



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103517993 A

(43) 申请公布日 2014. 01. 15

(21) 申请号 201280020801. 3

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2012. 02. 28

C12Q 1/68 (2006. 01)

(30) 优先权数据

61/447, 490 2011. 02. 28 US

61/532, 887 2011. 09. 09 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2013. 10. 28

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2012/026938 2012. 02. 28

(87) PCT国际申请的公布数据

W02012/118802 EN 2012. 09. 07

(71) 申请人 环球基因有限公司

地址 美国内布拉斯加州

(72) 发明人 K·理查森 B·小勒让德 Y·施

(74) 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

72002

代理人 左路 林晓红

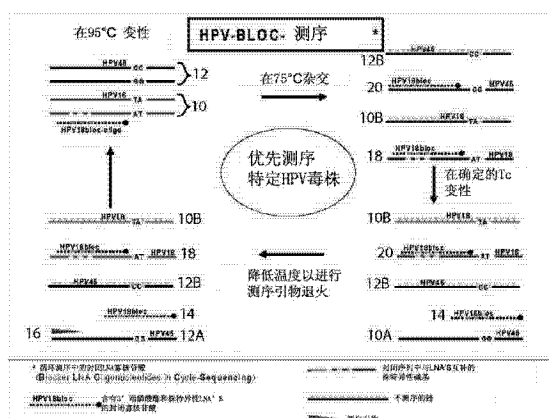
权利要求书3页 说明书15页 附图13页

(54) 发明名称

用于对混合群体中的靶 DNA 进行测序的试剂盒和方法

(57) 摘要

本文提供了在具有相关的参考序列的样品中对靶 DNA 序列进行测序的方法和试剂盒。具体而言,描述了用于对癌症和癌症治疗相关突变进行测序的试剂盒和方法。还提供了用于检测线粒体突变和用于在紧密相关的病毒株之间进行区分的试剂盒和方法。



1. 对具有参考序列的样品中的靶 DNA 序列进行测序的试剂盒,其包含测序引物和封闭核酸,所述测序引物与靶序列的一条链的一部分和参考序列的一条链的一部分互补,所述封闭核酸与所述参考序列的一条链的至少一部分完全互补,其中所述测序引物和所述封闭核酸与参考序列的同一链互补,并且其中所述封闭核酸在 3' 端被封闭使得其不能被聚合酶延伸。

2. 权利要求 1 的试剂盒,还包含标记的链终止三磷酸核苷酸。

3. 权利要求 1 或 2 的试剂盒,其中所述靶序列和所述参考序列能被变性以产生靶链和参考链,并且其中在允许杂交的条件下所述封闭核酸能够与完全互补的参考链形成同源双链体和与部分互补的靶链形成异源双链体。

4. 权利要求 3 的试剂盒,其中所述封闭核酸和互补靶链的异源双链体的变性温度低于所述封闭核酸和互补参考链的双链体的变性温度。

5. 权利要求 4 的试剂盒,其中所述测序引物能够在低于临界温度的温度退火至靶链。

6. 权利要求 1-5 任一项的试剂盒,其中:

所述测序引物的 3' 端能够在邻近所述参考序列的链上的结合所述封闭核酸 5' 端的碱基处与所述参考序列的所述链结合;

或者所述测序引物的 3' 端和所述封闭核酸的 5' 端与所述参考序列的至少一个相同碱基互补。

7. 权利要求 1-6 任一项的试剂盒,其中所述封闭核酸上的 5' 端包含阻止 DNA 聚合酶从 5' 至 3' 的外切核酸降解的核苷酸。

8. 权利要求 1-7 任一项的试剂盒,其中所述封闭核酸是单链核酸。

9. 权利要求 1-8 任一项的试剂盒,其中所述封闭核酸包含 DNA、RNA、肽核酸、锁核酸、另外的修饰的核苷酸或者其组合。

10. 权利要求 9 的试剂盒,其中所述封闭核酸中肽核酸、锁核酸或另外的修饰的核苷酸的位置经选择以匹配所述参考序列和所述靶序列疑似不同的位置。

11. 权利要求 10 的试剂盒,其中使所述封闭核酸和互补靶链的异源双链体变性所需的温度与使所述封闭核酸和参考链的双链体变性所需的温度之间的差异被最大化。

12. 权利要求 9-11 任一项的试剂盒,其中所述封闭核酸中肽核酸、锁核酸或另外的修饰的核苷酸的位置经选择以提供横跨所述封闭核酸的更恒定的解链温度。

13. 权利要求 1-12 任一项的试剂盒,还包含 5' - 磷酸化的引物,其中所述 5' - 磷酸化的引物不与所述测序引物互补于同一链。

14. 权利要求 13 的试剂盒,还包含 5' - 磷酸酯依赖性外切核酸酶。

15. 权利要求 1-14 任一项的试剂盒,其中所述靶序列或所述参考序列包含 K-RAS 外显子 2 密码子 12 和 / 或 13。

16. 权利要求 1-14 任一项的试剂盒,其中所述靶序列或所述参考序列包含线粒体突变。

17. 权利要求 16 的试剂盒,其中所述线粒体突变与 MELAS 相关。

18. 权利要求 1-14 任一项的试剂盒,其中所述靶序列或所述参考序列包含 HPV 核酸。

19. 权利要求 1-14 任一项的试剂盒,其中所述靶序列或所述参考序列包含 BRAF 外显子 11 和 / 或外显子 15。

20. 制备样品中的靶序列以进行测序的方法,包括:

a) 将所述样品加至 DNA 测序反应混合物以形成反应混合物,

所述样品具有参考序列且还疑似具有一或多个靶序列,以及所述 DNA 测序反应混合物包含测序引物和摩尔过量的封闭核酸,所述封闭核酸与所述参考序列的一条链的至少一部分完全互补,

其中所述封闭核酸和所述测序引物与所述参考序列的同一链互补,以及

其中所述封闭核酸在 3' 端被封闭使得其不能被聚合酶延伸;

b) 使疑似具有靶序列的反应混合物经受第一变性温度以形成变性的参考链和变性的靶链,所述第一变性温度高于所述参考序列和所述靶序列的解链温度 (T_m);

c) 降低反应混合物的温度以使得形成所述封闭核酸和互补参考链的双链体以及封闭序列和靶链的异源双链体;

d) 提高反应混合物的温度至临界温度 (T_c),所述临界温度足以使所述封闭核酸和互补靶链的异源双链体变性,但却不足以使所述封闭核酸和互补参考链的双链体变性;

e) 降低反应混合物的温度使所述测序引物退火至反应混合物中游离的靶链和游离的参考链;以及

f) 延伸测序引物以产生延伸产物,所述延伸产物能够被分析以确定靶序列的核酸序列。

21. 权利要求 20 的方法,还包括确定所述靶序列的核酸序列。

22. 权利要求 21 的方法,其中通过双脱氧测序、单分子测序、焦磷酸测序、或第二代高通量测序来确定所述序列。

23. 权利要求 20-22 任一项的方法,其中:

所述测序引物的 3' 端能够在邻近所述参考序列的链上的结合所述封闭核酸 5' 端的碱基处与所述参考序列的所述链结合;

或者所述测序引物的 3' 端和所述封闭核酸的 5' 端与所述参考序列的至少一个相同碱基互补。

24. 权利要求 20-23 任一项的方法,其中所述测序引物的 3' 端和所述封闭核酸的 5' 端与所述参考链的超过一个的相同碱基互补。

25. 权利要求 20-24 任一项的方法,其中所述封闭核酸的 5' 端包含阻止 DNA 聚合酶从 5' 至 3' 的外切核酸降解的核苷酸。

26. 权利要求 20-25 任一项的方法,其中步骤 (a) 的所述封闭核酸是单链核酸。

27. 权利要求 20-26 任一项的方法,其中所述封闭核酸包含 DNA、RNA、肽核酸、锁核酸、另外的修饰的核苷酸或者其组合。

28. 权利要求 27 的方法,其中所述封闭核酸中肽核酸、锁核酸或另外的修饰的核苷酸的位置经选择以匹配所述参考序列和所述靶序列疑似不同的位置。

29. 权利要求 27 或 28 的方法,其中所述封闭核酸中肽核酸、锁核酸或另外的修饰的核苷酸的位置经选择以提供横跨所述封闭核酸的更恒定的解链温度。

30. 权利要求 20-29 任一项的方法,其中所述靶序列与所述参考序列具有至少 50% 的序列同性。

31. 权利要求 20-30 任一项的方法,其中所述封闭核酸等于或者短于所述参考序列。

32. 权利要求 20-31 任一项的方法,其中所述测序引物能够在低于临界温度的温度退火至所述参考序列的链。

33. 权利要求 20-32 任一项的方法,其中相对于所述封闭核酸,添加至所述反应混合物中的所述测序引物是摩尔过量的。

34. 权利要求 20-33 任一项的方法,其中所述参考链和封闭核酸的双链体的解链温度高于所述靶链和封闭核酸的异源双链体的解链温度。

35. 权利要求 20-34 任一项的方法,还包括通过在反应混合物中加入扩增引物来扩增样品中的至少一个靶序列,然后将扩增产物的至少一部分用作步骤 (a) 的样品。

36. 权利要求 20-34 任一项的方法,还包括通过在反应混合物中加入扩增引物来扩增样品中的至少一个靶序列。

37. 权利要求 35 或 36 的方法,还包括选择性地降解所述扩增产物的一条链。

38. 权利要求 37 的方法,其中所述扩增引物经标记以使所得的经标记的靶链被降解。

39. 权利要求 38 的方法,其中用 5'-磷酸酯标记所述扩增引物并且所述方法还包括将所述测序反应物与 5'-磷酸酯依赖性外切核酸酶一起温育。

40. 权利要求 20-39 任一项的方法,其中在循环测序反应中将所述方法重复 2 个或更多个循环。

41. 权利要求 20-40 任一项的方法,其中所述反应混合物含有核酸检测染料。

用于对混合群体中的靶 DNA 进行测序的试剂盒和方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求 2011 年 2 月 28 日提交的美国临时专利申请 No. 61/447, 490 和 2011 年 9 月 9 日提交的美国临时专利申请 No. 61/532, 887 的优先权, 二者均以其整体援引加入本文。

[0003] 发明介绍

[0004] 本发明涉及对含有其它参考序列的核酸样品中的靶 DNA 序列的 DNA 测序进行改进。所述参考序列和靶序列可以是紧密相关的, 例如所述靶序列可以是所述参考序列的等位基因、所述参考序列的突变的形式、来自不同的株或种的参考序列。具体而言, 本发明涉及封闭核酸在 DNA 测序反应期间用于封闭对参考序列而非靶序列的测序的用途。

[0005] DNA 测序使得可以通过使用特异于核酸特定区域的测序引物来鉴别具体的 DNA 序列。该方法非常有力并且快速地提供序列信息, 仅仅只要测序引物特异于样品中的一个序列。测序中常常遇到的问题是, 当序列的群体是混合的时候, 测序引物会针对两种序列, 使得这两种序列不能适当解析。一直存在着对在相关联的参考序列背景中对靶序列进行鉴别和测序的新开发的测序方法的需要。

[0006] 发明概述

[0007] 本文提供了用于对具有相关的参考序列的样品中的靶 DNA 序列进行测序的试剂盒和方法。所述试剂盒包括与靶序列一条链的一部分和参考序列一条链的一部分互补的测序引物, 以及与参考序列一条链的至少一部分完全互补并且与靶序列的任一条链都不完全互补的封闭核酸 (BNA)。所述测序引物和所述封闭核酸互补于所述参考序列的同一链, 并且所述封闭核酸在 3' 端被封闭使得其不能被聚合酶延伸。所述试剂盒还可以包括标记的链终止三磷酸核苷酸。

[0008] 在另一方面, 还提供了用于扩增靶序列并对靶序列进行测序的试剂盒。另外, 在上文所述的试剂盒中的要素之外, 这些试剂盒还包括不与所述测序引物结合相同靶序列链的 5' - 磷酸化的扩增引物。所述试剂盒还可以包括 λ 外切核酸酶以降解包含 5' - 磷酸酯的扩增产物。

[0009] 在另一方面, 提供了制备样品中的靶序列以进行测序的方法。所述方法包括将具有参考序列并且还疑似具有一或多个靶序列的样品加入到 DNA 测序反应混合物中以形成反应混合物。所述 DNA 测序反应混合物包括测序引物和过量的封闭核酸。所述封闭核酸与参考序列一条链的至少一部分完全互补并且与靶序列的任一条链都不完全互补。所述封闭核酸在 3' 端被封闭从而其不能被聚合酶延伸, 并且所述测序引物和所述封闭核酸都互补于所述参考序列的同一链。使疑似具有靶序列的反应混合物经受第一变性温度 (高于参考序列和靶序列的解链温度 (T_m)) 以形成变性的参考链和变性的靶链。继而将反应混合物的温度降低以允许形成封闭核酸和互补参考链的双链体以及封闭序列和靶链的异源双链体。继而使反应混合物经受临界温度 (T_c), 与使封闭核酸和互补参考链的双链体变性相比, 所述临界温度足以优先使封闭核酸和互补靶链的所述异源双链体变性。继而将反应混合物的温度降低以使所述测序引物退火至反应混合物中的游离靶链和游离参考链。最终, 延伸测序

引物以产生延伸产物,所述延伸产物能够被分析以使所述靶序列的核酸序列被确定。

[0010] 在另一方面,在上文所述的测序方法之前或者与其同时,可以用 PCR 扩增靶序列。在一个实施方案中,可以选择性地降解所扩增的靶序列的一条链。适宜的是,所降解的链是互补于测序引物的链。在一个实施方案中,将 5' - 磷酸化的扩增引物与测序引物一起加入到 PCR 反应中并扩增靶序列。可以通过与 λ 外切核酸酶温育来降解所扩增的包含 5' - 磷酸酯的靶序列的链。

[0011] 在参阅附图和下文的详述之后,本领域技术人员可以明了本发明的其它实施方案以及优势。

[0012] 附图简述

[0013] 图 1 是本文所述方法的描述。

[0014] 图 2 是使用反向 M13 引物的 K-RAS G12V 和野生型 DNA 的一组测序电泳图。样品含有 85% 的野生型和 15% 的 G12V 突变 DNA。

[0015] 图 3 是使用正向 M13 引物的 K-RAS G12V 和野生型 DNA 的一组测序电泳图。样品含有 85% 的野生型和 15% 的 G12V 突变 DNA。

[0016] 图 4 是在初始的 K-RAS G12R 的 Ice-COLD-PCR 及随后使用反向封闭核酸 (BNA) 和反向 M13 引物的 BLOcker™ 测序之后, K-RAS G12 和野生型 DNA 的一组测序电泳图。PCR 的初始样品含有 99% 的野生型和 1% 的 G12R 突变 DNA。顶端一幅显示了在测序反应中含有 0nM BNA 的反应的结果,第二幅显示了含有 50nM BNA 的反应的结果,第三幅显示了含有 75nMBNA 的反应的结果以及第四幅显示了含有 100nM BNA 的反应的结果。

[0017] 图 5 是在初始的 K-RAS G12R 的 Ice COLD-PCR 及随后使用正向 BNA 和正向 M13 引物的 BLOcker 测序之后, K-RAS G12 和野生型 DNA 的一组测序电泳图。PCR 的初始样品含有 99% 的野生型和 1% 的 G12R 突变 DNA。顶端一幅显示了在测序反应中含有 0nM BNA 的反应的结果,第二幅显示了含有 50nM BNA 的反应的结果,第三幅显示了含有 75nM BNA 的反应的结果以及第四幅显示了含有 100nM BNA 的反应的结果。

[0018] 图 6 是使用如实施例 4 所述的反向引物和反向 BNA 的线粒体突变的一组测序电泳图。

[0019] 图 7 是使用 HPV18F BNA (BNA 滴度从 0-75nM, 75.3°C 的 T_c) 的 HPV18 和 HPV45 混合物的一组测序电泳图。

[0020] 图 8 是使用 HPV18F BNA (BNA 浓度 75nM, 变性温度 (T_c) 从 74.2-80.0°C) 的 HPV18 和 HPV45 混合物的一组测序电泳图。

[0021] 图 9 是使用 HPV45F BNA (BNA 滴度从 0-75nM, 76.3°C 的 T_c) 的 HPV18 和 HPV45 混合物的一组测序电泳图。

[0022] 图 10 是使用 HPV45F BNA (BNA 浓度 50nM, 变性温度 (T_c) 从 74.2-80.0°C) 的 HPV18 和 HPV45 混合物的一组测序电泳图。

[0023] 图 11 是使用 HPV56F BNA (BNA 滴度 0nM、50nM、75nM、和 100nM, 73.3°C 的变性温度 (T_c)) 的 HPV97 和 HPV56 混合物的一组测序电泳图。深色标注的部分使得无 BNA 的混合物与预期的序列结果比对。浅色标注的是 HPV56 和 HPV97 之间序列差异的部分。

[0024] 图 12 是使用 HPV97F BNA (BNA 滴度 0nM、50nM、75nM 和 100nM, 73.3°C 的变性温度 (T_c)) 的 HPV56 和 HPV97 混合物的一组测序电泳图。深色标注的部分使得无 BNA 的混合物

与预期的序列结果比对。浅色标注的是 HPV56 和 HPV97 之间序列差异的部分。

[0025] 图 13 是与无 BNA 测序相比,使用 HPV97F 或 HPV56F BNA (BNA 浓度 75nM, 73.3°C 的变性温度 (T_c)) 的 HPV56 和 HPV97 混合物的一组测序电泳图。两种毒株之间序列的差异被标注出来。

[0026] 图 14 是显示 Ice COLD-PCR 和 BLOCKer 测序策略的图解,包括了在大量的野生型 K-RAS 的背景下用于对少量的 K-RAS 外显子 2 突变体进行扩增和测序的引物和 BNA。粗体的序列是 K-RAS 外显子 2 编码区。两个斜体的区域表示第一轮 PCR 中使用的正向和反向引物位置。加下划线的序列表示在 ICE COLD PCR 扩增反应中使用的正向和反向引物的位置。括号中的区域表示 BNA 的序列且其中加下划线的(C)表示并入 LNA 的位置。浅灰色的序列表示测序引物的位置。

[0027] 图 15 是 BRAF 外显子 15 的一组测序电泳图,显示了 ICE-COLD PCR、BLOCKer 测序或标准的 Sanger 测序后所检测的野生型 DNA 的背景中量降低的 V600E 突变体。箭头表示 V600E 突变的位置,并且突变体的检出限被圈出。

[0028] 图 16 是 BRAF 外显子 11 的一组测序电泳图,显示了 ICE-COLD PCR 和 BLOCKer 测序后所检测的野生型 DNA 的背景中量降低的 G469E 突变体。箭头表示 G469E 突变的位置,并且突变体的检出限被圈出。

[0029] 发明详述

[0030] 本文提供了用于对在具有相关参考序列的样品中的靶 DNA 序列进行测序的试剂盒和方法。所述试剂盒和方法通过在测序反应期间添加封闭核酸而使得可以在相关参考序列的背景中对靶序列进行测序。本文所述的试剂盒和方法还可以与 PCR 扩增组合。

[0031] 本文所述的试剂盒和方法可用于其中想要从具有一些序列同源性的混合群体中鉴别出靶核酸的各种情形。具体而言,所述试剂盒和方法可用于突变分析、特别是体细胞突变分析,以及可以用于鉴别具有突变的细胞或对象,所述突变涉及例如,癌症的发展、癌症或者小分子和生物药物效力的预后、镶嵌现象或线粒体肌病。对于此方法用于体细胞突变分析的其它潜在应用,参见例如, Erickson RP. (2010) Somatic gene mutation and human disease other than cancer: an update. *Mutat Res.* 705(2):96-106。

[0032] 在实施例 1 中,验证了用于对已知与细胞癌转变相关的 K-RAS 和 BRAF 中的突变进行检测的测定法,以及用于对与 MELAS (线粒体脑肌病伴乳酸血症和卒中样发作) 的发展相关的线粒体 DNA 中的突变进行检测的测定法。所述方法和试剂盒还可用于鉴别其它类型的低水平线粒体异质性。另外,所述方法和试剂盒可用于在潜在混合的群体中确定株或种的命名,如在感染期间。在实施例 1 中,在混合的群体中区分了人乳头状瘤病毒 (HPV) 毒株 18 和 45 或者毒株 57 和 96。所述方法还可用于鉴别在感染 (如病毒例如 HIV、或者细菌感染) 的药物期间发展的抗生素抗性突变体。本领域技术人员会理解本文所述试剂盒和方法的其它用途。

[0033] 图 1 说明了制备用于根据本发明的所述方法和试剂盒进行测序的靶序列。开始 (图 1, 步骤 1, 左上角), 核酸样品含有双链参考序列 10 (例如, 野生型序列) 和双链靶序列 12 (例如, 突变体序列)。测序反应混合物含有样品、测序引物 16、其它测序成分如三磷酸核苷酸 (NTP, 其中某些可经标记) 和链终止 NTP 或双脱氧 NTP、DNA 聚合酶、和过量浓度水平 (如 25nM) 的封闭核酸 14。适宜的是, 所述封闭核酸以摩尔过量 (与靶和参考序列相比)

的浓度水平存在。

[0034] 在图 1 中,所示的封闭核酸 14 是单链核酸序列,其与参考序列 10 的链 10A 之一互补。封闭核酸 14 和测序引物 16 与参考序列 10 的同一链互补,以及封闭核酸 14 在 3' 端被封闭使得其不能被聚合酶所延伸。

[0035] 图 1 的步骤 1 中的反应混合物经受第一变性温度,例如 95°C 15 秒,其导致参考序列 10A、10B 和靶序列 12A、12B 的变性的链(以提供参考链和靶链)。继而将反应混合物冷却以促进杂交,例如,70°C 120 秒。所述温度降低在过量封闭核酸 14 的存在下发生,以使得封闭核酸 14 优先与参考序列的互补链 10A 以及还与靶序列的互补链 12A 杂交。在图 1 的步骤 2 中,说明了反应混合物在于 70°C 杂交之后的状态。在封闭核酸 14 与互补参考链 10A 的同源双链体 18 以及封闭核酸 14 与互补的靶链 12A 的异源双链体 20 之外,反应混合物还分别含有参考和靶序列的变性的天然链 10B 和 12B。还可以有一些互补链和靶链同源双链体以及互补链:靶链异源双链体;反应中过量的封闭核酸即是用于使这些复合物最小化。

[0036] 在图 1 的步骤 3 中,反应混合物继而经受临界温度“ T_c ”,例如,84.5°C,选择该温度以使靶链 12A 与封闭核酸 14 的异源双链体 20 优先变性。适宜的是,步骤 3 中的温度高于步骤 2 中所用的温度,从而将温度提高至临界温度。选择临界温度(T_c)使得当于在 T_c 温育反应混合物时,封闭核酸 14 与互补参考链 10A 的双链体 18 保持基本不变性。封闭核酸 14 与靶链 10B 的双链体 20 的解链温度将总是低于封闭核酸 14 与互补参考链 10A 的双链体 18 的解链温度,因为封闭核酸 14 与参考链 10A 的至少一部分完全互补,而与靶链 12A 则会有至少一个错配。

[0037] 对于图 1 的步骤 4,在优先变性之后,将反应混合物的温度降低,例如,50°C,以使测序引物 16 退火至反应混合物中的游离靶链 12A。图 1 的步骤 4 说明了测序引物 16 不结合游离参考链 10B 或游离靶链 12B,而仅结合靶链 12A。测序引物 16 不能有效退火至游离参考链 10A,或者不能被延伸以对余下的游离参考链 10A 进行测序,因为参考链 10A 与封闭核酸 14 杂交,且至少参考链 10A 杂交至封闭核酸 14 的区段不能用于测序。适宜于将测序引物加至反应混合物,从而其以过量于封闭核酸而存在,适宜的是测序引物以摩尔过量于 BNA 而存在,从而靶链:序列引物双链体优先形成靶链:封闭核酸序列双链体。继而可以将反应混合物的温度降低,例如 60°C,以延伸退火的测序引物 16。或者,可以通过重复图 1 的步骤 1-4 来完成循环测序反应,以使延伸产物富集。图 1 所示的方法可以并且应当针对个别方案进行优化。

[0038] 最后,可以用本领域技术人员已知的 DNA 测序方法来确定靶序列的核酸序列。例如,可将标记的链终止核苷酸包括在 DNA 测序反应混合物中,以制备 Sanger 或双脱氧测序的延伸产物。本领域技术人员会理解,可以使用其它测序方法,如焦磷酸测序[®],各种下一代平台如 454[™] 测序, SOLiD[™] 系统, Illumina HiSeq[®] 系统,或者第三代测序平台。建议的焦磷酸测序方法会包括如下步骤:(1) 靶序列的 PCR,(2) 碱变性,(3) 纯化单链模板,(4) 在 70°C 退火封闭引物,(5) 将温度提升至 T_c ,(6) 可能的洗涤步骤以去除任何未结合的封闭引物,(7) 降低温度以使测序引物退火,(8) 冷却至室温并进行标准的焦磷酸测序反应。

[0039] 如上文所述,试剂盒和方法包括与靶序列参考序列的一条链的一部分互补的测序引物。测序引物是完全互补于靶序列的链的一部分并且还可以完全互补于参考序列的链

的一部分的核酸。测序引物能够退火至参考和靶链,从而聚合酶能够附着并延伸所述测序引物。测序引物一般是 DNA,但也可以是 RNA 或者含有经修饰的核苷酸。测序引物可以设计为具有最少的二级结构并抑制参考和靶链的重退火。测序引物适宜于具有低于临界温度(T_c)的退火温度。熟悉测序方法的本领域技术人员能够设计测序引物以用于所述试剂盒和方法。本领域技术人员可利用计算机程序设计适宜的测序引物和封闭核酸,例如,Oligo 和 Primer3。

[0040] 靶序列是想要在包括参考序列的混合的或可能混合的样品中确定的序列。靶序列是指可以在核酸样品中比相应参考序列少的核酸。靶序列可以占样品中参考序列加靶序列的总量的 0.01% 至超过 99%。检出下限 (lower limit of detection) 基于样品大小,所述样品从而必须含有至少一个可扩增的靶序列以使得能够对所述靶序列进行测序。如实施例所述,当靶序列以参考序列加靶序列总量的 50%、15%、1% 或者甚至 0.5% 存在时,用所述方法可以对靶序列进行有效测序。据预测本文所述的方法可以与其它靶序列选择性扩增的方法组合以提高靶序列在参考序列背景中的检出限。如实施例所示,本文所述方法可以用于先前经历过 ICE COLD-PCR 的样品,如国际专利申请 No. W02011/112534 中所述,其以其整体援引加入本文。当如本文所述将 ICE COLD PCR 与 BLOCKer 测序方法组合时,实施例所示的检出限低于任何一种方法单独使用。例如,检出限可以低于参考序列背景中 0.01% 的靶。经进一步优化,我们预期检出限可降低至单拷贝的靶序列也可以在参考序列背景中被检测。

[0041] 靶序列可以包括但不限于,体细胞突变、线粒体突变、株或种。例如,样品(例如,血液样品)可含有很多正常细胞和少量的癌细胞和/或游离循环的肿瘤 DNA。正常细胞含有非突变体或野生型等位基因,而少量的癌细胞和低水平的游离循环的肿瘤 DNA 则含有体细胞突变。在此情形中,突变体是靶序列而野生型序列是参考序列。靶序列与参考序列必须有至少一个核苷酸的差异,但必须与相应参考序列有至少 50% 同源性。测序引物应当能够结合靶序列和参考序列。如本文所用,“靶链”是指靶序列的单一核酸链。

[0042] 参考序列是指存在于样品中并且妨碍了通过常规测序方法(没使用封闭核酸)对靶序列进行有效测序的核酸。在使用本文所述方法之前,参考序列可以占参考序列加靶序列总量的 0.01-99% 或者更多。检出下限基于样品大小,所述样品从而必须含有至少一个可扩增的参考序列以使得能够对所述参考序列测序。如上文所述,可以通过将本文所述方法与其它方法如 ICE COLD PCR 组合来优化检出限。如本文所用,“参考链”是指参考序列的单一核酸链。

[0043] 参考序列还可以是指野生型。术语“野生型”是指某种基因在群体中最常见的多核苷酸序列或等位基因。通常,野生型等位基因会得自正常细胞。

[0044] 靶序列还可以是指突变体序列。术语“突变体”是指核酸序列中的核苷酸改变(即,单一的或多个核苷酸取代、倒位、缺失、或插入)。携带有突变的核酸具有与相应野生型多核苷酸序列在序列上不同的核酸序列(突变体等位基因)。本发明广泛涉及体细胞突变和多态性。本文所述方法可用于选择性富集含有一个或多个核苷酸序列改变(与参考链相比)的靶链。靶序列通常得自患病的组织或细胞并且可以与疾病状态相关或者可预示疾病状态或者可预示给定治疗的效力。

[0045] 靶序列和参考序列可得自各种来源,包括基因组 DNA、cDNA、线粒体 DNA、病毒 DNA

或 RNA、哺乳动物 DNA、胎儿 DNA、寄生虫 DNA 或细菌 DNA。虽然通常参考序列是野生型而靶序列是突变体,相反的情况也是可以的。突变体可以包括任意的一或多个核苷酸缺失、插入或改变。靶序列可以是指示如下的序列:细胞中的癌症、癌症的转移(通过检测不同组织中或血液中包含突变的细胞)、癌症或其它疾病的预后、癌症或微生物对于治疗的药物或化疗敏感性或抗性、或者与体细胞突变相关的疾病如线粒体异质性。

[0046] 封闭核酸是工程化的单链核酸序列,如寡核苷酸并且优选具有小于靶序列的长度。适宜地,封闭核酸也小于参考序列。封闭核酸必须是使得能够将封闭核酸和靶链的双链体的解链温度与封闭核酸和参考链的双链体的解链温度区分开的组分。封闭核酸的 3'-OH 端对于 DNA-聚合酶延伸而言被封闭,5'-端也可以经修饰以防止 DNA 聚合酶的 5' 至 3' 外切核酸降解(exonucleolysis)。封闭核酸还可以采取在反应混合物经受临界温度“ T_c ”时保持退火至参考序列的其它形式,如单链 DNA、RNA、肽核酸(PNA)、锁核酸(LNA)、或另外的经修饰的核苷酸之间的嵌合体。封闭核酸中的 PNA、LNA 或其它经修饰的核苷酸可以经选择以匹配参考序列与靶序列疑似有差异的位置。此种设计将使封闭核酸与部分互补的靶链的异源双链体变性所需的温度和使封闭核酸与完全互补的参考链的双链体变性所需的温度之间的差异最大化。或者或另外,可以选择经修饰核苷酸的位置来设计封闭核酸为具有横跨所述封闭核酸的更恒定解链温度。

[0047] 封闭核酸可以采取许多种形式,而优选的形式是单链、不可延伸的 DNA。适宜的是,所述测序引物的 3' 端结合至邻近封闭核酸的 5' 端的位置,或者所述测序引物的 3' 端和所述封闭核酸的 5' 端与所述参考序列的至少一个相同碱基互补。在另一实施方案中,测序引物与封闭核酸重叠 3-5 个碱基。在此实施方案中,用于测序的 DNA 聚合酶可以是链置换或非链置换 DNA 聚合酶。在另一选择中,测序引物和封闭核酸不重叠。如果测序引物和封闭核酸不重叠,优选在测序反应中使用非链置换 DNA 聚合酶。更具体地,优选的封闭核酸具有如下性质:

[0048] (a) 包含单链核酸;

[0049] (b) 与参考序列的至少一部分完全互补;

[0050] (c) 与测序引物互补于参考序列的同一链;以及

[0051] (d) 含有对 DNA-聚合酶延伸而言封闭的 3'-端。

[0052] 封闭核酸可以以若干方法之一合成。首先,可以通过使用允许修饰序列 3'-端的标准寡核苷酸合成方法来直接制备封闭核酸。或者,可以通过在生成单链 DNA 作为终产物的 PCR 反应期间由聚合酶合成来制备封闭核酸。在此情形中,所生成的单链 DNA 对应于封闭核酸所必需的确切序列。经聚合酶合成来合成单链 DNA 的方法使本领域技术人员熟知的。或者,可通过结合固体支持物上的双链 PCR 产物来合成单链封闭核酸。这通过进行标准 PCR 反应(使用其中之一被生物素化的引物对)来完成。在 PCR 之后,将 PCR 产物与链霉抗生物素蛋白-包被的固体支持物(例如磁珠)一起温育并使其结合至珠。随后,将温度提升至 95°C 达 2-3 分钟以使 DNA 变性并将未生物素化的 DNA 从固定的 PCR 产物释放至溶液中。继而将具有互补 DNA 链的磁珠移除,并将保留在溶液中的单链产物用作封闭核酸。

[0053] 在使用单链封闭核酸前,将 3'-端封闭以阻止聚合酶延伸。该 3'-端可含有磷酸酯基团、氨基基团、双脱氧核苷酸或封闭 5' 至 3' 聚合酶延伸的任意其它部分。这可通过本领域技术人员熟知的若干方式来实现。例如,可以利用其中使用末端脱氧核苷酸转移酶

(TdT) 的反应,在溶液中存在双脱氧核苷酸(ddNTP)的情况下,将单个 ddNTP 加至单链封闭核酸的末端。ddNTP 用于封闭聚合酶延伸。或者,可以使用互补于封闭核酸 3'-端的寡核苷酸模板,以提供过渡(transient)双链结构。继而,可使用聚合酶在与在家的寡核苷酸相对的封闭核酸的 3'-端插入单个 ddNTP。

[0054] 封闭核酸应当以过量于参考链加靶链的量存在(即,摩尔过量)。所需的封闭核酸的量可以由本领域技术人员所确定。通常封闭核酸的量超过 5nM。实施例中提供了在方案中使用 25nM、50nM、75nM 和 100nM 封闭核酸的数据。通常应当添加测序引物,使得其以摩尔过量的浓度(与封闭核酸相比)存在于反应混合物中。

[0055] 解链温度或者“ T_m ”是指多核苷酸从其互补序列解离的温度。通常, T_m 可以被定义为双链核酸分子中一半的 Watson-Crick 碱基对断开或解离(即,“解链”)而另一半的 Watson-Crick 碱基对保持完好双链构型的温度。换句话说, T_m 被定义为两个互补序列 50%的核苷酸退火(双链)且 50%的核苷酸变性(单链)的温度。因此, T_m 定义了从双链到单链核酸分子过渡(或者反之,从单链至双链核酸分子过渡)的中间点。

[0056] 可以通过许多方法估计 T_m ,例如通过最近邻计算(nearest-neighbor calculation)如 Wetmur1991(Wetmur, J. G. 1991. DNA probes: applications of the principles of nucleic acid hybridization. Crit Rev Biochem Mol Biol 26:227-259,),和通过商业程序包括 Oligo™ 引物设计以及互联网上可用的程序。或者,可以同实际试验来确定 T_m 。例如,双链 DNA 结合或相互作用染料,如溴化乙锭或 SYBR®-green (Molecular Probes) 可用于解链曲线以确定核酸的实际 T_m 。确定核酸的 T_m 的另外的方法是本领域熟知的。

[0057] 术语“临界温度”或“ T_c ”是指经选择以使靶链与封闭核酸的双链体优先变性的温度。临界温度(T_c)经选择,从而使得当反应混合物于 T_c 温育时,由封闭核酸和互补参考链组成的双链体保持基本不变性,而由封闭核酸和靶链组成的双链体基本变性。术语“基本”是指至少 60%、优选至少 90%、或者更优选至少 98% 的给定的变性或未变性形式。

[0058] 样品

[0059] 样品包括含有或被认为含有感兴趣核酸(靶和参考序列)的任意物质或者其本身即是含有或被认为含有感兴趣靶核酸的核酸。术语样品因而包括核酸样品(基因组 DNA、cDNA、RNA),细胞,生物体,组织,流体,或者包括但不限于如下的物质:例如血浆,血清,脑脊液,淋巴液,滑液,尿液,泪,粪便,皮肤、呼吸道、肠道、和生殖泌尿道的外分泌物,唾液,血细胞,组织活检,肿瘤,器官,组织,体外细胞培养成分,天然分离物(如饮用水,海水,固体材料),微生物样本,和经核酸示踪分子所“标记”的物体或样本。

[0060] 在用于本文所述方法之前,本发明的核酸序列可以被扩增,例如通过聚合酶链反应。可以通过选择性降解所扩增的靶序列的一条链来对扩增产物进行测序。一种选择双链 DNA 产物的单一链的方法,在上文中关于单一链封闭核酸的制备中有描述,即,一条链可经生物素化并结合至柱或固体支持物(包被有链霉抗生物素蛋白)。继而可以通过将链变性并去除结合至抗生物素蛋白包被的固体支持物的经生物素化的链来纯化未生物素化的链,以便使得可以对未生物素化的链进行测序。或者,如实施例中所述,可以在测序引物之外还使用 5'-磷酸化的扩增引物来进行 PCR 反应,从而产物的一条链包含 5'磷酸酯。继而可通过与 5'-磷酸酯依赖性外切核酸酶(如实施例中使用的 λ 外切核酸酶)一起温育来降解

此链。

[0061] 核酸序列可以来自 RNA、mRNA、cDNA 和 / 或基因组 DNA。可以根据本领域技术人员已知的方法从组织或细胞中分离这些核酸。互补的 DNA 或 cDNA 也可以根据本领域技术人员已知的方法来生成。或者,可以通过本领域熟知的方法从血液分离本发明的核酸序列。

[0062] 如在实施例中所示,提供了能够对 K-RAS 外显子 2,密码子 12 和 / 或 13 突变进行测序和检测的方法和试剂盒。这些突变的检测对于确定患有癌症对象的预后以及确定药物抗性肿瘤细胞的存在或出现而言是重要的。表皮生长因子受体 (EGFR) 拮抗剂,如西妥昔单抗 (cetuximab) 和帕木单抗 (panitumumab),是在结直肠癌 (CRC) 的治疗中有效的治疗剂。据显示,40% 的 CRC 肿瘤具有激活性 K-RAS 外显子 2 密码子 12 和 13 突变,并且这些突变可与对 EGFR 拮抗剂的不良反应相关。对此类诊断生物标记的很高灵敏度的检测是必须的,用于确定药物抗性肿瘤细胞群体的存在或出现。

[0063] 在实施例中,使用封闭核酸以使得可以对位置 3243 处的已知线粒体突变 (A → G) 进行测序和鉴别。此突变是线粒体基因组中 9 种已经确认的 MELAS (线粒体脑肌病伴乳酸血症和卒中样发作) 突变之一。因而,本发明所述方法和试剂盒可用于鉴别具有低水平的与疾病相关突变的对象。

[0064] 还是在实施例中,利用所述方法以区别 HPV 的毒株。实施例证明了包含 HPV18 和 45 混合物或者含 HPV56 和 97 混合物的样品可以被区分。此种株区分对于流行病学研究是重要的并且可影响治疗的决定。

[0065] 实施例还证明了所述方法可用于以 0.5% 的检测限检测两种 BRAF 突变 (V600E (外显子 15) 和 G469A (外显子 11))。这些 BRAF 突变与癌症特别是黑色素瘤相关。如上文对于 K-RAS 所述,这些突变的检测对于确定患有癌症对象的预后是重要的,并且可以证明其与化疗有效性的确定有关。

[0066] 如下的实施例仅用于说明而不是对本发明或所附权利要求范围的限定。本文所引用的所有参考文献均以其整体援引加入本文。

实施例

[0067] 实施例 1. 标准 PCR 之后 K-RAS BLOCKer 测序 (使用 K-RAS 外显子 2 反向 BNA)

[0068] 在若干癌症中已发现 K-RAS 外显子 2,密码子 12 和 13 中的突变并且其与对某些抗癌药物的抗性有关。因而对含有这些 K-RAS 突变的样品或对象进行鉴别的测定法会是有益的。因为其群体是混合的,所以通常这些突变难以鉴别。

[0069] 设计了封闭核酸 (BNA) 以特异性地结合野生型 K-RAS 序列,且除非另有说明则均由 Exiqon 制备。用于此实验的 BNA 和测序引物如下:

[0070]

	BNA	T _c (°C)	测序引物
K-RAS ₂ 反向	CTGGTGGCGTAGGCAAGAGTGCCTTG ACGATACAGCTAATTCAGA/3Phos/ (SEQ ID NO: 1)	81.0	ATGGTCATAGCTGTTTCCT (SEQ ID NO: 2)

[0071] 其中加下划线的核苷酸是 LNA 而其它核苷酸是常规核苷酸。BNA 和测序引物之间没有重叠。

[0072] 使用标准方案制备核酸样品,且含有密码子 12 突变 (K-RAS G12V;GTT;5'-CGCCAACAGCT-3';SEQ ID NO:3;加下划线的碱基是突变位点)的核酸占总核酸的 15% 而样品其余的 85% 是野生型基因组 DNA (GGT;5'-CGCCACCAGCT-3';SEQ ID NO:4;加下划线的碱基是突变位点)。将 BNA (25nM) 和核酸加至标准循环测序反应混合物。

[0073] 将测序反应混合物在 95℃变性 15 秒,继而将温度降低至 70℃持续 45 秒以使 BNA 杂交至参考链和靶链。继而使反应混合物经受 30 秒 81℃的 Tc 以使 BNA 和靶链的双链体变性。继而使反应混合物经受 10 秒 50℃的温度以使测序引物退火至游离靶链。使测序引物的最终延伸在 60℃进行 25 秒以产生延伸产物。上述循环重复 40 次以产生在 ABI 测序仪上读取的足够的序列。

[0074] 如图 2 所示, G12V K-RAS 突变体在无 BNA 的测序反应中以总量的 15% 存在时,难以检测 (参见中间幅中标注碱基处的小峰),但是在测序反应中含有针对野生型序列的 BNA 时,检测得到提高 (两个峰目前以相对等量出现在顶端幅中)。值得注意的是,在仅有野生型的测序反应中包括 BNA 并未完全封闭测序的能力,而是仅仅降低了峰的大小 (强度)。

[0075] 实施例 2. 标准 PCR 之后 K-RAS BLOcker 测序 (使用 K-RAS 外显子正向 BNA)

[0076] 也设计了封闭核酸 (BNA) 以特异性地结合野生型 K-RAS 序列的相对链。用于此实验的 BNA 和测序引物如下:

[0077]

	BNA	T _c (°C)	测序引物
K-RAS _{Se2} 正向	GCTGAAAATGACTGAATATAAACTTGTG GTAGTTGGAGCTGGTGGCGTA/3Phos/ (SEQ ID NO: 5)	77.0	TGTAAAACGACGGCCAGT (SEQ ID NO: 6)

[0078] 其中加下划线的核苷酸是 LNA 而其它核苷酸是常规核苷酸。BNA 和测序引物之间没有重叠。

[0079] 使用标准方案制备核酸样品,且含有密码子 12 突变 (K-RAS G12V;5'-AGCTGTTGGCG-3';SEQ ID NO:7;加下划线的碱基是突变位点)的核酸占总核酸的 15% 而样品其余的 85% 是野生型基因组 DNA (5'-AGCTGGTGGCG-3';SEQ ID NO:8;加下划线的碱基是突变位点)。将 BNA (25nM) 和核酸加至标准循环测序反应混合物。如上文实施例 1 中所述完成循环测序反应。因而,循环测序可经过设计特异于参考序列每条链的 BNA 而用于双向测序。

[0080] 如图 3 所示, G12V K-RAS 突变体在无 BNA 的测序反应中以总量的 15% 存在时,难以检测 (参见中间幅中标注碱基处的小峰),但是在测序反应中含有针对野生型序列的 BNA 时,检测得到提高 (两个峰目前可见地出现在顶端幅中)。值得注意的是,在仅有野生型的测序反应中包括 BNA 并未完全封闭测序的能力,而是仅仅降低了峰的大小 (强度)。

[0081] 实施例 3:K-RAS BLOcker 测序实例 - 在 COLD-PCR 之后 K-RAS G12R 突变的检测

[0082] 近来,已显示 Ice COLD-PCR(Improved and Complete Enrichment CO-amplification at Lower Denaturation temperature PCR;Milbury et al., Nucleic Acids Res. 2011Jan1;39(1):e2.) 可大幅改善 K-RAS 外显子 2 突变的检出限。也可参见国际专利申请 No. WO2011/112534。在 Ice COLD-PCR 中,在存在野生型 (WT) DNA 时优先扩增突变体 DNA (Mut)。使用互补于 WT 链之一的参考序列寡核苷酸 (RS-oligo) 导致 WT 序列的线

性扩增,但却导致所存在的任何 Mut 序列的指数扩增。RS-oligo 可含有锁核酸 (LNATM),其提高了 RS-oligo:WT DNA 双链体与 RS-oligo:Mut DNA 双链体相比其之间的变性温度差异。如 Milbury et al. 所述通过在第一轮 PCR 使用 Phusion® 聚合酶以及在 Ice COLD-PCR 中使用 Optimase 来进行 PCR。参见图 14(SEQ ID NO:14) 的显示用于 K-RAS 序列内 Ice COLD-PCR 的引物和 RS-oligo 的位置的示意图。所使用的引物和 RS-oligo 如下:

[0083]

OLIGO 的使用	引物	SEQ ID NO:
第一轮 PCR 正向引物	5'-TTAACCTTATGTGTGACATGTTC	9
第一轮 PCR 反向引物	5'-TCCTGCACCAGTAATATGC	10
ICE COLD 正向引物	5'-GTGTGACATGTTCTAATATAG	11
ICE COLD 反向引物	5'-CTGAATTAGCTGTATCG	12
用于 ICE COLD 的 RS-oligo	5'-GCTGTATCGTCAAGGCACTCTTGC CTACACCACCAGCTCCAACCTACCAC	13

[0084] 为促进 Ice COLD-PCR 的检出限,将 BNA 的使用扩展至循环测序反应。因而,含 LNA 的寡核苷酸 (BNA) 封闭了野生型 DNA 的测序并允许含有任何突变的 DNA 的测序 (BLOCKer- 测序)。为了产生封闭,将另外的杂交步骤以及变性步骤 (于临界温度, T_c) 加至循环测序步骤。T_c 是 BNA:WTDNA 复合物保持完整但 BNA:Mut DNA 复合物却变性的温度。测序引物 (其在此实施例中与 BNA 的 5' 端重叠) 继而退火至突变体序列并随后延伸。

[0085] 设计了封闭核酸 (BNA) 以特异性地结合野生型 K-RAS 序列。用于此实验的 BNA 和测序引物如下:

[0086]

	BNA	T _c (°C)	测序引物
正向	<i>G</i>AAAAATGACTGAATATAAACTTGTG GTAGTTGGAGCTGGTGGCGTAGGCA/3Phos/ (SEQ ID NO: 15)	77.6	<i>TTATTATAAGGCCTGCTG</i>AAAAATG (SEQ ID NO: 16)
反向	<i>TTCTGAATTAGCTGTATCGTCAAGG</i> CACTCTTGCCCTACGCCACCAGCTCC/3Phos/ (SEQ ID NO: 17)	82.0	<i>TATTCGTCCACAAAATGATTCTG</i> (SEQ ID NO: 18)

[0087] 其中加下划线的核苷酸是 LNA 而其它核苷酸是常规核苷酸。斜体碱基表示测序引物和 BNA 之间的重叠。

[0088] 使用标准方案制备核酸样品,且含有密码子 12 突变 (K-RAS G12R;5' -GCCACG/CAGCTC-3' (SEQ ID NO:19) 和 5' -GAGCTC/GGTGGC-3' (SEQ ID NO:20));加下划线的碱基表示突变位点,其中靶或突变体序列列在前而野生型序列在斜杠后) 的核酸占加至初始 PCR 实验的总核酸的 1%,而样品其余的 99% 是野生型基因组 DNA。将 BNA (50nM、75nM 或 100nM) 和来自 Ice COLD-PCR 的核酸加至标准循环测序反应混合物。如上文实施例 1 中所述完成循环测序反应,除了其中杂交时间是 120 秒且循环测序延伸时间是 45 秒。因而,本发明的方法可以与 PCR 富集方法组合。

[0089] 如图 4 和图 5 所示,当仅以总序列的 1% 存在时,在没有 BNA 的测序反应中即便在 Ice COLD-PCR 之后也难以检测 K-RAS 突变体 (0nM; 参见顶端一幅中经标注碱基处的双峰),

但是当测序混合物含有针对野生型序列的 BNA 时,检测得以提高(在下面的三幅的每一幅中较大的峰代表突变体序列)。

[0090] 实施例 4: 线粒体体细胞突变的检测

[0091] 对在位置 3243 处具有已知线粒体突变 (A → G) 的样品进行了 BLOCKer 测序。此突变是线粒体基因组中 9 种已经确认的 MELAS (线粒体脑肌病伴乳酸血症和卒中样发作) 突变之一。下文实例反映了使用反向封闭核酸在反向方向的测序。

[0092] 设计了封闭核酸 (BNA) 以特异性地结合野生型线粒体序列。用于此实验的 BNA 和测序引物如下:

[0093]

	BNA	T _c (°C)	测序引物
3243 正向	<u>CCTCTGACTGTAAAGTTT</u>TAAGTTT ATGCGATTACCGGGC <u>CTG</u> /3Phos/ (SEQ ID NO: 21)	79.0	TGTTGTTAAGAAGAGGAATTGAACCTC (SEQ ID NO: 22)

[0094] 其中加下划线的核苷酸是 LNA 而其它核苷酸是常规核苷酸。BNA 和测序引物之间有 4 个碱基的重叠以斜体显示。

[0095] 使用标准方案制备核酸样品,且含有突变 (5'-GGCAGGGCCCG;SEQ ID NO:23; 突变加下划线) 的核酸占总核酸的 10% 而样品其余的 90% 是野生型基因组 DNA (5'-GGCAGAGCCCG;SEQ ID NO:24; 野生型碱基加下划线)。将 BNA (15 和 25nM) 和核酸加至标准循环测序反应混合物。如上文实施例 1 中所述完成循环测序反应,其中杂交时间是 120 秒且循环测序延伸时间是 45 秒,循环总数提高至 50 次。

[0096] 如图 6 所示,在没有 BNA 的测序反应中难以线粒体突变体 (参见底端一幅中经标注碱基处的小峰),但是当测序反应含有封闭野生型序列的 BNA 时,检测得以提高 (参见顶端幅和从上数第三幅)。G 峰 (黑) 与无 LNA 样品的测序相比提高的存在显示了突变可读性的改善。第二、第四和底端幅显示了野生型序列在缺乏或存在 BNA 时易于测序。

[0097] 实施例 5: 测序以区分 HPV 毒株 18 和 45

[0098] HPV 常常表现为各种毒株的混合感染。为了鉴别那些毒株存在于图片中,需要对毒株进行 DNA 测序。由于各个毒株之间相对数目较小的核苷酸变化以及缺乏确定那些毒株存在于任意一种样品中的能力,因而设计能够区别毒株的测序反应是有益的。

[0099] 设计了封闭核酸 (BNA) 以特异性地结合 HPV18 或者 HPV45 序列。用于此实验的 BNA 和测序引物如下:

[0100]

	BNA	T _c (°C)	测序引物
HPV18 正向	<u>TTTTTGCAGATGGCTTTGTGGCGGCC</u> TAGTGACA<u>ATACCGTATATC</u> /3Phos/ (SEQ ID NO: 25)	见 附图	CGATCGTAAACGTGTTCCCTATT (SEQ ID NO: 27)
HPV45 正向	<u>TTTTTGCAGATGGCTTTGTGGCGGCC</u> TAGTGACA<u>GTACCGTATATC</u> /3Phos/ (SEQ ID NO: 26)		

[0101] 其中加下划线的核苷酸是 LNA 而其它核苷酸是常规核苷酸。BNA 和测序引物之间有 3 个碱基的重叠以斜体显示。

[0102] 在本文所述的实验中使用了 (10,000 拷贝 / μ L) 原种质粒 (HPV 毒株模板的克隆)。使用标准方案制备核酸样品,并通过使用 **Stratagene Brilliant[®] II Master Mix** 的 PCR 扩增。用于初始扩增的引物是 HPV 的 L1 区中的共有引物。将通用标签 (UP) 加至正向和反向引物 (阴影区) 以便获得基于特异性测序的引物 (参见表 1)。

[0103] 表 1 HPV 共有引物序列 (正向引物中标注了 UP1; 反向引物中标注了 UP2)

[0104]	HPV Cons w/UP F	tcgaggtcgcacggtatcgat CGTAAACGTTTCCTATTTTTT (SEQ ID NO: 28)
	HPV Cons w/UP R	ccagtacggactcgtgttag TACCCTAAATACCCTATATTG (SEQ ID NO: 29)

[0105] 在 PCR 之后,将核酸混合,从而使 HPV18 核酸占总核酸的 50% 而样品的其余 50% 是 HPV45DNA。继而将 BNA (HPV18 为 50nM,而 HPV45 为 75nM) 和核酸加至标准循环测序反应混合物。如上文实施例 1 中所述完成循环测序反应,其中杂交时间是 120 秒且循环测序延伸时间是 45 秒。

[0106] 为了确定每个 BNA 的 T_c ,用跨越经计算的 BNA- 与其参考序列的 T_m 的温度梯度来对各种浓度的 BNA 进行循环测序。用测序电泳图来评估每个测序反应中两种毒株的峰的存在以及随后样品中参考序列峰 (其被 BNA 从测序中封闭) 的优先消失。继而确定了 BNA 的特定浓度和 T_c ,并将其用于后来此混合样品群体的优先循环测序。

[0107] 通过梯度热循环仪来使用了 HPV18BNA 的各种浓度,以确定使 HPV18BNA 与 HPV18 毒株保持双链体而允许对 HPV45 进行序列分析的临界温度。在第二组实验中,使用 HPV45BNA 以在封闭 HPV45 的测序时,优先对 HPV18 测序。

[0108] 如图 7 和图 9 分别显示了,HPV18 (SEQ ID NO:30,如图 7-10 中所示) 和 HPV45 (SEQ ID NO:31,如图 7-10 中所示) 毒株在无 BNA 时难以测序 (参见顶端一幅中标注碱基处的重叠峰),但是当测序反应含有封闭参考序列的 BNA 时,靶序列的检测得以提升 (在加入更多的 HPV18- 特异性 BNA 时,HPV45 序列在下方几幅中成为优势峰,反之亦然,分别见图 7 和 9)。

[0109] 图 8 和图 10 显示了对 BNA 从相对链变性所应发生的温度进行改变所带来的效应。如顶端一幅所示,无 BNA 不清楚。过低的变性温度会使得不能封闭参考序列的测序从而两个峰均可见。在中间的几幅中提高温度时,靶序列成为优势峰。在底端一幅中,将温度提升至高于 T_c 并允许参考序列的测序,则峰又混合了。此实例证明了 BNA 的量和选择用于变性的温度都可根据经验进行选择。

[0110] 实施例 6: 测序以区分 HPV 毒株 56 和 97

[0111] 设计了封闭核酸 (BNA) 以特异性地结合 HPV56 或者 HPV97 序列。用于此实验的 BNA 和测序引物如下:

[0112]

	BNA	T _c (°C)	测序引物
HPV56 正向	<i>TTTTTGCAGATGGCGAC</i><u>CGTGGCGGCC</u> TAG TGAA<u>AAATAAGGTGTATCTACC</u>/3Phos/ (SEQ ID NO: 32)	73.3	CGATCGTAAACGTGTTCCCTATT <i>TTT</i> (SEQ ID NO: 34)
HPV97 正向	<i>TTTTTGCAGATGGCTT</i><u>ACTGGCGGCC</u> TAG TGAC<u>AGTACGGTTTATCTGCC</u>/3Phos/ (SEQ ID NO: 33)		

[0113] 其中加下划线的核苷酸是 LNA 而其它核苷酸是常规核苷酸。BNA 和测序引物之间有 3 个碱基的重叠以斜体显示。

[0114] 在本文所述的实验中使用了 (10,000 拷贝 / μ L) 原种质粒 (HPV 毒株模板的克隆)。使用标准方案制备核酸样品,并通过使用 Stratagene Brilliant II Master Mix 的 PCR 扩增。用于初始扩增的引物是 HPV 的 L1 区中的共有引物。将通用标签 (UP) 加至正向和反向引物以便获得基于特异性测序的引物 (参见表 1)。

[0115] 在 PCR 之后,将核酸混合,从而使 HPV56 核酸占总核酸的 50% 而样品的其余 50% 是 HPV97DNA。继而将 BNA (HPV56 和 HPV45 均为 75nM) 和核酸加至标准循环测序反应混合物。如上文实施例 1 中所述完成循环测序反应,其中杂交时间是 120 秒且循环测序延伸时间是 45 秒。

[0116] 为了确定每个 BNA 的 T_c,用跨越经计算的 BNA- 与其参考序列的 T_m 的温度梯度来对各种浓度的 BNA 进行循环测序。用测序电泳图来评估每个测序反应中两种毒株的峰的存在以及随后样品中参考序列峰 (其被 BNA 从测序中封闭) 的优先消失。继而确定了 BNA 的特定浓度和 T_c,并将其用于后来此混合样品群体的优先循环测序。

[0117] 通过梯度热循环仪来使用了 HPV56BNA 的各种浓度,以确定使 HPV56BNA 与 HPV56 毒株保持双链体而允许对 HPV97 进行序列分析的临界温度。在第二组实验中,使用 HPV97BNA 以在封闭 HPV97 的测序时,优先对 HPV56 测序。

[0118] 如图 11 和图 12 分别显示了, HPV97 (SEQ ID NO:35) 和 HPV56 (SEQ ID NO:36) 毒株在无 BNA 时难以测序 (参见顶端一幅中的重叠峰),但是当测序反应含有 BNA 以封闭参考序列时,靶序列的检测得以提升 (在加入更多的 HPV56- 特异性 BNA 时, HPV97 序列在下方几幅中成为优势峰,反之亦然,分别见图 11 和 12)。图 13 显示了无 BNA 的测序反应电泳图 (中间一幅有许多区域不能读取) 与使用最佳 BNA 浓度和变性温度的几幅的比较 (分别显示经解析的 HPV56 和 97 的序列的顶端一幅和底端一幅)。

[0119] 实施例 7: 扩增随后测序以检测 BRAF 突变

[0120] 设计了封闭核酸 (BNA) 以特异性地对 BRAF 突变 V600E 和 G469A 进行扩增并使得可以测序。测序引物在 PCR 期间也被用作扩增引物。将测序引物和 BNA 设计为结合 DNA 的相同链。将扩增引物设计为结合相对的链或互补的链并且 5' 磷酸化。

[0121] 对于 BRAF V600E 的检测,引物或者寡核苷酸具有如下序列和修饰: 测序引物¹

[0122] 5' -ATGCTCAGACACAATTAGCGCGACCCTTAGATCCAGACAACACTGTTCAAAC-3' (SEQ ID NO:37)

[0123] 5' - 磷酸化的扩增引物²

[0124] /5Phos/TCCTTTACTTACTACACCTCAG-3' (SEQ ID NO:38)

[0125] 封闭 oligo(BNA)³

[0126] 5' -AACTGTTCAAACCTGATGGGACCCACTCCATCGAGATTT+C+A+C+TGTAGCTAG/3Phos/
(SEQ ID NO:39)

[0127] 对于 BRAF G469A, 引物或者寡核苷酸具有如下序列和修饰:

[0128] 测序引物

[0129] 5' -GGGACTCGAGTGATGATTGG-3' (SEQ ID NO:40)

[0130] 5' - 磷酸化的扩增引物

[0131] /5Phos//5Phos/CCACATTACATACTTACCATGCC-3' (SEQ ID NO:41)

[0132] 封闭 oligo(BNA)

[0133] 5' -ACCATGCCACTTTCCTTGTAGACTGTT+C+CAAATGAT+CCAGAT+CCAATTC/3Phos/ (SEQ ID NO:42);

[0134] 其中 /5Phos/ 代表 5' - 磷酸化, "+" 代表锁核酸 (LNA), 以及 /3Phos// 代表 3' - 磷酸化。

[0135] 在本文所述的实验中使用了原种质粒 (BRAF 的克隆) 及其稀释物 (10,000 拷贝 / μ L)。使用标准方案制备核酸样品, 通过 PCR 扩增以及在反应混合物中测序, 所述反应混合物含有 2.5 μ L Better Buffer (The Gel Company)、0.25 μ L Big Dye v.3.1 (Applied Biosystems)、0.13 μ L 10mM dNTP、1 μ L 10 μ M 测序引物、1 μ L 1 μ M 5' - 磷酸化的扩增引物、1.6 μ L (或优化的) 2.5 μ M 封闭核酸和 1 μ L DNA 模板至每个反应的总体积 10 μ L。在热循环仪中进行所述反应如下: 40 个循环的 95°C 15sec、70°C 2 分钟、临界温度 30 秒, 50°C 10 秒以及 60°C 45 秒随后在 12°C 温育。继而将 λ 外切核酸酶 (以 5,000U/mL 的 0.5 μ L) 加至反应混合物并在 37°C 温育 30 分钟以降解所扩增的包含 5' - 磷酸酯的链。用于 V600E 测序的临界温度为 77.6°C 以及用于 ICE COLD PCR 的为 76.4°C。用于 G469A 测序的临界温度为 74.6°C 以及用于 ICE COLD PCR 的为 73.2°C。最后, 如根据 CleanSEQ 方案 (Agencourt Biosciences) 的标准测序那样将材料进一步纯化。如上文所述确定各 Tc 以及将所使用的 BNA 浓度优化。

[0136] 图 15 显示了在过量的野生型序列 (SEQ ID NO:43; 5' -CTACAGA/TGAAAT-3'; 加下划线的碱基是突变位点, 其中第一个碱基是突变体斜杠之后的碱基是野生型) 背景中检测 V600E BRAF 外显子 15 突变的电泳图。百分比表示加至反应混合物的总 DNA 模板中突变体靶的百分比。第一个电泳图证明了靶 V600E 突变用 ICE COLD PCR 的检出限是 0.05%, 中间的电泳图显示了本文所述的反应提供了 0.5% 的检出限, 以及右方的电泳图中所示的标准测序显示了标准测序提供 10% 的检出限。

[0137] 图 16 显示了在过量的野生型序列 (SEQ ID NO:44; 5' -TTTGC/GAACAG-3'; 加下划线的碱基是突变位点, 其中第一个碱基是突变体斜杠之后的碱基是野生型) 背景中检测 G469A BRAF 外显子 11 突变的电泳图。百分比表示加至反应混合物的总 DNA 模板中突变体靶的百分比。左侧的电泳图证明了靶 G469A 突变用 ICE COLD PCR 的检出限是 0.01%。右侧的电泳图显示了本文所述的 BLOCKer 测序反应提供了 0.5% 的检出限。我们预期 ICE COLD PCR 和 BLOCKer 测序反应的组合 (而不是本文所述的常规 PCR 和 BLOCKer 测序) 会导致更

低的检出限。

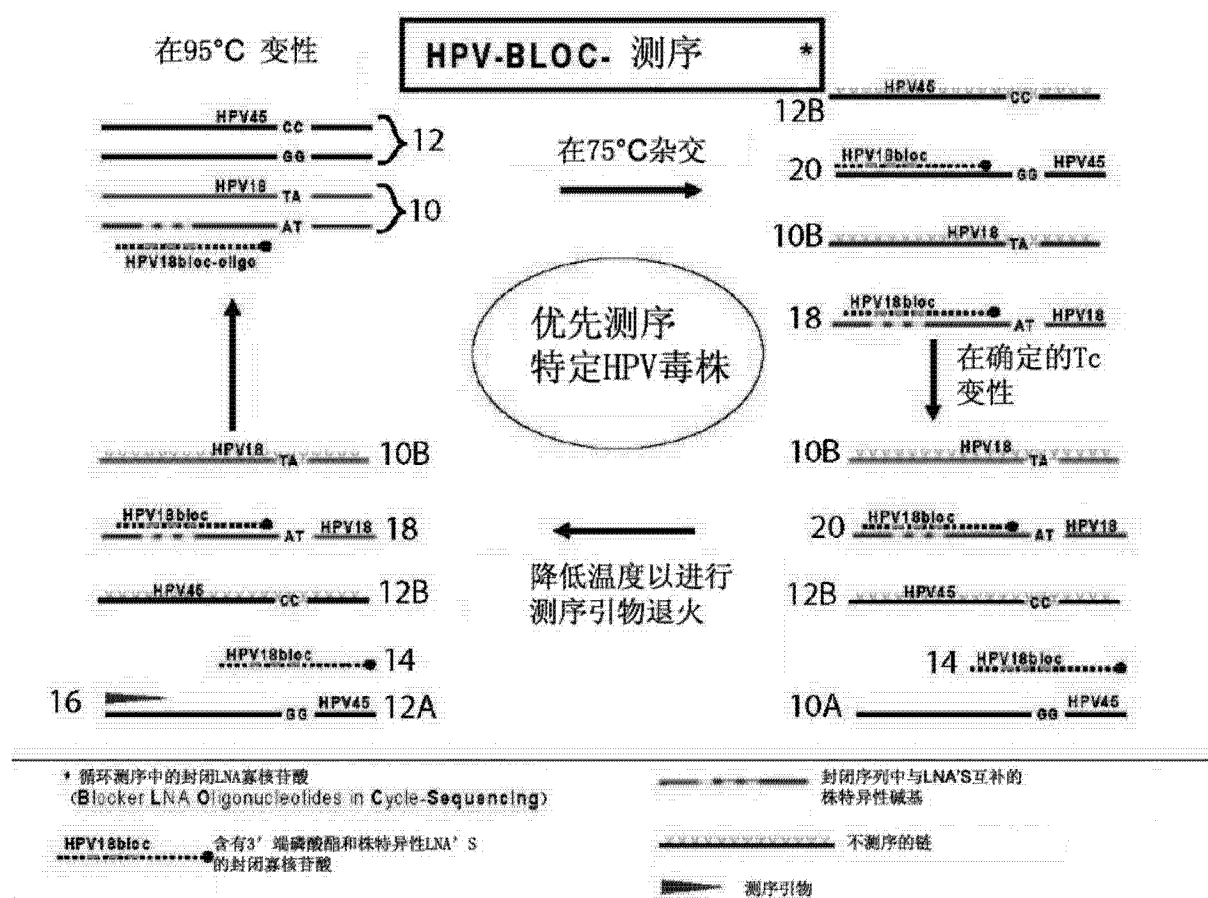


图 1

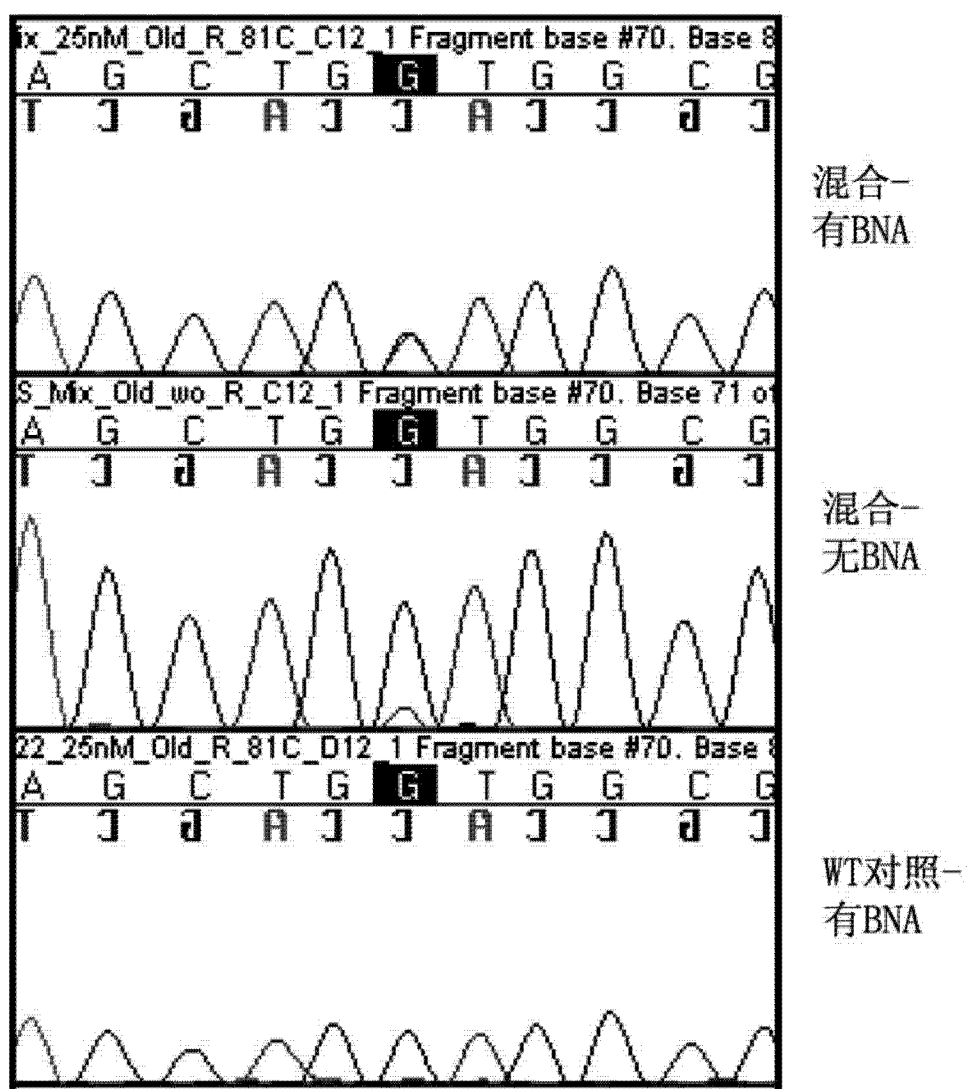


图 2

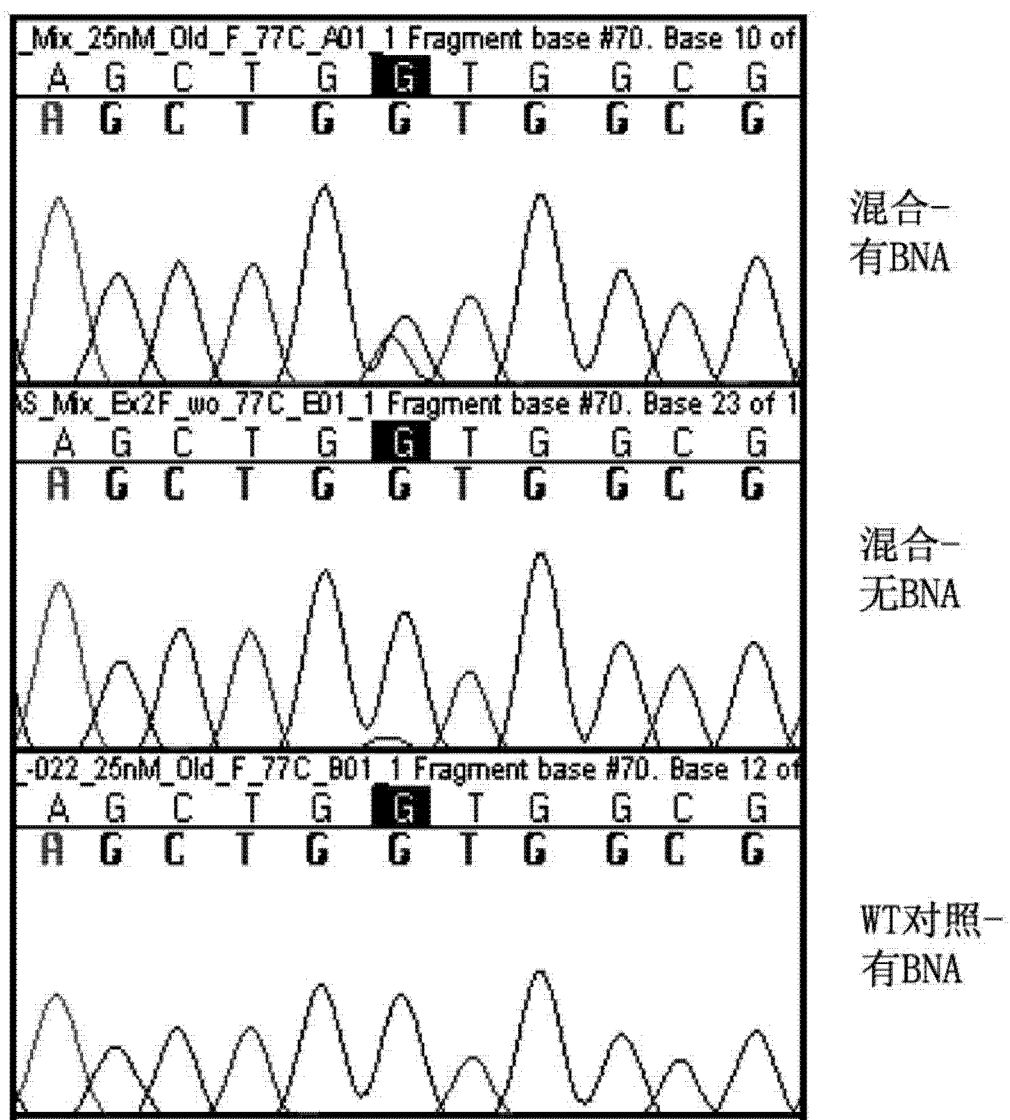


图 3

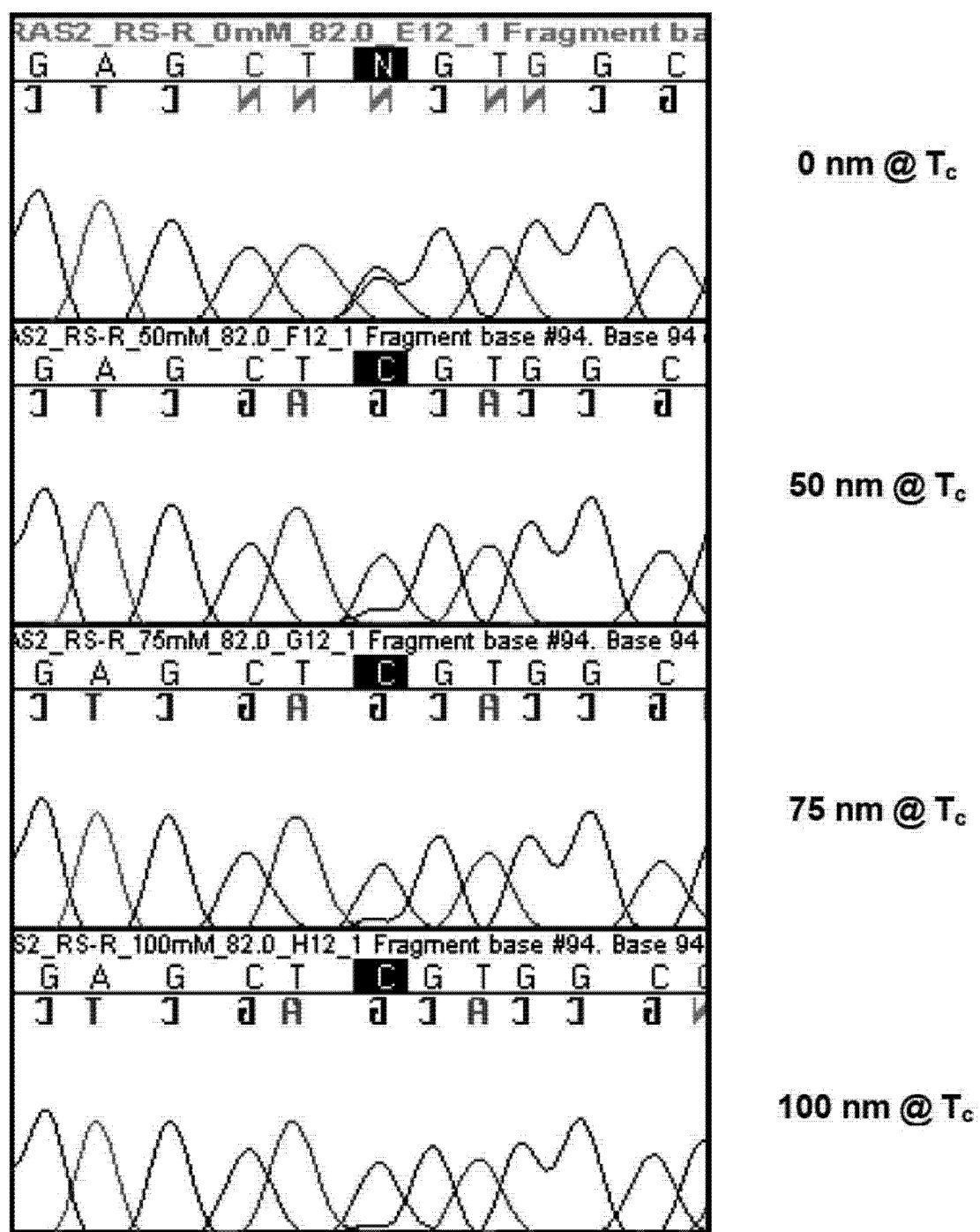


图 4

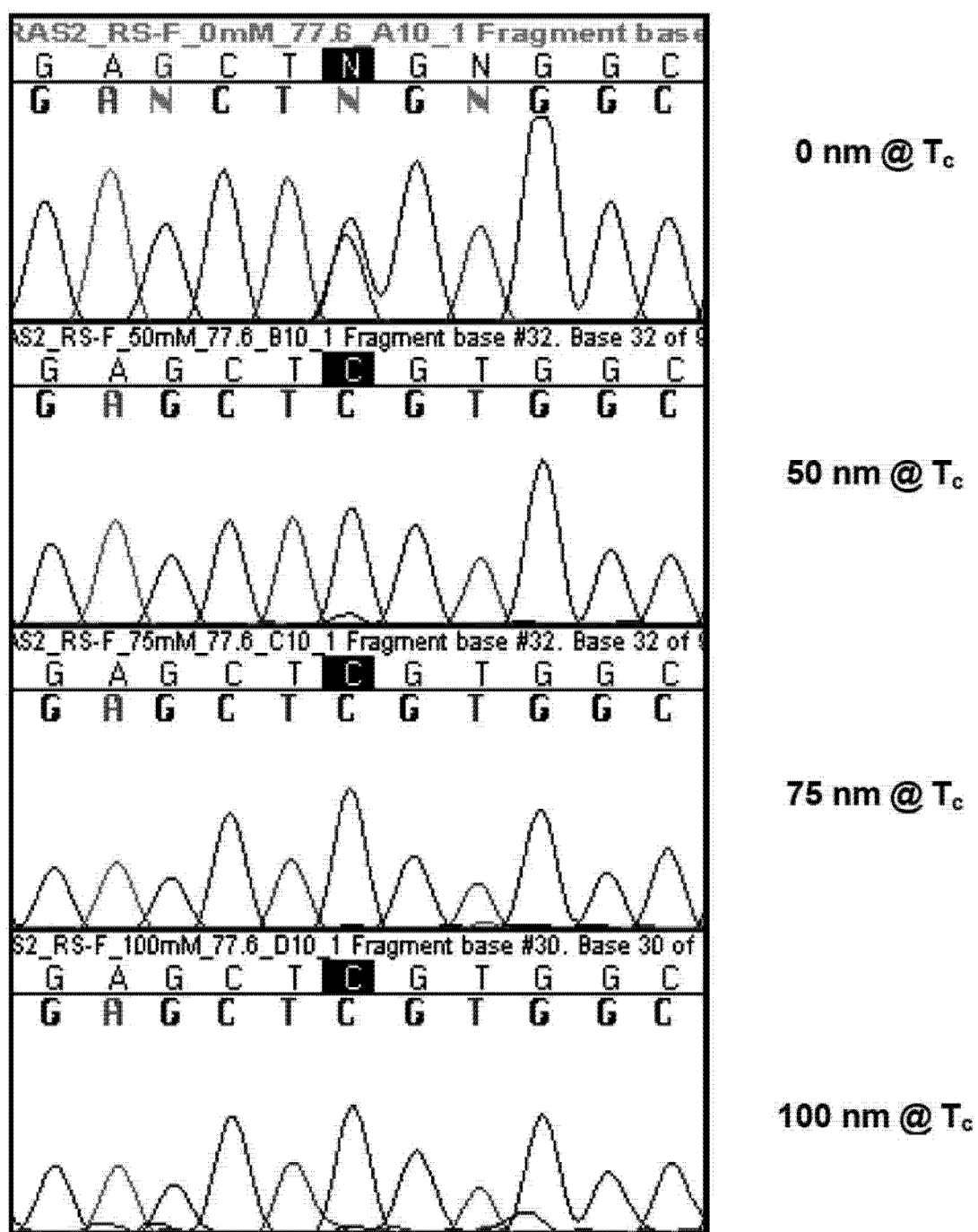


图 5

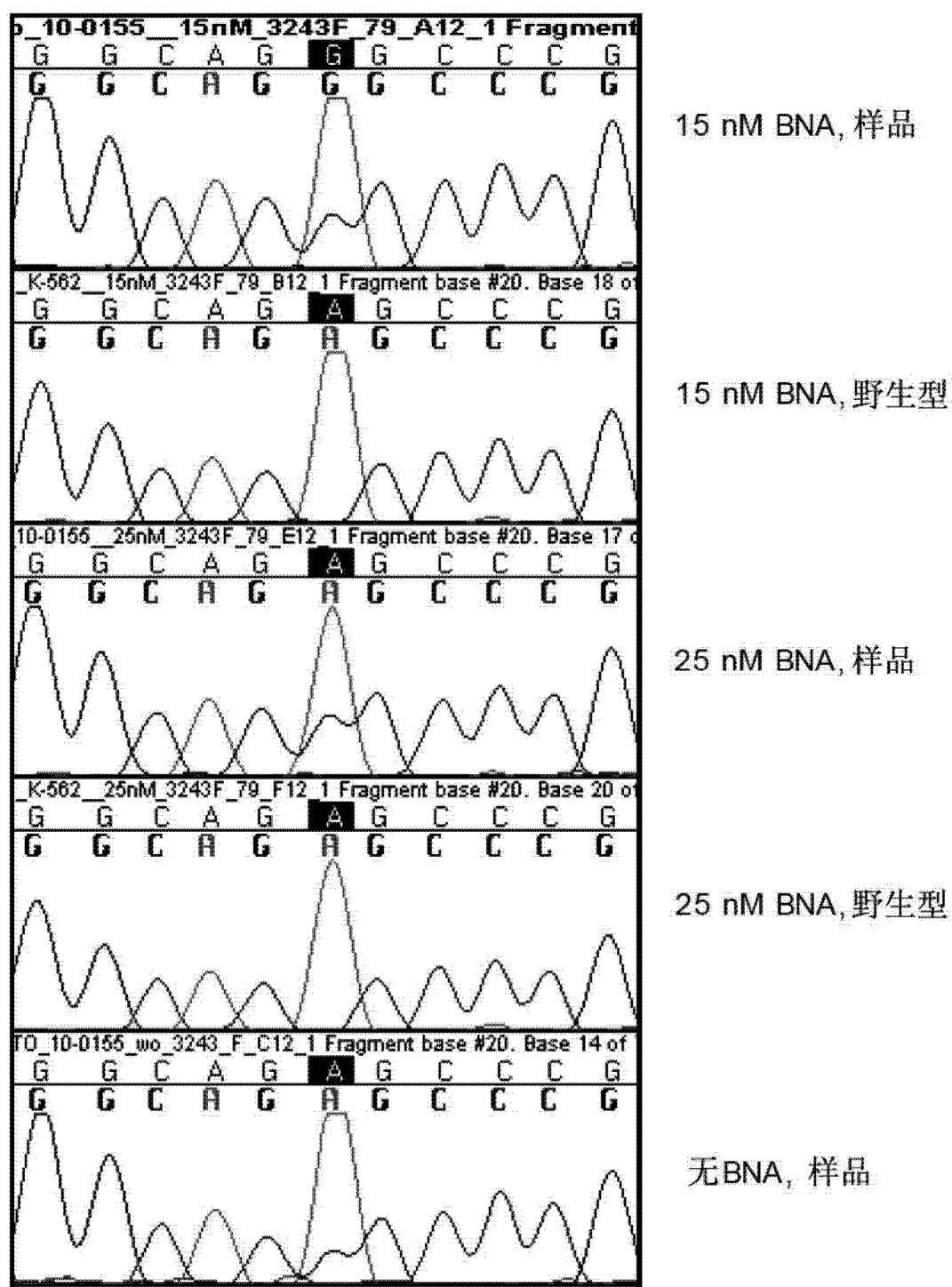


图 6

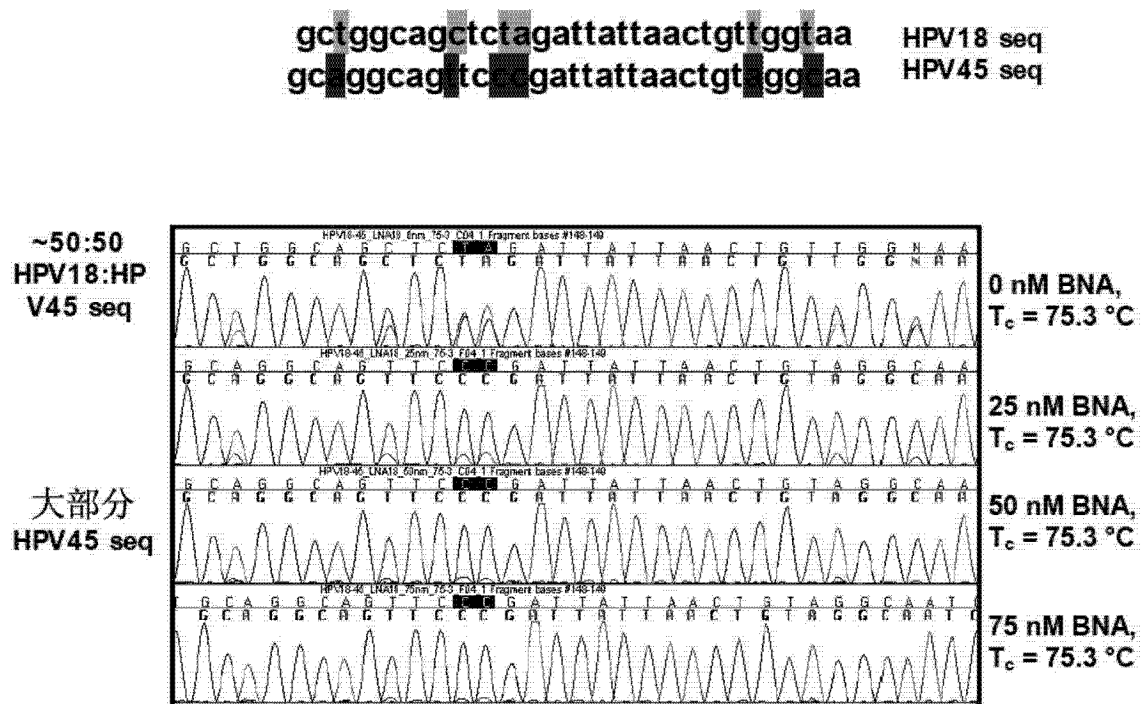


图 7

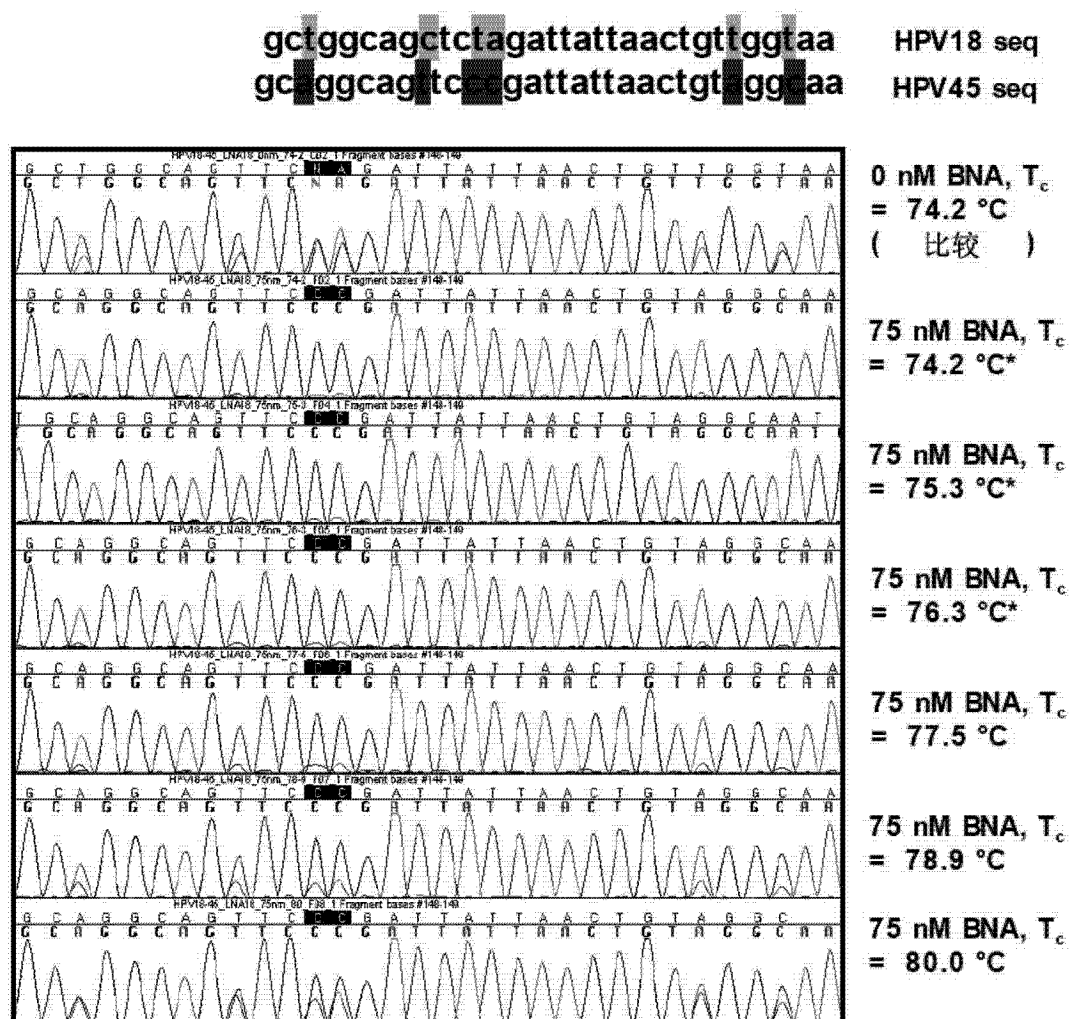


图 8

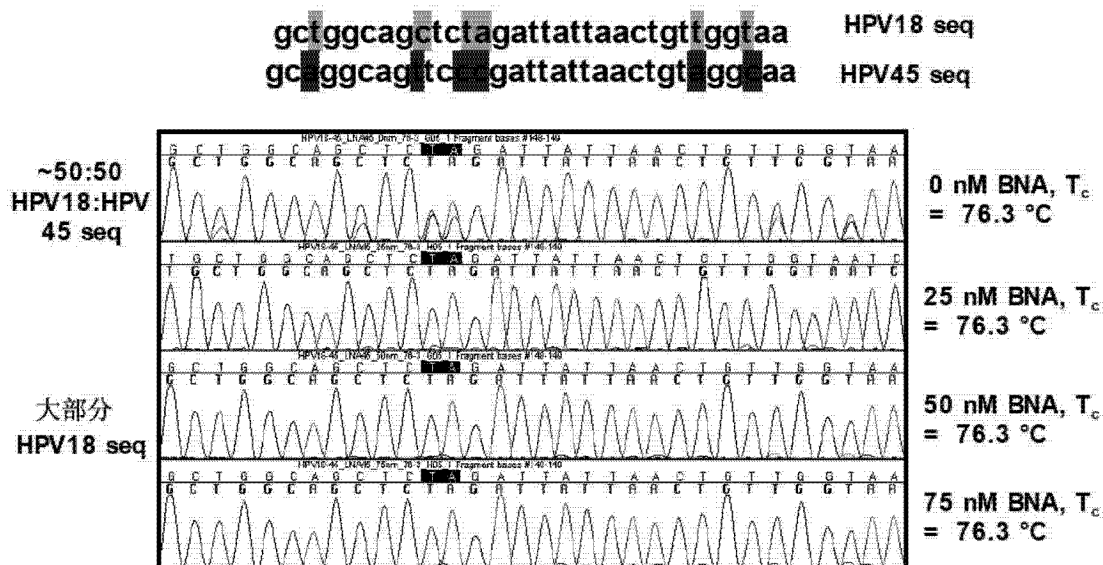


图 9

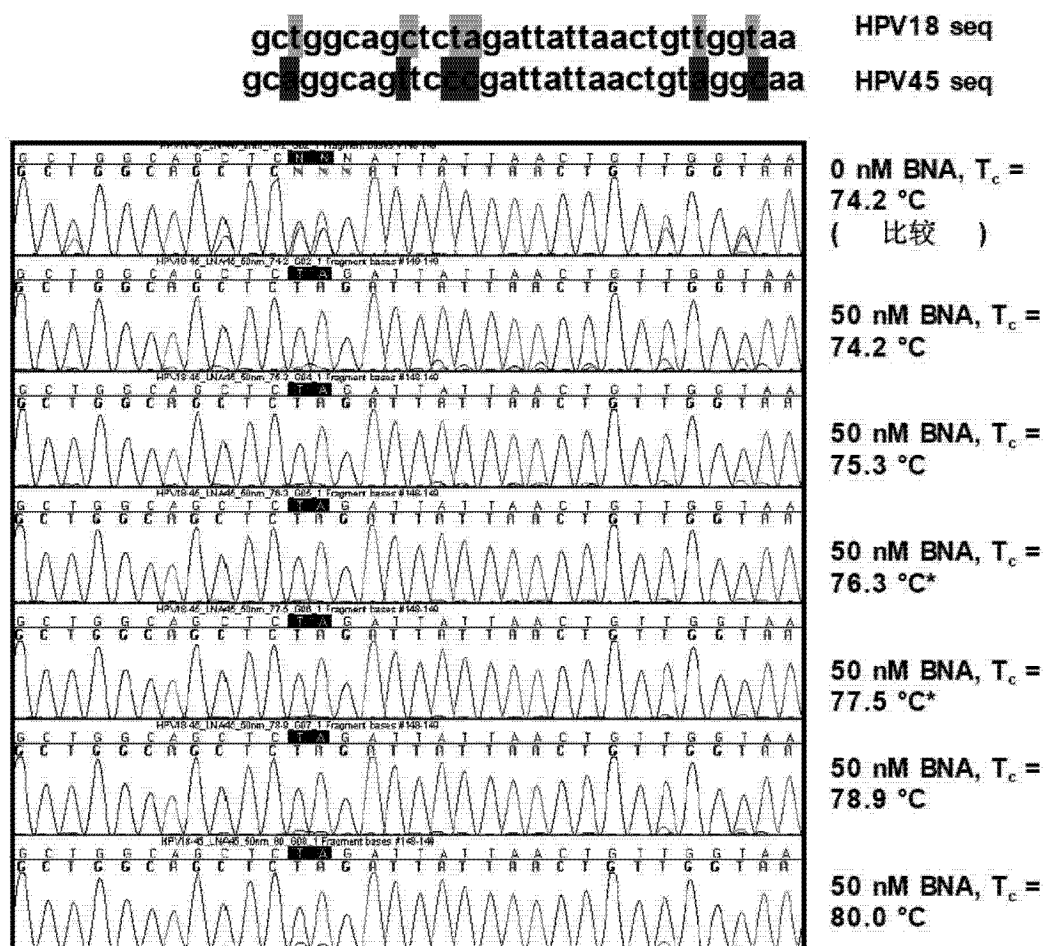


图 10

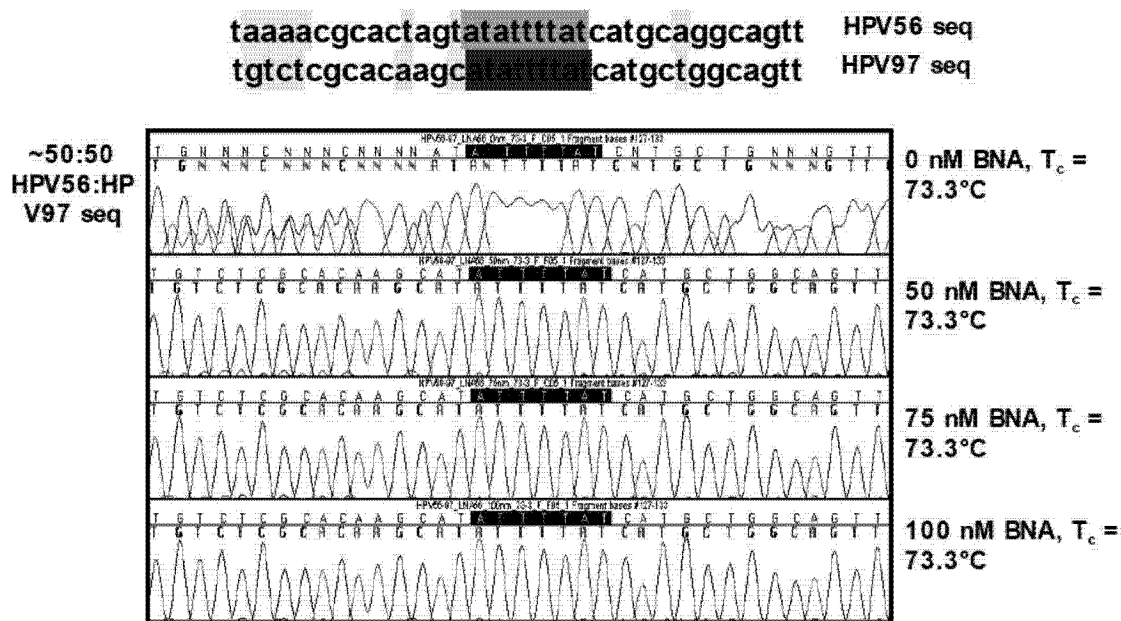


图 11

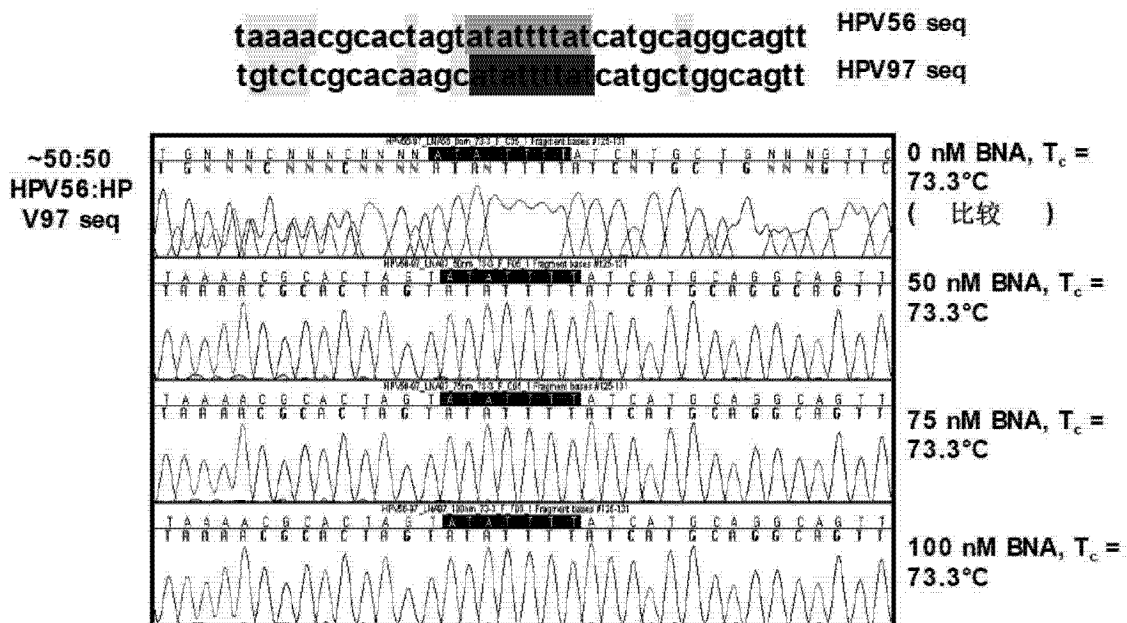


图 12

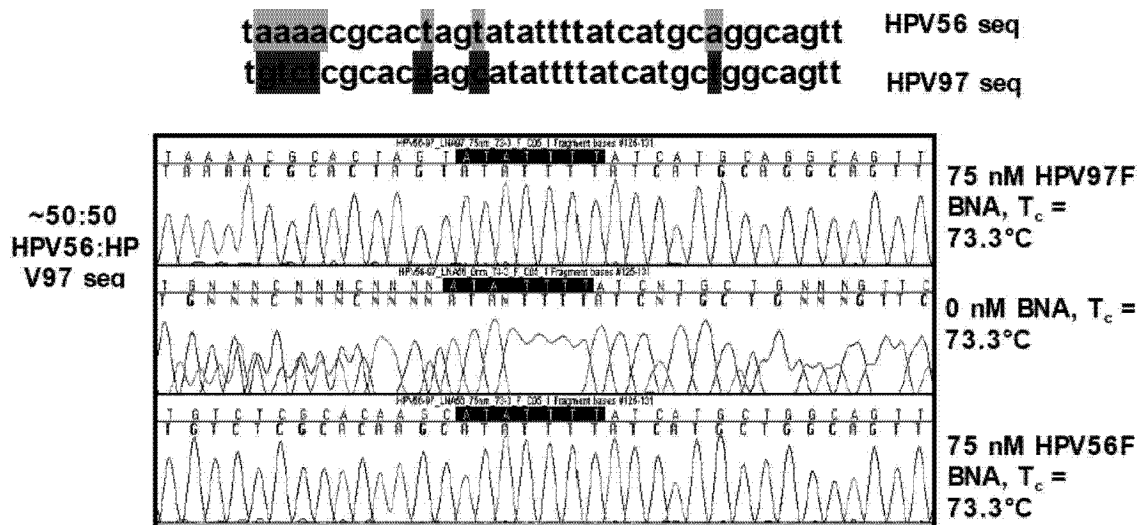


图 13

GTTTGTATTAAAAGGTACTGGTGGAGTATTTGATAGTGTA
 84-1stPCR → KRASseq →
 TTAACCTTAT GTGTGACATGTTT TAATATAG
 KRASseq →
 TCACATTTTCATTATTTTTA TTATAA GCCTGCTGAAAATG ACTGAATAT
 ← KRASseqR
 AAACCTTGTTGGTAGTTGGAGCTGGTGGT GTAGGCAAGAGTGCCTTGA CGATACAGCT AATTCAG
 (3'-7th- CACCATCAACCTCGACCACCA CATCCGTTCTCACGGAAGTCTATGTCG)
 AATCATTTTGTGGACGAATATGATCCAACAATAGAG GTAAATCTTGTTTTAATAT
 GCATATTACTGGTGCAGGA CCATTCTTTGATACAGATAAA
 ← 67-1stPCR

图 14

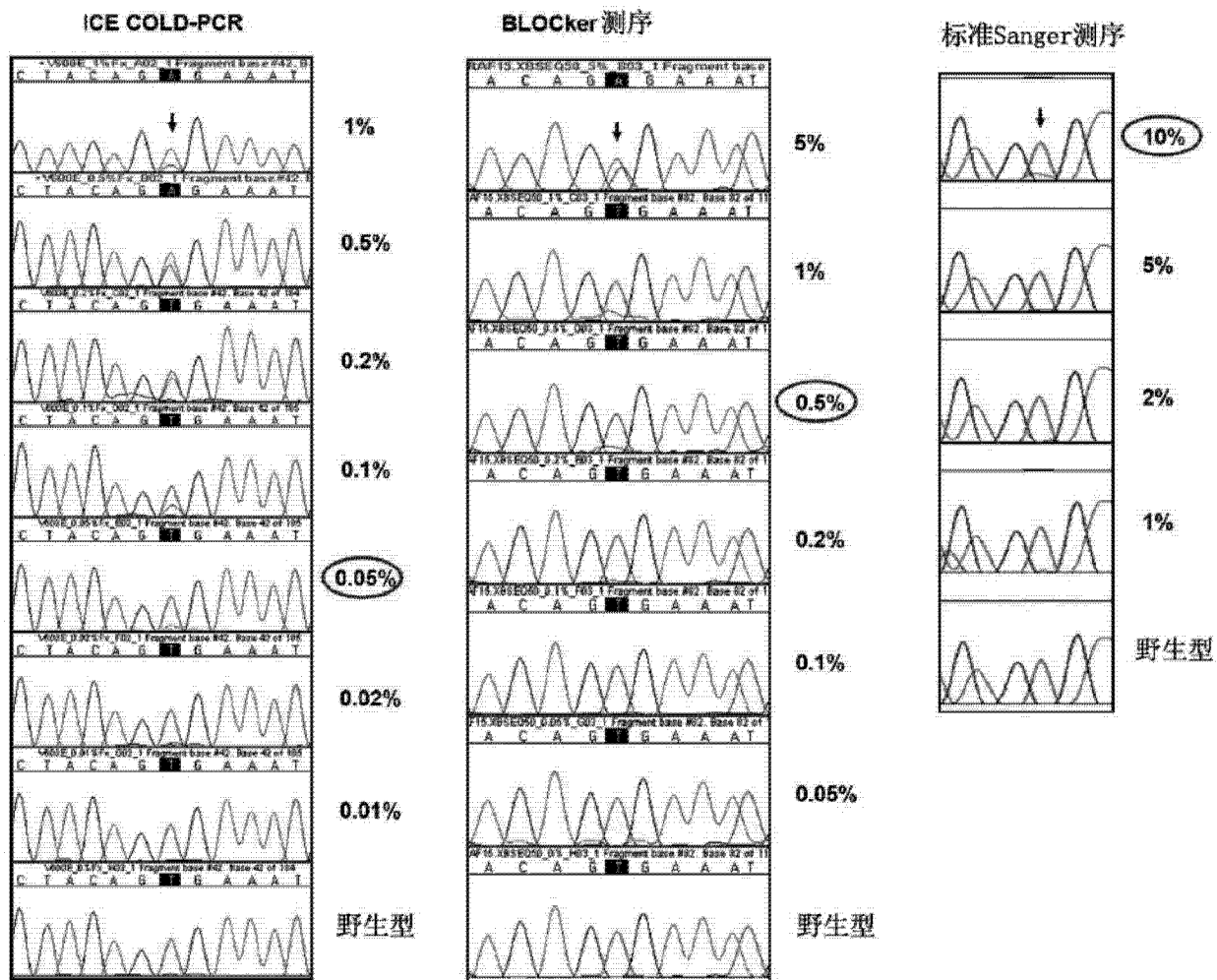


图 15

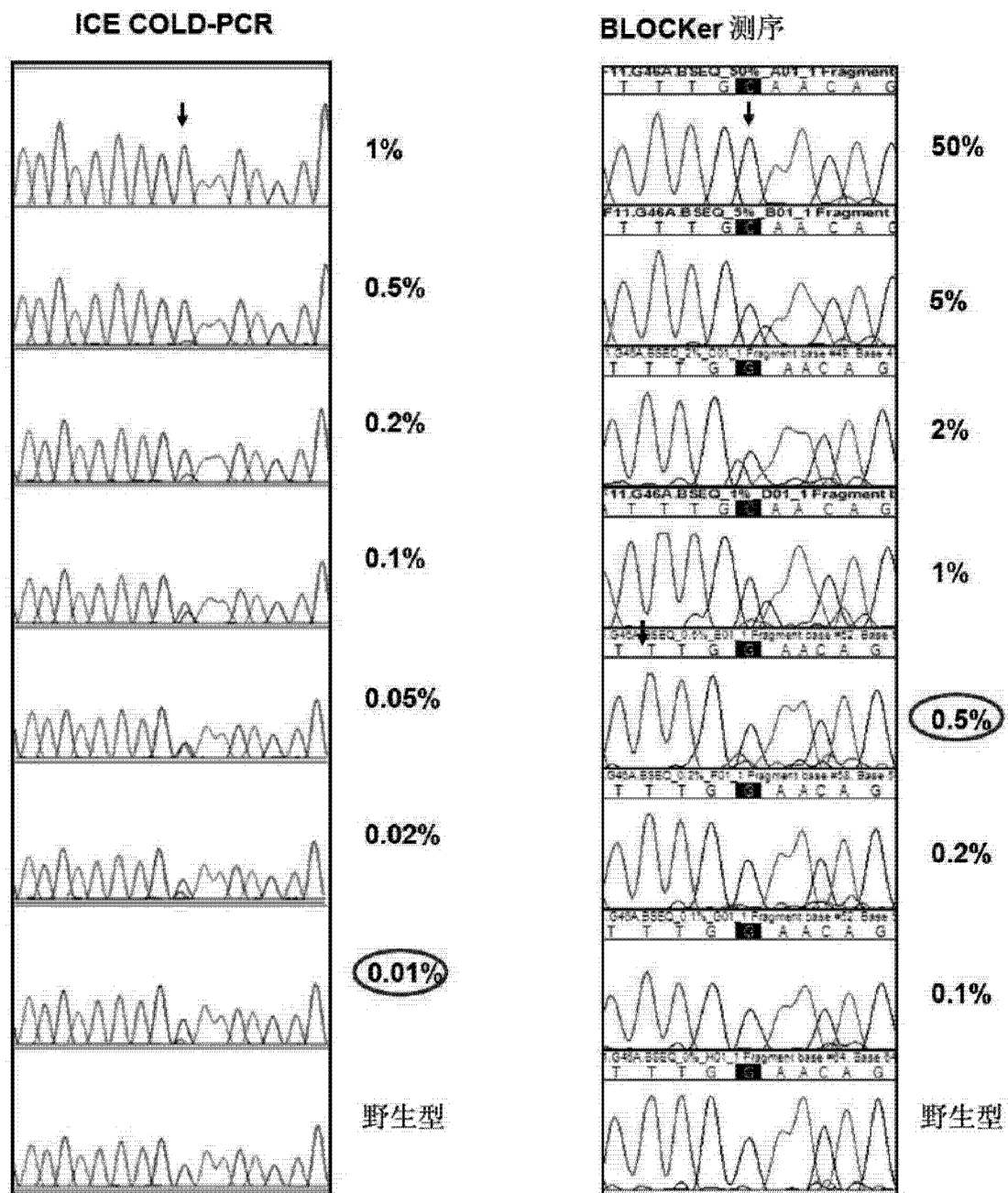


图 16