



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105969875 B

(45)授权公告日 2019.11.08

(21)申请号 201610418048.3

(22)申请日 2016.06.15

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 105969875 A

(43)申请公布日 2016.09.28

(73)专利权人 昆明理工大学
地址 650093 云南省昆明市五华区学府路
253号

(72)发明人 盛苗苗 罗瑛 唐文如 李珊珊
王芳 赵月光 张继虹 贾舒婷
吴晓明 刘静 周若宇 旦菊花

(51)Int.Cl.

C12Q 1/6886(2018.01)

C12Q 1/6858(2018.01)

C12N 15/11(2006.01)

(56)对比文件

CN 102816839 A,2012.12.12,

CN 102634510 A,2012.08.15,

CN 102533958 A,2012.07.04,

CN 102628077 A,2012.08.08,

CN 103773837 A,2014.05.07,

Sandeep Kathju et al..Multiple displacement amplification as an adjunct to PCR-based detection of Staphylococcus aureus in synovial fluid.《BMC Research Notes》.2010,1-5.

审查员 毛舒燕

权利要求书1页 说明书8页
序列表4页 附图3页

(54)发明名称

用于检测微量组织中PIK3CA基因突变的引物组合及其应用

(57)摘要

本发明公开了一种用于检测微量组织中PIK3CA基因突变的引物组合,其包括预扩增引物组、用于检测9号外显子突变的引物组、用于检测20号外显子突变的引物组;该方法旨在将微量的DNA通过预扩增得到较高浓度的DNA模板,结合直接测序法检测样本中PIK3CA基因的突变情况;将该引物组合应用于制备检测PIK3CA基因突变的检测试剂中,可检测样本的DNA浓度低至100pg,且可以同时检测PIK3CA基因第9和20号外显子的所有突变,本发明提供的检测方法灵敏度高,特异性强,成本低,适用于临床肿瘤患者PIK3CA基因突变的检测,具有很好的临床应用价值。

1. 用于检测微量组织中*PIK3CA*基因突变的引物组合,其特征在于:由如SEQ ID NO:1-SEQ ID NO:18所示的预扩增引物组、如SEQ ID NO:19- SEQ ID NO:20所示的用于检测9号外显子突变的引物组、如SEQ ID NO:21- SEQ ID NO:22所示的用于检测20号外显子突变的引物组组成;

用于检测*PIK3CA*基因突变的引物组合的检测使用方法,具体步骤如下:

(1) 引物稀释

将primer1-prime18分别稀释后混匀制得Primer Mix,其中primer1-primer16引物的终浓度为0.05-0.1 μ M,primer17-primer18引物的终浓度为1-3 μ M;primer19-primer22引物稀释至5-10 μ M;

(2) 预扩增

在扩增管中加入1 μ L的10 \times 反应缓冲液、2.5 μ L的Primer Mix、100-1000pg微量DNA模板、用去离子水补足至8.8 μ L;混匀,98 $^{\circ}$ C预变性5-10min,然后置于冰上10-20min;再加入0.5 μ L dNTP 10mM each、0.2 μ L 100 \times BSA以及0.5 μ L phi29 DNA聚合酶,30-35 $^{\circ}$ C扩增过夜,65 $^{\circ}$ C加热10-20min使酶失活;

(3) 使用PCR纯化试剂盒纯化上述预扩增产物;

(4) *PIK3CA*基因突变检测

针对*PIK3CA*基因的9,20号外显子突变,分别采用如SEQ ID NO:19- SEQ ID NO:20所示的引物组检测9号外显子突变;如SEQ ID NO:21- SEQ ID NO:22所示的引物组检测20号外显子突变;

配置PCR反应总体系为25 μ L:其中Pfu Mix混合液12.5 μ L、5-10 μ M正向引物0.5-1 μ L、5-10 μ M反向引物0.5-1 μ L、预扩增产物1-2 μ L、用水补足至25 μ L;

PCR反应条件为:①94 $^{\circ}$ C,5min预变性;②94 $^{\circ}$ C,30s变性;③55 $^{\circ}$ C,30s退火;④72 $^{\circ}$ C,35s延伸;循环②至④35次;⑤72 $^{\circ}$ C,5min;测序检测。

2. 权利要求1所述的引物组合在制备检测*PIK3CA*基因突变的检测试剂中的应用。

3. 权利要求1所述的引物组合在制备检测*PIK3CA*基因突变的检测试剂盒中的应用。

用于检测微量组织中PIK3CA基因突变的引物组合及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物检测技术领域,具体涉及一种用于微量组织中PIK3CA基因突变检测的引物组合及其在肿瘤用药选择和疾病诊断相关方面的应用。

背景技术

[0002] 磷脂酰肌醇-3-激酶(PI3K)是一种可使肌醇环第三位羟基磷酸化的磷脂酰肌醇激酶,具有磷脂酰肌醇激酶和丝氨酸-苏氨酸蛋白激酶双重活性(Fruman, D. A. et al. 2014),调节细胞增殖、存活、迁移、凋亡和细胞周期等多种生物学功能。PIK3CA基因编码IA类PI3K催化亚单位P110 α ,其定位于3q26.3,包含21个外显子(Volinia, S. et al. 1994)。KANG S等研究发现,PIK3CA基因在多种肿瘤中扮演着癌基因的角色,约30%的人类实体瘤存在PIK3CA基因的突变,其中80%-90%的突变发生在该基因的第9和第20外显子,分别对应该酶的螺旋区和激酶区。该区域的改变引起PIK3CA过表达、P110 α 活性增加,进而激活下游AKT等信号分子,导致成纤维细胞和乳腺上皮细胞的生长和转化,并抑制细胞凋亡,最终导致肿瘤发生(Vivanco, I. et al. 2002)。

[0003] 目前已发现多种癌症中存在PIK3CA基因突变(如乳腺癌、非小细胞肺癌、结肠癌等),其突变会导致PI3K/AKT信号通路的持续活化。PI3K作为EGFR下游信号分子被激活,导致肿瘤细胞对EGFR-TKI药物及西妥昔单抗、帕尼单抗、拉帕替尼等药物产生耐药性。因此PIK3CA基因突变检测能够提高肿瘤临床治疗的针对性,降低治疗费用,节约宝贵的治疗时间。

[0004] 目前针对PIK3CA突变的检测方法有很多,如直接测序法,该法对样本要求较高,检测范围有限。多态性分析法(RFLP),是将PCR与限制性酶切相结合的一种方法,此实验操作繁琐,检测周期长,成本高昂,存在第一轮酶切不完全导致的假阳性。Taqman水解探针法,使用扩增阻滞突变系统(ARMS)与荧光探针结合来检测突变,针对该方法设计的引物,使得突变型得到扩增,野生型无法扩增,从而增强了突变信号,便于检测。但是ARMS技术应用最后一个碱基不匹配并不能完全阻滞野生型DNA的扩增,存在假阳性的风险,且只能针对特异性位点检测。此外,如高效液相色谱、毛细血管电泳等,需要特殊的仪器设备,且操作复杂,不利于在临床上进行大范围的推广。核酸序列扩增法(NASBA)、自序序列复制法(3SR)和链置换复制法(SDA)虽均为等温扩增法,但是它们对目的序列的扩增特异性不强。

[0005] 尽管如此,PIK3CA突变的检测方法仍以肿瘤组织标本检测为金标准,但是临床上常常由于组织样本获取不足量,使其检测具有一定的局限性。因此临床上亟需一种高效准确全面地检测微量组织中PIK3CA基因突变的产品及方法,以便于为肿瘤个性化治疗服务。

[0006] 为此,本发明利用恒温扩增与直接测序相结合的方法,建立了一套针对微量组织样本中PIK3CA基因所有突变类型检测的技术流程,该检测方法灵敏度高,特异性强,成本低,有利于临床使用和推广。

发明内容

[0007] 本发明的目的在于提供一种具有高特异性和灵敏度的检测微量组织样本中 *PIK3CA* 基因突变的引物组合,以组织DNA为检测对象,结合恒温预扩增技术和普通PCR技术,通过直接测序法确定肿瘤样本中是否有 *PIK3CA* 基因突变,可对 *PIK3CA* 基因的突变进行准确的检测。

[0008] 本发明提供的引物组合能检测出 *PIK3CA* 基因发生在第9和20号外显子的所有突变。

[0009] 本发明提供的用于检测 *PIK3CA* 基因突变的引物组合包括如SEQ ID NO:1- SEQ ID NO:18所示的预扩增引物组、如SEQ ID NO:19- SEQ ID NO:20所示的用于检测9号外显子突变的引物组、如SEQ ID NO:21- SEQ ID NO:22所示的用于检测20号外显子突变的引物组。

[0010] 本发明的另一目的是将上述引物组合应用在制备检测 *PIK3CA* 基因突变的检测试剂中。

[0011] 本发明的另一目的是将上述引物组合应用于制备用于检测 *PIK3CA* 基因突变的检测试剂盒中,所述试剂盒组分还包含下列常规组分中的一种或几种:聚合酶、引物组合、PCR反应缓冲液、dNTP、BSA、去离子水。

[0012] 本发明用于检测 *PIK3CA* 基因突变的引物组合的检测使用方法,具体步骤如下:

[0013] (1) 引物稀释

[0014] 将primer1-prime18分别稀释后混匀制得Primer Mix(表1),其中primer1-primer16引物的终浓度为0.05-0.1 μ M,primer17-primer18引物的终浓度为1-3 μ M; primer19-primer22引物(表1)稀释至5-10 μ M。

[0015] (2) 预扩增

[0016] 在扩增管中加入1 μ L的10 \times 反应缓冲液、2.5 μ L的Primer Mix、100-1000pg微量DNA模板(本发明采用的DNA模板来源于乳腺癌病人组织,并按照《分子克隆实验指南》中所述常规方法提取组织DNA)、用去离子水补足至8.8 μ L;混匀,98 $^{\circ}$ C预变性5-10min,然后置于冰上10-20min;再加入0.5 μ L dNTP (10mM each)、0.2 μ L 100 \times BSA以及0.5 μ L phi29 DNA聚合酶,30-35 $^{\circ}$ C扩增过夜,65 $^{\circ}$ C加热10-20min使酶失活。

[0017] (3) 使用PCR纯化试剂盒纯化上述预扩增产物。

[0018] (4) *PIK3CA* 基因突变检测

[0019] 针对 *PIK3CA* 基因的9,20号外显子突变,分别采用如SEQ ID NO:19- SEQ ID NO:20所示的引物组检测9号外显子突变;如SEQ ID NO:21- SEQ ID NO:22所示的引物组检测20号外显子突变。

[0020] 配置PCR反应总体系为25 μ L:其中Pfu Mix混合液12.5 μ L、所述正向引物(5-10 μ M)的体积0.5-1 μ L、反向引物(5-10 μ M)的体积0.5-1 μ L、预扩增产物1-2 μ L、用水补足至25 μ L。PCR反应条件为:①94 $^{\circ}$ C,5min预变性;②94 $^{\circ}$ C,30s变性;③55 $^{\circ}$ C,30s退火;④72 $^{\circ}$ C,35s延伸;循环②至④35次;⑤72 $^{\circ}$ C,5min;测序检测。

[0021] 本发明的检测优势在于:① 本发明采用多引物组合、利用恒温扩增及普通PCR相结合的方法,解决了组织样本中初始DNA含量低的,无法进行 *PIK3CA* 基因突变检测的局限性。② 本发明中使用的试剂价格低廉,可大批量的处理样本。③ 本发明方法扩增效率高,如100pg的DNA经扩增后可得到1000ng/ μ L;可同时检测多位点的突变情况。④ 本发明方法DNA

扩增后DNA忠实性好。总之,使用本发明方法可实现对微量组织样本中的*PIK3CA*基因的突变情况进行高效、准确的检测,其对于临床肿瘤早期筛查,指导临床用药,以及监测肿瘤的预后具有很好的实际应用价值。

[0022] 表1:引物1-22的核苷酸序列

引物名称	序列 (5'-3')	序列号
Primer 1	TATAGGTTTCAIGGAG	SEQ ID NO: 1
Primer 2	GCATGCCAATCTCTT	SEQ ID NO: 2
Primer 3	TGGAATGCCAGAACT	SEQ ID NO: 3
Primer 4	GCCTTAGATAAAACT	SEQ ID NO: 4
Primer 5	TGATGCACATCATGG	SEQ ID NO: 5
Primer 6	ACACAATTAACAGC	SEQ ID NO: 6
Primer 7	TGAAAGCTCACTCTG	SEQ ID NO: 7
Primer 8	AGGCAAAGACCGAAT	SEQ ID NO: 8
Primer 9	TCGAATAGCTAGATA	SEQ ID NO: 9
Primer 10	TTCCAGAGCCAAGCA	SEQ ID NO: 10
Primer 11	GTCTTTCGAAATGTAT	SEQ ID NO: 11
Primer 12	TTCATGAAATACTCC	SEQ ID NO: 12
Primer 13	GGAAGATCCAATCCA	SEQ ID NO: 13
Primer 14	GCTTTCATTTCTCA	SEQ ID NO: 14
Primer 15	GCCTGCTGAGAGTTA	SEQ ID NO: 15
Primer 16	GCTGTTCATGGATTG	SEQ ID NO: 16
Primer 17	GGGCAGGANG	SEQ ID NO: 17
Primer 18	NNATGTGG	SEQ ID NO: 18
Primer 19	AGGGTTTTCCAGTCACG TGC TTTTCTCTG TAAATCATCTGTG	SEQ ID NO: 19
Primer 20	AAACAGAGAAATCTCCATTTAGCACTT	SEQ ID NO: 20
Primer 21	AGGGTTTTCCAGTCACG GGCTTATCTAGCTATTCGACAGC	SEQ ID NO: 21
Primer 22	AGAGTGAGCTTTCATTTCTCAGTTATC	SEQ ID NO: 22

[0023]

附图说明

[0024] 图1是本发明针对1000pg的DNA模板扩增结果;其中A图为预扩增结果(3次重复);B图为*PIK3CA*基因9,20号外显子扩增结果。

[0025] 图2是本发明针对500pg的DNA模板扩增结果;其中A图为预扩增结果(3次重复);B图为*PIK3CA*基因9,20号外显子扩增结果。

[0026] 图3是本发明针对100pg的DNA模板扩增结果。A图为预扩增结果(3次重复);B图为*PIK3CA*基因9,20号外显子扩增结果。

[0027] 图4是本发明针对1000pg的DNA模板中*PIK3CA*基因9,20号外显子测序结果图。

[0028] 图5是本发明针对500pg的DNA模板中*PIK3CA*基因9,20号外显子测序结果图。

[0029] 图6是本发明针对100pg的DNA模板中*PIK3CA*基因9,20号外显子测序结果图。

具体实施方式

[0030] 下面结合附图和实施例对本发明作进一步详细的说明。以下实施例仅用于说明本发明而不适用于限制本发明的范围,该领域的技术人员可以根据上述本发明内容对本发明做出一些非本质的改进和调整。下述实施例中,若非特异表明,所用试剂均为分析纯,所有试剂均可从商业渠道获得,百分比均为质量百分比。文中未注明具体条件的实验方法,通常按照《分子克隆实验指南》中所述常规条件,或试剂制造厂商所建议的条件实施。除非另行定义,文中所使用的所有专业和科学用语与本领域熟练人员所熟悉的意义相同。

[0031] 实施例1:1000pg的DNA模板中*PIK3CA*基因突变检测

[0032] 1、实验材料

[0033] phi29 DNA聚合酶,10×reaction buffer,dNTP (10nM) ,100×BSA,1000pg的DNA模板,去离子水,primer1-prime18 (即Primer Mix),2×Pfu Mix,primer19-primer22,PCR仪,超薄产物纯化试剂盒(天根生化科技(北京)有限公司DP203),1%的琼脂糖凝胶,电泳仪。

[0034] 2、实验步骤及结果

[0035] 2.1 预扩增

[0036] (1)引物稀释

[0037] 将primer1-prime18分别稀释后混匀形成Primer Mix(表1),其中primer1-primer16引物的终浓度为0.1μM,primer17-primer18引物的终浓度为2μM。配置如下体系:

[0038]	10×reaction buffer	1.0 μL	;
	Primer Mix	2.5 μL	
	1000pg DNA 模板	1.0 μL	
	H ₂ O	4.3 μL	

[0039] (2)将上述试剂混匀后,98℃预变性10min,然后迅速置于冰上20min;

[0040] (3)再加入如下体系:

[0041]	dNTP (10nM)	0.5 μL	;
	100×BSA	0.2 μL	
	phi29 DNA 聚合酶	0.5 μL	

[0042] 将上述混合物混匀后,30-35℃扩增过夜,65℃加热10-20min使酶失活。铺1%的胶检测(图1A)。结果显示使用phi29DNA聚合酶对1000pg的DNA模板扩增效果良好。

[0043] 2.2 PCR产物纯化

[0044] (1)柱平衡步骤:向吸附柱CB1中加入500μL的平衡液BL,12,000 rpm (~13,400×g)离心1 min,倒掉收集管中的废液,将吸附柱重新放回收集管中;

[0045] (2) 估计PCR反应液的体积,向其中加入5倍体积的结合液PB,充分混匀(无需去除石蜡油或矿物油);

[0046] (3) 将上一步所得溶液加入一个吸附柱CB1中(吸附柱放入收集管中),室温放置2 min,12,000 rpm($\sim 13,400 \times g$)离心30-60s,倒掉收集管中的废液,将吸附柱CB1放入收集管中;

[0047] (4) 向吸附柱CB1中加入600 μ L漂洗液PW(使用前请先检查是否已加入无水乙醇),12,000 rpm ($\sim 13,400 \times g$)离心30-60s,倒掉收集管中的废液,将吸附柱CB1放入收集管中;

[0048] (5) 重复操作步骤(4);

[0049] (6) 12,000 rpm($\sim 13,400 \times g$)离心2 min,尽量除去漂洗液,将吸附柱置于室温放置数分钟,彻底地晾干,以防止残留的漂洗液影响下一步的实验;

[0050] (7) 取出吸附柱CB1,放入一个干净的离心管中,向吸附膜中间位置悬空滴加20-50 μ L洗脱缓冲液EB,室温放置2 min。12,000rpm($\sim 13,400 \times g$)离心2 min,收集DNA溶液。

[0051] 2.3 *PIK3CA*基因突变检测

[0052] (1) 配置如下PCR反应体系,分别扩增*PIK3CA*基因的第9号和20号外显子;

2 \times Pfu Mix	12.5 μ L
正向引物(10 μ M)	1.0 μ L
[0053] 反向引物(10 μ M)	1.0 μ L
DNA 模板	1.0 μ L
去离子水	补足至 25 μ L

[0054] 其中针对9号外显子突变的引物如SEQ ID NO:19- SEQ ID NO:20所示;针对20号外显子突变的引物如SEQ ID NO:21- SEQ ID NO:22所示。

[0055] (2) 反应条件:①94 $^{\circ}$ C,5min预变性;②94 $^{\circ}$ C,30s变性;③55 $^{\circ}$ C,30s退火;④72 $^{\circ}$ C,35s延伸;循环②至④35次;⑤72 $^{\circ}$ C,5min;

[0056] (3) PCR反应结束后,铺1%的胶检测(图1B),结果显示第二轮PCR对*PIK3CA*基因的第9和20号外显子均出现特异性扩增;然后送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序检测。测序结果如图4所示,*PIK3CA*基因第9号外显子发生突变c.1634A>C p.E545A和c.1658_1659GT>C p.S553fs*7,第20号外显子发生突变c.3140A>CG p.H1047R。

[0057] 实施例2:500pg的DNA模板中*PIK3CA*基因突变检测

[0058] 1、实验材料

[0059] phi29 DNA聚合酶,10 \times reaction buffer,dNTP (10nM),100 \times BSA,1000pg的DNA模板,去离子水,primer1-prime18(即Primer Mix),2 \times Pfu Mix,primer19-primer22,PCR仪,超薄产物纯化试剂盒(天根生化科技(北京)有限公司DP203),1%的琼脂糖凝胶,电泳仪。

[0060] 2、实验步骤

[0061] 2.1 预扩增

[0062] (1) 引物稀释。将primer1-prime18分别稀释后混匀形成Primer Mix(表1),其中

primer1-primer16引物的终浓度为0.1 μ M, primer17-primer18引物的终浓度为2 μ M。配置如下体系:

[0063]	10 \times reaction buffer	1.0 μ L
	Primer Mix	2.5 μ L
	500pg DNA 模板	1.0 μ L
	H ₂ O	4.3 μ L

[0064] (2) 将上述试剂混匀后, 98 $^{\circ}$ C 预变性10min, 然后迅速置于冰上20min。

[0065] (3) 再加入如下体系:

[0066]	dNTP (10mM)	0.5 μ L
	100 \times BSA	0.2 μ L
	phi29 DNA 聚合酶	0.5 μ L

[0067] 将上述混合物混匀后, 30-35 $^{\circ}$ C 扩增过夜, 65 $^{\circ}$ C 加热10-20min使酶失活。铺1%的胶检测(图2A)。结果显示使用phi29DNA聚合酶对500pg的DNA模板扩增效果良好。

[0068] 2.2 PCR产物纯化

[0069] (1) 柱平衡步骤: 向吸附柱CB1中加入500 μ L的平衡液BL, 12,000 rpm (~13,400 \times g) 离心1 min, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱重新放回收集管中。

[0070] (2) 估计PCR反应液的体积, 向其中加入5倍体积的结合液PB, 充分混匀(无需去除石蜡油或矿物油)。

[0071] (3) 将上一步所得溶液加入一个吸附柱CB1中(吸附柱放入收集管中), 室温放置2 min, 12,000 rpm (~13,400 \times g) 离心30-60 sec, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱CB1放入收集管中。

[0072] (4) 向吸附柱CB1中加入600 μ L漂洗液PW(使用前请先检查是否已加入无水乙醇), 12,000 rpm (~13,400 \times g) 离心30-60 sec, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱CB1放入收集管中。

[0073] (5) 重复操作步骤4。

[0074] (6) 12,000 rpm (~13,400 \times g) 离心2 min, 尽量除去漂洗液。将吸附柱置于室温放置数分钟, 彻底地晾干, 以防止残留的漂洗液影响下一步的实验。

[0075] (7) 取出吸附柱CB1, 放入一个干净的离心管中, 向吸附膜中间位置悬空滴加20-50 μ L洗脱缓冲液EB, 室温放置2 min。12,000rpm (~13,400 \times g) 离心2 min, 收集DNA溶液。

[0076] 2.3 *PIK3CA*基因突变检测

[0077] (1) 配置如下PCR反应体系, 分别扩增*PIK3CA*基因的第9和20号外显子。

[0078] 其中针对9号外显子突变的引物如SEQ ID NO:19- SEQ ID NO:20所示; 针对20号外显子突变的引物如SEQ ID NO:21- SEQ ID NO:22所示。

[0079] (2) 反应条件: ①94 $^{\circ}$ C, 5min预变性; ②94 $^{\circ}$ C, 30s变性; ③55 $^{\circ}$ C, 30s退火; ④72 $^{\circ}$ C, 35s延伸; 循环②至④35次; ⑤72 $^{\circ}$ C, 5min;

[0080] (3) PCR反应结束后,铺1%的胶检测(图2B),结果显示第二轮PCR对*PIK3CA*基因的第9和20号外显子均出现特异性扩增;然后送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序检测。测序结果如图5所示,*PIK3CA*基因第9号外显子发生突变c.1634A>C p.E545A和c.1658_1659GT>C p.S553fs*7,第20号外显子发生突变c.3140A>CG p.H1047R。

[0081] 实施例3:100pg的DNA模板中*PIK3CA*基因突变检测

[0082] 1、实验材料

[0083] phi29 DNA聚合酶,10×reaction buffer,dNTP (10nM),100×BSA,1000pg的DNA模板,去离子水,primer1-prime18 (即Primer Mix),2×Pfu Mix,primer19-primer22,PCR仪,超薄产物纯化试剂盒(天根生化科技(北京)有限公司DP203),1%的琼脂糖凝胶,电泳仪。

[0084] 2、实验步骤

[0085] 2.1 预扩增

[0086] (1) 引物稀释。将primer1-prime18分别稀释后混匀形成Primer Mix(表1),其中primer1-primer16引物的终浓度为0.1μM,primer17-primer18引物的终浓度为2μM。

[0087] 配置如下体系:

[0088]	10×reaction buffer	1.0 μL
	Primer Mix	2.5 μL
	100pg DNA 模板	1.0 μL
	H ₂ O	4.3 μL

[0089] (2) 将上述试剂混匀后,98℃预变性10min,然后迅速置于冰上20min。

[0090] (3) 再加入如下体系:

[0091]	dNTP (10nM)	0.5 μL
	100×BSA	0.2 μL
	phi29 DNA 聚合酶	0.5 μL

[0092] 将上述混合物混匀后,30-35℃扩增过夜,65℃加热10-20min使酶失活。铺1%的胶检测(图3A)。结果显示使用phi29DNA聚合酶对100pg的DNA模板扩增效果良好。

[0093] 2.2 PCR产物纯化

[0094] (1) 柱平衡步骤:向吸附柱CB1中加入500 μL的平衡液BL,12,000 rpm (~13,400×g) 离心1 min,倒掉收集管中的废液,将吸附柱重新放回收集管中。

[0095] (2) 估计PCR反应液的体积,向其中加入5倍体积的结合液PB,充分混匀(无需去除石蜡油或矿物油)。

[0096] (3) 将上一步所得溶液加入一个吸附柱CB1中(吸附柱放入收集管中),室温放置2 min,12,000 rpm (~13,400×g) 离心30-60 sec,倒掉收集管中的废液,将吸附柱CB1放入收集管中。

[0097] (4) 向吸附柱CB1中加入600 μL 漂洗液PW(使用前请先检查是否已加入无水乙

醇), 12,000 rpm (~13,400×g) 离心30-60 sec, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱CB1放入收集管中。

[0098] (5) 重复操作步骤4。

[0099] (6) 12,000 rpm (~13,400×g) 离心2 min, 尽量除去漂洗液。将吸附柱置于室温放置数分钟, 彻底地晾干, 以防止残留的漂洗液影响下一步的实验。

[0100] (7) 取出吸附柱CB1, 放入一个干净的离心管中, 向吸附膜中间位置悬空滴加20-50 μL 洗脱缓冲液EB, 室温放置2 min。12,000rpm (~13,400×g) 离心2 min, 收集DNA溶液。

[0101] 2. *PIK3CA* 基因突变检测

[0102] (1) 配置如下PCR反应体系, 分别扩增*PIK3CA*基因的第9和20号外显子。

2×Pfu Mix	12.5 μL	
正向引物(10 μM)	1.0 μL	
[0103] 反向引物(10 μM)	1.0 μL	;
DNA 模板	1.0 μL	
去离子水	补足至 25 μL	

[0104] 其中针对9号外显子突变的引物如SEQ ID NO:19- SEQ ID NO:20所示; 针对20号外显子突变的引物如SEQ ID NO:21- SEQ ID NO:22所示。

[0105] (2) 反应条件: ①94℃, 5min预变性; ②94℃, 30s变性; ③55℃, 30s退火; ④72℃, 35s延伸; 循环②至④35次; ⑤72℃, 5min;

[0106] (3) PCR反应结束后, 铺1%的胶检测(图3B), 结果显示第二轮PCR对*PIK3CA*基因的第9和20号外显子均出现特异性扩增; 然后送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序检测。测序结果如图6所示, *PIK3CA*基因第9号外显子发生突变c.1634A>C p.E545A和c.1658_1659GT>C p.S553fs*7, 第20号外显子发生突变c.3140A>CG p.H1047R。

[0107] 以上所述仅为本发明的优选实施例而已, 并不用于限制本发明, 对于本领域的技术人员来说, 本发明可以有各种更改和变化。凡在本发明的精神和原则之内, 所作的任何修改、等同替换、改进等, 均应包含在本发明的保护范围之内。

[0001]	序列表	
[0002]	<110> 昆明理工大学	
[0003]	<120> 用于检测微量组织中 <i>PIK3CA</i> 基因突变的引物组合及其应用	
[0004]	<160> 22	
[0005]	<170> PatentIn version 3.3	
[0006]	<210> 1	
[0007]	<211> 15	
[0008]	<212> DNA	
[0009]	<213> 人工序列	
[0010]	<400> 1	
[0011]	tataggtttc aggag	15
[0012]	<210> 2	
[0013]	<211> 15	
[0014]	<212> DNA	
[0015]	<213> 人工序列	
[0016]	<400> 2	
[0017]	gcatgccaat ctctt	15
[0018]	<210> 3	
[0019]	<211> 15	
[0020]	<212> DNA	
[0021]	<213> 人工序列	
[0022]	<400> 3	
[0023]	tggaatgcca gaact	15
[0024]	<210> 4	
[0025]	<211> 15	
[0026]	<212> DNA	
[0027]	<213> 人工序列	
[0028]	<400> 4	
[0029]	gccttagata aaact	15
[0030]	<210> 5	
[0031]	<211> 15	
[0032]	<212> DNA	
[0033]	<213> 人工序列	
[0034]	<400> 5	
[0035]	tgatgcacat catgg	15
[0036]	<210> 6	
[0037]	<211> 15	
[0038]	<212> DNA	

[0039]	<213>	人工序列	
[0040]	<400>	6	
[0041]	acacaattaa	acagc	15
[0042]	<210>	7	
[0043]	<211>	15	
[0044]	<212>	DNA	
[0045]	<213>	人工序列	
[0046]	<400>	7	
[0047]	tgaaagctca	ctctg	15
[0048]	<210>	8	
[0049]	<211>	15	
[0050]	<212>	DNA	
[0051]	<213>	人工序列	
[0052]	<400>	8	
[0053]	aggcaaagac	cgatt	15
[0054]	<210>	9	
[0055]	<211>	15	
[0056]	<212>	DNA	
[0057]	<213>	人工序列	
[0058]	<400>	9	
[0059]	tcgaatagct	agata	15
[0060]	<210>	10	
[0061]	<211>	15	
[0062]	<212>	DNA	
[0063]	<213>	人工序列	
[0064]	<400>	10	
[0065]	ttccagagcc	aagca	15
[0066]	<210>	11	
[0067]	<211>	15	
[0068]	<212>	DNA	
[0069]	<213>	人工序列	
[0070]	<400>	11	
[0071]	gtctttcgaa	tgtat	15
[0072]	<210>	12	
[0073]	<211>	15	
[0074]	<212>	DNA	
[0075]	<213>	人工序列	
[0076]	<400>	12	
[0077]	ttcatgaaat	actcc	15

[0078]	<210>	13	
[0079]	<211>	15	
[0080]	<212>	DNA	
[0081]	<213>	人工序列	
[0082]	<400>	13	
[0083]		ggaagatcca atcca	15
[0084]	<210>	14	
[0085]	<211>	15	
[0086]	<212>	DNA	
[0087]	<213>	人工序列	
[0088]	<400>	14	
[0089]		gctttcattt tctca	15
[0090]	<210>	15	
[0091]	<211>	15	
[0092]	<212>	DNA	
[0093]	<213>	人工序列	
[0094]	<400>	15	
[0095]		gcctgctgag agtta	15
[0096]	<210>	16	
[0097]	<211>	15	
[0098]	<212>	DNA	
[0099]	<213>	人工序列	
[0100]	<400>	16	
[0101]		gctgttcatg gattg	15
[0102]	<210>	17	
[0103]	<211>	10	
[0104]	<212>	DNA	
[0105]	<213>	人工序列	
[0106]	<400>	17	
[0107]		gggcaggang	10
[0108]	<210>	18	
[0109]	<211>	8	
[0110]	<212>	DNA	
[0111]	<213>	人工序列	
[0112]	<400>	18	
[0113]		nnatgtgg	8
[0114]	<210>	19	
[0115]	<211>	42	
[0116]	<212>	DNA	

[0117]	<213>	人工序列	
[0118]	<400>	19	
[0119]	agggttttcc	cagtcacgtg ctttttctgt aaatcatctg tg	42
[0120]	<210>	20	
[0121]	<211>	27	
[0122]	<212>	DNA	
[0123]	<213>	人工序列	
[0124]	<400>	20	
[0125]	aaacagagaa	tctccatttt agcactt	27
[0126]	<210>	21	
[0127]	<211>	41	
[0128]	<212>	DNA	
[0129]	<213>	人工序列	
[0130]	<400>	21	
[0131]	agggttttcc	cagtcacggg cttatctagc tattcgacag c	41
[0132]	<210>	22	
[0133]	<211>	28	
[0134]	<212>	DNA	
[0135]	<213>	人工序列	
[0136]	<400>	22	
[0137]	agagtgagct	ttcattttct cagttatc	28

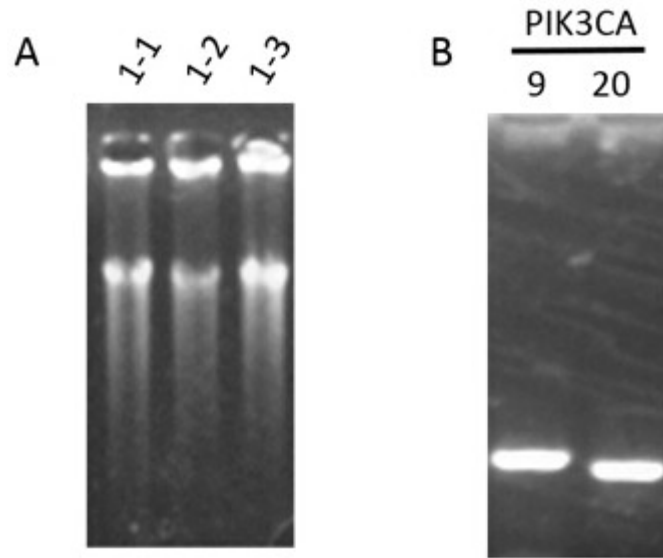


图1

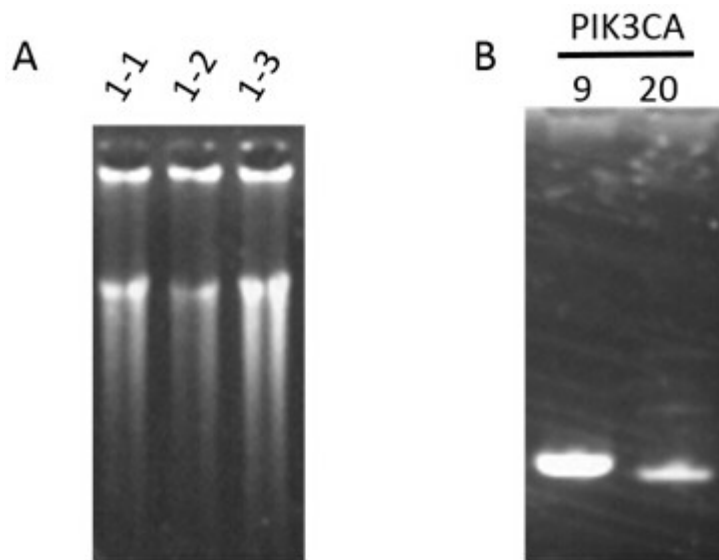


图2

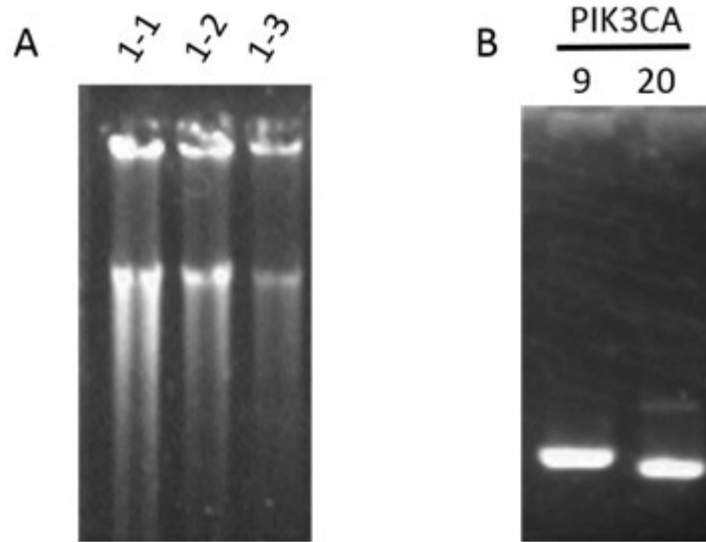


图3

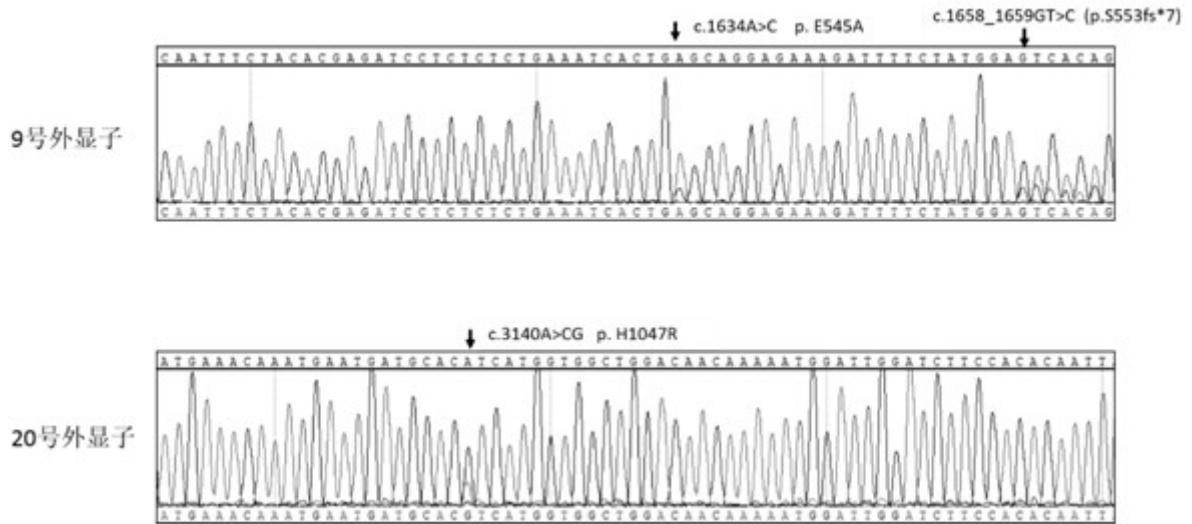


图4

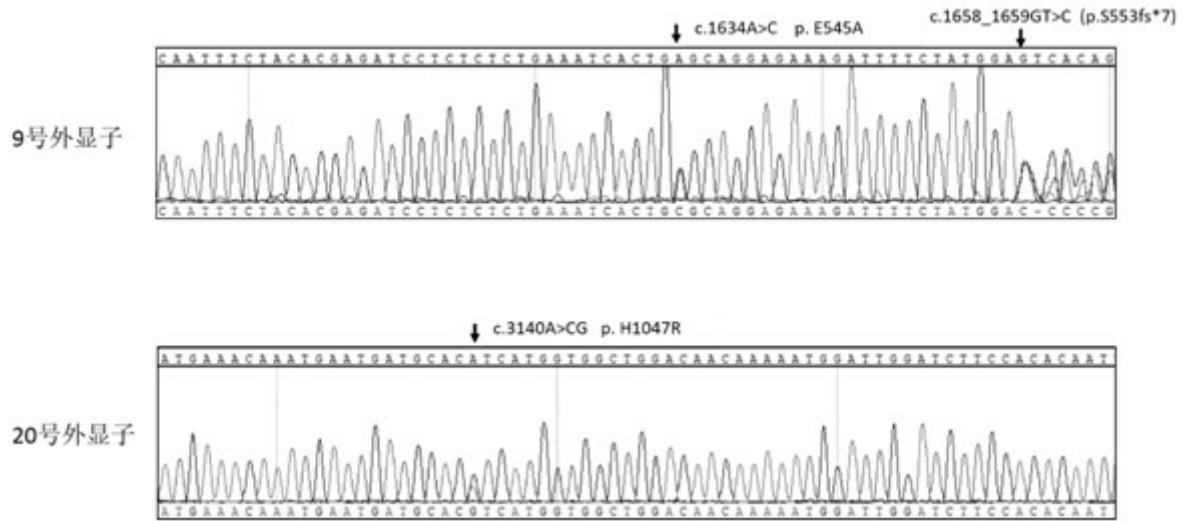


图5

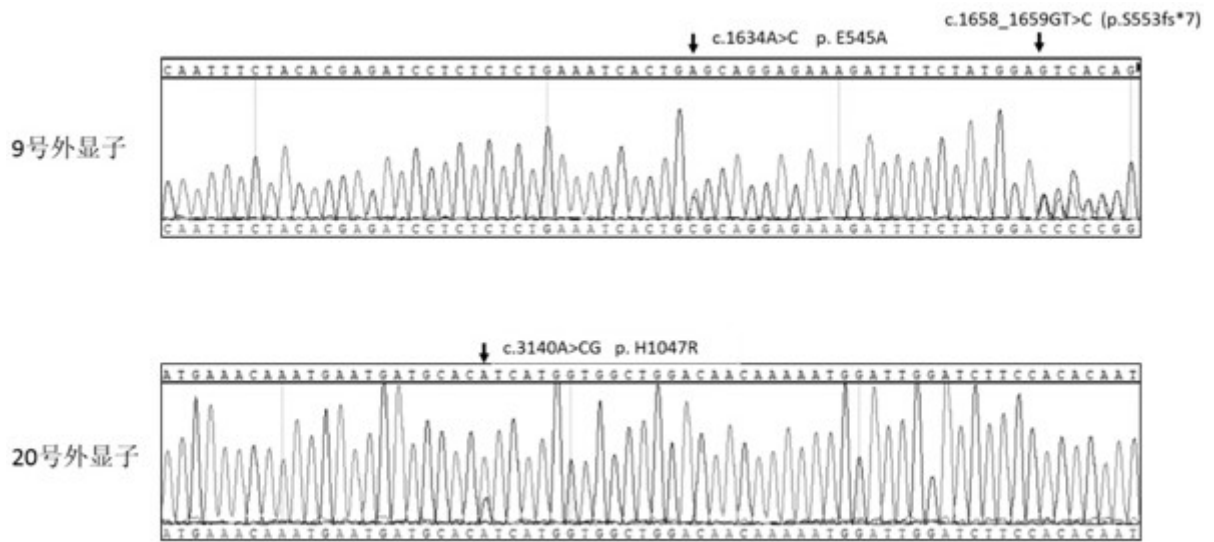


图6