



## (12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 109312398 B

(45) 授权公告日 2022.05.31

(21) 申请号 201780035794.7

(22) 申请日 2017.04.05

(65) 同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 109312398 A

(43) 申请公布日 2019.02.05

(30) 优先权数据  
62/319,332 2016.04.07 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日  
2018.12.07

(86) PCT国际申请的申请数据  
PCT/US2017/026088 2017.04.05

(87) PCT国际申请的公布数据  
W02017/176852 EN 2017.10.12

(73) 专利权人 新泽西州立拉特格斯大学  
地址 美国新泽西州

(72) 发明人 塞尔瓦托·A·E·马拉斯

D·瓦尔加斯-戈尔德 S·泰尔吉  
F·R·克雷默

(74) 专利代理机构 北京安信方达知识产权代理  
有限公司 11262  
专利代理师 王玮玮 郑霞

(51) Int.Cl.  
C12Q 1/6858 (2018.01)  
C12N 15/11 (2006.01)

(56) 对比文件  
CN 105102467 A, 2015.11.25  
WO 2015185902 A1, 2015.12.10  
US 2016032373 A1, 2016.02.04  
审查员 马艳林

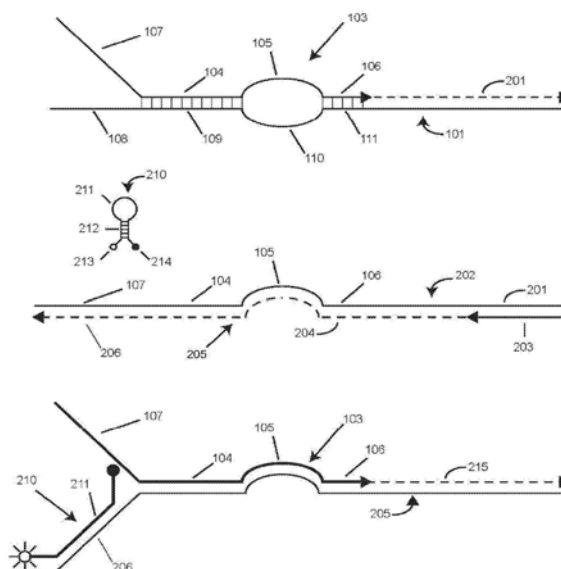
权利要求书5页 说明书44页  
序列表13页 附图15页

### (54) 发明名称

能够检测密切相关的等位基因的多重核酸  
测定方法及其试剂

### (57) 摘要

本发明披露了用于引物依赖性核酸扩增方  
法的多部分引物。还披露了多重测定方法、相关  
的试剂盒和用于此类方法的寡核苷酸。



1. 一种多重测定方法,其能够在10,000个拷贝的相关的野生型DNA靶序列的存在下在样本中扩增和检测至少两种不同的密切相关的、预期的罕见突变体DNA靶序列中的每一种的少至十个拷贝,其中这些突变体DNA靶序列与彼此以及该野生型DNA靶序列相差少至单核苷酸多态性,该多重测定方法包括:

(a) 制备非对称引物依赖性扩增反应混合物,该混合物包括该样本;DNA聚合酶;脱氧核糖核苷三磷酸;扩增所需的其他试剂;四甲基氯化铵 (TMAC) 或能够增强独特的多部分引物的等位基因选择性的另一种霍夫迈斯特盐;可区分标记的均相荧光检测探针,该均相荧光检测探针对每种罕见突变体DNA靶序列的扩增产物是特异的;过量浓度的针对这些密切相关的突变体靶序列的反向引物;以及限制浓度的针对该每种预期的罕见突变体靶序列的独特的多部分引物,所述多部分引物具有与任何靶DNA序列不互补的至少一种独特的DNA序列,并且在由该反向引物引发的扩增子链中的所述独特的序列中的一种的互补物是该探针的靶,并且该独特的DNA序列对于要单独识别的每种靶序列或靶序列组是独特的,其中每种多部分引物的序列在5'至3'方向上包含通过延伸该反向引物复制的以下三种连续DNA序列:

锚定DNA序列,该锚定DNA序列足够长使得其能够在引物退火过程中与这些密切相关的突变体DNA靶序列和该相关的野生型DNA靶序列杂交;

独特的桥DNA序列,该独特的桥DNA序列至少六个核苷酸长,其在引物退火期间不与该独特的多部分引物预期的DNA靶序列杂交,不与任何其他密切相关的突变体靶DNA序列杂交,或在引物退火过程中不与该相关的野生型DNA靶序列杂交;和

独特的足DNA序列,该独特的足DNA序列7至14个核苷酸长并且与该预期的DNA靶序列完全互补,但与突变体DNA靶序列和该相关的野生型DNA序列彼此存在一个或更多个核苷酸不匹配,该一个或更多个核苷酸中的至少一个是3'末端核苷酸或3'倒数第二核苷酸,其中:

(i) 如果该多部分引物的锚定DNA序列和足DNA序列都与其预期的DNA靶序列杂交,从而产生引物-靶杂交体,则该引物-靶杂交体在该多部分引物的5'至3'方向上包含:锚-靶杂交体、泡状物、和足-靶杂交体,所述泡状物具有24至40个核苷酸的周长并且由该靶DNA序列中的间插DNA序列形成,该间插DNA序列至少八个核苷酸长并且在引物退火期间不与该引物的桥DNA序列杂交,

(ii) 该泡状物将足-靶杂交体与锚-靶杂交体分离,并且根据阈值 $C_T$ 与使用常规引物发生的 $C_T$ 相比延迟至少五个循环所证明的,该分离的足-靶杂交体是使得复制预期的靶DNA序列的可能性不大的弱杂交体,该常规引物不含任何桥DNA序列;

(iii) 根据由至少十个热循环的阈值差异即  $\Delta C_T$  所证明的,在PCR扩增期间,针对其预期的靶DNA序列的多部分引物将引发任何密切相关的突变体靶DNA序列或该相关的野生型靶DNA序列的复制的概率比引发其预期的靶序列的复制的概率低至少1,000倍;

(iv) 产生扩增子链的多部分引物具有桥DNA序列和足DNA序列,这些桥DNA序列和足DNA序列与该扩增子链的互补链完全互补;和

(v) 每种多部分引物的桥DNA序列的长度和序列,连同其预期的靶DNA序列的间插DNA序列的长度,产生了对一种仅含有十个拷贝的其预期的靶DNA序列的样本观察到的阈值 $C_T$ ,该 $C_T$ 将在指数扩增的60个循环中出现并且与从不含有拷贝的样本中观察到的 $C_T$ 是可区分的;和

(b) 重复地循环该反应混合物以扩增在该样本中存在的这些密切相关的罕见突变体靶DNA序列,并通过经由实时或端点检测测量来自每种可区分地标记的探针的荧光强度来检测那些DNA序列的存在;

其中所述多重测定方法用于非诊断和非治疗目的。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中循环是聚合酶链反应(PCR)方法中的温度循环。

3. 根据权利要求1或权利要求2所述的方法,其中对于至少一种预期的罕见靶序列,该多部分引物包含不与任何靶序列互补的、对于要单独识别的每种靶序列或靶序列组是独特的5'标签序列,并且在由该反向引物引发的扩增子链中的该5'标签序列的互补物是该探针的靶。

4. 根据权利要求1或权利要求2所述的方法,其中对于至少一种预期的罕见靶序列,该探针的靶是由该反向引物引发的扩增子链中的桥序列的互补物。

5. 根据权利要求1-4中任一项所述的方法,其中该足DNA序列与该密切相关的野生型DNA序列存在一个或更多个核苷酸不匹配,并且其中该一个或更多个核苷酸的至少一个是3'-末端核苷酸。

6. 根据权利要求1-5中任一项所述的方法,其中该足序列的长度为8-10个核苷酸。

7. 根据权利要求1-6中任一项所述的方法,其中该桥序列与该间插序列的长度不相同并且该泡状物是不对称的。

8. 根据权利要求2所述的方法,其中一种靶DNA序列的 $C_T$ 值表示与任何其他靶DNA序列相同数量的起始模板。

9. 根据权利要求1所述的方法,其包括扩增和检测与该至少两种密切相关的突变体靶DNA序列不密切相关的参考野生型DNA序列,其中该引物依赖性扩增反应混合物包括针对该参考DNA序列的限制性多部分引物、过量反向引物和均相荧光检测探针,其中针对该参考DNA序列的多部分引物具有权利要求1中描述的结构和功能限制,并且其中针对该参考DNA序列的多部分引物的桥DNA序列的长度和核苷酸序列与针对这些突变体靶DNA序列的多部分引物的那些相协调,使得针对每种突变体靶DNA序列获得的 $C_T$ 值和针对该参考野生型DNA序列获得的 $C_T$ 值之间的差异反映了相对于该参考野生型DNA序列的丰度的该突变体靶DNA序列的丰度,而不管该样本中存在的DNA量如何。

10. 根据权利要求1-9中任一项所述的方法,其中使该反应混合物循环通过仪器进行,其中靶DNA序列的数量超过仪器可以分别检测的颜色数量,并且其中多种不同的探针是具有相同的荧光团但具有不同的解链温度的热特异性杂交探针。

11. 根据权利要求1-10中任一项所述的方法,其中扩增和检测是数字PCR方法,并且其中这些探针是颜色编码的分子导标探针。

12. 根据权利要求1-10中任一项所述的方法,其中扩增和检测在荧光分光光度热循环仪中进行,并且其中这些探针是颜色编码的分子导标探针。

13. 根据权利要求1-12中任一项所述的方法,其能够扩增和检测该至少两种密切相关的罕见突变体靶DNA序列中的任何一种的少于十个拷贝,其中由这些多部分引物的锚定DNA序列和这些突变体靶DNA序列形成的这些杂交体具有比由该反向引物和这些突变体靶DNA序列形成的杂交体的解链温度( $T_m$ )低的 $T_m$ ,其中在步骤(b)之前,使用该反向引物的线性扩增的多个循环使用引物退火温度进行,在该引物退火温度该反向引物杂交但这些多部分引

物杂交可能性非常低,并且其中步骤(b)使用较低引物退火温度进行,在该较低引物退火温度这些多部分引物和该反向引物杂交。

14.一种试剂盒,其包括足以进行根据权利要求1-13中任一项所述的方法中的扩增和检测的试剂,所述试剂盒包括所述DNA聚合酶、所述脱氧核糖核苷三磷酸、所述扩增所需的其他试剂、TMAC或能够增强独特的多部分引物的等位基因选择性的所述另一种霍夫迈斯特盐、所述可区分标记的均相荧光检测探针、所述反向引物和所述独特的多部分引物。

15.四甲基氯化铵(TMAC)或能够增强独特的多部分引物的等位基因选择性的另一种霍夫迈斯特盐在制备用于进行多重测定方法的试剂盒中的用途,所述多重测定方法能够在10,000个拷贝的相关的野生型DNA靶序列的存在下在样本中扩增和检测至少两种不同的密切相关的、预期的罕见突变体DNA靶序列中的每一种的少至十个拷贝,其中这些突变体DNA靶序列与彼此以及该野生型DNA靶序列相差少至单核苷酸多态性,其中所述多重测定方法包括:

(a)制备非对称引物依赖性扩增反应混合物,该混合物包括该样本;DNA聚合酶;脱氧核糖核苷三磷酸;扩增所需的其他试剂;四甲基氯化铵(TMAC)或能够增强独特的多部分引物的等位基因选择性的另一种霍夫迈斯特盐;可区分标记的均相荧光检测探针,该均相荧光检测探针对每种罕见突变体DNA靶序列的扩增产物是特异的;过量浓度的针对这些密切相关的突变体靶序列的反向引物;以及限制浓度的针对该每种预期的罕见突变体靶序列的独特的多部分引物,所述多部分引物具有与任何靶DNA序列不互补的至少一种独特的DNA序列,并且在由该反向引物引发的扩增子链中的所述独特的序列中的一种的互补物是该探针的靶,并且该独特的DNA序列对于要单独识别的每种靶序列或靶序列组是独特的,其中每种多部分引物的序列在5'至3'方向上包含通过延伸该反向引物复制的以下三种连续DNA序列:

锚定DNA序列,该锚定DNA序列足够长使得其能够在引物退火过程中与这些密切相关的突变体DNA靶序列和该相关的野生型DNA靶序列杂交;

独特的桥DNA序列,该独特的桥DNA序列至少六个核苷酸长,其在引物退火期间不与该独特的多部分引物预期的DNA靶序列杂交,不与任何其他密切相关的突变体靶DNA序列杂交,或在引物退火过程中不与该相关的野生型DNA靶序列杂交;和

独特的足DNA序列,该独特的足DNA序列7至14个核苷酸长并且与该预期的DNA靶序列完全互补,但与突变体DNA靶序列和该相关的野生型DNA序列彼此存在一个或更多个核苷酸不匹配,该一个或更多个核苷酸中的至少一个是3'末端核苷酸或3'倒数第二核苷酸,其中:

(i)如果该多部分引物的锚定DNA序列和足DNA序列都与其预期的DNA靶序列杂交,从而产生引物-靶杂交体,则该引物-靶杂交体在该多部分引物的5'至3'方向上包含:锚-靶杂交体、泡状物、和足-靶杂交体,所述泡状物具有24至40个核苷酸的周长并且由该靶DNA序列中的间插DNA序列形成,该间插DNA序列至少八个核苷酸长并且在引物退火期间不与该引物的桥DNA序列杂交,

(ii)该泡状物将足-靶杂交体与锚-靶杂交体分离,并且根据阈值 $C_T$ 与使用常规引物发生的 $C_T$ 相比延迟至少五个循环所证明的,该分离的足-靶杂交体是使得复制预期的靶DNA序列的可能性不大的弱杂交体,该常规引物不含任何桥DNA序列;

(iii)根据由至少十个热循环的阈值差异即 $\Delta C_T$ 所证明的,在PCR扩增期间,针对其预期

的靶DNA序列的多部分引物将引发任何密切相关的突变体靶DNA序列或该相关的野生型靶DNA序列的复制的概率比引发其预期的靶序列的复制的概率低至少1,000倍;

(iv) 产生扩增子链的多部分引物具有桥DNA序列和足DNA序列,这些桥DNA序列和足DNA序列与该扩增子链的互补链完全互补;和

(v) 每种多部分引物的桥DNA序列的长度和序列,连同其预期的靶DNA序列的间插DNA序列的长度,产生了对一种仅含有十个拷贝的其预期的靶DNA序列的样本观察到的阈值 $C_T$ ,该 $C_T$ 将在指数扩增的60个循环中出现并且与从不含有拷贝的样本中观察到的 $C_T$ 是可区分的;和

(b) 重复地循环该反应混合物以扩增在该样本中存在的这些密切相关的罕见突变体靶DNA序列,并通过经由实时或端点检测测量来自每种可区分地标记的探针的荧光强度来检测那些DNA序列的存在。

16. 根据权利要求15所述的用途,其中循环是聚合酶链反应(PCR)方法中的温度循环。

17. 根据权利要求15或权利要求16所述的用途,其中对于至少一种预期的罕见靶序列,该多部分引物包含不与任何靶序列互补的、对于要单独识别的每种靶序列或靶序列组是独特的5'标签序列,并且在由该反向引物引发的扩增子链中的该5'标签序列的互补物是该探针的靶。

18. 根据权利要求15或权利要求16所述的用途,其中对于至少一种预期的罕见靶序列,该探针的靶是由该反向引物引发的扩增子链中的桥序列的互补物。

19. 根据权利要求15-18中任一项所述的用途,其中该足DNA序列与该密切相关的野生型DNA序列存在一个或更多个核苷酸不匹配,并且其中该一个或更多个核苷酸的至少一个是3'-末端核苷酸。

20. 根据权利要求15-19中任一项所述的用途,其中该足序列的长度为8-10个核苷酸。

21. 根据权利要求15-20中任一项所述的用途,其中该桥序列与该间插序列的长度不相同并且该泡状物是不对称的。

22. 根据权利要求16所述的用途,其中一种靶DNA序列的 $C_T$ 值表示与任何其他靶DNA序列相同数量的起始模板。

23. 根据权利要求15所述的用途,其中所述多重测定方法包括扩增和检测与该至少两种密切相关的突变体靶DNA序列不密切相关的参考野生型DNA序列,其中该引物依赖性扩增反应混合物包括针对该参考DNA序列的限制性多部分引物、过量反向引物和均相荧光检测探针,其中针对该参考DNA序列的多部分引物具有权利要求15中描述的结构和功能限制,并且其中针对该参考DNA序列的多部分引物的桥DNA序列的长度和核苷酸序列与针对这些突变体靶DNA序列的多部分引物的那些相协调,使得针对每种突变体靶DNA序列获得的 $C_T$ 值和针对该参考野生型DNA序列获得的 $C_T$ 值之间的差异反映了相对于该参考野生型DNA序列的丰度的该突变体靶DNA序列的丰度,而不管该样本中存在的DNA量如何。

24. 根据权利要求15-23中任一项所述的用途,其中使该反应混合物循环通过仪器进行,其中靶DNA序列的数量超过仪器可以分别检测的颜色数量,并且其中多种不同的探针是具有相同的荧光团但具有不同的解链温度的热特异性杂交探针。

25. 根据权利要求15-24中任一项所述的用途,其中扩增和检测是数字PCR方法,并且其中这些探针是颜色编码的分子导标探针。

26. 根据权利要求15-24中任一项所述的用途,其中扩增和检测在荧光分光光度热循环仪中进行,并且其中这些探针是颜色编码的分子导标探针。

27. 根据权利要求15-26中任一项所述的用途,其中所述多重测定方法能够扩增和检测该至少两种密切相关的罕见突变体靶DNA序列中的任何一种的少于十个拷贝,其中由这些多部分引物的锚定DNA序列和这些突变体靶DNA序列形成的这些杂交体具有比由该反向引物和这些突变体靶DNA序列形成的杂交体的解链温度( $T_m$ )低的 $T_m$ ,其中在步骤(b)之前,使用该反向引物的线性扩增的多个循环使用引物退火温度进行,在该引物退火温度该反向引物杂交但这些多部分引物杂交可能性非常低,并且其中步骤(b)使用较低引物退火温度进行,在该较低引物退火温度这些多部分引物和该反向引物杂交。

## 能够检测密切相关的等位基因的多重核酸测定方法及其试剂

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2016年4月7日提交的美国临时申请号62/319,332的优先权。该申请的内容通过引用整体并入本文。

### 技术领域

[0003] 本发明涉及核酸扩增和检测测定,例如PCR扩增和检测方法,并且涉及用于此类方法的引物、反应混合物和试剂盒。

[0004] 发明背景

[0005] 长期寻找的医学目标是能够在极早期检测极其罕见的突变,该突变在临床样本中的存在可用于诊断癌症,确定预后并指示有效治疗的选择。相关体细胞突变的检测和定量评估有多种用途,这些用途包括:(i)在遗传更可能发生癌症的基因的患者中,在可治疗阶段检测癌症;(ii)检测良性癌细胞中的突变,这些突变表明它们现在可能转移;(iii)在治疗期间测量癌细胞的丰度;和(iv)确定在治疗期间是否出现耐药性癌细胞,使得可以调整治疗。进一步的目标是开发能够进行多重测定的方法,这些多重测定可以同时测量不同罕见突变的丰度。如果可以获得此类测定,癌症可能会从常常致命的疾病转变为可以通过频繁的测试结合个性化的治疗调整来控制的慢性病。

[0006] 带动这些努力的是认识到无论癌细胞位于体内的哪个位置,它们都会经常分裂,经历细胞凋亡和坏死,因此来自那些癌细胞的基因组DNA片段存在于每个患者的血浆中。这一认识开辟了如下的可能性:通过使用从血浆中分离的DNA进行“液体活组织检查”,可以在非常早的阶段检测和定量指示癌症诊断、预后和治疗的罕见突变的存在。测定设计者面临的挑战是找到一种选择性检测和定量血浆DNA中这些罕见突变体序列片段的方法,尽管存在来自全身正常细胞的丰富相关野生型序列片段,并且尽管事实上虽然起源于不同的细胞,但不同相关突变通常发生在相同或相邻的密码子中。虽然复杂且昂贵,但用于检测血浆DNA中罕见突变体序列片段的“下一代”测序的成功已经说明了该方法的值(参见,例如,Murtaza等人(2013)Nature[自然]497:108-112)。

[0007] 基于核酸靶序列的指数扩增的分子诊断测定,例如聚合酶链反应,是廉价的并且足够灵敏以从少至单个模板分子产生信号。常规地,通过使引物足够长使得在扩增反应条件下,主要在引物-退火步骤期间,引物仅到达核酸链中的一个位置来获得特异性。为区分两种或更多种靶序列,通常使用等位基因-特异性杂交探针,例如分子导标探针。如果被研究的序列是等位基因,例如与另一等位基因(例如野生型(WT)变体)以混合物存在的单核苷酸多态性(SNP),通过使用探针进行区分则具有约3%的实际检出限(等位基因选择性为在10,000个分子的替代等位基因的存在下不低于约300个靶等位基因分子),这是由于常见等位基因的扩增倾向于压倒罕见等位基因的扩增。

[0008] 研究人员已转向修饰扩增引物以改进扩增测定的选择性。具有高度等位基因选择性的引物使得突变体DNA序列的指数扩增成为可能,同时抑制存在的远更丰富的野生型序列的扩增,即使它们之间的差异是SNP。仅仅缩短常规扩增引物将改进其等位基因-选择性,

但由于这种改进是以特异性为代价的,因此它对分析等位基因混合物的价值有限。已经开发了引物的其他修饰以改进它们的选择性同时保持特异性。一种此类的方法是ARMS(“扩增阻滞突变系统”)。ARMS引物具有与所研究的序列变体互补但是与另一种或更多种等位基因不匹配的3'末端核苷酸。参见Newton等人(1989) *Nucleic Acids Res.* [核酸研究] 17:2503-2516;和Ferrie等人(1992) *Am. J. Hum. Genet.* [美国人类遗传学杂志] 51:251-262。ARMS依赖于某些DNA聚合酶的阻滞性质,即不延伸具有这种不匹配的引物-靶杂交体的趋势。ARMS已被证明可用于确定接合性(纯合WT、杂合或纯合突变体(MUT)),但它对于其他用途具有约1%(在10,000个分子的替代等位基因的存在下不低于约100个靶等位基因分子)的实际检出限。

[0009] 其他方法试图增加针对突变体序列的引物将与突变体序列杂交并导致其扩增、但不太可能与相应的野生型序列杂交从而抑制其扩增的可能性。若干种引物设计的共同之处在于它们具有与突变体靶完全互补的引发序列,但含有与相应的野生型序列不匹配的内部询问核苷酸。在此类设计中有双引发寡核苷酸(DPO)引物、MyT引物、发夹引物和PASS引物。选择它们的引发序列的长度,使得在退火条件下,可能形成完全互补的突变体杂交体,并且因此可能导致扩增子的产生,而不匹配的野生型杂交体不太可能形成,并且因此,不太可能导致产生扩增子。涉及PCR钳夹或使用发夹寡核苷酸阻断剂的替代方法使用包含与突变体序列结合的常规DNA引物以及设计用于选择性结合野生型序列的“抗引物”二者的混合物,从而防止引发野生型扩增子合成。然而,所有这些方法虽然通常适用于突变体序列的检测,但对检测极其罕见的突变体不够灵敏,由于它们的序列中存在非天然核苷酸而与实时PCR不相容,或者尚未示出当在同一密码子中发生不同的靶突变时,能够在多重实时PCR测定中进行定量测定。

[0010] 我们开发了多部分引物,我们将其称为“SuperSelective”引物,其结构和在PCR测定中的用途描述于2014年8月14日作为WO 2014/124290A1公开的共同未决的专利申请PCT/US 2014/015351中。我们描述了实时单重PCR测定,其中SuperSelective引物既是“特异性”的(进入基因组中的正确位置),又是高度“选择性”的(排斥野生型或类似于靶序列的其他丰富序列)。我们描述了使用质粒DNA和SuperSelective引物的实时单重PCR测定,该测定在含有1,000,000个野生型等位基因的混合物中成功地检测到少至10种突变体等位基因,并且我们描述了使用人类DNA和SuperSelective引物的实时单重PCR测定,该测定在含有10,000个野生型等位基因的样本中成功检测到10种突变体等位基因,尽管 $C_T$ 值对突变体拷贝(模板)起始数的对数的图不同于100个拷贝以下的线性。然而,针对密切相关的罕见突变体靶序列,我们没有证明多重测定或描述多重测定,其中SuperSelective引物设计和方法能够检测少至十种突变体靶序列。

[0011] 发明概述

[0012] 本发明包括多重测定方法,其能够在10,000个拷贝的相关野生型靶序列的存在下在含有基因组DNA片段的样本中检测至少两种不同的密切相关的、预期的罕见突变体DNA靶序列中的每一种的少至十个拷贝,其中这些突变体靶序列与彼此以及它们的相关野生型序列相差少至单核苷酸多态性。如果突变不能经受使用单独的引物对进行PCR扩增,并且它们的扩增产物(扩增子)能够交叉杂交并形成异源双链,则突变是“密切相关的”。密切相关的突变包括以下这样的突变,虽然它们可能很好地存在于不同的细胞中,但它们位于相同的



密码子或相邻密码子中,或者它们可以被多达几个密码子分开。密切相关的突变可以与彼此以及与它们的相关野生型序列相差少至单个核苷酸。野生型序列和突变体序列之间的单核苷酸差异通常被称为单核苷酸多态性(SNP)。

[0013] 本发明的第一方面是一种多重测定方法,其能够在10,000个拷贝的相关的野生型DNA靶序列的存在下在样本中扩增和检测至少两种不同的密切相关的、预期的罕见突变体DNA靶序列中的每一种的少至十个拷贝,其中这些突变体DNA靶序列与彼此以及该野生型DNA靶序列相差少至单核苷酸多态性,该多重测定方法包括:

[0014] (a) 制备非对称引物依赖性扩增反应混合物,该混合物包括该样本;DNA聚合酶;脱氧核糖核苷三磷酸;扩增所需的其他试剂;可区分标记的均相荧光检测探针,该均相荧光检测探针对每种罕见突变体DNA靶序列的扩增产物是特异的;过量浓度的针对这些密切相关的突变体靶序列的反向引物;以及限制浓度的针对该每种预期的罕见突变体靶序列的独特的多部分引物,其中每种多部分引物的序列在5'至3'方向上包含通过延伸该反向引物复制的以下四种连续DNA序列:

[0015] 与任何靶DNA序列不互补的标签DNA序列,在由该反向引物引发的扩增子链中的该标签DNA序列的互补物是该探针的靶,并且该标签DNA序列对于要单独识别的每种靶序列或靶序列组是独特的;

[0016] 锚定DNA序列,该锚定DNA序列足够长使得其能够在引物退火过程中与这些密切相关的突变体DNA靶序列和该相关的野生型DNA靶序列杂交;

[0017] 独特的桥DNA序列,该独特的桥DNA序列至少六个核苷酸长,其在引物退火期间不与该独特的多部分引物预期的DNA靶序列杂交,不与任何其他密切相关的突变体靶DNA序列杂交,或在引物退火过程中不与该相关的野生型DNA靶序列杂交;和

[0018] 独特的足DNA序列,该独特的足DNA序列7至14个核苷酸长并且与该预期的DNA靶序列完全互补,但与突变体DNA靶序列和该相关的野生型DNA序列彼此存在一个或多个核苷酸不匹配,该一个或多个核苷酸中的至少一个是3'末端核苷酸或3'倒数第二核苷酸,其中:

[0019] (i) 如果该多部分引物的锚DNA定序列和足DNA序列都与其预期的DNA靶序列杂交,从而产生引物-靶杂交体,则该引物-靶杂交体在该多部分引物的5'至3'方向上包含:锚-靶杂交体、泡状物、和足-靶杂交体,所述泡状物具有18至40个核苷酸的周长并且由该靶DNA序列中的间插DNA序列形成,该间插DNA序列至少八个核苷酸长并且在引物退火期间不与该桥DNA序列杂交,

[0020] (ii) 该泡状物将足-靶杂交体与锚-靶杂交体分离,并且该分离的足-靶杂交体是弱杂交体,该弱杂交体使得复制预期的靶DNA序列的可能性不大,如阈值( $C_T$ )与使用常规引物发生的 $C_T$ 相比延迟至少五个循环所证明的,该常规引物15-40个核苷酸长并且在引物退火条件下形成杂交体;

[0021] (iii) 在PCR扩增期间,针对其预期的靶DNA序列的多部分引物将引发任何密切相关的突变体靶DNA序列或该相关的野生型靶DNA序列的复制的概率比引发其预期的靶序列的复制的概率低至少1,000倍,如由至少十个热循环的阈值差异( $\Delta C_T$ )所证明的;

[0022] (iv) 产生扩增子链的多部分引物具有桥DNA序列和足DNA序列,这些桥DNA序列和足DNA序列与该扩增子链的互补链完全互补;和

[0023] (v) 每种多部分引物的桥DNA序列的长度和序列,连同其预期的靶DNA序列的间插DNA序列的长度,产生了对一种仅含有十个拷贝的其预期的靶DNA序列的样本观察到的阈值( $C_T$ ),该 $C_T$ 将在指数扩增的60个循环中出现并且与从不含有拷贝的样本中观察到的 $C_T$ 是可区分的;和

[0024] (b) 重复地循环该反应混合物以扩增在该样本中存在的这些密切相关的罕见突变体靶DNA序列,并通过经由实时或端点检测测量来自每种可区分地标记的探针的荧光强度来检测那些DNA序列的存在。

[0025] 在该多重测定方法的一个实施例中,循环是聚合酶链反应(PCR)方法中的温度循环。

[0026] 在该多重测定方法的一个实施例中,该扩增反应混合物不含等位基因选择性增强试剂,并且每种多部分引物的足DNA序列长7-9个核苷酸。

[0027] 在该多重测定方法的一个实施例中,该扩增反应混合物含有四甲基氯化铵(TMAC)或另一种等位基因选择性增强试剂,并且每种多部分引物的足DNA序列长8-10个核苷酸。

[0028] 在该多重测定方法的一个实施例中,该足DNA序列与该密切相关的野生型DNA序列存在一个或更多个核苷酸不匹配,并且其中该一个或更多个核苷酸的至少一个是3'-末端核苷酸。

[0029] 在该多重测定方法的一个实施例中,一种靶DNA序列的 $C_T$ 值表示与任何其他靶DNA序列相同数量的起始模板。

[0030] 在该多重测定方法的一个实施例中,该多重测定方法包括扩增和检测与该至少两种密切相关的突变体靶DNA序列不密切相关的参考野生型DNA序列,其中该引物依赖性扩增反应混合物包括针对该参考DNA序列的限制性多部分引物、过量反向引物和均相荧光检测探针,其中针对该参考DNA序列的多部分引物具有以上所述第一方面中描述的结构和功能限制,并且其中针对该参考DNA序列的多部分引物的桥DNA序列的长度和核苷酸序列与针对这些突变体靶DNA序列的多部分引物的那些相协调,使得针对每种突变体靶DNA序列获得的 $C_T$ 值和针对该参考野生型DNA序列获得的 $C_T$ 值之间的差异反映了相对于该参考野生型DNA序列的丰度的该突变体靶DNA序列的丰度,而不管该样本中存在的DNA量如何。

[0031] 在该多重测定方法的一个实施例中,使该反应混合物循环通过仪器进行,其中靶DNA序列的数量超过仪器可以分别检测的颜色数量,并且其中多种不同的探针是具有相同的荧光团但具有不同的解链温度的热特异性杂交探针。

[0032] 在该多重测定方法的一个实施例中,扩增和检测是数字PCR方法,并且其中这些探针是颜色编码的分子导标探针。

[0033] 在该多重测定方法的一个实施例中,扩增和检测在荧光分光光度热循环仪中进行,并且其中这些探针是颜色编码的分子导标探针。

[0034] 在一个实施例中,该多重测定方法能够扩增和检测该至少两种密切相关的罕见突变体靶DNA序列中的任何一种的少于十个拷贝,其中由这些多部分引物的锚定DNA序列和这些突变体靶DNA序列形成的这些杂交体具有比由该反向引物和这些突变体靶DNA序列形成的杂交体的解链温度( $T_m$ )低的 $T_m$ ,其中在步骤(b)之前,使用该反向引物的线性扩增的多个循环使用引物退火温度进行,在该引物退火温度该反向引物杂交但这些多部分引物杂交可能性非常低,并且其中步骤(b)使用较低引物退火温度进行,在该较低引物退火温度这些多

部分引物和该反向引物杂交。

[0035] 根据本发明的测定方法包括通过非对称引物依赖性扩增方法(例如聚合酶链反应(PCR)方法)选择性扩增每种密切相关的突变体序列(如果存在于样本中),并通过使用至少一种荧光标记的探针的荧光检测从每种突变体靶序列分别检测扩增产物(扩增子)。根据本发明的方法可以是定性的或定量的。在一些定量方法中,实时PCR阈值(或阈值循环, $C_T$ )反映样本中存在的突变体靶序列的量。某些实施例还包括扩增参考野生型基因序列,该参考野生型基因序列可以是与待检测的突变体序列相关的野生型序列或存在于样本中但与那些突变体序列不相关的参考野生型序列。

[0036] 根据本发明的测定方法使用具有5'标签序列的SuperSelective引物,这些5'标签序列用作通过荧光标记的杂交探针进行检测的靶。通过在不同的SuperSelective引物中包括独特的5'标签序列(每种不同于特定测定中的所有其他5'标签序列),并且包括靶向每种不同5'标签序列的互补物的可区分标记的探针,检测探针杂交标识哪种标签序列并且因此哪种SuperSelective引物被扩增。优选的杂交探针是均相检测探针,这些均相检测探针的杂交是可检测的,不需要洗去未结合的探针。优选的荧光标记物是荧光团。我们最优选的均相检测探针是用至少一种荧光团标记并且还用非荧光猝灭剂标记的分子导标探针。

[0037] 根据本发明的测定方法是多重测定,这些多重测定能够在大量野生型序列的存在下在含有基因组DNA片段的样本中检测所选野生型序列的至少两种密切相关的突变的存在。不同实施例具有不同的目的和特征。

[0038] 某些实施例的目的是检测可能存在于样本中的若干种密切相关的突变中的任何一种或更多种。用于此类测定的反应混合物包括针对每种突变体靶序列的不同SuperSelective引物,和任选地出于定量目的的不相关的野生型基因序列,其中每种SuperSelective引物具有不同的5'标签序列,该5'标签序列的互补物是可区分的荧光探针的靶。许多此类实施例包括使用针对每种靶序列的不同的均相检测探针(在测定中与其靶的杂交是可检测的探针),优选地不同分子导标探针的均相检测。我们优选每种不同的分子导标探针针对不同5'标签序列的互补物是特异的,并且用荧光团标记,该荧光团与反应中的其他荧光探针是可区分的。此类方法通常在荧光分光光度热循环仪中进行,该荧光分光光度热循环仪将可区分的颜色(通常使用的热循环仪是5色仪器)的数量限制为最多八个或有时十个。其他实施例的目的是检测任何一个或更多个突变组,其中组中一个或更多个突变的存在在技术上是重要的,例如,关于癌症患者的治疗是重要的。此类方法通常在荧光分光光度热循环仪中进行,该荧光分光光度热循环仪将可区分的颜色(通常使用的热循环仪是5色仪器)的数量限制为最多十个。用于此类测定的反应混合物包括针对每种突变体靶序列的不同SuperSelective引物,和任选地出于定量目的的不相关的野生型基因序列,其中组中的每种SuperSelective引物具有相同的5'标签序列,并且每组具有不同的5'标签序列;并且反应混合物包括可区分地不同的荧光团标记的杂交探针,该探针靶向每种不同的5'标签序列的互补物,优选地是均相检测探针,该均相检测探针的杂交是可检测的而不用洗去未结合的探针,最优选地是分子导标探针。

[0039] 又其他实施例是多重测定,这些多重测定具有从超过荧光分光光度热循环仪的颜色数量的数量中检测任何一种或更多种突变体靶序列或靶序列组的能力。这些实施例中的某些使用我们称为“热特异性”杂交探针的探针,优选地分子导标探针,这些探针的探针-靶

杂交体具有不同的解链温度( $T_m$ )。例如,如果要在五色荧光分光光度热循环仪上测试液体活组织检查样本中是否存在35种不同靶序列中的一种或更多种,则可以将35种不同的SuperSelective引物(每种对不同的靶序列特异)分为五组,每组七种。五组中的每一组中的所有七种都具有5'标签,这些5'标签的互补序列是七种不同的热特异性杂交探针例如分子导标探针的靶,所有这些探针都用相同的荧光团标记,但是所有这些探针都产生具有可区分 $T_m$ 的探针-靶杂交体。因此,如果存在,35种不同靶序列中的每一种可以通过在扩增后(端点)热分析中确定的荧光颜色和 $T_m$ 的组合来识别。

[0040] 又其他的实施例是筛选测定,其为一种类型的多重测定,该多重测定的目的是确定来自许多不同突变体靶序列的列表中的哪种突变体靶序列存在于样本中,或确定那些突变体靶序列中没有一种存在于该样本中。在这些测定中,存在的无论哪个突变体靶序列均以指数方式扩增,优选地在聚合酶链反应中以指数方式扩增,并且用荧光标记的杂交探针检测所得扩增子(这些扩增子仅在样本中存在突变体靶序列时产生)。在此类的实施例中,对于每种可能的突变体靶序列,存在具有不同5'标签序列的SuperSelective引物。通常,列表上的突变体靶序列的数量超过了检测仪器可以区分的不同荧光颜色的数量,并且当发生这种情况时,在测定中存在不同的颜色编码的分子导标探针用于检测每种不同的5'标签序列互补物,这些5'-标签序列互补物可以掺入到所得的扩增子中(对于颜色编码的分子导标的描述,参见国际专利公开WO 2004/099434 A3)。在这些筛选测定中使用SuperSelective引物使得能够检测罕见突变体靶序列而不受来自丰富的相关野生型序列的干扰。

[0041] 又其他实施例是数字PCR测定方法,这些方法包括在热循环仪中的许多不同反应孔中进行的测定,和在热循环仪中以许多不同液滴进行的液滴数字PCR(ddPCR)测定;并且在两种情况下,所得扩增子的检测通常在单独的检测仪器,例如Bio-Rad QX200™液滴数字PCR系统或Stilla Technologies(斯蒂勒技术公司)Naica™系统中进行。此类方法针对多种(例如15或35种)靶序列中的每一种使用具有与反应中的所有其他5'标签序列不同的5'标签序列的SuperSelective引物。对于每种不同的靶序列,存在颜色编码的分子导标探针,该分子导标探针靶向其5'标签序列的互补物。因为数字PCR包括将反应混合物细分到如此多的孔或液滴中,使得每个孔或液滴很可能仅含有一种靶分子或根本不含靶分子,所以此类方法是定量的。

[0042] 数字PCR测定的基本原理(此处通过ddPCR的描述说明)是可以将样本稀释至液滴中仅存在一种靶DNA分子(或液滴中不存在靶分子)的程度,并且存在大量的液滴。然后,在每个液滴中进行同时PCR扩增,并且存在于每个液滴中的荧光标记的探针与在该液滴中产生的扩增子(如果该液滴含有靶分子)结合,并且在特定颜色编码中变为明亮的荧光,这表明液滴包含靶分子,并识别了该靶分子是哪种靶序列。在相同颜色编码中点亮的液滴数量提供了对原始样本中相应靶分子的数量的准确测量;并且这种方法非常灵敏,甚至可以检测样本中的单个靶分子。

[0043] 经典的液滴数字PCR已被用于检测和定量与癌症诊断、预后和治疗相关的罕见体细胞突变。参见Sanmamed等人(2015) Clin. Chem. [临床化学] 61:297-304。为了将罕见突变体靶分子与远更丰富的相关野生型分子分离,需要超过一百万个液滴。参见,例如Hindson等人(2011) Anal. Chem. [分析化学] 83:8604-8610。这种大量的液滴是必要的,因为样本中的野生型靶的数量远远超过罕见的相关突变体靶的数量(该罕见的相关突变体靶通常仅与

野生型靶相差单核苷酸多态性),并且因为探针(这些探针被设计用于结合包含突变的扩增子内的子序列)偶尔会与相关的野生型靶产生的扩增子中的相应序列结合,因此需要有这么多的液滴,使得包含突变体靶的液滴不太可能还将包含一种或更多种相关的野生型靶。这确保将不会有含有足够野生型靶的液滴,使得该液滴中产生的信号强度与该液滴中含有突变体靶序列时产生的信号强度相似,其后果是:该液滴被错误地认为含有相关的突变体靶。换句话说,如果将原始样本分成太少的液滴,则含有一些野生型靶序列且没有相关突变体靶序列的液滴将被误认为是含有突变体靶的液滴。

[0044] 然而,当进行使用SuperSelective引物的数字PCR实施例以检测样本中的罕见突变体靶分子时,需要少得多的液滴(例如,仅20,000至30,000个液滴),因为SuperSelective引物不会从也可能存在于液滴中的相对较少的相关野生型DNA分子产生可检测的扩增子。在此类数字PCR测定中,检测可以在热循环仪中、在流式细胞仪中或用显微镜进行。

[0045] 为了选择性地扩增密切相关的突变体序列,根据本发明的方法使用针对每种突变体靶序列的不同的多部分引物(我们称该多部分引物为“SuperSelective”引物),和共同反向引物(该共同反向引物优选地是常规PCR引物)。为了也扩增相关的野生型序列,根据本发明的方法使用针对该序列的SuperSelective引物和相同的共同反向引物。为了也扩增不相关的序列,例如不相关的突变体或野生型序列,根据本发明的方法使用针对该序列的SuperSelective引物和单独的反向引物。

[0046] SuperSelective引物是多部分寡脱氧核糖核苷酸,这些多部分寡脱氧核糖核苷酸在PCR扩增中的功能分为两部分。有效结合目的基因的功能被分配给相对长的序列区段(我们称之为“锚定序列”或“锚”),以及选择性结合在该基因内的含有待检测的突变的附近子序列并且然后起始扩增子的合成的功能被分配给单独的短3'序列区段(我们称之为“足序列(foot sequence)”或“足(foot)”)。与其功能一致,锚定序列被设计成在PCR循环的引物-退火步骤期间与引物的预期靶序列形成强杂交体。在这方面,它在功能和长度上类似于常规PCR引物。足序列是短序列区段,其与探针的预期靶序列完全互补,但与密切相关的靶序列(无论是密切相关的突变体靶序列还是相关野生型序列)存在一个或多个核苷酸不匹配。与密切相关的突变体靶序列或相关野生型序列不匹配的足中的每个核苷酸是“询问核苷酸”。在SuperSelective引物中,通过另外的、在许多实施例中相对长的序列区段(我们称之为“桥序列”或“桥”)将锚与足分离。选择桥以确保其不形成二级结构并且不与模板分子中连接锚的靶序列与足的靶序列的“间插序列”互补。因此,当引物与模板分子杂交时,引物中的桥序列和模板中的间插序列形成单链“泡状物”,该单链“泡状物”在功能上将锚杂交体的有效形成与足杂交体的形成分离开。以核苷酸计的泡状物周长是:桥序列的长度加上间插序列的长度加4。得到的引物是双功能的:在引物-退火条件下,长的5'锚定序列使引物能够有效且特异性地结合至靶DNA片段中存在的目的基因组区域,而短的3'足序列(该3'足序列具有一个或多个询问核苷酸),因为它通过桥序列与锚定序列连接,其能够与其预期的靶序列形成弱的、完全互补的杂交体。由于其长度短,足不太可能与密切相关的靶序列形成远远更弱的、不匹配的杂交体,无论该密切相关的靶序列是相关的野生型序列还是该序列的不同突变。

[0047] 在PCR测定中,当SuperSelective引物与被分析的原始样本中存在的DNA模板结合时,发生选择性步骤。一旦SuperSelective引物的足序列引发扩增子的合成,

SuperSelective引物的整个序列(包括“人工”桥序列)就被整合到该(+)扩增子中。在随后的指数扩增热循环中,所得的扩增子以正常方式有效扩增,其中整个SuperSelective引物序列,或至少桥和足序列,作为与(-)扩增子完全互补的长的常规引物。

[0048] 在我们的共同未决专利申请PCT/US 2014/015351(国际公开号W0 2014/124290 A1,公开日:2014年8月14日)中,我们一般性地披露了SuperSelective引物并且使用用SYBR<sup>®</sup>绿,一种dsDNA结合染料的检测例证了它们在单重对称PCR测定中的用途。如其中所描述的,SuperSelective引物是具有三个连续DNA序列(在5'至3'方向):锚定序列、桥序列和足序列,并满足某些结构和功能标准的多部分引物,该结构和功能标准如下:

[0049] • 锚定序列在引物退火期间与待检测的突变体靶序列杂交,并且还相应的野生型序列杂交,形成通常15-40个核苷酸长的杂交体。

[0050] • 足序列至少5个核苷酸长,优选地6-7个核苷酸长,并且与待检测的突变体靶序列完全互补但与相应的野生型序列和该野生型序列的另一个突变存在一个或两个核苷酸不匹配。

[0051] • 桥序列至少6个核苷酸长,并且在引物退火期间不与待检测的突变体靶序列或相应的野生型序列或该野生型序列的另一个突变杂交。

[0052] • 如果锚定序列和足序列与待检测的突变体靶序列杂交,则在靶序列中存在至少8个核苷酸长的间插序列,其在引物退火期间不与桥序列杂交,桥序列和间插序列一起产生杂交体中的泡状物,该泡状物具有16-52个核苷酸的周长。

[0053] • 泡状物的周长和足的长度导致弱的足/靶序列杂交体,这使得复制预期的靶序列的可能性不大,如与使用常规PCR引物相比,通常为从二到十个热循环的阈值循环( $C_T$ )的延迟所证明的。

[0054] • 在用 $10^6$ 个拷贝的突变体靶序列或 $10^6$ 个拷贝的相应野生型序列开始的PCR扩增期间,引物/野生型序列杂交体将被延伸的概率比引物/靶序列杂交体将被延伸的概率低至少1000倍,如通过至少10个循环、优选地至少12个循环的阈值循环差异( $\Delta C_T$ )所证明的。

[0055] 为了在例如下文实例6-10中所述的根据本发明的多重测定方法中使用(这些多重测定方法能够在10,000个拷贝的相关野生型靶序列的存在下在含有基因组DNA片段的样本中检测至少两种不同的密切相关的、预期的罕见突变体DNA靶序列中的每一种的少至十个拷贝),针对每种突变体靶序列的SuperSelective引物是多部分引物,该多部分引物在5'至3'方向上包含通过延伸反向引物被复制的四个连续DNA序列。如实例6-10中所使用的,那些序列是:

[0056] (1) 多部分引物序列的5'区段是在引物退火期间不与样本中的任何靶序列杂交的尾部。多重测定中的每种尾部都是独特的。通过延伸共同反向引物而形成的其互补物充当荧光团标记的探针的靶。我们将尾部称为“标签序列”或“标签”。标签足够长,以至于其互补物可以作为探针的靶。探针是均相检测探针,其杂交导致可检测的荧光信号。这种探针的类型是众所周知的。它们包括至少一种用荧光团标记的寡核苷酸。该探针可以是,例如,分子导标探针、TaqMan<sup>®</sup>探针、FRET探针(荧光团标记的供体寡核苷酸和荧光团标记的或淬灭剂标记的受体寡核苷酸)、阴阳探针、Resonsense探针或Eclipse探针。我们优选的检测探针是分子导标探针。

[0057] (2) 紧邻标签序列的是锚定序列,该锚定序列如上所述。锚定序列足够长,使得在PCR扩增期间,它在PCR循环的引物退火步骤期间杂交。锚定序列足够长,使得它在引物退火条件下形成强杂交体,在这方面与常规PCR引物相似。针对密切相关突变体靶序列的SuperSelective引物可以包括相同的锚定序列,或者它们的锚定序列可以略微不同。这同样适用于针对相关野生型序列的SuperSelective引物,如果该引物被包括的话。

[0058] (3) 紧邻锚定序列的是桥序列。桥序列是独特的序列,该独特的序列不与引物的突变体靶序列或任何密切相关的靶序列(密切相关的突变体靶序列或相关的野生型序列)杂交。在本发明的方法中使用的SuperSelective引物中,桥长至少为六个核苷酸。桥不超过18个核苷酸长,通常不超过15个核苷酸长,并且在某些优选实施例中为9-13个核苷酸长。当锚定序列与靶序列杂交时,桥序列与靶中的我们称为“间插序列”的序列相对,但不与其杂交,下文进一步描述。

[0059] (4) 紧邻桥序列并构成引物的3'末端的是足序列。在如实例6-10中所述的本发明方法中使用的SuperSelective引物中,足序列是独特的序列,其为6-10个核苷酸长,优选地7-9个核苷酸长并且与引物的预期突变体靶序列完全互补但是与密切相关的靶序列(突变体靶序列或相关野生型靶序列)彼此存在一个或多个核苷酸不匹配,我们将该一个或多个核苷酸称为“询问核苷酸”。至少一个询问核苷酸是足序列的3'末端核苷酸或与其相邻的核苷酸(3'倒数第二核苷酸)。在引物退火过程中,桥序列和足序列不会一起引发任何其他密切相关的罕见突变体靶序列、它们相应的野生型靶序列或混合物中的任何非靶序列。

[0060] 为了在例如下文实例11-15中所述的根据本发明的测定方法中使用(这些测定方法包括使用等位基因选择性增强试剂并且在10,000个拷贝的相关野生型靶序列存在下能够在含有基因组DNA片段的样本中检测至少两种不同的密切相关的、预期的罕见突变体DNA靶序列的每一种的少于十个拷贝),令人惊讶的是,SuperSelective引物序列有些不同。虽然5'标签序列和锚定序列保持如上所述,但是桥序列和足序列的长度具有更大的灵活性。短的足序列,例如7-8个核苷酸长,可以与例如18个核苷酸长的长的桥序列组合使用,并且因此具有更大的泡状物周长;并且相反地,较长的足序列,例如9-10个核苷酸长,可以与例如10个核苷酸长的短的桥序列组合使用,并因此具有更短的泡状物周长。我们已经发现,在这些情况的每一种中,等位基因选择性增强试剂四甲基氯化铵(TMAC)的最佳量是不同的。当使用TMAC时,足的长度应为7-14个核苷酸长,并且周长应为24-40个核苷酸长。

[0061] 根据本发明的方法包括制备非对称引物依赖性扩增混合物,例如聚合酶链反应(PCR)扩增混合物,该混合物包括含有或可含有至少两种密切相关的突变体DNA靶序列的样本;DNA聚合酶,脱氧核糖核苷三磷酸和扩增所需的其他试剂;针对待扩增和检测的每种密切相关的靶序列的以限制浓度的如上所述的独特的SuperSelective引物;以过量浓度的针对密切相关的靶序列的共同的常规反向引物;以及针对待扩增和检测的每种密切相关的靶序列的可区分标记的荧光检测探针,优选地均相荧光检测探针,最优选地分子导标探针,所述可区分标记的荧光检测探针对该靶序列的SuperSelective引物的标签的互补物是特异的。对于使用等位基因选择性增强试剂(例如TMAC)的实施例,扩增混合物还包括有效浓度,优选地优化浓度的该试剂。这种反应混合物的制备可包括在适当时逆转录RNA模板。根据本发明的方法包括使反应混合物经受多个热循环以通过聚合酶链反应(PCR)扩增来扩增预期的靶序列,并通过经由实时检测测量来自每种可区分地标记的探针的荧光强度来检测扩增



产物(扩增子)的存在。

[0062] 在具有实时检测的PCR扩增中,在多个热循环期间,例如在引物退火步骤期间,观察探针的荧光团的荧光强度。阈值循环( $C_T$ )是指数扩增的循环,在该循环中来自探针的荧光强度在背景荧光之上变得可检测。每种SuperSelective限制性引物的浓度足以在指数扩增期间使用SuperSelective引物和共同反向引物获得 $C_T$ 。共同反向引物浓度过量,使得每种SuperSelective引物用完后额外的PCR热循环产生单链扩增子,这些单链扩增子含有SuperSelective引物标签的互补物。在通过相同标记的探针(例如分子导标探针)的解链温度( $T_m$ )的差异另外地区分这些相同标记的探针(例如分子导标探针)的本发明的方法中,包括了扩增后解链分析。

[0063] 在本发明的方法中,当多部分引物的锚定序列和足序列与样本中引物的预期靶序列杂交时,泡状物将足序列杂交体与锚定序列杂交体分离,并且该分离的足序列杂交体是弱杂交体,该弱杂交体使得复制预期的靶序列的可能性不大,如阈值( $C_T$ )与使用常规引物发生的 $C_T$ 相比延迟至少五个循环所证明的。每种多部分引物的桥序列的长度和序列,连同样本中其预期的靶序列的间插序列的长度,产生了对一种含有少至十个拷贝的其预期的靶序列的样本观察到的在指数扩增的50个循环以内的阈值( $C_T$ ),并且该 $C_T$ 与对不含有其预期靶的拷贝的样本观察到的 $C_T$ 是可区分的。在足序列和另一种密切相关的靶序列(密切相关的突变体序列或相关的野生型序列)之间可能或确实形成的杂交体甚至更弱。在本发明的方法中,在PCR扩增期间,针对一种预期靶序列的SuperSelective引物将引发任何密切相关的突变体靶序列或相关野生型靶序列的复制的概率比引发其预期靶序列的复制的概率低至少1,000倍,如由至少10个热循环的阈值差异( $\Delta C_T$ )所证明的。

[0064] 在本发明前述方法的某些优选实施例中,一种靶序列的 $C_T$ 值表示与任何其他靶序列相同数量的起始模板。

[0065] 本发明前述方法的某些实施例包括扩增和检测与至少两种密切相关的突变体靶序列相关的参考野生型序列。在此类实施例中,反应混合物,例如PCR测定混合物,包括针对相关参考靶序列的SuperSelective引物,其可以以限制浓度用于本发明的方法(如上所述)。参考序列的扩增使用与密切相关的突变体靶序列的扩增相同的反向引物。反应混合物还包括均相荧光检测探针(如上所述),该均相荧光检测探针的靶是针对野生型序列的SuperSelective引物的标签的互补物。

[0066] 本发明前述方法的某些优选的实施例包括扩增和检测与至少两种密切相关的突变体靶序列不相关的参考野生型序列。在此类实施例中,反应混合物包括针对不相关的参考序列的可以以限制浓度用于本发明的方法(如上所述)的SuperSelective引物和针对不相关的参考序列的可以以过量浓度的单独的常规反向引物。

[0067] 本发明还包括向上述方法的实施例的反应混合物中添加等位基因选择性增强试剂,例如TMAC。

[0068] 本发明前述方法的某些实施例能够扩增和检测少于十个拷贝的至少两种密切相关的罕见突变体靶序列。在一些实施例中,由多部分引物锚定序列和突变体靶序列形成的杂交体具有低于由共同反向引物和突变体靶序列形成的杂交体的解链温度( $T_m$ )的 $T_m$ 。PCR扩增之前是在引物退火温度仅使用反向引物的多个循环的线性扩增,在该温度共同反向引物杂交但多部分引物很少杂交。然后,使用较低引物退火温度进行随后的指数扩增循环,在



该温度多部分引物和共同反向引物杂交。

[0069] 本发明还包括试剂盒,其包括足以进行根据任何前述方法所述的扩增和检测的试剂。

[0070] 本发明还包括寡核苷酸的组,其包括进行根据任何前述方法所述的扩增和检测所需的引物和探针。

[0071] 附图简述

[0072] 图1是根据本发明的SuperSelective引物及其在PCR扩增过程中的复制和检测的示意图。

[0073] 图2是用于不同密切相关的等位基因靶序列的两种SuperSelective引物的示意图,示出了为什么仅复制用于给定靶序列的正确引物。

[0074] 图3是使用具有不同长度的足序列的SuperSelective引物的实例1中PCR测定的 $C_T$ 对靶序列的起始数的对数的图。

[0075] 图4是使用形成不同周长泡状物的SuperSelective引物的实例2中PCR测定的 $C_T$ 对靶序列的起始数的对数的图。

[0076] 图5是实例5中PCR测定的 $C_T$ 对靶序列的起始数的对数的图。

[0077] 图6示出了实例6中描述的多重测定的实时荧光结果(荧光强度对热循环数)。

[0078] 图7示出了双重PCR测定的实时荧光结果,其中分子导标探针靶向如实例7A中所描述的SuperSelective引物的桥序列的互补物。

[0079] 图8示出了双重PCR测定的实时荧光结果,其中分子导标探针靶向如实例7B中所描述的SuperSelective引物的5'标签序列的互补物。

[0080] 图9给出了在微调之前和之后,使用SuperSelective引物的实例8中PCR测定的 $C_T$ 对靶序列的起始数的对数的图。

[0081] 图10示出了实例9A中描述的多重PCR测定的实时荧光结果,其中还扩增和检测了不相关的野生型序列。

[0082] 图11示出了实例9B中描述的多重PCR测定的实时荧光结果,其中还扩增和检测了不相关的野生型序列。

[0083] 图12示出了实例10A中的PCR测定的实时荧光结果和 $C_T$ 对靶序列的起始数的对数的图,其中还扩增和检测了相关的野生型序列。

[0084] 图13示出了实例10B中的PCR测定的实时荧光结果和 $C_T$ 对靶序列的起始数的对数的图,其中还扩增和检测了相关野生型序列。

[0085] 图14示出了实例11A中描述的具有SuperSelective引物 and 不同浓度的TMAC的PCR测定的实时荧光结果,所述SuperSelective引物具有6:1:1足。

[0086] 图15示出了实例11B中描述的具有SuperSelective引物 and 不同浓度的TMAC的PCR测定的实时荧光结果,所述SuperSelective引物具有8:1:1足。

[0087] 图16示出了实例12中描述的具有SuperSelective引物、具有和不具有TMAC的PCR测定的实时荧光结果,所述SuperSelective引物具有8:1:1足。

[0088] 图17是实例13中描述的PCR测定的 $C_T$ 对靶序列的起始数的半对数图。

[0089] 图18是实例14中描述的PCR测定的 $\Delta C_T$ 对TMAC浓度的图,其中SuperSelective引物了产生不同大小的泡状物。

[0090] 图19是针对具有9:1:0足序列的SuperSelective引物的实例15中描述的PCR测定的 $C_T$ 对TMAC浓度的图。

[0091] 图20是针对具有8:1:1足序列的SuperSelective引物的实例15中描述的PCR测定的 $C_T$ 对TMAC浓度的图。

[0092] 图21是实例15中描述的PCR测定的 $\Delta C_T$ 对TMAC浓度的图,其中SuperSelective引物具有在不同位置的询问核苷酸。

### 具体实施方式

[0093] 根据本发明的测定是引物依赖性扩增和检测方法,例如像PCR扩增和检测方法。根据本发明的方法是多重测定,这些多重测定能够在含有基因组DNA片段的样本中检测在大量相关野生型序列的存在下所选野生型序列的至少两种密切相关的突变的存在。在此类方法中使用的反应混合物包括用于每种突变体靶序列的SuperSelective引物。

[0094] 可用于本发明方法的引物依赖性扩增反应可以是任何合适的指数扩增方法,该指数扩增方法包括聚合酶链反应(PCR)、连接酶链反应(LCR)、切口酶扩增反应(NEAR)、链-置换扩增(SDA)、基于核酸序列的扩增(NASBA)、转录介导的扩增(TMA)和滚环扩增(RCA)。优选的方法使用PCR。在非对称PCR扩增方法中,例如不对称PCR,一种引物(限制性引物)以限量存在,以便在扩增完成之前耗尽,之后使用剩余的引物(过量的引物)进行线性扩增。可用于本发明的非对称PCR方法是LATE-PCR(参见例如,欧洲专利EP 1,468,114;和Pierce等人(2005)Proc.Natl.Acad.Sci.USA[美国国家科学院院刊]102:8609-8614)。在根据本发明的非对称扩增方法中,多部分引物是限制性引物。优选的方法还包括数字PCR(参见,例如,Vogelstein和Kinzler(1999)Proc.Natl.Acad.Sci.USA[美国国家科学院院刊]98:9236-9241),其中需要检测来自存在于含有相关野生型分子的反应中的单个突变体模板分子的扩增子。

[0095] 如果扩增反应使用RNA依赖性DNA聚合酶(例如NASBA),则扩增反应是等温的。我们将扩增产物的重复轮次的合成称为“循环”,但它们不是热循环。对于此类扩增,由根据本发明的多部分引物引发的“预期靶序列”和“非预期靶序列”是在原始样本和扩增反应混合物中发生的RNA序列,其中它们与DNA聚合酶和多部分引物一起存在。

[0096] 如果扩增反应使用DNA依赖性DNA聚合酶(一个实例是PCR),则原始样本可含有DNA或RNA靶。对于此类的扩增,由可用于本发明方法的多部分引物引发的“预期的靶序列”和“非预期的靶序列”是在原始样本中存在或通过逆转录在原始样本中存在的RNA序列而制备的DNA序列。如果多部分引物用于逆转录,则“预期的靶序列”和“非预期的靶序列”是RNA以及cDNA。如果使用单独的外部引物进行逆转录,则“预期的靶序列”和“非预期的靶序列”是cDNA。在任一情况下,“预期的靶序列”和“非预期的靶序列”是与DNA聚合酶和多部分引物一起存在于扩增反应混合物中的核酸序列。引物依赖性扩增反应包括引物退火、引物延伸和链变性(链解链)的重复热循环。引物退火可以在低于引物延伸温度的温度进行(例如,三温PCR),或者引物退火和引物延伸可以在相同温度进行(例如,二温PCR)。反应的总体热分布可以包括特定循环的重复,或者温度/时间可以在一个或更多个循环期间变化。例如,一旦开始扩增并且延长多部分引物的引发序列,可以使用适合于较长引物的较高退火温度来完成扩增反应。

[0097] 尽管我们在下面列出的实例中描述了测定,其中存在两种或三种靶序列和两种或三种SuperSelective引物,但是本发明的多重测定方法可以包括更多的靶序列和更多的SuperSelective引物。对于包括比荧光分光光度热循环仪可以区分的颜色(有时最多十个,有时最多八个,但更典型地五个)更多的靶序列的高度多重测定,本发明的方法包括若干增加测定的能力的方法中的任一种。一种方法是使用数字PCR方法,例如,无论是基于液滴的乳液PCR或基于珠的乳液PCR,可以是高度多重的。虽然预期在特定的扩增反应中(例如,在液滴中)仅存在一种靶序列,但PCR混合物将包含针对每种可能的靶的SuperSelective引物和单独的检测探针,例如分子导标探针。对于许多分子导标探针(其中不同探针的数量超过不同颜色的荧光团的数量,这些荧光团的光谱可通过仪器区分(通常不超过7或8种)),可以使用增加可识别的探针数量的技术。例如,如在公开的国际专利申请WO 2002/099434和美国专利7,385,043和7,771,949中所披露的,每种探针可以通过以下用两种或更多种颜色编码:取一定量的探针,将其分成多个等分试样,用不同的荧光团标记每个等分试样,并重新合并等分试样,从而给探针提供独特的多色编码。我们将此过程称为“颜色编码”,并将所得探针称为“颜色编码的”分子导标探针。例如,从一组六种可区分的荧光团开始,将每种探针的量分成两个等分试样,并用不同颜色标记两个等分试样,十五种不同的探针可以进行独特地颜色编码(如果人们添加六种探针,该六种探针的两个等分试样用相同的荧光团标记,独特颜色的探针的数量增加到21)。流式细胞术检测方法非常适合于在数字PCR液滴中检测。

[0098] 另一种技术是使用“热特异性”杂交探针,优选地是分子导标探针,其中若干种不同的探针具有相同的荧光团但可通过它们的 $T_m$ 区分。通过进行可在荧光分光光度热循环仪中进行的扩增后解链,可以通过 $T_m$ 将给定颜色的探针彼此区分,以便能够识别哪种探针发荧光。

[0099] 筛选测定是多重测定,其中预期样本中仅存在许多可能的靶序列中的一种。对于使用荧光分光光度热循环仪的扩增和检测,根据本发明的筛选测定使用不同的SuperSelective引物,该SuperSelective引物具有针对许多(例如15或35)种可能靶中的每一种的独特的5'标签序列,并且对于每种不同的5'标签序列,它们使用独特地颜色编码的分子导标探针,如上所述。

[0100] 图1示意性地描述了可用于本发明方法的SuperSelective引物。在上图中,示出SuperSelective引物103与其预期的靶序列101杂交。在5'到3'方向,引物103是多部分引物,该多部分引物包括四个连续的DNA序列:5'标签107、锚定序列104、桥序列105和足序列106。标签序列107不与靶序列101互补。当引物103与靶序列101杂交时,标签序列107与靶序列108相对,但不与其杂交。相反地,标签107作为单链尾部(“5'尾部”)存在。锚定序列104与在靶序列101中的序列109形成足够长的杂交体,所述杂交体通常长度为15-40个核苷酸,以在引物退火期间有效地将引物103与靶序列101结合,如通常由锚定序列104和其结合位点109之间的短垂直线(代表互补核苷酸的配对)指示的。锚定序列104可以与靶序列101完全互补。然而,只要其功能得以维持,就不必完全互补。引物103的3'末端的足序列106与预期的靶序列101的序列111完全互补。如果不使用等位基因特异性增强试剂,则足序列6-10个核苷酸长,优选地7-9个核苷酸长,最优选地长7-8个核苷酸长。如果使用等位基因特异性增强试剂,则足序列106可以是7-14个核苷酸长,优选地在一些情况下8-10个核苷酸长。而锚

定序列104通过与所有靶序列、密切相关的突变体和相关的野生型中的目的序列结合而赋予引物103特异性,足序列106通过在有利于甚至仅相差单个核苷酸的序列的引物退火期间选择性地与其预期靶序列杂交而赋予选择性(等位基因选择性)。分离锚定序列104和足序列106的是不与靶序列101杂交的桥序列105。桥序列105是8-20个核苷酸长的独特的序列,不形成二级结构,并且不与靶序列101或任何密切相关的靶序列或相关的野生型序列互补。当锚定序列104和足序列106与链101杂交时,桥序列105与靶序列101中的未杂交序列110相对,我们将未杂交序列110称为“间插”序列。间插序列110为至少6个核苷酸长。桥序列105和间插序列110一起形成单链“泡状物”,该单链“泡状物”以核苷酸计的周长是桥序列的长度加上间插序列的长度加4。在根据本发明的方法中,泡状物的周长在18-30个核苷酸的范围内,或者如果使用等位基因选择性增强试剂,则在18-40个核苷酸的范围内。

[0101] 通过聚合酶链反应用多部分引物103和常规反向引物203进行的PCR扩增描述于图1的三个图中。上图示出了使用预期的突变体靶链101作为模板,通过DNA聚合酶对引物103的延伸,以产生延伸201。这产生了链202(中间图)。图1中的中间图描绘了在下一个扩增循环中发生的情况。常规反向引物203与扩增产物链202杂交,并且然后使用链202作为模板通过DNA聚合酶延伸以产生延伸204。引物203和延伸204构成扩增子链205(下图)。将观察到延伸204包括与引物103的所有四个连续序列(标签、锚、桥和足)完全互补的序列。扩增子链205中的序列206与标签序列107互补,并用作均相检测探针210的结合位点。因为标签序列107是独特的序列,其互补物,即序列206也是独特的序列。探针210是分子导标探针。它包含单链环211、茎杂交体212、荧光团213和猝灭剂214。环211与序列206互补。在PCR扩增的指数期期间的下一个扩增循环和随后的循环中,如图1的下图所示,扩增子链205通过另一拷贝的引物103的延伸(215)复制。可以观察到引物103的整体与链205完全互补;没有未杂交的桥序列105并且没有泡状物。探针210与引物区段107竞争与序列206杂交。对于探针210成功竞争的链205部分,环211与序列206杂交,并且探针变为荧光的。如图1所示,甚至对于探针210杂交的链205,锚定序列104、桥序列105和足序列106都与链205杂交,并且引物103用作非常有效的常规PCR引物。因为根据本发明的多重测定使用非对称PCR,其中SuperSelective引物是限制性引物并且共同反向引物是过量引物,当SuperSelective引物用完时,扩增从指数变为线性。再次参考图1,这导致产生扩增子链205,这些扩增子链205没有形成双链体的互补的扩增子链202。分子导标探针210或其他均相检测探针不必与扩增子链202竞争以结合这些链和信号。

[0102] 由桥序列105和间插序列110形成的泡状物可以是对称的,这意味着桥序列和间插序列的长度相同,或者泡状物可以是非对称的,这意味着桥序列和间插序列的长度彼此不同。在任一种情况下,桥序列足够长使得桥序列和足序列一起构成有效的PCR引物,如将在以下所解释的。因此,如果泡状物非常小而且是非对称的,我们经常选择比间插序列110长的桥序列105。

[0103] 如以上所解释的,根据本发明的多重反应混合物中的每种SuperSelective引物可以具有不同的、独特的标签序列;不同的、独特的桥序列;和不同的、独特的足序列。然而,用于密切相关突变的多重扩增反应中的多种SuperSelective引物的锚定序列可以是相同或非常相似的。这产生了这样的可能性:在引物退火期间,不正确的引物(用于不同密切相关的靶序列、突变体或野生型的引物)的锚定序列可以与预期的靶序列的产物链杂交。在根据

本发明的多重方法中,不会导致不正确的复制,如图2所示。图2的上面的图所示的是预期的靶序列101(图1)的引物103和分子导标探针210。如图2的中间图所示的是密切相关的靶序列(未示出)的SuperSelective引物303和分子导标探针310。引物303在5'至3'方向上包括标签序列307、锚定序列304、桥序列305和足序列306。引物103的足106示出在3'倒数第二位置具有询问核苷酸“r”。引物303的足306示出在3'倒数第二位置具有不同的询问核苷酸“s”。分子导标探针310的环311的靶是标签序列307的互补物。图2下部的示意图示出了扩增子链205(图1),引物103与该扩增子链205完全互补。然而,引物303的锚定序列304与引物103的锚定序列104相同或非常相似,因此它可以与通过引物103的延伸制备的链的互补物(图1中的链205)杂交。锚定序列304示出为与链205杂交。然而,它的其他序列都不与链205杂交。标签307、桥305和足306保持为单-链尾部。这允许正确引物103的桥序列105和足序列106与链205杂交。在用于在本发明方法中使用的SuperSelective引物中,桥序列105和足序列106一起构成链205的有效常规PCR引物,如下图所示。因此,即使SuperSelective引物都具有相同的锚定序列,也可以在扩增开始后实现SuperSelective引物103成为有效的PCR引物的功能。错误引物通过其锚定序列的结合的作用是最小的,并且有效的复制仍然可以发生。

[0104] 对SuperSelective引物的单重研究

[0105] 以下是我们对SuperSelective引物命名的解释。含有5'标签序列的引物通过四个引物区段的长度(以核苷酸计)和间插序列的长度描述,除了足由一个或更多个询问核苷酸5'的核苷酸的数量、询问核苷酸的数量(相对于例如相关的野生型序列)以及一个或更多个询问核苷酸3'的核苷酸数量来定义。例如,32-30-10/9-6:1:1描述了一种引物,该引物具有32个核苷酸长的标签、30个核苷酸长的锚、与9个核苷酸长的间插序列相对的10个核苷酸长的桥、以及含有单个询问核苷酸5'的6个核苷酸和该询问核苷酸3'的1个核苷酸的足。不包含标签的引物缺少第一描述符。例如,24-14/12-5:1:1描述了一种引物,该引物具有24个核苷酸长的锚、与12个核苷酸长的间插序列相对的14个核苷酸长的桥、以及含有单个询问核苷酸5'的5个核苷酸和该询问核苷酸3'的1个核苷酸的足。

[0106] 我们已经使用不含有等位基因选择性增强试剂、只含有单个SuperSelective引物和预期的突变体靶序列和相关野生型序列(只有单个核苷酸的差异)二者的单重对称PCR测定来研究了SuperSelective引物的不同的若干种结构特征对选择性( $\Delta C_T$ )的作用。目的是使用定量的SuperSelective引物进行测定,其中PCR阈值循环( $C_T$ )反映了预期靶序列的起始数。原始存在于样本中的突变体靶的数量的对数与针对该样本观察到的 $C_T$ 值之间的逆线性关系是定量指数扩增测定的标志,因此我们的研究还包括对线性的作用。来自该研究的实验在下面的实例1-5中给出。在那些实例中的荧光检测使用SYBR®绿染料,因为并不要求不同的扩增子的单独检测。

[0107] 实例1给出了使用限制性酶消化的质粒DNA的单重实验,以研究改变足序列长度所产生的作用。我们研究了缩短针对EGFR L858R突变体序列的SuperSelective引物的足的长度以克服足将与EGFR野生型靶序列中存在的富含G-C的序列形成杂交体的可能性的作用。我们进行了三组对称PCR测定,每组使用SuperSelective引物,该SuperSelective引物的足序列长度为6、7或8个核苷酸。在所有其他方面,引物的设计是相同的:(i) 询问核苷酸位于每个足的3'倒数第二位置上;(ii) 锚定序列为24个核苷酸长;并且(iii) 桥序列和间插序列

均为14个核苷酸长。每一组PCR测定用不同量的突变体模板( $10^6$ 、 $10^5$ 、 $10^4$ 、 $10^3$ 、 $10^2$ 和 $10^1$ 个拷贝)在 $10^6$ 个拷贝的野生型模板的存在下引发。在图3中,将得到的阈值绘制为最初存在的突变体模板数量的对数的函数。用具有最短足长(六个核苷酸,4:1:1)的引物获得的 $C_T$ 值全部落在直线31上,证明即使EGFR靶序列富含GC,也可以定量少至10个突变体模板,而不受存在的1,000,000个野生型模板的干扰。然而,当我们认为由于对丰富的野生型模板的扩增子合成的抑制不足,突变体靶是最罕见的时候,具有较长足长(七个核苷酸,5:1:1;或八个核苷酸,6:1:1)的引物导致偏离线性。这些结果证明,较短的足长尽管降低了足杂交体的平衡丰度,导致了在达到阈值循环之前的更长的延迟,但导致了选择性增强(即,“等位基因选择性”较低)。从热力学角度来看,在较短的足长改进的选择性是由于与不匹配的野生型足杂交体的平衡丰度相比,完全互补的突变体足杂交体的平衡丰度的比率较高。

[0108] 实例2给出了使用限制性酶消化的质粒DNA的单重实验,以研究改变泡状物周长(桥序列的长度加上间插序列的长度加上4)的作用。单链泡状物在功能上将锚杂交体与足杂交体分开(参见图1)。我们进行了三组对称PCR测定,这三组对称PCR测定与实例1中描述的实验相同,除了使用三种不同的SuperSelective引物,所述三种不同的SuperSelective引物的每一种在与其模板杂交时形成对称的泡状物。这三种引物中的每一种都具有相同的7-核苷酸长的足序列,其中询问核苷酸位于3'倒数第二位置上,并且每种引物中锚定序列的长度维持在24个核苷酸。然而,每种引物中的桥序列长度被选择为10、14或18个核苷酸,并每种引物中锚定序列的身份被选择以便在模板中产生与桥序列相同长度的间插序列。因此,当与模板完全杂交时,由这些引物中的每一个形成的泡状物(由桥序列、间插序列、锚杂交体末端的两个核苷酸和足杂交体末端的两个核苷酸组成)的周长的长度为24、32或40个核苷酸。每一组PCR测定用不同量的突变体模板( $10^6$ 、 $10^5$ 、 $10^4$ 、 $10^3$ 、 $10^2$ 和 $10^1$ 个拷贝)在 $10^6$ 个拷贝的野生型模板的存在下引发。在图4中,将得到的阈值绘制为最初存在的突变体模板数量的对数的函数。用形成最大泡状物(40个核苷酸)的引物获得的 $C_T$ 值全部落在直线41上,证明即使EGFR靶序列富含GC,也可以定量少至10个突变体模板,而不受存在的1,000,000个野生型模板的干扰。然而,当我们认为由于对丰富的野生型模板的扩增子合成的抑制不足,存在仅10个突变体靶时,具有较小泡状物(32个核苷酸和24个核苷酸)的引物导致偏离线性。尽管在达到阈值循环之前导致更长的延迟,使用形成最大泡状物的引物获得的数据的优异线性表明了降低突变体杂交体和野生型杂交体的平衡丰度(由于足相对于其靶的更大的熵自由度)增强了测定的选择性。

[0109] 实例3给出了使用限制性酶消化的质粒DNA的单重实验,以研究改变足序列内单个询问核苷酸的位置的作用,包括引物辨别突变体模板与野生型模板的能力。我们进行了一系列对称PCR测定,其中使用了六种不同的SuperSelective引物,每种引物在7个核苷酸长的足序列内的不同位置具有询问核苷酸。锚定序列、桥序列和间插序列的长度分别维持在24、14和14个核苷酸。足是6:1:0、5:1:1、4:1:2、3:1:3、2:1:4和1:1:5。用每种引物进行两个反应,一个用 $10^6$ 个拷贝的突变体模板引发,并且一个用 $10^6$ 个拷贝的野生型模板引发。观察到的阈值循环列于实例3的表4中。结果示出,当询问核苷酸的位置最接近引物的3'末端时,突变体的阈值循环( $C_T$ )与野生型的阈值循环( $C_T$ )之间的辨别窗口( $\Delta C_t$ )最宽。因为其询问核苷酸位于足的3'末端的引物( $\Delta C_t=18.8$ )与其询问核苷酸位于从足的3'末端倒数第二位置上的引物( $\Delta C_T=18.2$ )之间的 $\Delta C_t$ 只有很小的差异,我们得出结论,将询问核苷酸放

置在这两个位置的任一位置上都很有效。因为从足的3'末端倒数第二位置上的询问核苷酸在PCR退火条件下不与野生型序列中的相应的核苷酸形成碱基对,所以足的3'-末端核苷酸与野生型序列中的相应核苷酸形成碱基对的可能性非常低。

[0110] 实例4给出了使用限制性酶消化的质粒DNA的实验,以研究改变泡状物对称性的作用。我们研究了改变泡状物对称性对引物辨别突变体模板与野生型模板的能力的作用。我们进行了一系列对称PCR测定,其中使用了五种不同的SuperSelective引物中的一种。所有形成的泡状物具有相同的周长,但它们具有不同长度的桥序列。在这些引物中,不保持所有锚定序列相同,而是选择锚定序列的身份以便在模板中产生其长度与引物中桥序列的长度相结合,产生周长为32个核苷酸的泡状物的间插序列。针对每种引物进行两个反应,一个用 $10^6$ 个拷贝的突变体模板引发,并且一个用 $10^6$ 个拷贝的野生型模板引发。观察到的阈值循环列于实例4的表5中。结果表明,突变体靶序列的阈值循环与野生型序列的阈值循环之间的辨别窗口( $\Delta C_t$ )在五个引物之间有所不同,其中对称泡状物的 $\Delta C_t$ 为最高,但 $\Delta C_t$ 值之间没有很大差异。我们注意到,泡状物的周长(实例2)对 $\Delta C_t$ 具有稍微更大的作用,这反映了足序列遇到靶序列的平衡概率。

[0111] 实例5报道了用限制酶消化的人基因组DNA进行的实验。实例1-4中描述的测定用从质粒获得的DNA片段进行,所述质粒用限制性内切核酸酶消化,以便模拟血浆样本中存在的靶序列。然而,临床血浆样本含有来自整个人类基因组的DNA片段。虽然临床样本中DNA片段的数量在人与人之间并且在给定的人中随时间变化很大,但是在从10mL血液中获得样本中通常存在不超过与每个靶突变相关的10,000个野生型模板片段。为了模拟从血浆中分离的DNA片段引发的测定,我们在一组八个单重对称PCR测定中使用了EGFR L858R 24-14/14-5:1:1SuperSelective引物,这些单重对称PCR测定在从含有野生型EGFR基因的10,000个人类细胞中分离的经限制性酶消化的基因组DNA存在下,由含有不同量的从携带EGFR L858R突变的人细胞系H1975分离的经限制性酶消化的基因组DNA(DNA来自0;10;30;100;300;1,000;3,000;或10,000个H1975细胞)的样本引发。结果示于图5中。 $C_t$ 值作为每个反应中最初存在的突变体片段数的对数的函数的图的线性(线51)证实了当样本含有基因组DNA片段时使用SuperSelective引物的测定的特异性。此外,仅用野生型DNA引发的反应的高 $C_t$ 值(短划线52)证实了引物的选择性不受基因组DNA片段存在的影响。该实验的重要性在于SuperSelective引物凭借其双功能性(锚和足必须形成待合成的扩增子的杂交体)是如此特异使得它们不受来自其余的人类基因组的DNA片段的存在的的影响。

[0112] 我们也已经研究了等位基因选择性增强试剂四甲基氯化铵(TMAC)对使用SuperSelective引物的测定方法的作用,这些作用包括对使用单重PCR测定的SuperSelective引物的不同的若干个结构特征的选择性( $\Delta C_t$ )的作用,这些单重PCR测定包含不同量的该等位基因选择性增强试剂、仅单个SuperSelective引物、和预期的突变体靶序列和仅相差单个核苷酸的相关的野生型序列二者。来自该研究的实验在下面的实例11至14中给出。

[0113] 用SuperSelective引物多重化

[0114] 多重扩增和检测测定是能够扩增和检测至少两种核酸序列的测定。筛选测定是多重测定的特殊情况,其能够扩增和检测至少两种核酸序列,但预期许多可能靶序列的不多于一个序列会存在。多重测定和测定方法可分为两种类型。第一类是扩增和检测广泛分离



的不相关突变体靶序列。对于该类型的多重化,将独特的引物对用于待扩增和检测的每种不相关的序列。第二类是扩增和检测密切相关的靶序列。对于该类型的多重化,对于每个密切相关的序列使用不同的正向引物,但使用共同反向引物。在两个密切相关的序列的扩增和检测测定中,使用独特的正向引物但相同的反向引物,待扩增和检测的其他序列也可以密切相关。可替代地,或此外,使用独特的引物对进行扩增,待扩增和检测的其他序列可以与至少两种密切相关的序列不相关。在下面的实例中,我们描述了两个密切相关的突变的双重测定,并且我们描述了两个密切相关的突变加上它们相关的野生型序列或不相关的野生型序列的三重测定。

[0115] 在多重实时PCR测定中,在不同靶序列密切相关的情况中,如测量突变丰度发生的那样,尽管它们可能存在于不同的细胞中,位于相同或相邻的密码子中,但从更丰富的突变体产生的扩增子可以与从不太丰富的突变体产生的互补扩增子形成异源双链体,这导致对不太丰富的突变体的指数扩增的过早抑制,从而改变了不太丰富的突变体的 $C_T$ 值。我们已经发现,使用非对称引物浓度(其中每个SuperSelective引物的浓度是有限的)保持每个突变体靶序列的 $C_T$ 值的独立性并允许其单独地确定。显然,初始反应混合物中每种SuperSelective引物的浓度都很低,使得即使更丰富的突变体的所有SuperSelective引物都并入(+)扩增子中,这些存在的(+)扩增子也不会足以通过异源双链体形成显著地抑制不太丰富的突变体的指数扩增。此外,在将给定突变体的所有SuperSelective引物并入(+)扩增子后,过量的共同的常规反向引物的存在使得能够继续合成互补(-)扩增子。在后一个“线性”扩增阶段期间,与那些(-)扩增子结合的独特颜色的分子导标几乎没有面临来自不太丰富的互补(+)扩增子的竞争,并且那些(-)扩增子的持续合成提供了每种突变体的 $C_T$ 值,该 $C_T$ 值与原始样本中该突变体的丰度成线性反比。我们还发现,在针对相同或相邻密码子中的不同突变的SuperSelective引物中,使桥的序列彼此不同,在各个扩增子之间形成的任何异源双链体中产生了非互补区域,这反过来导致SuperSelective引物仅结合正确的扩增子并仅在正确的扩增子上引发合成,使得所得的 $C_t$ 值不会受到异源双链体形成的影响。

[0116] 实例6和图6示出了前一发现。他们示出了用于在相关BRAF野生型存在下扩增和检测两种密切相关的突变体靶序列BRAF V600R和BRAF V600E的对称PCR和非对称PCR之间的差异。样本含有限制性酶消化的质粒DNA:固定量的野生型靶序列(10,000个拷贝)、固定量的BRAF V600E突变体靶序列(1,000个拷贝)和不同量的BRAF V600R突变体靶序列(从10,000个拷贝到无拷贝)。反应包括针对每种突变体靶序列的SuperSelective引物和针对每种扩增子的分子导标探针。实时荧光测量(荧光强度对热循环数)示于图6中。左上图示出了在对称PCR情况下的V600R探针的实时曲线。左下图示出了在非对称PCR情况下的V600R探针的实时曲线。当通过对称PCR进行扩增时,以不同量的V600R突变体模板开始的样本都具有相似的 $C_T$ ,但此后曲线的斜率作为BRAF V600R突变体靶序列的起始量的函数而不同。另一方面,当通过非对称PCR进行扩增时,情况恰恰相反: $C_T$ 随BRAF V600R突变体靶序列的起始量而变化,但此后曲线的斜率是平行的。如图6所示的结果证明,在对称PCR条件下的多重测定中,来自不太丰富的BRAF V600R靶序列的产物链(扩增子)与来自更丰富的BRAF V600E靶序列的互补扩增子链形成异源双链体,导致不太丰富的BRAF V600R靶序列的 $C_T$ 值由于它们与更丰富的BRAF V600E扩增子的结合而改变。改变遮蔽了 $C_T$ 随模板起始数的预期变化。在另



一方面,在非对称PCR条件下,异源双链体不太丰富,从而能够独立定量每个样本中存在的 BRAF V600R靶序列的相对丰度。这些结果证明,在含有非对称引物浓度的多重实时PCR测定中测定的 $C_T$ 值提供了定量结果,尽管同时检测到在相同密码子中存在的不同突变。

[0117] 在我们共同未决的专利申请PCT/US 2014/015351 (国际公开号W0 2014/124290 A1,公开日期2014年8月14日)中,我们披露了一种多重化(检测同一反应中的两个或更多个靶)的方法,其中长桥序列的互补物可以用作探针(例如分子导标)的靶,以检测和区分单管中的多于一个靶。实例7示出,虽然用这种方法可以实现多于一个靶的多重检测,但检测的灵敏度是有限的。图7中的图G01和G02描述了双重实验,其中使用具有18个核苷酸长的桥序列的一对引物(BRAF V600E 25-18/9-6:1:1和BRAF V600R 25-18/9-5:2:1 (SEQ ID No.36和SEQ ID No.37))检测到两种可替代的靶(BRAF V600E和BRAF V600R)。虽然可检测到1,000个分子的靶,但5个拷贝不能产生可检测的信号。由于桥序列的相对较小的长度(18个核苷酸),这些双重反应的灵敏度受到了限制。探针-靶杂交体不够稳定,不能在退火温度保持结合。该问题的解决方案是增加桥长度,如已经描述的那样。然而,正如已经描述的那样,增加桥长度也导致信号出现的延迟。当桥长从18个核苷酸增加到32个核苷酸时(引物BRAF V600E 30-32/9-6:1:1和BRAF V600R 30-32/9-5:2:1 (SEQ ID No.32和SEQ ID No.33)), $C_T$ 值向右移动到如此程度,使得在少于60个循环中可以检测到1,000个分子的突变体BRAF V600R,但是5个分子的突变体BRAF V600E在60个循环内没有产生可检测的信号(图7,图G03和G04)。

[0118] 我们设计的从较短的18个核苷酸长的桥获得可检测的信号的一种可能的方法是将探针结合区域从桥向外延伸到锚和足区域。图7的图G05和G06示出从一对SuperSelective引物获得的结果,其中探针结合区域还包括来自足和锚定区域的少数几个核苷酸(引物BRAF V600E 25-18/9-7:1:0和BRAF V600R 24-18/9-6:2:0 (SEQ ID No.34和SEQ ID No.35))。这些引物不仅产生更高的荧光强度,还可以检测到5个拷贝的BRAF V600E突变体。虽然有效,但该解决方案限制了引物序列的设计。

[0119] 我们发现的更好的方法是根据本发明的方法,其中在每个引物的5'末端引入不同的可扩增标签序列。然后互补物(存在于扩增子的另一条链中)作为探针的靶。可以独立于桥的长度选择探针-靶杂交体的长度。如上所述,这些标签在扩增过程中被复制,并且它们的互补物存在于另一条链中。

[0120] 此类5'标签的有效性在图8中示出(图G07-G14)。在图G07-G08所示的实验使用引物BRAF V600E 32-30-18/9-6:1:1和BRAF V600R 32-30-18/9-5:2:1 (SEQ ID No.28和SEQ ID No.29),这些引物具有32个核苷酸的5'标签和18个核苷酸的桥。这些实验示出,用5个拷贝的BRAF V600E引发的大多数反应通常可以与没有BRAF V600E的反应区分(然而,用5个拷贝的一个反应未能给出任何信号,并且一个阴性对照反应产生了可检测的信号)。引物BRAF V600E 32-30-18/9-7:1:0和BRAF V600R 32-30-18/9-6:2:0 (SEQ ID No.30和SEQ ID No.31) (其与前述对相似,除了辨别核苷酸位于3'末端而不是倒数第二位置上)导致类似的高辨别水平(图G09-G10)。

[0121] 我们已经发现,当桥序列的长度进一步减少时,双重测定结果的灵敏度进一步改进。这在图G11-G12和图G13-G14中得到证明。当使用具有较短的桥序列(与18个核苷酸相对的10-12个核苷酸)的引物(引物BRAF V600E 32-25-10/9-6:1:1和BRAF V600R 32-25-12/

9-5:2:1 (SEQ ID No.19和SEQ ID No.20))时,用五个分子的BRAF V600E靶标引发的反应可以清楚地与没有BRAF V600E靶分子的情况下引发的反应区分(图G11-G12)。此外,当使用另一对引物(其与这对引物在所有方面都是相似的,除了辨别核苷酸位于3'末端而不是倒数第二位置上)(引物BRAF V600E 32-25-10/9-7:1:0和BRAF V600R 32-25-12/9-6:2:0 (SEQ ID No.26和SEQ ID No.27))时,可以获得相似的高辨别水平(图G13-G14)。

[0122] 使用SuperSelective引物的多重实时PCR测定的重要临床目标是测量具有与癌症相关的突变的不同罕见DNA片段的丰度,并确定它们相对于样本中存在的DNA量的丰度。然而,在这些多重测定中,每种SuperSelective引物都具有稍微不同的足序列,这会影响足杂交体的强度(焓),并且每种SuperSelective引物具有明显不同的桥序列,其长度和刚度作为泡状物的一部分影响足杂交体形成的概率(熵)。因此,对于给定数量的含有特定突变的DNA片段,在多重PCR测定中用给定的SuperSelective引物观察到的 $C_T$ 值可以比含有不同的突变的相同数量的DNA片段观察到的 $C_T$ 值稍早或稍晚出现,从而难以相互比较不同突变体片段的丰度。出现这种情况时, $C_T$ 值对起始模板的数量或 $C_T$ 值对初始存在的模板的数量的对数的多个图或图表将被提供给用户,对于每种SuperSelective引物,这要求不同的图或图表。

[0123] 我们已经发现,可以对SuperSelective引物桥序列的长度进行微小的改变,以便微调对于给定数量的靶序列将获得的 $C_T$ 值(不显著影响引物的选择性)。甚至可以通过对其桥的核苷酸序列进行微小改变(不改变核苷酸的数量)来微调所得的 $C_T$ 值,从而改变桥的刚性。以这种方式,可以调整将在多重PCR测定中一起使用的一组SuperSelective引物的每个成员的设计(基于初步实验),使得一个靶序列的 $C_T$ 值表示与任何其他靶序列的相同 $C_T$ 值所表示的相同数量的起始模板。然后,所有靶序列的 $C_T$ 值将落在 $C_T$ 值对模板起始数的对数的图中的相同线上。因此,在相同测定中测量其丰度的所有不同靶序列的一组 $C_T$ 值将是直接可相互比较的。当微调一组SuperSelective引物时,用户只需要 $C_T$ 值对起始模板数或 $C_T$ 值对起始存在的模板的数量的对数的单个的图或图表。

[0124] 实例8和图9说明了用于双重测定中的一组两种SuperSelective引物的微调,以检测两种密切相关的突变体序列。我们以没有微调的SuperSelective引物开始。进行非对称PCR,并进行实时荧光测量。如图9的上图所示,得到的 $C_T$ 对靶序列起始数的图在不同的线上,而不是在同一条线上。我们找到了一种方法,我们称之为微调,以纠正这种情况。应理解的是,为了微调一组引物,可以修饰一种或更多种引物。在实例8的情况下,我们保持一个引物相同并仅修改另一个引物以降低用于给定起始数的靶序列的修饰的引物获得的 $C_T$ 值。尽管可能需要一些试验,但是实例2中提供的改变泡状物周长的作用和实例4中提供的改变泡状物对称性的作用是修饰桥进行微调的指导。如实例2的实验所证明的(实验的结果示于表3和图4中),泡状物周长的相对大的变化产生用SuperSelective引物获得的 $C_T$ 值的相对小的变化。在实例8中报道的实验中,我们所做的是将桥序列缩短五个核苷酸而不改变间插序列的长度。如图9的下图所示,一种SuperSelective引物的这一变化导致了两种SuperSelective引物被微调。 $C_T$ 值对起始模板数对数的图在同一条线上。对于三重测定,不仅扩增和检测两种密切相关的突变体序列而且还扩增和检测参考野生型序列,如实例9和10中所报道的,我们使用的三组SuperSelective引物被微调,如图10-13所示。

[0125] 选择实时多重测定中存在的每个SuperSelective引物的桥的长度和核苷酸序列

的独特的能力使得能够包含SuperSelective引物(优选地微调的)用于扩增参考野生型序列(不相关的野生型序列或相关的野生型序列)。对于不相关的野生型序列的用途,PCR测定混合物包括SuperSelective引物和常规反向引物,该SuperSelective引物和常规反向引物对扩增样本中存在的参考野生型序列是特异的。对于相关的野生型序列的用途,PCR测定混合物包括SuperSelective引物,该SuperSelective引物对样本中存在的参考野生型序列是特异的,但不需要额外的反向引物。在任一情况下,来自参考序列的扩增子的产生(由独特颜色的分子导标的荧光反映)用作内部对照以确保PCR测定良好地起作用。此外,野生型扩增子的 $C_T$ 值反映了样本中存在的DNA量,并且如果该 $C_T$ 值结果高于预定值,则由于样品中的DNA太少而难以存在罕见的靶突变(如果罕见靶突变存在的话),测定结果将被忽略。值得注意的是,使用微调的SuperSelective引物(其产生反映样本中DNA量的 $C_T$ 值)使得由突变体靶序列的类似微调SuperSelective引物产生的 $C_T$ 值可以直接相互比较。罕见突变体的 $C_T$ 值与参考基因的 $C_T$ 值之间的差异是它们相对丰度的直接反映,并且该比较不需要预先确定样本中的DNA量。

[0126] 实例9和10证明了在使用微调SuperSelective引物的非对称多重测定中包括参考野生型基因的引物的值。在实例9中,野生型参考是不相关的;在实例10中它是相关的。三重实时非对称PCR测定同时扩增BRAF V600E和BRAF V600R突变体序列,以及不相关的参考EGFR野生型序列(实例9)或相关的BRAF野生型序列(实例10)。每个反应含有三种不同颜色的分子导标探针以检测所得的扩增子。在每个实例中,进行两组反应。第一组含有固定量的野生型片段和BRAF V600E片段(分别为10,000个拷贝和1,000个拷贝),和不同量的BRAF V600R片段(0;10;39;156;625;和2,500个拷贝)。第二组含有固定量的野生型片段和BRAF V600R片段(分别为10,000个拷贝和1,000个拷贝),和不同量的BRAF V600E片段(0;10;39;156;625;和2,500)。实例9中的两组含有10,000个BRAF野生型片段以模拟实际样本,尽管反应不包括用于BRAF野生型序列的指数扩增的SuperSelective引物。

[0127] 结果(如图10-13所示)证明,当针对样本中存在的那些靶序列的数量的对数绘图时,针对每个靶序列确定的 $C_T$ 值全部位于直线上,证实了对这些多重测定中使用的SuperSelective引物的设计进行微调,使得可以直接比较不同的 $C_T$ 值。因此,针对样本中的每种突变体靶序列获得的 $C_T$ 值与针对参考野生型靶序列获得的 $C_T$ 值之间的差异( $\Delta C_T$ )反映了那些突变体靶序列相对于参考野生型靶序列的丰度的丰度,不管样本中存在的DNA量如何。取自个体的液体活组织检查样本中的DNA量可能在一天内变化很大。然而,每个靶突变相对于参考基因的丰度的丰度可能是潜在临床情况的可靠指标。基于实例9和10的结果的比较,特别是在十个拷贝的突变体靶序列和没有该序列拷贝之间 $C_T$ 值的可区分差异,我们优选使用不相关的野生型序列。

[0128] 使用等位基因选择性增强试剂的多重测定

[0129] 某些多重测定(包括筛选测定)需要检测以非常低的拷贝数存在于样本中的突变的能力,例如,在液体活组织检查样本中的少于十个拷贝的DNA片段。液体活组织检查样本中存在的突变体DNA片段的数量非常低,并且通常少于十(当例如尚未出现症状时,或者当出现最好早期检测的新突变时(例如当药物抗性突变首次出现时))。在10,000个拷贝的相关野生型序列的存在下检测少于十个拷贝,甚至一个拷贝的突变体靶等位基因序列需要非常高的等位基因选择性。如已经描述的,在使用SuperSelective引物的测定方法中增加等

位基因灵敏度的两种方法是减少足序列的长度和增加由桥和间插序列形成的泡状物的周长。我们发现这样做有若干个缺点。首先,少于十个拷贝的突变体靶序列的 $C_T$ 值过高。其次,该 $C_T$ 值在重复样本中具有显著的可变性(例如,当测试名义上具有四个靶片段的多个样本时,观察到这种可变性发生)。第三,由于这种固有的可变性,仅具有野生型靶片段的对照样本可产生相似且难以(如果不是不可能)区分的 $C_T$ 。

[0130] 我们发现某些试剂(包括霍夫迈斯特(Hofmeister)盐和特别是四甲基氯化胺(TMAC))增加了SuperSelective引物的等位基因选择性,以区分密切相关的序列,例如区分突变体等位基因和野生型等位基因,或区分不同突变体等位基因,或区分多个突变体等位基因和其相关的野生型等位基因。我们已经研究了各种结构的SuperSelective引物 and 不同浓度的TMAC的使用。来自该研究的实验在下面的实例11-14中给出。

[0131] 实例11示出了若干件事:

[0132] • 比较图14和15的上部的图,可以看出,正如所预期的,在没有TMAC的情况下,具有较短的6:1:1足的测定给出了在大量相关的野生型序列的存在下包含突变体靶序列的样本和仅包含大量相关的野生型序列的样本之间的更好的 $\Delta C_T$ 。

[0133] • 从图14和图15的下图可以看出,过高浓度的TMAC(在这些反应中,100mM)抑制突变体序列的扩增,使得在60个PCR扩增循环后没有获得 $C_T$ 。

[0134] • 从图14和15的每一个可以看出,用各引物获得的 $\Delta C_T$ 随着TMAC的浓度而改变。 $\Delta C_T$ 通过60个PCR循环增加到最大(针对6:1:1足为50mM TMAC并且针对8:1:1足为70mM TMAC),并且然后不能进行计算,因为该突变体序列的扩增被完全抑制了。

[0135] • 比较图14和15,可以看出,在8:1:1足的情况下,增加TMAC浓度高达70mM对突变体靶序列的 $C_T$ 基本上没有作用,而在更短的6:1:1足的情况下,它确实具有约5个循环的延迟作用。

[0136] 实例12证明,TMAC实际上可以在大量拷贝的相关的野生型序列的存在的情况下消除来自不含有突变体靶序列拷贝的样本的背景信号。使用如实例11中所使用的相同的32-24/14/14-8:1:1SuperSelective正向引物和被发现是最佳的70mM TMAC(图15,曲线1507和1508),我们用40,000个拷贝的野生型序列(可能在液体活组织检查样本中发现的量)和10,000个;1,000个;100个;10个拷贝的相关的突变体靶序列;或没有相关的突变体靶序列拷贝的情况下进行了一系列PCR测定。为了比较,我们在不用TMAC的情况下进行了一个类似的系列。如以上所解释的,进行用十个拷贝的突变体靶序列的五个反应以评估当靶序列的数量如此之低使得泊松因子变得显著时的可变性。我们对没有突变体拷贝的样本进行了相同的评估。图16,像图15一样,示出了在65个PCR扩增循环期间,没有突变体靶序列拷贝的样本没有 $C_T$ 。图16还示出可通过 $C_T$ 区分所有五个水平的突变体靶序列浓度。具体地,尽管有一些可变性,但来自10个拷贝的 $C_T$ 与来自100个拷贝的和来自无拷贝(其曲线没有 $C_T$ )的 $C_T$ 是可区分的。相比之下,在没有TMAC的情况下,来自10个拷贝的 $C_T$ 的范围和来自无拷贝的范围中存在重叠。

[0137] 实例13和图17示出了阈值循环( $C_T$ )对样本中的突变体靶序列的起始数(从4到40,000)的对数的图,例如可能在液体活组织检查样本(40,000个拷贝的野生型序列)中发生的,非常接近于与数据拟合的直线(图17,线1701);并且4种突变体靶序列的 $C_T$ (48.7)与仅野生型序列的非常受抑制的 $C_T$ (54.9)是可区分的。在本实例中,我们使用了32-24-18/14-

7:1:0SuperSelective正向引物和50mM TMAC,我们认为50mM TMAC对于具有8个核苷酸的足引物是更接近最佳的。

[0138] 实例14和图18比较了不同TMAC浓度对使用具有相同长度足序列(8:1:1)但具有不同桥序列并形成不同泡状物(形成周长为40个核苷酸的对称泡状物的18个核苷酸长的桥,或形成长度为28个核苷酸的不对称泡状物的10个核苷酸的桥)的SuperSelective引物的测定的作用。图18示出,增加TMAC浓度对前一(18/18桥)引物比对后一(10/14桥)引物的 $\Delta C_T$ 具有更大的作用。因此,使用形成较小泡状物的SuperSelective引物(具有10/14桥的引物)需要略高于50mM的TMAC以达到约15的 $\Delta C_T$ ,而使用形成较大泡状物的SuperSelective引物(具有18/18桥的引物)则需要低于20mM的TMAC达到相同的 $\Delta C_T$ 。

[0139] 实例15和图19-21比较了在使用具有相同的10个核苷酸长的足但是足序列中单个询问核苷酸(3'末端询问核苷酸(9:1:0足)或3'倒数第二位置的询问核苷酸(8:1:1足))在不同位置的SuperSelective引物的测定中不同的TMAC浓度(从0至50mM)的作用。PCR测定混合物含有0或4,000个拷贝的突变体靶序列以及在每种情况下400,000个拷贝的密切相关的野生型序列。将实例15中的表8中的 $C_T$ 值绘制在图19-20中。图19中的线1902和图20中的线2002示出,随着TMAC浓度增加,无论使用哪种SuperSelective引物,包括突变体靶序列的样本的 $C_T$ 都略微降低。图19中的线1901和图20中的线2001示出,随着TMAC浓度增加,仅具有野生型的样本的 $C_T$ 增加,尽管速率不同;用具有9:1:0足的引物的样本的 $C_T$ 在具有TMAC浓度的情况下比使用具有8:1:1足的引物的样本的 $C_T$ 增加更快,并且在50mM TMAC的存在下, $C_T$ 在具有9:1:0足的引物的65个扩增循环之后甚至还未出现。图21示出对于两种SuperSelective引物, $\Delta C_T$ (仅具有野生型靶序列的 $C_T$ 减去突变体靶序列加野生型靶序列的 $C_T$ )随着增加的TMAC浓度而增加,但是,由于增加的TMAC浓度对仅具有野生型的样本的不同的作用,随着增加的TMAC浓度, $\Delta C_T$ 的增加对于具有3'末端询问核苷酸(线2101)的引物比对于具有3'倒数第二的询问核苷酸(线2102)的引物更大;也就是说,线2101的斜率大于线2102的斜率。

[0140] 我们的实验结果示出,当我们向含有SuperSelective引物的PCR测定添加不同浓度的TMAC(0到100mM)时,作用显著、剧烈地增加了仅具有野生型DNA的样本的 $C_T$ 值,同时略微降低了具有野生型DNA片段和突变体DNA片段二者的样本的 $C_T$ 值。我们得出结论,通过热力学和随后的动力学的组合,等位基因选择性存在显著的增加。

[0141] 图14-16示出,随着TMAC浓度增加,具有和不具有突变体DNA片段的样本的 $C_T$ 值存在最大分离。在甚至更高的TMAC浓度,含有突变体DNA片段的样本的 $C_T$ 值增加,因此减少了具有和不具有突变体DNA片段的样本的 $C_T$ 值的分离。这一令人惊讶的结果示出存在最佳TMAC浓度以改进SuperSelective PCR测定的选择性。在我们迄今为止的工作中,我们已经粗略地作了优化,比较了以10-mM增量变化的TMAC浓度,但是应当理解的是,如果需要,使用较小的增量将允许更精确的优化。

[0142] TMAC的作用取决于SuperSelective引物的足的长度。具有相对短的足(例如长度为7或8个核苷酸)的SuperSelective引物的最佳TMAC浓度低于具有相对较长的足(例如长度为9或10个核苷酸)的SuperSelective引物的最佳TMAC浓度。

[0143] TMAC的上述作用取决于足的G-C含量。如果足是高G-C的,该足应该比足是高A-T的情况更短,并且较短的足需要较少的TMAC浓度。TMAC的作用还取决于足中“询问核苷酸”的位置(询问核苷酸是与突变体中相应核苷酸互补,但不与野生型中相应的核苷酸互补的核

苷酸):如果该询问核苷酸是足序列的3'末端核苷酸,TMAC对 $\Delta C_T$ 有更大的作用。

[0144] 我们从这些观察中得出了以下推论:

[0145] • TMAC弱化不匹配杂交体的机制(虽然未知)取决于杂交体中核苷酸的数量。

[0146] • TMAC对具有低G-C含量的不匹配足杂交体具有更大的弱化作用;TMAC对足杂交体的相对作用取决于足的长度,从这个角度来说,较短的完全互补的足杂交体已经非常弱,因此需要较少的TMAC使它们显著不稳定,并且不匹配的短足杂交体是所有中最弱的,并且因此最容易受到影响,导致更晚的 $C_T$ 值。

[0147] • TMAC对足杂交体的相对作用取决于询问核苷酸的位置,对含有3'末端不匹配的杂交体的作用更大。

[0148] 虽然不希望受任何理论束缚,但我们推测TMAC不仅相对于相应的完全互补的足杂交体弱化了不匹配的足杂交体,从而降低了它们在平衡时的热力学比率,而且通过降低它们的相对固有稳定性,TMAC相对于可比较的完全互补的杂交体的平均持续时间,区别地缩短了不匹配的足杂交体的平均持续时间,从而增强了PCR测定的等位基因选择性。我们再次不希望受任何理论束缚,我们目前推测TMAC可防止酮-烯醇互变异构现象发生。TMAC越多,发生的酮-烯醇互变异构现象就越少。酮-烯醇互变异构现象可导致不匹配的碱基对暂时配对;并且酮-烯醇互变异构现象可导致互补的碱基对暂时不配对。根据我们目前的理论,它将如下工作:

[0149] (i) 对于具有3'末端询问核苷酸的SuperSelective引物,酮-烯醇互变异构现象使得足杂交体中的末端不匹配核苷酸偶尔形成3'末端碱基对(因此聚合酶确实具有产生扩增子的可能性)。TMAC越多,酮-烯醇互变异构现象越少,3'末端(不匹配的)碱基对发生的可能性越小,聚合酶可以产生扩增子的可能性越小,并且 $C_T$ 值越高。

[0150] (ii) 对于具有3'倒数第二询问核苷酸的SuperSelective引物,我们认为不匹配的倒数第二碱基对倾向于阻止形成3'末端(匹配的)碱基对。然而,由于酮-烯醇互变异构现象,偶然形成不匹配的倒数第二碱基对,导致偶然的完全匹配的足杂交体,尽管存在不匹配。TMAC越多,酮-烯醇互变异构现象越少,倒数第二(不匹配的)碱基对发生的可能性越小,聚合酶可以产生扩增子的可能性越小,并且 $C_T$ 值越高。

[0151] (iii) TMAC对增加在具有3'末端询问核苷酸的SuperSelective引物的情况下的不匹配的足杂交体的 $C_t$ 值的作用比TMAC对增加由具有倒数第二询问核苷酸的SuperSelective引物形成的不匹配的足杂交体的 $C_T$ 值的作用更大,因为防止单个的不匹配碱基对在足杂交体的3'末端形成比防止单个的不匹配碱基对在3'倒数第二碱基对上形成以及互补(匹配的)碱基对在足杂交体的3'末端几乎同时形成更容易的多。

[0152] (iv) 对于由任一SuperSelective引物形成的完全互补的足杂交体,我们假设在(名义上互补的)碱基对之一中通过酮-烯醇互变异构现象的短暂存在偶然地防止完全互补的杂交体聚集在一起。然而,存在的TMAC越多,酮-烯醇互变异构体形成的可能性越小,并且因此足杂交体的形成可能性越大,导致了更早的 $C_T$ 值。

[0153] 为了设计用于多重测定的一组SuperSelective引物,我们首先在单重非对称PCR测定中测试候选物SuperSelective引物,其中每种SuperSelective引物含有3'末端询问核苷酸和14/14桥/间插序列(32个核苷酸的泡状物)。如果该测定旨在辨别密切相关的野生型序列,我们首先检查以确保在引物/野生型杂交体中(如果形成的话),询问核苷酸不会形成

G-T碱基对-如果会形成G-T碱基对,我们切换到另一个靶链。我们测试不同的足长度(例如,7:1:0、8:1:0和9:1:0)和不同的TMAC浓度(20mM至50mM)以确定完全消除野生型序列的扩增(65个循环后没有 $C_T$ )的TMAC的最低浓度和不会对预期靶序列的 $C_T$ 产生不利影响的最高浓度。我们选择了使用的TMAC浓度。由于多重测定中的所有扩增都包括单个TMAC浓度,因此然后我们根据需要通过改变桥和间插序列的长度,并且/或者改变询问核苷酸的位置来“微调”一种或更多种SuperSelective引物,使得用任何SuperSelective引物获得的 $C_T$ 值将反映样本中突变体DNA片段的数量,而不管哪种SuperSelective引物产生了观察到的 $C_T$ 值。

[0154] 通过在PCR测定混合物中包括最佳浓度的TMAC,可以使用具有较长足序列和较小泡状物的SuperSelective引物,从而当扩增含有少量突变体DNA片段(通常小于10)的样本时降低获得的 $C_T$ 值的可变性,并且然而所获得的 $C_T$ 值可能与从不含突变体DNA片段的样本获得的 $C_T$ 值是可区分的,具体地如图16和17所示。

[0155] 具有预扩增的多重测定

[0156] 如已经指出的,当样本来源(例如受试者的血液)中存在的突变体靶分子的数量小于十,例如五或更少时,会出现潜在的问题。一个问题是样本间的变化。如果样本来源平均具有三个拷贝的突变体靶序列,则来自10,000个细胞的一些DNA样本将精确地含有三个拷贝,而其他样本可以预期包含更少的拷贝(甚至没有)或更多拷贝。另一个问题是由于针对密切相关的靶序列的两种或更多种不同的SuperSelective引物的存在引起,这些SuperSelective引物通过其相同或几乎相同的锚定序列竞争与这些罕见靶的结合,但这些SuperSelective引物中只有一种被设计为用于复制特定的罕见靶分子,并且这引入了初始可变性的另一个来源。并且最后,另一个问题是由于SuperSelective引物在任何给定的PCR热循环中引发复制其预期靶序列的可能性很小引起。在非常少的起始模板的情况下,指数扩增开始的热循环可以变化,并且与之相随的是阈值循环( $C_T$ )变化。因此, $C_T$ 值受到泊松因子的影响,该泊松因子导致观察到的 $C_T$ 值偶尔从预期的 $C_T$ 值变化,并且不能可靠地与不含突变体靶片段的样本的 $C_T$ 值是可区分的。此类的假阴性结果会降低要求最大灵敏度的测定的效用。

[0157] 如上所述,通过包括TMAC、另一种有效的霍夫迈斯特(Hofmeister)盐或另一种等位基因选择性增强试剂来解决这些问题。为了在没有这种添加剂的情况下解决这些问题,我们的解决方案是通过使用线性预扩增来增强SuperSelective引物可以结合的样本中的靶模板的数量。在开始指数PCR扩增之前,我们仅使用常规反向引物进行多个线性扩增循环。预扩增的循环数可以是三至四十,优选地是从五至三十。我们在这里描述了进行线性预扩增的两种方法。

[0158] 第一种方法涉及仅修改扩增方法,而不是SuperSelective引物。在该方法中,扩增和检测在多室盒中进行。线性预扩增在第一室中进行,其中反应混合物是PCR测定混合物减去SuperSelective引物。预扩增后,将得到的反应混合物转移到含有SuperSelective引物的第二室中,从而产生用于指数扩增的反应混合物。虽然使用反应管可以实现同样的事情,但是必须打开管以在线性预扩增后添加SuperSelective引物,这是我们不建议的步骤。

[0159] 第二种方法涉及修改扩增方法和SuperSelective引物。对于该方法,使用的SuperSelective引物是可用于本发明方法的SuperSelective引物,该SuperSelective引物具有短的锚定序列。它们可以是为本发明方法设计的引物,其中锚定序列被缩短以将锚定

序列的 $T_m$ 降低至低于共同反向引物的 $T_m$  8°C-15°C。用包括所有引物的完整PCR测定混合物开始扩增,但是使用高于SuperSelective引物的 $T_m$ 至少4°C但低于反向引物的 $T_m$ 的引物退火温度进行预扩增的循环,使得SuperSelective引物退火的可能性非常小,但反向引物的退火是非常可能的。在规定数量的预扩增循环后,根据本发明的方法使用较低的引物退火温度进行PCR扩增,在该引物退火温度所有引物与其靶杂交。例如,反向引物可以构建为具有70°C-75°C的 $T_m$ ,并且SuperSelective引物可以具有相对短的锚定序列,这些锚定序列的 $T_m$ 为60°C-62°C。用那些引物的多个预扩增循环可以使用72°C的引物退火温度进行,该温度比SuperSelective引物的 $T_m$ 高至少10°C,之后可以使用60°C的引物退火温度进行PCR扩增。可以如已知的那样测量或计算引物 $T_m$ ,以获得浓度调节的 $T_m$ 。

[0160] 每个预扩增循环产生等于起始数的许多新拷贝的每个靶序列(突变体和野生型)。例如,对于起始数为五个拷贝,十个循环的预扩增将在PCR扩增开始时产生55个拷贝;25个预扩增循环将产生130个拷贝;等等。PCR开始时的那些拷贝数减少了实际开始复制的循环的可变性,并且完全在根据本发明的多重测定的检测极限内。即使原始样本含有非常少量的突变体靶链,所得到的 $C_T$ 值可能可区分地大于从不含突变体靶链的样本获得的 $C_T$ 值,并且因此假阴性结果几乎不可能会出现。

[0161] 实例

[0162] 下面表1中给出的是实例1-5中EGFR突变L858R的单重PCR测定中使用的引物序列。

[0163] 表1



[0164]

引物	序列(5'至3')	SEQ ID NO.
<b>EGFR L858R</b>		
24-14/14-4:1:1	TGGTGAAAACACCGCAGCATGT <u>CACACGAGT</u> GAGCCCCGGG <b>CGG</b>	1
24-14/14-5:1:1	CTGGTGAAAACACCGCAGCATGT <u>CGCACGAGT</u> GAGCCCTGGG <b>CGG</b>	2
24-14/14-6:1:1	ACTGGTGAAAACACCGCAGCATGT <u>TGGAGCTGTGAGCCT</u> TGGG <b>CGG</b>	3
24-14/14-6:1:0	ACTGGTGAAAACACCGCAGCATGT <u>TGCACGAGT</u> GAGCCTTGGG <b>CG</b>	4
24-14/14-5:1:1	CTGGTGAAAACACCGCAGCATGT <u>CGCACGAGT</u> GAGCCCTGGG <b>CGG</b>	2
24-14/14-4:1:2	TGGTGAAAACACCGCAGCATGT <u>CACACGAGT</u> GAGCCACGGG <b>CGG</b>	5
24-14/14-3:1:3	GGTGAAAACACCGCAGCATGTCAA <u>ACGAGT</u> GAGCCACAGG <b>CGG</b>	6
24-14/14-2:1:4	GTGAAAACACCGCAGCATGTCAAGGAAGT <u>GAGCCACAAGC</u> GGG <b>CGC</b>	7
24-14/14-1:1:5	TGAAAACACCGCAGCATGTCAAGACAGACTGACCCAAACGGG <b>CGCA</b>	8
24-10/10-5:1:1	TGAAAACACCGCAGCATGTCAAGACACTCAGCCCTGGG <b>CGG</b>	9
24-14/14-5:1:1	CTGGTGAAAACACCGCAGCATGT <u>CGCACGAGT</u> GAGCCCTGGG <b>CGG</b>	2
24-18/18-5:1:1	CGTACTGGTGAAAACACCGCAGCACTGACGACAAGT <u>GAGCCCT</u> GGG <b>CGG</b>	10
24-18/10-5:1:1	TGAAAACACCGCAGCATGTCAAGACACACGACAAGT <u>GAGCCCT</u> GGG <b>CGG</b>	11
24-16/12-5:1:1	GGTGAAAACACCGCAGCATGTCAATCCAACAAGT <u>GAGCCCT</u> GGG <b>CGG</b>	12
24-14/14-5:1:1	CTGGTGAAAACACCGCAGCATGT <u>CGCACGAGT</u> GAGCCCTGGG <b>CGG</b>	2
24-12/16-5:1:1	TACTGGTGAAAACACCGCAGCATGGACGACGAGCCCTGGG <b>CGG</b>	13
24-10/18-5:1:1	CGTACTGGTGAAAACACCGCAGCACTGACGGCCCTGGG <b>CGG</b>	14
反向引物	GCATGGTATTCTTTCTCTTCCGCA	15

[0165] 将每种SuperSelective引物中的桥序列加下划线,并且其足序列中的询问核苷酸用粗体字母表示。将引物排列成反映它们在对比实验中的用途的组。

[0166] 作为表1中引物的靶的EGFR L858R序列是:

[0167] 3'-CCTTGCATGACCACCTTTTGTTGGCGTCGTACAGTTCTAGTGTCTAAAACCCGCCCGGTTTGACGACCCACGCCTTCTCTTTCTTATGGTACGTCTT-5' (SEQ ID No. 16)

[0168] 出于说明的目的,将24-14/14-5:1:1引物(SEQ ID No.2)的锚定序列和足序列的结合位点加下划线,反向引物的序列(SEQ ID No.15)也是如此。

[0169] 实例1. EGFR突变L858R和降低SuperSelective引物足长度的作用

[0170] 为了研究足序列的长度对选择性和延迟的作用,在单重、对称PCR测定中在用SYBR®染料检测的情况下比较了三种引物的性能。引物(表1)是24-14/14-4:1:1(SEQ ID No.1)、24-14/14-5:1:1(SEQ ID No.2)和24-14/14-6:1:1(SEQ ID No.3)。对于所有三种引物,锚定序列是24个核苷酸长,桥序列是14个核苷酸长,泡状物周长是32个核苷酸且对称(间插序列与桥序列长度相同)。此外,在所有三种情况下,单个询问核苷酸位于引物足的3'倒数第二位置上。使用集成DNA技术公司(Integrated DNA Technologies)的SciTools程

序计算DNA杂交体的解链温度(指定参数: [寡核苷酸] = 0.12 $\mu$ M; [Na<sup>+</sup>] = 60mM; [Mg<sup>2+</sup>] = 3mM; 每种[dNTP] = 0.25mM); 24-14/14-4:1:1锚定序列与模板结合的T<sub>m</sub>为68.9℃, 并且整个多部分引物与所得互补扩增子结合的T<sub>m</sub>为80.8℃; 24-14/14-5:1:1锚定序列与模板结合的T<sub>m</sub>为67.8℃, 并且整个多部分引物与所得互补扩增子结合的T<sub>m</sub>为80.4℃; 并且24-14/14-6:1:1锚定序列与模板结合的T<sub>m</sub>为69.0℃, 并且整个多部分引物与所得互补扩增子结合的T<sub>m</sub>为79.9℃。

[0171] 通过将含有EGFR L858R突变或相应的EGFR野生型序列的115-个碱基对EGFR基因片段插入pGEM-11Zf (+) 载体(普洛麦格公司(Promega))中来制备引物序列及其预期的靶质粒。用限制性内切核酸酶Mse I(新英格兰生物实验室(New England Biolabs))消化突变体和野生型质粒DNA。消化混合物在20- $\mu$ L体积中含有10单位的Mse I和4 $\mu$ g突变体或野生型基因组DNA, 该体积含有5mM KAc、2mM Tris-Ac (pH 7.9)、1mM MgAc、1%牛血清白蛋白、和100 $\mu$ M二硫苏糖醇。将反应物在37℃孵育120分钟, 然后在65℃孵育20分钟以使酶失活。

[0172] PCR扩增以30- $\mu$ L体积进行, 该30- $\mu$ L体积含有50mM KCl、10mM Tris-HCl (pH 8.0)、3mM MgCl<sub>2</sub>、1.5单位的AmpliTaq Gold DNA聚合酶(赛默飞世尔科技(ThermoFisher Scientific))、250 $\mu$ M四种脱氧核糖核苷三磷酸(dNTP)中的每一种、120nM的每种引物、和1x SYBR<sup>®</sup>绿dsDNA染料(赛默飞世尔科技(ThermoFisher Scientific))。在该系列中, 反应混合物含有10<sup>6</sup>个拷贝的相关的野生型(WT)序列和突变体(MUT)预期靶序列的稀释系列。使用Bio-Rad IQ5荧光分光光度热循环仪中的0.2ml聚丙烯PCR管(白色)进行扩增。该热循环程序是在95℃10min, 随后是在95℃持续20sec、在60℃持续20sec以及在72℃持续20sec的60个循环。在每个热循环的链延伸步骤(72℃)结束时测量SYBR<sup>®</sup>绿荧光强度。

[0173] 根据实时荧光测量(未示出), 测定仪器自动计算每个反应的阈值循环(C<sub>T</sub>)。C<sub>T</sub>值列于表2中。

[0174] 表2

针对含有不同数量的预期靶的反应观察到的  
的阈值循环 (C<sub>T</sub>)

[0175]	引物	10 <sup>6</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>1</sup>
	24-14/14-4:1:1	29.5	34.7	37.3	42.4	45.9	49.8
	24-14/14-5:1:1	23.8	28.8	32.0	35.3	38.5	41.2
	24-14/14-6:1:1	20.4	24.8	28.5	31.9	34.8	35.7

[0176] 图3是一组图, 其示出(对于含有相同引物的每组反应)观察到的C<sub>T</sub>值作为每个反应中存在的MUT模板数量的对数的函数。线31是针对具有六个核苷酸长的足序列(4:1:1)的引物的C<sub>T</sub>值的线性相关拟合; 线32是针对具有七个核苷酸长的足序列(5:1:1)的引物的C<sub>T</sub>值的线性相关拟合; 并且线33是针对具有八个核苷酸长的足序列(6:1:1)的引物的C<sub>T</sub>值的线性相关曲线拟合。

[0177] 实例2.EGFR突变L858R和增加泡状物周长的作用

[0178] 将实例1中描述的实验使用引物(表1) 24-10/10-5:1:1 (SEQ ID No.9)、24-14/14-5:1:1 (SEQ ID No.2) 和24-18/18-5:1:1 (SEQ ID No.10) 来重复。在所有三种情况中,锚定序列是24个核苷酸长,并且足序列为5:1:1,因此单个询问核苷酸位于每种引物的足中的3'倒数第二位置上。锚定序列的选择使得当引物与其模板结合时产生的间插序列与引物的桥序列长度相同,产生了对称的泡状物。由该系列的三个多部分引物形成的泡状物周长长度分别为24、32和40个核苷酸。

[0179] 使用集成DNA技术公司(Integrated DNA Technologies)的SciTools程序计算DNA杂交体的解链温度(指定参数:[寡核苷酸]=0.12 $\mu$ M;[Na<sup>+</sup>]=60mM;[Mg<sup>2+</sup>]=3mM;每种[dNTP]=0.25mM);24-10/10-5:1:1锚定序列与模板结合的T<sub>m</sub>为67.2 $^{\circ}$ C,并且整个多部分引物与所得互补扩增子结合的T<sub>m</sub>为78.5 $^{\circ}$ C;24-14/14-5:1:1锚定序列与模板结合的T<sub>m</sub>为67.8 $^{\circ}$ C,并且整个多部分引物与所得互补扩增子结合的T<sub>m</sub>为80.4 $^{\circ}$ C;并且24-18/18-5:1:1锚定序列与模板结合的T<sub>m</sub>为68.7 $^{\circ}$ C,并且整个多部分引物与所得互补扩增子结合的T<sub>m</sub>为79.7 $^{\circ}$ C。

[0180] 对于三种多部分引物设计中的每一种,如实例1中所述,使用以10<sup>6</sup>个拷贝的WT模板分别加10<sup>6</sup>、10<sup>5</sup>、10<sup>4</sup>、10<sup>3</sup>、10<sup>2</sup>或10<sup>1</sup>个拷贝的MUT模板起始的稀释系列进行一系列PCR扩增和检测测定。测定仪器自动计算每个反应的阈值循环(C<sub>T</sub>)。从每个反应的实时数据(未显示)计算的C<sub>T</sub>值列于表3中。

[0181] 表3

针对含有不同数量的预期靶的反应观察到的  
的阈值循环 (C<sub>T</sub>)

[0182]	引物	10 <sup>6</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>1</sup>
	24-10/10-5:1:1	20.0	24.3	27.3	30.8	33.5	35.2
	24-14/14-5:1:1	23.3	26.6	30.4	33.4	37.0	38.8
	24-18/18-5:1:1	25.8	30.6	33.2	36.4	42.0	45.2

[0183] 图4是一组图,其示出(对于含有相同引物的每组反应)观察到的C<sub>T</sub>值作为每个反应中存在的MUT模板数量的对数的函数。线43是针对形成具有24个核苷酸长的周长的泡状物的引物的C<sub>T</sub>值的线性相关拟合;线42是针对形成具有32个核苷酸长的周长的泡状物的引物的C<sub>T</sub>值的线性相关拟合;并且线41是针对形成具有40个核苷酸长的周长的泡状物的引物的C<sub>T</sub>值的线性相关拟合。

[0184] 实例3. EGFR突变L858R和改变单个询问核苷酸在足序列内的位置的作用

[0185] 将实例2中描述的实验使用引物(表1) 24-14/14-6:1:0 (SEQ ID No.4)、24-14/14-5:1:1 (SEQ ID No.2)、24-14/14-4:1:2 (SEQ ID No.5)、24-14/14-3:1:3 (SEQ ID No.6)、24-14/14-2:1:4 (SEQ ID No.7) 以及24-14/14-1:1:5 (SEQ ID No.8) 来重复。锚定序列、桥序列、间插序列和足序列的长度在所有引物中保持恒定。单个询问核苷酸在足中的位置是变化的。

[0186] 使用集成DNA技术公司(Integrated DNA Technologies)的SciTools程序计算DNA杂交体的解链温度(指定参数:[寡核苷酸]=0.06 $\mu$ M;[Na<sup>+</sup>]=60mM;[Mg<sup>2+</sup>]=3mM;每种[dNTP]=0.25mM);24-14/14-6:1:0锚定序列与模板结合的T<sub>m</sub>为69.0℃,并且整个多部分引物与所得互补扩增子结合的T<sub>m</sub>为79.5℃;24-14/14-5:1:1锚定序列与模板结合的T<sub>m</sub>为67.8℃,并且整个多部分引物与所得互补扩增子结合的T<sub>m</sub>为80.4℃;24-14/14-4:1:2锚定序列与模板结合的T<sub>m</sub>为67.8℃,并且整个多部分引物与所得互补扩增子结合的T<sub>m</sub>为79.3℃;24-14/14-3:1:3锚定序列与模板结合的T<sub>m</sub>为66.4℃,并且整个多部分引物与所得互补扩增子结合的T<sub>m</sub>为78.7℃;24-14/14-2:1:4锚定序列与模板结合的T<sub>m</sub>为65.6℃,并且整个多部分引物与所得互补扩增子结合的T<sub>m</sub>为78.2℃;并且24-14/14-1:1:5锚定序列与模板结合的T<sub>m</sub>为67.2℃,并且整个多部分引物与所得互补扩增子结合的T<sub>m</sub>为78.5℃。

[0187] 如实例1中所述进行PCR扩增。PCR混合物含有10<sup>6</sup>个拷贝的野生型(WT)序列或10<sup>6</sup>个拷贝的相关的突变体靶(MUT)序列。表4列出了两种靶与每种引物的机器计算的C<sub>T</sub>值,并且还示出了差异( $\Delta C_T$ )。

[0188] 表4

针对含有其询问核苷酸位于足序列的不同位置的 引物的反应观察到的阈值循环（C <sub>T</sub> ）				
引物		10 <sup>6</sup> MUT 模板	10 <sup>6</sup> WT 模板	ΔC <sub>T</sub>
[0189]	24-14/14-6 : 1 : 0	24.3	43.1	18.8
	24-14/14-5 : 1 : 1	22.9	41.1	18.2
	24-14/14-4 : 1 : 2	21.2	36.1	14.9
	24-14/14-3 : 1 : 3	23.0	35.2	12.2
	24-14/14-2 : 1 : 4	23.1	33.2	10.1
	24-14/14-1 : 1 : 5	21.1	30.4	9.3

[0190] 实例4. EGFR突变L858R和改变泡状物对称性的作用

[0191] 将实例3中描述的实验使用引物(表1) 24-18/10-5:1:1(SEQ ID No.11)、24-16/12-5:1:1(SEQ ID No.12)、24-14/14-5:1:1(SEQ ID No.2)、24-12/16-5:1:1(SEQ ID No.13)以及24-10/18-5:1:1(SEQ ID No.14)来重复。24-14/14-5:1:1引物形成“对称”泡状物,该“对称”泡状物包括其14个核苷酸长的桥序列和来自模板的14个核苷酸长的间插序列。其他引物形成“不对称”泡状物,其中桥序列和模板中的间插序列具有不同的长度。在该实验中,所有比较的多部分引物具有24个核苷酸长的锚定序列和5:1:1的足序列。对于每个多部分引物,选择锚定序列的身份,使得桥序列的长度加间插序列的长度之和(通过锚定序列和足序列二者与模板的结合形成)等于28。因此,由这五种多部分引物中的每一种形成的泡状物的周长总是相同的。

[0192] 使用集成DNA技术公司(Integrated DNA Technologies)的SciTools程序计算DNA杂交体的解链温度(指定参数:[寡核苷酸]=0.12 $\mu$ M;[Na<sup>+</sup>]=60mM;[Mg<sup>2+</sup>]=3mM;每种[dNTP]=0.25mM);24-18/10-5:1:1锚定序列与模板结合的T<sub>m</sub>为67.2℃,并且整个多部分引

物与所得互补扩增子结合的 $T_m$ 为79.6℃;24-16/12-5:1:1锚定序列与模板结合的 $T_m$ 为67.8℃,并且整个多部分引物与所得互补扩增子结合的 $T_m$ 为79.0℃;24-14/14-5:1:1锚定序列与模板结合的 $T_m$ 为67.8℃,并且整个多部分引物与所得互补扩增子结合的 $T_m$ 为80.4℃;24-12/16-5:1:1锚定序列与模板结合的 $T_m$ 为67.2℃,并且整个多部分引物与所得互补扩增子结合的 $T_m$ 为79.9℃;并且24-10/18-5:1:1锚定序列与模板结合的 $T_m$ 为68.7℃,并且整个多部分引物与所得互补扩增子结合的 $T_m$ 为79.8℃。

[0193] 如实例1中所述进行PCR扩增。具有每种引物的样本含有 $10^6$ 个拷贝的突变体(MUT)靶序列或 $10^6$ 个拷贝的相关的野生型(WT)序列。从实时荧光结果,即SYBR Green®荧光强度作为扩增循环数的函数(未示出),获得两种靶与每种引物的机器计算的 $C_T$ 值,并且计算差异( $\Delta C_T$ )。结果示于表5中。

[0194] 表5

针对含有形成具有不同对称性的泡状物的引物的 反应观察到的阈值循环 ( $C_T$ )				
	引物	$10^6$ MUT 模板	$10^6$ WT 模板	$\Delta C_T$
[0195]	24-18/10-5 : 1 : 1	22.8	39.3	16.5
	24-16/12-5 : 1 : 1	22.1	38.2	16.1
	24-14/14-5 : 1 : 1	22.9	41.1	18.2
	24-12/16-5 : 1 : 1	22.5	38.4	15.9
	24-10/18-5 : 1 : 1	22.1	39.5	17.4

[0196] 实例5. 含有人类基因组DNA的样本中L858R突变体序列的选择性扩增

[0197] 为了模拟从血浆中分离的DNA片段引发的测定,我们在一组八个PCR测定中使用了EGFR L858R 24-14/14-5:1:1 (SEQ ID No.2) 引物,这些PCR测定在从含有野生型EGFR基因的10,000个人类细胞中分离的经限制性酶消化的基因组DNA的存在下,由含有不同量的从携带EGFR L858R突变的人细胞系H1975分离的经限制性酶消化的基因组DNA (DNA来自0;10;30;100;300;1,000;3,000;或10,000个细胞)的样本引发。

[0198] PCR扩增以30- $\mu$ L体积进行,该30- $\mu$ L体积含有50mM KCl、10mM Tris-HCl (pH 8.0)、3mM  $MgCl_2$ 、1.5单位的AmpliTaQ Gold DNA聚合酶、250 $\mu$ M的每种脱氧核糖核苷三磷酸(dNTP)、60nM的每种引物以及1xSYBR®绿。使用Bio-Rad IQ5荧光分光光度热循环仪上的0.2ml聚丙烯PCR管(白色)进行扩增。该热循环程序是在95℃10min,随后是在95℃持续20sec、在60℃持续15sec以及在72℃持续20sec的60个循环。在每个链延长阶段(72℃)结束时测量SYBR®绿荧光强度。结果示于图5中。将包含突变体模板的每个反应测量的阈值循环作为每个反应中最初存在的突变体模板的数量的对数的函数作图。线51是针对数据点的线性相关拟合。短划线52标识仅用野生型模板引发的扩增的 $C_T$ 值。

[0199] 在下面的实例6-10中,我们描述了两种密切相关的突变的双重测定,并且我们描述了两种密切相关的突变加上它们相应的野生型序列或由不同的引物对扩增的不相关的序列的三重测定。表6中列出了在这些多重PCR测定中使用的引物和探针的序列。

[0200] 表6

引物和探针	序列 (5'至3')	SEQ ID No:
BRAF V600E 32-30-10/9-6:1:1	<u>ACCTGCCGTCAACACGTGCGCAGTAGACCATCATGAAGA</u> CCTCACAGTAAAAATAGGTGATT <u>CAGACCCAACCTACAGA</u> G	17
BRAF V600E 32-30-15/9-6:1:1	<u>ACCTGCCGTCAACACGTGCGCAGTAGACCATCATGAAGA</u> CCTCACAGTAAAAATAGGTGATT <u>CTTAATAGACCCAACCT</u> ACAGAG	18
BRAF V600E 32-25-10/9-6:1:1	<u>ACCTGCCGTCAACACGTGCGCAGTAGACCATCGACCTCA</u> CAGTAAAAATAGGTGATT <u>CAGACCCAACCTACAGAG</u>	19
BRAF V600R 32-30-12/9-5:2:1	<u>ACGTGCCCTCAATACGAGCCCCCTTCACCAACATGAAGA</u> CCTCACAGTAAAAATAGGTGATT <u>AATGGACGGAACCTACA</u> AGG	20
BRAF V600R 32-25-12/9-5:2:1	<u>ACGTGCCCTCAATACGAGCCCCCTTCACCAACGACCTCA</u> CAGTAAAAATAGGTGATT <u>AATGGACGGAACCTACAAGG</u>	21
BRAF 野生型 32-30-10/9-8:0:0	<u>ACGACCCGACAACCGTTGCTGCGTACTGCATCATGAAGA</u> CCTCACAGTAAAAATAGGTGATT <u>CCACAGCACACTACAGT</u> G	22
BRAF 反向引物	ATCAGTGGAATAATAGCCTCAATTCTTACCATCC	23
EGFR 野生型 32-25-14/9-8:0:0	<u>ACGACCCGACAACCGTTGCTGCGTACTGCATCGGAACGT</u> ACTGGTGAAAACACCGCAA <u>AATAGCCGCAGATCGATCACA</u> G	24
EGFR 反向引物	CATGGTATTCTTTCTCTTCCGCACCCA	25
BRAF V600E 32-25-10/9-7:1:0	<u>ACCTGCCGTCAACACGTGCGCAGTAGACCATCAGACCTC</u> ACAGTAAAAATAGGTGAT <u>CAGACCCAACGCTACAGA</u>	26
BRAF V600R 32-25-12/9-6:2:0	<u>ACGTGCCCTCAATACGAGCCCCCTTCACCAACAGACCTC</u> ACAGTAAAAATAGGTGATA <u>AATGGACGGAACGCTACAAG</u>	27
BRAF V600E 32-30-18/9-6:1:1	<u>ACCTGCCGTCAACACGTGCGCAGTAGACCATCATGAAGA</u> CCTCACAGTAAAAATAGGTGATT <u>CAACTTAATAGACCCAA</u> CCTACAGAG	28
BRAF V600R 32-30-18/9-5:2:1	<u>ACGTGCCCTCAATACGAGCCCCCTTCACCAACATGAAGA</u> CCTCACAGTAAAAATAGGTGATT <u>ACCCAATATGGACGGAA</u> CCTACAAGG	29
BRAF V600E 32-30-18/9-7:1:0	<u>ACCTGCCGTCAACACGTGCGCAGTAGACCATCCATGAAG</u> ACCTCACAGTAAAAATAGGTGAT <u>CAACTTAATAGACCCAA</u> CGCTACAGA	30

[0201]

[0202]

BRAF V600R 32-30-18/9-6:2:0	<u>ACGTGCCCTCAATACGAGCCCCCTTCACCAACCATGAAG</u> <u>ACCTCACAGTAAAAATAGGTGATACCCAATATGGACGGAA</u> <u>CGCTACAAG</u>	31
BRAF V600E 30-32/9-6:1:1	ATGAAGACCTCACAGTAAAAATAGGTGATT <u>ACCTGCCGTC</u> <u>AACACGTGCGCAGTAGACCATCCTACAGAG</u>	32
BRAF V600R 30-32/9-5:2:1	ATGAAGACCTCACAGTAAAAATAGGTGATT <u>ACGTGCCCTC</u> <u>AATACGAGCCCCCTTCACCAACCTACAAGG</u>	33
BRAF V600E 25-18/9-7:1:0	AGACCTCACAGTAAAAATAGGTGAT <u>CACGTTATAAGAATT</u> <u>AACGCTACAGA</u>	34
BRAF V600R 24-18/9-6:2:0	GACCTCACAGTAAAAATAGGTGAT <u>ACCCAATATAGAAGGA</u> <u>ACGCTACAAG</u>	35
BRAF V600E 25-18/9-6:1:1	AGACCTCACAGTAAAAATAGGTGAT <u>CACGTTATAAGAATT</u> <u>AACCTACAGAG</u>	36
BRAF V600R 25-18/9-5:2:1	AGACCTCACAGTAAAAATAGGTGAT <u>ACCCAATATAGAAGG</u> <u>AACCTACAAGG</u>	37
分子导标 V600E	Quasar 670- CGCCTGACCTGCCGTCAACACGTGCGCAGTAGACCATCC AGGCG- Black Hole Quencher 2	38
分子导标 V600R	FAM- CGCCTGACGTGCCCTCAATACGAGCCCCCTTCACCAACC AGGCG- Black Hole Quencher 1	39
分子导标 野生型	CalFluor Red 610- CGCCTGACGACCCGACAACCGTTGCTGCGTACTGCATCC AGGCG- Black Hole Quencher 2	40
分子导标 V600E2	Quasar 670- CCGCTGATAGGTGATCACGTTATAAGAATTAACGCCAGC GG-Black Hole Quencher 2	41
分子导标 V600R2	FAM- CCGTGCAGGTGATACCCAATATAGAAGGAACGCGCACGG -	42

[0203] 将在每种SuperSelective引物内的5'标签序列(其中存在标签的情况下)和桥序列加下划线,并且足序列中的一个或多个询问核苷酸用粗体字母表示。将引物排列成反映它们在对比实验中的用途的组。对于分子导标探针,将单链环(loop)加下划线。

[0204] 作为表6中BRAF引物的靶的BRAF序列是:

[0205] BRAF V600E MUT:

3'-TAAAGAAGTACTTCTGGAGTGTCATTTTTATCCACTAAAACCAGATCGATGTCT  
[0206] CTTTAGAGCTACCTACCCAGGGTAGTCAAACTTGTC AACAGACCTAGGTAAAC  
ACCTACCATTCTTAACTCCGATAAAAAGGTGACTAATTTAA-5' (SEQ ID No. 43).

[0207] 出于说明的目的,将32-30-10/9-6:1:1引物(SEQ ID No.17)的锚定序列和足序列的结合位点加下划线,反向引物的序列(SEQ ID No.23)也是如此。

[0208] BRAF V600R MUT:

3'-TAAAGAAGTACTTCTGGAGTGTCATTTTTATCCACTAAAACCAGATCGATGTTC  
[0209] CTTTAGAGCTACCTACCCAGGGTAGTCAAACTTGTC AACAGACCTAGGTAAAC  
ACCTACCATTCTTAACTCCGATAAAAAGGTGACTAATTTAA-5' (SEQ ID No. 44).

[0210] 出于说明的目的,将32-30-12/9-5:2:1引物(SEQ ID No.20)的锚定序列和足序列的结合位点加下划线,反向引物的序列(SEQ ID No.23)也是如此。

[0211] BRAF WT:

3'-TAAAGAAGTACTTCTGGAGTGTCATTTTTATCCACTAAAACCAGATCGATGTCA

[0212] CTTTAGAGCTACCTCACCCAGGGTAGTCAAACTTGTCAACAGACCTAGGTAAAAC  
ACCTACCATTCTTAACTCCGATAAAAAGGTGACTAATTAA-5' (SEQ ID No. 45).

[0213] 出于说明的目的,将32-30-10/9-8:0:0引物(SEQ ID No.22)的锚定序列和足序列的结合位点加下划线,反向引物的序列(SEQ ID No.23)也是如此。

[0214] EGFR WT:

3'-CCGTCGGTCCTTGCATGACCACTTTTGTGGCGTCGTACAGTTCTAGTGTCTAAA

[0215] ACCCGACCGTTTGACGACCCACGCCTTCTCTTTCTTATGGTACGTCTTCCTCCGT  
TT-5' (SEQ ID No. 46).

[0216] 出于说明的目的,将32-25-14/9-8:0:0引物(SEQ ID No.24)的锚定序列和足序列的结合位点加下划线,反向引物的序列(SEQ ID No.25)也是如此。

[0217] 实例6. 对称与非对称PCR扩增

[0218] 通过平行的反应组研究了对称与非对称的PCR扩增类型的作用。每个样本含有10,000个拷贝的BRAF野生型靶序列(SEQ ID No.34)、1,000个拷贝的BRAF V600E突变体靶序列(SEQ ID No.32)和不同量(10,000;2,500;625;156;39;10;或0个拷贝)的BRAF V600R突变体靶序列(SEQ ID No.33)。含有BRAF序列(V600E突变体序列、V600R突变体序列或野生型序列)的质粒购自集成DNA技术公司(Integrated DNA Technologies),并通过将200个碱基对基因片段插入pIDTSmart Amp载体中来制备。用限制性内切核酸酶Sca I(新英格兰生物实验室(New England Biolabs))消化突变体和野生型质粒DNA。消化混合物在20-μL体积中含有10单位的Sca I和4μg的突变体或野生型基因组DNA,该体积含有100mM NaCl、10mM MgCl<sub>2</sub>、1mM二硫苏糖醇以及50mM Tris-HCl (pH 7.9)。将反应物在37℃孵育120分钟,然后在80℃孵育20分钟以使酶失活。

[0219] PCR扩增以30-μL体积进行,该30-μL体积除了前述量的靶序列之外,还含有50mM KCl、10mM Tris-HCl (pH 8.0)、2.5mM MgCl<sub>2</sub>、1.5单位的铂Taq DNA聚合酶(赛默飞世尔科技公司(ThermoFisher Scientific))、250μM的四种脱氧核糖核苷三磷酸(dNTP)中的每一种、500nM(对称PCR)或60nM(非对称PCR)的BRAF SuperSelective引物BRAF V600E 32-30-10/9-6:1:1(SEQ ID No.17)和BRAF V600R 32-30-12/9-5:2:1(SEQ ID No.20)中的每一种、1,000nM的BRAF反向引物(SEQ ID No.23)、300nM的分子导标V600E(SEQ ID No.29)以及300nM的分子导标V600R(SEQ ID No.30)。使用Bio-Rad IQ5荧光分光光度热循环仪中的0.2ml聚丙烯PCR管(白色)进行扩增。该热循环程序是在95℃2min,随后是在95℃持续20sec、在60℃持续20sec以及在72℃持续20sec的60个循环。在每个退火阶段(60℃)结束时测量分子导标荧光强度。

[0220] 结果示于图6中。上图是对称PCR扩增的实时荧光曲线(荧光强度对完成的热循环数)的图。左边的图给出了来自含有不同量的BRAF V600R突变体靶序列的七个样本中的每一个的分子导标V600R的荧光强度。右边的图给出了来自相同七个样本(所有样本都含有1,



000个拷贝的BRAF V600E突变体靶序列)的分子导标V600E的荧光强度。下图是非对称PCR扩增的对应的图。

[0221] 实例7.其中桥序列的互补物或5'标签序列的互补物是探针的靶的双重测定

[0222] 为了比较各种桥序列和各种标签序列的性能,我们进行了一系列双重反应。所有双重反应含有10,000个分子的BRAF野生型靶(SEQ ID No.45)、1,000个分子的BRAF V600R靶(SEQ ID No.44)以及5或0个分子的BRAF V600E突变体靶(SEQ ID No.43)。这些扩增反应的靶是如实例6中所述通过限制性酶制备和片段化的质粒。如实例1中所述设计引物,并如分子导标网站([http://www.molecular-beacons.org/MB\\_SC\\_design.html](http://www.molecular-beacons.org/MB_SC_design.html))上所述设计分子导标。标签序列是任意的并且被设计成使得它们不会与反应中存在的任何引物的3'末端相互作用。

[0223] A.桥的互补物作为探针的靶

[0224] 我们进行了三个实验,其中探针靶向桥的互补物。在第一个实验中,非对称PCR混合物除靶序列之外含有60nM的SuperSelective引物BRAF V600E 25-18/9-6:1:1(SEQ ID No.36)、60nM的SuperSelective引物BRAF V600R 25-18/9-5:2:1(SEQ ID No.37)、1,000nM的BRAF共同反向引物(SEQ ID No.23)、300nM的Quasar 670-标记的分子导标BRAF V600E2(SEQ ID No.41)、300nM的荧光素标记的分子导标BRAF V600R2(SEQ ID No.42)以及如实例6中所述的另外的扩增试剂。在第二个实验中,非对称PCR混合物除靶序列之外含有60nM的SuperSelective引物BRAF V600E 30-32/9-6:1:1(SEQ ID No.32)、60nM的SuperSelective引物BRAF V600R 30-32/9-5:2:1(SEQ ID No.33)、1,000nM的BRAF共同反向引物(SEQ ID No.23)、300nM的Quasar 670-标记的分子导标BRAF V600E(SEQ ID No.38)、300nM的荧光素标记的分子导标BRAF V600R(SEQ ID No.39)以及如实例6中所述的另外的扩增试剂。在第三个实验中,非对称PCR混合物除靶序列之外含有60nM的SuperSelective引物BRAF V600E25-18/9-7:1:0(SEQ ID No.34)、60nM的SuperSelective引物BRAF V600R24-18/9-6:2:0(SEQ ID No.35)、1,000nM的BRAF共同反向引物(SEQ ID No.23)、300nM的Quasar 670-标记的分子导标BRAF V600E2(SEQ ID No.41)、300nM的荧光素标记的分子导标BRAF V600R2(SEQ ID No.42)以及如实例6中所述的另外的扩增试剂。

[0225] 如实例6中所述进行扩增和实时检测。每个实验重复五次。结果示于图7中,其包括三对荧光强度对完成的热循环数的图。在每对图中,左图是Quasar 670(V600E分子导标)的,并且右图是荧光素(V600R分子导标)的。用5个拷贝的BRAF V600E突变体靶序列引发的复制反应通过实线呈现,并且用0个拷贝的BRAF V600E突变体靶序列引发的反应中的荧光变化由虚线表示。上部的一对图G01和G02示出了第一个实验的结果,其中桥长度为18个核苷酸,并且泡状物周长为31个核苷酸。中间的一对图G03和G04示出了第二个实验的结果,其中桥长度为32个核苷酸,并且泡状物周长为45个核苷酸。下部的一对图G05和G06示出了第三个实验的结果,其中桥长度和泡状物周长如第一个实验,但SuperSelective引物的足不同。

[0226] B.标签的互补物作为探针的靶

[0227] 我们进行了四个实验,其中探针靶向5'标签的互补物。在第一个实验中,非对称PCR混合物除靶序列之外含有60nM的SuperSelective引物BRAF V600E 32-30-18/9-6:1:1(SEQ ID No.28)、60nM的SuperSelective引物BRAF V600R 32-30-18/9-5:2:1(SEQ ID

No.29)、1,000nM的BRAF共同反向引物(SEQ ID No.23)、300nM的Quasar 670-标记的分子导标BRAF V600E(SEQ ID No.38)、300nM的荧光素标记的分子导标BRAF V600R(SEQ ID No.39)以及如实例6中所述的另外的扩增试剂。在第二个实验中,非对称PCR混合物除靶序列之外含有60nM的SuperSelective引物BRAF V600E 32-30-18/9-7:1:0(SEQ ID No.30)、60nM的SuperSelective引物BRAF V600R 32-30-18/9-6:2:0(SEQ ID No.31)、1,000nM的BRAF共同反向引物(SEQ ID No.23)、300nM的Quasar 670-标记的分子导标BRAF V600E(SEQ ID No.38)、300nM的荧光素标记的分子导标BRAF V600R(SEQ ID No.39)以及如实例6中所述的另外的扩增试剂。在第三个实验中,非对称PCR混合物除靶序列之外含有60nM的SuperSelective引物BRAF V600E 32-25-10/9-6:1:1(SEQ ID No.19)、60nM的SuperSelective引物BRAF V600R 32-25-12/9-5:2:1(SEQ ID No.20)、1,000nM的BRAF共同反向引物(SEQ ID No.23)、300nM的Quasar 670-标记的分子导标BRAF V600E(SEQ ID No.38)、300nM的荧光素标记的分子导标BRAF V600R(SEQ ID No.39)以及如实例6中所述的另外的扩增试剂。在第四个实验中,非对称PCR混合物除靶序列之外含有60nM的SuperSelective引物BRAF V600E 32-25-10/9-7:1:0(SEQ ID No.26)、60nM的SuperSelective引物BRAF V600R 32-25-12/9-6:2:0(SEQ ID No.27)、1,000nM的BRAF共同反向引物(SEQ ID No.23)、300nM的Quasar 670-标记的分子导标BRAF V600E(SEQ ID No.38)、300nM的荧光素标记的分子导标BRAF V600R(SEQ ID No.39)以及如实例6中所述的另外的扩增试剂。

[0228] 如实例6中所述进行扩增和实时检测。每个实验重复五次。结果如图8所报道,其包括四对荧光强度对完成的热循环数的图。在每对图中,左图是Quasar 670(V600E分子导标)的,并且右图是荧光素(V600R分子导标)的。用5个拷贝的BRAF V600E突变体靶序列引发的复制反应通过实线呈现,并且用0个拷贝的BRAF V600E突变体靶序列引发的反应中的荧光变化由虚线表示。上部的一对图G07和G08来自第一个实验,其中桥长度为18个核苷酸,并且泡状物周长为31个核苷酸。第二对图G09和G10来自第二个实验,其中桥长度和泡状物周长没有变化,但V600E SuperSelective引物的足中的询问核苷酸从3'倒数第二核苷酸变为3'末端核苷酸。第三对图G11和G12来自第三个实验,其中桥长度和泡状物周长是短的。第四组(下部的)图G13和G14来自第四个实验,其中桥长度也是短的,但V600E SuperSelective引物的询问核苷酸从3'倒数第二核苷酸变为3'末端核苷酸。

[0229] 实例8.用于多重测定的微调SuperSelective引物。

[0230] 如果针对多重反应中一组不同SuperSelective引物, $C_T$ 值作为反应中存在的模板数量的对数的函数的图落在不同的线上,我们将该组SuperSelective引物描述为未经微调的。另一方面,如果这些图落在同一条线上,我们将该组SuperSelective引物描述为经过微调的。在设计用于多重测定的SuperSelective引物时,初始设计几乎总是产生未经微调的引物。通过调整桥的长度和身份(核苷酸序列),我们可以微调这些引物。在该实例中,我们首先描述了一种多重测定,其中SuperSelective引物结果不是微调的;并且然后我们描述了在我们对SuperSelective引物组进行微调后的相同的多重测定。如实例6中所述,制备了突变体BRAF V600E、突变体BRAF V600R和野生型BRAF质粒DNA。

[0231] A.微调前的引物

[0232] 制备了两个系列的反应。针对第一系列的反应,每个样本含有100,000个拷贝的

BRAF野生型靶序列 (SEQ ID No.45)、10,000个拷贝的BRAF V600E突变体靶序列 (SEQ ID No.43) 和不同量 (100,000;10,000;或1,000个拷贝) 的BRAF V600R突变体靶序列 (SEQ ID No.44)。针对第二系列的反应,每个样本含有100,000个拷贝的BRAF野生型靶序列 (SEQ ID No.45)、10,000个拷贝的BRAF V600R突变体靶序列 (SEQ ID No.44) 和不同量 (100,000;10,000;或1,000个拷贝) 的BRAF V600E突变体靶序列 (SEQ ID No.43)。

[0233] 如实例6中所述进行PCR扩增,其中对所用的引物和分子导标探针进行如下修改。这些反应含有60nM的BRAF SuperSelective引物BRAF V600E 32-30-15/9-6:1:1 (SEQ ID No.18) 和BRAF V600R 32-30-12/9-5:2:1 (SEQ ID No.20) 中的每一种、1,000nM的BRAF反向引物 (SEQ ID No.23)、300nM的分子导标V600E (SEQ ID No.38) 和300nM的分子导标V600R (SEQ ID No.39)。结果示于图9的上图中,图9的上图是作为每个反应中存在的可变模板数量的对数的函数观察到的 $C_T$ 值的图。实心圆圈表示具有不同量的BRAF V600R的反应,并且实心三角形表示具有不同量的BRAF V600E的反应。线F01是针对BRAF V600R数据的线性相关拟合,并且线F02是针对BRAF V600E数据的线性相关拟合。

[0234] B.微调后的引物

[0235] 对于用微调的引物的测定,反应如部分A中所述,除了SuperSelective引物是BRAF V600E 32-30-10/9-6:1:1 (SEQ ID No.17) 和BRAF V600R 32-30-12/9-5:2:1 (SEQ ID No.20)。结果示于图9的下图中,图9的下图是作为每个反应中存在的可变模板数量的对数的函数观察到的 $C_T$ 值的图。实心圆圈表示具有不同量的BRAF V600R的反应,并且实心三角形表示具有不同量的BRAF V600E的反应。线F03是针对BRAF V600R数据的线性相关拟合,并且线F04是针对BRAF V600E数据的线性相关拟合。

[0236] 如所指出的,在微调引物时,我们保持BRAF V600R引物 (SEQ ID No.20) 相同并且仅修饰BRAF V600E引物,使得线F04落在线F03上。比较未调节的引物 (SEQ ID No.18) 和调节的引物 (SEQ ID No.17) (其序列在表6中给出),可以看出在这种情况下我们保留了BRAF V600E引物的桥序列的5'末端核苷酸但从桥序列中去除了接下来的五个核苷酸 (TTATT),这实现了我们的微调目标。

[0237] 实例9.扩增和检测不相关的参考野生型序列的多重PCR测定。

[0238] 进行三重测定以扩增和检测两种密切相关的突变体靶序列 (BRAF V600R和BRAF V600E) 以及还有不相关的野生型序列 (EGFR)。在第一个系列中,改变了BRAF V600R突变体靶序列的起始量。在第二个系列中,改变了BRAF V600E突变体靶序列的起始量。

[0239] 如实例6中所述制备了突变体BRAF V600E和BRAF V600R质粒DNA,并如实例1中所述制备野生型EGFR质粒DNA。

[0240] A.改变BRAF V600R

[0241] 六个样本中的每一个含有10,000个拷贝的EGFR野生型靶序列 (SEQ ID No.46)、10,000个拷贝的BRAF野生型序列 (SEQ ID No.45)、1,000个拷贝的BRAF V600E突变体靶序列 (SEQ ID No.43) 和不同量 (2,500;625;156;39;10或0个拷贝) 的BRAF V600R突变体靶序列 (SEQ ID No.44)。

[0242] PCR扩增以30- $\mu$ L体积进行,该30- $\mu$ L体积除前述量的靶序列之外,还含有50mM KCl、10mM Tris-HCl (pH 8.0)、2.5mM  $MgCl_2$ 、1.5单位的铂Taq DNA聚合酶 (赛默飞世尔科技 (ThermoFisher Scientific))、250 $\mu$ M的四种脱氧核糖核苷三磷酸 (dNTP) 中的每一种、60nM

的引物BRAF V600E 32-30-10/9-6:1:1 (SEQ ID No.17)、60nM的引物BRAF V600R32-30-12/9-5:2:1 (SEQ ID No.20)、60nM的引物EGFR野生型32-25-14/9-8:0:0 (SEQ ID No.24)、1,000nM的BRAF反向引物 (SEQ ID No.23)、500nM的EGFR反向引物 (SEQ ID No.25)、300nM的分子导标V600E (SEQ ID No.38)、300nM的分子导标V600R (SEQ ID No.39) 以及300nM的分子导标野生型 (SEQ ID No.40)。使用Bio-Rad IQ5荧光分光光度热循环仪中的0.2ml聚丙烯管(白色)进行扩增。该热循环程序是在95℃2min,随后是在95℃持续20sec、在60℃持续20sec以及在72℃持续20sec的55个循环。在每个退火阶段(60℃)结束时测量分子导标荧光强度。

[0243] 结果示于图10中。三个图是实时荧光曲线(荧光强度对完成的热循环数)的图。左上图示出了来自六个样本的分子导标V600R的荧光曲线,该六个样本含有不同量的BRAF V600R突变体靶序列。右上图示出了来自包含在那六个样本中的每一个中的1,000个拷贝的BRAF V600E靶序列的分子导标V600E的荧光曲线。左下图示出了来自包含在那六个样本中的每一个中的10,000个拷贝的EGFR野生型序列的分子导标野生型的荧光曲线。右下图是从实时曲线获得的 $C_T$ 值作为每个反应中存在的模板数量的对数的函数的图。实心圆圈是BRAF V600R的 $C_T$ 值;实心三角形B02是BRAF V600E的 $C_T$ 值;并且实心菱形B03是EGFR野生型的 $C_T$ 值。线B01是针对BRAF V600R数据的线性相关拟合。短划线B04标识用10,000个EGFR野生型模板、10,000个BRAF野生型模板、1,000个BRAF V600E模板和无BRAF V600R模板引发的扩增的 $C_T$ 值。

#### [0244] B. 改变BRAF V600E

[0245] 六个样本中的每一个含有10,000个拷贝的EGFR野生型靶序列 (SEQ ID No.46)、10,000个拷贝的BRAF野生型序列 (SEQ ID No.45)、1,000个拷贝的BRAF V600R突变体靶序列 (SEQ ID No.44) 和不同量(2,500;625;156;39;10或0个拷贝)的BRAF V600E突变体靶序列 (SEQ ID No.43)。扩增反应混合物和PCR扩增如上文A部分所述。

[0246] 结果示于图11中。三个图是实时荧光曲线(荧光强度对完成的热循环数)的图。右上图示出了来自六个样本的分子导标V600E的荧光的曲线,该六个样本含有不同量的BRAF V600E突变体靶序列。左上图示出了来自包含在那六个样本中的每一个中的1,000个拷贝的BRAF V600R靶序列的分子导标V600R的荧光曲线。左下图示出了来自包含在那六个样本中的每一个中的10,000个拷贝的EGFR野生型序列的分子导标野生型的荧光曲线。右下图是从实时曲线获得的 $C_T$ 值作为每个反应中存在的模板数量的对数的函数的图。实心三角形是BRAF V600E的 $C_T$ 值;实心圆圈C02是BRAF V600R的 $C_T$ 值;并且实心菱形C03是EGFR野生型的 $C_T$ 值。线C01是针对BRAF V600E数据的线性相关拟合。短划线C04标识用10,000个EGFR野生型模板、10,000个BRAF野生型模板、1,000个BRAF V600R模板和无BRAF V600E模板引发的扩增的 $C_T$ 值。

#### [0247] 实例10. 扩增和检测相关的参考野生型序列的多重PCR测定。

[0248] 进行三重测定以扩增和检测两种密切相关的突变体靶序列 (BRAF V600R和BRAF V600E) 以及还有它们的相关的野生型序列 (BRAF野生型)。在第一个系列中,改变了BRAF V600R突变体靶序列的起始量。在第二个系列中,改变了BRAF V600E突变体靶序列的起始量。

[0249] 如实例6中所述,制备了突变体BRAF V600E、突变体BRAF V600R和野生型BRAF质粒DNA。

[0250] A.改变BRAF V600R

[0251] 六个样本中的每一个含有10,000个拷贝的BRAF野生型靶序列(SEQ ID No.45)、1,000个拷贝的BRAF V600E突变体靶序列(SEQ ID No.43)和不同量(2,500;625;156;39;10或0个拷贝)的BRAF V600R突变体靶序列(SEQ ID No.44)。

[0252] 如实例9中所述进行PCR扩增,其中对引物和分子导标探针进行如下修改。这些反应含有60nM的BRAF SuperSelective引物BRAF V600E 32-30-10/9-6:1:1(SEQ ID No.17)、BRAF V600R 32-30-12/9-5:2:1(SEQ ID No.20)、BRAF野生型32-30-10/9-8:0:0(SEQ ID No.22)中的每一种、1,500nM的BRAF反向引物(SEQ ID No.23)、300nM的分子导标V600E(SEQ ID No.38)、300nM的分子导标V600R(SEQ ID No.39)和300nM的分子导标野生型(SEQ ID No.40)。

[0253] 结果示于图12中。三个图是实时荧光曲线(荧光强度对完成的热循环数)的图。左上图示出了来自六个样本的分子导标V600R的荧光曲线,该六个样本含有不同量的BRAF V600R突变体靶序列。右上图示出了来自包含在那六个样本中的每一个中的1,000个拷贝的BRAF V600E靶序列的分子导标V600E的荧光曲线。左下图示出了来自包含在那六个样本中的每一个中的10,000个拷贝的BRAF野生型序列的分子导标野生型的荧光曲线。右下图是从实时曲线获得的 $C_T$ 值作为每个反应中存在的模板数量的对数的函数的图。实心圆圈是BRAF V600R的 $C_T$ 值;实心三角形D02是BRAF V600E的 $C_T$ 值;并且实心菱形D03是BRAF野生型的 $C_T$ 值。线D01是针对BRAF V600R数据的线性相关拟合。短划线D04标识用10,000个BRAF野生型模板、1,000个BRAF V600E模板和无BRAF V600R模板引发的扩增的 $C_T$ 值。

[0254] B.改变BRAF V600E

[0255] 六个样本中的每一个含有10,000个拷贝的BRAF野生型靶序列(SEQ ID No.45)、1,000个拷贝的BRAF V600R突变体靶序列(SEQ ID No.44)和不同量(2,500;625;156;39;10或0个拷贝)的BRAF V600E突变体靶序列(SEQ ID No.43)。扩增反应混合物和PCR扩增如上文A部分所述。

[0256] 结果示于图13中。三个图是实时荧光曲线(荧光强度对完成的热循环数)的图。右上图示出了来自六个样本的分子导标V600E的荧光的曲线,该六个样本含有不同量的BRAF V600E突变体靶序列。左上图示出了来自包含在那六个样本中的每一个中的1,000个拷贝的BRAF V600R靶序列的分子导标V600R的荧光曲线。左下图示出了来自包含在那六个样本中的每一个中的10,000个拷贝的BRAF野生型序列的分子导标野生型的荧光曲线。右下图是从实时曲线获得的 $C_T$ 值作为每个反应中存在的模板数量的对数的函数的图。实心三角形是BRAF V600E的 $C_T$ 值;实心圆圈E02是BRAF V600R的 $C_T$ 值;并且实心菱形E03是BRAF野生型的 $C_T$ 值。线E01是针对BRAF V600E数据的线性相关拟合。短划线E04标识用10,000个BRAF野生型模板、1,000个BRAF V600R模板和无BRAF V600E模板引发的扩增的 $C_T$ 值。

[0257] 实例11.在不同浓度的TMAC情况下的足长度。

[0258] 我们研究了不同浓度的TMAC在使用具有针对不含TMAC的测定的优选设计(32-24-14/14-6:1:1)的SuperSelective引物和具有更长的足序列的SuperSelective引物(32-24-14/14-8:1:1)的突变BRAF V600E的测定中的作用。

[0259] A.SuperSelective引物32-24-14/14-6:1:1

[0260] 全部反应以30- $\mu$ l体积进行,该30- $\mu$ l体积含有50mM KCl、2.5mM MgCl<sub>2</sub>、20mM

Tris-HCl (pH 8.3)、250 $\mu$ M dATP、250 $\mu$ M dCTP、250 $\mu$ M dGTP、250 $\mu$ M dTTP、1.5单位的铂Taq DNA聚合酶(赛默飞世尔科技(ThermoFisher Scientific))、0.5%Tween 20(西格玛公司(Sigma))、300nM的Quasar<sup>®</sup> 670-标记的BRAF V600E特异性分子导标(SEQ ID No.38)用于在每个热循环的退火阶段监控扩增子丰度。在最初的在95 $^{\circ}$ C 2min之后,该热循环程序是在95 $^{\circ}$ C 15sec、在60 $^{\circ}$ C 20sec、以及在72 $^{\circ}$ C 20sec的65个重复。

[0261] 反应混合物含有1,000个拷贝的BRAF V600E突变体靶序列和1,000,000个拷贝的相关的BRAF野生型序列,或仅1,000,000个拷贝的相关的BRAF野生型序列。在不同的反应混合物中,TMAC的量变化如下:0mM、30mM、50mM、70mM或100mM。引物浓度是60nM BRAF V600E正向引物和500nM BRAF常规反向引物。

[0262] 引物序列(加下划线的5'标签序列和桥序列;呈粗体的询问核苷酸):

[0263] SuperSelective正向引物32-24-14/14-6:1:1

[0264] 5'-ACCTGCCGTCAACACGTGCGCAGTAGACCATCCAGACAACTGTTCAA<sup>**ACTGAT**</sup>  
GGGCAAACACATCATCCGATTTC-3' (SEQ ID No. 43)

[0265] BRAF V600E常规反向引物

[0266] 5'-ATAGGTGATTTTGGTCTAGC-3' (SEQ ID No. 44)

[0267] 结果示于图14中。五个图中的每一个都指示了使用的TMAC的量,并且呈现了荧光强度对PCR循环数的两个实时曲线。曲线1401、1403、1405、1407以及1409是用1,000个拷贝的BRAF V600E突变体靶和1,000,000个拷贝的BRAF野生型靶引发的测定;并且曲线1402、1404、1406、1408和1410是仅用1,000,000个拷贝的BRAF野生型靶引发的测定。仪器计算的这些曲线的C<sub>t</sub>值是:曲线1401,40.6;曲线1402,52.1;曲线1403,39.3;曲线1404,56.3;曲线1405,40.0;曲线1406,N/A;曲线1407,45.1;曲线1408,N/A;曲线1409,N/A和曲线1410,N/A。基于那些值,计算的整个65个PCR循环的 $\Delta C_T$ 的值(仅含野生型的情况下的C<sub>T</sub>减去也存在突变体的情况下的C<sub>T</sub>)随着TMAC浓度而变化:曲线1401和1402,11.5;曲线1403和1404,17.0。对于曲线1405和1406,以及对于曲线1407和1408,没有 $\Delta C_T$ ,因为每对中的至少一个曲线没有C<sub>T</sub>。

[0268] B. SuperSelective引物32-24-14/14-8:1:1

[0269] 反应混合物和PCR循环如上文A部分所述,反向引物和分子导标探针也是如此。该SuperSelective BRAF V600E正向引物的序列是不同的。其序列(加下划线的5'标签序列和桥序列;呈粗体的询问核苷酸)是:

[0270] 5'-ACCTGCCGTCAACACGTGCGCAGTAGACCATCTCCAGACAACTGTTCAA<sup>**ACTG**</sup>  
ATGTTCAAACACAATCAGAGATTTC-3' (SEQ ID No. 45)

[0271] 结果示于图15中。五个图中的每一个都指示了使用的TMAC的量,并且呈现了荧光强度对PCR循环数的两个实时曲线。曲线1501、1503、1505、1507以及1509是用1,000个拷贝的BRAF V600E突变体靶和1,000,000个拷贝的BRAF野生型靶引发的测定;并且曲线1502、1504、1506、1508和1510是仅用1,000,000个拷贝的BRAF野生型靶引发的测定。仪器计算的这些曲线的C<sub>t</sub>值是:曲线1501,44.9;曲线1502,47.1;曲线1503,42.7;曲线1504,47.9;曲线1505,41.6;曲线1506,52.9;曲线1507,42.6;曲线1508,59.0;曲线1509,N/A和曲线1510,N/A。基于那些值,计算的整个65个PCR循环的 $\Delta C_T$ 的值(仅含野生型的情况下的C<sub>T</sub>减去也存在突变体的情况下的C<sub>T</sub>)随着TMAC浓度而变化:曲线1501和1502,2.2;曲线1503和1504,5.2;

曲线1505和1506,11.3;曲线1507和1508,16.4。

[0272] 实例12.伪液体活组织检查样本中8:1:1足序列和不同的靶序列浓度

[0273] 我们使用实例11中所述的具有8:1:1足序列 (SEQ ID No.45) 的SuperSelective引物和相同的常规反向引物 (SEQ ID No.44) 进行了一系列的测定。反应混合物含有40,000个拷贝的BRAF野生型序列和不同量的BRAF V600E突变体靶序列:0个;10个;100个;1,000个;或10,000个拷贝。否则,反应混合物如实例11中所述。PCR扩增和检测如实例11中所述。

[0274] 结果示于图16中。TMAC的浓度在图中指出-无TMAC(三个左图)或70mM TMAC(三个右图)。每个图呈现来自分子导标探针的实时荧光读数,即作为PCR热循环的函数的荧光强度。曲线1601、1602和1603分别来自不具有TMAC且具有10,000、1,000和100个拷贝的突变体靶序列的反应。多条曲线1604来自不具有TMAC且具有10个拷贝的突变体靶序列的重复反应。多条曲线1605来自不具有TMAC且没有突变体靶序列拷贝的重复反应。曲线1606、1607和1608分别来自具有70mM TMAC以及10,000、1,000和100个拷贝的突变体靶序列的反应。多条曲线1609来自具有70mM TMAC和10个拷贝的突变体靶序列的重复反应。多条曲线1610来自具有70mM TMAC且没有突变体靶序列拷贝的重复反应。

[0275] 左栏图的仪器计算的 $C_T$ 值如下:曲线1601,40.2;曲线1602,44.7;曲线1603,48.6;五条个体曲线1604:53.6、50.0、52.4、50.9和50.1;五条个体曲线1605:52.9、53.8、61.0、61.7和56.3。右栏图的值如下:曲线1606,37.8;曲线1607,42.4;曲线1608,47.2;五条个体曲线1609:51.1、51.5、54.5、52.4和50.3;五条个体曲线1610:全部是N/A。在没有TMAC的情况下,具有10个突变体拷贝的反应的最高 $C_T$ 为53.6,并且没有突变体拷贝的反应的最低 $C_T$ 为52.9。在70mM TMAC的情况下,具有10个突变体拷贝的反应的最高 $C_T$ 为54.5,并且没有突变体拷贝的反应的最低 $C_T$ 为N/A,即,在杂交和延伸的65个循环内不可测量。

[0276] 实例13.伪液体活组织检查样本中的突变体检测

[0277] 我们使用SuperSelective引物EGFR G719S 32-24-18/14-7:1:0、常规反向引物EGFR G719S、和分子导标SEQ ID No.38进行了一系列测定。反应混合物含有40,000个拷贝的EGFR野生型序列和不同量的EGFR G719S突变体靶序列:0个;4个;40个;400个;4,000个;或40,000个拷贝。除了TMAC浓度为50mM而不是70mM之外,否则,反应混合物如实例11中所述。PCR扩增和检测如实例11中所述。

[0278] 引物序列(加下划线的5'标签序列和桥序列;呈粗体的询问核苷酸):

[0279] SuperSelective正向引物32-24-18/14-7:1:0

[0280] 5'-ACCTGCCGTCAACACGTGCGCAGTAGACCATCTGAGGATCTTGAAGGAAACTG  
AATCACTCTCAATTGAGCACCAGTGCTGA-3' (SEQ ID No. 46)

[0281] EGFR G719S常规反向引物

[0282] 5'-CACCGTGCCGAACGCA-3' (SEQ ID No. 47)

[0283] 图17所示的结果被绘制为阈值循环( $C_T$ )对反应混合物中突变体靶序列的起始数(该轴是对数的)的图。线1701是针对来自含有所示量的突变体靶序列的反应混合物的 $C_T$ 值的线性拟合。那些仪器计算的 $C_T$ 是:对于40,000个拷贝,34.6;对于4,000个拷贝,37.6;对于400个拷贝,40.9;对于40个拷贝,46.8;以及对于4个拷贝,48.7。点线1702是仅含有相应野生型序列的反应混合物的 $C_T$ 值(54.9)。

[0284] 实例14.在不同泡状物的情况下TMAC浓度的作用

[0285] 我们使用SuperSelective引物 and 不同浓度的TMAC (0mM、20mM、40mM以及60mM) 进行了一系列实时PCR测定,该SuperSelective引物具有大的18个核苷酸长的桥序列(与大的18个核苷酸长的间插序列组合),其产生了大的40个核苷酸的周长的对称的泡状物: SuperSelective引物BRAF V600E 32-24-18/18-8:1:1。我们还使用SuperSelective引物进行了一个平行系列实时PCR测定,该SuperSelective引物具有较小的10个核苷酸长的桥序列(与较小的14个核苷酸长的间插序列组合),产生了较小的28个核苷酸的周长的不对称的泡状物: SuperSelective引物BRAF V600E 32-24-10/14-8:1:1。对于每种TMAC浓度,存在用每种引物的两个测定:一个以100,000个拷贝的BRAF V600E突变体靶序列开始,并且一个以100,000个拷贝的相应BRAF V600E野生型序列开始。除引物序列和所述的TMAC和BRAF V600E浓度外,反应混合物如实例11中所述。PCR扩增和检测如实例11中所述。引物序列(加下划线的5'标签序列和桥序列;呈粗体的询问核苷酸)是:

[0286] SuperSelective正向引物BRAF V600E 32-24-18/18-8:1:1

5'-ACCTGCCGTCAACACGTGCGCAGTAGACCATCTGGATCCAGACAACTGTTCAA

[0287] ACTTTCAAACGCATACAATCAGAGATTTCTC-3' (SEQ ID No. 48)

[0288] SuperSelective正向引物BRAF V600E 32-24-10/14-8:1:1

5'-ACCTGCCGTCAACACGTGCGCAGTAGACCATCTCCAGACAACTGTTCAAACTG

[0289] ATGTTCACCATCAGAGATTTCTC-3' (SEQ ID No. 49)

[0290] BRAF V600E常规反向引物

[0291] 5'-TTCTTCATGAAGACCTCACA-3' (SEQ ID NO. 50)

[0292] 获得了以下的 $C_T$ 和 $\Delta C_T$ :

[0293] 表7

		针对含有形成不同大小泡状物的引物的反应观察到的阈值循环 ( $C_T$ )			
引物		TMAC 浓度 (mM)	$10^5$ 个突变体模板	$10^5$ 个野生型模板	$\Delta C_T$
[0294]	<u>32-24-18/18-8:1:1</u>	0	32.5	44.1	11.6
	<u>32-24-18/18-8:1:1</u>	20	29.8	46.7	16.9
	<u>32-24-18/18-8:1:1</u>	40	31.8	54.4	22.6
	<u>32-24-18/18-8:1:1</u>	60	32.7	58.5	26.8
	<u>32-24-10/14-8:1:1</u>	0	33.7	45.1	11.4
	<u>32-24-10/14-8:1:1</u>	20	33.8	46.5	12.7
	<u>32-24-10/14-8:1:1</u>	40	32.9	46.0	13.1
	<u>32-24-10/14-8:1:1</u>	60	32.7	49.7	17.0

[0295] 在图18中,将表7中的 $\Delta C_T$ 值针对TMAC浓度作图,其中线1801针对用引物32-24-18/18-8:1:1获得的 $\Delta C_T$ 值被拟合出,并且线1802针对用引物32-24-10/14-8:1:1获得的 $\Delta$



$C_T$ 值被拟合出。

[0296] 实例15.在不同浓度TMAC的情况下的询问核苷酸的位置。

[0297] 我们研究了与使用也具有十个核苷酸长的足序列但是还具有3' 倒数第二询问核苷酸(8:1:1)的SuperSelective引物的作用相比,不同浓度的TMAC在使用了具有十个核苷酸长的足序列和3'末端询问核苷酸(9:1:0)的SuperSelective引物的突变BRAF V600E的测定中的作用。

[0298] A.SuperSelective引物32-24-14/14-9:1:0

[0299] 全部反应以30- $\mu$ l体积进行,该30- $\mu$ l体积含有50mM KCl、2.5mM  $MgCl_2$ 、20mM Tris-HCl (pH 8.3)、250 $\mu$ M dATP、250 $\mu$ M dCTP、250 $\mu$ M dGTP、250 $\mu$ M dTTP、1.5单位的铂Taq DNA聚合酶(赛默飞世尔科技(ThermoFisher Scientific))、0.5%Tween 20(西格玛公司(Sigma))、300nM的Quasar<sup>®</sup> 670-标记的BRAF V600E特异性分子导标(SEQ ID No.38)用于在每个热循环的退火阶段监控扩增子丰度。在最初的在95℃2min之后,该热循环程序是在95℃15sec、在60℃20sec、以及在72℃20sec的65个重复。

[0300] 反应混合物含有4,000个拷贝的BRAF V600E突变体靶序列和400,000个拷贝的相关的BRAF野生型序列,或仅400,000个拷贝的相关的BRAF野生型序列。在不同的反应混合物中,TMAC的量变化如下:0mM、10mM、20mM、30mM、40mM或50mM。引物浓度是60nM BRAF V600E正向引物和500nM BRAF常规反向引物。

[0301] 引物序列(加下划线的5'标签序列和桥序列;呈粗体的询问核苷酸):

[0302] SuperSelective正向引物32-24-14/14-9:1:0

[0303] 5'-ACCTGCCGTCAACACGTGCGCAGTAGACCAT**CATCCAGACA**ACTGTTCAAAC  
GATTCAAACACAATACCCGAGATTCT-3' (SEQ ID No. 51)

[0304] BRAF V600E常规反向引物

[0305] 5'-TTCTTCATGAAGACCTCACA-3' (SEQ ID NO. 50)

[0306] B.SuperSelective引物32-24-14/14-8:1:1 (SEQ ID No.45)

[0307] 反应混合物和PCR循环如上文A部分所述,除了SuperSelective BRAF V600E正向引物,其为SEQ ID No.45。

[0308] 获得了以下的 $C_T$ 和 $\Delta C_T$ 。

[0309] 表8

	引物	TMAC 浓度 (mM)	观察到的阈值循环 ( $C_T$ )		$\Delta C_T$
			$4 \times 10^3$ 个突变体 加 $4 \times 10^5$ 个野生 型模板	$4 \times 10^5$ 个野生型 模板	
[0310]	<u>32</u> -24-14/14-8 : 1 : 1	0	42.4	43.6	1.2
	<u>32</u> -24-14/14-8 : 1 : 1	10	42.3	45.8	3.5
	<u>32</u> -24-14/14-8 : 1 : 1	20	42.2	44.8	2.6
	<u>32</u> -24-14/14-8 : 1 : 1	30	40.6	44.5	3.9
	<u>32</u> -24-14/14-8 : 1 : 1	40	40.9	46.3	5.4
	<u>32</u> -24-14/14-8 : 1 : 1	50	40.4	47.9	7.5
	<u>32</u> -24-14/14-9 : 1 : 0	0	43.8	48.0	4.2
	<u>32</u> -24-14/14-9 : 1 : 0	10	41.3	48.8	7.5
	<u>32</u> -24-14/14-9 : 1 : 0	20	40.8	49.7	8.9
	<u>32</u> -24-14/14-9 : 1 : 0	30	39.6	54.3	14.7
	<u>32</u> -24-14/14-9 : 1 : 0	40	40.2	56.9	16.7
	<u>32</u> -24-14/14-9 : 1 : 0	50	39.7	N/A	N/A

[0311] 在图19中,将用表8中的SuperSelective引物32-24-14/14-9:1:0的测定的 $C_T$ 值针对TMAC浓度作图,其中线1901是仅含有BRAF野生型序列的样本的,并且线1902是含有BRAF野生型序列加BRAF V600E突变体靶序列的样本的。在图20中,将用表8中的SuperSelective引物32-24-14/14-8:1:1的测定的 $C_T$ 值针对TMAC浓度作图,其中线2001是仅含有BRAF野生型序列的样本的,并且线2002是含有BRAF野生型序列加BRAF V600E突变体靶序列的样本的。在图21中,将表8中的 $\Delta C_T$ 值针对TMAC浓度作图,其中线2101针对用引物32-24-14/14-9:1:0获得的 $\Delta C_T$ 值被拟合出,并且线2102针对用引物32-24-14/14-8:1:1获得的 $\Delta C_T$ 值被拟合出。

[0312] 前述实例和优选的实施例的描述应被视为说明,而不是限制由权利要求限定的本发明。如将容易理解的是,在不偏离如权利要求书中所阐述的本发明的情况下,可以使用上述特征的许多变化和组合。这些变化不视为偏离本发明的范围,并且所有这些变化旨在包括在以下权利要求的范围内。本文所引用的所有参考文献均通过引用以其全文而并入。

## 序列表

	<110> 新泽西州立拉特格斯大学 (RUTGERS, THE STATE UNIVERSITY OF NEW JERSEY)	
	<120> 能够检测密切相关的等位基因的多重核酸 测定方法及其试剂	
	<130> 096747.00339	
	<140> PCT/US2017/026088	
	<141> 2017-04-06	
	<150> 62/319,332	
	<151> 2016-04-07	
	<160> 55	
	<170> PatentIn 3.5版本	
	<210> 1	
	<211> 44	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工序列描述: 合成的引物	
[0001]	<400> 1 tggtgaaaac accgcagcat gtcacacgag tgagccccgg gcgg	44
	<210> 2	
	<211> 45	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工序列描述: 合成的引物	
	<400> 2 ctggtgaaaa caccgcagca tgcgcacga gtgagccctg ggcgg	45
	<210> 3	
	<211> 46	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工序列描述: 合成的引物	
	<400> 3 actggtgaaa acaccgcagc atgttgagc tgtgagcctt ggcgg	46
	<210> 4	

	<p>&lt;211&gt; 45 &lt;212&gt; DNA &lt;213&gt; 人工序列</p> <p>&lt;220&gt; &lt;223&gt; 人工序列描述：合成的引物</p> <p>&lt;400&gt; 4 actggtgaaa acaccgcagc atgttgcacg agtgagcctt gggcg</p>	45
	<p>&lt;210&gt; 5 &lt;211&gt; 45 &lt;212&gt; DNA &lt;213&gt; 人工序列</p> <p>&lt;220&gt; &lt;223&gt; 人工序列描述：合成的引物</p> <p>&lt;400&gt; 5 tggtgaaaac accgcagcat gtcacacgag tgagccacgg gcggg</p>	45
[0002]	<p>&lt;210&gt; 6 &lt;211&gt; 45 &lt;212&gt; DNA &lt;213&gt; 人工序列</p> <p>&lt;220&gt; &lt;223&gt; 人工序列描述：合成的引物</p> <p>&lt;400&gt; 6 ggtgaaaaca ccgcagcatg tcaaacgagt gagccacagg cgggc</p>	45
	<p>&lt;210&gt; 7 &lt;211&gt; 45 &lt;212&gt; DNA &lt;213&gt; 人工序列</p> <p>&lt;220&gt; &lt;223&gt; 人工序列描述：合成的引物</p> <p>&lt;400&gt; 7 gtgaaaacac cgcagcatgt caaggaagtg agccacaagc gggcc</p>	45
	<p>&lt;210&gt; 8 &lt;211&gt; 45 &lt;212&gt; DNA &lt;213&gt; 人工序列</p> <p>&lt;220&gt; &lt;223&gt; 人工序列描述：合成的引物</p> <p>&lt;400&gt; 8</p>	

	tgaaaacacc gcagcatgtc aagacagact gacccaaacg ggcca	45
	<210> 9	
	<211> 41	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工序列描述：合成的引物	
	<400> 9	
	tgaaaacacc gcagcatgtc aagacactca gccctgggcg g	41
	<210> 10	
	<211> 49	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工序列描述：合成的引物	
	<400> 10	
	cgtactggtg aaaacaccgc agcactgacg acaagtgagc cctgggcgg	49
[0003]	<210> 11	
	<211> 49	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工序列描述：合成的引物	
	<400> 11	
	tgaaaacacc gcagcatgtc aagacacacg acaagtgagc cctgggcgg	49
	<210> 12	
	<211> 47	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工序列描述：合成的引物	
	<400> 12	
	ggtgaaaaca ccgcagcatg tcaatccaac aagtgagccc tgggcgg	47
	<210> 13	
	<211> 43	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	

	<220>		
	<223> 人工序列描述：合成的引物		
	<400> 13		
	tactggtgaa aacaccgcag catggacgac gagccctggg cgg		43
	<210> 14		
	<211> 41		
	<212> DNA		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> 人工序列描述：合成的引物		
	<400> 14		
	cgtactggtg aaaacaccgc agcactgacg gccctgggcg g		41
	<210> 15		
	<211> 24		
	<212> DNA		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> 人工序列描述：合成的引物		
[0004]	<400> 15		
	gcatggtatt ctttctcttc cgca		24
	<210> 16		
	<211> 95		
	<212> DNA		
	<213> 智人(Homo sapiens)		
	<400> 16		
	ttctgcatgg tattctttct ctccgcacc cagcagtttg gcccgcccaa aatctgtgat		60
	cttgacatgc tgcggtgttt tcaccagtac gtcc		95
	<210> 17		
	<211> 80		
	<212> DNA		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> 人工序列描述：合成的引物		
	<400> 17		
	acctgccgtc aacacgtgcg cagtagacca tcatgaagac ctcacagtaa aaataggtga		60
	ttcagacca acctacagag		80

	<210> 18	
	<211> 85	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工序列描述：合成的引物	
	<400> 18	
	acctgccgtc aacacgtgcg cagtagacca tcatgaagac ctcacagtaa aaataggtga	60
	ttcttaatag acccaaccta cagag	85
	<210> 19	
	<211> 75	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工序列描述：合成的引物	
	<400> 19	
	acctgccgtc aacacgtgcg cagtagacca tcgacctcac agtaaaaata ggtgattcag	60
	accaaccta cagag	75
[0005]	<210> 20	
	<211> 82	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工序列描述：合成的引物	
	<400> 20	
	acgtgccctc aatacgagcc cccttcacca acatgaagac ctcacagtaa aaataggtga	60
	ttaatggacg gaacctacaa gg	82
	<210> 21	
	<211> 77	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工序列描述：合成的引物	
	<400> 21	
	acgtgccctc aatacgagcc cccttcacca acgacctcac agtaaaaata ggtgattaat	60
	ggacggaacc tacaagg	77

	<210> 22	
	<211> 80	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工序列描述：合成的引物	
	<400> 22	
	acgacccgac aaccgttgct gcgtactgca tcatgaagac ctcacagtaa aaataggtga	60
	ttccacagca cactacagtg	80
	<210> 23	
	<211> 34	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工序列描述：合成的引物	
	<400> 23	
	atcagtggaa aaatagcctc aattcttacc atcc	34
[0006]	<210> 24	
	<211> 79	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工序列描述：合成的引物	
	<400> 24	
	acgacccgac aaccgttgct gcgtactgca tcggaacgta ctggtgaaaa caccgcaa	60
	atgcgcagat cgatcacag	79
	<210> 25	
	<211> 27	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工序列描述：合成的引物	
	<400> 25	
	catggtattc tttctcttcc gcacca	27
	<210> 26	
	<211> 75	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	



	<220>		
	<223>	人工序列描述：合成的引物	
	<400>	26	
		acctgccgtc aacacgtgcg cagtagacca tcagacctca cagtaaaaat aggtgatcag	60
		acccaacgct acaga	75
	<210>	27	
	<211>	77	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	人工序列描述：合成的引物	
	<400>	27	
		acgtgccctc aatacgagcc cccttcacca acagacctca cagtaaaaat aggtgataat	60
		ggacggaacg ctacaag	77
	<210>	28	
	<211>	88	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
[0007]	<220>		
	<223>	人工序列描述：合成的引物	
	<400>	28	
		acctgccgtc aacacgtgcg cagtagacca tcatgaagac ctcacagtaa aaataggtga	60
		ttcaacttaa tagacccaac ctacagag	88
	<210>	29	
	<211>	88	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	人工序列描述：合成的引物	
	<400>	29	
		acgtgccctc aatacgagcc cccttcacca acatgaagac ctcacagtaa aaataggtga	60
		ttaccaata tggacggaac ctacaagg	88
	<210>	30	
	<211>	88	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	

	<220>	
	<223> 人工序列描述：合成的引物	
	<400> 30	
	acctgccgtc aacacgtgcg cagtagacca tccatgaaga cctcacagta aaaataggtg	60
	atcaacttaa tagacccaac gctacaga	88
	<210> 31	
	<211> 88	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工序列描述：合成的引物	
	<400> 31	
	acgtgccctc aatacgagcc cccttcacca accatgaaga cctcacagta aaaataggtg	60
	ataccaata tggacggaac gctacaag	88
	<210> 32	
	<211> 70	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
[0008]	<220>	
	<223> 人工序列描述：合成的引物	
	<400> 32	
	atgaagacct cacagtaaaa ataggtgatt acctgccgtc aacacgtgcg cagtagacca	60
	tcctacagag	70
	<210> 33	
	<211> 70	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工序列描述：合成的引物	
	<400> 33	
	atgaagacct cacagtaaaa ataggtgatt acgtgccctc aatacgagcc cccttcacca	60
	acctacaagg	70
	<210> 34	
	<211> 51	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	

	<220>		
	<223>	人工序列描述：合成的引物	
	<400>	34	
		agacctcaca gtaaaaatag gtgatcacgt tataagaatt aacgtacag a	51
	<210>	35	
	<211>	50	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	人工序列描述：合成的引物	
	<400>	35	
		gacctcacag taaaaatagg tgatacccaa tatagaagga acgctacaag	50
	<210>	36	
	<211>	51	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	人工序列描述：合成的引物	
[0009]	<400>	36	
		agacctcaca gtaaaaatag gtgatcacgt tataagaatt aacctacaga g	51
	<210>	37	
	<211>	51	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	人工序列描述：合成的引物	
	<400>	37	
		agacctcaca gtaaaaatag gtgataccca atatagaagg aacctacaag g	51
	<210>	38	
	<211>	44	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	人工序列描述：合成的探针	
	<400>	38	
		cgcctgacct gccgtcaaca cgtgcgagc agaccatcca ggcg	44

	<p>&lt;210&gt; 39 &lt;211&gt; 44 &lt;212&gt; DNA &lt;213&gt; 人工序列</p> <p>&lt;220&gt; &lt;223&gt; 人工序列描述：合成的探针</p> <p>&lt;400&gt; 39 cgcctgacgt gccctcaata cgagccccct tcaccaacca ggcg</p>	44
	<p>&lt;210&gt; 40 &lt;211&gt; 44 &lt;212&gt; DNA &lt;213&gt; 人工序列</p> <p>&lt;220&gt; &lt;223&gt; 人工序列描述：合成的探针</p> <p>&lt;400&gt; 40 cgcctgacga cccgacaacc gttgctgcgt actgcatcca ggcg</p>	44
[0010]	<p>&lt;210&gt; 41 &lt;211&gt; 41 &lt;212&gt; DNA &lt;213&gt; 人工序列</p> <p>&lt;220&gt; &lt;223&gt; 人工序列描述：合成的探针</p> <p>&lt;400&gt; 41 ccgctgatag gtgatcacgt tataagaatt aacgccagcg g</p>	41
	<p>&lt;210&gt; 42 &lt;211&gt; 39 &lt;212&gt; DNA &lt;213&gt; 人工序列</p> <p>&lt;220&gt; &lt;223&gt; 人工序列描述：合成的探针</p> <p>&lt;400&gt; 42 ccgtgcaggt gatacccaat atagaaggaa cgcgcacgg</p>	39
	<p>&lt;210&gt; 43 &lt;211&gt; 150 &lt;212&gt; DNA &lt;213&gt; 智人</p> <p>&lt;400&gt; 43 aatttaatca gtggaaaaat agcctcaatt cttaccatcc acaaaatgga tccagacaac</p>	60

	tggtcaaact gatgggaccc actccatcga gatttctctg tagctagacc aaaatcacct	120
	atTTTTactg tgaggtcttc atgaagaaat	150
	<210> 44	
	<211> 150	
	<212> DNA	
	<213> 智人	
	<400> 44	
	aatttaatca gtggaaaaat agcctcaatt cttaccatcc acaaaatgga tccagacaac	60
	tggtcaaact gatgggaccc actccatcga gatttccttg tagctagacc aaaatcacct	120
	atTTTTactg tgaggtcttc atgaagaaat	150
	<210> 45	
	<211> 150	
	<212> DNA	
	<213> 智人	
	<400> 45	
	aatttaatca gtggaaaaat agcctcaatt cttaccatcc acaaaatgga tccagacaac	60
	tggtcaaact gatgggaccc actccatcga gatttcactg tagctagacc aaaatcacct	120
[0011]	atTTTTactg tgaggtcttc atgaagaaat	150
	<210> 46	
	<211> 112	
	<212> DNA	
	<213> 智人	
	<400> 46	
	tttgcctcct tctgcatggt attctttctc ttccgcaccc agcagtttgg ccagcccaaa	60
	atctgtgatc ttgacatgct gcggtgtttt caccagtacg ttcttgctg cc	112
	<210> 47	
	<211> 16	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工序列描述：合成的引物	
	<400> 47	
	caccgtgccg aacgca	16
	<210> 48	
	<211> 84	

	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工序列描述：合成的引物	
	<400> 48	
	acctgccgtc aacacgtgcg cagtagacca tctggatcca gacaactgtt caaactttca	60
	aacgcataca atcagagatt tctc	84
	<210> 49	
	<211> 76	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工序列描述：合成的引物	
	<400> 49	
	acctgccgtc aacacgtgcg cagtagacca tctccagaca actgttcaaa ctgatgttca	60
	ccatcagaga tttctc	76
[0012]	<210> 50	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工序列描述：合成的引物	
	<400> 50	
	ttcttcatga agacctcaca	20
	<210> 51	
	<211> 80	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工序列描述：合成的引物	
	<400> 51	
	acctgccgtc aacacgtgcg cagtagacca tcatccagac aactgttcaa actgattcaa	60
	acacaatacc cgagatttct	80
	<210> 52	
	<211> 78	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	

	<220>		
	<223> 人工序列描述：合成的引物		
	<400> 52		
	acctgccgtc aacacgtgcg cagtagacca tccagacaac tgttcaaact gatgggcaaa	60	
	cacatcatcc gatttctc	78	
	<210> 53		
	<211> 20		
	<212> DNA		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> 人工序列描述：合成的引物		
	<400> 53		
	ataggtgatt ttggtctagc	20	
	<210> 54		
	<211> 80		
[0013]	<212> DNA		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> 人工序列描述：合成的引物		
	<400> 54		
	acctgccgtc aacacgtgcg cagtagacca tctccagaca actgttcaaa ctgatgttca	60	
	aacacaatca gagatttctc	80	
	<210> 55		
	<211> 82		
	<212> DNA		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> 人工序列描述：合成的引物		
	<400> 55		
	acctgccgtc aacacgtgcg cagtagacca tctgaggatc ttgaaggaaa ctgaatcact	60	
	ctcaattgag caccagtgt ga	82	





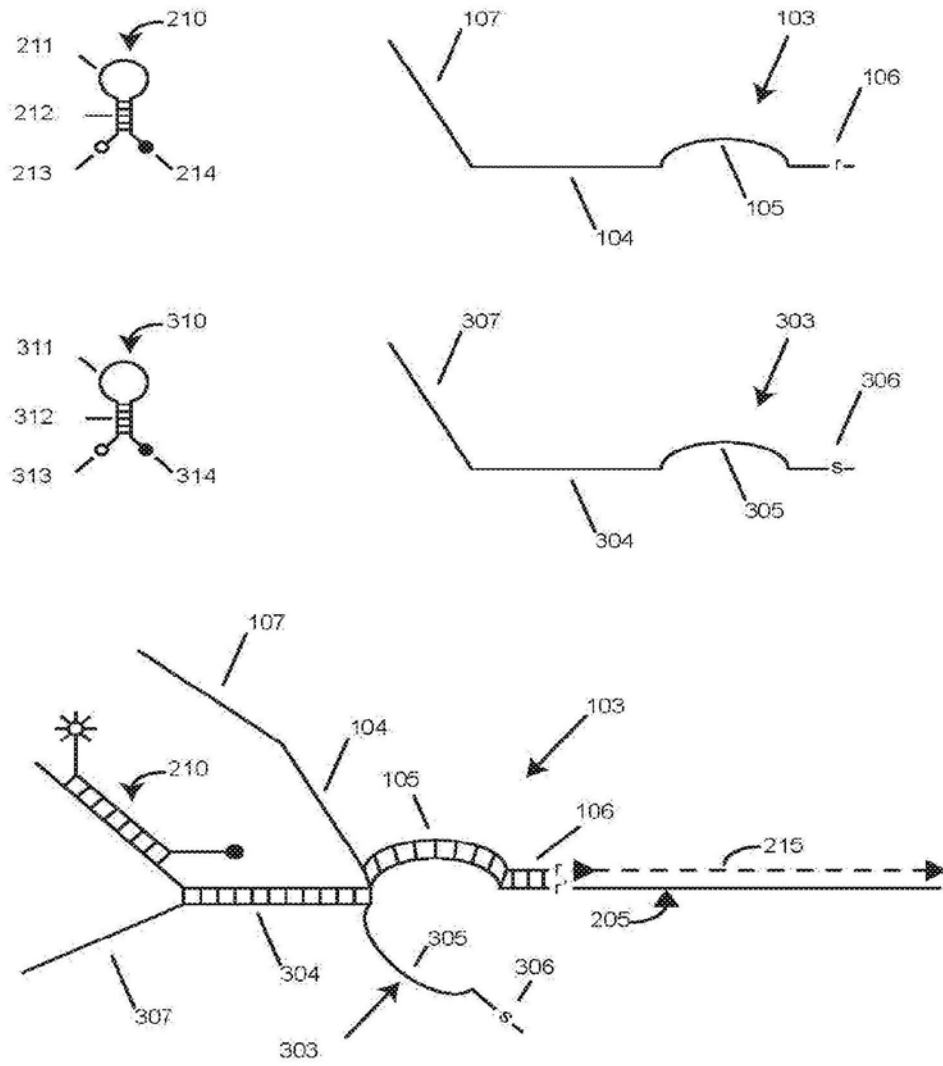


图2

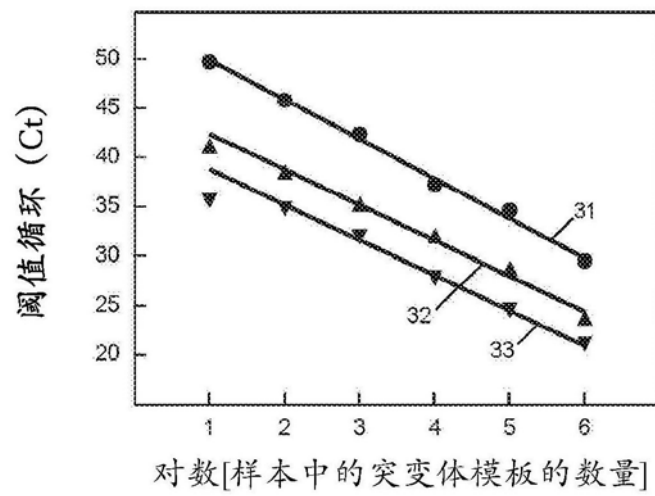


图3

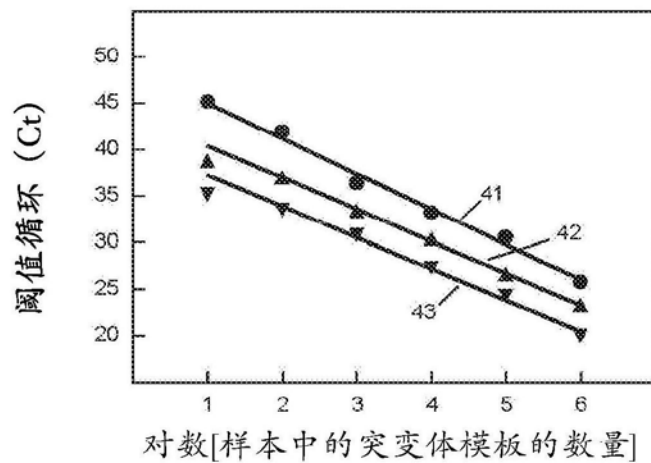


图4

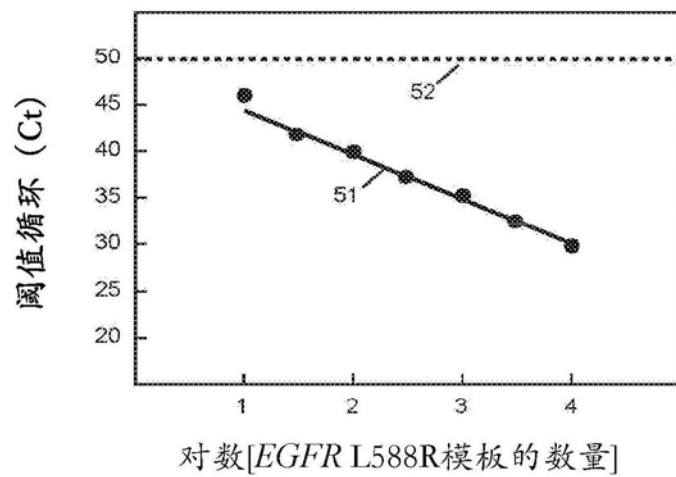
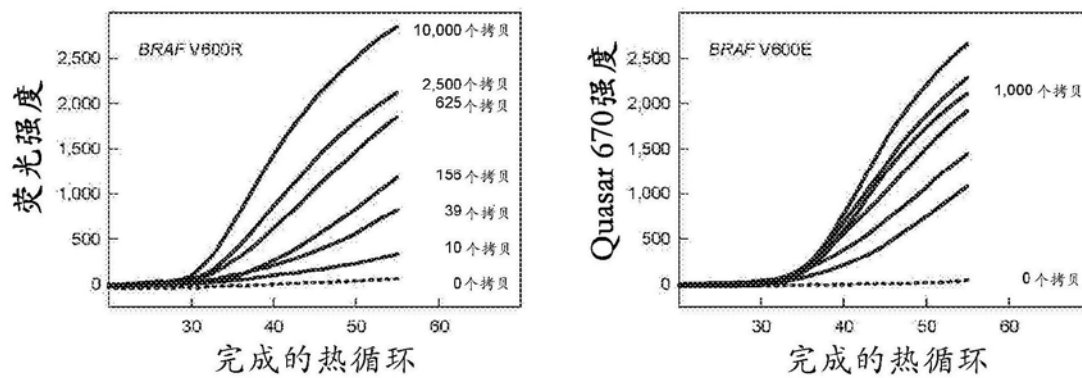


图5

## 对称PCR



## 非对称PCR

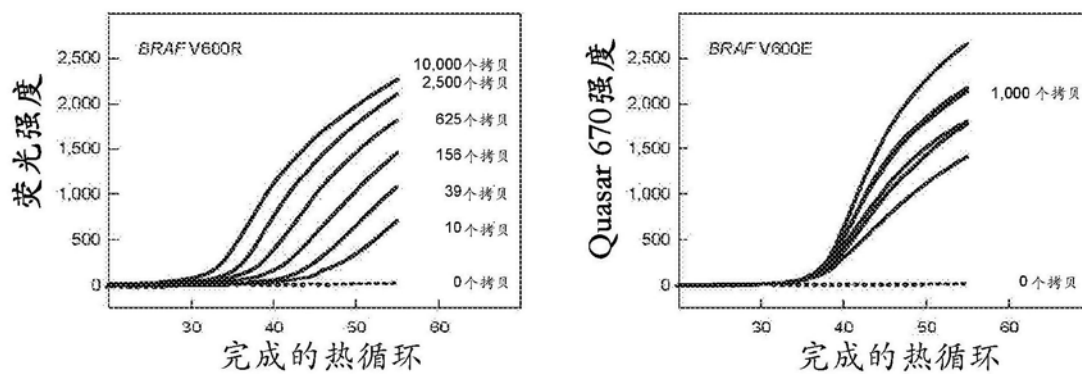


图6

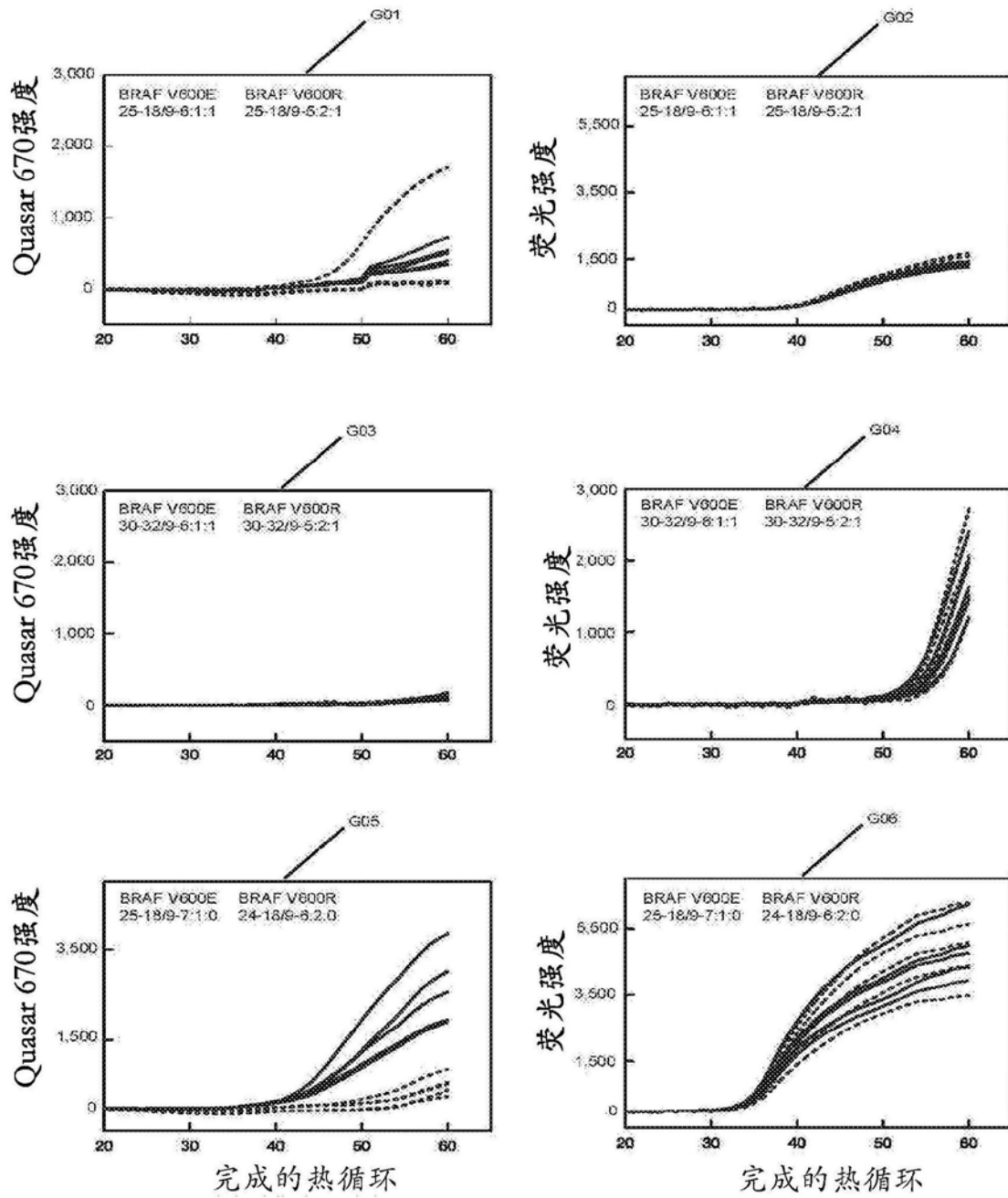


图7

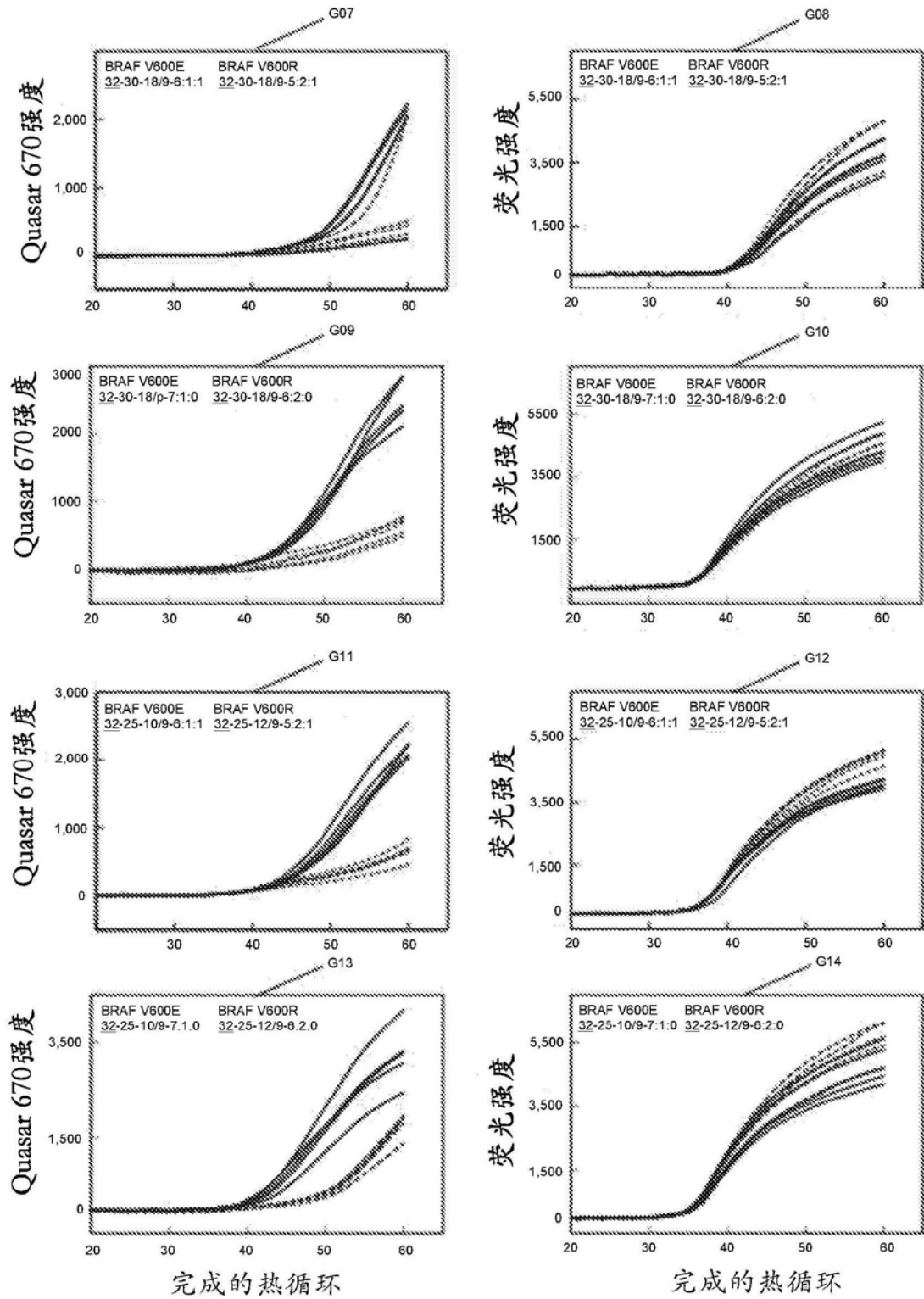


图8

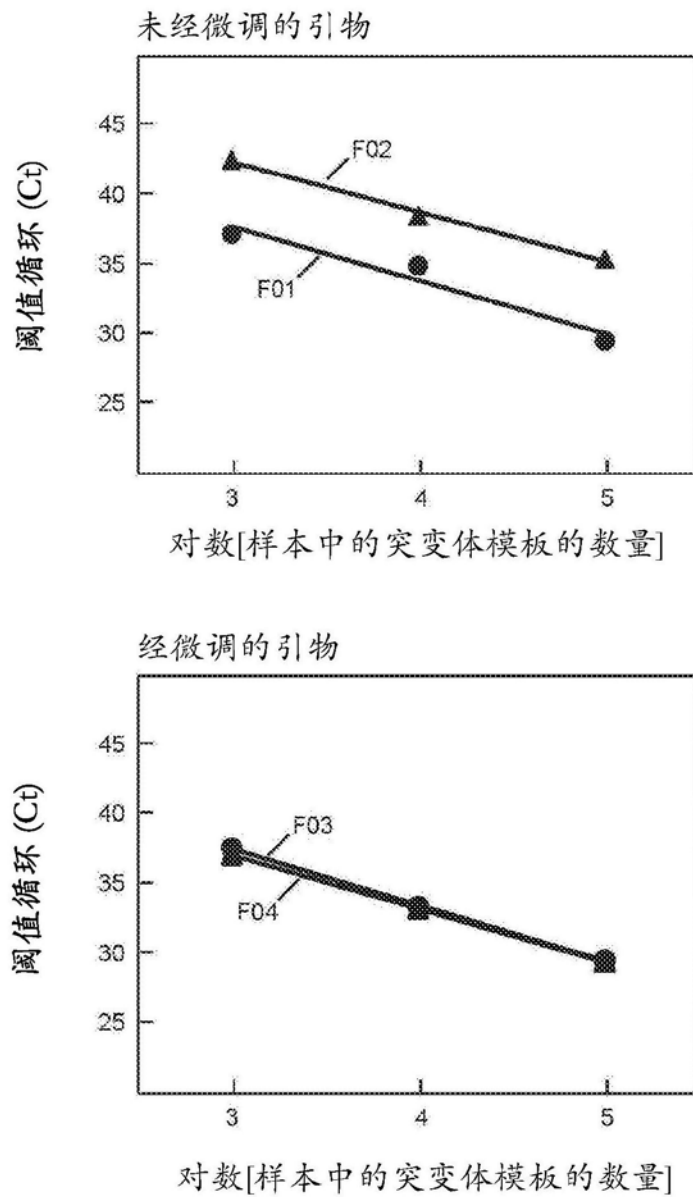


图9

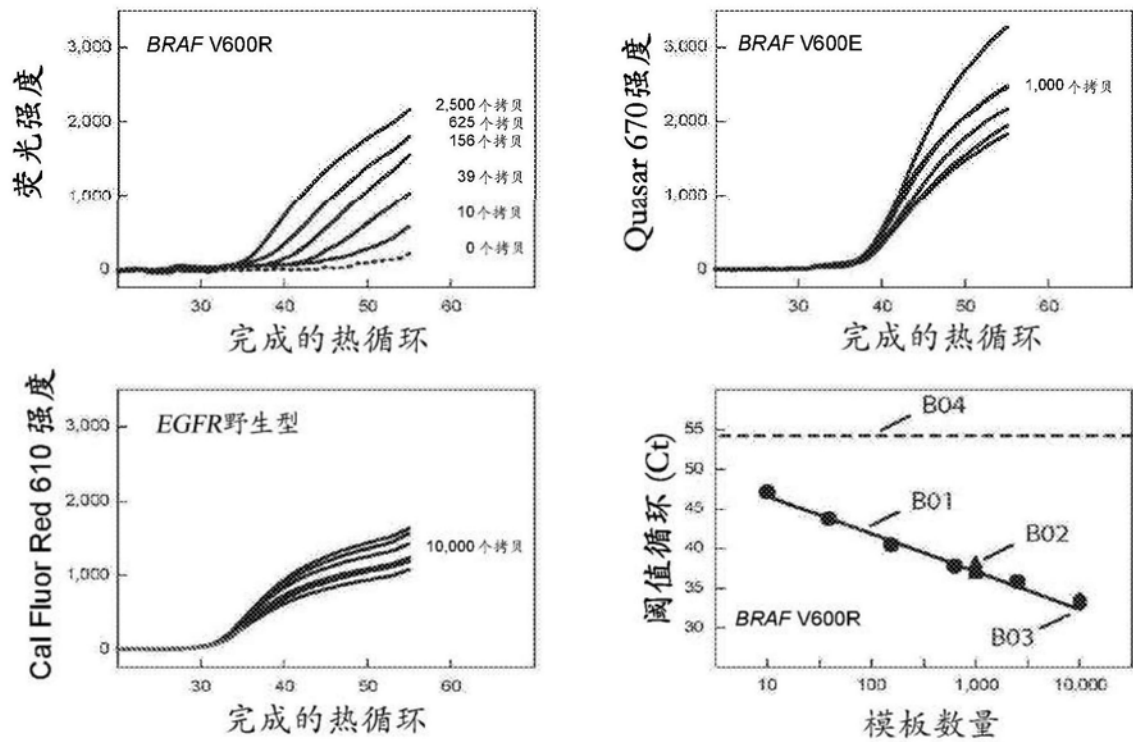


图10

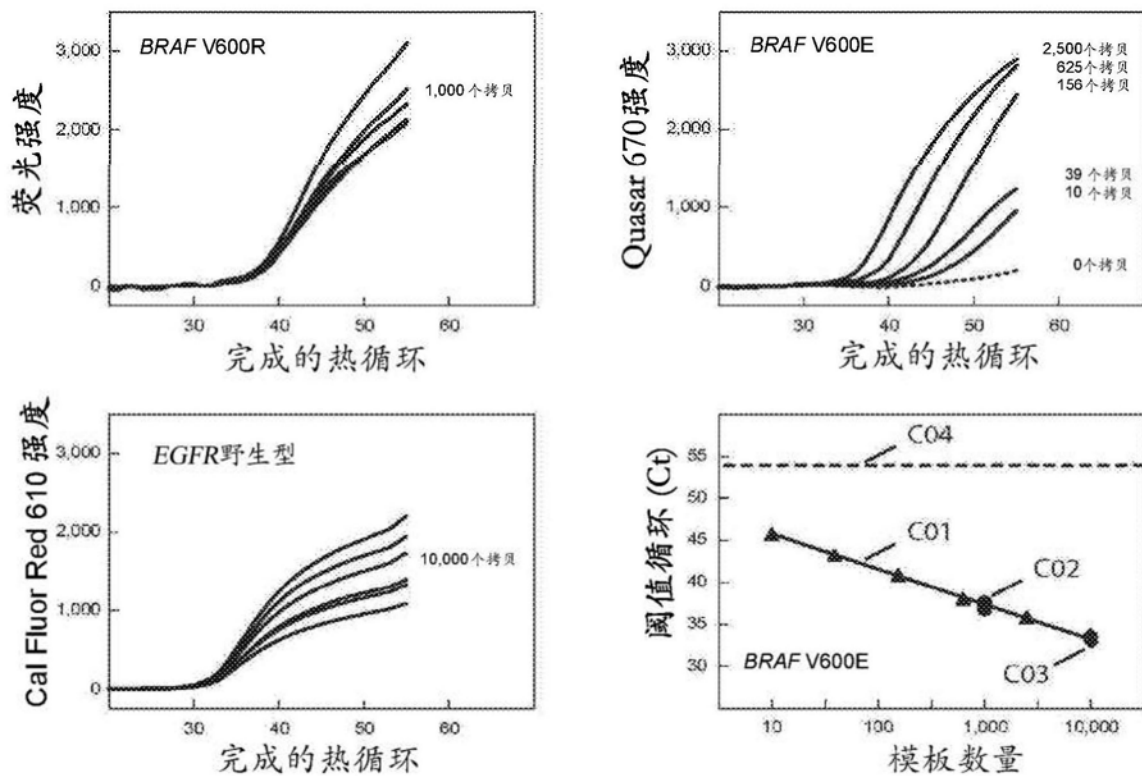


图11

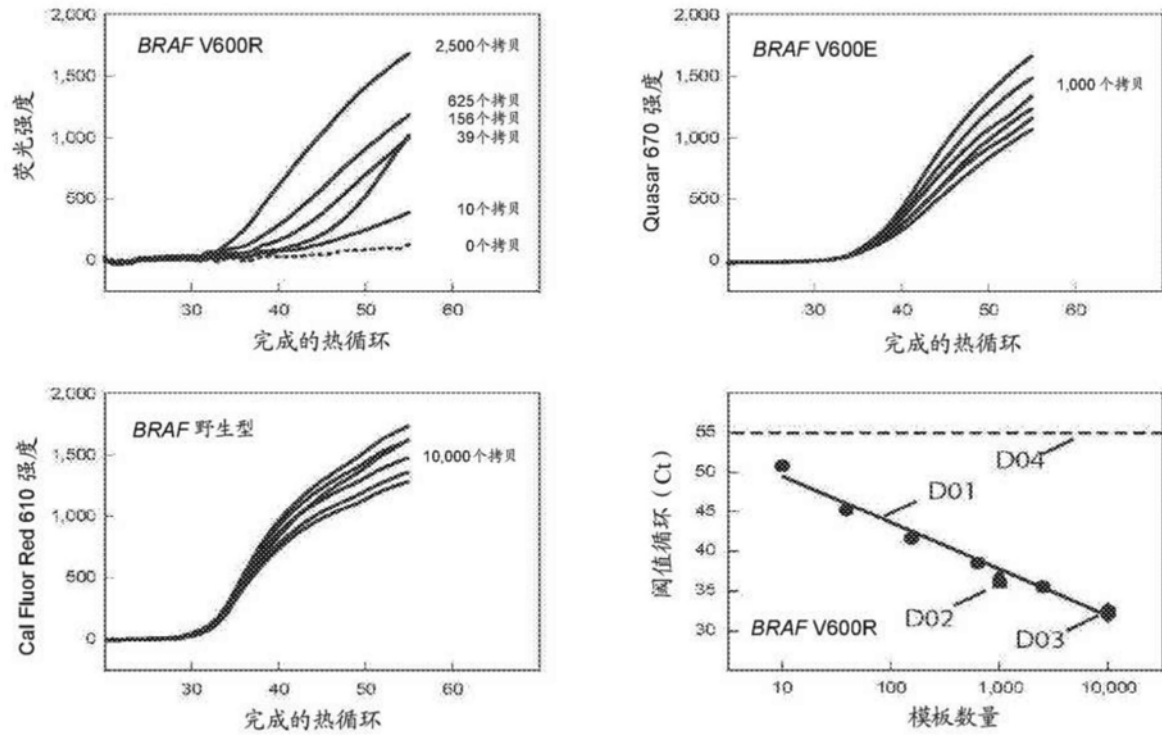


图12

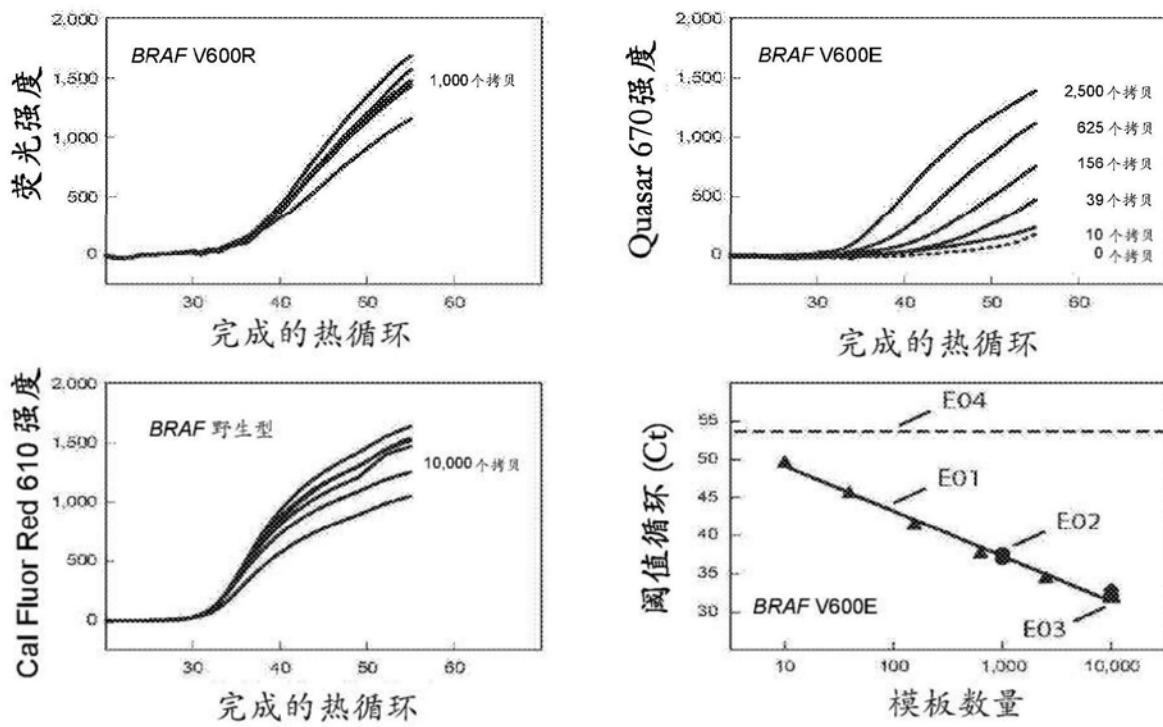


图13



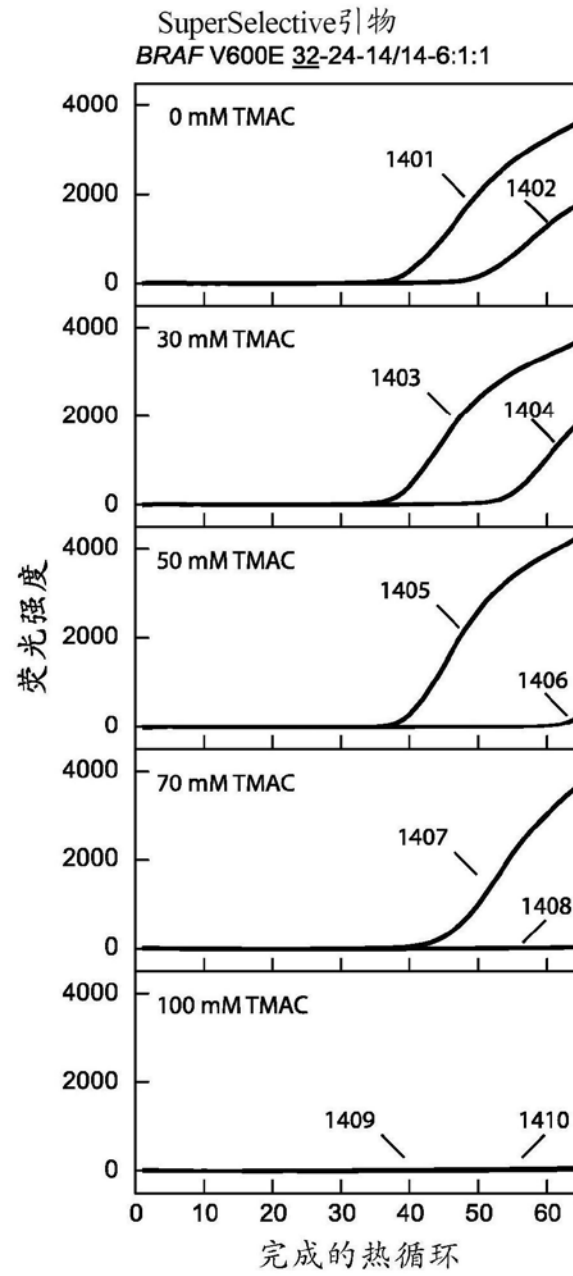


图14

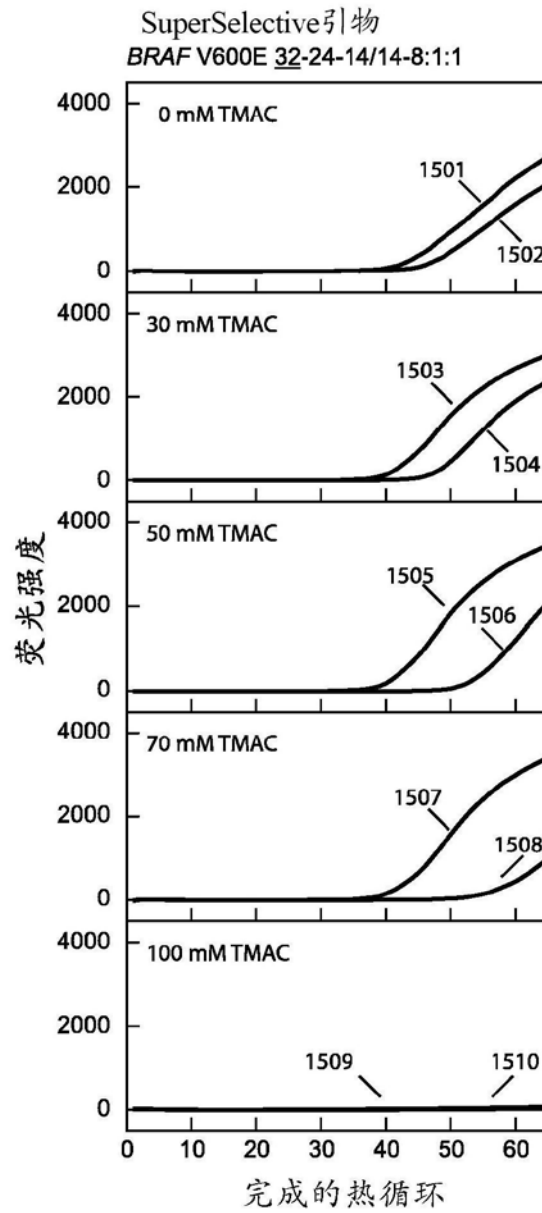


图15

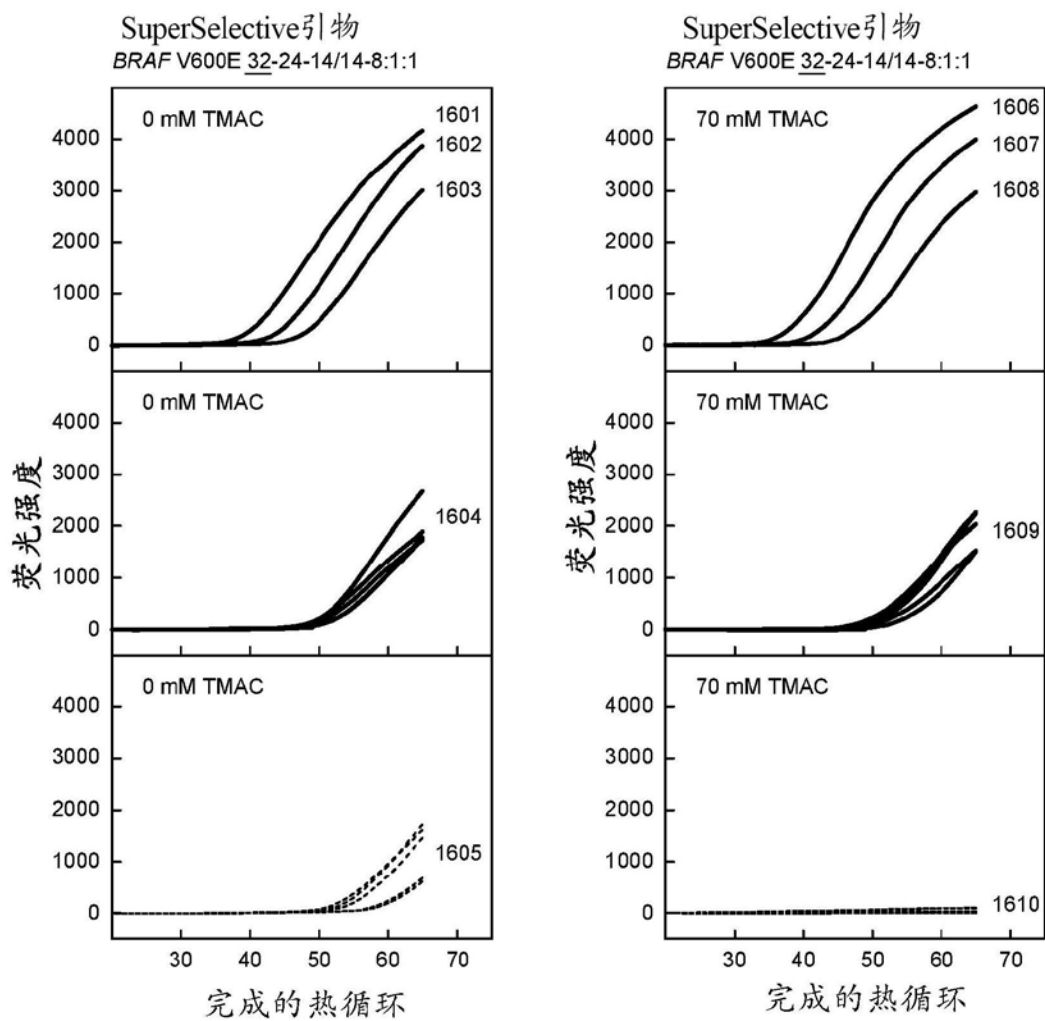


图16

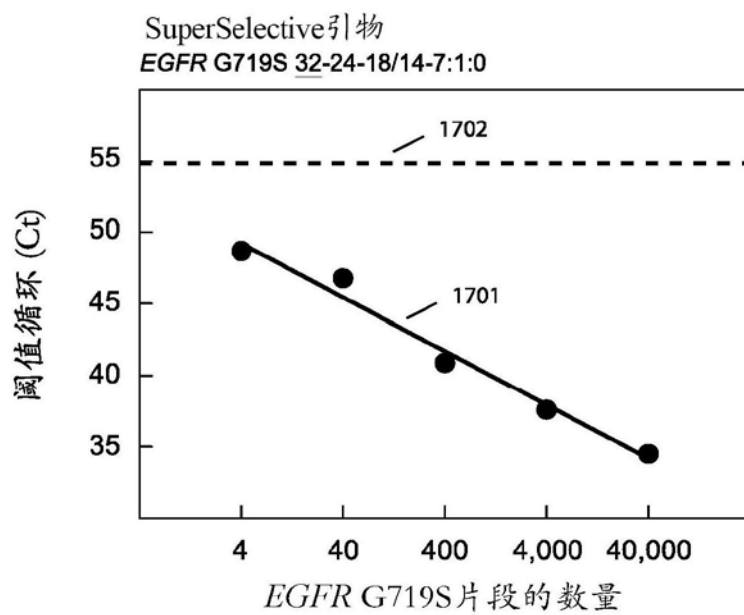


图17

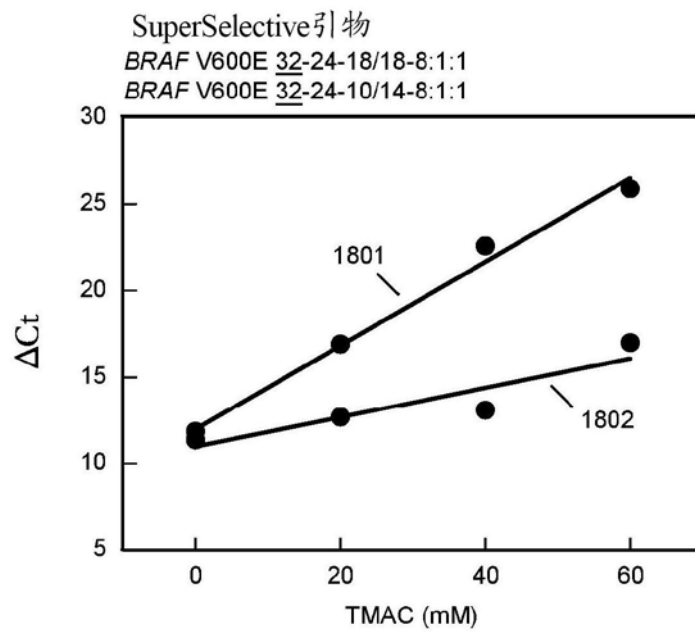


图18

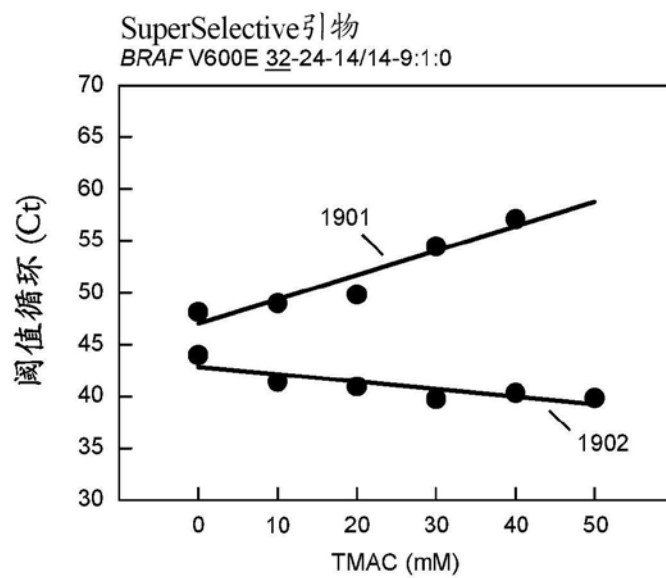


图19

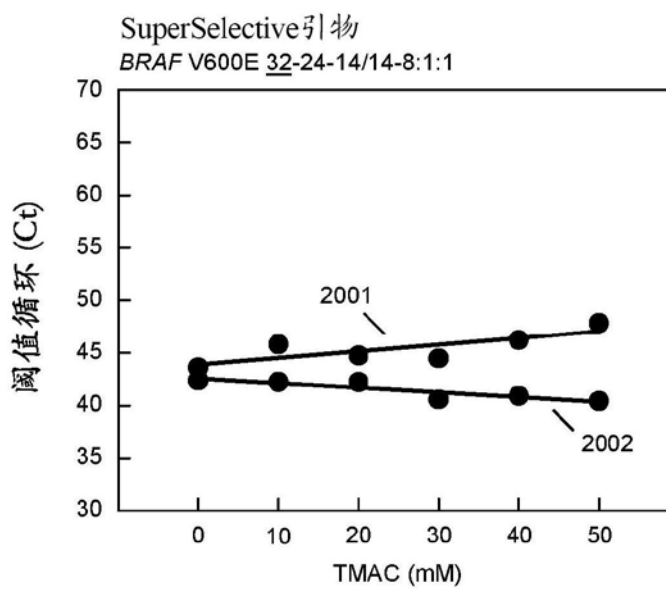


图20

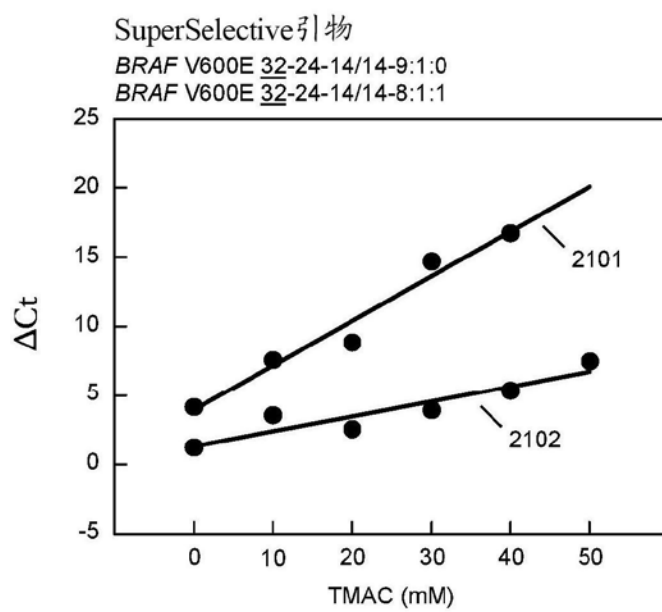


图21