



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112210595 A

(43) 申请公布日 2021.01.12

(21) 申请号 202010801573.X

(22) 申请日 2020.08.11

(71) 申请人 广州君瑞康生物科技有限公司  
地址 510700 广东省广州市黄埔区新瑞路6号A205房

(72) 发明人 董超 张泽龙 卢东培

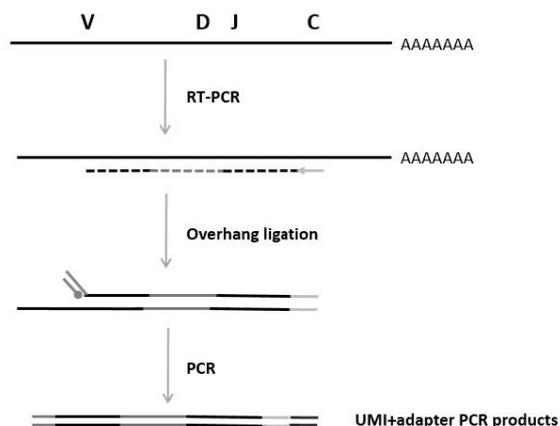
(74) 专利代理机构 广州博士科创知识产权代理有限公司 44663  
代理人 梁志标

(51) Int. Cl.  
G12Q 1/6869 (2018.01)  
G12N 15/11 (2006.01)

权利要求书1页 说明书9页 附图1页

(54) 发明名称  
一种检测微小残留病的方法

(57) 摘要  
本发明提供了一种检测微小残留MRD的方法,通过在cDNA 5'端添加一种Ω双链接头,使得所述方法相较于线性双接头连接效率更高,建库时间更短且数据GC更稳定。



1. 一种检测微小残留病的  $\Omega$  双接头, 其特征在于, 所述  $\Omega$  双接头由 top 序列和 bottom 序列组成:

其中, 所述 top 序列选自 SEQ ID NO. 10-21 任一所示的序列, 所述 bottom 序列为 SEQ ID NO. 22 所示的序列。

2. 一种检测微小残留病的试剂盒, 所述试剂盒含有如权利要求 1 所述的  $\Omega$  双接头。

3. 如权利要求 1 所述的  $\Omega$  双接头在制备用于检测微小残留病的试剂中的应用, 其特征在于, 所述试剂的使用方法为:

步骤 1 按照本领域常规方法, 从待检者血液里提取总 RNA;

步骤 2 利用反转引物序列将步骤 1 获得的 RNA 延伸成 cDNA, 通过反应条件控制延伸长度;

步骤 3 在 cDNA 上连接所述  $\Omega$  双接头序列;

步骤 4 PCR。

4. 如权利要求 3 所述的应用, 其特征在于, 所述反转引物序列选自 SEQ ID NO. 1-9 任一所示序列。

## 一种检测微小残留病的方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,具体涉及一种检测微小残留病(Minimal Residual Disease,MRD)的方法。

### 背景技术

[0002] 淋系血液癌症主要包括T/B淋巴细胞白血病、淋巴瘤以及多发性骨髓瘤,而微小残留病(Minimal Residual Disease,MRD)是指白血病/淋巴瘤/骨髓瘤患者经诱导治疗缓解后,体内仍残留少量癌细胞的状态,最终可能会引起疾病复发。随着化疗、特异性靶向治疗、造血干细胞移植(HSCT)治疗等技术的不断改进,血液癌症的治疗效果甚至可达到血液学完全缓解(hematologic complete remission,HCR),但获得HCR并不足以保证患者长期无病存活,因此复发仍是困扰癌症治愈的一个难点,究其原因主要与血液癌症细胞微小残留病(MRD)有关。近年来研究表明,血液癌症复发与MRD密切相关,MRD升高可提前预示血液癌症的全面复发。因此,采用灵敏度高、特异性强及稳定可靠的实验方法对血液癌症患者进行定期MRD检测,对评估疾病状态、判断疗效、预测复发、指导治疗具有重要的临床意义。血液癌症的治疗方案与新型有效的药物的配合,患者疾病缓解程度更深,MRD监测的时间点及检测灵敏度对于复发预测尤为重要。

目前检测微小残留病(MRD)的方法包括多参数流式细胞仪检测(FC)、聚合酶链反应(PCR)、融合基因检测实时荧光定量聚合酶链反应(RT-qPCR)、等位基因寡核苷酸杂交法(ASO-PCR)和高通量二代测序(IG/TR NGS)等。其中最常用的是基于分子免疫学的流式细胞仪术(Flow Cytometry),但其灵敏度仅可达 $10^{-4}$ 数量级(0.01%),且该方法对MRD结果判断的准确性在很大程度上取决于每个实验室的实验条件和操作者的个人经验,标准化程度低,而且有研究表明在化疗过程中由于化疗药物的影响使癌细胞的免疫表型发生变化,即“免疫漂移”现象,可影响MRD检测结果的可靠性和准确性。聚合酶链反应(PCR)的方法无法定量,只能看到IG/TCR的基因重排的情况。融合基因实时荧光定量聚合酶链反应(RT-qPCR)检测方法只能应用于存在融合基因异常的急性白血病,不能提示白血病细胞的来源。等位基因寡核苷酸杂交法(ASO-PCR)的应用较普遍存在于欧洲,该方法需要根据每一位患者定制一套引物,容易出现非特异性扩增,实验条件和操作技术要求较高,耗时耗人力。

T细胞基因座上大量的V(可变区)、D(多变区)、J(连接区)基因片段在T细胞受体的形成中会产生各种多样性重组。这种V-D-J基因的重组赋予了每一种T细胞自己独特的T细胞受体(TCR),从而使得每一个TCR的序列能有效的成为一个T细胞克隆的唯一生物标志物。因此对T细胞TCR基因的序列组成进行测序,可以很好的定位每一种T细胞,其中包括白血病癌变的T细胞,并且灵敏度最高可达 $10^{-6}$ (0.0001%)。然而由于TCR基因的最大特点是V、D、J基因片段的随机重组,所以,针对未知基因序列,很难设计一个上游引物用于识别TCR基因的5'端序列,所以也无法利用PCR技术扩增TCR基因和测序。

而另外一种TCR测序方法,即多重引物PCR的方法,只能测序TCR基因中的部分序列信息,这样使得测序基因信息不完整。另外,多重引物PCR方法的引物是根据已知V、J基因设计

的,但在癌症病人中,癌细胞的基因突变是很常见的,如果白血病癌细胞的TCR产生了突变,那么已知序列的引物就有可能无法识别突变后的基因,对检测结果来说,就容易造成假阴性。

## 发明内容

[0003] 针对现有技术中TCR RNA测序方案存在检测灵敏度、特异性较低,连接效率不高的技术问题,本发明提供了一种 $\Omega$ 双链接头序列,用于PCR扩增时5'端引物结合及UMI添加。 $\Omega$ 双链接头相较于现有技术中使用的illumina通用线性双链接头连接效率更高,时间更短且更稳定。

进一步的,本发明提供一种检测微小残留病的方法。更为具体的,所述方法包括如下技术步骤:

- 1、获取人血液样本10ml于EDTA抗凝管;
- 2、分离淋巴细胞并用Trizol提取RNA;
- 3、RNA反转录成cDNA。

4、在cDNA 5'端添加一种 $\Omega$ 双链接头,用于PCR扩增时5'端引物结合及UMI添加,其中,所述UMI为一段已知的序列用于区分测序后的目标区域数据。

- 5、PCR:通过单对引物的方式扩增重组TCR cDNA。

在一些实施方案中,步骤3中所用的反转录引物选自如下序列任一:

SEQ ID NO.1:GAATGGACTCCTCTGCCACTGGATTAAGACACAGTCGGAGGCCAAGCGGTCT

SEQ ID NO.2:GAATGGACTCCTCTGCCACTGGATTGAACCTTAGTCGGAGGCCAAGCGGTCT

SEQ ID NO.3:GAATGGACTCCTCTGCCACTGGATTGCTAAGTAGTCGGAGGCCAAGCGGTCT

SEQ ID NO.4:GAATGGACTCCTCTGCCACTGGATCTAATCGAAGTCGGAGGCCAAGCGGTCT

SEQ ID NO.5:GAATGGACTCCTCTGCCACTGGATCTAGAACAAGTCGGAGGCCAAGCGGTCT

SEQ ID NO.6:GAATGGACTCCTCTGCCACTGGATTAAGTTCCAGTCGGAGGCCAAGCGGTCT

SEQ ID NO.7:GAATGGACTCCTCTGCCACTGGATTAGACCTAAGTCGGAGGCCAAGCGGTCT

SEQ ID NO.8:GAATGGACTCCTCTGCCACTGGATAAGGTTCAAGTCGGAGGCCAAGCGGTCT

SEQ ID NO.9:GAATGGACTCCTCTGCCACTGGATACTTAGCAAGTCGGAGGCCAAGCGGTCT

在一些实施方案中,为了区分样本,步骤4中所使用的 $\Omega$ 双链接头由top序列和bottom序列组成,每个样本选用不同top序列接头,通过不同top序列接头中不一致的序列区域来实现区分样本的技术效果。

在一些实施方案中,所述 $\Omega$ 双链接头top序列为如下序列组成的组:

SEQ ID NO. 10: CAGAGGTCAGCTTCGGGCTGCCAGCACTAAAGCCCGATCGCTCGAGCTCG

SEQ ID NO. 11: CAGAGGTCAGCTTCGGGCTGCTGGTGACAAAGCCCGATCGCTCGAGCTCG

SEQ ID NO. 12: CAGAGGTCAGCTTCGGGCTGCACCTAGACAAGCCCGATCGCTCGAGCTCG

SEQ ID NO. 13: CAGAGGTCAGCTTCGGGCTGCGGCAAACAAGCCCGATCGCTCGAGCTCG

SEQ ID NO. 14: CAGAGGTCAGCTTCGGGCTGCACGACCCAAAGCCCGATCGCTCGAGCTCG

SEQ ID NO. 15: CAGAGGTCAGCTTCGGGCTGCCTCCCCAAAAGCCCGATCGCTCGAGCTCG

SEQ ID NO. 16: CAGAGGTCAGCTTCGGGCTGCTCCAACCAAGCCCGATCGCTCGAGCTCG

SEQ ID NO. 17: CAGAGGTCAGCTTCGGGCTGCCACACCACAAGCCCGATCGCTCGAGCTCG

SEQ ID NO. 18: CAGAGGTCAGCTTCGGGCTGCACCCAAAGAAGCCCGATCGCTCGAGCTCG  
 SEQ ID NO. 19: CAGAGGTCAGCTTCGGGCTGCACCAGTGTAAAGCCCGATCGCTCGAGCTCG  
 SEQ ID NO. 20: CAGAGGTCAGCTTCGGGCTGCAACTGGGAAAGCCCGATCGCTCGAGCTCG  
 SEQ ID NO. 21: CAGAGGTCAGCTTCGGGCTGCGGTGAGGAAAGCCCGATCGCTCGAGCTCG

在一些实施方案中,所述 $\Omega$ 双链接头bottom序列为:

SEQ ID NO. 22: AGCGATCACCTCTG

与现有技术相比,本发明的技术方案具有如下突出的技术效果:

1. 使用的 $\Omega$ 双接头方式相较于线性双接头连接效率更高,时间更短且更稳定;
2.  $\Omega$ 接头序列中包含有不同的UMI序列,可显著提高检测灵敏度及准确性。

## 附图说明

[0004] 附图用来提供对本发明的进一步理解,并且构成说明书的一部分,与本发明的实施例一起用于解释本发明,并不构成对本发明的限制。在附图中:

图1 使用 $\Omega$ 双接头进行PCR扩增;

图2 本发明所用的 $\Omega$ 接头与传统线性双接头(Y接头)的连接效率对比(泳道1-4: $\Omega$ 双接头;Lane 5:Y接头)。

## 具体实施方式

[0005] 以下结合附图对本发明的优选实施例进行说明,应当理解,此处所描述的优选实施例仅用于说明和解释本发明,并不用于限定本发明。

### 实施例1

步骤1 按照本领域常规方法,从待检者血液里提取总RNA。

步骤2 利用反转引物序列将步骤1获得的RNA延伸成cDNA,通过反应条件控制延伸长度。

所述反转引物序列为:

SEQ ID NO.1:GAATGGACTCCTCTGCCACTGGATTAAGACACAGTCGGAGGCCAAGCGGTCT

反应体系为:

RNA (200ng)	X ul
5x反转录缓冲液	5 ul
dNTP (10Mm)	1 ul
SEQ ID NO.1 (20uM)	3 ul
Superscript II RT	1 ul
ddH <sub>2</sub> O	(40-X) ul

反应程序为:

4°C 1min, 42°C 30min, 70°C 8min, 4°C 永久。

最终获得的cDNA用1.5x Axygen磁珠纯化并洗脱至50ul。

步骤3 在cDNA上连接 $\Omega$ 双接头序列。

所述 $\Omega$ 双接头序列由top序列和bottom序列组成,其中所述top序列为:

SEQ ID NO. 10: CAGAGGTCAGCTTCGGGCTGCCAGCACTAAAGCCCGATCGCTCGAGCTCG

所述buttom序列为:

SEQ ID NO. 22: AGCGATCACCTCTG

反应体系:

CPE cDNA 50 ul  
Ligation buffer (10x) 8 ul  
T4 ligase (5U/ul) 2 ul  
Adapter 1 (10uM) 10 ul  
H<sub>2</sub>O 10 ul

反应程序:37°C 1hr, 65°C 15min, 4°C 永久。

DcDNA用1.5x Axygen磁珠纯化并洗脱至10ul。

步骤4 PCR

PCR引物为:

SEQ ID NO. 23: AGACAAGCTCGAGCTCGAGCGATCGGGCTT

SEQ ID NO. 24: TCCTAAGACCGCTTGGCCTCCGACT

反应体系:

Kappa 2x master mix 12.5 ul  
Lig DNA 10 ul  
SEQ ID NO.7 (10uM) 1 ul  
SEQ ID NO.8 (10uM) 1 ul  
H<sub>2</sub>O 0.5 ul

反应程序:

温度	时间	循环
95° C	30s	
95° C	15s	15 个循环
56° C	30s	
72° C	4min	
4° C	Hold	

DNA用1x Axygen磁珠纯化并洗脱至20ul。

实施例2

步骤1 按照本领域常规方法,从待检者血液里提取总RNA。

步骤2 利用反转引物序列将步骤1获得的RNA延伸成cDNA,通过反应条件控制延伸长度。

所述反转引物序列为:

SEQ ID NO.2:GAATGGACTCCTCTGCCACTGGATTGAACCTTAGTCGGAGGCCAAGCGGTCT。

反应体系为:

RNA (200ng) X ul  
5x反转录缓冲液 5 ul  
dNTP (10Mm) 1 ul  
SEQ ID NO.1 (20uM) 3 ul

Superscript II RT            1 ul  
ddH<sub>2</sub>O                        (40-X) ul

反应程序为:

4°C 1min, 42°C 30min, 70°C 8min, 4°C 永久。

最终获得的cDNA用1.5x Axygen磁珠纯化并洗脱至50ul。

步骤3 在cDNA上连接Ω双接头序列。

所述Ω双接头序列由top序列和bottom序列组成,其中所述top序列为:

SEQ ID NO. 11: CAGAGGTCAGCTTCGGGCTGCTGGTGACAAAGCCCGATCGCTCGAGCTCG

所述bottom序列为:

SEQ ID NO. 22: AGCGATCACCTCTG

反应体系:

CPE cDNA                    50 ul  
Ligation buffer (10x)      8 ul  
T4 ligase (5U/ul)          2 ul  
Adapter 1 (10uM)          10 ul  
H<sub>2</sub>O                            10 ul

反应程序:37°C 1hr, 65°C 15min, 4°C 永久。

DcDNA用1.5x Axygen磁珠纯化并洗脱至10ul。

步骤4 PCR

PCR引物为:

SEQ ID NO. 23: AGACAAGCTCGAGCTCGAGCGATCGGGCTT

SEQ ID NO. 24: TCCTAAGACCGCTTGGCCTCCGACT

反应体系:

Kappa 2x master mix            12.5 ul  
Lig DNA                        10 ul  
SEQ ID NO.7 (10uM)            1 ul  
SEQ ID NO.8 (10uM)            1 ul  
H<sub>2</sub>O                            0.5 ul

反应程序:

温度	时间	循环
95° C	30s	
95° C	15s	15 个循环
56° C	30s	
72° C	4min	
4° C	Hold	

DNA用1x Axygen磁珠纯化并洗脱至20ul。

实施例3

步骤1 按照本领域常规方法,从待检者血液里提取总RNA。

步骤2 利用反转引物序列将步骤1获得的RNA延伸成cDNA,通过反应条件控制延伸长

度。

所述反转引物序列为：

SEQ ID NO.3:GAATGGACTCCTCTGCCACTGGATTGCTAAGTAGTCGGAGGCCAAGCGGTCT。

反应体系为：

RNA (200ng)	X ul
5x反转录缓冲液	5 ul
dNTP (10Mm)	1 ul
SEQ ID NO.1 (20uM)	3 ul
Superscript II RT	1 ul
ddH <sub>2</sub> O	(40-X) ul

反应程序为：

4°C 1min, 42°C 30min, 70°C 8min, 4°C 永久。

最终获得的cDNA用1.5x Axygen磁珠纯化并洗脱至50ul。

步骤3 在cDNA上连接Ω双接头序列。

所述Ω双接头序列由top序列和bottom序列组成,其中所述top序列为：

SEQ ID NO. 12: CAGAGGTCAGCTTCGGGCTGCACCTAGACAAGCCCGATCGCTCGAGCTCG

所述bottom序列为：

SEQ ID NO. 22: AGCGATCACCTCTG

反应体系：

CPE cDNA	50 ul
Ligation buffer (10x)	8 ul
T4 ligase (5U/ul)	2 ul
Adapter 1 (10uM)	10 ul
H <sub>2</sub> O	10 ul

反应程序:37°C 1hr, 65°C 15min, 4°C 永久。

DcDNA用1.5x Axygen磁珠纯化并洗脱至10ul。

步骤4 PCR

PCR引物为：

SEQ ID NO. 23: AGACAAGCTCGAGCTCGAGCGATCGGGCTT

SEQ ID NO. 24: TCCTAAGACCGCTTGGCCTCCGACT

反应体系：

Kappa 2x master mix	12.5 ul
Lig DNA	10 ul
SEQ ID NO.7 (10uM)	1 ul
SEQ ID NO.8 (10uM)	1 ul
H <sub>2</sub> O	0.5 ul

反应程序：

温度	时间	循环
95° C	30s	
95° C	15s	15 个循环
56° C	30s	
72° C	4min	
4° C	Hold	

DNA用1x Axygen磁珠纯化并洗脱至20ul。

#### 实施例4

步骤1 按照本领域常规方法,从待检者血液里提取总RNA。

步骤2 利用反转引物序列将步骤1获得的RNA延伸成cDNA,通过反应条件控制延伸长度。所述反转引物序列为:

SEQ ID NO.4:GAATGGACTCCTCTGCCACTGGATCTAATCGAAGTCGGAGGCCAAGCGGTCT。

反应体系为:

RNA (200ng)	X ul
5x反转录缓冲液	5 ul
dNTP (10Mm)	1 ul
SEQ ID NO.1 (20uM)	3 ul
Superscript II RT	1 ul
ddH <sub>2</sub> O	(40-X) ul

反应程序为:

4°C 1min, 42°C 30min, 70°C 8min, 4°C 永久。

最终获得的cDNA用1.5x Axygen磁珠纯化并洗脱至50ul。

步骤3 在cDNA上连接Ω双接头序列。

所述Ω双接头序列由top序列和bottom序列组成,其中所述top序列为:

SEQ ID NO. 13: CAGAGGTCAGCTTCGGGCTGCGCAAACAAAGCCCGATCGCTCGAGCTCG

所述bottom序列为:

SEQ ID NO. 22: AGCGATCACCTCTG

反应体系:

CPE cDNA	50 ul
Ligation buffer (10x)	8 ul
T4 ligase (5U/ul)	2 ul
Adapter 1 (10uM)	10 ul
H <sub>2</sub> O	10 ul

反应程序:37°C 1hr, 65°C 15min, 4°C 永久。

DcDNA用1.5x Axygen磁珠纯化并洗脱至10ul。

步骤4 PCR

PCR引物为:

SEQ ID NO. 23: AGACAAGCTCGAGCTCGAGCGATCGGGCTT

SEQ ID NO. 24: TCCTAAGACCGCTTGGCCTCCGACT

反应体系:

Kappa 2x master mix	12.5 ul
Lig DNA	10 ul
SEQ ID NO.7 (10uM)	1 ul
SEQ ID NO.8 (10uM)	1 ul
H <sub>2</sub> O	0.5 ul

反应程序:

温度	时间	循环
95° C	30s	
95° C	15s	15 个循环
56° C	30s	
72° C	4min	
4° C	Hold	

DNA用1x Axygen磁珠纯化并洗脱至20ul。

实施例5 (对比例)

步骤同实施例1-4,其中接头序列替换为现有技术已知的线性双链Y接头序列,其序列如下所示:

Top:

SEQ ID NO.25:Caagcagaagacggcatacagagattatacggcgtctcgtgggctgg

Buttom:

SEQ ID NO.26:aatgatacggcgcaccaccgagatctacactagctacttcgtcgccagcgtc

实验结果:

1、电泳结果:

实施例1-5的电泳结果如图2所示,Lane 4亮度明显高于Lane1-3 and Lane 5。根据电泳结果可知本发明所用的Ω接头连接效率显著高于Y接头。

2、测序多样性:

如下表所示,本发明的欧米伽接头在对患者进行微小残留病相关基因测序过程中,在Reads数目接近的情况下,获得的unique reads数量远远多于普通Y接头,说明使用本发明的Ω接头序列进行测序检测到的基因多样性更高,这使得最终的鉴定结果更为准确,可有效避免假阳性结果或漏检。

	测序类型	Unique reads	duplicate	与疾病相关识别位置	与疾病相关的 MRD 序列	Reads 数
实施例 1 所用 Q 接头	PE150	211	8.51%	MDR	CASRGETQYF	504
实施例 2 所用 Q 接头	PE150	207	8.32%	MDR	CASRPGTSSYEQYF	523
实施例 3 所用 Q 接头	PE150	198	8.45%	MDR	CASSLGGQKETQYF	536
实施例 4 所用 Q 接头	PE150	225	8.70%	MDR	CASSLATDTQYF	512
对比例 所用 Y 接头	PE150	127	3.20%	MDR	CASSLATDTQYF	587

显然,本领域的技术人员可以对本发明进行各种改动和变型而不脱离本发明的精神和范围。这样,倘若本发明的这些修改和变型属于本发明权利要求及其等同技术的范围之内,则本发明也意图包含这些改动和变型在内。

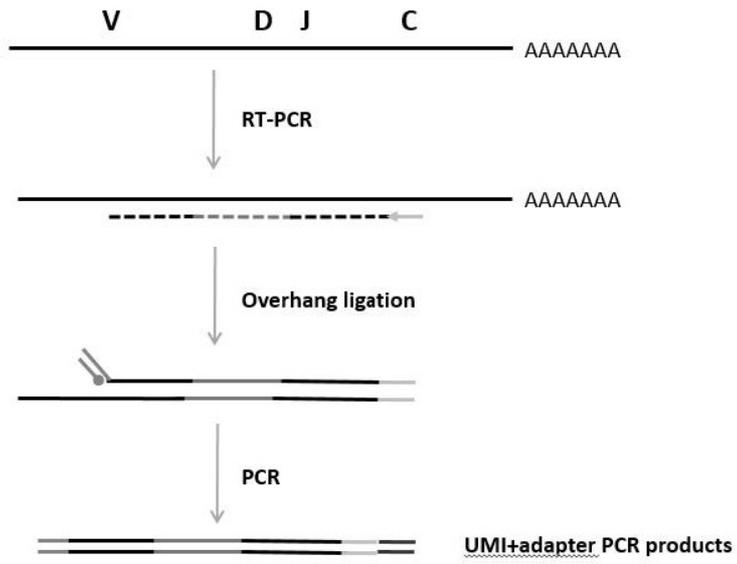


图1

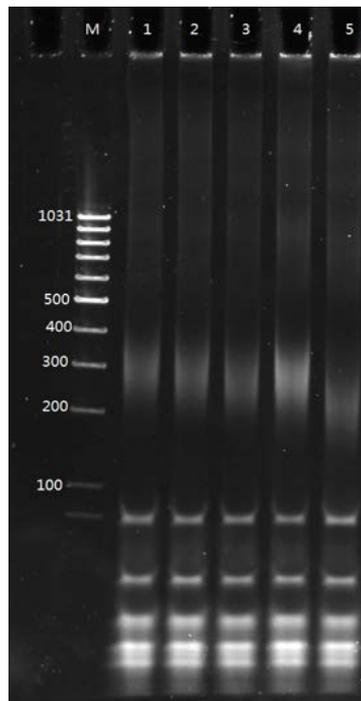


图2