的盒,其中所述盒被配置以使在使用时所述盒包括:

包含样品的第一室;

包含硫氰酸胍-乙醇 (GTC-EtOH) 溶液的第二室;

包含亚硫酸氢盐试剂的第三室;

包含缓冲液的第四室;

包含冲洗溶液的第五室;和

包含洗脱/脱磺酸基试剂的第六室。

60. 权利要求59的盒,其中所述第一室包含GTC-EtOH-Tween萃取/沉淀试剂中的所述样品。

61. 权利要求47-60中任一项的盒,其中:

在将所述样品放置在所述盒中时或接近将所述样品放置在所述盒中时配置所述盒以用于待被添加到所述盒的亚硫酸氢盐试剂;和/或

在将所述样品放置在所述盒中时或接近将所述样品放置在所述盒中时配置所述盒以用于添加GTC-ETOH-Tween缓冲液。

62. 权利要求47-60中任一项的盒,其中:

将亚硫酸氢盐试剂作为所述盒的组分提供;和/或

将GTC-ETOH-Tween缓冲液作为所述盒的组分提供。

63. 权利要求47-62中任一项的盒,其中所述盒包括含有PCR引物和/或探针和/或PCR酶的第七室。

64. 权利要求47-63中任一项的盒,其中

所述盒包括一个或多个室,所述室包含特异性针对亚硫酸氢盐转化的甲基化和/或未甲基化的序列的引物;和/或

所述盒包括一个或多个含有TaqMan PCR反应试剂的室;和/或

所述盒包括一个或多个室,其含有一种或多种为扩增的甲基化序列标记物的荧光探针和/或一种或多种为扩增的未甲基化的序列标记物的荧光探针。

65. 权利要求64的盒,其中所述探针包括荧光报告染料和淬灭剂染料,其中所述探针在经Taq DNA聚合酶的5'至3'核酸酶活性裂解时提供信号。

66. 权利要求64-65中任一项的盒,其中

所述盒包括多个探针,其分别特异性针对目的扩增区域中不同的甲基化区域;或

所述盒包括多个探针,其分别特异性针对目的扩增区域中相同甲基化区域;或
所述盒包括特异性针对目的扩增区域中的甲基化区域的单一探针。

67. 权利要求47-66中任一项的盒,其中所述盒包含引物和/或探针以测定选自以下的基因的启动子区的甲基化:MGMT、RASSF1A、ADAMTS1、BNC1、HIST1H3C、HOXB4、RASGRF2、TM6SF1和AKR1B1;和/或

所述盒包含一种或多种表5、9或10中所示的引物和/或一种或多种表5、9或10中所示的探针。

68. 权利要求47-67中任一项的盒,其中所述盒被配置以用于测定甲基转移酶的RNA表达水平。

69. 一种用于测定生物样品中核酸的甲基化的系统,所述系统包括:

被配置以包含一个或多个样品处理模块的附件,各样品处理模块被配置以容纳可移动的权利要求47-68中任一项的盒;

其中所述系统被配置以操作所述样品处理模块进行样品处理,来测定一种或多种靶核酸的甲基化并任选地测定相应的可移动样品盒内一种或多种靶DNA序列的水平,其中所述对相应的可移动样品盒内的样品的处理实施权利要求1-46中任一项的方法。

70. 权利要求69的系统,其中:

所述系统被配置以包含一个样品处理模块;或

所述系统被配置以包含至少两个样品处理模块,或至少4个样品处理模块,或至少8个样品处理模块,或至少12个样品处理模块,或至少16个样品处理模块,或至少20个样品处理模块,或至少24个样品处理模块,或至少28个样品处理模块,或至少32个样品处理模块,或至少64个样品处理模块,或至少128个样品处理模块。

71. 权利要求69-70中任一项的系统,其中:

所述模块包括一个或多个加热板以加热所述盒中的温度控制的室或通道;和/或

所述模块包括被配置来冷却所述盒中的温度控制的通道或室的风扇,是热循环通道或室;和/或

所述模块包括电路以将信息(例如光学信息)传递到计算机,用于分析;和/或

所述模块包括光学区块以提供一种或多种所述盒中的反应产生的光学信号的激发和/或检测。

72. 权利要求69-71中任一项的系统,其中:

所述系统被配置以操作所述盒进行权利要求1-46中任一项的方法;和/或

所述系统被配置以操作所述盒:

将样品结合至柱;

从所述柱洗脱DNA并用转化试剂结合所述DNA;

在反应室或管中加热DNA/转化试剂溶液以产生转化的DNA;

将转化的DNA结合至柱;

从柱脱磷酸基并洗脱DNA;和

在反应室或管中对被洗脱的脱磷酸基的DNA进行PCR。

73. 权利要求72的系统,其中所述PCR在相同的反应室或管中进行,在所述反应室或管中DNA/转化试剂溶液被事先加热。

74. 一种用于样品制备的盒,所述盒包括:

包含结合DNA的亲基质通道或室,排列在中央阀组件的周围并且选择性地处于与
所述中央阀组件的流体连通中的多个室,其中所述中央阀组件被配置以适应柱塞,所述柱
塞能够将流体引入或引出与所述中央阀处于流体连通的室,其中所述多个室包括:

被配置以接收最高达约5mL或最高达约4mL的样品溶液;

包含PEG的室;

包含GTC-EtOH的室;

包含碱性溶液的室;和

包含缓冲液的室。

75. 权利要求74的盒,其中

所述多个室还包括含有亚硫酸氢盐试剂的室;和/或

所述多个室包括含有GTC-乙醇洗涤溶液的室。

76. 权利要求74-75中任一项的盒,其中所述多个室包括含有珠的室,所述珠包含一种
或多种PCR引物和/或探针。

77. 权利要求74-76中任一项的盒,其中

所述包含PEG的室包含约1mL PEG;和/或

所述包含碱性溶液的室包含约500 μ L溶液;和/或

所述包含GTC-EtOH的室包含约2mL GTC-EtOH;和/或

所述包含缓冲液的室包含约2mL缓冲液。

78. 高体积样品制备(HVSP),所述盒包括:

包含结合DNA的亲基质的通道或室,排列在中央阀组件的周围并且选择性地处于与
所述中央阀组件的流体连通中的多个室,其中所述中央阀组件被配置以适应柱塞,所述柱
塞能够将流体引入或引出与所述中央阀处于流体连通的室,其中所述多个室包括:

至少两个不同的室,其分别被配置以接收最高达约4.5mL样品溶液;

包含PEG的室;

包含碱性溶液的室;和

包含缓冲液的室。

79. 权利要求78的盒,其中所述多个室包括至少三个不同的室,其分别被配置以接收最
高达4mL样品溶液。

80. 权利要求78-79中任一项的盒,其中

所述PEG包括PEG200;和/或

所述碱性溶液包括KOH;和/或

所述缓冲液包括Tris。

81. 权利要求78-80中任一项的盒,其中所述多个室包括含有洗涤溶液的室。

82. 权利要求78-81中任一项的盒,其中所述样品室在使用时包含样品溶液、GTC和异丙
醇。

83. 权利要求78-82中任一项的盒,其中所述盒在使用时包含4mL样品溶液,该样品溶液
被配制在各经配置以接收样品的所述室中。

84. 权利要求78-83中任一项的盒,其中所述盒提供DNA或RNA回收,其基本上相对于

0.5mL至约4m样品的样品体积呈线性关系。

85. 权利要求78-84中任一项的盒,其中所述盒包含或经配置以接收转化试剂。

86. 权利要求85的盒,其中所述盒在使用时进行DNA的亚硫酸盐转化。

87. 用于从血清或血浆制备DNA样品的裂解溶液,所述裂解溶液包括:GTC、缓冲液、去垢剂和任选的消泡剂。

88. 权利要求87的裂解溶液,其中所述用于血清或血浆的裂解溶液包括GTC、Tris pH 7.0、Tween 20和消泡剂SE15。

89. 权利要求88的裂解溶液,其中所述用于血清或血浆的裂解溶液包括约4.5M GTC、约45mM Tris pH 7.0、约1% Tween 20和约0.01%消泡剂SE15。

90. 用于从FFPE样品制备DNA样品的裂解溶液。

91. 权利要求90的裂解溶液,其中所述用于FFPE样品的裂解溶液包括缓冲液、去垢剂、NaCl、MgCl₂、螯合剂、消泡剂SE15和叠氮化钠。

92. 权利要求91的裂解溶液,其中所述用于FFPE样品的裂解溶液包括约1% Tween20、约400mM NaCl、约25mM EDTA、约10mM MgCl₂、约50mM HEPES pH 7.2、约0.01%消泡剂SE15和约0.01%叠氮化钠。

93. 用于测定DNA甲基化的试剂盒,所述试剂盒包括:包含权利要求47-71中任一项的用于测定核酸甲基化状态的盒的容器。

94. 权利要求93的试剂盒,其中所述试剂盒还包括:

含有权利要求87-89中任一项的用于血清或血浆的裂解溶液的容器;和/或

含有权利要求90-92中任一项的用于FFPE样品的裂解溶液的容器;和/或

含有蛋白酶K的容器;和/或

所述盒中或与所述盒分开的容器中的转化试剂;和/或

包含权利要求78-84中任一项的用于样品制备的盒的容器。

95. 用于检测癌症的甲基化标记物的盒,所述盒包括:

多个室和热循环通道或室,其中所述多个室或进入所述热循环通道或室的端口排列在中央阀组件的周围并且选择性地处于与所述中央阀组件的流体连通中,其中所述中央阀组件被配置以适应柱塞,所述柱塞能够将流体引入或引出与所述中央阀处于流体连通的室或端口,其中所述多个室包括:

样品接收室;

包含或经配置以接收亚硫酸氢盐试剂(转化试剂)的室;

包含洗涤溶液的室;

包含Tris缓冲液的室;

包含碱性溶液的室,所述碱性溶液包括KOH;

包含提供PCR主混合物的珠的室;和

包含珠的室,所述珠提供PCR引物和探针以检测一种或多种基因启动子的甲基化,所述基因启动子的甲基化状态是癌症的标记物。

96. 权利要求95的盒,其中所述亚硫酸氢盐试剂包括选自偏亚硫酸氢钠、亚硫酸氢钾、亚硫酸氢铯、亚硫酸氢铵和DABSO的化合物。

97. 权利要求95-96中任一项的盒,其中所述包含提供PCR引物和探针以检测一种或多

种基因启动子的甲基化的珠的室包含这样的珠,即其提供PCR引物和探针以检测一种或多种基因启动子的甲基化,所述基因启动子的甲基化状态是选自以下的癌症的标记物:乳腺癌、胰腺癌、前列腺癌、脑癌和肺癌。

98. 权利要求95-97中任一项的盒,其中所述包含提供PCR引物和探针以检测一种或多种基因启动子的甲基化的珠的室包含这样的珠,即其提供PCR引物和探针以检测一种或多种基因启动子的甲基化,所述基因选自RASSF1A、AKR1B1、HOXB4、HIST1H3C、RASGRF2、TM6SF1、BRCA1、BNC1、ADAMTS1、CD01、SOX17、TAC1、HOXA7和MGMT。

99. 权利要求95-98中任一项的盒,其中:

所述包含提供PCR引物和探针以检测一种或多种基因启动子的甲基化的珠的室包含这样的珠,即其提供PCR引物和探针以检测一种或多种基因启动子的甲基化,所述基因启动子的甲基化状态是胰腺癌的标记物;和/或

所述包含提供PCR引物和探针以检测一种或多种基因启动子的甲基化的珠的室包含这样的珠,即其提供PCR引物和探针以检测一种或多种基因启动子的甲基化,所述基因启动子的甲基化状态是乳腺癌的标记物;和/或

所述包含提供PCR引物和探针以检测一种或多种基因启动子的甲基化的珠的室包含这样的珠,即其提供PCR引物和探针以检测一种或多种基因启动子的甲基化,所述基因启动子的甲基化状态是肺癌的标记物;和/或

所述包含提供PCR引物和探针以检测一种或多种基因启动子的甲基化的珠的室包含这样的珠,即其提供PCR引物和探针以检测一种或多种基因启动子的甲基化,所述基因启动子的甲基化状态是脑癌的标记物。

100. 权利要求99的盒,其中

所述包含提供PCR引物和探针以检测一种或多种基因启动子的甲基化的珠的室包含这样的珠,即其提供PCR引物和探针以检测基因的甲基化,所述基因的甲基化状态是胰腺癌的标记物,其中所述引物和/或探针包括用于检测ADAMTS1和/或BNC1的启动子的甲基化的引物和/或探针;和/或

所述包含提供PCR引物和探针以检测一种或多种基因启动子的甲基化的珠的室包含这样的珠,即其提供PCR引物和探针以检测基因的甲基化,所述基因的甲基化状态是乳腺癌的标记物,其中所述引物和/或探针包括用于检测选自以下的一种、两种、三种、四种、五种或全部基因的启动子的甲基化:BRCA1、RASSF1A、AKR1B1、HOXB4、HIST1H3C、RASGRF2和TM6SF1;和/或

所述包含提供PCR引物和探针以检测一种或多种基因启动子的甲基化的珠的室包含这样的珠,即其提供PCR引物和探针以检测基因的甲基化,所述基因的甲基化状态是肺癌的标记物,其中所述引物和/或探针包括用于检测选自以下的一种、两种、三种或全部基因的启动子的甲基化:CD01、SOX17、TAC1和HOXA7;和/或

所述包含提供PCR引物和探针以检测一种或多种基因启动子的甲基化的珠的室包含这样的珠,即其提供PCR引物和探针以检测基因的甲基化,所述基因的甲基化状态是脑癌的标记物,其中所述引物和/或探针包括用于检测MGMT启动子的甲基化的引物和/或探针。

101. 一种从血清或血浆制备cfDNA样品的方法,所述方法包括:

将蛋白酶K处理的血清或血浆样品与权利要求87-89中任一项的裂解溶液和醇结合以

形成样品溶液；

将所述样品溶液加样到权利要求74-77中任一项的盒中的样品接收室，或加样到权利要求78-86中任一项的盒中的样品接收室；和

操作所述盒以将所述样品中的DNA结合至所述亲和基质，然后从所述基质洗涤和释放所述DNA。

102. 权利要求101的方法，其中所述结合蛋白酶K处理的血清或血浆样品包括以对应于以下的比例结合所述样品、裂解溶液和醇：约1.3mL蛋白酶K处理的血清或血浆、2.2mL裂解溶液和约1.5mL醇。

103. 权利要求101-102中任一项的方法，其中

所述样品包括血清；和/或

所述样品包括血浆。

104. 权利要求101-103中任一项的方法，其中所述方法包括：

将所述盒引入到权利要求69-73中任一项的系统中的样品处理模块；和/或

操作所述盒以转化所述DNA，用于甲基化检测；和/或

操作所述盒以使用所述DNA或转化的DNA作为模板来进行一种或多种PCR反应。

105. 权利要求101-104中任一项的方法，其中所述加样包括将所述样品溶液加样到权利要求78-83中任一项的盒中的一个或多个样品接收室。

106. 权利要求105的方法，其中所述方法还包括将释放的DNA转移到第二盒，用于甲基化检测和/或PCR。

107. 权利要求106的方法，其中所述第二盒是权利要求47-68中任一项的盒。

108. 权利要求106-107中任一项的方法，其中：

所述方法还包括操作所述第二盒以转化所述DNA，用于甲基化检测；和/或

所述方法还包括操作所述第二盒以使用所述DNA或转化的DNA作为模板来进行一种或多种PCR反应。

109. 权利要求106-108中任一项的方法，其中所述操作所述第二盒包括将所述第二盒引入到权利要求69-73中任一项的系统中的样品处理模块。

110. 一种从FFPE样品制备DNA的方法，所述方法包括：

将福尔马林固定石蜡包埋的样品与权利要求90-92中任一项的裂解溶液结合；

加热包含所述样品的所述裂解溶液；

添加醇至所述样品以形成样品溶液；

将所述样品溶液加样到权利要求74-77中任一项的盒中的样品接收室，或加样到权利要求78-86中任一项的盒中的样品接收室；以及

操作所述盒以将所述样品中的DNA结合至所述亲和基质，然后从所述基质洗涤并释放所述DNA。

111. 权利要求110的方法，其中：

所述加热包括将蛋白酶K添加到所述样品中并加热所述样品；和/或

所述加热包括将约50 μ L蛋白酶K添加到约1.2mL包含FFPE样品的FFPE裂解溶液中；和/或

所述加热包括加热所述裂解溶液至温度约50 $^{\circ}$ C至约60 $^{\circ}$ C；和/或

所述加热持续最长达约4小时,或最长达约5小时,或最长达约6小时。

112. 权利要求110-111中任一项的方法,其中所述方法包括:

以约1:1裂解溶液:醇的体积比将醇添加到所述裂解溶液中;和/或

操作所述盒包括将所述盒引入到权利要求69-73中任一项的系统中的样品处理模块中;和/或

操作所述盒以转化所述DNA,用于甲基化检测;和/或

操作所述盒以使用所述DNA或转化的DNA作为模板来进行一种或多种PCR反应。

113. 权利要求110-112中任一项的方法,其中:

所述加样包括将所述样品溶液加样到权利要求78-83中任一项的盒中的一个或多个样品接收室;和/或

所述方法还包括将释放的DNA转移到第二盒,用于甲基化检测和/或PCR,其中所述第二盒是权利要求47-68中任一项的盒。

114. 权利要求113的方法,其中:

所述方法还包括操作所述第二盒以转化所述DNA,用于甲基化检测;和/或

所述方法还包括操作所述第二盒以使用所述DNA或转化的DNA作为模板来进行一种或多种PCR反应;和/或

所述操作所述第二盒包括将所述第二盒引入到权利要求69-73中任一项的系统中的样品处理模块中。

115. 一种在受试者中检测癌症和/或分期癌症和/或检测癌症易感性的方法,所述方法包括:

提供来自所述受试者的生物样品,其中所述生物样品包含DNA;

利用权利要求95-100中任一项的盒来检测所述DNA中一种或多种基因启动子的甲基化,所述基因启动子的甲基化状态是癌症标记物,其中所述一种或多种基因启动子的甲基化的增加指示癌症的存在或癌症易感性或癌症或癌前期的阶段。

116. 权利要求115的方法,其中所述癌症是选自以下的癌症:乳腺癌、胰腺癌、前列腺癌、脑癌、肺癌、B细胞淋巴瘤、肺癌、支气管癌、结直肠癌、胃癌、卵巢癌、膀胱癌、脑或中枢神经系统癌、周围神经系统癌、食管癌、宫颈癌、黑色素瘤、子宫或子宫内膜癌、口腔或咽癌、肝癌、肾癌、胆道癌、小肠或阑尾癌、唾液腺癌、甲状腺癌、肾上腺癌、骨肉瘤、软骨肉瘤、脂肪肉瘤、睾丸癌和恶性纤维组织细胞瘤。

117. 权利要求115-116中任一项的方法,其中

所述样品包括来自血清或血浆的样品;和/或

所述样品包括FFPE样品。

118. 权利要求115-117中任一项的方法,其中所述一种或多种基因启动子包括一种或多种选自RASSF1A、AKR1B1、HOXB4、HIST1H3C、RASGRF2、TM6SF1、BRCA1、BNC1、ADAMTS1、CD01、SOX17、TAC1、HOXA7和MGMT的基因的启动子。

119. 权利要求115-117中任一项的方法,其中

所述癌症是胰腺癌并且所述一种或多种基因启动子包括选自ADAMTS1和BNC1的一种、两种、三种或四种基因的启动子;和/或

所述癌症是乳腺癌并且所述一种或多种基因启动子包括选自BRCA1、RASSF1A、AKR1B1、

HOXB4、HIST1H3C、RASGRF2和TM6SF1的一种、两种、三种、四种、五种或全部基因的启动子；和/或

所述癌症是肺癌并且所述一种或多种基因启动子包括选自CD01、SOX17、TAC1和HOXA7的一种、两种、三种或全部基因的启动子；和/或

所述癌症是脑癌并且所述一种或多种基因启动子包括MGMT的启动子。

120. 一种将DNA中的胞嘧啶残基转化为尿嘧啶，同时使5-甲基胞嘧啶残基基本上不受影响的方法，所述方法包括：

使包含DNA的样品与DABSO接触以转化所述DNA；和

使转化的DNA脱磺酸基以产生DNA，其中胞嘧啶残基被转化为尿嘧啶，但是5-甲基胞嘧啶残基基本上不受影响。

121. 权利要求120的方法，其中

所述接触包括加热DABSO/DNA溶液至温度范围从约55℃至约90℃；和/或

使所述DABSO与DNA反应，持续约15分钟至最高达约90分钟。

122. 一种分析DNA甲基化的方法，所述方法包括：

提供DNA样品；

根据权利要求120-121中任一项的方法转化所述样品中的DNA；和

对转化的核酸进行甲基化特异性PCR和/或核酸测序和/或高分辨率熔解分析 (HRM) 以测定所述核酸的甲基化。

123. 权利要求122的方法，其中所述提供DNA样品包括根据权利要求101-104中任一项或根据权利要求110-114中任一项来制备样品。

124. 用于检测DNA甲基化状态的试剂盒，所述试剂盒包括：

包含转化试剂的容器，所述转化试剂包括DABSO；和

包含脱磺酸基试剂的容器。

125. 权利要求124的试剂盒，其中所述试剂盒包括：

含有亲和基质的柱；和/或

含有结合缓冲液的容器；和/或

含有洗脱缓冲液的容器；和/或

含有洗涤缓冲液的容器；和/或

含有权利要求87-89中任一项的裂解溶液的容器；和/或

含有权利要求90-92中任一项的裂解溶液的容器。

126. 权利要求124-125中任一项的试剂盒，其中所述试剂盒包括：

权利要求74-78中任一项的盒；和/或

权利要求78-84中任一项的盒。

127. 用于使用巢式PCR反应来测定MGMT甲基化，任选地测定作为对照的ACTB的甲基化的一组引物和探针，所述组包括以下引物和探针：

外正向引物，其包含核苷酸序列：GTTTT (T*) AGAAYG (T*) TTTGYGTTT (SEQ ID NO:263)；

外反向引物，其包含核苷酸序列：AAAAAC (T*) CCRCCTCTTCC (SEQ ID NO:265)；

内正向引物，其包含核苷酸序列：TTTCGACGTTTCGTAGGTTTTTCGC (SEQ ID NO:266)；

内反向引物，其包含核苷酸序列：GCACTCTCCGAAAACGAAACG (SEQ ID NO:267)；和

探针,其包含核苷酸序列:荧光团-CCAAACAC (T*) CACCAAATC (N*) CAAAC-阻断剂 (SEQ ID NO:268);以及

任选地还包括以下用于检测ACTB甲基化的引物和探针:

外正向引物 (102),其包含核苷酸序列:GTGATGGAGGAGGTTTAGTAAGTT (SEQ ID NO:103);

外反向引物 (103),其包含核苷酸序列:CCAATAAAACCTACTCCTCCCTTAA (SEQ ID NO:104);

内正向引物 (148),其包含核苷酸序列:GGTTTAGTAAGTTTTTTGGATTGTG (SEQ ID NO:149);

内反向引物 (149),其包含核苷酸序列:CCTTAAAAATTACAAAAACCACAAC (SEQ ID NO:150);和

探针 (178),其包含核苷酸序列:荧光团-CCACCACCCAACACA (N*) CAA (T*) AACAAACAC-阻断剂 (SEQ ID NO:179)。

128.一种使用甲基化特异性PCR来测定MGMT甲基化的方法,所述方法包括:

提供转化的 (例如亚硫酸氢盐转化的) DNA,其包含MGMT基因的启动子区;

使用巢式PCR反应进行针对MGMT甲基化的甲基化特异性PCR,其包括以下引物和探针:

外正向引物,其包含核苷酸序列:GTTTT (T*) AGAAYG (T*) TTTGYGTTT (SEQ ID NO:263);

外反向引物,其包含核苷酸序列:AAAAAC (T*) CCRCACCTCTCC (SEQ ID NO:265);

内正向引物,其包含核苷酸序列:TTTCGACGTTTCGTAGGTTTTTCGC (SEQ ID NO:266);

内反向引物,其包含核苷酸序列:GCACTCTTCCGAAAACGAAACG (SEQ ID NO:267);和

探针,其包含核苷酸序列:荧光团-CCAAACAC (T*) CACCAAATC (N*) CAAAC-阻断剂 (SEQ ID NO:268);以及

检测和/或定量PCR扩增产物以提供测定所述MGMT基因的甲基化;以及

任选地提供转化的 (例如亚硫酸氢盐转化的) DNA,其包含ACTB基因 (例如作为对照) 的启动子区;

使用巢式PCR反应进行针对ACTB甲基化的甲基化特异性PCR,其包括以下引物和探针:

外正向引物,其包含核苷酸序列:GTGATGGAGGAGGTTTAGTAAGTT (SEQ ID NO:103);

外反向引物,其包含核苷酸序列:CCAATAAAACCTACTCCTCCCTTAA (SEQ ID NO:104);

内正向引物,其包含核苷酸序列:GGTTTAGTAAGTTTTTTGGATTGTG (SEQ ID NO:149);

内反向引物,其包含核苷酸序列:CCTTAAAAATTACAAAAACCACAAC (SEQ ID NO:150);和

探针,其包含核苷酸序列:荧光团-CCACCACCCAACACA (N*) CAA (T*) AACAAACAC-阻断剂 (SEQ ID NO:179);以及

检测和/或定量PCR扩增产物以提供测定所述ACTB基因的甲基化。

在自动化反应盒中DNA甲基化的整合的纯化和测量以及突变 和/或mRNA表达水平的共同测量

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2015年6月15日提交的USSN 62/175,916的优先权和权益,为了所有目的以引用的方式将USSN 62/175,916全文纳入本文。

[0003] 政府支持的声明

[0004] [不适用]

背景技术

[0005] 高等真核生物的基因组包含经修饰的5-甲基胞嘧啶核苷(5-meC)。该修饰通常作为二核苷CpG的部分存在,在二核苷CpG中,胞嘧啶在反应中被转化为5-甲基胞嘧啶,所述反应涉及将靶胞嘧啶翻转到完整的双螺旋之外并通过甲基转移酶从S-腺苷甲硫氨酸转移甲基(参见,例如Klimasauskas等人(1994) *Cell* 76:357-369)。这种酶促转化是已知存在于脊椎动物中的主要的DNA表观遗传修饰并且对于正常胚胎发育而言是必需的(参见,例如Bird(1992) *Cell* 70:5-8;Laird和Jaenisch(1994) *Human Mol. Genet.* 3:1487-1495;以及Li等人(1992) *Cell* 69:915-926)。

[0006] 在真核细胞中,DNA甲基化调节正常的细胞进程,例如基因组印迹、染色体不稳定性 and X染色体失活。通常,DNA甲基化发生在基因启动子中或邻近基因启动子的双核苷酸5'-CpG-3' 位点(称为CpG岛或岸)处胞嘧啶的第五位碳上。甲基化通过下调转录(通过直接抑制转录机制或间接通过招募染色质重塑蛋白)来控制基因表达。染色体甲基化模式在胚胎发育期间发生动态变化,正确的甲基化模式必须始终在个体的终生保持。甲基化模式的变化与衰老有关,DNA甲基化中的错误是肿瘤形成过程中发生的最早的变化之一。因此,基因启动子上甲基化的检测是重要的,尤其是对于诊断和/或监测癌症患者而言。

[0007] 表观遗传改变(包括DNA甲基化)中断了DNA-RNA-蛋白质轴(axis),其描述了遗传信息如何转录为信使RNA(mRNA)。基因组DNA变异、mRNA拷贝数和蛋白质水平之间的相关性可通过DNA甲基化水平来描述。因此,DNA甲基化水平和对应的下游mRNA水平的共同测量对于理解表观遗传细胞调节的机制而言是重要的。

[0008] 已开发了若干方法来有效且准确地检测和定量甲基化。最常用的技术是亚硫酸氢盐转化法,其将未甲基化的胞嘧啶转化为尿嘧啶。一旦被转化,可通过标准PCR技术、测序法等来确定DNA甲基化特征(profile)。

[0009] 存在若干适于亚硫酸氢盐转化和DNA清除的DNA甲基化试剂盒(例如来自Zymo Research的EZ DNA Methylation™试剂盒)。大多数试剂盒包括若干步骤、试剂和孵育次数,并且通常需要在转化前纯化DNA,尽管一些试剂盒可利用组织或血浆/血清作为起始材料。

[0010] 通常,亚硫酸氢盐转化方法需要至少4个步骤:1) DNA变性;2) 亚硫酸氢盐孵育;3) DNA纯化;和4) 脱磺酸基。最后的脱磺酸基步骤可在柱上或溶液中完成,然后进行乙醇沉淀。目前没有甲基化试剂盒允许使用者一步完成全部过程——DNA纯化、亚硫酸氢盐孵育、脱磺酸基、第二次DNA纯化和甲基化特异性PCR。

发明内容

[0011] 本文包括的各实施方案可包括但无需限于以下实施方案中的一种或多种：

[0012] 本文包括的各实施方案可包括但无需限于以下实施方案中的一种或多种：

[0013] 实施方案1：测定核酸的甲基化状态的方法，所述方法包括：

[0014] i) 使包含核酸的生物样品与包含第一柱或滤器的第一基质材料接触，所述基质材料在第一柱或滤器处结合和/或过滤所述样品中的核酸，从而纯化DNA。

[0015] ii) 从所述第一基质材料上洗脱结合的DNA并使DNA变性以产生洗脱的变性DNA；

[0016] iii) 在亚硫酸氢盐试剂的存在下加热洗脱的DNA以产生脱氨基的核酸；

[0017] iv) 使所述脱氨基的核酸与包含第二柱的第二基质材料接触以使所述脱氨基的核酸与所述第二基质材料结合；

[0018] v) 将结合的脱氨基的核酸脱磺酸基和/或通过将脱氨基的核酸与碱性溶液接触来将核酸同时洗脱和脱磺酸基以产生转化的（例如亚硫酸氢盐转化的）核酸；

[0019] vi) 从所述第二基质材料上洗脱所述亚硫酸氢盐转化的核酸；和

[0020] vii) 在所述转化的核酸上进行甲基化特异性PCR和/或核酸测序和/或高分辨率熔解分析 (HRM) 以测定所述核酸的甲基化，其中至少步骤iv) 至vi) 在单个反应盒中进行。

[0021] 实施方案2：实施方案1的方法，其中至少步骤iv) 至vi) 在单个反应盒中进行。

[0022] 实施方案3：实施方案1的方法，其中至少步骤iii) 至vi) 在单个反应盒中进行。

[0023] 实施方案4：实施方案1的方法，其中至少步骤ii) 至vi) 在单个反应盒中进行。

[0024] 实施方案5：实施方案1的方法，其中至少步骤i) 至vi) 在单个反应盒中进行。

[0025] 实施方案6：实施方案1-5中任一项的方法，其中步骤vii) 在相同的反应盒中进行。

[0026] 实施方案7：实施方案1-6中任一项的方法，其中所述第一基质材料和所述第二基质材料是形成相同柱的相同材料。

[0027] 实施方案8：实施方案1-7中任一项的方法，其中所述第一基质材料和所述第二基质材料形成不同的柱。

[0028] 实施方案9：实施方案1-8中任一项的方法，其中当进行所述甲基化特异性PCR时，是在所述盒中进行。

[0029] 实施方案10：实施方案1-9中任一项的方法，其中当进行所述核酸测序时，是在所述盒中或在与所述盒偶联的装置中进行。

[0030] 实施方案11：实施方案1-10中任一项的方法，其中所述盒包括含有所述第一基质材料的柱、样品接收室、温度控制的通道或室、多个包含试剂和/或缓冲液的室，并且在使用时所述室中至少一个包含脱磺酸基/洗脱缓冲液，并且其中所述盒任选地包括含有所述第二基质材料的第二柱。

[0031] 实施方案12：实施方案11的方法，其中在使用时所述室中至少一个包含提供亚硫酸氢盐离子的试剂。

[0032] 实施方案13：实施方案11-12中任一项的方法，其中所述第二柱不存在。

[0033] 实施方案14：实施方案11-13中任一项的方法，其中所述第二柱存在。

[0034] 实施方案15：实施方案11-14中任一项的方法，其中所述盒除所述温度控制的通道或室以外还包括热循环通道或室。

[0035] 实施方案16:实施方案11-14中任一项的方法,其中所述温度控制的通道或室是热循环通道或室。

[0036] 实施方案17:实施方案11-16中任一项的方法,其中所述盒包括含有一种或多种试剂的一个或多个室,所述试剂选自甲基化特异性PCR引物、甲基化特异性PCR探针、PCR酶和PCR反应缓冲液。

[0037] 实施方案18:实施方案17的方法,其中所述盒包括含有一种或多种引物和探针的一个或多个室,所述引物和探针用于检测亚硫酸氢盐转化的DNA的正向链的甲基化。

[0038] 实施方案19:实施方案17-18中任一项的方法,其中所述盒包括含有一种或多种引物和探针的一个或多个室,所述引物和探针用于检测亚硫酸氢盐转化的DNA的反向链的甲基化。

[0039] 实施方案20:实施方案11-19中任一项的方法,其中所述样品接收室、所述柱、所述多个室、和当存在时,所述温度控制的通道或室和/或热循环通道或室,选择性地处于流体连通中。

[0040] 实施方案21:实施方案20的方法,其中所述样品接收室、所述柱、所述多个室、和当存在时,所述热循环通道或室,通过微流体通道和阀选择性地处于流体连通中。

[0041] 实施方案22:实施方案20的方法,其中所述样品接收室、所述柱、所述多个室、和当存在时,所述热循环通道或室或进入所述热循环通道或室的端口(port),排列在中央阀的周围并且选择性地处于与所述中央阀中的通道的流体连通中,其中配置所述中央阀以适应柱塞,所述柱塞能够将流体引入或引出与所述中央阀处于流体连通的室。

[0042] 实施方案23:实施方案11-22中任一项的方法,其中所述盒在使用时包括:

[0043] 包含样品的第一室;

[0044] 包含硫氰酸胍-乙醇(GTC-EtOH)溶液的第二室;

[0045] 包含亚硫酸氢盐试剂的第三室;

[0046] 包含缓冲液的第四室;

[0047] 包含冲洗溶液的第五室;和

[0048] 包含洗脱/脱磺酸基试剂的第六室。

[0049] 实施方案24:实施方案23的方法,其中所述第一室包含GTC-EtOH-Tween萃取/沉淀试剂中的所述样品。

[0050] 实施方案25:实施方案23-24中任一项的方法,其中在将所述样品放置在盒中时或接近将所述样品放置在盒中时添加GTC-ETOH-Tween缓冲液。

[0051] 实施方案26:实施方案23-25中任一项的方法,其中在将所述样品放置在盒中时或接近将所述样品放置在盒中时添加亚硫酸氢盐试剂。

[0052] 实施方案27:实施方案23的方法,其中将GTC-ETOH-Tween缓冲液作为所述盒的组分提供。

[0053] 实施方案28:实施方案23-25中任一项的方法,其中将亚硫酸氢盐试剂作为所述盒的组分提供。

[0054] 实施方案29:实施方案11-28中任一项的方法,其中所述盒包括含有PCR引物和/或探针和/或PCR酶的第七室。

[0055] 实施方案30:实施方案11-29中任一项的方法,其中所述盒包括也含有PCR引物和/

或探针和/或PCR酶的第八室。

[0056] 实施方案31:实施方案29-30的方法,其中将所述PCR引物和/或探针和/或酶作为珠提供。

[0057] 实施方案32:实施方案1-31中任一项的方法,其中所述生物样品包括一种或多种选自以下的样品:细胞、组织和含有核酸的生物液体。

[0058] 实施方案33:实施方案32的方法,其中所述生物样品包括选自全血液、血浆、血清、唾液、粘液、尿、痰、胰液和脑脊髓液的生物液体。

[0059] 实施方案34:实施方案32的方法,其中所述生物样品包括选自以下的样品:组织样品、福尔马林固定石蜡包埋的(FFPE)组织、新鲜冷冻组织、细针抽吸物(FNA)和组织芯活检。

[0060] 实施方案35:实施方案1-34中任一项的方法,其中所述方法包括使所述生物样品与裂解溶液接触。

[0061] 实施方案36:实施方案35的方法,其中所述方法包括在所述样品接收室中提供所述样品并使所述样品与萃取/沉淀溶液接触。

[0062] 实施方案37:实施方案1-36中任一项的方法,其中所述基质材料包括选自玻璃或二氧化硅、离子交换树脂、纤维素和羟基磷灰石的柱材料。

[0063] 实施方案38:实施方案37的方法,其中所述基质材料包括玻璃。

[0064] 实施方案39:实施方案1-38中任一项的方法,其中所述亚硫酸氢盐离子被提供为选自亚硫酸氢铵、偏亚硫酸氢钠、亚硫酸氢钾、亚硫酸氢铯和DABSO的化合物。

[0065] 实施方案40:实施方案39的方法,其中所述亚硫酸氢盐离子由亚硫酸氢铵提供。

[0066] 实施方案41:实施方案1-40中任一项的方法,其中所述亚硫酸氢盐在试剂混合物中提供,所述试剂混合物包括防止亚硫酸盐氧化的清除剂和/或催化剂。

[0067] 实施方案42:实施方案41的方法,其中所述亚硫酸氢盐在试剂混合物中提供,所述试剂混合物包括选自Trolox和氢醌的清除剂。

[0068] 实施方案43:实施方案41-42中任一项的方法,其中所述亚硫酸氢盐在试剂混合物中提供,所述试剂混合物包括作为催化剂的聚胺。

[0069] 实施方案44:实施方案1-43中任一项的方法,其中所述洗脱结合的DNA包括使用低浓度的氢氧化钾或其他碱洗脱并使所述DNA变性。

[0070] 实施方案45:实施方案44的方法,其中所述洗脱结合的DNA包括使用pH大于约pH 10.5的碱性溶液来洗脱并使所述DNA变性。

[0071] 实施方案46:实施方案44的方法,其中所述洗脱结合的DNA包括使用pH大于约pH 12的碱性溶液来洗脱并使所述DNA变性。

[0072] 实施方案47:实施方案45-46的方法,其中所述碱性溶液是10-15mMKOH溶液。

[0073] 实施方案48:实施方案1-47中任一项的方法,其中所述用亚硫酸氢盐离子孵育洗脱的DNA以产生脱氨基的核酸包括在浓度范围从约6M至约7M的亚硫酸氢铵溶液中孵育DNA。

[0074] 实施方案49:实施方案48的方法,其中所述用亚硫酸氢盐离子孵育洗脱的DNA以产生脱氨基的核酸包括在浓度约6.5M的亚硫酸氢铵溶液中孵育DNA。

[0075] 实施方案50:实施方案49的方法,其中所述孵育包括将浓缩的亚硫酸氢盐溶液中的DNA转移到所述盒中的温度控制的通道或室并加热所述混合物。

[0076] 实施方案51:实施方案50的方法,其中所述孵育包括从温度约60°C至约95°C热循

环浓缩的亚硫酸氢盐溶液。

[0077] 实施方案52:实施方案1-51中任一项的方法,其中所述使所述脱氨基的核酸与第二基质材料接触包括将DNA-亚硫酸氢盐溶液与新鲜的GTC-EtOH混合并将所述溶液分配到所述第二基质材料上。

[0078] 实施方案53:实施方案52的方法,其中所述方法包括用新鲜的GTC-EtOH、然后用冲洗溶液来洗涤所述第二基质材料中的DNA。

[0079] 实施方案54:实施方案53的方法,其中所述冲洗溶液包括PEG200。

[0080] 实施方案55:实施方案1-54中任一项的方法,其中所述将结合的脱氨基的核酸脱磺酸基包括使用高pH脱磺酸基缓冲液从所述第二柱洗脱DNA和孵育所述溶液。

[0081] 实施方案56:实施方案55的方法,其中所述孵育持续时间范围为约1分钟至约1小时,或约5分钟至约30分钟,或约10分钟至约20分钟,或约15分钟。

[0082] 实施方案57:实施方案55-56的方法,其中所述高pH脱磺酸基/洗脱缓冲液包括KOH。

[0083] 实施方案58:实施方案55-57中任一项的方法,其中所述孵育是在之前盛放所述高pH脱磺酸基缓冲液的室(例如室10)中。

[0084] 实施方案59:实施方案1-58中任一项的方法,其中在用亚硫酸氢盐离子孵育之后,用缓冲液洗涤温度控制的通道或室以除去残余的亚硫酸氢盐并中和pH。

[0085] 实施方案60:实施方案1-59中任一项的方法,其中对所述亚硫酸氢盐转化的核酸进行高分辨率熔解分析(HRM)以测定所述核酸的甲基化。

[0086] 实施方案61:实施方案1-60中任一项的方法,其中进行所述亚硫酸氢盐转化的核酸的核酸测序以测定所述核酸的甲基化。

[0087] 实施方案62:实施方案1-60中任一项的方法,其中进行甲基化特异性PCR以测定靶核酸序列的甲基化。

[0088] 实施方案63:实施方案62的方法,其中使用特异性针对甲基化序列的引物和/或特异性针对未甲基化序列的引物进行所述甲基化特异性PCR(MSP)。

[0089] 实施方案64:实施方案62的方法,其中所述甲基化特异性PCR包括MethyLight方案。

[0090] 实施方案65:实施方案62的方法,其中使用特异性针对亚硫酸氢盐转化的甲基化序列和/或未甲基化序列的引物来进行TaqMan PCR反应。

[0091] 实施方案66:实施方案62-65中任一项的方法,其中所述MSP使用一种或多种为扩增的甲基化序列的标记物的荧光探针和/或一种或多种为扩增的未甲基化的序列的标记物的荧光探针。

[0092] 实施方案67:实施方案66的方法,其中所述荧光探针包括荧光报告染料和淬灭剂染料,其中所述探针在经Taq DNA聚合酶的5'至3'核酸酶活性裂解时提供信号。

[0093] 实施方案68:实施方案66-67中任一项的方法,其中通过分别特异性针对目的扩增区域中不同的甲基化区域的多个探针的组合信号来确定甲基化信号。

[0094] 实施方案69:实施方案66-67中任一项的方法,其中通过特异性针对目的扩增区域中相同甲基化区域的多个探针来确定甲基化信号。

[0095] 实施方案70:实施方案66-67中任一项的方法,其中所述多个探针包括2、3、4、5、6、

7、8、9、10或更多个探针。

[0096] 实施方案71:实施方案66-67中任一项的方法,其中通过目的扩增区域中的单一探针来确定甲基化信号。

[0097] 实施方案72:实施方案66-71中任一项的方法,其中所述探针以单路或多路运行。

[0098] 实施方案73:实施方案66-71中任一项的方法,其中所述探针以多路形式运行。

[0099] 实施方案74:实施方案66-73中任一项的方法,其中所述探针作为巢式PCR反应运行。

[0100] 实施方案75:实施方案66-74中任一项的方法,其中所述PCR反应包括亚硫酸氢盐污染对照探针,如果反应中存在亚硫酸氢盐,则在PCR过程中该探针经历亚硫酸氢盐介导的裂解。

[0101] 实施方案76:实施方案1-75中任一项的方法,其中针对一种或多种突变基因进行PCR。

[0102] 实施方案77:实施方案1-76中任一项的方法,其中针对作为对照的未转化的DNA,进行PCR。

[0103] 实施方案78:实施方案1-77中任一项的方法,其中针对作为对照的转化的DNA,进行PCR。

[0104] 实施方案79:实施方案77的方法,其中针对未转化的DNA进行PCR,其中所述未转化的DNA是所述方法的靶标。

[0105] 实施方案80:实施方案1-79中任一项的方法,其中亚硫酸氢盐反应和PCR反应、或脱磺酸基反应和PCR反应,或亚硫酸氢盐反应、脱磺酸基反应和PCR反应全部在相同的反应管或室中进行。

[0106] 实施方案81:实施方案1-80中任一项的方法,其中所述使包含核酸的生物样品与第一基质材料接触包括使含有RNA的样品与所述第一基质材料接触,其中所述基质材料结合所述RNA,从而纯化所述RNA。

[0107] 实施方案82:实施方案81的方法,其中所述方法包括从所述基质材料上洗脱所述RNA,基本上独立于DNA。

[0108] 实施方案83:实施方案82的方法,其中使用Tris缓冲液洗脱从所述第一基质材料上洗脱RNA。

[0109] 实施方案84:权利要求81-83中任一项的方法,其中所述RNA被洗脱并贮存在室中。

[0110] 实施方案85:实施方案81-84中任一项的方法,其中在所述RNA上进行逆转录(RT)并进行qRT-PCR以测定靶RNA序列的水平。

[0111] 实施方案86:实施方案82-85中任一项的方法,其中所述RNA部分用于从所述第二基质材料上洗脱亚硫酸氢盐转化的核酸并与亚硫酸氢盐转化的DNA混合,或与被洗脱的亚硫酸氢盐转化的DNA混合。

[0112] 实施方案87:实施方案86的方法,其中所述RNA在与亚硫酸氢盐转化的DNA结合之前或之后进行RT。

[0113] 实施方案88:实施方案86-87中任一项的方法,其中针对混合物中的RT RNA进行qRT-PCR以测定靶RNA序列的水平,并对所述混合物进行甲基化特异性PCR以测定靶DNA序列的甲基化。

[0114] 实施方案89:实施方案1-88中任一项的方法,其中测定选自以下的基因的启动子区的甲基化:MGMT、RASSF1A、ADAMTS1、BNC1、HIST1H3C、HOXB4、RASGRF2、TM6SF1和AKR1B1。

[0115] 实施方案90:实施方案81-89中任一项的方法,其中测定甲基转移酶的RNA表达水平。

[0116] 实施方案91:实施方案90的方法,其中测定选自DNMT1、DNMT2、DNMT3A、DNMT3B和DNMT3L的甲基转移酶的RNA表达水平。

[0117] 实施方案92:用于测定核酸的甲基化状态的盒,所述盒包括:包含第一基质材料的柱、样品接收室、温度控制的通道或室、多个包含试剂和/或缓冲液的室,在使用时至少一个所述室包含亚硫酸氢盐试剂,并且至少一个所述室包含脱磺酸基/洗脱缓冲液,并且其中所述盒任选地包括含有所述第二基质材料的第二柱。

[0118] 实施方案93:实施方案92的盒,其中所述盒在使用时包括含有试剂的室,所述试剂包含硫氰酸胍乙醇(GTC-EtOH)。

[0119] 实施方案94:实施方案92-93中任一项的盒,其中不存在所述第二柱。

[0120] 实施方案95:实施方案92-93中任一项的盒,其中存在所述第二柱。

[0121] 实施方案96:实施方案92-95中任一项的盒,其中所述温度控制的通道或室是热循环通道或室。

[0122] 实施方案97:实施方案92-96中任一项的盒,其中所述盒还包括第二加热通道或室。

[0123] 实施方案98:实施方案92-97中任一项的盒,其中所述亚硫酸氢盐试剂包括选自亚硫酸氢铵、偏亚硫酸氢钠、亚硫酸氢钾、亚硫酸氢铯和DABSO的化合物。

[0124] 实施方案99:实施方案98的盒,其中所述亚硫酸氢盐试剂包括亚硫酸氢铵。

[0125] 实施方案100:实施方案92-99中任一项的盒,其中所述亚硫酸氢盐在试剂混合物中提供,所述试剂混合物包括防止亚硫酸盐氧化的清除剂和/或催化剂。

[0126] 实施方案101:实施方案100的盒,其中所述亚硫酸氢盐在试剂混合物中提供,所述试剂混合物包括选自Trolox和氢醌的清除剂。

[0127] 实施方案102:实施方案100-101中任一项的和,其中所述亚硫酸氢盐在试剂混合物中提供,所述试剂混合物包括作为催化剂的聚胺。

[0128] 实施方案103:实施方案92-102中任一项的盒,其中当存在所述第一基质材料和/或所述第二基质材料时,所述第一基质材料和/或所述第二基质材料包括选自玻璃或二氧化硅、离子交换树脂和羟基磷灰石的材料。

[0129] 实施方案104:实施方案92-103中任一项的盒,其中所述盒包括一个或多个含有一种或多种试剂的室,所述试剂选自甲基化特异性PCR引物、甲基化特异性PCR探针、PCR酶和PCR反应缓冲液。

[0130] 实施方案105:实施方案104的盒,其中所述盒包含至少两个室,所述室包含一种或多种选自甲基化特异性PCR引物、甲基化特异性PCR探针、PCR酶和PCR反应缓冲液的试剂。

[0131] 实施方案106:实施方案92-105中任一项的盒,其中所述盒包含至少一个室,所述室包含用于检测转化的DNA的正向链的甲基化的引物和探针。

[0132] 实施方案107:实施方案92-106中任一项的盒,其中所述盒包含至少一个室,所述室包含用于检测转化的DNA的反向链的甲基化的引物和探针。

[0133] 实施方案108:实施方案104-107中任一项的盒,其中所述PCR引物和/或探针和/或酶作为珠提供。

[0134] 实施方案109:实施方案92-108中任一项的盒,其中所述样品接收室、所述柱、所述多个室以及所述温度控制的加热通道或室选择性地处于流体连通中。

[0135] 实施方案110:实施方案109的盒,其中所述样品接收室、所述柱、所述多个室,以及所述温度控制的通道或室通过微流体通道和阀选择性地处于流体连通中。

[0136] 实施方案111:实施方案109的盒,其中所述样品接收室、所述柱、所述多个室,以及所述温度控制的通道或室或进入所述温度控制的通道或室的端口排列在中央阀的周围并且选择性地处于与所述中央阀中的通道的流体连通中,其中配置所述中央阀以适应柱塞,所述柱塞能够将流体引入或引出与所述中央阀处于流体连通的室。

[0137] 实施方案112:实施方案92-111中任一项的盒,其中配置所述盒从而在使用时所述盒包括:

[0138] 包含样品的第一室;

[0139] 包含硫氰酸胍-乙醇(GTC-EtOH)溶液的第二室;

[0140] 包含亚硫酸氢盐试剂的第三室;

[0141] 包含缓冲液的第四室;

[0142] 包含冲洗溶液的第五室;和

[0143] 包含洗脱/脱磺酸基试剂的第六室。

[0144] 实施方案113:实施方案112的盒,其中所述第一室包含GTC-EtOH-Tween萃取/沉淀试剂中的所述样品。

[0145] 实施方案114:实施方案92-113中任一项的盒,其中在将所述样品放置在盒中时或接近将所述样品放置在盒中时配置所述盒以用于待被添加至所述盒的亚硫酸氢盐试剂。

[0146] 实施方案115:实施方案92-113中任一项的盒,其中将亚硫酸氢盐试剂作为所述盒的组分提供。

[0147] 实施方案116:实施方案92-115中任一项的盒,其中在将所述样品放置在盒中时或接近将所述样品放置在盒中时配置所述盒以用于添加GTC-ETOH-Tween缓冲液。

[0148] 实施方案117:实施方案92-115中任一项的盒,其中将GTC-ETOH-Tween缓冲液作为所述盒的组分提供。

[0149] 实施方案118:实施方案92-117中任一项的盒,其中所述盒包括含有PCR引物和/或探针和/或PCR酶的第七室。

[0150] 实施方案119:实施方案92-118中任一项的盒,其中所述盒包括也含有PCR引物和/或探针和/或PCR酶的第八室。

[0151] 实施方案120:实施方案92-119中任一项的盒,其中所述盒包括一个或多个室,所述室包含特异性针对亚硫酸氢盐转化的甲基化和/或未甲基化序列的引物。

[0152] 实施方案121:实施方案92-120中任一项的盒,其中所述盒包括一个或多个含有TaqMan PCR反应试剂的室。

[0153] 实施方案122:实施方案92-121中任一项的盒,其中所述盒包括一个或多个室,其含有一种或多种为扩增的甲基化序列标记物的荧光探针和/或一种或多种为扩增的未甲基化序列标记物的荧光探针。

[0154] 实施方案123:实施方案122的盒,其中所述探针包括荧光报告染料和淬灭剂染料,其中所述探针在经Taq DNA聚合酶的5'至3'核酸酶活性裂解时提供信号。

[0155] 实施方案124:实施方案122-123中任一项的盒,其中所述盒包括多个探针,所述探针分别特异性针对目的扩增区域中不同的甲基化区域。

[0156] 实施方案125:实施方案122-123中任一项的盒,其中所述盒包括特异性针对目的扩增区域中的甲基化区域的单一探针。

[0157] 实施方案126:实施方案122-123中任一项的盒,其中所述盒包括多个探针,所述探针分别特异性针对目的扩增区域中的相同甲基化区域。

[0158] 实施方案127:实施方案92-126中任一项的盒,其中所述盒包含引物和/或探针以测定选自以下的基因的启动子区的甲基化:MGMT、RASSF1A、ADAMTS1、BNC1、HIST1H3C、HOXB4、RASGRF2、TM6SF1和AKR1B1。

[0159] 实施方案128:实施方案92-126中任一项的盒,其中所述盒包含一种或多种表5、9或10中所示的引物和/或一种或多种表5、9或10中所示的探针。

[0160] 实施方案129:实施方案128的盒,其中所述盒包含以下用于使用巢式PCR反应来测定MGMT甲基化的探针和引物:

[0161] 外正向引物(248b),其包含核苷酸序列GTTTT (T*) AGAAYG (T*) TTTGYGTTT (SEQ ID NO:263);

[0162] 外反向引物(249b),其包含核苷酸序列:AAAAAC (T*) CCRCACTCTTCC (SEQ ID NO:265);

[0163] 内正向引物(250),其包含核苷酸序列TTTCGACGTTTCGTAGGTTTTTCGC (SEQ ID NO:266);

[0164] 内反向引物(251),其包含核苷酸序列GCACTCTTCCGAAAACGAAACG (SEQ ID NO:267);和

[0165] 探针(252a),其包含核苷酸序列:荧光团-CCAAACAC (T*) CACCAAATC (N*) CAAAC-阻断剂 (SEQ ID NO:268)。

[0166] 实施方案130:实施方案128-129中任一项的盒,其中所述盒包含以下用于使用巢式PCR反应来测定ACTB(例如,作为对照)甲基化的探针和引物:

[0167] 外正向引物(102),其包含核苷酸序列:GTGATGGAGGAGGTTTAGTAAGTT (SEQ ID NO:103);

[0168] 外反向引物(10),其包含核苷酸序列:CCAATAAAACCTACTCCTCCCTTAA (SEQ ID NO:104);

[0169] 内正向引物(148),其包含核苷酸序列:GGTTTAGTAAGTTTTTTGGATTGTG (SEQ ID NO:149);

[0170] 内反向引物(149),其包含核苷酸序列:CCTTAAAAATTACAAAAACCACAAC (SEQ ID NO:150);和

[0171] 探针(178),其包含核苷酸序列:荧光团-CCACCACCCAACACA (N*) CAA (T*) AACAAACAC-阻断剂 (SEQ ID NO:179)。

[0172] 实施方案131:实施方案92-130中任一项的盒,其中配置所述盒以用于测定甲基转移酶的RNA表达水平。

[0173] 实施方案132:实施方案131的盒,其中所述甲基转移酶选自DNMT1、DNMT2、DNMT3A、DNMT3B和DNMT3L。

[0174] 实施方案133:用于测定生物样品中核酸的甲基化的系统,所述系统包括:被配置以包含一个或多个样品处理模块的附件(enclosure),各样品处理模块被配置以容纳可移动的实施方案92-132中任一项的盒;其中所述系统被配置以操作所述样品处理模块进行样品处理,来测定一种或多种靶核酸的甲基化并任选地测定相应的可移动样品盒内一种或多种靶DNA序列的水平,其中所述对相应的可移动样品盒内的样品的处理实施实施方案1-91中任一项的方法。

[0175] 实施方案134:实施方案133的系统,其中所述系统被配置以包含一个样品处理模块。

[0176] 实施方案135:实施方案133的系统,其中所述系统被配置以包含至少两个样品处理模块,或至少4个样品处理模块,或至少8个样品处理模块,或至少12个样品处理模块,或至少16个样品处理模块,或至少20个样品处理模块,或至少24个样品处理模块,或至少28个样品处理模块,或至少32个样品处理模块,或至少64个样品处理模块,或至少128个样品处理模块。

[0177] 实施方案136:实施方案133-135中任一项的系统,其中所述模块包括一个或多个加热板以加热所述盒中温度控制的室或通道。

[0178] 实施方案137:实施方案133-136中任一项的系统,其中所述模块包括被配置来冷却所述盒中温度控制的通道或室的风扇。

[0179] 实施方案138:实施方案133-137中任一项的系统,其中所述模块包括电路以将信息(例如光学信息)传递到计算机,用于分析。

[0180] 实施方案139:实施方案133-138中任一项的系统,其中所述模块包括光学区块(block)以提供一种或多种所述盒中的反应产生的光学信号的激发和/或检测。

[0181] 实施方案140:实施方案133-139中任一项的系统,其中所述系统被配置以操作所述盒进行实施方案1-91中任一项的方法。

[0182] 实施方案141:实施方案133-139中任一项的系统,其中所述系统被配置以操作所述盒:将样品结合至柱;从所述柱洗脱DNA并用转化试剂结合所述DNA;在反应室或管中加热DNA/转化试剂溶液以产生转化的DNA;将转化的DNA结合至柱;从柱脱磷酸基并洗脱DNA;在反应室或管中对洗脱的脱磷酸基的DNA进行PCR。

[0183] 实施方案142:实施方案141的系统,其中所述PCR在相同的反应室或管中进行,在所述反应室或管中DNA/转化试剂溶液被事先加热。

[0184] 实施方案143:用于样品制备的盒,所述盒包括:包含结合DNA的亲和基质的管道或室,排列在中央阀组件的周围并且选择性地处于与所述中央阀组件的流体连通中的多个室,其中配置所述中央阀组件以适应柱塞,所述柱塞能够将流体引入或引出与所述中央阀处于流体连通的室,其中所述多个室包括:被配置以接收最高达约5mL或最高达约4mL的样品溶液;包含PEG的室;包含GTC-EtOH的室;包含碱性溶液的室;和包含缓冲液的室。

[0185] 实施方案144:实施方案143的盒,其中所述多个室还包括含有亚硫酸氢盐试剂的室。

[0186] 实施方案145:实施方案143-144中任一项的盒,其中所述多个室包括含有GTC-乙

醇洗涤溶液的室。

[0187] 实施方案146:实施方案145的盒,其中所述GTC-乙醇洗涤溶液包含1.25M硫氰酸胍、25mM Tris pH 7.0和50%乙醇。

[0188] 实施方案147:实施方案143-146中任一项的盒,其中所述PEG包括PEG200。

[0189] 实施方案148:实施方案143-147中任一项的盒,其中所述碱性溶液包括KOH。

[0190] 实施方案149:实施方案143-148中任一项的盒,其中所述缓冲液包括Tris。

[0191] 实施方案150:实施方案143-149中任一项的盒,其中所述多个室包括含有珠的室,所述珠包含一种或多种PCR引物和/或探针。

[0192] 实施方案151:实施方案143-150中任一项的盒,其中所述包含PEG的室包含约1mL PEG。

[0193] 实施方案152:实施方案143-151中任一项的盒,其中所述包含碱性溶液的所述室包含约500 μ L溶液。

[0194] 实施方案153:实施方案143-152中任一项的盒,其中所述包含GTC-EtOH的室包含约2mL GTC-EtOH。

[0195] 实施方案154:实施方案143-153中任一项的盒,其中所述包含缓冲液的室包含约2mL缓冲液。

[0196] 实施方案155:高容量样品制备(HVSP),所述盒包括:包含结合DNA的亲基质通道或室,排列在中央阀组件的周围并且选择性地处于与所述中央阀组件的流体连通中的多个室,其中配置所述中央阀组件以适应柱塞,所述柱塞能够将流体引入或引出与所述中央阀处于流体连通的室,其中所述多个室包括:至少两个不同的室,其分别被配置以接收最高达4.5mL样品溶液;包含PEG的室;包含碱性溶液的室;和包含缓冲液的室。

[0197] 实施方案156:实施方案155的盒,其中所述多个室包括至少三个不同的室,其分别被配置以接收最高达4mL样品溶液。

[0198] 实施方案157:实施方案155-156中任一项的盒,其中所述PEG包括PEG200。

[0199] 实施方案158:实施方案155-157中任一项的盒,其中所述碱性溶液包括KOH。

[0200] 实施方案159:实施方案155-158中任一项的盒,其中所述缓冲液包括Tris。

[0201] 实施方案160:实施方案155-159中任一项的盒,其中所述多个室包括含有洗涤溶液的室。

[0202] 实施方案161:实施方案160的室,其中所述洗涤溶液包括1.25M硫氰酸胍、25mM Tris pH 7.0和50%乙醇。

[0203] 实施方案162:实施方案155-161中任一项的盒,其中所述盒包括被配置以去除经处理的样品的室。

[0204] 实施方案163:实施方案155-162中任一项的盒,其中所述样品室在使用时包含样品溶液、GTC和异丙醇。

[0205] 实施方案164:实施方案163的盒,其中所述样品室在使用时包含基本上等体积的样品溶液、GTC和异丙醇。

[0206] 实施方案165:实施方案155-164中任一项的盒,其中所述盒在使用时包含4mL样品溶液,该样品溶液被设置在各经配置以接收样品的所述室中。

[0207] 实施方案166:实施方案155-165中任一项的盒,其中所述盒提供DNA或RNA回收,其

基本上相对于0.5mL至约4mL样品的样品体积呈线性关系。

[0208] 实施方案167:实施方案155-166中任一项的盒,其中所述盒包含或经配置以接收转化试剂。

[0209] 实施方案168:实施方案167的盒,其中所述盒在使用时进行DNA的亚硫酸盐转化。

[0210] 实施方案169:用于从血清或血浆制备DNA样品的裂解溶液,所述裂解溶液包括:GTC、缓冲液、洗涤剂 and 任选的消泡剂。

[0211] 实施方案170:实施方案169的裂解溶液,其中所述用于血清或血浆的裂解溶液包括GTC、Tris pH 7.0、Tween 20和消泡剂SE15。

[0212] 实施方案171:实施方案170的裂解溶液,其中所述用于血清或血浆的裂解溶液包括约4.5M GTC、约45mM Tris pH 7.0、约1% Tween20和约0.01%消泡剂SE15。

[0213] 实施方案172:用于从FFPE样品制备DNA样品的裂解溶液。

[0214] 实施方案173:实施方案172的裂解溶液,其中所述用于FFPE样品的裂解溶液包括缓冲液、洗涤剂、NaCl、MgCl₂、螯合剂、消泡剂SE15和叠氮化钠。

[0215] 实施方案174:实施方案173的裂解溶液,其中所述用于FFPE样品的裂解溶液包括约1% Tween20、约400mM NaCl、约25mM EDTA、约10mM MgCl₂、约50mM HEPES pH 7.2、约0.01%消泡剂SE15和约0.01%叠氮化钠。

[0216] 实施方案175:用于测定DNA甲基化的试剂盒,所述试剂盒包括:包含实施方案92-136中任一项的用于测定核酸甲基化状态的盒的容器。

[0217] 实施方案176:实施方案175的试剂盒,其中所述试剂盒还包括含有裂解溶液的容器。

[0218] 实施方案177:实施方案176的试剂盒,其中所述裂解溶液是实施方案169-171中任一项的用于血清或血浆的裂解溶液。

[0219] 实施方案178:实施方案176的试剂盒,其中所述裂解溶液是实施方案172-174中任一项的用于FFPE样品的裂解溶液。

[0220] 实施方案179:实施方案175-178中任一项的试剂盒,其中所述试剂盒包括含有蛋白酶K的容器。

[0221] 实施方案180:实施方案175-179中任一项的试剂盒,其中所述试剂盒包括所述盒中或与所述盒分开的容器中的转化试剂。

[0222] 实施方案181:实施方案180的试剂盒,其中所述试剂盒包括与所述盒分开的容器中的所述转化试剂。

[0223] 实施方案182:实施方案180的试剂盒,其中所述试剂盒包括在所述盒的室中提供的所述转化试剂。

[0224] 实施方案183:实施方案180-182中任一项的试剂盒,其中所述转化试剂包括选自偏亚硫酸氢钠、亚硫酸氢钾、亚硫酸氢铯、亚硫酸氢铵和DABSO的化合物。

[0225] 实施方案184:实施方案183的试剂盒,其中所述转化试剂包括亚硫酸氢铵。

[0226] 实施方案185:实施方案175-184中任一项的试剂盒,其中所述试剂盒包括含有样品处理试剂的容器。

[0227] 实施方案186:实施方案185的试剂盒,其中所述样品处理试剂包括硫氰酸胍。

[0228] 实施方案187:实施方案185-186中任一项的试剂盒,其中所述样品处理试剂包括

乙醇。

[0229] 实施方案188:实施方案175-187中任一项的试剂盒,其中所述试剂盒包括含有实施方案155-166中任一项的用于样品制备的盒的容器。

[0230] 实施方案189:实施方案175-188中任一项的试剂盒,其中所述试剂盒包含教导使用所述盒来测定DNA甲基化的指导材料。

[0231] 实施方案190:用于检测癌症的甲基化标记物的盒,所述盒包括:多个室和热循环通道或室,其中所述多个室和进入所述热循环通道或室的端口排列在中央阀组件的周围并且选择性地处于与所述中央阀组件的流体连通中,其中配置所述中央阀组件以适应柱塞,所述柱塞能够将流体引入或引出与所述中央阀处于流体连通的室或端口,其中所述多个室包括:样品接收室;包含或经配置以接收亚硫酸氢盐试剂的室;包含洗涤溶液的室;包含Tris缓冲液的室;包含碱性溶液的室,所述碱性溶液包括KOH;包含提供PCR主混合物的珠的室;和包含珠的室,所述珠提供PCR引物和探针以检测一种或多种基因启动子的甲基化,所述基因启动子的甲基化状态是癌症的标记物。

[0232] 实施方案191:实施方案190的盒,其中所述多个室包括被设置以接收废液的室。

[0233] 实施方案192:实施方案190-191中任一项的盒,其中所述亚硫酸氢盐试剂包括选自偏亚硫酸氢钠、亚硫酸氢钾、亚硫酸氢铯、亚硫酸氢铵和DABSO的化合物。

[0234] 实施方案193:实施方案192的盒,其中所述亚硫酸氢盐试剂包括亚硫酸氢铵。

[0235] 实施方案194:实施方案190-193中任一项的盒,其中所述洗涤溶液包括1.25M GTC、25mM Tris pH 7.0和50%乙醇。

[0236] 实施方案195:实施方案190-194中任一项的盒,其中包含提供PCR引物和探针以检测一种或多种基因启动子的甲基化的珠的所述室包含这样的珠,即其提供PCR引物和探针以检测一种或多种基因启动子的甲基化,所述基因启动子的甲基化状态是选自以下的癌症的标记物:乳腺癌、胰腺癌、前列腺癌、脑癌和肺癌。

[0237] 实施方案196:实施方案195的盒,其中包含提供PCR引物和探针以检测一种或多种基因启动子的甲基化的珠的所述室包含这样的珠,即其提供用于巢式PCR反应的PCR引物和探针。

[0238] 实施方案197:实施方案196的盒,其中所述巢式PCR包括特异性针对转化的DNA的第一PCR反应和特异性针对甲基化CpG的第二PCR反应。

[0239] 实施方案198:实施方案190-197中任一项的盒,其中包含提供PCR引物和探针的珠的所述室包含这样的珠,即其提供PCR引物和探针以检测转化的DNA的正向链的甲基化。

[0240] 实施方案199:实施方案190-198中任一项的盒,其中包含提供PCR引物和探针的珠的所述室包含这样的珠,即其提供PCR引物和探针以检测转化的DNA的反向链的甲基化。

[0241] 实施方案200:实施方案190-199中任一项的盒,其中包含提供PCR引物和探针以检测一种或多种基因启动子的甲基化的珠的所述室包含这样的珠,即其提供PCR引物和探针以检测一种或多种基因启动子的甲基化,所述基因选自RASSF1A、AKR1B1、HOXB4、HIST1H3C、RASGRF2、TM6SF1、BRCA1、BNC1、ADAMTS1、CD01、SOX17、TAC1、HOXA7和MGMT。

[0242] 实施方案201:实施方案190-200中任一项的盒,其中包含提供PCR引物和探针以检测一种或多种基因启动子的甲基化的珠的所述室包含这样的珠,即其提供PCR引物和探针以检测一种或多种基因启动子的甲基化,所述基因启动子的甲基化状态是胰腺癌的标记

物。

[0243] 实施方案202:实施方案201的盒,其中包含提供PCR引物和探针以检测一种或多种基因启动子的甲基化的珠的所述室包含这样的珠,即其提供PCR引物和探针以检测ADAMTS1和/或BNC1的启动子的甲基化。

[0244] 实施方案203:实施方案202的盒,其中包含提供PCR引物和探针以检测一种或多种基因启动子的甲基化的珠的所述室包含这样的珠,即其提供PCR引物和探针以检测ADAMTS1的启动子的甲基化。

[0245] 实施方案204:实施方案202-203中任一项的盒,其中包含提供PCR引物和探针以检测一种或多种基因启动子的甲基化的珠的所述室包含这样的珠,即其提供PCR引物和探针以检测BNC1的启动子的甲基化。

[0246] 实施方案205:实施方案202的盒,其中包含提供PCR引物和探针以检测一种或多种基因启动子的甲基化的珠的所述室包含这样的珠,即其提供表5或10中所示的用于ADAMTS1和/或BNC1的一种或多种PCR引物和/或探针。

[0247] 实施方案206:实施方案190-200中任一项的盒,其中包含提供PCR引物和探针以检测一种或多种基因启动子的甲基化的珠的所述室包含这样的珠,即其提供PCR引物和探针以检测一种或多种基因启动子的甲基化,所述基因启动子的甲基化状态是乳腺癌的标记物。

[0248] 实施方案207:实施方案206的盒,其中包含提供PCR引物和探针以检测一种或多种基因启动子的甲基化的珠的所述室包含这样的珠,即其提供PCR引物和探针以检测选自以下的一种、两种、三种、四种、五种或全部基因的启动子的甲基化:BRCA1、RASSF1A、AKR1B1、HOXB4、HIST1H3C、RASGRF2和TM6SF1。

[0249] 实施方案208:实施方案207的盒,其中包含提供PCR引物和探针以检测一种或多种基因启动子的甲基化的珠的所述室包含这样的珠,即其提供PCR引物和探针以检测BRCA1的启动子的甲基化。

[0250] 实施方案209:实施方案207-208中任一项的盒,其中包含提供PCR引物和探针以检测一种或多种基因启动子的甲基化的珠的所述室包含这样的珠,即其提供PCR引物和探针以检测RASSF1A的启动子的甲基化。

[0251] 实施方案210:实施方案207-209中任一项的盒,其中包含提供PCR引物和探针以检测一种或多种基因启动子的甲基化的珠的所述室包含这样的珠,即其提供PCR引物和探针以检测AKR1B1的启动子的甲基化。

[0252] 实施方案211:实施方案207-210中任一项的盒,其中包含提供PCR引物和探针以检测一种或多种基因启动子的甲基化的珠的所述室包含这样的珠,即其提供PCR引物和探针以检测HOXB4的启动子的甲基化。

[0253] 实施方案212:实施方案207-211中任一项的盒,其中包含提供PCR引物和探针以检测一种或多种基因启动子的甲基化的珠的所述室包含这样的珠,即其提供PCR引物和探针以检测HIST1H3C的启动子的甲基化。

[0254] 实施方案213:实施方案207-212中任一项的盒,其中包含提供PCR引物和探针以检测一种或多种基因启动子的甲基化的珠的所述室包含这样的珠,即其提供PCR引物和探针以检测RASGRF2的启动子的甲基化。

[0255] 实施方案214:实施方案207-213中任一项的盒,其中包含提供PCR引物和探针以检测一种或多种基因启动子的甲基化的珠的所述室包含这样的珠,即其提供PCR引物和探针以检测TM6SF1的启动子的甲基化。

[0256] 实施方案215:实施方案207-214中任一项的盒,其中包含提供PCR引物和探针以检测一种或多种基因启动子的甲基化的珠的所述室包含这样的珠,即其提供表5或9中所示的一种或多种PCR引物和/或一种或多种PCR探针。

[0257] 实施方案216:实施方案206的盒,其中包含提供PCR引物和探针以检测一种或多种基因启动子的甲基化的珠的所述室包含这样的珠,即其提供PCR引物和探针以检测BRCA1的启动子的甲基化。

[0258] 实施方案217:实施方案190-200中任一项的盒,其中包含提供PCR引物和探针以检测一种或多种基因启动子的甲基化的珠的所述室包含这样的珠,即其提供PCR引物和探针以检测一种或多种基因启动子的甲基化,所述基因启动子的甲基化状态是肺癌的标记物。

[0259] 实施方案218:实施方案217的盒,其中包含提供PCR引物和探针以检测一种或多种基因启动子的甲基化的珠的所述室包含这样的珠,即其提供PCR引物和探针以检测选自CD01、SOX17、TAC1和HOXA7的一种、两种、三种或全部基因的启动子的甲基化。

[0260] 实施方案219:实施方案218的盒,其中包含提供PCR引物和探针以检测一种或多种基因启动子的甲基化的珠的所述室包含这样的珠,即其提供PCR引物和探针以检测CD01的启动子的甲基化。

[0261] 实施方案220:实施方案218-219中任一项的盒,其中包含提供PCR引物和探针以检测一种或多种基因启动子的甲基化的珠的所述室包含这样的珠,即其提供PCR引物和探针以检测SOX17的启动子的甲基化。

[0262] 实施方案221:实施方案218-220中任一项的盒,其中包含提供PCR引物和探针以检测一种或多种基因启动子的甲基化的珠的所述室包含这样的珠,即其提供PCR引物和探针以检测TAC1的启动子的甲基化。

[0263] 实施方案222:实施方案218-221中任一项的盒,其中包含提供PCR引物和探针以检测一种或多种基因启动子的甲基化的珠的所述室包含这样的珠,即其提供PCR引物和探针以检测HOXA7的启动子的甲基化。

[0264] 实施方案223:实施方案190-200中任一项的盒,其中包含提供PCR引物和探针以检测一种或多种基因启动子的甲基化的珠的所述室包含这样的珠,即其提供PCR引物和探针以检测一种或多种基因启动子的甲基化,所述基因启动子的甲基化状态是脑癌的标记物。

[0265] 实施方案224:实施方案223中任一项的盒,其中包含提供PCR引物和探针以检测一种或多种基因启动子的甲基化的珠的所述室包含这样的珠,即其提供PCR引物和探针以检测MGMT的启动子的甲基化。

[0266] 实施方案225:实施方案224的盒,其中包含提供PCR引物和探针以检测一种或多种基因启动子的甲基化的珠的所述室包含这样的珠,即其提供表5或10中所示的MGMT的一种或多种PCR引物和/或探针。

[0267] 实施方案226:实施方案225的盒,其中所述盒包含以下探针和引物,用于使用巢式PCR反应来测定MGMT的甲基化:

[0268] 外正向引物(248b),其包含核苷酸序列:GTTTT (T*) AGAAYG (T*) TTTGYGTTT (SEQ ID

NO:263) ;

[0269] 外反向引物 (249b) ,其包含核苷酸序列:AAAAAAC (T*) CCRCACTCTTCC (SEQ ID NO: 265) ;

[0270] 内正向引物 (250) ,其包含核苷酸序列:TTTCGACGTTCTGTAGGTTTTCGC (SEQ ID NO: 266) ;

[0271] 内反向引物 (251) ,其包含核苷酸序列:GCACTCTTCCGAAAACGAAACG (SEQ ID NO: 267) ;和

[0272] 探针 (252a) ,其包含核苷酸序列:荧光团-CCAAACAC (T*) CACCAAATC (N*) CAAAC-阻断剂 (SEQ ID NO:268) 。

[0273] 实施方案227:实施方案225-226中任一项的盒,其中所述盒包含以下探针和引物,用于使用巢式PCR反应来测定ACTB (例如,作为对照) 的甲基化:

[0274] 外正向引物 (102) ,其包含核苷酸序列:GTGATGGAGGAGGTTTAGTAAGTT (SEQ ID NO: 103) ;

[0275] 外反向引物 (103) ,其包含核苷酸序列:CCAATAAACCTACTCCTCCCTTAA (SEQ ID NO: 104) ;

[0276] 内正向引物 (148) ,其包含核苷酸序列:GGTTTAGTAAGTTTTTTGGATTGTG (SEQ ID NO: 149) ;

[0277] 内反向引物 (149) ,其包含核苷酸序列:CCTTAAAAATTACAAAAACCACAAC (SEQ ID NO: 150) ;和

[0278] 探针 (178) ,其包含核苷酸序列:荧光团-CCACCACCCAACACA (N*) CAA (T*) AACAAACAC-阻断剂 (SEQ ID NO:179) 。

[0279] 实施方案228:从血清或血浆制备cfDNA样品的方法,所述方法包括:

[0280] 将蛋白酶K处理的血清或血浆样品与实施方案169-171中任一项的裂解溶液和醇结合以形成样品溶液;

[0281] 将所述样品溶液加样到实施方案143-154中任一项的盒中的样品接收室,或加样到实施方案155-168中任一项的盒中的样品接收室;和

[0282] 操作所述盒以将所述样品中的DNA结合至所述亲和基质,然后从所述基质洗涤和释放所述DNA。

[0283] 实施方案229:实施方案228的方法,其中所述结合蛋白酶K处理的血清或血浆样品包括以对应于以下的比例结合所述样品、裂解溶液和醇:约1.3mL蛋白酶K处理的血清或血浆、2.2mL裂解溶液和约1.5mL醇。

[0284] 实施方案230:实施方案228-229中任一项的方法,其中所述醇包括异丙醇。

[0285] 实施方案231:实施方案228-230中任一项的方法,其中所述样品包括血清。

[0286] 实施方案232:实施方案228-231中任一项的方法,其中所述样品包括血浆。

[0287] 实施方案233:实施方案228-232中任一项的方法,其中所述样品包括血清。

[0288] 实施方案234:实施方案228-233中任一项的方法,其中操作所述盒包括将所述盒引入到实施方案133-139中任一项的系统中的样品处理模块。

[0289] 实施方案235:实施方案228-234中任一项的方法,其中所述方法还包括操作所述盒以转化所述DNA,用于甲基化检测。

[0290] 实施方案236:实施方案228-235中任一项的方法,其中所述方法还包括操作所述盒以使用所述DNA或转化的DNA作为模板来进行一种或多种PCR反应。

[0291] 实施方案237:实施方案228-234中任一项的方法,其中所述加样包括加载所述样品溶液到实施方案155-165中任一项的盒中的一个或多个样品接收室。

[0292] 实施方案238:实施方案237的方法,其中所述方法还包括将释放的DNA转移到第二盒,用于甲基化检测和/或PCR。

[0293] 实施方案239:实施方案238的方法,其中所述第二盒是实施方案92-132中任一项的盒。

[0294] 实施方案240:实施方案238-239中任一项的方法,其中所述方法还包括操作所述第二盒以转化所述DNA,用于甲基化检测。

[0295] 实施方案241:实施方案238-240中任一项的方法,其中所述方法还包括操作所述第二盒以使用所述DNA或转化的DNA作为模板来进行一种或多种PCR反应。

[0296] 实施方案242:实施方案238-241中任一项的方法,其中所述操作所述第二盒包括将所述第二盒引入到实施方案133-139中任一项的系统中的样品处理模块。

[0297] 实施方案243:从FFPE样品制备DNA的方法,所述方法包括:

[0298] 将福尔马林固定石蜡包埋的样品与实施方案172-174中任一项的裂解溶液结合;

[0299] 加热包含所述样品的所述裂解溶液;添加醇至所述样品以形成样品溶液;将所述样品溶液加到实施方案143-154中任一项的盒中的样品接收室,或加到实施方案155-168中任一项的盒中的样品接收室;以及

[0300] 操作所述盒以结合所述样品中的DNA至亲和基质,然后从所述基质洗涤并释放所述DNA。

[0301] 实施方案244:实施方案243的方法,其中所述加热包括将蛋白酶K添加到所述样品中并加热所述样品。

[0302] 实施方案245:实施方案244的方法,其中所述加热包括将约50 μ L蛋白酶K添加到约1.2mL包含FFPE样品的FFPE裂解溶液中。

[0303] 实施方案246:实施方案243-245中任一项的方法,其中所述加热包括加热所述裂解溶液至温度约50 $^{\circ}$ C至约60 $^{\circ}$ C。

[0304] 实施方案247:实施方案246的方法,其中所述加热包括加热所述裂解溶液至温度约56 $^{\circ}$ C。

[0305] 实施方案248:实施方案243-247中任一项的方法,其中所述加热持续最长达约4小时,或最长达约5小时,或最长达约6小时。

[0306] 实施方案249:实施方案248的方法,其中所述加热持续约4小时。

[0307] 实施方案250:实施方案243-249中任一项的方法,其中所述醇包括乙醇。

[0308] 实施方案251:实施方案243-250中任一项的方法,其中所述方法包括以约1:1裂解溶液:醇的体积比将醇添加到所述裂解溶液中。

[0309] 实施方案252:实施方案243-251中任一项的方法,其中操作所述盒包括将所述盒引入到实施方案133-139中任一项的系统中的样品处理模块中。

[0310] 实施方案253:实施方案243-252中任一项的方法,其中所述方法还包括操作所述盒以转化所述DNA,用于甲基化检测。

[0311] 实施方案254:实施方案243-253中任一项的方法,其中所述方法还包括操作所述盒以使用所述DNA或转化的DNA作为模板来进行一种或多种PCR反应。

[0312] 实施方案255:实施方案243-251中任一项的方法,其中所述加样包括将所述样品溶液加到实施方案155-165中任一项的盒中的一个或多个样品接收室。

[0313] 实施方案256:实施方案255的方法,其中所述方法还包括将释放的DNA转移到第二盒,用于甲基化检测和/或PCR。

[0314] 实施方案257:实施方案256的方法,其中所述第二盒是实施方案92-132中任一项的盒。

[0315] 实施方案258:实施方案256-257中任一项的方法,其中所述方法还包括操作所述第二盒以转化所述DNA,用于甲基化检测。

[0316] 实施方案259:实施方案256-258中任一项的方法,其中所述方法还包括操作所述第二盒以使用所述DNA或转化的DNA作为模板来进行一种或多种PCR反应。

[0317] 实施方案260:实施方案256-259中任一项的方法,其中所述操作所述第二盒包括将所述第二盒引入到实施方案133-139中任一项的系统中的样品处理模块中。

[0318] 实施方案261:在受试者中检测癌症和/或分期癌症和/或检测癌症易感性的方法,所述方法包括:

[0319] 提供来自所述受试者的生物样品,其中所述生物样品包含DNA;

[0320] 利用实施方案190-225中任一项的盒来检测所述DNA中一种或多种基因启动子的甲基化,所述基因启动子的甲基化状态是癌症标记物,其中所述一种或多种基因启动子的甲基化的增加指示癌症的存在或癌症易感性或癌症或癌前期的阶段。

[0321] 实施方案262:实施方案261的方法,其中所述受试者是人类。

[0322] 实施方案263:实施方案261-262中任一项的方法,其中所述癌症是选自以下的癌症:乳腺癌、胰腺癌、前列腺癌、脑癌、肺癌、B细胞淋巴瘤、支气管癌、结直肠癌、胃癌、卵巢癌、膀胱癌、脑或中枢神经系统癌、周围神经系统癌、食管癌、宫颈癌、黑色素瘤、子宫或子宫内膜癌、口腔或咽癌、肝癌、肾癌、胆道癌、小肠或阑尾癌、唾液腺癌、甲状腺癌、肾上腺癌、骨肉瘤、软骨肉瘤、脂肪肉瘤、睾丸癌和恶性纤维组织细胞瘤。

[0323] 实施方案264:实施方案261-262中任一项的方法,其中所述癌症是选自乳腺癌、胰腺癌、前列腺癌、脑癌、肺癌的癌症。

[0324] 实施方案265:实施方案261-264中任一项的方法,其中所述样品包括来自血清或血浆的样品。

[0325] 实施方案266:实施方案261-264中任一项的方法,其中所述样品包括FFPE样品。

[0326] 实施方案267:实施方案261-266中任一项的方法,其中所述一种或多种基因启动子包括一种或多种选自RASSF1A、AKR1B1、HOXB4、HIST1H3C、RASGRF2、TM6SF1、BRCA1、BNC1、ADAMTS1、CD01、SOX17、TAC1、HOXA7和MGMT的启动子。

[0327] 实施方案268:实施方案261-266中任一项的方法,其中所述癌症是胰腺癌并且所述一种或多种基因启动子包括选自ADAMTS1和BNC1的一种、两种、三种或四种基因的启动子。

[0328] 实施方案269:实施方案268的方法,其中所述一种或多种基因启动子包括ADAMTS1的启动子。

[0329] 实施方案270:实施方案268-269中任一项的方法,其中所述一种或多种基因启动子包括BNC1的启动子。

[0330] 实施方案271:实施方案261-266中任一项的方法,其中所述癌症是乳腺癌并且所述一种或多种基因启动子包括选自BRCA1、RASSF1A、AKR1B1、HOXB4、HIST1H3C、RASGRF2和TM6SF1的一种、两种、三种、四种、五种或全部基因的启动子。

[0331] 实施方案272:实施方案271的方法,其中所述一种或多种基因启动子包括BRCA1的启动子。

[0332] 实施方案273:实施方案271-272中任一项的方法,其中所述一种或多种基因启动子包括RASSF1A的启动子。

[0333] 实施方案274:实施方案271-273中任一项的方法,其中所述一种或多种基因启动子包括AKR1B1的启动子。

[0334] 实施方案275:实施方案271-274中任一项的方法,其中所述一种或多种基因启动子包括HOXB4的启动子。

[0335] 实施方案276:实施方案271-275中任一项的方法,其中所述一种或多种基因启动子包括HIST1H3C的启动子。

[0336] 实施方案277:实施方案271-276中任一项的方法,其中所述一种或多种基因启动子包括RASGRF2的启动子。

[0337] 实施方案278:实施方案271-277中任一项的方法,其中所述一种或多种基因启动子包括TM6SF1的启动子。

[0338] 实施方案279:实施方案261-266中任一项的方法,其中所述一种或多种基因启动子包括BRCA1的启动子。

[0339] 实施方案280:实施方案261-266中任一项的方法,其中所述癌症是肺癌并且所述一种或多种基因启动子包括选自CD01、SOX17、TAC1和HOXA7的一种、两种、三种或全部基因的启动子。

[0340] 实施方案281:实施方案280的方法,其中所述一种或多种基因启动子包括CD01的启动子。

[0341] 实施方案282:实施方案280-281中任一项的方法,其中所述一种或多种基因启动子包括SOX17的启动子。

[0342] 实施方案283:实施方案280-282中任一项的方法,其中所述一种或多种基因启动子包括TAC1的启动子。

[0343] 实施方案284:实施方案280-283中任一项的方法,其中所述一种或多种基因启动子包括HOXA7的启动子。

[0344] 实施方案285:实施方案261-266中任一项的方法,其中所述癌症是脑癌并且所述一种或多种启动子包括MGMT的启动子。

[0345] 实施方案286:将DNA中的胞嘧啶残基转化为尿嘧啶,同时使5-甲基胞嘧啶残基基本上不受影响的方法,所述方法包括:

[0346] 使包含DNA的样品与DABSO接触以转化所述DNA;

[0347] 使转化的DNA脱磺酸基以产生DNA,其中胞嘧啶残基被转化为尿嘧啶,但是5-甲基胞嘧啶残基基本上不受影响。

[0348] 实施方案287:实施方案286的方法,其中所述接触包括使所述DNA与浓度范围从2M至最高达约5M的DABSO接触。

[0349] 实施方案288:实施方案286的方法,其中所述接触包括使所述DNA与浓度约2.5M的DABSO接触。

[0350] 实施方案289:实施方案286-288中任一项的方法,其中所述DABSO溶解于碱性水溶液中。

[0351] 实施方案290:实施方案289的方法,其中所述DABSO溶解于包含KOH的溶液中。

[0352] 实施方案291:实施方案286-290中任一项的方法,其中所述接触包括加热DABSO/DNA溶液至温度范围从约55℃至约90℃。

[0353] 实施方案292:实施方案286-291中任一项的方法,其中使所述DABSO与DNA反应,持续约15分钟至最长约90分钟。

[0354] 实施方案293:实施方案286-292中任一项的方法,其中所述脱磺酸基包括使所述转化的DNA与碱性试剂接触。

[0355] 实施方案294:实施方案293的方法,其中所述碱性试剂包括KOH。

[0356] 实施方案295:实施方案286-294中任一项的方法,其中所述转化和/或脱磺酸基在结合至柱的DNA上进行。

[0357] 实施方案296:实施方案286-294中任一项的方法,其中所述转化和/或脱磺酸基在溶液中的DNA上进行。

[0358] 实施方案297:分析DNA甲基化的方法,所述方法包括:

[0359] 提供DNA样品;

[0360] 根据实施方案286-296中任一项的方法转化所述样品中的DNA;和

[0361] 对转化的核酸进行甲基化特异性PCR和/或核酸测序和/或高分辨率熔解分析(HRM)以测定所述核酸的甲基化。

[0362] 实施方案298:实施方案297的方法,其中所述提供DNA样品包括根据实施方案228-234中任一项或根据实施方案243-252中任一项来制备样品。

[0363] 实施方案299:用于检测DNA甲基化状态的试剂盒,所述试剂盒包括:

[0364] 包含转化试剂的容器,所述转化试剂包括DABSO;和

[0365] 包含脱磺酸基试剂的容器。

[0366] 实施方案300:实施方案299的试剂盒,其中所述试剂盒包括含有亲和基质的柱。

[0367] 实施方案301:实施方案299-300中任一项的试剂盒,其中所述试剂盒包括含有结合缓冲液的容器。

[0368] 实施方案302:实施方案299-301中任一项的试剂盒,其中所述试剂盒包括含有洗脱缓冲液的容器。

[0369] 实施方案303:实施方案299-302中任一项的试剂盒,其中所述试剂盒包括含有洗涤缓冲液的容器。

[0370] 实施方案304:实施方案299-303中任一项的试剂盒,其中所述试剂盒包括含有实施方案169-171中任一项的裂解溶液的容器,和/或含有实施方案172-174中任一项的裂解溶液的容器。

[0371] 实施方案305:实施方案299-304中任一项的试剂盒,其中所述试剂盒包括实施方

案143-155中任一项的盒和/或实施方案155-166中任一项的盒。

[0372] 实施方案306:实施方案299-305中任一项的试剂盒,所述试剂盒包括教导使用所述试剂盒来转化核酸以测定所述核酸的甲基化状态的指导材料。

[0373] 实施方案307:用于使用巢式PCR反应来测定MGMT甲基化的一组引物和探针,所述组包括以下引物和探针:

[0374] 外正向引物,其包含核苷酸序列:GTTTT (T*) AGAAYG (T*) TTTGYGTTT (SEQ ID NO: 263);

[0375] 外反向引物,其包含核苷酸序列:AAAAAC (T*) CCRCACCTCTCC (SEQ ID NO:265);

[0376] 内正向引物,其包含核苷酸序列:TTTCGACGTTCTAGGTTTTTCGC (SEQ ID NO:266);

[0377] 内反向引物,其包含核苷酸序列:GCACTCTTCCGAAAACGAAACG (SEQ ID NO:267);和

[0378] 探针,其包含核苷酸序列:荧光团-CCAAACAC (T*) CACCAAATC (N*) CAAAC-阻断剂 (SEQ ID NO:268)。

[0379] 实施方案308:用于使用巢式PCR反应来测定ACTB (例如作为对照) 甲基化的一组引物和探针,所述组包括以下引物和探针:

[0380] 外正向引物 (102),其包含核苷酸序列:GTGATGGAGGAGGTTTAGTAAGTT (SEQ ID NO: 103);

[0381] 外反向引物 (103),其包含核苷酸序列:CCAATAAACCTACTCCTCCCTTAA (SEQ ID NO: 104);

[0382] 内正向引物 (148),其包含核苷酸序列:GGTTTAGTAAGTTTTTTGGATTGTG (SEQ ID NO: 149);

[0383] 内反向引物 (149),其包含核苷酸序列:CCTTAAAAATTACAAAAACCACAAC (SEQ ID NO: 150);和

[0384] 探针 (178),其包含核苷酸序列:荧光团-CCACCACCCAACACA (N*) CAA (T*) AACAAACAC-阻断剂 (SEQ ID NO:179)。

[0385] 实施方案309:用于使用巢式PCR反应来测定MGMT甲基化以及测定作为对照的ACTB的甲基化的引物和探针组,包括实施方案307的引物和探针以及实施方案308的引物和探针。

[0386] 实施方案310:使用甲基化特异性PCR来测定MGMT甲基化的方法,所述方法包括:

[0387] 提供转化的 (例如亚硫酸氢盐转化的) DNA,其包含MGMT基因的启动子区;

[0388] 使用巢式PCR反应进行针对MGMT甲基化的甲基化特异性PCR,其包括以下引物和探针:

[0389] 外正向引物,其包含核苷酸序列:GTTTT (T*) AGAAYG (T*) TTTGYGTTT (SEQ ID NO: 263);

[0390] 外反向引物,其包含核苷酸序列:AAAAAC (T*) CCRCACCTCTCC (SEQ ID NO:265);

[0391] 内正向引物,其包含核苷酸序列:TTTCGACGTTCTAGGTTTTTCGC (SEQ ID NO:266);

[0392] 内反向引物,其包含核苷酸序列:GCACTCTTCCGAAAACGAAACG (SEQ ID NO:267);和

[0393] 探针,其包含核苷酸序列:荧光团-CCAAACAC (T*) CACCAAATC (N*) CAAAC-阻断剂 (SEQ ID NO:268);以及

[0394] 检测和/或定量PCR扩增产物以测定所述MGMT基因的甲基化。

- [0395] 实施方案311:实施方案310的方法,其中所述方法还包括:
- [0396] 提供转化的(例如亚硫酸氢盐转化的)DNA,其包含ACTB基因(例如作为对照)的启动子区;
- [0397] 使用巢式PCR反应进行针对ACTB甲基化的甲基化特异性PCR,其包括以下引物和探针:
- [0398] 外正向引物,其包含核苷酸序列:GTGATGGAGGAGGTTTAGTAAGTT (SEQ ID NO:103);
- [0399] 外反向引物,其包含核苷酸序列:CCAATAAAACCTACTCCTCCCTTAA (SEQ ID NO:104);
- [0400] 内正向引物,其包含核苷酸序列:GGTTTAGTAAGTTTTTTGGATTGTG (SEQ ID NO:149);
- [0401] 内反向引物,其包含核苷酸序列:CCTTAAAAATTACAAAAACCACAAC (SEQ ID NO:150);
- 和
- [0402] 探针,其包含核苷酸序列:荧光团-CCACCACCCAACACA (N*) CAA (T*) AACAAACAC-阻断剂 (SEQ ID NO:179);以及
- [0403] 检测和/或定量PCR扩增产物以测定所述ACTB基因的甲基化。
- [0404] 实施方案312:实施方案310-311中任一项的方法,其中所述针对MGMT甲基化的甲基化特异性PCR和所述针对ACTB甲基化的甲基化特异性PCR在单个多路PCR反应中进行。
- [0405] 实施方案313:实施方案310-312中任一项的方法,其中使用实施方案92-132中任一项的盒来进行所述甲基化特异性PCR。
- [0406] 实施方案314:实施方案313的方法,其中所述提供包含MGMT基因的启动子区的转化的DNA包括:将包含MGMT基因的启动子区的未转化的DNA引入到所述盒中并操作所述盒以使用转化试剂转化所述盒中的所述DNA;和/或所述提供包含ACTB基因的启动子区的转化的DNA包括:将包含ACTB基因的启动子区的未转化的DNA引入到所述盒中并操作所述盒以使用转化试剂转化所述盒中的所述DNA。
- [0407] 实施方案315:实施方案314的方法,其中所述转化试剂包括选自亚硫酸氢铵、偏亚硫酸氢钠、亚硫酸氢钾、亚硫酸氢铯和DABSO的化合物。
- [0408] 实施方案316:实施方案313-315中任一项的方法,其中所述操作所述盒包括在热循环通道或室中加热所述DNA和所述转化试剂,所述热循环通道或室之后用于进行所述巢式PCR反应。
- [0409] 在某些实施方案中,所述方法和/或盒明确地排除磁性材料,包括磁性玻璃、磁性羟基磷灰石和磁性基质材料。在某些实施方案中,所述方法和/或盒明确地排除用于DNA分离的磁性材料。

附图说明

- [0410] 图1A说明了适用于本文所述的方法的盒(例如**GENEXPERT®**盒)的主要组件。图1B示出了所述盒的俯视图,说明了排列在中央阀周围的室。图1C示出了利用所述反应盒来测定DNA甲基化的说明性流程图。
- [0411] 图2,A-C部分说明了适用于如本文所述的DNA甲基化测定的**GENEXPERT®**盒的一个实施方案。
- [0412] 图3A-3C示出了用于DNA甲基化测定的模块和系统(例如处理单元)的示例性但非限制性的实施方案。图3A说明了用于操作**GENEXPERT®**盒的模块。图3B说明了用于操

作盒以进行DNA甲基化分析的模块的一个实施方案的一些组件。图3C说明了整合多个模块的系统(例如处理单元)。

[0413] 图4A-4D说明了使用MethyLight方案以检测/定量DNA磷酸化的多种策略。图4A,改进自Eads等人92000) *Nucleic Acids.Res.*, 28 (8):e32), 其示意性地说明了MethyLight技术。DNA经亚硫酸氢钠修饰,产生甲基化依赖性的序列差异,例如在CpG双核苷酸处通过将未甲基化的胞嘧啶残基(位置通过白色圆圈来表示)转化为尿嘧啶,而甲基化的胞嘧啶残基(位置通过黑色圆圈来表示)保持为胞嘧啶。然后使用引物进行基于荧光的PCR,所述引物与甲基化位点重叠或不与任何甲基化位点重叠。序列区别可发生在PCR扩增过程的水平上(框D)或在探针杂交过程的水平上(框B)或同时在二者的水平上(框D)。PCR扩增水平上的序列区别利用引物和探针(框D),或仅利用引物(框C)以与可能的甲基化位点(例如CpG双核苷酸)重叠。仅示出了多个理论甲基化排列中的两个(完全甲基化(M)和完全未甲基化(U))。也可设计MethyLight测定,以使序列区别不发生在PCR扩增水平上。如果探针和引物都不与甲基化位点(例如CpG双核苷酸)重叠(框A),则没有甲基化依赖性的序列区别发生在PCR扩增或探针杂交水平上。该反应代表未转化的基因组DNA的扩增没有偏向甲基化状态,其可作为输入DNA的量的对照。当仅探针与甲基化位点重叠时(框B),则序列区别可通过探针杂交发生。图4B说明了使用单一的(例如甲基化特异性的)探针(PR3)以及甲基化特异性正向引物(FW)和反向引物(RV)的MethyLight方法。图4C说明了使用分别靶向不同区域的多种探针(PR1……PR5)的MethyLight方法。图4D说明了使用分别靶向相同区域但提供不同的甲基化模式的信号的多种探针(PR1……PR5)的MethyLight方法。

[0414] 图5说明了来自300ng HGDNA的代表性GeneXpert运行的结果,示出了ACTB qPCR曲线和HMBS qPCR曲线。

[0415] 图6A和6B说明了在15个循环的巢式qPCR(图6A)和20个循环的巢式qPCR(图6B)中使用人基因组DNA(hgDNA),对亚硫酸氢盐转化的ACTB的滴定结果。

[0416] 图7A-7C表示针对6个甲基化靶标(AKR1B1、HOXB4、TM6SF1、RAASGRF2和RASSF1A)的20个循环的巢式qPCR(在盒中)的结果。图7A示出了没有亚硫酸氢盐转化的25ng HSDNA或5000个细胞的结果。图7B示出了使用来自MBA-453细胞的DNA,针对亚硫酸氢盐转化的甲基化靶标的20个循环的巢式qPCR的结果。图7C示出了使用来自载体中的MBA-453细胞的DNA(1 μg SS和10ng HS DNA),针对亚硫酸氢盐转化的甲基化靶标的20个循环的巢式qPCR的结果。下降(Fallout)出现在约25-50个拷贝或约100个细胞时。

[0417] 图8说明了转化效率的测定结果。未转化的HMBS和转化的ACTB之间的转化效率差异约66%(~1Ct)。

[0418] 图9说明了针对通过巢式qPCR产生的转化DNA的特异性的增加。

[0419] 图10说明了甲基化盒的特异性。未转化的DNA(上图)或未甲基化的DNA(下图)没有启动-关闭(priming off),HIST1H3C除外。

[0420] 图11示出了使用盒(例如**GENEXPERT®**盒)来分析甲基化的示例性但非限制性流程。上部说明了用于在血清或血浆样品中分析DNA甲基化的一个操作流程。下部说明了用于在组织切片(例如冷冻或福尔马林固定石蜡包埋的(FFPE)切片)中分析DNA甲基化的一个操作流程。

[0421] 图12说明了转化的ALU(蓝色)和甲基化的RASSF1A(灰色)的FFPE细胞按钮

(button)的结果。

[0422] 图13A说明了盒的布置,图13B说明了实施例4中使用的方案的流程图。

[0423] 图14说明了其中一些样品包含亚硫酸氢盐污染的运行。

[0424] 图15A说明了具有亚硫酸氢盐转化的1000个MBA-453细胞的结果。图15B说明了25ng HS DNA对照的结果。

[0425] 图16说明了DABSO (1,4-二氮桥二环[2.2.2]辛烷-1,4-亚磺酸氢盐)的结构。

[0426] 图17说明了cfDNA样品制备盒的一个实施方案。所述盒对于DNA和RNA分离都是有效的。所述盒提供三次GTC-乙醇洗涤 (GTC-乙醇洗涤通常为1.25M硫氰酸胍、25mM Tris pH 7.0、50%乙醇)、PEG200冲洗和15mM KOH洗脱。

[0427] 图18说明了cfDNA提取的对照。

[0428] 图19A示出了与标准管填充 (即基于管的试剂盒) 制备相比,使用本文所述的样品制备盒的cfDNA制备的比较。所述盒制备的产量与使用管填充法获得的产量非常相当。图19B示出了基于DNA量的标准管填充相比,使用基于盒的DNA清除 (cleanup) 检测的提取的DNA的量的比较。所述基于盒的方法保守地在管填充法的1Ct之内,并且被认为在更高的DNA浓度下更为接近。

[0429] 图20A说明了可与qPCR盒和/或与甲基检测盒一起使用的高体积 (例如最高达12mL) 样品制备 (HVSP) 盒的一个实施方案。图20B示意性地说明了当HVSP盒与qPCR盒结合使用以进行甲基化分析时,HVSP盒的操作流程的一个变化。

[0430] 图21说明了与使用应用于单一PCR分析盒 (产生更少的样品体积) 的样品的检测相比,使用利用高体积样品制备盒的双盒清除 (参见例如图20) ——其中将样品从高体积盒转移到PCR分析盒——的HBMS或 β -球蛋白检测。

[0431] 图22说明了与单一加热步骤 (上图) 相比,使用多加热步骤 (下图) 的亚硫酸氢盐转化的结果。

[0432] 图23A说明了与使用本文所述的甲基化分析盒的甲基化分析相比,使用与Zymo DNA甲基化试剂盒结合的标准Qiagen DNA纯化试剂盒 (右) 的甲基化分析的步骤和劳动时间。图23B示出了使用两种不同方案得到的结果的比较。

[0433] 图24示出了与使用Zymo亚硫酸盐转化试剂的DNA转化相比,对使用DABSO作为转化试剂的DNA转化的比较。

[0434] 图25,框A和B说明了甲基化DNA检测的灵敏度。框A示出了甲基化DNA (MGMT) 的稀释系列。框B说明了甲基化的胰腺癌标记物检测的灵敏度。

[0435] 图26说明了针对两条链的反向互补多路测定的结果。

[0436] 图27A说明了在相同的盒中甲基化DNA和突变的检测。上图说明了一个盒中的甲基化DNA和Kras G12D突变的检测,而下图说明了一个盒中的甲基化DNA和野生型Kras的检测。图27B说明了在以下两种胰腺癌细胞系中相同盒中的甲基化DNA和突变I的检测:PANC-1细胞 (上图) 和MIA-PaCa细胞 (下图)。

[0437] 图28说明了ADAMTS1和BNC1的多路甲基化分析中亚硫酸氢盐转化的DNA的正向链 (上图) 和反向链 (下图) 的温度优化。

[0438] 图29说明了多路复用BNC1、ADAMTS1和对照基因ACTB的MSP引物和探针组的能力。根据优选的条件将探针结合到两组中。

[0439] 图30说明了用于检测MGMT甲基化的一组引物和探针。内正向引物22150 (SEQ ID NO:266);外正向引物22422 (SEQ ID NO:263);探针22419 (SEQ ID NO:268);内反向引物22151 (SEQ ID NO:267);外反向引物22423 (SEQ ID NO:265);模板 (SEQ ID NO:1)。

[0440] 图31示出了对于提取的DNA (上图) 和对于FFPET样品 (下图), 亚硫酸氢盐焦磷酸测序 (pyrsequencing) 和MGMT甲基化盒之间的比较结果。

[0441] 图32说明了在甲基化的转化的DNA和未甲基化的转化的DNA之间 ΔCt 的BRCA1引物和探针组优化。

[0442] 图33说明了用ACTB对照基因测试的BRCA1甲基化的一个靶试验。如图所示, 测试了8种不同的细胞系并比较了添加NH₄的效果。

[0443] 图34说明了在正常血浆和三种不同的肺癌细胞系的背景下, 其甲基化与肺癌相关的基因 (SOX17、CD01、TAC1) 的三靶标甲基化试验的结果。

[0444] 定义

[0445] 为了有助于理解本发明, 许多术语和词语被定义如下:

[0446] 本文使用的术语“检测”、“检测 (detecting)”或“检测 (detection)”可描述发现或识别的一般行为或对可检测地标记的组合物的具体测量。

[0447] 本文使用的术语“可检测地不同的”或“光谱可区分的”是指一组标记物 (例如染料/荧光团), 其可同时被检测和区分。

[0448] DNA甲基化是指将甲基基团 (CH₃) 共价添加到通常在二核苷酸5' -CpG-3' 中的碱基胞嘧啶 (C)。术语CpG是指在DNA核苷酸序列中碱基胞嘧啶 (C) 通过磷酸键连接至碱基鸟嘌呤 (G)。

[0449] 术语“转化试剂”是指在单链DNA中使胞嘧啶脱氨基成为尿嘧啶, 同时使5-MeC基本上不受影响的试剂。示例性的转化试剂包括亚硫酸氢盐 (例如偏亚硫酸氢钠、亚硫酸氢钾、亚硫酸氢铯、亚硫酸氢铵等) 和/或在适当的反应条件下可产生亚硫酸氢盐的化合物 (例如DABSO)。

[0450] 词语“检测基因的甲基化”通常是指检测通常在基因的启动子区中的CPG岛中的胞嘧啶的甲基化。

[0451] 本文使用的术语“患者”和“受试者”通常可互换使用以指代人类。在一些实施方案中, 本文所述方法可用于来自非人类的动物的样品, 例如非人类的灵长类动物、犬、马、猫、猪、牛、兔等。

[0452] 本文使用的术语“寡核苷酸”、“多核苷酸”、“核酸分子”等是指包含核酸的分子, 包括但不限于DNA。所述术语包括含有任何已知的DNA和RNA的碱基类似物的序列, 所述碱基类似物包括但不限于4-乙酰胞嘧啶、8-羟基-N6-甲基腺苷、氮丙定基胞嘧啶、假异胞嘧啶、5-(羧羟基甲基) 尿嘧啶、5-氟尿嘧啶、5-溴尿嘧啶、5-羧甲基氨基甲基-2-硫代尿嘧啶、5-羧甲基氨基甲基尿嘧啶、二氢尿嘧啶、肌苷、N6-异戊烯基腺嘌呤、1-甲基腺嘌呤、1-甲基假尿嘧啶、1-甲基鸟嘌呤、1-甲基肌苷、2,2-二甲基-鸟嘌呤、2-甲基腺嘌呤、2-甲基鸟嘌呤、3-甲基胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、N6-甲基腺嘌呤、7-甲基鸟嘌呤、5-甲基氨基甲基尿嘧啶、5-甲氧基氨基-甲基-2-硫代尿嘧啶、 β -D-甘露糖基Q核苷 (β -D-mannosylqueosine)、5'-甲氧羰基甲基尿嘧啶、5-甲氧基尿嘧啶、2-甲基硫代-N6-异戊烯基腺嘌呤、尿嘧啶-5-羧乙酸甲酯、尿嘧啶-5-羧乙酸、oxybutoxosine、假尿嘧啶、Q核苷 (queosine)、2-硫代胞嘧啶、5-甲基-2-硫代

尿嘧啶、2-硫代尿嘧啶、4-硫代尿嘧啶、5-甲基尿嘧啶、N-尿嘧啶-5-羟乙酸甲酯、尿嘧啶-5-羟乙酸、假尿嘧啶、Q核苷、2-硫代胞嘧啶和2,6-二氨基嘌呤。

[0453] 本文使用的术语“寡核苷酸”是指通常具有少于500个核苷酸的单链多核苷酸。在一些实施方案中,寡核苷酸的长度为8至200、8至100、12至200、12至100、12至75或12至50个核苷酸。可通过寡核苷酸的长度来提及它们,例如24个残基的寡核苷酸可称为“24-mer”。

[0454] 本文使用的术语与靶基因(或其靶区域)“互补”,以及探针序列与靶基因序列的“互补性”百分比是与靶基因的序列或与靶基因序列的互补物的“同一性”百分比。在测定本文所述组合物中使用的探针(或其区域)和靶基因(例如本文公开的那些)之间的“互补性”程度中,“互补性”程度被表示为探针(或其区域)的序列和靶基因序列或与其最佳比对的靶基因序列的互补物之间的同一性百分比。通过计数两个序列之间相同的比对碱基数,除以探针中连续核苷酸的总数,乘以100,来计算所述百分比。当使用术语“互补”时,所述寡核苷酸与靶分子至少90%互补,除非另外说明。在一些实施方案中,对象寡核苷酸与靶序列至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%互补。

[0455] 本文使用的“引物”或“探针”是指一种寡核苷酸,其包含与靶核酸分子(例如靶基因)的至少8个连续核苷酸的序列互补的区域。在一些实施方案中,引物或探针包含与靶分子的至少9、至少10、至少11、至少12、至少13、至少14、至少15、至少16、至少17、至少18、至少19、至少20、至少21、至少22、至少23、至少24、至少25、至少26、至少27、至少28、至少29、至少29、至少30、至少31、至少32、至少33、至少34、至少35、至少36、至少37、至少38、至少39或至少40个连续核苷酸的序列互补的区域。当引物或探针包含“与靶分子的至少x个连续核苷酸互补”的区域时,所述引物或探针与靶分子的至少x个连续核苷酸至少95%互补。在一些实施方案中,引物或探针与靶分子至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%互补。

[0456] 术语“核酸扩增”包括通常以模板依赖的方式使至少一种靶核酸的至少一部分复制的任何方法,包括但不限于用于线性或指数扩增核酸序列的宽范围的技术。用于进行扩增步骤的示例性方法包括聚合酶链式反应(PCR)、连接酶链式反应(LCR)、连接酶检测反应(LDR)、多路连接依赖性探针扩增(MLPA)、连接后Q-复制酶扩增、引物延伸、链置换扩增(SDA)、超分支的链置换扩增、多置换扩增(MDA)、基于核酸链的扩增(NASBA)、两步多路扩增、滚环扩增(RCA)等,包括多路版本及其组合,例如但不限于,OLA/PCR、PCR/OLA、LDR/PCR、PCR/PCR/LDR、PCR/LDR、LCR/PCR、PCR/LCR(还已知为组合链反应——CCR),数字扩增等。这类技术的描述可参见Ausbel等人;PCR Primer: A Laboratory Manual, Diffenbach, Ed., Cold Spring Harbor Press (1995); The Electronic Protocol Book, Chang Bioscience (2002; Msuih等人, J. Clin. Micro. 34: 501-07 (1996); The Nucleic Acid Protocols Handbook, R. Rapley编辑, Humana Press, Totowa, N. J. (2002); Abramson等人, Curr Opin Biotechnol. 1993二月; 4(1): 41-7, 美国专利No. 6,027,998; 美国专利No. 6,605,451, Barany等人, PCT公开号W0 97/31256; Wenz等人, PCT公开号W0 01/92579; Day等人, Genomics, 29(1): 152-162 (1995), Ehrlich等人, Science 252: 1643-50 (1991); Innis等人, PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Academic Press (1990); Favis等人, Nature Biotechnology 18: 561-64 (2000); 和 Rabenau等人, Infection 28: 97-102 (2000); Belgrader, Barany和Lubin, Development of a Multiplex Ligation Detection

Reaction DNA Typing Assay, Sixth International Symposium on Human Identification, 1995 (可获自万维网: promega.com/geneticidproc/ussymp6proc/blegrad.html); LCR试剂盒说明书手册, Cat. #200520, Rev. #050002, Stratagene, 2002; Barany, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:188-93 (1991); Bi和Sambrook, Nucl. Acids Res. 25:2924-2951 (1997); Zirvi等人, Nucl. Acid Res. 27:e40i-viii (1999); Dean等人, Proc Natl Acad Sci USA 99:5261-66 (2002); Barany和Gelfand, Gene 109:1-11 (1991); Walker等人, Nucl. Acid Res. 20:1691-96 (1992); Polstra等人, BMC Inf. Dis. 2:18- (2002); Lage等人, Genome Res. 2003二月; 13 (2):294-307, 和Landegren等人, Science 241:1077-80 (1988), Demidov, V., Expert Rev Mol Diagn. 2002十一月; 2 (6):542-8., Cook等人, J Microbiol Methods. 2003五月; 53 (2):165-74, Schweitzer等人, Curr Opin Biotechnol. 2001二月; 12 (1):21-7, 美国专利No. 5,830,711, 美国专利No. 6,027,889, 美国专利No. 5,686,243, PCT公开No. W00056927A3和PCT公开No. W09803673A1, 以及其他来源。

[0457] 在一些实施方案中, 扩增包括以下依次步骤的至少一个循环: 使至少一种靶核酸中具有互补或基本上互补序列的至少一种引物退火; 使用聚合酶, 以模板依赖性方式合成至少一条核苷酸链; 使新形成的核酸双链体变性以分开链。所述循环可重复或不重复。扩增可包括热循环, 或在一些实施方案中, 可以以等温方式进行。

[0458] 术语“杂交”在本文中通常是指“特异性的杂交”, 其为核酸分子优先与特定的核苷酸序列结合、成为双链或杂交, 在一些实施方案中, 在严格条件下进行。术语“严格条件”是指这样的条件, 即在该条件下, 探针将优先与其靶序列杂交, 并且在更少的程度上、或完全不与其他序列杂交。在核酸杂交的情况下, “严格杂交”和“严格杂交洗涤条件”是序列依赖性的, 并且在不同环境参数下是不同的。对核酸杂交的广泛指导参见, 例如Tijssen (1993) *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology--Hybridization with Nucleic Acid Probes* 第I部分, 第2章, “Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assays,” Elsevier, N.Y. (“Tijssen”)。通常, 选择的滤膜杂交的高度严格杂交和洗涤条件为: 在确定的离子强度和pH下, 比特定序列的热熔点 (T_m) 低约5°C。 T_m 是 (在确定的离子强度和pH下) 50%的靶序列与完全匹配的探针杂交的温度。在某些实施方案中, 非常严格的条件经选择为等于特定探针的 T_m 。杂交严格度对缓冲组合物、温度和探针长度的依赖性是本领域技术人员公知的 (参见, 例如Sambrook和Russell (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (第3版) 第1-3卷, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Press, NY)。

[0459] 本文使用的“样品”通常指生物样品, 包括生物液体 (例如血液或血液组分、血清、血浆、胰液、脑脊髓液、口腔液、淋巴液、眼内液等) 和/或组织样品, 包括但不限于来自各组织的活检样品、冷冻组织样品、福尔马林固定石蜡包埋 (FFPE) 的样品, 所述组织包括但不限于乳腺组织、宫颈组织、阴道组织、结肠/直肠组织、喉组织, 以及其他类型的人样品, 例如血液、粪便和活检样品。术语样品还包括上述样品的稀释形式和/或缓冲形式, 例如其中放置了拭子样品的缓冲液, 已添加缓冲液的尿样品等。

[0460] 本文使用的词语“指示癌症存在或癌症易感性”意指倾向于表明癌症存在和/或癌前病况存在或可能存在的特定结果。该词语并不意味着最终确定所述状况存在。可根据从业医生认为合适的进一步检查或试验来进行最终确定。此外, 该词语不需要仅根据特定的

结果来确定哪种状况可能存在。另外,预期将考虑根据其他检查或测试的阳性结果以达到鉴别诊断。

[0461] 术语“管填充(tubefill)操作”是指使用标准实验室设备而非盒(例如而非使用本文所述的**GENEXPERT®**或改良的**GENEXPERT®**盒)来运行的操作。

具体实施方式

[0462] 在各实施方案中,提供了装置和方法,其有助于快速检测和/或表征DNA样品中的甲基化。在某些实施方案中,提供了自动化的反应盒以及利用该自动化反应盒以有助于分析DNA样品的甲基化分析和任选地测量mRNA水平以及测定DNA甲基化的方法。在各实施方案中,通过亚硫酸氢盐转化和对亚硫酸氢盐转化的DNA的分析(例如,通过甲基化特异性PCR、核酸测序、熔点分析等)来测定DNA甲基化。在某些实施方案中,所述盒进行DNA的亚硫酸氢盐转化的全部或部分,以及对亚硫酸氢盐转化的DNA的分析的全部或部分。在某些实施方案中,所述盒进行亚硫酸氢盐转化中涉及的全部步骤以及对亚硫酸氢盐转化的DNA的分析的全部或部分。在某些实施方案中,所述盒进行亚硫酸氢盐转化中涉及的全部步骤以及对亚硫酸氢盐转化的DNA的分析的全部。在某些实施方案中,所述盒任选地进行待被分析的DNA的分离和纯化。

[0463] 甲基化分析的自动化具有若干优势,包括例如减少总处理时间,提高效率,减少使用者失误和变化,最小化步骤之间的损失,以及提高使用更少量样品的能力。本文所述的基于盒的方法的使用不仅允许多种样品类型的快速和简单检测,还允许评估若干不同类型的癌症中测定的甲基化变化,所述癌症包括但不限于乳腺癌、结直肠癌、前列腺癌和肺癌。

[0464] 另外,本文所述的基于盒的方法允许测量来自相同样品的mRNA。DNA甲基化中涉及的相应的上游和/或下游mRNA的测量对于理解表观遗传修饰的机制和活性是重要的。例如,已经研究了DNA甲基转移酶(DNMT)mRNA的测量,以及若干癌症的DNA甲基化(参见表1)。表1. 示例性的DNA甲基转移酶以及它们在特定癌症中的重要性(来自Subramaniam等人(2014) Front Oncol.,4:Article 80,doi:10.3389/fonc.2014.000)。

[0465]

甲基转移酶	癌症
DNMT1	白血病: 上调的- 5.3 倍表达 胃癌- 64.8%定位于细胞质和细胞核 乳腺癌- 16.6% 肝细胞癌- 100% 胰腺癌-高表达的- Gli 靶基因 结肠癌- 高表达的 成胶质细胞瘤- 过表达的
DNMT2 或 TRDMT1	肝细胞癌- 降低的表达 结直肠癌和胃癌-更低的 mRNA 表达
DNMT3A	急性髓性白血病- 22.1 %突变并且影响翻译 胃癌- 70.4%定位于细胞质 乳腺癌- 14% 肝细胞癌 - 60% 胰腺癌-高表达的- 由 Gli 1 调控 结肠癌-高表达的
DNMT3B	白血病: 上调的- 11.7 倍表达 胃癌- 51.9%定位于细胞质 乳腺癌- 81.8%预后差 乳腺癌细胞系-高度甲基化缺陷导致异常-过表达 DNMT 活性 干细胞癌 (60%) 和 mRNA 水平高 结肠癌-高表达的 前列腺癌-过表达的 成胶质细胞瘤- 过表达的
DNMT3L	宫颈癌-有希望的生物标记物 胚胎性癌-新型生物标记物

[0466] 通常,单独的DNA或RNA的单独提取用于研究和测量基因和转录物。来自相同样品制备的共检测对于最小化样品制备、测定到测定、样品到样品和细胞到细胞的变化性是理想的。

[0467] 基于盒的DNA亚硫酸氢盐转化

[0468] 在某些实施方案中,DNA提取、亚硫酸氢盐转化和甲基化特异性PCR全部在盒中进行。在一个示例性的实施方案中,使用者将样品添加到裂解/结合试剂中,然后短暂地混合/涡旋试剂,然后将样品添加到盒中的样品端口或室。示例性但非限制性的裂解试剂(包括特别适用于FFPE切片的试剂)记载于PCT专利公开No.WO/2014/052551 (PCT/US2013/061863)中,该专利因其中记载的试剂而以引用的方式纳入本文。

[0469] 其他用于血清或血浆以及用于福尔马林固定石蜡包埋 (FFPE) 的样品的示例性裂

解试剂在实施例中示出(分别在表11和12中)。

[0470] 在某些实施方案中,将所述盒放置在处理模块中,并通过在控制所述处理模块的软件内点击一组选择来开始测定(参见,例如图11A和11B)。所述盒之后进行亚硫酸氢盐转化过程和亚硫酸氢盐转化的DNA的分析。在某些实施方案中,还测定mRNA。在某些实施方案中,全部操作都在盒中进行,而在其他实施方案中,各操作的分组在盒中进行,如下文所述。

[0471] 样品可包括含有DNA的任何生物样品,所述DNA的甲基化状态将被评估。示例性的样品包括但不限于分离的DNA和/或分离的总核酸、细胞、组织、含有核酸的生物液体等。在某些实施方案中,生物样品包括生物液体,其选自血浆、血清、羊膜液、唾液、粘液、尿、胰液和脑脊髓液。在某些实施方案中,样品包括来自健康组织的组织样品或来自患病样品的组织样品。在某些实施方案中,组织样品来自胎儿、新生儿、儿童、青少年或成年。在某些实施方案中,组织样品包括肿瘤细胞和/或来自肿瘤(例如乳腺癌、前列腺癌、脑癌、宫颈癌、卵巢癌、胰腺癌、结肠癌、胃癌、肝细胞癌等)的活检。在某些实施方案中,样品包括固定的样品,例如福尔马林固定的组织样品。在某些实施方案中,样品包括包埋的组织样品(例如福尔马林固定石蜡包埋(FFPE)的组织样品)。

[0472] DNA的亚硫酸氢盐转化通常包括以下四个步骤:

[0473] 1) DNA纯化;

[0474] 2) DNA变性;

[0475] 3) DNA转化(例如亚硫酸氢盐脱氨基);和

[0476] 4) 碱性脱磺酸基。

[0477] 通常,DNA转化(例如使用转化试剂如亚硫酸氢盐)包括:1) 脱磺酸基:添加亚硫酸氢盐至胞嘧啶的5-6双键;和2) 水解脱氨基作用:对得到的胞嘧啶-亚硫酸氢盐衍生物进行水解脱氨基以产生尿嘧啶亚硫酸氢盐衍生物。之后进行碱性脱磺酸基:通过碱处理除去磺酸基,产生尿嘧啶,如上文所示。

[0478] 如上文指出的,在某些实施方案中,在将样品放置在盒中之前可进行DNA纯化,或者可通过盒本身来进行DNA纯化。因此,在某些实施方案中,将样品直接添加到反应盒,而在其他实施方案中,将样品与一种或多种试剂混合。在某些实施方案中,DNA制备通常包括制备基本上分离的DNA。这可包括裂解细胞以释放DNA,除去微粒和细胞碎片和/或除去蛋白质组分以提供包含基本上纯的核酸(例如,基本上纯的DNA和/或基本上纯的DNA和RNA的组合)的样品。在一个示例性但非限制性的实施方案中,将样品(例如组织样品)添加到裂解试剂中,搅动,然后插入到盒中,用于进一步处理。

[0479] 在某些实施方案中,在盒中提供进行DNA的亚硫酸氢盐转化所需的全部试剂。在某些实施方案中,为了避免盒中试剂随着时间降解,可在使用前立即将某些试剂添加到盒中。因此,例如在某些实施方案中,预期在将样品加到盒中时或接近将样品加到盒中时,可向盒中装载转化试剂(例如亚硫酸氢盐试剂)和/或硫氰酸胍试剂(例如GTC-EtOH-Tween)。在某些实施方案中,硫氰酸胍试剂(例如GTC-EtOH-Tween)与样品结合并被添加到盒中的样品接收室(例如**GENEXPERT®**盒中的室2)。

[0480] 在某些实施方案中,当使用反应盒(例如**GENEXPERT®**盒)进行DNA的亚硫酸氢盐转化时,所述方法包括:

[0481] i) 使包含核酸的生物样品与包含第一柱或滤器的第一基质材料接触,在该第一柱

或滤器处所述基质材料结合和/或过滤所述样品中的核酸,从而纯化DNA。

[0482] ii) 从所述第一基质材料上洗脱结合的DNA (例如使用碱性溶液) 并使DNA变性以产生洗脱的变性DNA;

[0483] iii) 在转化试剂 (例如产生亚硫酸氢盐离子的试剂) 的存在下加热洗脱的DNA以产生转化的 (例如脱氨基) 核酸;

[0484] iv) 使所述转化的核酸与包含第二柱的第二基质材料接触以将所述脱氨基的核酸与所述第二基质材料结合 (注意在某些实施方案中,第二柱可以是与第一柱不同的柱,或在其他实施方案中,两次使用相同的柱);

[0485] v) 将结合的脱氨基的核酸脱磺酸基和/或通过所述脱氨基的核酸与碱性溶液接触来使所述核酸同时洗脱和脱磺酸基以产生转化的 (例如亚硫酸氢盐转化的) 核酸;和

[0486] vi) 从所述第二基质材料上洗脱所述转化的核酸,其中至少步骤iv) 至vi) 在一个反应盒中进行。

[0487] 在某些实施方案中,所述方法还包括对转化的DNA的分析。因此,在某些实施方案中,所述方法还包括:

[0488] vii) 在所述转化的核酸上进行甲基化特异性PCR和/或核酸测序和/或高分辨率熔解分析 (HRM) 以测定所述核酸的甲基化,其中至少步骤iv) 至vi) 在单个反应盒中进行。

[0489] 在某些实施方案中,至少步骤iii) 至vi) 在一个反应盒中进行。

[0490] 在某些实施方案中,至少步骤ii) 至vi) 在一个反应盒中进行。

[0491] 在某些实施方案中,至少步骤i) 至vi) 在一个反应盒中进行。

[0492] 在某些实施方案中,至少步骤i) 至vii) 在一个反应盒中进行。

[0493] 应注意,第一柱和 (存在时) 第二柱可以指分开的柱。然而,特别是当被整合到反应盒中时,“柱”可以简单地指设置在盒中的室或通道的基质材料。在各实施方案中,“柱”作为滤器和/或作为结合核酸的亲合柱发挥作用。因此,在某些实施方案中,所述柱包含结合核酸 (例如DNA和/或RNA) 的基质材料。示例性的基质材料包括但不限于玻璃 (二氧化硅)、离子交换树脂、羟基磷灰石等。应理解,基质材料可以为多种形式。因此,在某些实施方案中,基质材料包括多孔材料、微粒材料 (例如微珠、纳米珠等)、结构性材料 (例如,多孔“挡板”系统、蛇纹石通道等)。在某些实施方案中,第一柱和第二柱是不同的柱 (室或通道)。在其他实施方案中,第一柱和第二柱是相同的柱 (室或通道),其可使用两次 (例如第一次和第二次)。

[0494] 在某些实施方案中,考虑使用一种或多种额外的滤器,例如以在与第一基质材料接触前清除初始样品。因此,例如,在某些实施方案中,滤器基质 (例如聚碳酸酯滤器、尼龙滤器、聚丙烯滤器、聚酯滤器、尼龙滤器、陶瓷滤器、聚四氟乙烯滤器等) 被设置在样品接收室中或样品接收室的“下游”并且在第一“柱”之前。还应理解,在某些实施方案中,样品在沉积到样品接收室之前可被裂解和/或过滤。

[0495] 在某些示例性但非限制性的实施方案中,可使用 **GENEXPERT®** 盒 (Cepheid, Inc., Sunnyvale, CA) 或其变体来进行本文所述的方法。在各实施方案中,样品提取和/或扩增和/或DNA转化和/或检测全部在该自含式“盒中实验室”内进行 (参见,例如美国专利 No. 5,958,349、6,403,037、6,440,725、6,783,736 和 6,818,185,将其分别以引用的方式全文纳入本文)。在各实施方案中,盒的组件可包括但不限于包含试剂的处理室,滤器,以及适用于提取、纯化和扩增靶核酸的捕获技术。阀使流体能够从室转移到室并且包含核酸裂解

和过滤组分。光学窗口使得能够进行实时光学检测(例如PCR扩增产物的实时光学检测)。可提供允许非常快速加热和/或热循环的反应管。

[0496] 在某些实施方案中,示例性的**GENEXPERT®**盒包括排列在中央阀组件的周围并且选择性地处于与所述中央阀组件的流体连通中的多个室,其中配置所述中央阀组件以适应柱塞,所述柱塞能够将流体引入或引出与所述中央阀处于流体连通的室。阀组件的旋转决定了哪个室与中央阀处于流体连通中。图1A说明了一个示例性的**GENEXPERT®**盒,其示出了所述盒、处理/试剂室、反应管(例如加热和/或热循环管)、任选的光学窗口和有助于流体从室转移到室的阀。

[0497] 所述盒的示例性布置如图1B所示,其提供了通过编号识别各室的盒的俯视图。在一个示例性但非限制性的实施方案中,盒中包含的室的组分列于表2。应理解,这种试剂和室的设置是示例性和非限制性的。使用本文提供的教导,本领域技术人员可获得其他试剂设置和/或其他室布局。

[0498] 表2. 一个示例性实施方案,其示出了用于测量DNA甲基化的**GENEXPERT®**盒的室内含物

[0499]

室#	室内含物	初始体积 (μL)
1		--
2*	样品室(与例如 GTC-EtOH-Tween 沉淀试剂混合的样品)	

[0500]

3**	GTC-EtOH	
4***	亚硫酸氢盐试剂 (例如, 8 M 亚硫酸氢铵)	
5	缓冲液 例如, 50 mM Tris pH 8.5	
6		--
7		--
8	冲洗剂 (例如, PEG 200)	
9	珠 (例如, 聚合酶、引物、探针)	
10	洗脱/脱磺酸基试剂 (例如, 15 mM KOH)	
11	珠 (例如, 聚合酶、引物、探针)	
*使用者将样品添加到室 2。 **在某些实施方案中, 使用时 (例如, 添加样品时) 添加 GTC-EtOH。在某些实施方案中, GTC-EtOH 被提供为已经被设置在盒中的试剂。 ***在某些实施方案中, 使用时 (例如, 添加样品时) 添加亚硫酸氢盐试剂。在某些实施方案中, 亚硫酸氢盐试剂已经被设置在盒中。		

[0501] 利用这种盒的DNA甲基化测定的逐步操作流程的一个实施方案示于图1C。在该盒构造中, 具有5个室, 其在使用时 (例如当操作盒以测定DNA甲基化时) 将盛放试剂和缓冲液 (例如室3、4、5、8和10); 一个盛放使用者添加的样品的室 (例如室2); 以及一个或两个 (或更多个) 盛放分析试剂 (例如MSP试剂如酶反应、模板特异性反应和/或200mM Tris pH 7.0, 例如珠) 的室 (例如室9和11)。在某些实施方案中, 以溶液的形式提供试剂 (例如聚合酶、逆转录酶、引物、探针)。在某些实施方案中, 以冻干粉末的形式提供试剂。在某些实施方案中, 以冻干珠的形式提供试剂。所述珠可进一步包含提高试剂稳定性和/或活性的试剂 (参见, 例如美国专利公开No. 2006/0068399, 该专利因其中记载的珠、珠构造和珠制剂而以引用的方式纳入本文)。

[0502] 在某些实施方案中, 提供的盒包含运行该盒所需的全部试剂, 并且仅将样品 (例如缓冲/裂解/沉淀溶液中的样品) 添加到盒中。在某些实施方案中, 提供的盒不含有GTC-EtOH和/或亚硫酸氢盐试剂, 这两种试剂的一种或两种在使用时添加。因此, 在某些实施方案中, 在使用时将GTC-EtOH试剂添加到盒中; 在某些实施方案中, 在使用时将亚硫酸氢盐试剂 (除样品以外) 添加到室中; 在某些实施方案中, 在使用时将GTC-EtOH和亚硫酸氢盐试剂 (除样品以外) 添加到盒中。在某些实施方案中, 将这些试剂直接添加到所需室中 (参见例如表2)。在某些实施方案中, 提供用于装载试剂的端口, 并且配置所述端口以将试剂递送到所需的室。

[0503] 在测定开始时, 盒分配样品, 例如从盒中的室2经过玻璃纤维柱 (例如第一柱)。将

DNA从柱上洗脱,同时通过碱性溶液(例如来自室10的低浓度氢氧化钾溶液)使DNA变性,进入室4中的浓缩的亚硫酸盐试剂(例如浓缩的亚硫酸氢铵)。在某些实施方案中,用KOH的碱性溶液来洗脱DNA,该溶液的pH大于约10.5或pH大于约12。在某些实施方案中,用10–15mM KOH洗脱DNA。

[0504] 如上文所述,将DNA洗脱(任选地使用超声法破裂)到亚硫酸氢盐试剂中。在各实施方案中,转化试剂(例如亚硫酸氢盐试剂)以约4M至约10M、约5M至约8M、或约6M或约7M的浓度存在。在某些实施方案中,亚硫酸盐溶液包括偏亚硫酸氢钠或亚硫酸氢钾或亚硫酸氢铵或亚硫酸氢铯或DABSO (1,4-二氮桥二环[2.2.2]辛烷-1,4-亚磺酸氢盐,参见例如图16)。在某些实施方案中,转化试剂(例如亚硫酸氢盐试剂)包含自由基清除剂(包括但不限于一种或多种阻止亚硫酸盐氧化为硫酸盐的化学品(TROLOX和氢醌))和/或催化剂(聚胺)。

[0505] 之后将DNA-亚硫酸氢盐(DNA/转化试剂)混合物引入温度控制的室或通道中并在约40℃至约95℃的温度下孵育。在某些实施方案中,在恒定温度下孵育所述混合物,而在其他实施方案中,例如当温度控制的室或通道是热循环室或通道(例如盒后部的智能循环仪管)时,将混合物热循环(例如60℃至95℃)。孵育所述混合物直至DNA被转化(例如脱氨基)。在某些实施方案中,孵育持续约5分钟至最高达约4小时,或优选约15分钟至最高达约45分钟。

[0506] 在孵育DNA/转化试剂(例如DNA-亚硫酸氢盐)之后,将溶液与新鲜的硫氰酸胍-EtOH(例如来自室3)混合并分配到基质材料上。在某些实施方案中,重新使用第一柱,因此仅有一个柱并且第二柱和第一柱是相同的。在某些实施方案中,第二柱是不同于第一柱的单独的柱。

[0507] 将结合至第二柱基质材料的DNA用新鲜的GTC-EtOH(例如,来自室3)洗涤并冲洗(例如用PEG 200冲洗剂,例如来自室8)。然后将DNA在柱上脱磺酸基,或通过使脱氨基的核酸与碱性溶液(例如来自室10的KOH)接触来同时洗脱和脱磺酸基以产生亚硫酸氢盐转化的核酸。在某些实施方案中,孵育持续约1分钟至约1小时,或约5分钟至约30分钟,或约10分钟至约20分钟,或约15分钟。

[0508] 当初始孵育是在要被进一步使用的热循环室中时,将所述热循环室或通道用缓冲液洗涤以除去残留的亚硫酸氢盐并中和pH。出乎意料地发现,使用转化试剂(例如亚硫酸氢盐试剂)的孵育和/或脱磺酸基可以在之后用于PCR的通道或室中进行,而没有基本上干扰之后PCR反应的亚硫酸氢盐污染。

[0509] 被洗脱的脱磺酸基的亚硫酸氢盐转化的DNA可以与适当的缓冲液混合并分析甲基化。在某些实施方案中,经转化的DNA与室9和11中的浓缩的Tris,酶反应和模板特异性珠(例如包含用于PCR或巢式PCR反应的引物和/或探针的珠)混合,并将最终混合物吸入热循环管或室,用于甲基化特异性定量PCR反应。

[0510] qPCR步骤中的亚硫酸氢盐污染可以是甲基化盒的主要失败方式。残留的亚硫酸氢盐可源自PCR反应管的直接污染(例如在亚硫酸氢盐转化步骤中)或源自间接污染(例如室之间的亚硫酸氢盐流体运动过程中的交叉污染)。残留的亚硫酸氢盐污染如果存在,可通过qPCR步骤中亚硫酸氢盐介导的探针裂解来测量,所述探针裂解引起通常用于背景扣除(background subtraction)的早期qPCR循环(循环1–10)中荧光反应的增加。因此,在某些实施方案中,所述盒包括提供一种或多种探针的珠,如果亚硫酸氢盐存在,所述探针在PCR

过程中是可裂解的。包含亚硫酸氢盐污染的运行的结果在图14中示出。

[0511] 尽管就**GENEXPERT®**盒中特定的室来描述上述方法(以及在实施例4中,参见例如图13A),应理解,特定的试剂/室分配可根据应用的甲基化分析方案的特定情况而改变。

[0512] 因此,例如,甲基化分析盒(例如**GENEXPERT®**盒)的操作通常过流程图来描述(参见例如图1C和13B)。在图13B中所示的示例性但非限制性的实施方案中,DNA样品以结合缓冲液(例如包含GTC-EtOH的缓冲液,在某些实施方案中,在将样品用蛋白酶K和/或裂解溶液处理之后)的形式提供。在某些实施方案中,从本文所述的样品制备盒获得样品(参见例如图20)。

[0513] 将结合缓冲液中的样品引入所述盒的样品接收室。在操作中,操控盒以将样品溶液递送到结合DNA的基质(“柱”)。然后使用与亚硫酸氢盐试剂结合的碱性试剂(例如KOH溶液),将结合的DNA从柱上洗脱,然后使其移动到盒中的加热管(通常为PCR反应管),在该加热管中进行亚硫酸氢盐反应(例如,在该示例性方案中,在约50℃或约60℃至约90℃下进行约45分钟(或最长可达约90分钟))。反应的DNA与结合缓冲液(例如,2.25M硫氰酸胍、22.5mM Tris pH 7.0、0.5% Tween20、50%乙醇和0.005% SE-15消泡剂(活性硅消泡剂和非离子乳化剂的10%乳液))结合,并移动回相同的柱,或移动到不同的柱,在那里它再次结合至柱基质。将反应的DNA用GTC-EtOH洗涤,用PEG(例如PEG200)冲洗,并使用碱性试剂(例如KOH)再次从柱上洗脱,所述碱性试剂还使DNA脱磺酸基。当DNA被脱磺酸基时,可将反应管(例如PCR反应管)加热并冲洗(例如10×冲洗剂)以除去任何亚硫酸氢盐试剂。可将洗脱的DNA(或其部分)移入反应管,用于PCR和/或巢式PCR。

[0514] 应理解,这些操作可在全部样品上进行,或在DNA样品的部分上进行。在后一种情况下,可将样品的部分贮存在一个或多个室并且用作对照,或进行不同的分析/方案。

[0515] RNA表达和DNA甲基化的共同纯化和检测

[0516] 在某些实施方案中,提供了在基于盒的测定(例如,利用**GENEXPERT®**盒)中基因的改变的RNA表达以及DNA甲基化(MSP)的共同纯化和检测。在某些实施方案中,这些测定从相同的样品制品鉴定与肿瘤特异性甲基化相关的如DNMT的改变的表达。在某些实施方案中,这些测定可用于证实表达和甲基化状态。

[0517] 本发明人已经证明,我们能够使用Tris缓冲液洗脱从柱上洗脱核酸,并保留部分核酸在柱上。在一个示例性实施方案中,使用Tris溶液洗脱RNA组分并将其保留在例如盒中的室中。

[0518] 在保存RNA组分之后,清除柱并洗脱和变性DNA的NaOH或KOH洗脱剂将进入亚硫酸氢盐,用于转化,如上所述。然后,使用RNA洗脱组分以从柱上洗脱亚硫酸盐转化的DNA,或使用KOH洗脱混合物,将两种组分(RNA和转化的DNA产物)混合,用于RNA加上亚硫酸氢盐转化的qRT-PCR。这包括从相同的样品在相同的管中合并针对RNA的逆转录酶(RT)步骤加上MSP(或其他分析方法)。替代性的方法包括但不限于,使用盒中的一个热循环管/室或同时使用多个热循环管/室,单独地/依次进行qPCR的RT步骤(单独地在与DNA混合(结合cDNA和DNA)之前),或DNA的PCR,或RT RNA。

[0519] 对转化的DNA的分析

[0520] 在盒中可进行许多分析方法以评估DNA甲基化。或者,在某些实施方案中,所述盒

可以与另一种装置和/或系统偶联,用于转化的(例如亚硫酸氢盐或DABSO转化的)DNA的进一步分析。示例性的方法包括但不限于甲基化特异性PCR(MSP)、直接测序、高分辨率熔解分析(HRM)、焦磷酸测序(通过添加的测序)、碱基特异性裂解分析(例如碱基特异性MALDI-TOF)等。

[0521] 甲基化特异性PCR(MSP)

[0522] 在各实施方案中,甲基化特异性PCR可用于评估靶DNA的甲基化状态。MSP使用被设计为“甲基化特异性的”(通过包含仅与未转化的5-甲基胞嘧啶互补的序列)或相反地“非甲基化特异性的”(与从未甲基化的胞嘧啶转化的胸腺嘧啶互补)引物和/或探针组。然后通过特异性引物实现扩增的能力来测定甲基化。该方法对于研究高甲基化密度的区域中的CpG岛而言是特别有效的,因为待被扩增的靶标中未转化的甲基胞嘧啶的数目增加提高了PCR的特异性。在某些实施方案中,将CpG对置于引物的3'端也提高了特异性。

[0523] 在某些实施方案中,使用MethyLight法来评估甲基化。MethyLight法基于MSP,但是使用定量PCR提供了定量分析(参见,例如Eades等人(2000) *Nucleic Acids Res.*, 28(8): E32. doi:10.1093/nar/28.8.e32)。使用甲基化特异性引物,并且还使用退火至扩增区域的甲基化特异性荧光报告探针。在另一种方式中,如果需要在包含的序列内的CpG对之间进行区分,则可设计不具有甲基化特异性的引物或探针。对甲基化的参照DNA进行定量。为了提高成功进行亚硫酸氢盐转化的DNA的PCR的特异性,该方案的一个修改(ConLight-MSP)使用另外的亚硫酸氢盐转化的DNA的探针以定量该非特异性扩增(参见,例如Rand等人(2002) *Methods* 27(2):114-120)。

[0524] 在各实施方案中,MethyLight法利用**TAQMAN®**技术,该技术基于PCR扩增过程中Taq聚合酶的5'核酸酶活性对双标记的荧光杂交探针的裂解(Eads等人(1999) *Cancer Res.*, 59:2302-2306; Livak等人(1995) *PCR Meth. Appl.*, 4:357-362; Lee等人(1993) *Nucleic Acids Res.*, 21:3761-3766; Fink等人(1998) *Nat. Med.*, 4:1329-1333)。在**TAQMAN®**技术中使用三种不同的寡核苷酸(正向和反向PCR引物和荧光杂交探针)为若干序列检测策略提供了机会。

[0525] 例如,序列区分可发生在PCR扩增过程的水平上(参见,例如图4A,框C)和/或在荧光探针杂交的水平上(参见,例如图4A,框B)。在这两个步骤中,区分是基于完全匹配的寡核苷酸相对于不匹配的寡核苷酸的差别化退火。在MethyLight技术中,PCR扩增水平上的序列区分通过以下步骤发生:设计引物和探针或仅引物或仅探针以与可能的DNA甲基化位点(例如CpG二核苷酸)重叠。一种方法仅仅是MSP技术的基于荧光的版本(Herman等人(1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93:9821-9826)。每种寡核苷酸(引物和探针)能够覆盖从零到多个CpG二核苷酸的任何位置。每种CpG二核苷酸能够在亚硫酸氢盐转化之后产生两种不同的序列变异,这取决于特定的位点是甲基化的(mCpG)还是未甲基化的(UpG)。例如,如果一个寡核苷酸与两个CpG二核苷酸重叠,则该寡核苷酸覆盖的区域内基因组DNA中可能的序列变体的数目为 $2 \times 2 = 4$ 。如果引物和探针都分别与两个CpG重叠,则寡核苷酸覆盖的序列内包含的变体的总数为 $4 \times 4 \times 4 = 64$ 。理论上,人们能够设计单独的PCR反应以分析这些可能的64种序列变体中每一种的相对量。然而,通过设计针对完全甲基化的分子和完全未甲基化的分子(其代表该假设实例的两种最极端的序列变体)的反应,重要的甲基化信息可获自数量少得多的变体的分析。这两种反应之间的比例或甲基化反应与对照反应之间的比例提供

了在该位置甲基化分子的普遍程度的度量。

[0526] 还可改进MethyLight技术以避免PCR扩增水平上的序列区分。如果引物和探针都未与任何CpG二核苷酸重叠,则反应代表无偏向的扩增并且可用作输入DNA的量的对照。一个说明性的有用的对照反应是其中整个扩增子在未转化的基因组序列中没有任何CpG二核苷酸的反应。当仅设计探针以覆盖CpG二核苷酸时,序列区分仅发生在探针杂交的水平上。在该版本下,以同等效率扩增源自亚硫酸氢钠转化步骤的全部序列变体,只要没有扩增偏向(参见,例如Wamecke等人(1997) *Nucleic Acids Res.*, 25:4422-1426)。在这种情况下,针对各种与特定的甲基化模式相关的不同序列变体的单独的探针的设计(在两个CpG的情况下, $2 \times 2 = 4$ 种探针)允许定量测定各种序列排列在PCR产物的混合池中的相对普遍程度。

[0527] 在某些实施方案中,所述分析方法还提供了特异性针对未转化的DNA的PCR。该PCR可研究SNP、突变和/或易位等。在这方面,注意到在单个盒中突变和甲基化的检测在实施例12中说明(参见,例如图27A和27B)。SNP、突变、易位等的检测可容易地通过包含特异性针对这些靶标的检测的引物和探针组来实现。

[0528] 巢式PCR和多路PCR测定

[0529] 在某些实施方案中,可使用本领域技术人员公知的PCR方法来检测甲基化DNA。在某些实施方案中,巢式PCR反应用于检测甲基化靶标。在一个说明性但非限制性的实施方案中(参见例如实施例4),巢式PCR方案可用于前15-20个循环的PCR反应并且非特异性针对甲基化而仅针对转化的DNA序列的情况(即它们不超过CpG,或当它们超过CpG时R=嘌呤或Y=嘧啶用于捕获甲基化和未甲基化的模板序列)。第二qPCR反应(例如45个循环的qPCR反应)可包含特异性针对通常为2-3个甲基化的CpG的引物和探针。

[0530] 应注意,在某些实施方案中,使用单一探针进行MethyLight分析(参见例如图4B)。在该方法中,使用单一的(例如甲基化特异性的)探针(PR3)以及甲基化特异性的正向(FW)和反向(RV)引物,探针(PR3)的甲基化特异性PCR提供了依赖于FW、RV和PR3序列的甲基化和亚硫酸氢盐转化的信号。

[0531] 在各实施方案中,包括多路PCR测定。以实例说明,图4C说明了使用分别靶向不同区域的多种探针(PR1、PR2、……PR5)的MethyLight方法。来自全部探针(PR1、PR2、PR3、PR4和PR5)的组合信号产生甲基化的量/程度的测量。在某些实施方案中,每种探针具有其自身特异性的染料/荧光团,从而它是不依赖于其他探针可检测的。因此,即使当一个靶标未被甲基化时,仍可检测到信号,例如,如果PR3未被甲基化,将没有来自其余探针的信号或来自其余探针的信号减少。图4D说明了使用分别靶向相同区域但是提供不同的甲基化模式的信号的多种探针(PR1……PR5)的MethyLight方法。尽管图4C中说明的方法能够提供来自更大区域的检测,这种在单一更小区域上的多探针方法可使用序列特异性引物或探针来完成,所述引物或探针在亚硫酸氢盐转化之后探寻特定序列上甲基化的程度。

[0532] 在某些实施方案中,可使用针对两条链的反向互补多路测定(参见,例如图26)。在亚硫酸氢盐转化之后,两条链都失去它们的互补性。因此,可设计一条链或另一条链的引物和探针组,并且产生独特的扩增子。除了为检测提供“更多机会”以外,这种方法可能有助于灵敏性(在LOD下,如果仅一条链或另一条链在管中结束,该方法将保证接收到信号)。这种方法允许多路测定扩展到检测相同启动子位点处的不同的CpG。反向互补多路提供了更多机会以检测靶标甲基化并获得异源甲基化。

[0533] 上述方法是说明性和非限制性的。使用本文提供的教导,MSP和/或MethyLight分析的多种变化将是本领域技术人员可获得的,并且可在反应盒(例如,如本文所述的)上实施。

[0534] 直接测序

[0535] 在某些实施方案中,使用直接测序方法可测定DNA的甲基化状态。在某些实施方案中,所述方法能够利用PCR和标准二脱氧核苷酸DNA测序以直接测定抵抗亚硫酸氢盐转化的核苷酸(参见,例如Frommer等人(1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89 (5) :1827-1831)。在各实施方案中,将引物设计为链特异性的,以及亚硫酸氢盐特异性的(例如引物包含非CpG胞嘧啶,从而它们不与未经亚硫酸氢盐处理的DNA互补),位于目的甲基化位点的侧翼(但是不包含目的甲基化位点)。因此,它将扩增甲基化和未甲基化的序列,不同于甲基化特异性PCR。所有未甲基化的胞嘧啶位点在获得的正义链的扩增序列中显示为胸腺嘧啶,在扩增的反义链中显示为腺嘌呤。在某些实施方案中,巢式PCR方法可用于增加用于测序的产物。

[0536] 在某些实施方案中,测序在所述盒中进行。在其他实施方案中,所述盒可与测序仪器偶联(例如流体偶联)以提供测序分析。或者,在某些实施方案中,可将扩增的产物从盒人工转移至测序系统。

[0537] 高分辨率熔解分析(HRM)

[0538] 在某些实施方案中,高分辨率熔解分析(HRM)可用于区分转化的与未转化的亚硫酸氢盐处理的DNA。HRM是定量PCR技术,其中通过温度爬升(ramping)和在熔解过程中产生的嵌入荧光染料的释放来直接分析PCR扩增子(参见,例如Wojdacz和Dobrovic(2007) *Nucleic Acids Res.* 35 (6) :e41)。用扩增子中C至T含量表示的甲基化程度决定了熔解的迅速和随之发生的染料释放。这种方法允许直接定量,但是评估作为整体的扩增区中的甲基化而非特定CpG位点处的甲基化。

[0539] 焦磷酸测序

[0540] 在某些实施方案中,焦磷酸测序(通过合成的测序)可用于分析亚硫酸氢盐处理的DNA,而不使用甲基化特异性PCR(参见,例如Colella等人(2003) *BioTechniques* 35 (1) :146-150;Tost等人(2003) *BioTechniques* 35 (1) :152-156;等等)。通过合成的测序与Sanger测序的区别在于,它利用核苷酸掺入时磷酸释放的检测,而非使用双脱氧核苷酸的链终止。基于以下事实,能够通过下一个互补核苷酸掺入时释放的光来测定DNA序列:通常,在某一时间4个可能的A/T/C/G核苷酸中仅有一个被添加且可获得,从而仅有一个字母可被掺入到单链模板上(其为待测定的序列)。

[0541] 在目的区域的PCR扩增之后,焦磷酸测序可用于测定特定区域(例如CpG位点)的亚硫酸氢盐转化的序列。在某些实施方案中,可根据序列延伸过程中C和T掺入的量来定量测定单独的位点处C/T的比例。

[0542] 该技术的改进可利用等位基因特异性引物,所述引物将单核苷酸多态性(SNP)掺入到测序引物的序列,因此允许对母本等位基因和父本等位基因的单独分析(参见,例如Wong等人(2006) *BioTechniques* 41 (6) :734-739)。这种改进特别适用于基因组印迹分析。

[0543] 碱基特异性的裂解分析

[0544] 在某些实施方案中,碱基特异性裂解/MALDI-TOF通过增加碱基特异性裂解步骤来利用亚硫酸氢盐转化以增加从核苷酸变化获得的信息(Ehrich等人(2005))

Proc.Natl.Acad.Sci.USA,102(44):15785-15790)。通过首先使用体外转录,将目的区域转录为RNA(通过将RNA聚合酶启动子位点添加到初始扩增中的PCR引物),RNase A可用于在碱基特异性位点裂解RNA转录物。RNase A在胞嘧啶和尿嘧啶核糖核苷酸处特异性地裂解RNA,并且通过增加在需要胞嘧啶特异性(C特异性)裂解时掺入裂解抗性的dTTP、以及在需要尿嘧啶特异性(U特异性)裂解时掺入dCTP而实现碱基特异性。之后可通过MALDI-TOF或其他方法来分析裂解的片段。亚硫酸氢盐处理通过C到U转化产生裂解位点的引入/去除,或通过扩增的反义链中的G到A转化产生片段质量的偏移。C特异性裂解将在全部甲基化的CpG位点处特异性切割。通过分析产生的片段的大小(例如使用MALDI-TOF、毛细管电泳、微芯片电泳等),可确定区域内CpG位点的DNA甲基化的特定模式,而非确定作为整体的区域的甲基化程度。

[0545] 甲基化敏感性单链构象分析(MS-SSCA)

[0546] 甲基化敏感性单链构象分析(MS-SSCA)是基于为单核苷酸多态性(SNP)分析开发的单链构象多态性分析(SSCA)(Bianco等人(1999)Hum.Mutat.14(4):289-293)。SSCA根据非变性电泳中的差异迁移,在大小相同但是序列不同的单链DNA片段之间进行区分。在MS-SSCA中,这用于在包含目的CpG位点的亚硫酸氢盐处理的PCR扩增的区域之间区分。尽管当仅存在单一核苷酸差异时SSCA缺乏灵敏性,亚硫酸氢盐处理在大多数目的区域中常常产生许多C到T转化,并且产生的灵敏度较高。在某些实施方案中,基于带密度的比值,MS-SSCA还可提供对DNA甲基化程度的半定量分析。通常,然而,MS-SSCA在目的区域中而非单个甲基化位点处评估作为整体的全部CpG位点。

[0547] 甲基化靶标

[0548] 如上文所述,DNA甲基化在大量情况下是重要的。在某些实施方案中,DNA甲基化的量在肿瘤学中特别具有临床意义。异常的DNA甲基化模式(与正常组织相比的超甲基化和低甲基化)与大量人恶性肿瘤相关。超甲基化通常发生在启动子区中的CpG岛并且与基因失活有关。更低水平的白细胞DNA甲基化水平与许多类型的癌症有关(Zhang等人(2011)Epigenetics,6(3):293-299)。整体的低甲基化还涉及通过不同机制的癌症的发生和发展。通常,存在肿瘤抑制基因的超甲基化和癌基因的低甲基化(参见,例如Lund等人(2004)J.Biol.Chem.279(28):29147-29154)。

[0549] 在这方面,注意到DNA甲基化提供了I期非小细胞肺癌(NSCLC)的预后指标。具体而言,发现5种基因的超甲基化明显与I期NSCLC中更短的无复发存活期(RFS)有关:HIST1H4F、PCDHGB6、NPBWR1、ALX1、和H0XA9。基于超甲基化事件的数量标记(signature)区分患有高风险I期NSCLC的患者和低风险I期NSCLC的患者(参见,例如Sandoval等人(2013)J.Clin.Oncol.,4140-4147)。

[0550] 类似地,观察到恶性神经胶质瘤可具有失活的MGMT基因,这是由于其启动子区的甲基化。目前的研究给出的预测是,通过使MGMT基因甲基化,可以产生对化学疗法更好的响应(因为肿瘤无法修复由烷基化试剂诱导的DNA损伤)。在神经胶质瘤中,MGMT启动子甲基化在放射疗法或化学疗法的情况下是有利的预后标记物(参见,例如//neurosurgery.ucsd.edu/brain-tumor-research-mgmt/)。

[0551] 以实例进一步说明,表3示出了在某些癌症中被超甲基化的多种基因。

[0552] 表3示出了在散发性癌症中超甲基化的基因的说明性但非限制性的实例(参见,例

如Baylin (2005) Nature Clinical Practice Oncology, 2:S4-S11)。

[0553]	基因或基因产物	肿瘤类型
	Rb	视网膜母细胞瘤
	APC	结直肠癌和其他癌症
	p14/ARF	结直肠癌
	p15/CDKN2B	白血病
	p16/CDKN2A	多种癌症
	BRCA1	乳腺癌、卵巢癌
[0554]	VHL	肾细胞癌
	hMLH1	结直肠癌、胃癌、子宫内膜癌
	ER-α	乳腺癌、结直肠癌、其他癌症

[0555] 在各示例性但非限制性的实施方案中,包括测量以下基因的启动子中的任何一种或多重的甲基化:APC、ARF、CDKN2B、CDKN2A、BRCA1、VHL、hMLH1、MGMT、RASSF1A、ADAMTS1、BNC1、HIST1H3C、HOXB4、RASGRF2、TM6SF1、AKR1B1、HIST1H4F、PCDHGB6、NPBWR1、ALX1和HOXA9。

[0556] 胰腺癌

[0557] 在某些实施方案中,确定一种或多种启动子的甲基化状态,所述启动子处的甲基化状态是胰腺癌的存在和/或预后的标记物。确定了ADAMTS1或BNC1的一种或多重的甲基化频率可用于检测和/或分期胰腺癌。因此,胰腺癌的示例性但非限制性的甲基化标记物包括但不限于ADAMTS1和/或BNC1。用于在这些基因的启动子处检测甲基化的示例性的引物和探针示于下表4(参考表5中的具体序列)、以及实施例4中的表10。在某些实施方案中,提供了用于检测转化的DNA的正向链中的甲基化的引物和探针,和/或用于检测转化的DNA的反向链中的甲基化的引物和探针。

[0558] 乳腺癌

[0559] 在某些实施方案中,确定一种或多种启动子的甲基化状态,所述启动子处的甲基化状态是乳腺癌的存在和/或预后的标记物。乳腺癌的示例性甲基化标记物包括但不限于RASSF1A和/或AKR1B1和/或HOXB4和/或HIST1H3C和/或RASGRF2和/或TM6SF1。用于检测这些基因的启动子处的甲基化的示例性引物和探针示于下表4(参考表5中的具体序列)、以及实施例4中的表9。

[0560] 在某些实施方案中,确定一种或多种启动子的甲基化状态,所述启动子处的甲基化状态是肺癌的存在或可能性的标记物。肺癌的示例性的甲基化标记物包括但不限于CD01、SOX17、TAC1和/或HOXA7。

[0561] 本文所述的方法不限于确定这些基因的启动子的甲基化。使用本文所述的方法,基本上可以确定任何目的靶标的甲基化。

[0562] 然而,应注意,DNA甲基化的测量不必限于启动子中CpG岛处的甲基化的测量。例

如,已经证明基因体甲基化也能够改变基因表达并且能够提供癌症的治疗靶标(参见,例如Yang等人(2014) *Cancer Cell*, 26 (4) :577-590)。

[0563] 另外,DNA甲基化测量对于癌症以外的病理学具有预后/治疗应用。例如,13号、18号、21号、X和Y染色体上的区域中的异常甲基化可用于诊断唐氏综合征(参见,例如Patsalis等人(2012) *Exp.Opin.Biol.Ther.* 12 (增刊1) :S155-S161)。因为胎儿DNA和母体DNA是被差异甲基化的,母体血浆中的无细胞DNA能够提供胎儿DNA的来源,其可通过非侵入式方式获得并用于评估上述染色体(或其他染色体或基因)的甲基化状态。

[0564] 如上文所述,在某些实施方案中,本文所述的盒和方法还用于测定mRNA水平,例如用于测定各种甲基转移酶的表达。在某些实施方案中,测定选自以下的甲基转移酶的RNA表达水平:DNMT1、DNMT2、DNMT3A、DNMT3B和DNMT3L。

[0565] 引物/探针和多路分析

[0566] 在各实施方案中,本文所述的方法能够包括巢式PCR反应,并且本文所述的盒能够包含用于这样的巢式PCR反应的试剂(例如引物和探针)。例如,在某些实施方案中,检测一种、两种、三种、四种、五种或六种基因(基因启动子)的甲基化。由于DNA的亚硫酸氢盐转化将胞嘧啶残基改变为尿嘧啶,但是5-甲基胞嘧啶残基不受影响,转化的(亚硫酸氢盐转化的)DNA的正义链和反义链不再互补。因此,可单独地探寻正义链和反义链(例如在多路PCR反应中)以为甲基化检测提供额外的特异性和灵敏度。在这样的情况下,单一靶标的测定可包括两路多路测定,而两种、三种、四种、五种或六种靶基因的测定可包括4路、6路、8路、10路或12路多路测定。

[0567] 在某些实施方案中,所述测定可分成两个多路反应,例如以独立地测定正向链和反向链。然而,应了解,当分成多个多路测定,测定的分组不需要通过正向或反向,但是可仅包括最适合特定PCR反应条件的引物/探针组。

[0568] 如上文所述,通过检测/表征其甲基化(或其缺失)与癌症相关的基因启动子的正向链和/或反向链上的甲基化状况,可鉴定多种癌症和/或对癌症进行分期和/或确定其预后。与各种癌症相关的示例性的基因(启动子)靶标如上文所述并示于下表4中。应了解,可确定针对各种癌症的表4中所示的一种或多种基因的甲基化(正向链和/或反向链)以针对所示癌症鉴定和/或分期和/或提供预后。在某些实施方案中,针对特定癌症所示的所有基因(正向链和/或反向链)的甲基化状态可在单一多路PCR反应中测定。

[0569] 表4.使用本文所述的装置和方法,检测与多种癌症相关的基因的启动子处的甲基化的示例性引物和探针。引物和探针编号是指下表5中所示的引物/探针编号(引物/探针num)。

[0570]

适应症/基因	外引物	内引物	探针
乳腺癌			
<i>AKR1B1</i>;	58 / 183	19 / 20	193
<i>HIST1H3C</i>;	42 / 43,	59 / 54	194
<i>HOXB4</i>;	186 / 187,	25 / 26	76
<i>RASGRF2</i>;	188 / 199,	192 / 14	67
<i>RASSF1A</i>;	189 / 1,	1 / 2	63
<i>TM6SF1</i>;	202 / 51,	31 / 57	77
<i>BG</i>;	175 / 158,	176 / 156	164
胰腺癌组 1:			
<i>BNC1</i>	213 / 214,	221 / 222	229
<i>ADAMTS1</i>;	219 / 220,	227 / 228	265
<i>ACTB</i>;	102 / 103,	320 / 321	150
胰腺癌组 2:			
<i>BNC1</i>;	217 / 218,	225 / 226	264
<i>ADAMTS1</i>;	215 / 216,	223 / 224	230
<i>ACTB</i>;	102 / 103,	320 / 321	150
肺 CPHD 组 2:			
<i>CDO1</i>;	283 / 284,	287 / 288	291

[0571]

TAC1:	293 / 294,	386 / 388	301
SOX17:	303 / 304,	382 / 385	312
ACTB:	102 / 103,	320 / 321	150
前列腺:			
GSTP1:	233 / 234,	239 / 240	245
APC:	235 / 236,	241 / 242	246
PTGS2:	237 / 238,	243 / 244	247
ACTB:	102 / 103,	320 / 321	150
BRCA1:			
BRCA1:	328 / 329,	330 / 331	327
ACTB:	102 / 103,	320 / 321	150
MGMT:			
MGMT:	248b / 249b,	250 / 251	252
ACTB:	102 / 103,	320 / 321	150

[0572] 用于检测各种基因的启动子处的甲基化的示例性引物和探针示于下表5、以及实施例4中的表9和10中。在某些实施方案中,这些引物和/或探针特别适用于多路扩增。

[0573] 表5. 用于检测多种基因启动子的甲基化的示例性引物和探针。注意:Y是C/T;R是A/G;C*是任选地官能化(例如以改变探针T_m)的C;T*是任选地官能化(例如以改变探针T_m)的T;A*是任选地官能化(例如以改变探针T_m)的A;N*是任选地为淬灭剂的核苷酸;dP是通用的嘧啶;dK是通用的嘌呤。

[0574]

引物 / 探针 编号	靶标	类型	序列	SEQ ID NO
1	RASSF1A	I	GCGTTGAAGTCGGGGTTC	1
2	RASSF1A	I	CCCGTACTTCGCTAACTTTAAACG	2
3	RASSF1A	P	ACAAACGCGAACCGAACGAAACC A-淬灭剂/阻断剂	3
4	RASSF1A STD	I	荧光团 -TTAGGGTAGATTGTGGATATTAG	4
5	RASSF1A STD	I	ATACTAACAACCTATCCAATACAAC	5

[0575]

6	RASSF1A STD	P	荧光团 - (C*)AGGTTGAAATTAG(T-淬灭剂)ATGTGTTATTTTGGTATGG	6
7	HIST1H3C	I	AATAGTTCGTAAGTTTATCGGCG	7
8	HIST1H3C	I	CTTCACGCCACCGATAACCGA	8
9	HIST1H3C	P	荧光团 -TACTTACGCGAAACTTTACCGCCG A-淬灭剂/阻断剂	9
10	HIST1H3C STD	I	GATTTAGAGTTGGATGTGTGGAT	10
11	HIST1H3C STD	I	ACCACCATACTAATAATCAAATCT A	11
12	HIST1H3C STD	P	荧光团 -AAATATCACTCATCACCAAATAA ATCCAA-淬灭剂/阻断剂	12
13	RASGRF2	I	GTAAGAAGACGGTCGAGGCG	13
14	RASGRF2	I	ACAACCTCTACTCGCCCTCGAA	14
15	RASGRF2	P	荧光团 -AACGAACCACTTCTCGTACCAAC GA-淬灭剂/阻断剂	15
16	RASGRF2 STD	I	TGTATGAGTTTGTGGTGAATAATG	16
17	RASGRF2 STD	I	AACTCACCATCAAACACTTTCCC	17
18	RASGRF2 STD	P	荧光团 -TACAAACCCAACATCCTCTATCTA TTC-淬灭剂/阻断剂	18
19	AKR1B1	I	GCGCGTTAATCGTAGGCGTTT	19
20	AKR1B1	I	CCCAATACGATACGACCTTAAC	20
21	AKR1B1	P	荧光团 -CGTACCTTTAAATAACCCGTAAAA TCGA-淬灭剂/阻断剂	21
22	AKR1B1 STD	I	TTTGTTGATGTTTTGTGGAAGTAA G	22
23	AKR1B1 STD	I	ATTCATCAATACTTTCAAATAACA CA	23
24	AKR1B1 STD	P	荧光团-(C*)AAATACATTATCC(T-淬灭剂)ACCACTAACAATACA	24
25	HOXB4	I	CGGGATTTTGGGTTTTTCGTCG	25
26	HOXB4	I	CGACGAATAACGACGCAAAAAC	26
27	HOXB4	P	荧光团 -AACCGAACGATAACGAAAACGAC GAA-淬灭剂/阻断剂	27
28	HOXB4 STD	I	GTTAGTTTTGTAGTGTATTGAGTAT	28
29	HOXB4 STD	I	CATCTCCACAATAAACTTCCAAT T	29
30	HOXB4 STD	P	荧光团 -TAACTCCACCTATTCTACCTACCA TTT-淬灭剂/阻断剂	30

[0576]

31	TM6SF1	I	CGTTTAGCGGGATGCGGTGA	31
32	TM6SF1	I	ACACGAAAACCCCGATAACCG	32
33	TM6SF1	P	荧光团 -AAACACTCATCGCAACCGCCGCG- 淬灭剂/阻断剂	33
34	TM6SF1 STD	I	TTAGATGTTGATTGGTTGTGTTTG	34
35	TM6SF1 STD	I	ATCATCATAAACTCAACAATCAA TT	35
36	TM6SF1 STD	P	荧光团 -CCAAACATCAAATCTTTAACTTTT ACCAA-淬灭剂/阻断剂	36
37	RASSF1A STD	P	荧光团-AGGTTGAAATTAGTATG(T- 淬灭剂)GTTATTTTGGTATGG-淬灭 剂/阻断剂	37
38	RASSF1A STD	P	荧光团 -AGGTTGAAATTAGTATGTGT(T-淬 灭剂)ATTTTGGTATGG-淬灭剂/阻断 剂	38
39	RASSF1A STD	P	荧光团 -AGGTTGAAATTAGTATGTGTTA(T- 淬灭剂)TTTGGTATGG-淬灭剂/阻断 剂	39
40	RASSF1A	E	GTTTTATAGTTTTTGTATTTAGG	40
41	RASSF1A	E	AACTCAATAAACTCAAACCTCCC	41
42	HIST1H3C	E	GTGTGTGTTTTTATTGTAAATGG	42
43	HIST1H3C	E	ATAAAATTTCTTCACRCCACC	43
44	RASGRF2	E	GAGGGAGTTAGTTGGGTAT	44
45	RASGRF2	E	CCTCCAAAAAATACATACCC	45
46	AKR1B1	E	GTGTAATTAATTAGAAGGTTTTTT	46
47	AKR1B1	E	AACACCTACCTTCCAAATAC	47
48	HOXB4	E	TTAGAGGYGAGAGAGTAGTT	48
49	HOXB4	E	AAACTACTACTAACCRCCCTC	49
50	TM6SF1	E	AGGAGATATYGTTGAGGGGA	50
51	TM6SF1	E	TCACTCATACTAAACCRCCAA	51
52	RASSF1A STD	I	TTAGGGTAGATTGTGGATATTAGA TAGG	52
53	RASSF1A STD	I	TAATACTAACAACCTATCCAATACA ACAC	53
54	HIST1H3C	I	CCGATAACCGAAACGCTCTTAC	54
55	AKR1B1	I	GCGTTAATCGTAGGCGTTT	55
56	TM6SF1	I	GTTTAGCGGGATGCGGTG	56
57	TM6SF1	I	ACACGAAAACCCCGATAAC	57
58	AKR1B1	E	GYGTAATTAAT(T*)AGAAGGTTTT T	58

[0577]

59	HIST1H3C	I	TCGTACGAAGTAAATAGTTCGTAA G	59
60	HIST1H3C	E	GGATTTTTGAAATATTATAGGATT AATTAG	60
61	RASSF1A	E	GTTTTATAGTT(T*)TTGTATTTAGG	61
62	RASSF1A	P	荧光团 -ACAAACGCGA(N*)ACCGAA(C**)G AAACCA-淬灭剂/阻断剂	62
63	RASSF1A	P	荧光团 - (C*)TGGTTTCGT(T- 淬灭 剂)CGGT(T*)CGCG-淬灭剂/阻断剂	63
64	RASSF1A STD	P	荧光团 - (C*)AGGTTGAAATTAGTA(T- 淬灭 剂)GTGTTAT(T*)TTGG(T*)ATGG- 淬 灭剂/阻断剂	64
65	HIST1H3C	P	荧光团 -CAAACACTTACGCGAACTT(T*) ACCGCC-淬灭剂/阻断剂	65
66	HIST1H3C STD	P	荧光团 -AAATATCACTCA(T*)CACCAAA(N *)TAAA(T*)CCAA-淬灭剂/阻断剂	66
67	RASGRF2	P	荧光团 -AAACGAACCACTTCTCG(T*)ACCA ACGAC-淬灭剂/阻断剂	67
68	RASGRF2 STD	P	荧光团 -CAAACCCAACATCCTC(T*)ATC(T*)ATTC-淬灭剂/阻断剂	68
69	AKR1B1	P	荧光团 -A(C*)GCGTACCTTT(N*)AAA(T*)A ACCCG(T*)AAAATCG- 淬灭剂/阻断 剂	69
70	AKR1B1	P	荧光团 -A(C*)GCGTACCTT(T- 淬灭 剂)AAA(T*)AACCCG(T*)AAAATCG- 淬灭剂/阻断剂	70
71	AKR1B1 STD	P	荧光团 - (C*)AAATACATTATCC(T-淬 灭剂)ACCAC(T*)AACAA(T*)ACA-淬 灭剂/阻断剂	71
72	HOXB4	P	荧光团 -AACCGAACGATAACGAAAA(C**)G ACGA-淬灭剂/阻断剂	72
73	HOXB4 STD	P	荧光团 -TAACTCCACCTATTC(T*)ACCT(N*)ACCA(T*)TT-淬灭剂/阻断剂	73
74	TM6SF1 STD	P	荧光团 -CAAACATCAAATCT(T*)TAAC(T*) TT(T*)AC-淬灭剂/阻断剂	74

[0578]

75	AKR1B1	P	荧光团 - (C*)A(C*)GCGTACCT(T-淬灭剂)TAAA(T*)AACCCG(T*)AAAATC G-淬灭剂/阻断剂	75
76	HOXB4	P	荧光团 -AACCGAACGA(T*)AACGAAA(N*) ACGACGAA-淬灭剂/阻断剂	76
77	TM6SF1	P	荧光团 -AAACACTCATCGCAACCGCCGCG- 淬灭剂/阻断剂	77
78	ACTB	P	荧光团 -TAACCACCACCCAACACA(C**)AA TAAC-淬灭剂/阻断剂	78
79	ALU 长组 1	P	荧光团 -CCCACTACT(T*)AAAAAAC(T*)A AAAC-淬灭剂/阻断剂	79
80	ALU 短组 1	P	荧光团 -CACCTAAAA(T*)CAAAAATT(T*)A AAACC-淬灭剂/阻断剂	80
81	ALU 长组 2	P	荧光团 -CAAATAATTCTCC(T*)ACCTCAAC C(T*)C-淬灭剂/阻断剂	81
82	ALU 短组 2	P	荧光团 -CTTAACCTCAC(T*)ACAACCTC(T*) ACC-淬灭剂/阻断剂	82
83	INSL6	P	荧光团 -CAAACCGAACGACGCGCACAAAC AC-淬灭剂/阻断剂	83
84	ACTB	E	GTATATAGGTTGGGGAAGTTTG	84
85	ACTB	E	AACTATACTCAACCAATAAAACC	85
86	ALU 长组 1	E	TGTTATTTAGGTTGGAGTGTAG	86
87	ALU 长组 1	E	TAATAACTCATACCTATAATCCC	87
88	ALU 长组 1	I	GGTTGGAGTGTAGTGGTATAATTT TAG	88
89	ALU 长组 1	I	TAATAACTCATACCTATAATCCCA ACAC	89
90	ALU 短组 1	E	GTAGAGATAGGGTTTTATTATGTT G	90
91	ALU 短组 1	I	GGTTTTATTATGTTGGTTAGGTTGG	91
92	ALU 长组 2	E	GTATTTTGGGAGGTTAAGGTAG	92
93	ALU 长组 2	E	ATCTTACTCTTATTACCCAAAC	93
94	ALU 长组 2	I	GGTTAAGGTAGGTAGATTATTGA GG	94
95	ALU 长组 2	I	ATCTTACTCTTATTACCCAAACTAA AATAC	95

[0579]

96	ALU 短组 2	E	GTTATTTAGGAGGTTGAGGTAG	96
97	ALU 短组 2	E	GAGGTAGGAGAATTATTTGAATTT AGG	97
98	INSL6	E	ATTTGAGATTTTTGAGTTGG	98
99	INSL6	E	AACCCTACTCCCTATCTACG	99
100	INSL6	I	GCGCGCGTTTTTTTTTGAAG	100
101	INSL6	I	GGCGTAGATAGGGAGTAGGGTT	101
102	ACTB	I	GTGATGGAGGAGGTTTAGTAAGTT	102
103	ACTB	I	CCAATAAAACCTACTCCTCCCTTA A	103
104	RASSF1A STD	P	荧光团 - (C*)(C*)ATACCAAAA(T-淬灭剂)AACACA(T*)CTAAT(T*)TCAACCT-淬灭剂/阻断剂	104
105	AKR1B1 STD	P	荧光团 - (C*)AAATACAT(T*)ATCC(T-淬灭剂)ACCAC(T*)AACAA(T*)ACA-淬灭剂/阻断剂	105
106	AKR1B1	P	荧光团 - (C*)ACGCGTACCTT(T-淬灭剂)AAA(T*)AACCCG(T*)AAAATCG-淬灭剂/阻断剂	106
107	AKR1B1	P	荧光团 - (C*)ACGCGTACCTT(T*)AAA(T-淬灭剂)AACCCG(T*)AAAATCG-淬灭剂/阻断剂	107
108	RASSF1A UM	P	荧光团 -CTAACAAACA(C-淬灭剂)AAA(C**)CAAA(C**)AAAACCA-淬灭剂/阻断剂	108
109	RASSF1A UM	P	荧光团 -CTAACAAACA(C**)AAA(C-淬灭剂)CAAA(C**)AAAACCA-淬灭剂/阻断剂	109
110	HIST1H3C UM	P	荧光团 -AACTACTTACA(C**)AAAACCTT(N*)TAC(C**)ACCAA-淬灭剂/阻断剂	110
111	HIST1H3C UM	P	荧光团 -AACTACTTA(C**)ACAAAA(C**)TTTACCAC-淬灭剂/阻断剂	111
112	RASGRF2 UM	P	荧光团 -AAACAAACCAC(T*)TCTCA(T*)ACCAACAAC-淬灭剂/阻断剂	112
113	AKR1B1 UM	P	荧光团 - (C*)ACATACCTTTAAA(T-淬灭剂)AACCCA(T*)AAAA(T*)CAAC-淬灭剂/阻断剂	113
114	AKR1B1 UM	P	荧光团 - (C*)ACATACCTT(T-淬灭剂)AAA(T*)AACCCA(T*)AAAATCA	114

[0580]

			AC-淬灭剂/阻断剂	
115	HOXB4 UM	P	荧光团 -CAACAAAAACCCAAAA(T*)CCCA AC(N*)AAACCACA-淬灭剂/阻断剂	115
116	HOXB4 UM	P	荧光团 -CAAAATCCCAA(C**)AAACCA(C**)ATAACA-淬灭剂/阻断剂	116
117	TM6SF1 UM	P	荧光团 -AAACACTCATCACAACCA(C**)CA CACC-淬灭剂/阻断剂	117
118	AKR1B1 UM	I	TGGTGTGTTAATTGTAGGTGTTTT	118
119	AKR1B1 UM	I	CCCAATACAATACAACCTTAACC	119
120	HOXB4 UM	I	GTGGTGTGTATTGTGTAGTGTTA	120
121	HOXB4 UM	I	CAAACCAAACAATAACAAAAACA AC	121
122	TM6SF1 UM	I	TGTTTAGTGGGATGTGGTGAAG	122
123	TM6SF1 UM	I	ACACAAAAACCCCAATAACCACA	123
124	RASSF1A UM	I	GTTTAAAGTTAGTGAAGTATGGGT TT	124
125	HIST1H3C UM	I	TGTATGAAGTAAATAGTTTGTAAG TTTATTGG	125
126	AKR1B1 STD	I	TTTGTGTGATGTTTTGTGGAAG(T*)A AG	126
127	AKR1B1 STD	I	ATTCATCAATACTTTCAAA(T*)AAC ACA	127
128	RASGRF2	P	荧光团 -AAACGAACCACTTCTCG(T*)ACCA ACGAC-淬灭剂/阻断剂	128
129	RASGRF2 STD	P	荧光团 -CAAACCCAACATCCTC(T*)ATC(T*)ATTC-淬灭剂/阻断剂	129
130	TM6SF1	P	荧光团 -AAACACTCATCGCAACCGCCGCG- 淬灭剂/阻断剂	130
131	TM6SF1 STD	P	荧光团 -CCAAACATCAAATCT(T*)TAACTT(T*)TACCAA-淬灭剂/阻断剂	131
132	TM6SF1	P	荧光团 -AAACACTCATCGCAACCGCCGCG- 淬灭剂/阻断剂	132
133	RASSF1A UM	I	GGTGTGTAAGTTGGGGTTTG	133
134	RASSF1A UM	I	CCCATACTTCACTAACTTTAAAC	134
135	HIST1H3C UM	I	GTAAATAGTTTGTAAGTTTATTGG TG	135
136	HIST1H3C UM	I	TTTCTTCACACCACCAATAACCAA	136

[0581]

137	RASGRF2 UM	I	GAGTAAGAAGATGGTTGAGGTG	137
138	RASGRF2 UM	I	CAACAACCTCTACTCACCTCAA	138
139		P	荧光团 -TCCCAACTACT(T*)AAAAAAC(T*) AAAAC-淬灭剂/阻断剂	139
140	ALU 长组 1	P	荧光团 -TCCCAACTACT(T*)AAAAAAC(T*) AAAAC-淬灭剂/阻断剂	140
141	ALU 长组 1	P	荧光团 -TCCCAACTACT(T*)AAAAAAC(T*) AAAAC-淬灭剂/阻断剂	141
142	ALU 长组 1	P	荧光团 -TCCCAACTACT(T*)AAAAAAC(T*) AAAAC-淬灭剂/阻断剂	142
143	ALU 长组 1	P	荧光团 -TCCCAACTACT(T*)AAAAAAC(T*) AAAAC-淬灭剂/阻断剂	143
144	HMBS	I	GGATAAGATTTTTGATATTGTATTT TTTAAGG	144
145	HMBS	I	CATATTCAAACCTCCTTAATAAACA AACTTTTCTC	145
146	HMBS	P	荧光团-CCGAACAAAAAAAAA(C-淬 灭剂)CTAAA(T*)AAATCCC(T*)TC- 淬灭剂/阻断剂	146
147	ACTB	P	荧光团 -CCACCACCCAACACACAA(T*)AA CAAACAC-淬灭剂/阻断剂	147
148	ACTB	I	GGTTTAGTAAGTTTTTTGGATTGTG	148
149	ACTB		CCTTAAAAATTACAAAAACCACAA C	149
150	ACTB	P	荧光团-CCACCACCCAACA(C-淬灭 剂)ACAA(T*)AACAAACAC-淬灭剂/ 阻断剂	150
151	ACTB	P	荧光团 -CCACCACCCAAC(N*)ACA(C**)AA TAA(C**)AAACAC-淬灭剂/阻断剂	151
152	ACTB	P	荧光团 -CCACCACCCAACACA(N*)CAA(T*) AACAAACAC-淬灭剂/阻断剂	152
153	BG	I	TTCAGTGCCGTTGGTAATGTAA- 淬灭剂/阻断剂	153
154	BG	I	CAACAACCTTAATACCTGTTTCAA GGA	154
155	BG conv	I	GGTATTTTTGTATTTGTTGGTGTG	155
156	BG conv	I	CATACATACACCAAACAATTCATT C	156

[0582]

157	BG conv	E	GTATGGTGGTATTTTTGTATTGTGTT G	157
158	BG conv	E	CACACATACATACACCAAACAATT C	158
159	BG	P	荧光团 -AAGATCCGATTTCACAGA(N*)CAA GCTCCGTCA-淬灭剂/阻断剂	159
160	BG	I	荧光团 -AAGATCCGATTTCACAGA(N*)CAA GCTCCGTCA-淬灭剂/阻断剂	160
161	BG conv	P	荧光团-(C*)AAAATCATTT(C-淬灭 剂)CTT(C**)ACAAATA(C**)ACTC- 淬灭剂/阻断剂	161
162	BG conv	P	荧光团-CCAAATACCA(T-淬灭 剂)AACCA(T*)TTTATTAA(T*)AACA C-淬灭剂/阻断剂	162
163	BG conv	P	荧光团 -AAAATCATTTCTT(C**)ACA(N*) AATA(C**)ACTC-淬灭剂/阻断剂	163
164	BG conv	P	荧光团 -CCAAATACCA(T*)AACCAT(N*)TT TATTAA(T*)AACAC-淬灭剂/阻断剂	164
165	短 HMBS	I	CCCTAGTATGCTAGGTCTCTTGCTG GGA	165
166	短 HMBS	I	CAGCCTCTCTGAGGGTTTAAGCCC A	166
167	短 HMBS	P	荧光团 -TCAGCC(T*)ATC(T*)GACACCCCG GG-淬灭剂/阻断剂	167
168	短 β -球蛋白	I	GACTCCTGAGGAGAAGTCTGCCGT TA	168
169	短 β -球蛋白	I	CCTTGATACCAACCTGCCCAGGG	169
170	短 β -球蛋白	P	荧光团 -AGGTGAACG(T*)GGATGAAGT(T*) GGTGGTG-淬灭剂/阻断剂	170
171	短 BG	I	CAACATCGCGCAAGAGCACGG	171
172	短 BG	I	CGTTTCCTTCACGAGTACGCTCTCC GA	172
173	短 BG	P	荧光团 -ACCGGCGAA(T*)ACAGAGA(T*)AC CG-淬灭剂/阻断剂	173
174	ACTB	P	荧光团 -CC(A*)CC(A*)CCCAAC(N*)ACA(C* *)AATAA(C**)AAACAC-淬灭剂/阻断 剂	174
175	BG conv	I	GTTGGTGTGAGAGTGTATTG	175

[0583]

176	BG conv	I	GGAGAGTGTATTTGTGAAGGAAAT G	176
177	BG conv	I	GGAAATGATTTTTTTTATGAGATG AGTG	177
178	ACTB	P	荧光团 -CCACCACCCAACACA(N*)CAA(T*) AACAAACAC-淬灭剂/阻断剂	178
179	ACTB	P	荧光团 -CCACCACCCAACACA(N*)CAA(T*) AACAAACAC-淬灭剂/阻断剂	179
180	ACTB	P	荧光团 -CCACCACCCAACACACAA(T*)AA CAAACAC-淬灭剂/阻断剂	180
181	ACTB	I	GATGGAGGAGGTTTAGTAAGTTTT T	181
182	ACTB	I	AATAAAACCTACTCCTCCCTTAAA AA	182
183a	AKR1B1	E	CTTACCATAACTACTAC(dK)CTCC	183
183b	AKR1B1	E	CTTACCATAACTACTACRCTCC	184
184	HIST1H3C	E	GTGTGTGTTTTATTGTAAATGGT	185
185a	HIST1H3C	E	AAC(dK)ATAAC(dK)ATAAAATTTC TTCAC	186
185b	HIST1H3C	E	AACRATAACRATAAAAATTCTTCA C	187
186a	HOXB4	E	GTTTGT(dP)GGGATTTTGGGT	188
186b	HOXB4	E	GTTTGTGTYGGGATTTTGGGT	189
187a	HOXB4	E	CC(dK)AACTCC(dK)AAAAAAAAAC C	190
187b	HOXB4	E	CCRAACTCCRAAAAAAAAAACC	191
188a	RASGRF2	E	GGTATTAAG(dP)G(dP)GGTTTTTTG	192
188b	RASGRF2	E	GGTATTAAGYGYGGTTTTTTG	193
189a	RASSF1A	E	GT(dP)GTTTAGTTTGATTTTGG	194
189b	RASSF1A	E	GTGTTTAGTTTGATTTTGG	195
190	TM6SF1	E	TTTCGAAGGGTAAGCGTTAAG	196
191a	TM6SF1	E	AACATAAATAACC(dK)AAA(T*)AA CC	197
191b	TM6SF1	E	AACATAAATAACCRAAA(T*)AACC	198
192	RASGRF2	I	CGGTTTTTTGAGTAAGAAGACGGT C	199
193a	AKR1B1	P	荧光团 -TACCTTTAAA(T- 淬灭 剂)AACCC(dK)(T*)AAAA(T*)CGAC AA-淬灭剂/阻断剂	200
193b	AKR1B1	P	荧光团 -TACCTTTAAA(T- 淬灭 剂)AACCCR(T*)AAAA(T*)CGACAA- 淬灭剂/阻断剂	201

[0584]

194a	HIST1H3C	P	荧光团 -ATAACAACTACT(T*)AC(dK)CGA AAC(T*)TTAC-淬灭剂/阻断剂	202
194b	HIST1H3C	P	荧光团 -ATAACAACTACT(T*)ACRCGAAA C(T*)TTAC-淬灭剂/阻断剂	203
195a	HOXB4	P	荧光团 -AACAAACC(dK)AA(C**)GA(T*)AA C(N*)AAAAC-淬灭剂/阻断剂	204
195b	HOXB4	P	荧光团 -AACAAACCRAA(C**)GA(T*)AAC(N*)AAAAC-淬灭剂/阻断剂	205
196	RASGRF2	P	荧光团 -CACATTCTAA(T*)AAAAAAC(N*)A ACCAC(T*)TC-淬灭剂/阻断剂	206
197a	RASSF1A	P	荧光团 -AACCC(dK)AA(C**)GAAA(C- 淬灭剂)CA(C**)AAAAC-淬灭剂/阻断 剂	207
197b	RASSF1A	P	荧光团 -AACCRAA(C**)GAAA(C- 淬 灭剂)CA(C**)AAAAC-淬灭剂/阻断剂	208
198	TM6SF1	P	荧光团 -CAAAAACAC(T*)CATC(N*)CAACC GCC-淬灭剂/阻断剂	209
199	RASGRF2	E	ACAACCCTCCAAAAAATACATA	210
200	BG conv	P	荧光团 -CCAAATACCATAACCA(T*)TTTAT TAA(T*)AACAC-淬灭剂/阻断剂	211
201	BG conv	P	荧光团 -CCAAATACCATAACCA(T*)TTTAT TAA(T*)AACAC-淬灭剂/阻断剂	212
202a	TM6SF1	E	TTT(dP)GAAGGGTAAG(dP)GTAAAG	213
202b	TM6SF1	E	TTYGAAGGGTAAGYGTTAAG	214
203a	TM6SF1	E	CAACAC(dK)AAAACCCC(dK)ATA	215
203b	TM6SF1	E	CAACACRAAAACCCCRATA	216
204	KRAS Multi	E	CCTGCTGAAAATGACTGAATATAA CCGCTAAGAACCCTCTCGGTCAGCT GAT	217
205	KRAS Multi	E	CCTGCTGAAAATGACTGAATATAA AGTCTCATTATAATCGTTCGAGCT GTT	218
206	KRAS Multi	E	CCTGCTGAAAATGACTGAATATAA GCAGACTTGGCGGTAGGTCCGAGC TTG	219
207	KRAS Multi	E	CCTGCTGAAAATGACTGAATATAA GTATCCTGAGCACGGTTGCGAGCT GCT	220

[0585]

208	KRAS Multi	I	CTCTTGCCTACGCC(N*)CCGCTAA GAACCTCTCGGTC	221
209	KRAS Multi	I	CTCTTGCCTACGCC(N*)AGTCTCAT TATAATCGTTCG	222
210	KRAS Multi	I	CTCTTGCCTACGCC(N*)GCAGACTT GGCGGTAGGTCC	223
211	KRAS Multi	I	CTCTTGCCTACGCC(N*)GTATCCTG AGCACGGTTGCG	224
212	ACTB	P	荧光团 -CCACCACCCAACACACAA(T*)AA CAAACAC-淬灭剂/阻断剂	225
213	BNC1	E	CCCRCAAACCRCGAAAACCTC	226
214	BNC1	E	GTTTTTTTTTYGGGAGAGGTAAATA	227
215	ADAMTS1	E	CRCCTCCRAAACTAAAACAAC	228
216	ADAMTS1	E	GGGTTATTGTAAAGTTAGGGTG	229
217	BNC1	E	GAGGT(dP)GTGGTTTT(dP)GTAGAT	230
218	BNC1	E	AAAC(dK)CCAAAAAACTTCAAAAC	231
219	ADAMTS1	E	TTTTGTTGGGATAAGAAG(dP)GTTT	232
220	ADAMTS1	E	ACCAAAAACCTATTACAAAACCAAA	233
221	BNC1	I	CCGACGACCGACG	234
222	BNC1	I	GGGAGAGGTAAATATCGATAC	235
223	ADAMTS1	I	CGCGAAAATTAATACCTAACG	236
224	ADAMTS1	I	TTAGGGTGCGTTATCGGAC	237
225	BNC1	I	CGGAGGTGTTTGTTCGTC	238
226	BNC1	I	CGAAAAAACAACACCGACACG	239
227	ADAMTS1	I	CGTTTTCGGGGTTGAGGTAAC	240
228	ADAMTS1	I	CCAAAATACGCTACCGAACGA	241
229	BNC1	P	荧光团 -AAAAT(A*)TCT(A*)(C**)CCC(C**)(dK)CC-淬灭剂/阻断剂	242
230	ADAMTS1	P	荧光团 -TATTACTCACTCTAC(T*)CAAAAC(T*)CTCC-淬灭剂/阻断剂	243
231	BNC1	P	荧光团 -ATATCTTTTACCAACAAA(T*)ACC T(T*)CAAA-淬灭剂/阻断剂	244
232	ADAMTS1	P	荧光团 -GTTTT(dP)GTTTTGGTTGCGA(T*)G TTGT-淬灭剂/阻断剂	245
233	GSTP1	E	GGGATTTTTTAGAAGAG(dP)GGT	246
234	GSTP1	E	TACTCACTAATAAC(dK)AAAAC(T*) AC	247
235	APC	E	GGTTTTGTGTTTTATTG(dP)GGAG	248
236	APC	E	CCTAAC(dK)AACTACACCAATACA	249

[0586]

			A	
237	PTGS2	E	GAGAGGGGATTTTTTG(dP)GTTT	250
238	PTGS2	E	CC(dK)AAAACCAATTCTAAACTAA TC	251
239	GSTP1	I	TTTTTAGAAGAGCGGTCGGC	252
240	GSTP1	I	CTAATAACGAAAACCTACGACGACG	253
241	APC	I	TTGTGTTTTATTGCGGAGTG	254
242	APC	I	AACCACATATCGATCACGTACG	255
243	PTGS2	I	GCGTTTTTCGGATTTTAGGGTC	256
244	PTGS2	I	AACTAATCGCCTTAAATAAAATAC CG	257
245	GSTP1	P	荧光团 -CCTCC(dK)AACCTTA(T*)AA(N*)A AA(T*)AATCCC-淬灭剂/阻断剂	258
246	APC	P	荧光团 -AAAAAC(dK)CCCTAATCC(N*)CA(T*)CCAAC-淬灭剂/阻断剂	259
247	PTGS2	P	荧光团 -CACTTAACTTCCTC(T*)CCAAAA TC(T*)AAAC-淬灭剂/阻断剂	260
248a	MGMT	E	GTTTT(T*)AGAA(dP)G(T*)TTTG(dP) GTTT	261
248b	MGMT	E	GTTTT(T*)AGAAYG(T*)TTTGYGTT T	262
249a	MGMT	E	AAAAAAC(T*)CC(dK)CACTCTTCC	263
249b	MGMT	E	AAAAAAC(T*)CCRCACCTCTTCC	264
250	MGMT	I	TTTCGACGTTCGTAGGTTTTCGC	265
251	MGMT	I	GCACTCTTCCGAAAACGAAACG	266
252a	MGMT	P	荧光团 -CCAAACAC(T*)CACCAAATC(N*)C AAAC-淬灭剂/阻断剂	267
252b	MGMT	P	荧光团 -CCAAACAC(T*)CACCAAATC(N*)C AAAC-淬灭剂/阻断剂	268
264	BNC1	P	荧光团-ATATCTTTTACCAA(C-淬灭 剂)AAA(T*)ACCT(T*)CAAA-淬灭剂/ 阻断剂	269
265	ADAMTS1	P	荧光团 -GTTTT(dP)GTTTTGGTTGCGA(T*)G TTGT-淬灭剂/阻断剂	270
283	CDO1	E	GGAGATAA(dP)GGGGTTTTTG	271
284	CDO1	E	CACTAAAAATATACCAAC(dK)ACC	272
285	CDO1	E	GGAGAGTTATTTAAGAAAGGTGG	273
286	CDO1	E	AAAATTAC(dK)C(dK)AAACCCAC	274

[0587]

287	CDO1	I	CGTGTCGTAGGGTTTTTTCGTTTT C	275
288	CDO1	I	CCAACGACCCTCGAAAAAAAAAAC G	276
289	CDO1	I	GATTTTGCGGGTACGGTTTACGC	277
290	CDO1	I	GATCCCTAAAACGCCGAAAACAAC G	278
291	CDO1	P	荧光团 - (C*)GTTATTTTT(T- 淬灭 剂)TTGGG(T*)GGTT(T*)TTCG- 淬灭 剂/阻断剂	279
292	CDO1	P	荧光团 - C(dK)AAAAACCACC(C- 淬灭 剂)AAAAAAA(T*)AAC- 淬灭剂/阻 断剂	280
293	TAC1	E	GGATAAATAT(dP)GTAAGGTATTG AG	281
294	TAC1	E	CGAAATACTAAATTTCTCTAATTC CTC	282
295	TAC1	E	GAGTTTTTTTGGTTTTTT(dP)GAG	283
296	TAC1	E	CTAAAATAAATACC(dK)CAAAACA C	284
297	TAC1	I	CGCGTTCGGATTTTTTTTTTCGGC	285
298	TAC1	I	AAATTTCTCTAATTCCTCCGAACG CACG	286
299	TAC1	I	GCGTACGTTGGTCGTTTCGTATTTT C	287
300	TAC1	I	GCAAAACACTAAACAAACGAAAA AACGCG	288
301	TAC1	P	荧光团 -GTAGTTAT(dP)GAGAG(T*)G(N*)G GAGCGA(T*)TAG-淬灭剂/阻断剂	289
302	TAC1	P	荧光团 -CTAATC(dK)CTCCGCAC(T*)CTC(N *)A(T*)AACTAC-淬灭剂/阻断剂	290
303	SOX17	E	GTTTGGAG(dP)GTTATGAGTAG	291
304	SOX17	E	CTTCATATCCCC(dK)ATAAACTC	292
305	SOX17	E	GGGTTTTTAGTCGGTTTAGTG	293
306	SOX17	E	CTAAAAC(dK)TAAAACTC(dK)AAC C	294
307	SOX17	I	GATTTAGAGCGCGTTGTTCGC	295
308	SOX17	I	CATATCCCCGATAAACTCAACGA CTCG	296
309	SOX17	I	GTCGGTTTAGTGATATTGCGGGC	297
310	SOX17	I	CCACGACCTAAACGTAAACCTAAC G	298
311	SOX17	P	荧光团 -GATGGT(dP)GGGTTGGGTT(T*)TT	299

[0588]

			GTTTTTGG-淬灭剂/阻断剂	
312	SOX17	P	荧光团 -CCAAAAACAAAAACCCAA(C**)C CGACCATC-淬灭剂/阻断剂	300
313	CDO1	P	荧光团 (C*)GTATATTTT(dP)GGTT(T*)TTT(N*)GGGT(T*)TCG-淬灭剂/阻断剂	301
314	CDO1	P	荧光团 -C(dK)AAACC(C**)GAAAAAA(C**)C(N*)AAAATATAC-淬灭剂/阻断剂	302
315	TAC1	P	荧光团 -GGTAGTTGT(dP)G(T*)CGGGAAGG AGGTTCG-淬灭剂/阻断剂	303
316	TAC1	P	荧光团 -C(dK)AACCTCCTCCCGAC(N*)AC AAC(T*)ACC-淬灭剂/阻断剂	304
317	SOX17	P	荧光团 -GGTTTTTTTGTGTA(T*)AGATGTGG T(T*)AATGG-淬灭剂/阻断剂	305
318	SOX17	P	荧光团 -CCATTAACCACA(T*)CTA(T*)ACA AAAAAAACC-淬灭剂/阻断剂	306
319	SOX17	E	GGTTTGGTTATAG(dP)GTATTTAG G	307
320	ACTB	I	GAGGTTTAG(T*)AAGTTTTTTGGAT TGTG	308
321	ACTB	I	CCCTTAAAAAT(T*)ACAAAAACCA CAAC	309
322	BRCA1	E	GTAGATTGGGTGGTTAATTTAGAG	310
323	BRCA1	E	CTATAATTCCC(dK)C(dK)CTTTC	311
324	BRCA1	I	GGTGGTTAATTTAGAGTTTCGAGA GAC	312
325	BRCA1	I	CGTTACCACGAAAACCAAAAAACT ACCG	313
326	BRCA1	P	荧光团 -GATTCGTATTT(T*)GAGAGG(T*) TGTGTTTAG-淬灭剂/阻断剂	314
327	BRCA1	P	荧光团 -CTAAACAACAACC(T*)CTCAAAA(T*) ACGAAATC-淬灭剂/阻断剂	315
328	BRCA1	E	GGTAGATTGGGTGGTTAATTTAGA G	316
329	BRCA1	E	CCAAAAAATCTCAACRAACTC	317
330	BRCA1	I	GGGTGGTTAATTTAGAGTTTCGAG AGAC	318
331	BRCA1	I	ACCACGAAAACCAAAAAACTACC	319

[0589]

			G	
336	MGMT	E	GGGATTTTGTTTAAGTATGTTAAA GG	320
337	MGMT	E	CCTACCTTACCTCTAAATACCAAC C	321
338	MGMT	I	GTATGTTAAAGGGTTGTTGTAAGT TAAGG	322
339	MGMT	I	CCTCTAAATACCAACCCCAAACC	323
340	MGMT	P	荧光团 -CCAAC(T*)ACTC(C- 淬灭剂)AAAAAACTTCCAAAAACC- 淬灭剂/阻断剂	324
341	MGMT	P	荧光团 -CCAAC(T*)ACTC(C- 淬灭剂)AAAAAACT(T*)TCCAAAAACC- 淬灭剂/阻断剂	325
342	MGMT	I	GTATGTTAAAGGGTTGT(T*)GTAA GTTAAGG	326
343	MGMT	I	CCTCTAAATACCAA(C**)CCCAAA CC	327
380	ACTB	P	荧光团 -CCACCACCCAACACACAA(T*)AA CAAACAC-淬灭剂/阻断剂	328
381	ACTB	P	荧光团 -CCACCACCCAACACACAA(T*)AA CAAACAC-淬灭剂/阻断剂	329
382	SOX17	I	ATTTAGAGCGCGTTGTTTCGC	330
383	SOX17	I	ATATCCCCGATAAAACTCAACGAC TCG	331
384	SOX17	I	TATCCCCGATAAAACTCAACGACT CG	332
385	SOX17	I	ATCCCCGATAAAACTCAACGACTC G	333
386	TAC1	I	GCGTTCGGATTTTTTTTTCGGC	334
387	TAC1	I	TTTCTCTAATTCCTCCGAACGCAC G	335
388	TAC1	I	CTCTAATTCCTCCGAACGCACG	336
389	SOX17	I	GTGACGATTAGAGTTAGATTTAGA GCGC	337
390	TAC1	P	荧光团 -GTAGTTATCGAGAG(T*)GCGGAGC GA(T*)TAG-淬灭剂/阻断剂	338
391	SOX17	P	荧光团 -CCAACCCGACCATCACCGCGAAC AAC-淬灭剂/阻断剂	339
392	BG 转化的	I	GGAGAGTGTATTTG(T*)GAAGGAA ATG	340
393	BG 转化的	I	CATACATACACCAAACAA(T*)TCA	341

[0590]

			TTC	
394	BG 转化的	P	荧光团 -CCAAATACCA(T*)AACCATTTTAT TAA(T*)AACAC-淬灭剂/阻断剂	342
395	BG 转化的	P	荧光团 -CCAAATACCA(T*)AACCATTTTAT TAA(T*)AACAC-淬灭剂/阻断剂	343
396	GSTP1 (Fwd)	E	GGTTTYGTTGGGGATTG	344
397	GSTP1 (Fwd)	E	ACCRCTCTTCTAAAAAATCC	345
398	GSTP1 (Fwd)	I	AGGTTTTTTTCGGTTAGTTGCGC	346
399	GSTP1 (Fwd)	I	AACGTCGACCGCAAAAAACG	347
400	GSTP1 (Fwd)	P	荧光团 - (C*)GCGAT(T*)T(C- 淬灭剂)GGGGA(T*)T(T*)TAGG-淬灭剂/阻断剂	348
401	GSTP1 (Fwd)	P	荧光团 -CC(T*)AAAA(T*)C(C- 淬灭剂)CCGAAA(T*)CGC-淬灭剂/阻断剂	349
402	APC (Fwd)	E	GAAGTAGTTGTGTAATTYGTTGG	350
403	APC (Fwd)	E	CACCCTAACRAACTACACC	351
404	APC (Fwd)	I	TGCGGATTAGGGCGTTTTTTATTTT C	352
405	APC (Fwd)	I	TACAACCACATATCGATCACGTAC G	353
406	APC (Fwd)	P	荧光团 -GGAGTTCGTCGA(T*)TGG(T*)TGG G-淬灭剂/阻断剂	354
407	APC (Fwd)	P	荧光团 -CCCAACCAA(T*)CGACGAAC(T*)C C-淬灭剂/阻断剂	355
408	EYA4 (Fwd)	E	GAGTTTTTYGGAGGGTTATAG	356
409	EYA4 (Fwd)	E	CAAACTACAAAAAACATTCAATCC	357
410	EYA4 (Fwd)	I	GCGTTTGGGTTTTTTTCGGTGTC	358
411	EYA4 (Fwd)	I	ATCGCCGCAATTAAAAAACCCG	359
412	EYA4 (Fwd)	P	荧光团 -GGTTCGCGTTTTTAAT(T*)TTTAGG(T*)ATTG-淬灭剂/阻断剂	360
413	EYA4 (Fwd)	P	荧光团 -CAATACC(T*)AAAAAT(T*)AAAAC GCGAACC-淬灭剂/阻断剂	361
414	OLIG2(Fwd)	E	GTTATGGATTYGGAYGTTAG	362
415	OLIG2(Fwd)	E	CTCCRACRAACAATCACTC	363
416	OLIG2(Fwd)	I	GTTTGGTGTTTAG(T*)CGTTCGTC	364
417	OLIG2(Fwd)	I	CACTCGAAATAAA(C**)GAAAACA CG	365
418	OLIG2(Fwd)	P	荧光团	366

[0591]

			-GGTAGTAGCGG(T*)AGCGTT(T*)T TATTG-淬灭剂/阻断剂	
419	OLIG2(Fwd)	P	荧光团 -CAATAAAAACGC(T*)ACCGC(T*)A CTACC-淬灭剂/阻断剂	367
420	ADAMTS12(Fwd)	E	GGYGTAGTTTATTTYGGTT	368
421	ADAMTS12(Fwd)	E	ATTTAACCRACRACCAAC	369
422	ADAMTS12(Fwd)	I	GTATGTTTCGCGGTTTCGTAGTTC	370
423	ADAMTS12(Fwd)	I	ACTAAACCTAACG(T*)TCGAAACG	371
424	ADAMTS12(Fwd)	P	荧光团 - (C*)GTTCGTTTCGG(T- 淬灭剂) G(T*)ATTTTTT(T*)TTCGG- 淬灭剂/阻断剂	372
425	ADAMTS12(Fwd)	P	荧光团 -CCGAAAAAAAAA(T- 淬灭剂) A(C**)ACCGAA(C**)GAAC- 淬灭剂/阻断剂	373
426	POU4F1(Fwd)	E	GTTTGAGTTGTTTTGATTTTAGTG	374
427	POU4F1(Fwd)	E	CTCCAACCTCAACTCTAAAC	375
428	POU4F1(Fwd)	I	GATTTTAGTGTCGCGTATTTTGGTTC	376
429	POU4F1(Fwd)	I	CTAAACTAAATCCCGCGAACCTCG	377
430	POU4F1(Fwd)	P	荧光团 -GGTTTTAT(T*)GGGGGTT(N*)AT(T*) TCGGGTAG-淬灭剂/阻断剂	378
431	POU4F1(Fwd)	P	荧光团 -CTACCCGAAATAACCC(C**)CAA(N*) TAAAA(C**)C-淬灭剂/阻断剂	379
432	ABCB1(Fwd)	E	GGTTTTTAGTATTTTAYGAAGGT	380
433	ABCB1(Fwd)	E	CRATACRAAAACCTACTCTCTA	381
434	ABCB1(Fwd)	I	TTTGGATTTTGTTCGTCGTTAGTGC	382
435	ABCB1(Fwd)	I	CTACTCTCTAAACCCGCGAACG	383
436	ABCB1(Fwd)	P	荧光团 -GGTTTTAGTCG(T*)CGCGGACGATGT- 淬灭剂/阻断剂	384
437	ABCB1(Fwd)	P	荧光团 -ACATCGTCCGCGACGAC(T*)AAACC- 淬灭剂/阻断剂	385
438	SOX17	I	GAGTTAGATTTAGAGCGCGTTGTTTC	386
439	TAC1	I	GAGCGCGTTTCGGATTTTTTTTTC	387

[0592] 注意到这些引物和探针鉴定各荧光团和淬灭剂的位置。然而,应了解,具体的荧光团和淬灭剂是说明性和非限制性的,并且许多扩增和/或检测策略可用于本文所述的盒。因此,在各实施方案中,本文所述方法和装置可使用许多不同的核酸杂交探针。通常,为了产

生信号,探针利用由于荧光团与另一分子或基团的相互作用的变化而导致的荧光团的荧光变化,所述相互作用的变化由荧光团和相互作用的分子或基团之间的距离改变而产生。或者,包括其他检测样品中多核苷酸的方法,包括但不限于使用放射性标记的探针。

[0593] 基于荧光的测定通常依赖于荧光共振能量转移(或“FRET”)的信号产生,据此,荧光的变化由第一荧光团与相互作用的共振能量受体或另一个荧光团或淬灭剂相隔的距离的变化而引起。荧光团和相互作用的分子或基团(包括淬灭分子或基团)的组合被称为“FRET对”。FRET对相互作用的机制通常需要所述对的一个成员的吸收光谱与另一成员(第一荧光团)的发射光谱重叠。如果相互作用的分子或基团是淬灭剂,其吸收光谱通常与荧光团的发射光谱重叠(参见例如Stryer(1978) *Ann. Rev. Biochem.* 47:819-846; Selvin(1995) *Meth. Enzymol.* 246:300-335等)。有效的FRET相互作用通常在所述对的吸收光谱和发射光谱大范围重叠时实现。FRET相互作用的效率与该重叠呈线性比例。通常,需要大量信号(即高度重叠)。因此,通常在此基础上选择FRET对,包括荧光团-淬灭剂对。

[0594] 许多标记的核酸杂交探针和利用FRET和FRET对的检测测定是已知的。一个这样的方案记载于Cardullo等人(1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85:8790-8794和Heller等人EP 0070685中。它使用的探针包含与靶DNA链的连续区域互补的寡脱氧核苷酸对。一个探针分子在其5'端包含荧光标记物——荧光团,另一个探针分子在其3'端包含不同的荧光标记物——也是荧光团。当探针与靶序列杂交时,所述两种标记物彼此非常靠近。当样品被适当频率的光刺激时,发生从一个标记物到另一个标记物的荧光共振能量转移。FRET产生来自标记物的光谱响应的可测量的变化,这是靶标存在的信号。一个标记物可以是“淬灭剂”,其尤其可以是释放作为热量被接受的能量的相互作用的基团(或分子)。

[0595] 另一种利用FRET对的核酸杂交探针测定类型是“**TaqMan®**”测定,如Gelfand等人美国专利No. 5,210,015和Livak等人美国专利No. 5,538,848中所述。探针通常是用FRET对标记的单链寡核苷酸。在**TaqMan®**测定中,DNA聚合酶通过在寡核苷酸探针与靶链杂交时裂解寡核苷酸探针而释放单个或多个核苷酸。该释放提供了一种方式以将FRET对的淬灭剂标记物和荧光团标记物分开。

[0596] 在某些实施方案中,也可使用非FRET荧光探针,例如Tyagi等人美国专利No. 6,150,097中记载的那些。例如,Tyagi等人的专利描述了如何将标记物对的吸收光谱的变化用作可检测信号,作为荧光变化的替代物。当利用吸收的变化时,标记物对可包括任意两个生色团,即荧光团、淬灭剂和其他生色团。标记物对甚至可以是相同的生色团。

[0597] 在一些实施方案中,将染料和其他基团(例如淬灭剂)引入用于本文所述方法和盒的引物和/或探针。在某些实施方案中,这类染料和淬灭剂包括但不限于适于用作FRET探针的染料(荧光团)。在某些实施方案中,染料和/或淬灭剂包括经修饰的核苷酸。“经修饰的核苷酸”是指已被化学修饰,但是仍作为核苷酸发挥作用的核苷酸。在一些实施方案中,经修饰的核苷酸具有共价连接的化学基团(例如染料或淬灭剂),并且可被引入到多核苷酸中,例如通过多核苷酸的固相合成引入。在一些实施方案中,经修饰的核苷酸包括一个或多个反应基团,其在所述经修饰的核苷酸掺入到核酸中之前、过程中或之后可以与染料或淬灭剂反应。在一些实施方案中,经修饰的核苷酸是胺修饰的核苷酸,即已被修饰而具有反应性胺基的核苷酸。在一些实施方案中,经修饰的核苷酸包括经修饰的碱基部分,例如尿苷、腺苷、鸟苷和/或胞苷。在一些实施方案中,胺修饰的核苷酸选自5-(3-氨基烯丙基)-UTP、8-

[(4-氨基) 丁基]-氨基-ATP和8-[(6-氨基) 丁基]-氨基-ATP、N6-(4-氨基) 丁基-ATP、N6-(6-氨基) 丁基-ATP、N4-[2,2-氧基-二-(乙胺)]-CTP、N6-(6-氨基) 己基-ATP、8-[(6-氨基) 己基]-氨基-ATP、5-炔丙基氨基-CTP、5-炔丙基氨基-UTP。在一些实施方案中,对具有不同核碱基部分的核苷酸进行类似修饰,例如以5-(3-氨基烯丙基)-GTP替换5-(3-氨基烯丙基)-UTP。许多胺修饰的核苷酸是市售可得的,可获自例如Applied Biosystems, Sigma, Jena Bioscience和TriLink。适合的荧光团的说明性但非限制性的列表示于表6。

[0598] 表6. 用于本文所述的引物和/或探针的说明性但非限制性的荧光团(荧光标记物)。

[0599]

染料	吸收波长	发射波长
Alexa fluor	345	442
Alexa fluor 430	430	545
Alexa fluor 488	494	517
Alexa fluor 532	530	555
Alexa fluor 546	556	573
Alexa fluor 555	556	573
Alexa fluor 568	578	603
Alexa fluor 594	590	617
Alexa fluor 633	621	639
Alexa fluor 633	650	668
Alexa fluor 660	663	690
Alexa fluor 680	679	702
别藻蓝蛋白	650	660
氨基香豆素	350	445
Cy2	490	510
Cy3	550	570
Cy3.5 581	581	596
Cy5	650	670
Cy5.5	675	694
Cy7	743	770
FAM	495	516
荧光素FITC	495	518
HEX	535	556
羟基香豆素	325	386
甲氧基香豆素	360	410
Red 613	480;565	613
罗丹明红-X	560	580
Rox	575	602
R-藻红蛋白(PE)	480;565	578

Tamara	565	580
德克萨斯红	615	615
TRITC	547	572
TruRed	490;675	695

[0600] 如果设计试验以检测一种靶DNA序列,则仅需要使用一种荧光杂交探针,在某些实施方案中,FAM、TET或HEX(或表7中列出的它们的替代物之一)将是标记探针的良好的荧光团。这些荧光团在各种光谱荧光测定热循环仪中易于被激发和检测。此外,由于这些荧光团的亚磷酰胺衍生物的可用性和淬灭剂连接的对照-孔玻璃柱的可用性,具有这些标记物的荧光杂交探针可以全部在自动化DNA合成过程中合成,优势为相对廉价和相对省工的探针制备。

[0601] 表7.用于荧光杂交探针的另外的说明性荧光团标记物

[0602]

荧光团	其他的荧光团	激发 (nm)	发射 (nm)
Cy3 ³	NED ² 、Quasar 570 ¹ 、Oyster 556 ⁴	550	570
Cy5 ³	LC red 670 ⁵ 、Quasar 670 ¹ 、Oyster 645 ⁴	650	670
HEX	JOE、VIC ^B 、CAL Fluor Orange 560 ¹	535	555
LC red 640 ⁵	CAL Fluor Red 635 ^A	625	640
LC red 705 ⁵	Cy5.5 ³	680	710
ROX	LC red 610 ⁵ 、CAL Fluor Red 610 ¹	575	605
TET	CAL Fluor Gold 540 ¹	525	540
Texas red	LC red 610 ⁵ 、CAL Fluor Red 610 ¹	585	605
TMR	CAL Fluor Red 590 ¹	555	575

¹⁾CAL 和 Quasar 荧光团可获自 Biosearch Technologies; ²⁾VIC 和 NED 可获自 Applied Biosystems; ³⁾Cy 染料可获自 Amersham Biosciences; ⁴⁾Oyster 荧光团可获自 Integrated DNA Technologies; 和 ⁵⁾LC (光循环仪) 荧光团可获自 Roche Applied Science.

[0603] 在某些实施方案中,在单个多路反应中检测多种靶基因。在一些实施方案中,每种靶向不同基因的探针在光谱上可与在多路反应中使用的其他探针区分(可检测地不同)。适于多路检测的探针组合是本领域技术人员已知的。例如,四靶标多路系统中可检测地不同的荧光团的说明性组合包括但不限于:

[0604] 1) FAM、TMR、德克萨斯红和Cy5;

[0605] 2) FAM、TET、TMR和德克萨斯红;

[0606] 3) FAM、HEX、德克萨斯红和Cy5;以及

[0607] 4) FAM、Cy3、德克萨斯红和Cy5。

[0608] 五靶标多路系统中可检测地不同的荧光团的说明性组合为FAM、TET、TMR、德克萨斯红和Cy5。六靶标多路系统中可检测地不同的荧光团的说明性组合包括但不限于:

[0609] 1) FAM、TET、HEX、TMR、ROX和德克萨斯红;以及

[0610] 2) FAM、HEX、LC红610、LC红640、LC红670和LC红705。

[0611] 应理解,这些荧光团的组合物是说明性和非限制性的,并且许多其他荧光团将是本领域技术人员可获得的。

[0612] 如上文所述,为了设计利用荧光共振能量转移(FRET)的荧光杂交探针,应当选择具有足够光谱重叠的荧光团-淬灭剂对。发射最大值为500至550nm的荧光团(例如FAM、TET和HEX)最佳地被吸收最大值为450至550nm的淬灭剂(例如dabcyl、BHQ-1等)淬灭(参见例如表8中的说明性淬灭剂标记物)。发射最大值高于550nm的荧光团(例如罗丹明)(包括TMR、ROX和德克萨斯红)和Cy染料(包括Cy3和Cy5)有效地被吸收最大值高于550nm的淬灭剂(包括BHQ-2)淬灭。

[0613] 为了设计利用接触淬灭的荧光杂交探针,任何非荧光淬灭剂可充当来自荧光团的能量的良好受体。例如,Cy3和Cy5有效地被BHQ-1和BHQ-2淬灭剂淬灭。

[0614] 表8. 荧光杂交探针的说明性淬灭剂标记物

淬灭剂	吸收最大值 (nm)
BHQ-1 ⁴	534
BHQ-2 ⁴	580
BHQ-3 ⁴	670
Dabcyl	475
DDQ-I ¹	430
DDQ-II ¹	630
Eclipse ²	530
Iowa Black FQ ³	532
Iowa Black RQ ³	645
QSY-21 ⁵	660
QSY-7 ⁵	571
¹)DDQ 或 Deep Dark 淬灭剂可获自 Eurogentec; ²)Eclipse 淬灭剂可获	
自 Epoch Biosciences; ³)Iowa 淬灭剂可获自 Integrated DNA	
Technologies; ⁴)BHQ 或 Black Hole 淬灭剂可获自 Biosearch	
Technologies; 和 ⁵)QSY 淬灭剂可获自 Molecular Probes。	

[0617] 在某些实施方案中,核苷酸能够淬灭荧光团的荧光,鸟苷为最有效的淬灭剂,然后是腺苷、胞苷和胸苷。通常,激发波长为500至550nm的荧光团更有效地被具有比荧光团更长激发波长的核苷酸淬灭。在设计荧光杂交探针时,需要避免将荧光团标记物直接置于尿苷旁边,以保证来自荧光团的更高的荧光信号。

[0618] 通过接触淬灭相互作用的一些荧光团-淬灭剂的稳定作用可对杂交探针的设计产生重要影响(参见例如Marras等人(2002) Nucleic Acids Res.30:e122;Johansson等人(2002) J. Am. Chem. Soc.124:6950-6956)。例如,已观察到用被BHQ-1或BHQ-2淬灭的荧光团标记的杂交探针与具有相同探针序列但是用被dabcyl淬灭的荧光团标记的杂交探针相比,

显示出杂交熔解温度升高约4℃。还注意到,在Cy染料Cy3和Cy5以及Black Hole淬灭剂BHQ-1和BHQ-2之间观察到强亲和力。

[0619] 鉴于上文所述和本文提供的实施例和教导,可获得多种引物/探针组合,以用于本文所述的方法和盒。

[0620] 用于DNA甲基化分析的盒、模块和系统

[0621] 在某些实施方案中,提供了用于实施本文所述方法(例如测定DNA甲基化和任选的RNA表达)的盒。在某些实施方案中,所述盒包括含有第一基质材料的柱、样品接收室、温度控制的通道或室、多个包含试剂和/或缓冲液的室,并且在使用时所述室中至少一个包含DNA转化试剂(例如DABSO和/或亚硫酸氢盐试剂),并且所述室中至少一个包含脱磺酸基/洗脱缓冲液,并且其中所述盒任选地包括含有所述第二基质材料的第二柱。在某些实施方案中,对所述盒进行配置,从而在使用时所述盒包括含有包括硫氰酸胍乙醇(GTC-EtOH)的试剂的室。在某些实施方案中,第二柱不存在,而在其他实施方案中,第二柱存在。在某些实施方案中,温度控制的通道或室可仅为加热通道或室,或者可以为热循环通道或室。在某些实施方案中,所述盒还包括第二加热通道或室(例如第二热循环通道或室)。在某些实施方案中,对所述盒进行配置,从而DNA转化步骤(例如亚硫酸氢盐孵育)和/或脱磺酸基步骤发生在相同的反应管或室中,在其中之后进行一种或多种PCR反应。

[0622] 在某些实施方案中,将亚硫酸氢盐试剂作为所述盒的组分提供。在某些其他实施方案中,在将样品置于盒中时或接近将样品置于盒中时,为待被添加到盒中的亚硫酸氢盐试剂对所述盒进行配置。在某些情况下,将亚硫酸氢盐试剂直接添加到盒中的室中,而在其他实施方案中,将亚硫酸氢盐试剂引入盒上的加样口(例如注射口)以将亚硫酸氢盐试剂引入到盒中。在某些实施方案中,通过操作所述盒的系统(例如处理模块)将亚硫酸氢盐试剂引入盒中,同时操作所述盒以测定DNA甲基化。

[0623] 在某些实施方案中,将包含硫氰酸胍的试剂(例如GTC-EtOH)作为所述盒的组分提供。在某些实施方案中,在将样品置于盒中时或接近将样品置于盒中时,为待被添加到盒中的包含硫氰酸胍的试剂对所述盒进行配置。在某些情况下,将包含硫氰酸胍的试剂直接添加到盒中的室中,而在其他实施方案中,将包含硫氰酸胍的试剂引入盒上的加样口(例如注射口)以将亚硫酸氢盐试剂引入到盒中。在某些实施方案中,通过操作所述盒的系统(例如处理模块)将包含硫氰酸胍的试剂引入盒中,同时操作所述盒以测定DNA甲基化。

[0624] 在各说明性但非限制性的实施方案中,转化试剂(例如亚硫酸氢盐试剂)包括选自偏亚硫酸氢钠、亚硫酸氢钾、亚硫酸氢铯、DABSO和亚硫酸氢铵的化合物。在某些实施方案中,所述亚硫酸氢盐在试剂混合物中提供,所述试剂混合物包括防止亚硫酸盐氧化的清除剂(例如Trolox和氢醌等)和/或催化剂。在某些实施方案中,所述亚硫酸氢盐在试剂混合物中提供,所述试剂混合物包括作为催化剂的聚胺。

[0625] 在各实施方案中,当所述第一基质材料和/或所述第二基质材料存在时,其包括选自玻璃或二氧化硅、离子交换树脂和羟基磷灰石的材料。

[0626] 在各实施方案中,所述盒包括一个或多个室(例如1个室、2个室、3个室、4个室等),各室分别包含一种或多种选自甲基化特异性PCR引物、甲基化特异性PCR探针、PCR酶(例如聚合酶)、逆转录酶和PCR反应缓冲液的试剂。

[0627] 在某些实施方案中,所述盒包含一个或多个室,其包含特异性针对亚硫酸氢盐转

化的甲基化序列和/或未甲基化的序列的引物。在某些实施方案中,所述盒包括一个或多个室,其含有用于MethyLight PCR方案的引物和探针。在某些实施方案中,所述盒包括一个或多个含有TaqMan PCR反应试剂的室。在某些实施方案中,所述盒包括一个或多个室,其含有一种或多种为扩增的甲基化序列的标记物的荧光探针和/或一种或多种为扩增的未甲基化的序列的标记物的荧光探针。在某些实施方案中,探针包含荧光报告染料和淬灭剂染料,在该染料处所述探针在经Taq DNA聚合酶的5'至3'核酸酶活性裂解时提供信号。在某些实施方案中,所述盒包括多个探针,其分别特异性针对目的扩增区域中不同的甲基化区域。在某些实施方案中,所述盒包括单一探针,其特异性针对目的扩增区域中的甲基化区域。在某些实施方案中,所述盒包括多个探针,其分别特异性针对目的扩增区域中相同的甲基化区域。

[0628] 说明性引物和探针包括但不限于用于测定选自以下的基因的启动子区的甲基化的引物和/或探针:APC、ARF、CDKN2B、CDKN2A、BRCA1、VLH、hMLH1、MGMT、RASSF1A、ADAMTS1、BNC1、HIST1H3C、HOXB4、RASGRF2、TM6SF1、AKR1B1、HIST1H4F、PCDHGB6、NPBWR1、ALX1和HOXA9。在某些实施方案中,选择引物和/或探针以测定选自以下的基因的启动子区的甲基化:MGMT、RASSF1A、ADAMTS1、BNC1、HIST1H3C、HOXB4、RASGRF2、TM6SF1和AKR1B1。在各实施方案中,将PCR引物和/或探针和/或酶提供为珠,例如美国专利公开No.2006/0068399中所述,该专利因其中记载的珠和珠制剂而以引用的方式纳入本文。

[0629] 在各实施方案中,配置所述盒以使样品接收室、所述柱、多个室和温度控制通道或室选择性地处于流体连通中。在某些实施方案中,通过微流体通道和阀提供选择性的流体连通。在某些实施方案中,通过提供排列在中央阀的周围并且选择性地处于与所述中央阀中的通道的流体连通中的样品接收室、所述柱、所述多个室、热通道或室或进入热通道或室的端口,来提供选择性的流体连通。

[0630] 在某些实施方案中,配置所述盒,从而在使用时所述盒包括:含有样品的第一室;含有硫代硫酸胍-乙醇(GTC-EtOH)溶液的第三室;含有亚硫酸氢盐试剂的第三室;含有缓冲液的第四室;含有冲洗溶液的第五室;和含有洗脱/脱磺酸基试剂的第六室。在某些实施方案中,所述盒包括含有PCR引物和/或探针和/或PCR酶的第七室。在某些实施方案中,所述盒包括也含有PCR引物和/或探针和/或PCR酶的第八室。

[0631] 图1A、1B和2说明了适于实施本文所述方法的一个盒。被说明的盒是基于**GENEXPERT®**盒(Cepheid, Inc., Sunnyvale, CA)。如图2, A部分所示,盒200包括箱体202,其含有多个试剂和/或缓冲液室208。所述室排列在中央注射筒206的周围,该中央注射筒与阀体210(B部分和图1B)处于流体连通中并且用垫圈204密封。阀体210可包括帽212,并且整个箱体可被支撑在盒基座226上。可操作“柱塞”(未示出)以将流体引入注射筒206,并且注射筒206和连接的阀体212的旋转提供了室208和腔214之间的选择性流体连通,所述腔214可包含本文所述的基质材料并且作为柱发挥作用。在各实施方案中,所述盒还包括一个或多个温度控制的通道或室216,在某些实施方案中,所述室216能够作为热循环室发挥作用。温度控制的通道或室还选择性地与腔214和/或室208处于流体连通中。如图1A所示,在某些实施方案中,所述盒提供了光学窗口,以提供例如扩增产物、测序操作中的碱基同一性等的实时检测。

[0632] 在某些实施方案中,配置盒200以插入到反应模块300中,例如图3A所示。如图3B中所说明的,配置所述模块以接收盒200。在某些实施方案中,反应模块提供了加热板308以加

热温度控制的室或通道。当温度控制的通道或室是热循环通道或室时,所述模块可任选地还包括风扇304以提供冷却。可提供电子电路302以传输信息(例如光学信息)到计算机,用于分析。在某些实施方案中,所述模块可包含光学区块306以提供一种或多种(例如1、2、3、4或多种)光学信号的激发和/或检测,所述光学信号代表例如多种核酸靶标。在各实施方案中,可提供电连接器312,用于将所述模块与系统(例如系统控制器)或与分离的分析/控制器单元相互连接。如图3B所说明,可使用移液管310将样品引入盒中。

[0633] 在某些实施方案中,所述模块还包含操作注射筒中的柱塞和阀体旋转的控制器。

[0634] 在某些实施方案中,提供了系统(例如处理单元)。一个说明性但非限制性的实施方案示于图3C中。在某些实施方案中,处理单元包括经配置以包含一个或多个样品处理模块的附件,其中各处理模块经配置以盛放和操作本文所述的可移动盒。在某些实施方案中,所述系统经配置以操作所述样品处理模块在相应的可移动样品盒内进行样品处理,以测定一种或多种靶核酸的甲基化并任选地测定一种或多种靶RNA/DNA序列的水平,其中在相应的可移动样品盒内对样品的处理实施本文所述的方法。在某些实施方案中,所述系统经配置以包含一个样品处理模块。在某些实施方案中,所述系统经配置以包含至少2个样品处理模块,或至少4个样品处理模块,或至少8个样品处理模块,或至少12个样品处理模块,或至少16个样品处理模块,或至少20个样品处理模块,或至少24个样品处理模块,或至少28个样品处理模块,或至少32个样品处理模块,或至少64个样品处理模块,或至少128个样品处理模块。在某些实施方案中,所述系统提供了用户界面,其允许用户输入操作指令和/或监测盒的操作以测定DNA甲基化。

[0635] 尽管本文所述的方法主要就Cepheid Inc. (Sunnyvale, CA) 的 **GENEXPERT®** 盒来描述(参见例如图1A),应了解,根据本文提供的教导,所述方法可在其他盒/微流体系统上实施。这类盒/微流体系统可包括例如使用软光刻法来实施的微流体系统,使用硬光刻法来实施的微米/纳米组装(fabricated)的微流体系统,等等。

[0636] 高体积样品制备(HVSP)盒

[0637] 在各实施方案中,提供了用于制备大样品体积的盒。在某些实施方案中,样品制备盒包括经修饰用于高体积样品制备的**GENEXPERT®**盒(例如,如图20所示)。在某些实施方案中,例如当所述盒基于**GENEXPERT®**盒时,其包括一个或多个含有结合DNA的亲基质通道或室,多个排列在中央阀组件的周围并且选择性地处于与所述中央阀组件的流体连通中的室,其中所述中央阀组件经配置以适应柱塞,所述柱塞能够将流体引入或引出与所述中央阀处于流体连通的室,其中所述多个室包括至少两个不同的室,其分别经配置以接收最高达约4mL(或最高达约5mL)的样品溶液(在某些实施方案中,室2的最大容积为约4mL,而室3的最大容积为约4.5mL),包含PEG(例如PEG200)的室,包含碱性溶液(例如KOH溶液)的室,以及包含缓冲液(例如Tris)的室。在某些实施方案中,多个室包括至少3个不同的室,其分别经配置以接收最高达约4mL(或最高达约5mL)的样品溶液。在某些实施方案中,多个室包括包含洗涤溶液(例如GTC-乙醇洗涤溶液,其通常为1.25M硫氰酸胍、25mM Tris pH 7.0、50%乙醇)的室。在某些实施方案中,所述盒包括经配置用于移除处理的样品的室。在某些实施方案中,样品室在使用时包含样品溶液、GTC和醇(例如异丙醇)。在某些实施方案中,样品室在使用时包含基本上等体积的样品溶液、GTC和醇。在某些实施方案中,所述盒在使用时包含4mL样品溶液、GTC和异丙醇,其被置于每个所述经配置以接收样品的室

中。在某些实施方案中,所述盒提供DNA或RNA回收,其基本上相对于0.5mL至约4mL样品的样品体积呈线性。

[0638] 在某些实施方案中,HVSP盒经配置以进行DNA转化(例如亚硫酸氢盐转化),从而提供甲基化分析。因此在某些实施方案中,HVSP盒经配置以包含或在使用前立即或不久接收转化试剂(例如亚硫酸氢盐试剂、DABSO等)。在某些实施方案中,HVSP盒可经配置而还包含用于且提供转化DNA的脱磺酸基的试剂。或者,在某些实施方案中,转化在HVSP盒中进行,而脱磺酸基和甲基化分析(例如PCR)在第二盒中进行(例如,如图20B中所示的操作流程图中所说明的)。

[0639] cfDNA样品制备盒

[0640] 在某些实施方案中,提供了样品制备盒,其特别适用于从血浆或血清中制备核酸(并任选地进行分析)。一个说明性但非限制性的实施方案示于图17中。如某些实施方案中所说明的,所述盒包括含有结合DNA的亲基质通道或室,多个排列在中央阀组件的周围并且选择性地处于与所述中央阀组件的流体连通中的室,其中所述中央阀经配置以适应柱塞,所述柱塞能够将流体引入或引出与所述中央阀处于流体连通的室,其中所述多个室包括:经配置以接收最高达约5mL或最高达约4mL的样品溶液的室;包含PEG(例如PEG200)的室;包含GTC-EtOH的室;包含碱性溶液(例如KOH溶液)的室;以及包含缓冲液(例如Tris)的室。在某些实施方案中,所述多个室还包括含有转化试剂(例如亚硫酸氢盐试剂)的室。在某些实施方案中,所述多个室包括含有洗涤溶液(例如GTC-乙醇洗涤液(通常为1.25M硫氰酸胍、25mM Tris pH 7.0、50%乙醇))的室。在某些实施方案中,所述多个室包括含有珠的室,所述珠包含一种或多种PCR引物和/或探针。在某些实施方案中,含有PEG的室包含约1mL PEG。在某些实施方案中,含有碱性溶液的室包含约500μL溶液。在某些实施方案中,含有GTC-EtOH的室包含约2mL GTC-EtOH。在某些实施方案中,含有缓冲液的室包含约2mL缓冲液。

[0641] 应了解,这种配置是说明性的,并且使用本文提供的教导,多种其他制备盒配置是本领域技术人员可获得的。

[0642] DABSO作为亚硫酸氢盐替代物的用途

[0643] 出乎意料地发现,DABSO可以以使用亚硫酸氢盐用于DNA转化和甲基化检测类似的方式用于进行DNA转化。因此,在某些实施方案中,提供了使用DABSO来将DNA中的胞嘧啶残基转化为尿嘧啶,同时使5-甲基胞嘧啶残基基本上不受影响的方法。在某些实施方案中,所述方法包括将包含DNA的样品与DABSO接触以转化DNA,以及将转化的DNA脱磺酸基以产生这样的DNA,其中胞嘧啶残基转化为尿嘧啶,但是5-甲基胞嘧啶残基基本上不受影响。在某些实施方案中,以约2M至最高达约5M的浓度提供DABSO。在某些实施方案中,以约2.5M的浓度提供DABSO。在某些实施方案中,将DABSO溶解于碱性水溶液(例如KOH溶液)中。在某些实施方案中,包含DABSO的试剂包含溶解于含KOH的溶液中的DABSO。

[0644] 在某些实施方案中,所述方法包括加热DABSO/DNA溶液至温度约55℃至约90℃。在某些实施方案中,使DABSO与DNA反应,持续约15分钟至最高达约90分钟。DNA被转化之后,它被脱磺酸基(例如通过将转化的DNA与碱性试剂(例如KOH溶液)接触)。在某些实施方案中,对结合至柱的DNA进行转化和/或脱磺酸基,而在其他实施方案中,对溶液中的DNA进行转化和/或脱磺酸基。

[0645] 还提供了分析DNA甲基化的方法,其中所述方法包括提供DNA样品,使用DABSO试剂

转化样品中的DNA(例如上文所述),以及进行甲基化特异性PCR和/或核酸测序,和/或对转化的核酸进行高分辨率熔解分析(HRM)以测定所述核酸的甲基化。在某些实施方案中,提供DNA样品包括如本文所述制备样品(例如使用裂解液和/或制备盒,如本文所述)。

[0646] 试剂盒

[0647] 用于甲基化检测的试剂盒

[0648] 在某些实施方案中,提供了用于进行本文所述方法的试剂盒。在一个说明性的实施方案中,所述试剂盒包括含有本文所述的反应盒的容器、含有本文所述的样品处理试剂的容器,以及含有本文所述的转化试剂(例如亚硫酸氢盐试剂)的容器。在某些实施方案中,在所述盒的室中提供亚硫酸氢盐试剂。在某些实施方案中,在与所述盒分开的容器中提供亚硫酸氢盐试剂。在某些实施方案中,在所述盒的室中提供样品处理试剂。在某些实施方案中,特别是当样品处理试剂包括硫氰酸胍时,在与所述盒分开的容器中提供样品处理试剂。

[0649] 此外,所述试剂盒任选地包括标记和/或指导材料,为使用本文所述的盒来测定DNA甲基化和任选地RNA表达提供指导(即方案)。

[0650] 在某些实施方案中,提供了用于测定DNA甲基化的试剂盒,其中所述试剂盒包括含有如本文所述的用于测定核酸的甲基化状态的盒的容器。在某些实施方案中,所述试剂盒还包括如本文所述的裂解溶液(例如用于血清或血浆的裂解溶液,例如表11所述,和/或用于FFPE样品的裂解溶液,例如表12所述)。在某些实施方案中,所述试剂盒包括含有蛋白酶K的容器。在某些实施方案中,所述试剂盒包含转化试剂(例如亚硫酸氢盐试剂),其在所述盒中或在与所述盒分开的容器中。在某些实施方案中,所述分开的容器可包含适于所述盒的一次“运行(run)”的预测量体积的转化试剂。在某些实施方案中,转化试剂包括选自偏亚硫酸氢钠、亚硫酸氢钾、亚硫酸氢铯、亚硫酸氢铵和DABSO的化合物。在某些实施方案中,所述试剂盒包括含有样品处理试剂的容器。在某些实施方案中,所述样品处理试剂包括硫氰酸胍和/或乙醇。

[0651] 在各实施方案中,所述试剂盒可另外包含如本文所述的用于样品制备的盒(例如,如图20中所说明的)。

[0652] 在某些实施方案中,所述试剂盒包含指导材料,其教导使用盒以测定DNA甲基化。当试剂盒中包含样品制备盒时,所述试剂盒可另外包含教导样品制备盒的使用和操作的指导材料。

[0653] 用于DABSO DNA转化和甲基化检测的试剂盒

[0654] 在某些实施方案中,提供了试剂盒,以例如在DNA甲基化状态的检测中使用DABSO作为转化试剂。在某些实施方案中,所述试剂盒包括含有转化试剂(包含DABSO)的容器,以及含有脱磺酸基试剂的容器。在某些实施方案中,所述试剂盒包括含有亲和基质(例如二氧化硅基质材料)的柱。在某些实施方案中,所述试剂盒包括含有结合缓冲液的容器和/或含有洗脱缓冲液的容器。在某些实施方案中,所述试剂盒包括含有洗涤缓冲液的容器。

[0655] 在某些实施方案中,所述试剂盒还包括本文所述的裂解溶液(例如用于血清或血浆的裂解溶液,例如表11中所述,和/或用于FFPE样品的裂解溶液,例如表12中所述)。在某些实施方案中,所述试剂盒包括含有蛋白酶K的容器。

[0656] 在各实施方案中,所述试剂盒可另外包含如本文所述的用于样品制备的盒(例如,如图20中所说明的)。

[0657] 在某些实施方案中,所述试剂盒包含指导材料,其教导使用所述试剂盒来转化核酸,以测定所述核酸的甲基化状态。

[0658] 尽管上述试剂盒中的指导材料通常包括手写或印刷材料,它们并不限于这些。任何能够存储这些指导并将其传达给终端用户的介质都包含在本发明中。这类介质包括但不限于电子存储介质(例如磁盘、磁带、盒、芯片)、光学介质(例如CD ROM)等。这类介质可包括提供所述指导材料的互联网网站的地址。

[0659] 实施例

[0660] 提供以下实施例以进行说明,但并不是为了限制所要求保护的发明。

[0661] 实施例1

[0662] 为了验证所述方法,将人基因组DNA(HGDNA)用作起始样品,以监测Cepheid **GENEXPERT®**盒中的样品制备、亚硫酸氢盐转化、样品清除和甲基化特异性qPCR。为了测量亚硫酸氢盐转化效率,在亚硫酸氢盐转化步骤中将一半的DNA-亚硫酸氢盐混合物装载到50 μ L盒管中并加热。因此,在最佳转化条件下,约一半HGDNA被转化,另一半保持未转化。

[0663] 针对一种未转化的基因(HMBS(羟甲基胆色烷合酶管家基因))和一种转化的基因(ACTB(β 肌动蛋白))设计qPCR步骤的引物和Taqman探针,然后通过比较循环阈值(Ct)来定量转化效率。ACTB和HMBS都通常被用作单拷贝或低拷贝参照基因,因此本发明人预期每ng HGDNA的类似拷贝数。

[0664] 从300ng HGDNA运行的代表性**GENEXPERT®**示于下图5中,ACTB qPCR曲线为绿色, HMBS qPCR曲线为蓝色。qPCR反应运行45个循环,为一个3种温度的循环:96 $^{\circ}$ C 5秒,60 $^{\circ}$ C 15秒,72 $^{\circ}$ C 15秒。在20荧光单位的手动阈值设置下,本发明人观察到,转化的ACTB基因的Ct为31.7,未转化的HMBS基因的Ct为32.7。重要的是,该结果证明,在FFPE组织切片和血浆/血清样品中存在的DNA的生理相关浓度下,我们能够在我们的盒中实现HGDNA的接近最佳的亚硫酸氢盐转化效率。完全转化的序列的进一步特异性可通过巢式qPCR反应或通过加热完整样品而实现。然而,对于**GENEXPERT®**中的甲基化特异性qPCR而言这两种方案都不是绝对必需的,因为设计的引物和探针组仅扩增转化的序列。因此,剩余的未转化的DNA序列作为载体DNA发挥作用,其特别在亚硫酸氢盐转化、DNA分离和PCR方法过程中被频繁添加。

[0665] 实施例2

[0666] 图6A和6B示出了转化的ACTB的线性度。具体而言,图6A示出了使用hgDNA,ACTB的15个循环的巢式qPCR的结果。如从右侧图可见,信号(Ct值)在约25,000拷贝至约100拷贝之间基本上是线性的。图6B示出了使用hgDNA,ACTB的20个循环的巢式qPCR的结果。这些图证明了盒对于hgDNA的灵敏度。下降(dropout)开始出现在约20-50拷贝,灵敏度约为25个拷贝的转化DNA。

[0667] 图7A、7B和7C示出了六种甲基化靶标(AKR1B1、HOXB4、TM6SF1、RASGRF2和RASSF1A)的qPCR结果。图7A示出了对照的20个循环的巢式qPCR(25ng HSDNA和5000个DNA未被亚硫酸氢盐转化的MBA-453细胞)。图7B示出了使用来自被亚硫酸氢盐转化的MBA-453细胞的DNA,六种甲基化靶标的20个循环的巢式PCR的结果。示出了全部靶标的强信号。未可靠地检测到HIST1H3C。图7C示出了使用来自MBA-453细胞的DNA,六种甲基化靶标的20个循环的巢

式qPCR的结果,所述MBA-453细胞已被亚硫酸氢盐转化并且在包含1 μ g SS和10ng HS DNA的载体中。在约100个细胞或以下处观察到下降,然而,使用载体时具有显著更少的下降。

[0668] 实施例3

[0669] 图8说明了转化效率的测定结果。未转化的HMBS和转化的ACTB之间的转化效率差异为约66% (~1Ct)。100%结合/洗脱、100%转化和100%结合洗脱的理想Ct为约24-25。对于10倍降低,实验似乎显示出50%结合/洗脱、50-66%转化和50%结合/洗脱,Ct约为27。

[0670] 图9说明了通过巢式qPCR产生的转化的DNA的特异性的增加。巢式PCR似乎增大了转化的DNA的特异性,增大了甲基化DNA的特异性,以及减少了污染问题。

[0671] 图10说明了甲基化盒的特异性。对于未转化的DNA(上图)或未甲基化的DNA(下图),未示出特异性,HIST1H3C除外。

[0672] 图11A和11B示出了使用盒(例如**GENEXPERT®**盒)进行甲基化分析的一些说明性但非特异性的流程图。图11A说明了用于分析血清样品中的DNA甲基化的一个操作流程。如该流程图中说明的,将血清添加到裂解试剂瓶中并混合/涡旋。然后将样品分配到盒中的样品口。将盒置于系统中,用于分析。

[0673] 图11A说明了用于分析组织切片(例如冷冻或福尔马林固定石蜡包埋的(FFPE)切片)中DNA甲基化的一个操作流程。如图所示,在一个实施方案中,提供了组织切片(例如4 μ m FFPE切片)。添加FFPE裂解试剂(参见,例如PCT/US2013/061863 (WO/2014/052551)中的说明性裂解试剂),并且可加热混合物。可添加乙醇并将混合物涡旋。然后将样品分配到盒中的样品口。将盒置于系统中,用于分析。

[0674] 图12说明了转化的ALU和甲基化的RASSF1A的FFPE细胞按钮的结果。

[0675] 实施例4

[0676] 乳腺癌监测的标记物检测

[0677] 材料和方法

[0678] 将1000个MBA-453细胞或25ng人精液(HS) DNA添加到2.5mL结合缓冲液(2.25M硫氰酸胍、22.5mM Tris pH 7.0、0.5% Tween20、50%乙醇和0.005% SE-15消泡剂)中。将2.5mL细胞溶液或DNA添加到Cepheid甲基化盒的室2(图13A中的布置)中。甲基化盒中其余的室填充如下:室3——3.2mL洗涤缓冲液(1.25M硫氰酸胍、25mM Tris pH 7.0、50%乙醇);室4——90 μ L的7M亚硫酸氢铵;室5——4mL的50mM Tris pH 8.5;室8——1mL的PEG200Rinse;室9——包含EZR (Taq) 和TSR的定量PCR珠(针对RASSF1A、AKR1B1、HOXB4、HIST1H3C、RASGRF2、TM6SF1的六靶标乳腺癌多路,参见以下表9);室10——500 μ L的15mM KOH;和室11——包含EZR (Taq) 和TSR的巢式珠(针对RASSF1A、AKR1B1、HOXB4、HIST1H3C、RASGRF2、TM6SF1的六靶标乳腺癌多路)。然后将甲基化盒装载到Cepheid GeneXpert并通过GeneXpert完成整个甲基化测定——第一DNA样品制备、亚硫酸氢盐转化、第二转化后DNA样品制备、脱磺酸基和20个循环的巢式和定量PCR反应。

[0679] 说明甲基化方案的流程图示于图13B中。注意到,PEG200被添加到废液室8中,并且在开始测定之后PEG200被分配到室1中。PEG200是一种粘性液体,其不易于将其直接加载到更小的室1中。另外,在成为PEG200室之前,室1在首次装载所述盒时作为空气室发挥作用。因此,测定开始时室1=空气并且室8=PEG200,在盒装载之后迅速转变为室1=PEG200并且室8=废液。

[0680] 图13A的“初始体积”栏中所示的数字仅仅指液体体积。在这种情况下室11中仅有2x珠——1x TCR珠(6种靶标的引物和探针)和1x EZR珠(Phoenix Taq)。这些珠用于最终的qPCR反应。类似地,室9中有3x珠——1x TSR珠(6种靶标的引物)、1x Tris珠(以淬灭KOH)和1x EZR珠(Phoenix Taq)。这些珠用于首次的15-20个循环的PCR反应。

[0681] 还注意到,室6在整个测定中是空气室并且从未被填充。室7部分被用作通向盒后部的PCR管的入口。它在开始测定时未被填充,但是在装载到所述管中之前在以下三种情况下在测定过程中被填充:1)在管中被加热以用于转化的DNA-亚硫酸氢盐混合物;2)15-20个循环的PCR反应;和3)最终的qPCR反应。

[0682] 提供的表9中所示引物示出针对各基因的5种序列——用于各巢式扩增的两种延伸引物和两种qPCR引物以及一种探针。首次的15-20个循环的PCR反应并非特异性针对甲基化,而是仅特异性针对转化的DNA序列(即,它们未通过CpG,当它们通过CpG的两种情况下,我们使用R=嘌呤或Y=嘧啶以同时捕获甲基化的和未甲基化的)。第二45个循环的qPCR反应包含特异性针对通常2-3个甲基化CpG的引物和探针。

[0683] 结果

[0684] 使用含有和不含亚硫酸氢盐(图15A-15B)的1000个MBA-453细胞和25ng含有亚硫酸氢盐的HS DNA(图15C)来运行甲基化盒,所述细胞和HS DNA在各基因启动子处主要是未甲基化的(HIST1H3C除外)。在不含亚硫酸氢盐或未甲基化的HS DNA对照反应中少有或没有任何靶标的扩增(图15A、15C)。添加亚硫酸氢盐后,甲基化盒从1000个MBA-453细胞的多个基因启动子(特别是AKR1B1、RASSF1A、H0XB4和RASGRF2)处检测到高水平甲基化。

[0685] 表9. RASSF1A、AKR1B1、H0XB4、HIST1H3C、RASGRF2和TM6SF1的巢式引物。C*、T*为被任选地官能化(例如,为了改变探针T_m)的碱基。

基因 / 探针名称	类型	序列	SEQ ID NO
RASSF1A			
olAK61	外引物	GTTTATAGTT(T*)TTGTATTTAGG	62
olAK41	外引物	AACCTCAATAAACTCAAACCTCCC	42
olAK1	qPCR 引物	GCGTTGAAGTCGGGGTTC	2
olAK2	qPCR 引物	CCCGTACTTCGCTAACTTTAAACG	3
olAK63	qPCR 探针	荧光团 -(C*)TGGTTTCGT(T-猝灭剂)CGGT(T*)CGCG-淬灭剂/阻断剂	64
HIST1H3C			
olAK60	外引物	GGATTTTGTGAAATATTATAGGATTAATTAG	61
olAK43	外引物	ATAAAATTTCTCACRCCACC	44
olAK59	qPCR 引物	TCGTACGAAGTAAATAGTTCGTAAG	60
olAK54	qPCR 引物	CCGATAACCGAAACGCTCTTAC	56
olAK65	qPCR 探针	荧光团 -CAAACCTACTTACGCGAAACTT(T*)ACCGCC-淬灭剂/阻断剂	66
RASGRF2			
olAK44	外引物	GAGGGAGTTAGTTGGGTTAT	45
olAK45	外引物	CCTCCAAAAAATACATACCC	46
olAK13	qPCR 引物	GTAAGAAGACGGTCGAGGCG	14
olAK14	qPCR 引物	ACAACCTACTCGCCCTCGAA	15
olAK67	qPCR 探针	荧光团 -AAACGAACCACTTCTCG(T*)ACCAACGAC-淬灭剂/阻断剂	129
AKR1B1			
olAK58	外引物	GYGTAATTAAT(T*)AGAAGGTTTTT	59
olAK47	外引物	AACACCTACCTTCCAAATAC	48
olAK19	qPCR 引物	GCGCGTTAATCGTAGGCGTTT	20

[0687]

olAK20	qPCR 引物	CCCAATACGATACGACCTTAAC	12
olAK75	qPCR 探针	荧光团 -(C*)A(C*)GCGTACCT(T- 淬灭剂)TAAA(T*)AACCCG(T*)AAAAATCG-淬灭剂/阻断剂	76
HOXB4			
olAK48	外引物	TTAGAGGYGAGAGAGTAGTT	49
olAK49	外引物	AACTACTACTAACCRCCTC	50
olAK25	qPCR 引物	CGGGATTTTGGGTTTTCGTCG	26
olAK26	qPCR 引物	CGACGAATAACGACGCAAAAAC	27
olAK76	qPCR 探针	荧光团 -AACCGAACGA(T*)AACGAAA(N*)ACGACGAA-淬灭剂/阻断剂	77
TM6SF1			
olAK50	外引物	AGGAGATATYGTTGAGGGGA	51
olAK51	外引物	TCACTCATACTAAACCRCCAA	52
olAK56	qPCR 引物	GTTTAGCGGGATGCGGTG	57
olAK57	qPCR 引物	ACACGAAAACCCCGATAAC	58
olAK77	qPCR 探针	荧光团 -AAACACTCATCGCAACCGCCGCG-淬灭剂/阻断剂	34

[0688] 表9中所示的引物是说明性和非限制性的。许多其他引物和巢式引物组是本领域技术人员可获得的。例如,用于检测与胰腺癌相关的ADAMTS1和BNC1基因的甲基化和用于检测与神经胶质瘤相关的MGMT基因的甲基化的说明性引物示于表10中。

[0689] 表10. 用于检测与胰腺癌相关的ADAMTS1和BNC1基因的甲基化和用于检测与神经胶质瘤相关的MGMT基因的甲基化的说明性引物

[0690]

基因/探针名称	类型	序列	SEQ ID NO
BNC1	外引物	CCCRCAAACRCGAAAACCTC	227
	外引物	GTTTTTTTTYGGGAGAGGTAAATA	228
	qPCR 内引物	CCGACGACCGACG	235
	qPCR 内引物	GGGAGAGGTAAATATCGATAC	236
	qPCR 探针	荧光团-TGGYGGGGG(T*)AGA(T*)ATTTT-淬灭剂/阻断剂	388
ADAMTS 1	外引物	CRCCTCCRAAACTAAAACAAC	229
	外引物	GGGTATTGTAAAGTTAGGGTG	230
	qPCR 内引物	CGCGAAAATTAATACCTAACG	237
	qPCR 内引物	TTAGGGTGCGTTATCGGAC	238

[0691]

	物		
	qPCR 探针	荧光团-TCTACTCAAACTCTCCCCTCTCC-淬灭剂/阻断剂	389
MGMT	外引物	GTTTT(T*)AGAAAYG(T*)TTTGYGTTT	263
	外引物	AAAAAAC(T*)CCRCACCTCTCC	265
	qPCR 内引物	TTTCGACGTTCTAGGTTTTCGC	266
	qPCR 内引物	GCACTCTTCCGAAAACGAAACG	267
	qPCR 探针	荧光团-CCAAACAC(T*)CACCAAATC(N*)CAAAC-淬灭剂/阻断剂	268

[0692] 实施例5

[0693] 血浆和FFPE样品的样品制备

[0694] 图17说明了可用于制备用于PCR和/或甲基化检测的DNA样品的盒的构造。可简单地将血清或血浆获得的样品或FFPE样品引入所述盒的样品室(例如室3),并且如本文所述的盒的操作提供了准备用于PCR和/或甲基化检测的样品。

[0695] 样品制备

[0696] 在一个说明性但非限制性的实施方案中,通过用蛋白酶K处理血清或血浆来制备血清或血浆样品(例如,用于cfDNA分析)。然后将蛋白酶K处理的血清/血浆与裂解液混合,所述裂解液包括硫氰酸胍(GTC)、缓冲液(例如Tris pH 7.0)、去垢剂(例如Tween 20)和任选的消泡剂(例如消泡剂SE15)。将醇(例如异丙醇)添加到溶液中,然后将溶液引入用于样品处理的盒。在一个实施方案中,如表11所示配制裂解溶液。蛋白酶K处理的血清/血浆可以与裂解溶液和醇混合,混合比例相当于1.3mL蛋白酶K处理的血清/血浆、2.2mL裂解溶液和1.5mL醇。在某些实施方案中,将血清/血浆样品用蛋白酶K处理约15分钟。加入冷冻的裂解溶液并保持/混合约10分钟。然后将异丙醇加到混合物中,之后将混合物装载到用于处理的盒中。

[0697] 如上文所述,对于血清/血浆,通常在RT下进行醇(例如异丙醇)沉淀,特别是通常不使用“盐”溶液进行。在某些实施方案中,可使用更长的室温沉淀时间。

[0698] 表11. 用于血清或血浆的裂解溶液

[0699]

试剂	量
硫氰酸胍(GTC)	4.5M
缓冲液(例如Tris)pH 7.0	45mM
去垢剂(例如Tween20)	1%
消泡剂SE15	0.01%

[0700] 在另一个说明性但非限制性的实施方案中,通过结合FFPE样品与蛋白酶K和裂解溶液来制备福尔马林固定石蜡包埋的(FFPE)样品,所述裂解溶液包括缓冲液(例如HEPES)、螯合剂(例如EDTA)、NaCl、MgCl₂和任选的叠氮化钠和/或消泡剂。将溶液加热(例如70℃至90℃)一段时间,例如约10分钟至最高达约4小时。将醇添加到溶液中,然后将溶液引入用于

样品处理的盒中。在一个实施方案中,如表12所示配制裂解溶液。在一个说明性但非限制性的实施方案中,将1.2mL表12中所示的裂解溶液添加到FFPE切片。添加蛋白酶K并加热混合物,例如在80℃约15分钟。在某些实施方案中,56℃下加热约2小时,然后90℃下加热30分钟。然后将1.2mL乙醇添加到混合物中,并将混合物装载到用于处理的盒的样品室。

[0701] 表12.用于福尔马林固定石蜡包埋的 (FFPE) 样品的裂解液

[0702]

Tween20	1 %
NaCl	400mM
EDTA	25mM
MgCl ₂	10mM
HEPES pH 7.2	50mM
叠氮化钠	0.01 %
SE15	0.01 %

[0703] 盒操作和提取性能

[0704] 在某些实施方案中,当制备cfDNA时,可包含提取对照以允许监测DNA制备的质量。如图18所说明的,具有两个不同的珠组。一个珠组包含用于SAC (样品测定对照) 的内源性HMBS引物和探针组和用于SPC (样品制备对照) 的外源性BG引物和探针组。另一个珠组包含用于SAC的内源性β-珠蛋白PP组 (以及BG SPC) 。

[0705] 尤其发现在所述盒中GTC的用途对于血清样品的重要性低于对于血浆样品的重要性。不局限于特定的理论,认为这可能是由于血清包含更少的蛋白。因此,在某些实施方案中,所述盒可包含更少的GTC或可不含GTC。

[0706] 图19A和19B示出了与使用常规“管填充”操作获得的结果相比,对使用本文所述的盒进行的cfDNA制备的结果的比较。如图19A中所示的qPCR结果,使用所述盒获得的结合和洗脱效率非常接近于 (在1Ct之内) 使用管填充方案获得的那些。如图19B所说明的,样品浓度滴定表明,当样品浓度低至约10pg时,盒制备保守地在管填充制备的1Ct之内。认为在更高的样品浓度下,盒制备与管填充方案甚至更接近。

[0707] 实施例6

[0708] 测试高体积样品制备盒

[0709] 在某些实施方案中,提供了高体积样品制备 (HSVP) 盒,用于制备大体积样品 (例如最高达约12mL至15mL)。这在样品包含低浓度的DNA (例如血清或血浆中的cfDNA) 时特别有用。图20A示意性地示出了一个这样的盒。如图中所示,所述盒提供3个室 (室2、3和5),其可用于接收样品。在图示的实施方案中,这些室的每个能够接收约4mL样品,在某些实施方案中,所述样品包含4mL血浆/血清,其与4mLGTC和4mL醇 (例如异丙醇) 结合。

[0710] 将样品引入这些室,并且如本文所述操作所述盒以制备样品,用于PCR和/或甲基化分析。在某些实施方案中,以说明的方式,该盒的操作可包括使DNA结合至亲和柱 (例如用于清除) 并洗脱DNA。在某些实施方案中,当进行甲基化分析时,所述盒的操作可还包括将DNA与转化试剂 (例如本文所述的亚硫酸氢盐) 结合并将混合物加热以转化DNA。在某些实施方案中,HSVP盒也可经配置以使转化的DNA脱磺酸基。在其他实施方案中,DNA可在第二 (例如qPCR) 盒中脱磺酸基,如图20B的示意图所示。第二盒也可进行甲基化分析 (例如qPCR分

析)。

[0711] 图21示出了使用HMBS或 β -球蛋白引物和探针组,对单盒方案和双盒方案之间从血浆和血清的DNA样品制备结果的比较。如图中所示,在0.5mL至4mL血清或血浆之间DNA回收具有线性增加。此外,当使用一个盒来制备和分析或使用分开的盒来制备和分析时,损失很小至没有损失。

[0712] 实施例7

[0713] 优化亚硫酸盐转化

[0714] 在某些实施方案中,当如本文所述使用盒来进行甲基化分析时,一个可能的问题是使用可能的最小体积对洗脱效率的优化。使用自旋柱更易于处理小洗脱体积。这个问题可通过使用多个加热步骤来解决以处理更大的样品体积。

[0715] 第二个技术担忧在使用更小(例如50 μ L)的加热管或室的情况下加热更大量的样品(例如最小100 μ L)时出现。在某些情况下,加热步骤之间的增压作用使得难以重复地产生体积吸出物(aspirate)和分配物(disperse)。其次,缺少增压作用可导致体积变化和气泡,特别是在更高的温度下。第三,在加热步骤之间端口变化过程中,可在加热的样品和未加热的样品之间获取空气。

[0716] 为了研究50 μ L管中这些亚硫酸氢盐转化的优化,研究了单加热步骤和双加热步骤。如下进行该实验:

[0717] 吸取75-80 μ L亚硫酸氢盐-DNA;95 $^{\circ}$ C加热10s,65 $^{\circ}$ C加热300s x8;

[0718] 吸取静止(Pull rest)+5-10 μ L;增压;95 $^{\circ}$ C加热480s,65 $^{\circ}$ C加热1800s x1。

[0719] 0.5mL血清的结果如图22所示,其中上图为1x加热(转化的为33.0,未转化的为34.4)N=4,下图为2x加热(转化的为31.9,未转化的为36.1)N=4。

[0720] 当从1x加热转变为2x加热时,转化的ACTB信号中有约1Ct的增加。这表明几乎全部DNA被转化。这得到以下事实的支持:在未转化的HMBS信号中还有约2Ct的减少。1Ct增加是合理的,因为我们从加热50/100 μ L DNA-亚硫酸氢盐样品变为加热100/100 μ L DNA-亚硫酸氢盐样品。

[0721] 实施例8

[0722] DNA甲基化盒与基于管的商业试剂盒的比较

[0723] 图23A示出了使用本文所述的盒(左)进行甲基化分析时所需的使用步骤与使用商业试剂盒(QIAamp MinElute病毒自旋试剂盒(Qiagen,Inc.)和EZ DNA Methylation-LightningTM试剂盒(Zymo Research,Inc.))进行相同的分析时所需的步骤的比较。可容易地发现,与使用试剂盒所需的2-3小时劳动时间相比,基于盒的甲基化分析需要的使用步骤少得多,劳动时间约5分钟。

[0724] 为了比较不同的方法产生的结果,使用Qiagen试剂盒纯化200 μ L血清。使用Zymo试剂盒转化DNA,用第二自旋柱纯化并用10 μ L洗脱。使用转化的未甲基化的ACTB引物和探针(TSR)运行全部10 μ L。相比之下,200 μ L血清在本文所述的甲基化盒中运行。结果如图23B所示。非常显而易见的是,所述盒方法产生的结果与使用商业试剂盒得到的那些结果非常相当。然而,这是使用少得多的劳动和时间而实现的。

[0725] 实施例9

[0726] DABSO用于DNA转化的用途

[0727] 首先尝试将5g DABSO溶于5mL H₂O中。最后加入几毫升10M KOH和a mL水并加热以溶解DABSO,以及在预估的最终DABSO浓度约2.5M下使pH升高至约pH 5至pH 5.5。

[0728] 图24示出了使用DABSO或Zymo转化试剂转化的750ng DNA的管填充图。将材料在热循环仪中加热(1μg)并使用自旋柱纯化和作为管填充运行。3种不同的实验为:

[0729] 1) 120μL DABSO/30μL DNA;

[0730] 2) 120μL Zymo/30μL DNA;和

[0731] 3) 70μL Zymo/30μL DNA(目前在盒中的比例)。

[0732] 如图24所示,DABSO提供了良好的转化,该转化几乎与使用Zymo试剂获得的那些转化相当。

[0733] 实施例10

[0734] 甲基化DNA检测的灵敏度

[0735] 为了评估DNA甲基化检测的灵敏度,使用本文所述的盒根据拷贝数来检测转化的ACTB基因启动子。目标是检测少于25个拷贝的转化的未甲基化的DNA。如之前所示,在约10-50个拷贝处观察到下降(每个1下降)。对于血清背景中的甲基化DNA靶标,观察到类似的灵敏度。

[0736] 图25,框A,说明了稀释系列中甲基化DNA的检测(MGMT(0-6-甲基鸟嘌呤-DNA甲基转移酶基因))。如图中所示,在水平低至78pg下检测到MGMT。

[0737] MBA-453细胞中甲基化的乳腺癌标记物RASSF1A和AKR1B1的检测示于图25,框B中。如图中所示,在低至100个细胞下检测到乳腺癌标记物。

[0738] 稀释系列中甲基化的胰腺癌标记物ACTB、BNC1和ADAMTS1的检测如图25,框C所示。如图中所示,在低至25个拷贝下检测到胰腺癌标记物。

[0739] 表13示出了作为浓度函数的胰腺癌标记物BNC1和ADAMTS1的命中率。如图中所示,这些标记物可在低于120pg下被检测到。注意正“命中率”是任一基因中复制物的扩增。

[0740] 表13说明了随浓度变化的胰腺癌标记物检测的命中率

[0741]

浓度	命中率(#/复制物)
0pg	0/3
16pg	6/8
30pg	5/8
60pg	4/8
120pg	4/4

[0742] 实施例11

[0743] 针对两条链的反向互补多路测定

[0744] 图26说明了针对两条DNA链的反向互补多路测定的结果。亚硫酸氢盐转化之后,两条链都失去它们的互补性。因此,必须针对一条链或另一条链设计引物和探针组,并产生独特的扩增子。除提供“更多机会”以外,这种方法可能有助于灵敏度(在LOD下,如果仅一条链或另一条链在管中终止,这种方法将保证信号被捕获)。

[0745] 多路测定允许在相同的启动子位点检测不同的CpG。反向互补多路提供了在靶标上更多的查询和找到异型配子(heterogamous)甲基化的可能性。

[0746] 实施例12

[0747] 单一盒中DNA甲基化和突变的检测

[0748] 在某些实施方案中,多路PCR反应可在相同的盒中包含允许检测除甲基化以外的突变的引物和探针。图27A说明了甲基化的BNC1和ADAMTS1以及KRAS G12D突变以及对照BG的检测(上图),和甲基化的BNC1和ADAMTS1以及KRAS野生型以及对照BG的检测(下图)。

[0749] 图27B说明了PANC-1细胞(上图)和MIA-PaCa细胞(下图)中BNC1和ADAMTS1甲基化以及KRAS G12D突变的同时检测。

[0750] 实施例13

[0751] 胰腺癌的多路优化

[0752] 确认ADAMTS1、BNC1(以及某些其他基因)的甲基化分析允许胰腺癌的检测和/或分期。因此,优化针对BNC1和ADAMTS1的初始多路测定以促使其他基因的探针掺入。为了优化该测定,在正向/反向亚硫酸氢盐转化的链的外和内PCR上运行温度梯度。在56℃、58℃和60℃的外温度下以及64℃、66℃和68℃的内温度下运行单一路(各基因的正向/反向)(参见例如图28)。在某些实施方案中,所述测定发展为针对BNC1和ADAMTS1和两种其他基因的两个4路测定,一个4路测定针对正向链的甲基化分析,一个4路测定针对反向链的甲基化分析。

[0753] 根据优选的反应条件(盐条件:40mM(LS)、60mM(MS)、80mM(HS) KCl、15mM NH₄SO₄)将探针合成两组(参见图29)并优化其特异性。多路1的最终优化的盐条件为80mM KCl、5mM MgCl₂、20mM Tris pH 8.5和10mM NH₄,多路2的最终优化的盐条件为62mM KCl、4mM MgCl₂、20mM Tris pH 8.5和10mM NH₄。

[0754] 实施例14

[0755] MGMT甲基化的检测

[0756] O(6)-甲基鸟嘌呤-DNA甲基转移酶(MGMT)基因编码一种DNA修复酶,该酶能够消除烷化化疗(例如替莫唑胺(temozolamide))的作用。如果MGMT基因具有活性,则损伤可迅速被修复。认为恶性神经胶质瘤可具有失活的MGMT基因,这是由于其启动子区的甲基化。甲基化的MGMT基因是更好响应于化疗的预测性指示物(因为肿瘤无法修复由烷化剂诱导的DNA损伤)。

[0757] 开发引物和探针以检测MGMT甲基化,如图30所示,并且总结在以下表14中。具体而言,图30说明了用灰色表示的具有CPG的转化的模板(如从焦磷酸测序确定的)。如所说明的,在亚硫酸氢盐转化之后,正向链和反向链不再互补,允许对各链的单独分析。

[0758] 表14.用于检测MGMT甲基化的说明性引物/探针组(参见例如图30)。

[0759]

探针		探针类型	序列	SEQ ID NO
外	22422	MGMT Fwd-4	GTTTT(T*)AGAAAYG(T*)TTTGYGTTT	263
	22423	MGMT Rev-4	AAAAAAC(T*)CCRCACCTCTTCC	265
内	22150	MGMT Fwd-2	TTTCGACGTTTCGTAGGTTTTCGC	266
	22151	MGMT Rev-2	GCACTCTTCCGAAAACGAAACG	267
	22419	MGMT TaqMan-2	荧光团 CCAAACAC(T*)CACCAAATC(N*)CAAAC	268

[0760] 为了评估检测灵敏度,使用ACTB作为对照,评估MGMT稀释系列(在20ng HS DNA的背景下5ng至78pg MGMT DNA)。在一个说明性实验中,78pg甲基化MGMT DNA仅距只有未甲基化的HS DNA的Ct约10个循环。

[0761] 如图31中所示,将使用本文所述的甲基化盒检测MGMT甲基化而产生的结果与通过提取的DNA(图31,上)和FFPE样品(图31,下)的焦磷酸测序产生的结果进行比较。焦磷酸测序通常使用10-15%的临界值(cutoff)以测定患者层次。我们使用任意的临界值12.5(ACTB和MGMT之间)以尽可能匹配焦磷酸测序结果。因此,在本实施例中,将临界值设定在 $\delta Ct = 12.5$ 并基于>15%甲基化进行计算。对所提取的DNA的盒分析显示出90%的灵敏度和86%的特异性,而对FFPE样品的盒分析显示出88%的灵敏度和95%的特异性。

[0762] 注意到特异性可以通过两种方式提高:1)可升高退火温度,因为62℃的退火温度相当低。另外,可使用覆盖3个(或多个)CpG的甲基化探针。

[0763] 实施例15

[0764] BRCA1甲基化的检测

[0765] BRCA1是负责修复DNA的看守基因。认为BRCA1参与同源重组、非同源末端接合和核苷酸切除修复。具有异常BRCA1基因的女性患乳腺癌的几率为80%。

[0766] 不局限于特定的理论,认为BRCA1甲基化是三阴性BC患者中响应于化疗的可能的预测性标记物。对用顺铂治疗的NSCLC患者的研究表明,具有低BRCA1表达的那些患者的生存率提高。高水平通过修复对癌细胞造成的损伤降低了化疗的功效。

[0767] 鉴于这些和其他观察,开发了观察盒和使用方法以检测BRCA1甲基化。具体而言,如下优化PCR条件:1)评估56-62℃的外温度,我们选择了3步、56℃退火的PCR方案;2)评估64℃-70℃的内温度,我们选择了2步、68℃退火的PCR方案。结果示于图32。

[0768] 对于BRCA1,使用ACTB对照基因测试一个靶标测定。测试8种不同的细胞系并比较添加NH₄的效果(参见图33)。预期在3199细胞系中观察到BRCA1甲基化。

[0769] 实施例16

[0770] 与肺癌相关的基因甲基化的检测

[0771] 针对其甲基化与肺癌相关的基因(SOX17、CD01、TAC1),以及ACTB对照基因,测试三靶标甲基化测定。图34中所示的数据表明,如所预期的,所述3种靶标并未在正常血浆背景

中出现,但是一定程度上存在于三种不同的肺癌细胞系中。

[0772] 应理解,本文所述的实施例和实施方案仅用于说明性目的,根据其的各种修改和变化将被建议给本领域技术人员,并且被包含在本申请的精神和范围以及所附权利要求的范围内。本文引用的全部出版物、专利和专利申请都为了所有目的以引用的形式全文纳入本文。

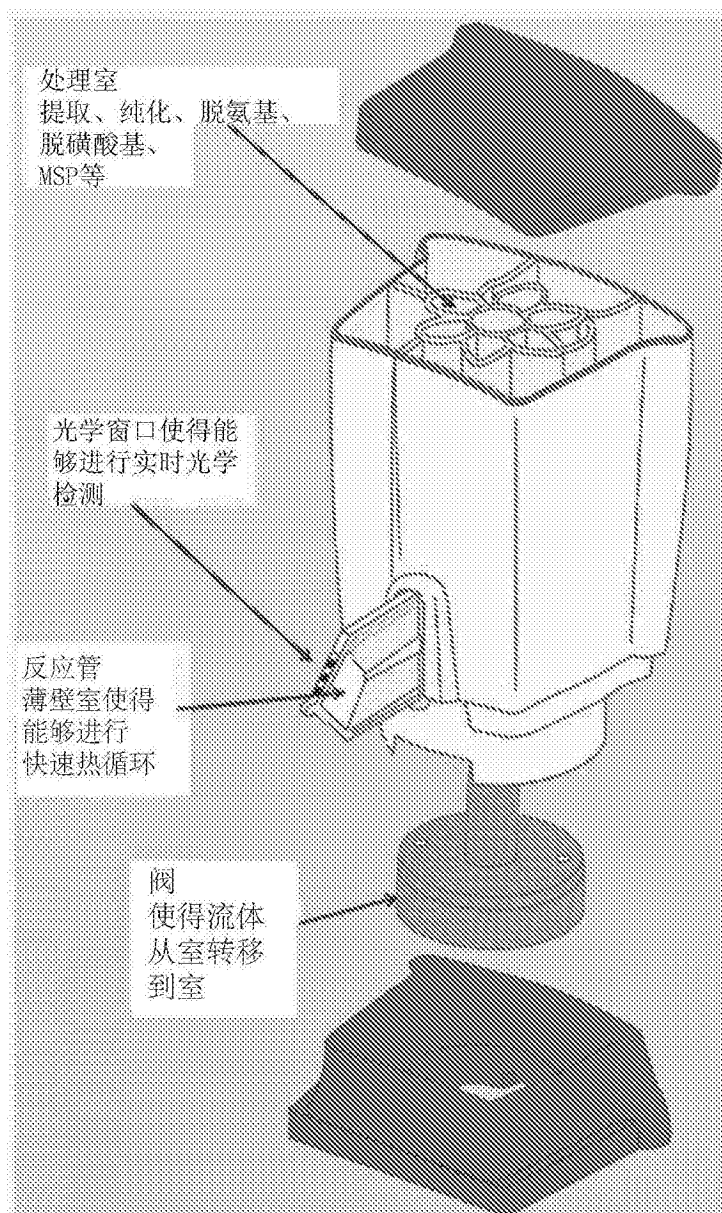


图1A

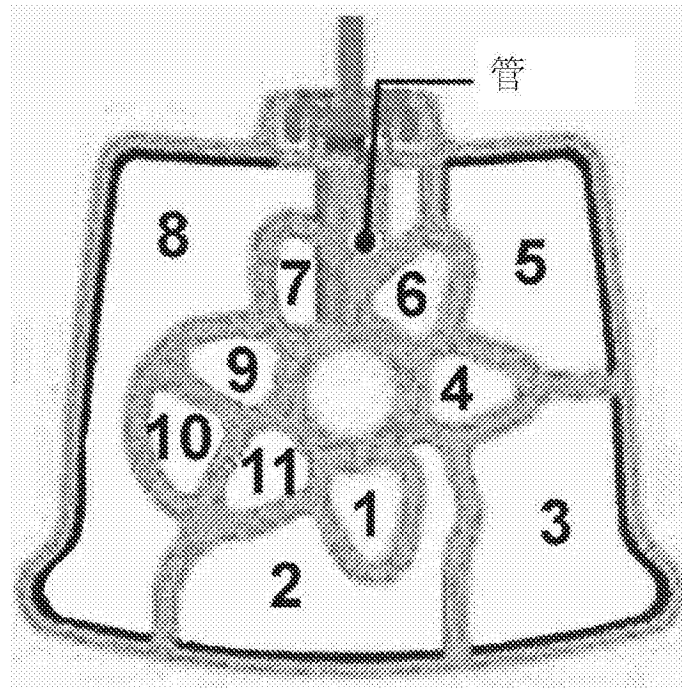


图1B

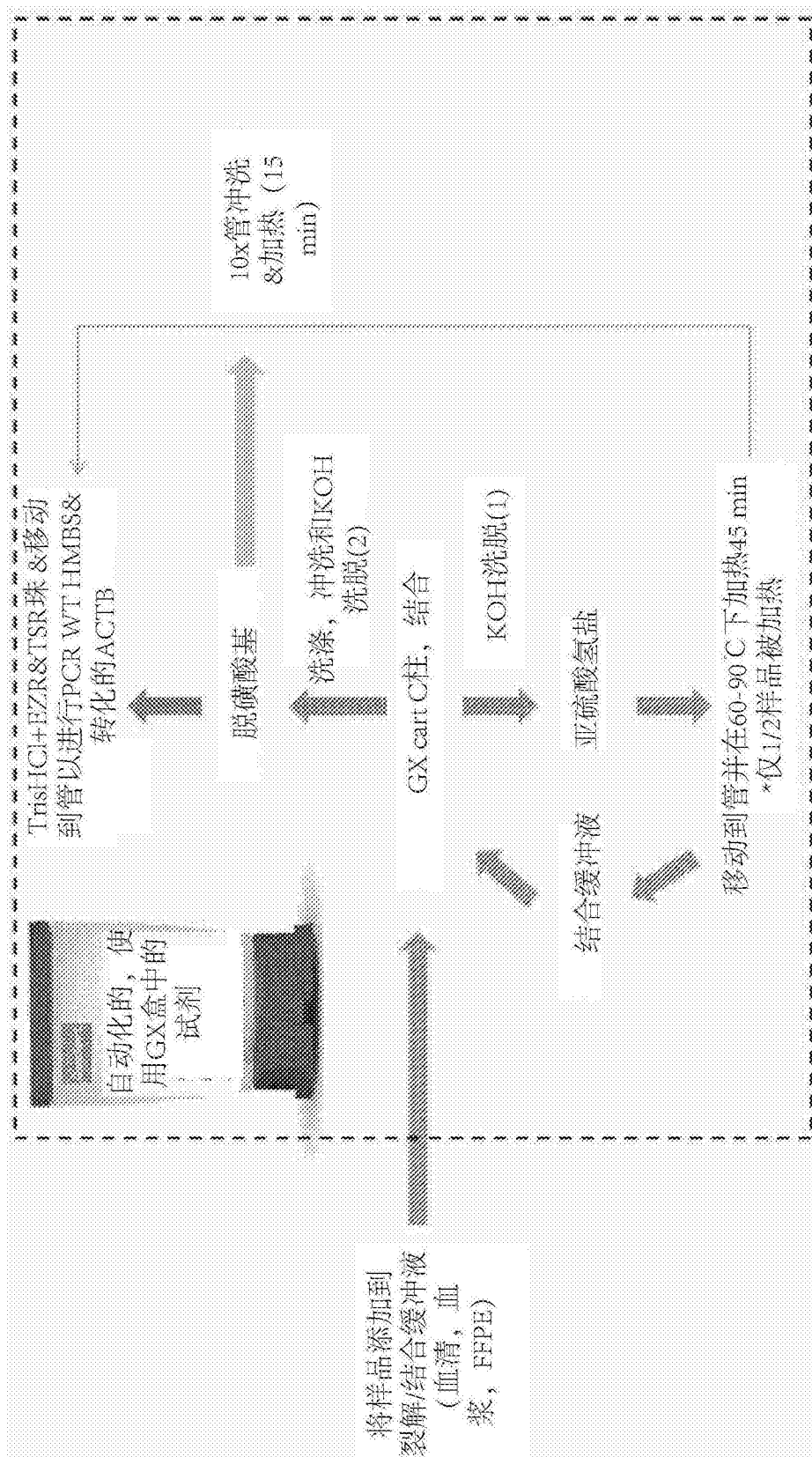


图1C

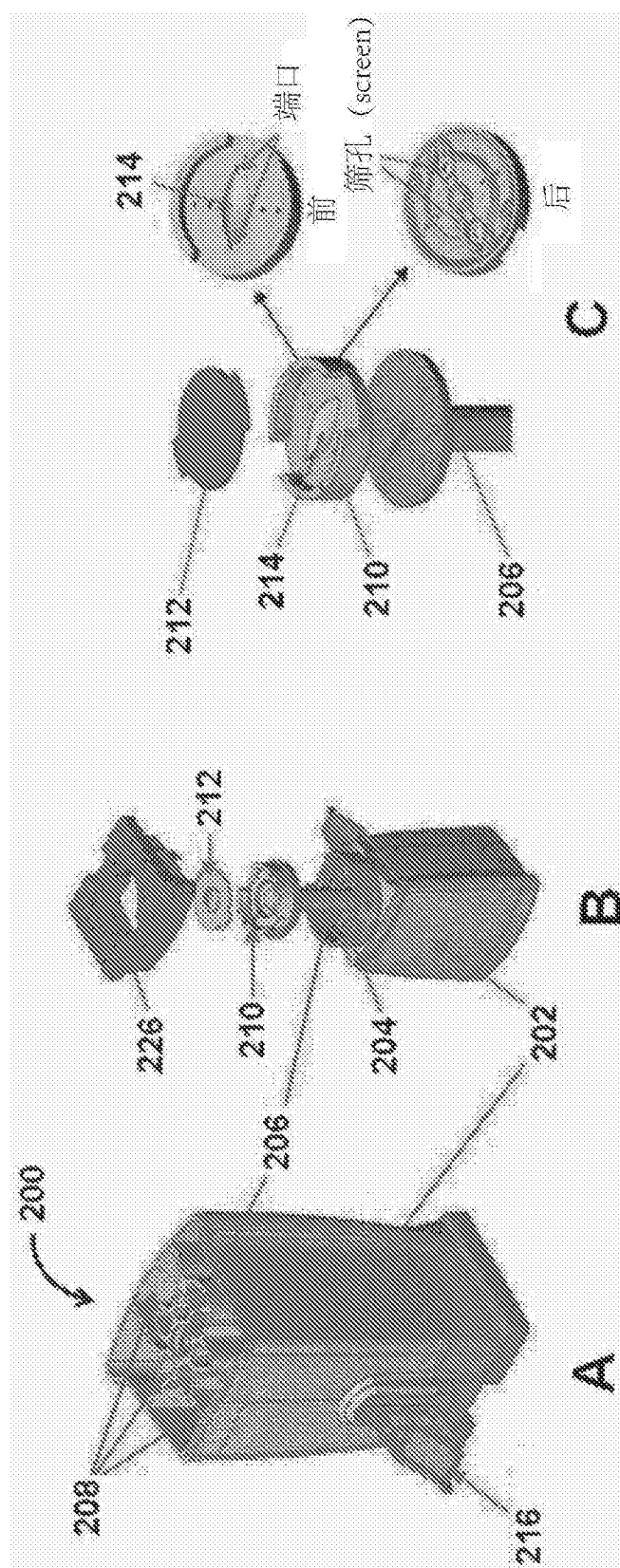


图2

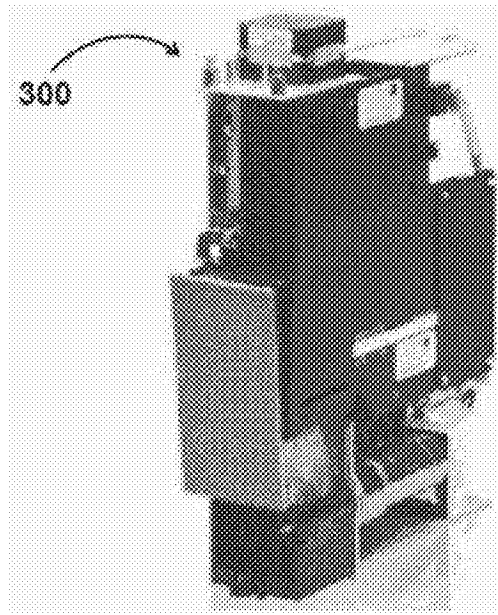


图3A

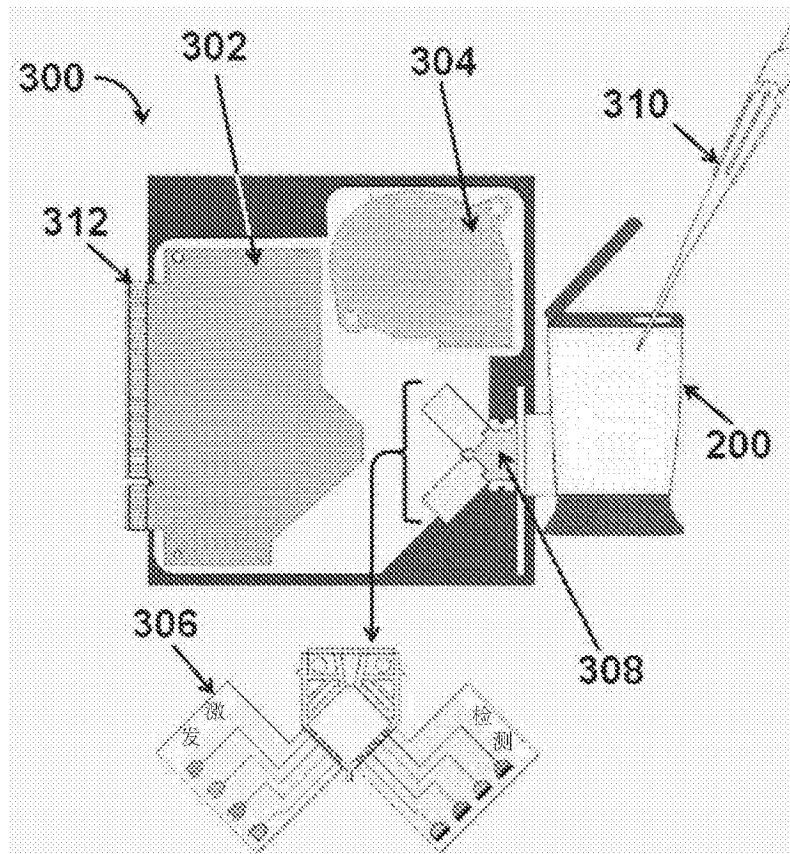


图3B

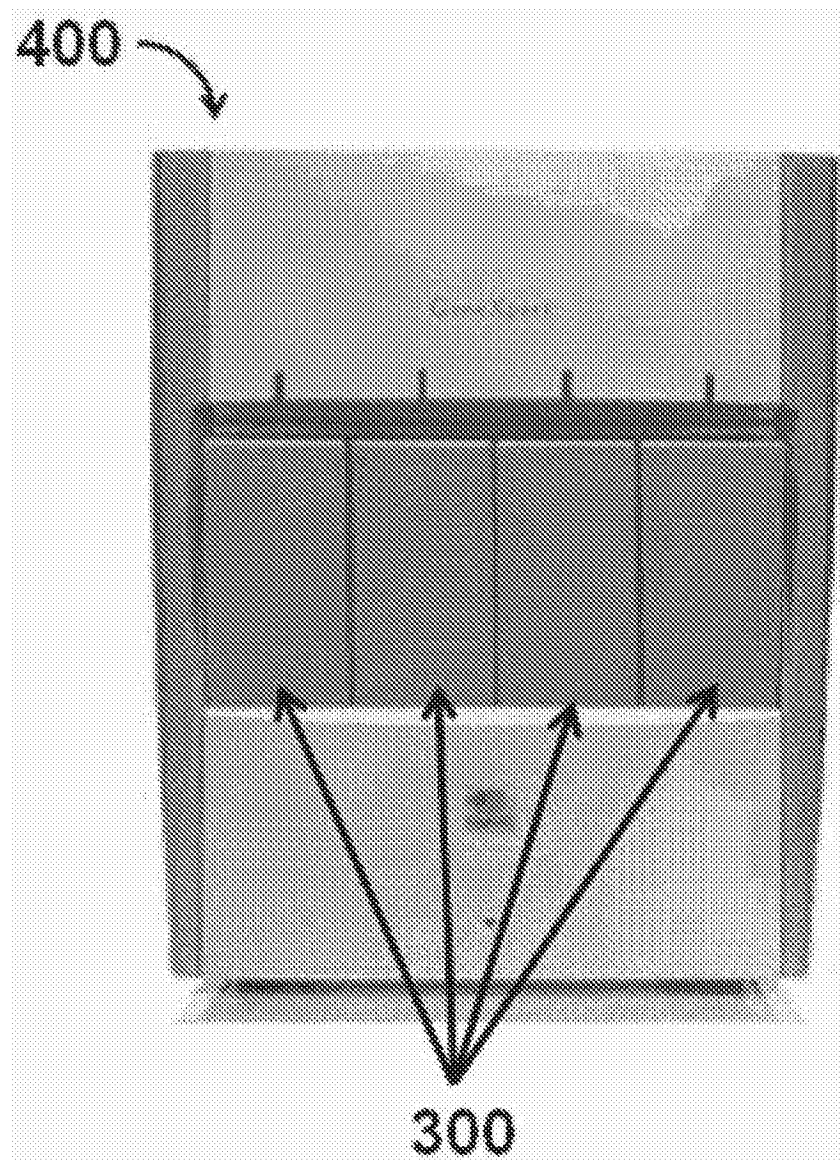


图3C

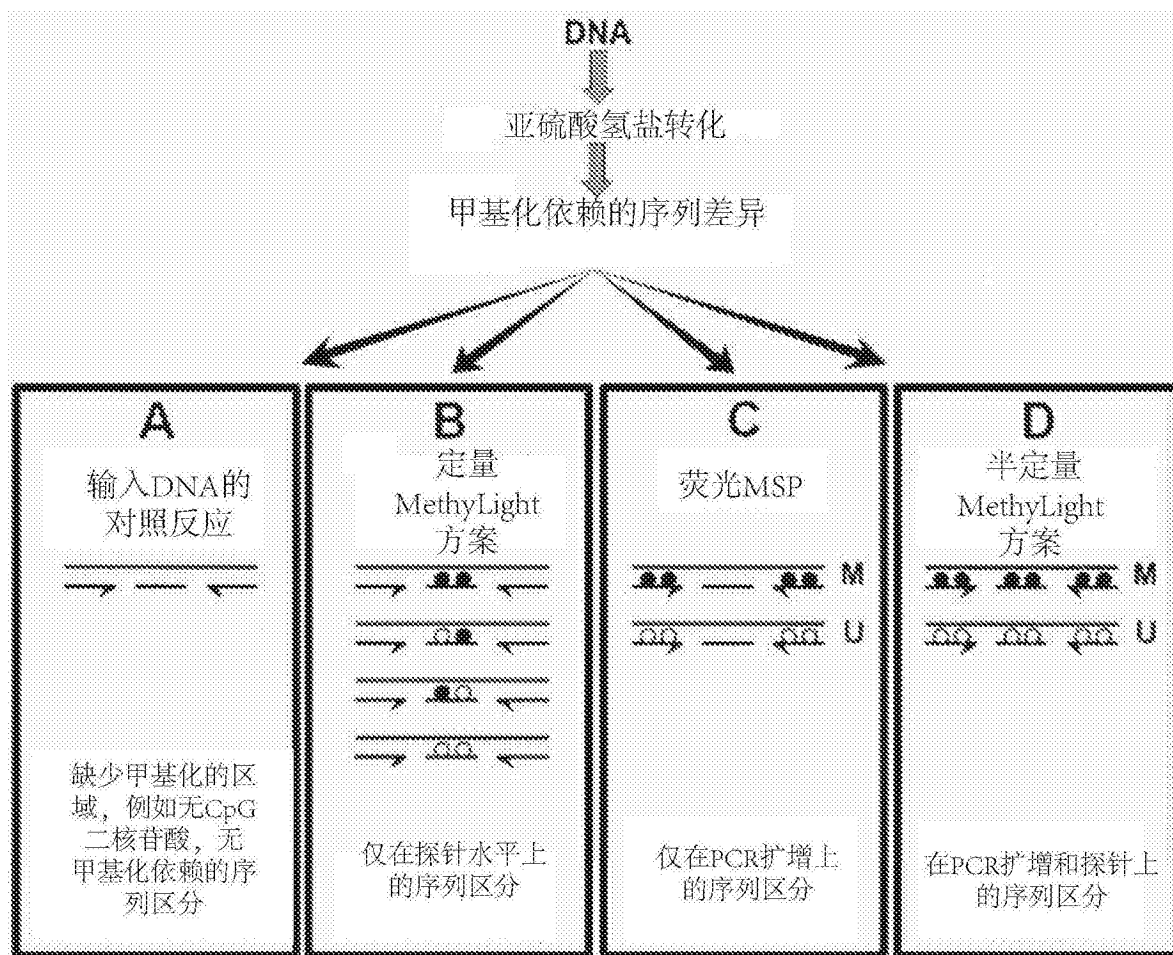


图4A

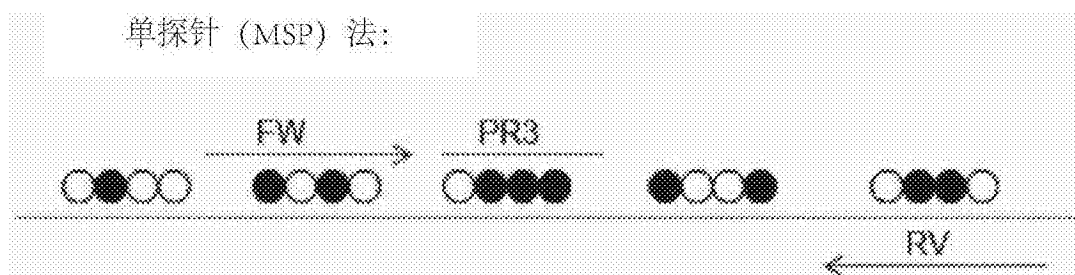


图4B

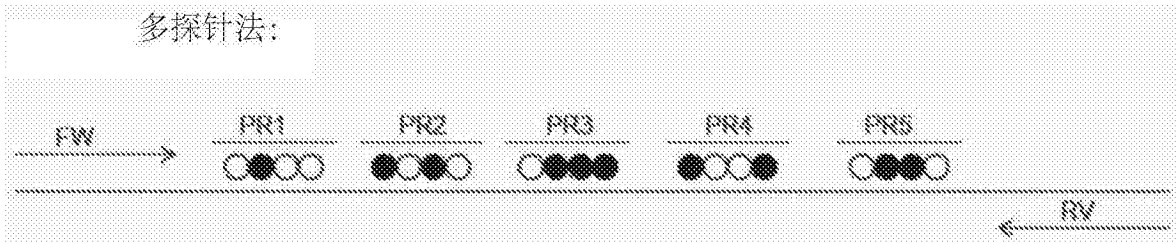


图4C

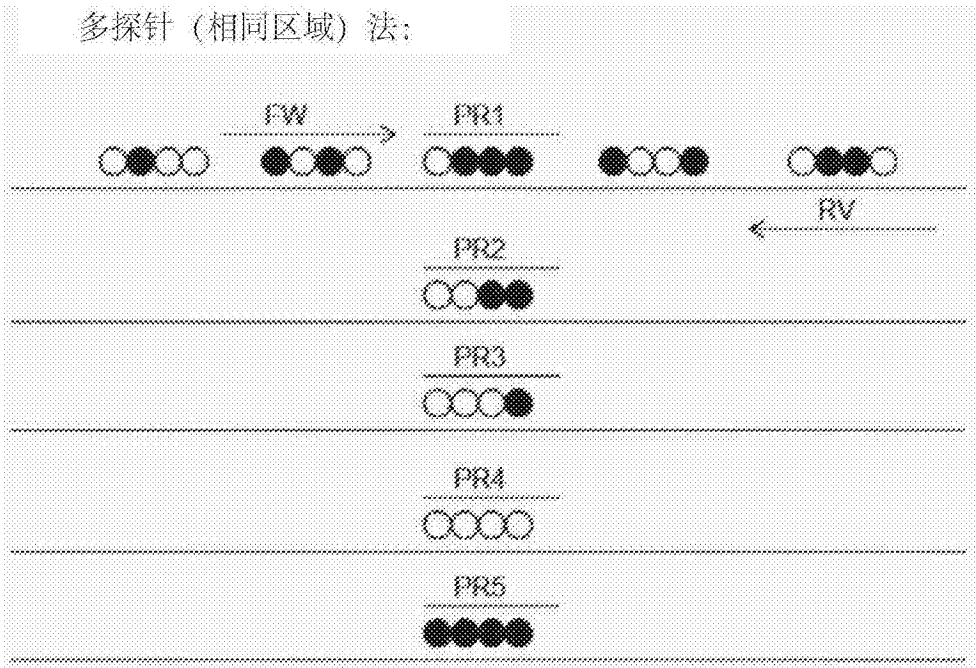


图4D

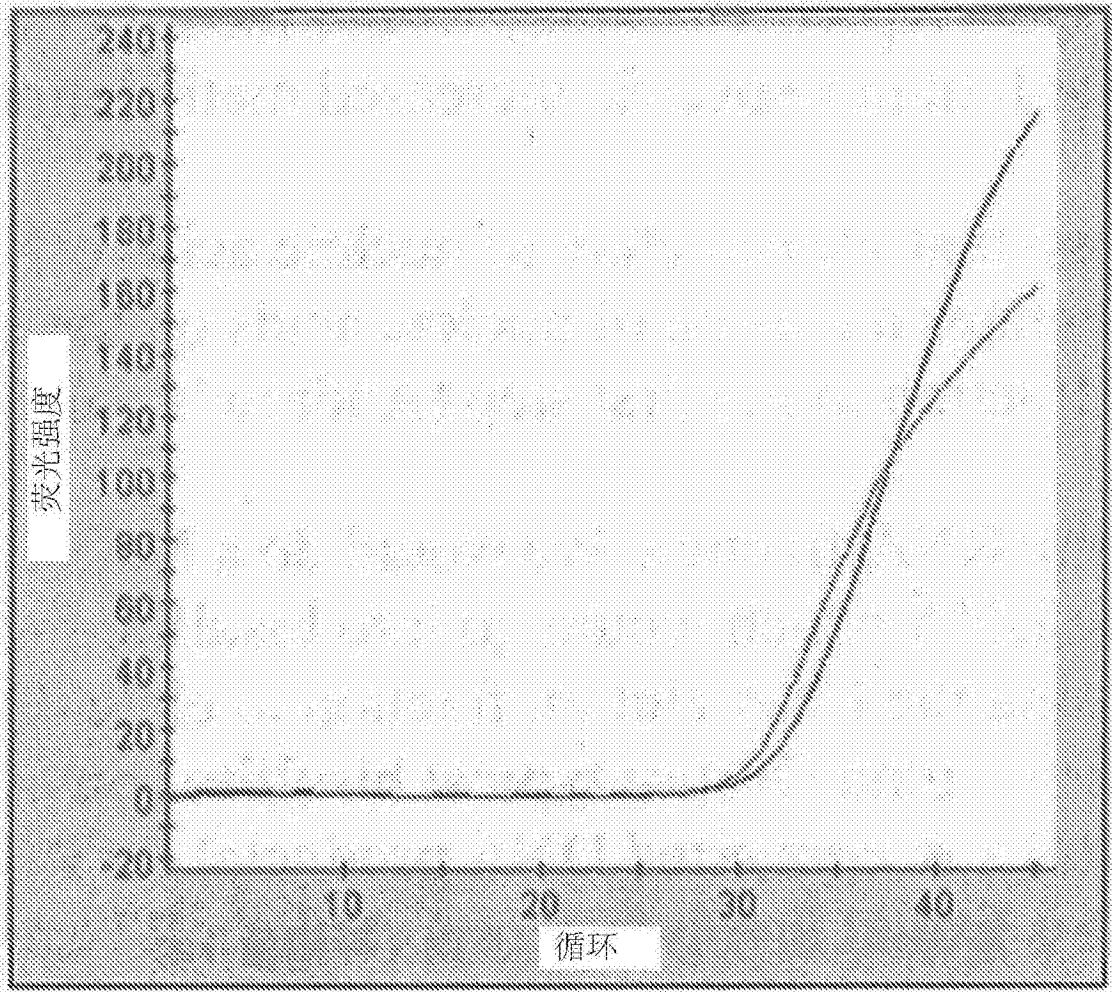


图5

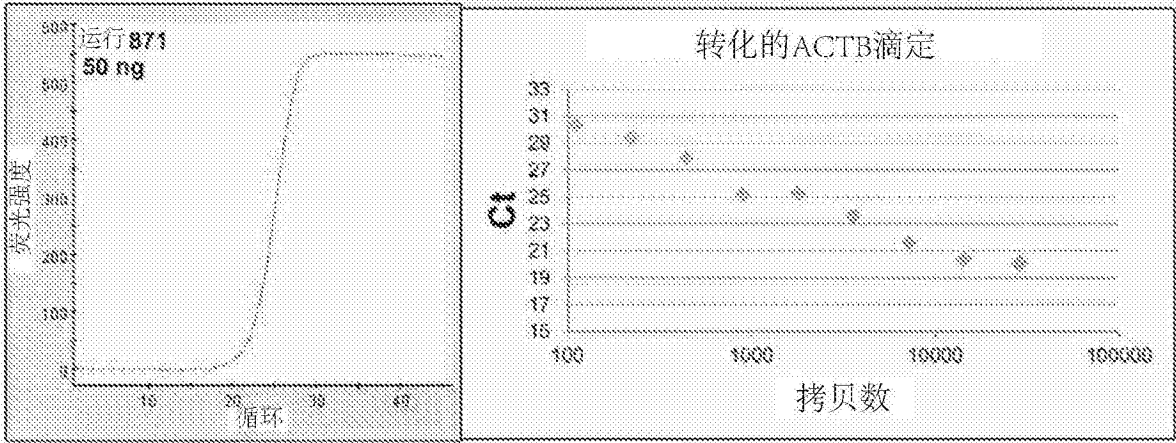


图6A

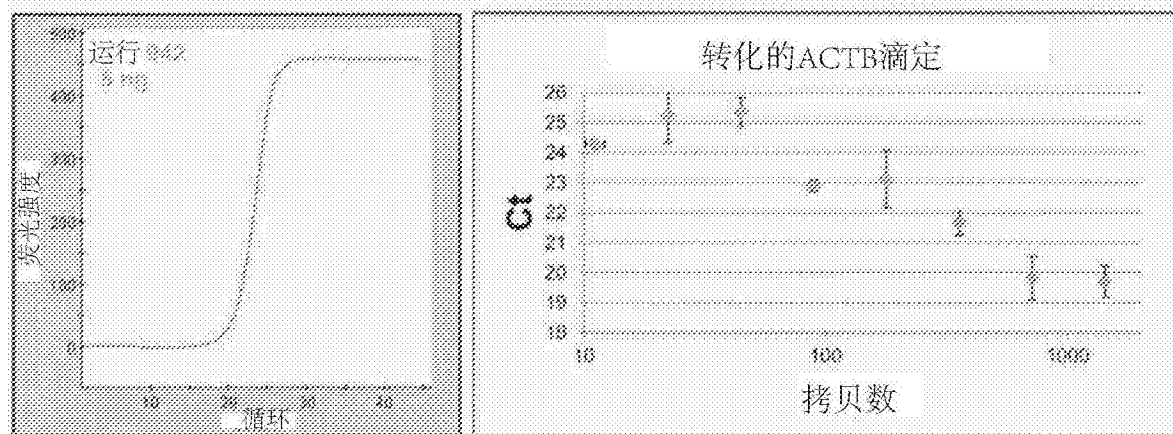


图6B

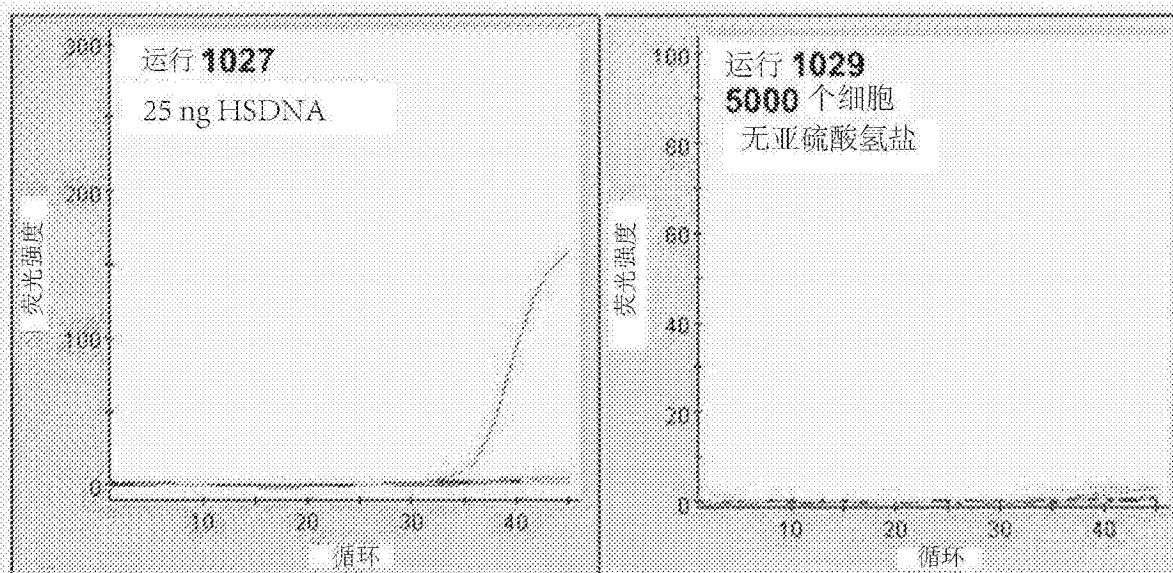


图7A

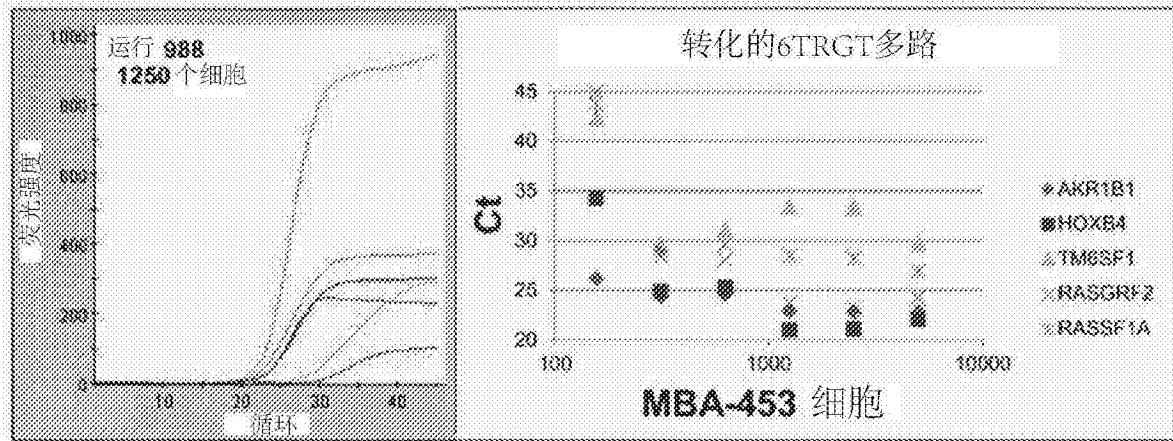


图7B

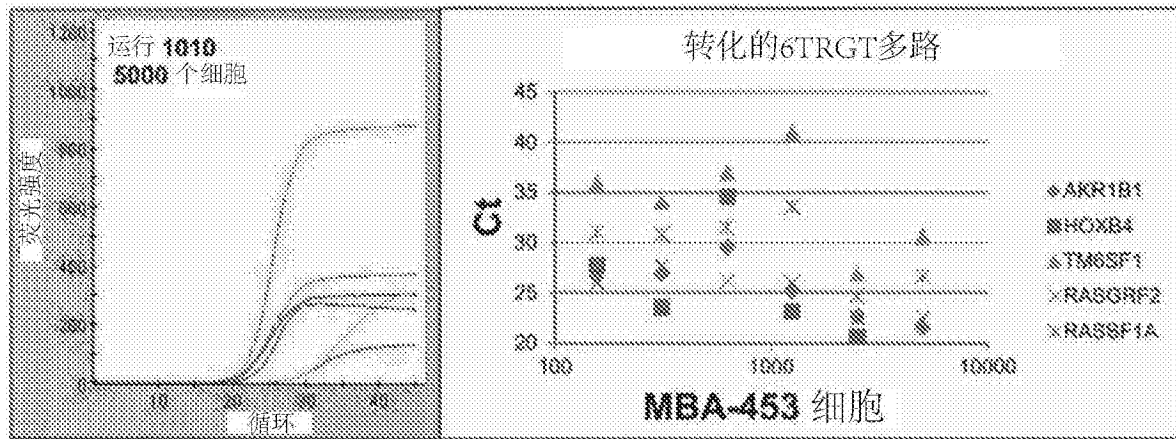


图7C

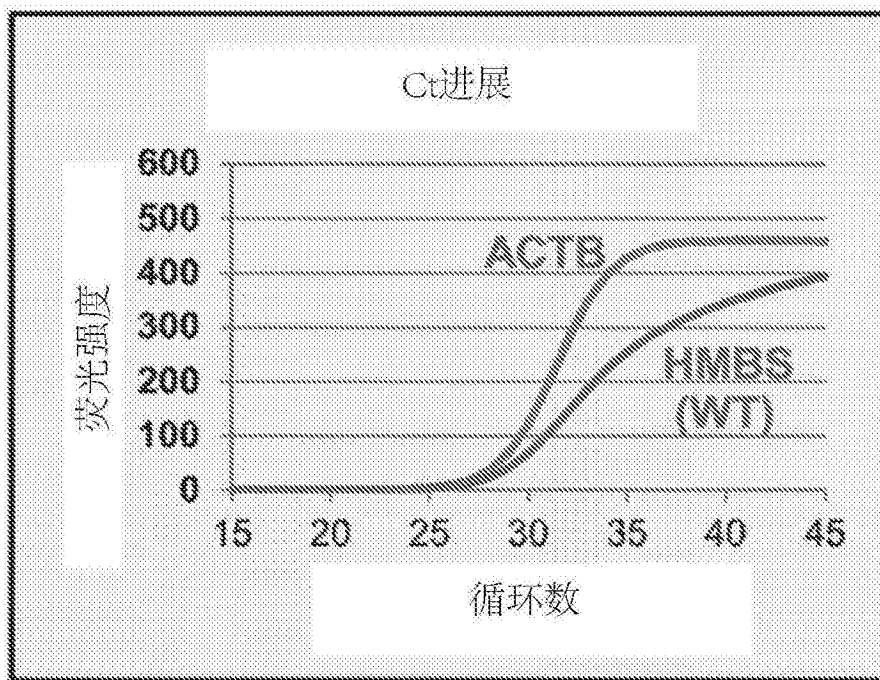


图8

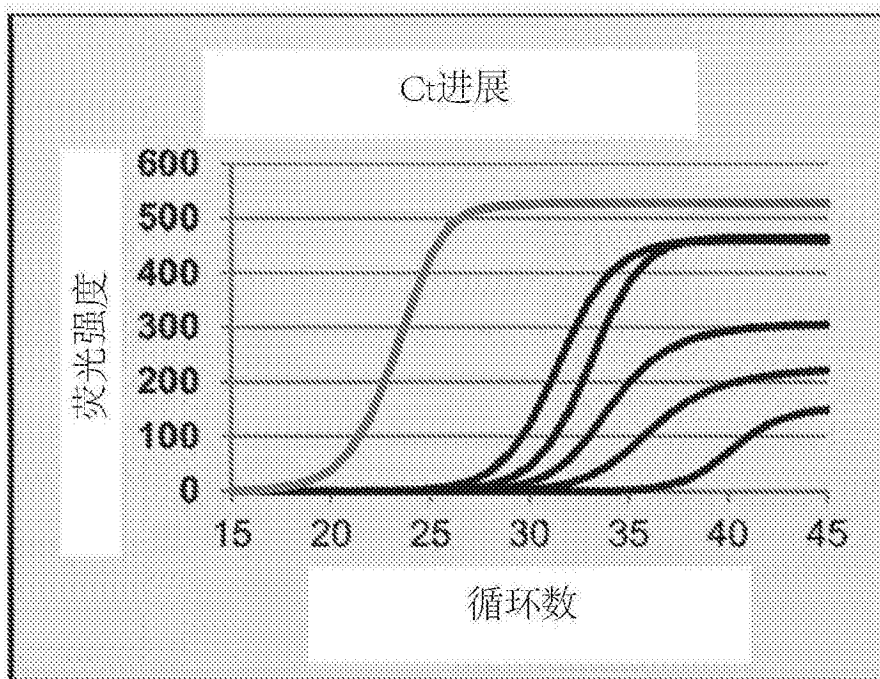


图9

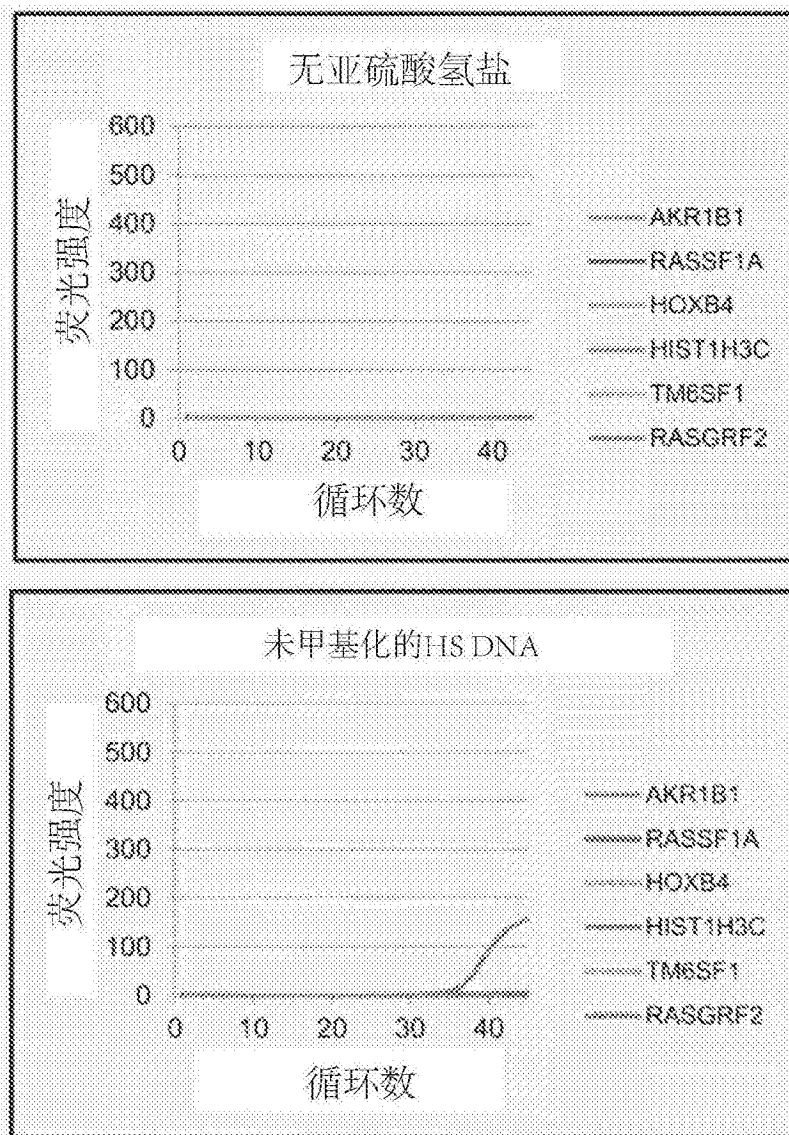


图10

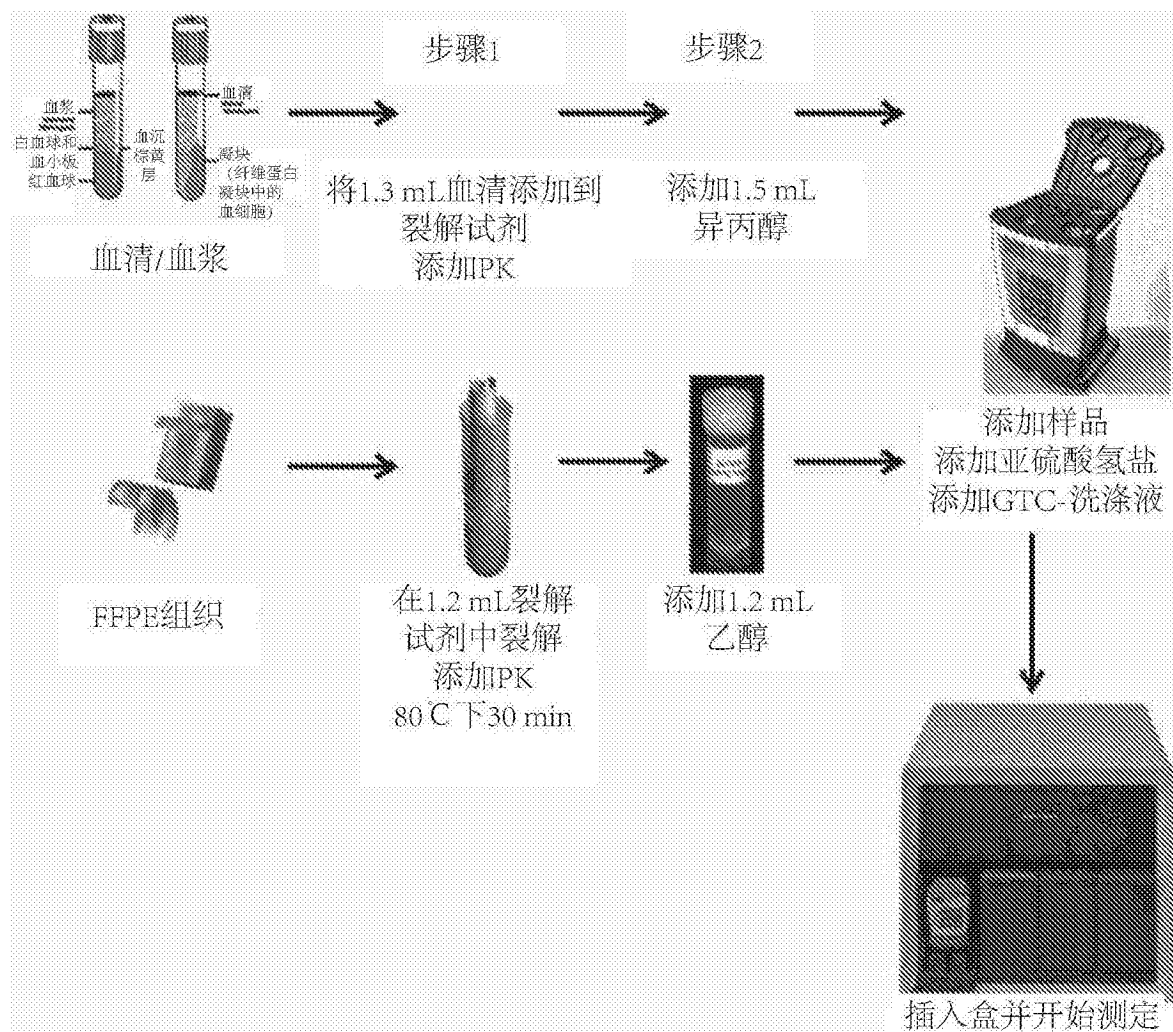


图11

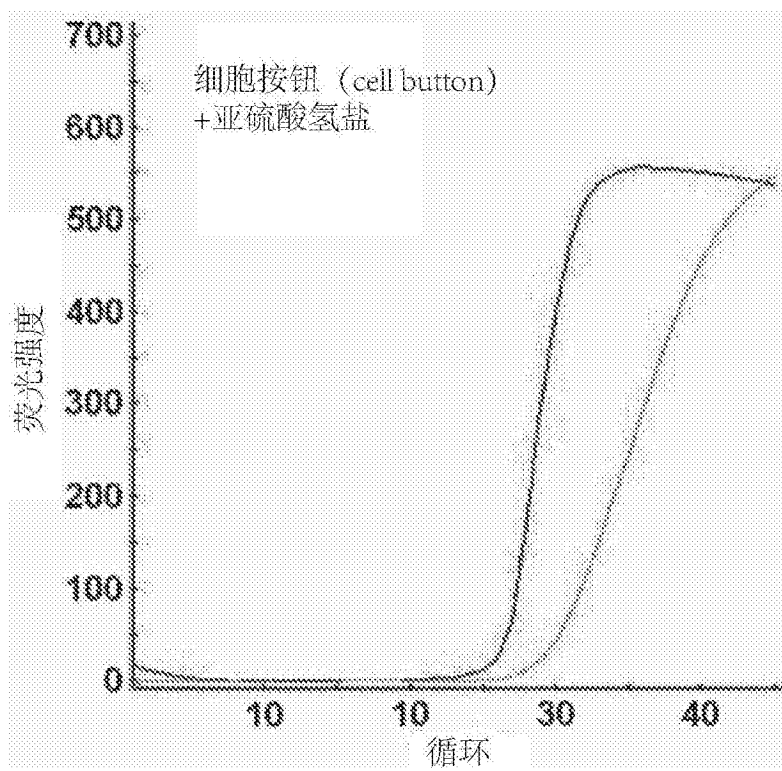


图12

盒类型

室

盒

* 0.12 * 1

The diagram shows a 12-well plate layout. The wells are numbered 1 through 12. A central tube, labeled '管' (tube), is positioned in the center of the plate. The layout is as follows:

- Wells 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, and 12 are arranged in a circular pattern around the central tube.
- Wells 1 and 2 are at the bottom, 3 and 4 are to the right, 5 and 6 are at the top right, 7 and 8 are at the top, 9 and 10 are at the top left, and 11 and 12 are at the bottom left.

#	名称	初始体积 (μL)	当前体积 (μL)
1	PEG	0	0
2	样品	2500	0
3	洗涤液	4000	0
4	亚硫酸氢盐	100	0
5	Tris	4000	0
6	空气2	0	0
7	主混合物	35	0
8	废液	1000	0
9	内珠	0	0
10	KOH	500	0
11	外珠	0	0
12	空气1	0	0

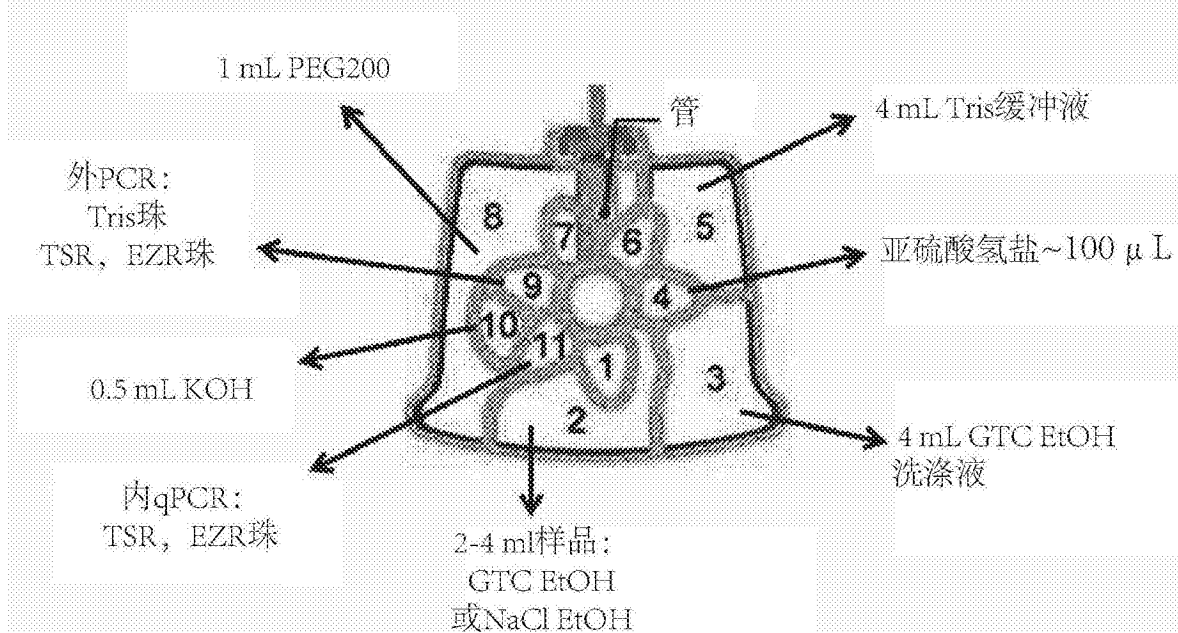


图13A

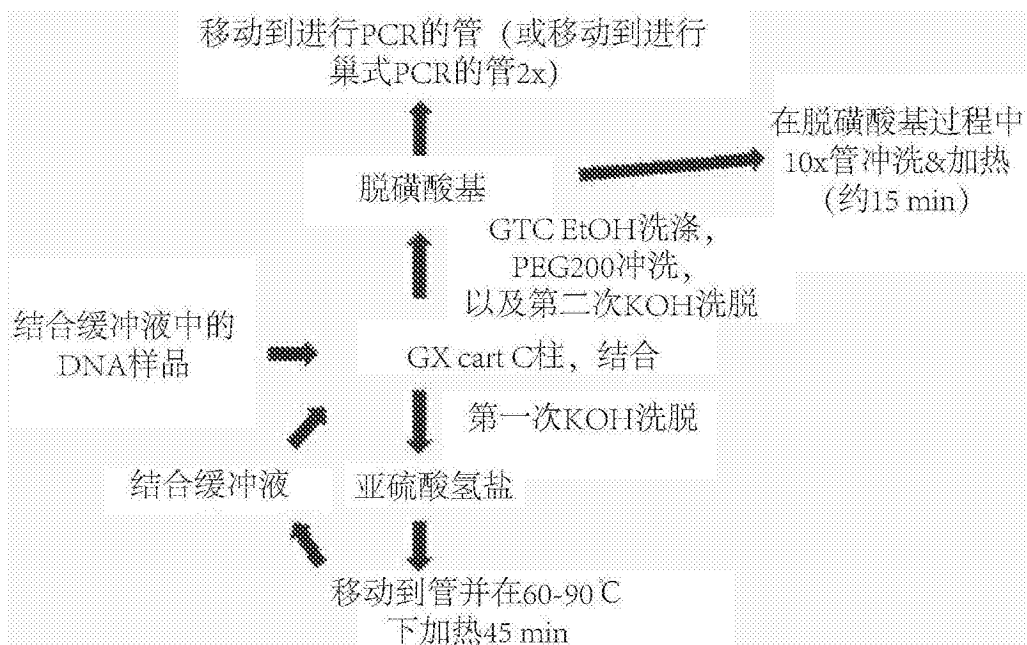


图13B

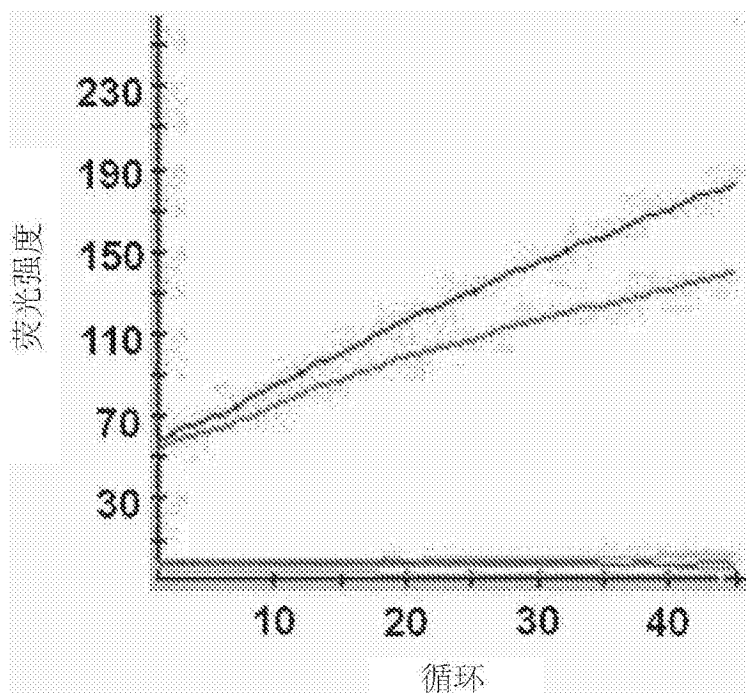


图14

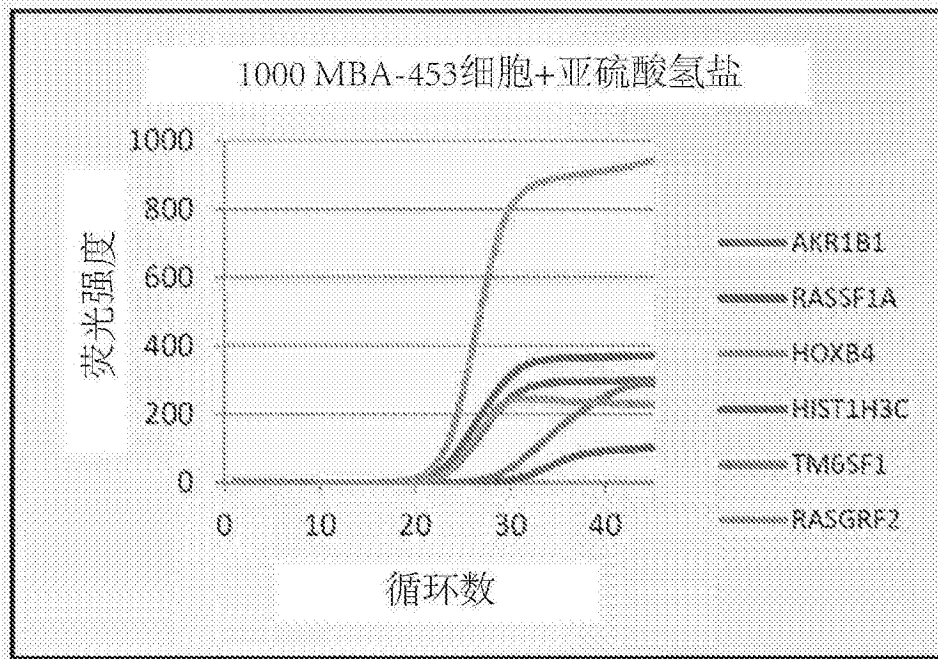


图15A

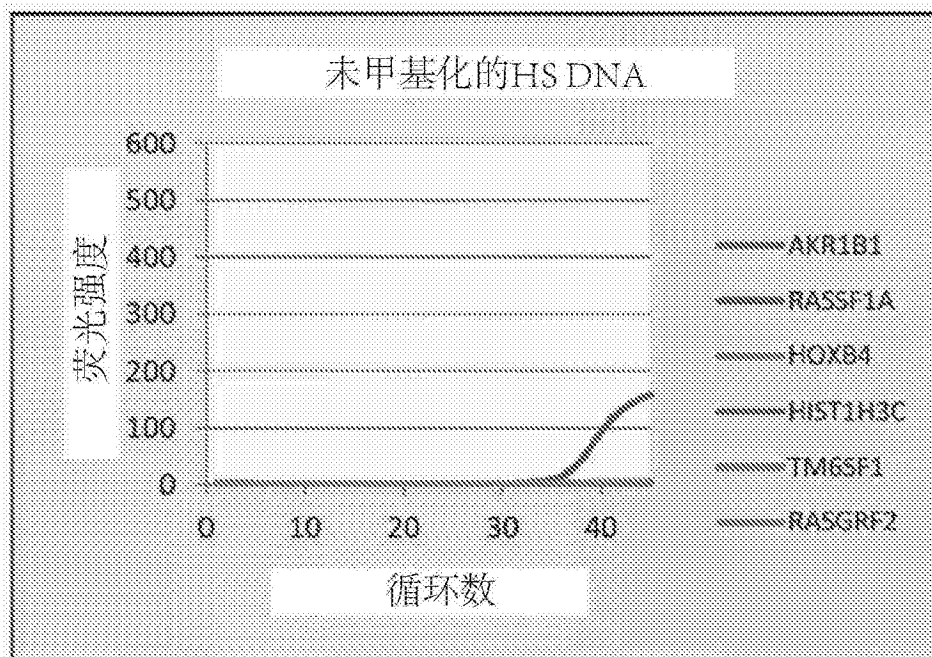


图15B

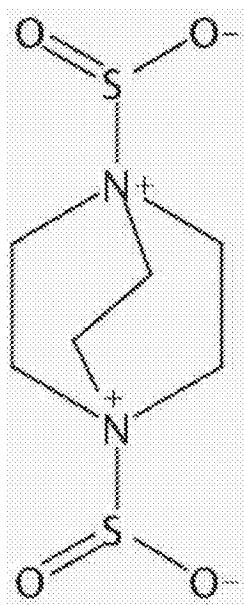


图16

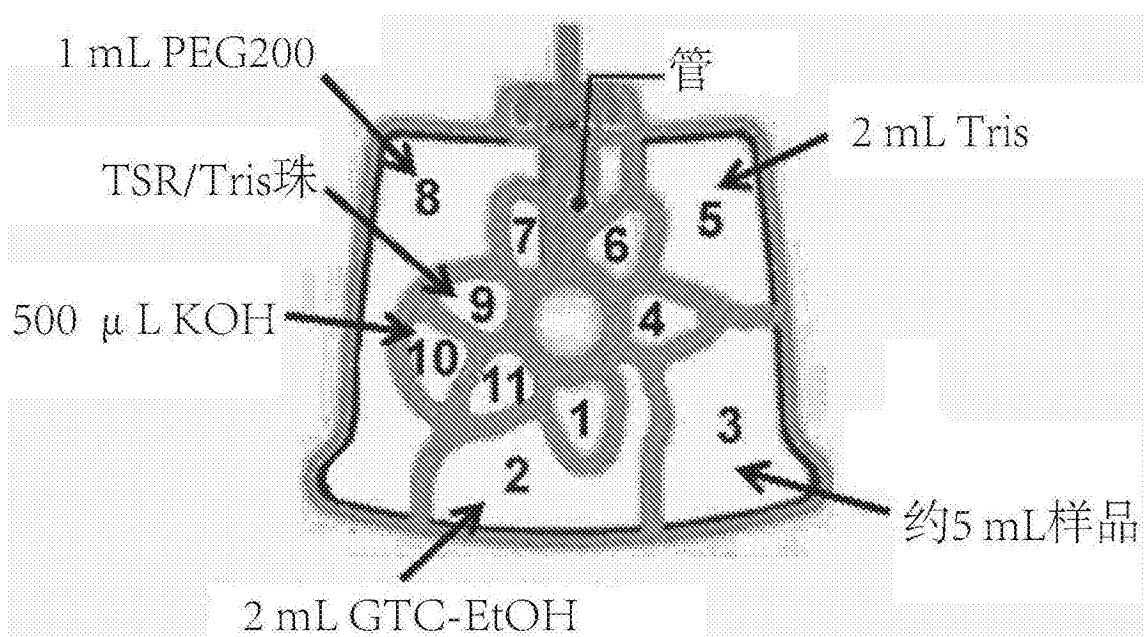


图17

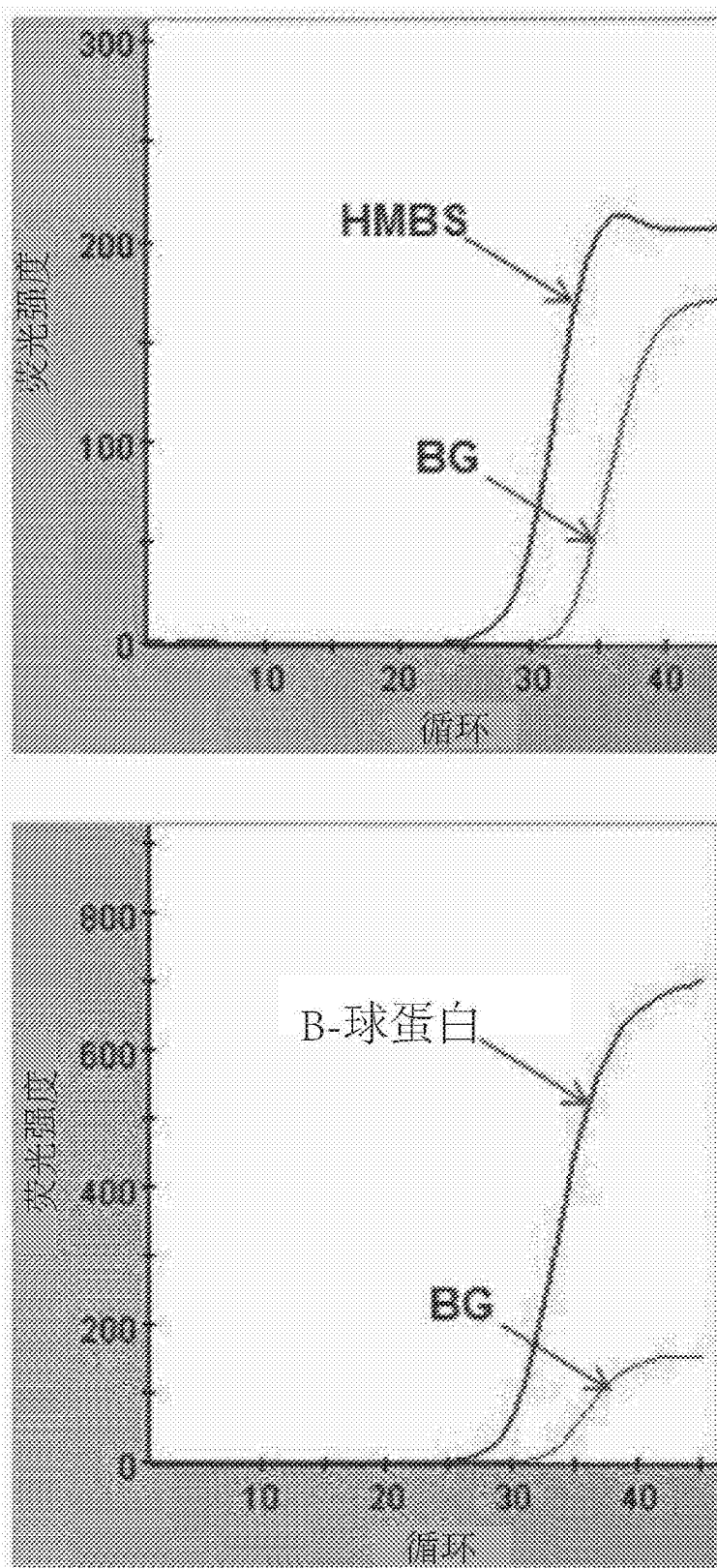


图18

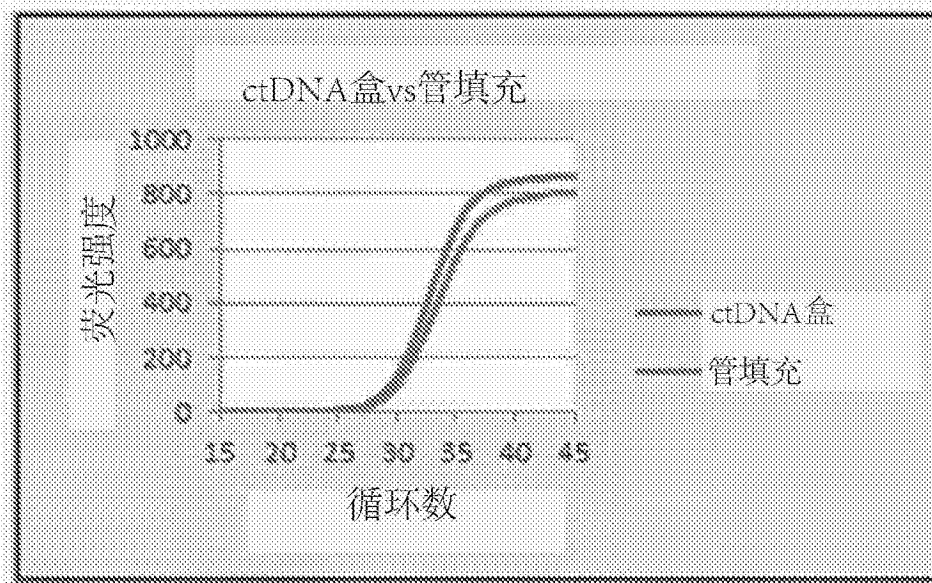


图19A

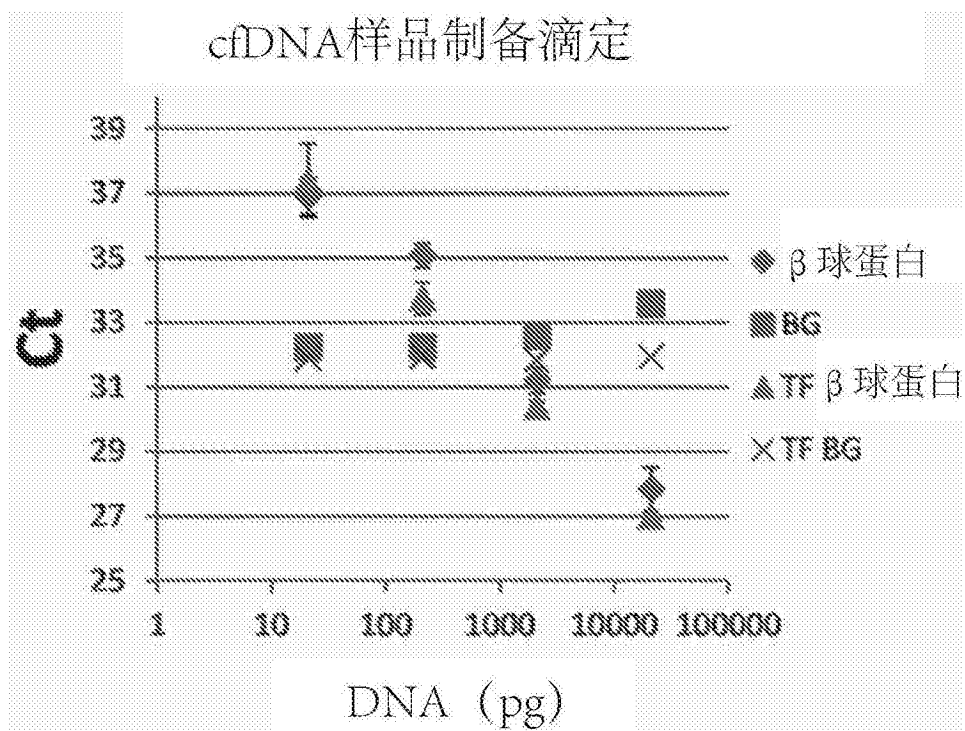


图19B

用于4-5 mL血浆/血清的样品制备盒

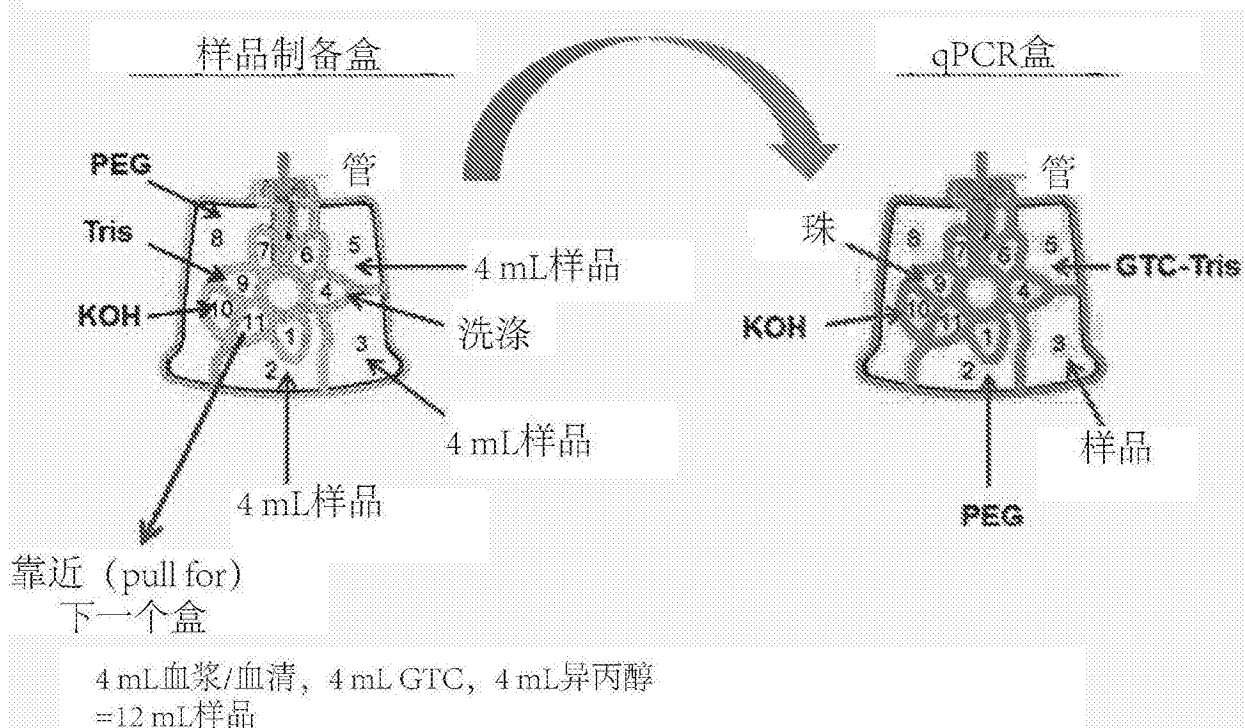


图20A

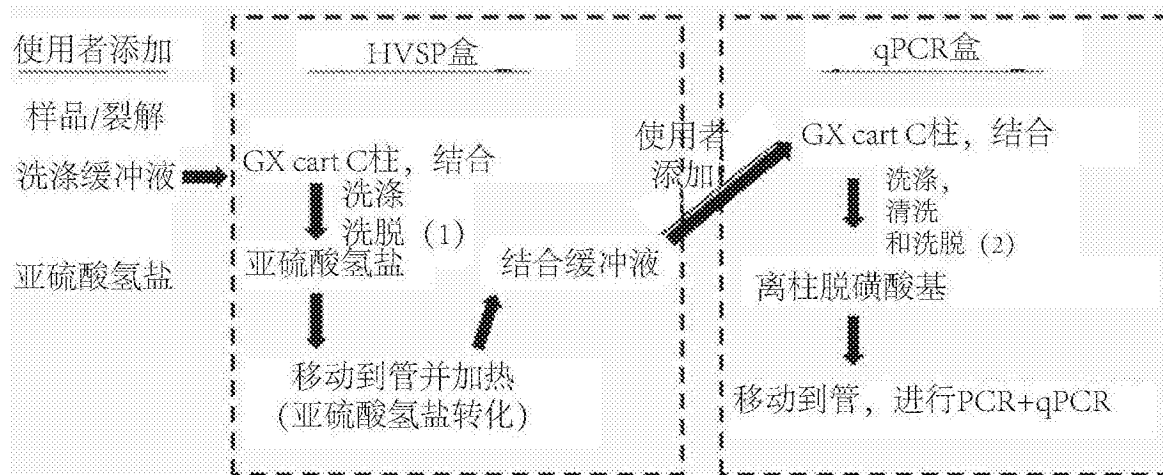


图20B

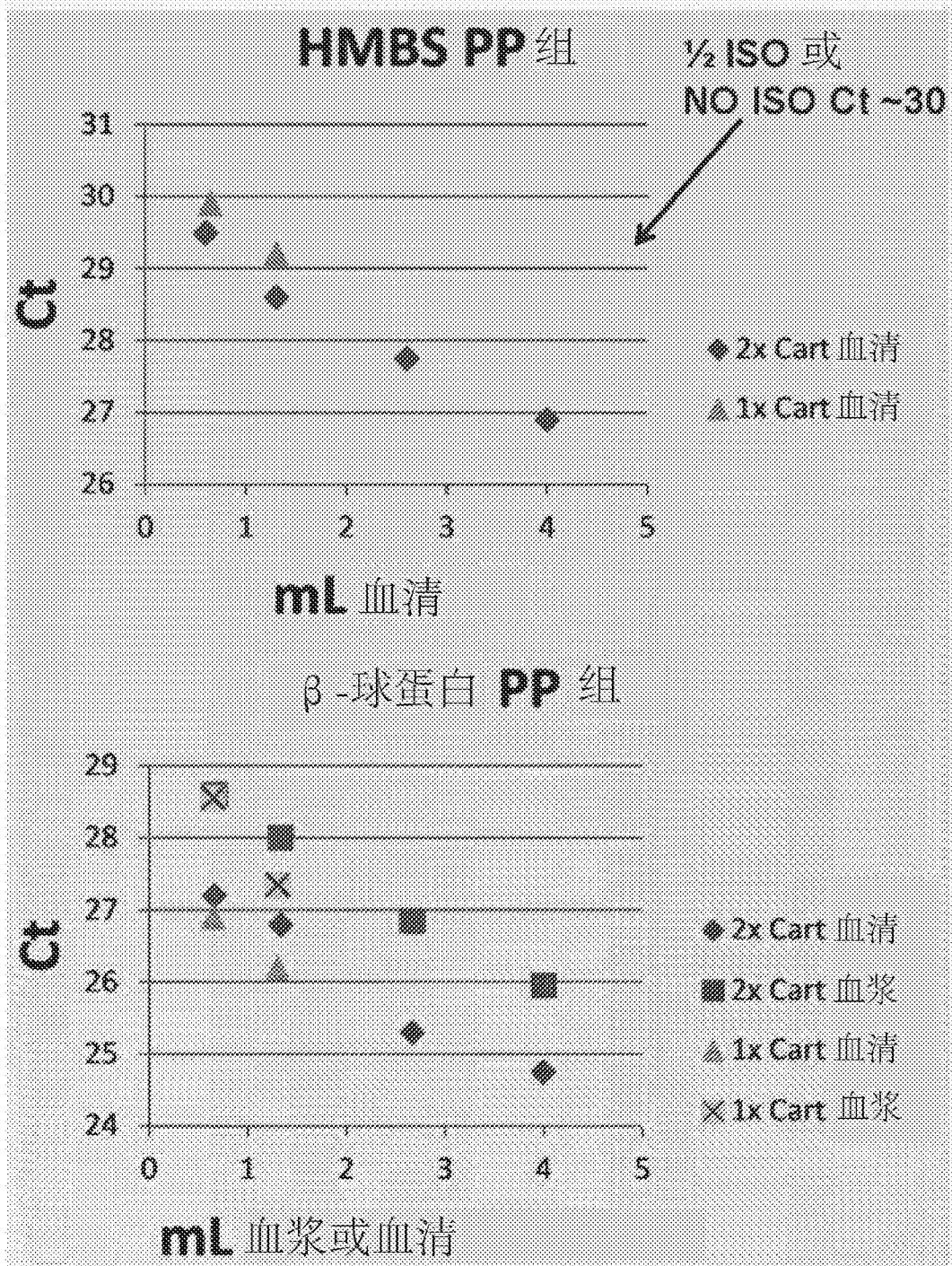


图21

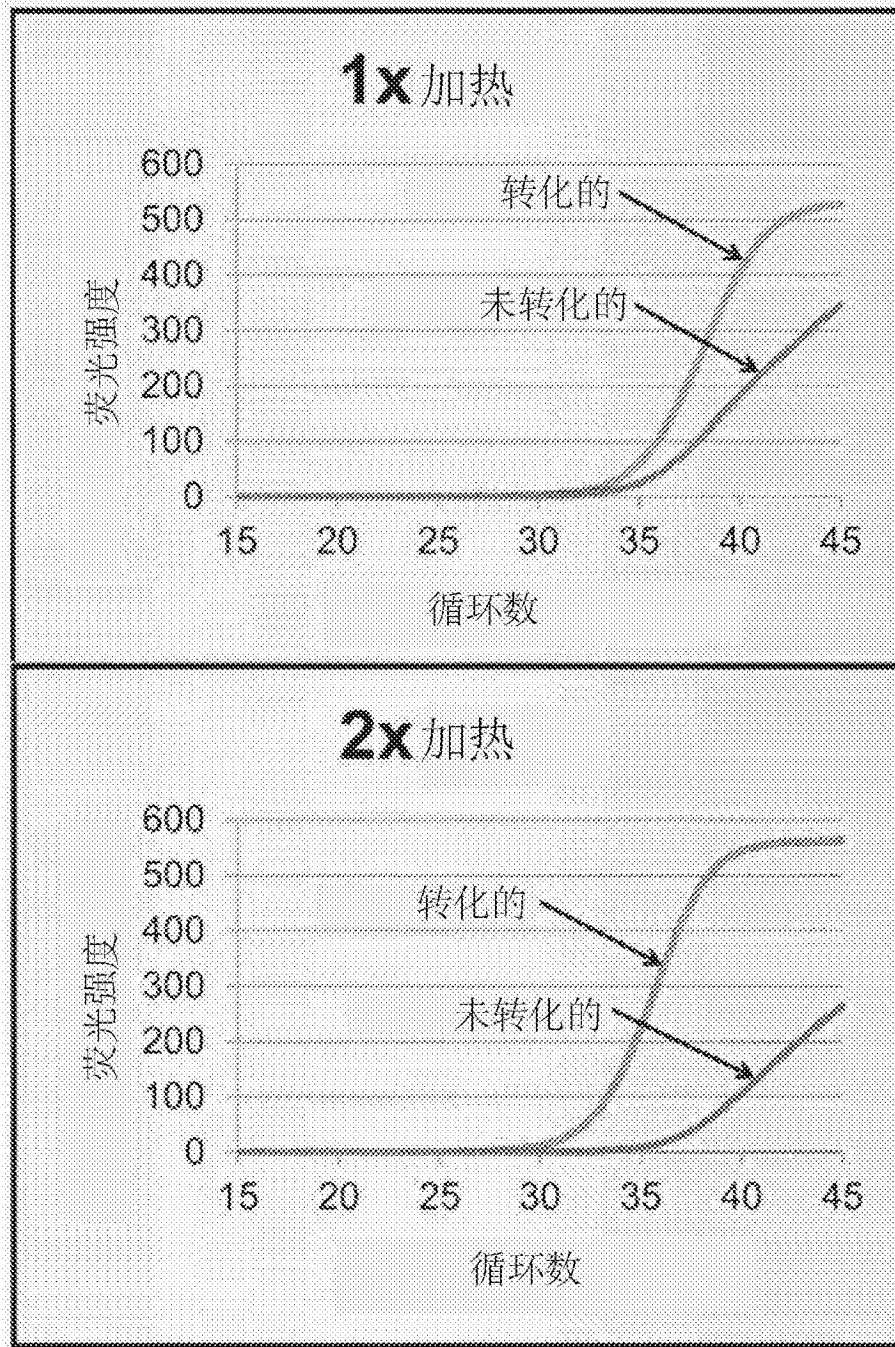


图22

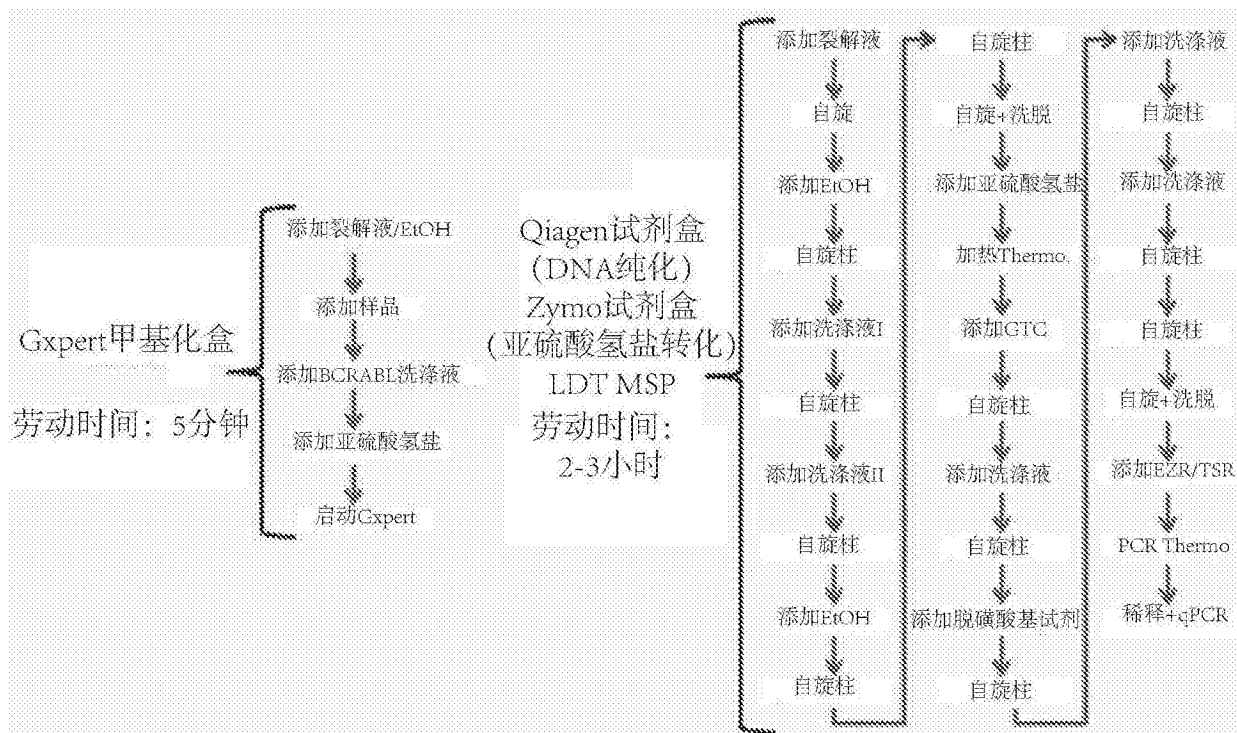


图23A

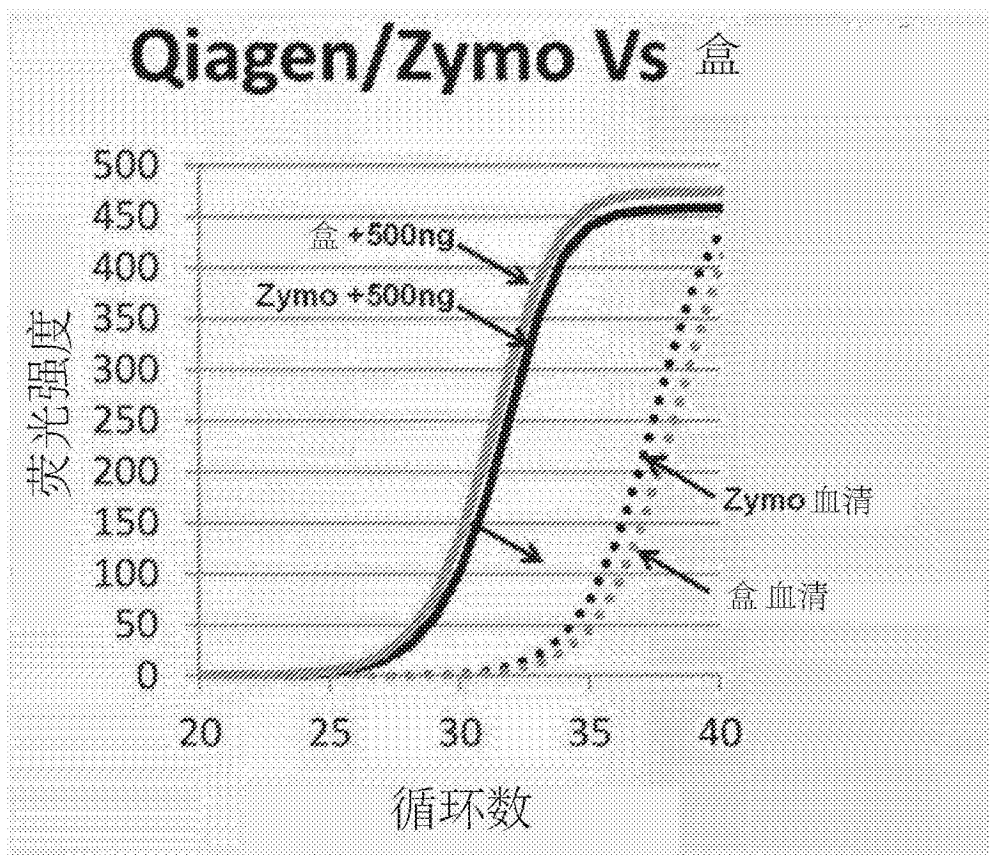


图23B

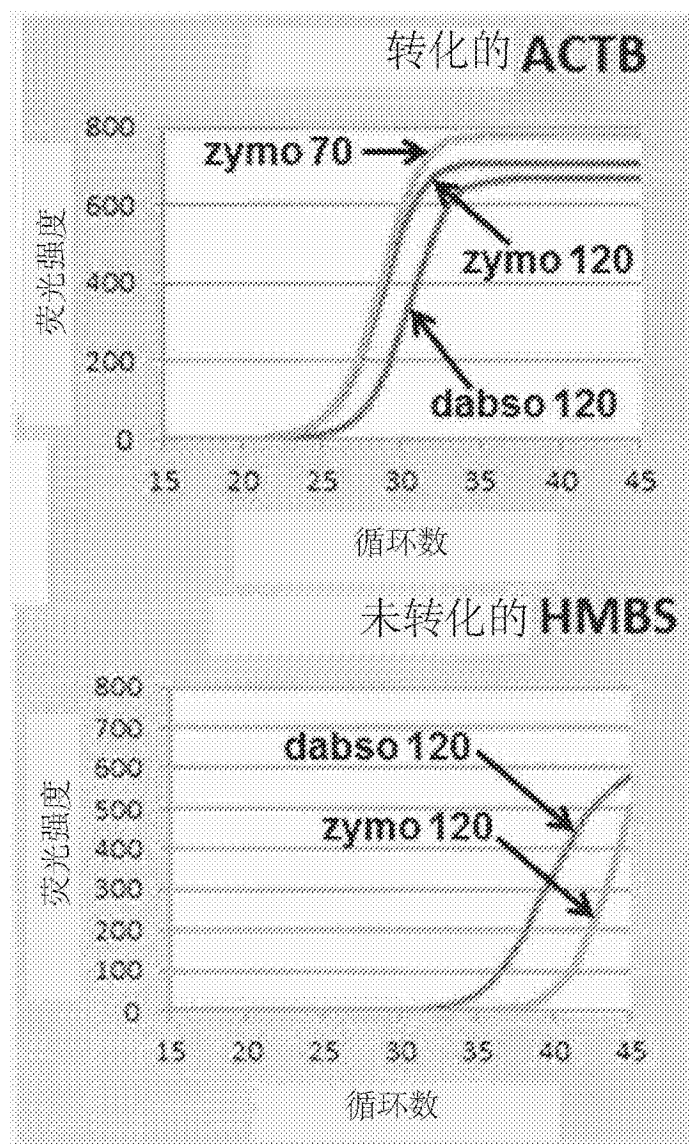


图24

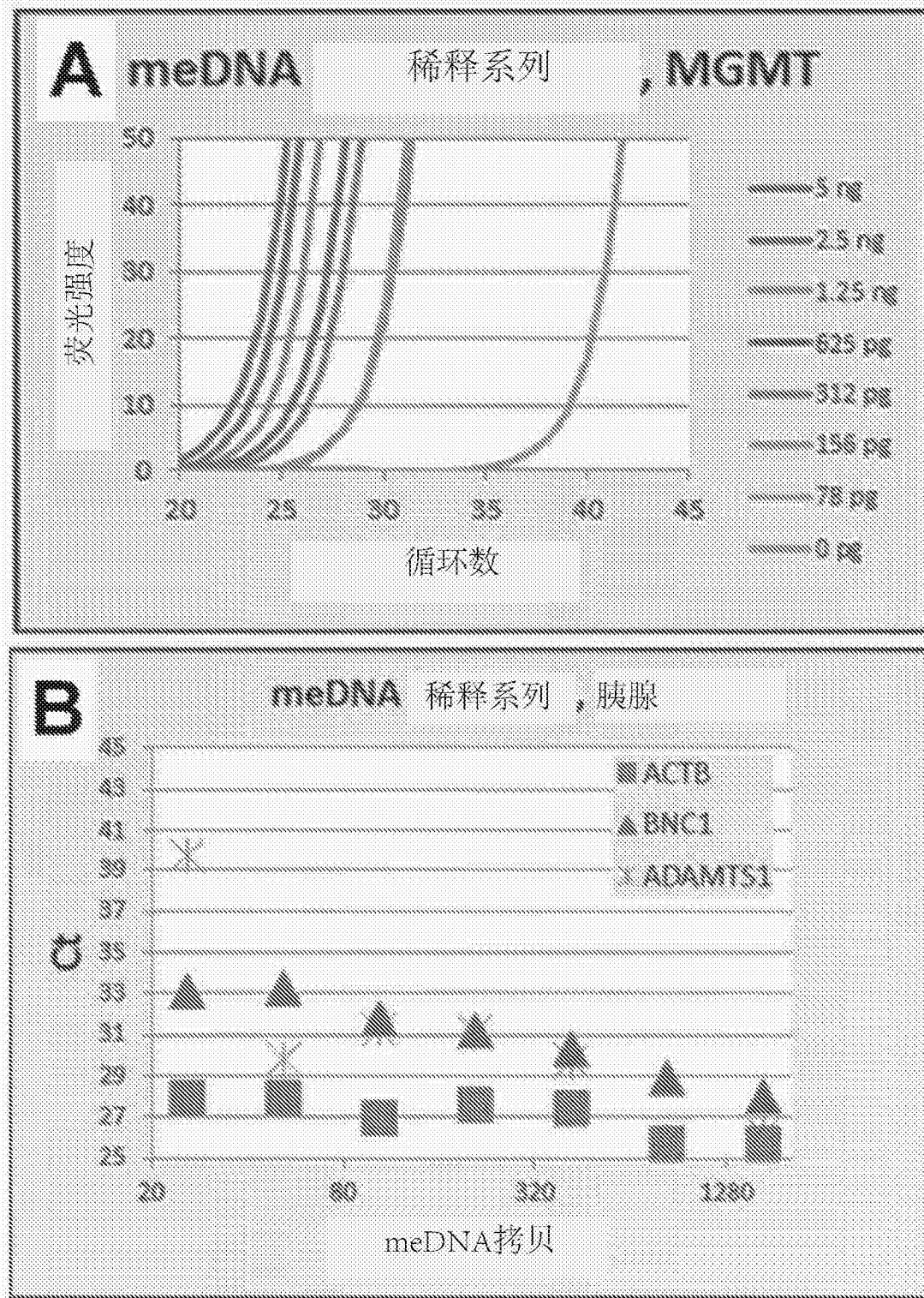


图25

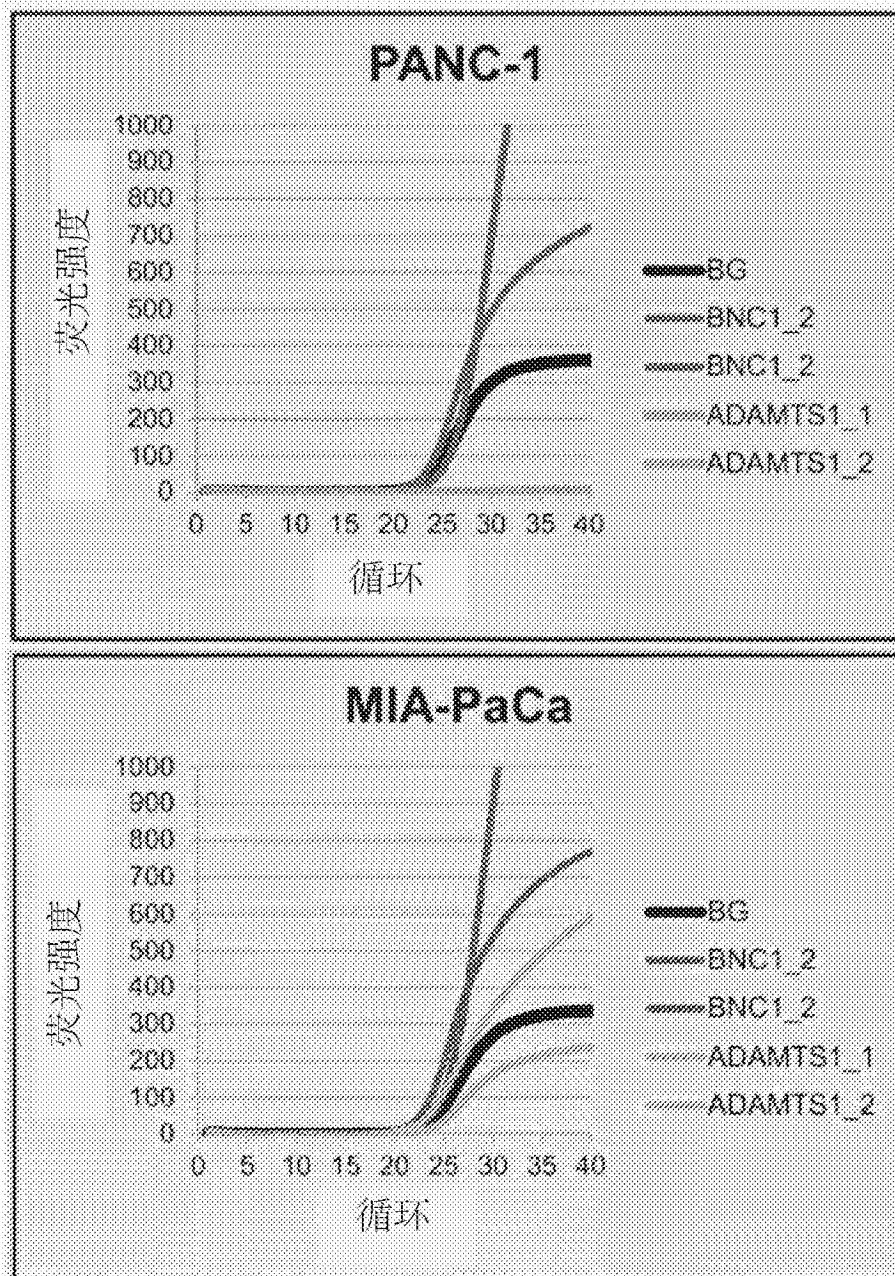


图26

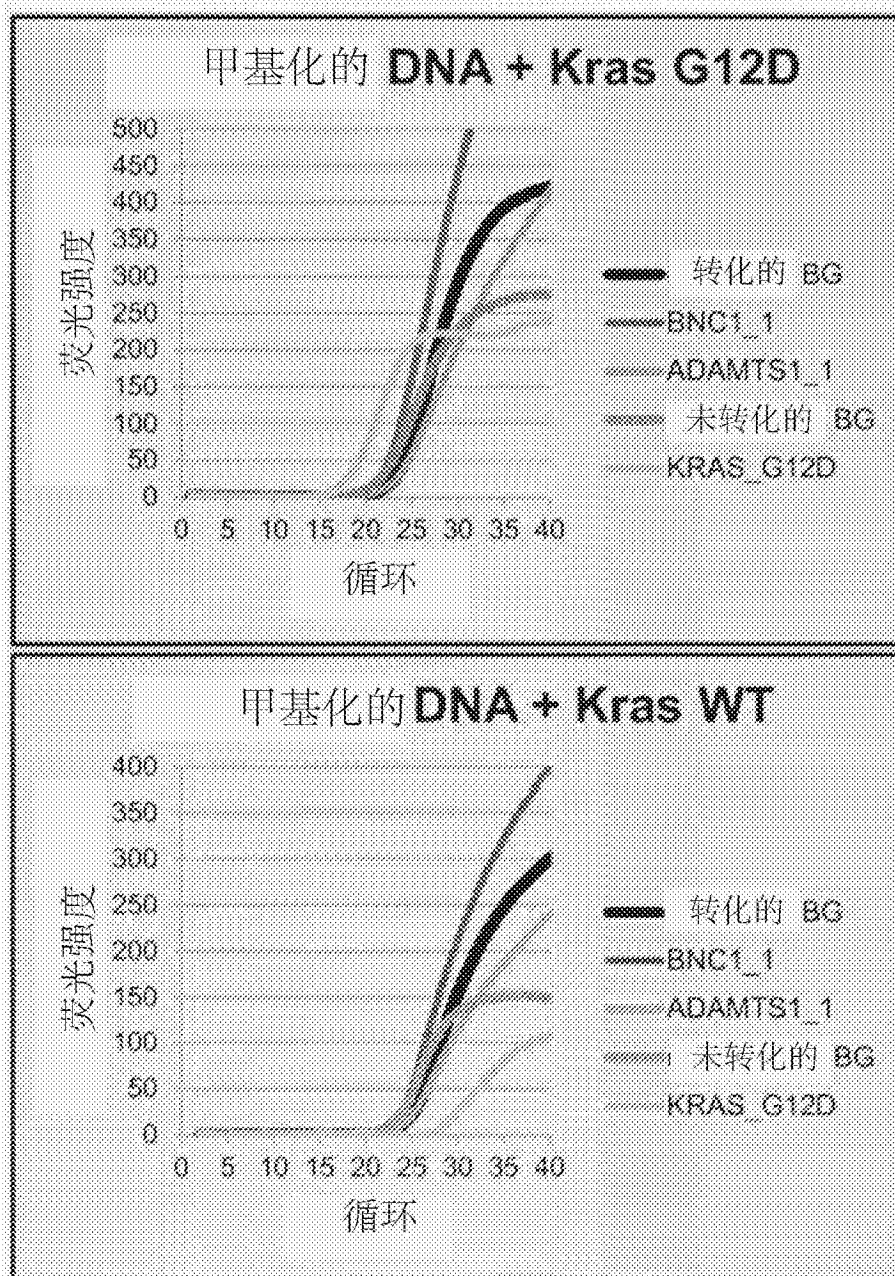


图27A

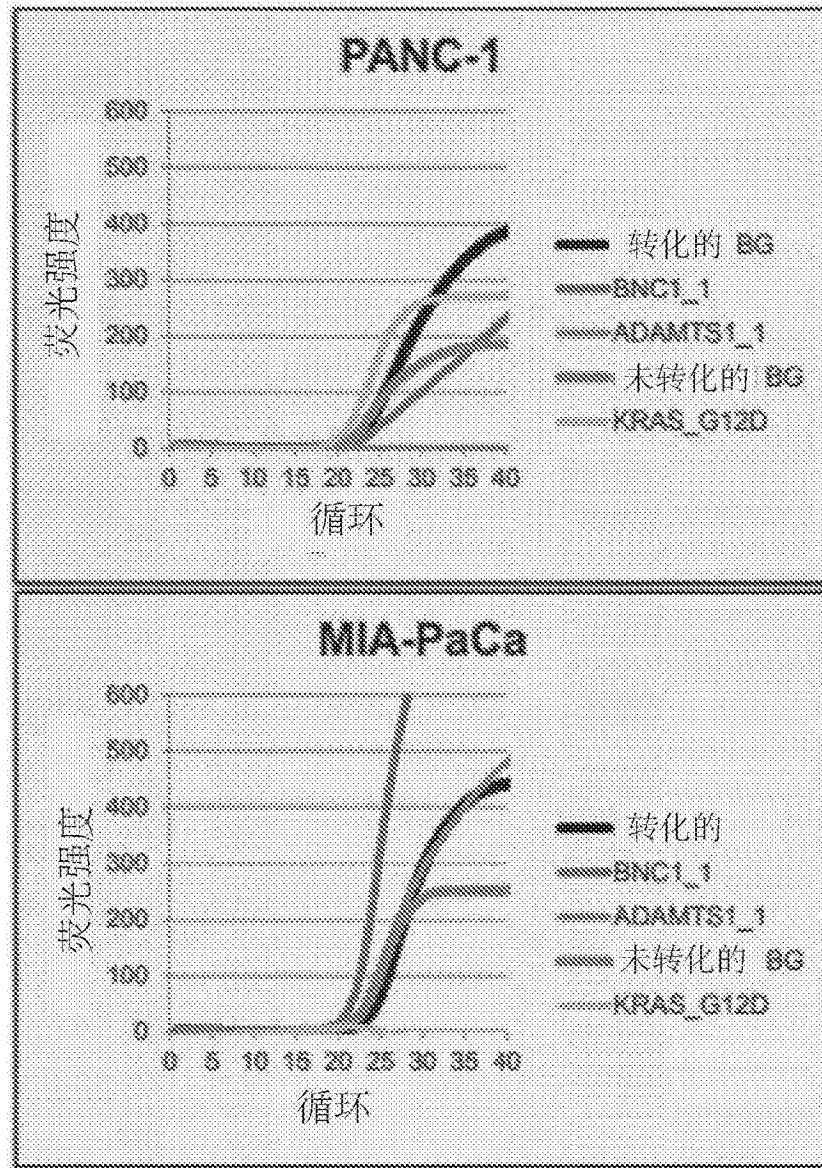


图27B

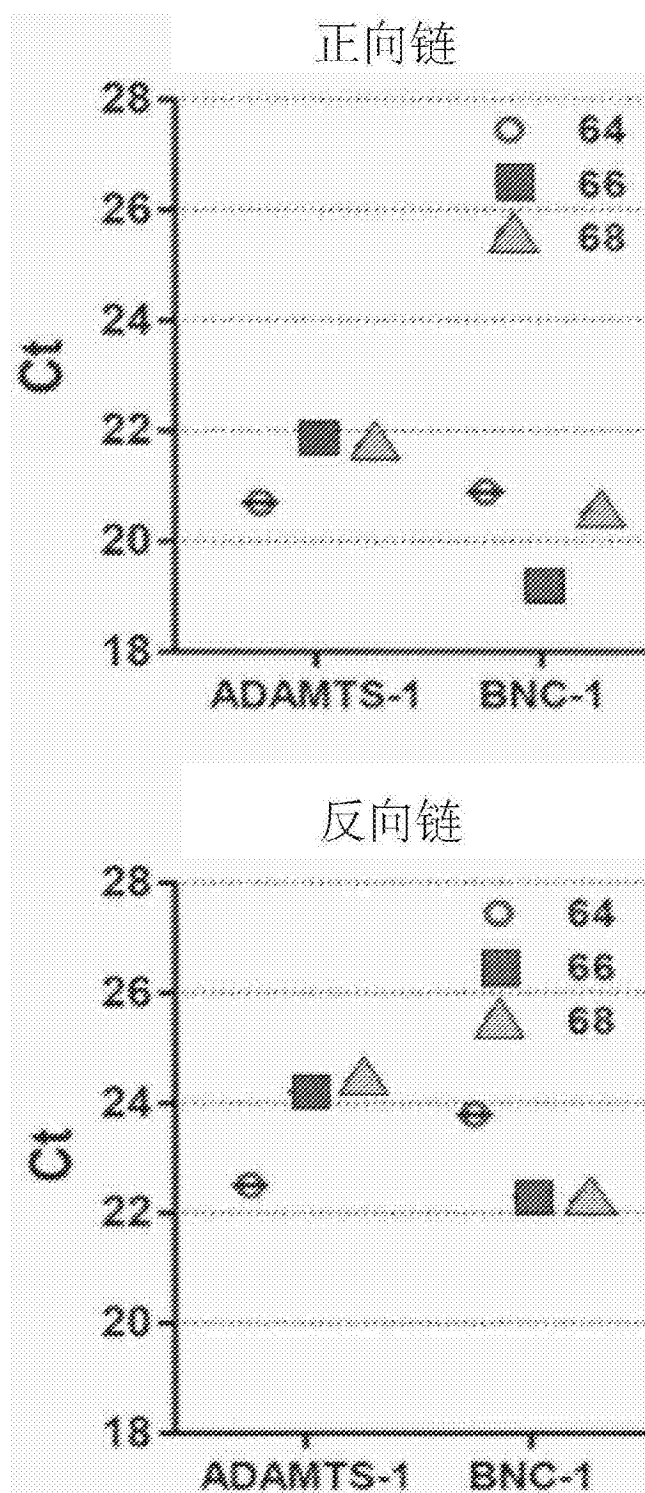


图28

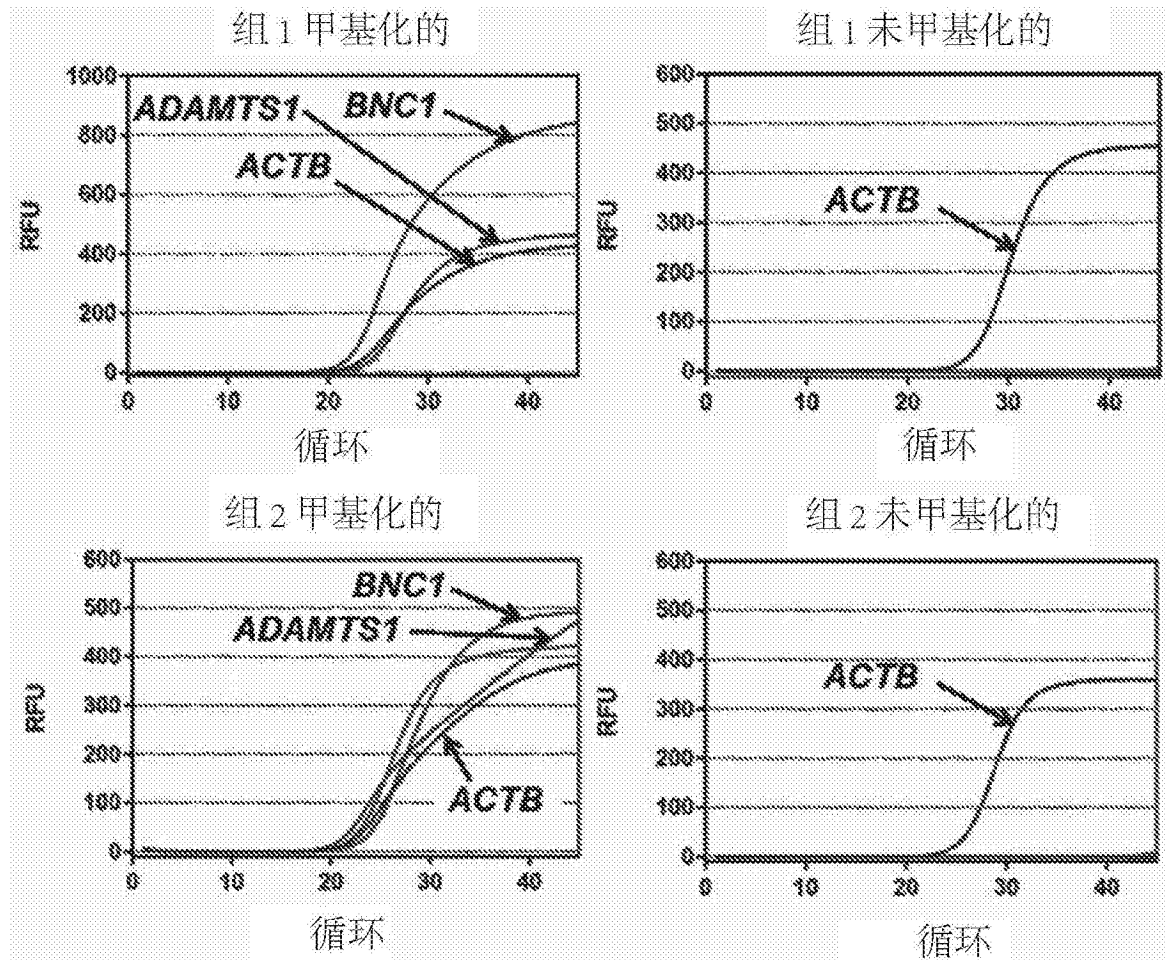


图29

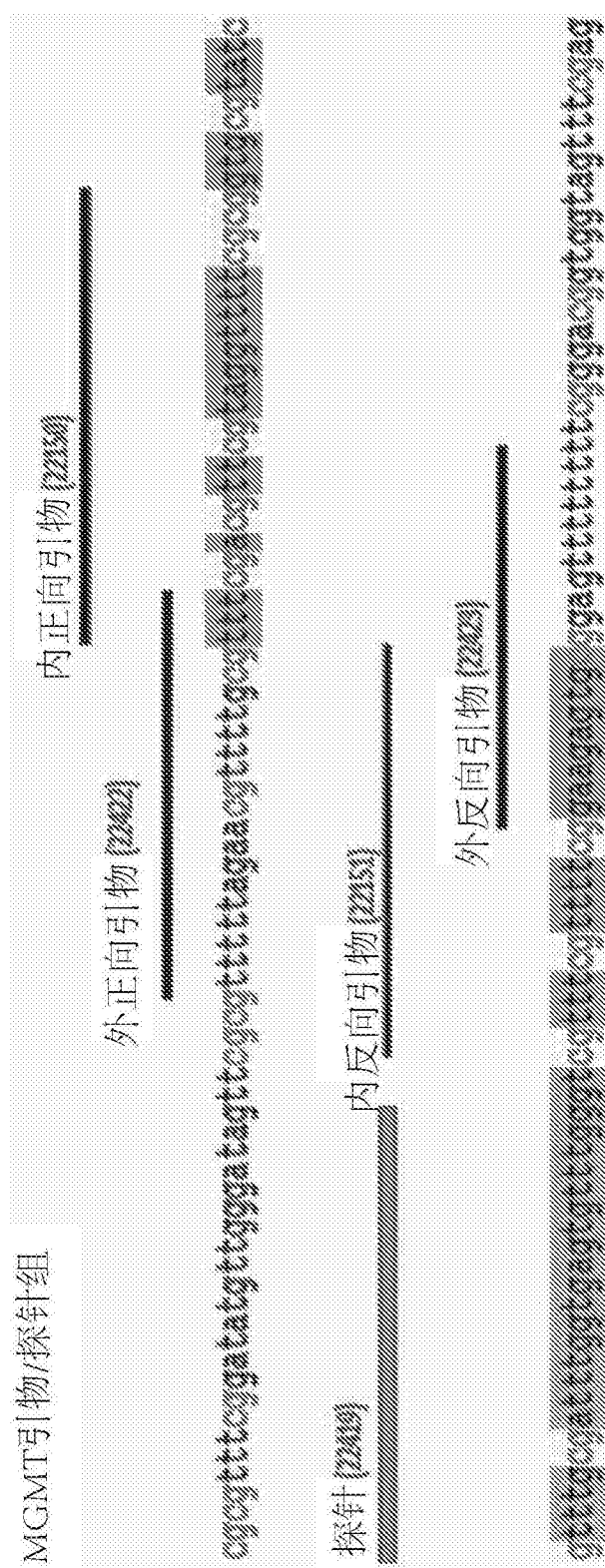


图30

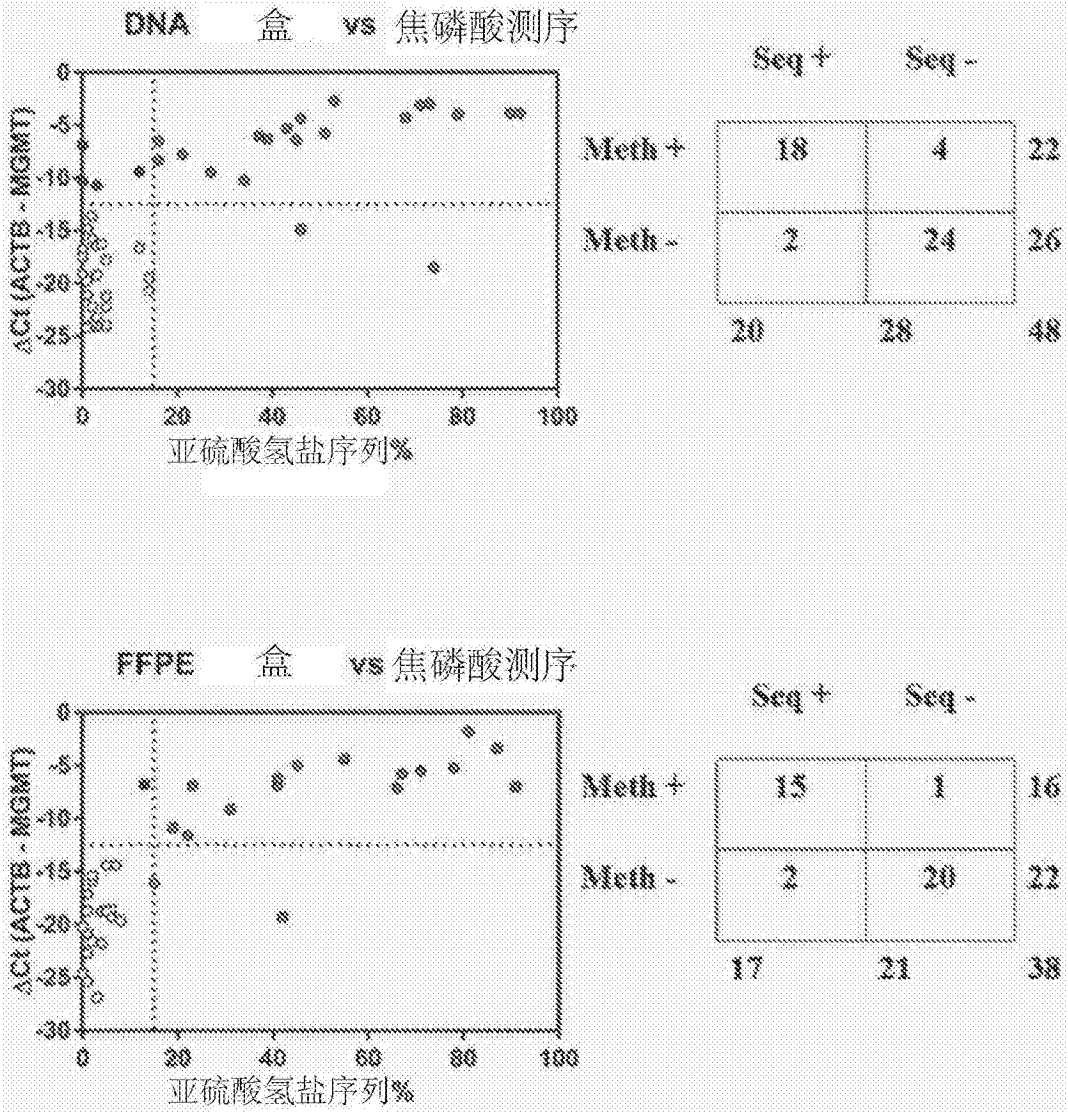


图31

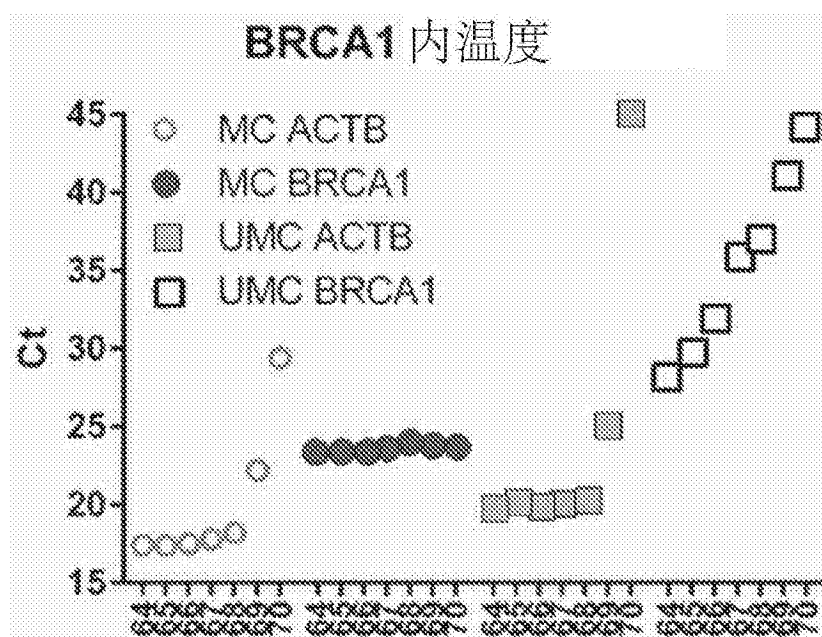


图32

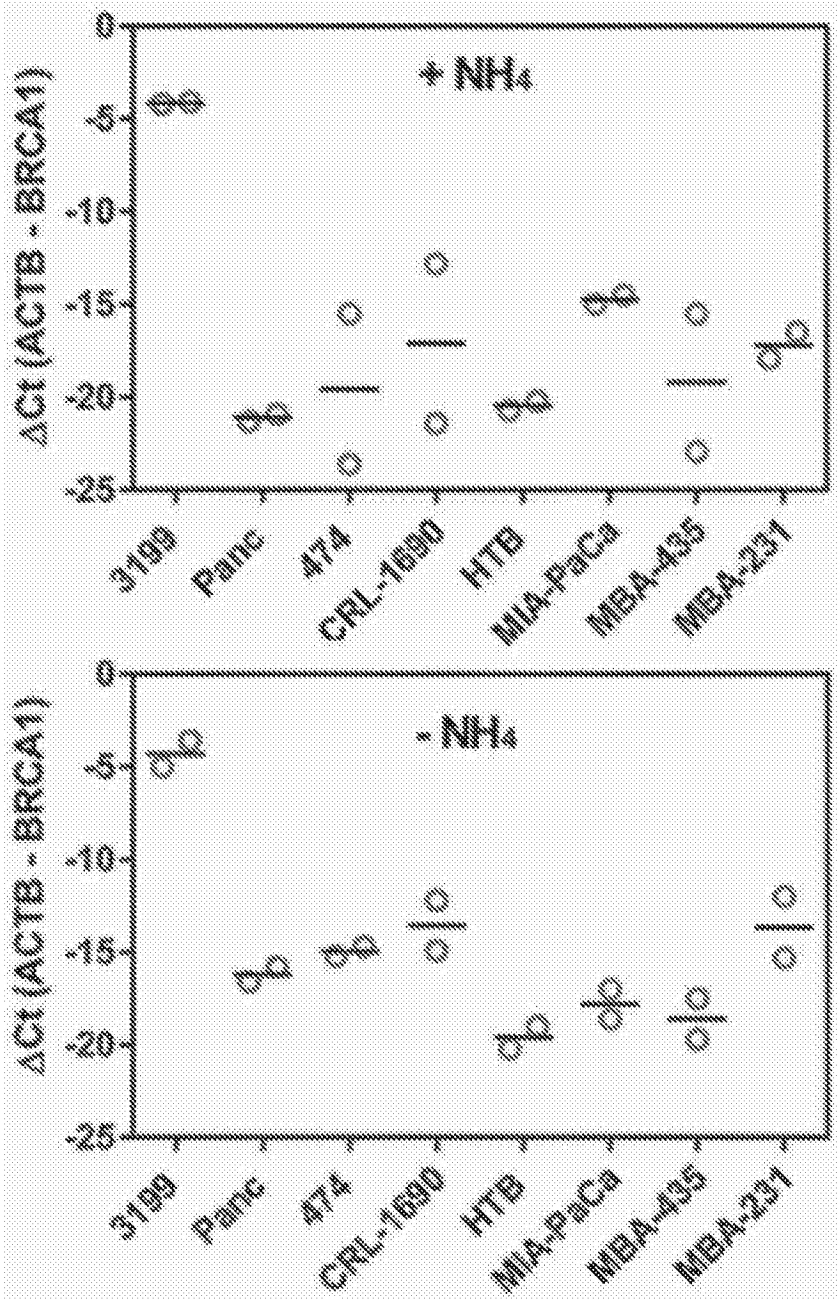


图33

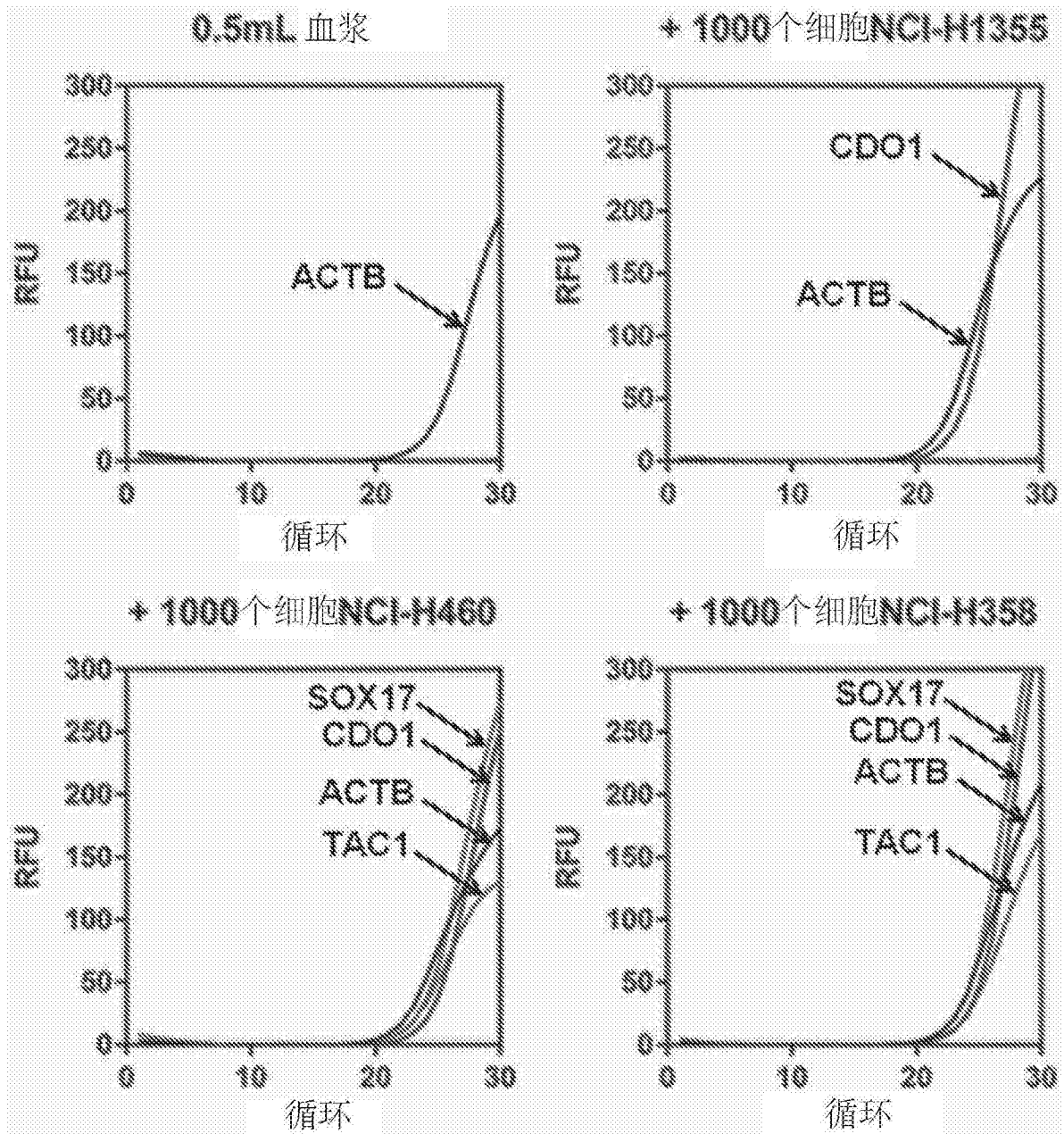


图34