



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108138209 A

(43)申请公布日 2018.06.08

(21)申请号 201680059223.2

(74)专利代理机构 北京同达信恒知识产权代理有限公司 11291

(22)申请日 2016.08.12

代理人 黄志华 石磊

(30)优先权数据

62/204,268 2015.08.12 US

(51)Int.Cl.

C12P 19/34(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2018.04.10

C12Q 1/6844(2018.01)

C40B 40/06(2006.01)

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2016/046875 2016.08.12

C40B 50/06(2006.01)

(87)PCT国际申请的公布数据

W02017/027835 EN 2017.02.16

(71)申请人 环基因治疗诊断有限责任公司

地址 美国阿拉巴马州

(72)发明人 叶辰雄

权利要求书5页 说明书82页

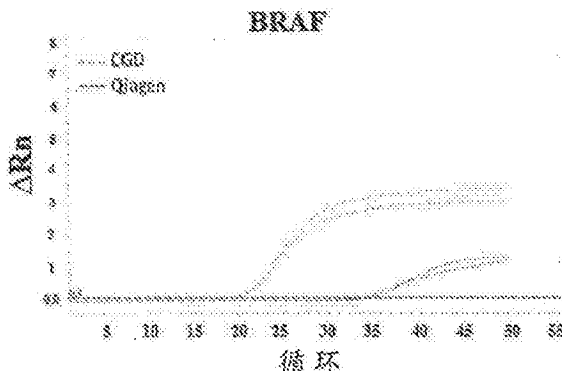
序列表4页 附图10页

(54)发明名称

通过原位扩增制备细胞游离核酸分子的方法

(57)摘要

提供用于原位扩增(ISA)样品中的cfNA、诸如cfDNA的方法,其中样品中的cfNA不经受核酸纯化步骤。所公开的方法可用于产生样品中存在的cfNA的可分析汇集物。可分析汇集物可与多种分析技术一起使用以表征样品中的核酸。还提供了受试者的诊断、确定治疗性干预和监测的方法。



1. 一种原位扩增细胞游离核酸 (cfNA) 的方法, 所述方法包括以下步骤:
 - a. 提供含有多个cfNA的液体样品;
 - b. 对所述样品进行至少一个处理步骤;
 - c. 使用酶混合物添加外源性核酸序列至所述样品中的至少一部分的所述cfNA的5' 末端或3' 末端中的至少一者上, 将所述样品中的至少一部分的所述cfNA转化为经修饰的cfNA以产生可扩增cfNA汇集物, 其中所述外源性核酸序列含有能够结合引物的引物位点; 和
 - d. 扩增所述可扩增cfNA汇集物以产生cfNA的可分析汇集物, 其中所述样品中的所述cfNA不经受核酸纯化步骤。
2. 如权利要求1所述的方法, 其中所述cfNA是cfDNA。
3. 如权利要求1所述的方法, 其中所述cfNA是cfRNA。
4. 如权利要求3所述的方法, 其中在步骤(c) 之前使所述cfRNA转化为双链DNA。
5. 如权利要求4所述的方法, 其中所述酶混合物包含DNA酶活性。
6. 如权利要求1所述的方法, 其中将所述样品中的至少一部分的所述cfNA连接在一起。
7. 如权利要求1所述的方法, 其中所述样品中的所述cfNA具有以下的片段尺寸分布: 50bp至2000bp、100bp至1000bp、50bp至600bp、100bp至500bp、100bp至400bp、100bp至300bp、100bp至200bp、200bp至300bp、300bp至400bp、400bp至500bp、或500bp至600bp。
8. 如权利要求1所述的方法, 其中所述方法在单个反应容器中进行。
9. 如权利要求1所述的方法, 其中所述引物位点是通用引物位点。
10. 如权利要求1所述的方法, 其中将所述外源性核酸序列添加至所述cfNA的5' 末端、所述cfNA的3' 末端、或至少一部分的所述cfNA的5' 末端和3' 末端两者。
11. 如权利要求1所述的方法, 其中所述样品中至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%或至少99%的所述cfNA经修饰以含有所述外源性核酸序列。
12. 如权利要求1所述的方法, 其中所述酶混合物包含:
 - a. 具有5' -3' 聚合酶活性且具有或不具有3' -5' 外切核酸酶活性的DNA聚合酶、和DNA连接酶;
 - b. 具有5' -3' 聚合酶活性且具有或不具有3' -5' 外切核酸酶活性的DNA聚合酶、DNA连接酶、和DNA多核苷酸激酶;
 - c. 具有5' -3' 聚合酶活性且具有或不具有3' -5' 外切核酸酶活性的DNA聚合酶、DNA连接酶、DNA多核苷酸激酶、和尿嘧啶DNA糖基化酶; 或
 - d. 具有5' -3' 聚合酶活性且具有或不具有3' -5' 外切核酸酶活性的DNA聚合酶、DNA连接酶、DNA多核苷酸激酶、尿嘧啶DNA糖基化酶、和单链DNA核酸切口酶。
13. 如权利要求1所述的方法, 其中所述酶混合物包含:
 - a. T4 DNA聚合酶、和T4 DNA连接酶;
 - b. DNA聚合酶I的克列诺片段、和T4 DNA连接酶;
 - c. T4 DNA聚合酶、T4 DNA连接酶、和DNA聚合酶I的克列诺片段;
 - d. T4 DNA聚合酶、T4 DNA连接酶、DNA聚合酶I的克列诺片段、和T4多核苷酸激酶;
 - e. T4 DNA聚合酶、T4 DNA连接酶、DNA聚合酶I的克列诺片段、T4多核苷酸激酶、和尿嘧啶-DNA糖基化酶; 或
 - f. T4 DNA聚合酶、T4 DNA连接酶、DNA聚合酶I的克列诺片段、T4多核苷酸激酶、尿嘧啶-

DNA糖基化酶、和Nb.BbvC1。

14. 如权利要求1所述的方法,其中使所述样品在步骤(c)经受依序加热程序。

15. 如权利要求14所述的方法,其中所述依序加热程序包括以下步骤:16°C持续第一限定的持续时间,24°C持续第二限定的持续时间,37°C持续第三限定的持续时间,和75°C持续第四限定的持续时间。

16. 如权利要求1所述的方法,其中所述外源性核酸序列具有侧接所述引物位点中的至少一侧的简并核酸序列。

17. 如权利要求16所述的方法,其中所述外源性核酸序列具有侧接所述引物位点中的任一侧的简并核酸序列。

18. 如权利要求16所述的方法,其中将所述外源性核酸序列在初始复制步骤期间合并至所述cfNA中。

19. 如权利要求16所述的方法,其中所述外源性核酸序列具有SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2的序列。

20. 如权利要求16至19中任一项所述的方法,其中所述酶混合物包含具有5' -3' 聚合酶活性且具有或不具有3' -5' 外切核酸酶活性的DNA聚合酶、和DNA连接酶。

21. 如权利要求16至19中任一项所述的方法,其中所述酶混合物包含T4 DNA聚合酶和T4 DNA连接酶。

22. 如权利要求1所述的方法,其中所述外源性核酸序列是包含双链反向重复序列和单链环的寡核苷酸,并且其中所述样品中的至少一部分的所述cfNA被制成在所述cfNA的5' 末端、所述cfNA的3' 末端、或所述cfNA的5' 末端和3' 末端两者处具有平末端。

23. 如权利要求22所述的方法,其中使所述外源性核酸序列的每条链在所述样品中的至少一部分的所述cfNA上的所述cfNA的5' 末端、所述cfNA的3' 末端、或所述cfNA的5' 末端和3' 末端两者处连接至所述cfNA的每条链。

24. 如权利要求23所述的方法,其中在步骤(d)之前裂解所述单链环。

25. 如权利要求24所述的方法,其中所述外源性核酸序列具有SEQ ID NO:10的序列。

26. 如权利要求22至25中任一项所述的方法,其中所述酶混合物包含具有5' -3' 聚合酶活性且具有或不具有3' -5' 外切核酸酶活性的DNA聚合酶、DNA连接酶、DNA多核苷酸激酶、和尿嘧啶-DNA糖基化酶。

27. 如权利要求22至25中任一项所述的方法,其中所述酶混合物包含T4 DNA聚合酶、T4 DNA连接酶、DNA聚合酶I的克列诺片段、T4多核苷酸激酶、和尿嘧啶-DNA糖基化酶。

28. 如权利要求1所述的方法,其中所述外源性核酸序列是包含双链反向重复序列和单链环的寡核苷酸,并且其中所述样品中的至少一部分的所述cfNA被制成在所述cfNA的3' 末端或者5' 末端中的至少一者上具有尾序列。

29. 如权利要求28所述的方法,其中使所述外源性核酸序列的每条链在所述样品中的至少一部分的所述cfNA上的所述cfNA的5' 末端、所述cfNA的3' 末端、或所述cfNA的5' 末端和3' 末端两者处连接至所述cfNA的每条链。

30. 如权利要求29所述的方法,其中在步骤(d)之前裂解所述单链环。

31. 如权利要求30所述的方法,其中所述外源性核酸序列具有SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:7的序列。

32. 如权利要求28至31中任一项所述的方法,其中所述酶混合物包含具有5' -3' 聚合酶活性且具有或不具有3' -5' 外切核酸酶活性的DNA聚合酶、DNA连接酶、DNA多核苷酸激酶、和尿嘧啶-DNA糖基化酶。

33. 如权利要求28至31中任一项所述的方法,其中所述酶混合物包含T4 DNA聚合酶、T4 DNA连接酶、DNA聚合酶I的克列诺片段、T4多核苷酸激酶、和尿嘧啶-DNA糖基化酶。

34. 如权利要求1所述的方法,其中所述外源性核酸序列是包含双链反向重复序列和单链环的寡核苷酸,并且其中所述样品中的至少一部分的所述cfNA被制成在所述cfNA的5' 末端、所述cfNA的3' 末端、或所述cfNA的5' 末端和3' 末端两者上具有平末端。

35. 如权利要求34所述的方法,其中使所述外源性核酸序列的一条链在所述样品中的至少一部分的所述cfNA上的所述cfNA的5' 末端、所述cfNA的3' 末端、或所述cfNA的5' 末端和3' 末端两者处连接至所述cfNA的一条链。

36. 如权利要求35所述的方法,其中所述外源性核酸序列具有SEQ ID NO:5的序列。

37. 如权利要求34至36中任一项所述的方法,其中所述酶混合物包含具有5' -3' 聚合酶活性且具有或不具有3' -5' 外切核酸酶活性的DNA聚合酶、DNA连接酶、DNA多核苷酸激酶、单链DNA核酸切口酶、和任选的复制块激活活性。

38. 如权利要求34至36中任一项所述的方法,其中所述酶混合物包含T4 DNA聚合酶、T4 DNA连接酶、DNA聚合酶I的克列诺片段、T4多核苷酸激酶、Nb.BbvC1、和任选的尿嘧啶-DNA糖基化酶。

39. 如权利要求1所述的方法,其中所述外源性核酸序列是包含双链反向重复序列、单链环的寡核苷酸且含有复制块,并且其中所述样品中的至少一部分的所述cfNA被制成在所述cfNA的5' 末端、所述cfNA的3' 末端、或所述cfNA的5' 末端和3' 末端两者上具有平末端。

40. 如权利要求39所述的方法,其中所述复制块是无活性的直至被复制块激活活性作用。

41. 如权利要求39所述的方法,其中使所述外源性核酸序列的一条链在所述样品中的至少一部分的所述cfNA上的所述cfNA的5' 末端、所述cfNA的3' 末端、或所述cfNA的5' 末端和3' 末端两者处连接至所述cfNA的一条链。

42. 如权利要求41所述的方法,其中所述外源性核酸序列具有SEQ ID NO:5的序列。

43. 如权利要求39至42中任一项所述的方法,其中所述酶混合物包含具有5' -3' 聚合酶活性且具有或不具有3' -5' 外切核酸酶活性的DNA聚合酶、DNA连接酶、DNA多核苷酸激酶、单链DNA核酸切口酶、和复制块激活活性。

44. 如权利要求39至42中任一项所述的方法,其中所述酶混合物包含T4 DNA聚合酶、T4 DNA连接酶、DNA聚合酶I的克列诺片段、T4多核苷酸激酶、Nb.BbvC1、和尿嘧啶-DNA糖基化酶。

45. 如权利要求1所述的方法,其中所述至少一个处理步骤是稀释所述液体样品、加热所述液体样品、使所述液体样品中的所述cfNA片段化、或前述的组合。

46. 如权利要求1所述的方法,其中所述至少一个处理步骤是稀释所述液体样品、加热所述液体样品、或前述的组合。

47. 如权利要求1所述的方法,其中所述加热步骤导致所述cfNA的片段化。

48. 如权利要求48所述的方法,其中所述液体样品中的所述cfNA在所述加热步骤后具

有50bp至600bp、100bp至500bp、100bp至400bp、100bp至300bp、100bp至200bp、200bp至300bp、300bp至400bp、400bp至500bp、或500bp至600bp的片段尺寸分布。

49. 如权利要求1所述的方法,其中所述液体样品是血清样品、血浆样品、尿样品、唾液样品或脑脊液样品。

50. 如权利要求1所述的方法,其中所述液体样品的体积小于100 μ L。

51. 如权利要求1所述的方法,其中所述液体样品的体积是10 μ L至50 μ L。

52. 如权利要求1所述的方法,其中所述经修饰的cfNA含有所述样品中存在的原始cfNA序列的一部分或其互补体、和外源性核酸序列。

53. 一种分析cfNA的方法,所述方法包括以下步骤:

a. 提供通过如权利要求1所述的方法产生的cfNA的可分析汇集物;和
b. 分析所述cfNA的可分析汇集物以确定所述cfNA分子的可分析汇集物中的cfNA的特征。

54. 如权利要求53所述的方法,其中所述特征选自由以下组成的组:染色体异常、单核苷酸多态性、基因突变、点突变、缺失、插入、甲基化形式和拷贝数变化。

55. 一种诊断受试者患有疾病或处于疾病风险的方法,所述方法包括以下步骤:

a. 提供通过如权利要求1所述的方法产生的cfNA的可分析汇集物;
b. 分析所述cfNA的可分析汇集物以确定所述cfNA分子的可分析汇集物中的cfNA的与所述疾病相关的特征;和

c. 基于所述特征的存在确定所述受试者患有所述疾病或处于所述疾病风险,或者基于所述特征的不存在确定所述受试者不患有所述疾病或不处于所述疾病风险。

56. 如权利要求55所述的方法,其中所述特征选自由以下组成的组:染色体异常、单核苷酸多态性、基因突变、点突变、缺失、插入、甲基化形式和拷贝数变化。

57. 一种确定患有疾病的受试者的治疗性介入的方法,所述方法包括以下步骤:

a. 提供通过如权利要求1所述的方法产生的cfNA的可分析汇集物;
b. 分析所述cfNA的可分析汇集物以确定所述cfNA分子的可分析汇集物中的cfNA的与所述疾病相关的特征;和
c. 基于经确定的所述特征确定所述治疗性介入。

58. 如权利要求57所述的方法,其中所述特征选自由以下组成的组:染色体异常、单核苷酸多态性、基因突变、点突变、缺失、插入、甲基化形式和拷贝数变化。

59. 一种监测受试者的方法,所述方法包括以下步骤:

a. 通过如权利要求1所述的方法提供来自所述受试者的cfNA的可分析汇集物;
b. 分析所述cfNA分子的可分析汇集物以确定所述cfNA分子的可分析汇集物中的cfNA的与所述疾病相关的特征;和
c. 基于经确定的所述特征确定所述受试者是否需要治疗。

60. 如权利要求59所述的方法,其中所述特征选自由以下组成的组:染色体异常、单核苷酸多态性、基因突变、点突变、缺失、插入、甲基化形式和拷贝数变化。

61. 一种监测受试者的治疗的方法,所述受试者经诊断患有疾病且经历用治疗所述疾病的治疗性方案的治疗,所述方法包括以下步骤:

a. 通过如权利要求1所述的方法提供来自所述受试者的cfNA的可分析汇集物;

b. 分析所述cfNA的可分析汇集物以确定所述cfNA的可分析汇集物中的cfNA的与所述疾病相关的特征;和

c. 确定经确定的所述特征是否与所述治疗性方案相兼容;

d. 如果经确定的所述特征指示禁用或不推荐所述治疗性方案则改变所述治疗性方案, 或者如果经确定的所述特征指示继续推荐所述治疗性方案则继续所述治疗性方案;和

e. 任选地, 以所需的时间间隔重复步骤a) 至步骤d)。

62. 如权利要求61所述的方法, 其中所述特征选自由以下组成的组: 染色体异常、单核苷酸多态性、基因突变、点突变、缺失、插入、甲基化形式和拷贝数变化。

63. 一种用于测定样品中的细胞游离核酸(cfNA)的原始浓度的方法, 所述方法包括以下步骤:

a. 通过如权利要求1所述的方法提供可扩增cfNA汇集物;

b. 扩增所述可扩增cfNA汇集物以产生cfNA分子的经扩增的汇集物;

c. 测定cfNA的所述经扩增的汇集物中的cfNA的浓度;和

d. 将经测定的cfNA的浓度与标准曲线进行比较以确定所述样品中的cfNA的原始浓度。

通过原位扩增制备细胞游离核酸分子的方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2015年8月12日提交(目前未决)的美国临时专利申请第62/204,268号的优先权。

背景技术

[0003] 据估计,今年诊断出160万的癌症新病例,导致超过50万的癌症死亡。这意味着每天约1,600人,占美国死亡人口的四分之一。实体瘤活检的遗传测试的主要进展改变了癌症的靶向和治疗方式,从而导致存活率提高。

[0004] 目前,通常来自原发性肿瘤的组织活检用于在靶向疗法开始之前的某单个时间点确定癌症的分子谱。然而,实体瘤取样有几个缺点和局限性。首先,实体瘤取样是一种侵入性手术,并且在很多情况下会给患者带来风险。其次,在某些情况下,由于肿瘤的位置和/或大小,实体瘤取样不是一种选择,或者是不切实际的。第三,由于实体瘤取样在空间上局限于活检区域并且在时间上局限于活检时的肿瘤状态,因此可能无法充分解决肿瘤异质性。肿瘤基因组非常不稳定,并且在选择压力下容易发生克隆扩增。因此,癌症的基因组标签在空间上和时间上都变化,并且本质上不是静态的。第四,鉴别来自实体瘤取样的相关信息用于进行治疗决策可能需要几天到几周或甚至几个月,这使信息在治疗应用中的使用变得复杂。第五,实体瘤取样的费用很高,因此在很多情况下限制了它的应用。最后,实体瘤取样对于癌症疗法的纵向监测由于诸多因素(诸如分析所需的时间、分析成本和获得分析样品的侵入性等)是不切实际的。因此,肿瘤组织的基因组表征仍然是癌症治疗和管理中的主要挑战。

[0005] 特别是循环细胞游离DNA (cfDNA) 的血液活检(也被称为液体活检)正在成为用于鉴别肿瘤中存在的特定遗传改变的非侵入性方法。目前正在研究此类方法,以鉴定可由已知的癌症疗法治疗的那些突变,并为治疗开发靶向疗法。用于分离、定量和分析血液中cfDNA的先进技术已经导致鉴别循环中的癌症-特异性畸变,诸如染色体异常、基因突变、甲基化模式的差异和拷贝数变化。这些畸变被发现反映来自实体瘤组织的那些畸变。

[0006] 利用cfDNA分析的血液活检为实体瘤取样遇到的缺点提供了解决方案。血液活检是微创的,允许在常规诊所就诊期间常规采集样品进行分析。此外,血液活检允许对多种肿瘤DNA取样,并克服实体瘤取样中所见的异质性缺乏。血液活检还提供诊断性信息快速返回给医疗保健提供者。最后,血液活检由于其微创性性质和快速结果,对于以最具成本效益的方式实时纵向监测肿瘤基因组进化是理想的。

[0007] 基于循环cfDNA的测试使临床医生具有实时确保治疗功效、监测耐药性、转移和复发及并为患者定制个体化治疗性干预措施的能力。使用循环cfDNA的肿瘤基因组测序来指导治疗决策将极大地改善临床结果。因此,cfDNA在癌症诊断和疗法的个体化管理中的临床实用性能够显著改变目前的治疗模型、提高总癌症存活率并成为新一代癌症管理的护理标准。

[0008] 然而,cfDNA的分析也存在几个缺点。此类限制包括但不限于需要样品体积大、

cfDNA产率低、不同大小的cfDNA片段的不同回收率以及缺乏再现性。以上是在临床中基于cfDNA的测试的常规应用的主要障碍。

[0009] 目前,尽管采用了许多提取和分离cfDNA的方法,但由于从样品不完全提取cfDNA起始材料和此过程中的大量材料损失,cfDNA分离的效率和产率非常低。此外,由于缺乏标准化,定量是易变的。

[0010] cfDNA的分析和使用cfDNA作为临床工具并不是最佳的。本公开通过提供用于从样品进行优异cfDNA富集的方法,提供了一种针对cfDNA分析中遇到的问题新颖且有创造性的解决方案。此类方法需要低输入体积的样品,并且提供高的核酸材料回收率以用于随后的分析。因此,本公开的方法允许直接从样品中富集cfDNA。所公开的方法能够在范围广泛的基因组平台上使用微升体积(血滴体积)的样品进行多重分析,包括但不限于下一代测序(NGS)和qPCR。本公开的方法使临床医生能够使用小至10微升的样品体积(例如经由扎手指)工作。本公开的方法具有许多优势,包括但不限于涉及的遗传改变的更完整表征、加速的临床决策制定、靶向疗法的鉴定以及以既省时又省钱的方式鉴定符合条件的患者的实验性临床试验。因此,通过利用本公开的方法可以充分实现cfDNA分析的潜力。

附图说明

[0011] 图1A显示了使用CGD方法从20 μ L血浆产生的cfDNA的琼脂糖凝胶电泳。使用溴化乙锭可视化cfDNA。泳道1-4是来自诊断为或疑似患有癌症的受试者的冷冻的临床血浆样品,泳道5是用来自样品4的血浆加标的来自健康受试者的新鲜血浆。泳道6-8是来自健康受试者的冷冻的血浆样品且泳道9-10是来自健康受试者的新鲜血浆样品。

[0012] 图1B显示了使用CGD方法从10 μ L尿产生的cfDNA的琼脂糖凝胶电泳。使用溴化乙锭可视化cfDNA。泳道1-6是来自健康受试者的新鲜尿样品且泳道7是用于比较的血浆样品。

[0013] 图2显示了对分别使用CGD方法和QIAamp试剂盒从20 μ L和200 μ L血浆制备的cfDNA使用TaqMan实时定量PCR产生的KRAS的扩增曲线图。

[0014] 图3A显示了对cfDNA使用TaqMan实时定量PCR产生的BRAF的扩增曲线图,所述cfDNA分别使用CGD方法和QIAamp试剂盒从20 μ L和200 μ L血浆制备。

[0015] 图3B显示了对cfDNA使用TaqMan实时定量PCR产生的PIK3CA的扩增曲线图,所述cfDNA分别使用CGD方法和QIAamp试剂盒从20 μ L和200 μ L血浆制备。

[0016] 图3C显示了对cfDNA使用TaqMan实时定量PCR产生的NRAS的扩增曲线图,所述cfDNA分别使用CGD方法和QIAamp试剂盒从20 μ L和200 μ L血浆制备。

[0017] 图4显示了使用CGD方法从使用商业唾液取样试剂盒(具有或不具有防腐剂)收集的20 μ L唾液产生的cfDNA的琼脂糖凝胶电泳(2%)。使用溴化乙锭可视化cfDNA。泳道1和泳道2显示了来自用具有防腐剂的商业取样试剂盒获得的唾液样品的结果,其中泳道3是阴性对照(无唾液样品存在),而泳道4和泳道5显示了来自用不具有防腐剂的商业取样试剂盒获得的唾液样品的结果,其中泳道6是阴性对照(无唾液样品存在)。

[0018] 图5显示了使用CGD方法从20 μ L血浆和脑脊液及10 μ L尿产生的cfDNA的琼脂糖凝胶电泳(2%)。使用溴化乙锭可视化cfDNA。样品分配如下(其中cfDNA浓度在括号中):泳道1CSF(8.5),泳道2尿(5.1),泳道3血浆(22),泳道4血浆(59),泳道5血浆(36.4),泳道6阴性对照;泳道7尿(52.2),泳道8尿(11.2),泳道9尿(89.6)和泳道10尿(30)。

[0019] 图6显示了使用Agilent 2100Bioanalyzer进行的图5的样品1至5的分析以确定由CGD方法从血浆、CSF和尿样品制备的cfDNA的尺寸分布和定量。

[0020] 图7显示了用CGD方法和组织活检获得的卵巢癌患者处理前和处理后的就PIK3CA、PTEN和KRAS基因而言的结果之间的比较。

[0021] 图8A显示了诊断为肺癌的受试者中的cfDNA突变的测定。疗法期间循环cfDNA中较低的突变负荷和稳定疾病50天之后升高的突变负荷。治疗起始由黑色箭头指示。突变负荷表达为每患者检测到的体突变的数目(图右侧上的垂直刻度)。蓝色虚线指示进行PET/CT的时间。时间点指示进行cfDNA分析的时间。

[0022] 图8B显示了受试者的PET/CT成像,指示2015年11月30日的稳定疾病和2016年3月的进行性疾病,从而确认了图XA中的cfDNA分析的结果。

[0023] 图9A显示了诊断为胰周淋巴结腺癌的受试者中的cfDNA突变的确定。疗法期间循环cfDNA中的突变负荷下降,指示稳定疾病。稳定疾病与蛋白质生物标记、PET/CT成像(右图)和临床结果一致。突变负荷表达为每患者检测到的体突变的数目(图右侧上的垂直刻度)。蓝色虚线指示进行PET/CT的时间。时间点指示进行cfDNA分析的时间。

[0024] 图9B显示了受试者的PET/CT成像,指示疗法后的稳定疾病,从而证实了图XA中的cfDNA分析的结果。

[0025] 图10显示了使用储存在 -20°C (泳道1-5)和 4°C (泳道6-10)下的试剂通过CGD方法制备的可分析的cfDNA汇集物(pool),其经受2%琼脂糖凝胶电泳且使用溴化乙锭(分子量标准1kb)可视化。

[0026] 图11显示了使用CGD方法使用纯化的DNA在0、0.001、0.005、0.01、0.025、0.05、0.1、0.25、0.5和 $1\text{ng}/\mu\text{L}$ 的浓度下生成的标准曲线。

[0027] 图12显示了由使用CGD方法从来自 $20\mu\text{L}$ 血浆的cfRNA生成的cDNA的扩增曲线图。

发明内容

[0028] 提供本概述是为了以简化的形式介绍将在以下详述中进一步描述的概念选择。本概述并非旨在确定所要求保护的主题的关键或基本特征,也并非旨在用于限制所要求保护的主题的范围。要求保护的主题的其它特征、细节、效用和优势根据以下书面详述将显而易见,包括在附图中示出并在所附权利要求中限定的那些。

[0029] 在第一方面,本公开提供了原位扩增(ISA)样品中的细胞游离核酸(cfNA)且使样品中的cfNA不经受核酸纯化步骤的方法,所述方法包括以下步骤:i)提供含有多个cfNA分子的液体样品;ii)对样品进行至少一个处理步骤;iii)将样品中的至少一部分的cfNA分子转化为经修饰的cfNA以产生可扩增cfNA汇集物;和iv)扩增可扩增cfNA汇集物以产生cfNA分子的可分析汇集物。

[0030] 在第二方面,本公开提供了ISA样品中的cfNA且不使样品中的cfNA经受核酸纯化步骤的方法,所述方法包括以下步骤:i)提供含有多个cfNA分子的液体样品;ii)对样品进行至少一个处理步骤;iii)通过添加外源性核酸序列至样品中至少一部分的cfNA分子的3'末端,将样品中的至少一部分的cfNA分子转化为经修饰的cfNA以产生可扩增cfNA汇集物;和v)扩增可扩增cfNA汇集物以产生cfNA分子的可分析汇集物。

[0031] 在第三方面,本公开提供了ISA样品中的cfNA且不使样品中的cfNA经受核酸纯化

步骤的方法,所述方法包括以下步骤:i)提供含有多个cfNA分子的液体样品;ii)对样品进行至少一个处理步骤;iii)通过添加外源性核酸序列至样品中至少一部分的cfNA分子的5'末端,将样品中的至少一部分的cfNA分子转化为经修饰的cfNA以产生可扩增cfNA汇集物;和v)扩增可扩增cfNA汇集物以产生cfNA分子的可分析汇集物。

[0032] 在第四方面,本公开提供了ISA样品中的cfNA且不使样品中的cfNA经受核酸纯化步骤的方法,所述方法包括以下步骤:i)提供含有多个cfNA分子的液体样品;ii)对样品进行至少一个处理步骤;iii)通过添加外源性核酸序列至样品中至少一部分的cfNA分子的3'和5'末端两者,将样品中的至少一部分的cfNA分子转化为经修饰的cfNA以产生可扩增cfNA汇集物;和v)扩增可扩增cfNA汇集物以产生cfNA分子的可分析汇集物。

[0033] 在第五方面,本公开提供了ISA样品中的cfDNA且不使样品经受核酸纯化步骤的方法,所述方法包括以下步骤:i)提供含有多个cfDNA分子的液体样品;ii)对样品进行至少一个处理步骤;iii)将样品中的至少一部分的cfDNA分子转化为经修饰的cfDNA以产生可扩增cfDNA汇集物;和iv)扩增可扩增cfDNA汇集物以产生cfDNA分子的可分析汇集物。

[0034] 在第六方面,本公开提供了ISA样品中的cfDNA且不使样品经受核酸纯化步骤的方法,所述方法包括以下步骤:i)提供含有多个cfDNA分子的液体样品;ii)对样品进行至少一个处理步骤;iii)通过添加外源性核酸序列至样品中至少一部分的cfDNA分子的3'末端,将样品中的至少一部分的cfDNA分子转化为经修饰的cfDNA以产生可扩增cfDNA汇集物;和v)扩增可扩增cfDNA汇集物以产生cfDNA分子的可分析汇集物。

[0035] 在第七方面,本公开提供了ISA样品中的cfDNA且不使样品经受核酸纯化步骤的方法,所述方法包括以下步骤:i)提供含有多个cfDNA分子的液体样品;ii)对样品进行至少一个处理步骤;iii)通过添加外源性核酸序列至样品中至少一部分的cfDNA分子的5'末端,将样品中的至少一部分的cfDNA分子转化为经修饰的cfDNA以产生可扩增cfDNA汇集物;和v)扩增可扩增cfDNA汇集物以产生cfDNA分子的可分析汇集物。

[0036] 在第八方面,本公开提供了ISA样品中的cfDNA且不使样品经受核酸纯化步骤的方法,所述方法包括以下步骤:i)提供含有多个cfDNA分子的液体样品;ii)对样品进行至少一个处理步骤;iii)通过添加外源性核酸序列至样品中至少一部分的cfDNA分子的3'和5'末端两者,将样品中的至少一部分的cfDNA分子转化为经修饰的cfDNA以产生可扩增cfDNA汇集物;和v)扩增可扩增cfDNA汇集物以产生cfDNA分子的可分析汇集物。

[0037] 在第九方面,本公开提供了ISA样品中的cfRNA且不使样品经受核酸纯化步骤的方法,所述方法包括以下步骤:i)提供含有多个cfRNA分子的液体样品;ii)对样品进行至少一个处理步骤;iii)将样品中的至少一部分的cfRNA分子转化为经修饰的cfRNA以产生可扩增cfRNA汇集物;和iv)扩增可扩增cfRNA汇集物以产生cfRNA分子的可分析汇集物。

[0038] 在第十方面,本公开提供了ISA样品中的cfRNA且不使样品经受核酸纯化步骤的方法,所述方法包括以下步骤:i)提供含有多个cfRNA分子的液体样品;ii)对样品进行至少一个处理步骤;iii)通过添加外源性核酸序列至样品中至少一部分的cfRNA分子的3'末端,将样品中的至少一部分的cfRNA分子转化为经修饰的cfRNA以产生可扩增cfRNA汇集物;和v)扩增可扩增cfRNA汇集物以产生cfRNA分子的可分析汇集物。

[0039] 在第十一方面,本公开提供了ISA样品中的cfRNA且不使样品经受核酸纯化步骤的方法,所述方法包括以下步骤:i)提供含有多个cfRNA分子的液体样品;ii)对样品进行至少

一个处理步骤;iii)通过添加外源性核酸序列至样品中至少一部分的cfRNA分子的5'末端,将样品中的至少一部分的cfRNA分子转化为经修饰的cfRNA以产生可扩增cfRNA汇集物;和v)扩增可扩增cfRNA汇集物以产生cfRNA分子的可分析汇集物。

[0040] 在第十二方面,本公开提供了ISA样品中的cfRNA且不使样品经受核酸纯化步骤的方法,所述方法包括以下步骤:i)提供含有多个cfRNA分子的液体样品;ii)对样品进行至少一个处理步骤;iii)通过添加外源性核酸序列至样品中至少一部分的cfRNA分子的3'和5'末端两者,将样品中的至少一部分的cfRNA分子转化为经修饰的cfRNA以产生可扩增cfRNA汇集物;和v)扩增可扩增cfRNA汇集物以产生cfRNA分子的可分析汇集物。

[0041] 在上述第一至第十二方面中的每一个的某些实施方案中,液体样品是从受试者获得的任何液体样品。在某些实施方案中,液体样品是血液样品、血清样品、血浆样品、唾液样品、脑脊液样品或尿样品。在某些实施方案中,液体样品被处理。例如,血液样品可被处理以产生血浆或血清样品。

[0042] 在上述第一至第十二方面中的每一个的某些实施方案中,样品体积可为小于约1ml、小于约0.5ml、小于约0.1ml、小于约0.05ml或小于约0.025ml(但在所有情况下大于0.010ml)。在某些实施方案中,样品体积为约10微升至约150微升。在某些实施方案中,样品体积为约10微升至约100微升。在某些实施方案中,样品体积为约10微升至约75微升。在某些实施方案中,样品体积为约10微升至约50微升。在某些实施方案中,样品体积为约10微升至约25微升。

[0043] 在上述第一至第十二方面中的每一个的某些实施方案中,在上述范围内的样品体积可从受试者直接获得(即,25微升血液样品可通过手指针刺从受试者获得)。在上述第一至第四方面的每一个中,上述范围内的样品体积可从更大体积的来自受试者的样品获得(即,5ml血液样品可从受试者获得,并且50微升样品可取自该5ml样品且用作样品体积)。

[0044] 在上述第一至第十二方面中的每一个的某些实施方案中,添加至cfNA、cfDNA和/或cfRNA的3'末端、5'末端、或3'末端和5'末端两者的外源性核酸序列是双链核酸序列。在上述第一至第十二方面中的每一个的某些实施方案中,添加至cfNA、cfDNA和/或cfRNA的3'末端、5'末端、或3'末端和5'末端两者的外源性核酸序列是含有回文序列的单链核酸序列。在上述的某些实施方案中,cfNA、cfDNA和/或cfRNA是双链的。

[0045] 在上述第一至第四方面中的每一个的某些实施方案中,cfNA可为任何核酸。在某些实施方案中,cfNA是cfDNA。在某些实施方案中,cfNA是双链cfDNA。在某些实施方案中,cfNA是单链cfDNA。在某些实施方案中,cfNA是细胞游离-RNA(cfRNA)。在某些实施方案中,cfNA是双链cfRNA。在某些实施方案中,cfNA是单链cfRNA。

[0046] 在第一至第十二方面的某些实施方案中,样品可含有cfDNA和cfRNA两者,且cfDNA和cfRNA中的每一者经扩增以产生cfDNA和cfRNA分子两者的可分析汇集物。在第一至第十二方面的某些实施方案中,样品可含有cfDNA和cfRNA两者,且仅cfDNA经扩增以产生cfDNA分子的可分析汇集物。在第一至第十二方面的某些实施方案中,样品可含有cfDNA和cfRNA两者,且仅cfRNA经扩增以产生cfRNA分子的可分析汇集物。在前述中,cfDNA可为双链的和/或cfRNA可为双链的。

[0047] 在上述第一至第十二方面中的每一个的某些实施方案中,处理步骤可为稀释、添加缓冲液或缓冲液系统、加热样品、片段化样品中的至少一部分的cfNA(包括cfDNA和/或

cfRNA)或前述的组合。

[0048] 在上述第一至第十二方面中的每一个的某些实施方案中,将样品中的至少一部分的cfNA分子转化为经修饰的cfNA以产生可扩增cfNA汇集物步骤涉及样品中的至少一部分的cfNA(包括cfDNA和/或cfRNA)的末端修复、将样品中的至少一部分的cfNA(包括cfDNA和/或cfRNA)转化为平末端cfNA、样品中的至少一部分的cfNA(包括cfDNA和/或cfRNA)的A-加尾、连接或前述的组合。

[0049] 在上述第一至第十二方面中的每一个的某些实施方案中,将样品中的至少一部分的cfNA分子转化为经修饰的cfNA以产生可扩增cfNA汇集物步骤涉及使用包含以下的酶混合物:

[0050] i) 具有5' -3' 聚合酶活性且具有或不具有3' -5' 外切核酸酶活性的聚合酶,和ii) 连接酶;

[0051] i) 具有5' -3' 聚合酶活性且具有或不具有3' -5' 外切核酸酶活性的聚合酶,ii) 连接酶和iii) 多核苷酸激酶;

[0052] i) 具有5' -3' 聚合酶活性且具有或不具有3' -5' 外切核酸酶活性的聚合酶,ii) 连接酶,iii) 多核苷酸激酶和iv) 复制块激活活性;

[0053] i) 具有5' -3' 聚合酶活性且具有或不具有3' -5' 外切核酸酶活性的聚合酶,ii) 连接酶,iii) 多核苷酸激酶,iv) 复制块激活活性和v) 核酸切口酶活性;

[0054] i) 具有5' -3' 聚合酶活性且具有或不具有3' -5' 外切核酸酶活性的聚合酶,ii) 连接酶,iii) 多核苷酸激酶,iv) 复制块激活活性,v) 核酸切口酶活性和vi) 核酸结合蛋白。

[0055] 在上述第五至第八方面中的每一个的某些实施方案中,cfDNA可为双链cfDNA或单链cfDNA。在第五至第八方面的某些实施方案中,cfDNA是双链cfDNA。在上述第五至第八方面中的每一个的某些实施方案中,样品还可含有cfRNA(单链的或双链的)。在第五至第八方面的某些实施方案中,样品可含有cfDNA和cfRNA两者,且仅cfDNA经扩增以产生cfDNA分子的可分析汇集物。在第五至第八方面的某些实施方案中,样品可含有cfDNA和cfRNA两者,且cfDNA和cfRNA中每一个经扩增以产生cfDNA和cfRNA分子的可分析汇集物。

[0056] 在上述第九至第十二方面中的每一个的某些实施方案中,cfRNA可为双链cfRNA或单链cfRNA。在第九至第十二方面的某些实施方案中,cfRNA是双链cfRNA。在上述第九至第十二方面的某些实施方案中,样品还可含有cfDNA(单链的或双链的)。在第九至第十二方面的某些实施方案中,样品可含有cfRNA和cfDNA两者,且仅cfRNA经扩增以产生cfRNA分子的可分析汇集物。在第九至第十二方面的某些实施方案中,样品可含有cfRNA和cfDNA两者,且cfRNA和cfDNA中的每一个经扩增以产生cfRNA和cfDNA分子的可分析汇集物。

[0057] 在上述第一至第十二方面中的每一个的某些实施方案中,将样品中存在的至少50%或更多、60%或更多、70%或更多、80%或更多、90%或更多或95%或更多的cfNA转化为经修饰的cfNA以产生可扩增cfNA汇集物。当诸如在第五至第八方面中cfNA是cfDNA(包括双链cfDNA)时,将样品中存在的至少50%或更多、60%或更多、70%或更多、80%或更多、90%或更多或95%或更多的cfDNA转化为经修饰的cfDNA以产生可扩增cfDNA汇集物。当诸如在第九至第十二方面中cfNA是cfRNA(包括双链cfRNA)时,将样品中存在的至少50%或更多、60%或更多、70%或更多、80%或更多、90%或更多或95%或更多的cfRNA转化为经修饰的cfRNA以产生可扩增cfRNA汇集物。

[0058] 在第十三方面,本公开提供了制备样品中的cfNA以用于分析且不使样品中的cfNA经受核酸纯化步骤的方法,所述方法包括以下步骤:i)提供含有多个cfNA分子的液体样品;ii)对样品进行至少一个处理步骤;和iii)将样品中的至少一部分的cfNA分子转化为经修饰的cfNA以产生可扩增cfNA汇集物。

[0059] 在第十四方面,本公开提供了制备样品中的cfNA以用于分析且不使样品中的cfNA经受核酸纯化步骤的方法,所述方法包括以下步骤:i)提供含有多个cfNA分子的液体样品;ii)对样品进行至少一个处理步骤;和iii)通过添加外源性核酸序列至样品中至少一部分的cfNA分子的3'末端,将样品中的至少一部分的cfNA分子转化为经修饰的cfNA以产生可扩增cfNA汇集物。

[0060] 在第十五方面,本公开提供了制备样品中的cfNA以用于分析且不使样品中的cfNA经受核酸纯化步骤的方法,所述方法包括以下步骤:i)提供含有多个cfNA分子的液体样品;ii)对样品进行至少一个处理步骤;和iii)通过添加外源性核酸序列至样品中至少一部分的cfNA分子的5'末端,将样品中的至少一部分的cfNA分子转化为经修饰的cfNA以产生可扩增cfNA汇集物。

[0061] 在第十六方面,本公开提供了制备样品中的cfNA以用于分析且不使样品中的cfNA经受核酸纯化步骤的方法,所述方法包括以下步骤:i)提供含有多个cfNA分子的液体样品;ii)对样品进行至少一个处理步骤;和iii)通过添加外源性核酸序列至样品中至少一部分的cfNA分子的3'和5'末端两者,将样品中的至少一部分的cfNA分子转化为经修饰的cfNA以产生可扩增cfNA汇集物。

[0062] 在第十七方面,本公开提供了制备样品中的cfDNA以用于分析且不使样品中的cfDNA经受核酸纯化步骤的方法,所述方法包括以下步骤:i)提供含有多个cfDNA分子的液体样品;ii)对样品进行至少一个处理步骤;和iii)将样品中的至少一部分的cfDNA分子转化为经修饰的cfDNA以产生可扩增cfDNA汇集物。

[0063] 在第十八方面,本公开提供了制备样品中的cfDNA以用于分析且不使样品中的cfDNA经受核酸纯化步骤的方法,所述方法包括以下步骤:i)提供含有多个cfDNA分子的液体样品;ii)对样品进行至少一个处理步骤;和iii)通过添加外源性核酸序列至样品中至少一部分的cfDNA分子的3'末端,将样品中的至少一部分的cfDNA分子转化为经修饰的cfDNA以产生可扩增cfDNA汇集物。

[0064] 在第十九方面,本公开提供了制备样品中的cfDNA以用于分析且不使样品中的cfDNA经受核酸纯化步骤的方法,所述方法包括以下步骤:i)提供含有多个cfDNA分子的液体样品;ii)对样品进行至少一个处理步骤;和iii)通过添加外源性核酸序列至样品中至少一部分的cfDNA分子的5'末端,将样品中的至少一部分的cfDNA分子转化为经修饰的cfDNA以产生可扩增cfDNA汇集物。

[0065] 在第二十方面,本公开提供了制备样品中的cfDNA以用于分析且不使样品中的cfDNA经受核酸纯化步骤的方法,所述方法包括以下步骤:i)提供含有多个cfDNA分子的液体样品;ii)对样品进行至少一个处理步骤;iii)通过添加外源性核酸序列至样品中至少一部分的cfDNA分子的3'和5'末端两者,将样品中的至少一部分的cfDNA分子转化为经修饰的cfDNA以产生可扩增cfDNA汇集物;和v)扩增可扩增cfDNA汇集物以产生cfDNA分子的可分析汇集物。

[0066] 在第二十一方面,本公开提供了制备样品中的cfRNA以用于分析且不使样品中的cfRNA经受核酸纯化步骤的方法,所述方法包括以下步骤:i)提供含有多个cfRNA分子的液体样品;ii)对样品进行至少一个处理步骤;和iii)将样品中的至少一部分的cfRNA分子转化为经修饰的cfRNA以产生可扩增cfRNA汇集物。

[0067] 在第二十二方面,本公开提供了制备样品中的cfRNA以用于分析且不使样品中的cfRNA经受核酸纯化步骤的方法,所述方法包括以下步骤:i)提供含有多个cfRNA分子的液体样品;ii)对样品进行至少一个处理步骤;和iii)通过添加外源性核酸序列至样品中至少一部分的cfRNA分子的3'末端,将样品中的至少一部分的cfRNA分子转化为经修饰的cfRNA以产生可扩增cfRNA汇集物。

[0068] 在第二十三方面,本公开提供了制备样品中的cfRNA以用于分析且不使样品中的cfRNA经受核酸纯化步骤的方法,所述方法包括以下步骤:i)提供含有多个cfRNA分子的液体样品;ii)对样品进行至少一个处理步骤;和iii)通过添加外源性核酸序列至样品中至少一部分的cfRNA分子的5'末端,将样品中的至少一部分的cfRNA分子转化为经修饰的cfRNA以产生可扩增cfRNA汇集物。

[0069] 在第二十四方面,本公开提供了制备样品中的cfRNA以用于分析且不使样品中的cfRNA经受核酸纯化步骤的方法,所述方法包括以下步骤:i)提供含有多个cfRNA分子的液体样品;ii)对样品进行至少一个处理步骤;和iii)通过添加外源性核酸序列至样品中至少一部分的cfRNA分子的3'和5'末端两者,将样品中的至少一部分的cfRNA分子转化为经修饰的cfRNA以产生可扩增cfRNA汇集物。

[0070] 在上述第十三至第二十四方面中的每一个的某些实施方案中,液体样品如对第一至第十二方面所述。

[0071] 在上述第十三至第二十四方面中的每一个的某些实施方案中,样品体积如对第一至第十二方面所述。

[0072] 在上述第十三至第二十四方面中的每一个的某些实施方案中,处理步骤可如对第一至第十二方面所述。

[0073] 在上述第十三至第二十四方面中的每一个的某些实施方案中,将样品中的至少一部分的cfNA分子转化为经修饰的cfNA以产生可扩增cfNA汇集物步骤涉及如对第一至第十二方面所述的过程。

[0074] 在上述第十三至第二十四方面中的每一个的某些实施方案中,将样品中的至少一部分的cfNA分子转化为经修饰的cfNA以产生可扩增cfNA汇集物步骤涉及使用如对第一至第十二方面所述的酶混合物。

[0075] 在上述第十三至第二十四方面中的每一个的某些实施方案中,添加至cfNA、cfDNA和/或cfRNA的3'末端、5'末端、或3'末端和5'末端两者的外源性核酸序列如第一至第十二方面中所述。

[0076] 在上述第十三至第二十四方面中的每一个的某些实施方案中,cfNA可为任何核酸。在某些实施方案中,cfNA是cfDNA。在某些实施方案中,cfNA是双链cfDNA。在某些实施方案中,cfNA是单链cfDNA。在某些实施方案中,cfNA是细胞游离RNA(cfRNA)。在某些实施方案中,cfNA是双链cfRNA。在某些实施方案中,cfNA是单链cfRNA。

[0077] 在第十三至第二十四方面中的某些实施方案中,样品可含有cfDNA和cfRNA两者,

且cfDNA和cfRNA中的每一者经修饰以产生cfDNA和cfRNA分子两者的可扩增汇集物。在第十三至第二十四方面中的某些实施方案中,样品可含有cfDNA和cfRNA两者,且仅cfDNA经修饰以产生cfDNA分子的可扩增汇集物。在第十三至第二十四方面中的某些实施方案中,样品可含有cfDNA和cfRNA两者,且仅cfRNA经修饰以产生cfRNA分子的可扩增汇集物。在前述中,cfDNA可为双链的和/或cfRNA可为双链的。

[0078] 在上述第十七至第二十方面中的每一个的某些实施方案中,cfDNA可为双链cfDNA或单链cfDNA。在第十七至第二十方面的某些实施方案中,cfDNA是双链cfDNA。在上述第十七至第二十方面的某些实施方案中,样品还可含有cfRNA(单链或双链)。在第十七至第二十方面的某些实施方案中,样品可含有cfDNA和cfRNA两者,且仅cfDNA经修饰以产生cfDNA分子的可扩增汇集物。在第十七至第二十方面的某些实施方案中,样品可含有cfDNA和cfRNA两者,且cfDNA和cfRNA中的每一者经修饰以产生cfDNA和cfRNA分子的可扩增汇集物。

[0079] 在上述第二十一至第二十四方面中的每一个的某些实施方案中,cfRNA可为双链cfRNA或单链cfRNA。在第二十一至第二十四方面的某些实施方案中,cfRNA是双链cfRNA。在上述第二十一至第二十四方面的某些实施方案中,样品还可含有cfDNA(单链或双链)。在第二十一至第二十四方面的某些实施方案中,样品可含有cfRNA和cfDNA两者,且仅cfRNA经修饰以产生cfRNA分子的可扩增汇集物。在第二十一至第二十四方面的某些实施方案中,样品可含有cfRNA和cfDNA两者,且cfRNA和cfDNA中的每一者经修饰以产生cfRNA和cfDNA分子的可扩增汇集物。

[0080] 在上述第二十一至第二十四方面中的每一个的某些实施方案中,将样品中存在的至少50%或更多、60%或更多、70%或更多、80%或更多、90%或更多或95%或更多的cfNA转化为经修饰的cfNA以产生可扩增cfNA汇集物。当诸如在第十七至第二十方面中cfNA是cfDNA(包括双链cfDNA)时,将样品中存在的至少50%或更多、60%或更多、70%或更多、80%或更多、90%或更多或95%或更多的cfDNA转化为经修饰的cfDNA以产生可扩增cfDNA汇集物。当诸如在第二十一至第二十四方面中cfNA是cfRNA(包括双链cfRNA)时,将样品中存在的至少50%或更多、60%或更多、70%或更多、80%或更多、90%或更多或95%或更多的cfRNA转化为经修饰的cfRNA以产生可扩增cfRNA汇集物。

[0081] 在第二十五方面,本公开提供了分析cfNA的方法,所述方法包括以下步骤:i)由本文(诸如第一至第四方面)所述的任一种方法提供cfNA分子的可分析汇集物;和ii)分析cfNA分子的可分析汇集物以确定在cfNA分子的可分析汇集物中cfNA分子的特征。

[0082] 在第二十六方面,本公开提供了分析cfDNA的方法,所述方法包括以下步骤:i)由本文(诸如第五至第八方面)所述的任一种方法提供cfDNA分子的可分析汇集物;和ii)分析cfDNA分子的可分析汇集物以确定在cfDNA分子的可分析汇集物中cfDNA分子的特征。

[0083] 在第二十七方面,本公开提供了分析cfRNA的方法,所述方法包括以下步骤:i)由本文(诸如第九至第十二方面)所述的任一种方法提供cfRNA分子的可分析汇集物;和ii)分析cfRNA分子的可分析汇集物以确定在cfRNA分子的可分析汇集物中cfRNA分子的特征。

[0084] 在第二十五方面的某些实施方案中,可分析汇集物由第一、第二、第三或第四方面的方法产生。在第二十六方面的某些实施方案中,可分析汇集物由第五、第六、第七或第八方面的方法产生。在第二十七方面的某些实施方案中,可分析汇集物由第九、第十、第十一或第十二方面的方法产生。

[0085] 在上述第二十五至第二十七方面中的每一者中,分析步骤可涉及适用于分析核酸分子的任何技术。适合的技术包括但不限于下一代测序(NGS)和基于PCR的技术,诸如但不限于实时定量PCR、阻断PCR、数字液滴PCR(ddPCR)、夹紧PCR、ICE-COLD PCR、castPCR、ARMS PCR、BEAMing等。根据本公开的方法产生的cfNA分子(包括cfDNA和cfRNA)的可分析汇集物提供了足够数量和质量的cfNA分子用于这些和其它分析技术中,而不需要在可分析的cfNA汇集物的制备期间纯化核酸分子。

[0086] 在上述第二十五至第二十七方面中的每一者中,待确定的特征可为cfNA分子(包括cfDNA和cfRNA)的任何特征。可同时分析超过1种特征。代表性特征包括但不限于染色体异常、单核苷酸多态性、基因突变(诸如但不限于点突变、缺失和插入)、甲基化形式和拷贝数变化。在一个实施方案中,该特征与疾病相关。

[0087] 在第二十八方面,本公开提供了诊断受试者患有疾病或处于疾病风险的方法,所述方法包括以下步骤:i)由本文(诸如第一至第四方面)所述的任一种方法提供cfNA分子的可分析汇集物;ii)分析cfNA分子的可分析汇集物以确定在cfNA分子的可分析汇集物中cfNA分子的与疾病相关的特征;和iii)基于该特征的存在确定受试者患有疾病和/或处于疾病风险或基于该特征的不存在确定受试者不患有疾病和/或不处于疾病风险。

[0088] 在第二十九方面,本公开提供了用于诊断受试者患有疾病或处于疾病风险的方法,所述方法包括以下步骤:i)由本文(诸如第五至第八方面)所述的任一种方法提供cfDNA分子的可分析汇集物;ii)分析cfDNA分子的可分析汇集物以确定在cfDNA分子的可分析汇集物中cfDNA分子的与疾病相关的特征;和iii)基于该特征的存在确定受试者患有疾病和/或处于疾病风险或基于该特征的不存在确定受试者不患有疾病和/或不处于疾病风险。

[0089] 在第三十方面,本公开提供了用于诊断受试者患有疾病或处于疾病风险的方法,所述方法包括以下步骤:i)由本文(诸如第九至第十二方面)所述的任一种方法提供cfRNA分子的可分析汇集物;ii)分析cfRNA分子的可分析汇集物以确定在cfRNA分子的可分析汇集物中cfRNA分子的与疾病相关的特征;和iii)基于该特征的存在确定受试者患有疾病和/或处于疾病风险或基于该特征的不存在确定受试者不患有疾病和/或不处于疾病风险。

[0090] 在第二十八方面的某些实施方案中,可分析汇集物由第一、第二、第三或第四方面的方法产生。在第二十九方面的某些实施方案中,可分析汇集物由第五、第六、第七或第八方面的方法产生。在第三十方面的某些实施方案中,可分析汇集物由第九、第十、第十一或第十二方面的方法产生。

[0091] 在上述第二十八至第三十方面中的每一者中,分析步骤可涉及适用于分析核酸分子中的任何技术。适合的技术包括但不限于下一代测序(NGS)和基于PCR的技术,诸如但不限于实时定量PCR、阻断PCR、数字液滴PCR(ddPCR)、夹紧PCR、ICE-COLD PCR、castPCR、ARMS PCR、BEAMing等。根据本公开的方法产生的cfNA分子(包括cfDNA和cfRNA)的可分析汇集物提供了足够数量和质量的cfNA分子用于这些和其它分析技术中,而不需要在可分析的cfNA汇集物的制备期间纯化核酸分子。

[0092] 在上述第二十八至第三十方面中的每一者中,待确定的特征可为cfNA分子(包括cfDNA和cfRNA)的任何特征。可同时分析超过1种特征。代表性特征包括但不限于染色体异常、单核苷酸多态性、基因突变(诸如但不限于点突变、缺失和插入)、甲基化形式和拷贝数变化。在一个实施方案中,该特征与疾病相关。

[0093] 在第三十一方面,本公开提供了确定用于患有疾病的受试者的治疗性干预的方法,所述方法包括以下步骤:i)由本文(诸如第一至第四方面)所述的任一种方法提供cfNA分子的可分析汇集物;ii)分析cfNA分子的可分析汇集物以确定在cfNA分子的可分析汇集物中cfNA分子的与疾病相关的特征;和iii)基于经确定的特征确定治疗性干预。

[0094] 在第三十二方面,本公开提供了确定用于患有疾病的受试者的治疗性干预的方法,所述方法包括以下步骤:i)由本文(诸如第五至第八方面)所述的任一种方法提供cfDNA分子的可分析汇集物;ii)分析cfDNA分子的可分析汇集物以确定在cfDNA分子的可分析汇集物中cfDNA分子的与疾病相关的特征;和iii)基于经确定的特征确定治疗性干预。

[0095] 在第三十三方面,本公开提供了确定用于患有疾病的受试者的治疗性干预的方法,所述方法包括以下步骤:i)由本文(诸如第九至第十二方面)所述的任一种方法提供cfRNA分子的可分析汇集物;ii)分析cfRNA分子的可分析汇集物以确定在cfRNA分子的可分析汇集物中cfRNA分子的与疾病相关的特征;和iii)基于经确定的特征确定治疗性干预。

[0096] 在第三十一方面的某些实施方案中,可分析汇集物由第一、第二、第三或第四方面的方法产生。在第三十二方面的某些实施方案中,可分析汇集物由第五、第六、第七或第八方面的方法产生。在第三十一方面的某些实施方案中,可分析汇集物由第九、第十、第十一或第十二方面的方法产生。

[0097] 在上述第三十一至第三十三方面中的每一者中,分析步骤可涉及适用于分析核酸分子中的任何技术。适合的技术包括但不限于下一代测序(NGS)和基于PCR的技术,诸如但不限于实时定量PCR、阻断PCR、数字液滴PCR(ddPCR)、夹紧PCR、ICE-COLD PCR、castPCR、ARMS PCR、BEAMing等。根据本公开的方法产生的cfNA分子(包括cfDNA和cfRNA)的可分析汇集物提供了足够数量和质量的cfNA分子用于这些和其它分析技术中,而不需要在可分析的cfNA汇集物的制备期间纯化核酸分子。

[0098] 在上述第三十一至第三十三方面中的每一者中,待确定的特征可为cfNA分子(包括cfDNA和cfRNA)的任何特征。可同时分析超过1种特征。代表性特征包括但不限于染色体异常、单核苷酸多态性、基因突变(诸如但不限于点突变、缺失和插入)、甲基化形式和拷贝数变化。在一个实施方案中,该特征与疾病相关。

[0099] 在第三十四方面,本公开提供了监测经诊断患有疾病且经历用治疗疾病的治疗性方案治疗的受试者的治疗的方法,所述方法包括以下步骤:i)由本文(诸如第一至第四方面)所述的任一种方法提供cfNA分子的可分析汇集物;ii)分析cfNA分子的可分析汇集物以确定在cfNA分子的可分析汇集物中cfNA分子的与疾病相关的特征;iii)确定经确定的特征是否与当前的治疗性治疗方案相容;iv)如果经确定的特征指示禁用或不推荐治疗性方案则改变治疗性方案,或如果经确定的特征指示继续推荐治疗性方案则继续治疗性方案;和vi)任选地重复步骤i)至iv)以以所需的时间间隔监测治疗性干预。

[0100] 在第三十五方面,本公开提供了监测经诊断患有疾病且经历用治疗疾病的治疗性方案治疗的受试者的治疗的方法,所述方法包括以下步骤:i)由本文(诸如第五至第八方面)所述的任一种方法提供cfDNA分子的可分析汇集物;ii)分析cfDNA分子的可分析汇集物以确定在cfDNA分子的可分析汇集物中cfDNA分子的与疾病相关的特征;iii)确定经确定的特征是否与当前的治疗性治疗方案相容;iv)如果经确定的特征指示禁用或不推荐治疗性方案则改变治疗性方案,或如果经确定的特征指示继续推荐治疗性方案则继续治疗性方

案;和vi) 任选地重复步骤i) 至iv) 以以所需的时间间隔监测治疗性干预。

[0101] 在第三十六方面,本公开提供了监测经诊断患有疾病且经历用治疗疾病的治疗性方案治疗的受试者的治疗的方法,所述方法包括以下步骤:i) 由本文(诸如第九至第十二方面)所述的任一种方法提供cfRNA分子的可分析汇集物;ii) 分析cfRNA分子的可分析汇集物以确定在cfRNA分子的可分析汇集物中cfRNA分子的与疾病相关的特征;iii) 确定经确定的特征是否与当前的治疗性治疗方案相容;iv) 如果经确定的特征指示禁用或不推荐治疗性方案则改变治疗性方案,或如果经确定的特征指示继续推荐治疗性方案则继续治疗性方案;和vi) 任选地重复步骤i) 至iv) 以以所需的时间间隔监测治疗性干预。

[0102] 在第三十四方面的某些实施方案中,可分析汇集物由第一、第二、第三或第四方面的方法产生。在第三十五方面的某些实施方案中,可分析汇集物由第五、第六、第七或第八方面的方法产生。在第三十六方面的某些实施方案中,可分析汇集物由第九、第十、第十一或第十二方面的方法产生。

[0103] 在上述第三十四至第三十六方面中的每一者中,分析步骤可涉及适用于分析核酸分子中的任何技术。适合的技术包括但不限于下一代测序(NGS)和基于PCR的技术,诸如但不限于实时定量PCR、阻断PCR、数字液滴PCR(ddPCR)、夹紧PCR、ICE-COLD PCR、castPCR、ARMS PCR、BEAMing等。根据本公开的方法产生的cfNA分子(包括cfDNA和cfRNA)的可分析汇集物提供了足够数量和质量的cfNA分子用于这些和其它分析技术中,而不需要在可分析的cfNA汇集物的制备期间纯化核酸分子。

[0104] 在上述第三十四至第三十六方面中的每一者中,待确定的特征可为cfNA分子(包括cfDNA和cfRNA)的任何特征。可同时分析超过1种特征。代表性特征包括但不限于染色体异常、单核苷酸多态性、基因突变(诸如但不限于点突变、缺失和插入)、甲基化形式和拷贝数变化。在一个实施方案中,该特征与疾病相关。

[0105] 在第三十七方面,本公开提供了监测受试者的方法,所述方法包括以下步骤:i) 由本文(诸如第一至第四方面)所述的任一种方法提供cfNA分子的可分析汇集物;ii) 分析cfNA分子的可分析汇集物以确定在cfNA分子的可分析汇集物中cfNA分子的与疾病相关的特征;和iii) 基于经确定的特征确定受试者是否需要治疗。

[0106] 在第三十八方面,本公开提供了监测受试者的方法,所述方法包括以下步骤:i) 由本文(诸如第五至第八方面)所述的任一种方法提供cfDNA分子的可分析汇集物;ii) 分析cfDNA分子的可分析汇集物以确定在cfDNA分子的可分析汇集物中cfDNA分子的与疾病相关的特征;和iii) 基于经确定的特征确定受试者是否需要治疗。

[0107] 在第三十九方面,本公开提供了监测受试者的方法,所述方法包括以下步骤:i) 由本文(诸如第九至第十二方面)所述的任一种方法提供cfRNA分子的可分析汇集物;ii) 分析cfRNA分子的可分析汇集物以确定在cfRNA分子的可分析汇集物中cfRNA分子的与疾病相关的特征;和iii) 基于经确定的特征确定受试者是否需要治疗。

[0108] 在第三十七方面的某些实施方案中,可分析汇集物由第一、第二、第三或第四方面的方法产生。在第三十八方面的某些实施方案中,可分析汇集物由第五、第六、第七或第八方面的方法产生。在第三十九方面的某些实施方案中,可分析汇集物由第九、第十、第十一或第十二方面的方法产生。

[0109] 在上述第三十七至第三十九方面中的每一者中,分析步骤可涉及适用于分析核酸

分子中的任何技术。适合的技术包括但不限于下一代测序(NGS)和基于PCR的技术,诸如但不限于实时定量PCR、阻断PCR、数字液滴PCR(ddPCR)、夹紧PCR、ICE-COLD PCR、castPCR、ARMS PCR、BEAMing等。根据本公开的方法产生的cfNA分子(包括cfDNA和cfRNA)的可分析汇集物提供了足够数量和质量的cfNA分子用于这些和其它分析技术中,而不需要在可分析的cfNA汇集物的制备期间纯化核酸分子。

[0110] 在上述第三十七至第三十九方面中的每一者中,待确定的特征可为cfNA分子(包括cfDNA和cfRNA)的任何特征。可同时分析超过1种特征。代表性特征包括但不限于染色体异常、单核苷酸多态性、基因突变(诸如但不限于点突变、缺失和插入)、甲基化形式和拷贝数变化。在一个实施方案中,该特征与疾病相关。

具体实施方式

[0111] 在以下描述中,阐述了许多特定细节以提供对本发明更透彻的理解。然而,对于本领域技术人员显而易见的是,可以在没有这些特定细节中的一个或多个的情况下实施所公开的实施方案。在其它情况下,为了避免模糊本发明,没有描述本领域技术人员熟知的公知特征和程序。

[0112] 定义

[0113] 如在本说明书中使用,术语“可扩增核酸汇集物”是指已从其原始状态修饰以允许扩增核酸分子的核酸的汇集物。在某些实施方案中,可扩增核酸汇集物通过将外源性核酸序列添加至样品中存在的至少一部分的核酸分子的3'末端、5'末端、或3'和5'末端两者来产生。

[0114] 如在本说明书中使用,术语“可扩增核酸汇集物”和“可扩增cfNA汇集物”是指样品中存在的多个核酸,其已经被修饰以含有至少一条外源性核酸序列,其中外源性核酸序列用于扩增外源序列所附接的核酸分子的反应中。在某些实施方案中,核酸可能含有1或2条外源性序列。

[0115] 如在本说明书中使用,术语“可扩增cfDNA汇集物”是指样品中存在的经修饰为含有至少一条外源性核酸序列的多个cfDNA,其中外源性核酸序列用于扩增外源性序列所附接的cfDNA分子的反应中。在某些实施方案中,cfDNA可含有1或2条外源性序列。

[0116] 如在本说明书中使用,术语“可扩增cfRNA汇集物”是指样品中存在的经修饰为含有至少一条外源性核酸序列的多个cfRNA,其中外源性核酸序列用于扩增外源性序列所附接的cfRNA分子的反应中。在某些实施方案中,cfRNA可含有1或2条外源性序列。

[0117] 如在本说明书中使用,术语“外源性核酸序列”意指核酸分子(包括样品中存在的cfNA、cfDNA和/或cfRNA)中不存在于的序列。在某些实施方案中,外源性核酸序列是人类基因组中不存在的序列。在某些实施方案中,外源性核酸序列含有能够结合引物的引物位点。在某些实施方案中,引物位点是通用引物位点。在某些实施方案中,外源性核酸序列含有复制块。

[0118] 如在本说明书中使用,术语“细胞游离核酸”或“cfNA”意指在细胞之外(诸如在包括但不限于血流、脑脊液、唾液或尿在内的体液中)存在的核酸区段。cfNA可以来源于受试者(例如,来自受试者的细胞)或可以来源于除了受试者以外的来源(例如,来自病毒感染)。

[0119] 如在本说明书中使用,术语“细胞游离DNA”或“cfDNA”意指在细胞之外(诸如在包

括但不限于血流、脑脊液、唾液或尿在内的体液中)存在的DNA区段。cfDNA可以来源于受试者(例如,来自受试者的细胞)或可以来源于除了受试者以外的来源(例如,来自病毒感染)。

[0120] 如在本说明书中使用,术语“细胞游离RNA”或“cfRNA”意指在细胞之外(诸如在包括但不限于血流、脑脊液、唾液或尿在内的体液中)存在的RNA区段。术语“细胞游离RNA”或“cfRNA”还包括由RNA(诸如例如,双链cDNA)的区段产生的DNA。cfRNA可以来源于受试者(例如,来自受试者的细胞)或可以来源于除了受试者以外的来源(例如,来自病毒感染)。

[0121] 如在本说明书中使用,术语“不使样品经受核酸纯化步骤”、“尚未经受纯化步骤”、“未纯化”或“未经受纯化”(以及类似术语)当用于描述样品或样品中的核酸(包括cfNA、cfDNA和/或cfRNA)时意指样品/核酸尚未经受特异性分离或纯化样品中的核酸(包括cfNA、cfDNA和/或cfRNA)的步骤。

[0122] 如本文所用,术语“特异性分离”意指步骤或一系列步骤,其允许样品中的核酸(包括cfNA、cfDNA和/或cfRNA)基于核酸的序列特定特征从样品分离(诸如,例如通过使用探针)。如本文所用,术语“纯化”当它涉及样品中的核酸(包括cfNA、cfDNA和/或cfRNA)时意指步骤或一系列步骤,其允许样品中的核酸(包括cfNA、cfDNA和/或cfRNA)基于核酸的结合特征(例如,与除了序列特异性方式以外的方式结合核酸的核酸结合试剂一起孵育)从样品中分离。因此,无论样品的性质如何,样品不:i)经受特异性分离样品中可能存在的任何核酸(包括cfNA、cfDNA和/或cfRNA)的一个或多个步骤;或ii)经受涉及样品中核酸(包括cfNA、cfDNA和/或cfRNA)与核酸结合试剂相互作用以分离核酸的步骤,以便从样品中去除核酸或从样品中去除样品中的除核酸以外的所有或基本所有的样品组分。在某些情况下,可以处理含有核酸的样品(例如,可以通过离心或其它方式处理血液样品以产生血清或血浆样品),并且处理可以去除某些组分(例如蛋白质、细胞或其它组分)和/或增加样品中核酸的浓度。此类处理不被认为是“特异性分离”或“纯化”样品中的核酸(包括cfNA、cfDNA和/或cfRNA),因为核酸分子仍然与样品的附加组分一起存在,并且处理不是特异性针对样品中的核酸分子的。在一个实施方案中,术语“特异性分离”和“纯化”不包括样品的离心。在另一个实施方案中,当样品中的至少一种其它组分的浓度也增加时,增加cfNA(包括cfDNA和/或cfRNA)的浓度的处理步骤不被认为是“特异性分离”或“纯化”样品中的cfNA(包括cfDNA和/或cfRNA)。

[0123] 如本文所用,术语“原位”当用于描述反应(诸如核酸的扩增)时,意指反应发生在如所提供的样品中,不需要进一步操纵样品。

[0124] 如本文所用,术语“约”意指大致、粗略地、大约或在...范围内。当术语“约”与数值范围结合使用时,它通过使界限延伸高于和低于所述数值来修饰该范围。通常,术语“约”在本文中高于及低于所述值上下变化1%至20%(更高或更低)来修饰数值;在某些实施方案中,术语“约”在本文中高于及低于所述值上下变化1%至5%(更高或更低)来修饰数值。

[0125] 如本文所用,术语“动物”、“受试者”和“患者”如本文所用,包括动物界的所有成员,包括但不限于哺乳动物、动物(如猫、狗、马、猪科动物等)和人类。在一个特定的实施方案中,受试者是人类。

[0126] 如本文所用,术语“添加外源性核酸序列至样品中的至少一部分的cfNA分子的5'末端和/或3'末端”或类似术语是指将外源性核酸序列掺入到样品中存在的cfNA序列中或

将外源性核酸序列掺入到作为cfNA的至少一部分序列的互补序列中。此类掺入可以通过将外源性核酸序列退火至cfNA序列并随后复制cfNA序列(其可以由外源性核酸序列引发)来完成。此类掺入可以通过将外源性核酸序列的至少一条链连接至cfNA的至少一条链来实现。在任何情况下,产生cfNA(或cfNA的互补体),其在本文中也可称为经修饰的cfNA,其中cfNA的至少5'和3'末端含有外源性核酸序列。

[0127] 应注意,如本文所用并且在所附权利要求中,除非上下文另有明确规定,否则单数形式“一个”、“一种”和“该”包括复数指示物。因此,例如,对“一个核酸分子”的引用是指一个、多于一个的此类核酸分子或此类核酸分子的混合物,且对“一种测定”的引用包括对本领域技术人员已知的等效步骤和方法等的引用。

[0128] 在提供数值范围的情况下,应理解,在此范围的上限和下限之间的每个居中值以及在所述范围内的任何其它指定值或居中值都涵盖在本发明内。在所述范围包括上限和下限的情况下,排除那些包括的限值中的任一个的范围也包括在本发明中。

[0129] 除非明确说明,否则本文所用的术语旨在具有如本领域普通技术人员所理解的一般和普通含义。该定义旨在帮助读者理解本发明,但不意在改变或另外地限制此类术语的含义,除非明确指出。为了描述和公开在该公开中描述并且可以结合当前描述的本发明使用的制剂和方法,将本文提到的所有出版物通过引用并入。

[0130] 引言

[0131] 体内的大部分核酸(DNA和RNA)位于细胞内,但在血液循环中也可以发现大量的胞外核酸。自1948年Mandel和Métais首次在血液中发现cfDNA以来,研究人员发现cfDNA可以通过两种方式区分患有疾病或疾患(例如癌症)的患者与健康个体:首先通过患有疾病或疾患的患者的血液中升高的cfDNA浓度;和其次通过在患有疾病或疾患的患者中的cfDNA中存在肿瘤-特异性改变。已在血液中发现肿瘤-特异性cfDNA,其对应于广泛范围的癌症,诸如但不限于血液癌、结直肠癌、胰腺癌、皮肤癌、头颈癌、肺癌、乳腺癌、胃癌、前列腺癌和宫颈癌。这表明cfDNA是所有癌症的标志,并反映了可用于诊断癌症、监测疾病进展、鉴别治疗性干预和监测治疗响应的病理过程。认为cfDNA通过新合成的核酸的“主动”释放以及通过“被动”机制作为坏死和/或凋亡细胞死亡的终产物进入血流。

[0132] 对于健康受试者,循环cfDNA的平均浓度为10-30ng/mL的血浆,其中癌症患者的值超过100ng/mL的血浆。使用多种方法获得的由肿瘤提供的cfDNA的估值在0.01至90%之间(Schwarzenbach H等,2008,Ann N Y Acad Sci 1137:190-196)。大多数cfDNA片段测量长度在150至200个碱基对之间,循环中的可变半衰期的范围为15分钟至几个小时。血流中cfDNA的量受多种因素影响,诸如但不限于肿瘤进展、肿瘤位置、肿瘤转移、肿瘤大小以及通过血液和淋巴循环进行的cfDNA的清除、降解和过滤。最常见的公布的cfDNA提取方法是可商购获得的旋转柱提取试剂盒。其它报道的提取方法包括磁珠、苯酚/氯仿提取和碱性盐析(alkaline salting)。cfDNA提取的效率可直接影响检测一种或多种突变的能力,其直接影响测定灵敏度。

[0133] 根据特定癌症的分子表征,基于循环cfDNA的非侵入性方法可用于检测和监测特定且预测性的生物标记,以用于癌症患者的恰当治疗。例如通过使用qPCR、数字PCR或测序,KRAS和EGFR突变状态可以在靶向疗法之前、期间和之后从癌症患者中的cfDNA获得(Bidard FC等,2013,Cancer Metastasis Rev.32(1-2):179-188)。下一代测序(NGS)对cfDNA的全外

显子组测序可以提供关于肿瘤进展的分子状态的全面、完整和实时的图片(Diaz LA Jr等, 2013, *Oncotarget* 4(10):1856-1857)。最重要的是,肿瘤负荷可以通过超深cfDNA突变谱分析(mutation profiling)来定量估计(Bettegowda C等, 2014, *Sci. Transl. Med.* 6(224):224ra24)。也可以在cfDNA片段中检测肿瘤基因组的甲基化状态(Mori T等, 2005, *J. Clin. Oncol.* 23(36):9351-9358)。总体而言,用血液活检开发以患者为中心的分子诊断技术为患者护理提供了许多益处。

[0134] 在精准医学时代,预计患者将越来越多地根据其特定肿瘤的遗传结构而不是肿瘤的位置或组织学特征进行治疗。然而,癌症基因组是不稳定的,并且在选择压力(诸如施疗法)下易于改变。因此,经遗传定制的癌症疗法需要连续监测肿瘤基因组以改善临床结果。采用现有技术进行此类实践在临床上并不可实践。在癌症患者的循环cfDNA中可以检测到原发性肿瘤典型的遗传和表观遗传改变的发现表明血液中至少部分的cfDNA是肿瘤来源的。因此,来自外周血液的cfDNA分析为以非侵入性方式进行纵向肿瘤监测提供了独特的机会。

[0135] 上面已经讨论了实体瘤取样中固有的缺点。

[0136] 相反,血液活检,特别是cfDNA分析,为精确癌症管理提供了一种容易获得的、微创且纵向的解决方案。采用cfDNA的临床测试具有固有的特异性、灵敏性,并能够实时捕获肿瘤内和肿瘤间的异质性(Dawson SJ等, 2013, *N Engl J Med* 368:1199-1209)。通过周期性“血液活检”分析检测低频突变可以在病变足够大以便通过成像检测之前监测肿瘤进展(Diaz LA Jr等, 2012, *Nature* 486(7404):537-540)。也可以保证超过单一突变的分析以捕获肿瘤异质性以进行有效的治疗决策(Sequist LV等, 2011, *Sci. Transl. Med.* 23(75):75ra26)。血液活检不像组织活检那样空间受限,并且可展现出我们身体内整个癌症发展期间发生的全谱突变。然而,传统分析方法诸如桑格测序(Sanger sequencing)的灵敏度不足以检测低频变异。在这方面,先进的NGS技术可以为具有高灵敏度的多重突变的高通量分析提供成本有效的替代方案。此外,具有单分子扩增和/或选择性富集来自绝对正常人群的肿瘤-特异性cfDNA特征的基于PCR的平台已经证实了前所未有的测定灵敏度。

[0137] 经由cfDNA评估癌症-相关的遗传改变也可以避免肿瘤的直接取样所固有的位置偏差,其中观察到的突变谱可能在同一恶性组织内的不同活检切片之间不同。虽然DNA释放到血液中的确切机制仍然不确定,但它被认为是由肿瘤细胞的细胞凋亡、坏死和主动释放的组合所致。此类信息丰富的cfDNA生物标记显示出在几乎所有癌症类型中改善早期检测、诊断、预后、疾病和疗法监测的潜力(Gormally E等, 2007, *Mutat. Res.* 635(2-3):105-117; Tong YK等, 2006 *Clin. Chim. Acta* 363(1-2):187-196; Gautschi O等, 2004, *J. Clin. Oncol.* 22(20):4157-4164; Xue X等, 2006 *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1075:154-164; Khan S等, 2004 *Intl. J. Cancer* 110(6):891-895)。

[0138] 表A显示了血液活检和实体瘤取样的关键特征的比较。

[0139]

表 A: 血液活检和实体瘤取样的比较		
关键特征	血液活检	组织活检
侵入性	否	是
在整个疾病过程中的样品可用性	是	否
当离体维持时的样品稳定性	是	当处理时是稳定的
纵向疾病监测的效用	是	否
成本	低	高
处理时间	短	长 (组织切片、染色和病理学家的参与)
排斥/失效率	低	高 (由于 QNS 或 TNI 导致)
用于多重测试的原料	高	罕见
表缩写: QNS: 数量不足; TNI: 肿瘤未鉴定		

[0140] 尽管与健康个体相比在癌症患者中持续检测到更高水平的血浆cfDNA,但在研究和方法上存在相当大差异。这些变化可归因于研究群组、预分析样品制备和用于分离和定量cfDNA的方法的差异(Xue X等,2006,Ann.N.Y.Acad.Sci.1075:154-164;Boddy JL等,2005,Clin.Cancer Res.11(4):1394-1399;Wu TL等2002,Clin.Chim.Acta 321(1-2):77-87;Chiu RW等2001,Clin.Chem.47(9):1607-1613)。循环cfDNA是一种用于提取的具有挑战性的分析物,因为其浓度低、尺寸分布不均匀和血浆中碎片化性质。因此,由于大量输入、成本和劳动强度的要求,cfDNA的分离具有挑战性。目前不存在用于cfDNA提取、纯化或定量的标准方法。许多实验室使用可商购获得的提取试剂盒,而其它实验室开发自己的分离方法。

最常用的可商购获得的试剂盒是QIAamp循环核酸试剂盒(Qiagen),其中二氧化硅膜优选以旋转柱形式结合cfDNA的小片段,从而提供快速且简单的纯化cfDNA的方式以用于进一步的基因组分析。然而,由于步骤(诸如结合、洗涤和洗脱)中不可避免的损失,目前的方法对cfDNA的回收效率极其低,导致需要大量原料(>10mL血液)。此外,此类二氧化硅膜结合技术不能有效地回收各种大小的cfDNA片段,从而进一步影响下游分析。

[0141] 目前液体活检领域的大多数研究集中在从受试者中选择性富集或扩增肿瘤-特异性cfDNA的新技术上。然而,如上所述,因为通过现有技术分离的cfDNA仅代表最初存在于样品中的一部分cfDNA,故原料仍然不完全。因此,无论下游富集和检测技术多么灵敏,这些技术都无法弥补上游样品制备过程中已经损失的cfDNA。此外,现有技术在回收各种大小的cfDNA片段方面不一致。

[0142] 因此,现有技术缺乏符合目的样品制备方法,其可以有效地回收较高分子量(坏死性死亡)和较低分子量(凋亡性死亡)的cfNA种类(包括cfDNA和/或cfRNA)以精确定量以及检测同一样品中细胞游离核酸的肿瘤-特异性突变谱。本公开提供了此类方法,且允许提高cfDNA分析中的分析灵敏度和特异性。

[0143] 扩增方法

[0144] 本公开提供了液体活检临床应用中至少三个主要未解决的挑战的解决方案,包括施加基于cfNA的液体活检给患者护理:i)输入样品体积;ii)用于分析的cfNA的输出量;iii)用于分析的输出cfNA的质量。本公开提供了制备样品中的cfNA(包括cfDNA和/或cfRNA)用于分析且不使样品经受核酸纯化步骤的方法。在此类方法中,所需的样品体积低于现有技术的方法(低至需要10至50微升全血来产生适合的血浆样品),污染的风险降低(因为不需要核酸纯化步骤),并且样品中全谱cfNA的回收率增加(因为不需要核酸纯化步骤)。本公开还提供了使用cfNA的方法,例如分析样品中的cfNA(包括cfDNA和/或cfRNA)的方法,其中使用本公开的方法制备cfNA(即,样品尚未经受核酸纯化步骤)。

[0145] 因为在扩增和分析之前消除了对纯化或回收cfNA的需求,故由本公开的方法制备的核酸提供了样品中的cfNA的优异利用。本公开提供了样品中cfNA的原位扩增,并且可以在单个反应(即,多孔板的单管或单孔)中进行。此外,由本公开的方法制备的cfNA具有比由现有技术的方法制备的cfNA更高的质量,允许优异的下流分析。此外,本公开的方法只需要少量的起始样品。可以使用低至10-50微升的体积(液滴体积)。例如,本公开显示了从10微升尿和10-20微升血浆(其可从约50微升全血获得)扩增和/或分析cfNA。因此,本公开的方法适用于下一代液体活检、定点护理和纳米-或微型化微流体“芯片实验室”诊断设备。此外,使用本公开的方法可以分析更广范围的cfNA分子(例如,广泛分布的小的cfNA片段和大的cfNA片段)。例如,本公开的方法证明对核酸片段尺寸没有偏好。

[0146] 对cfNA进行ISA的方法和用于制备cfNA以供扩增的方法

[0147] 本公开的方法利用原位扩增液体样品中的cfNA而不需要使样品经受核酸纯化步骤。因此,cfNA可以直接从液体样品(例如尿、CSF、唾液、血浆或血清)中原位扩增而不需要核酸纯化步骤(例如,cfNA不经特别分离或纯化)。该特征至少部分消除了制备步骤中样品中的cfNA的损失,优势是样品中的cfNA的完整表达可用于后续分析。在本文所述的方法中,与现有技术相比,样品体积显著减小。

[0148] 此外,本公开的方法提供cfNA的可分析汇集物,它具有高质量且可用于各种下游

分析技术。任何已知的分析技术都可以与本公开的方法结合使用来分析由本公开的方法产生的cfNA的可分析汇集物。适合的技术包括但不限于下一代测序(NGS)和基于PCR的技术,诸如但不限于实时定量PCR、阻断PCR、数字液滴PCR(ddPCR)、夹紧PCR、ICE-COLD PCR、castPCR、ARMS PCR、BEAMing等。以前认为高度纯化的cfNA是这些技术使用所需的。

[0149] 本公开提供了原位扩增样品中的核酸(包括,例如cfDNA)以产生可扩增核酸汇集物的方法。可扩增核酸汇集物可经扩增以产生可分析的核酸汇集物,并且可用于如本文所述的后续分析。此外,本公开提供了制备样品中的核酸(包括,例如cfDNA)以用于扩增的方法。所述方法在没有使样品经受核酸纯化步骤的情况下进行(例如,cfNA不经特别分离或纯化)。此外,在某些实施方案中,该方法以10微升至50微升的样品体积进行。下面提供了该方法的某些实施方案。另外,在某些实施方案中,所有描述的反应均在单个反应容器中进行。

[0150] 核酸分子可为任何核酸。在某些实施方案中,核酸是cfDNA。在某些实施方案中,核酸是双链cfDNA。在某些实施方案中,核酸是双链cfRNA。

[0151] 以下描述是指本文公开的方法的每个实施方案和方面。尽管为了简单起见,下面的讨论可能涉及cfDNA作为代表性cfNA,但本公开的方法适用于任何类型的cfNA,并且不应限于cfDNA。

[0152] 本公开的方法提供了ISA样品中的cfNA的方法,所述方法包括:1)提供含有cfNA(包括cfDNA和/或RNA)的液体样品;2)使样品经受处理步骤;3)通过添加外源性核酸序列至样品中至少一部分的cfNA分子的5'末端和/或3'末端,将样品中的至少一部分的cfNA分子转化为经修饰的cfNA以产生可扩增cfNA汇集物;和4)扩增可扩增cfNA汇集物以产生cfNA的可分析汇集物。

[0153] 如本文所讨论,cfNA可为cfDNA(诸如双链cfDNA)。因此,本公开提供了ISA样品中的cfDNA的方法,所述方法包括:1)提供含有cfDNA的液体样品;2)使样品经受处理步骤;3)通过添加外源性核酸序列至样品中至少一部分的cfDNA分子的5'末端和/或3'末端,将样品中的至少一部分的cfDNA分子转化为经修饰的cfDNA以产生可扩增cfDNA汇集物;和4)扩增可扩增cfDNA汇集物以产生cfDNA的可分析汇集物。

[0154] 如本文所讨论,cfNA可为cfRNA。因此,本公开提供了ISA样品中的cfRNA的方法,所述方法包括:1)提供含有cfRNA的液体样品;2)使样品经受处理步骤;3)通过添加外源性核酸序列至样品中的至少一部分的cfRNA分子的5'末端和/或3'末端,将样品中的至少一部分的cfRNA分子转化为经修饰的cfRNA以产生可扩增cfRNA汇集物;和4)扩增可扩增cfRNA汇集物以产生cfRNA的可分析汇集物。

[0155] 本公开提供了制备样品中的cfNA以用于分析且不使样品中的cfNA经受核酸纯化步骤的方法,所述方法包括以下步骤:i)提供含有多个cfNA分子的液体样品;ii)对样品进行至少一个处理步骤;和iii)将样品中的至少一部分的cfNA分子转化为经修饰的cfNA以产生可扩增cfNA汇集物。

[0156] 如本文所讨论,cfNA可为cfDNA(诸如双链cfDNA)。因此,本公开提供了制备样品中的cfNA以用于分析且不使样品中的cfNA经受核酸纯化步骤的方法,所述方法包括以下步骤:1)提供含有cfDNA的液体样品;2)使样品经受处理步骤;和3)通过添加外源性核酸序列至样品中至少一部分的cfDNA分子的5'末端和/或3'末端,将样品中的至少一部分的cfDNA分子转化为经修饰的cfDNA以产生可扩增cfDNA汇集物。

[0157] 如本文所讨论, cfNA可为cfRNA。因此, 本公开提供了制备样品中的cfNA以用于分析且不使样品中的cfNA经受核酸纯化步骤的方法, 所述方法包括以下步骤: 1) 提供含有cfRNA的液体样品; 2) 使样品经受处理步骤; 3) 通过添加外源性核酸序列至样品中至少一部分的cfRNA分子的5'末端和/或3'末端, 将样品中的至少一部分的cfRNA分子转化为经修饰的cfRNA以产生可扩增cfRNA汇集物; 和4) 扩增可扩增cfRNA汇集物以产生cfRNA的可分析汇集物。

[0158] 本公开的方法特别包括以上发明内容部分中所述的第一至第十二和第十三至第二十四方面的那些方法。以下描述应用于ISA的方法和用于制备分析用cfNA的方法两者。

[0159] 在某些实施方案中, 样品中的至少一部分的cfNA(包括cfDNA和/或cfRNA)在cfNA的5'末端或3'末端处含有1条外源性核酸序列。在某些实施方案中, 样品中的至少一部分的cfNA(包括cfDNA和/或cfRNA)含有2条外源性核酸序列(1条在5'末端处且1条在3'末端处)。当存在多条外源性核酸序列时, 外源性核酸序列可彼此相同或可彼此不同。在某些实施方案中, 将外源性核酸序列添加至样品中存在的至少一部分的cfNA(包括cfDNA和/或cfRNA)分子的3'末端和5'末端两者。

[0160] 提供含有多个cfNA分子(例如, cfDNA和/或cfRNA)的液体样品。液体样品可以从受试者获得的任何液体样品。在某些实施方案中, 液体样品是血液样品、血清样品、血浆样品、唾液样品、CSF样品、唾液样品或尿样品。可以根据需要处理液体样品。例如, 可以处理血液样品以去除细胞并提供血浆/血清级分。可直接使用液体样品, 而不进行任何处理。液体样品的性质将至少部分决定是否需要处理步骤。在一个实施方案中, 液体样品不含有全细胞或细胞片段。处理步骤可用于从样品中除去不需要的材料, 诸如细胞、细胞片段等。无论样品的性质如何, 样品中的cfNA都不经特别分离或纯化。在某些实施方案中, 液体样品来自受试者, 诸如人类受试者。在某些实施方案中, 液体样品来自疑似患有疾病或疾患(诸如癌症、细菌感染或病毒感染)的受试者, 包括人类受试者。在某些实施方案中, 液体样品来自正在经历疾病或疾患治疗的受试者, 包括人类受试者。在一些实施方案中, 液体样品随着时间的推移从受试者(包括人类受试者)连续收集, 而受试者正在经历疾病或疾患治疗(包括在治疗开始之前、治疗期间和/或治疗停止后)。

[0161] 在一个实施方案中, 液体样品的体积小于1ml。在另一个实施方案中, 液体样品的体积小于0.5ml。在另一个实施方案中, 液体样品的体积小于0.1ml。在另一个实施方案中, 液体样品的体积小于0.05ml。在某些实施方案中, 液体样品的体积为10微升至1000微升。在某些实施方案中, 液体样品的体积为10 μ L至750 μ L。在某些实施方案中, 液体样品的体积为10 μ L至500 μ L。在某些实施方案中, 液体样品的体积为10 μ L至250 μ L。在某些实施方案中, 液体样品的体积为10 μ L至100 μ L。在某些实施方案中, 液体样品体积为10 μ L至50 μ L。样品的性质可至少部分确定所需的样品体积。

[0162] 在一个实施方案中, 处理步骤是稀释样品。因此, 可任选地稀释含有cfNA的样品。在某些实施方案中, 将样品在与本文所述的另外反应相容的溶液中稀释。在某些实施方案中, 将样品在扩增可接受的溶液中稀释。“扩增可接受的溶液”是与用于扩增样品中的经修饰的cfDNA分子的核酸扩增反应相容的溶液和不降解样品中的cfNA的溶液。可使用的代表性溶液是本领域中已知的且包括但不限于磷酸盐缓冲盐水(PBS)、PCR扩增缓冲液、无核酸酶的水和Tris-基缓冲液。在某些实施方案中, 未稀释样品。在某些实施方案中, 当使用血浆

或血清样品时,将样品用诸如扩增可接受溶液稀释1-20倍、1-10倍或1-5倍。在某些实施方案中,溶液是PBS。在某些实施方案中,溶液是10mM Tris,pH 8.0;1mM EDTA。在某些实施方案中,溶液是无核酸酶水。在某些实施方案中,稀释血浆样品和血清样品。在某些实施方案中,未稀释尿样品。扩增可接受溶液可含有预防样品中的cfNA降解的试剂。在某些实施方案中,扩增可接受溶液不含有预防样品中的cfNA降解的试剂。

[0163] 在一个实施方案中,处理步骤是加热样品。因此,可任选地加热含有cfNA的样品。加热至少部分地用于使蛋白质变性、使cfNA复合物解离、使样品中的核酸酶(例如,DNA酶和/或RNA酶)失活并使样品中的cfDNA片段化。可改变加热步骤。在一个实施方案中,将样品在70℃至120℃、80℃至110℃或90℃至100℃的温度下加热。可将样品加热1分钟至20分钟、1分钟至10分钟或1分钟至5分钟。在一个特定的实施方案中,将样品在95℃下加热4分钟。

[0164] 在一个实施方案中,处理步骤是片段化样品中的cfNA。如本文所讨论,来自各种来源的cfNA可能具有不同的片段尺寸分布。如本文所述的方法中所用,在某些实施方案中,优选地cfNA具有50bp至2000bp的片段尺寸分布。在某些实施方案中,cfNA具有100bp至1000bp的片段尺寸分布。在某些实施方案中,cfNA具有50bp至600bp的片段尺寸分布。在某些实施方案中,cfNA具有50bp至500bp的片段尺寸分布。在某些实施方案中,cfNA具有100bp至500bp的片段尺寸分布。在某些实施方案中,cfNA具有100bp至400bp的片段尺寸分布。在某些实施方案中,cfNA具有100bp至300bp的片段尺寸分布。在某些实施方案中,cfNA具有100bp至200bp的片段尺寸分布。在某些实施方案中,cfNA具有200bp至300bp、300bp至400bp、400bp至500bp或者500bp至600bp的片段尺寸分布。在某些实施方案中,cfNA的主要部分具有100bp至2000bp、或者以上讨论的任何范围的片段尺寸分布。“主要部分”意指样品中至少50%的cfNA,诸如至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或更大。因此,可任选地片段化含有cfNA的样品。在某些实施方案中,在片段化步骤后cfNA具有50bp至600bp、100bp至500bp、100bp至400bp、100bp至300bp、100bp至200bp、200bp至300bp、300bp至400bp、400bp至500bp或500bp至600bp的片段尺寸分布。片段化步骤可以使用本领域已知的任何方法来完成。如上所讨论,在一个实施方案中,可通过加热样品来完成片段化。当加热用于片段化cfNA时,可以将二价阳离子(例如,镁)添加至样品。在一个实施方案中,片段化通过物理手段完成,诸如但不限于声学剪切、超声处理和流体动力学剪切。

[0165] 在一个实施方案中,处理步骤是稀释和加热。在一个实施方案中,处理步骤是稀释和片段化。在一个实施方案中,处理步骤是加热和片段化。在一个实施方案中,处理步骤是稀释、加热和片段化。

[0166] 在某些实施方案中,通过添加外源性核酸序列至样品中至少一部分的cfNA分子的5'末端,将样品中的至少一部分的cfNA分子转化为经修饰的cfNA以产生可扩增cfNA汇集物。在某些实施方案中,通过添加外源性核酸序列至样品中至少一部分的cfNA分子的3'末端,将样品中的至少一部分的cfNA分子转化为经修饰的cfNA以产生可扩增cfNA汇集物。在某些实施方案中,通过添加外源性核酸序列至样品中至少一部分的cfNA分子的5'末端和3'末端两者,将样品中的至少一部分的cfNA分子转化为经修饰的cfNA以产生可扩增cfNA汇集物。

[0167] 为了将外源性核酸序列添加至样品中的至少一部分的cfNA分子,可以处理cfNA以产生可有效连接至外源性核酸序列的cfNA(被称为“优化的cfNA”)。样品中的cfNA不是同质

的,特别是在5'末端和/或3'末端处。因此,在某些实施方案中,将样品中的至少一部分的cfNA在添加一条或多条外源性核酸序列之前转化为优化的cfDNA。可以通过许多方法来制备优化的cfNA,所述方法可能部分取决于待添加的一条或多条外源性核酸序列的性质。在某些实施方案中,将样品中的cfNA如本文所讨论那样片段化,之后将外源性核酸序列添加至样品中的至少一部分cfNA分子。

[0168] 在一个实施方案中,cfNA经末端修复以产生具有平末端的cfNA。通过此类末端修复,使用适合的聚合酶填充任何的5'悬突和/或3'悬突。尽管不需要3'-5'外切核酸酶活性,但优选地聚合酶具有除5'-3'聚合酶活性之外的3'-5'外切核酸酶/校对活性。例如,对于cfDNA T4DNA聚合酶,可以使用DNA聚合酶I克列诺片段(Klenow fragment)或Taq DNA聚合酶。可通过连接将外源性核酸序列直接添加至样品中的至少一部分的cfNA的3'末端和5'末端之一或两者。

[0169] 在另一个实施方案中,将样品中的cfNA末端修复(例如,使用聚合酶)以在cfNA的一个或两个末端处产生3'悬突(其可以是单个腺嘌呤或由聚合酶产生的聚-腺苷序列)。将外源性核酸序列设计为具有与3'悬突杂交的互补序列,并且随后连接至样品中至少一部分的cfDNA分子的3'和5'末端中的一个或两个。

[0170] 在另一个实施方案中,使用末端脱氧核苷酰转移酶(TdT)修饰cfNA的一个或两个3'末端以产生均聚物尾(例如,聚-腺嘌呤序列),这允许添加具有互补性核苷酸序列(例如,聚-胸腺嘧啶)的外源性核酸序列。DNA连接酶可用于封闭单链切口。

[0171] 在前述的任一种中,通过核苷酸激酶活性(诸如T4多核苷酸激酶)可添加5'磷酸根。

[0172] 可使用多种酶混合物以完成上述反应。在某些实施方案中,酶混合物可包含以下组分:

[0173] 1)具有5'-3'聚合酶活性且具有或不具有3'-5'外切核酸酶活性的聚合酶和ii)连接酶;

[0174] 2)具有5'-3'聚合酶活性且具有或不具有3'-5'外切核酸酶活性的聚合酶,ii)连接酶和iii)多核苷酸激酶;

[0175] 3)具有5'-3'聚合酶活性且具有或不具有3'-5'外切核酸酶活性的聚合酶,ii)连接酶,iii)多核苷酸激酶和iv)复制块激活活性;

[0176] 4)具有5'-3'聚合酶活性且具有或不具有3'-5'外切核酸酶活性的聚合酶,ii)连接酶,iii)多核苷酸激酶,iv)复制块激活活性和v)核酸切口酶活性;

[0177] 5)具有5'-3'聚合酶活性且具有或不具有3'-5'外切核酸酶活性的聚合酶,ii)连接酶,iii)多核苷酸激酶,iv)复制块激活活性,v)核酸切口酶活性和vi)核酸结合蛋白。

[0178] 在某些实施方案中,酶混合物可包含以下组分:

[0179] 1)具有5'-3'聚合酶活性且具有或不具有3'-5'外切核酸酶活性的DNA聚合酶和ii)DNA连接酶;

[0180] 2)具有5'-3'聚合酶活性且具有或不具有3'-5'外切核酸酶活性的DNA聚合酶,ii)DNA连接酶和iii)DNA多核苷酸激酶;

[0181] 3)具有5'-3'聚合酶活性且具有或不具有3'-5'外切核酸酶活性的DNA聚合酶,ii)DNA连接酶,iii)DNA多核苷酸激酶,和iv)尿嘧啶-DNA糖基化酶活性;

[0182] 4) 具有5' -3' 聚合酶活性且具有或不具有3' -5' 外切核酸酶活性的DNA聚合酶, ii) DNA连接酶, iii) DNA多核苷酸激酶, iv) 尿嘧啶-DNA糖基化酶活性和v) 单链DNA核酸切口酶活性;

[0183] 5) 具有5' -3' 聚合酶活性且具有或不具有3' -5' 外切核酸酶活性的DNA聚合酶, ii) DNA连接酶, iii) DNA多核苷酸激酶, iv) 尿嘧啶-DNA糖基化酶活性, v) 单链DNA核酸切口酶活性和vi) 单链DNA结合蛋白。

[0184] 在某些实施方案中, 酶混合物可包含以下组分:

[0185] 1) T4DNA聚合酶和ii) T4DNA连接酶, 或者DNA聚合酶I的克列诺片段和ii) T4DNA连接酶;

[0186] 2) T4DNA聚合酶, ii) T4DNA连接酶和iii) DNA聚合酶I的克列诺片段;

[0187] 3) T4DNA聚合酶, ii) T4DNA连接酶, iii) DNA聚合酶I的克列诺片段, 和iv) T4多核苷酸激酶;

[0188] 4) T4DNA聚合酶, ii) T4DNA连接酶, iii) DNA聚合酶I的克列诺片段, iv) T4多核苷酸激酶, 和v) 尿嘧啶-DNA糖基化酶; 或

[0189] 5) T4DNA聚合酶, ii) T4DNA连接酶, iii) DNA聚合酶I的克列诺片段, iv) T4多核苷酸激酶, v) 尿嘧啶-DNA糖基化酶和Nb.BbvC1。

[0190] 以上任一种还可包含单链结合蛋白(诸如例如, 大肠埃希氏菌单链结合蛋白)。

[0191] 在某些实施方案中, 酶混合物包含T4DNA聚合酶, T4DNA连接酶; DNA聚合酶I的克列诺片段、T4多核苷酸激酶、尿嘧啶-DNA糖基化酶和Nb.BbvC1。在某些实施方案中, 酶混合物包含DNA聚合酶I的克列诺片段和T4DNA连接酶。

[0192] 可以改变在本文公开的方法中可使用的各种酶的浓度。在一个实施方案中, 该酶以以下浓度范围使用: 2-15U的T4DNA聚合酶, 2-20U的克列诺片段, 100-1,000U的T4DNA连接酶, 5-20U的T4多核苷酸激酶, 5-20U的Nb.BbvC1, 和1-6U的尿嘧啶-DNA糖基化酶; 大肠埃希氏菌单链结合蛋白可以50-500ng存在。

[0193] 多种缓冲液/反应溶液可用于如本领域已知的本公开的方法中。在一个实施方案中, 反应溶液包含20-75mM 乙酸钾、10-100mM Tris-乙酸盐(pH 7.9, 在25°C下)、1-30mM 乙酸镁、0.1-20mM DTT、5-100μM Dntp、0.5-2mM ATP和100-400ug/mL BSA。在另一个实施方案中, 反应溶液包含20-75mM NaCl、10-100mM Tris-Cl, pH 7.0-8.0、1-30mM MgCl₂、0.1-20mM DTT、5μM至100μM Dntp和0.5-2mM ATP。

[0194] 在某些实施方案中, 使酶混合物经受依序加热程序(诸如通过使用热循环仪)以启动并完成反应。在一个实施方案中, 依序加热程序由2个限定持续时间的加热步骤、3个限定持续时间的加热步骤、4个限定持续时间的加热步骤或5个或更多个限定持续时间的加热步骤组成。各个加热步骤的持续时间可以独立变化并且可以持续1至40分钟, 诸如5至30分钟、10至25分钟、1至5分钟、20分钟或5分钟。依序加热程序用于通过改变样品的温度, 使酶混合物中的某些酶在限定的时间点优先有活性。优先有活性意指酶混合物中的一种或多种酶将显示出比酶混合物中的至少一种其它酶更大的活性。以这种方式, 可将产生可扩增cfNA汇集物所需的各种反应定序、至少到部分地定序。依序加热程序开始于聚合酶活动优先有活性从而允许形成最佳cfNA的温度(例如T4DNA聚合酶和/或克列诺片段), 随后是连接酶优先有活性从而允许一条或多条外源性核酸序列连接至cfNA的温度。也可能包括其它加热步

骤。例如,可以包括温度步骤以允许外源性核酸序列裂解。作为另一个实例,可以包括使酶混合物中的所有或一些酶失活的温度步骤。

[0195] 依序加热程序的示例性温度范围包括12℃至20℃、20℃至30℃、30℃至40℃和60℃至90℃。在一个具体的实施方案中,依序加热程序的温度范围为:14℃至18℃和22℃至26℃;14℃至18℃、22℃至26℃和70℃至80℃;或14℃至18℃、22℃至26℃、35℃至39℃和70℃至80℃。在进入下一个温度范围之前,可将每个温度范围维持限定的持续时间。

[0196] 可以与本公开的方法一起使用的代表性依序加热程序是:i) 16℃,20分钟;ii) 24℃,20分钟;iii) 37℃,20分钟;iv) 75℃,5分钟(失活);和v) 4℃(保持;如果需要立即PCR扩增,则该步骤是可选的)。该过程的结果是在经修饰的cfDNA分子的5'和3'末端中的一个或两个处具有引物位点的cfDNA分子的可扩增汇集物。这个反应的结果是cfDNA分子的可扩增汇集物。

[0197] 在前述中,所有酶促反应都发生在原始样品中,而不需要cfNA纯化(cfNA不经特别分离或纯化),并且发生在单个反应容器中,而不需要去除组分、去除产物或底物或以其它方式“清除”步骤之间的反应物。

[0198] 前述的结果是产生cfNA分子的可扩增汇集物,其可以用于产生cfNA分子的可分析汇集物。

[0199] 外源性核酸序列含有能够结合引物的引物位点,其用于cfNA的可扩增汇集物的扩增中。术语“能够结合引物”意指包括具有与特定引物的序列互补的序列的引物位点以及具有与特定引物的序列相同的序列的引物位点(在这种情况下,与引物互补的序列是在如本文讨论的初始复制步骤期间产生的)。在某些实施方案中,外源性核酸序列含有与特定引物互补的引物位点或与特定引物相同的序列,其在初始的一轮DNA合成后产生引物位点。在某些实施方案中,引物位点是通用的引物位点。因此,添加通用的引物位点至样品中的至少一部分的cfNA分子的3'末端、5'末端、或3'末端和5'末端两者。添加至3'末端的引物位点被称为3'引物位点,在5'末端处添加的引物位点被称为5'引物位点。在一个实施方案中,3'引物位点中的每一个对于经修饰的每个cfNA分子是相同的,并且5'引物位点中的每一个对于每个经修饰的cfNA分子是相同的,其中3'引物位点和5'引物位点彼此不同(即,能够以序列特异性的方式结合不同的引物)。因此,可以使用单对引物来扩增可扩增cfNA汇集物,从而通过消除优化多个引发位点的扩增条件的复杂性来简化扩增条件。在一个实施方案中,3'引物位点和5'引物位点中的每一个对于每个经修饰的cfNA分子都是相同的,并且3'引物位点和5'引物位点中的每一个能够以序列特异性方式结合相同的引物。可以使用单个引物扩增可扩增cfNA汇集物,从而通过消除优化多引发位点扩增条件的复杂性来进一步简化扩增条件。在某些实施方案中,3'引物结合位点和/或5'引物结合位点是在人类基因组中未发现的序列。在某些实施方案中,3'引物位点和/或5'引物位点被设计为使得各自的引物在基本上相同的扩增条件下结合3'结合位点和/或5'结合位点。在某些实施方案中,3'引物位点和/或5'引物位点被设计为使得各自的引物结合3'结合位点和/或5'结合位点,熔融温度和/或退火温度在彼此的1℃至2℃内或彼此的2℃至4℃内。

[0200] 在一个实施方案中,外源性核酸序列具有以下显示的序列,其中N₆₋₁₀和N₃₋₆表示任何核酸序列。还提供了用于每个位点的各自引物。

[0201] 衔接子1:5'-(N₆₋₁₀)ATTAACCCTCACTAAAG(N₃₋₆)-3'(SEQ ID NO:1)

- [0202] 衔接子: 2:5' - (N₆₋₁₀) TAATACGACTCACTATAGGG (N₃₋₆) -3' (SEQ ID NO:2)
- [0203] 5' 引物: 5' -ATTAACCCTCACTAAAG-3' - (SEQ ID NO:3)
- [0204] 3' 引物: 5' -TAATACGACTCACTATAGGG-3' - (SEQ ID NO:4)
- [0205] 在另一个实施方案中, 外源性核酸序列具有以下显示的序列。还提供了用于每个位点的各自引物。
- [0206] 衔接子:
- [0207] 5' -OH-
- [0208] TGTGTTGGGTGTGGUUUUUATTTAATACGACTCACTATAGACCCTCAGCACCACCACACCCAACACA-3' (SEQ ID NO:5)
- [0209] 引物: 5' -ACTCACTATAGACCCTCAGCACCAC-3' (SEQ ID NO:6)
- [0210] 在另一个实施方案中, 外源性核酸序列具有以下显示的序列。还提供了用于每个位点的各自引物。
- [0211] 衔接子:
- [0212] 5' -TGTGTTGGGTGTGGUUUUUATTTAATACGACTCACTATAGACCCTCAGCACCACCACACCCAACAC A (N)_n-3' (SEQ ID NO:7), 其中N可为任何核苷酸且n是0至10的整数。在某些实施方案中, N是腺嘌呤且n是1至5或n是1 (诸如SEQ ID NO:9)。在某些实施方案中, n是0 (诸如SEQ ID NO:10)。
- [0213] 5' -TGTGTTGGGTGTGGUUUUUATTTAATACGACTCACTATAGACCCTCAGCACCACCACACCCAACAC AA-3' (SEQ ID NO:9)
- [0214] 5' -TGTGTTGGGTGTGGUUUUUATTTAATACGACTCACTATAGACCCTCAGCACCACCACACCCAACAC A (SEQ ID NO:10)
- [0215] 引物: 5' -TGAGTGATATCTGGGAGTCGAGGTG (SEQ ID NO:8)。
- [0216] 在某些实施方案中, 外源性核酸含有复制块。如本文所用, 术语“复制块”是指核酸序列, 其干扰或终止DNA聚合酶的作用, 使得DNA聚合酶不越过复制块产生互补核酸链。在某些实施方案中, 复制块的核酸序列呈非活性形式并且被反应混合物的组分 (例如酶混合物的组分) 转化为活性形式。在以上外源性核酸序列的某些实施方案中, 复制块由聚-U序列表示, 除非被尿嘧啶-DNA糖基化酶作用, 否则它作为复制块是无活性的。
- [0217] 以上提供的序列在性质上是示例性的, 并且可以提供其它外源性核酸序列。在本文公开的方法中, 外源性核酸序列可以以0.1μM至5μM使用, 且引物可以以50nM至1000nM使用。
- [0218] 添加至样品中的至少一部分cfNA的5' 末端和/或3' 末端的外源性核酸序列可以以各种形式提供。在一个实施方案中, 外源性核酸序列是形成茎环结构并且包括单链环部分的序列。
- [0219] 在某些实施方案中, 样品中至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%或至少99%的cfNA分子经修饰以在5' 末端和/或3' 末端的一者处或两者处含有外源性核酸序列。在某些实施方案中, 样品中至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%或至少99%的cfNA分子经修饰以在5' 末端和3' 末端两者处含有外源性核酸序列。
- [0220] 以下描述了将外源性核酸序列添加至样品中的cfNA的5' 末端、3' 末端和/或5' 末

端和3'末端两者的若干种示例性方法。在某些实施方案中,将外源性核酸序列通过cfNA的初始复制添加至cfNA的5'末端和/或3'末端,其可以由外源性核酸序列引发或起始。在某些实施方案中,使外源性核酸序列的至少一条链在cfNA的5'末端和/或3'末端处连接至cfNA的至少一条链。在某些实施方案中,使外源性核酸序列的至少一条链在cfNA的5'末端和/或3'末端处连接至cfNA的至少一条链,并且至少一部分的外源性核酸序列由初始复制复制,其可由cfNA引发或起始。在本文所述的实施方案中,可使样品中的一个或多个cfNA连接在一起以形成更大的cfNA片段。

[0221] 在一个实施方案中,本公开的方法利用通过使携带通用5'末端引物位点的简并寡核苷酸引物退火来初始复制样品中存在的cfNA(包括,例如cfDNA)。经退火的引物由DNA聚合酶延伸,然后可以作为另一循环的引物退火和延伸的新模板。结果,样品中的cfNA(包括,例如cfDNA)通过添加含有引物位点的外源性核酸序列进行修饰(在这种情况下,通过初始复制掺入到cfNA中)并且适用于在分析之前的指数扩增,从而产生可扩增cfNA(包括,例如cfDNA)汇集物。因此将外源性核酸序列通过初始复制添加到5'末端和/或3'末端,因为外源性核酸序列引发初始复制。在一个实施方案中,所有酶促反应都发生在原始样品中,而不需要转移材料(包括核酸)或纯化cfNA(例如,cfNA不经特别分离或纯化)。在某些实施方案中,样品中的cfNA片段可能经历连接以在简并引物结合至cfNA序列之前或之后产生更长的cfNA片段。适用于此类实施方案的酶混合物包括但不限于这样的酶混合物,其包含以下、基本上由以下组成或由以下组成:DNA聚合酶I和T4DNA连接酶。

[0222] 在另一个实施方案中,本公开的方法将分子克隆的概念应用于将序列-特异性外源性核酸序列酶促添加至样品中至少一部分的cfNA(包括,例如cfDNA)上的5'末端-和3'-末端的一者或两者,从而产生用于PCR扩增的一个或多个引物位点。在一个实施方案中,所有酶促反应都发生在原始样品和单个反应容器中,而不需要转移材料(包括核酸)或纯化cfNA(例如,cfNA不经特别分离或纯化)。

[0223] 在分子克隆方法的一个实施方案中,外源性核酸序列是形成茎环结构的序列且包括单链环部分,并且使外源性核酸序列的每条链在样品中的至少一部分的cfNA分子的5'末端和/或3'末端处连接至cfNA的每条链,使得经修饰的cfNA在外源性核酸序列与cfNA序列之间的核酸链中没有缺口、切口或断裂。在该方法的一个实施方案中,使外源性核酸序列直接连接至cfNA。cfNA可以被制备成具有如本文所讨论的平末端,并且外源性核酸序列在5'末端和/或3'末端处直接连接至cfNA的每条链。在此类实施方案中,外源性核酸序列的环部分可以被裂解(或打开),诸如通过使用酶(例如,尿嘧啶-DNA糖基化酶)。对于此类实施方案适合的酶混合物包括但不限于包含以下、基本上由以下组成或者由以下组成的酶混合物: i) T4DNA聚合酶; ii) T4DNA连接酶; iii) DNA聚合酶I的克列诺片段; iv) T4多核苷酸激酶; 和v) 尿嘧啶-DNA糖基化酶(任选地含有Nb.BbvC1)。适用于此类实施方案的适合的外源性核酸序列包括但不限于与引物SEQ ID NO:8一起的SEQ ID NO:10的序列。

[0224] 也可以制备cfNA具有尾序列(例如3'悬突),诸如单个核苷酸(例如单个腺嘌呤残基)或多个核苷酸(例如聚-腺嘌呤尾);在某些实施方案中,尾位于cfNA的5'末端和/或3'末端的一者或两者上。在某些实施方案中,尾是单个腺嘌呤或聚-腺嘌呤尾(诸如2-10个核苷酸长度)。在此类实施方案中,外源性核酸序列的环部分可以被裂解(或打开),例如通过使用酶(例如,尿嘧啶-DNA糖基化酶)。适用于此类实施方案的酶混合物包括但不限于包含以

下、基本上由以下组成或由以下组成的酶混合物：T4DNA聚合酶，ii) T4DNA连接酶；iii) DNA聚合酶I的克列诺片段；iv) T4多核苷酸激酶；和v) 尿嘧啶-DNA糖基化酶（任选地含有Nb.BbvC1）。适用于此类实施方案的适合的外源性核酸序列包括但不限于连同引物SEQ ID NO:8的SEQ ID NO:7（例如，SEQ ID NO:9）的序列。

[0225] 在分子克隆方法的另一个实施方案中，外源性核酸序列是形成茎环结构并且包括包含引物位点的互补体的单链环部分的序列；使外源性核酸序列的一条链在样品中至少一部分的cfNA分子的5'末端和/或3'末端处连接至cfNA的一条链，使得经修饰的cfNA在cfNA的5'末端和/或3'末端处在cfNA序列的末端3' OH残基与外源性核酸序列的5' OH之间的核酸链中含有缺口、切口或断裂。在该实施方案中，本公开的方法利用外源性核酸序列的初始复制，其经由在cfNA的游离3' OH处起始的切口平移机制复制外源性核酸序列，从而产生引物结合位点。5'磷酸根基团可以通过T4多核苷酸激酶添加，其用磷酸根替代最初存在于外源性核酸序列上的3' OH。适用于此类实施方案的酶混合物包括但不限于包含以下、基本上由以下组成或由以下组成的酶混合物：T4DNA聚合酶、T4DNA连接酶、DNA聚合酶I的克列诺片段、T4多核苷酸激酶和Nb.BbvC1（任选地含有尿嘧啶-DNA糖基化酶）。适用于此类实施方案适合的外源性核酸序列包括但不限于连同引物SEQ ID NO:6一起的SEQ ID NO:5的序列。

[0226] 在分子克隆方法的另一个实施方案中，外源性核酸序列是形成茎环结构并且包括包含复制块和引物位点的互补体的单链环部分的序列；使外源性核酸序列的一条链在样品中的至少一部分的cfNA分子的5'末端和/或3'末端处连接至cfNA的一条链，使得经修饰的cfNA在cfNA的5'末端和/或3'末端处在cfNA序列的末端3' OH残基与外源性核酸序列的5' OH之间的核酸链中含有缺口、切口或断裂。在该实施方案中，本公开的方法利用外源性核酸序列的初始复制，其经由在cfNA的游离3' OH处起始的切口翻译机制将外源性核酸序列复制直至复制块。产生的5'悬突可以使用DNA聚合酶填充以产生引物结合位点。在某些实施方案中，从经修饰的cfNA中去除原始外源性核酸序列的一部分回文序列，以防止在随后的PCR扩增过程中形成发夹结构。此类反应可以使用单链切口酶（例如NbBbv1）和尿嘧啶-DNA糖基化酶进行。5'磷酸根基团可以通过T4多核苷酸激酶添加，其用磷酸根替代最初存在于外源性核酸序列上的3' OH。适用于此类实施方案的酶混合物包括但不限于包含以下、基本上由以下组成或由以下组成的酶混合物：T4DNA聚合酶、T4DNA连接酶、DNA聚合酶I的克列诺片段、T4多核苷酸激酶、尿嘧啶-DNA糖基化酶和Nb.BbvC1。适用于此类实施方案的适合的外源性核酸序列包括但不限于连同引物SEQ ID NO:6一起的SEQ ID NO:5的序列。

[0227] 在分子克隆方法的某些实施方案中，从经修饰的cfNA中去除原始外源性核酸序列的一部分回文序列（其形成双链茎部分），以防止在随后的PCR扩增过程中形成发夹结构。此类反应可以使用单链切口酶（例如NbBbv1）和尿嘧啶-DNA糖基化酶进行。在分子克隆方法的某些实施方案中，未去除一部分的回文序列。

[0228] 然后通过任何已知技术扩增可扩增cfNA汇集物以产生足够量的cfNA用于下游分析。扩增反应的产物被称为cfNA的可分析汇集物。在一个实施方案中，使可扩增cfNA汇集物经受使用针对3'引物结合位点和/或5'引物结合位点的序列-特异性引物进行的PCR。在一个实施方案中，在扩增中使用3'结合位点和5'结合位点两者及其各自的引物。在一个实施方案中，只有3'引物结合位点或5'引物结合位点之一和各自的引物用于扩增。任何PCR扩增方案或技术可用于扩增可扩增cfDNA汇集物。

[0229] PCR扩增可以进行所需数目的扩增循环以在cfNA的可分析汇集物中产生cfNA的所需产率。在某些实施方案中,进行10至30个循环的扩增。在某些实施方案中,进行12至28个循环的扩增。在某些实施方案中,进行15至25个循环的扩增。在某些实施方案中,进行17至23个循环的扩增。在某些实施方案中,进行18个循环的扩增。在某些实施方案中,进行25个循环的扩增。

[0230] 用于PCR扩增反应的循环条件可以是本领域已知的并且通常包括用于模板变性、引物退火和引物延伸的步骤。最初的步骤通过加热至94°C或更高持续15秒至4分钟将靶标DNA变性。在变性过程中,DNA链彼此分开,产生必需的单链DNA模板以供热稳定性聚合酶复制。在循环的下一个步骤中,将温度降低到大约40°C-65°C。在该温度下,寡核苷酸引物可与经变性的靶标DNA形成稳定的缔合(退火),并用作聚合酶的引物,从而导致新的模板合成。这个步骤通常发生在65°C-74°C的范围内持续1-7分钟。下一个循环从返回至94°C进行变性开始。用于PCR扩增的特定条件可以如本领域已知的那样变化并且仍然可与本公开的方法一起使用。

[0231] 在一个实施方案中,使用以下PCR扩增条件:i)在95°C下初始变性3分钟;ii)随后25个循环的在94°C下变性15秒和在65°C下退火/延伸5分钟。

[0232] 在另一个实施方案中,使用以下PCR扩增条件:i)在95°C下初始变性3分钟;ii)随后18个循环的在94°C下变性15秒和在65°C下退火/延伸5分钟。

[0233] 扩增反应的结果是cfDNA分子的可分析汇集物。

[0234] 示例性程序

[0235] 本文的方法部分和实施例中提供了进行本文所述方法的示例性程序。

[0236] cfDNA的可分析汇集物的分析

[0237] 通过本文方法产生的cfDNA的可分析汇集物可以通过本领域已知的任何方法分析。此外,可以在分析中使用任何量的cfNA。

[0238] 在一个实施方案中,分析方法是下一代测序(NGS)。使用NGS时,来自可分析汇集物的cfNA的量可能会改变。在某些实施方案中,可分析汇集物中1ng至50ng的cfNA用于NGS分析。在某些实施方案中,可分析汇集物中的1ng至10ng,诸如1ng至2ng、2ng至5ng、5ng至7ng或7ng至10ng的cfNA用于NGS分析。在某些实施方案中,可分析汇集物中的10ng至25ng,诸如13ng至27ng、16ng至24ng或19ng至21ng的cfNA用于NGS分析。

[0239] 在另一个实施方案中,分析方法是NGS且cfNA样品(例如上面指定的量)取自cfNA的单一可分析汇集物。来自cfNA的可分析汇集物的cfNA可以单次取样或多次取样取出。

[0240] 在另一个实施方案中,分析方法是NGS,并且例如上面指定的量的cfNA样品取自从相同样品制备的cfNA的多个可分析汇集物。可对任何量(例如2至10)的cfNA的可分析汇集物取样。来自cfNA的可分析汇集物的cfNA可以单次取样或多次取样从cfNA的任何可分析汇集物取出。可以在取样之前合并由相同样品制备的cfNA的另外的多个分析汇集物。可以合并(或汇集)任何量(例如2至10)的cfNA的可分析汇集物。来自经合并的cfNA可分析汇集物的cfNA可以以单次取样或多次取样取自经合并的cfNA可分析汇集物。

[0241] 使用方法

[0242] 本公开还提供了使用cfNA的可扩增汇集物和cfNA的可分析汇集物的方法。

[0243] 本公开提供了分析样品中的cfNA(包括但不限于cfDNA)的方法。下文提供了该方

法的某些实施方案。

[0244] 在一个实施方案中,本公开提供了分析细胞游离核酸的方法,所述方法包括以下步骤:i)通过本文所述的任何方法提供cfNA分子的可分析汇集物;和ii)分析cfNA分子的可分析汇集物以确定在cfNA分子的可分析汇集物中的cfNA分子的特征。

[0245] 在分析的方法中,cfNA可为cfDNA。在某些实施方案中,核酸是cfDNA。在某些实施方案中,核酸是双链cfDNA。在某些实施方案中,cfNA是cfRNA或源自此类cfRNA且代表其的DNA。

[0246] 因此,在另一个实施方案中,本公开提供了分析cfDNA的方法,所述方法包括以下步骤:i)通过本文所述的任何方法提供cfDNA分子的可分析汇集物;和ii)分析cfDNA分子的可分析汇集物以确定在cfDNA分子的可分析汇集物中的cfDNA分子的特征。

[0247] 在另一个实施方案中,本公开提供了分析cfRNA的方法,所述方法包括以下步骤:i)通过本文所述的任何方法提供cfRNA分子的可分析汇集物;和ii)分析cfRNA分子的可分析汇集物以确定在cfRNA分子的可分析汇集物中的cfDNA分子的特征。在某些实施方案中,将cfRNA转化为代表cfRNA的DNA并且可分析汇集物包含代表cfRNA的DNA。

[0248] 可通过本领域已知的任何技术分析可分析汇集物。适合的技术包括但不限于下一代测序(NGS)和基于PCR的技术,诸如但不限于实时定量PCR、阻断PCR、数字液滴PCR(ddPCR)、夹紧PCR、ICE-COLD PCR、castPCR、ARMSPCR、BEAMing等。根据本公开的方法产生的可分析汇集物提供了足够数量和质量的cfNA以用于这些和其它分析技术中。

[0249] 在某些实施方案中,分析可分析汇集物以确定可分析汇集物中的一个或多个cfNA(包括cfDNA)的至少一种特征。待确定的特征可以是cfNA的任何特征。可以同时分析超过1种特征。代表性特征包括但不限于染色体异常、单核苷酸多态性、基因突变(诸如但不限于点突变、缺失和插入)、甲基化形式和拷贝数变化;此外,特征可能是存在媒介物(诸如但不限于病毒、细菌或真菌)。在一个实施方案中,该特征与疾病有关。在一个实施方案中,使用该特征以确定样品的提供者是否患有疾病。在另一个实施方案中,使用该特征以确定样品的提供者是否处于发展疾病的风险中。在另一个实施方案中,该特征用于确定样品的提供者中存在媒介物(诸如但不限于病毒、细菌或真菌)。在另一个实施方案中,该特征用于为受试者确定治疗或疗法过程。在另一个实施方案中,该特征用于确定当前的治疗或疗法过程有效。

[0250] 分析cfNA(包括,例如cfDNA)的特定特征的能力在诊断意义上和在确定治疗疾病的治疗性干预方面都是有益的。如本文所讨论,本公开的方法允许以小样品体积分析cfNA(包括,例如cfDNA),而不需要纯化cfNA。因此,本公开的方法在患者护理中的应用得以极大扩展。

[0251] 本公开提供了诊断受试者患有疾病或处于疾病风险的方法。

[0252] 在一个实施方案中,所述方法包括以下步骤:i)通过本文所述的任何方法提供cfNA分子的可分析汇集物;ii)分析cfNA分子的可分析汇集物以确定在cfNA分子的可分析汇集物中的cfNA分子的与疾病相关的特征;和iii)基于存在该特征确定受试者患有和/或处于疾病风险或者基于不存在该特征确定受试者不患有和/或不处于疾病风险。

[0253] 在另一个实施方案中,所述方法包括以下步骤:i)通过本文所述的任何方法提供cfDNA分子的可分析汇集物;ii)分析cfDNA分子的可分析汇集物以确定在cfDNA分子的可分

析汇集物中的cfDNA分子的与疾病相关的特征;和iii) 基于存在该特征确定受试者患有和/或处于疾病风险或者基于不存在该特征确定受试者不患有和/或不处于疾病风险。

[0254] 在另一个实施方案中,所述方法包括以下步骤:i) 通过本文所述的任何方法提供cfRNA分子的可分析汇集物;ii) 分析cfRNA分子的可分析汇集物以确定在cfRNA分子的可分析汇集物中的cfRNA分子的与疾病相关的特征;和iii) 基于存在该特征确定受试者患有和/或处于疾病风险或者基于不存在该特征确定受试者不患有和/或不处于疾病风险。在某些实施方案中,将cfRNA转化为代表cfRNA的DNA并且可分析汇集物包含代表cfRNA的DNA。

[0255] 可以使用如本文讨论的各种方法来确定cfNA的许多特征。作为上述方法的示例性应用,如果受试者疑似患有晚期转移性结肠癌,则可分析可分析汇集物的与晚期转移性结肠癌有关的特征(例如在KRAS、BRAF、NRAS和PIK3CA基因中的一者或多者中的突变)。如果该特征存在于可分析汇集物中(KRAS、BRAF、NRAS和PIK3CA基因中的一者或多者中的突变),则受试者被确定为患有结肠癌或处于结肠癌的风险中。

[0256] 本公开提供了确定用于患有疾病的受试者的治疗性干预的方法。

[0257] 在一个实施方案中,所述方法包括以下步骤:i) 通过本文所述的任何方法提供cfNA分子的可分析汇集物;ii) 分析cfNA分子的可分析汇集物以确定在cfNA分子的可分析汇集物中的cfNA分子的与疾病相关的特征;和iii) 基于经确定的特征确定治疗性干预。

[0258] 在另一个实施方案中,所述方法包括以下步骤:i) 通过本文所述的任何方法提供cfDNA分子的可分析汇集物;ii) 分析cfDNA分子的可分析汇集物以确定在cfDNA分子的可分析汇集物中的cfDNA分子的与疾病相关的特征;和iii) 基于经确定的特征确定治疗性干预。

[0259] 在另一个实施方案中,所述方法包括以下步骤:i) 通过本文所述的任何方法提供cfRNA分子的可分析汇集物;ii) 分析cfRNA分子的可分析汇集物以确定在cfRNA分子的可分析汇集物中的cfRNA分子的与疾病相关的特征;和iii) 基于经确定的特征确定治疗性干预。在某些实施方案中,将cfRNA转化为代表cfRNA的DNA且可分析汇集物包含代表cfRNA的DNA。

[0260] 可以使用如本文讨论的各种方法来确定cfNA的多种特征。作为确定治疗性干预的方法的示例性应用,再次考虑结肠癌实例。如所讨论的,KRAS、BRAF、NRAS和PIK3CA基因中的一者或多者中的突变指示结肠癌。然而,根据存在的特定畸形,最有效治疗所需的治疗性干预是不同的。如果经确定的一种或多种特征在KRAS、BRAF、NRAS和PIK3CA基因中没有突变,则可以确定使用抗-EGFR抗体、诸如西妥昔单抗和帕尼单抗(其是根据NCCN和ASCO指南的第一线治疗选项)的疗法作为适当的疗法。然而,如果确定的特征是在KRAS、BRAF、NRAS和PIK3CA基因中存在突变,则不推荐用抗-EGFR抗体的疗法,因为KRAS、BRAF、NRAS和PIK3CA基因中的突变表明对抗-EGFR抗体疗法无反应性。

[0261] 本公开还提供了监测经诊断患有疾病且正经历治疗疾病所用的治疗性方案治疗的受试者的治疗的方法。

[0262] 在一个实施方案中,所述方法包括以下步骤:i) 通过本文(诸如第一至第四方面)所述的任何方法提供cfNA分子的可分析汇集物;ii) 分析cfNA分子的可分析汇集物以确定在cfNA分子的可分析汇集物中的cfNA分子的与疾病相关的特征;iii) 确定经确定的特征是否与当前的治疗性治疗方案相容;iv) 如果经确定的特征指示禁用或不推荐治疗性方案则改变治疗性方案,或如果经确定的特征指示继续推荐治疗性方案则继续治疗性方案;和vi) 任选地重复步骤i) 至iv) 以以所需的时间间隔监测治疗性干预。

[0263] 在另一个实施方案中,所述方法包括以下步骤:i)通过本文(诸如第一至第四方面)所述的任何方法提供cfDNA分子的可分析汇集物;ii)分析cfDNA分子的可分析汇集物以确定在cfDNA分子的可分析汇集物中的cfDNA分子的与疾病相关的特征;iii)确定经确定的特征是否与当前的治疗性治疗方案相容;iv)如果经确定的特征指示禁用或不推荐治疗性方案则改变治疗性方案,或如果经确定的特征指示继续推荐治疗性方案则继续治疗性方案;和vi)任选地重复步骤i)至iv)以以所需的时间间隔监测治疗性干预。

[0264] 在另一个实施方案中,所述方法包括以下步骤:i)通过本文(诸如第一至第四方面)所述的任何方法提供cfRNA分子的可分析汇集物;ii)分析cfRNA分子的可分析汇集物以确定在cfRNA分子的可分析汇集物中的cfRNA分子的与疾病相关的特征;iii)确定经确定的特征是否与当前的治疗性治疗方案相容;iv)如果经确定的特征指示禁用或不推荐治疗性方案则改变治疗性方案,或如果经确定的特征指示继续推荐治疗性方案则继续治疗性方案;和vi)任选地重复步骤i)至iv)以以所需的时间间隔监测治疗性干预。在某些实施方案中,将cfRNA转化为代表cfRNA的DNA且可分析汇集物包含代表cfRNA的DNA。

[0265] 可以使用如本文讨论的各种方法来确定cfNA的多种特征。本公开的方法通过确定样品中cfNA的特征、确定经确定的特征是否与当前的治疗性治疗方案相容并且基于经确定的一种或多种特征做出治疗决策(例如改变治疗性方案(如果经确定的特征指示禁用或不推荐治疗性方案)或继续治疗性方案(如果经确定的特征指示继续推荐治疗性方案)来提供对受试者的监测。考虑已被诊断患有结肠癌并且在初始筛选后确定其适合于进行抗-EGFR抗体治疗的受试者。如上所讨论,KRAS、BRAF、NRAS和PIK3CA基因中的一者或多者中的突变指示抗-EGFR抗体疗法可能不合适。如果经确定的特征是KRAS、BRAF、NRAS和PIK3CA基因中的一者或多者中的突变同时继续抗-EGFR抗体治疗,则可以决定停止用抗-EGFR抗体进行的治疗并启动新的治疗方案。

[0266] 在另一个实施方案中,特征可能是指示肿瘤细胞中耐药性发展的特征,其可能影响当前癌症的治疗。如果确定了耐药表型,则可以根据需要修正和改变治疗方案。在又一个实施方案中,特征可以指示肿瘤的克隆进化(例如,新特征的出现或先前确定的特征的消失)。再次,可以根据需要修正和改变治疗方案。在又一个实施方案中,特征可以是指示肿瘤转移的特征。如果确定了此类特征,那么如果需要则可以相应地修正治疗方案或者启动新的治疗方案。

[0267] 本公开还提供了监测受试者的方法。

[0268] 在一个实施方案中,所述方法包括以下步骤:i)通过本文(诸如第一至第四方面)所述的任何方法提供cfNA分子的可分析汇集物;ii)分析cfNA分子的可分析汇集物以确定在cfNA分子的可分析汇集物中的cfNA分子的与疾病相关的特征;和iii)基于经确定的特征确定受试者是否需要治疗。

[0269] 在另一个实施方案中,所述方法包括以下步骤:i)通过本文(诸如第一至第四方面)所述的任何方法提供cfDNA分子的可分析汇集物;ii)分析cfDNA分子的可分析汇集物以确定在cfDNA分子的可分析汇集物中的cfDNA分子的与疾病相关的特征;和iii)基于经确定的特征确定受试者是否需要治疗。

[0270] 在另一个实施方案中,所述方法包括以下步骤:i)通过本文(诸如第一至第四方面)所述的任何方法提供cfRNA分子的可分析汇集物;ii)分析cfRNA分子的可分析汇集物以

确定在cfRNA分子的可分析汇集物中的cfRNA分子的与疾病相关的特征;和iii) 基于经确定的特征确定受试者是否需要治疗。在某些实施方案中,将cfRNA转化为代表cfRNA的DNA且可分析汇集物包含代表cfRNA的DNA。

[0271] 可以使用如本文讨论的各种方法来确定cfNA的多种特征。例如,再次考虑结肠癌的实例。如果受试者目前处于缓解期,则可以使用本公开的方法来监测受试者。如果确定了指示结肠癌复发的特征,则可以重新开始治疗性干预。治疗性干预可以至少部分地通过所确定的特征来指导。

[0272] 样品中cfNA的定量方法

[0273] 本公开的方法还允许确定样品中cfNA的原始浓度或量。目前用于定量样品中cfDNA量的方法由于难以从样品中纯化cfDNA(其导致cfDNA从样品中丢失)和样品中低浓度cfDNA而具有极大变异性。量化样品中cfDNA浓度的稳健且有效的方法是值得期望的,并且将具有重要的临床应用。例如,高水平的cfDNA被认为可预测移植排斥反应、损伤后创伤后并发症(包括器官衰竭)、缺血性中风的危险分层、败血症的严重程度和其它症状。所描述的CGD方法是线性扩增过程。因此,可以通过参考使用已知量的DNA作为输入(替代含有cfDNA的样品)制作的标准曲线来量化原始样品中cfDNA的浓度。例如,可以使用DNA、优选经纯化的DNA(例如,使用0、0.001、0.005、0.01、0.025、0.05、0.1、0.25、0.5和1ng/ μ L的连续浓度)作为CGD方法中的输入并确定经扩增的DNA在制备标准曲线的各浓度下的产率来建立标准曲线。然后确定样品中由cfDNA产生的经扩增的cfDNA的产率,并参照标准曲线确定样品中cfDNA的原始浓度。

[0274] 在一个实施方案中,所述方法包括以下步骤:i) 通过本文所述的任何方法提供可扩增cfNA汇集物;ii) 扩增可扩增cfNA汇集物以产生cfNA分子的经扩增的汇集物;iii) 确定cfNA的经扩增的汇集物中cfNA的浓度;和iv) 将经确定的cfNA的浓度与标准曲线比较以确定样品中的cfNA的浓度。

[0275] 在某些实施方案中,使用与用于制备cfNA的经扩增的汇集物的相同的方法制作标准曲线。在某些实施方案中,使用经纯化的DNA制作标准曲线。在某些实施方案中,同时用cfNA的经扩增的汇集物制作标准曲线。

[0276] 试剂盒

[0277] 本公开还提供了试剂盒,其包含所述方法所需的一种或多种试剂和/或反应溶液。在一个实施方案中,本公开提供了试剂盒,其包含实施本公开的方法所需的至少一部分的组分和试剂。

[0278] 在一个实施方案中,可以容纳在进行反应的合适的容器或反应容器中的试剂盒包含以下、由以下组成或基本上由以下组成:至少一条外源性核酸序列(即衔接子);适用于将外源性核酸序列连接至cfNA的反应溶液;和任选地,适合与反应溶液一起使用以产生cfNA的可扩增汇集物的酶混合物。

[0279] 在另一个实施方案中,可以容纳在进行反应的合适的容器或反应容器中的试剂盒包含以下、由以下组成或基本上由以下组成:适用于连接外源性核酸序列至cfNA的反应溶液;适合与反应溶液一起使用以产生cfNA的可扩增汇集物的酶混合物;和任选地,至少一条外源性核酸序列(即衔接子)。

[0280] 在另一个实施方案中,可以容纳在进行反应的合适的容器或反应容器中的试剂盒

包含以下、由以下组成或基本上由以下组成：适用于连接外源性核酸序列至cfNA的反应溶液；适合与反应溶液一起使用以产生cfNA的可扩增汇集物的酶混合物；和至少一条外源性核酸序列（即衔接子）。

[0281] 以上任何试剂盒还可包含以下中的一种或多种：第二反应溶液，适用于扩增可扩增cfNA汇集物；至少一种引物，其用于与外源性核酸序列一起使用；第二酶混合物，其用于与第二反应溶液一起用于可扩增cfNA汇集物的扩增以产生cfNA的可分析汇集物；及实施该方法的说明书。在某些实施方案中，以上任何试剂盒都含有所有引用的另外的组分。

[0282] 在一个实施方案中，可将试剂盒储存在-20℃。在另一个实施方案中，可将试剂盒储存在4℃。储存时间可以从几天到几个月到几年不等，特别是在-20℃下储存时。

[0283] 在一个实施方案中，试剂盒以多孔板规格、诸如96-孔板提供。

[0284] 在某些实施方案中，适合与反应溶液一起使用以产生cfNA的可扩增汇集物的酶混合物可含有以下活性：

[0285] 1) 具有5' -3' 聚合酶活性和3' -5' 外切核酸酶活性的聚合酶，和ii) 连接酶；

[0286] 2) 具有5' -3' 聚合酶活性和3' -5' 外切核酸酶活性的聚合酶，ii) 连接酶和iii) 多核苷酸激酶；

[0287] 3) 具有5' -3' 聚合酶活性和3' -5' 外切核酸酶活性的聚合酶，ii) 连接酶，iii) 多核苷酸激酶，和iv) 尿嘧啶-DNA糖基化酶活性；

[0288] 4) 具有5' -3' 聚合酶活性和3' -5' 外切核酸酶活性的聚合酶，ii) 连接酶，iii) 多核苷酸激酶，iv) 尿嘧啶-DNA糖基化酶活性，和v) 核酸切口酶活性；

[0289] 5) 具有5' -3' 聚合酶活性和3' -5' 外切核酸酶活性的聚合酶，ii) 连接酶，iii) 多核苷酸激酶，iv) 尿嘧啶-DNA糖基化酶活性，v) 核酸切口酶活性，和vi) 核酸结合蛋白。

[0290] 在某些实施方案中，适合与反应溶液一起使用以产生cfNA的可扩增汇集物的酶混合物可包含以下组分：

[0291] 1) 具有5' -3' 聚合酶活性和3' -5' 外切核酸酶活性的DNA聚合酶和ii) DNA连接酶；

[0292] 2) 具有5' -3' 聚合酶活性和3' -5' 外切核酸酶活性的DNA聚合酶，ii) 连接酶和iii) DNA多核苷酸激酶；

[0293] 3) 具有5' -3' 聚合酶活性和3' -5' 外切核酸酶活性的DNA聚合酶，ii) DNA连接酶，iii) DNA多核苷酸激酶，和iv) 尿嘧啶-DNA糖基化酶活性；

[0294] 4) 具有5' -3' 聚合酶活性和3' -5' 外切核酸酶活性的DNA聚合酶，ii) DNA连接酶，iii) DNA多核苷酸激酶，iv) 尿嘧啶-DNA糖基化酶活性，和v) 单链DNA核酸切口酶活性；

[0295] 5) 具有5' -3' 聚合酶活性和3' -5' 外切核酸酶活性的DNA聚合酶，ii) DNA连接酶，iii) DNA多核苷酸激酶，iv) 尿嘧啶-DNA糖基化酶活性，v) 单链DNA核酸切口酶活性，和vi) 单链DNA结合蛋白。

[0296] 在某些实施方案中，适合与反应溶液一起使用以产生cfNA的可扩增汇集物的酶混合物可包含以下组分：

[0297] 1) T4DNA聚合酶和ii) T4DNA连接酶或者DNA聚合酶I的克列诺片段和ii) T4DNA连接酶；

[0298] 2) T4DNA聚合酶，ii) T4DNA连接酶，和iii) DNA聚合酶I的克列诺片段；

[0299] 3) T4DNA聚合酶，ii) T4DNA连接酶，iii) DNA聚合酶I的克列诺片段，和iv) T4多核苷

酸激酶；

[0300] 4) T4DNA聚合酶, ii) T4DNA连接酶, iii) DNA聚合酶I的克列诺片段, iv) T4多核苷酸激酶, 和v) 尿嘧啶-DNA糖基化酶；或

[0301] 5) T4DNA聚合酶, ii) T4DNA连接酶, iii) DNA聚合酶I的克列诺片段, iv) T4多核苷酸激酶, v) 尿嘧啶-DNA糖基化酶和Nb.BbvC1。

[0302] 前述中的任一个还可包括单链结合蛋白(诸如例如, 大肠埃希氏菌单链结合蛋白)。

[0303] 在某些实施方案中, 适合与反应溶液一起使用以产生cfNA的可扩增汇集物的酶混合物包含T4DNA聚合酶、T4DNA连接酶、DNA聚合酶I的克列诺片段、T4多核苷酸激酶、尿嘧啶-DNA糖基化酶和Nb.BbvC1。在某些实施方案中, 适合与反应溶液一起使用以产生cfNA的可扩增汇集物的酶混合物包含DNA聚合酶I的克列诺片段和T4DNA连接酶。

[0304] 可以在本文公开的方法中使用的各种酶的浓度可以变化。在一个实施方案中, 该酶以下浓度范围使用: 2-15U的T4DNA聚合酶, 2-20U的克列诺片段, 100-1000U的T4DNA连接酶, 5-20U的T4多核苷酸激酶, 5-20U的Nb.BbvC1和1-6U的尿嘧啶-DNA糖基化酶; 大肠埃希氏菌单链结合蛋白可以以50-500ng存在。

[0305] 在某些实施方案中, 适合与反应溶液一起使用以产生cfNA的可扩增汇集物的酶混合物包括在本文实施例12中所述的酶混合物。

[0306] 多种缓冲液/反应溶液可用于如本领域已知的本公开的方法中。在某些实施方案中, 反应溶液包含20-75mM乙酸钾、10-100mM Tris-乙酸盐(pH 7.9, 在25°C下)、1-30mM乙酸镁、0.1-20mM DTT、5至100 μ M dNTP、0.5-2mM ATP和100-400 μ g/mL BSA。在某些实施方案中, 反应溶液包含20-75mM NaCl、10-100mM Tris-Cl(pH 7.0-8.0)、1-30mM MgCl₂、0.1-20mM DTT、5至100 μ M dNTP和0.5-2mM ATP。

[0307] 在某些实施方案中, 与酶混合物一起使用的反应溶液是在本文的实施例13中所述的反应溶液。

[0308] 方法

[0309] 血浆cfDNA的制备

[0310] 将血液收集在含有EDTA的管(Becton Dickinson, 富兰克林湖, NJ)中, 并以2500rpm离心20分钟。如果需要可采用进一步离心(10000rpm, 10分钟), 以除去残留碎片(例如已存储的样品中的碎片)。将血浆转移到冷冻小瓶中, 小心避免血沉棕黄层, 并将其储存在-80°C下直到进一步分析。分别使用本文所述的cfDNA富集和回收技术(被称为CGD方法)和QIAamp循环核酸试剂盒(Qiagen, 巴伦西亚, CA; 根据制造商的说明书使用)从20 μ L和200 μ L的血浆样品制备cfDNA。

[0311] 从尿制备cfDNA

[0312] 除非另有说明, 否则使用CGD方法直接从10-20 μ L未加工的、未稀释的尿样品制备循环cfDNA。

[0313] cfDNA的ISA

[0314] 在本文描述的实施例中, 使用若干变型针对cfDNA的ISA进行CGD方法。某些实施例提供了用于优化目的的各种方案的比较, 并且在每个此类实施例中提供了进行CGD方法的方法。

[0315] 以下描述并非意图限制如所述的CGD方法的一般应用,并且作为用于进行本文所述的方法的示例性方案来提供。所述的方法在适合的容器或反应容器(诸如例如PCR管或多壁条/板)中进行。

[0316] 方案A

[0317] 1. 对于样品(例如,20 μ L血浆、血清、尿、唾液或CSF),将样品添加1x PBS进行稀释(对于20 μ L样品体积,80 μ L),并且将样品任选地混合。

[0318] 2. 向来自步骤1的10 μ L样品中加入1 μ L 10x TE缓冲液,并将样品在95 $^{\circ}$ C下加热4分钟。

[0319] 4. 将样品立即在冰上冷却并短暂离心样品以固化内含物。

[0320] 5. 将2 μ L主混合物(反应终浓度40 μ M dNTP、各2 μ M的衔接子分子;即,外源性核酸序列)和2 μ L通用缓冲液(反应终浓度50mM NaCl、25mM Tris-Cl,pH7.0-8.0、10mM Mg₂Cl、2.5mM DTT和1mM ATP)添加至每个样品中。

[0321] 5'-(N₆₋₁₀)ATTAACCCTCACTAAAG(N₃₋₆)-3' (SEQ ID NO:1)

[0322] 5'-(N₆₋₁₀)TAATACGACTCACTATAGGG(N₃₋₆)-3' (SEQ ID NO:2)

[0323] 6. 将样品充分涡旋、短暂离心并在95 $^{\circ}$ C下加热2分钟。

[0324] 7. 将样品在冰上冷却,通过离心固化,并返回冰上。

[0325] 8. 向每个样品中添加1 μ L的包含大肠杆菌DNA聚合酶(克列诺片段)和T4DNA连接酶的酶混合物(终浓度为5U的聚合酶和100U的连接酶),并将样品充分涡旋并短暂离心。

[0326] 9. 将样品置于热循环仪中并如下孵育:

[0327] 16 $^{\circ}$ C,持续20分钟

[0328] 24 $^{\circ}$ C,持续20分钟

[0329] 37 $^{\circ}$ C,持续20分钟

[0330] 75 $^{\circ}$ C,持续5分钟

[0331] 4 $^{\circ}$ C静置

[0332] 10. 从热循环仪中去除后,将样品短暂离心。将样品储存在-20 $^{\circ}$ C下(长达3天)且如下所述进行进一步处理,或者如下所述立即进行进一步处理。

[0333] 11. 为了扩增含有衔接子核酸的经修饰的cfNA,将以下试剂添加至来自步骤10的每个样品:

[0334] 7.5 μ L的10X主混合物(反应中的终浓度为40 μ M dNTP和500nM的具有SEQ ID NO:3和SEQ ID NO:4的序列的引物);

[0335] 47.5 μ L水(分子生物学级);和

[0336] 5 μ L高保真度DNA聚合酶

[0337] 5'引物5'-ATTAACCCTCACTAAAG-3' (SEQ ID NO:3)

[0338] 3'引物:5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3' (SEQ ID NO:4)

[0339] 13. 将每个样品充分涡旋、短暂离心、置于热循环仪中并如下孵育:

[0340] 初始变性95 $^{\circ}$ C持续3分钟

[0341] 如下进行25个循环:

[0342] 变性94 $^{\circ}$ C持续15秒

[0343] 退火/延伸65 $^{\circ}$ C持续5分钟

[0344] 循环完成后,将样品保持在4℃下,并使经扩增的cfNA经受如本文所述的分析或在-20℃下储存直至进行如本文所述的分析。

[0345] 方案B

[0346] 1.向20μL的样品(例如,血浆、血清、尿或CSF)中添加1x PBS并且将样品任选地混合。

[0347] 2.向10μL来自步骤1的样品中加入1μL 10x TE缓冲液(100mM TrisOHCL,pH 8.0,和10mM EDTA),并将样品在95℃下加热4分钟。

[0348] 4.将样品立即在冰上冷却并短暂离心样品以固化内含物。

[0349] 5.将2μL CG1缓冲液(终浓度:2μM SEQ ID NO:5的衔接子分子(在无核酸酶水中);即,外源性核酸序列)和1μL CG2缓冲液(终浓度:50mM乙酸钾,20mM tris-乙酸盐、pH 7.9,10mM乙酸镁,1mM DTT,1mM ATP,40μM dNTP和200μg/ml BSA)添加至每个样品中。

[0350] 5'-OHTGTGTTGGGTGTGGUUUUATTTAATACGACTCACTATAGACCCTCAGCACCACCACACCCAACACA-3'(SEQ ID NO:5)

[0351] 6.将样品充分涡旋、短暂离心并在95℃下加热2分钟。

[0352] 7.将样品在冰上冷却,通过离心固化,并返回冰上。

[0353] 8.向每个样品中添加1μL由以下组成的酶混合物:T4DNA聚合酶的克列诺片段、T4DNA连接酶、大肠杆菌DNA聚合酶I、T4多核苷酸激酶、尿嘧啶-DNA糖基化酶(UDG)、Nb.BbvC1和大肠杆菌单链结合蛋白(终浓度5U T4DNA聚合酶,800U T4DNA连接酶,12.5U克列诺片段,12.5U T4多核苷酸激酶,3.75U尿嘧啶-DNA糖基化酶和120ng单链结合蛋白),并将样品充分涡旋并短暂离心。

[0354] 9.将样品置于热循环仪中并如下孵育:

[0355] 16℃持续20分钟

[0356] 24℃持续20分钟

[0357] 37℃持续20分钟

[0358] 75℃持续5分钟

[0359] 4℃静置

[0360] 10.从热循环仪中去除后,将样品短暂离心。将样品储存在-20℃下(长达3天)且如下所述进行进一步处理,或者如下所述立即进行进一步处理。

[0361] 11.为了扩增含有衔接子核酸的经修饰的cfNA,将以下试剂添加至来自步骤10的每个样品:

[0362] 7.5μL 10X主混合物(40μM dNTP和500nM具有SEQ ID NO:6序列的引物);

[0363] 47.5μL水(分子生物学级);和

[0364] 5μL高保真度DNA聚合酶

[0365] 5'-ACTCACTATAGACCCTCAGCACCAC-3'(SEQ ID NO:6)

[0366] 13.将每个样品充分涡旋、短暂离心、置于热循环仪中并如下孵育:

[0367] 初始变性95℃持续3分钟

[0368] 进行25个如下循环:

[0369] 变性94℃持续15秒

[0370] 退火/延伸65℃持续5分钟

[0371] 循环完成后,将样品保持在4℃下,并使经扩增的cfNA经受如本文所述的分析或在-20℃下储存直至经受如本文所述的分析。

[0372] cfRNA的ISA

[0373] 以下描述是对cfRNA进行ISA的示例性方法。该描述并非旨在限制如所述的CGD方法的一般应用,并且作为用于进行本文所述的方法的示例性方案来提供。所述方法在适合的容器或反应容器(诸如例如PCR管或多壁条/板)中进行。

[0374] 1.取10μL经稀释的血浆(1:5)于95℃下加热2分钟以使内源性核酸酶失活,裂解DNA复合物和使cfDNA片段化/变性;

[0375] 2.添加1μL DNA酶I反应缓冲液(终浓度10mM Tris-HCl,2.5mM MgCl₂,0.5mM CaCl₂,pH 7.6)和2个单位的DNA酶I,充分混合并在37℃下孵育30分钟;

[0376] 3.添加1μL 0.5M EDTA(至5mM的终浓度);

[0377] 4.在85℃下热失活15分钟;

[0378] 5.进行逆转录和cDNA合成(例如使用来自New England BioLabs,Ipswich,MA的Protoscript II试剂盒)。向11μL上述DNA酶I-处理的样品中添加3μL 5X第一链合成反应缓冲液和1μL随机引物;在94℃下将样品孵育15分钟,将管转移至冰上;添加0.5μL鼠RNA酶抑制剂(20U)和1μL逆转录酶,并用水补足至20μL的终体积;并将样品在预热的热循环仪中如下进行孵育:在25℃下10分钟;在42℃下15分钟;在70℃下15分钟;和保持在4℃。

[0379] 6.进行第二链合成(例如使用来自New England BioLabs,Ipswich,MA的NEBNext第二链合成模块(NEBNext Second Strand Synthesis Module))。向反应物(20μl)中添加以下试剂:无核酸酶水48μl;合成反应缓冲液8μl;合成酶混合物4μl(总体积80μl);充分混合并在热循环仪中在16℃下孵育1小时,将加热盖设定在≤40℃。

[0380] 7.使用Agencourt AMPure XP珠(Beckman Coulter,Brea,CA)纯化双链cDNA。

[0381] 8.继续进行cfDNA的ISA方案(例如,方案A或方案B)的步骤5。

[0382] 实时PCR

[0383] 使用TaqMan实时定量PCR,用经设计对KRAS、BRAF、PIK3CA和NRAS基因具有特异性的引物(Life Technologies,Carlsbad,CA),对每个样品重复一式两份地进行cfDNA的扩增。扩增曲线图和Ct值由内置软件(QuantStudio 12K仪器,Life Technologies,Carlsbad,CA)生成。在每次运行中包括适当的空白和阳性对照以控制PCR反应的准确性。

[0384] 血浆cfNA的定量

[0385] 使用Qubit 2.0荧光计连同dsDNA BR和HS测定试剂盒(Life Technologies,Carlsbad,CA)进行cfNA的定量。根据制造商的说明书进行分析。

[0386] 通过Ion Torrent NGS进行的深度靶向测序和数据分析

[0387] 简而言之,根据制造商的说明书(Life Technologies,Carlsbad,CA)使用Ion AmpliSeq Library试剂盒2.0和癌症热区组v2(Cancer Hotspot Panel v2)产生靶向测序文库。该测试组经设计用于靶向以下50个关键癌症基因中的2855个突变:ABL1、AKT1、ALK、APC、ATM、BRAF、CDH1、CDKN2A、CSF1R、CTNNB1、EGFR、ERBB2、ERBB4、EZH2、FBXW7、FGFR1、FGFR2、FGFR3、FLT3、GNAQ、GNAS、GNA11、HNF1A、HRAS、IDH1、IDH2、JAK2、JAK3、KDR、KIT、KRAS、MET、MLH1、MPL、NOTCH1、NPM1、NRAS、PDGFRA、PIK3CA、PTEN、PTPN11、RB1、RET、SMAD4、SMARCB1、SMO、SRC、STK11、TP53和VHL。突变的完整列表可见于(<http://path.upmc.edu/>

divisions/map/)。可以从癌症体细胞突变目录 (Catalogue of Somatic Mutations in Cancer, COSMIC) 数据库中获得突变细节,其相应的COSMIC ID在<http://cancer.sanger.ac.uk/cancergenome/projects/cosmic/>。用作这组基因参照的DNA序列可见于<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/rsg/>。突变命名法基于人类基因组变异协会 (Human Genome Variation Society) 推荐的惯例 (<http://www.hgvs.org/mutnomen/>)。

[0388] 原料由使用CGD方法或通过其它方法 (例如QIAamp试剂盒) 制备的1-20ng的cfDNA组成。分析整个50-基因组的每个样品,询问总共大约2800个突变。用于文库扩增的引物被Pfu酶部分消化,然后与相应的带条形码衔接子连接并使用Ampure Beads纯化。使用QuantStudio 6实时PCR仪评估文库的质量。在用于乳液PCR的Ion Chef系统上分析二十皮摩尔的每个文库以克隆扩增测序模板。基于所分析样品的数量,使用芯片314、316或318。在Ion Torrent PGM上进行深度测序,覆盖范围为1000-4000X。通过Variant Caller 4.0软件使用体细胞高度严格参数和经靶向的热区管道进行分析测序数据。通过GenePool (Station X, San Francisco, CA) 分析数据进一步确认了所有经鉴定的变体。

[0389] 实施例

[0390] 实施例1-cfDNA回收

[0391] 为了证明CGD方法的优越特性,使用CGD方法和可商购获得的cfDNA纯化试剂盒 (QIAamp循环核酸试剂盒;Qiagen, Valencia, CA) 制备cfDNA。如所述使用方案A从血浆 (20 μ L) 和尿 (10 μ L) 样品制备cfDNA。使可扩增cfDNA汇集物经受如方案A所述的PCR扩增。使用QIAamp试剂盒 (根据制造商的说明书使用) 从血浆 (200 μ L) 样品制备cfDNA。cfDNA从17名癌症患者的血浆样品制备;尿样品来自健康受试者。通过对KRAS、BRAF、PIK3CA和NRAS基因 (仅对血浆样品) 进行荧光Qubit dsDNA BR或HS测定和Taqman实时PCR分析来对cfDNA定量。此外,采用NGS分析以检测血浆样品组 (仅对血浆样品) 中的突变。

[0392] 如表1所示,CGD方法提供了比QIAamp试剂盒显著更多的cfDNA,如Qubit测量所确定。使用CGD方法观察到的cfDNA的平均浓度为92.5ng/ μ L,相比之下使用QIAamp试剂盒为0.42ng/ μ L (n=17, P<0.0001)。当考虑输入样品体积时,这种增强的回收更加明显。对于CGD方法,与使用QIAamp试剂盒的200 μ L血浆样品相比,使用20 μ L血浆样品。即使在减少的样品体积下,CGD方法仍然提供了非常优异的结果。

[0393] 也使用CGD方法从尿样品回收cfDNA并将其通过Qubit测量进行定量。使用CGD方法获得的cfDNA的平均浓度为40.9ng/ μ L (N=6) (4.52ng/ml至80.4ng/ml)。对于血浆样品,CGD方法显示出从尿样品有效制备cfDNA。结果显示在表1中。

表 1		
	CGD 方法	QIAamp 试剂盒
血浆 (n=17)	92.5	0.42
尿 (n=6)	40.9	

[0394]

[0395] 还通过琼脂糖凝胶电泳揭示了用CGD方法获得的cfDNA的更高输出。使由CGD方法从血浆和尿样制备的所选cfDNA样品经受琼脂糖凝胶电泳(2%),并使用溴化乙锭可视化。通过CGD方法制备的从血浆(图1B)和尿(图1C)获得的cfDNA显示出强烈的DNA强度。

[0396] 在图1B中,经分析的样品包括从7个冷冻的血浆样品和3个新鲜血浆样品提取的cfDNA。泳道1-4是来自诊断为或疑似患有癌症的受试者的临床血浆样品,泳道5是用来自样品4的血浆加标的来自健康受试者的新鲜血浆。泳道6-8是来自健康受试者的冷冻的血浆样品,和泳道9-10是来自健康受试者的新鲜血浆样品。使用CGD方法制备的血浆cfDNA的分级分离揭示出在100-bp至500-bp之间的一致尺寸分布并显示出强烈的染色。

[0397] 在图1C中,使从10 μ L尿回收的cfDNA经受琼脂糖凝胶电泳(2%),并使用溴化乙锭可视化。经分析的样品来自6名健康个体的尿样品(泳道1-6),其中血浆样品作为阳性对照(泳道7)。如对于血浆样品所见,使用CGD方法从尿样品获得的cfDNA的分级分离通过CGD方法揭示出在100-bp与500-bp之间的一致尺寸分布并显示出强烈的染色。

[0398] 以上结果表明CGD方法提供了来自各种样品类型的大量优异的cfDNA制备物。此外,CGD方法优于经测试的现有技术方法。

[0399] 实施例2-cfDNA的可扩增性

[0400] 然后,通过对四种原始致癌基因(KRAS、BRAF、PIK3CA和NRAS)进行TaqMan实时定量PCR(qPCR)来检查如实施例1所述通过CGD方法和使用QIAamp试剂盒由血浆样品制备的cfDNA的可扩增能力,以评价产生的cfDNA的可分析汇集物的质量。血浆样品如实施例1所述制备并经受qPCR分析。

[0401] qPCR技术涉及连续监测扩增过程并允许靶标定量。如预期,来自使用CGD方法和QIAamp试剂盒制备的cfDNA的KRAS的扩增曲线图显示了对于分别使用CGD方法和QIAamp试剂盒制备的cfDNA的在17-24和28-33之间的阈值循环(Ct)值的范围(图2)。在所有样品中,KRAS被扩增,表明血浆样品中存在足够的cfDNA。然而,Ct值的比较表明CGD方法提供比QIAamp试剂盒多至少100倍的可分析的cfDNA($\Delta Ct > 7$)。

[0402] 接下来确定是否存在与3种其它基因-BRAF、PIK3CA和NRAS的获得测量值相似的差异。如实施例1所述制备血浆样品。BRAF、PIK3CA和NRAS的结果分别在图3A-3C中显示。使用CGD方法制备的cfDNA的扩增曲线图与使用QIAamp试剂盒制备的cfDNA相比,显示出更低的Ct值。在所有三种基因中观察到差异。 ΔCt 的量级与KRAS的量级一致。

[0403] 表2显示了这些实验的关键特征的概述。

[0404]

表 2: cfDNA 样品制备方法的比较		
关键特征	CGD 方法	QIAamp 方法
产率, 范围 (ng/ μ L), n=12	97.30 – 132.25	0.43 – 26.27
产率, 平均值 \pm SD (ng/ μ L), n=1	108.46 \pm 11.17	4.58 \pm 24.80
产率, CV%, n=12	10.30	541.48
平均 Ct, <i>KRAS</i> , n=12	22.7	33.2
平均 Ct, <i>BRAF</i> , n=12	20.6	30.8

[0405]

平均 Ct, <i>PIK3CA</i> , n=12	19.6	31.2
平均 Ct, <i>NRAS</i> , n=12	18.2	27.8
表缩写: Ct: 循环阈值		

[0406] 以上结果表明CGD方法提供了高质量cfDNA的可分析汇集物用于进一步分析。此外,CGD方法优于经测试的现有技术方法。

[0407] 实施例3-下一代测序

[0408] 使用下一代测序(NGS)分析进行对由CGD方法和QIAamp试剂盒制备的cfDNA的进一步评价。如实施例1所述制备cfDNA。如上所述进行NGS分析。

[0409] 分析使用CGD方法和使用QIAamp试剂盒制备的1ng至10ng的cfDNA的整个50-基因组,询问总共大约2800个突变(癌症热区组v2,Life Technologies,Carlsbad,CA)。结果显示在表3中。

[0410]

表 3.通过对由 CGD 方法或现有技术方法制备的 cfDNA 进行 NGS (下一代测序) 检测到的突变的汇总		
样品	通过 CGD 方法检测的突变 (突变体%, 读段深度)	通过 QIAamp 方法 检测的突变 (突变 体%, 读段深度)
1	EGFR, G719D (6.5%, 1358)	QNS
2	PIK3CA, K111R (2.1%, 1189) ABL1, Y253H (2.4%, 1189) SMAD4, C499Y (2.1%, 1189)	QNS
3	无	QNS
4	无	无
5	HNF1A, R272H (3.0%, 1191) TP53, E221K (4.8%, 1191)	无

[0411]

6	GNAS, R844C (3.2%, 1338) GNAS, R201C (3.2%, 1338)	QNS
7	PIK3CA, K111R (5.1%, 1023) EGFR, E734K (7.6%, 1023) EGFR, R776H (2.0%, 1023) HNF1A, T260M (13.1%, 1023)	无
8	PIK3CA, K111R (2.9%, 1783) EGFR, I821T (2.4%, 1783) TP53, R273C (3.7%, 1783)	QNS
9	VHL, C162R (1.9%, 1006) CTNNB1, T40I (1.8%, 1006)	无
10	无	无
11	PTEN, Q171E (3.1%, 1507)	QNS
12	TP53, P72S (3.3%, 1108)	无
13	无	无
14	无	TP53, S215G (2.2%, 463)
15	无	无
16	BRAF, V600M (3.8%, 2412) BRAF, I592V (3.3%, 2412) TP53, Y205H (2.2%, 2412) SMAD4, D355G (11.8%, 2412)	QNS
17	TP53, R249G (8.1%, 3542)	QNS

[0412] 在所测试的17个样品中,使用由QIAamp试剂盒制备的cfDNA的8个样品(8/17,

47.1%)是QNS(数量不足)以产生与实施例1中之前的Qubit和实时PCR结果一致的结果。使用由CGD方法制备的cfDNA的所有样品是可分析的(17/17,100%)。NGS分析显示了使用由CGD方法和QIAamp试剂盒制备的cfDNA确定为野生型(无突变)的四个一致情况(样品4、10、13和15)。NGS分析还揭示了使用由CGD方法和QIAamp试剂盒制备的cfDNA的5种不一致情况。在四种情况中,使用QIAamp试剂盒制备的cfDNA未揭示突变,而在同一样品中使用由CGD方法制备的cfDNA检测到至少一种突变(样品5、7、9和12)。在一种情况中,使用QIAamp试剂盒制备的cfDNA揭示出单一突变(低覆盖度,463X),而由CGD方法从相同的样品制备的cfDNA产生野生型结果(样品14)。

[0413] 在筛选出沉默突变和未确认的体细胞突变后,17名受试者中有11名(64.7%)具有在使用由CGD方法制备的cfDNA时由NGS分析检测到的至少一个突变。那些样品的读段深度范围为1006X-3542X。相反,使用用QIAamp试剂盒制备的cfDNA的NGS分析揭示出17名受试者中仅有1名(5.9%)突变。使用由CGD方法制备的cfDNA的NGS分析允许测定使用用QIAamp试剂盒制备的cfDNA通过NGS分析未检测到的11个样品中的23种突变。经鉴定的所有突变是取代。总之,NGS结果表明,与现有技术方法相比,由CGD方法提取的cfDNA提供了用于分析的优良原料。此外,相比之下,QIAamp试剂盒显示出由于cfDNA制备步骤中的损失导致的高QNS和假阴性率。

[0414] 在另一个实验中,为了解决关于样品可变性和潜在的未能检测生物标记的问题,进行了加标-和-回收实验。测试了来自Horizon Diagnostics的两种NGS参照标准品:标准品4覆盖10种突变(在5%),和标准品6携带20种突变(在2.5%),两者均呈基因组DNA格式。参考通常在健康个体中出现的10-30ng/mL的cfDNA,使用两种加标浓度(5ng/mL和20ng/mL)。如表4所示,通过NGS分析在由CGD方法制备的样品中可以检测到60%的突变(6/10和12/20)(在2.5%或5%),而在使用QIAamp试剂盒制备的相同加标样品中通过NGS分析未检测到突变。加标研究的结果与先前的NGS分析数据一致,并且进一步证实CGD方法相较于现有技术方法从较少血浆得到更高量的cfDNA,并且导致鉴定出更多的突变。

[0415]

表 4. 通过对由 CGD 方法或现有技术方法制备的加标的血浆样品进行 NGS (下一代测序) 检测的突变汇总

样品	CGD 方法	QIAamp 方法
加标的 5 ng/mL 标准 4 参照 DNA (10 个突变, 5% 突变体分数, Horizon Dx)	6/10	0/10
加标的 20 ng/mL 标准 6 参照 DNA (20 个突变, 2.5% 突变体分数, Horizon Dx)	12/20	0/20

[0416] CGD方法允许对从液滴体积的血浆(低至20 μ L)制备的cfDNA进行高级基因组分析(如,下一代测序)。CGD方法可应用于范围广泛的临床遗传测试,其具有最小样本体积、最高产率、简化的工作流程与降低的成本和周转时间的优势。

[0417] 实施例4-使用CGD方法对唾液样品进行ISA

[0418] 本实施例说明了在CGD方法中使用唾液样品。在该实施例中,根据方案进行CGD方法。唾液样品获自两名单独的受试者。用含有或不含防腐剂的商业取样试剂盒(Pure-SAL口腔样本收集系统(Pure-SAL Oral Specimen Collection System);Oasis Diagnostics)获得唾液样品。使用20 μ L的唾液样品作为输入并产生cfDNA分子的可分析汇集物。

[0419] 用于该实施例的样品是取自两个不同受试者的唾液样品,两者均含有或不含有商业唾液取样试剂盒中存在的防腐剂,每种实验中使用20 μ L样品。如方案A中所述处理唾液样品以产生cfDNA汇集物的可分析汇集物。如上所述使用Qubit 2.0荧光计定量经扩增的cfDNA的总产率。

[0420] 使由CGD方法产生的cfDNA经受在2%凝胶上的琼脂糖凝胶电泳,并使用溴化乙锭进行可视化(图4)。在图4中,泳道1和泳道2显示了用含有防腐剂的商业取样试剂盒获得的唾液样品的结果,其中泳道3是阴性对照(无唾液样品存在),而泳道4和泳道5显示了用不含防腐剂的商业取样试剂盒获得的唾液样品的结果,其中泳道6是阴性对照(无唾液样品存在)。直接取自唾液样品的cfDNA显示了强烈的染色强度,表明存在由CGD方法产生的丰富cfDNA。相反,使用含有防腐剂和其它试剂的商业试剂盒取出的唾液样品显示出几乎没有或没有染色(泳道1和泳道2)。

[0421] 该实施例显示了CGD方法可以有效地用于从唾液样品中存在的cfDNA制备cfDNA分子的可分析汇集物。此外,该实施例证明,商业取样试剂盒中存在的试剂可能干扰通过CGD方法进行的cfDNA的扩增。

[0422] 实施例5-使用CGD方法对血浆、尿和脑脊液样品进行ISA

[0423] 本实施例说明在CGD方法中使用血浆、尿和脑脊液(CSF)样品。在该实施例中,CGD方法根据方案A进行。如方案A所述处理样品以产生cfDNA汇集物的可分析汇集物。使cfDNA的可分析汇集物经受如所述的NGS分析。如上所述使用Qubit 2.0荧光计定量经扩增的cfDNA的总产率。

[0424] 冷冻样品获自各种来源。对于血浆和CSF样品,使用20 μ L样品作为CGD方法中的输入,而对于尿样品使用10 μ L样品作为CGD方法中的输入。

[0425] 使由CGD方法产生的cfDNA经受在2%凝胶上的琼脂糖凝胶电泳,并使用溴化乙锭(分子量标准1kb)可视化(图5)。在图5中,由各种样品制备的cfDNA如下,cfDNA浓度以ng/ μ L提供在括号中:泳道1CSF(8.5),泳道2尿(5.1),泳道3血浆(22),泳道4血浆(59),泳道5血浆(36.4),泳道6阴性对照;泳道7尿(52.2),泳道8尿(11.2),泳道9尿(89.6)和泳道10尿(30)。来自所有样品的cfDNA显示出强烈的染色强度,表明存在由CGD方法产生的丰富的cfDNA。通过Agilent 2100生物分析仪分析由图5的泳道1至6中显示的样品制备的cfDNA,以确定由CGD方法制备的cfDNA的尺寸分布和定量(图6)。

[0426] 该实施例显示了CGD方法可以有效地用于从以各种样品类型存在的cfDNA制备cfDNA分子的可分析汇集物。此外,使用CGD方法的cfDNA的尺寸分布通常在100kb至600kb的范围内,这有利于下游分析。

[0427] 实施例6-使用cfDNA测定突变体分数

[0428] 本实施例说明了野生型和突变体cfDNA的绝对拷贝数的测定以及突变体分数的计算。使用QIAamp试剂盒(根据制造商的说明书使用)从血浆和CSF样品(200 μ L)制备cfDNA。样品直接用于CGD方法。根据方案A进行CGD方法。用于该实施例的样品是取自受试者的血浆样

品。如方案A所述处理血浆样品以产生可分析的cfDNA汇集物。对于CGD方法和QIAamp试剂盒,CGD方法的样品输入体积分别为20 μ L和200 μ L。cfDNA由6个血浆样品和1个CSF样品连同阳性和阴性对照制备。由独立实验室使用QX200液滴数字PCR系统(QX200Droplet Digital PCR System,Bio-Rad,Hercules,CA)分析cfDNA。

[0429] ddPCR允许对核酸靶标序列进行高精度绝对定量。在使用热循环仪在每个液滴内进行PCR扩增反应之后,通过对封装在离散、体积限定的油包水液滴分区中的核酸分子计数来测量绝对拷贝数。将液滴在液滴读取器上以单行流动,它对两种不同的荧光信号:一种用于野生型DNA的荧光信号,另一种用于突变体DNA的荧光信号计数。使用下式计算突变体部分:突变体部分%=(突变体拷贝数/总拷贝数) \times 100。结果显示于表5中。

[0430] 从表5中可以看出,与现有技术的方法相比,使用CGD方法制备的cfDNA在富集突变体部分方面优越。在7个测试的样品中,CGD方法提供了5/7样品(71.4%)中突变体部分的优异富集。

[0431] 表5

表 5		
	突变体分数	
样品 ID	QiaAmp	CGD
1	17.84	5.11
2	2.65	2.01
3	0.93	43.57
4	1.31	14.62
5	0.95	34.31
6	0.02	0.97
7	0.31	2.25
阴性对照	0.22	0.37
阳性对照	49.68	46.11

[0434] 实施例6-CGD方法的再现性

[0435] 本实施例显示了CGD方法的再现性。在10个月的时间段内分析了6个质量对照样品(2个阳性对照、2个阴性对照和2个加标过程对照)。对于阳性对照,使用可商购获得的细胞系SW480和NCI-H1975。对于阴性对照,使用可商购获得的细胞系NA12878和NA19240。所有细胞系均购自美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection,Manassas,VA)。对于过程对照,使用两个先前测试的阳性患者DNA样品来加标至正常血浆(终浓度200ng/ml)中以产生两种过程对照。从细胞分离DNA,并使用10ng DNA作为CGD方法中的输入。

[0436] 根据方案A进行CGD方法。使cfDNA的可分析汇集物经受如上所述的NGS分析。结果显示在表6A中。表6A显示了由COSMIC ID号指示的基因和突变的变体识别、沉默突变和未确认的体细胞突变未被过滤掉。不同的COSMIC ID可能代表相同的突变。COSMIC ID取自癌症体细胞突变目录：<http://cancer.sanger.ac.uk/cancergenome/projects/cosmic/>。

[0437] 如表6A中显示,CGD方法随时间推移完全可再现,其中在所有测试期间使用质量对照样品达成100%一致。

[0438]

对照	2014年12月10日	2014年12月18日	2015年1月22日	2015年8月26日	2015年9月1日	2015年9月12日
过程对照 1 (加标样品)	PDGFRA (COSM22413), APC (COSM19049, COSM27993), KIT	PDGFRA (COSM22413), APC (COSM19049, COSM27993), KIT	PDGFRA (COSM22413), APC (COSM19049, COSM27993), KIT	PDGFRA (COSM22413), APC (COSM19049, COSM27993), KIT	PDGFRA (COSM22413), APC (COSM19049, COSM27993), KIT	PDGFRA (COSM22413), APC (COSM19049, COSM27993), KIT

[0439]

	(COSM1324), JAK3 (COSM34215)	(COSM1324), JAK3 (COSM34215)	(COSM1324), JAK3 (COSM34215)	(COSM1324), JAK3 (COSM34215)	(COSM1324), JAK3 (COSM34215)	(COSM1324), JAK3 (COSM34215)
过程对照 2 (加标样品)	APC (COSM19049), EGFR (COSM28601), BRAF (COSM1120), TP53 (COSM43737, COSM44091, COSM44358, COSM45777, COSM44852)	APC (COSM19049), EGFR (COSM28601), BRAF (COSM1120), TP53 (COSM43737, COSM44091, COSM44358, COSM45777, COSM44852)	APC (COSM19049), EGFR (COSM28601), BRAF (COSM1120), TP53 (COSM43737, COSM44091, COSM44358, COSM45777, COSM44852)	APC (COSM19049), EGFR (COSM28601), BRAF (COSM1120), TP53 (COSM43737, COSM44091, COSM44358, COSM45777, COSM44852)	APC (COSM19049), EGFR (COSM28601), BRAF (COSM1120), TP53 (COSM43737, COSM44091, COSM44358, COSM45777, COSM44852)	APC (COSM19049), EGFR (COSM28601), BRAF (COSM1120), TP53 (COSM43737, COSM44091, COSM44358, COSM45777, COSM44852)
SW480	PDGFRA (COSM22413), KIT (COSM28026), HRAS (COSM249860), KRAS (COSM520), TP53 (COSM10660, COSM99729), SMAD4 (COSM14167)	PDGFRA (COSM22413), KIT (COSM28026), HRAS (COSM249860), KRAS (COSM520), TP53 (COSM10660, COSM99729), SMAD4 (COSM14167)	PDGFRA (COSM22413), KIT (COSM28026), HRAS (COSM249860), KRAS (COSM520), TP53 (COSM10660, COSM99729), SMAD4 (COSM14167)	PDGFRA (COSM22413), KIT (COSM28026), HRAS (COSM249860), KRAS (COSM520), TP53 (COSM10660, COSM99729), SMAD4 (COSM14167)	PDGFRA (COSM22413), KIT (COSM28026), HRAS (COSM249860), KRAS (COSM520), TP53 (COSM10660, COSM99729), SMAD4 (COSM14167)	PDGFRA (COSM22413), KIT (COSM28026), HRAS (COSM249860), KRAS (COSM520), TP53 (COSM10660, COSM99729), SMAD4 (COSM14167)
NCI-H1975	PDGFRA	PDGFRA	PDGFRA	PDGFRA	PDGFRA	PDGFRA

[0440]

	(COSM22413), EGFR	(COSM22413), EGFR	(COSM22413), EGFR	(COSM22413), EGFR	(COSM22413), EGFR	(COSM22413), EGFR
	(COSM6240, COSM6224), CDKN2A	(COSM6240, COSM6224), CDKN2A	(COSM6240, COSM6224), CDKN2A	(COSM6240, COSM6224), CDKN2A	(COSM6240, COSM6224), CDKN2A	(COSM6240, COSM6224), CDKN2A
	(COSM13281), HRAS	(COSM13281), HRAS	(COSM13281), HRAS	(COSM13281), HRAS	(COSM13281), HRAS	(COSM13281), HRAS
	(COSM249860), TP53	(COSM249860), TP53	(COSM249860), TP53	(COSM249860), TP53	(COSM249860), TP53	(COSM249860), TP53
	(COSM10660, COSM99729), SMARCB1	(COSM10660, COSM99729), SMARCB1	(COSM10660, COSM99729), SMARCB1	(COSM10660, COSM99729), SMARCB1	(COSM10660, COSM99729), SMARCB1	(COSM10660, COSM99729), SMARCB1
	(COSM1090), SMARCB1	(COSM1090), SMARCB1	(COSM1090), SMARCB1	(COSM1090), SMARCB1	(COSM1090), SMARCB1	(COSM1090), SMARCB1
NA19240	IDH1 (NOCOSM105), PDGFRA (COSM22413), STK11 (COSM29005)	IDH1 (NOCOSM105), PDGFRA (COSM22413), STK11 (COSM29005)	IDH1 (NOCOSM105), PDGFRA (COSM22413), STK11 (COSM29005)	IDH1 (NOCOSM105), PDGFRA (COSM22413), STK11 (COSM29005)	IDH1 (NOCOSM105), PDGFRA (COSM22413), STK11 (COSM29005)	IDH1 (NOCOSM105), PDGFRA (COSM22413), STK11 (COSM29005)
NA12878	PDGFRA (COSM22413)	PDGFRA (COSM22413)	PDGFRA (COSM22413)	PDGFRA (COSM22413)	PDGFRA (COSM22413)	PDGFRA (COSM22413)

[0441] 还检验了使用CGD方法的批内变异。收集15个血浆样品(2个来自健康受试者;4个来自癌症受试者,2个经加标的血浆样品,4个细胞系样品和3个血清样品)。如上制备加标血浆样品。从细胞系中纯化DNA并将10ng DNA用作CGD方法的输入。根据方案A进行CGD方法。使cfDNA的可分析汇集物经受如上所述的NGS分析。将15个具有不同频率突变的文库用不同的条码索引,多路复用且在同一轮使用Ion Proton NGS测定测试5次。平均读段深度>200X。

[0442] 结果显示在表6B中。表6B显示了由COSMIC ID号指示的基因和突变的变体识别、沉默突变和未确认的体细胞突变未被过滤掉。不同的COSMIC ID可能代表相同的突变。COSMIC ID取自癌症体细胞突变目录:<http://cancer.sanger.ac.uk/cancergenome/projects/cosmic/>。也显示了重复测定之间的一致性。结果显示了每个重复分析中突变识别的100%一致性。突变的变体频率可高度再现(%CV<10%)。

[0443]

表 6B						
	重复 1	重复 2	重复 3	重复 4	重复 5	一致性%
1	BRAF (COSM21542) ATM (COSM21826)	BRAF (COSM21542) ATM (COSM21826)	BRAF (COSM21542) ATM (COSM21826)	BRAF (COSM21542) ATM (COSM21826)	BRAF (COSM21542) ATM (COSM21826)	100
2	KIT (COSM28026) APC (COSM13121)	KIT (COSM28026) APC (COSM13121)	KIT (COSM28026) APC (COSM13121)	KIT (COSM28026) APC (COSM13121)	KIT (COSM28026) APC (COSM13121)	100
3	CTNNB1 (COSM 5738) PDGFRA (COSM22413) KIT (COSM28026 COSM1243) TP53 (COSM43968 COSM43980 COSM44413)	CTNNB1 (COSM 5738) PDGFRA (COSM22413) KIT (COSM28026 COSM1243) TP53 (COSM43968 COSM43980 COSM44413)	CTNNB1 (COSM 5738) PDGFRA (COSM22413) KIT (COSM28026 COSM1243) TP53 (COSM43968 COSM43980 COSM44413)	CTNNB1 (COSM 5738) PDGFRA (COSM22413) KIT (COSM28026 COSM1243) TP53 (COSM43968 COSM43980 COSM44413)	CTNNB1 (COSM 5738) PDGFRA (COSM22413) KIT (COSM28026 COSM1243) TP53 (COSM43968 COSM43980 COSM44413)	100

[0444]

4	PTEN (COSM5121), TP53 (COSM43747, COSM10684)	PTEN (COSM5121), TP53 (COSM43747, COSM10684)	PTEN (COSM5121), TP53 (COSM43747, COSM10684)	PTEN (COSM5121), TP53 (COSM43747, COSM10684)	PTEN (COSM5121), TP53 (COSM43747, COSM10684)	100
5	KIT (COSM12711), TP53 (COSM11449)	KIT (COSM12711), TP53 (COSM11449)	KIT (COSM12711), TP53 (COSM11449)	KIT (COSM12711), TP53 (COSM11449)	KIT (COSM12711), TP53 (COSM11449)	100
6	PDGFRA (COSM22413), EGFR (COSM18425)	PDGFRA (COSM22413), EGFR (COSM18425)	PDGFRA (COSM22413), EGFR (COSM18425)	PDGFRA (COSM22413), EGFR (COSM18425)	PDGFRA (COSM22413), EGFR (COSM18425)	100
7	KIT (COSM1155), RB1 (COSM895)	KIT (COSM1155), RB1 (COSM895)	KIT (COSM1155), RB1 (COSM895)	KIT (COSM1155), RB1 (COSM895)	KIT (COSM1155), RB1 (COSM895)	100
8	TP53 (COSM45326)	TP53 (COSM45326)	TP53 (COSM45326)	TP53 (COSM45326)	TP53 (COSM45326)	100
9	BRAF (COSM476), PTPN11 (COSM13014)	BRAF (COSM476), PTPN11 (COSM13014)	BRAF (COSM476), PTPN11 (COSM13014)	BRAF (COSM476), PTPN11 (COSM13014)	BRAF (COSM476), PTPN11 (COSM13014)	100
10	PDGFRA (COSM22413), APC (COSM19049, COSM27993),	PDGFRA (COSM22413), APC (COSM19049, COSM27993),	PDGFRA (COSM22413), APC (COSM19049, COSM27993),	PDGFRA (COSM22413), APC (COSM19049, COSM27993),	PDGFRA (COSM22413), APC (COSM19049, COSM27993),	100

[0445]

	JAK3 (COSM34215)	JAK3 (COSM34215)	JAK3 (COSM34215)	JAK3 (COSM34215)	JAK3 (COSM34215)	
11	APC (COSM19049), EGFR (COSM28601), BRAF (COSM1120), TP53 (COSM43737)	APC (COSM19049), EGFR (COSM28601), BRAF (COSM1120), TP53 (COSM43737)	APC (COSM19049), EGFR (COSM28601), BRAF (COSM1120), TP53 (COSM43737)	APC (COSM19049), EGFR (COSM28601), BRAF (COSM1120), TP53 (COSM43737)	APC (COSM19049), EGFR (COSM28601), BRAF (COSM1120), TP53 (COSM43737)	100
12	PDGFRA (COSM22413) KIT (COSM28026) HRAS (COSM249860) KRAS (COSM520) TP53 (COSM10660) COSM99729) SMAD4 (COSM14167)	PDGFRA (COSM22413), KIT (COSM28026), HRAS (COSM249860), KRAS (COSM520), TP53 (COSM10660, COSM99729) SMAD4 (COSM14167)	PDGFRA (COSM22413) KIT (COSM28026) HRAS COSM249860 KRAS (COSM520) TP53 (COSM10660 COSM99729) SMAD4 (COSM14167)	PDGFRA (COSM22413) KIT (COSM28026) HRAS (COSM249860 COSM99729) KRAS (COSM520) TP53 (COSM10660 COSM99729) SMAD4 (COSM14167)	PDGFRA (COSM22413) KIT (COSM28026) HRAS (COSM249860 COSM99729) KRAS (COSM520), TP53 (COSM10660, COSM99729) SMAD4 (COSM14167)	100

[0446]

13	PDGFRA (COSM22413) EGFR (COSM6240, COSM6224) CDKN2A (COSM13281) HRAS (COSM249860) TP53 (COSM10660, COSM99729) SMARCB1 (COSM1090)	PDGFRA (COSM22413) EGFR (COSM6240, COSM6224) CDKN2A (COSM13281) HRAS (COSM249860) TP53 (COSM10660, COSM99729) SMARCB1 (COSM1090)	PDGFRA (COSM22413) EGFR (COSM6240, COSM6224) CDKN2A (COSM13281) HRAS (COSM249860) TP53 (COSM10660,CO SM99729) SMARCB1 (COSM1090)	PDGFRA (COSM22413) EGFR (COSM6240, COSM6224) CDKN2A (COSM13281) HRAS (COSM249860) TP53 (COSM10660, COSM99729) SMARCB1 (COSM1090)	PDGFRA (COSM22413) EGFR (COSM6240, COSM6224) CDKN2A (COSM13281) HRAS (COSM249860) TP53 (COSM10660, COSM99729) SMARCB1 (COSM1090)	100
14	IDH1 (NOCOSM105) PDGFRA (COSM22413) STK11 (COSM29005)	IDH1 (NOCOSM105) PDGFRA (COSM22413) STK11 (COSM29005)	IDH1 (NOCOSM105) PDGFRA (COSM22413) STK11 (COSM29005)	IDH1 (NOCOSM105) PDGFRA (COSM22413) STK11 (COSM29005)	IDH1 (NOCOSM105) PDGFRA (COSM22413) STK11 (COSM29005)	100
15	PDGFRA (COSM22413)	PDGFRA (COSM22413)	PDGFRA (COSM22413)	PDGFRA (COSM22413)	PDGFRA (COSM22413)	100

[0447] 2名操作者使用批内研究中描述的15个样品经不同的5轮,进行批间再现性研究。根据方案A进行CGD方法。使cfDNA的可分析汇集物经受如上所述的NGS分析。15个具有不同频率突变的文库用不同的条码索引、多路复用且在5个单独轮中使用Ion Proton NGS测定测试。平段读段深度>200X。

[0448] 结果显示在表6C中。表6C显示了由COSMIC ID号指示的基因和突变的变体识别、沉默突变和未确认的体细胞突变未被过滤掉。不同的COSMIC ID可能代表相同的突变。COSMIC ID取自癌症体细胞突变目录:<http://cancer.sanger.ac.uk/cancergenome/projects/cosmic/>。也显示了重复测定之间的一致性。与批内研究一样,结果显示了所有5个分析中突变识别的100%一致性。突变的变体频率高度可再现(%CV<10%)。

[0449]

	第 1 轮	第 2 轮	第 3 轮	第 4 轮	第 5 轮	一致性%
1	BRAF (COSM21542), ATM (COSM21826)	BRAF (COSM21542), ATM (COSM21826)	BRAF (COSM21542), ATM (COSM21826)	BRAF (COSM21542), ATM (COSM21826)	BRAF (COSM21542), ATM (COSM21826)	100
2	KIT (COSM28026), APC (COSM13121)	KIT (COSM28026), APC (COSM13121)	KIT (COSM28026), APC (COSM13121)	KIT (COSM28026), APC (COSM13121)	KIT (COSM28026), APC (COSM13121)	100
3	CTNNB1 (COSM 5738), PDGFRA (COSM22413), KIT (COSM28026, COSM1243), TP53 (COSM43968, COSM43980, COSM44413)	CTNNB1 (COSM 5738), PDGFRA (COSM22413), KIT (COSM28026, COSM1243), TP53 (COSM43968, COSM43980, COSM44413)	CTNNB1 (COSM 5738), PDGFRA (COSM22413), KIT (COSM28026, COSM1243), TP53 (COSM43968, COSM43980, COSM44413)	CTNNB1 (COSM 5738), PDGFRA (COSM22413), KIT (COSM28026, COSM1243), TP53 (COSM43968, COSM43980, COSM44413)	CTNNB1 (COSM 5738), PDGFRA (COSM22413), KIT (COSM28026, COSM1243), TP53 (COSM43968, COSM43980, COSM44413)	100
4	PTEN (COSM5121), TP53	PTEN (COSM5121), TP53	PTEN (COSM5121), TP53	PTEN (COSM5121), TP53	PTEN (COSM5121), TP53	100

[0450]

	(COSM43747, COSM10684)	(COSM43747, COSM10684)	(COSM43747, COSM10684)	(COSM43747, COSM10684)	(COSM43747, COSM10684)	
5	KIT (COSM12711), TP53 (COSM11449)	KIT (COSM12711), TP53 (COSM11449)	KIT (COSM12711), TP53 (COSM11449)	KIT (COSM12711), TP53 (COSM11449)	KIT (COSM12711), TP53 (COSM11449)	100
6	PDGFRA (COSM22413), EGFR (COSM18425)	PDGFRA (COSM22413), EGFR (COSM18425)	PDGFRA (COSM22413), EGFR (COSM18425)	PDGFRA (COSM22413), EGFR (COSM18425)	PDGFRA (COSM22413), EGFR (COSM18425)	100
7	KIT (COSM1155), RB1 (COSM895)	KIT (COSM1155), RB1 (COSM895)	KIT (COSM1155), RB1 (COSM895)	KIT (COSM1155), RB1 (COSM895)	KIT (COSM1155), RB1 (COSM895)	100
8	TP53 (COSM45326)	TP53 (COSM45326)	TP53 (COSM45326)	TP53 (COSM45326)	TP53 (COSM45326)	100
9	BRAF (COSM476), PTPN11 (COSM13014)	BRAF (COSM476), PTPN11 (COSM13014)	BRAF (COSM476), PTPN11 (COSM13014)	BRAF (COSM476), PTPN11 (COSM13014)	BRAF (COSM476), PTPN11 (COSM13014)	100
10	PDGFRA (COSM22413), APC (COSM19049, COSM27993), JAK3 (COSM34215)	PDGFRA (COSM22413), APC (COSM19049, COSM27993), JAK3 (COSM34215)	PDGFRA (COSM22413), APC (COSM19049, COSM27993), JAK3 (COSM34215)	PDGFRA (COSM22413), APC (COSM19049, COSM27993), JAK3 (COSM34215)	PDGFRA (COSM22413), APC (COSM19049, COSM27993), JAK3 (COSM34215)	100

[0451]

11	APC (COSM19049), EGFR (COSM28601), BRAF (COSM1120), TP53 (COSM43737)	APC (COSM19049), EGFR (COSM28601), BRAF (COSM1120), TP53 (COSM43737)	APC (COSM19049), EGFR (COSM28601), BRAF (COSM1120), TP53 (COSM43737)	APC (COSM19049), EGFR (COSM28601), BRAF (COSM1120), TP53 (COSM43737)	APC (COSM19049), EGFR (COSM28601), BRAF (COSM1120), TP53 (COSM43737)	100
12	PDGFRA (COSM22413), KIT (COSM28026), HRAS (COSM249860), KRAS (COSM520), TP53 (COSM10660), COSM99729), SMAD4 (COSM14167)	PDGFRA (COSM22413), KIT (COSM28026), HRAS (COSM249860), KRAS (COSM520), TP53 (COSM10660), COSM99729), SMAD4 (COSM14167)	PDGFRA (COSM22413), KIT (COSM28026), HRAS (COSM249860), KRAS (COSM520), TP53 (COSM10660), COSM99729), SMAD4 (COSM14167)	PDGFRA (COSM22413), KIT (COSM28026), HRAS (COSM249860), KRAS (COSM520), TP53 (COSM10660), COSM99729), SMAD4 (COSM14167)	PDGFRA (COSM22413), KIT (COSM28026), HRAS (COSM249860), KRAS (COSM520), TP53 (COSM10660), COSM99729), SMAD4 (COSM14167)	100
13	PDGFRA (COSM22413), EGFR (COSM6240, COSM6224), CDKN2A (COSM13281), HRAS	PDGFRA (COSM22413), EGFR (COSM6240, COSM6224), CDKN2A (COSM13281), HRAS	PDGFRA (COSM22413), EGFR (COSM6240, COSM6224), CDKN2A (COSM13281), HRAS	PDGFRA (COSM22413), EGFR (COSM6240, COSM6224), CDKN2A (COSM13281), HRAS	PDGFRA (COSM22413), EGFR (COSM6240, COSM6224), CDKN2A (COSM13281), HRAS	100

[0452]

	(COSM249860, TP53, (COSM10660, COSM99729), SMARCB1, (COSM1090)	(COSM249860, TP53, (COSM10660, COSM99729), SMARCB1, (COSM1090)	(COSM249860, TP53, (COSM10660, COSM99729), SMARCB1, (COSM1090)	(COSM249860, TP53, (COSM10660, COSM99729), SMARCB1, (COSM1090)	(COSM249860, TP53, (COSM10660, COSM99729), SMARCB1, (COSM1090)	
14	IDH1, (NOCOSM105, PDGFRA, (COSM22413), STK11, (COSM29005)	IDH1, (NOCOSM105, PDGFRA, (COSM22413), STK11, (COSM29005)	IDH1, (NOCOSM105, PDGFRA, (COSM22413), STK11, (COSM29005)	IDH1, (NOCOSM105, PDGFRA, (COSM22413), STK11, (COSM29005)	IDH1, (NOCOSM105, PDGFRA, (COSM22413), STK11, (COSM29005)	100
15	PDGFRA, (COSM22413)	PDGFRA, (COSM22413)	PDGFRA, (COSM22413)	PDGFRA, (COSM22413)	PDGFRA, (COSM22413)	100

[0453] 实施例7-CGD方法的灵敏度

[0454] 该实施例说明了CGD方法的灵敏度和检测限 (LOD)。在该实施例中,使用Horizon Dx NGS参照标准品Tru-Q 4和Tru-Q 7。这些标准品含有已知的限定频率突变。将这两种标准品以4:1、3:2、2:3和1:4的比率连续稀释至正常人类基因组DNA (Promega) 中以获得不同水平的突变并通过CGD方法分析。

[0455] 根据方案A进行CGD方法。使cfDNA的可分析汇集物经受如上所述的NGS分析。结果显示于表7A中(对于Tru-Q 4)和表7B中(对于Tru-Q 7)。所述表提供了标准品中存在的每种突变以及突变频率,并显示了未稀释样品和每个系列稀释物的每种突变的CGD方法的灵敏度 (LOD)。每个样品的平均读段深度>4000X。结果显示,最可行的体细胞突变的LOD范围为1%至3%。

表 7A							
Tru-Q 4 中的变体	未稀释	4:1	3:2	2:3	1:4	LOD	
ABL1 T315I 5.0%	✓	✓	✓	✓		2.0%	

[0456]

[0457]

BRAF V600E	8.0%	✓	✓	✓	✓		3.2%
BRAF V600R	4.0%					✓	
EGFR G719S	16.7%	✓	✓	✓	✓	✓	3.3%
EGFR L861Q	4.2%	✓	✓	✓	✓		1.7%
IDH2 R172K	5.0%	✓	✓	✓	✓	✓	1.0%
KIT D816V	5.0%	✓	✓	✓			3.0%
KRAS G12C	5.0%	✓	✓	✓			3.0%
KRAS G12D	5.0%	✓	✓	✓	✓		2.0%
KRAS G13D	25.0%	✓	✓	✓	✓		10.0%
KRAS Q61H	5.0%	✓	✓	✓			3.0%
NRAS Q61R	5.0%	✓	✓	✓	✓		2.0%
PDGFRA D842V	5.0%	✓	✓	✓			3.0%
PIK3CA H1047R	30.0%	✓	✓	✓	✓	✓	6.0%

[0458]

表 7B		未稀释	4:1	3:2	2:3	1:4	LOD
Tru-Q 7 中的变体							
ABL1 T315I	1.3%	✓					1.3%
BRAF V600E	8.0%	✓	✓	✓	✓	✓	1.6%
BRAF V600M	1.0%			✓			
EGFR G719S	16.7%	✓	✓	✓	✓	✓	3.3%
EGFR T790M	1.0%				✓		
FLT3 D835Y	1.3%		✓				
FLT3 ΔI836	1.3%				✓		
GNA11 Q209L	1.3%	✓					1.3%
GNAQ Q209L	1.3%			✓			
IDH2 R140Q	1.3%	✓					1.3%
IDH2 R172K	1.3%	✓					1.3%
JAK2 V617F	1.3%	✓					1.3%

[0459]

KIT D816V	1.3%	✓	✓				1.0%
KRAS A146T	1.3%	✓					1.3%
KRAS G12C	1.3%		✓				
KRAS G12R	1.3%					✓	
KRAS G12S	1.3%	✓					1.3%
KRAS G13D	25.0%	✓	✓	✓	✓	✓	5.0%
KRAS Q61L	1.3%	✓		✓			1.3%
NOTCH L1601P	1.3%	✓					1.3%
NRAS Q61K	1.3%	✓	✓				1.0%
PIK3CA H1047R	30.0%	✓	✓	✓	✓	✓	6.0%

[0460] 实施例8-CGD方法的特异性

[0461] 本实施例说明了CGD方法的特异性。血浆样品获自17名健康受试者。通过CGD方法在申请人的实验室分析血浆样品。根据方案A进行CGD方法。使cfDNA的可分析汇集物经由如上所述的NGS分析。通过使用可商购获得的cfDNA提取试剂盒纯化cfDNA,在第二CLIA认证实

实验室分析相同的血浆样品。根据制造商的说明书,用Ion Torrent PCG测序仪分析cfDNA。

[0462] 结果示于表8中。表8显示了由COSMIC ID号指示的基因和突变的变体识别、沉默突变和未确认的体细胞突变未被过滤掉。不同的COSMIC ID可能代表相同的突变。COSMIC ID取自癌症体细胞突变目录:<http://cancer.sanger.ac.uk/cancergenome/projects/cosmic/>。也显示了CGD方法与比较方法之间的一致性。结果显示,测试特异性是99.9% (在基因水平 (849/850)), 并且与由第二CLIA认证实验室进行的测试具有强一致性 (16/17; 94%)。

表 8			
样品 ID	Circulogene	CLIA 实验室 2	一致性
[0463] 1	PDGFRA (COSM22413), TP53 (COSM43606, COSM39293,	PDGFRA (COSM22413), TP53 (COSM43606, COSM39293,	100%

[0464]

	COSM179807, COSM179806, COSM179805, COSM44683)	COSM179807, COSM179806, COSM179805, COSM44683)	
2	PIK3CA (COSM758), APC (COSM19099)	PIK3CA (COSM758), APC (COSM19099)	100%
3	PDGFRA(COSM22413), MET (NOCOSM988), BRAF (COSM1116), RET (COSM29804), PTEN (COSM5101), ATM (COSM21825), TP53 (COSM12296), SMARCB1 (COSM1090)	PDGFRA(COSM22413), MET (NOCOSM988), BRAF (COSM1116), RET (COSM29804), PTEN (COSM5101), ATM (COSM21825), TP53 (COSM12296), SMARCB1 (COSM1090)	100%
4	PDGFRA (COSM22413), NRAS (COSM587), VHL (COSM14355), PIK3CA (COSM94986, COSM775), BRAF (COSM1116), PTEN (COSM5111)	PDGFRA (COSM22413), NRAS (COSM587), VHL (COSM14355), PIK3CA (COSM94986, COSM775), BRAF (COSM1116), PTEN (COSM5111)	100%
5	PIK3CA (COSM14052), KIT (COSM21983), APC (COSM19099), BRAF (COSM1116), GNAQ (COSM28760), TP53 (COSM45329, COSM43960, COSM46214)	PIK3CA (COSM14052), KIT (COSM21983), APC (COSM19099), BRAF (COSM1116), GNAQ (COSM28760), TP53 (COSM45329, COSM43960, COSM46214)	100%

6	TP53 (COSM11517)	TP53 (COSM11517)	100%
7	PDGFRA (COSM22413), KIT (COSM1290), APC (COSM19049), TP53 (COSM44512, COSM45511)	PDGFRA (COSM22413), KIT (COSM1290), APC (COSM19049), TP53 (COSM44512, COSM45511)	100%
8	STK11 (COSM25851)	STK11 (COSM25851)	100%
9	KIT (COSM28026)	KIT (COSM28026)	100%
10	APC (COSM13125), TP53 (COSM44973), ERBB2 (COSM35496)	APC (COSM13125), TP53 (COSM44973), ERBB2 (COSM35496)	100%
11	BRAF (COSM21542), ATM (COSM21826), TP53 (COSM45169)	BRAF (COSM21542), ATM (COSM21826)	一个变体未被 CLIA 实验室 2 识别
12	EGFR (COSM41603, COSM41663), MET (COSM710), BRAF (COSM461)	EGFR (COSM41603, COSM41663), MET (COSM710), BRAF (COSM461)	100%
13	MET (COSM691), TP53 (COSM10995)	MET (COSM691), TP53 (COSM10995)	100%
14	ATM (COSM21626), TP53 (COSM43879), SMAD4 (COSM13115)	ATM (COSM21626), TP53 (COSM43879), SMAD4 (COSM13115)	100%
15	PDGFRA (COSM22413), MET (NOCOSM988), BRAF (COSM1116), TP53 (COSM11738, COSM44848)	PDGFRA (COSM22413), MET (NOCOSM988), BRAF (COSM1116), TP53 (COSM11738, COSM44848)	100%

[0465]

	16	未检测到突变	未检测到突变	100%
[0466]	17	VHL (COSM30295), ERBB2 (COSM35496)	VHL (COSM30295), ERBB2 (COSM35496)	100%

[0467] 在另一个比较中,获得了50个临床血浆样品(来自15名胰腺癌患者;15名结直肠癌患者,1名胃肠道间质肿瘤患者,4名肺癌患者和15名CEA-阳性血清样品-用S标记)。通过CGD方法在申请人的实验室分析血浆样品。根据方案进行CGD方法。使cfDNA的可分析汇集物经受如上所述的NGS分析。如上所述,在相同的第二CLIA认证实验室中分析相同的血浆样品。

[0468] 结果显示在表9中。表9显示了由COSMIC ID号指示的基因和突变的变体识别、沉默突变和未确认的体细胞突变未被过滤掉。不同的COSMIC ID可能代表相同的突变。COSMIC ID取自癌症体细胞突变目录:<http://cancer.sanger.ac.uk/cancergenome/projects/cosmic/>。也显示了CGD方法与比较方法之间的一致性。结果显示96%的一致性(48/50),其中样本2和8不一致。

[0469]

样品 ID	Circulogene	CLIA 实验室 2	一致性
1	PIK3CA (COSM27273), EZH2 (COSM37032), TP53 (COSM44397)	PIK3CA (COSM27273), EZH2 (COSM37032), TP53 (COSM44397)	100%
2	FGFR3 (COSM718), IDH2 (COSM86960), TP53 (COSM45516)	KIT (COSM1255), AKT1 (COSM48226)	不一致
3	KIT (COSM28026), APC (COSM13121), TP53 (COSM44578)	KIT (COSM28026), APC (COSM13121), TP53 (COSM44578)	100%
4	KIT (COSM1290)	KIT (COSM1290)	100%
5	PDGFRA (COSM22413), EGFR (COSM18425, COSM41663)	PDGFRA (COSM22413), EGFR (COSM18425, COSM41663)	100%

[0470]

6	PDGFRA (COSM22413)	PDGFRA (COSM22413)	100%
7	PDGFRA (COSM22413), MET (COSM701), BRAF (COSM33729), SMO (COSM13146), ATM (COSM12791), TP53 (COSM45511)	PDGFRA (COSM22413), MET (COSM701), BRAF (COSM33729), SMO (COSM13146), ATM (COSM12791), TP53 (COSM45511)	100%
8	PDGFRA (COSM22413), NRAS (COSM587, COSM583)	PIK3CA (COSM14052), ABL1 (COSM12576) RB1 (COSM1042), SMAD4 (COSM14221)	不一致
9	CDKN2A (COSM12746)	NRAS (COSM577)	100%
10	IDH1 (NOCOSM105), PIK3CA (COSM14052), PDGFRA (COSM22413), EGFR (COSM18419), RET (COSM978), HNF1A (COSM24923)	IDH1 (NOCOSM105), PIK3CA (COSM14052), PDGFRA (COSM22413), EGFR (COSM18419), RET (COSM978), HNF1A (COSM24923)	100%
11	IDH1 (NOCOSM105), PDGFRA (COSM22413), TP53 (COSM43968, COSM99933, COSM10659, COSM44036)	IDH1 (NOCOSM105), PDGFRA (COSM22413), TP53 (COSM43968, COSM99933, COSM10659, COSM44036)	100%
12	IDH1 (NOCOSM105), PDGFRA (COSM22413), STK11 (COSM20943)	IDH1 (NOCOSM105), PDGFRA (COSM22413), STK11 (COSM20943)	100%
13	IDH1 (NOCOSM105), PDGFRA (COSM22413)	IDH1 (NOCOSM105), PDGFRA (COSM22413)	100%
14	IDH1 (NOCOSM105), PDGFRA	IDH1 (NOCOSM105), PDGFRA	100%

[0471]

	(COSM22413), PTEN (COSM5200), HNF1A (COSM24931)	(COSM22413), PTEN (COSM5200), HNF1A (COSM24931)	
15	IDH1 (NOCOSM105), PDGFRA (COSM22413), ALK (COSM28057), BRAF (COSM18443), TP53 (COSM43692)	IDH1 (NOCOSM105), PDGFRA (COSM22413), ALK (COSM28057), BRAF (COSM18443), TP53 (COSM43692)	100%
16	IDH1 (NOCOSM105), PDGFRA (COSM22413), TP53 (COSM44338, COSM44219), JAK3 (COSM34214)	IDH1 (NOCOSM105), PDGFRA (COSM22413), TP53 (COSM44338, COSM44219), JAK3 (COSM34214)	100%
17	BRAF (COSM1130), SMAD4 (COSM14232)	BRAF (COSM1130), SMAD4 (COSM14232)	100%
18	KIT (COSM1155), IDH2 (COSM33731)	KIT (COSM1155), IDH2 (COSM33731)	100%
19	EGFR (COSM41663)	EGFR (COSM41663)	100%
20	TP53 (COSM43872, COSM44328)	TP53 (COSM43872, COSM44328)	100%
21S	PDGFRA (COSM22413), KIT (COSM28026), PTEN (COSM28897)	PDGFRA (COSM22413), KIT (COSM28026), PTEN (COSM28897)	100%
22S	TP53 (COSM44120)	TP53 (COSM44120)	100%
23S	VHL (COSM25719), ATM (COSM21825), TP53 (COSM45332)	VHL (COSM25719), ATM (COSM21825), TP53 (COSM45332)	100%
24S	IDH1 (NOCOSM105), VHL (COSM18009), TP53 (COSM45189), SMAD4	IDH1 (NOCOSM105), VHL (COSM18009), TP53 (COSM45189), SMAD4	100%

[0472]

	(COSM14113)	(COSM14113)	
25S	PIK3CA (COSM13570), EGFR (COSM13183), HNF1A (COSM24915)	PIK3CA (COSM13570), EGFR (COSM13183), HNF1A (COSM24915)	100%
26S	PIK3CA (COSM14052), PDGFRA (COSM22413), KIT (COSM28026), TP53 (COSM44525)	PIK3CA (COSM14052), PDGFRA (COSM22413), KIT (COSM28026), TP53 (COSM44525)	100%
27S	未检测到突变	未检测到突变	100%
28S	PDGFRA (COSM22413), KIT (COSM1273), PTPN11 (COSM13017)	PDGFRA (COSM22413), KIT (COSM1273), PTPN11 (COSM13017)	100%
29S	KIT (COSM28026), CSF1R (COSM954), PTEN (COSM5916)	KIT (COSM28026), CSF1R (COSM954), PTEN (COSM5916)	100%
30S	MPL (COSM43212), KRAS (COSM517), TP53 (COSM11449)	MPL (COSM43212), KRAS (COSM517), TP53 (COSM11449)	100%
31S	CTNNB1 (COSM5738), PIK3CA (COSM27134), PDGFRA (COSM22413), KIT (COSM28026, COSM1243), PTEN (COSM5048), ATM (COSM21826), KRAS (COSM521), RB1 (COSM879), TP53 (COSM43968, COSM43980, COSM44413)	CTNNB1 (COSM5738), PIK3CA (COSM27134), PDGFRA (COSM22413), KIT (COSM28026, COSM1243), PTEN (COSM5048), ATM (COSM21826), KRAS (COSM521), RB1 (COSM879), TP53 (COSM43968, COSM43980, COSM44413)	100%
32S	PDGFRA (COSM22413), KIT (COSM21983),	PDGFRA (COSM22413), KIT (COSM21983),	100%

[0473]

	EGFR (COSM28511, COSM28601), TP53 (COSM44129, COSM 11089)	EGFR (COSM28511, COSM28601), TP53 (COSM44129, COSM 11089)	
33S	KIT (COSM1316), HRAS (COSM249860), ATM (COSM21826)	KIT (COSM1316), HRAS (COSM249860), ATM (COSM21826)	100%
34S	PTEN (COSM5121), TP53 (COSM10663, COSM99947, COSM43747, COSM10684, COSM43910)	PTEN (COSM5121), TP53 (COSM10663, COSM99947, COSM43747, COSM10684, COSM43910)	100%
35S	PDGFRA (COSM22413), KIT (COSM21983), APC (COSM18852), SMAD4 (COSM14096), GNAQ (COSM28760)	PDGFRA (COSM22413), KIT (COSM21983), APC (COSM18852), SMAD4 (COSM14096), GNAQ (COSM28760)	100%
36	ERBB2 (COSM14060), TP53 (COSM44853)	ERBB2 (COSM14060), TP53 (COSM44853)	100%
37	IDH1 (NOCOSM105), PDGFRA (COSM22413), TP53 (COSM44536, COSM43787), ERBB2 (COSM21985), GNAS (COSM123397, COSM27887), SMARCB1 (COSM1002)	IDH1 (NOCOSM105), PDGFRA (COSM22413), TP53 (COSM44536, COSM43787), ERBB2 (COSM21985), GNAS (COSM123397, COSM27887), SMARCB1 (COSM1002)	100%
38	EGFR (COSM14243, COSM28603), KRAS (COSM12722, COSM528), TP53 (COSM44603, COSM44428, COSM43582)	EGFR (COSM14243, COSM28603), KRAS (COSM12722, COSM528), TP53 (COSM44603, COSM44428, COSM43582)	100%
39	PIK3CA (COSM770), APC (COSM19718), RET (COSM966),	PIK3CA (COSM770), APC (COSM19718), RET (COSM966),	100%

[0474]

	TP53 (COSM11073, COSM99721, COSM45005, COSM44326), JAK3 (COSM34213)	TP53 (COSM11073, COSM99721, COSM45005, COSM44326), JAK3 (COSM34213)	
40	PDGFRA (COSM22413), APC (COSM19049, COSM27993), KIT (COSM1324), JAK3 (COSM34215)	PDGFRA (COSM22413), APC (COSM19049, COSM27993), KIT (COSM1324), JAK3 (COSM34215)	100%
41	APC (COSM19049), EGFR (COSM28601), BRAF (COSM1120), TP53 (COSM43737, COSM44091, COSM44358, COSM45777, COSM44852)	APC (COSM19049), EGFR (COSM28601), BRAF (COSM1120), TP53 (COSM43737, COSM44091, COSM44358, COSM45777, COSM44852)	100%
42	PDGFRA (COSM22413), KIT (COSM28026), HRAS (COSM249860), KRAS (COSM520), TP53 (COSM10660, COSM99729), SMAD4 (COSM14167)	PDGFRA (COSM22413), KIT (COSM28026), HRAS (COSM249860), KRAS (COSM520), TP53 (COSM10660, COSM99729), SMAD4 (COSM14167)	100%
43	PDGFRA (COSM22413), EGFR (COSM6240, COSM6224), CDKN2A (COSM13281), HRAS (COSM249860), TP53 (COSM10660, COSM99729), SMARCB1 (COSM1090)	PDGFRA (COSM22413), EGFR (COSM6240, COSM6224), CDKN2A (COSM13281), HRAS (COSM249860), TP53 (COSM10660, COSM99729), SMARCB1 (COSM1090)	100%
44	IDHI (NOCOSM105), PDGFRA	IDHI (NOCOSM105), PDGFRA	100%

[0475]

	(COSM22413), STK11 (COSM29005)	(COSM22413), STK11 (COSM29005)	
45	PDGFRA (COSM22413)	PDGFRA (COSM22413)	100%
46	PDGFRA (COSM22413), KIT (COSM28026), HRAS (COSM249860), KRAS (COSM520), TP53 (COSM10660, COSM99729), SMAD4 (COSM14167)	PDGFRA (COSM22413), KIT (COSM28026), HRAS (COSM249860), KRAS (COSM520), TP53 (COSM10660, COSM99729), SMAD4 (COSM14167)	100%
47	PDGFRA (COSM22413), EGFR (COSM6240, COSM6224), CDKN2A (COSM13281) HRAS (COSM249860), TP53 (COSM10660, COSM99729), SMARCB1 (COSM1090)	PDGFRA (COSM22413), EGFR (COSM6240, COSM6224), CDKN2A (COSM13281) HRAS (COSM249860), TP53 (COSM10660, COSM99729), SMARCB1 (COSM1090)	100%
48	未检测到突变	未检测到突变	100%
49	未检测到突变	未检测到突变	100%
50	PDGFRA (COSM22413)	PDGFRA (COSM22413)	100%

[0476] 这些结果显示了CGD方法与现有技术的方法相比非常有利。

[0477] 实施例9-CGD方法与组织活检结果的比较

[0478] 本实施例说明了CGD方法与组织活检的比较。获得来自的经历复发的乳腺癌患者 (n=13) 和卵巢癌患者 (化疗前和化疗后) (n=15) 的血浆样品。所有受试者都有组织活检数据可供比较。对于乳腺癌患者来说,组织活检数据可以从肿瘤中的两个分开的位置获得。对于卵巢癌患者,组织活检数据可以从化疗治疗前和化疗治疗后获得;此外,也提取了匹配的组织基因组DNA并提供用于分析。将从血浆样品制备的cfDNA获得的结果与组织活检的结果进行比较。

[0479] 根据方案A进行CGD方法。使获得的cfDNA的可分析汇集物经受如上所述的NGS分析。

[0480] 对于经历了复发的乳腺癌患者,用CGD方法获得的结果显示出与从组织活检获得的结果的强烈一致性。总之,用CGD方法获得的结果与用组织活检获得的结果之间存在69.2%的一致性,这与本领域报道的一致性值一致。结果显示在表10中。

表 10		
	CGD 方法	
[0481] 组织活检	阳性	阴性
阳性	7	2
阴性	2	2

[0482] 对于卵巢癌比较,用CGD方法获得的结果显示出与由组织活检(化疗治疗前和化疗治疗后两者)获得的结果的强烈一致性(参见表11和表12以及图7)。对KRAS、BRAF、PIK3CA和PTEN基因的两种方法之间在患者水平和突变水平两者下的结果都有强烈一致性(表11)。与组织活检相比,CGD方法检测到更多的具有突变的基因和个别基因的更多突变。在CGD方法和组织活检之间,就最频繁突变基因而言的模式是一致的(表12)。

[0483]

表 11				
组织 vs CGD n=15	KRAS	BRAF	PIK3CA	PTEN
一致性 (患者水平)	93.3%	100%	86.7%	73.3%
组织 vs CGD	KRAS (n=64)	BRAF (n=77)	PIK3CA(n=101)	PTEN(N= 161)
一致性 (突变水平)	98.4%	100%	98.8%	99.4%

[0484]

	前	后	前	后
	cfDNA (血浆)		DNA (肿瘤)	
突变的基因数	20	22	6	6
突变的总数	58	59	40	39
最频繁突变的基因	P53 (20/58)	P53 (17/59)	P53 (25/40)	P53 (25/39)
	PI3KCA (6/58)	KIT (8/59)	KDR (5/40)	KDR (6/39)
	KIT (5/58)	PI3KCA (5/59)	KIT (5/40)	KIT (4/39)
	EGFR (4/58)	ATM (4/59)	PIK3CA (3/40)	PIK3CA (2/39)

[0485] 当根据治疗标准(例如,化疗治疗前和化疗治疗后)比较来自CGD方法和组织活检的结果时,CGD方法和组织活检的结果在基因水平上提供了一致的结果(图7)。在图7中,对每个基因呈现的数据从左到右对应于治疗前的组织活检、治疗前的CGD方法、治疗后的组织活检和治疗后的CGD方法。

[0486] 这些结果显示了CGD方法与当前现有技术的组织活检方法之间的一致性。

[0487] 实施例10-经历癌症疗法的受试者的纵向监测

[0488] 在本实施例中,在2名患者中在疗法期间进行血浆cfDNA中的体细胞改变的纵向监测。对突变负荷动态作图,并将其与治疗过程中的癌症抗原(CA)标记和PET/CT成像进行比较。使用实体瘤响应评价标准(Response Evaluation Criteria in Solid Tumors, RECIST)评估成像扫描。

[0489] 在该实施例中,根据方案A进行CGD方法。用于该实施例的样品是经时间的推移取自两名受试者的血浆样品。如上所述使用Qubit 2.0荧光计对扩增的DNA的总产率进行定量。使用AmpliSeq癌症热区组,第2版(Life Technologies,Carlsbad,CA,USA)根据供应商的方案,使用一定浓度的1-10ng可分析的cfDNA汇集物扩增207个靶向的基因座,靶向在50个癌症驱动基因内的2855个热区突变。后续的基于半导体的测序是在Ion Chef和Ion Proton(Life Technologies,Carlsbad,CA,USA)上进行的,保持每个样品>200,000的读段数目。

[0490] 受试者1是一名诊断为肺癌伴转移的69岁、不吸烟的中国女性患者。组织活检显示了表皮生长因子受体(EGF-R)的致敏突变,而ALK、ROS-1、BRAF为阴性(2015年5月19日)。受试者每月一次用特罗凯(Tarceva)(盐酸厄洛替尼,其靶向EGF-R;每天100mg)和阿瓦斯丁(Avastin)(贝伐单抗)开始疗法。在近5个月的疗法后,如通过使用CGD方法的cfDNA分析所确定,受试者的癌胚抗原(CEA)、CA19-9和CA125水平全部显著下降(图XA)。PET/CT扫描评价

也显示了持续101天且肿瘤大小和活性降低的稳定疾病(图XB)。然而,使用CGD方法的血浆cfDNA分析检测到两个在TP53和PTEN基因中维持大约50天的新体细胞突变。截至2016年3月末,检出的肿瘤突变逐渐增加至3、7和8个突变,表明了一种进行性疾病。2016年3月的cfDNA分析揭示了EGFR的2个低-等位基因-频率亚克隆,E114K(4.2%)和E868G(2.4%),这意味着在药物选择压力后的克隆进化。2016年3月31日的PET/CT扫描识别出一个新的肿瘤块(刚好超出分辨率水平;约1cm³),证实了cfDNA分析。总之,本案例表明,通过使用CGD方法的cfDNA分析检测到的突变与放射学稳定疾病密切相关,其中突变负荷增加比放射学进展早2个月出现。此外,由于建议PET/CT扫描每年不超过两次,所以CGD方法为受试者的纵向评价提供了一种有效、安全的替代方法。

[0491] 受试者2是一名诊断为原发灶不明的转移性胰周淋巴结腺癌的79岁的伊朗女性患者。细针活检的免疫组织化学为CK7阳性,而CK20、TTF、S100和CD45在2015年10月26日均为阴性。受试者最初接受XELOX疗法(由卡培他滨组合奥沙利铂组成的化疗方案)。此后,免疫染色也鉴定出PD-L1过表达,因此,随后用XELIRI(由卡培他滨组合伊立替康组成的化疗方案)、阿瓦斯汀(Avastin)(贝伐单抗)和奥德武(Opdivo)(纳武单抗)对她进行治疗。2016年2月11日的PET/CT扫描显示肿瘤大小和活性显著下降,响应率>90%(图XB)。结果血浆cfDNA分析与成像结果一致,显示了CEA和CA标记(CA125、CA27-29、CA19-9)降低,表明稳定疾病维持至少41天(图XA)。最初检测到四种体细胞突变(FLT3Y572C 6.5%;TP53E165G 5.2%;TP53Y104C 4.1%;TP53C137Y 4.0%),然后在治疗过程中下降至1和0突变。该案例再次说明了通过血滴液体活检的突变分析与响应于疗法的临床结果强烈相关。

[0492] 重要的是,CEA和CA蛋白标记不一定对癌症细胞具有特异性,并且PET/CT扫描受到分辨率限制。相反,本文中由CGD方法检测到的癌症-相关的体细胞突变对恶性肿瘤具有特异性,并且具有这些突变的血浆cfDNA显示出指示存在恶性肿瘤。本实施例中的结果显示通过使用CGD方法的cfDNA分析检测到的体突变水平与当前标准护理测试结果和临床结果良好相关,并且可能提供最早的复发指征。

[0493] 实施例11-使用CGD方法纵向监测

[0494] 本实施例说明了在癌症患者的纵向监测中使用CGD方法。使用CGD方法,可使临床医生获得有关治疗效果、残留疾病、克隆进化、耐药性进化和肿瘤复发的实时纵向信息。通过准确的实时信息,临床医生可以对治疗性干预做出更准确的决策,从而使临床医生修改当前的治疗,以成本有效的方式提供最有效的治疗。

[0495] 在该实施例中,根据方案A进行CGD方法。用于该实施例中的样品是取自受试者的血浆样品。使cfDNA的可分析汇集物经受如所述的NGS分析。

[0496] 表13显示了来自患有各种癌症的患者分析的示例性结果(CRC代表结直肠癌;GIST代表胃肠道间质瘤)。从表13可以看出,使用CGD方法的纵向监测效用是明显的。例如,患有CRC的受试者1在2015年11月的初始测试中显示了NRAS和PTEN突变。在治疗期间,在2015年12月重新测试患者,未检测到突变。在2015年2月,对患者进行重新测试,并且呈BRAF突变(低频率)阳性。作为另一个实例,将受试者5(肺癌)最初于2015年11月进行测试,并显示了TP53基因中的突变。经过2015年12月、2016年1月和2016年2月的进一步纵向检测后,肿瘤突变模式的改变明显。在该患者中,原始TP53突变显示出频率减少(尽管于2016年2月仍然存在),且在2016年2月检测到KDR、ERBB4、VHL、CTNNb1和RB1基因中突变出现。使用实时提供的

此类信息, 临床医生可以改变治疗性干预, 以解决患者肿瘤概况的每一个变化的性质 (every-changing nature)。

[0497]

迹象	第 1 测试	第 2 测试	第 3 测试	第 4 测试
CRC	11-30-15 NRAS (53.5%) PTEN (6.7%)	12-21-15 无突变	2-19-16 BRAF (1.9%)	
GIST	11-2-15 Kit (49.8%)	12-8-15 无突变	2-5-16 无突变	
肺	11-10-15 TP53 (92.7%) VHL (4.6%)	2-5-16 无突变		
CRC	12-8-15 BRAF (3.2%)	12-21-15 EGFR (5.6%; 4.6%) SMAD4 (2.3%)		
肺	11-30-15 TP53 (40%; 15.6%)	12-21-15 PTEN (19.3%; 6.0%)	1-19-16 TP53 (5.2%; 3.3%) EGFR (4.7%)	2-12-16 KDR (98.6%) ERBB4 (5.8%) VHL (5.4%) CTNNB1 (3.9%) RBI (3.7%) TP53 (3.1%; 2.0%)
乳房	11-10-15 ERBB2 (2.7%)	12-28-15 无突变	1-29-16 TP53 (8.6%; 3.1%)	
乳房	11-30-15 PICK3CA (2.8%)	12-28-15 无突变	1-19-16 无突变	
胰腺	11-30-15	12-8-15		

[0498]

TP53 (96.9%)	TP53 (95.2%)		
CDKN2A (6.4%)			
SMARCB1 (5.9%)			
HRAS (5.0%)			
EGFR (4.8%)			
VHL (2.4%)			
IDH1 (2.0%)			
SMAD4 (2.0%)			

[0499] 实施例12-ISA酶混合物的优化

[0500] 本文所讨论,CGD方法可使用各种酶混合物以从样品中存在的cfDNA有效提供可扩增cfDNA汇集物。本实施例说明了几种不同的酶混合物(1至6)对CGD方法效率(其效率基于以ng/ μ L计的扩增的cfDNA的产率)的用途。表14中提供了酶混合物1至6的组成。

[0501] 根据方案A进行CGD方法,除了下面指出的例外。用于该实施例的样品是取自单个受试者的血浆样品,每个实验使用20 μ L样品。如方案A所述处理血浆样品以产生可扩增cfDNA汇集物,不同之处在于在方案A的步骤8,酶混合物1至6取代方案A中引用的酶混合物。如方案A中所述使可扩增cfDNA汇集物经受PCR扩增,以产生cfDNA的可分析汇集物。如上所述,使用Qubit 2.0荧光计连同dsDNA BR和HS测定试剂盒对扩增的DNA的总产率进行定量。

[0502] 结果显示在表14中。所有酶混合物都能产生良好的结果。方案A的酶混合物基于原始样品cfDNA输入产生82.3ng/ μ L扩增的DNA。酶混合物1与方案A相比产生类似的经扩增的DNA的产率(82.2ng/ μ L),而酶混合物2和酶混合物6与方案A相比分别产生降低的经扩增的DNA的产率(分别为70.4ng/ μ L和58.6ng/ μ L)(尽管此类混合物适合用于本文所述的方法中)。与方案A相比,酶混合物3、酶混合物4和酶混合物5产生增加的经扩增的DNA的产率(分别为97.1ng/ μ L、105.0ng/ μ L和96.4ng/ μ L)。

[0503] 这些结果显示了CGD方法需要5' -3' 聚合酶活性、3' -5' 外切核酸酶活性和DNA连接酶活性以从样品中存在的cfDNA有效地产生cfDNA分子的可扩增汇集物。多核苷酸激酶活性的添加也提高了可扩增cfDNA汇集物的产生效率。如表14中显示,在不显著抑制可扩增cfDNA汇集物的产生效率的情况下也可以存在相加活性。

[0504]

方案 A	酶 ID	酶混合物 1	酶混合物 2	酶混合物 3	酶混合物 4	酶混合物 5	酶混合物 6
--	T4 DNA 聚合酶	5 个单位 (1.75 μ L)	5 个单位 (1.75 μ L)	5 个单位 (1.75 μ L)	5 个单位 (1.75 μ L)	5 个单位 (1.75 μ L)	5 个单位 (1.75 μ L)
--	T4 DNA 连接酶	800 个单位 (2.5 μ L)	2.5 μ L	2.5 μ L	2.5 μ L	2.5 μ L	2.5 μ L
5 个单位 (2.5 μ L)	克列诺片段	12.5 个单位 (2.5 μ L)	12.5 个单位 (2.5 μ L)	12.5 个单位 (2.5 μ L)	12.5 个单位 (2.5 μ L)	12.5 个单位 (2.5 μ L)	--
100 个单位 (2.5 μ L)	T4 多核苷酸激酶	12.5 个单位 (2.5 μ L)	12.5 个单位 (2.5 μ L)	12.5 个单位 (2.5 μ L)	12.5 个单位 (2.5 μ L)	--	--
1 个单位 (0.75 μ L)	尿嘧啶-DNA 糖基化酶	3.75 个单位 (0.75 μ L)	3.75 个单位 (0.75 μ L)	3.75 个单位 (0.75 μ L)	--	--	--
--	Nb.BbvC1	12.5 个单位 (1.25 μ L)	12.5 个单位 (1.25 μ L)	--	--	--	--
--	大肠杆菌单链结合蛋白	120 ng (0.25 μ L)	--	--	--	--	--
--	水	--	(0.25 μ L)	(1.5 μ L)	(2.25 μ L)	(4.75 μ L)	(7.25 μ L)
	总体积	11.5 μ L	11.5 μ L	11.5 μ L	11.5 μ L	11.5 μ L	11.5 μ L
82.3	产率 (ng/μL)	82.2	70.4	97.1	105	96.4	58.6

[0505] 实施例13-ISA缓冲液溶液的优化

[0506] 如本文所讨论,CGD方法可使用各种酶混合物以从样品中存在的cfDNA有效提供可分析的cfNA汇集物。本实施例说明了几种不同的酶混合物对本公开方法的效率(其效率基于以ng/ μ L计的经扩增的cfDNA的产率)的用途。

[0507] 在该实施例中,方案A中使用的主混合物和通用缓冲液用表6所示组合的CG1缓冲

液或CG2缓冲液替代,并测定对经扩增的cfDNA的总产率的影响。CG1和CG2当用作主混合物和/或通用缓冲液的替代品时,以与按方案A替换的组分相同的体积添加。

[0508] 添加主混合物(也被称为L缓冲液)以提供以下的反应中的终浓度:40 μ M dNTP,和2 μ M的SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2的衔接子分子。

[0509] 添加通用缓冲液(也称为S缓冲液)以提供以下的反应中的终浓度:50mM NaCl、25mM Tris-Cl(pH 7-8)、10mM Mg₂Cl₂、2.5mM DTT和1mM ATP。

[0510] 添加CG1缓冲液以提供以下的反应中的终浓度:50mM乙酸钾、20mM三-乙酸盐,pH 7.9、10mM乙酸镁、1mM DTT、1mM ATP、40 μ M dNTP和200 μ g/ml BSA。

[0511] 添加CG2缓冲液以提供以下的反应中的终浓度:2 μ M的SEQ ID NO:5的衔接子分子(在无核酸酶水中)。

[0512] 根据方案A进行CGD方法,除了下面指出的例外。用于该实施例的样品是取自单个受试者的血浆样品,每个实验使用20 μ L样品。如方案A所述处理血浆样品以产生可扩增cfDNA汇集物,不同之处在于在方案A的步骤5,CG1和/或CG2缓冲液替代方案A中引用的主混合物和/或通用缓冲液。使可扩增cfDNA汇集物进行如方案A所述的PCR扩增,以产生cfDNA的可分析汇集物,不同之处在于,当在CG2缓冲液中使用SEQ ID NO:5的衔接子分子时,使用引物5'-ACTCACTATAGACCCTCAGCACCAC-3'(SEQ ID NO:6),而不是方案A中指定的引物。方案A中指定的酶混合物用于所有反应中。

[0513] 如上所述,使用Qubit 2.0荧光计以及dsDNA BR和HS测试试剂盒对经扩增的DNA的总产率进行定量。

[0514] 下面提供了每个反应的组分的终浓度,结果显示在表6中。

[0515] 测试1

[0516] 50mM乙酸钾,20mM Tris-乙酸盐(pH 7.9),10mM乙酸镁,1mM DTT,1mM ATP,40 μ M dNTP,200 μ g/ml BSA来自CG1;和50mM NaCl,25mM Tris-Cl(pH 7-8),10mM Mg₂Cl₂,2.5mM DTT和1mM ATP来自S缓冲液

[0517] 测试2

[0518] 2 μ M衔接子来自CG2;和50mM NaCl,25mM Tris-Cl(pH 7-8),10mM Mg₂Cl₂,2.5mM DTT和1mM ATP来自S缓冲液

[0519] 测试3

[0520] 50mM乙酸钾,20mM Tris-乙酸盐(pH 7.9),10mM乙酸镁,1mM DTT,1mM ATP,40 μ M dNTP,200 μ g/ml BSA来自CG1;和40 μ M dNTP和2 μ M衔接子来自L缓冲液

[0521] 测试4

[0522] 40 μ M dNTP来自L缓冲液和2 μ M衔接子来自CG2;注意当提供衔接子分子时,在该测试中省略了来自主混合物的衔接子分子

[0523] 测试5

[0524] 50mM乙酸钾,20mM Tris-乙酸盐(pH 7.9),10mM乙酸镁,1mM DTT,1mM ATP,40 μ M dNTP,200 μ g/ml BSA来自CG1;和2 μ M衔接子来自CG2

[0525] 方案A

[0526] 50mM NaCl,25mM Tris-Cl(pH 7-8),10mM Mg₂Cl₂,2.5mM DTT和1mM ATP来自S缓冲液;40 μ M dNTP和2 μ M衔接子来自L缓冲液

[0527] 测试1用作阴性对照(因为CG1和通用缓冲液都不含有产生经修饰的cfDNA分子所需的衔接子分子,所述经修饰的cfDNA分子为可扩增cfDNA汇集物需要)。测试2显示了dNTP的存在为有效生产可扩增cfDNA汇集物所需的经修饰的cfDNA所需。测试3显示了与方案A相比,CG1缓冲液替代通用缓冲液提高了经扩增的cfDNA的总产率。测试4显示了与方案A相比,用CG2缓冲液替代通用缓冲液提高了经扩增的cfDNA的总产率。测试5还显示了不需要另外的缓冲液组分来产生可接受量的经扩增的cfDNA。测试5显示了CG1和CG2缓冲液替代主混合物和通用缓冲液两者也提高了经扩增的cfDNA的总产率。

[0528] 结果显示在表15中。这些结果显示了本公开的方法可以用各种缓冲液组合物进行,并且如在测试4中所示不添加缓冲液组分,以产生cfDNA分子的可分析汇集物。

[0529]

表 15						
	方案 A	测试 1	测试 2	测试 3	测试 4	测试 5
95°C 4 分钟						
	主混合物	CG1	CG2	主混合物	主混合物	CG1
	通用缓冲液	通用缓冲液	通用缓冲液	CG1	CG2	CG2
95°C 2 分钟						
产率 (ng/μL)	82.3	不可检测	3.10	109	127	90

[0530] 实施例14-ISA酶混合物和缓冲液溶液的优化

[0531] 如在实施例12和13中所示,CGD方法可以使用多种酶混合物和缓冲液溶液以从样品中存在的cfDNA有效地提供可分析的cfDNA汇集物。本实施例说明了使用CG1和CG2缓冲液对本公开方法的效率(其效率基于以ng/μL计的经扩增的cfDNA的产率)进行的酶混合物的优化。

[0532] 在该实施例中,将方案A中使用的主混合物和通用缓冲液用CG1缓冲液和CG2缓冲液替代,并将实施例12的酶混合物用这种组合进行测试。CG1和CG2当用作主混合物和/或通用缓冲液的替代品时,以与按方案A替换的组分相同的体积添加。

[0533] 根据方案A进行CGD方法,或根据方案A,但除了下面指出的例外(对于酶混合物1至4)之外进行CGD方法。用于该实施例的样品是取自单个受试者的血浆样品,其中每个实验使用20μL样品。如方案A所述处理血浆样品以产生可扩增cfDNA汇集物,不同之处在于在方案A的步骤5,CG1和CG2缓冲液替代方案A中引用的主混合物和通用缓冲液,并且在步骤8所述的酶混合物1至5替代方案A的酶混合物。使可扩增cfDNA汇集物经受如方案A所述的PCR扩增以产生cfDNA的可分析汇集物,除了使用引物5'-ACTCACTATAGACCCTCAGCACCAC-3'(SEQ ID NO:6)而不是方案A中指定的引物。

[0534] 如上所述,使用Qubit 2.0荧光计连同dsDNA BR和HS测定试剂盒对经扩增的DNA的总产率进行定量。

[0535] 添加CG1缓冲液以提供反应中的终浓度:50mM乙酸钾、20mM三-乙酸盐,pH 7.9、10mM乙酸镁、1mM DTT、1mM ATP、40 μ M dNTP和200 μ g/ml BSA。

[0536] 添加CG2缓冲液以提供以下的反应中的终浓度:2 μ M的SEQ ID NO:5的衔接子分子(在无核酸酶水中)。

[0537] 结果显示在表16中。所有酶混合物产生了良好的结果。在该实施例中,酶混合物2和3提供了来自原始样品cfDNA输入的140ng/ μ L经扩增的cfDNA,而酶混合物1、混合物4和混合物5提供了分别来自原始样品cfDNA输入的124ng/ μ L、112ng/ μ L和99.4ng/ μ L经扩增的cfDNA。所有测试的酶混合物适用于本文所述的方法。

[0538] 这些结果与实施例12一致,并且显示了CGD方法需要5'-3'聚合酶活性、3'-5'外切核酸酶活性和DNA连接酶活性以从样品中存在的输入cfDNA有效产生cfDNA分子的可分析汇集物。多核苷酸激酶活性和尿嘧啶-DNA糖基化酶活性的添加也提高了cfDNA分子的可分析汇集物的产生效率。如表16所示,也可能存在相加活性而不显著抑制cfDNA分子的可分析汇集物的产生效率。

[0539]

	测试 1	测试 2	测试 3	测试 4	测试 5
	相同	相同	相同	相同	相同
	CG1	CG1	CG1	CG1	CG1
	CG2	CG2	CG2	CG2	CG2

[0540]

	相同	相同	相同	相同	相同
	酶混合物 1	酶混合物 2	酶混合物 3	酶混合物 4	酶混合物 5
产率(ng/μL)	124	140	140	112	99.4

[0541] 实施例15-在血浆中的cfDNA与经纯化的DNA之间的ISA的效率

[0542] 本实施例说明了对来自血浆样品的cfDNA和经纯化的DNA的ISA效率(其效率基于以ng/ μ L计经扩增的cfDNA或DNA的产率)。

[0543] 在该实施例中,根据方案A进行CGD方法,除了下面指出的例外(对于酶混合物1至5)。用于该实施例的样品是取自单个受试者的血浆样品,其中每个实验使用20 μ L样品。如方案A所述处理血浆样品以产生可扩增cfDNA汇集物,不同之处在于在方案A的步骤5,CG1和CG2缓冲液替代方案A中引用的主混合物和通用缓冲液,并且在步骤8所述的酶混合物1至5替代方案A的酶混合物。使可扩增cfDNA汇集物进行如方案A所述的PCR扩增以产生cfDNA的可分析汇集物,除了使用引物5'-ACTCACTATAGACCCTCAGCACCAC-3'(SEQ ID NO:6)而不是方案A中指定的引物。对于经纯化的DNA实验,以与PBS相等的体积使用10ng的输入DNA。

[0544] 如上所述,使用Qubit 2.0荧光计连同dsDNA BR和HS测定试剂盒对经扩增的DNA的总产率进行量化,并以ng/ μ L表示。

[0545] 结果显示在表17中,产率以ng/ μ L报告。所有酶混合物产生了良好的结果。在该实施例中,酶混合物3、混合物4和混合物5从原始样品cfDNA输入产生的经扩增的cfDNA的产率等于或大于用10ng经纯化的DNA获得的产率。由酶混合物1和混合物2产生的经扩增的cfDNA的产率以及方案A的产率也显示了良好的结果。所有测试的酶混合物适用于本文所述的方法。

[0546] 这些结果与之前的实施例一致,并证明本公开的方法在从生物样品扩增cfDNA方面的效率高且处于与经纯化的DNA用作样品输入时相同的范围内。

[0547]

表 17						
样品类型	方案 A	酶混合物 1	酶混合物 2	酶混合物 3	酶混合物 4	酶混合物 5

[0548]

DNA (10 ng 输入)	67.2	89.8	85.0	78.0	71.6	72.8
血浆纯度	82.3	82.2	70.4	97.1	105	96.4

[0549] 实施例16-ISA中所用试剂的稳定性

[0550] 为了评价制备含有进行CGD方法所需试剂的试剂盒(诸如预上样的96孔板)的潜力,将实施CGD方法所需的各种缓冲液和酶混合物预上样到96孔板中,并在-20 $^{\circ}$ C或4 $^{\circ}$ C下储存5个月。此外,还检查了将主混合物和酶组分(在通用缓冲液中)一起或单独地储存在96-孔板中的效果。比较了使用储存的试剂和现配试剂的6个样品的结果。

[0551] 在该实施例中,根据方案A进行CGD方法。该实施例的样品是取自受试者的血浆样品。如方案A所述处理血浆样品以产生cfDNA汇集物的可分析汇集物。使cfDNA的可分析汇集物进行如所述的NGS分析。如上所述使用Qubit 2.0荧光计量化cfDNA的总产率。

[0552] 结果显示在表18中(经扩增的cfDNA产率以ng/ μ L显示)。如所示,在-20 $^{\circ}$ C或4 $^{\circ}$ C下储存进行CGD方法所需的试剂对CGD方法的性能没有显著影响。此外,主混合物和酶组分一起(称为组合)的储存比分别储存各自(称为单独的)多少更有效。

[0553]

样品 ID	标准制剂	预上样且在-20	预上样且在-20	预上样且在 4	预上样且在 4
		储存组合	储存单独	储存组合	储存单独
1	73.2	86.4	72.6	93.4	64.2
2	70	75.6	68.6	69.6	64.6
3	92.4	120	109	118	101
4	57	61	57	62.6	57.4
5	100	84.4	65.6	72.8	60.4
6	90.6	72	73	76.6	62

[0554] 此外,使由使用储存在-20℃和4℃下的试剂的CGD方法制备的可分析cfDNA汇集物进行在2%凝胶上的琼脂糖凝胶电泳,并使用溴化乙锭可视化(图10)。在图10中,泳道1-10显示了来自10个样品的结果,其中泳道1-5显示了使用储存在-20℃下的试剂制备的cfDNA的结果且泳道6-10显示了使用储存在4℃下的试剂制备的cfDNA的结果。在所有情况下,cfDNA显示出强烈的染色强度和正常的尺寸分布。这结果进一步证实了进行CGD方法所用试剂的稳定性。

[0555] 这些结果共同证实了进行CGD方法所用试剂的稳定性,并允许制造用于进行CGD方法的试剂盒。

[0556] 实施例17-样品中的cfDNA的定量

[0557] 本实施例说明样品中cfDNA浓度的定量。在该实施例中,根据方案A进行CGD方法。用于该实施例的样品是取自受试者的血浆样品。如方案A所述处理血浆样品以产生cfDNA的可分析汇集物。为了使用经纯化的DNA制备标准曲线,浓度为0、0.001、0.005、0.01、0.025、0.05、0.1、0.25、0.5和1ng/μL的经纯化的DNA的样品10μL体积,并按方案A经受CGD方法。如上所述使用Qubit 2.0荧光计定量经扩增的cfDNA或纯化的DNA的总产率。

[0558] 图11显示了使用0、0.001、0.005、0.01、0.025、0.05、0.1、0.25、0.5和1ng/μL浓度的经纯化的DNA作为CGD过程中的输入在18个循环的扩增下建立的标准曲线的线性。通过从原始cfDNA样品输入确定经扩增的cfDNA的产率(以ng/μL计),可通过参考使用经纯化的DNA产生的标准曲线确定原始样品中cfDNA的浓度。表20显示了最初存在于两个临床样品中的cfDNA浓度的测定结果。使用CGD方法从两个临床样品确定cfDNA浓度(以ng/μL计)。从cfDNA的输出产率中,由图11显示的标准曲线确定样品中的原始cfDNA浓度。

[0559]

	cfDNA 产 率 (ng/ μ L)	样品中的原始 cfDNA 浓度 (ng/ μ L)
样品 1	0.424	0.0126
样品 2	0.302	0.0083

[0560] 该实施例显示了CGD方法可用于确定临床样品中的原始cfDNA浓度,从而允许快速且准确地确定受试者中的cfDNA浓度,并允许在各种临床环境中诊断性使用cfDNA浓度。

[0561] 实施例18-汇集cfDNA的多种可分析汇集物以用于分析

[0562] 本实施例说明了在分析之前汇集cfDNA分子的多种可分析汇集物的用途。如上所述,在某些实施例中,使用1 μ L至10 μ L的cfDNA的可分析汇集物(来自总体积20 μ L;大约1-2ng)以产生用于NGS分析(例如,通过Ion Torrent NGS)的测序文库。在某些情况下,此类取样可能会导致NGS测序应用中的统一性变化。在该实施例中,用于产生NGS的测序文库的cfDNA输入增加到约20ng的来自产生的可分析汇集物的cfDNA。为了完成这个目标,修改如方案A所述的CGD方法。首先,改变CGD方法以使用于产生cfDNA分子的可分析汇集物的扩增循环从25个循环减少到18个循环,以降低可分析汇集物中cfDNA的总产率。其次,不是从cfDNA的单一可分析汇集物中取得cfDNA输入来进行分析,而是从单个样品产生多种可分析汇集物,并将其合并(即,汇集),并从cfDNA的合并的可分析汇集物取得cfDNA输入。如讨论,NGS分析中使用的cfDNA的量增加到约20ng。NGS覆盖度和NGS统一性使用从使用25个循环扩增产生(用于NGS分析)的cfDNA的单一可分析汇集物取出的cfDNA样品,对比使用18个循环的扩增产生(用于NGS分析)的cfDNA的四种单独的可分析汇集物取出的cfDNA样品进行比较。

[0563] 在该实施例中,根据方案A进行CGD方法。用于该实施例的样品是取自受试者的血浆样品。如方案A所述处理血浆样品以产生可分析的cfDNA汇集物。使cfDNA的可分析汇集物进行如所述的NGS分析。对于改善的CGD方法(命名为CGD2),使用18个循环的扩增产生cfDNA的可分析汇集物,并且用于NGS分析的cfDNA样品取自cfDNA的四种单独可分析汇集物的合并汇集物。为了清晰,为了比较CGD方法(被称为CGD1),使用25个循环的扩增产生cfDNA的可分析汇集物,并且从cfDNA的单一可分析汇集物取出用于NGS分析的cfDNA样品。

[0564] 结果显示在表20中,报告了NGS覆盖度、NGS统一性和使用cfDNA的合并可分析汇集物的NGS统一性的百分比提高。如下所示,合并cfDNA的可分析汇集物一致地增加了NGS一致性。此外,样品14显示了当通过Ion Torrent NGS分析单一可分析的cfDNA汇集物和合并的可分析的cfDNA汇集物时,CGD方法的再现性。

表 20				
	方法	NGS 覆盖度	NGS 统一性	统一性提高%
1	CGD1	7596	53.6	23.3
	CGD2	11809	66.1	
2	CGD1	7444	30.4	113.8
	CGD2	12690	65.0	
3	CGD1	6617	7.0	157.1
	CGD2	7492	18.0	
4	CGD1	9888	4.7	87.9
	CGD2	6195	9.3	
5	CGD1	6242	6.4	243.8
	CGD2	8634	22.0	
6	CGD1	9358	11.9	171.1
	CGD2	8958	11.9	
		7388	17.3	
7	CGD1	8274	7.1	46.5
	CGD2	6685	11.6	
		6909	9.2	
8	CGD1	6498	9.2	184.8
	CGD2	9315	26.2	
9	CGD1	10957	4.8	177.1
	CGD2	1373	13.3	
10	CGD1	7157	5.8	108.6
	CGD2	8502	12.1	

[0565]

11	CGD1	8648	8.2	168.3
	CGD2	6040	22.0	
12	CGD1	1069	4.6	234.8
	CGD2	8062	15.4	
13	CGD1	1023	9.6	47.9
	CGD2	6387	14.2	
[0566] 14	CGD1	6193	61.4	16.2
		10372	67.9	
		9983	71.1	
		10843	71.3	
		8947	70.9	
		9393	68.5	
	CGD2	10041	78.9	
		12314	80.3	

[0567] 实施例19-使用CGD方法对RNA进行ISA

[0568] 本公开的方法也可用于cfRNA的ISA。在cfRNA的ISA方法中,使用标准方法将样品中的cfRNA转化为双链DNA。然后以与样品中的cfDNA相同的方式处理双链DNA。在方法部分提供了使用本公开的方法的示例性方案。

[0569] 在该实施例中,根据方案A进行CGD方法。用于该实施例的样品是取自单个受试者的血浆样品。如方案A中所述用将cfRNA转化成cDNA的另外的DNA酶I和逆转录步骤,处理血浆样品以产生可分析的cDNA汇集物。使cDNA的可分析汇集物进行如所述的NGS分析。

[0570] 图12显示了扩增曲线图,说明由cfRNA产生的cDNA成功进行ISA。NGS测序对933674个读段作图,其中98.91%的读数在靶标上。平均碱基覆盖深度为4.072,并且碱基覆盖的统一性为59.56%。该实施例说明了CGD方法在cfRNA中的成功应用。

序列表

<110> 环基因治疗诊断有限责任公司, 叶辰雄

<120> 通过原位扩增制备细胞游离核酸分子的方法

<130> 210058-301001

<150> 62/204,268

<151> 2015-08-12

<160> 10

<170> PatentIn版本 3.5

<210> 1

<211> 17

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 衔接子序列 1

<400> 1

attaaccctc actaaag 17

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 衔接子序列 2

<400> 2

taatacgact cactataggg 20

<210> 3

<211> 17

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工引物 1

<400> 3

attaaccctc actaaag 17

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工引物 2

<400> 4
 taatacgact cactataggg 20
 <210> 5
 <211> 67
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 衔接子 3
 <220>
 <221> 修饰_碱基
 <222> (1) .. (1)
 <220>
 <221> 修饰_碱基
 <222> (1) .. (1)
 <223> 在序列的5'端处的胸腺嘧啶含有游离OH,而不是游离磷酸根
 <220>
 <221> 混杂_信号
 <222> (15) .. (19)
 <223> 对于每次发生 n 是尿苷
 <220>
 <221> 混杂_特征
 <222> (15) .. (19)
 <223> n 是 a, c, g, 或 t
 <400> 5
 tgtgttggt gtggnnnna ttaatacga ctactatag accctcagca ccaccacacc 60
 caacaca 67
 <210> 6
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列 3
 <400> 6
 actcactata gaccctcage accac 25
 <210> 7
 <211> 68
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>

- <223> 衔接子 4
<220>
<221> 混杂_结构
<222> (15) .. (19)
<223> 对于全部发生 n 是尿苷
<220>
<221> 混杂_特征
<222> (15) .. (19)
<223> n 是 a, c, g, 或 t
<220>
<221> 混杂_特征
<222> (68) .. (68)
<223> n 是 a, c, g, 或 t
<220>
<221> 混杂_特征
<222> (69) .. (69)
<223> n 是任意氨基酸
<400> 7
tgtgttgggt gtggnnnna ttaatacga ctactatag accctcagca ccaccacacc 60
caacacan 68
<210> 8
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工引物 4
<400> 8
tgagtgatat ctgggagtcg aggtg 25
<210> 9
<211> 68
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 衔接子 5
<220>
<221> 混杂_特征
<222> (15) .. (19)
<223> 对于每次发生 n 是尿苷
<220>

<221> 混杂_特征

<222> (15)..(19)

<223> n 是 a, c, g, 或 t

<400> 9

tgtgttgggt gtggnnnna ttaatacga ctactatag acctcagca ccaccacacc 60
caacacaa 68

<210> 10

<211> 67

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 衔接子 6

<220>

<221> 混杂_特征

<222> (15)..(19)

<223> 对于每次发生 n 是尿苷

<220>

<221> 混杂_特征

<222> (15)..(19)

<223> n 是 a, c, g, 或 t

<400> 10

tgtgttgggt gtggnnnna ttaatacga ctactatag acctcagca ccaccacacc 60
caacaca 67

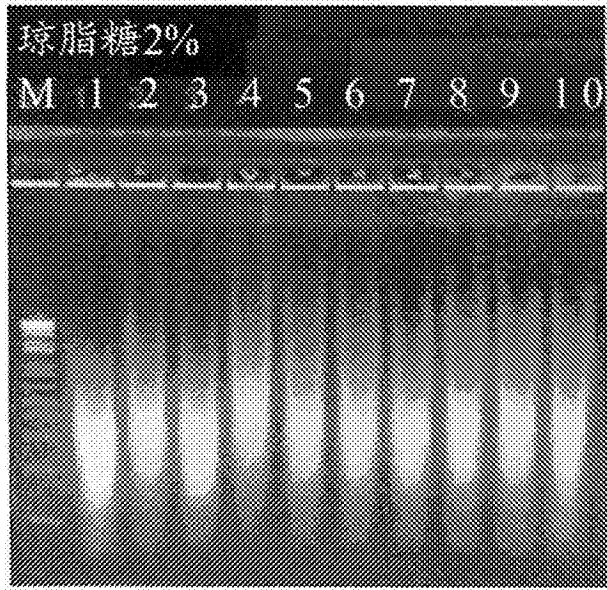


图1A

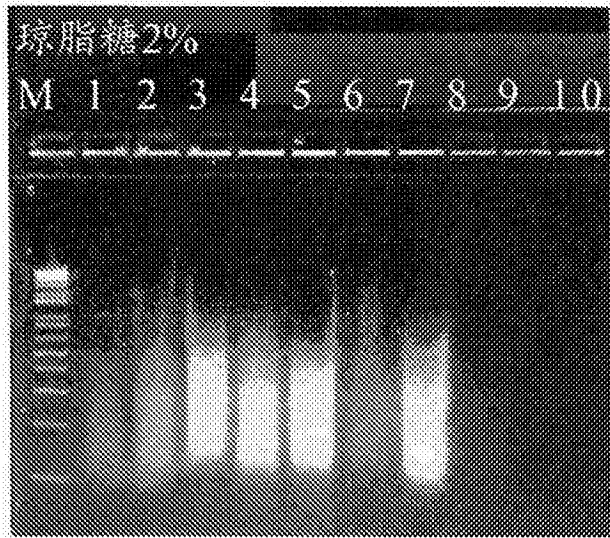


图1B

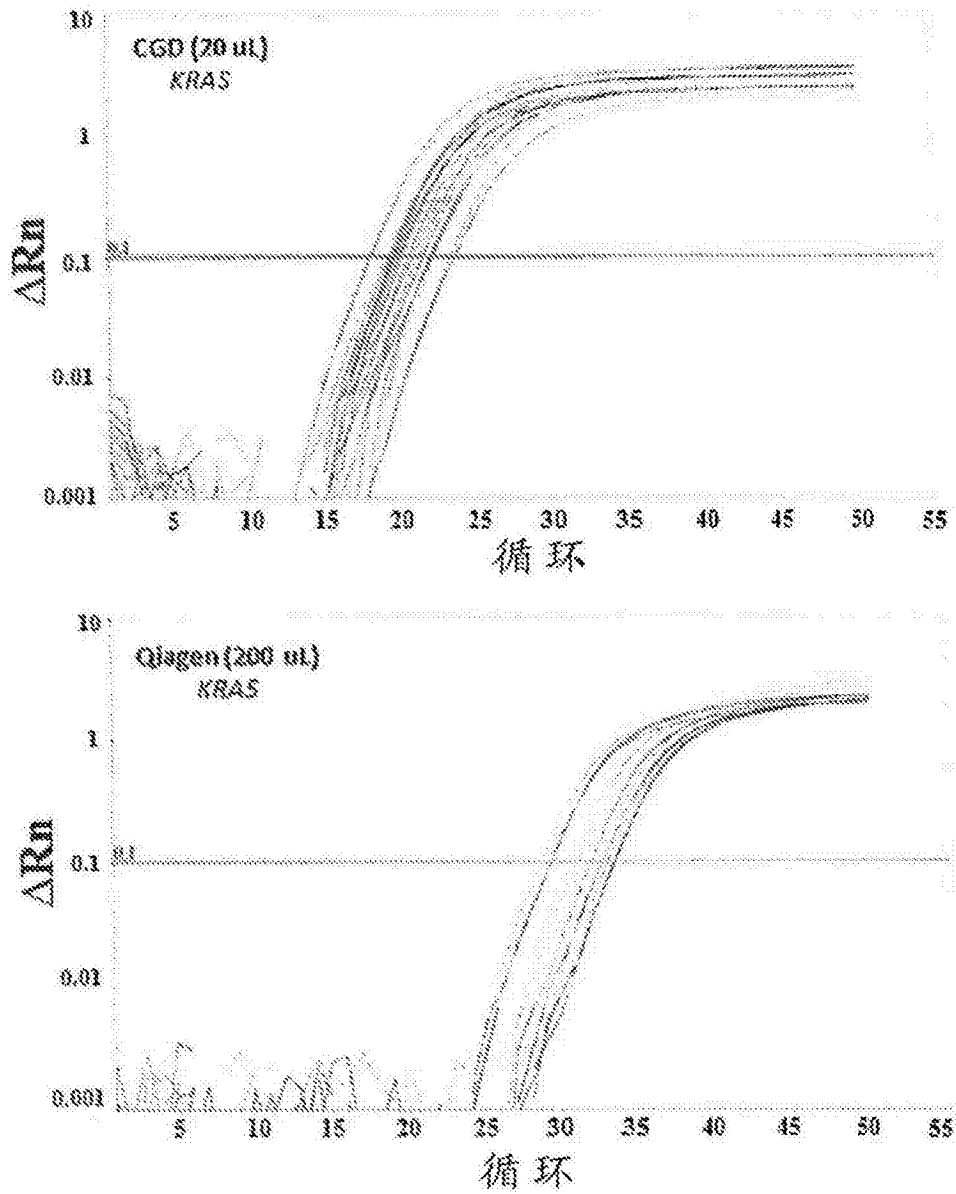


图2

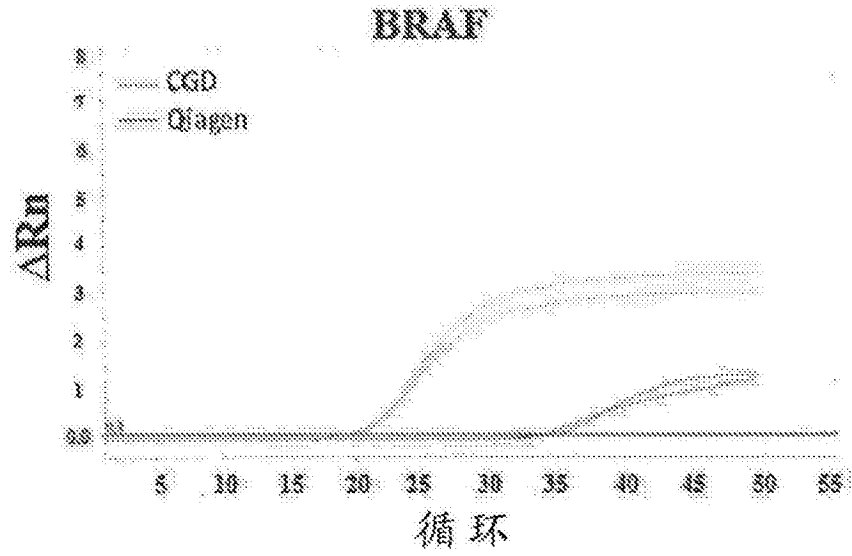


图3A

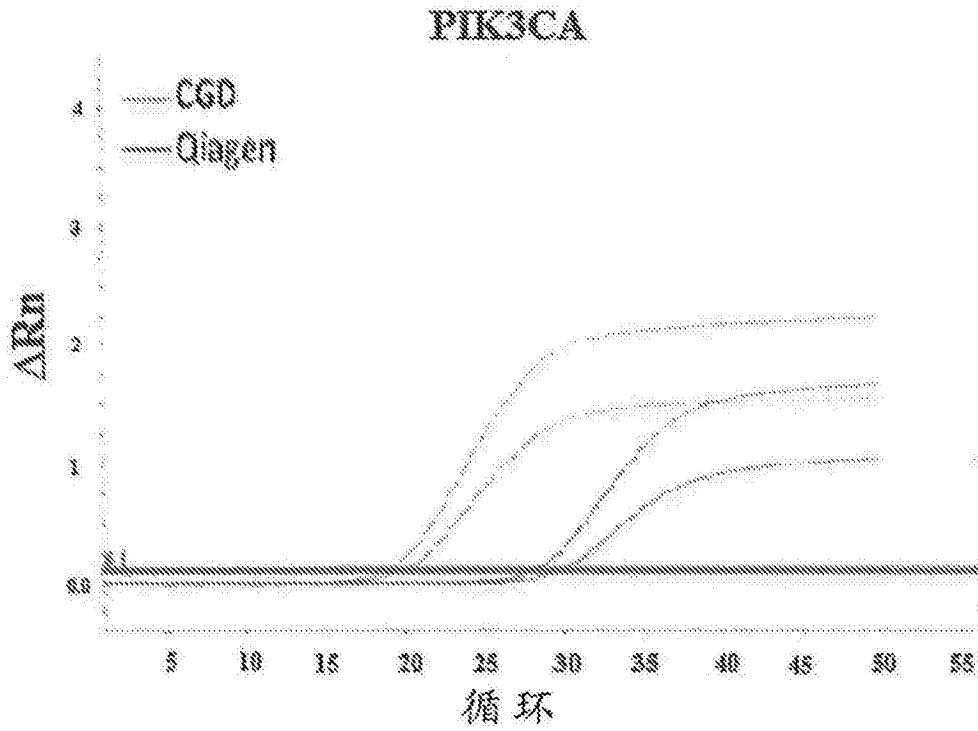


图3B

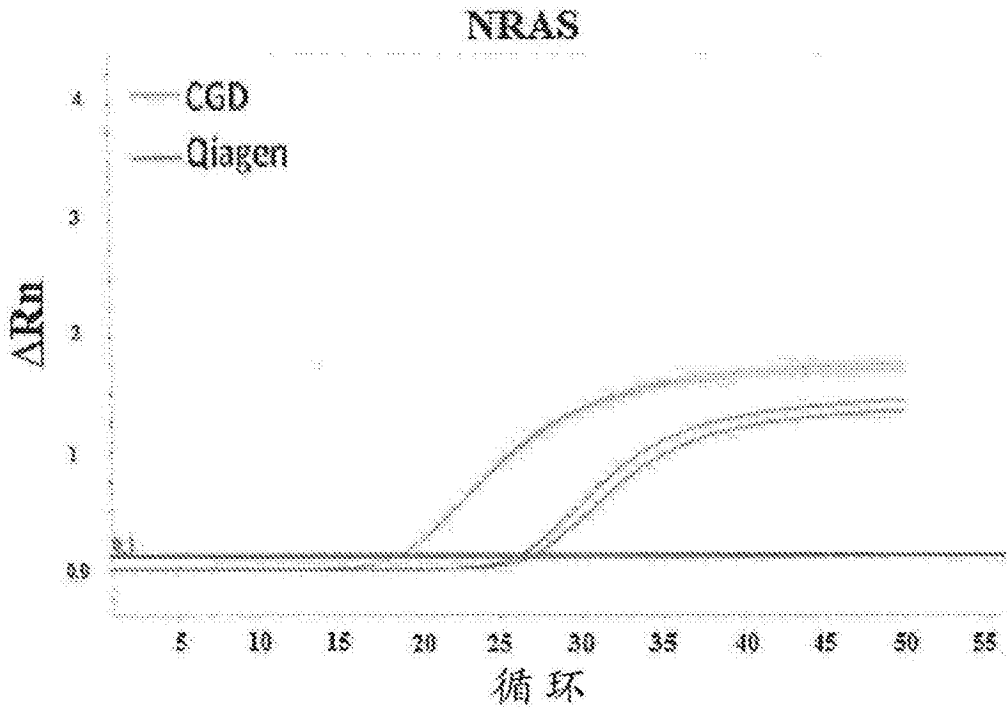


图3C

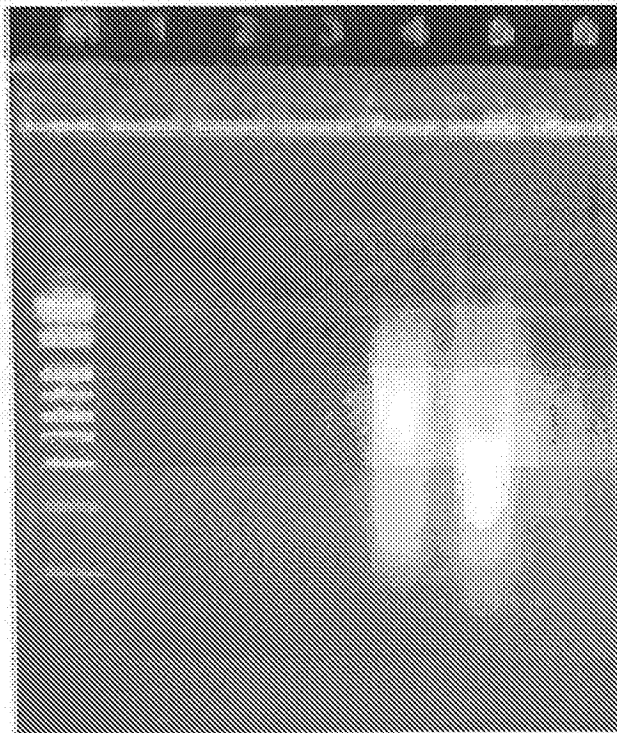


图4

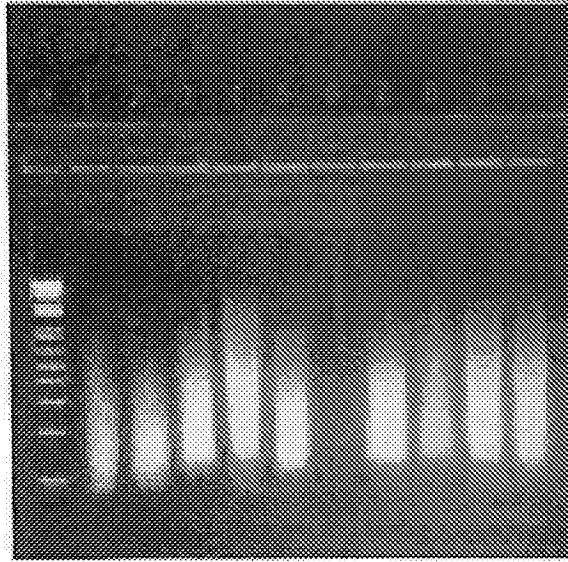


图5

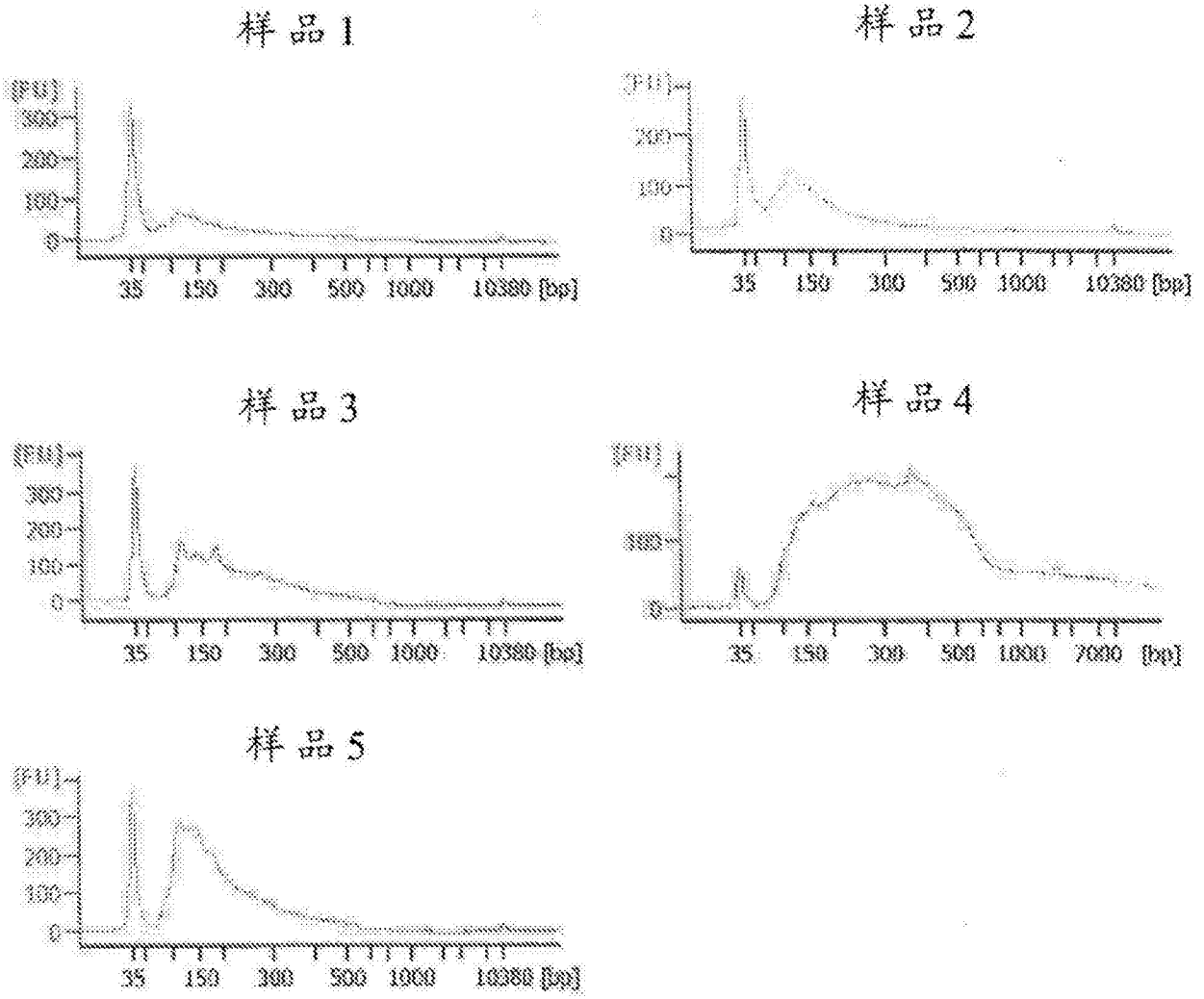


图6

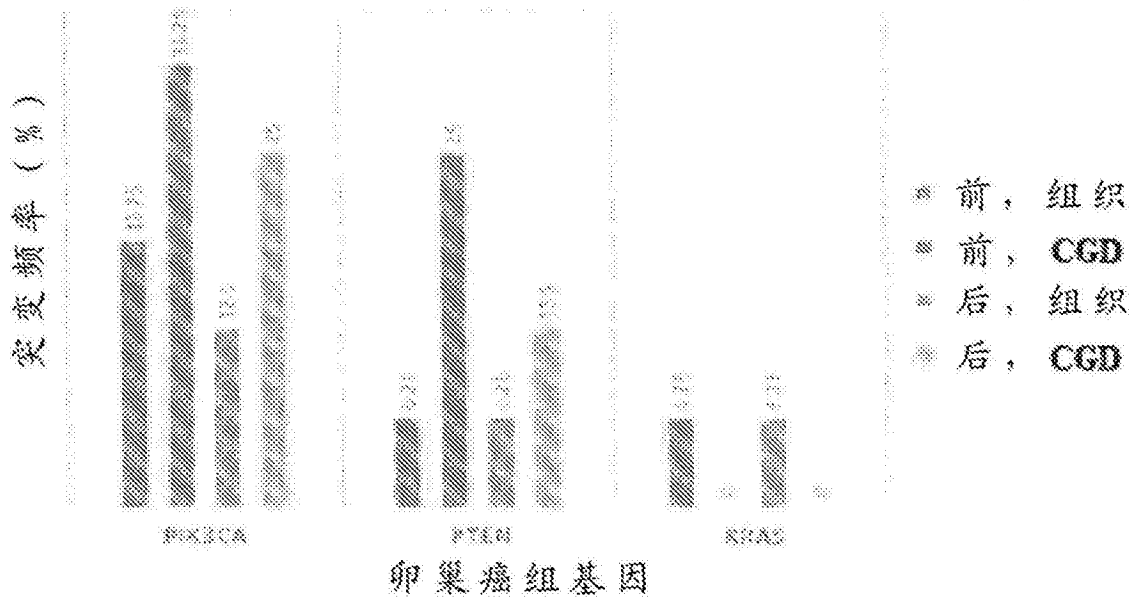


图7

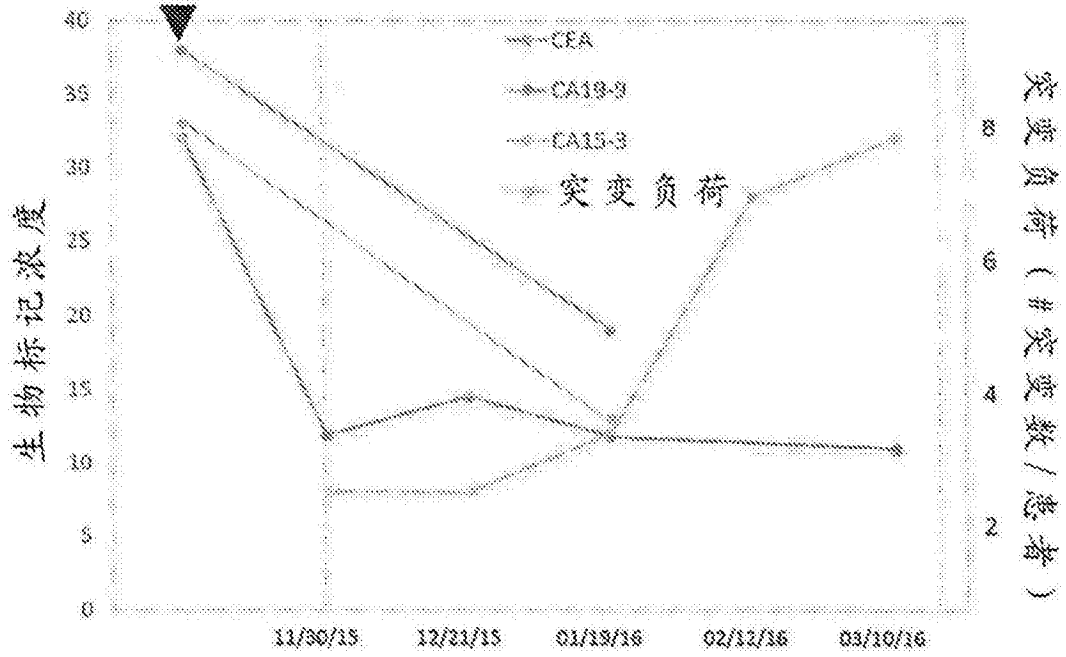


图8A

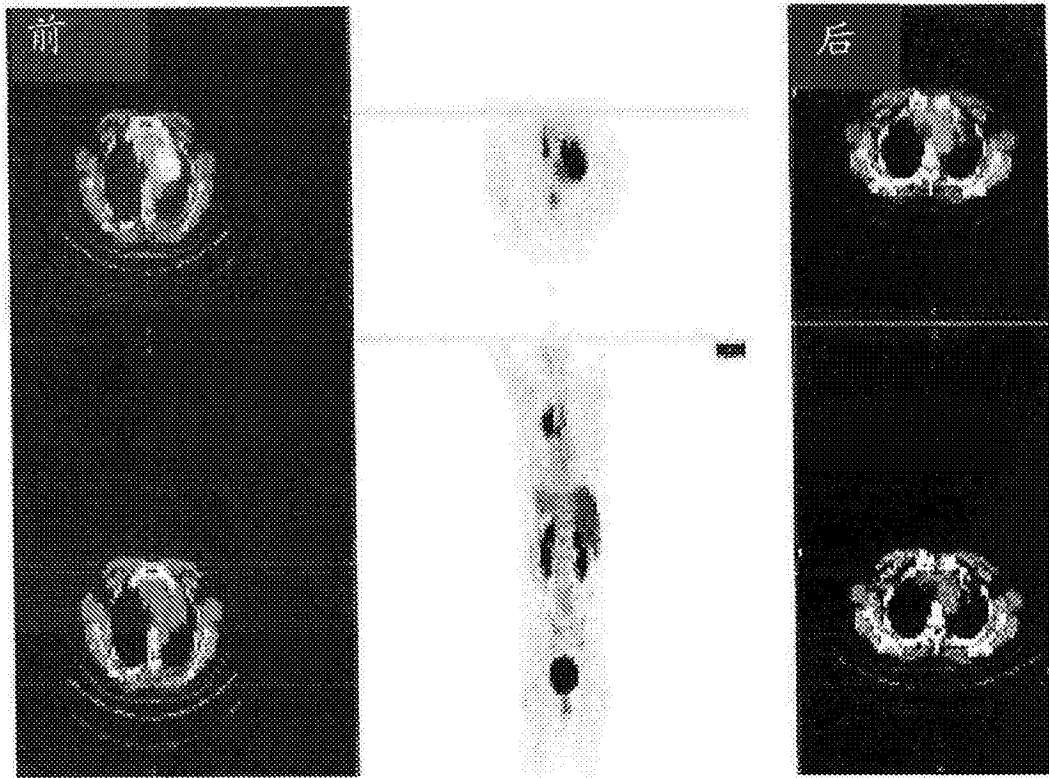


图8B

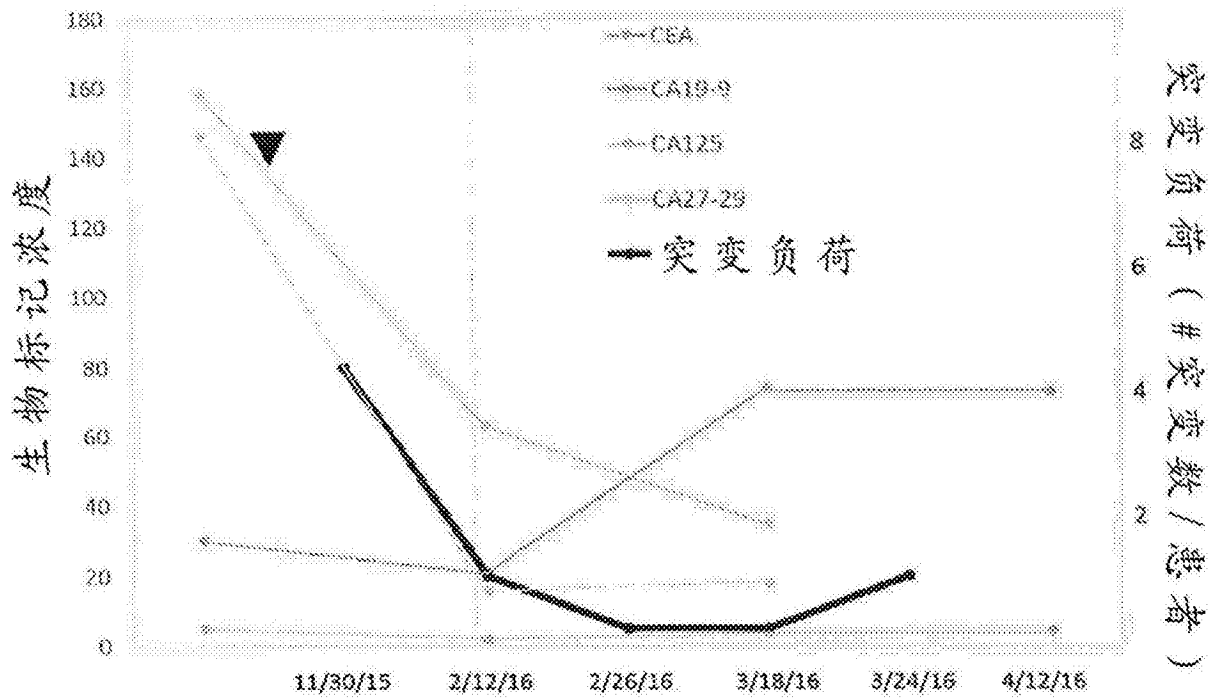


图9A

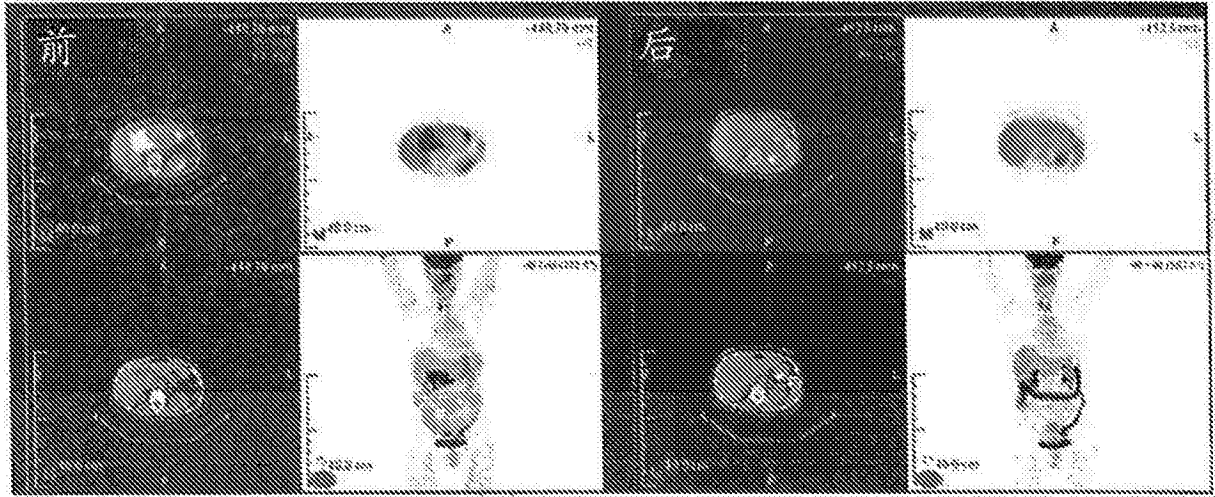


图9B

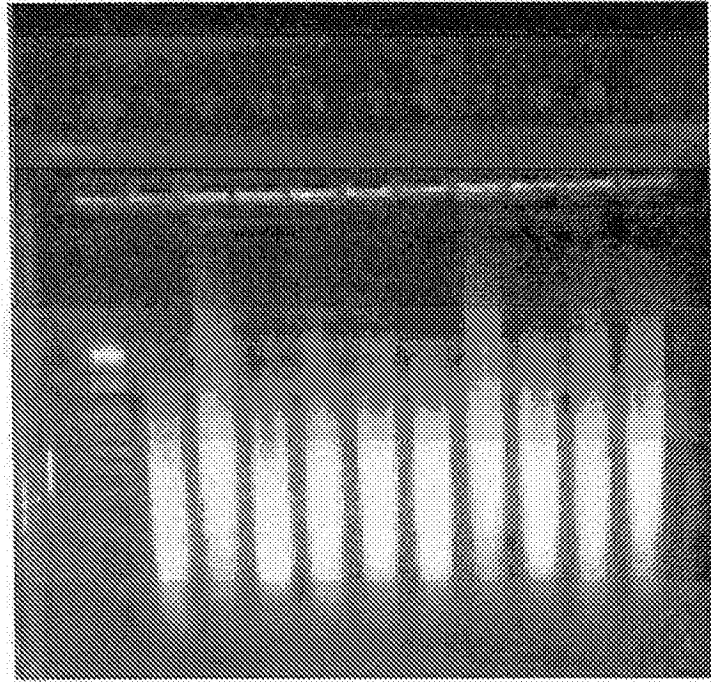


图10

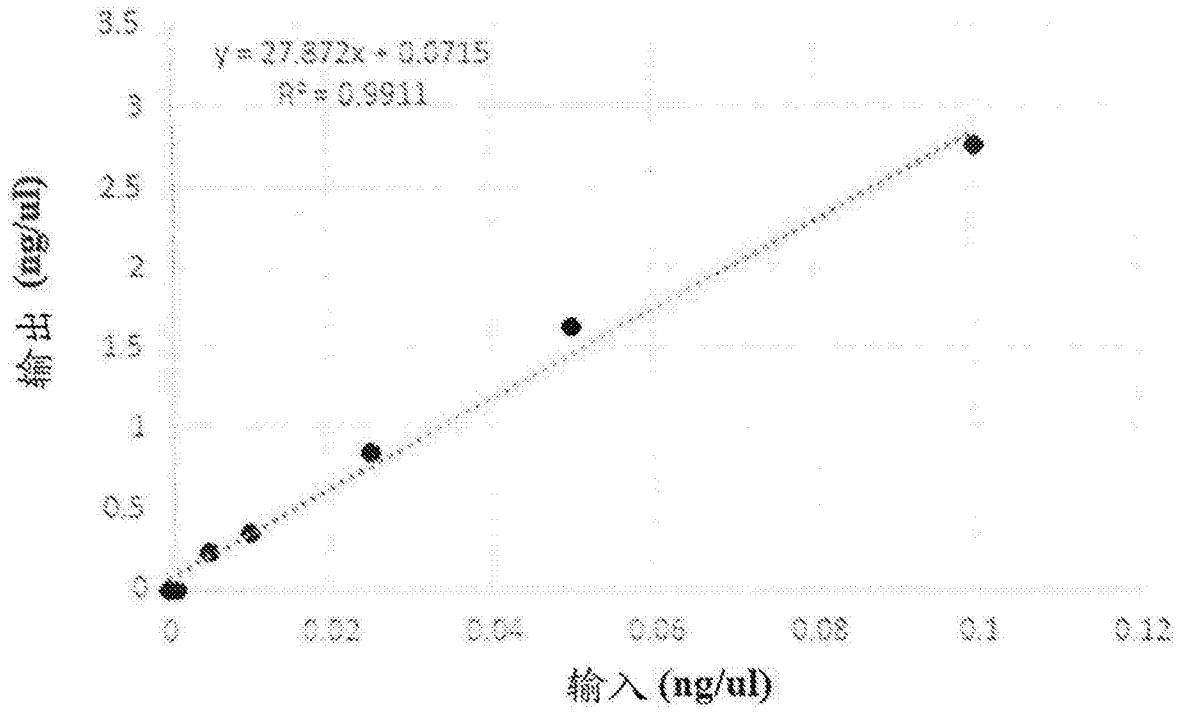


图11

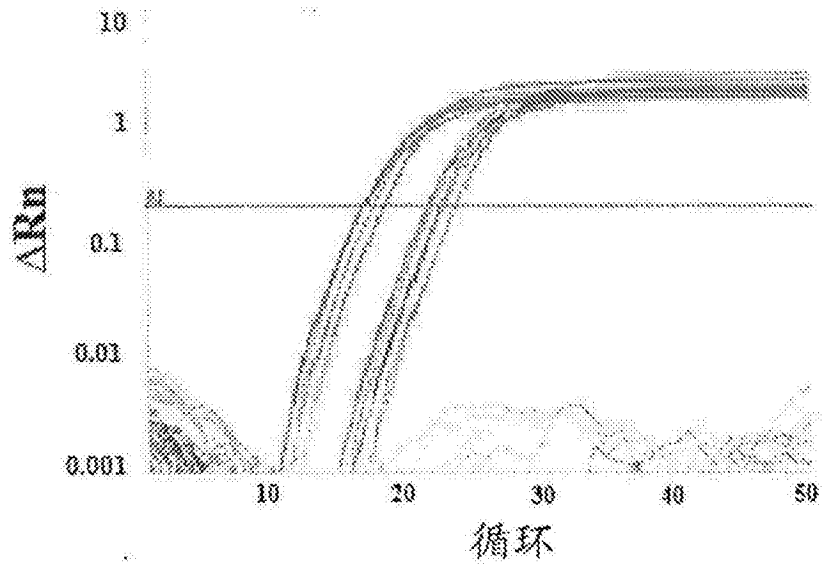


图12