



# (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108342480 A

(43)申请公布日 2018.07.31

(21)申请号 201810181583.0

(22)申请日 2018.03.05

(71)申请人 北京医院

地址 100730 北京市东城区东单大华路1号

(72)发明人 林贵高 李金明 张括 韩彦熙

(74)专利代理机构 天津欣达睿诚知识产权代理  
事务所(普通合伙) 12216

代理人 李欣

(51)Int.Cl.

C12Q 1/6886(2018.01)

C12N 5/10(2006.01)

C12N 15/85(2006.01)

C12N 15/90(2006.01)

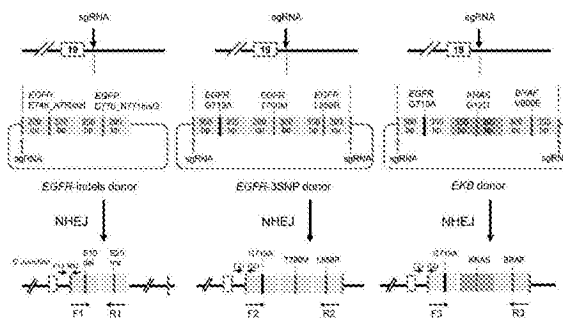
权利要求书1页 说明书13页  
序列表5页 附图6页

## (54)发明名称

一种基因变异检测质控物及其制备方法

## (57)摘要

本发明涉及一种基因变异检测质控物及其制备方法,属于临床检验学和生物技术领域。一种基因变异检测质控物,为通过CRISPR/Cas介导的非同源末端连接的高效整合机制在染色体靶位插入含特定变异DNA序列的永生化细胞系。本发明的创新点在于:在核酸序列已知的情况下,本发明可以通过基因编辑制备获得含任意基因变异的细胞阳性质控物,适用于所有基于PCR扩增的基因突变检测的质量控制。制备过程简单、高效。



1. 一种基因变异检测质控物,其特征在于:是通过CRISPR/Cas介导的非同源末端连接的高效整合机制在染色体靶位插入含特定变异DNA序列的永生化细胞系。

2. 根据权利要求1所述的一种基因变异检测质控物,其特征在于:所述的永生细胞是指获得无限繁殖能力,能持续生存的细胞系;包括无恶性的无限细胞和肿瘤细胞;无限细胞包括NIH3T3和HEK293T;肿瘤细胞包括HeLa和A549。

3. 根据权利要求2所述的一种基因变异检测质控物,其特征在于:所述的永生细胞为HEK293T和A549肺癌细胞。

4. 根据权利要求1所述的一种基因变异检测质控物,其特征在于:所述的特定变异DNA序列是指一段DNA序列,除某个特定的基因变异位点的碱基为突变碱基外,其余碱基与人基因组参考序列同源。

5. 根据权利要求4所述的一种基因变异检测质控物,其特征在于:所述的特定变异DNA序列为基因突变EGFR G719A、L858R、T790M点突变、KRASG12D点突变、BRAF V600E点突变、EGFR E746\_A750del删除突变、和EGFR D770\_N771insG插入突变。

6. 根据权利要求1所述的一种基因变异检测质控物,其特征在于:所述基因变异模式包括1)单核苷酸变异;2)短片段插入删除(Indels);以及3)含有上述变异的多重变异。

7. 权利要求1-6中任何一项所述的一种基因变异检测质控物的制备方法,其特征在于包括如下步骤:

步骤一:向待编辑细胞转染引入1)向导RNA(sgRNA)及编码Cas9核酸酶的质粒;2)含预期突变DNA片段的供体质粒,待插入的DNA片段两端还包含sgRNA识别序列;

步骤二:用单克隆技术将转染后的细胞混合克隆分离成单个细胞培养;

步骤三:阳性克隆株的筛选及验证,用PCR技术筛选含有插入片段的克隆株,对阳性克隆株含有的变异进一步用基因变异检测技术验证。

8. 权利要求7所述的一种基因变异检测质控物的制备方法,其特征在于:步骤一还包括细胞的培养,及sgRNA引导的Cas9核酸酶在染色体核酸序列及供体质粒靶位置的同时切割,造成DNA双链断裂,随后细胞修复机器对剪切后的相同DNA末端进行连接,由此将外源DNA片段引入染色体。

9. 权利要求8所述的一种基因变异检测质控物的制备方法,其特征在于:所述待编辑的细胞为人永生化细胞HEK293T和/或A549,待引入突变位点为野生型的肿瘤细胞A549,编码Cas9核酸酶的质粒是含有绿色荧光蛋白的质粒。

10. 权利要求1-5所述的一种基因变异检测质控物用于制备基因检测标准品的用途。

## 一种基因变异检测质控物及其制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明公开了一种基因变异检测质控物及其制备方法,属于临床检验学和生物技术领域。

### 背景技术

[0002] 个体化医疗,是以患者的基因信息为基础制订个性化治疗方案,从基因组成或表达的差异来预测药物的治疗效果或毒副作用,为每个患者选择最合适的药物和用药方案。个体化用药基因检测的准确性是精准医学成功实施的基石。个体的基因变异,分为存在于胚系DNA的可遗传的变异,以及由于体细胞发生突变而获得的变异。可遗传的胚系变异,主要是通过影响药物的吸收、分布、代谢和排泄以及靶位点的敏感性,表现出药效的个体差异。如检测CYP2C9\*2\*3和VKORC1-1639G>A的多态性用于指导心血管药物华法林的安全用药。体细胞突变产生的变异,主要发生于肿瘤细胞,决定肿瘤“靶向”治疗药物的疗效。如检测EGFR/KRAS基因突变用于指导吉非替尼、帕尼单抗等靶向药物治疗非小细胞肺癌。

[0003] 基因检测是高度复杂的检测项目。为确保每一次基因检测的准确性,需要阳性质控物(quality control materials)进行室内质量控制。质控物,包括质控品(controls)和标准物质(reference material, RM),主要用于室内质控、室间质量评价、校准、赋值、新检测项目的性能验证、评估检测试剂的性能表现,以及监测实验过程中存在的错误。理想的质控物在基质、浓度、成分上都应接近于实际的临床样本。目前,在个体化用药基因检测领域,实际应用的质控物,主要是含有特定突变的构建质粒,或者是来自病人检测剩余的阳性标本。质粒和临床样本(如石蜡包埋组织切片、活细胞等)有本质上的差异,因此无法对基因检测前的样本处理(如脱蜡、提取DNA)这一过程进行质量控制。阳性标本的主要问题是来源有限,且有一些稀有突变无法获得。由于缺乏合适的质控物,实验室无法对相关基因检测方法进行性能评估,检验质量控制机构无法对实验室进行检测水平的合理评价,这在一定程度上也制约了个体化基因检测试剂的研发,以及个体化医学检测的在临床上的开展。

[0004] 目前可持续获得的个体化基因检测质控物的制备主要有三种途径:1)人工合成含有特定基因变异序列的质粒或DNA片段。缺点上文已述。2)从含有特定基因变异永生化人类细胞库获取,如美国Coriell细胞库。这种携带特定突变/多态性的人类细胞可以进一步制备成模拟临床样本的石蜡包埋组织切片等质控品,因此适合用于室内质量控制和室间质量评价。但是需要对大量的细胞进行基因检测、鉴定、永生化,单独的实验室无法完成。因为这些细胞库主要在国外,存在报关、购买不便、运输周期长以及价格昂贵等问题。还有一个主要问题是这种细胞库不可能覆盖所有的基因变异类型,某些稀有的突变/多态性细胞株无法从这些细胞库获取。3)采用基因编辑的方法对人类细胞基因组进行精确的改造。通过基因编辑制备的细胞质控品能最大程度上模拟临床样本,满足质量控制的要求。CRISPR/Cas9技术可以对基因组DNA进行精确点突变、插入、删除、多点位突变、基因重排等操作,基本上涵盖了主要的基因突变和基因多态性的模式。理论上,对一个野生的细胞系可以用CRISPR/Cas9技术改造获得包含任意变异类型的细胞系,细胞可以在体外无限传代培养,就可以从

来源、数量和技术上解决个体化基因检测用质控物获取困难的问题。

[0005] 目前基于同源重组修复的CRISPR/Cas9技术用于构建含特定基因突变细胞系的方法效率低下(<3%),且由于Cas9酶重复切割,常导致靶位点附近引入额外的碱基插入和删除(Indels),无法作为基因检测的质控物。

## 发明内容

[0006] 为了解决现有基因检测质控物原料来源及制备技术所存在的问题,本发明的目的是提供一种基因变异检测质控物及其制备方法。

[0007] 为了实现本发明目的,本发明首先提供一种基因变异检测质控物,其是利用CRISPR/Cas9介导的非同源末端连接(Non-homologous end joining,NHEJ)的序列整合技术在人永生细胞染色体非检测靶区域高效插入含预期突变DNA片段,经此改造的细胞即可作为基因突变检测的阳性质控物。

[0008] 本发明的第一个方面,提供了一种基因变异检测质控物,是通过CRISPR/Cas介导的非同源末端连接的高效整合机制在染色体靶位插入含特定变异DNA序列的永生细胞系。

[0009] 所述的永生细胞是指获得无限繁殖能力,能持续生存的细胞系。包括:无恶性的无限细胞(如NIH3T3,HEK293T)和肿瘤细胞(如HeLa,A549)。

[0010] 优选的永生细胞为HEK293T和A549肺癌细胞。

[0011] 所述的特定变异DNA序列是指一段DNA序列,除某个特定的基因变异位点的碱基为突变碱基(如EGFR c.2369C>T,p.T790M点突变中,EGFR基因第2369位参考碱基为C,突变碱基为T)外,其余碱基与人基因组参考序列同源。由于人的基因序列有无数突变位点,所以该特定变异DNA序列无法穷举。本发明中下述含特定变异(EGFR G719A、L858R、T790M点突变、KRAS G12D点突变、BRAF V600E点突变、EGFR E746\_A750del删除突变、和EGFR D770\_N771insG插入突变)DNA序列作为举例,列出具体碱基,见表2。

[0012] 所述的特定变异DNA序列包括但不限于基因突变EGFR G719A、L858R、T790M点突变、KRAS G12D点突变、BRAF V600E点突变、EGFR E746\_A750del删除突变、和EGFR D770\_N771insG插入突变。

[0013] 所述基因变异模式包括1)单核苷酸变异(single nucleotide variant,SNV);2)短片段插入删除(Indels);以及3)含有上述变异的多重变异。

[0014] 本发明的第二个方面,提供了所述基因变异检测质控物的制备方法,具体包括如下步骤:

[0015] 1、向待编辑细胞转染引入1)向导RNA(sgRNA)及编码Cas9核酸酶的质粒;2)含预期突变DNA片段的供体质粒,待插入的DNA片段两端还包含sgRNA识别序列。进一步地,该方法包括细胞的培养,及sgRNA引导的Cas9核酸酶在染色体核酸序列及供体质粒靶位置的同时切割,造成DNA双链断裂,随后细胞修复机器对剪切后的相同DNA末端进行连接,由此将外源DNA片段引入染色体。在一项实施例中,编码Cas9核酸酶的质粒可以是含有绿色荧光蛋白(GFP)的质粒。在某些实施例中,待编辑的细胞可以是人正常永生细胞,待引入突变位点为野生型的肿瘤细胞。

[0016] 2、用单克隆技术将转染后的细胞混合克隆分离成单个细胞培养。

[0017] 3、阳性克隆株的筛选及验证。用PCR技术筛选含有插入片段的克隆株,对阳性克隆株含有的变异进一步用基因变异检测技术验证。

[0018] 本发明提供的方法可以制备的基因变异模式包括1)单核苷酸变异(single nucleotide variant,SNV);2)短片段插入删除(Indels);以及3)含有上述变异的多重变异。

[0019] 在本发明的具体实施方式中,以EGFR/KRAS/BRAF基因突变为例,本发明提供了多个肿瘤基因突变检测阳性质控物,其是将含有ALK基因sgRNA靶序列和特定变异的人DNA同源序列的不同的供体质粒和Cas9/sgRNA质粒,共同转染细胞,在细胞的ALK基因位置,插入目的变异序列。引入的突变包括EGFR G719A、L858R、T790M点突变、KRAS G12D点突变、BRAF V600E点突变、EGFR E746\_A750del删除突变、EGFR D770\_N771insG插入突变。

[0020] 进一步地,其制备方法包括如下步骤:

[0021] 1、构建EGFP-ALK\_sgRNA-Cas9质粒

[0022] 2、构建含有特定变异的人DNA序列的3条供体质粒。供体质粒1含有EGFR E746\_A750del、EGFR D770\_N771insG插入突变;供体质粒2含有EGFR G719A、L858R、T790M点突变;供体质粒3含有EGFR G719A、KRASG12D点突变、BRAF V600E点突变。

[0023] 3、EGFP-ALK\_sgRNA-Cas9质粒和供体质粒1转染HEK293T细胞;EGFP-ALK\_sgRNA-Cas9质粒和供体质粒2转染A549细胞;EGFP-ALK\_sgRNA-Cas9质粒和供体质粒3转染A549细胞。

[0024] 4、转染后用流式细胞仪分选单个GFP+细胞,单克隆培养。

[0025] 5、提取DNA,用PCR扩增5'整合区序列、插入序列全长的方法筛选阳性整合克隆。

[0026] 6、阳性克隆进一步用测序或其他基因突变检测技术验证所设计的序列成功插入。

[0027] 本发明的基因变异检测质控物用于制备基因检测标准品的用途。其可以用于基因检测室间质评体系使用,并以此为基础建立基因检测室间质评体系,这对开展基因检测室间质评具有重大意义,并对提升基因检测实验室的竞争力有重大的现实意义。

[0028] 本发明的优点:本发明基于CRISPR/Cas9非同源末端连接修复的机制,巧妙地在细胞染色体插入一段含特定变异的人DNA序列(即引入需要的突变),具有很高的成功率(使用双侧切除供体质粒转染阳性克隆可以达45%以上),可以大量节省筛选阳性克隆的人力和时间。优于用同源重组方法引入基因突变的成功率低及编辑位点周围Indels的缺点。可以在一个细胞中一次引入多个变异(如同一基因多个变异,不同基因的多个变异),制备的一个质控物就可以用于多种突变检测的质控,具有很好的成本-效益价值。同时,通过对插入位置进行控制,可以获得纯合子变异和杂合子变异的细胞株。制备的突变细胞可以进一步免疫裸鼠形成异种肿瘤,制备成模拟临床病理样本的FFPE(甲醛固定,石蜡包埋)质控物,这种质控物可以监测包括核酸提取在内的分子检测全过程。最后,可制备用于肿瘤突变、药物基因多态性、遗传变异检测等不同应用领域的质控物。

[0029] 下面结合附图和具体实施方式对本发明进行说明,以使公众更好地理解本发明内容及应用,并不以任何方式造成对本发明的限定。凡依照本发明公开内容所做的任何等同替换,均属于本发明保护范围。

## 附图说明

[0030] 图1 T7E1错配酶酶切实验验证sgRNA效率。EGFP-ALK\_sgRNA-Cas9转染后提细胞基因组DNA扩增PCR片段,酶切,电泳。Lane 1, ALK\_sgRNA\_1; Lane 2, ALK\_sgRNA\_2; Lane 3, ALK\_sgRNA\_3; Lane 4, 对照。

[0031] 图2利用CRISPR/Cas9介导的同源重组独立的序列整合技术将人工基因突变引入人细胞系。图2A展示了供体质粒的设计及基因突变的引入策略。图2B展示了用3种质粒转染的细胞,其基因组DNA与外源序列5'端连接处PCR的检测结果,引物对F1J/R1J和F2J/R2J分别扩增5'端连接处(产物分别为428bp和416bp),引物的位置见图A。图2C检测流式分选GFP阳性单克隆细胞株特异的PCR产物(代表性克隆)。引物对F1/R1、F2/R2和F3/R3分别扩增3条插入序列,长度分别为794bp,1600bp,1600bp,引物的位置见图A。阳性扩增子提示整条外源序列的成功整合。

[0032] 图3阳性克隆190所含基因突变的验证。图3A上部为Sanger测序的结果,图3A下部为艾德EGFR突变检测试剂盒(原理为扩增阻滞突变系统)检测的结果,阴性对照为水和未经编辑的细胞株293T,阳性对照为试剂盒所带阳性质粒。图3B同理。测序结果和PCR检测结果显示190细胞株含有EGFR E746\_A750del和EGFR D770\_N771insG变异。

[0033] 图4阳性克隆S16所含基因突变的验证。图4A上部为Sanger测序的结果,图4A下部为艾德EGFR突变检测试剂盒(原理为扩增阻滞突变系统)检测的结果,阴性对照为水和未经编辑的细胞株A549,阳性对照为试剂盒所带阳性质粒。图4B、4C同理。测序结果和PCR检测结果显示S16细胞株含有EGFR G719A、L858R、T790M点突变。

[0034] 图5阳性克隆E7所含基因突变的验证。图5A上部为Sanger测序的结果,图5A下部为艾德KRAS/NRAS/BRAF突变检测试剂盒(原理为扩增阻滞突变系统)检测的结果,阴性对照为水和未经编辑的细胞株A549,阳性对照为试剂盒所带阳性质粒。图5B、5C同理。测序结果和PCR检测结果显示E7细胞株含有EGFR G719A、KRAS G12D点突变、BRAF V600E点突变。

## 具体实施方式

[0035] 以下实施例用于说明本发明,但不用来限制本发明的范围。凡依照本发明公开内容所做的任何等同替换,均属于本发明保护范围。

[0036] 实施例1:EGFR/KRAS/BRAF基因突变阳性质控物的制备

[0037] 一、材料

[0038] HEK293T细胞,A549细胞,北京协和医科大学细胞库,中国

[0039] pSpCas9(BB)-2A-GFP质粒,addgene,美国

[0040] pUC19质粒,Promega,美国

[0041] FastDigest BbsI内切酶,NEB,美国

[0042] Gotaq green Mix,NEB,美国

[0043] T7E1,NEB,美国

[0044] T4 DNA连接酶缓冲液,NEB,美国

[0045] T4 PNK,NEB,美国

[0046] 10×Tango buffer,NEB,美国

[0047] DTT,NEB,美国

[0048] ATP,NEB,美国

- [0049] Plasmid-safe exonuclease, NEB, 美国
- [0050] T7连接酶NEB, 美国
- [0051] top10感受态细胞, 天根, 中国
- [0052] Lipofectamine 3000, Thermo Fisher, 美国
- [0053] DMEM, Thermo Fisher, 美国
- [0054] F12K, Thermo Fisher, 美国
- [0055] FBS, Thermo Fisher, 美国
- [0056] 胰酶, Thermo Fisher, 美国
- [0057] 抗生素, Thermo Fisher, 美国
- [0058] 24孔细胞培养板, Corning, 美国
- [0059] 96孔细胞培养板, Corning, 美国
- [0060] PrimeSTAR Max, TAKARA, 中国
- [0061] QuickExtract, Epicentre, 美国
- [0062] 引物, 生工, 中国
- [0063] EGFR突变检测试剂盒, 艾德, 中国
- [0064] KRAS/NRAS/BRAF突变检测试剂盒, 艾德, 中国
- [0065] 二、方法
- [0066] 1、EGFP-ALK\_sgRNA-Cas9质粒的构建
- [0067] (1) 根据ALK内含子序列在sgRNA设计网站<http://crispr.mit.edu/>设计3条sgRNA。5'-GAGCTAGAAGTGACGTCTAG-3' (SEQ ID NO:1), 5'-GCGAGCTTTCACCATCGTGA-3' (SEQ ID NO:2), 5'-CTAGAAGTGACGTCTAGGGG-3' (SEQ ID NO:3)。
- [0068] (2) 构建sgRNA/Cas9质粒
- [0069] 1) 将合成的sgRNA退火形成双链DNA, 克隆至pSpCas9 (BB)-2A-GFP质粒;
- [0070] • 将合成的oligo (sgRNA) 用Tris-EDTA缓冲液调至终浓度为100 $\mu$ mol/L
- [0071] • 取等量的上游链和下游链混合
- |                           |                  |
|---------------------------|------------------|
| Forward oligo             | 1 $\mu$ L        |
| Reverse oligo             | 1 $\mu$ L        |
| 10 $\times$ T4 DNA 连接酶缓冲液 | 1 $\mu$ L        |
| [0072] ddH <sub>2</sub> O | 6 $\mu$ L        |
| T4 PNK                    | 1 $\mu$ L        |
| <hr/> 反应体系                | <hr/> 10 $\mu$ L |
- [0073] • 按如下程序: 37 $^{\circ}$ C 30min; 95 $^{\circ}$ C 5min; 95 $^{\circ}$ C-25 $^{\circ}$ C-5 $^{\circ}$ C/min; 4 $^{\circ}$ C 保持
- [0074] • 将2 $\mu$ L sgRNA寡核苷酸双链与398 $\mu$ L双蒸水常温下混合稀释
- [0075] • 双链sgRNA连接质粒DNA, 配制连接反应体系

- |        |                          |                  |
|--------|--------------------------|------------------|
|        | pSpCas9(BB)-2A-GFP 质粒    | 100 ng           |
|        | 稀释的 sgRNA 寡核苷酸双链         | 2 $\mu$ L        |
|        | 10 $\times$ Tango buffer | 2 $\mu$ L        |
|        | 10mmol/L DTT             | 1 $\mu$ L        |
| [0076] | 10mmol/L ATP             | 1 $\mu$ L        |
|        | FastDigest BbsI          | 1 $\mu$ L        |
|        | T7 连接酶                   | 0.5 $\mu$ L      |
|        | ddH <sub>2</sub> O       | 加至 20 $\mu$ L    |
|        | <hr/> 反应体系共              | <hr/> 20 $\mu$ L |
- [0077] 将以上连接反应体系混匀后按以下程序进行孵育:37 $^{\circ}$ C 5min;21 $^{\circ}$ C 5min;重复6个循环。
- [0078] 消化剩余残留线性DNA
- |  |                                 |             |
|--|---------------------------------|-------------|
|  | 上述步骤的连接反应液                      | 11 $\mu$ L  |
|  | 10 $\times$ Plasmid-safe buffer | 1.5 $\mu$ L |
- [0079] 10mmol/L ATP
- |  |                          |                  |
|--|--------------------------|------------------|
|  | Plasmid-safe exonuclease | 1 $\mu$ L        |
|  | <hr/> 反应体系共              | <hr/> 15 $\mu$ L |
- [0080] 将以上反应体系按以下程序进行孵育:37 $^{\circ}$ C 30min;70 $^{\circ}$ C 30min。
- [0081] 2) 重组质粒转化大肠杆菌;
- [0082] 取产物2 $\mu$ L加入到刚解冻的20 $\mu$ L top10感受态细胞中,轻弹混匀,冰浴10min后,42 $^{\circ}$ C热激30s,冰上静置2min,直接涂于含有100 $\mu$ g/mL氨苄西林的LB琼脂糖平板培养。
- [0083] 3) 挑取阳性克隆,扩增,提质粒测序验证sgRNA正确插入。每个平板分别挑3至5个白色菌落,转入5mL LB培养液中,37 $^{\circ}$ C摇菌过夜,取一定量菌液提质粒,进行测序(测序引物:AGGGATGGTTGGTTGGTGGG (SEQ ID NO:4))。
- [0084] (3) HEK293T培养和转染:1) 将HEK293T培养至适合转染状态和密度。用含10%胎牛血清DMEM培养液培养,培养基中含有10%胎牛血清,100IU/ml青霉素和100IU/ml链霉素;在37 $^{\circ}$ C含5%CO<sub>2</sub>的恒温细胞培养箱中培养,用0.25%胰蛋白酶消化进行细胞传代,将细胞培养至密度为200,000/mL并处于对数生长期;2) 质粒DNA:EGFP-ALK\_sgRNA-Cas9质粒500ng,用Lipofectamine 3000,根据操作说明转染,同时转染阴性对照。以下参数适用于24孔细胞培养板一个孔的转染。EP管1中加入3 $\mu$ L lipo3000和50 $\mu$ L opti-MEM,漩涡振荡2秒,充分混匀;管2加入50 $\mu$ L opti-MEM、2 $\mu$ L P3000试剂、500ng质粒,充分混匀;管1与管2混合,室温孵育5min;加混合物至细胞孔,在37 $^{\circ}$ C,5%的CO<sub>2</sub>中培养48h。
- [0085] (4) T7E1错配酶筛选sgRNA:1) 细胞转染48h后,取1000个以上细胞提DNA;2) 设计错配酶靶位点扩增引物,使用高保真PCR酶扩增,以未转染的细胞作为对照进行实验;3) 取2-5 $\mu$ L PCR产物电泳,确保只有一个扩增条带;4) 纯化PCR产物,并按文献条件进行变性退火,加



入T7E1酶切。阴性、阳性对照同样处理；5) 酶切步骤结束后，将PCR产物琼脂糖电泳检测。若sgRNA/Cas9成功打靶会观察到3个条带。根据条带亮度挑选剪切效率最高的sgRNA序列。

[0086] 2、含特定基因变异序列的供体质粒的构建

[0087] (1) 序列设计。共设计3条插入序列，包含7个变异位点(表1)。其中每个变异位点左右两侧为200-300bp的人参考DNA序列(GRCh38)。序列A左侧引入ALK-sgRNA靶序列(表2下划线序列)，序列B、C左右两侧各引入一个ALK-sgRNA靶序列(表2下划线序列)。

[0088] 表1待人工引入的变异

[0089]	序列	包含变异
	序列 A	NM_005228.3( <i>EGFR</i> ):c.2235_2249del15 (p.Glu746_Ala750del); NM_005228.3( <i>EGFR</i> ):c.2310_2311insGGT (p.Asp770_Asn771insGly)
	序列 B	NM_005228.3( <i>EGFR</i> ):c.2156G>C (p.Gly719Ala); NM_005228.3( <i>EGFR</i> ):c.2369C>T (p.Thr790Met); NM_005228.3( <i>EGFR</i> )c.2573T>G (p.Leu858Arg)
[0090]	序列 C	NM_005228.3( <i>EGFR</i> ):c.2156G>C (p.Gly719Ala); NM_033360.3( <i>KRAS</i> ):c.35G>A (p.Gly12Asp); NM_004333.4( <i>BRAF</i> ):c.1799T>A (p.Val600Glu)

[0091] 表2插入序列

[0092] 表2序列A、B、C即表1中的序列A、B、C的具体的DNA碱基，下划线为sgRNA靶向序列，灰色背景的碱基为引入的变异。

序列	碱基
A	<p><u>ccatcacgatggtgaaagctcgccagcaatcagccttaggtgaggctccacagccccagtgtccctc</u>            accttcgggggtgcatcgctggtaacatccaccagatcaactgggcagcatgtggcaccatctcacaattgc            cagttaacgtcttctctctctctgcatagggactctggatccagaaggtgagaaagttaaaattcccgtc            gctatcaaaacatctccgaaagccaacaaggaaatcctcgaatgtgagttctgtcttctgtgtgggggtcc            atggctctgaacctcaggeccacctttctcctatgtctggcagctgtctctctagacctgtcactccac            atcclaaatgttcactttctatgtctttccctttctagctctagtggtataactccctccccctgcgtaaagctc            cctgtgctaggtctttgcaggcacagctttctccatgagtacgtatittgaaactcaagatcgcatctcatgc            gtcttcaacctggaaggggtccatgtgcccctctctggccaccatgcaagccacactgacgtgcctctc            cctccccaggaagcctacgtgatggccagcgtggacggtaacccccacgtgtgccgctgtctgggca            tctgctcactccaccgtgcagctcatcacgcagctcatgcccttcggtctgctcctggactatgtccggg            aacacaaagacaataatggctcccagttacctgtcaactggtgtgtgcagatcgcaaaggtaatcagggg            agggagatacggggaggggagataaggagc (SEQ ID NO:5)</p>
[0093]	<p><u>ccatcacgatggtgaaagctcgcatcagagcctgtgtttctaccaactctgtcaagctctgtagagaaggc</u>            gtacattgtccttccaaatgagctggcaagtgcctgtctctggcaccceccatgccgtggctgtgg            tccccctgtgggcatgtctggcaactgcttccagcatggtgagggtgaggtgaccttgtctctgtgttc            ttgccccccagcttggagccttfaaccagtgaggagaagctccaaccaagctctcttgaggatctt            gaaggaaactgaattcaaaaagatcaaagtgtggtctccggtgcgttcggcacgggtgataaggtaagg</p>



tatgaaaggggccattgacctgccatgggggtgcagcacagggcgagaactgtctatgtagcatttatgc  
 attttcttaagcgtcgaaggaggagttgtaaatgaagtacagttacatacacgtctgcagcactg  
 gaatttcatgattgaatttgaaggatatttgaataatttcatataaaggtagttgtattaaaaggtagt  
 gggagatttgatagtgattaaacctatgtgtgacatgttctaataatagtcacatttcatattttattataagg  
 cctgctgaaaatgactgaatataaacttggtagttggagctgatggcgtaggcaagagtgccctgacgat  
 acagetaattcagaatcatttgggacgaatatgatccaacaatagaggtaaatctgttttaatatgcatatt  
 actggtgcaggaccattcttgatacagataaaggttcttgaccatttcatgactactattacaagataatt  
 atgctgaaagttaagttatctgaaatgacctgggttcaagttatatgtaaccattaatatgggaacttacttt  
 cctgggagatgtcagggtccatgatgttcaactctctgtgcatttccacctcatcctaacacatttcaagcc  
 ccaaaaaacttaaaagcagggtatataaggctaaatagaactaatcattgttttagacatactattgactctaag  
 aggaaagatgaagtactatgttttaagaatattatattacagaattatagaattagatctttacctaactct  
 tcataatgcttgcctgataggaaaatgagatctactgtttccttacttactacacctcagatatatttctcat  
 gaagacctcacagtaaaaataggtgatttggcttagctacagagaaatctcgaaggagtggtcccatca  
 gtttgaacagttgtctggatccatttgggatggtaagaattgaggetattttccactgattaaattttggcc  
 ctgagatgctgctgagttactagaagtcattgaaggtctcaactatagtattttcatagttccagattcaca  
 aaaatcagtggtctatttttataataatagatttttaactttttctttacccttaaacgaatatttgaaccag  
 tttcagtgatttcaaacaaaaatataatgtcttataaacagtcacatcagatggtgaaagctcgc (SEQ ID  
 NO:7)

[0096] (2) 质粒构建

[0097] 上述3条序列交付上海生工合成,并分别克隆进pUC57载体质粒,分别命名为EGFR-indels质粒(包含序列A)、EGFR-3SNP质粒(包含序列B)和EKB质粒(包含序列C),Sanger测序验证序列。

[0098] 3、转染

[0099] (1) 细胞培养:HEK293T用DEME培养基,A549用F12K培养基,添加物为10%胎牛血清、100IU/ml青霉素和100IU/ml链霉素;在37℃含5%CO<sub>2</sub>的恒温细胞培养箱中培养,用0.25%胰蛋白酶消化进行细胞传代,将细胞系扩大培养至200,000细胞/ml并处于对数生长期。

[0100] (2) 质粒:EGFP-ALK\_sgRNA-Cas9质粒,含特定基因变异序列的供体质粒;

[0101] (3) 对于一个24孔板细胞的转染,使用EGFP-ALK\_sgRNA-Cas9质粒700ng,供体质粒300ng,用3μL Lipofectamine 3000依说明书转染;

[0102] (4) EGFR-indels质粒转染293T,EGFR-3SNP质粒和EKB质粒转染A549细胞;

[0103] (5) 转染后24h更换培养基,再培养48h。

[0104] 4、流式分选单个细胞克隆

[0105] (1) 收集转染72h后的细胞,处理成单细胞悬液,重悬于0.5%BSA和双抗的PBS;

[0106] (2) 将细胞过滤,冰上备用;

[0107] (3) 将GFP阳性单个细胞使用FACS流式仪分选至96孔培养板培养,分选4~5块;显微镜下确认大部分为单细胞孔;

[0108] (4) 分选剩余的细胞提基因组DNA,做外源序列5'端与基因组DNA连接处PCR;若含突变序列成功插入ALK内含子处,用设计的ALK内含子引物及插入序列(如EGFR基因19内含子)引物(表3引物对F1J/R1J),即可扩增出预期大小片段产物。

[0109] PCR扩增体系

	成分	体积
	Gotaq green Mix	25 $\mu$ L
[0110]	引物(10 $\mu$ M)	各 1 $\mu$ L
	模板(120ng)	1 $\mu$ L
	灭菌水	22 $\mu$ L
	Total	50 $\mu$ L

[0111] PCR扩增条件:95 $^{\circ}$ C 2min;95 $^{\circ}$ C 30s,60 $^{\circ}$ C 30s,72 $^{\circ}$ C 1min,30cycles,72 $^{\circ}$ C 5min

[0112] (5) 于分选5天后加入100 $\mu$ l培养基,每5天更换100 $\mu$ l培养基,培养2~3周,转至24孔板培养。

[0113] 表3所用引物

	引物	序列 (5'-3')	序列表编号
	F1J	5'-GCATCATGATTGGTGAGTGCACA-3'	SEQ ID NO:8
	R1J	5'-AATTGTGAGATGGTGCCACATGC-3'	SEQ ID NO:9
[0114]	F2J	5'-CCGGCATCATGATTGGTGAGTG-3'	SEQ ID NO:10
	R2J	5'-ACTTGCCAGCTCATTGGAAGG-3'	SEQ ID NO:11
	F1	5'-CAGCAATATCAGCCTTAGGTGCG-3'	SEQ ID NO:12
	R1	5'-TTATCTCCCCTCCCCGTATCTC-3'	SEQ ID NO:13
	F2	5'-TCAAGCTCTGTAGAGAAGGCG-3'	SEQ ID NO:14
[0115]	R2	5'-CATCCTCCCCTGCATGTGTTA-3'	SEQ ID NO:15
	F3	5'-TGTCAAGCTCTGTAGAGAAGGC-3'	SEQ ID NO:16
	R3	5'-AGTAACTCAGCAGCATCTCAGG-3'	SEQ ID NO:17

[0116] 5、外源序列插入阳性克隆的初筛

[0117] (1) 备份细胞孔。

[0118] (2) 待细胞生长融合至90%,胰酶消化,用QuickExtract提基因组DNA,设计引物扩增外源插入序列全长片段;对每种变异,可初步对10个克隆株进行PCR筛选。选取PCR阳性的克隆株,扩大培养。使用表3引物对F1/R1,F2/R2,F3/R3。

[0119] PCR扩增体系

	成分	体积
[0120]	Gotaq green Mix	25 $\mu$ L
	引物(10 $\mu$ M)	各 1 $\mu$ L
	模板(120ng)	1 $\mu$ L
	灭菌水	22 $\mu$ L
	Total	50 $\mu$ L

[0121] PCR扩增条件:95 $^{\circ}$ C 2min;95 $^{\circ}$ C 30s,60 $^{\circ}$ C 30s,72 $^{\circ}$ C 2min,30cycles,72 $^{\circ}$ C 5min

[0122] 6、含特定变异细胞株的验证

[0123] (1) Sanger测序:选取PCR阳性的克隆株,提DNA,设计引物扩增出插入序列全长,将PCR产物构建进入pUC19载体,进行Sanger测序,与设计的序列比对,分析设计的含特定变异外源序列是否整合入细胞。使用表3引物对F1/R1,F2/R2,F3/R3。

[0124] PCR扩增体系

	成分	体积
[0125]	Gotaq green Mix	25 $\mu$ L
	引物(10 $\mu$ M)	各 1 $\mu$ L
	模板(120ng)	1 $\mu$ L
	灭菌水	22 $\mu$ L
	Total	50 $\mu$ L

[0126] PCR扩增条件:95 $^{\circ}$ C 2min;95 $^{\circ}$ C 30s,60 $^{\circ}$ C 30s,72 $^{\circ}$ C 2min,30cycles,72 $^{\circ}$ C 5min

[0127] (2) 商品试剂验证:选取Sanger测序正确的克隆株,提DNA,使用艾德商品试剂,对上述特定基因变异是否成功引入进行验证。

[0128] 三、结果

[0129] 1、经过T7E1错配酶实验,选靶向切割效率最佳的ALK\_sgRNA:5'-GCGAGCTTTCACCATCGTGA-3'(图1中的sgRNA2,SEQ ID NO:2)进行后续实验。

[0130] 2、以HEK293T和A549肺癌细胞2种人永生化细胞为模式细胞,以临床检测中重要的肿瘤基因突变EGFR G719A、L858R、T790M点突变、KRAS G12D点突变、BRAF V600E点突变、EGFR E746\_A750del删除突变、EGFR D770\_N771insG插入突变等模式突变,展示本方法的可行性。将含有ALK基因sgRNA靶序列和特定变异的人DNA同源序列的不同的供体质粒和Cas9/sgrNA质粒,共同转染HEK293T和A549细胞,在细胞的ALK基因位置,插入目的变异序列,如图2A所示。转染后的细胞用流式荧光分选出单个细胞、再进行单细胞克隆、特异整合区域PCR的方法初步筛选出成功插入包含特定变异的人DNA同源序列的细胞株(图2B,2C),并扩大培养。采用单侧切除的供体质粒(EGFR-indels)转染后的109个培养起来的单克隆细胞中有9个阳性(阳性率9.17%,10/109)。采用双侧切除的供体质粒(EGFR-3SNP、EKB)转染后阳性率分别为45.16%(22/44)和59.09%(14/31)。选取3个初筛阳性的细胞株(I90,S16,E7),进一步克隆出包含特定突变的外源DNA序列并用Sanger测序验证目的变异确实存在(图3-图5)。

同时用国家药监局批准的检测上述突变的商品试剂盒(基于突变阻滞扩增系统)验证目的变异确实存在(图3-图5)。

[0131] 3、提取阳性克隆细胞DNA,由多家采用不同检测原理和平台的基因检测实验室进行盲样检测,均能测出人工编辑的变异,证明质控物具有广泛适用性。所用方法包括高通量测序(17家实验室)、突变阻滞扩增系统(15家实验室)、Sanger测序(8家实验室)、焦磷酸测序(3家实验室)、等位特异定量PCR(3家实验室)、PCR-流式荧光法(1家实验室)、数字PCR(1家实验室)和时间分辨飞行质谱(1家实验室)。

## 序列表

<110>	北京医院	
<120>	一种基因变异检测质控物及其制备方法	
<130>	XDRC18I010	
<160>	17	
<170>	SIP0SequenceListing 1.0	
<210>	1	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<400>	1	
	gagctagaag tgacgtctag	20
<210>	2	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<400>	2	
	gcgagctttc accatcgtga	20
<210>	3	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<400>	3	
	ctagaagtga cgtctagggg	20
<210>	4	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<400>	4	
	agggatggtt ggttgggtggg	20
<210>	5	
<211>	823	
<212>	DNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<400>	5	
	ccatcacgat ggtgaaaget cgcccagcaa tateagcett aggtgcgget ccacagcccc	60
	agtgtccctc accttcgggg tgcacgctg gtaacatcca cccagatcac tgggcagcat	120
	gtggcaccat ctcaaatg ccagttaacg tcttccttet ctctctgtca tagggactet	180



ggatcccaga aggtgagaaa gttaaaattc ccgctcctat caaaacatct ccgaaagcca	240
acaaggaaat cctcgatgtg agtttctgct ttgctgtgtg ggggtccatg gctctgaacc	300
tcaggccac cttttctcat gtctggcagc tgctctgctc tagaccctgc tcatctccac	360
atcctaaatg ttcactttct atgtctttcc ctttctagct ctagtgggta taactccctc	420
cccctgcgta aacgtccctg tgctaggtct tttgcaggca cagcttttcc tccatgagta	480
cgtattttga aactcaagat cgcattcatg cgtcttcacc tggaaagggg ccatgtgccc	540
ctccttctgg ccaccatgcg aagccacact gacgtgctc tccctccctc caggaagcct	600
acgtgatggc cagcgtggac ggtaaccccc acgtgtgccg cctgctgggc atctgcctca	660
cctccaccgt gcagctcacc acgcagctca tgcccttcgg ctgcctcctg gactatgtcc	720
gggaacacaa agacaatatt ggtcaccagt acctgctcaa ctgggtgtgtg cagatcgcaa	780
aggtaatcag ggaagggaga tacggggagg ggagataagg agc	823
<210> 6	
<211> 1849	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<400> 6	
ccatcacgat ggtgaaagct cgcacacagag cctgtgtttc taccaacttc tgtcaagctc	60
tgtagagaag gcgtacattt gtccttccaa atgagctggc aagtgccgtg tectggcacc	120
caagcccatg ccgtggctgc tggccccct gctgggccc atgtctgcaact gctttccagc	180
atgggtgagg ctgaggtgac cctgtctctc gtgtttctgt cccccccagc ttgtggagcc	240
tcttacacc agtgagagaag ctcccaacca agctctcttg aggatcttga aggaaactga	300
attcaaaaag atcaaagtgc tggcctccgg tgcgttcggc acggtgtata aggtaaggtc	360
cctggcacag gcctctgggc tgggcccag ggctctctat ggtctgggtg ggagcccaga	420
gtccttgcaa gctgtatatt tccatcatct actttactct ttgtttcact gactgtttgg	480
gaaactccag tgtttttccc aagttattga gaggaaatct ttataacca cagtaatcag	540
tggctctgtg agaccaattc acagacaaa ggcattttta tgaaaggggc cattgacctt	600
gccatggggg gcagcacagg gcggcaccca ggaggggccc tctcccactg catctgtcac	660
ttcacagccc tgcgtaaacg tccctgtgct aggtcttttg caggeacagc ttttctcca	720
tgagtacgta ttttgaact caagatcgea tcatgcgtc ttacactgga aggggtccat	780
gtgccccctc ttctggccac catgcgaagc cactctgac tgctctccc tccctccagg	840
aagcctacgt gatggccagc gtggacaacc cccacgtgtg ccgctgctg ggcactctgc	900
tcacctccac cgtgcagctc atcatgcagc tcatgcctt cggctgctc ctggactatg	960
tccgggaaca caaagacaat attggetccc agtacctgct caactgggtg gtgcagatcg	1020
caaaggtaat cagggaaggg agatacgggg aggggagata aggagccagg atcctccat	1080
gcggtctgcg ctctgggat agcaagagtt tgccatgggg atatgtgtgt gcgtgcatgc	1140
agcacacaca cattccttta ttttggatc aatcaagttg atcttctgtg gcacaaatca	1200
gtgcctgtcc catctgcatg tggaaagtta atggtcagca gcgggttaca tcttcttca	1260
tgcgccttcc cattctttgg atcagtagtc actaacgttc gccagccata agtctctgac	1320
gtggagagge tcagagcctg gcatgaacat gaccctgaat tcggatgcag agcttcttcc	1380

catgatgate	tgtccctcac	agcaggttct	tctctgttct	aggcatgaa	ctacttggag	1440
gaccgtcgct	tgggtgcaccg	cgacctggca	gccaggaacg	tactggtgaa	aacaccgcag	1500
catgtcaaga	tcacagattt	tgggcgggcc	aaactgctgg	gtgcggaaga	gaaagaatac	1560
catgcagaag	gaggcaaagt	aaggaggtgg	cttttaggtca	gccagcattt	tcctgacacc	1620
agggaccagg	ctgccttccc	actagctgta	ttgtttaaca	catgcagggg	aggatgctct	1680
ccagacattc	tgggtgagct	cgacagcagct	gctgctggca	gctgggtcca	gccaggttct	1740
cctggtagtg	tgagccagag	ctgctttggg	aacagtactt	gctgggacag	tgaatgagga	1800
tgttatcccc	aggtgatcat	tagcaacct	cacgatgggt	aaagctcgc		1849
<210>	7					
<211>	1849					
<212>	DNA					
<213>	人工序列 (Artificial Sequence)					
<400>	7					
ccatcacgat	ggtgaaagct	cgcacagag	cctgtgttct	taccaacttc	tgtcaagctc	60
tgtagagaag	gcgtacattt	gtccttccaa	atgagctggc	aagtgccttg	tcttggcacc	120
caagcccatg	ccgtggctgc	tggccccct	gctgggcat	gtctggcact	gctttccagc	180
atgggtgagg	ctgaggtgac	ccttgtctct	gtgttcttct	ccccccagc	ttgtggagcc	240
tcttacacc	agtggagaag	ctcccaacca	agctctcttg	aggatcttga	aggaaactga	300
attcaaaaag	atcaaaagtc	tggcctccgg	tgcgttcggc	acggtgtata	aggtaaggtc	360
cctggcacag	gcctctgggc	tgggccgcag	ggcctctcat	ggtctggtgg	ggagcccaga	420
gtccttgcaa	gctgtatatt	tccatcatct	actttactct	ttgtttact	gagtgtttgg	480
gaaactccag	tgtttttccc	aagttattga	gaggaaatct	tttataacca	cagtaatcag	540
tggctctgtg	agaccaatc	acagacaaa	ggcattttta	tgaaaggggc	cattgacctt	600
gcatgggggt	gcagcacagg	gcggagaact	gtctatgtag	catttatgca	ttttcttaa	660
gcgtcgatgg	aggagtttgt	aatgaagta	cagttcatta	cgatacacgt	ctgcagtcaa	720
ctggaatttt	catgattgaa	ttttgtaagg	tattttgaaa	taatttttca	tataaaggtg	780
agtttgtatt	aaaaggtact	ggtggagtat	ttgatagtgt	attaacctta	tgtgtgacat	840
gttctaatat	agtcacattt	tcattatttt	tattataagg	cctgctgaaa	atgactgaat	900
ataaacttgt	gtagttgga	gctgatggcg	taggcaagag	tgccttgacg	atacagctaa	960
ttcagaatca	ttttgtggac	gaatatgac	caacaataga	ggtaaactct	gttttaatat	1020
gcatattact	ggtgcaggac	cattctttga	tacagataaa	ggtttctctg	accattttca	1080
tgagtactta	ttacaagata	attatgctga	aagttaagtt	atctgaaatg	taccttgggt	1140
ttcaagttat	atgtaacct	taatatggga	actttacttt	ccttgggagt	atgtcagggt	1200
ccatgatgtt	cactctctgt	gcatttctca	cctcactcta	acacatttca	agccccaaaa	1260
atcttaaaaag	caggttata	aggctaaata	gaactaatca	ttgtttttaga	catacttatt	1320
gactctaaga	ggaaagatga	agtaactatgt	tttaaagaat	attatattac	agaattatag	1380
aaattagatc	tcttacctaa	actcttcata	atgcttgctc	tgataggaaa	atgagatcta	1440
ctgttttctc	ttaactta	cacctcagat	atatttcttc	atgaagacct	cacagtaaaa	1500
ataggtgatt	ttggcttagc	tacagagaaa	tctcgatgga	gtgggtccca	tcagtttgaa	1560

cagttgtctg gatccatttt gtggatggta agaattgagg ctatTTTTcc actgattaaa	1620
TTTTggccc tgagatgctg ctgagttact agaaagtcac tgaaggctc aactatagta	1680
TTTTcatagt tcccagtatt cacaaaaatc agtgTtctta TTTTTatgt aaatagattt	1740
TtTaaacttt ttctttacc ttaaaacgaa tattttgaaa ccagtttcag tgtatttcaa	1800
acaaaaatat atgtcttata aacagtccat cacgatggTg aaagctcgc	1849
<210> 8	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
<400> 8	
gcatcatgat tggTgagTgc aca	23
<210> 9	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
<400> 9	
aattgtgaga tggTgccaca tgc	23
<210> 10	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
<400> 10	
ccggcatcat gattggTgag tg	22
<210> 11	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
<400> 11	
actTgccagc tcattTggaa gg	22
<210> 12	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
<400> 12	
cagcaatate agccttaggt gcg	23
<210> 13	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	

<400> 13	
ttatctcccc tccccgtatc tc	22
<210> 14	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<400> 14	
tcaagctctg tagagaaggc g	21
<210> 15	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<400> 15	
catcctcccc tgcattgttt a	21
<210> 16	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<400> 16	
tgtcaagctc ttagagaag gc	22
<210> 17	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<400> 17	
agtaactcag cagcatctca gg	22

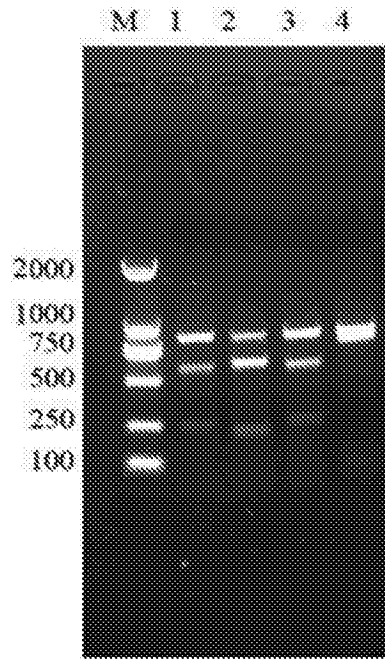


图1

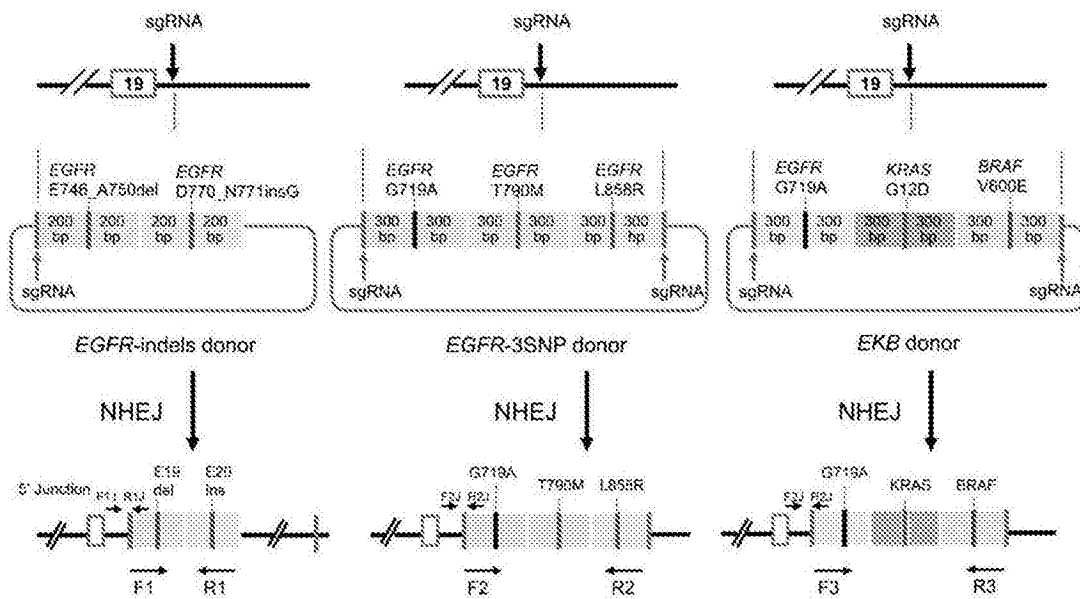


图2A

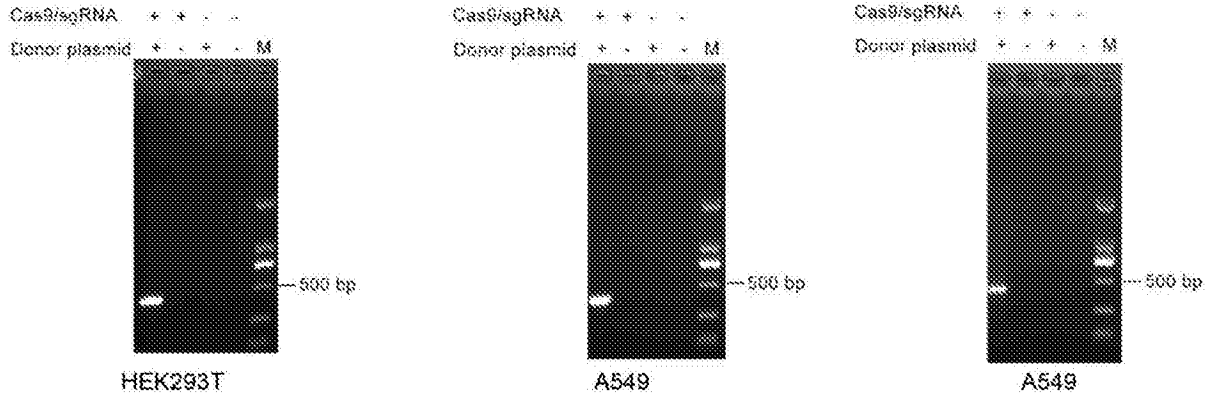


图2B

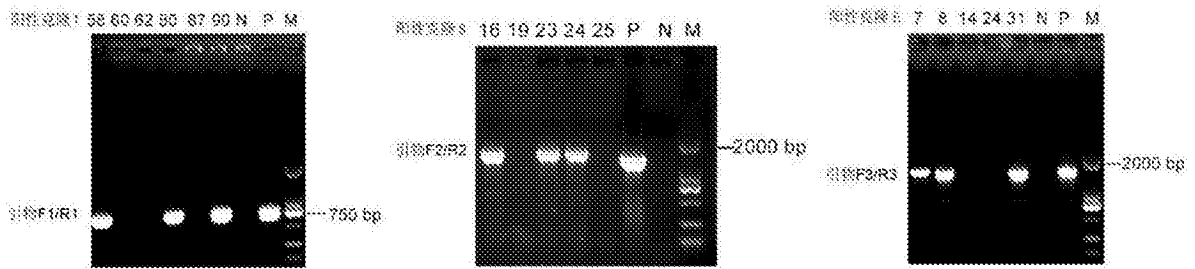


图2C

A

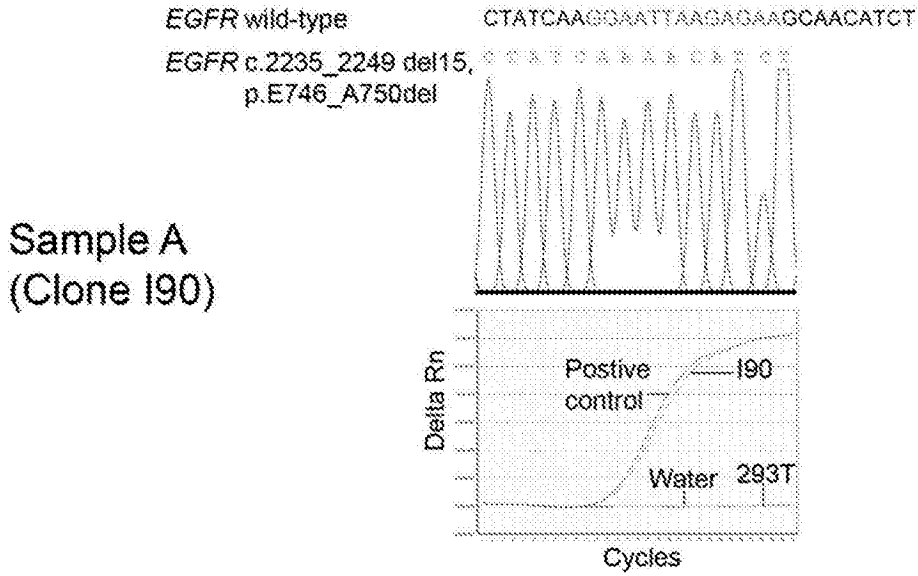


图3A

**B**

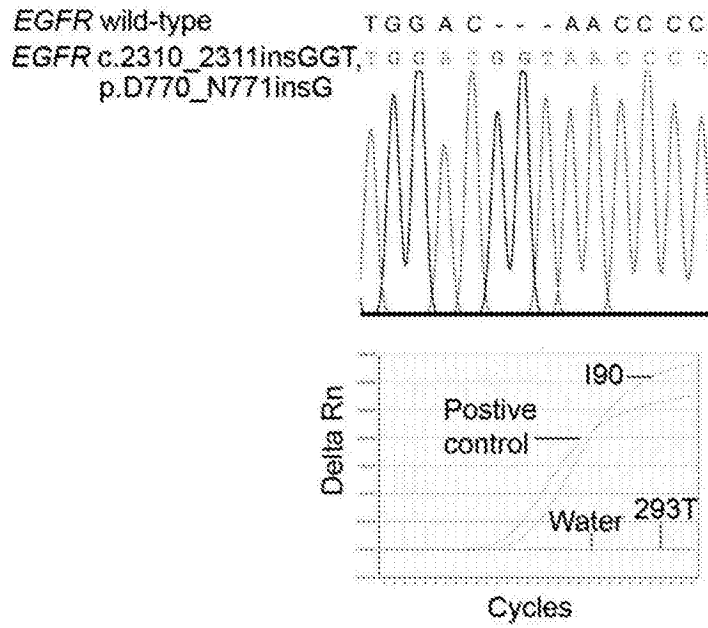


图3B

**A**

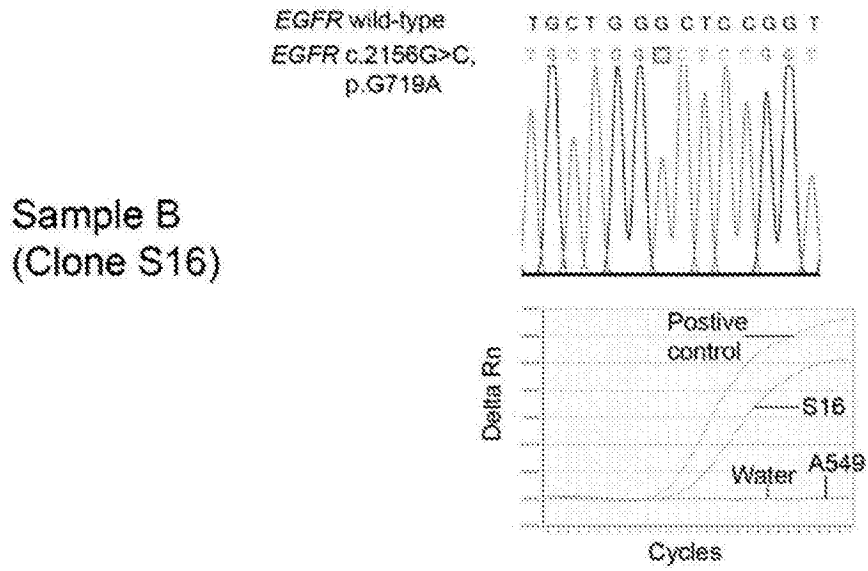


图4A

**B**

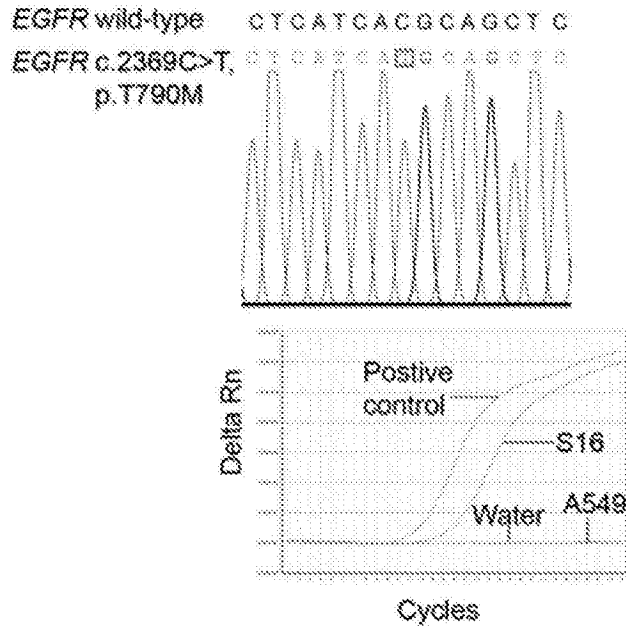


图4B

**C**

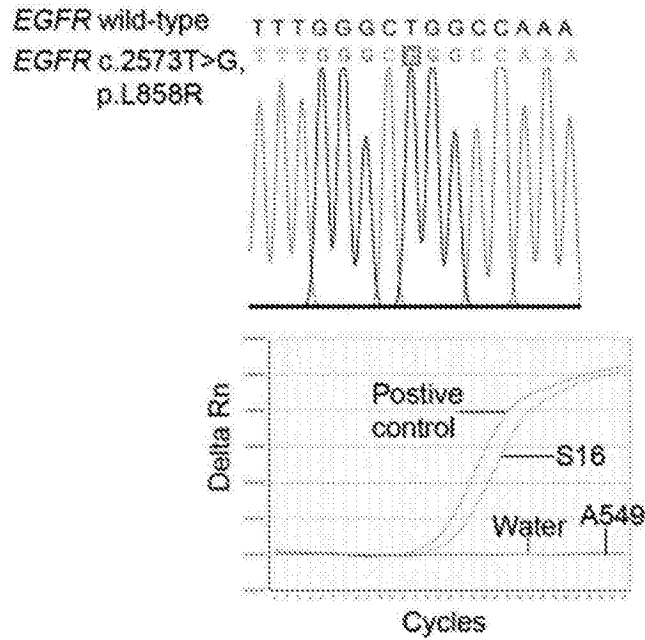


图4C



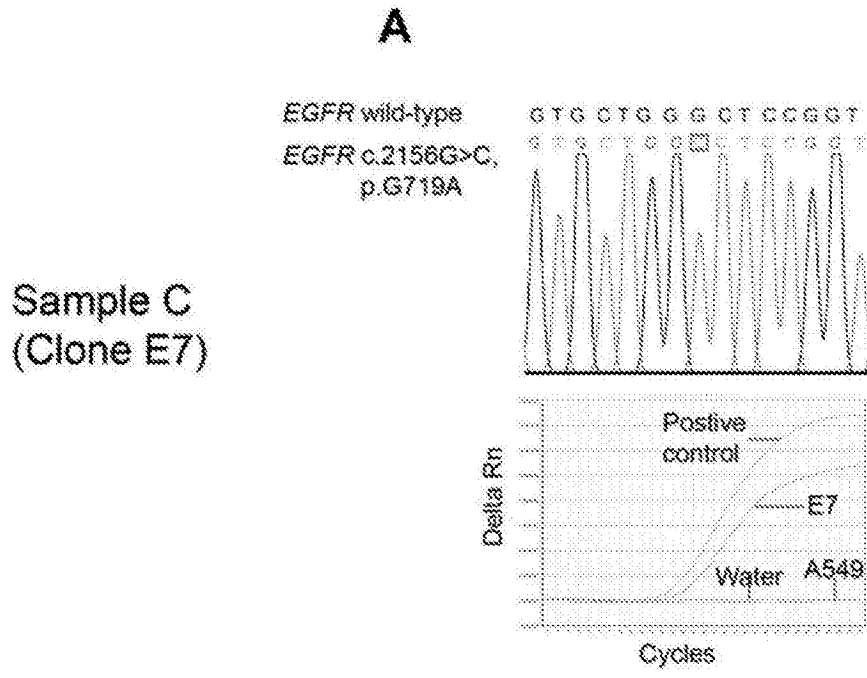


图5A

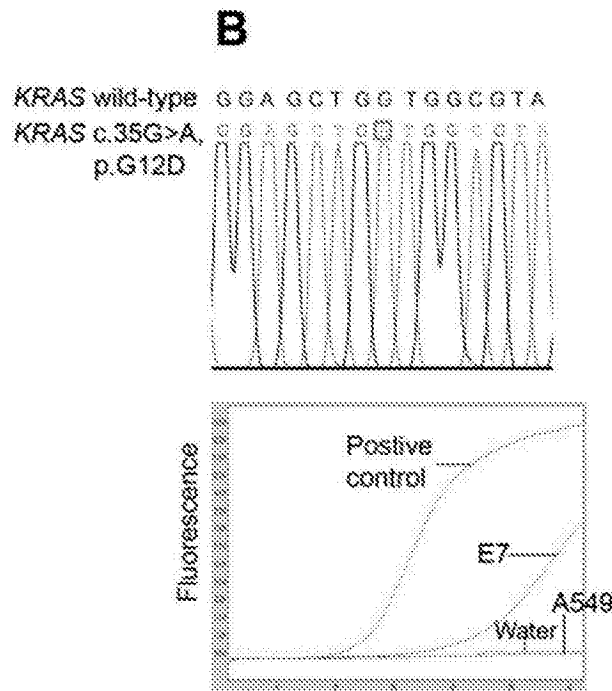


图5B

C

*BRAF* wild-type G C T A C A G T G A A A T C T  
*BRAF* c.1799T>A, p.V600E

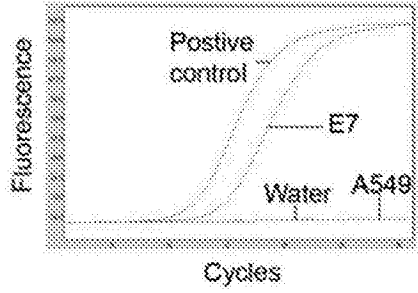
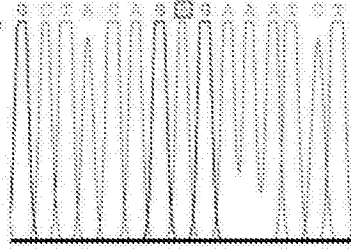


图5C