



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107405540 A

(43)申请公布日 2017. 11. 28

(21)申请号 201580070732.0

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

(22)申请日 2015.10.23

代理人 权陆军 周齐宏

(30)优先权数据

62/068443 2014.10.24 US

(51)Int.Cl.

B01D 15/34(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2017.06.23

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2015/057179 2015.10.23

(87)PCT国际申请的公布数据

W02016/065295 EN 2016.04.28

(71)申请人 雅培分子公司

地址 美国伊利诺伊州

(72)发明人 D.H.金 G.冈林 H.A.马布尔

M.W.埃舒

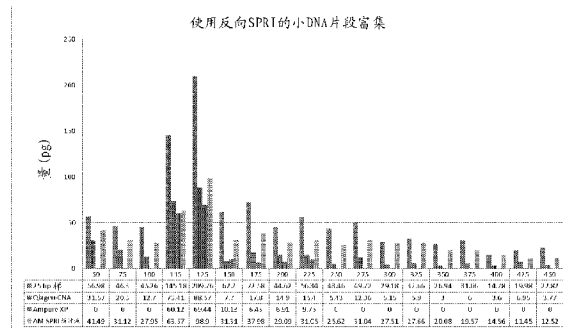
权利要求书4页 说明书33页 附图6页

(54)发明名称

小核酸的富集

(57)摘要

本文提供涉及处理核酸样品的技术,特别但并非排他地涉及用于针对小核酸诸如小循环无细胞DNA富集样品的方法。凋亡胎儿滋养细胞在妊娠期间将cffDNA直接脱落入胎盘中的母体血液中。据估计,在2.5升母体血浆(典型雌性的大约总血液体积为5升)中,cffDNA以每分钟约20,000的速率释放到母体血浆中,并且在循环母体血浆中到妊娠的第10周或第11周通过一些测试检测到,并且在一些研究中早达第5周(参见,例如Holmberg等人(2013),PLoS One 8(8): e73068),或者通过一些测试,早达妊娠的18日(参见例如Guibert等人(2003)Hum Reprod 18: 1733-6)。母体血浆中的cffDNA生物发生和通过母体血浆核酸酶的cffDNA降解之间存在准稳态关系。



1. 用于针对小核酸富集样品的方法,所述方法包括:

- 1) 提供输入样品;和
- 2) 通过使用以下中的一种或多种处理所述输入样品来产生包含小核酸的输出样品:
 - a) 优先从二氧化硅洗脱或洗涤小核酸;
 - b) 优先在二氧化硅上保留大核酸;
 - c) 通过甲基化DNA免疫沉淀用抗体包被的固体支持物富集小核酸;
 - d) 通过尺寸排阻富集小核酸;
 - e) 通过阻力变化系数尺寸分析来富集小核酸;
 - f) 通过固相可逆固定尺寸分析富集小核酸;
 - g) 通过基于电泳的尺寸分析来富集小核酸;或
 - h) 通过亲和层析富集小核酸,

其中用(a)至(h)中的一种或多种处理所述输入样品,产生包含相比所述输入样品中的小核酸的浓度,具有更高浓度的小核酸的输出样品。

2. 用于针对小核酸富集样品的方法,所述方法包括:

- 1) 提供输入样品;和
- 2) 通过使用a)和b)中的一种或两种与c)至h)中的一种或多种的组合处理所述输入样品,产生包含小核酸的输出样品:
 - a) 优先从二氧化硅洗脱或洗涤小核酸;和/或
 - b) 优先在二氧化硅上保留大核酸;
 - c) 通过甲基化DNA免疫沉淀用抗体包被的固体支持物富集小核酸;
 - d) 通过尺寸排阻富集小核酸;
 - e) 通过阻力变化系数尺寸分析来富集小核酸;
 - f) 通过固相可逆固定尺寸分析富集小核酸;和/或
 - g) 通过基于电泳的尺寸分析来富集小核酸;和/或
 - h) 通过亲和层析富集小核酸,

其中用(a)和/或(b)中的一种或两种与(c)、(d)、(e)、(f)、(g)和/或(h)中的一种或多种的组合处理所述输入样品,产生包含相比输入样品中的小核酸的浓度,具有更高浓度的小核酸的输出样品。

3. 根据权利要求1或2中一项所述的方法,其中优先从二氧化硅洗脱或洗涤小核酸包括:

- i) 在5至25%乙醇、5至25%甲醇、5至25%乙腈、5至25% DMSO、1至25%甲酰胺、大于1M NaCl、高浓度的离液剂中洗脱;
 - ii) 在低于16°C的温度下或在等于或低于硅表面的表面硅烷醇基团的pKa的pH下洗脱;
 - iii) 在乙醇缓冲液中洗涤;
 - iv) 在包含Tween-20、乙醇和MgCl₂的缓冲液中洗涤;
 - v) 通过连续的前相电洗脱、连续的反相电洗脱或振荡相电洗脱来电洗脱小核酸;和/或
 - vi) 使用离子交换柱。

4. 根据权利要求1或2中一项所述的方法,其中优先在二氧化硅上保留大核酸包括:
 - i) 用聚合物涂层、体积排阻剂或吸收剂处理二氧化硅;
 - ii) 用胺结合表面掺杂剂或多磷酸盐结合表面掺杂剂掺杂二氧化硅膜;和/或
 - iii) 用紫外线辐射、通过形成胸苷二聚体、通过使用补骨脂素或用化学交联剂交联大核酸。
5. 根据权利要求1或2中一项所述的方法,其中优先在二氧化硅上保留大核酸包括用以下处理二氧化硅:包含19:1至29:1交联比的0.5至2%丙烯酰胺/双丙烯酰胺,0.01至0.5%琼脂糖,0.01至1.0%平均分子量为1000至10,000的聚乙二醇,1至10%硫酸葡聚糖,1至10%聚蔗糖(ficoll),1至10%山梨糖醇,1至10%己醛糖聚合物,1至10%聚乙烯醇PVA,1至10%多胺、尼龙、聚酯或聚苯乙烯。
6. 根据权利要求1或2中一项所述的方法,其中优先在二氧化硅上保留大核酸包括用福尔马林或DTT-可切割的、硫醇不稳定的双丙烯酰胺/丙烯酰胺混合物交联大核酸。
7. 根据权利要求1或2中一项所述的方法,其中富集甲基化DNA包括:
 - i) 将来自基于二氧化硅的分离方法的洗脱物与用识别甲基化DNA的抗体官能化的顺磁珠温育;
 - ii) 使用过量的5-甲基胞嘧啶、使用热变性或使用抗体的失活来从顺磁珠洗脱小DNA;和
 - iii) 纯化或扩增小DNA。
8. 根据权利要求1或2中一项所述的方法,其中通过尺寸排阻的富集包括使用超滤、尺寸排阻层析法或透析。
9. 根据权利要求1或2中一项所述的方法,其中通过固相可逆固定化尺寸分析的富集包括使用拥挤剂。
10. 根据权利要求1或2中一项所述的方法,其中通过固相可逆固定化尺寸分析的富集包括使用羧化珠粒。
11. 根据权利要求1或2中一项所述的方法,其中通过固相可逆固定化尺寸分析的富集包括使用磁珠。
12. 根据权利要求1或2中一项所述的方法,其中通过固相可逆固定化尺寸分析的富集包括使用PEG 8000。
13. 根据权利要求1或2中一项所述的方法,其中通过固相可逆固定化尺寸分析的富集包括使用浓度为4至5%重量/体积的PEG 8000。
14. 根据权利要求1或2中一项所述的方法,其包括使用浓度为小于5.1%重量/体积或小于4.8%重量/体积的PEG。
15. 根据权利要求1或2中一项所述的方法,其包括使用PEG 8000和/或异丙醇。
16. 根据权利要求1或2中一项所述的方法,其中通过电泳的富集包括使用琼脂糖凝胶电泳、丙烯酰胺凝胶电泳或毛细管电泳。
17. 根据权利要求1或2中一项所述的方法,其中优先从二氧化硅洗涤或洗脱小核酸包括在包含10% Tween-20、15%乙醇和20 mM MgCl₂的缓冲液中以约 0.4:0.5结合缓冲液体积:样品体积比率洗涤。
18. 根据权利要求1或2中一项所述的方法,其中所述亲和层析法是使用带正电基底的

亲和层析法。

19. 根据权利要求1或2中一项所述的方法,其中所述亲和层析法是使用氧化铁、羟基磷灰石、聚阳离子、螯合金属离子或通过磁场捕获的磁性颗粒的亲和层析法。

20. 根据权利要求1或2中一项所述的方法,其中小核酸具有长度截止值1000、900、800、700、600、500、400、300、275、250、225、200、175、150、125、100、75或50个碱基对、碱基或核苷酸的长度。

21. 根据权利要求1或2中一项所述的方法,其中所述输出样品中的小于长度截止值的尺寸的分布以及所述输入样品中的小于长度截止值的尺寸的分布是相同的。

22. 权利要求3的方法,其中所述离液剂选自盐、丁醇、乙醇、盐酸胍、硫氰酸胍、高氯酸锂、乙酸锂、氯化镁、苯酚、丙醇、十二烷基硫酸钠、硫脲和尿素。

23. 根据权利要求1或2中一项所述的方法,其中同时使用(a)至(h)中的两种或更多种。

24. 根据权利要求1或2中一项所述的方法,其中相继使用(a)至(h)中的两种或更多种。

25. 根据权利要求1或2中一项所述的方法,其中同时使用(a)至(h)中的两种或更多种且相继使用(a)至(h)中的两种或更多种。

26. 根据权利要求1或2中一项所述的方法,其还包括测试所述输出样品中的核酸。

27. 根据权利要求26所述的方法,其中测试所述核酸包括测试遗传异常、染色体畸变或非整倍体。

28. 根据权利要求26所述的方法,其中测试所述核酸包括测试与癌症或肿瘤状态相关的生物标记物。

29. 根据权利要求26所述的方法,其中测试所述核酸包括测试与感染病原体相关的核酸。

30. 根据权利要求26所述的方法,其中所述测试包括使用核酸扩增,通过测序的数字计数,杂交,染色或质谱。

31. 权利要求1或2中任一项所述的方法,其中所述核酸包含胎儿DNA,并且所述受试者是孕妇。

32. 权利要求26的方法,其中所述测试包括确定与正常胎儿的对照值相比胎儿核酸的分数增加或减少。

33. 根据权利要求31所述的方法,其中所述孕妇在妊娠的第10至第11周。

34. 根据权利要求31所述的方法,其中所述孕妇在妊娠的第1至第10周。

35. 通过根据权利要求1或2中一项所述的方法产生的针对小核酸富集的输出样品。

36. 根据权利要求35所述的输出样品,其中所述输出样品中的小核酸的量相对于所述血液样品中的小核酸的量的比率为超过2、超过5、超过10、超过50或超过100。

37. 根据权利要求35所述的输出样品,其中所述输出样品中超过5%的核酸是小核酸。

38. 根据权利要求35所述的输出样品,其中所述输出样品中超过10%的核酸是小核酸。

39. 根据权利要求35所述的输出样品,其中所述输出样品中超过15%的核酸是小核酸。

40. 根据权利要求35所述的输出样品,其中所述输出样品中超过20%的核酸是小核酸。

41. 根据权利要求1或2中一项所述的方法,其中富集甲基化DNA包括使用包含或连接至特异性结合甲基化核酸的实体的固体支持物。

42. 根据权利要求1或2中一项所述的方法,其中富集甲基化DNA包括使用包含特异性结

合甲基化核酸的抗体的亲和柱。

43. 根据权利要求1或2中一项所述的方法,其中所述小核酸是DNA。

44. 根据权利要求1或2中一项所述的方法,其中所述小核酸是RNA。

45. 用于检测非整倍体胎儿的方法,所述方法包括:

a) 提供通过根据权利要求1或2中一项所述的方法产生的针对小核酸富集的输出样品;

b) 定量来自所述受试者的输出样品中的染色体片段的量;和

c) 计算以下中的一种或多种:

i) 来自所述输出样品的染色体片段的量与来自整倍体对照的染色体片段的第二量的比率;或

ii) 来自所述输出样品的染色体片段的量与来自所述输出样品的整倍体对照染色体片段的第二量的比率,

其中当所述比率大于或小于1.00时,所述受试者被指示为孕育非整倍体胎儿。

46. 权利要求45的方法,其中定量所述输出样品中染色体片段的量相比于定量从来自受试者的血液样品制备的未富集样品中染色体片段的量在更少时间内、用更少量的核酸、使用更少的扩增反应或使用更少的测序反应来进行。

47. 用于产生包含相对于输入样品浓度增加的小核酸的输出样品的方法,所述方法包括:

a) 提供包含核酸的输入样品;

b) 将所述输入样品与羧化顺磁珠和PEG温育以产生包含大核酸的结合级分和包含小核酸的上清液部分;和

c) 移去上清液级分以产生包含小核酸的输出样品。

48. 权利要求47的方法,其中所述PEG是PEG 8000。

49. 权利要求47的方法,其中所述PEG 8000具有4%至5%重量/体积的浓度。

50. 权利要求47的方法,其中所述PEG 8000具有约4.8%的浓度,且所述输出样品包含尺寸小于或等于约1000bp、碱基或nt的小核酸。

51. 权利要求47的方法,其中所述PEG 8000具有约5.1%的浓度,且所述输出样品包含尺寸小于或等于约600bp、碱基或nt的小核酸。

52. 根据权利要求1或2中一项所述的方法用于遗传测试、肿瘤学测试、感染性疾病测试或胎儿测试的用途。

53. 通过根据权利要求1或2中一项所述的方法产生的针对小核酸富集的输出样品用于遗传测试、肿瘤学测试、感染性疾病测试或胎儿测试的用途。

54. 权利要求1或2的方法,其中所述输入样品是血液样品。

55. 权利要求1或2的方法,其还包括从受试者获取血液样品。

小核酸的富集

[0001] 本申请要求2014年10月24日提交的美国临时专利申请序列号62/698,379的优先权,所述申请全文通过引用并入本文。

发明领域

[0002] 本文提供涉及处理核酸样品的技术,特别但并非排他地涉及用于富集小核酸诸如小循环无细胞DNA的样品的方法,其可用于例如产前测试、肿瘤学测试和感染性疾病应用中。

[0003] 背景

产前诊断或产前筛查是指在胎儿或胚胎出生前在其中测试疾病或病况。目的是检测出生缺陷诸如神经管缺陷、唐氏综合征、染色体异常、遗传疾病和其它病况诸如脊柱裂、腭裂、泰萨病、镰状细胞性贫血、地中海贫血、囊性纤维化、肌营养不良和脆性X综合症。筛查也可用于产前性别鉴别。常见的测试程序包括羊膜穿刺术、超声检查,包括颈背透明层超声、血清标记物测试或遗传筛选。在一些情况下,施用所述测试以早期诊断高危怀孕,使得可以在婴儿可以接受适当的护理的三级保健医院安排分娩。

[0004] 诊断性产前测试可以是侵入性或非侵入性的方法。侵入性方法涉及将探针或针插入子宫,例如,羊膜穿刺术,其可以从约14周妊娠进行,通常长达约20周,和绒毛膜绒毛取样,其可以在更早(妊娠9.5和12.5周之间)进行,但胎儿的风险可能略高。绒毛膜绒毛样品和羊膜穿刺术分别具有约1/100例怀孕和1/200例怀孕的相关流产风险。在美国和其它国家已经实施了非侵入性产前诊断的风险较小的程序。这些技术包括通过超声检查和母体血清筛查检查妇女的子宫。例如,基于检测母体血液中存在的胎儿DNA的选择三体的血液测试已经可用(例如,在美国的唐氏综合症的测试和在中国的唐氏综合征和爱德华综合症的测试)。在1997年首次报道了母体血浆中胎儿DNA的存在,其为仅通过母体血液样品的分析提供了非侵入性产前诊断的可能性(Lo等人(1997), *Lancet* 350:485-487)。

[0005] 随着技术进展,测试将从当前更危险的测试转变为较低危险的非侵入性测试。领先的医疗机构(例如,美国妇产科医师学院(American College of Obstetricians and Gynecologists)、美国医学遗传学和基因组学院(American College of Medical Genetics and Genomics)以及孕产妇和胎儿医学学院(Society of Maternal and Fetal Medicine))目前支持高危妊娠的非侵入性产前筛查。此外,几个公司(例如Sequenom、Verinata、Ariosa、Natera)正在提供非整倍体检测服务(例如,检测染色体21、18、13、X和Y的三体性),其基于根据临床实验室改进修改(CLIA)程序开发的实验室开发的测试(LDT)。此外,几个支付者(例如BCBS, Kaiser)在面对日益增加的消费者需求下(由预期母亲选择现代非侵入性测试替代方案的压倒性愿望所驱动),提供三体检测的报销。

[0006] 一种特别有利的非侵入性测试涉及无细胞胎儿DNA(cffDNA)的分析。在特定应用中,cffDNA的非侵入性产前非整倍性测试是基于检测与正常整倍体胎儿相比,在非整倍体(例如,三体性)的情况下表现的小分数过量的DNA进行测试。在这些测试中,三体检测代表区分混合物中3个拷贝的染色体与2个拷贝的染色体的问题,在所述混合物中约90%的样品

是整倍体(例如二体的)。

[0007] 然而,在实践中,循环cffDNA构成母体血浆中无细胞总DNA的少部分(约3%至6%(参见例如Lo等人(1998) *Am J Hum Genet* 62:768)或至多达10%至20%(根据一些量度,(参见例如Lun等人(2008) *Clin Chem* 54:1664))。一般而言,部分循环cffDNA浓度在妊娠早期平均为约10%(参见例如Chiu等人(2011) *BMJ* 342:c7401)。这种限制对非侵入性产前检测策略构成相当大的挑战,所述非侵入性产前检测策略依赖于用于检测胎儿非整倍体状态的直接染色体计数方法(诸如数字PCR、下一代测序或质谱)。

[0008] 例如,假设母体血浆中10%胎儿DNA含量,与正常胎儿相比,胎儿三体(例如,涉及染色体13、18、21、X、Y或另一染色体)中DNA的分数增加预测为1.05(即,对于三体,21个总拷贝,相比之下,对于整倍体,20个拷贝)。DNA含量的这种微妙差异是通过超高密度统计计数方法进行测量的,所述方法区分了分别在正常整倍体和三体怀孕情况中观察到的1和1.05率值。

[0009] 在常规临床环境中,母体血浆的胎儿DNA含量通常小于10%,导致三体性和整倍体之间甚至更小的染色体差异(例如约1.02至1.03的比率)。将cffDNA级分富集数倍至适度水平(例如,约5倍至10倍富集,导致约25%至40%胎儿DNA含量)的能力分别降低了NGS和数字PCR应用的覆盖范围和/或分区要求(例如,减少了与技术相关的“数字不动产(digital real estate)”)。胎儿DNA富集也有利于通过基于质谱的方法的胎儿非整倍体检测。因此,需要技术来富集母体血液样品的cffDNA,以改善产前非侵入性诊断测试。

[0010] 概述

凋亡胎儿滋养细胞在妊娠期间将cffDNA直接脱落入胎盘中的母体血液中。据估计,在2.5升母体血浆(典型雌性的大约总血液体积为5升)中,cffDNA以每分钟约20,000的速率释放到母体血浆中,并且在循环母体血浆中到妊娠的第10周或第11周通过一些测试检测到,并且在一些研究中早达第5周(参见,例如Holmberg等人(2013), *PLoS One* 8(8):e73068),或者通过一些测试,早达妊娠的18日(参见例如Guibert等人(2003) *Hum Reprod* 18:1733-6)。母体血浆中的cffDNA生物发生和通过母体血浆核酸酶的cffDNA降解之间存在准稳态关系。作为这些竞争过程的结果,据估计cffDNA在母体血浆中具有约16分钟的半衰期,其对应于在任何给定时间的总母体循环中约 7×10^5 个拷贝的cffDNA或每毫升母体血液约300个拷贝。因此,任何特定的cffDNA分子在其递送至母体血浆的约24小时内从母体血浆清除至不可检测的水平。作为结果,cffDNA在儿童出生的约24小时内从母体血浆清除,因此与一次怀孕相关。此外,与成年母体DNA相比,通常预期胎儿DNA在妊娠发育程序期间被广泛和活跃地转录,其表明其可能比母体DNA更可及(例如,结构上去卷绕和去凝集)和较不与组蛋白复合。净效果是cffDNA通过其较小物理尺寸分布可与无细胞循环母体DNA区分开(参见例如,Chan等人(2004) *Clin Chem* 50: 88-92; Lo等人(2010) *Sci Transl Med* 2)。

[0011] 通常,cffDNA主要以约100bp、碱基或nt至200bp、碱基或nt的尺寸存在。约99%的胎儿DNA具有短于约350bp、碱基或nt的长度(参见例如Chan等人(2004) *Clinical Chemistry* 50(1):88),并且许多最近的研究表明胎儿DNA通常趋于小于约300bp、碱基或nt的尺寸,且母体DNA大于300bp、碱基或nt的尺寸(参见例如Gahan(2013) *Int J Womens Health* 5:177-186)。本文提供的技术利用DNA尺寸分布的差异来针对胎儿DNA富集获得自母体血液的样品。

[0012] 因此,本文提供用于从较高分子量母体无细胞循环DNA(例如,包含大于约200bp、碱基或nt)的背景中,选择性分离和富集小细胞循环胎儿核酸(例如DNA或RNA)(例如包含小于约100bp、碱基或nt至200bp、碱基或nt等,诸如在约10至11周妊娠的孕妇的母体血浆中存在的cffDNA)的技术。

[0013] 通常,该技术提供用于从较高分子量核酸的复杂分布选择性富集低分子量核酸(例如DNA或RNA)的方法。因此,在一些实施方案中,该技术可用于检测、定量和表征不是源自胎儿的循环无细胞DNA,例如在男性中,在非怀孕女性中,或在孕妇中,用于除了用于胎儿的产前检测的用途,例如评价成年男性或女性的医疗状态。该技术可用于在受试者中的癌症、肝脏疾病、心血管(例如心脏)疾病、肾脏疾病、炎症疾病和肺部疾病的诊断、评价、治疗和监测的循环无细胞核酸(例如DNA或RNA)的非侵入性分析。例如,该技术可用于检测、定量和表征生物标记物(例如,该技术可用于检测、定量和表征甲基化的Septin 9(ms9))用于结肠直肠癌检测和筛选,例如如通过亚硫酸氢盐PCR测定法提供(例如,通过Abbott Molecular mS9亚硫酸氢盐PCR测定法商业提供,例如,在m2000rt实时PCR平台上)。

[0014] 此外,该技术可用于从其它生物样品例如尿液、脑脊液(CSF)和腹膜液选择性分离和富集小无细胞循环胎儿核酸(例如DNA或RNA)片段。

[0015] 该技术可用于促进直接源自(例如在妊娠5周后、例如在妊娠10至11周时获得的)母体血浆样品的无细胞循环胎儿核酸的非侵入性产前分析。胎儿核酸富集降低用于非整倍体分析和检测的常规染色体计数方法施加的统计计数负担,所述方法例如PCR(例如数字PCR)、质谱和/或下一代测序(例如高通量鸟枪法测序,下一代测序)。也就是说,针对胎儿核酸的母体血浆样品的富集提供这样的方法,其中比现有方法中评估较少核酸 - 例如,计数更少的总胎儿和母体染色体、等位基因、标记物和/或核酸分子以检测整倍体(1.00的比率)或非整倍体比(不是1的比率,例如大于1.00的比率)。具体地,非整倍体检测的方法包括定量母体和胎儿等位基因、染色体、核酸分子和/或标记物,和计算胎儿与母体等位基因、染色体、核酸分子和/或标记物的比率,以区分3拷贝的胎儿染色体或染色体片段与2个拷贝的胎儿染色体或染色体片段。在其中约90%或更多的样品是来自母体的整倍体核酸(例如,二体)和10%为胎儿核酸的混合物中,胎儿三体中的核酸(例如,DNA)与正常胎儿相比的分数增加预期为1.05(即,对于三体,21个拷贝,相比之下,对于整倍体,20个拷贝)。因此,需要计数大量的等位基因、染色体、核酸分子和/或标记物,以提供1.05的值与1.00的值的统计学显著的区分。随着样品中胎儿核酸的分数降低(例如,至小于10%),指示非整倍体状态的比率降低例如至1.04、1.03、1.02等,其为需要非常敏感的检测和甚至更广泛的列举以提供与1.00的值的统计学显著的区分的值。

[0016] 相比之下,在包含大于10%胎儿核酸的富集样品(例如,如由本技术提供)中,指示非整倍体的比率越来越大于1.05(例如,1.06、1.07、1.08、1.09、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5)。因此,列举较少的等位基因、染色体、核酸分子和/或标记物以提供该值为1.00(指示整倍体)或大于1.00(指示非整倍体)的统计学显著指征。此外,额外的列举提供了为1.00的值和大于1.00的值之间的区分的更大置信度。因此,该技术提供基于相对于现有技术更少的总胎儿和母体染色体、等位基因、标记物和/或核酸分子的列举来区分非整倍体比率与整倍体比率的方法。

[0017] 减少的统计计数负担转化为更短的有效测定周转时间(例如,改进数字PCR和下一

代测序应用),增加的灵敏度,通过患者样品的增加复用的增加的通量以及扩展的测定覆盖范围,例如涵盖或包括额外染色体或亚染色体靶标和/或标记物。对于基于下一代测序的方法,通过最小化列举精确呼叫(call)所需的序列标签(例如,序列读取)的数量来改进测定非有效率(例如,无呼叫率或无效率)。

[0018] 因此,该技术的一些实施方案提供了用于产生与输入样品相比包含增加浓度的小核酸(例如,DNA(例如,cffDNA)和/或RNA)的输出样品的方法,所述方法包括以下步骤中的一种或多种:(a)优先从二氧化硅洗脱小核酸片段;(b)优先在二氧化硅上保留大核酸片段;(c)基于相对于其它核酸的甲基化差异富集小核酸(例如,通过甲基化DNA免疫沉淀(例如,由Cyprus Genetics提供的MeDIP)(例如,用由磁场捕获的抗体包被的颗粒)(例如顺磁或磁性颗粒)或捕获在固体支持物上(例如,在亲和柱(例如,抗体包被的吸附柱,例如如由Molzyme提供)上)或其它固体支持物诸如例如微量滴定板、珠粒、载玻片、纳米结构等));(d)通过尺寸排阻富集小核酸;(e)通过同步(或非同步)阻力变化系数尺寸分析(SCODA,例如,如由Boreal Genomics提供)富集小核酸;(f)通过固相可逆固定尺寸分析(例如使用羧化磁珠)富集小核酸;(g)通过基于电泳的尺寸分析来富集小核酸;(h)通过亲和层析使用氧化铁富集小核酸;i)通过亲和层析,例如核酸对带正电荷的基底(例如,聚阳离子、金属离子(例如螯合金属离子,例如包含多个螯合金属离子的组合物),包含羟基磷灰石的组合物,或羟基磷灰石包被的磁性颗粒)的亲合力,富集小核酸;或(j)通过同时使用阴离子交换和尺寸排阻(例如,使用包含阴离子交换官能团(例如胺,例如弱胺)的微粒)和产生靶(例如,小)核酸可及的微米和亚微米尺寸孔的表面不规则物)来富集小核酸,其中用这些技术中的一种或多种处理输入样品产生包含比输入样品中的小核酸的浓度更高浓度的小核酸的输出样品。

[0019] 一些相关实施方案提供用于评估包含胎儿核酸(例如DNA和/或RNA)的血液样品的方法,所述方法包括1)从孕妇获得血液样品;2)使用以下中的一种或多种从血液样品产生输出样品:a)优先从二氧化硅洗脱小核酸;b)优先在二氧化硅上保留大核酸;c)通过甲基化DNA免疫沉淀或用由磁场捕获的抗体包被的颗粒(例如顺磁性或磁性颗粒)捕获来富集小核酸;d)通过尺寸排阻富集小核酸;e)通过阻力变化系数尺寸分析来富集小核酸;f)通过固相可逆固定尺寸分析富集小核酸;g)通过基于电泳的尺寸分析来富集小核酸;(h)通过亲和层析使用氧化铁富集小核酸;i)通过亲和层析,例如核酸对带正电荷的基底(例如,聚阳离子、金属离子(例如螯合金属离子,例如包含多个螯合金属离子的组合物),包含羟基磷灰石的组合物,或羟基磷灰石包被的磁性颗粒)的亲合力,富集小核酸;或通过同时使用阴离子交换和尺寸排阻(例如,使用包含阴离子交换官能团(例如胺,例如弱胺)的微粒)和产生靶(例如,小)核酸可及的微米和亚微米尺寸孔的表面不规则物)来富集小核酸,和3)针对遗传异常测试小核酸,其中用这些技术中的一种或多种处理血液样品产生包含比血液样品中的小核酸的浓度更高浓度的小核酸的输出样品。

[0020] 在一些实施方案中,方法还包括最小化和/或消除母体细胞的裂解以最小化和/或消除样品中的母体核酸。例如,最小化样品储存的时间,最小化处理时间,加入试剂以稳定细胞(例如,防止裂解(例如,防止母体白细胞的裂解)),使用细胞稳定管,加入防腐剂,去除母体细胞,最小化样品的物理运动(例如处理、搅拌、运输),最小化温度变化,和包封母体细胞。

[0021] 在一些实施方案中,这些方法通过使用机器人和其它装置(例如,可编程和/或计算机控制的装置)而自动化。在一些实施方案中,该方法可用于微流体装置中。

[0022] 该技术的一些实施方案提供了用于产生相对于输入样品,包含增加浓度的小核酸的输出样品的方法,所述方法包括将 A) 优先从二氧化硅洗脱小核酸片段和/或优先在二氧化硅上保留大核酸片段中的一种或两种,与以下中的一种或多种能够组合:B) 通过甲基化DNA免疫沉淀或用由磁场捕获的抗体包被的颗粒(例如顺磁性或磁性颗粒)或亲和柱捕获来富集;通过尺寸排阻富集;通过阻力变化系数尺寸分析富集;通过固相可逆固定尺寸分析富集;通过基于电泳的尺寸分析富集;和/或通过组合的阴离子交换和尺寸排阻富集,其中用一种或多种基于二氧化硅的技术与一种或多种富集技术组合处理输入样品,以产生包含具有比输入样品中的小核酸的浓度更高浓度的小核酸的输出样品。

[0023] 在一些实施方案中,优先从二氧化硅洗脱小核酸包括在5至25%乙醇、5至25%甲醇、5至25%乙腈、5至25% DMSO、1至25%甲酰胺、大于1M NaCl、高浓度的离液盐中洗脱;在低于16°C的温度下洗脱或在等于或低于硅表面的表面硅烷醇基团的pKa的pH下洗脱;通过连续的前场电洗脱、连续的反场电洗脱或振荡场电洗脱来电洗脱小核酸;和/或使用离子交换柱。在一些实施方案中,优先在二氧化硅上保留大核酸包括用聚合物涂层、体积排阻剂或吸收剂处理二氧化硅,用胺结合表面掺杂剂或多磷酸盐结合表面掺杂剂掺杂二氧化硅膜;和/或用紫外线辐射、通过形成胸苷二聚体、通过使用补骨脂素或用化学交联剂(例如,福尔马林,烷化剂(例如,1,3-双(2-氯乙基)-1-亚硝基脲(BCNU,卡莫司汀)、氮芥、顺铂、亚硝酸、醛类(例如,丙二醛、丙烯醛、巴豆醛)、氯乙基化试剂、亚硝基脲类、三氮烯类、烷基磺酸盐类、环氧化物类、二环氧丁烷、嗜癌菌素、阿维霉素B、顺式二氨基二氯铂(II)、沙拉霉素、luzopeptins、isochrysohermidin、吡咯并苯并二氮杂草试剂、环磷酰胺、N, N, N', N', N'-六甲基蜜胺、吡咯里西啶生物碱类、葱环类、丝裂霉素C、氮丙啶基苯醌类、biselezin)交联大核酸。在一些实施方案中,优先在二氧化硅上保留大核酸包括用以下处理二氧化硅:包含19:1至29:1交联比的0.5至2%丙烯酰胺/双丙烯酰胺,0.01至0.5%琼脂糖,0.01至1.0%平均分子量为1000至10,000的聚乙二醇,1至10%硫酸葡聚糖,1至10%聚蔗糖(ficoll),1至10%山梨糖醇,1至10%己醛糖聚合物,1至10%聚乙烯醇,1至10%多胺、尼龙、聚酯或聚苯乙烯。在一些实施方案中,优先在二氧化硅上保留大核酸包括用交联剂(例如,福尔马林,烷化剂(例如,1,3-双(2-氯乙基)-1-亚硝基脲(BCNU,卡莫司汀)、氮芥、顺铂、亚硝酸、醛类(例如,丙二醛、丙烯醛、巴豆醛)、氯乙基化试剂、亚硝基脲类、三氮烯类、烷基磺酸盐类、环氧化物类、二环氧丁烷、嗜癌菌素、阿维霉素B、顺式二氨基二氯铂(II)、沙拉霉素、luzopeptins、isochrysohermidin、吡咯并苯并二氮杂草试剂、环磷酰胺、N, N, N', N', N'-六甲基蜜胺、吡咯里西啶生物碱类、葱环类、丝裂霉素C、氮丙啶基苯醌类、biselezin)或DTT-可切割的、硫醇不稳定的双丙烯酰胺/丙烯酰胺混合物交联大核酸。

[0024] 在一些实施方案中,基于相对于其它DNA具有不同甲基化状态来富集小DNA。在一些实施方案中,基于甲基化状态的富集包括使用相对于非甲基化DNA对甲基化DNA特异性的试剂(例如,识别甲基化DNA的抗体,例如对甲基-胞嘧啶特异性的抗体或对CpG二核苷酸中(例如CpG岛中)的甲基-胞嘧啶特异性的抗体)。在一些实施方案中,基于甲基化状态的富集包括使用固体支持物,其包含(例如连接至)相对于非甲基化DNA对甲基化DNA特异性的试剂(例如,识别甲基化DNA的抗体,例如对甲基-胞嘧啶特异性的抗体或对CpG二核苷酸中(例如

CpG岛中)的甲基-胞嘧啶特异性的抗体)。在一些实施方案中,所述固体支持物是亲和柱(例如,在一些实施方案中,基于甲基化状态的富集包括使用亲和柱,其包含(例如连接至)相对于非甲基化DNA对甲基化DNA特异性的试剂(例如,识别甲基化DNA的抗体,例如对甲基-胞嘧啶特异性的抗体或对CpG二核苷酸中(例如CpG岛中)的甲基-胞嘧啶特异性的抗体))。

[0025] 在一些实施方案中,基于甲基化状态的富集包括使用甲基化DNA免疫沉淀(MeDIP),例如,使用抗体包被的固体支持物(例如,由磁场捕获的抗体包被的颗粒(例如,抗体包被的顺磁性颗粒或抗体包被的磁性颗粒))以及包括以下的方法:将来自基于二氧化硅的分离方法的洗脱物与固体支持物(例如,由磁场捕获的抗体包被的颗粒(例如,抗体包被的顺磁性颗粒或抗体包被的磁性颗粒))温育,所述固体支持物用识别甲基化DNA的抗体官能化;使用过量5-甲基胞嘧啶、使用热变性或使用抗体的失活从固体支持物(例如,抗体包被的顺磁性颗粒或抗体包被的磁性颗粒)洗脱小DNA;和/或纯化或扩增小DNA。

[0026] 在一些实施方案中,通过尺寸排阻的富集包括使用超滤、尺寸排阻层析法、使用具有不规则表面的珠粒或透析。在一些实施方案中,通过固相可逆固定化尺寸分析的富集包括使用拥挤剂。在一些实施方案中,方法包括使用浓度为小于5.1%重量/体积或小于4.8%重量/体积的PEG。在一些实施方案中,方法包括使用PEG 8000。在一些实施方案中,方法包括使用浓度为小于10%、9%、8%、7%、6%、例如小于5.1%重量/体积、例如小于4.8%重量/体积的PEG 8000(例如,具有约8000的平均分子量的PEG)。在一些实施方案中,通过电泳的富集包括使用琼脂糖凝胶电泳、丙烯酰胺凝胶电泳或毛细管电泳。在一些实施方案中,优先从二氧化硅洗脱小核酸包括使用磁珠。例如,一些实施方案包括使用磁珠纯化的尺寸选择和结合缓冲液组合物的控制。在一些实施方案中,PEG 8000用作与磁珠的结合缓冲液,并且调节PEG的浓度以提供所需尺寸选择。具体地,结合缓冲液中PEG的百分比越高,DNA与珠粒结合越多。此外,降低PEG的百分比促进较大DNA的结合并阻碍较小片段的结合。

[0027] 该技术可适于一系列截止值,其用于区分小DNA与大DNA。例如,可以调整PEG浓度以提供所需截止值(例如,使用4至5%、例如4.0%、4.1%、4.2%、4.3%、4.4%、4.5%、4.6%、4.7%、4.8%、4.9%或5.0%的PEG(例如,PEG 8000)浓度)。因此,实施方案提供用于针对小DNA富集样品的方法,其中小DNA是具有小于长度截止值1000、900、800、700、600、500、400、300、275、250、225、200、175、150、125、100、75或50个碱基对、碱基或核苷酸的长度的DNA。在一些实施方案中,输出样品中的小于长度截止值的片段尺寸的分布和相对丰度以及输入样品中的小于长度截止值的片段尺寸的分布和相对丰度是相同的或类似的。在一些实施方案中,使用较高浓度的PEG(例如PEG 8000),例如15%至20%(例如15%、16%、17%、18%、19%或20%)。

[0028] 因此,该技术的一些实施方案提供了用于产生与输入样品相比包含增加浓度的小核酸(例如,DNA(例如,cfDNA)和/或RNA)的输出样品的方法,所述方法包括优先从对核酸具有亲和力的基底洗脱小核酸。例如,一些实施方案通过亲和层析,例如通过基于核酸对带正电荷的基底(例如,聚阳离子、金属离子(例如螯合金属离子,例如包含多个螯合金属离子的组合物)的亲合力的方法,包含羟基磷灰石的组合物或羟基磷灰石包被的磁性颗粒),富集小核酸。在一些实施方案中,所述方法包括使用含有抗衡离子的磷酸盐溶液从氧化铁、羟基磷灰石和/或羟基磷灰石包被的磁性颗粒中的一种或多种洗脱小核酸,所述抗衡离子的浓度与DNA的较高分子量级分相比选择性洗脱小DNA。

[0029] 在一些实施方案中,该技术提供用于产生相对于输入样品包含浓度增加的小核酸的输出样品的方法。具体地,方法包括提供包含核酸(例如,包含小核酸)的输入样品(例如,生物样品,例如血液样品或源自血液样品的样品);将输入样品与SPRI基底(例如,珠粒,例如,磁珠,例如羧化顺磁珠)和拥挤剂(例如PEG,例如PEG 8000)温育以产生包含大核酸的结合级分和包含小核酸级分的上清液;和移取上清液级分以产生包含小核酸的输出样品(例如,以浓度大于输入样品中小核酸的浓度)。在一些实施方案中,方法包括提供包含小核酸的输入样品(例如,生物样品,例如血液样品或源自血液样品的样品);将输入样品与羧化顺磁珠和具有约8000的平均分子量的PEG温育以产生包含大核酸的结合级分和包含小核酸的上清液级分;和移取上清液级分以产生包含小核酸的输出样品(例如,以浓度大于输入样品中小核酸的浓度)。在一些实施方案中,所述技术提供包括以下的方法:提供包含小核酸的输入样品(例如,生物样品,例如血液样品或源自血液样品的样品);将输入样品与羧化顺磁珠和具有约8000的平均分子量和4%至5%重量/体积的浓度的PEG温育以产生包含大核酸的结合级分和包含小核酸的上清液级分;和移取上清液级分以产生包含小核酸的输出样品(例如,浓度大于输入样品中小核酸的浓度)。

[0030] 在一些实施方案中,所述技术提供包括以下的方法:提供包含小核酸的输入样品(例如,血液样品或源自血液样品的样品);将输入样品与羧化顺磁珠和具有约8000的平均分子量和约4.8%重量/体积的浓度的PEG温育以产生包含大核酸的结合级分和包含具有小于或等于约1000 bp、碱基或nt的尺寸的小核酸的上清液级分;和移取上清液级分以产生包含小核酸的输出样品(例如,浓度大于输入样品中小核酸的浓度)。

[0031] 在一些实施方案中,所述技术提供包括以下的方法:提供包含小核酸的输入样品(例如,生物样品,例如血液样品或源自血液样品的样品);将输入样品与羧化顺磁珠和具有约8000的平均分子量和约5.1%重量/体积的浓度的PEG温育以产生包含大核酸的结合级分和包含具有小于或等于约600 bp、碱基或nt的尺寸的小核酸的上清液级分;和移取上清液级分以产生包含小核酸的输出样品(例如,以浓度大于输入样品中小核酸的浓度)。

[0032] 在一些实施方案中,所述技术提供包括以下的方法:提供包含小核酸的输入样品(例如,生物样品(例如,血液样品、尿液样品、腹膜液样品、脑脊液样品或从血液样品衍生或分离的样品)、尿液样品、腹膜液样品或脑脊髓液样品);将输入样品与固体支持物(例如,珠粒,例如,磁珠,例如羧化顺磁珠)和拥挤剂(例如,PEG,例如,具有约5000至10,000的平均分子量的PEG;例如,具有5000;6000;7000;8000;9000;或10,000的平均分子量的PEG)(其浓度为约4.0%至6.0%(例如,4.1%、4.2%、4.3%、4.4%、4.5%、4.6%、4.7%、4.8%、4.9%、5.0%、5.1%、5.2%、5.3%、5.4%、5.5%、5.6%、5.7%、5.8%、5.9%、6.0%)重量/体积)温育以产生包含大核酸的结合级分和包含具有小于或等于约500至1200 bp、碱基或nt(例如,500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000、1050、1100、1150、1200 bp、碱基或nt)的尺寸的小核酸的上清液级分;和移取上清液级分以产生包含小核酸的输出样品(例如,以浓度大于输入样品中小核酸的浓度)。

[0033] 在一些实施方案中,所述包括将样品与如上所述的固体支持物和拥挤剂温育的方法另外包括以下中的一种或多种:(a) 优先从二氧化硅洗脱小核酸片段;(b) 优先在二氧化硅上保留大核酸片段;(c) 基于相对于其它核酸的甲基化差异富集小核酸(例如,通过甲基化DNA免疫沉淀(例如,由Cyprus Genetics提供的MeDIP)(例如,用由磁场捕获的抗体包被

的颗粒) (例如顺磁或磁性颗粒) 或捕获在固体支持物上 (例如, 在亲和柱 (例如, 抗体包被的吸附柱, 例如如由Molzyme提供) 上) 或其它固体支持物诸如例如微量滴定板、珠粒、载玻片、纳米结构等) 上; (d) 通过尺寸排阻富集小核酸; (e) 通过同步 (或非同步) 阻力变化系数尺寸分析 (SCODA, 例如, 如由Boreal Genomics提供) 富集小核酸; (f) 通过固相可逆固定尺寸分析 (例如使用羧化磁珠) 富集小核酸; (g) 通过基于电泳的尺寸分析来富集小核酸; (h) 通过亲和层析使用氧化铁富集小核酸; (i) 通过亲和层析, 例如核酸对带正电荷的基底 (例如, 聚阳离子、金属离子 (例如螯合金属离子, 例如包含多个螯合金属离子的组合物) 的亲合力, 包含羟基磷灰石的组合物, 或羟基磷灰石包被的磁性颗粒), 富集小核酸; 或 (j) 通过同时使用阴离子交换和尺寸排阻 (例如, 使用包含阴离子交换官能团 (例如胺, 例如弱胺) 的微粒) 和产生靶 (例如, 小) 核酸可及的微米和亚微米尺寸孔的表面不规则物) 来富集小核酸。

[0034] 所述方法可用于非侵入性产前测试; 因此, 在一些实施方案中, 输入样品是血液样品, 从血液样品来源、产生和/或包含血液样品的样品和/或通过从孕妇获得血液样品来提供输入样品。另外的实施方案提供用于针对染色体畸变测试受试者的方法, 所述方法包括针对染色体畸变测试输出样品。在一些实施方案中, 所述染色体畸变是非整倍体。所述技术不限于适用于用于产前测试的富集样品的测试。例如, 在一些实施方案中, 所述测试包括使用PCR (数字PCR、定量PCR、液滴数字PCR), 通过测序的数字计数, 测序 (例如, 大规模并行测序、下一代测序、高通量鸟枪法测序) 和/或质谱。在一些实施方案中, 所述技术提供通过如本文所述的方法产生的富集小DNA的样品。在一些实施方案中, 输出样品中的小DNA相对于输入样品中的小DNA的比率为2、5、10、50或100。

[0035] 此外, 在一些实施方案中, 所述技术提供用于产生相对于输入样品包含增加浓度的小DNA的输出样品 (例如, 输出样品中的小DNA相对于输入样品中的小DNA的比率为2、5、10、50或100) 的方法, 所述方法包括将A) 中的一种或两种与B) 中的一种或多种组合, 其中: A) 优先从二氧化硅洗脱小核酸 (例如, 包括在5至25%乙醇、5至25%甲醇、5至25%乙腈、5至25% DMSO、1至25%甲酰胺、大于1M NaCl、高浓度的离液盐中洗脱; 在低于16°C的温度下洗脱或在等于或低于硅表面的表面硅烷醇基团的pKa的pH下洗脱; 通过连续的前场电洗脱、连续的反场电洗脱或振荡场电洗脱来电洗脱小核酸; 和/或使用离子交换柱); 和/或优先在二氧化硅上保留大核酸 (例如, 包括用聚合物涂层、体积排阻剂或吸收剂处理二氧化硅, 用胺结合表面掺杂剂或多磷酸盐结合表面掺杂剂掺杂二氧化硅膜; 和/或用紫外线辐射、通过形成胸苷二聚体、通过使用补骨脂素或用化学交联剂 (例如, 福尔马林, 烷化剂 (例如, 1,3-双(2-氯乙基)-1-亚硝基脲 (BCNU, 卡莫司汀)、氮芥、顺铂、亚硝酸、醛类 (例如, 丙二醛、丙烯醛、巴豆醛)、氯乙基化试剂、亚硝基脲类、三氮烯类、烷基磺酸盐类、环氧化物类、二环氧丁烷、嗜癌菌素、阿维霉素B、顺式二氨基二氯铂 (II)、沙拉霉素、luzopeptins、isochrysohermidin、吡咯并苯并二氮杂草试剂、环磷酰胺、N, N, N, N', N', N'-六甲基蜜胺、吡咯里西啶生物碱类、葱环类、丝裂霉素C、氮丙啶基苯醌类、biselezin) 交联大核酸; 包括用以下处理二氧化硅: 包含19:1至29:1交联比的0.5至2%丙烯酰胺/双丙烯酰胺 (且任选地, 使用DTT-可切割的硫醇不稳定双丙烯酰胺交联剂), 0.01至0.5%琼脂糖, 0.01至1.0%平均分子量为1000至10,000的聚乙二醇, 1至10%硫酸葡聚糖, 1至10%聚蔗糖 (ficoll), 1至10%山梨糖醇, 1至10%己醛糖聚合物, 1至10%聚乙烯醇, 1至10%多胺、尼龙、聚酯或聚苯乙烯; 包括用交联剂 (例如, 福尔马林, 烷化剂 (例如, 1,3-双(2-氯乙基)-1-亚硝

基脲 (BCNU, 卡莫司汀)、氮芥、顺铂、亚硝酸、醛类 (例如, 丙二醛、丙烯醛、巴豆醛)、氯乙基化试剂、亚硝基脲类、三氮烯类、烷基磺酸盐类、环氧化物类、二环氧丁烷、嗜癌菌素、阿维霉素B、顺式二氨基二氯铂 (II)、沙拉霉素、luzopeptins、isochrysohermidin、吡咯并苯并二氮杂草试剂、环磷酰胺、N, N, N, N', N', N'-六甲基蜜胺、吡咯里西啶生物碱类、葱环类、丝裂霉素C、氮丙啶基苯醌类、biselezin) 交联大核酸; B) 通过甲基化DNA免疫沉淀可用磁场捕获的抗体包被的颗粒 (例如, 抗体包被的顺磁性颗粒或抗体包被的磁性颗粒) 富集 (例如, 包括将来自基于二氧化硅的分离方法的洗脱物与用识别甲基化DNA的抗体官能化的顺磁珠温育; 使用过量的5-甲基胞嘧啶、使用热变性、使用抗体的失活来从顺磁珠洗脱小DNA; 和纯化或扩增小DNA); 通过尺寸排阻富集 (例如, 使用超滤、尺寸排阻层析或透析; 使用拥挤剂; 使用PEG (例如, PEG 8000) (其浓度为小于5.1%重量/体积或小于4.8%重量/体积); 使用琼脂糖凝胶电泳、丙烯酰胺凝胶电泳或毛细管电泳); 通过阻力变化系数尺寸分析富集; 通过固相可逆固定尺寸分析富集; 和/或通过基于电泳的尺寸分析富集, 其中用一种或两种基于二氧化硅的技术与一种或多种富集技术组合处理输入样品产生包含比输入样品中的小DNA的浓度更高浓度的小DNA (例如, 具有小于1000、900、800、700、600、500、400、300、275、250、225、200、175、150、125、100、75或50个碱基对、碱基或核苷酸的长度截止值的长度) 的输出样品, 其中输出样品中的小于长度截止值的片段尺寸的分布和片段尺寸的相对丰度以及输入样品中的小于长度截止值的片段尺寸的分布和片段尺寸的相对丰度是相同的或类似的。

[0036] 在一些实施方案中, 该技术提供用于通过从受试者获得血液样品来评估包含核酸的血液样品、从血液样品产生包含小核酸的输出样品和测试小核酸的方法。在一些实施方案中, 产生输出样品使用包括以下的各种排列和/或组合的方法: 优先从二氧化硅洗脱小核酸, 优先在二氧化硅上保留大核酸, 通过甲基化DNA免疫沉淀用抗体包被的固体支持物富集小核酸, 通过尺寸排阻富集小核酸, 通过阻力变化系数尺寸分析来富集小核酸, 通过固相可逆固定尺寸分析富集小核酸, 通过基于电泳的尺寸分析来富集小核酸, 和通过亲和层析富集小核酸。在一些实施方案中, 所述方法包括使用以下中的任何2种、任何3种、任何4种、任何5种、任何6种、任何7种或全部8种的排列和/或组合: 优先从二氧化硅洗脱小核酸, 优先在二氧化硅上保留大核酸, 通过甲基化DNA免疫沉淀用抗体包被的固体支持物富集小核酸, 通过尺寸排阻富集小核酸, 通过阻力变化系数尺寸分析来富集小核酸, 通过固相可逆固定尺寸分析富集小核酸, 通过基于电泳的尺寸分析来富集小核酸, 和通过亲和层析富集小核酸。

[0037] 例如, 在一些实施方案中, 该技术包括使用固相可逆固定 (SPRI) 来富集小核酸。在包括使用固相可逆固定的一些实施方案中, 使用固体支持物诸如珠粒 (例如, 包含羧酸基团的顺磁珠)、拥挤剂 (例如PEG) 和盐 (例如, NaCl) 富集小核酸。在包括使用固体支持物诸如珠粒 (例如, 包含羧酸基团的磁性 (例如顺磁性) 珠粒)、拥挤剂 (例如, PEG (例如, PEG 8000)) (约3%至8% (或3%, 4% (例如, 4.8%), 5% (例如, 5.1%), 例如, 5.5%, 6%, 6.5%, 7%, 7.5%等) 重量/体积) 和盐 (例如, NaCl) 的一些实施方案中, 大核酸优先与固体支持物结合, 因此用周围缓冲液富集小核酸 (例如, 小于500个碱基、bp或nt (例如, 小于450、400、350、300、250、200、150或100个碱基、bp或nt))。

[0038] 在一些实施方案中, 该技术包括使用二氧化硅柱和洗涤缓冲液富集小核酸, 所述洗涤缓冲液促进大核酸与二氧化硅柱的结合, 并促进小核酸从柱洗涤于洗涤缓冲液中。例

如,在一些实施方案中,通过使用二氧化硅柱和包含70%EtOH的洗涤缓冲液来富集小核酸,且洗涤缓冲液体积与样品体积的比率为约0.5:1至0.4:1。在一些实施方案中,该技术包括使用二氧化硅柱和包含Tween-20、乙醇和MgCl₂(例如,10% Tween-20、15%乙醇和20 mM MgCl₂)的洗涤缓冲液来富集小核酸,其中洗涤缓冲液体积与样品体积的比率为约0.5:1至0.4:1。

[0039] 因此,在一些实施方案中,该技术包括使用通过固相可逆固定 (SPRI) 的富集和使用二氧化硅柱的富集的组合来针对小核酸(例如DNA)富集样品。在包括通过固相可逆固定和二氧化硅柱富集的一些实施方案中,使用包含约至少4%至至少5%PEG(例如,PEG 8000(例如,4.8%或5.1% PEG 8000))的PEG缓冲液来增加小核酸从SPRI基底的回收,并且使用包含乙醇(例如,70%乙醇)的洗涤缓冲液或包含Tween-20、乙醇和MgCl₂的洗涤缓冲液(例如,洗涤缓冲液体积与样品体积比率为0.5:1至0.4:1)来增加小核酸从二氧化硅柱至洗涤缓冲液中的回收。在一些实施方案中,PEG缓冲液促进大核酸与SPRI基底的结合,因此促进小核酸回收于流通物、洗涤液和/或洗脱物中。类似地,在一些实施方案中,二氧化硅柱洗涤缓冲液(例如,包含乙醇或包含Tween-20、乙醇和MgCl₂)促进大核酸与二氧化硅基底的结合,因此促进洗涤中小核酸的回收。

[0040] 在一些实施方案中,所述方法包括优先从二氧化硅洗脱小核酸和通过甲基化DNA免疫沉淀用抗体包被的固体支持物富集小核酸。在一些实施方案中,所述方法包括优先从二氧化硅洗脱小核酸和通过尺寸排阻富集小核酸。在一些实施方案中,所述方法包括优先从二氧化硅洗脱小核酸和通过阻力变化系数尺寸分析来富集小核酸。在一些实施方案中,所述方法包括优先从二氧化硅洗脱小核酸和通过固相可逆固定尺寸分析富集小核酸。在一些实施方案中,所述方法包括优先从二氧化硅洗脱小核酸和通过基于电泳的尺寸分析来富集小核酸。在一些实施方案中,所述方法包括优先从二氧化硅洗脱小核酸和通过亲和层析富集小核酸。

[0041] 在一些实施方案中,所述方法包括优先在二氧化硅上保留大核酸和通过甲基化DNA免疫沉淀用抗体包被的固体支持物富集小核酸。在一些实施方案中,所述方法包括优先在二氧化硅上保留大核酸和通过尺寸排阻富集小核酸。在一些实施方案中,所述方法包括优先在二氧化硅上保留大核酸和通过阻力变化系数尺寸分析来富集小核酸。在一些实施方案中,所述方法包括优先在二氧化硅上保留大核酸和通过固相可逆固定尺寸分析富集小核酸。在一些实施方案中,所述方法包括优先在二氧化硅上保留大核酸和通过基于电泳的尺寸分析来富集小核酸。在一些实施方案中,所述方法包括优先在二氧化硅上保留大核酸和通过亲和层析富集小核酸。

[0042] 在一些实施方案中,所述方法包括优先从二氧化硅洗脱小核酸和优先在二氧化硅上保留大核酸。在一些实施方案中,所述方法包括优先从二氧化硅洗脱小核酸和通过甲基化DNA免疫沉淀用抗体包被的固体支持物富集小核酸。在一些实施方案中,所述方法包括优先从二氧化硅洗脱小核酸和通过尺寸排阻富集小核酸。在一些实施方案中,所述方法包括优先从二氧化硅洗脱小核酸和通过阻力变化系数尺寸分析来富集小核酸。在一些实施方案中,所述方法包括优先从二氧化硅洗脱小核酸和通过固相可逆固定尺寸分析富集小核酸。在一些实施方案中,所述方法包括优先从二氧化硅洗脱小核酸和通过基于电泳的尺寸分析来富集小核酸。在一些实施方案中,所述方法包括优先从二氧化硅洗脱小核酸和通过亲和

层析富集小核酸。

[0043] 在一些实施方案中,所述方法包括优先在二氧化硅上保留大核酸和优先从二氧化硅洗脱小核酸。在一些实施方案中,所述方法包括优先在二氧化硅上保留大核酸和通过甲基化DNA免疫沉淀用抗体包被的固体支持物富集小核酸。在一些实施方案中,所述方法包括优先在二氧化硅上保留大核酸和通过尺寸排阻富集小核酸。在一些实施方案中,所述方法包括优先在二氧化硅上保留大核酸和通过阻力变化系数尺寸分析来富集小核酸。在一些实施方案中,所述方法包括优先在二氧化硅上保留大核酸和通过固相可逆固定尺寸分析富集小核酸。在一些实施方案中,所述方法包括优先在二氧化硅上保留大核酸和通过基于电泳的尺寸分析来富集小核酸。在一些实施方案中,所述方法包括优先在二氧化硅上保留大核酸和通过亲和层析富集小核酸。

[0044] 在一些实施方案中,所述方法包括通过甲基化DNA免疫沉淀用抗体包被的固体支持物富集小核酸和优先从二氧化硅洗脱小核酸。在一些实施方案中,所述方法包括通过甲基化DNA免疫沉淀用抗体包被的固体支持物富集小核酸和优先在二氧化硅上保留大核酸。在一些实施方案中,所述方法包括通过甲基化DNA免疫沉淀用抗体包被的固体支持物富集小核酸和通过尺寸排阻富集小核酸。在一些实施方案中,所述方法包括通过甲基化DNA免疫沉淀用抗体包被的固体支持物富集小核酸和通过阻力变化系数尺寸分析来富集小核酸。在一些实施方案中,所述方法包括通过甲基化DNA免疫沉淀用抗体包被的固体支持物富集小核酸和通过固相可逆固定尺寸分析富集小核酸。在一些实施方案中,所述方法包括通过甲基化DNA免疫沉淀用抗体包被的固体支持物富集小核酸和通过基于电泳的尺寸分析来富集小核酸。在一些实施方案中,所述方法包括通过甲基化DNA免疫沉淀用抗体包被的固体支持物富集小核酸和通过亲和层析富集小核酸。

[0045] 在一些实施方案中,所述方法包括通过尺寸排阻富集小核酸和优先从二氧化硅洗脱小核酸。在一些实施方案中,所述方法包括通过尺寸排阻富集小核酸和优先在二氧化硅上保留大核酸。在一些实施方案中,所述方法包括通过尺寸排阻富集小核酸和通过甲基化DNA免疫沉淀用抗体包被的固体支持物富集小核酸。在一些实施方案中,所述方法包括通过尺寸排阻富集小核酸和通过阻力变化系数尺寸分析来富集小核酸。在一些实施方案中,所述方法包括通过尺寸排阻富集小核酸和通过固相可逆固定尺寸分析富集小核酸。在一些实施方案中,所述方法包括通过尺寸排阻富集小核酸和通过基于电泳的尺寸分析来富集小核酸。在一些实施方案中,所述方法包括通过尺寸排阻富集小核酸和通过亲和层析富集小核酸。

[0046] 在一些实施方案中,所述方法包括通过阻力变化系数尺寸分析来富集小核酸和优先从二氧化硅洗脱小核酸。在一些实施方案中,所述方法包括通过阻力变化系数尺寸分析来富集小核酸和优先在二氧化硅上保留大核酸。在一些实施方案中,所述方法包括通过阻力变化系数尺寸分析来富集小核酸和通过甲基化DNA免疫沉淀用抗体包被的固体支持物富集小核酸。在一些实施方案中,所述方法包括通过阻力变化系数尺寸分析来富集小核酸和通过尺寸排阻富集小核酸。在一些实施方案中,所述方法包括通过阻力变化系数尺寸分析来富集小核酸和通过固相可逆固定尺寸分析富集小核酸。在一些实施方案中,所述方法包括通过阻力变化系数尺寸分析来富集小核酸和通过基于电泳的尺寸分析来富集小核酸。在一些实施方案中,所述方法包括通过阻力变化系数尺寸分析来富集小核酸和通过亲和层析

富集小核酸。

[0047] 在一些实施方案中,所述方法包括通过固相可逆固定尺寸分析富集小核酸和优先从二氧化硅洗脱小核酸。在一些实施方案中,所述方法包括通过固相可逆固定尺寸分析富集小核酸和优先在二氧化硅上保留大核酸。在一些实施方案中,所述方法包括通过固相可逆固定尺寸分析富集小核酸和通过甲基化DNA免疫沉淀用抗体包被的固体支持物富集小核酸。在一些实施方案中,所述方法包括通过固相可逆固定尺寸分析富集小核酸和通过尺寸排阻富集小核酸。在一些实施方案中,所述方法包括通过固相可逆固定尺寸分析富集小核酸和通过阻力变化系数尺寸分析来富集小核酸。在一些实施方案中,所述方法包括通过固相可逆固定尺寸分析富集小核酸和通过基于电泳的尺寸分析来富集小核酸。在一些实施方案中,所述方法包括通过固相可逆固定尺寸分析富集小核酸和通过亲和层析富集小核酸。在一些实施方案中,所述方法包括通过基于电泳的尺寸分析来富集小核酸,和优先从二氧化硅洗脱小核酸。在一些实施方案中,所述方法包括通过基于电泳的尺寸分析来富集小核酸,和优先在二氧化硅上保留大核酸。在一些实施方案中,所述方法包括通过基于电泳的尺寸分析来富集小核酸,和通过甲基化DNA免疫沉淀用抗体包被的固体支持物富集小核酸。在一些实施方案中,所述方法包括通过基于电泳的尺寸分析来富集小核酸,和通过尺寸排阻富集小核酸。在一些实施方案中,所述方法包括通过基于电泳的尺寸分析来富集小核酸,和通过阻力变化系数尺寸分析来富集小核酸。在一些实施方案中,所述方法包括通过基于电泳的尺寸分析来富集小核酸,和通过固相可逆固定尺寸分析富集小核酸。在一些实施方案中,所述方法包括通过基于电泳的尺寸分析来富集小核酸,和通过亲和层析富集小核酸。

[0048] 在一些实施方案中,所述方法包括通过亲和层析富集小核酸和优先从二氧化硅洗脱小核酸。在一些实施方案中,所述方法包括通过亲和层析富集小核酸和优先在二氧化硅上保留大核酸。在一些实施方案中,所述方法包括通过亲和层析富集小核酸和通过甲基化DNA免疫沉淀用抗体包被的固体支持物富集小核酸。在一些实施方案中,所述方法包括通过亲和层析富集小核酸和通过尺寸排阻富集小核酸。在一些实施方案中,所述方法包括通过亲和层析富集小核酸和通过阻力变化系数尺寸分析来富集小核酸。在一些实施方案中,所述方法包括通过亲和层析富集小核酸和通过固相可逆固定尺寸分析富集小核酸。在一些实施方案中,所述方法包括通过亲和层析富集小核酸和通过基于电泳的尺寸分析来富集小核酸。在一些实施方案中,所述方法包括使用具有不规则表面(例如,包含微米或亚微米尺寸的孔)的胺官能化珠粒的双重和同时阴离子交换和尺寸排阻。

[0049] 所述方法可用于非侵入性产前测试;因此,在一些实施方案中,输入样品是血液样品(例如,来自孕妇的血液样品),并且所述方法包括通过PCR或通过测序的数字计数来针对染色体畸变诸如非整倍体测试受试者。一些实施方案可用于检测单基因胎儿病症和胎盘相关病症。

[0050] 其它实施方案在癌症应用中可用于筛选、诊断、预后和监测结肠直肠癌检测和筛选的残留疾病或疾病复发(例如,检测、定量和/或表征其生物标记物(例如,甲基化的 septin 9 (ms9)),例如,如由亚硫酸氢盐PCR测定法提供(例如,如由在m2000rt实时PCR平台上的Abbott Molecular mS9亚硫酸氢盐PCR测定法商业提供))。在一些实施方案中,该技术可用于检测、表征和/或定量小循环无细胞核酸(例如,小循环无细胞DNA和/或小循环无细胞RNA),用于与以下相关的应用:测试(例如,评价风险(例如获得或发展的风险));检测是否

存在发展的倾向或不发展的倾向;筛选;诊断;预后和/或监测残留疾病或复发),其与包括但不限于以下的各种人和非人急性和慢性疾病状态病理学(病理生理学):肿瘤学、血液学、感染性疾病、肝脏疾病、心血管(例如,心脏)疾病、肾脏疾病、炎性疾病(例如,风湿病、关节炎、支气管、胃肠道、真皮、脑脊髓等)和各种形式的肺部疾病(例如肺气肿、COPD、间皮瘤)。

[0051] 基于本文含有的教导,另外实施方案对于相关领域的技术人员将是显而易见的。

[0052] 附图简述

考虑下列附图,本技术的这些和其它特征、方面和优点将变得更好地理解:

图1是显示使用“反向SPRI”方法富集小核酸的图。

[0053] 图2是显示使用相对于其它技术的“反向SPRI”方法的均匀富集小核酸的一系列图。图2A显示富集之前的尺寸分布。图2B显示用设计用于从人血浆或血清分离游离循环的DNA和RNA的商业试剂盒(Qiagen循环核酸试剂盒)富集后的输出样品中的尺寸分布。图2C显示使用Beckman AMPure SPRI珠粒富集之后的输出样品中的尺寸分布。图2D显示使用Abbott Molecular SPRI珠粒富集之后的输出样品中的尺寸分布。使用凝胶电泳和凝胶图像的光密度分析,在富集之前和之后定量测试样品的每个片段的量。图2E显示AMPure和Abbott Molecular SPRI方法提供约150%的小片段(例如,小于500bp、碱基或nt)的富集。

[0054] 图3是显示减少缓冲液中聚乙二醇浓度降低较小核酸的回收率的图。

[0055] 图4是显示作为使用的洗涤缓冲液的类型和体积的函数的二氧化硅柱上的尺寸选择的一系列图。图4A显示乙醇洗涤缓冲液的测试结果,而图4B显示包含10% Tween-20、15%乙醇和20 mM MgCl₂的洗涤缓冲液的测试结果。

[0056] 图5显示使用磁珠富集小核酸的毛细管电泳数据。

[0057] 图6是显示具有粗糙表面的胺官能化的珠粒(例如,包含导致微米和亚微米尺寸孔的表面不规则性的珠粒)相对于具有相对光滑表面的胺官能化的珠粒提供小核酸样品的改善的富集的一系列图。图6A显示使用不规则表面轮廓珠粒的结果,而图6B显示来自光滑表面轮廓珠粒的结果。

[0058] 应理解的是,图不一定按比例绘制,图中的物体也不一定彼此成比例绘制。图为意在带来对本文公开的装置、系统和方法的各个实施方案的清楚和理解的描绘。只要有可能,相同的参考数字将在整个附图中用于指相同或相似的部分。此外,应理解的是附图不意在以任何方式限制本教导的范围。

[0059] 发明详述

本文提供涉及处理核酸样品的技术,特别但并非排他地用于针对小核酸诸如小循环无细胞DNA富集样品的方法,其可用于产前测试和人疾病测试中。在一些实施方案中,该技术涉及检测、表征和/或定量小循环无细胞核酸用于癌症相关应用诸如筛选、诊断、预后和监测残留疾病或疾病复发。在一些实施方案中,该技术涉及鉴定、表征和/或定量小循环无细胞DNA和/或小循环无细胞RNA,用于与以下相关的应用:测试(例如,评价风险(例如获得或发展的风险));检测是否存在发展的倾向或不发展的倾向;筛选;诊断;预后和/或监测残留疾病或复发),其与包括但不限于以下的各种人和非人急性和慢性疾病状态病理学(病理生理学):肿瘤学、血液学、感染性疾病、肝脏疾病、心血管(例如,心脏)疾病、肾脏疾病、炎性疾病(例如,风湿病、关节炎、支气管、胃肠道、真皮、脑脊髓等)和各种形式的肺部疾病(例如肺气肿、COPD、间皮瘤)。

[0060] 在该技术的各个实施方案的该描述中,本文所用的节段标题仅用于组织的目的,而不应理解为以任何方式限制描述的主题。此外,为了解释目的,描述了很多具体的细节以提供对所公开实施方案的透彻理解。然而,本领域技术人员将理解,这些各个实施方案可用或不用这些具体细节来实践。在其它情况下,结构和装置以框图形式显示。此外,本领域技术人员可容易地理解,呈现和实施方法的具体顺序为说明性的并且考虑顺序可进行改变,但仍在本文所公开的各个实施方案的精神和范围内。

[0061] 对于任何目的,本申请中引用的所有文献和相似材料,包括但不限于,专利、专利申请、文章、书籍、论文和因特网网页通过引用全文清楚地通过引用并入。除非另有定义,本文使用的所有技术和科学术语具有与本文所述的各个实施方案所属领域的普通技术人员通常理解的相同的含义。当并入参考文献中的术语的定义似乎与本教导中提供的定义不同时,应以本教导中提供的定义为准。

[0062] 定义

为了便于理解本技术,下面定义了许多术语和短语。另外的定义记载于整个详述中。

[0063] 在整个说明书和权利要求中,下列术语采用如本文明确相关的相关领域的普通技术人员所理解的一致含义,除非上下文另有清楚指示。如本文中所使用的短语“在一个实施方案中”不一定指相同的实施方案,尽管其可能指相同的实施方案。此外,如本文中所使用的短语“在另一个实施方案中”不一定指不同的实施方案,尽管其可能指不同的实施方案。因此,如下文所描述,可容易地组合本发明的各个实施方案,而不脱离本发明的范围或精神。

[0064] 另外,如本文中所使用,术语“或”是包括性的“或”操作符并且与术语“和/或”等同,除非上下文另有清楚指示。术语“基于”不是排他的并且允许基于额外的未描述的因素,除非上下文另有清楚指示。另外,在整个说明书中,“一个”、“一种”和“该/所述”的含义包括复数对象。“在…中”的含义包括“在..中”和“在…上”。

[0065] 如本文中所使用,术语“SPRI”是指“固相可逆固定化”的技术,其中靶核酸在特定缓冲液条件下在珠粒或其它固相材料(通常是羧化和顺磁性的)存在的情况下选择性沉淀。沉淀的靶核酸固定化至所述珠粒并保持结合,直到根据操作者的需要通过洗脱缓冲液移去(参见例如,DeAngelis等人(1995) *Nucleic Acids Res* 23: 4742-4743)。如本文中所使用的术语“羧化的”是指通过添加至少一个羧基(例如COOH或COO⁻)来修饰材料,诸如微粒。在一些实施方案中,使用SPRI来使目标核酸与固相结合,并且在一些实施方案中,使用SPRI来结合和保留非目标核酸,例如,目标核酸保留在非结合液相(例如,“反向SPRI”)中。

[0066] 如本文中所使用,如本文中所使用的术语“顺磁性”是指材料的特征,其中所述材料的磁性仅在外部施加的磁场存在的情况下发生,并且一旦移除外部施加的磁场就不会保留任何磁化。

[0067] 如本文中所使用,术语“珠粒”是指任何类型的不规则或规则形状的任何方便尺寸的固相颗粒,并且其由任何数量的已知材料制成,诸如纤维素、纤维素衍生物、丙烯酸树脂、玻璃、硅胶、聚苯乙烯、明胶、聚乙烯吡咯烷酮、乙烯基和丙烯酰胺的共聚物、与二乙烯基苯交联的聚苯乙烯等(如例如Merrifield (1964) *Biochemistry* 3:1385-1390中所述)、聚丙烯酰胺、胶乳凝胶、聚苯乙烯、葡聚糖、橡胶、硅、塑料、硝化纤维素、天然海绵、硅胶、受控孔玻璃(CPG)、金属、交联葡聚糖(例如Sephadex™)、琼脂糖凝胶(Sepharose™)和本领域技术

人员已知的其它固相珠粒支持物。

[0068] 如本文中所使用的“支持物”是指这样的基质,在其上或其中固定核酸分子、微粒等,例如它们可以共价或非共价连接,或者在其中或其上它们可以部分或完全嵌入,使得大大或完全防止它们相对于彼此自由扩散或移动。

[0069] 如本文中所使用,术语“染色体异常”、“染色体畸变”和“染色体改变”在本文中可互换使用。它们是指与核型正常个体中的染色体数目和结构组织相比,染色体数目的差异(例如,变异)或一条或多条染色体的结构组织中的差异(例如,修饰)。如本文中所使用,这些术语还意味着包括在基因水平发生的异常。非整倍体的实例是三体21和三体13。在一些上下文中,术语“染色体异常”和“染色体畸变”可互换使用以指染色体中引起异常或病理表型的数值和结构改变。染色体异常可以是几种类型,例如,额外或缺失个别染色体,额外或缺失染色体部分(区段重复或缺失),断裂,环和重排等。

[0070] 如本文中所使用,“拷贝数改变”(“CNV”)是指DNA(例如,在基因组中)的改变,其导致具有DNA的一个或多个部分的异常拷贝数的细胞。通常,CNV对应于在某些染色体上已被缺失(例如,基因组包含少于正常数量)或复制(例如,基因组包含超过正常数量)的基因组的相对大的区域。例如,通常具有依次为L-M-N-O的部分的染色体可以替代地具有部分L-M-N-N-O(例如,N的复制)或L-M-O(例如,N的缺失)。CNV也可以由非整倍体和插入事件导致。在人类中,CNV占人类基因组DNA的约12%,且每个变异通常范围为数百或数千个碱基(例如,约一千碱基(1000个核苷酸碱基))至几百万碱基尺寸。

[0071] 存在的异常数量(例如,太多或太少)的染色体或染色体片段被称为“非整倍体”,例如,出现比染色体的正常二倍体数目至少多一个或少一个染色体,导致不平衡的染色体互补物。染色体非整倍体与大量遗传病症和退行性疾病有关。尽管本文提供了包含异常高数量染色体的非整倍体的许多实施方案,但该技术同样适用于包含异常低数量染色体的非整倍体。具体地,在用于区分非整倍体状态下的多于2个(例如3个或更多个)染色体与在整倍体状态下的2个染色体的技术的描述中,该技术应被理解为也适用于检测非整倍体状态下的少于2个染色体(例如,1或0个染色体)。

[0072] 如本文中所使用,术语“与染色体异常相关的疾病或病症”是指已知或怀疑由染色体异常引起的任何疾病、病症、病况或缺陷。与染色体异常相关的示例性疾病或病况包括但不限于三体性(例如唐氏综合征(三体21),爱德华综合征(三体18),帕图综合征(三体13),克氏综合征(XXY),三重X综合征(XXX)和XYY疾病),特纳综合征(不存在X染色体,例如X0)和X连锁病症(例如,杜氏肌营养不良症,血友病A,某些形式的严重联合免疫缺陷,Lesch-Nyhan综合征,和脆性X综合征)。与染色体异常相关的疾病或病况的额外实例描述于 *Harrison's Principles of Internal Medicine*, Wilson等人(编), 1991(第12版), McGraw Hill, New York, NY, pp. 24-46,其全文通过引用并入本文。

[0073] 如本文中所使用,“核酸”是指DNA、RNA、修饰的DNA、修饰的RNA等。核酸可以包含任何数目的核苷酸,例如2至超过1百万个核苷酸。

[0074] 术语“DNA的样品”或“DNA样品”是指从天然来源分离和适于通过测定进行评价的形式(例如作为可溶性水溶液)的包含DNA或代表DNA的核酸的样品。

[0075] 如本文中所使用,术语“小DNA”、“小RNA”、“小RNA片段”、“小DNA片段”、“小核酸”等是指小于“截止值”的核酸(例如DNA或RNA)(例如,样品中的单个核酸的集合)。在示例性实

实施方案中,小核酸是指具有小于1000、900、800、700、600、500、400、300、275、250、225、200、175、150、125、100、75或50个碱基对(bp)、碱基或核苷酸(nt)的尺寸的核酸;优选地,小核酸为约50至约500个碱基对、碱基或核苷酸,或约50至约400个碱基对、碱基或核苷酸,或约50至约300个碱基对、碱基或核苷酸,或约50至约200个碱基对、碱基或核苷酸,或约50至约100个碱基对、碱基或核苷酸。如本文中所使用,“大DNA”、“大RNA”、“大RNA片段”、“大DNA片段”、“大核酸”等是指大于“截止值”的核酸(例如DNA或RNA)(例如,样品中的单个核酸的集合)。

[0076] 尺寸可以通过质量、长度或其它合适的尺寸量度来定义。核酸的长度可以以表示“碱基对”(缩写为“bp”)的数量、“碱基”的数量或核苷酸(“nt”或“nts”)的数量的单位表示。双链核酸(例如DNA)的长度通常但非排他地以碱基对(bp)的单位表示。单链核酸(例如DNA)的长度通常但非排他地以核苷酸(nt)的单位表示。以碱基的单位表示的长度可以应用于双链核酸或单链核酸。这些单位可用标准的SI前缀进行修饰,以指示10的幂的倍数,例如kbp、Mbp、Gbp、千碱基、兆碱基、千兆碱基等)。

[0077] 尺寸测量可以以本领域已知的各种方式进行,例如核酸的配对末端测序和比对,电泳,离心,光学方法,质谱等。可以测量统计学显著数量的核酸以提供样品的精确尺寸概况。在一些实施方案中,在计算机接收从物理测量获得的数据并进行分析以完成核酸的尺寸的测量。例如,可以分析由电泳产生的电泳图(例如,通过电泳图条带、峰等的光密度分析)来确定尺寸。在一个实施方案中,分析核酸的确包括测序或使核酸进行电泳的实际过程,而其它实施方式进行所得数据的分析。在一些实施方案中,参数提供生物样品中核酸的尺寸分布(例如柱状图)的统计量度。该参数可以被称为尺寸参数,因为其从多个核酸的尺寸来确定。

[0078] “胎儿的母体宿主”是指孕育胎儿的妇女,其中寻求检测和/或检测所述胎儿的DNA的遗传状况。术语“胎儿的母体宿主”、“母体宿主”和“母亲”可互换使用。“胎儿”是指在任何妊娠阶段在子宫中发育的后代。可在人类妊娠的10或11周开始的“胎儿期”之前检测胎儿DNA。因此,“胎儿”不仅包括胎儿期的发育后代,而且还包括在人类妊娠的第10或第11周之前的早期胚胎发育阶段的发育后代。

[0079] “受试者”是脊椎动物,优选哺乳动物,更优选人。哺乳动物包括,但不限于,鼠、猿、人、农场动物、运动动物和宠物。

[0080] 如本文中所使用,“无细胞DNA”是指不在细胞内的DNA。在一个实施方案中,无细胞DNA包括在血液中循环的DNA。在另一个实施方案中,无细胞DNA包括存在于细胞外的DNA。在另一个实施方案中,无细胞DNA包括存在于细胞外的DNA以及在血液样品已经历部分或温和的细胞裂解之后存在于这样的血液样品中的DNA。

[0081] 如本文中所使用,“无细胞胎儿DNA”(“cffDNA”)是指源自胎儿而非母亲并且不在细胞内的DNA。在一个实施方案中,无细胞胎儿DNA包括在母体血液中循环的胎儿DNA。在另一个实施方案中,无细胞胎儿DNA包括存在于细胞(例如胎儿细胞)外的胎儿DNA。在另一个实施方案中,无细胞胎儿DNA包括存在于细胞外的胎儿DNA以及在母体血液样品已经历部分或温和的细胞裂解之后存在于这样的血液样品中的胎儿DNA。母体血浆和血清中胎儿DNA的综述由Peril和Bianchi(2001)以及Lo(2000)提供。

[0082] “生物样品”是指从胎儿的母体宿主衍生的任何样品。在一个实施方案中,母体宿主的生物样品包括任何加工或未加工的固体、半固体或液体生物样品,例如血液、尿液、唾

液和粘膜样品(例如,来自子宫或阴道等的样品)。例如,母体宿主的生物样品可以是全血、部分裂解的全血、血浆和/或部分加工的全血的样品。在一个实施方案中,母体宿主的生物样品是来自母体宿主的全血的无细胞DNA或游离的漂浮DNA的样品。

[0083] 如本文中所使用,术语“Tween-20”是指聚山梨醇酯表面活性剂,例如脱水山梨糖醇单月桂酸酯的聚氧乙烯衍生物(例如聚山梨醇酯20(聚氧乙烯(20)脱水山梨糖醇单月桂酸酯))。Tween-20与聚山梨醇酯范围内的其它成员的不同之处在于聚氧乙烯链的长度和脂肪酸酯部分。因此,其它Tween表面活性剂为Tween-40(聚山梨醇酯40(聚氧乙烯(20)脱水山梨糖醇单棕榈酸酯))、Tween-60(聚山梨醇酯60(聚氧乙烯(20)脱水山梨糖醇单硬脂酸酯))、Tween-80(聚山梨醇酯80(聚氧乙烯(20)脱水山梨糖醇单油酸酯))等。“聚氧乙烯”后的数字20是指分子中发现的氧乙烯-(CH₂CH₂O)-基团的总数量。“聚山梨醇酯”后的数字涉及与分子的聚氧乙烯脱水山梨糖醇部分相关的脂肪酸的类型。单月桂酸酯由20表示,单棕榈酸酯由40表示,单硬脂酸酯由60表示,且单油酸酯由80表示。在描述Tween-20的一些实施方案中,另一种洗涤剂或表面活性剂可以被取代,例如Tween-40、Tween-60和/或Tween-80。

[0084] 描述

该技术提供了各种单独使用或组合使用来从母体血浆样本中存在的循环母体核酸(例如DNA和/或RNA)的丰富背景中富集低丰度核酸(例如DNA和/或RNA,诸如小循环胎儿DNA片段、mRNA、miRNA、piRNA等)的方法。在一些实施方案中,该技术适用于从较大分子量核酸(例如,具有大于约200bp、碱基或nt的长度并且延伸至约20,000或更多bp、碱基或nt)的背景环境选择性富集小核酸(例如,具有小于约200bp、碱基或nt的长度)。该技术不限于用于区分“小”核酸和“大”或“非小”核酸的尺寸截止值(例如,以bp、碱基或nt计)。如本文所使用,提及在尺寸分布方面区分小核酸和大核酸的200-bp、200-碱基或200-nt截止值旨在是示例性的,并且不旨在将该技术限于该具体尺寸截止值。因此,在一些实施方案中,使用200bp、碱基或nt的尺寸截止值来区分小核酸(例如,DNA(例如,cffDNA)和/或RNA)与大核酸(例如,母体核酸)。在一些实施方案中,使用例如1000、900、800、700、600、500、400、300、275、250、225、200、175、150、125、100、75或50个碱基对、碱基或核苷酸的截止值。对于特定应用,所需截止值可由本领域技术人员确定。

[0085] 此外,提供的技术不会引入可检测或另外可辨别的基因组和/或序列代表性偏倚,除了尺寸区分,其可能具有损害非侵入性产前测试(NIPT)应用的非整倍体标记物分析中的下游敏感性的潜能。

[0086] 该技术不限于富集的核酸的类型。因此,该技术适用于分离、富集和检测DNA(例如,cffDNA和其它小DNA和DNA片段)。该技术适用于分离、富集和检测RNA,诸如信使RNA(mRNA)、micro RNA(microRNA或miRNA)、piRNA和其它小核酸(例如血液中存在的核酸)以及用于分离、富集和检测母体血液中存在的胎儿信使RNA(mRNA)和胎儿micro RNA(microRNA或miRNA)。

[0087] 该技术在本文中通过两种一般类型的策略和子技术来例举。然而,应当理解,该技术不限于这些说明性实例。第一组子技术提供了直接从基于二氧化硅的捕获膜和基质(例如Qiagen循环核酸试剂盒或Qiagen DNeasy试剂盒)选择性和优先(例如,富集)洗脱小核酸。第二组子技术依赖于二次富集过程,其需要额外的实验室仪器,诸如甲基化DNA免疫沉淀(例如,“MeDIP”),其具有可以用磁场捕获的抗体包被的颗粒(例如,抗体包被的顺磁性颗

粒或抗体包被的磁性颗粒))或捕获至亲和柱(例如,抗体包被的吸附柱,例如由Molzyme商业提供)或其它固体支持物(例如微量滴定板、珠粒、载玻片或纳米结构),固相可逆固定(SPRI)珠粒,自动化电泳和电洗脱(例如生命技术Pippin Prep),LabChip XT,同步阻力变化系数(synchronous coefficient drag of alteration,SCODA),同时阴离子交换和尺寸排阻等。这些方法可以直接和独立地用于从血浆分离小核酸(例如,提供单一富集方法)和/或相继在二氧化硅膜捕获过程的后期进行(例如,提供双重富集方法,例如与根据本文提供的技术在一些实施方案中修改的基于二氧化硅的分离方法诸如Qiagen循环核酸试剂盒结合使用)。尽管本文的公开内容涉及某些说明的实施方案,但是应当理解,这些实施方案通过实例而非限制的方式呈现。

[0088] 1. 从二氧化硅优先洗脱小核酸

在该技术的一些实施方案中,通过优先和/或选择性洗脱从样品(例如,由母体血液或血浆制备或衍生的样品)中分离或在其中富集小核酸(例如,小DNA(例如,cffDNA)和/或小RNA)。例如,在一些实施方案中,在二氧化硅基质或膜上从样品捕获(例如,结合)大部分或总核酸之后,小核酸优先从二氧化硅基质或膜洗脱或以其它方式回收。

[0089] 在某些盐存在下和某些pH条件下,通常在高离子强度的条件下,核酸(例如DNA、RNA)非特异性结合二氧化硅表面。例如,在pH等于或低于硅表面的表面硅烷醇基团的pKa的缓冲溶液存在下,DNA吸附是最有效的。在一些实施方案中,在离液剂(例如盐、丁醇、乙醇、盐酸胍、硫氰酸胍、高氯酸锂、乙酸锂、氯化镁、苯酚、丙醇、十二烷基硫酸钠、硫脲和尿素)(其通过破坏其周围的水合壳而使生物分子变性)存在下,核酸(例如DNA)结合二氧化硅。在一些实施方案中,核酸用高盐和乙醇洗涤,并且通常用包含低盐的洗脱缓冲液洗脱。

[0090] 因此,在一些实施方案中,在结合全部或大部分核酸(例如,来自母体血液样品)之后,洗脱条件促进小核酸从二氧化硅表面相对于大核酸的选择性和优先释放。在示例性实施方案中,溶剂效应用于促进小核酸从二氧化硅的洗脱。因此,实施方案提供小核酸从二氧化硅优先洗脱在包含5至25%乙醇、5至25%甲醇、5至25%乙腈、5至25% DMSO和/或1至25%甲酰胺的洗脱缓冲液中。在一些实施方案中,离子强度效应用于促进小核酸从硅的优先洗脱。因此,实施方案提供小核酸从二氧化硅优先洗脱在洗脱缓冲液中,所述洗脱缓冲液包含升高的氯化钠浓度(例如,大于500mM,例如1M或更高)以筛选抗衡离子结合相互作用和/或包含升高的离液盐浓度以稳定较大核酸与二氧化硅表面的结合。在一些实施方案中,pH效应优先促进小核酸从二氧化硅膜或柱的洗脱。在一些实施方案中,调整洗脱条件以改变吸附和从二氧化硅释放的动力学,以有利于从二氧化硅释放小核酸,例如在低温(例如2°C至16°C),小核酸优先从二氧化硅柱洗脱。

[0091] 2. 在二氧化硅上优先保留大核酸

此外,在该技术的一些实施方案中,通过经由捕获后二氧化硅柱隔离而选择性和优先保留大核酸,从样品(例如,由母体血液或血浆制备或衍生的样品)中分离或在其中富集小核酸(例如,DNA(例如,cffDNA)和/或小RNA)。在一些实施方案中,在结合全部或大部分核酸(例如,来自母体血液样品)之后,洗脱条件促进大核酸通过二氧化硅表面相对于小核酸的选择性和优先保留。

[0092] 例如,在一些实施方案中,用聚合物涂层、体积排阻剂或吸收剂处理二氧化硅表面(膜,柱等)以便将大核酸(例如,大于200bp、碱基或nt)隔离至柱上且促进小核酸(例如小于

200bp、碱基或nt)的洗脱。示例性实施方案提供这样的方法,其中将核酸(例如DNA)吸附至二氧化硅表面,所述二氧化硅表面用以下处理:0.5至2%丙烯酰胺/双丙烯酰胺(例如,包含19:1至29:1交联比),0.01至0.5%琼脂糖,0.01至1.0%聚乙二醇(平均分子量为1000至10,000的PEG),1至10%硫酸葡聚糖,1至10%聚蔗糖(ficoll)、山梨糖醇或糖(例如,己醛糖)聚合物,1至10%聚乙烯醇(PVA),1至10%多胺(例如精胺、亚精胺等)或低水平合成聚合物,诸如例如尼龙、聚酯、聚苯乙烯等。

[0093] 在一些实施方案中,掺杂的二氧化硅膜和/或柱基质将大核酸(例如,大于200bp、碱基或nt)隔离至柱上并促进小核酸(例如,小于200bp的碱基,或nt)从柱的洗脱。例如,一些实施方案包括使用嵌入胺结合表面掺杂剂(例如,羧基团衍生化)的二氧化硅。在一些实施方案中,将二氧化硅嵌入聚磷酸盐结合表面掺杂剂(例如,氨基衍生化)。在一些实施方案中,将二氧化硅嵌入可逆的、可控制的或胺反应性表面基团中的一种或多种,用于小核酸的受控、可逆和优先洗脱。在一些实施方案中,将二氧化硅嵌入可逆的、可控制的或羧基反应性表面基团中的一种或多种,用于小核酸的受控、可逆或优先洗脱。

[0094] 在一些实施方案中,该技术提供这样的方法,其包括相对于小核酸优先交联大核酸以将大核酸保留在基底(例如二氧化硅柱)上。例如,在一些实施方案中,方法包括大核酸的低水平紫外线辐射交联,例如在低能量强度下,以捕获大交联分子量核酸,例如大于200bp、碱基或nt。在一些实施方案中,方法包括核酸的内源性交联,例如相对于小核酸优选在大核酸(例如DNA)中中环丁烷和/或胸苷二聚体的内源性交联。在一些实施方案中,方法包括在外源交联剂诸如例如补骨脂素存在下优先使用紫外线辐射来交联大核酸。

[0095] 在一些实施方案中,方法包括使用低水平化学交联(例如,促进小尺寸核酸的可逆、受控和优先洗脱)。例如,一些实施方案提供这样的方法,其包括使用包含10%中性缓冲福尔马林的溶液优先交联大核酸。在一些实施方案中,通过用或不用EDBE(例如,用于制备福尔马林固定、石蜡包埋的样品的Gundling试剂;参见例如美国专利申请公开号20130323815,其通过引用并入本文)处理的热修复进行福尔马林处理。

[0096] 在一些实施方案中,方法包括使用可逆的双官能交联剂(例如DTT-可切割的、硫醇不稳定的双丙烯酰胺/丙烯酰胺混合物)。在与针对胎儿核酸测试母体血液相关的实施方案中,这些低水平交联方法利用相对于较长(例如母体)核酸较低丰度的较小(例如胎儿)核酸(例如,DNA)。不受理论所束缚,统计学和随机性预期,与丰度较低的较小(例如,胎儿)核酸相比,较大(例如,母体)核酸分子将优先彼此交联。大和小核酸分子的相对长度进一步增强这种效果,因为较大物质更可能通过链内和链间交联事件交联。一些实施方案包括使用交联剂,所述交联剂包含福尔马林、烷化剂(例如1,3-双(2-氯乙基)-1-亚硝基脒(BCNU,卡莫司汀)、氮芥、顺铂、亚硝酸、醛类(例如,丙二醛、丙烯醛、巴豆醛)、氯乙基化试剂、亚硝基脒类、三氮烯类、烷基磺酸盐类、环氧化物类、二环氧丁烷、嗜癌菌素、阿维霉素B、顺式二氨基二氯铂(II)、沙拉霉素、luzopeptins、isochrysohermidin、吡咯并苯并二氮杂萘试剂、环磷酸胺、N, N, N, N', N', N'-六甲基蜜胺、吡咯里西啶生物碱类、葱环类、丝裂霉素C、氮丙啶基苯醌类或biselezin。

[0097] 一些实施方案提供电洗脱方法。例如,一些实施方案提供包括从柱优先电洗脱小核酸的方法。一些实施方案包括连续的前场电洗脱(例如,低场、阴极辅助电洗脱),连续的反场电洗脱(例如,低场、阳极辅助电洗脱)或振荡场电洗脱(例如,高频、低场、可逆阳极/阴

极电振荡驱动的电洗脱)。

[0098] 一些实施方案提供包括使用离子交换柱与选择性洗脱小核酸的方法。柱、基质或膜介质的实例包括但不限于二氧化硅、DEAE、Dionex或其它衍生的层析柱介质、基质或膜。一些实施方案包括具有递增或递减盐梯度的洗脱(例如,等度和/或非等度的洗脱),具有递增或递减pH梯度的洗脱(例如,等度和/或非等度的洗脱),和/或具有水/非水(例如甲醇、乙醇、乙腈)双溶剂梯度洗脱系统的洗脱(例如,等度和/或非等度的洗脱)。

[0099] 3. 在柱洗涤期间优先保留大核酸

在方法的相关实施方案中,在洗涤步骤期间(例如,在洗脱步骤之前),大核酸保留在固体支持物(例如二氧化硅柱)上,和/或小核酸不保留在固体支持物上。例如,在一些实施方案中,包含核酸的样品在柱上流动以使核酸与柱结合。然后,用洗涤缓冲液洗涤柱(包含结合的核酸)。用洗涤缓冲液洗涤柱后,一些核酸保持吸附至柱(例如,大核酸优先吸附至柱;例如,在柱上富集大核酸),并从柱移取一些核酸并且存在于洗涤缓冲液中(例如,将小核酸从柱优先移取在洗涤缓冲液中;例如,在洗涤缓冲液中富集小核酸)。因此,在一些实施方案中,洗涤缓冲液从柱优先移取小核酸(例如,大核酸保持吸附至柱)。随后,使洗脱缓冲液流过柱,以移去在洗涤期间在柱保持结合的核酸。在洗涤步骤期间核酸(例如大核酸)优先结合至柱将产生富含大核酸的洗脱液和富含小核酸的洗涤缓冲液。因此,洗脱液中大核酸的回收率的增加表明,洗涤缓冲液流通物富含小核酸。

[0100] 在一些实施方案中,控制洗涤缓冲液与样品体积的比率,以稳定在洗涤步骤期间大核酸与二氧化硅的结合,其允许将较小核酸回收在洗涤缓冲液中(例如,在将大核酸洗脱在洗脱缓冲液中前)。在一些实施方案中,洗涤缓冲液体积:样品缓冲液体积比为0.7:1、0.6:1、0.5:1、0.4:1、0.3:1。此外,在一些实施方案中,洗涤缓冲液包含乙醇(例如,50-60%乙醇(例如70%乙醇))。在一些实施方案中,洗涤缓冲液包含Tween-20、乙醇和MgCl₂(例如,在一些实施方案中,洗涤缓冲液包含10% Tween-20、15%乙醇和20 mM MgCl₂)。在一些实施方案中,以0.5:1、0.4:1或0.3:1的比率使用70%乙醇;在一些实施方案中,以0.5:1或0.4:1的比率使用包含Tween-20、乙醇和MgCl₂的缓冲液。

[0101] 4. 通过甲基化DNA免疫沉淀(MeDIP)富集

该技术的一些实施方案包括使用对核酸具有亲和力的二氧化硅柱(例如,DNA结合柱,例如如商业提供的Qiagen循环核酸试剂盒)连同使用甲基化DNA免疫沉淀(“MeDIP”)与抗体包被的颗粒,其可以用磁场(例如,抗体包被的顺磁性颗粒或抗体包被的磁性颗粒)捕获。具体地,包括使用MeDIP的方法包括将来自基于二氧化硅的分离方法的洗脱物(例如,来自Qiagen循环核酸试剂盒的洗脱物)与用识别甲基化DNA的抗体官能化的珠粒(例如,可以用磁场捕获的抗体包被的颗粒(例如,抗体包被的顺磁性颗粒或抗体包被的磁性颗粒))温育。具体地,识别甲基化DNA上的5-甲基胞嘧啶部分的抗体由于胎儿DNA相对于母体DNA的高甲基化而选择性捕获母体血液中的胎儿DNA。然后,在一些实施方案中,方法还包括从二氧化硅柱洗脱高甲基化胎儿DNA,例如通过在过量5-甲基胞嘧啶存在下洗脱以提供竞争性结合,使用热变性和/或失活抗甲基化DNA抗体,使用化学抗体变性和/或失活(例如,使用甲酰胺、离液剂、pH、洗涤剂,表面活性剂或离子液体)或使用物理变性过程(例如超声处理(例如,在KHz范围内),超声波处理(例如,在MHz范围内),珠粒打击和/或机械搅动(例如,使用涡旋器或其它装置,诸如Eppendorf EpiMotion),例如在溶剂和/或佐剂存在下)。一些实施方案还

包括纯化富集的胎儿核酸级分(例如,使用基于珠粒或基于柱的方法,诸如一些PCR清洗方法)和/或包括通过用Klenow片段和dNTP(例如,如商业提供的Invitrogen BioPrime随机引发试剂盒)随机引发的低水平、全基因组扩增(WGA)。在一些实施方案中,包括使用二氧化硅柱(例如,DNA结合柱)和MeDIP的方法提供了从随机引发扩增反应扩增约50倍至100倍的cffDNA和约2 μ g至5 μ g的预期产量的随机引发和扩增的胎儿DNA,而不在基因组呈现中引入序列扩增偏差(例如,导致不平衡的标记物覆盖)或偏差。

[0102] 5. 通过尺寸排阻富集

在一些实施方案中,该技术提供其中二氧化硅捕获与尺寸排阻、层析法和/或微透析方法结合的方法的实施方案。例如,在一些实施方案中,方法包括使用超滤,例如具体地使用离心样品浓缩器(例如,Amicon、CentriCon),其通过基于分子量的尺寸排阻截止值(例如范围为约10,000至30,000道尔顿的分子量截止值)富集小核酸(例如,DNA和/或RNA)。因此,在一些实施方案中,柱流通物中存在小核酸(例如胎儿DNA、其它小DNA和/或小RNA)。在一些实施方案中,方法包括使用尺寸排阻层析吸附柱(例如,G-25、G-50、G-100等),其中小核酸保留在多孔层析介质中并且不存在于高分子量流通物中,其代表柱空隙体积。在一些实施方案中,方法包括胎儿核酸的微透析,随后为稀释剂交换缓冲液回收和样品中低分子量核酸的浓缩。具体地,在一些实施方案中,方法采用使用具有约10,000至30,000道尔顿的标称分子量截止范围的透析膜,随后是二氧化硅膜再捕获、旋转蒸气交换缓冲液浓缩、真空浓缩(例如,通过Speed-Vac品牌真空浓缩器或等效物)、离心蒸发(例如,通过Speed-Vac品牌真空浓缩器或等效物)和/或乙醇沉淀,以捕获来自微透析过滤交换缓冲液的渗透物。

[0103] 6. 同步阻力变化系数(SCODA)尺寸分析

在一些实施方案中,使用包括通过同步阻力变化系数(SCODA)分离的方法,例如如商业产品诸如Boreal Genomics (Vancouver, BC)的Aurora系统中所实施,从样品富集、分离或获得小核酸。该方法基于核酸(例如DNA和/或RNA)对电泳场的非线性响应,其引起它们在某些类型的叠加、旋转电场下相对于其它组分漂移。参见,例如,Pei, 等人(2009)“Nonlinear electrophoretic response yields a unique parameter for separation of biomolecules” *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 106 (35): 14796。

[0104] 7. 基于固相可逆固定(SPRI)珠粒的尺寸分析

在一些实施方案中,使用包括固相可逆固定(SPRI)的方法,例如在固体支持物例如珠粒上,从样品中富集、分离或获得小核酸。参见,例如,DeAngelis等人(1995)“Solid-phase reversible immobilization for the isolation of PCR products” *Nucleic Acids Res.* 23 (22):4742。SPRI珠粒包含在被包裹的聚苯乙烯核心和涂覆有羧酸基团的外部聚合物表面之间的顺磁性磁铁矿层。羧酸基团在拥挤剂(例如,聚乙二醇(PEG),例如以每体积20重量%) and 盐(例如2.5M NaCl)存在下可逆地结合核酸(例如DNA和/或RNA)。拥挤剂促进核酸与珠粒表面上的羧基结合。

[0105] 调整PEG浓度和/或珠粒:总核酸比率以进行尺寸选择,例如针对小核酸富集样品。随着PEG浓度和珠粒:核酸比率变化,溶液中结合和/或残留的片段的长度变化。通常,溶液中PEG和盐的浓度越高,截止尺寸越小。尽管大于截止值的片段(例如,基于溶液条件,例如PEG和/或盐浓度)与珠粒结合,因此从样品中移去,但小于截止值的片段保留在缓冲液中。在一些情况下,术语“反向SPRI”是指使用SPRI珠粒以便将小核酸、而不是与珠粒结合的长

核酸回收在缓冲液中。包括SPRI技术的一些示例性商业产品是例如来自Beckman的Ampure XP珠粒。

[0106] 该技术可适于一系列截止值用于区分小DNA与大DNA。例如,可以调整PEG浓度以提供所需截止值(例如,使用4至5%、例如4.0%、4.1%、4.2%、4.3%、4.4%、4.5%、4.6%、4.7%、4.8%、4.9%或5.0%的PEG(例如,PEG 8000)浓度)。因此,实施方案提供用于针对小DNA富集样品的方法,其中小DNA是具有小于长度截止值1000、900、800、700、600、500、400、300、275、250、225、200、175、150、125、100、75或50个碱基对、碱基或核苷酸的长度的DNA。在一些实施方案中,输出样品中的小于长度截止值的片段尺寸的分布和相对丰度以及输入样品中的小于长度截止值的片段尺寸的分布和相对丰度是相同的或类似的。在一些实施方案中,使用较高浓度的PEG(例如PEG 8000),例如15%至20%(例如15%、16%、17%、18%、19%或20%)。

[0107] 在一些实施方案中,相对于较大DNA,PEG(例如PEG 8000)浓度调节较小(例如较低分子量)DNA的回收(图3)。例如,5.1% PEG的浓度产生约600bp、碱基或nt的回收率截止值 - 例如大于600bp、碱基或nt的核酸与珠粒结合并从样品移取;小于600bp、碱基或nt的核酸保留在样品中,然后针对小于600bp、碱基或nt的小核酸将其富集。此外,4.8% PEG的浓度产生约1000bp、碱基或nt的回收率截止值 - 例如大于1000bp、碱基或nt的核酸与珠粒结合并从样品移取;小于1000bp、碱基或nt的核酸保留在样品中,然后针对小于1000bp、碱基或nt的小核酸将其富集。

[0108] 在一些实施方案中,SPRI珠粒可用于手动尺寸分级,包括移液、混合、离心和转移步骤;并且在一些实施方案中,SPRI珠粒可用于自动化SPRI尺寸分级,例如使用Beckman Coulter Genomics SPRI-TE NGS机器人技术,其适用于许多用于样品制备的仪器,诸如可得自Precision System Science的仪器。在一些实施方案中,方法包括确定用于SPRI珠粒表面上尺寸特异性核酸沉淀的所需截止值(例如,适当的小片段和大片段之间)的离子强度(例如,NaCl浓度)和PEG浓度的步骤。

[0109] 8. 基于电泳的尺寸分析

在一些实施方案中,使用包括基于电泳的尺寸调整的方法从样品富集、分离或获得小核酸。在一些实施方案中,电泳与其它富集方法诸如本文讨论的二氧化硅基质方法组合使用。用于基于尺寸的电泳富集的商业装置包括Sage Sciences的Pippin Prep,其包括使用琼脂糖凝胶电泳。这些系统可以针对具有50bp、碱基或nt的最小尺寸到8000bp、碱基或nt至50,000bp、碱基或nt的最大尺寸的核酸进行选择。另一种示例性商业产品基于核酸的毛细管电泳高分辨率尺寸选择(例如,Caliper LabChip XT)。

[0110] 9. 在磁珠上同时阴离子交换和尺寸排阻

在一些实施方案中,使用方法从样品富集、分离或获得小核酸,所述方法包括在包含胺(例如弱胺)阴离子交换官能团的磁珠和包含导致微米和亚微米尺寸的孔的表面不规则物的珠粒上优先捕获小核酸(参见例如,实施例4)。

[0111] 例如,在一些实施方案中,该技术利用尺寸排阻(例如,作为表面和/或内部不规则物(例如,孔和/或空腔)的结果)和阴离子交换(例如,作为官能化表面和/或内部的结果)的组合以选择性结合、释放和纯化靶核酸(例如,所选尺寸范围的核酸);尽管本发明不限于任何特定的作用机制,并且作用机制的理解不是实施本发明所必需的。在一些实施方案中,微

粒是磁性的,含有允许核酸的阴离子交换的官能团,并且包含允许核酸的尺寸选择性粘附和/或释放的不规则表面特征(例如孔)。在一些实施方案中,磁性颗粒允许例如操纵微粒(例如,有或没有粘附的核酸)。

[0112] 在一些实施方案中,使用强阳离子交换官能团,诸如季胺,例如作为阴离子交换官能团。额外的强阴离子交换官能团是本领域技术人员已知的。

[0113] 在其它实施方案中,弱阴离子交换官能团是合适的阴离子交换官能团,诸如聚乙烯亚胺、带电芳族胺、二乙基氨基甲基或二乙基氨基乙基。这样的官能团具有9.0或更大的pKa值。

[0114] 在一些实施方案中,微粒的制造方法在颗粒表面上和颗粒和/或颗粒簇内产生不规则物(例如,微米或亚微米尺寸的孔或空腔)。由于尺寸排阻性质,微粒上的结构不规则物(例如,孔)粘附靶核酸产物(例如,所需尺寸或尺寸范围,例如小核酸),而不粘附非靶核酸(例如,非靶尺寸的核酸(例如较大基因组核酸))。在一些实施方案中,表面和/或内部不规则物(例如,孔)用结合核酸的弱阴离子交换官能团官能化。

[0115] 在一些实施方案中,靶核酸和非靶核酸都粘附至多孔微粒,但提供和/或调整条件以控制小核酸的结合和释放以提供富集的样品。

[0116] 在某些实施方案中,本文提供的组合物和方法允许使用者减少来自样品的大量背景核酸(例如大核酸诸如基因组核酸)。

[0117] 在一些实施方案中,本技术提供组合物,其包含具有包含空腔和/或其它表面不规则物的表面的微粒(例如,珠粒,例如磁珠)和/或包含两种或更多种所述微粒的聚集物,所述聚集物包含开口,其中所述表面、空腔、开口和/或其它表面不规则物/孔:a)用弱阴离子交换官能团官能化;和b)尺寸适合从较大核酸分子排除较小核酸分子。在一些实施方案中,较大核酸分子包含或衍生自人类基因组核酸。在一些实施方案中,组合物还包含与孔结合的较小核酸分子。在一些实施方案中,微粒是铁颗粒。在一些实施方案中,弱阴离子交换官能团是胺。在一些实施方案中,氨基是伯、仲或叔烷基胺。在一些实施方案中,胺具有大于9的pKa。在一些实施方案中,组合物包含多个所述微粒。

[0118] 10. 技术的组合

在一些实施方案中,该技术包括例如以同时和/或相继组合使用从二氧化硅优先洗脱小核酸、大核酸优先保留在二氧化硅上、用可以用磁场捕获的抗体包被的颗粒(例如,抗体包被的顺磁性颗粒或抗体包被的磁性颗粒)通过MeDIP富集、通过尺寸排阻富集、通过SCODA富集、通过基于SPRI珠粒的尺寸分析的富集、通过基于电泳的尺寸分析来富集以提供小核酸(例如,DNA(例如,cfDNA)和/或RNA)的样品用于分析和/或在包含胺(例如弱胺)阴离子交换官能团且包含导致微米和亚微米尺寸孔的表面不规则物的磁珠上优先捕获小核酸中的一种或多种。在一些实施方案中,将基于二氧化硅的富集方法与一种或多种其它富集方法结合以提供用于分析的样品。在一些实施方案中,将两种或更多种技术相继应用于样品,并且在一些实施方案中,同时应用两种或更多种技术。例如,在一些实施方案中,用于从二氧化硅优先洗脱小核酸的方法与用于通过二氧化硅优先保留大核酸的方法同时使用。在一些实施方案中,在固体支持物(例如珠粒、柱(例如亲和柱)、微板等,其包含对于甲基化DNA特异性的试剂(例如,抗体))上直接进行MeDIP。在一些实施方案中,同时应用两种或更多种技术,并且相继应用额外技术。

[0119] 11. 样品的集合

该技术不限于针对小核酸(例如DNA)采集和富集的样品。例如,在一些实施方案中,样品是生物样品(例如,取自受试者),诸如例如尿液样品、脑脊液(CSF)样品或腹膜液样品。

[0120] 在一些实施方案中,取血液样品。根据医院或诊所通常遵循的标准方案进行血液收集。例如,在一些实施方案中,收集适当量的外周血,例如通常在5ml至50ml之间,并且可以在进一步制备前根据标准程序储存。可以使用例如全血、血清或血浆进行在血液中发现的核酸的分析。从血液制备血清或血浆的方法是本领域技术人员众所周知的。例如,可以将血液放置在含有EDTA或专门商业产品诸如Vacutainer SST (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ)的管中以防止血液凝结,然后通过离心从全血获得血浆。在一些实施方案中,在血液凝结后用或不用离心获得血清。在包括使用离心的实施方案中,通常以适当的速度(例如1500至3000 × g)进行离心。可以将血浆或血清进行额外的离心步骤,然后转移至新鲜管用于提取核酸。除了全血的无细胞部分之外,还可从细胞级分回收核酸,其富集于血沉棕黄层部分,其可以在从女性离心全血样品和去除血浆后获得。

[0121] 存在许多已知的用于从包括血液的生物样品提取DNA的已知方法。可以遵循DNA制备的一般方法(例如,由Sambrook and Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*第3版, 2001描述);各种市售的试剂或试剂盒,诸如QiaAmp DNA Mini试剂盒或QiaAmp DNA Blood Mini试剂盒(Qiagen, Hilden, Germany)、GenomicPrep™血液DNA分离试剂盒(Promega, Madison, Wisc.)和GFX™基因组血液DNA纯化试剂盒(Amersham, Piscataway, N.J.)也可用于从血液样品获得核酸。也可以使用这些方法中的多于一种的组合。

[0122] 例如,在与测试胎儿核酸相关的实施方案中,在适合于使用非侵入性诊断方法进行测试的孕龄从孕妇获得血液样品。合适的孕龄可能根据测试的病症而变化。

[0123] 12. 测试

该技术适用于测试生物样品、例如血液中的小核酸,例如用于肿瘤学、感染性疾病、胎儿监测和测试等。

[0124] 在一些实施方案中,该技术涉及通过检测与受试者中的遗传病状相关的遗传标记物的存在或不存在来遗传学检测受试者。在一些实施方案中,该技术涉及通过检测与受试者中的感染性实体相关的核酸的存在或不存在来测试受试者中感染性实体(例如,细菌、病毒、真核生物病原体等)的存在。

[0125] 在一些实施方案中,该技术包括通过检测与胎儿中的遗传病状相关的遗传标记物的存在或不存在来非侵入性遗传测试胎儿。例如,该技术考虑通过检测从胎儿的母体宿主获得的生物样品中遗传标记物的存在或不存在来检测胎儿中遗传标记物的存在或不存在。遗传标记物的存在或不存在表明遗传病况的存在或不存在。此外,在一些实施方案中,该技术提供检测来自胎儿的母体宿主的样品中胎儿核酸的存在,然后针对与疾病或病状相关的遗传标记物的存在或不存在来测试检测的胎儿核酸。

[0126] “遗传标记物”是指已知与疾病或病状相关的任何遗传标记物,例如SNP、CNV、基因、等位基因、增强子、基因座、序列等。在一个实施方案中,遗传标记物位于母体宿主的生物样品中的无细胞胎儿DNA中保留的染色体位置。在一些实施方案中,通过检测位于仅一个染色体位置的标记物的存在或不存在来在胎儿中检测病状。在其它实施方案中,通过检测

一个或多个染色体位置和/或基因中多于一种遗传标记物,例如两种、三种、四种、五种或更多种标记物的存在或不存在在胎儿中检测病状。在一些实施方案中,遗传标记物可以是一个或多个染色体位置或基因中的突变。该突变可以是本领域已知的插入、缺失、移框、取代或任何其它突变。遗传标记物的存在或不存在可以通过本领域已知的任何方法测定,例如核酸测序、杂交、内切核酸酶消化和/或PCR。在一些实施方案中,在RNA中检测遗传标记物(例如, RNA中存在突变)和/或定量RNA的量并且其指示疾病或病状(例如, RNA的量指示基因或遗传标记物的过表达或低表达)。

[0127] 在一些实施方案中,可以在从源自胎儿的母体宿主的全血样品的富集的胎儿核酸中检测到一种或多种遗传标记物的存在或不存在。举例来说,全血样品可以取自胎儿的母体宿主,并且如本文所述富集,以获得富集的胎儿核酸的样品。然后通过本领域已知的任何方法(例如,核酸测序或PCR)测试富集的胎儿核酸,例如,以检测在一个或多个染色体位置内遗传标记物的存在或不存在和/或基因表达的量(例如RNA量)。通过该方法进行的胎儿测试的结果可以与源自母体的未富集的全血的相同测试或含有母体核酸的较大尺寸的分级核酸或在怀孕前获得自母体宿主的核酸样品进行进一步比较,以证实在胎儿核酸、而不是母体核酸中检测到遗传标记物的存在或不存在。待检测的遗传病状可以是任何病状。

[0128] 在一些实施方案中,该技术可用于确定胎儿的性别。在具体实施方案中,该技术可用于检测母体血液中Y染色体的存在或不存在。例如,一些实施方案提供Y染色体和/或其它Y染色体相关基因座(例如序列)诸如DYS、DYZ和/或DAZ的性别决定区域(SRY)的检测。这样的测试在怀孕第6周后具有大于99%特异性和灵敏性,并且在妊娠第8周后达到超过99.9%特异性和灵敏性。在一些实施方案中,女性性别的确定与病状诸如X连锁遗传异常(例如杜氏肌营养不良症和血友病)的不存在相关。

[0129] 在一些实施方案中,该技术可用于检测具有显性父系继承模式的单基因疾病。在这样的疾病中,母体基因组不具有与疾病相关的等位基因,因此其检测指示胎儿中存在该疾病。这样的病状的实例是亨廷顿氏病、软骨发育不良、肌强直性营养不良和Apert综合征。

[0130] 在一些实施方案中,富含胎儿来源的核酸的核酸的靶向测序提供针对目标突变、等位基因等的胎儿基因组的非侵入性检测。在一些实施方案中,该技术提供胎儿基因组的测序。

[0131] 在一些实施方案中,该技术可用于确定胎儿-母体ABO(例如血型)和/或Rh因子相容性。例如,一些实施方案提供Rh血型D-抗原基因(RHD)的测试,例如通过靶向RHD的外显子4、5、7和10,RHD假基因和用于性别确定的序列(例如,Y染色体的SRY区域)。

[0132] 本技术的方法也可用于检测非整倍性(包括单体或三体)的存在或不存在。例如,当前技术的方法可用于核型分析,例如,用于检测三体13、14、15、16、18、21、22、X和/或Y。在一个具体实施方案中,通过测量位于染色体21 q22.2-21q22.3的DCR基因、位于染色体21q22.2-21q22.3的CBS基因、在21q22.3-21q22.3的KNO基因和/或在染色体21 q22.1-21q22.1的SOD1基因或其任何组合来检测三体21。

[0133] 测定胎儿核酸,例如,在一些实施方案中通过探针杂交(FISH等),PCR,测序(例如,下一代测序),数字计数(例如,通过下一代测序);参见例如Chiu等人(2010)“Maternal plasma DNA analysis with massively parallel sequencing by ligation for noninvasive prenatal diagnosis of trisomy 21” *Clin Chem* 56:459-63),核酸酶消

化,探针延伸,显微镜,数字PCR,实时PCR,定量PCR,染色(例如核型分析和条带分析)等。在一些实施方案中,测定表观遗传状态,诸如甲基化和组蛋白组成。

[0134] 在一些实施方案中,测试包括检测与正常整倍体胎儿相比小部分过量的核酸(例如,如非整倍性(例如,三体)所示)。在这些测试中,三体检测区分混合物中3个拷贝的染色体或染色体片段与2个拷贝的染色体或染色体片段,在所述混合物中约90%的样品是整倍体(例如二体)。在一些实施方案中,与正常胎儿相比,胎儿三体(例如,涉及染色体13、18、21、X、Y或另一染色体)中核酸的分数增加为1.05或更小(即,对于三体,21个总拷贝,相比之下,对于整倍体,20个拷贝)。在一些实施方案中,比率为1.04或更低、1.03或更低或1.02或更低。

[0135] 在一些实施方案中,胎盘特异性核酸(RNA(例如mRNA)或DNA)的特定等位基因的比率用于检测非整倍体;在一些实施方案中,特定胎儿特异性甲基化标记物的比率用于检测非整倍体。

[0136] 在一些实施方案中,通过分子计数检测非整倍体。在一些实施方案中,通过单分子分析来检测非整倍体,例如以计数存在于非整倍体染色体中的核酸相对于以整倍体(例如正常)数目存在的剩余染色体的分数过量或缺。

[0137] 在一些实施方案中,测量等位基因比率(例如,一个等位基因相对于另一等位基因的数量),并且2:1的比率表示非整倍体。在一些实施方案中,将一条染色体的拷贝数与基因组中一条或多条其它染色体的拷贝数进行比较。使用这种方法,三体非整倍体染色体与二倍体整倍体染色体的比率预期为3:2(1.5的值),且单体非整倍体染色体与二倍体整倍体染色体的比率预期为1:2(0.5的值)。

[0138] 在背景二倍体母体DNA的存在下(例如,如大多数母体DNA血浆样品中),三体的比率小于1.5,但大于1,且单体的比率大于0.5,但小于1。在具有大量的背景母体核酸的样品中(例如,在包含约10%或小于10%(例如5或6%)胎儿核酸的未富集的样品中),这些值接近1.0(例如,对于三体,略大于1.0,对于单体,略小于1.0)。由于样品中胎儿核酸的量与背景母体核酸成比例增加(例如,在如本技术提供的富集样品中),三体非整倍体染色体与二倍体整倍体染色体的比率接近1.5,且单体非整倍体染色体与二倍体整倍体染色体的比率接近0.5。因此,本文所述的富集技术提供用于检测非整倍体的改进方法,因为指示非整倍体的比率(例如,更接近1.5或0.5的值)比指示非富集样品中指示非整倍体的比率(例如,对于三体和单体,更接近1.0,因此不太容易区分)更加不同于整倍体1.0比率(并且因此更容易检测)。

[0139] 通过计数大于样品中噪声的统计学上可预测的阈值的许多染色体(或例如染色体标记物、等位基因、基因等)来检测非整倍体染色体的过表达或低表达。

[0140] 在母体血液中,大多数无细胞DNA源自母体,其通常具有正常的基因型(例如,是整倍体)。对于三体胎儿,母体血浆中胎儿DNA的分数为 f ,三体染色体与整倍体染色体的的拷贝数比率为 $1 + f/2$,且三体染色体的拷贝数和参考染色体的拷贝数 r 之间的差异为 $rf/2$ 。

[0141] 三体染色体中的这种分数增加是可检测的,条件是计数的分子数量提供信号相对于噪声的分辨率,其根据泊松分布(例如,假定泊松分布的正态近似且泊松分布与平均值 N 的方差为 N)和以下方程作为计数的平方根缩放:

$$r = \frac{4 \left(a\sqrt{2} + b\sqrt{2 + \frac{f}{2}} \right)^2}{f^2} \quad (1)$$

其中f是母体血浆中胎儿核酸(DNA)的分数,r是参考染色体的拷贝数,且a和b提供如下:

$$a = \frac{c-0}{\sqrt{2r}} \quad (2a)$$

$$-b = \frac{c-(a-r)}{\sqrt{a+r}} \quad (2b)$$

其中c是用于检测参考染色体数r和异常染色体数a之间的差异的截止值(例如, $a - r > 0$)。值a和b分别与假阳性误差率和假阴性误差率相关。值a和r通过以下方程关联:

$$a = r \left(1 + \frac{f}{2} \right) \quad (3)$$

[0142] 根据这些方程1-3,需要计数的参考染色体的数量(r)取决于胎儿DNA分数(f)和灵敏度和特异性(与a和b相关)。因此,母体血液中胎儿核酸的分数越低,区分非整倍体与整倍体所需的数量越多。并且,因此,母体血液中胎儿核酸的分数越高(例如,以相同给定的灵敏度和特异性),区分非整倍体与整倍体所需计数越少(例如,较少的数字PCR反应,较少的测序反应和较少的序列信息等)。参见例如,Fan, Hei-Mun Christina, Stephen Ronald Quake, Russ Altman, and Markus Covert, "Molecular Counting: From Noninvasive Prenatal Diagnostics to Whole-Genome Haplotyping" Thesis (Ph.D.) - Stanford University, 2011,其通过引用全文并入本文。

[0143] 在一些实施方案中,通过数字PCR进行染色体计数。在一些实施方案中,通过测序进行染色体计数。在一些实施方案中,通过荧光原位杂交或其它基于探针的方法进行染色体计数。在一些实施方案中,通过定量荧光PCR进行染色体计数。在一些实施方案中,将淀粉样蛋白基因(代表染色体21的拷贝数)的数目与GAPDH基因的数目(代表参考染色体(染色体12)的拷贝数)进行比较。任何人染色体的其它染色体标记物和单体型是本领域已知的。

[0144] 在一些实施方案中,该技术包括获得、富集和/或分离小核酸(例如小DNA(例如,cfDNA)和/或RNA),和测试小核酸以及进行一种或多种其它测试诸如羊膜穿刺、绒毛膜绒毛取样、胎盘活检、脐带穿刺、细胞遗传学诊断、颈部半透明筛选、生物化学参数的评估(例如人绒毛膜促性腺激素、怀孕相关血浆蛋白、甲胎蛋白、游离雌三醇、抑制素A、胎儿生物测定等)。

[0145] 在一些实施方案中,从评价母体血液中存在的胎儿核酸获得的信息用于告知对胎儿的产前干预和/或医疗护理递送。在一些实施方案中,从评价母体血液中存在的胎儿核酸获得的信息表明对儿童的分娩后干预和/或医疗护理递送。

[0146] 在一些实施方案中,该技术涉及针对癌症测试受试者。与癌症相关的遗传异常(例如体细胞DNA突变诸如单碱基取代、插入、缺失和易位(例如,基因融合、基因扩增和/或杂合性损失))为癌症提供经检测和监测以诊断和治疗癌症的特异性生物标记物。与癌症相关的肿瘤细胞将包含体细胞突变的核酸(例如,小核酸)释放到血液中(参见例如,Bettegomda, 等人(2014) "Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies" Sci Transl Med. 6(224): 224ra24,其通过引用全文并入本文)。在一些情况下,死亡中的肿瘤细胞将DNA的小片段释放到血液中,其有时被称为"无细胞循环肿瘤

DNA (ctDNA)”。因此,如本文中所使用,“ctDNA”是指与细胞或细胞片段不缔合并且提供与癌症相关的生物标记物的核酸的小片段。

[0147] 因此,在一些实施方案中,该技术涉及癌症生物标记物的非侵入性检测 - 例如,该技术提供检测样品中(例如,在血液中)的生物分子(例如小核酸,诸如小循环无细胞DNA)的方法,所述样品指示癌症的存在或指示癌症将发展的可能性。因此,该技术的实施方案被用作癌症诊断法(例如,评价癌症的风险;检测癌症的存在(例如,检测肿瘤、检测癌细胞、检测肿瘤);检测与癌症相关的遗传状态;确定未来发展癌症的倾向)。

[0148] 在一些实施方案中,该技术涉及检测来自患者样品的癌症的小核酸生物标记物和指示癌症的阶段(例如,I期、II期、III期或IV期)。在一些实施方案中,血液中小核酸癌生物标记物的量(例如,质量、浓度、重量(例如在绝对或相对方面))与癌症转移的量或癌症阶段相关(例如,包含癌症生物标记物的小循环无细胞DNA的血液中的浓度随着转移量和/或癌症阶段增加而增加)。在一些实施方案中,在具有转移性癌症的患者的循环中以相对高浓度发现包含癌症生物标记物的循环无细胞DNA(例如,ctDNA),并且在具有局部癌症的患者中以较低、但可检测的浓度检测到包含癌症生物标记物的循环无细胞DNA(例如,ctDNA)。

[0149] 在一些实施方案中,定量和监测包含癌症生物标记物的小循环无细胞DNA的水平指示癌症的进展和/或阶段。在一些实施方案中,该技术提供监测肿瘤进展和测试肿瘤对药物治疗的反应。在一些实施方案中,该技术可用于监测被靶向药物治疗的患者和/或检测复发和/或提供涉及对用于癌症治疗的一种或多种药物的抗性的遗传基础的信息。

[0150] 在一些实施方案中,该技术提供胰腺、卵巢、结肠直肠、膀胱、胃食管、乳腺、黑色素瘤、肝细胞和/或头颈癌的检测、诊断、监测和/或治疗。在一些实施方案中,该技术提供脑、肾、前列腺和/或甲状腺癌的检测、诊断、监测和/或治疗。在一些实施方案中,在不包含可检测的循环肿瘤细胞的患者样品中可检测到包含癌症生物标记物(例如,ctDNA)的小循环无细胞DNA。在一些实施方案中,在包含可检测的循环肿瘤细胞的患者样品中可检测到包含癌症生物标记物(例如,ctDNA)的小循环无细胞DNA。在一些实施方案中,在不包含癌症的可检测蛋白生物标记物的患者样品中可检测到包含癌症生物标记物(例如,ctDNA)的小循环无细胞DNA。

[0151] 在一些实施方案中,根据本文提供的技术分离小循环无细胞DNA,并且使用例如扩增(例如PCR)、测序(例如,靶向测序、外切割测序和/或全基因组测序)、单碱基延伸、杂交等检测癌症生物标记物,以鉴定与癌症相关的突变(例如,检测或鉴定生物标记物)。

[0152] 与特定癌症相关的癌症生物标记物是本领域已知的(参见例如,Schwarzenbach, 等人(2011)“Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients”, Nature Reviews Cancer 11, 426-437,其通过引用全文并入本文)。例如,KRAS、BRAF、NRAS和PIK3CA是已知的体细胞癌生物标记物。其它示例性体细胞癌和/或肿瘤生物标记物包括但不限于ALK、B-raf、EGFR、K-ras、N-ras、AKT1、PIK3CA、Her2、FGFR1、FGFR2、FGFR3、MEK、c-Met、PTEN、ROS-1、DDR、RET和c-kit。

[0153] 在一些实施方案中,该技术涉及检测与结肠直肠癌相关的Septin 9生物标记物的存在或甲基化状态 - 在一些实施方案中,检测Septin 9启动子区域的甲基化(例如,在包含Septin 9启动子区域的小循环无细胞DNA中)提供患者中的结肠直肠癌的检测。在一些实施方案中,该技术提供Septin 9小循环无细胞DNA的分离。

[0154] 在一些实施方案中,与癌症相关的小核酸生物标记物提供涉及癌症预后(例如,小核酸生物标记物提供涉及癌症阶段的信息)、癌症诊断、癌症疗法的选择(例如外科手术、放射疗法、化疗、其它药物疗法等)和/或预测受试者对癌症疗法的反应的信息。

[0155] 13. 受试者

此外,在一些实施方案中,该技术可用于处理获得自受试者的样品,例如获得自受试者(例如,怀孕的母亲、肿瘤患者、具有或怀疑具有感染性疾病的受试者)的血液,用于分析受试者或孕育胎儿的状态(例如遗传状态、癌症状态、感染状态)。

[0156] 在一些实施方案中,基于与受试者的年龄相关的风险因素选择和/或测试受试者。具体地,一些遗传性病症(例如在孕育胎儿或受试者中(例如受试者中的癌症或肿瘤))的发生率随着受试者的年龄而增加。

[0157] 在一些实施方案中,受试者具有大于30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49或50岁的年龄。在一些实施方案中,基于先前侵入性或非侵入性测试(诸如超声波、羊膜穿刺术、绒毛膜绒毛取样和测试等)的结果(例如,异常结果)来选择受试者。在一些实施方案中,一个或两个亲本具有已知的遗传异常(例如易位、倒置、点突变、插入、缺失等),因此提供用于从中选择受试者以收集和检测cffDNA的标准。在一些实施方案中,现有的儿童具有已知的遗传异常(例如易位、倒置、点突变、插入、缺失等),因此提供用于从中选择受试者以收集和检测同胞胎儿的cffDNA的标准。在一些实施方案中,这些风险因素中的两种或更多种的组合指示存在较高的风险,使得应当获得来自受试者怀孕母亲的血液并测试cffDNA。

实施例

[0158] 实施例1-通过反向SPRI富集小DNA片段

在开发本文提供的技术的实施方案期间,进行实验以使用SPRI测试样品中小核酸的富集。具体而言,使用SPRI珠粒从样品结合和去除大核酸,因此针对未结合的小核酸富集剩余液体样品(例如,“反向SPRI”)。使用包含核酸梯(E-凝胶25bp DNA梯,Life Technologies目录号10488095)的测试样品来评估核酸的回收,所述核酸梯尺寸为25 bp、碱基或nt;50 bp、碱基或nt;75 bp、碱基或nt;100 bp、碱基或nt;115 bp、碱基或nt;125 bp、碱基或nt;150 bp、碱基或nt;175 bp、碱基或nt;200 bp、碱基或nt;225 bp、碱基或nt;250 bp、碱基或nt;275 bp、碱基或nt;300 bp、碱基或nt;325 bp、碱基或nt;350 bp、碱基或nt;375 bp、碱基或nt;400 bp、碱基或nt;425 bp、碱基或nt;450 bp、碱基或nt;500 bp、碱基或nt;和2652 bp、碱基或nt。

[0159] 使用内部SPRI珠粒方案(Abbott Molecular (“AM”) SPRI)和两种商业试剂盒测试从样品回收片段。测试的商业试剂盒是Qiagen QIAamp循环核酸(CNA)试剂盒和Beckman Coulter Agencourt AMPure XP。用于富集小核酸(例如,50bp至500bp)的AM SPRI方案包括以下步骤。首先,使用去离子水将250ng测试样品(25bp梯)稀释至1ml。向该稀释的样品中加入750 μ l含有1 μ M羧基修饰的珠粒(Sera-Mag Magnetic SpeedBeads羧甲基修饰的,Thermo Scientific)(以1 mg/ml珠粒)的AM-结合-A缓冲液(18% PEG-8000, 1 M NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH ~8), 1 mM EDTA)(例如,样品:AM-结合-A的1:0.75比率),并通过上下抽吸约10次来充分混合。将该混合物在室温下温育约5分钟,并放置在磁架上约7分钟。将1.6ml

体积的上清液小心地转移至新管。向上清液中加入4ml AM-结合-B缓冲液(14% PEG-8000, 1.2 M NaCl, 6 mM Tris-HCl (pH ~8), 0.6 mM EDTA, 39%异丙醇)(上清液:AM-结合-B的1:2.5比率),并通过上下抽吸约10次来充分混合。将该混合物在室温下温育约10分钟,并放置在磁架上约7分钟。将管保持在磁架中,小心地吸出上清液并弃去。该管仍然保留在磁架中,将珠粒洗涤两次,每次洗涤使用300 μ l的75%乙醇。在第二次洗涤结束时,移去乙醇而不干扰珠粒。将珠粒空气干燥约5分钟,并使其离开磁架重新悬浮于50 μ l的低Tris-EDTA缓冲液(10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA (pH~8))中。将具有重新悬浮的珠粒的管放置在磁架上约1分钟。最后,将包含小DNA片段富集产物的上清液转移至新管,而不干扰珠粒(例如,移去约98 μ l的上清液而不是整个100 μ l)。将1 μ l体积的该上清液用于DNA片段分析,例如使用具有高灵敏度DNA芯片的Agilent的Bioanalyzer 2100。

[0160] 遵循由各个供应商提供的方案进行使用如上所述的测试样品和商业试剂盒(例如,Qiagen QIAamp循环核酸(CNA)试剂盒和Beckman Coulter Agencourt AMPure XP (Gel-free DNA尺寸选择))进行小DNA片段富集。最终产物用于DNA片段分析,例如使用具有高灵敏度DNA芯片的Agilent Bioanalyzer 2100。

[0161] 在实验期间收集的数据表明,使用AM SPRI有效地捕获具有100bp、碱基或nt或更小的尺寸的核酸(图1)。通过AMPure XP没有捕获到100 bp、碱基或nt或更小的核酸(图1)。图1显示以皮克计的输入样品中存在的每个片段尺寸(表的第一行)的量(表的第二行)以及使用三种富集方法回收的每个片段的量(表的第三、第四和第五行)。此外,与Qiagen QIAamp循环核酸试剂盒和AMPure XP试剂盒相比,通过AM SPRI方法更有效地捕获非常少量的样品。

[0162] 此外,通过这三种方法进行实验以评估小核酸的富集。具体地,通过将富集的样品中的小DNA的分数与包含核酸梯的输入测试样品进行比较来分析富集的样品。在用设计以便从人血浆或血清分离游离循环的DNA和RNA的商业试剂盒(Qiagen循环核酸试剂盒,图2B)和两种类型的SPRI珠粒(Beckman AMPure,图2C;AM SPRI,图2D)富集之前(图2A)和之后收集数据。使用凝胶电泳和凝胶图像的光密度分析,在富集之前和之后定量测试样品的每个片段的量。

[0163] 收集的数据显示,AMPure和AM SPRI方法都提供约150%的小片段(例如,小于500bp、碱基或nt)的富集(图2E)。具体地,输入测试样品包含20.2ng小于500bp、碱基或nt的DNA片段和32.0ng大于500bp、碱基或nt的DNA片段,其中小于500bp、碱基或nt的片段相对于大于500bp、碱基或nt的片段的比率为38.7%。通过AMPure富集的样品包含3.3 ng小于500bp、碱基或nt的DNA片段和0.1 ng大于500bp、碱基或nt的DNA片段,其中小于500bp、碱基或nt的片段相对于大于500bp、碱基或nt的片段的比率为97.0%。通过AM SPRI富集的样品包含11.6 ng小于500bp、碱基或nt的DNA片段和0.6 ng大于500bp、碱基或nt的DNA片段,其中小于500bp、碱基或nt的片段相对于大于500bp、碱基或nt的片段的比率为95.1%。这些数据表明通过AMPure方法富集150%,且通过AM SPRI方法富集146%。

[0164] 尽管AMPure和AM SPRI方法提供了小片段的类似富集,但AM SPRI方法产生了小片段的分布,其反映了比AMPure方法更均匀和一致地反映输入样品组成(比较图2A与图2C(AMPure)和图2D(AM SPRI))。收集的数据显示,AMPure方法提供了小片段的不均匀富集,并且没有富集少于75bp、碱基或nt的片段(比较图2A与图2C)。AM SPRI方法提供了小片段(包

括小于75bp、碱基或nt的片段)的更均匀富集(比较图2A与图2D)。

[0165] 实施例2 - PEG浓度有助于尺寸选择

在开发本文提供的技术的实施方案的期间,进行实验以评价作为用于大DNA的基于SPRI珠粒的耗竭的缓冲液中的PEG浓度的函数的小核酸的回收率。Magnamedics MagSi DNA-结合珠粒用于DNA结合,测试样品包含500ng DNA梯,且PEG 8000以5.1%、4.8%、4.5%和4.2%(体积重量)用于缓冲液中。收集的数据显示,降低PEG%降低了较小(例如较低分子量)DNA的回收率(图3)。4.5%和4.2% PEG的总产率非常低(图3)。5.1% PEG的浓度产生约600bp、碱基或nt的截止值,例如大于600bp、碱基或nt的核酸与珠粒结合并从样品移取;小于600bp、碱基或nt的核酸保留在样品中,然后针对小于600bp、碱基或nt的小核酸将其富集。4.8% PEG的浓度产生约1000bp、碱基或nt的截止值,例如大于1000bp、碱基或nt的核酸与珠粒结合并从样品移取;小于1000bp、碱基或nt的核酸保留在样品中,然后针对小于1000bp、碱基或nt的小核酸将其富集。

[0166] 实施例3 - 使用二氧化硅柱的尺寸选择

在开发本文提供的技术的实施方案期间,进行实验以测试洗脱缓冲液和洗涤缓冲液组分对从总体积DNA优先回收小核酸的影响。实验定量在各种的缓冲条件下结合和从二氧化硅洗脱之前和之后来自DNA梯的不同尺寸的核酸的量。

[0167] 输入样品是包含一定尺寸范围(约100bp、碱基或核苷酸至约8000bp、碱基或核苷酸)的DNA。使样品流过柱以使核酸与柱结合。然后用洗涤缓冲液洗涤柱(包含结合的核酸)。用洗涤缓冲液洗涤柱之后,一些DNA保持吸附至柱(例如,在洗涤条件下优先吸附大核酸),并且从柱中移取一些DNA并存在于洗涤缓冲液中(例如在洗涤条件下从该柱优先释放的小核酸)。然后,使洗脱缓冲液流过柱,以在洗涤期间从柱移取保持结合的DNA。因此,在洗涤步骤期间DNA(例如大DNA)优先结合至柱将产生富含大DNA的洗脱液和富含小DNA的洗涤缓冲液。因此,洗脱液中DNA的回收率的增加表明,洗涤缓冲液流通物富含小DNA。

[0168] 数据表明,通过调整洗涤缓冲液组分和/或浓度来提供尺寸选择。为了使用二氧化硅膜测试尺寸选择,测试洗涤缓冲液与样品体积的几种比率,以评价在洗涤步骤期间大DNA与二氧化硅的稳定结合,其允许在将大DNA洗脱在洗脱缓冲液中前将较小DNA回收在洗涤缓冲液中。测试两种洗涤缓冲液:70%乙醇(参见图4A)和包含Tween-20、乙醇和MgCl₂的洗涤缓冲液(例如,“T10/15/20”,其是包含10% Tween-20、15%乙醇和20 mM MgCl₂的洗涤缓冲液)(参见图4B)。以0.5:1、0.4:1和0.3:1的比率测试70%乙醇;以0.5:1和0.4:1的比率测试缓冲液T10/15/20。

[0169] 数据显示,当用70%乙醇的洗涤缓冲液以0.5:1的洗涤缓冲液:样品体积比和0.4:1的洗涤缓冲液:样品体积比洗涤柱时,洗脱液中DNA的回收率(基于%产率)增加(图4A)。使用70%乙醇作为洗涤缓冲液以0.3:1的洗涤缓冲液:样品体积比检测到洗脱液中DNA的较低回收率。因此,数据表明,以0.5:1的洗涤缓冲液:样品体积比和0.4:1的洗涤缓冲液:样品体积比,70%乙醇洗涤缓冲液富含小核酸,而以0.3:1的洗涤缓冲液:样品体积比则程度较小。

[0170] 类似地,数据显示,当用包含Tween-20、乙醇和MgCl₂的洗涤缓冲液(T10/15/20缓冲液)以0.5:1的洗涤缓冲液:样品体积比和0.4:1的洗涤缓冲液:样品体积比洗涤柱时,洗脱液中DNA的回收率(基于%产率)增加(图4B)。因此,数据表明,以0.5:1的洗涤缓冲液:

样品体积比和0.4:1的洗涤缓冲液:样品体积比,T10/15/20洗涤缓冲液富含小核酸。因此,包含Tween-20、乙醇和MgCl₂的洗涤缓冲液导致小核酸(例如,小于1000bp,例如小于500bp,例如小于300bp)相对于大核酸的富集。

[0171] 总之,这些实验证明通过SPRI方法(例如,“反向SPRI”)和柱上DNA尺寸选择来富集小DNA(例如小于200bp、碱基或nt的片段)。常规的SPRI清洗方案不能充分富集小核酸(例如,小于200bp、碱基或nt),同时使大DNA片段残留(例如大于200bp、碱基或nt)最小化。使用AM SPRI缓冲液和羧基修饰的磁珠提供了相对于常规SPRI小于75至100bp、碱基或nt的片段的更均匀富集,同时保持针对大于500bp、碱基或nt的大核酸的选择。此外,增加的PEG(8000MW)导致较小核酸的产率增加(4.8% PEG最小化或消除低于1000bp、碱基或nt的核酸的回收率;5.1% PEG最小化或消除低于600bp、碱基或nt的核酸的回收率)。调整洗涤缓冲液组成直接提供在二氧化硅吸附柱的表面上的尺寸选择。

[0172] 实施例4 - 通过阴离子交换和尺寸排阻的尺寸选择

在开发技术的实施方案期间,进行实验以比较使用具有粗糙表面的珠粒(例如,包含导致微米和亚微米尺寸孔的表面不规则的珠粒)和具有相对光滑(例如,更光滑)表面的珠粒针对小DNA的样品的富集。如本文中所使用,“具有不规则表面的珠粒”或“包含表面孔的珠粒”是指具有表面孔的颗粒(例如,核酸捕获颗粒),所述表面孔为适合于富集样品中的核酸的珠粒提供尺寸排阻性质(例如,仅目标尺寸的核酸、例如小核酸可及的孔)。例如,在一些实施方案中,“具有不规则表面的珠粒”或“包含表面孔的珠粒”是指包含尺寸为约1至10微米的孔的颗粒(例如,核酸捕获珠粒)或尺寸为约小于一微米的孔(例如,尺寸为约1至1000纳米或更小的尺寸的孔)。因此,如本文中所使用,“具有光滑表面的珠粒”是指不具有表面不规则物和/或不具有为适合于富集样品中的小核酸的珠粒提供尺寸排阻性质的表面孔的颗粒(例如,核酸捕获颗粒)。例如,在一些实施方案中,“具有光滑表面的珠粒”没有尺寸为约1至10微米的孔,例如在其中颗粒具有孔的一些实施方案中,孔具有大于约1至10微米的尺寸。在一些实施方案中,包含导致微米和亚微米尺寸孔的表面不规则物的珠粒还包含胺(例如弱胺)阴离子交换官能团。

[0173] 从毛细管电泳分析实验收集数据,其测量富集前含有12μg人DNA的PCR反应后的多核苷酸组分(例如,包含扩增子形式的小核酸)(图5,“输入”)。在胺磁珠存在下的4分钟温育允许小核酸(例如靶扩增子)的优先结合,而大部分背景DNA和引物不结合(图5,“未结合”)。三次洗涤(图5“W1”、“W2”和“W3”)后,小核酸(例如,靶扩增子)从珠粒洗脱,而剩下的背景DNA不以相对于其起始量显著的量洗脱(图5,“洗脱”)。这些数据表明,大多数非靶背景核酸不与胺磁珠结合,而靶小核酸被有效地结合和洗脱,因此提供富含小核酸的样品。

[0174] 此外,收集数据,其表明大核酸的充分去除与使用具有不规则表面轮廓的磁珠相关。具体地,将通过用胺基官能化并具有不规则表面轮廓的磁珠的核酸捕获与用胺基官能化并具有光滑表面轮廓的磁珠的核酸捕获进行比较。在一些实施方案中,不规则表面轮廓珠粒是由Bangs Laboratories商业销售的珠粒。在一些实施方案中,光滑表面轮廓珠粒是由Life Technologies商业销售的DynaI磁珠。

[0175] 在这些实验中,使用胺官能化的不规则表面和胺官能化的光滑表面珠粒在12μg人基因组DNA存在和不存在下分离纳摩尔浓度(例如,1至300纳摩尔)的小核酸(例如,150-bp扩增子DNA)。通过电喷雾离子化质谱(ESI-MS)分析所得样品(参见图6A和图6B;注意不同的

y-轴刻度)。如图6A中所示,通过不规则表面珠粒富集后通过ESI-MS检测的小核酸(平均扩增子幅度)随富集前样品中存在的小核酸的浓度而增加。对于仅包含小核酸的样品和对于在大量非靶背景核酸(12 μ g人基因组DNA)存在下包含小核酸的样品,都观察到这种现象。在大量非靶背景核酸(12 μ g人基因组DNA)存在下,检测到的最大信号(在300nM小核酸)为约100,000,而在非靶背景核酸不存在下,检测到的最大信号为约200,000-250,000。

[0176] 相比之下,在非靶背景核酸(12 μ g人基因组DNA)存在下,通过光滑表面珠粒富集后通过ESI-MS检测的小核酸(平均扩增子幅度)非常低,并且随着富集前样品中存在的小核酸的浓度增加而不增加(例如,对于在非靶背景核酸存在下测试的所有浓度的小核酸,幅度小于10,000)。此外,在非靶背景核酸不存在下,通过光滑表面珠粒富集之后通过ESI-MS检测的小核酸(平均扩增子幅度)达到最大值(约100,000-120,000),其为对于不规则表面珠粒检测到的值的约一半(例如,比较图6A和图6B)。因此,收集的数据表明,具有粗糙表面的珠粒(例如,包含导致微米和亚微米尺寸孔的表面不规则物的珠粒)相对于具有相对光滑表面的珠粒提供了小核酸样品的改善的富集。

[0177] 为了所有目的,上述说明书中提及的所有出版物和专利全文通过引用并入本文。该技术的所述组合物、方法和用途的各种修改和变化对于本领域技术人员将是显而易见的,而不脱离所述技术的范围和精神。尽管已经结合具体示例性实施方案描述了该技术,但应当理解,如请求保护的本发明不应不适当地限于这样的具体实施方案。实际上,对于本领域技术人员显而易见的用于进行实施本发明的所述模式的各种修改意在处于所附权利要求的范围内。

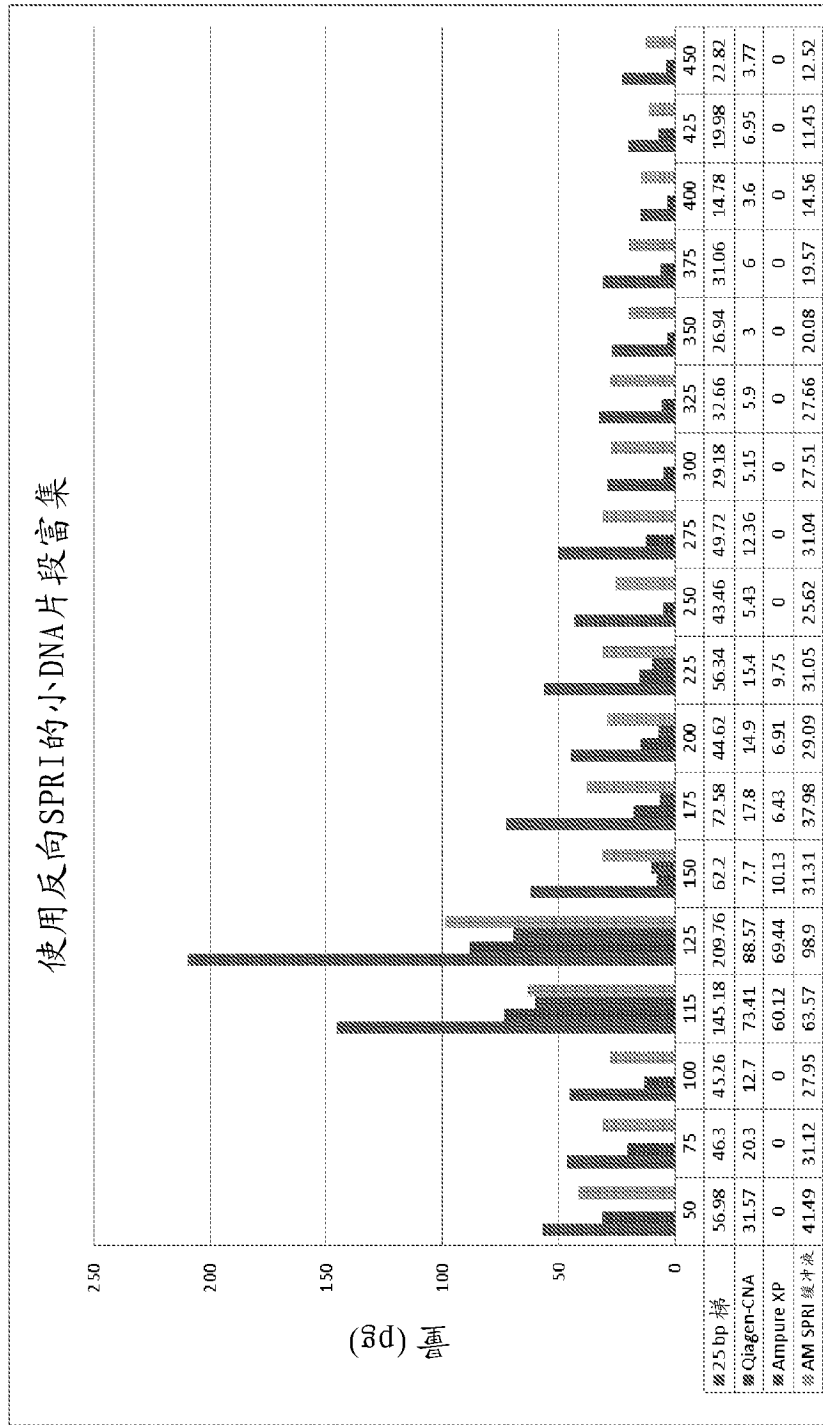


图 1

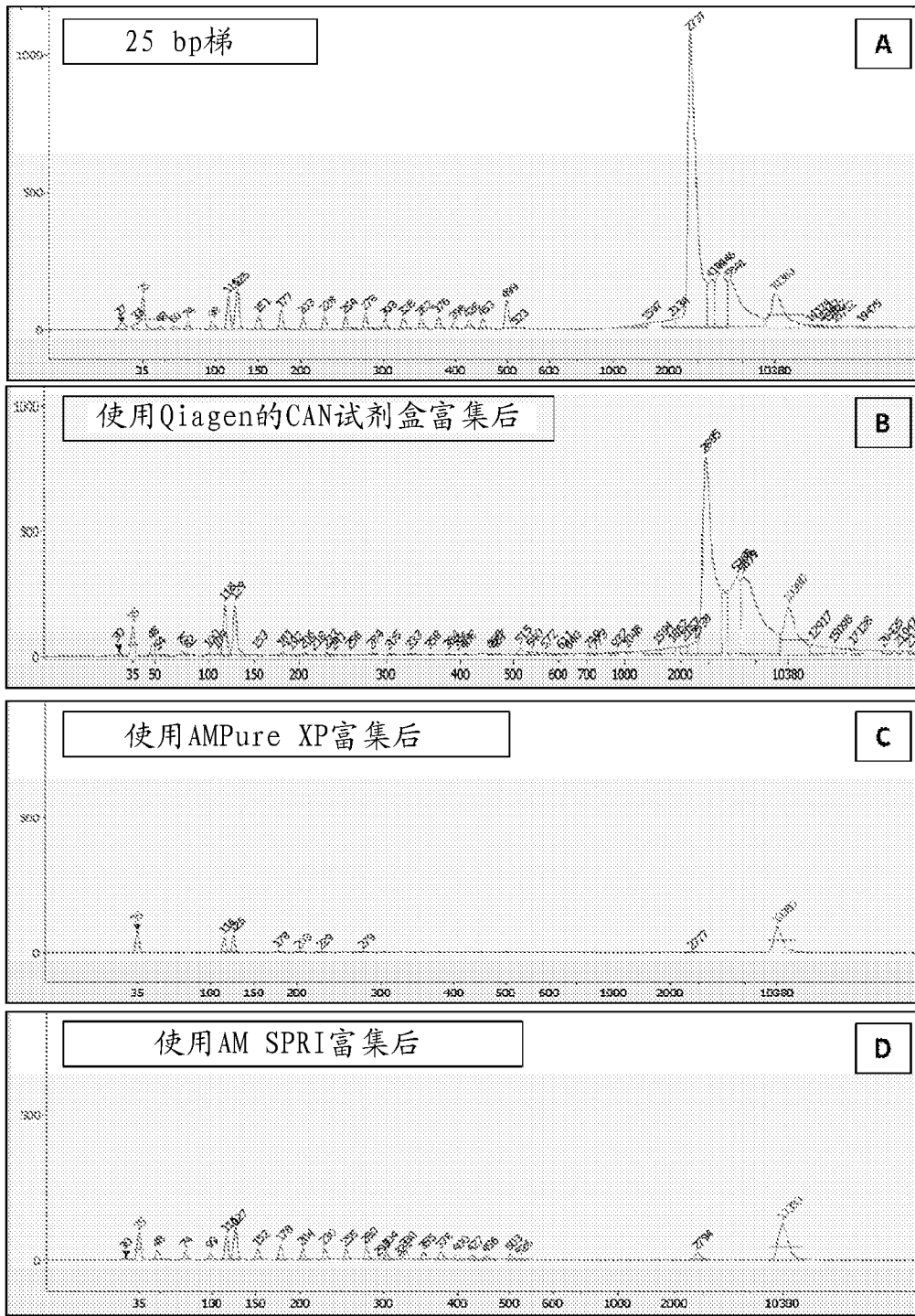
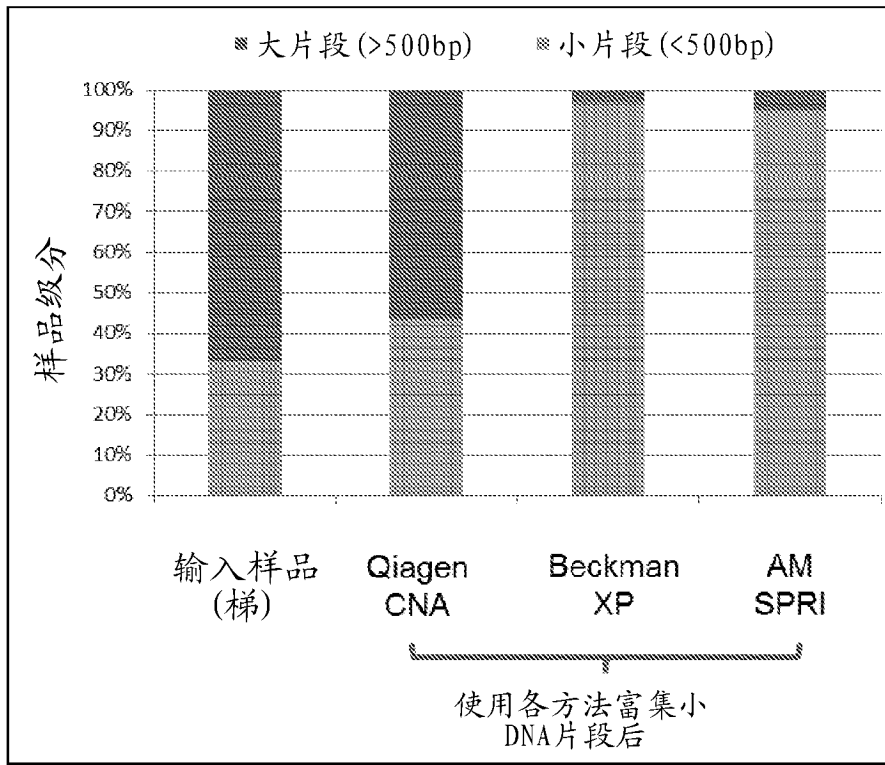
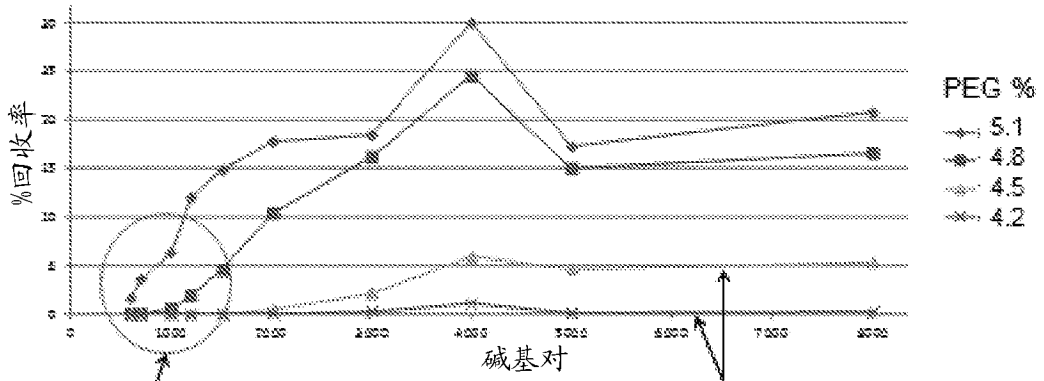


图 2



E

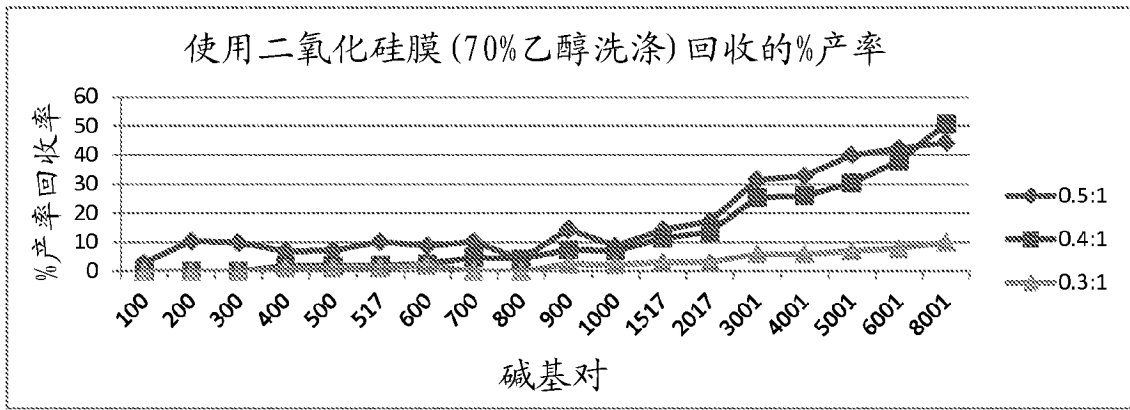
图 2 (续)



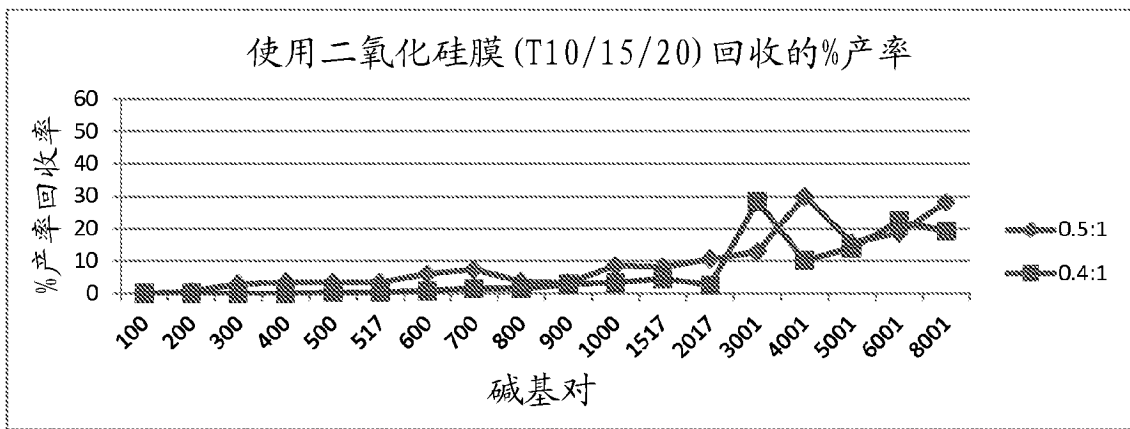
在4.8% PEG下的1000bp截止值
 在5.1% PEG下的600bp截止值

4.5%和4.2%的总产率非常低

图 3



A



B

图 4

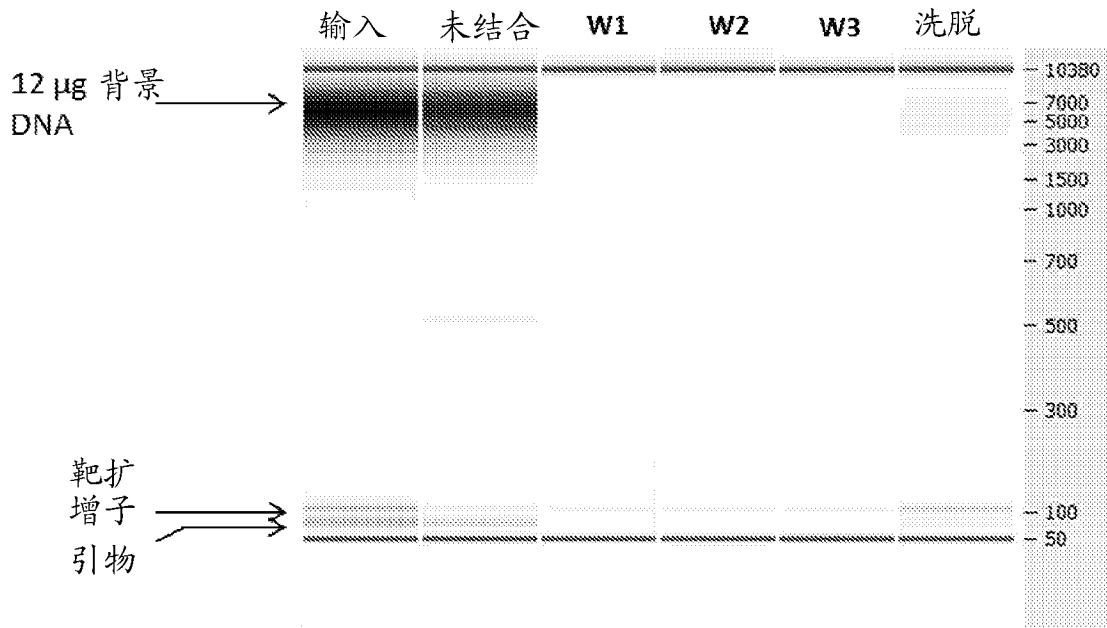


图 5

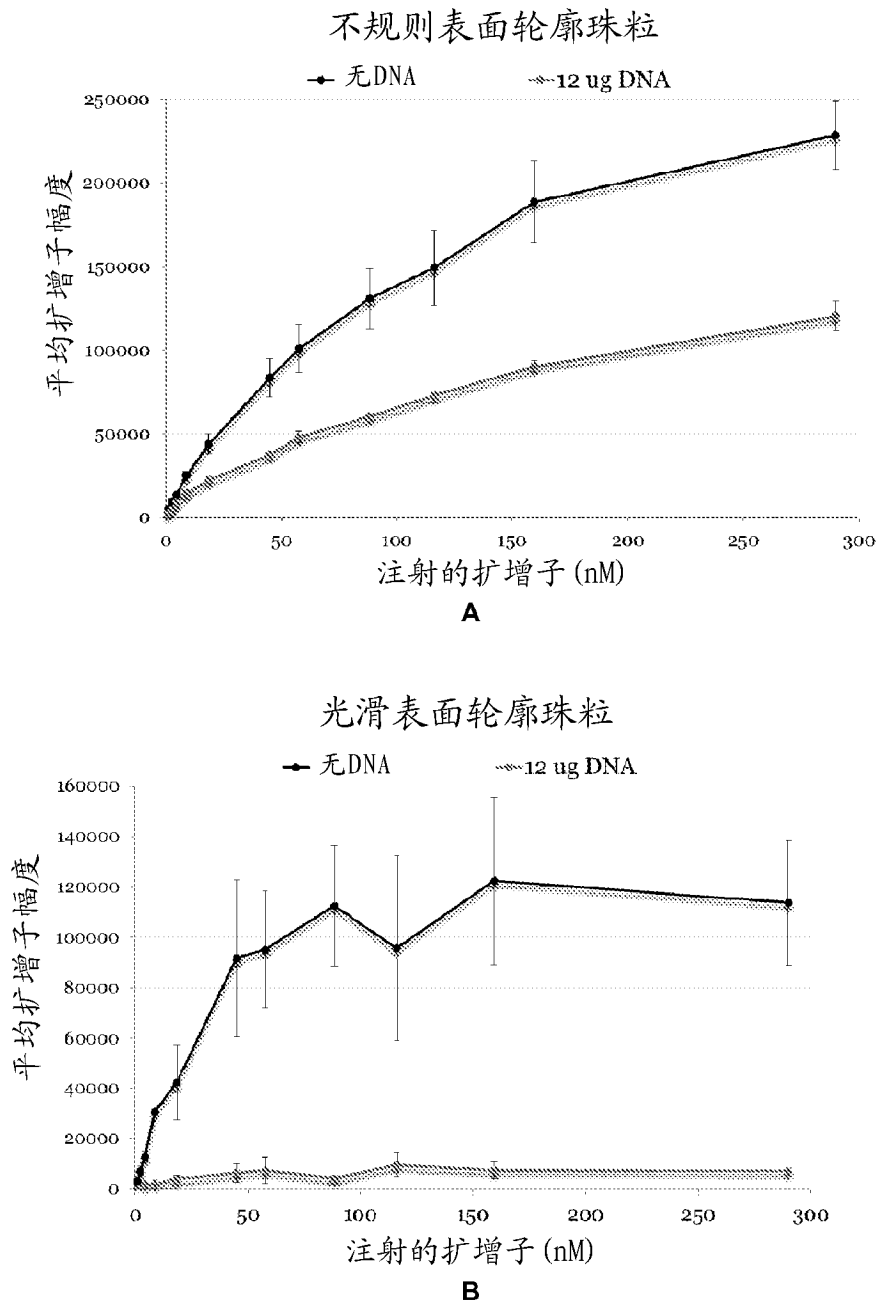


图 6