



(21) 申请号 202311375623.2

(22) 申请日 2023.10.23

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 117448422 A

(43) 申请公布日 2024.01.26

(73) 专利权人 复旦大学附属肿瘤医院

地址 200030 上海市徐汇区东安路270号

专利权人 北京橡鑫生物科技有限公司

(72) 发明人 叶定伟 戴波 朱耀 王弘恺

吴俊龙 王旺

(74) 专利代理机构 深圳维启专利代理有限公司

44827

专利代理师 梁师浩

(51) Int. Cl.

C12Q 1/6806 (2018.01)

(56) 对比文件

Amy Oreskovic等.Ultrasensitive hybridization capture: Reliable detection of <1 copy/mL short cell-free DNA from large-volume urine samples.PLOS ONE.2021, 第16卷(第2期),第1-26页.

Amy Oreskovic等.Diagnosing Pulmonary Tuberculosis by Using Sequence-Specific Purification of Urine Cell-Free DNA.Journal of Clinical Microbiology.2021,第59卷(第8期),第1-14页.

审查员 胡百灵

权利要求书1页 说明书10页
序列表(电子公布)

(54) 发明名称

一种基于生物素双探针的尿液中cfDNA富集方法

(57) 摘要

本申请涉及cfDNA富集的技术领域,具体公开了一种基于生物素双探针的尿液中cfDNA富集方法。该方法包括以下步骤:S1、使得目标cfDNA和生物素双探针链霉亲和素磁珠杂交,得到捕获有cfDNA的生物素双探针链霉亲和素磁珠;S2、洗涤捕获有cfDNA的生物素双探针链霉亲和素磁珠;S3、将捕获有目标cfDNA的生物素双探针链霉亲和素磁珠加热变性,孵育后,回收得到目标cfDNA;生物素双探针链霉亲和素磁珠包括链霉亲和素磁珠、双生物素标记探针BP1和双生物素标记探针BP2。本申请的方法能够高效富集尿液样本中的小片段cfDNA。

1. 一种基于生物素双探针的尿液中cfDNA富集方法,其特征在于,包括以下步骤:

S1、使得目标cfDNA和生物素双探针链霉亲和素磁珠杂交,得到捕获有cfDNA的生物素双探针链霉亲和素磁珠;

S2、洗涤捕获有cfDNA的生物素双探针链霉亲和素磁珠以去除非目标cfDNA,得到纯化后的捕获有目标cfDNA的生物素双探针链霉亲和素磁珠;

S3、将纯化后的捕获有目标cfDNA的生物素双探针链霉亲和素磁珠加热变性,降温,孵育,离心,取上清,以回收得到目标cfDNA;

所述生物素双探针链霉亲和素磁珠包括链霉亲和素磁珠、连接在所述链霉亲和素磁珠上的双生物素标记探针BP1、连接在所述链霉亲和素磁珠上的双生物素标记探针BP2;

所述生物素双探针链霉亲和素磁珠的制备方法包括以下步骤:

I、将所述链霉亲和素磁珠和盐缓冲液混合,得到链霉亲和素磁珠悬浮液,所述链霉亲和素磁珠和盐缓冲液的体积比为1:(0.9-1.1);

将所述双生物素标记探针BP1、双生物素标记探针BP2、四氧化三铁修饰生物素以及链霉亲和素磁珠悬浮液混合,使得所述双生物素标记探针BP1的终浓度为45-55 μ M,使得所述双生物素标记探针BP2的终浓度为45-55 μ M,使得所述四氧化三铁修饰生物素的终浓度为15-20 μ M;孵育后除去溶液,得到初始生物素双探针链霉亲和素磁珠;

其中,所述探针BP1包括polyA和与靶标互补的短序列特异性结合序列A,所述探针BP2包括polyA和与靶标互补的短序列特异性结合序列B,所述短序列特异性结合序列A的序列为:CTCAACCAATAAAACCTACTCCTCC,所述短序列特异性结合序列B的序列为:CTAACTTTAAACRCTAACAACGC;

II、将所述初始生物素双探针链霉亲和素磁珠与pH1.2-1.8 5-6M的盐酸胍溶液混合并搅拌,依次以4-5M盐酸胍溶液、3-4M盐酸胍溶液、水置换pH1.2-1.8 5-6M的盐酸胍溶液,除水后,得到生物素双探针链霉亲和素磁珠。

2. 根据权利要求1所述的一种基于生物素双探针的尿液中cfDNA富集方法,其特征在于,制备所述生物素双探针链霉亲和素磁珠时的孵育时间为10-15min。

3. 根据权利要求1所述的一种基于生物素双探针的尿液中cfDNA富集方法,其特征在于,所述初始生物素双探针链霉亲和素磁珠以0.8-1.2:1的体积比和pH1.2-1.8 5-6M的盐酸胍溶液混合并搅拌。

4. 根据权利要求1所述的一种基于生物素双探针的尿液中cfDNA富集方法,其特征在于,所述盐缓冲液的组分包括:0.8-1.2M NaCl,8-13mM Tris-HCl,0.03-0.07wt% Tween-20,以水为溶剂。

5. 根据权利要求1所述的一种基于生物素双探针的尿液中cfDNA富集方法,其特征在于,所述S1中具体包括以下步骤:将目标cfDNA、孵育液A以及生物素双探针链霉亲和素磁珠混合,在88-92 $^{\circ}$ C下加热变性12-18min,所述孵育液A的组分包括:4-6M NaCl溶液和8-12wt%吐温-20溶液,所述NaCl溶液和吐温-20溶液的体积比为(18.5-20.5):1。

6. 根据权利要求1所述的一种基于生物素双探针的尿液中cfDNA富集方法,其特征在于,所述S3中加热变性的温度为92-98 $^{\circ}$ C,加热变性的时间为1-4min。

一种基于生物素双探针的尿液中cfDNA富集方法

技术领域

[0001] 本申请涉及cfDNA富集的技术领域,更具体地说,它涉及一种基于生物素双探针的尿液中cfDNA富集方法。

背景技术

[0002] 目前对cfDNA的富集方法的步骤为:1、提取获得样本中总cfDNA,具体包括使得目标样中的cfDNA和磁性微球结合,随后洗脱后以获得纯化的总cfDNA;2、将总cfDNA进行末端修复和连接接头后和探针杂交,随后进行PCR扩增、纯化和洗脱,得到目标cfDNA。

[0003] 但是以上述方法富集cfDNA时还存在以下不足:在对cfDNA提取时,磁珠提取的方式受到反应体系的限制,因此不适合大体积样品的cfDNA的提取,且该方式难以实现对痕量cfDNA的提取。

[0004] 传统方法中还有基于二氧化硅提取cfDNA的方法,但是其实现cfDNA提取是通过cfDNA吸附到二氧化硅上实现的。DNA和二氧化硅吸附的作用力是:二氧化硅和DNA表面脱水导致的疏水相互作用以及二氧化硅和DNA骨架之间的氢键。也就是说,二者的作用力大小是与DNA片段长度成正比的,这将直接导致对于低于50-100bp的DNA片段是难以回收的。但尿液中由于核酸酶丰富,DNA半衰期短,来源于肿瘤的ctDNA往往以短片段cfDNA的形式存在于尿液中,所以尿液中短片段cfDNA的富集可有效的提升后续检测的准确性、敏感度等性能。

[0005] 综上,以现有方法富集cfDNA时存在难以对大体积、低cfDNA浓度的样品中的目标cfDNA实现有效富集。

发明内容

[0006] 为了提高大体积、低cfDNA浓度的样本中cfDNA富集效果,本申请提供一种基于生物素双探针的尿液中cfDNA富集方法。

[0007] 本申请提供的一种基于生物素双探针的尿液中cfDNA富集方法采用如下的技术方案:一种基于生物素双探针的尿液中cfDNA富集方法,包括以下步骤:

[0008] S1、使得目标cfDNA和生物素双探针链霉亲和素磁珠杂交,得到捕获有cfDNA的生物素双探针链霉亲和素磁珠;

[0009] S2、洗涤捕获有cfDNA的生物素双探针链霉亲和素磁珠以去除非目标cfDNA,得到纯化后的捕获有目标cfDNA的生物素双探针链霉亲和素磁珠;

[0010] S3、将纯化后的捕获有目标cfDNA的生物素双探针链霉亲和素磁珠加热变性,降温,孵育,离心,取上清,以回收得到目标cfDNA;

[0011] 所述生物素双探针链霉亲和素磁珠包括链霉亲和素磁珠、连接在所述链霉亲和素磁珠上的双生物素标记探针BP1、连接在所述链霉亲和素磁珠上的双生物素标记探针BP2。

[0012] 通过采用上述技术方案,本申请的cfDNA富集方法中,引入了双生物素双探针链霉亲和素磁珠来实现富集。生物素双探针链霉亲和素磁珠中的双生物素直接提升了探针和链霉亲和素磁珠的热稳定性,因此将该生物素双探针链霉亲和素磁珠用于cfDNA的富集时,不

需要先提取出样本中总cfDNA后再以探针捕获目标cfDNA。本申请是可以将该生物素双探针链霉亲和素磁珠和含有目标cfDNA的样本混合后直接变性,并在室温捕获目标cfDNA,以提高效率。此外,以双生物素与链霉亲和素的结合作为稳定连接探针和磁珠的桥梁,使得探针和磁珠的连接稳定性更高。另外,以双生物素将两种探针分别稳定连接在链霉亲和素磁珠上,使得多个探针在链霉亲和素磁珠表面能够以较佳的空间分布来降低探针之间的空间位阻,进一步提高探针和磁珠的连接稳定性和并增大探针密度。在将该生物素双探针链霉亲和素磁珠用于大体积、低cfDNA浓度的样本中的小片段cfDNA富集时,其具有靶向性高、特异性强以及回收率高的优点。此外,该富集方法将不会受限于样本中cfDNA含量的多少以及cfDNA的片段大小。另外,本申请的生物素双探针链霉亲和素磁珠用于cfDNA富集时,探针是预先固定在含有生物素的链霉亲和素磁珠上的,这也避免了样本内的内源生物素与探针竞争链霉亲和素磁珠的问题,从而使得链霉亲和素磁珠能够连接更多的探针,进一步提高富集效率。

[0013] 可选的,所述生物素双探针链霉亲和素磁珠的制备方法包括以下步骤:将所述双生物素标记探针BP1、双生物素标记探针BP2和链霉亲和素磁珠悬浮液混合,使得所述双生物素标记探针BP1的终浓度为45-55 μ M,使得所述双生物素标记探针BP2的终浓度为45-55 μ M;

[0014] 孵育,除去溶液,得到生物素双探针链霉亲和素磁珠。

[0015] 进一步可选的,制备所述生物素双探针链霉亲和素磁珠时的孵育时间为10-15min。

[0016] 可选的,所述探针BP1包括polyA和与靶标互补的短序列特异性结合序列A,所述探针BP2包括polyA和与靶标互补的短序列特异性结合序列B;所述短序列特异性结合序列A为15-20nt,所述短序列特异性结合序列B为15-20nt,所述polyA为15-25nt。

[0017] 本申请中,polyA的长度为15-25nt,例如:可以是15nt、18nt、20nt、23nt或25nt。短序列特异性结合序列A的长度为15-20nt,例如:可以是15nt、16nt、17nt、18nt、19nt或20nt。短序列特异性结合序列B的长度为15-20nt,例如:可以是15nt、16nt、17nt、18nt、19nt或20nt。

[0018] 进一步可选的,所述探针BP1和所述探针BP2的3'端均连接有C3阻断剂。

[0019] 本申请中选用的探针只要是能够和靶标互补并特异性结合的短序列均即可,并不限于以下所列举的。

[0020] 可选的,所述目标cfDNA来源于尿液时,所述短序列特异性结合序列A的序列为:CTCAACCAATAAAACCTACTCCTCC;所述短序列特异性结合序列B的序列为:CTAACTTTAAACRCTAACAACGC。

[0021] 本申请中,短序列特异性结合序列A的序列记为SEQ ID NO.1,短序列特异性结合序列B的序列记为SEQ ID NO.2。短序列特异性结合序列B中的R指的是兼并碱基,具体指代A或G”。

[0022] 可选的,所述生物素双探针链霉亲和素磁珠的制备方法包括以下步骤:I、将所述链霉亲和素磁珠和盐缓冲液混合,得到链霉亲和素磁珠悬浮液,所述链霉亲和素磁珠和盐缓冲液的体积比为1:(0.9-1.1);

[0023] 将所述双生物素标记探针BP1、双生物素标记探针BP2、四氧化三铁修饰生物素以

及链霉亲和素磁珠悬浮液混合,使得所述双生物素标记探针BP1的终浓度为45-55 μ M,使得所述双生物素标记探针BP2的终浓度为45-55 μ M,使得所述四氧化三铁修饰生物素的终浓度为15-20 μ M;孵育后除去溶液,得到初始生物素双探针链霉亲和素磁珠;

[0024] II、将所述初始生物素双探针链霉亲和素磁珠与pH1.2-1.8 5-6M的盐酸胍溶液混合并搅拌,依次以4-5M盐酸胍溶液、3-4M盐酸胍溶液、水置换pH1.2-1.8 5-6M的盐酸胍溶液,除水后,得到生物素双探针链霉亲和素磁珠。

[0025] 仅仅将双生物素标记探针BP1、双生物素标记探针BP2以及链霉亲和素磁珠混合后,富集cfDNA;将得到的cfDNA进行检测后,得到的相关基因片段的 Δ Ct值不稳定,重复样本间的 Δ Ct值的差距大于等于1;也就是说对以该方法富集得到的cfDNA进行检测时,平行样本间的稳定性不佳。

[0026] 链霉亲和素是一种非糖基化四聚体蛋白,由四个亚基组成,每个亚基各有一个生物素的结合位点,与生物素的亲和力非常强。以双生物素标记的探针直接和链霉亲和素磁珠混合后,可能一个链霉亲和素分子上的四个生物素结合位点均被占据,其中一种最有可能的情况是:一个链霉亲和素分子上同时连接有两个双生物素标记探针。这种情况下,两个探针在捕获目标cfDNA后会因为探针之间相对较强的空间位阻导致某些探针不能成功捕获目标cfDNA;而有的链霉亲和素分子上仅仅结合有一个探针,空间位阻较小,更能成功捕获目标cfDNA。因此在制备生物素双探针链霉亲和素磁珠时,链霉亲和素上四个亚基结合探针的结果是不确定的,这种不确定性导致将以同一来源样本富集得到的cfDNA用于检测时,平行样本间的检测结果差距大,重复性不好。

[0027] 通过采用上述技术方案,将双生物素标记探针BP1、双生物素标记探针BP2、四氧化三铁修饰生物素以及链霉亲和素磁珠一起混合后又以盐酸胍溶液梯度洗脱的方式获得生物素双探针链霉亲和素磁珠。以该磁珠进行目标cfDNA富集后,在检测富集得到的cfDNA时同一样本的 Δ Ct值小于1,即样本间的稳定性良好。其原因可能在于,以该方式得到的磁珠,一个链霉亲和素分子上连接一个探针,占据了链霉亲和素的两个生物素结合位点;而另外两个生物素结合位点被四氧化三铁修饰生物素占据。因此,在以该生物素双探针链霉亲和素磁珠进行目标cfDNA富集时,探针之间的相对位阻减小,使得探针能够成功捕获cfDNA并进行富集。

[0028] 而以双生物素标记探针BP1、双生物素标记探针BP2和四氧化三铁修饰生物素这三种生物素标记物共同和链霉亲和素磁珠接触后,使得每个链霉亲和素分子上结合有一个双生物素标记探针和一个四氧化三铁修饰生物素,避免结合两个探针。其优势在于:1、避免因为一个链霉亲和素分子上结合两个探针后带来的探针间空间位阻大导致捕获失败的问题;2、使得生物素标记物和链霉亲和素的结合方式相对一致,即一个链霉亲和素分子上结合一个探针和一个四氧化三铁修饰生物素。因此最终能够获得重复样本间相对稳定的检测结果。而以盐酸胍溶液梯度洗脱的过程进一步将结合不稳定的双生物素标记探针以及四氧化三铁修饰生物素洗脱,以保证最终检测结果的稳定性。

[0029] 可选的,所述初始生物素双探针链霉亲和素磁珠以0.8-1.2:1的体积比与pH1.2-1.8 5-6M的盐酸胍溶液混合并搅拌。

[0030] 通过采用上述技术方案,以适当比例将初始生物素双探针链霉亲和素磁珠与pH1.2-1.8 5-6M的盐酸胍溶液混合,以达到较佳洗脱效果的同时不影响二者的结合稳定

性。

[0031] 可选的,所述盐缓冲液的组分包括:0.8-1.2M NaCl,8-13mM Tris-HCl,0.03-0.07wt% Tween-20,以水为溶剂。

[0032] 本申请的盐酸缓冲液中,NaCl的浓度为0.8-1.2M,例如:可以是0.8M、0.9M、1.0M、1.1M或1.2M。Tris-HCl的浓度为8-13mM,例如:可以是8mM、10mM、11mM或13mM。Tween-20的浓度为0.03-0.07wt%,例如:可以是0.03wt%、0.04wt%、0.05wt%、0.06wt%或0.07wt%。

[0033] 可选的,S1中具体包括以下步骤:将目标cfDNA、孵育液A以及生物素双探针链霉亲和素磁珠混合,在88-92°C下加热变性12-18min;随后室温混合25-35min,离心后得到捕获有cfDNA的生物素双探针链霉亲和素磁珠。

[0034] 本申请中,S1中加热变性的温度为88-92°C,例如,可以是88°C、89.5°C、91°C或92°C;加热变性的时间为12-18min,例如,可以是12min、13.5min、15min、16.5min或18min。

[0035] 进一步可选的,孵育液A的组分包括:4-6M NaCl溶液和8-12wt%吐温-20溶液;其中,所述NaCl溶液和吐温-20溶液的体积比为(18.5-20.5):1。

[0036] “8-12wt%吐温-20溶液”的含义是配制吐温-20溶液,使得吐温-20溶液中的质量百分比为8-12%。

[0037] 本申请的孵育液A中的组分,NaCl溶液和吐温-20溶液的体积比为(18.5-20.5):1,例如,NaCl溶液和吐温-20溶液的体积比可以是18.5:1、19:1、19.5:1、20:1或20.5:1。

[0038] 进一步可选的,所述孵育液A和所述生物素双探针链霉亲和素磁珠的体积比为(48-56):1。

[0039] 本申请的孵育液A和所述生物素双探针链霉亲和素磁珠的体积比为(48-56):1,例如,该体积比可以是48:1、50:1、52:1、54:1或56:1。

[0040] 可选的,S2中的洗涤包括以下步骤:

[0041] 将捕获有cfDNA的双生物素双探针链霉亲和素磁珠以所述盐缓冲液洗涤,随后以低盐缓冲液洗涤后得到;所述低盐缓冲液的组分包括:12-18mM NaCl,7-14mM Tris-HCl,溶剂为水。

[0042] 本申请的低盐缓冲液中NaCl的浓度为12-18mM,例如,该浓度可以是12mM、14mM、16mM或18mM;Tris-HCl的浓度为7-14mM,例如,该浓度可以是7mM、9mM、11mM或14mM。

[0043] 可选的,S3中加热变性的温度为92-98°C,加热变性的时间为1-4min。

[0044] 本申请中,S3中加热变性的温度为92-98°C,例如,可以是92°C、94°C、96°C或98°C;加热变性的时间为1-4min,例如,可以是1min、1.8min、2.6min、3.2min或4min。

[0045] 可选的,S3中降温指的是将加热变性的样本置于冰上以实现降温后的低温环境。

[0046] 采用本申请的方法适用于cfDNA的富集,尤其对cfDNA含量低且样本体积大的小片段cfDNA(例如50-100bp甚至是20-50bp的cfDNA片段)的富集。该样本可以是尿液样本但是并不限于仅仅为尿液样本。从尿液样本中获得的富集cfDNA,可以用于前列腺癌、尿路上皮癌等疾病的检测鉴定,但是也不仅仅限于以上疾病的检测鉴定。

[0047] 综上所述,本申请具有以下有益效果:

[0048] 1、本申请的生物素双探针链霉亲和素磁珠中由于双生物素的引入,直接提升了探针和链霉亲和素磁珠的热稳定性,因此可以将该磁珠直接加入样本中变性并和目标cfDNA杂交,直接节约了cfDNA提取的时间,因此富集过程更加高效。

[0049] 2、本申请的生物素双探针链霉亲和素磁珠克服了常规探针因空间位阻和静电排斥带来的探针密度低的问题,显著提高探针密度。

[0050] 3、本申请的生物素双探针链霉亲和素磁珠上双探针系统兼容双链DNA捕获,克服了常规探针仅仅能针对单链DNA回收,即只能回收一半的可用分子,无法对靶标每条互补链都回收的技术局限性。

[0051] 4、本申请的生物素双探针链霉亲和素磁珠上的探针在和目标cfDNA杂交前就将探针通过双生物素预先固定在链霉亲和素磁珠上,该方式能够避免在杂交时,连接有生物素的探针与内源性生物素竞争,以减少链霉亲和素磁珠的消耗,进而扩大反应体系的规模。

[0052] 5、针对尿液这种能够获得大体积样本但是cfDNA浓度低的类型的样本,本申请的双生物素双探针链霉亲和素磁珠能够靶向、特异性以及大量捕获样本中的短序列、低浓度的目标cfDNA,其cfDNA的回收率高并且拷贝数大。

[0053] 6、本申请使得双生物素标记探针BP1、双生物素标记探针BP2、四氧化三铁修饰生物素以及链霉亲和素磁珠共同接触,通过四氧化三铁修饰生物素对链霉亲和素中生物素结合位点的占位,在一定程度上避免一个链霉亲和素分子上结合两个探针的情况,使得链霉亲和素与探针的结合结果更加唯一确定,以进一步降低探针间的空间位阻,保证探针能够有效捕获cfDNA,最终提高同一样本平行样本间检测结果的稳定性和准确性。

具体实施方式

[0054] 以下结合实施例对本申请作进一步详细说明,予以特别说明的是:以下实施例中未注明具体条件者,按照常规条件或制造商建议的条件进行,以下实施例中所用原料除特殊说明外均可来源于普通市售。

[0055] 制备例1

[0056] 本制备例的生物素双探针链霉亲和素磁珠针对的是尿液上清中GSTP1基因(GRCh37,chr11:67118615-67118704)目标区域以及APC基因(chr15:112737761-112737851)目标区域进行捕获。

[0057] 生物素双探针链霉亲和素磁珠的制备方法,具体步骤为:

[0058] 1)、原料准备:1-1)、探针设计:

[0059] 设计双生物素标记探针BP1,其结构为:5' 双生物素修饰-polyA-短序列特异性结合序列A-C3阻断剂-3',该探针用于捕获GSTP1基因(GRCh37,chr11:67118615-67118704)目标区域,其中短序列特异性结合序列A的序列如SEQ ID NO.1所示,具体序列为:CTCAACCAATAAAACCTACTCCTCC,即双生物素标记探针BP1的结构为:5' 双生物素修饰-polyA-CTCAACCAATAAAACCTACTCCTCC-C3阻断剂-3'。设计双生物素标记探针BP2,其结构为:5' 双生物素修饰-polyA-短序列特异性结合序列B-C3阻断剂-3',该探针用于捕获APC基因(chr15:112737761-112737851)目标区域,其中短序列特异性结合序列B的序列如SEQ ID NO.1所示,具体序列为:CTAACTTTAAACRCTAACAAACGC,即双生物素标记探针BP1的结构为:5' 双生物素修饰-polyA-CTAACTTTAAACRCTAACAAACGC-C3阻断剂-3'。polyA的大小为20nt。双生物素标记探针BP1和双生物素标记探针BP2均委托IDT埃德特公司(Integrated DNA Technologies, Inc.)合成得到。

[0060] 1-2)、链霉亲和素磁珠悬浮液制备:

[0061] A、将链霉亲和素磁珠在室温下平衡30min;随后将链霉亲和素磁珠涡旋混匀15s,并在1.5mL的离心管分装50 μ L链霉亲和素磁珠,即链霉亲和素磁珠的实验量为50 μ L/反应。

[0062] B、然后加50 μ L盐缓冲液于离心管中,涡旋10s,将离心管放回磁力架,吸附到溶液澄清后弃上清;其中,盐缓冲液的组分为:1M NaCl,10mM Tris-HCl,0.05wt% Tween-20,水为溶剂。

[0063] C、重复“B”两次,共计洗涤三次。

[0064] D、以50 μ L盐缓冲液重旋链霉亲和素磁珠,得到链霉亲和素磁珠悬浮液。

[0065] 2)、双生物素双探针链霉亲和素磁珠制备

[0066] E、将双生物素标记探针BP1、双生物素标记探针BP2和链霉亲和素磁珠悬浮液混合,使得双生物素标记探针BP1的终浓度为50 μ M,使得双生物素标记探针BP2的终浓度为50 μ M,随后立即涡旋5s,然后在室温孵育15min。

[0067] F、加50 μ L盐缓冲液(盐缓冲液的组分为:1M NaCl,10mM Tris-HCl,0.05wt% Tween-20,水为溶剂),涡旋10s,随后将离心管放回磁力架,吸附到溶液澄清后弃上清。

[0068] G、重复“F”两次,以盐缓冲液共计洗涤三次。

[0069] H、加50 μ L盐缓冲液(盐缓冲液的组分为:1M NaCl,10mM Tris-HCl,0.05wt% Tween-20,水为溶剂),得到双生物素双探针链霉亲和素磁珠,该双生物素双探针链霉亲和素磁珠悬浮于盐缓冲液中。

[0070] 制备例2

[0071] 本制备例和制备例1的区别在于,制备得到的是双生物素单探针链霉亲和素磁珠,所用探针仅仅为双生物素标记探针BP1,即本制备例的探针仅仅捕获尿液上清中GSTP1基因(GRCh37,chr11:67118615-67118704)目标区域。

[0072] 双生物素单探针链霉亲和素磁珠的制备方法,具体步骤为:

[0073] 本对比例针对的是尿液上清中GSTP1基因(GRCh37,chr11:67118615-67118704)目标区域进行捕获。

[0074] 一种cfDNA富集用双生物素单探针链霉亲和素磁珠,其制备方法为:

[0075] 步骤一、原料准备:

[0076] (1)、探针设计。

[0077] 设计双生物素标记探针BP1,其结构同制备例1,其结构为:5' 双生物素修饰-polyA-CTCAACCAATAAAACCTACTCCTCC-C3阻断剂-3'。双生物素标记探针BP1委托IDT埃德特公司(Integrated DNA Technologies, Inc.)合成得到。

[0078] (2)、链霉亲和素磁珠悬浮液制备,具体步骤同制备例1的方法步骤1-2)。

[0079] 步骤二、双生物素单探针链霉亲和素磁珠制备

[0080] E、将双生物素标记探针BP1和链霉亲和素磁珠悬浮液混合,使得双生物素标记探针BP1的终浓度为50 μ M,随后立即涡旋5s,然后在室温孵育15min。

[0081] 步骤F-H同制备例1,得到双生物素单探针链霉亲和素磁珠,该双生物素单探针链霉亲和素磁珠悬浮于盐缓冲液中。

[0082] 制备例3

[0083] 本制备例和制备例1的区别在于,制备得到的是双生物素单探针链霉亲和素磁珠,所用探针仅仅为双生物素标记探针BP2。

- [0084] 双生物素单探针链霉亲和素磁珠的制备方法,具体步骤为:
- [0085] 本对比比例针对的是尿液上清中APC基因(chr15:112737761-112737851)目标区域进行捕获。
- [0086] 一种cfDNA富集用双生物素单探针链霉亲和素磁珠,其制备方法为:
- [0087] 步骤一、原料准备:
- [0088] (1)、探针设计。
- [0089] 设计双生物素标记探针BP2,其结构同制备例1,具体为:5' 双生物素修饰-polyA-CTAACTTTAAACRCTAACAAACGC-C3阻断剂-3'。双生物素标记探针BP2委托IDT埃德特公司(Integrated DNATechnologies, Inc.)合成得到。
- [0090] (2)、链霉亲和素磁珠悬浮液制备,具体步骤同制备例1的方法步骤1-2)。
- [0091] 步骤二、双生物素单探针链霉亲和素磁珠制备
- [0092] E、将双生物素标记探针BP2和链霉亲和素磁珠悬浮液混合,使得双生物素标记探针BP2的终浓度为50 μ M,随后立即涡旋5s,然后在室温孵育15min。
- [0093] 步骤F-H同制备例1,得到双生物素单探针链霉亲和素磁珠,该双生物素单探针链霉亲和素磁珠悬浮于盐缓冲液中。
- [0094] 实施例1
- [0095] 本实施例针对的是尿液上清中GSTP1基因(GRCh37,chr11:67118615-67118704)目标区域以及APC基因(chr15:112737761-112737851)目标区域进行捕获。
- [0096] 一种基于生物素双探针的尿液中cfDNA富集方法,具体步骤为:
- [0097] S1、捕获有cfDNA的生物素双探针链霉亲和素磁珠的制备
- [0098] 使得目标cfDNA和生物素双探针链霉亲和素磁珠杂交,得到捕获有cfDNA的生物素双探针链霉亲和素磁珠。具体步骤如下:
- [0099] S11、尿液cfDNA的制备
- [0100] 1)、准备15mL离心管,加入500 μ L 0.5M EDTA和100 μ L 1M Tris-HCl,混匀。将尿液收集至无菌容器中;收集尿液后,将10mL尿液样本加入至准备好的15mL离心管中,颠倒混匀。
- [0101] 2)、随后离心,离心条件为8000g、5min。
- [0102] 3)、离心后将上清转移至新的15mL离心管中待实验并在-80 $^{\circ}$ C条件下保存。
- [0103] S12、捕获尿液上清中的目标cfDNA
- [0104] 4)、取S11得到的上清液(含有目标cfDNA)10mL,加入2.5mL 5M NaCl、127 μ L10wt% Tween-20和50 μ L制备例1制备得到的生物素双探针链霉亲和素磁珠混合在15mL离心管中,颠倒混匀。
- [0105] 5)、随后将15mL离心管放至水浴锅中,在90 $^{\circ}$ C下孵育15min。
- [0106] 6)、结束后将15mL离心管固定在垂直混匀仪上,室温混匀30min。垂直混匀仪上取下离心管,在5000g、离心5min的条件下离心,吸弃上清后,得到捕获有cfDNA的生物素双探针链霉亲和素磁珠。
- [0107] S2、洗涤捕获有cfDNA的生物素双探针链霉亲和素磁珠以去除非目标cfDNA,得到纯化后的捕获有目标cfDNA的生物素双探针链霉亲和素磁珠。具体步骤如下7)至10):
- [0108] 7)、将S1得到的捕获有cfDNA的生物素双探针链霉亲和素磁珠全部置于1.5mL离心

管中,然后加入1mL高盐缓冲液以悬浮捕获有cfDNA的生物素双探针链霉亲和素磁珠。

[0109] 8)、将7)中得到的1.5mL离心管放置在磁力架静置1min,待溶液澄清后,弃上清。

[0110] 9)、随后于经过8)处理后的1.5mL离心管加入1mL高盐缓冲液,吹吸混匀,瞬时离心,再放置在磁力架静置1min,待溶液澄清后,彻底弃吸上清。

[0111] 10)、最后加入1mL低盐缓冲液至9)处理后的1.5mL离心管中,吹吸混匀,瞬时离心,放置在磁力架静置1min,待溶液澄清后,彻底弃吸上清。

[0112] 其中,高盐缓冲液的组分为:1M NaCl、10mM Tris-HCl和0.05wt% Tween-20,溶剂为水;低盐缓冲液的组分为:15mM NaCl和10mM Tris-HCl,溶剂为水。

[0113] 通过S2将捕获有cfDNA的生物素双探针链霉亲和素磁珠洗涤以去除非目标cfDNA,得到纯化后的捕获有目标cfDNA的生物素双探针链霉亲和素磁珠。

[0114] S3、将纯化后的捕获有目标cfDNA的生物素双探针链霉亲和素磁珠加热变性,随后在低温环境中孵育后,取上清,以回收得到目标cfDNA。具体步骤如下11)至13):11)、于S2最终得到的纯化后的捕获有目标cfDNA的生物素双探针链霉亲和素磁珠中加入20 μ L的无核酸酶水,重悬磁珠,将重悬的磁珠转移至新的0.2mL PCR管中,使用PCR仪在95 $^{\circ}$ C下变性2min。

[0115] 12)、变性结束后,无需降温,立即将0.2mL PCR管放置在冰盒上孵育3min。

[0116] 13)、孵育完成后,将0.2mL PCR管放置磁力架上,静置1min,待溶液澄清后,将上清转移至新的1.5mL低吸附离心管中,该离心管中即含有目标cfDNA。

[0117] S4、以S3最终回收得到的目标cfDNA为模板进行qPCR扩增,以富集cfDNA,进行qPCR扩增时以常规方法进行即可。

[0118] 对比例1尿液中cfDNA富集的方法

[0119] 一种尿液中cfDNA富集的方法,和实施例1的区别在于,以等体积的制备例2制备得到的双生物素单探针链霉亲和素磁珠替换制备例1制备得到的生物素双探针链霉亲和素磁珠,其他同实施例1。

[0120] 对比例2尿液中cfDNA富集的方法

[0121] 一种尿液中cfDNA富集的方法,和实施例1的区别在于,以等体积的制备例3制备得到的双生物素单探针链霉亲和素磁珠替换制备例1制备得到的生物素双探针链霉亲和素磁珠,其他同实施例1。

[0122] 性能检测试验

[0123] 1、拷贝数测定

[0124] 对加入1000拷贝、50nt单链DNA的1mL尿液样本,进行靶向捕获,3个技术重复。通过qPCR定量测定其拷贝数,结果发现:实施例1通过双探针系统捕获dsDNA的两条链,其拷贝数为9950拷贝,对比例1的拷贝数为7300,对比例2的拷贝数为8400。实施例1富集方法得到的基因拷贝数是对比例1的1.36倍,也是对比例2的1.18倍。

[0125] 2、回收率测定

[0126] 对加入1000拷贝、50nt单链DNA的1mL尿液样本,进行靶向捕获,通过qPCR定量测定实施例1、对比例1和对比例2的cfDNA的拷贝数并计算回收率(回收率% = qPCR定量得到的拷贝数/初始拷贝数 \times 100%, 初始拷贝数为1000),对比例1的回收率为73%,对比例2的回收率为84%,实施例1的回收率为99.5%。由此可见本申请方法富集对大体积、低cfDNA浓度的尿液样本中小片段cfDNA的富集、回收效果优异。

[0127] 制备例4

[0128] 本制备例的生物素双探针链霉亲和素磁珠针对的是尿液上清中GSTP1基因 (GRCh37, chr11:67118615-67118704) 目标区域以及APC基因 (chr15:112737761-112737851) 目标区域进行捕获。

[0129] 生物素双探针链霉亲和素磁珠的制备方法,具体步骤为:

[0130] I、将链霉亲和素磁珠和盐缓冲液混合,得到链霉亲和素磁珠悬浮液。将双生物素标记探针BP1、双生物素标记探针BP2、四氧化三铁修饰生物素以及链霉亲和素磁珠悬浮液混合;孵育后除去溶液,得到初始生物素双探针链霉亲和素磁珠。具体步骤如下I-I)至I-III)。

[0131] I-I)、探针设计:

[0132] 设计双生物素标记探针BP1和双生物素标记探针BP2,具体同实施例1。

[0133] I-II)、链霉亲和素磁珠悬浮液制备,具体步骤同实施例1。

[0134] I-III)、初始生物素双探针链霉亲和素磁珠制备

[0135] E、将双生物素标记探针BP1、双生物素标记探针BP2、四氧化三铁修饰生物素(购自西安齐岳生物有限公司,95wt%纯度)和链霉亲和素磁珠悬浮液混合,使得双生物素标记探针BP1的终浓度为50 μ M,使得双生物素标记探针BP2的终浓度为50 μ M,四氧化三铁修饰生物素的终浓度为18 μ M,随后立即涡旋5s,然后在室温孵育15min,随后将离心管放回磁力架,吸附到溶液澄清后弃上清,得到初始生物素双探针链霉亲和素磁珠。

[0136] II、将初始生物素双探针链霉亲和素磁珠与盐酸胍溶液混合并搅拌,并以盐酸胍溶液梯度洗脱,得到生物素双探针链霉亲和素磁珠。具体步骤如F至L所示。

[0137] F、将50 μ L初始生物素双探针链霉亲和素磁珠和50 μ L pH1.5 5.5M的盐酸胍溶液混合,随后立即涡旋10s;将离心管放回磁力架,吸附到溶液澄清后弃上清。

[0138] G、于F的离心管中加50 μ L 4.5M的盐酸胍溶液混合,随后立即涡旋10s;将离心管放回磁力架,吸附到溶液澄清后弃上清。

[0139] H、于G的离心管中加50 μ L 3.5M的盐酸胍溶液混合,随后立即涡旋10s;将离心管放回磁力架,吸附到溶液澄清后弃上清。

[0140] I、于H的离心管中加50 μ L无核酸酶水混合,随后立即涡旋10s;将离心管放回磁力架,吸附到溶液澄清后弃上清。

[0141] J、于I的离心管中加50 μ L盐缓冲液(盐缓冲液的组分为:1M NaCl,10mM Tris-HCl,0.05wt% Tween-20,水为溶剂),涡旋10s;将离心管放回磁力架,吸附到溶液澄清后弃上清。

[0142] K、重复“J”两次,以盐缓冲液共计洗涤三次。

[0143] L、加50 μ L盐缓冲液(盐缓冲液的组分为:1M NaCl,10mM Tris-HCl,0.05wt% Tween-20,水为溶剂),得到生物素双探针链霉亲和素磁珠,该生物素双探针链霉亲和素磁珠悬浮于盐缓冲液中。

[0144] 实施例2

[0145] 本实施例针对的是尿液上清中GSTP1基因 (GRCh37, chr11:67118615-67118704) 目标区域进行捕获。

[0146] 一种基于生物素双探针的尿液中cfDNA富集方法,本实施例和实施例1的区别在于,以等体积的制备例4制备得到的生物素双探针链霉亲和素磁珠替换制备例1制备得到的

生物素双探针链霉亲和素磁珠,其他同实施例1。

[0147] 1、对加入1000copy、50nt单链DNA的1mL尿液样本,分别以实施例1和实施例2的方法进行靶向捕获和富集,通过qPCR定量测定,每组设计3个平行样,计算其 ΔCt 值,具体结果见表1。

[0148] 表1不同实施方案获得的cfDNA用于qPCR定量后的 ΔCt 值

实施方案	ΔCt 值		
	平行样 1	平行样 2	平行样 3
[0149] 实施例 1	6.5	7.6	5.8
实施例 2	4.5	4.8	4.3

[0150] 2、选取60个尿液样本,分别以实施例1和实施例2的方法进行靶向捕获和富集,并通过qPCR定量测定,每组设计3个平行样,计算测定结果的 ΔCt 值。同一尿液样本的平行样本间任意两个样本间的 ΔCt 值相差大于等于1,则认为该样本的平行样本间的检测结果具有显著差异,计为检测结果不准确;同一尿液样本的平行样本间任意两个样本间的 ΔCt 值相差均小于1,则认为该样本的平行样本间的检测结果无显著差异,计为检测结果准确。分别统计以实施例1和实施例2的富集方法得到的各样本检测结果的准确性,并计算准确率(%);准确率(%) = 计为检测结果准确的样本数/总样本数 $\times 100\%$ 。具体结果见表2。

[0151] 表2不同富集方法得到的cfDNA进行qPCR定量测定后 ΔCt 值的准确性

实施方案	计为检测结果准确的样本数	总样本数	准确率 (%)
[0152] 实施例 1	45	60	75.00
实施例 2	58	60	96.67

[0153] 从表2的数据结果中看出,和实施例1的方法相比,实施例2的方法能够相对准确地、完整地富集尿液中小片段的cfDNA,以保证检测结果的准确性,使得样本间的检测结果的稳定性优异。

[0154] 本具体实施例仅仅是对本申请的解释,其并不是对本申请的限制,本领域技术人员在阅读完本说明书后可以根据需要对本实施例做出没有创造性贡献的修改,但只要在本申请的权利要求范围内都受到专利法的保护。