



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 102559866 B

(45)授权公告日 2017.03.01

(21)申请号 201110348377.2

C12N 15/11(2006.01)

(22)申请日 2011.10.31

(56)对比文件

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 102559866 A

薛志红等. EGFR的多态性与鼻咽癌放射敏感性的初步研究.《肿瘤预防与治疗》.2008,(第01期),

(43)申请公布日 2012.07.11

朱红等. EGFR突变与非小细胞肺癌酪氨酸激酶抑制剂靶向治疗.《中国肿瘤生物治疗杂志》.2007,(第02期),

(30)优先权数据

2010-244643 2010.10.29 JP

庄莉. 吉非替尼对EGFR基因突变型晚期肺癌患者的影响.《山东医药》.2009,(第05期),

(73)专利权人 爱科来株式会社

地址 日本京都府

李彦等. EGFR表达的相关因素分析.《西南军医》.2008,(第06期),

(72)发明人 井口亚希 伊集院萌子

审查员 汪未申

(74)专利代理机构 北京东方亿思知识产权代理有限公司 11258

代理人 肖善强

(51)Int.Cl.

C12Q 1/68(2006.01)

权利要求书1页 说明书43页

序列表20页 附图8页

(54)发明名称

EGFR基因的多态性检测用探针、扩增用引物及其应用

(57)摘要

本发明提供了能够简便且以优秀的可信度来判别关于EGFR基因中不同多态性的多态性检测用探针、扩增用引物及其用途。选自P1、P3、P5~P7及P15~P18中的至少一种经荧光标记的寡核苷酸作为多态性检测用探针来使用。

1. 多态性检测用探针,所述探针是能检测EGFR外显子21 858多态性的探针,其特征在于所述探针由下述寡核苷酸组成:

(P1)由序列编号7的碱基序列构成、且3'末端被荧光染料标记的寡核苷酸。

2. 如权利要求1所述的探针,其中,所述经荧光标记的寡核苷酸在未杂交靶标序列时发出荧光,并且,与所述靶标序列杂交时荧光强度减少或增加。

3. 如权利要求2所述的探针,其中,所述经荧光标记的寡核苷酸在未杂交靶标序列时发出荧光,与所述靶标序列杂交时荧光强度减少。

4. 如权利要求1~3中任意一项所述的探针,其中,所述探针是用于熔解曲线分析的探针。

5. 用于检测EGFR基因中多态性的试剂盒,所述试剂盒含有用于检测EGFR外显子21 858多态性的权利要求1~4中任意一项所述的探针。

6. 如权利要求5所述的试剂盒,所述探针为由选自下述P5~P7的一种以上的荧光标记寡核苷酸构成的多态性检测用探针,

(P5)由序列编号5的碱基序列构成的寡核苷酸、

(P6)由序列编号4的碱基序列构成的寡核苷酸、

(P7)由序列编号6的碱基序列构成的寡核苷酸。

7. 如权利要求5所述的试剂盒,所述试剂盒还含有检测EGFR外显子20T790M的多态性的探针。

8. 如权利要求6所述的试剂盒,所述试剂盒还含有检测EGFR外显子20T790M的多态性的探针。

9. 如权利要求5所述的试剂盒,所述试剂盒还含有:

由序列编号15记载的寡核苷酸和序列编号16记载的寡核苷酸构成的引物组,或者由序列编号15记载的寡核苷酸和序列编号17记载的寡核苷酸构成的引物组。

10. 如权利要求6所述的试剂盒,所述试剂盒还含有:

由序列编号15记载的寡核苷酸和序列编号17记载的寡核苷酸构成的引物组,以及由序列编号19记载的寡核苷酸和序列编号20记载的寡核苷酸构成的引物组。

EGFR基因的多态性检测用探针、扩增用引物及其应用

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求享有以2010年10月29日提交的日本专利申请号2010-244643为基础的优先权,该申请的全部公开内容通过引用并入本文。

背景技术

[0003] 本发明涉及EGFR基因的多态性检测用探针、扩增用引物及其应用。

[0004] 表皮生长因子受体(Epidermal Growth Factor Receptor:EGFR)是表皮生长因子(EGF)的酪氨酸激酶受体。已知,EGFR在多种实体癌中高度表达,其过表达与癌症的恶性程度或预后相关联。因此,例如,将吉非替尼等EGFR的酪氨酸激酶抑制剂(EGFR-TKI)作为癌症治疗药物使用。但是,患者中,既有通过吉非替尼肿瘤缩小效果得以提高的情形,也有出现了对吉非替尼的耐药性而无法获得治疗效果的情形。并且,近年,已有研究表明对这类药剂的敏感度与EGFR的突变相关(PLoS Medicine,2005年,Vol.2,No.3,p.225-235和Journal of Clinical Oncology,2005年,Vol.23,No.11,p.2513-2520)。

[0005] 已知:上述突变例如是EGFR的第790位和第858位上的替换突变,EGFR基因外显子19中的缺失突变(PLoS Medicine,2005年,Vol.2,No.3,p.225-235和Journal of Clinical Oncology,2005年,Vol.23,No.11,p.2513-2520)。上述第790位上的突变是EGFR的第790位氨基酸苏氨酸(T)被替换为甲硫氨酸(M)的突变,序列编号21所示的EGFR基因的部分序列中,第347位碱基胞嘧啶(c)被替换为胸腺嘧啶(t)。上述第858位上的突变是EGFR的第858位氨基酸赖氨酸(L)被替换为精氨酸(R)的突变,序列编号1所示的EGFR基因的部分序列中,第261位碱基胸腺嘧啶(t)被替换为鸟嘌呤(g)。上述EGFR基因外显子19中的缺失突变是上述外显子19中连续几个到十几个碱基缺失的突变,序列编号2所示的EGFR基因的部分序列中,例如,第112-164位碱基中的任何碱基缺失。因此,如果能检测出EGFR基因中是否有这样的突变,在治疗前评价对吉非替尼的敏感度,会使更为有效的个体化癌症治疗成为可能。

[0006] 另一方面,已报道了多种检测基因多态性的方法,例如PCR-RFLP(限制性片段长度多态性,Restriction Fragment Length Polymorphism)法等。

[0007] 但是,上述PCR-RFLP法操作复杂,并且有扩增产物散布、混入第二次的其他反应的可能。由于存在这样的问题,多态性检测的自动化仍是难题。

[0008] 由于存在这样的问题,近年来,实施了利用熔解曲线分析(T_m分析)的检测作为基因多态性的检测方法。其是这样的方法:使用与含有检测目标的基因多态性的检测对象序列互补的探针,使检测样品的靶标单链DNA与上述探针形成杂交体(双链DNA),对该杂交形成体实施加热处理,根据吸光度等信号测定来检测随着温度上升的杂交体解离(熔解),基于该检测结果确定T_m值,由此判断目标多态性的有无。杂交形成体的同源性越高,T_m值就越高,杂交形成体的同源性越低,T_m值就越低。因此,可以针对含有目标多态性的检测对象序列和与其互补的探针的杂交形成体预先求出T_m值(评价基准值),然后测定检测样品的靶标单链DNA与上述探针的T_m值(测定值),如果测定值与评价基准值相同,就能判断靶标DNA中存在目标多态性,如果测定值低于评价基准值,就能判断靶标DNA中不存在目标多态性。

[0009] “ T_m 值”是指双链核酸解离的温度(解离温度 T_m),一般将其定义为,260nm处的吸光度达到吸光度完全上升值的50%时的温度。即,对双链核酸(例如含有双链DNA的溶液)进行加热,260nm处的吸光度就会上升。这是因为,双链DNA的两链之间的氢键由于加热发生断裂,解离为单链DNA(DNA的熔解)。当全部双链DNA都解离成为单链DNA时,其吸光度显示为加热开始时的吸光度(仅双链DNA时的吸光度)的约1.5倍,据此可判断为熔解完全。 T_m 值是根据这种现象设定的。

[0010] 但是,这种利用 T_m 分析的检测方法根据 T_m 值来判断至少一个碱基的差异,因此,存在多个基因多态性时,对一个样品的分析也要花费大量的劳力。

发明内容

[0011] 基于上述理由,EGFR基因的多态性检测,例如,对于上述疾病治疗方法的选择来说非常重要。因此,本发明的目的是提供下述多态性检测用探针及多态性检测方法,其能够简便且以优秀的可信度来判别关于EGFR基因的一个碱基不同的多态性。

[0012] 为了实现上述目的,本发明所用的多态性检测用探针是能检测EGFR基因突变的探针,其特征在于,所述多态性检测用探针包括选自下述P1、P3、P5~P7及P15~P18中的至少一种经荧光标记的寡核苷酸。

[0013] (P1)寡核苷酸,其具有与含有序列编号1所示的碱基序列中碱基编号251~261的11~50个碱基长的碱基序列互补的序列或与所述互补的序列具有同源性的序列,其中,与碱基编号261对应的碱基为腺嘌呤或胞嘧啶,与碱基编号251对应的碱基为胞嘧啶,所述胞嘧啶被荧光色素标记;

[0014] (P3)寡核苷酸,其具有与含有序列编号1所示的碱基序列中碱基编号257~261的5~50个碱基长的碱基序列互补的序列或与所述互补的序列具有同源性的序列,其中,与碱基编号261对应的碱基为腺嘌呤或胞嘧啶,与碱基编号257对应的碱基为胞嘧啶,所述胞嘧啶被荧光色素标记;

[0015] (P5)寡核苷酸,其具有与含有序列编号2所示的碱基序列中碱基编号104~112的9~50个碱基长的碱基序列具有同源性的序列,其中,与碱基编号112同源的碱基为胸腺嘧啶,与碱基编号104同源的碱基为胞嘧啶,所述胞嘧啶被荧光色素标记;

[0016] (P6)寡核苷酸,其具有与含有序列编号2所示的碱基序列中碱基编号104~119的16~50个碱基长的碱基序列具有同源性的序列,其中,碱基编号119的碱基被G以外的碱基替换,与碱基编号104同源的碱基为胞嘧啶,所述胞嘧啶被荧光色素标记;

[0017] (P7)寡核苷酸,其具有与含有序列编号3所示的碱基序列中碱基编号136~145的10~50个碱基长的碱基序列具有同源性的序列,其中,与碱基编号145同源的碱基为胞嘧啶,所述胞嘧啶被荧光色素标记;

[0018] (P15)寡核苷酸,其具有与含有序列编号1所示的碱基序列中碱基编号259~264的6~50个碱基长的碱基序列互补的序列或与所述互补的序列具有同源性的序列,其中,与碱基编号261对应的碱基为腺嘌呤或胞嘧啶,位于所述碱基3'侧的胞嘧啶被荧光色素标记;

[0019] (P16)寡核苷酸,其具有与含有序列编号1所示的碱基序列中碱基编号258~262的5~50个碱基长的碱基序列互补的序列或与所述互补的序列具有同源性的序列,其中,与碱基编号261对应的碱基为腺嘌呤或胞嘧啶,位于所述碱基5'侧的胞嘧啶被荧光色素标记;

[0020] (P17)寡核苷酸,其具有与含有序列编号1所示的碱基序列中碱基编号249~264的16~50个碱基长的碱基序列具有同源性的序列,其中,与碱基编号261同源的碱基为胸腺嘧啶或鸟嘌呤,位于所述碱基5'侧的胞嘧啶被荧光色素标记;

[0021] (P18)寡核苷酸,其具有与含有序列编号1所示的碱基序列中碱基编号257~264的8~50个碱基长的碱基序列具有同源性的序列,其中,与碱基编号261同源的碱基为胸腺嘧啶或鸟嘌呤,位于所述碱基3'侧的胞嘧啶被荧光色素标记。

[0022] 本发明的多态性检测方法是EGFR基因中多态性的检测方法,其特征在于使用本发明的探针。

[0023] 本发明的判定方法是判定对EGFR-TKI的耐药性或EGFR-TKI的药效的方法,所述方法特征在于包括:利用本发明的方法来检测EGFR基因中的多态性的步骤,以及根据多态性的有无来判断对EGFR-TKI的耐药性或药效的步骤。

[0024] 本发明的试剂盒是用于检测EGFR基因中的多态性的试剂盒,其特征在于含有本发明的探针。

[0025] 本发明的引物是能检测EGFR基因突变的引物,其是选自于下述P8-13的多态性检测用引物。

[0026] (P8)与序列编号1同源的10~50个碱基的寡核苷酸,其中以第233位的碱基C作为3'末端,

[0027] (P9)与序列编号1互补的10~50个碱基的寡核苷酸,其中以与第284位的碱基G互补的碱基C作为3'末端,

[0028] (P10)与序列编号1互补的10~50个碱基的寡核苷酸,其中以与第290位的碱基G互补的碱基C作为3'末端,

[0029] (P11)与序列编号2同源的10~50个碱基的寡核苷酸,其中以第95位的碱基G作为3'末端,

[0030] (P12)与序列编号2同源的10~50个碱基的寡核苷酸,其中以第73位的碱基C作为3'末端,

[0031] (P13)与序列编号2互补的10~50个碱基的寡核苷酸,其中以与第155位的碱基G互补的碱基C作为3'末端。

[0032] 使用本发明的多态性检测方法,通过使用本发明的多态性检测用探针,例如,能够简便且以优秀的可信度判别EGFR基因的多态性。具体地说,例如,即使在样品中共存目标多态性是野生型的EGFR基因和是突变型的EGFR基因的情况下,也能够简便且以优秀的可信度检测出野生型和突变型的多态性。而且,使用本发明的引物,例如,能够特异地扩增含有EGFR基因的多态性的区域。这样,根据本发明,能够简便且以优秀的可信度扩增及判定EGFR基因的多态性,因此,例如,检测结果能被反映于对上述疾病的治疗方法的选择中。例如,能够判定对吉非替尼等EGFR-TKI的耐药性或药效。此外,本发明不仅适用于例如医疗领域,其还适用于在生物化学等广泛的领域中对EGFR多态性的检测。

附图说明

[0033] [图1]图1是示出本发明实施例1中反应液的 T_m 值分析结果的图。

[0034] [图2]图2是示出本发明实施例2中反应液的 T_m 值分析结果的图。

- [0035] [图3]图3是示出本发明实施例4中反应液的T_m值分析结果的图。
- [0036] [图4]图4是示出本发明实施例5-1中反应液的T_m值分析结果的图。
- [0037] [图5]图5是示出本发明实施例5-2中反应液的T_m值分析结果的图。
- [0038] [图6]图6是示出本发明实施例5-3中反应液的T_m值分析结果的图。
- [0039] [图7]图7是示出比较例1中反应液的T_m值分析结果的图。
- [0040] [图8]图8是示出比较例2中反应液的T_m值分析结果的图。
- [0041] [图9]图9是示出实施例3-1中反应液的T_m值分析结果的图。
- [0042] [图10]图10是示出实施例3-2中反应液的T_m值分析结果的图。
- [0043] [图11]图11是示出实施例3-1中反应液的T_m值分析结果的图。
- [0044] [图12]图12是示出比较例3中反应液的T_m值分析结果的图。

具体实施方式

[0045] 本发明中,基因多态性表示例如因为突变而产生的一个或多个基因座中的多样性。上述突变例如是替换、缺失、插入以及添加。

[0046] 作为EGFR基因,序列编号1、2以及21所示的部分序列,例如分别被收录为如下所示的GeneBank登记号。

[0047] (序列编号1)

[0048] NT_033968

[0049] 第4848624位~第4849033位的碱基序列

[0050] (序列编号2)

[0051] NT_033968.6

[0052] 第4831717位~第4832033位的碱基序列

[0053] (序列编号21)

[0054] NG_007726

[0055] 第167001位~第168020位的碱基序列

[0056] 本发明中,EGFR基因中检测目标的多态性例如是以下的多态性。

[0057] 序列编号1所示的EGFR基因的部分序列中第261位碱基(k)的多态性

[0058] 序列编号2所示的EGFR基因的部分序列中第104~133位碱基的至少任意一个碱基的多态性

[0059] 序列编号2所示的EGFR基因的部分序列中第130~164位碱基的至少任意一个的多态性

[0060] 序列编号21所示的EGFR基因的部分序列中第347位碱基(y)的多态性。

[0061] 下文中,序列编号1的上述多态性被称为“EGFR外显子21 858多态性”,序列编号2的上述多态性被称为“EGFR外显子19多态性”,序列编号21的上述多态性称为“EGFR790多态性”。上述各多态性均分别存在野生型和突变型。就上述各多态性而言,野生型EGFR基因被称为“野生型基因”,突变型EGFR基因被称为“突变型基因”。

[0062] 上述序列编号1中第261位碱基(k)的多态性为,野生型为胸腺嘧啶(t),突变型为鸟嘌呤(g)。野生型的情况下,EGFR第858位氨基酸为赖氨酸(L),突变型的情况下,EGFR第858位氨基酸为精氨酸(R)。

[0063] 本发明中，“EGFR外显子21 L858R”表示EGFR基因的外显子21中的突变，密码子858的突变意指氨基酸赖氨酸(L)到精氨酸(R)的突变。此外，本发明中“EGFR外显子21的突变型”意指“EGFR外显子21L858R”。本发明中EGFR外显子21的碱基序列意指GeneBank登记号NT_033968中的第4848624位~第4849033位；EGFR外显子21 L858R的突变意指GeneBank登记号NT_033968中所示的碱基序列的第4848884位碱基由“T(胸腺嘧啶)”向“G(鸟嘌呤)”的突变。

[0064] 上述序列编号2的第104-164位碱基的多态性，例如是下表1所示的多态性(参见Journal of Clinical Oncology,2005年,Vol.23,No 11,p.2513-2520)。下表1中，多态性1为野生型。下述多态性1的碱基序列对应于序列编号2中第104~164位的寡核苷酸。下表1中，多态性2~18为序列编号2中第112~164位的区域内至少任意一个碱基缺失的突变型(外显子19缺失突变)。其中，下述多态性2~17为序列编号2中第122~132位的区域内至少任意一个碱基缺失的突变型，特别地，上述第112~140位的区域内多个碱基缺失的突变型。下述多态性18为序列编号2中第137~151位的碱基缺失的突变型。下表1的多态性2~18中“-”指与多态性1相对应的位点的碱基缺失。

[0065] [表1]

多态性		碱基序列						
		104	111	121	131	141	151	161
WT	1	CCCGTCG	CTATCAAGGA	ATTAAGAGAA	GCAACATCTC	CGAAAGCCAA	Caaggaaatc	ctcg
MT	2	CCCGTCG	CTATCAA---	-----	--AACATCTC	CGAAAGCCAA	C-----	----
	3	CCCGTCG	CTATCAAG--	-----	---ACATCTC	CGAAAGCCAA	-aaggaaatc	ctcg
	4	CCCGTCG	CTATCAAGGA	A-----	cCAACATCTC	CGAAAGCCAA	Caaggaaatc	ctcg
	5	CCCGTCG	CTATCAAGGA	AT-----	-----CTC	CGAAAGCCAA	Caaggaaatc	ctcg
	6	CCCGTCG	CTATCAAGGA	AT-----	-----	CGAAAGCCAA	Caaggaaatc	ctcg
	7	CCCGTCG	CTATCAAGGA	A-----	---cCATCTC	CGAAAGCCAA	Caaggaaatc	ctcg
[0066]	8	CCCGTCG	CTATCAAGGA	A-----	-----C	CGAAAGCCAA	Caaggaaatc	ctcg
	9	CCCGTCG	CTATCAAGG-	-----	-----tTC	CGAAAGCCAA	Caaggaaatc	ctcg
	10	CCCGTCG	CTATCAAGGA	AT-----	---CATCTC	CGAAAGCCAA	Caaggaaatc	ctcg
	11	CCCGTCG	CTATCAAGGA	AT-----	-----	CGAAAGCCAA	Caaggaaatc	ctcg
	12	CCCGTCG	CTATCAAGGA	A-----	-----C	aGAAAGCCAA	Caaggaaatc	ctcg
	13	CCCGTCG	CTATCAAGG-	-----	----tATCTC	CGAAAGCCAA	Caaggaaatc	ctcg
	14	CCCGTCG	CTATCAAGGt	-----	-----TC	CGAAAGCCAA	Caaggaaatc	ctcg
	15	CCCGTCG	CTATCAA---	-----	---AaTCTC	CGAAAGCCAA	Caaggaaatc	ctcg
	16	CCCGTCG	C-----A	ATTAAGAt---	---ATCTC	CGAAAGCCAA	Caaggaaatc	ctcg
	17	CCCGTCG	CTATCAAGGA	A-----	-CAA-----C	CGAAAGCCAA	Caaggaaatc	ctcg
	18	CCCGTCG	CTATCAAGGA	ATTAAGAGAA	GCAACA----	-----	-aaggaaatc	ctcg

[0067] ※上述1~18的序列分别如序列编号29~31、34~48所示

[0068] EGFR基因中，上述两处的多态性中至少一种为上述突变型的话，例如则能够判断为存在对吉非替尼等EGFR-TKI的耐药性的高可能性。

[0069] 上述序列编号21的第347位碱基(y)的野生型为胞嘧啶(c)，此时，EGFR第790位氨基酸为苏氨酸(T)。其突变型为胸腺嘧啶(t)，此时，EGFR第790位氨基酸为甲硫氨酸(M)。EGFR基因中，该多态性为上述突变型的话，例如，则能够判断为存在显示出对吉非替尼等

EGFR-TKI的耐药性的可能性。

[0070] 本发明中，“具有同源性的序列”优选是对于特定的碱基序列而言例如具有80%以上的同源性的序列。前述同源性例如优选为85%以上，更优选为90%以上，进一步优选为95%以上，最优选为96%以上、97%以上、98%以上、99%以上、100%。即，本发明中，具有同源性的序列可以是包括上述特定的碱基序列的序列(同源性100%)，也可以是相对上述特定的碱基序列而言有一个碱基以上的替换、缺失、插入和/或添加的序列(例如，同源性在80%以上但小于100%)(下文中也适用)。上述多态性发生的位点，即，正义链中的位点及其互补的反义链中的位点，称为“检测位点”。包含上述检测位点在内，上述多态性检测用探针可能杂交的区域被称为“杂交区域或检测序列”。上述检测位点为野生型的检测序列也称为“野生型检测序列”，检测位点为突变型的检测序列也称为“突变型检测序列”。

[0071] 本发明中，上述用于检测EGFR858多态性(t/g)的探针，也称为“EGFR858用探针”，上述用于检测外显子19多态性的探针，也称为“外显子19用探针”，上述用于检测EGFR790多态性(c/t)的探针，也称为“EGFR790用探针”。此外，上述检测序列中，较之上述突变型检测序列而言，对上述野生型检测序列杂交更强的探针，被称为“野生型探针”。另一方面，上述检测序列中，较之上述野生型检测序列而言，对上述突变型检测序列杂交更强的探针被称为“突变型探针”。“杂交强度”例如能根据 T_m 值的关系来表示，具体而言，能针对探针和野生型检测序列的 T_m 值以及上述探针与突变型检测序列的 T_m 值，根据两个 T_m 值的高低关系来表示。即，上述野生型探针例如是，显示出比与突变型检测序列的 T_m 值更高的、与野生型检测序列的 T_m 值的探针。另一方面，上述突变型探针例如是，显示出比与野生型检测序列的 T_m 值更高的、与突变型检测序列的 T_m 值的探针。

[0072] 上述“显示出比……更高的…… T_m 值”例如可以是只要能检测出各 T_m 值的峰的差异即可，具体而言，上述各 T_m 值的差为3℃以上是优选的，更优选4℃以上，进一步更优选5℃以上，对上述各 T_m 值的差没有上限限制，例如，30℃。

[0073] 本发明中，EGFR基因中的扩增区域例如可以是EGFR正义链中的区域，也可以是与其相对应的反义链的区域，也可以两者兼有。

[0074] 本发明中，碱基序列末端意指碱基序列5'侧以及3'侧最边缘的碱基。此外，5'末端区域为碱基序列5'末端起多个碱基的区域，3'末端区域为碱基序列3'末端起多个碱基的区域。上述多个碱基例如是末端起的1个碱基~10个碱基。本发明中，碱基序列末端起第Z位碱基(Z为正整数)是从末端第一位碱基开始计数的。

[0075] <多态性检测用探针>

[0076] (1)EGFR858用探针

[0077] 本发明的多态性检测探针，如前所述，是能够检测EGFR外显子21L858R的基因突变的探针，其特征在于，所用探针包括选自P1、P3及P15~P18中的至少一种经荧光标记的寡核苷酸。

[0078] (P1)寡核苷酸，其具有与含有序列编号1所示的碱基序列中碱基编号251~261的11~50个碱基长的碱基序列互补的序列或与所述互补的序列具有同源性的序列，其中，与碱基编号261对应的碱基为腺嘌呤或胞嘧啶，与碱基编号251对应的碱基为胞嘧啶，所述胞嘧啶被荧光色素标记；

[0079] (P3)寡核苷酸，其具有与含有序列编号1所示的碱基序列中碱基编号257~261的5

~50个碱基长的碱基序列互补的序列或与所述互补的序列具有同源性的序列,其中,与碱基编号261对应的碱基为腺嘌呤或胞嘧啶,与碱基编号257对应的碱基为胞嘧啶,所述胞嘧啶被荧光色素标记;

[0080] (P15)寡核苷酸,其具有与含有序列编号1所示的碱基序列中碱基编号259~264的6~50个碱基长的碱基序列互补的序列或与所述互补的序列具有同源性的序列,其中,与碱基编号261对应的碱基为腺嘌呤或胞嘧啶,位于所述碱基3'侧的胞嘧啶被荧光色素标记;

[0081] (P16)寡核苷酸,其具有与含有序列编号1所示的碱基序列中碱基编号258~262的5~50个碱基长的碱基序列互补的序列或与所述互补的序列具有同源性的序列,其中,与碱基编号261对应的碱基为腺嘌呤或胞嘧啶,位于所述碱基5'侧的胞嘧啶被荧光色素标记;

[0082] (P17)寡核苷酸,其具有与含有序列编号1所示的碱基序列中碱基编号249~264的16~50个碱基长的碱基序列具有同源性的序列,其中,与碱基编号261同源的碱基为胸腺嘧啶或鸟嘌呤,位于所述碱基5'侧的胞嘧啶被荧光色素标记;

[0083] (P18)寡核苷酸,其具有与含有序列编号1所示的碱基序列中碱基编号257~264的8~50个碱基长的碱基序列具有同源性的序列,其中,与碱基编号261同源的碱基为胸腺嘧啶或鸟嘌呤,位于所述碱基3'侧的胞嘧啶被荧光色素标记。

[0084] 包括上述P1、P3及P15~P18的寡核苷酸的探针是用于检测上述EGFR 858多态性(t/g)的探针,即上述EGFR 858用探针。这些探针,例如是用于检测序列编号1所示的碱基序列中第261位碱基是否发生替换突变的探针。

[0085] 上述P1、P3及P15~P18的各寡核苷酸,例如与EGFR基因的正义链互补,能够通过上述正义链的杂交来确定上述多态性。上述P1的寡核苷酸中,与序列编号1第261位碱基(t或g)互补的(对应的)碱基为腺嘌呤(a)或胞嘧啶(c)。上述P1的寡核苷酸中,上述碱基是腺嘌呤(a)的寡核苷酸也称为“P1-wt”,上述碱基是胞嘧啶(c)的寡核苷酸也称为“P1-mt”。上述P1-wt对EGFR858野生型检测序列的杂交比对EGFR858突变型检测序列更强,故而可被称为EGFR858用野生型探针。上述P1-mt对EGFR858突变型检测序列的杂交比对EGFR858野生型检测序列更强,故而可被称为EGFR858用突变型探针。可通过这些寡核苷酸与上述EGFR基因的检测序列中EGFR858野生型检测序列或EGFR858突变型检测序列的某一个的强杂交,来检测EGFR基因的多态性。

[0086] 上述P3的寡核苷酸,例如与EGFR基因的正义链互补,能够通过上述正义链的杂交来确定上述多态性。上述P3的寡核苷酸中,与序列编号1第261位碱基(t或g)互补的(对应的)碱基为腺嘌呤(a)或胞嘧啶(c)。上述P3的寡核苷酸中,上述碱基是腺嘌呤(a)的寡核苷酸也称为“P3-wt”,上述碱基是胞嘧啶(c)的寡核苷酸也称为“P3-mt”。上述P3-wt对EGFR858野生型检测序列的杂交比对EGFR858突变型检测序列更强,故而可被称为EGFR858用野生型探针。上述P3-mt对EGFR858突变型检测序列的杂交比对EGFR858野生型检测序列更强,故而可被称为EGFR858用突变型探针。可通过这些寡核苷酸与上述EGFR基因的检测序列中EGFR858野生型检测序列或EGFR858突变型检测序列的某一个强的杂交,来检测EGFR基因的多态性。

[0087] 上述P1的寡核苷酸(3T-EGFR-858-R2),如前所述,可以为11~50个碱基长,优选为11~40个碱基长,更优选为11~30个碱基长,进一步更优选为12~20个碱基长。上述P3的寡核苷酸(3T-EGFR-858-R1),如前所述,可以为5~50个碱基长,优选为10~40个碱基长,更优

选为10~30个碱基长,进一步优选为12~20个碱基长。

[0088] 上述各寡核苷酸中,经上述标记物质标记的位点无特别限制,例如优选为5'末端区域或3'末端区域,更优选为5'末端或3'末端。此外,如下文所述,上述寡核苷酸中,经上述标记物质标记的碱基,例如优选为胞嘧啶(c)或鸟嘌呤(g)。上述标记物质例如可以直接标记碱基,也可以通过标记含有上述碱基的核苷酸残基的任何位点,来对上述碱基间接进行标记。

[0089] 上述P1的寡核苷酸优选在3'末端起算的第1~3位的位置具有经荧光色素标记的、与碱基编号251互补的(对应的)碱基。上述寡核苷酸中,“与碱基编号251互补的(对应的)碱基”意指:对上述寡核苷酸与序列编号1的碱基序列进行比对时,与序列编号1的碱基序列中第251位碱基(g)互补的碱基(c)。具体地,与碱基编号251互补的碱基在P1的寡核苷酸中表示为c。

[0090] 上述P1的寡核苷酸优选在3'末端具有经荧光色素标记的与第251位碱基互补的碱基。

[0091] 上述P1-mt例如是序列编号7所示的寡核苷酸,上述P1-wt例如是序列编号8所示的寡核苷酸。

[0092] 5'-ttgcccgccccaaaatc-3'(序列编号7)(3T-EGFR-858-R2)

[0093] 5'-ttgcccagccccaaaatc-3'(序列编号8)

[0094] 上述P3的寡核苷酸优选在3'末端起算的第1~3位的位置具有经荧光色素标记的、与碱基编号257互补的(对应的)碱基。上述寡核苷酸中,“与碱基编号257互补的(对应的)碱基”意指:对上述寡核苷酸与序列编号1的碱基序列进行比对时,与序列编号1的碱基序列中第257位碱基(g)互补的碱基(c)。具体地,与碱基编号257互补的碱基在P3的寡核苷酸中表示为c。

[0095] 上述P3-wt例如是序列编号12~14所示的寡核苷酸;上述P3-mt例如是序列编号9~11所示的寡核苷酸。

[0096] 5'-cagtttgccagccc-3'(序列编号12)

[0097] 5'-ctgtttgccagccc-3'(序列编号13)

[0098] 5'-ccgtttgccagccc-3'(序列编号14)

[0099] 5'-cagtttgcccgccc-3'(序列编号9)(3T-EGFR-858-R1)

[0100] 5'-ctgtttgcccgccc-3'(序列编号10)

[0101] 5'-ccgtttgcccgccc-3'(序列编号11)

[0102] 上述P15的寡核苷酸例如是下述P15-1~P15-5的寡核苷酸。

[0103] (P15-1)寡核苷酸,其具有与含有序列编号1所示的碱基序列中碱基编号235~264的30~50个碱基长的碱基序列互补的序列或与所述互补的序列具有同源性的序列,其中,与碱基编号261对应的碱基为腺嘌呤或胞嘧啶,与碱基编号235对应的碱基为胞嘧啶,所述胞嘧啶被荧光色素标记;

[0104] (P15-2)寡核苷酸,其具有与含有序列编号1所示的碱基序列中碱基编号239~264的26~50个碱基长的碱基序列互补的序列或与所述互补的序列具有同源性的序列,其中,与碱基编号261对应的碱基为腺嘌呤或胞嘧啶,与碱基编号239对应的碱基为胞嘧啶,所述胞嘧啶被荧光色素标记;

[0105] (P15-3)寡核苷酸,其具有与含有序列编号1所示的碱基序列中碱基编号244~264的21~50个碱基长的碱基序列互补的序列或与所述互补的序列具有同源性的序列,其中,与碱基编号261对应的碱基为腺嘌呤或胞嘧啶,与碱基编号244对应的碱基为胞嘧啶,所述胞嘧啶被荧光色素标记;

[0106] (P15-4)寡核苷酸,其具有与含有序列编号1所示的碱基序列中碱基编号258~264的7~50个碱基长的碱基序列互补的序列或与所述互补的序列具有同源性的序列,其中,与碱基编号261对应的碱基为腺嘌呤或胞嘧啶,与碱基编号258对应的碱基为胞嘧啶,所述胞嘧啶被荧光色素标记;

[0107] (P15-5)寡核苷酸,其具有与含有序列编号1所示的碱基序列中碱基编号259~264的6~50个碱基长的碱基序列互补的序列或与所述互补的序列具有同源性的序列,其中,与碱基编号261对应的碱基为腺嘌呤或胞嘧啶,与碱基编号259对应的碱基为胞嘧啶,所述胞嘧啶被荧光色素标记。

[0108] 上述P16的寡核苷酸例如是下述P16-1~P16-10的寡核苷酸。

[0109] (P16-1)寡核苷酸,其具有与含有序列编号1所示的碱基序列中碱基编号258~263的6~50个碱基长的碱基序列互补的序列或与所述互补的序列具有同源性的序列,其中,与碱基编号261对应的碱基为腺嘌呤或胞嘧啶,与碱基编号263对应的碱基为胞嘧啶,所述胞嘧啶被荧光色素标记;

[0110] (P16-2)寡核苷酸,其具有与含有序列编号1所示的碱基序列中碱基编号258~262的5~50个碱基长的碱基序列互补的序列或与所述互补的序列具有同源性的序列,其中,与碱基编号261对应的碱基为腺嘌呤或胞嘧啶,与碱基编号262对应的碱基为胞嘧啶,所述胞嘧啶被荧光色素标记;

[0111] (P16-3)寡核苷酸,其具有与含有序列编号1所示的碱基序列中碱基编号258~271的14~50个碱基长的碱基序列互补的序列或与所述互补的序列具有同源性的序列,其中,与碱基编号261对应的碱基为腺嘌呤或胞嘧啶,与碱基编号271对应的碱基为胞嘧啶,所述胞嘧啶被荧光色素标记;

[0112] (P16-4)寡核苷酸,其具有与含有序列编号1所示的碱基序列中碱基编号258~274的17~50个碱基长的碱基序列互补的序列或与所述互补的序列具有同源性的序列,其中,与碱基编号261对应的碱基为腺嘌呤或胞嘧啶,与碱基编号274对应的碱基为胞嘧啶,所述胞嘧啶被荧光色素标记;

[0113] (P16-5)寡核苷酸,其具有与含有序列编号1所示的碱基序列中碱基编号258~275的18~50个碱基长的碱基序列互补的序列或与所述互补的序列具有同源性的序列,其中,与碱基编号261对应的碱基为腺嘌呤或胞嘧啶,与碱基编号275对应的碱基为胞嘧啶,所述胞嘧啶被荧光色素标记;

[0114] (P16-6)寡核苷酸,其具有与含有序列编号1所示的碱基序列中碱基编号258~276的19~50个碱基长的碱基序列互补的序列或与所述互补的序列具有同源性的序列,其中,与碱基编号261对应的碱基为腺嘌呤或胞嘧啶,与碱基编号276对应的碱基为胞嘧啶,所述胞嘧啶被荧光色素标记;

[0115] (P16-7)寡核苷酸,其具有与含有序列编号1所示的碱基序列中碱基编号258~278的21~50个碱基长的碱基序列互补的序列或与所述互补的序列具有同源性的序列,其中,

与碱基编号261对应的碱基为腺嘌呤或胞嘧啶,与碱基编号278对应的碱基为胞嘧啶,所述胞嘧啶被荧光色素标记;

[0116] (P16-8)寡核苷酸,其具有与含有序列编号1所示的碱基序列中碱基编号258~280的23~50个碱基长的碱基序列互补的序列或与所述互补的序列具有同源性的序列,其中,与碱基编号261对应的碱基为腺嘌呤或胞嘧啶,与碱基编号280对应的碱基为胞嘧啶,所述胞嘧啶被荧光色素标记;

[0117] (P16-9)寡核苷酸,其具有与含有序列编号1所示的碱基序列中碱基编号258~281的24~50个碱基长的碱基序列互补的序列或与所述互补的序列具有同源性的序列,其中,与碱基编号261对应的碱基为腺嘌呤或胞嘧啶,与碱基编号281对应的碱基为胞嘧啶,所述胞嘧啶被荧光色素标记;

[0118] (P16-10)寡核苷酸,其具有与含有序列编号1所示的碱基序列中碱基编号258~284的27~50个碱基长的碱基序列互补的序列或与所述互补的序列具有同源性的序列,其中,与碱基编号261对应的碱基为腺嘌呤或胞嘧啶,与碱基编号284对应的碱基为胞嘧啶,所述胞嘧啶被荧光色素标记。

[0119] 上述P17的寡核苷酸例如下述P17-1~P17-4的寡核苷酸。

[0120] (P17-1)寡核苷酸,其具有与含有序列编号1所示的碱基序列中碱基编号236~264的29~50个碱基长的碱基序列具有同源性的序列,其中,与碱基编号261同源的碱基为胸腺嘧啶或鸟嘌呤,与碱基编号236同源的碱基为胞嘧啶,所述胞嘧啶被荧光色素标记;

[0121] (P17-2)寡核苷酸,其具有与含有序列编号1所示的碱基序列中碱基编号241~264的24~50个碱基长的碱基序列具有同源性的序列,其中,与碱基编号261同源的碱基为胸腺嘧啶或鸟嘌呤,与碱基编号241同源的碱基为胞嘧啶,所述胞嘧啶被荧光色素标记;

[0122] (P17-3)寡核苷酸,其具有与含有序列编号1所示的碱基序列中碱基编号247~264的18~50个碱基长的碱基序列具有同源性的序列,其中,与碱基编号261同源的碱基为胸腺嘧啶或鸟嘌呤,与碱基编号247同源的碱基为胞嘧啶,所述胞嘧啶被荧光色素标记;

[0123] (P17-4)寡核苷酸,其具有与含有序列编号1所示的碱基序列中碱基编号249~264的16~50个碱基长的碱基序列具有同源性的序列,其中,与碱基编号261同源的碱基为胸腺嘧啶或鸟嘌呤,与碱基编号249同源的碱基为胞嘧啶,所述胞嘧啶被荧光色素标记;

[0124] 上述P18的寡核苷酸例如下述P18-1~P18-5的寡核苷酸。

[0125] (P18-1)寡核苷酸,其具有与含有序列编号1所示的碱基序列中碱基编号257~264的8~50个碱基长的碱基序列具有同源性的序列,其中,与碱基编号261同源的碱基为胸腺嘧啶或鸟嘌呤,与碱基编号264同源的碱基为胞嘧啶,所述胞嘧啶被荧光色素标记;

[0126] (P18-2)寡核苷酸,其具有与含有序列编号1所示的碱基序列中碱基编号257~265的9~50个碱基长的碱基序列具有同源性的序列,其中,与碱基编号261同源的碱基为胸腺嘧啶或鸟嘌呤,与碱基编号265同源的碱基为胞嘧啶,所述胞嘧啶被荧光色素标记;

[0127] (P18-3)寡核苷酸,其具有与含有序列编号1所示的碱基序列中碱基编号257~269的13~50个碱基长的碱基序列具有同源性的序列,其中,与碱基编号261同源的碱基为胸腺嘧啶或鸟嘌呤,与碱基编号269同源的碱基为胞嘧啶,所述胞嘧啶被荧光色素标记;

[0128] (P18-4)寡核苷酸,其具有与含有序列编号1所示的碱基序列中碱基编号257~272的16~50个碱基长的碱基序列具有同源性的序列,其中,与碱基编号261同源的碱基为胸腺

嘧啶或鸟嘌呤,与碱基编号272同源的碱基为胞嘧啶,所述胞嘧啶被荧光色素标记;

[0129] (P18-5)寡核苷酸,其具有与含有序列编号1所示的碱基序列中碱基编号257~279的23~50个碱基长的碱基序列具有同源性的序列,其中,与碱基编号261同源的碱基为胸腺嘧啶或鸟嘌呤,与碱基编号279同源的碱基为胞嘧啶,所述胞嘧啶被荧光色素标记。

[0130] 本发明的EGFR858用探针可以例如是下述探针,所述探针两端的碱基是胞嘧啶,所述两个胞嘧啶被荧光标记。这样的探针例如是下述P19的经荧光标记的寡核苷酸。

[0131] (P19)寡核苷酸,其具有与含有序列编号1所示的碱基序列中碱基编号257~274的18~50个碱基长的碱基序列互补的序列或与所述互补的序列具有同源性的序列,其中,与碱基编号261对应的碱基为腺嘌呤或胞嘧啶,与碱基编号257对应的碱基及与碱基编号274对应的碱基为胞嘧啶,所述两个胞嘧啶被荧光色素标记。

[0132] 本发明中,(P1)、(P3)、(P15)、(P16)、(P19)的寡核苷酸例如可以是在严谨条件下与上述各寡核苷酸的互补链杂交的寡核苷酸。例如可根据各种杂交检验来检测上述杂交。上述杂交检验及严谨条件例如可采用Sambrook等编著的「モレキュラー・クローニング:ア・ラボラトリーマニュアル第2版(Molecular Cloning:A Laboratory Manual 2nd Ed., [Cold Spring Harbor Laboratory Press(1989)])」等记载的方法和条件。

[0133] 除非另有说明,例如,与上述P1及P3的各寡核苷酸相关的说明可应用至上述P15~P19的寡核苷酸。例如,各寡核苷酸中的经标记位点如上文所述优选胞嘧啶残基,对上述P15、P16及P19而言,例如,对应于序列编号1中的鸟嘌呤的胞嘧啶残基是优选的,对上述P17和P18而言,例如,序列编号1中的胞嘧啶是优选的。

[0134] P15的寡核苷酸的碱基长度下限为6个碱基长,优选为16个碱基长。

[0135] P16的寡核苷酸的碱基长度下限为5个碱基长,优选为6个碱基长,更优选为18个碱基长。

[0136] P17的寡核苷酸的碱基长度下限为16个碱基长,优选为20个碱基长。

[0137] P18的寡核苷酸的碱基长度下限为8个碱基长,优选为20个碱基长。

[0138] 上述P15~P19的各寡核苷酸的碱基长度上限为例如40个碱基长,优选为30个碱基长。

[0139] 关于上述P15~P19的寡核苷酸,下文给出了各序列分别的具体实施例。下文所述的序列中,与目标多态性位点对应的碱基例如可以是野生型,也可以是突变型。具体而言,对上述P15、P16和P19来说,例如,序列中的上述碱基可表示为m(a或c),对上述P17和P18来说,例如,序列中的上述碱基可表示为k(t或g)。并且,本发明不限于这些序列。

[0140] P15-1(序列编号72)

[0141] 5'-gccCgccccaaatctgtgatcttgacatgc-3'(3T-EGFR-858-R4)

[0142] P15-2(序列编号73)

[0143] 5'-gccCgccccaaatctgtgatcttgac-3'(3T-EGFR-858-R5)

[0144] P15-3(序列编号74)

[0145] 5'-tggccCgccccaaatctgtgatc-3'(3T-EGFR-858-R6)

[0146] P15-4(序列编号75)

[0147] 5'-agcagtttgccCgcc-3'(3T-EGFR-858-R7)

[0148] P15-5(序列编号76)

- [0149] 5'-accagcagtttggccCgc-3' (3T-EGFR-858-R8)
[0150] P16-1(序列编号77)
[0151] 5'-ccCgccccaaaatctgtga-3' (3T-EGFR-858-R9)
[0152] P16-2(序列编号78)
[0153] 5'-cCgccccaaaatctgtgat-3' (3T-EGFR-858-R10)
[0154] P16-3(序列编号79)
[0155] 5'-cagtttggccCgccccaaaatct-3' (3T-EGFR-858-R11)
[0156] P16-4(序列编号80)
[0157] 5'-cagcagtttggccCgccccaaa-3' (3T-EGFR-858-R12)
[0158] P16-5(序列编号81)
[0159] 5'-ccagcagtttggccCgccccaaa-3' (3T-EGFR-858-R13)
[0160] P16-6(序列编号82)
[0161] 5'-cccagcagtttggccCgccccaaa-3' (3T-EGFR-858-R14)
[0162] P16-7(序列编号83)
[0163] 5'-caccagcagtttggccCgccc-3' (3T-EGFR-858-R15)
[0164] P16-8(序列编号84)
[0165] 5'-cgcaccagcagtttggccCgccc-3' (3T-EGFR-858-R16)
[0166] P16-9(序列编号85)
[0167] 5'-ccgcaccagcagtttggccCgcc-3' (3T-EGFR-858-R17)
[0168] P16-10(序列编号86)
[0169] 5'-cttcgcaccagcagtttggccCgcc-3' (3T-EGFR-858-R18)
[0170] P17-1(序列编号89)
[0171] 5'-catgtcaagatcacagatTTTGGGCgggc-3' (5T-EGFR-858-F1)
[0172] P17-2(序列编号90)
[0173] 5'-caagatcacagatTTTGGGCgggc-3' (5T-EGFR-858-F2)
[0174] P17-3(序列编号91)
[0175] 5'-cacagatTTTGGGCgggcaaaa-3' (5T-EGFR-858-F3)
[0176] P17-4(序列编号92)
[0177] 5'-cagatTTTGGGCgggcaaaa-3' (5T-EGFR-858-F4)
[0178] P18-1(序列编号94)
[0179] 5'-atcacagatTTTGGGCgggc-3' (3T-EGFR-858-F6)
[0180] P18-2(序列编号95)
[0181] 5'-atcacagatTTTGGGCgggcc-3' (3T-EGFR-858-F7)
[0182] P18-3(序列编号96)
[0183] 5'-atTTTGGGCgggcaaac-3' (3T-EGFR-858-F8)
[0184] P18-4(序列编号97)
[0185] 5'-atTTTGGGCgggcaaacTgc-3' (3T-EGFR-858-F9)
[0186] P18-5(序列编号98)
[0187] 5'-ggcGggcaaacTgctgggtgc-3' (3T-EGFR-858-F10)

[0188] P19-1(序列编号88)

[0189] 5'-cagcagtttggccCgccc-3'(35T-EGFR-858-R21)

[0190] (2)外显子19用探针

[0191] 本发明的外显子19用探针,如前文所述,是能检测EGFR外显子19缺失的基因突变的探针,其特征在于,所述探针包括选自下述P5~P7中的至少一种经荧光色素标记的寡核苷酸。

[0192] (P5)寡核苷酸,其具有与含有序列编号2所示的碱基序列中碱基编号104~112的9~50个碱基长的碱基序列具有同源性的序列,其中,与碱基编号112同源的碱基为胸腺嘧啶,与碱基编号104同源的碱基为胞嘧啶,所述胞嘧啶被荧光色素标记;

[0193] (P6)寡核苷酸,其具有与含有序列编号2所示的碱基序列中碱基编号104~119的16~50个碱基长的碱基序列具有同源性的序列,其中,碱基编号119的碱基被G以外的碱基替换,与碱基编号104同源的碱基为胞嘧啶,所述胞嘧啶被荧光色素标记;

[0194] (P7)寡核苷酸,其具有与含有序列编号3所示的碱基序列中碱基编号136~145的10~50个碱基长的碱基序列具有同源性的序列,其中,与碱基编号145同源的碱基为胞嘧啶,所述胞嘧啶被荧光色素标记。

[0195] 包括上述P5~P7的寡核苷酸的探针是用于检测上述外显子19多态性的探针,即,上述外显子19用探针。

[0196] 上述P5~P7的寡核苷酸,例如与EGFR基因的反义链互补,能够通过上述反义链的杂交来确定上述多态性。

[0197] 上述P5的寡核苷酸在例如当序列编号2的第104~112位碱基为野生型时,较之上述碱基被缺失突变的突变型的情况而言,与上述检测序列更强地杂交。因此,根据上述P5的寡核苷酸对上述EGFR基因的检测序列中的上述野生型或突变型中的任一种更强的杂交,可以确定EGFR基因的外显子19多态性,即,是外显子19野生型(上述表1的多态性1)还是外显子19突变型(上述表1的多态性2~17)。下文中,将包括上述P5的寡核苷酸的探针称为“外显子19用野生型探针”。

[0198] 上述P6的寡核苷酸在例如当序列编号2的第104~119位碱基为野生型时,除了第119位的碱基之外,与检测序列强杂交。因此,根据上述P6的寡核苷酸对上述EGFR基因的检测序列是否更强的杂交,可以确定EGFR基因的外显子19多态性,即,是外显子19野生型(上述表1的多态性1)还是外显子19突变型(上述表1的多态性2~15及17)。下文中,将包括上述P6的寡核苷酸的探针称为“外显子19用突变型(sub)探针”。

[0199] 上述P7的寡核苷酸在例如当序列编号2的第137~151位碱基是缺失突变的突变型时,较之上述碱基未缺失突变的野生型的情况而言,与上述检测序列更强地杂交。因此,根据上述P7的寡核苷酸对上述EGFR基因的检测序列中的上述野生型或突变型中的任一种更强的杂交与否,可以确定EGFR基因的外显子19多态性,即,是外显子19野生型(上述表1的多态性1)还是外显子19突变型(上述表1的多态性18)。下文中,将包括P7的寡核苷酸的探针称为“外显子19用突变型(del)探针”。

[0200] 上述P5的寡核苷酸(5FL-EGFR-EX19-F2),如前文所述,为9~50个碱基长,优选为20~40个碱基长,更优选为25~35个碱基长,进一步优选为10~30个碱基长。上述P6的寡核苷酸(5T-EGFR-EX19-No19-F2-3),如前文所述,为9~50个碱基长,优选为20~40个碱基长,

更优选为25~35个碱基长,进一步优选为10~30个碱基长。上述P7的寡核苷酸(3T-EGFR-EX19-No18-F1),如前文所述,可以为10~50个碱基长,优选为10~30个碱基长,更优选为12~30个碱基长,进一步优选为15~20个碱基长。

[0201] 上述各寡核苷酸中,经上述标记物质标记的位点无特别限制,例如,优选为5'末端区域或3'末端区域,更优选为5'末端或3'末端。此外,后文述及的上述寡核苷酸中,经上述标记物质标记的碱基,例如优选为胞嘧啶(c)或鸟嘌呤(g)。上述标记物质例如可以直接标记碱基,也可以通过标记含有上述碱基的寡核苷酸残基中的任一位点,对上述碱基间接进行标记。

[0202] 上述P5的寡核苷酸优选在5'末端起算的第1~3位的位置具有经荧光色素标记的与碱基编号104同源的碱基。上述P6的寡核苷酸优选在5'末端起算的第1~3位的位置具有经荧光色素标记的与碱基编号104同源的碱基。上述寡核苷酸中“与碱基编号104同源的碱基”意指与序列编号2的碱基序列中第104位的碱基(c)同源的碱基(c)。具体地,与碱基编号104同源的碱基在P5及P6的寡核苷酸中表示为c。上述P7的寡核苷酸优选在3'末端起算的第1~3位的位置具有经荧光色素标记的与碱基编号145同源的碱基。上述寡核苷酸中“与碱基编号145同源的碱基”意指与序列编号3的碱基序列中第145位的碱基(c)同源的碱基(c)。具体地,与碱基编号145同源的碱基在P7的寡核苷酸中表示为c。

[0203] 上述P5的寡核苷酸优选在5'末端具有经荧光色素标记的与碱基编号104同源的碱基。上述P6的寡核苷酸优选在5'末端具有经荧光色素标记的与碱基编号104同源的碱基。上述P7的寡核苷酸优选在3'末端具有经荧光色素标记的与碱基编号145同源的碱基。

[0204] 上述P5的寡核苷酸,例如是序列编号5所示的寡核苷酸。

[0205] 5'-cccgtcgtatcaaggaattaagagaagc-3'(序列编号5)(5FL-EGFR-EX19-F2)

[0206] 上述P6的寡核苷酸,例如是序列编号4所示的寡核苷酸。

[0207] 5'-cccgtcgtatcaagtaattaagagaagcaaca-3'(序列编号4)(5T-EGFR-EX19-No19-F2-3)

[0208] 上述P7的寡核苷酸,例如是序列编号6所示的寡核苷酸。

[0209] 5'-agcaacaaaggaaatc-3'(序列编号6)(3T-EGFR-EX19-No18-F1)。

[0210] 如前文所述,本发明中,上述P1、P3、P5~P7及P15~P19的寡核苷酸可以是具有下述序列的寡核苷酸,所述序列与例举的上述序列中任一具有同源性。上述同源性例如是80%以上,优选85%以上,更优选90%以上,进一步更优选95%以上,最优选96%以上、97%以上、98%以上、99%以上、100%。本发明的探针例如可以是由上述寡核苷酸构成的探针,也可以是含有上述寡核苷酸的探针。

[0211] 上述探针例如可以是由天然碱基构成的,也可以是非天然核酸构成的。所述天然核酸例如是DNA或RNA。所述非天然核酸例如是桥联核酸(Bridged Nucleic Acid, BNA;也称为LNA(Locked Nucleic Acid,锁核酸))等交联核酸或PNA(肽核酸)等。上述探针例如是上述非天然核酸构成时,由于对检测对象序列杂交的能力能被提高,所以例如可设计短的探针序列。由所述LNA构成的探针和所述检测对象序列的T_m值的预测可例如通过EXIQON社的主页(<http://www.exiqon.com/oligo-tools>)来计算。

[0212] 上述经荧光色素标记的寡核苷酸,例如在未与上述靶标序列杂交时发出荧光,并且与上述靶标序列杂交时荧光强度减少或增加。此外,上述经荧光色素标记的寡核苷

酸,例如在未与上述靶标序列杂交时发出荧光,并且与上述靶标序列杂交时荧光强度减少或增加。

[0213] 上述荧光色素无特别限制,例如是荧光团等荧光色素。上述荧光色素例如是荧光素、磷光体、罗丹明、聚甲炔色素衍生物等。市售的荧光色素例如为Pacific Blue(注册商标,Molecular Probes公司制造)、BODIPY FL(注册商标,Molecular Probes公司制造)、FluorePrime(商品名,Amersham Pharmacia公司制造)、Fluoredate(商品名,Millipore公司制造)、FAM(注册商标,ABI公司制造)、Cy3以及Cy5(商品名,Amersham Pharmacia公司制造)、TAMRA(注册商标,Molecular Probes公司制造)等等。上述荧光色素的检测条件无特别限制,例如可根据荧光色素的种类做出合适的决定,例如,对Pacific Blue而言检测波长450~480nm、对TAMRA而言检测波长585~700nm、对BODIPY FL而言检测波长515~555nm时,能够进行检测。使用这类经荧光色素标记的寡核苷酸,例如,通过检测作为信号的荧光、测定作为信号值的荧光强度,就能从荧光强度的变动容易地确认杂交和解离。

[0214] 从检测效率的观点来看,多态性检测用探针优选为带标记的经标记探针。经标记的探针中的标记物质的具体例子例如是荧光色素以及荧光团。作为上述经标记的探针的具体例子,优选为经荧光色素标记、单独存在时显示荧光并且杂交体形成时荧光强度减少(例如,淬灭)的探针。

[0215] 这种利用荧光淬灭现象(Quenching phenomenon)的探针,一般称为荧光淬灭探针。其中,优选地,上述探针中,寡核苷酸的3'区域(例如3'末端)或5'区域(例如5'末端)的碱基经荧光色素,经标记的上述碱基优选为胞嘧啶(C)。此时,优选地,将上述经标记的探针的碱基序列设计为使得:与上述经标记的探针杂交的检测目标序列中,与上述经标记的探针末端碱基C配对的碱基或与上述配对的碱基距离1~3个碱基的碱基为鸟嘌呤(G)。这种探针一般称为鸟嘌呤淬灭探针,即已知的所谓QProbe(注册商标)。这种鸟嘌呤淬灭探针与检测目的序列杂交后,经荧光色素标记的末端C,会靠近上述检测目标序列中的G,由此出现上述荧光色素发光变弱(荧光强度减少)的现象。通过使用这种探针,通过测定信号的变动,能够容易地确定杂交和解离。此外,上述标记物质例如通常能与核苷酸的磷酸基团结合。

[0216] 本发明的探针例如可以在3'末端添加磷酸基团。可以通过PCR等基因扩增法来制备待检测突变有无的DNA(靶标DNA),此时,其可以与本发明的探针在基因扩增反应的反应液共存。这种情况下,在探针的3'末端添加磷酸基团,能够充分防止探针自身通过基因扩增反应而出现延伸。此外,在3'末端添加如前文所述的标记物质,也能获得同样的效果。

[0217] 而且,除使用QProbe的检测方法以外,也适用公知的检测手段。这类检测手段可以是Tag-man Probe法或RFLP法等。

[0218] 上述荧光色素无特别限制,例如是荧光素、磷光体、罗丹明、聚甲炔色素衍生物等。市售的荧光色素例如为BODIPY FL(注册商标,Molecular Probes公司制造)、FluorePrime(商品名,Amersham Pharmacia公司制造)、Fluoredate(商品名,Millipore公司制造)、FAM(注册商标,ABI公司制造)、Cy3以及Cy5(商品名,Amersham Pharmacia公司制造)、TAMRA(注册商标,Molecular Probes公司制造)等等。用于多个探针的荧光色素的组合例如只要能在不同条件下被检测出即可,并无特别限制,例如是Pacific Blue(检测波长450~480nm)、TAMRA(检测波长585~700nm)及BODIPY FL(检测波长515~555nm)的组合等等。

[0219] <多态性检测方法>

[0220] 本发明的多态性检测方法是检测EGFR基因的多态性的方法,其特征在于使用与上述检测序列杂交的探针。

[0221] 而且,本发明的多态性检测方法,其特征在于使用本发明的多态性检测用探针,其他构成和条件等不限于下文的记载。本发明例如能够适用于医疗领域之外、并非诊断及治疗方法的领域中的EGFR基因多态性检测。

[0222] 本发明的多态性检测方法包含例如下述(A)步骤和(B)步骤。

[0223] (A)步骤:使含有上述待检测多态性的被检测核酸与本发明多态性检测用探针的反应体系的温度变化,测定显示上述被检测核酸与上述多态性检测用探针的杂交形成体的熔解状态的信号值。

[0224] (B)步骤:根据伴随上述温度变化的上述信号值的变动,来确定上述被检测核酸中的上述多态性。

[0225] 上述(A)步骤中,上述本发明的多态性检测用探针例如可以使用任一种,也可以组合使用两种以上。使用的上述多态性检测用探针的种类例如可以对应于检测目标的多态性来适当地确定。

[0226] 上述(A)步骤中使用的上述多态性检测用探针,可以其中至少一种是本发明的多态性检测用探针。上述探针的种类,例如可对应于EGFR基因中的检测目标多态性来适当地确定。本发明中,例如可以仅检测EGFR858多态性,也可以仅检测外显子19多态性,也可以在同一反应体系中检测这两种多态性。此外,也可以在同一反应体系中检测上述EGFR858多态性和外显子19多态性中的至少一种和其他多态性。上述其他多态性并无特别限制,其例如是EGFR基因的EGFR790多态性等等。

[0227] 仅检测上述EGFR858多态性时,上述本发明的多态性检测用探针中,优选使用上述EGFR858用探针。上述EGFR858用探针例如可以是EGFR858用野生型探针,可以是EGFR858用突变型探针,也可以组合使用两者。

[0228] 仅检测上述外显子19多态性时,上述本发明的多态性检测用探针中,优选使用上述外显子19用野生型探针、上述外显子19用突变型(sub)探针以及上述外显子19用突变型(de1)探针中的至少任意一种。通过使用上述外显子19用野生型探针,例如能检测出外显子19多态性是外显子19野生型(上述多态性1)还是外显子19突变型(上述多态性2~17);通过使用上述外显子19用突变型(sub)探针,例如能检测出外显子19多态性是外显子19野生型(上述多态性1)还是外显子19突变型(上述多态性2~15,17)通过使用上述外显子19用突变型(de1)探针,例如能检测出外显子19多态性是外显子19野生型(上述多态性1)还是外显子19突变型(上述多态性18)。本发明中,可以使用上述外显子19用野生型探针、上述外显子19用突变型(sub)探针以及外显子19用突变型(de1)探针中的任意一种,能够判断出是上述多态性1还是上述多态性2~18,也可以组合使用两种以上探针。探针的组合无特别限制,例如,优选地,P5与P7的组合能够检测多态性1~18的18种多态性;P6与P7的组合能够检测多态性16以外的17种多态性(P5自身淬灭,P6自身不淬灭);单独使用P5能够检测出多态性18以外的17种多态性;单独使用P6能够检测出多态性16、18以外的16种多态性(P5自身淬灭,P6自身不淬灭);单独使用P7仅能检测出多态性18一种多态性。

[0229] 本发明中,将上述EGFR858用探针和上述外显子19用探针组合使用是令人期望的。本发明的探针,如前文所述,能够以优秀的可信度检测出多态性,因此,即时在同一反应液

中使用上述EGFR858用探针和上述外显子19用探针,也能够分别特异性地检测上述EGFR858多态性和上述外显子19多态性。上述外显子19用探针,如前文所述,优选地为,组合使用上述外显子19用野生型探针、上述外显子19用突变型(sub)探针和外显子19用突变型(del)探针。

[0230] 本发明,例如,还可以检测上述EGFR790的多态性,还优选同时检测上述EGFR858的多态性和/或上述外显子19的多态性。“同时检测”例如包括使用同一反应体系进行检测的含义。此时,除上述两种探针以外,本发明还可以组合使用上述EGFR790用探针。

[0231] 上述EGFR790用探针,无特别限制,例如是包括下述(P14)的寡核苷酸的探针。

[0232] (P14)寡核苷酸,其包括与碱基长为14~50个碱基长的、以序列编号21所示的碱基序列中第334位碱基(g)作为5'末端的寡核苷酸互补的碱基序列或与所述互补的序列具有同源性的碱基序列,其中,与第347位碱基对应的碱基是鸟嘌呤或腺嘌呤,与第334位对应的碱基是胞嘧啶。

[0233] 包括上述(P14)的寡核苷酸探针,例如是用于检测序列编号21所示的碱基序列中第347位的碱基的替换突变的有无的探针。上述(P14)的寡核苷酸例如与EGFR基因的正义链互补,能够通过上述正义链的杂交来确定上述多态性。上述(P14)的寡核苷酸中,与序列编号21的第347位碱基对应的互补的碱基表示为r,所述r为鸟嘌呤(g)和腺嘌呤(a)。其中r为鸟嘌呤(g)的上述寡核苷酸与EGFR790野生型的检测序列的杂交比对EGFR790突变型的检测序列的杂交更强,因此可被称为EGFR790野生型用探针。其中r为腺嘌呤(a)的上述寡核苷酸与EGFR790突变型的检测序列的杂交比对EGFR790野生型的检测序列的杂交更强,因此可被称为EGFR790突变型用探针。通过判断这些寡核苷酸与上述EGFR790基因的检测序列中EGFR790野生型的检测序列或EGFR790突变型的检测序列中任一**的强杂交**,就能检测EGFR基因的多态性。上述(P14)的寡核苷酸中,3'末端为胞嘧啶。

[0234] 上述(P14)的寡核苷酸例如是序列编号22所示的寡核苷酸,该碱基序列中r如前文所述。上述寡核苷酸的具体例子例如是EGFR790用突变型探针(序列编号23所示的寡核苷酸)以及EGFR790用野生型探针(序列编号24所示的寡核苷酸)。

[0235] 5'-tgagctgcrtgatgaggtgcac-3'(序列编号22)

[0236] 5'-tgagctgcatgatgaggtgcac-3'(序列编号23)(3T-EGFR-T790M-mt-R3)

[0237] 5'-tgagctgcgtgatgaggtgcac-3'(序列编号24)

[0238] 本发明中,如前文所述,上述P14的寡核苷酸可以是具有下述序列的寡核苷酸,所述序列与例举的上述序列中任一具有同源性。上述同源性例如是80%以上,优选85%以上,更优选90%以上,进一步更优选95%以上,最优选96%以上、97%以上、98%以上、99%以上、100%。

[0239] (A)步骤中,当上述多态性检测用探针两种以上组合使用时,优选地,各探针是具有不同标记物质的标记探针。所述不同的标记物质例如是检测条件不同的标记物质。

[0240] 本发明中,上述被检测核酸可以是单链核酸,也可以是双链核酸。当上述被检测核酸为上述双链核酸时,例如,如后文所述,所述步骤(A)中优选包括对所述反应体系进行加热、使得双链的所述被检测核酸解离的步骤。由于上述双链核酸解离为单链核酸,例如,本发明的多态性检测用探针易于与所述单链核酸杂交。

[0241] 本发明中,上述被检测核酸例如可以是样品中原本含有的核酸,为了提高检测精

度,其也可以是以上述核酸为模板核酸、通过核酸扩增法扩增得到的扩增产物。上述扩增产物例如可以是以上述样品中的DNA为模板得到的扩增产物。而且,上述被检测核酸例如可以是以上述样品中总RNA、mRNA等RNA通过RT-PCR(Reverse Transcription PCR)合成得到的cDNA,也可以是以上述cDNA为模板得到的扩增产物。上述扩增产物例如优选是含有上述检测序列的区域的扩增产物。上述检测序列的上述检测位点例如可以仅含有上述EGFR858多态性的检测位点,也可以仅含有上述外显子19多态性的检测位点。此外,上述检测位点可以同时含有上述EGFR858多态性和上述外显子19多态性。进一步,上述检测位点还可以含有上述EGFR790多态性。

[0242] 例如当上述被检测核酸为上述扩增产物时,本发明的多态性检测方法可以进一步包括由上述模板核酸生成上述扩增产物的步骤。上述扩增产物的产生步骤例如可以在上述(A)步骤之前进行,也可以在上述(A)步骤中进行。

[0243] 当上述被检测核酸为上述扩增产物时,上述(A)步骤中,例如可以使用预先制备得到的扩增产物来制备含有本发明的多态性检测用探针与上述扩增产物的反应体系;也可以在存在本发明的多态性检测用探针的情况下,在上述反应体系中,由上述模板核酸产生上述扩增产物,然后制备含有上述多态性检测用探针和上述扩增产物的反应体系。

[0244] 上述核苷酸的扩增方法无特别限制,例如是PCR(聚合酶链式反应,Polymerase Chain Reaction)法、NASBA(基于核酸序列的扩增,Nucleic Acid Sequence Based Amplification)法、TMA(转录介导的扩增,Transcription Mediated Amplification)法、SDA(链置换扩增,Strand Displacement Amplification)法等,其中PCR法是优选地。此外,上述扩增方法的条件无特别限制,可以使用现有的公知的方法进行操作。

[0245] 对由上述模板核酸产生上述扩增产物而言,例如,优选使用用于扩增含有EGFR基因中检测目标多态性的序列的引物。

[0246] 通过上述引物得到的扩增区域无特别限制,可以根据检测目标多态性进行适当设定,即,检测目标多态性为上述EGFR858多态性时,上述扩增区域例如是含有上述EGFR858基因多态性检测位点的区域,即,优选为序列编号1的碱基序列中含有第261位碱基的区域。具体而言,优选为EGFR基因的序列编号1所示的碱基序列中含有与寡核苷酸P1、P3及P15~P19中的至少一个寡核苷酸杂交的序列的区域。此外,检测目标多态性为上述外显子19多态性时,上述扩增区域,例如为含有上述外显子19多态性的检测位点的区域,即,优选为序列编号2的碱基序列中含有第112~151位碱基的区域。具体而言,优选为含有与序列编号2所示的碱基序列中P5~P6的寡核苷酸以及序列编号3所示的碱基序列中P7的寡核苷酸中的至少一个杂交的序列的区域。此外,检测目标多态性为上述EGFR858多态性和外显子19多态性时,上述扩增区域例如可以是含有上述EGFR858多态性检测位点的区域和含有上述外显子19多态性检测位点的区域和这两个区域二者。上述扩增区域,还例如可以含有含上述EGFR790基因多态性检测位点的区域。

[0247] 此外,上述引物的序列无特别限制,其例如能够扩增含有上述检测位点的检测序列即可,也可以根据上述检测序列及其周围序列等,按现有公知的方法进行合适的设定。上述引物的长度无特别限制,可以设定为一般的长度,例如为16~50个碱基长。

[0248] 上述引物可以使用扩增正义链的正向引物(下文也称为“F引物”)以及扩增反义链的反向引物(下文也称为“R引物”)中的任意一种,使用将两者作为一对的引物组是优选的。

下文将以上述引物的一个例子来说明本发明的引物。

[0249] 用于检测EGFR外显子21 L858基因突变的引物,例如是用于扩增EGFR基因的序列编号1所示的碱基序列中的下述区域的引物,所述区域含有与P1、P3及P15~P19中的至少一种寡核苷酸杂交的序列,作为具体的例子,所述引物是选自下述P8~P10的多态性检测用引物。

[0250] (P8)与序列编号1同源的10~50个碱基的寡核苷酸,其中以第233位的碱基C作为3'末端,

[0251] (P9)与序列编号1互补的10~50个碱基的寡核苷酸,其中以与第284位的碱基G互补的碱基C作为3'末端,

[0252] (P10)与序列编号1互补的10~50个碱基的寡核苷酸,其中以与第290位的碱基G互补的碱基C作为3'末端。

[0253] 上述P8的寡核苷酸,例如是序列编号15记载的寡核苷酸;上述P9的寡核苷酸,例如是序列编号17记载的寡核苷酸;上述P10的寡核苷酸,例如是序列编号16记载的寡核苷酸。

[0254] 5'-aggaacgtactggtgaaaacaccgc-3'(序列编号15)(EGFR-L858R-F2)

[0255] 5'-ttactttgectccttctgcatggtattc-3'(序列编号16)(EGFR-L858R-R2)

[0256] 5'-gcctccttctgcatggtattctttctc-3'(序列编号17)(EGFR-L858R-R1)

[0257] 此外,用于检测EGFR外显子19缺失的基因突变的引物例如是用于扩增下述区域的引物,所述区域含有与EGFR基因的序列编号2所示的碱基序列中P5及P6中至少一种寡核苷酸杂交的序列,或者含有与序列编号3所示的碱基序列中P7的寡核苷酸杂交的序列,作为具体例子,所述引物是选自下述P11~P13的多态性检测用引物。

[0258] (P11)与序列编号2同源的10~50个碱基的寡核苷酸,其中以第95位的碱基G作为3'末端,

[0259] (P12)与序列编号2同源的10~50个碱基的寡核苷酸,其中以第73位的碱基C作为3'末端,

[0260] (P13)与序列编号2互补的10~50个碱基的寡核苷酸,其中以与第155位的碱基G互补的碱基C作为3'末端。

[0261] 上述P11的寡核苷酸,例如是序列编号18记载的寡核苷酸;上述P12的寡核苷酸,例如是序列编号19记载的寡核苷酸;上述P13的寡核苷酸例如是序列编号20记载的寡核苷酸。

[0262] 5'-gatcccagaaggtgagaaag-3'(序列编号18)(EGFR-EX19-F1)

[0263] 5'-tctctctgtcataggactc-3'(序列编号19)(EGFR-EX19-F2)

[0264] 5'-gaaactcacatcgaggatttc-3'(序列编号20)(EGFR-EX19-R1)

[0265] 上述反应体系中,上述引物的添加浓度无特别限制,例如,对于一种引物,可以为0.1~4 $\mu\text{mol/L}$,优选为0.25~1.5 $\mu\text{mol/L}$,特别优选为0.5~1 $\mu\text{mol/L}$ 。此外,使用F引物和R引物二者时,上述F引物(F)和上述R(R)引物的添加比例(摩尔比F:R)无特别限制,例如,优选为1:0.25~1:4,更优选为1:0.5~1:2。

[0266] 上述步骤(A)中,本发明的多态性检测用探针相对于上述被检测核酸的添加比例(摩尔比)无特别限制,为能充分确保检测信号,优选为1倍以下。此时,上述被检测核酸例如可以是,含有野生型检测序列的核酸和含有突变型检测序列的核酸的组合,也可以是含有野生型检测序列的扩增产物和含有突变型检测序列的扩增产物的组合。而且,被检测核酸

中,含有与上述多态性检测用探针更强杂交的检测序列的核酸比例通常未知,但结果,上述多态性检测用探针的添加比例(摩尔比)优选为:相对于含有更强杂交的检测序列的核酸(含有上述检测序列的扩增产物)而言20倍以下,更优选为10倍以下,进一步更优选为5倍以下。此外,其下限无特别限制,例如为0.001倍以上,优选为0.01倍以上,更优选为0.1倍以上。本发明的多态性检测用探针与上述被检测核酸的添加比例,例如可以是相对于双链核酸的摩尔比,也可以是相对于单链核酸的摩尔比。

[0267] 本发明的多态性检测用探针在上述反应体系中的添加浓度无特别限制,例如,对于每一种上述的多态性检测用探针而言,以10~1000nmol/L的范围添加是优选的,更优选为20~500nmol/L。

[0268] 适用于本发明的多态性检测方法的样品无特别限制,其可以是生物体样品。上述生物体样品的具体例子例如,全血,白细胞等血细胞,骨髓,口腔粘膜等口腔细胞,指甲、毛发等体细胞,生殖细胞,痰液,羊水,石蜡包埋的组织,尿液,胃液,洗胃液等。本发明中,上述样品的采取方法以及由所述样品制备被检测核酸的方法无特别限制,可采用已有的公知方法。当上述生物体样品为全血时,上述全血在上述反应体系中的浓度例如为0.01~2体积%,优选为0.05~1.5体积%,更优选为0.1~1体积%。此外,当上述生物体样品为血清时,上述血清在上述反应体系中的浓度例如为0.1~20体积%,优选为0.25~15体积%,更优选为0.5~10体积%。

[0269] 如上文所述,本发明的多态性检测方法能利用所谓的 T_m 分析(又称熔解曲线分析)。下面,对 T_m 分析中的 T_m 值进行说明。例如,对含有双链DNA的溶液进行加热时,260nm处的吸光度会升高。原因是因为,双链DNA两链之间的氢键由于加热而断裂,解离为单链DNA(DNA的熔解)。因此,当所有双链DNA全部解离成为单链DNA时,该吸光度显示为加热开始时的吸光度(仅双链DNA时的吸光度)的约1.5倍,由此可以判断熔解完全。根据该现象,一般而言,熔解温度 T_m 值被定义为吸光度达到吸光度最大上升值的50%时的温度。

[0270] 在上述(A)步骤中,对显示上述被检测核酸和上述多态性检测用探针的杂交形成体的熔解状态的信号的测定,如前文所述,优选为对上述荧光色素的信号进行测定。上述探针例如是单独存在时显示信号并且形成杂交体时不显示信号的标记探针;或者是单独存在时不显示信号并且形成杂交体时显示信号的标记探针。前一种探针的情况下,与上述扩增产物形成杂交体(双链DNA)时不显示信号,加热后上述探针从上述扩增产物上解离时显示信号。后一种探针的情况下,与上述扩增产物形成杂交体(双链DNA)时显示信号,加热后上述探针从上述扩增产物上解离时信号减少(消失)。因此,通过检测上述荧光色素的信号,与测定260nm处的吸光度一样,能够确定杂交形成体的熔解过程以及 T_m 值。上述荧光色素的信号检测,例如可在对上述荧光色素的信号来说特殊的条件下进行检测,上述条件例如是激发波长、检测波长等。而且,关于上述标记探针和上述荧光色素,参见前文所述。

[0271] 下面,以一具体实施方式来说明本发明的多态性检测方法。在该实施方式中,使用经荧光色素标记的标记探针作为本发明的多态性检测用探针,存在上述多态性检测用探针时,从模板核酸进行扩增,将得到的扩增产物用作为上述被检测核酸。而且,本发明的多态性检测方法的特征在于其本身使用多态性检测用探针,其他步骤、条件无任何限制。

[0272] 首先,从上述生物体样品中分离出基因组DNA。可以采用已有的公知方法,来从所述生物体样品中分离出基因组DNA。具体例子例如,可以使用市售的基因组DNA分离试剂盒

(商品名GFX Genomic Blood DNA Purification kit;GE Healthcare Bioscience公司制造)等。

[0273] 接下来,向含有经分离的基因组DNA的样品中添加标记探针,制备反应液。上述标记探针例如优选是前文所述的QProbe(注册商标)。

[0274] 上述标记探针例如可添加至含有经分离的基因组DNA的样品中,也可以在溶剂中与基因组DNA混合。上述溶剂无特别限制,例如是Tris-HCl等缓冲溶液,含有KCl、MgCl₂、MgSO₄、甘油等的溶剂,PCR用反应液等扩增用反应液等已有的公知溶剂。

[0275] 而且,上述标记探针的添加时机无特别限制,例如可以在扩增反应之前、期间或之后添加。其中,例如,为了进行添加,不必将上述反应液暴露给外部环境,并且,所述扩增反应和信号值的测定可连续进行,因此,在上述扩增反应前添加上述反应液是优选的。此时,如前文所述,上述标记探针优选是其3'末端被标记物质或磷酸基团修饰的探针。

[0276] 接下来,以经分离的基因组DNA为模板,在上述标记探针存在的情况下,通过PCR等扩增方法,扩增含有发生目标多态性的检测位点的序列。下面以PCR作为扩增方法的例子,对本发明进行说明,但不限于此例。此外,PCR的条件无特别限制,可按照已有的公知的方法进行。

[0277] 具体地,使用含有上述基因组DNA、上述标记探针以及上述引物的所述反应液进行PCR。该反应液的组成无特别限制,本领域技术人员可以进行合适的设定,例如,除上述基因组DNA、上述标记探针以及上述引物之外,还有DNA聚合酶等聚合酶、三磷酸核苷、缓冲液、各种催化剂等。上述反应液中的上述标记探针以及上述引物的添加比例无特别限制,例如分别为前文所述的范围。

[0278] 上述DNA聚合酶无特别限制,例如可以使用现有公知的来源于耐热细菌的聚合酶。作为具体例子,来源于水生栖热菌(*Thermus aquaticus*)的DNA聚合酶(美国专利4,889,818和5,079,352)(商品名Taq聚合酶)、来源于嗜热栖热菌(*Thermus thermophilus*)的DNA聚合酶(W091/09950)(rTth DNA聚合酶)、来源于极端嗜热菌(*Pyrococcus furiosus*)的DNA聚合酶(WO 92/9689)(Pfu DNA聚合酶,Stratagene公司制造)、来源于附岸热球菌(*Thermococcus litoralis*)的DNA聚合酶(EP-A455430(商标Vent):New England Biolabs公司制造)等可商业获得的DNA聚合酶,其中来源于水生栖热菌(*Thermus aquaticus*)的耐热性聚合酶是优选的。

[0279] 上述反应液中DNA聚合酶的添加比例无特别限制,例如是1~100U/mL,优选为5~50U/mL,更优选为20~40U/mL。此外,关于DNA聚合酶的活性单位(U),一般来说,以活化的鲑鱼精DNA作为模板引物,在活性测定用反应液中,在74℃,30分钟内将10nmol的所有核酸转换为酸不溶性沉淀物的活性被记为1U。上述活性测定用反应液的组成例如是25mmol/L TAPS缓冲液(pH 9.3,25℃)、50mmol/L KCl、2mmol/L MgCl₂、1mmol/L 巯基乙醇、200μmol/L dATP、200μmol/L dGTP、200μmol/L dTTP、100μmol/L “α-³²P” dCTP缓冲液、0.25mg/mL活化的鲑鱼精DNA。

[0280] 上述三磷酸核苷通常是dNTP(dATP、dCTP、dGTP以及dTTP或dUTP)。上述反应液中dNTP的添加比例无特别限制,例如是0.01~1mmol/L,优选为0.05~0.5mmol/L,更优选为0.1~0.3mmol/L。

[0281] 上述缓冲液例如是Tris-HCl、Tricine、MES、MOPS、HEPES、CAPS等,可以使用市售的

PCR用缓冲液和市售的PCR试剂盒的缓冲液。

[0282] 此外,上述反应溶液还可以含有肝素、甜菜碱、KCl、MgCl₂、MgSO₄、甘油等,这些物质的添加比例,例如被设定在不妨碍PCR反应的范围内即可。

[0283] 上述反应液的总体积无特别限制,例如可以根据使用的热循环仪等仪器进行适当设定,其通常为1~500μL,优选为10~100μL。

[0284] 下面进行PCR反应。上述PCR的循环条件无特别限制,例如,关于(1)作为被检测核酸的双链DNA向单链DNA的解离,(2)引物向上述单链DNA的退火,(3)上述引物通过聚合酶反应的延伸,可分别例如下表2所示的条件。此外,循环数无特别限制,下述(1)~(3)的三步作为1个循环,例如30个循环以上是优选的。上述循环数总和的上限无特别限制,例如是100个循环以下,优选为70个循环以下,进一步优选为50个循环以下。各步的温度变化,例如可以通过热循环仪等进行自动控制。

[0285] [表2]

		温度(°C)和时间(秒)
[0286]	(1) 单链 DNA 的解离	例如 90~99°C、1~120 秒
		优选为 92~95°C、1~60 秒
[0286]	(2) 引物的退火	例如 40~70°C、1~300 秒
		优选为 50~70°C、5~60 秒
[0286]	(3) 延伸反应	例如 50~80°C、1~300 秒
		优选为 50~75°C、5~60 秒

[0287] 上述反应液中标记探针的添加比例无特别限制,例如,上述标记探针以10~1000nmol/L的范围添加是优选的,更优选为20~500nmol/L的范围。此外,例如,为了确保充分的信号值,上述反应液中,上述标记探针与上述被检测核酸的摩尔比,例如优选为1倍以下。上述标记探针与上述被检测核酸的添加比例,例如可以是与双链核酸的摩尔比,也可以是与单链核酸的摩尔比。

[0288] 下面进行得到的扩增产物(双链DNA)的解离以及进行经解离得到的单链DNA与上述标记探针的杂交。上述反应,例如可在标记探针存在的情况下,改变上述反应液的温度来进行。此时,如前文所述,对于预先添加了上述标记探针的上述反应液来说,扩增反应结束后改变上述反应液的温度是优选的。

[0289] 上述解离步骤中的加热温度,即双链的上述扩增产物能解离为单链的温度无特别限制,例如是85~95°C。加热时间无特别限制,通常为1秒~10分钟,优选为1秒~5分钟。

[0290] 解离的单链DNA与上述标记探针的杂交例如可在上述解离步骤之后,通过降低解离步骤的加热温度来实现。温度条件例如是40~50°C。此外,上述温度的处理时间无特别限制,其例如是1~600秒。

[0291] 然后,改变上述反应液的温度,测定显示上述扩增产物与上述标记探针的杂交形成体熔解状态的信号值。具体地,例如,对上述反应液(上述单链DNA与上述标记探针的杂交形成体)加热,测定伴随温度上升的信号值的变化。如前文所述,使用鸟嘌呤淬灭探针(即未

端胞嘧啶(c)被标记的探针)时,其与单链DNA杂交的状态下荧光强度减少(或淬灭),解离的状态下则发出荧光。因此,可以对荧光强度减少(或淬灭)的杂交形成体逐渐加热,测定伴随温度上升的荧光强度的增加。

[0292] 测定上述荧光强度变化时的温度范围无特别限制,起始温度例如是室温~85℃,优选为25~70℃;终止温度例如是40~105℃。此外,温度的上升速度无特别限制,例如是0.1~20℃/秒,优选为0.3~5℃/秒。

[0293] 下面,分析上述信号值的变化,来确定 T_m 值。具体地,从测得的荧光强度计算出各温度点下单位时间内荧光强度的变化量(-d荧光强度增加量/dt),显示为最低值的温度即确定为 T_m 值。此外,还可以将单位时间内荧光强度的增加量(d荧光强度增加量/dt)的最高点确定为 T_m 值。而且,上述标记探针不是荧光淬灭探针而是单独存在时不显示信号但形成杂交体后显示信号的探针时,与之前相反,可以测定荧光强度的减少量。

[0294] 上述 T_m 值,例如可根据已有的公知的MELTCALC软件(<http://www.meltcalc.com>)计算得出,或者,也可以根据最邻近碱基对法(Nearest Neighbor Method)来确定。

[0295] 接下来,根据上述 T_m 值来确定EGFR基因的多态性是上述野生型还是上述突变型。上述 T_m 分析中,野生型探针对上述野生型检测序列的杂交比对上述突变型检测序列的杂交更强。因此,较之上述野生型探针和上述突变型检测序列的 T_m 值,上述野生型探针和上述野生型检测序列的 T_m 值显示为更高的值。另一方面,突变型探针对上述突变型检测序列的杂交比对上述野生型检测序列的杂交更强。因此,较之上述突变型探针和上述野生型检测序列的 T_m 值,上述突变型探针和上述突变型检测序列的 T_m 值显示为更高的值。

[0296] 通过预先确定上述探针与检测序列强杂交的 T_m 值(T_{mH})和探针以比该 T_m 值(T_{mH})更低的值与检测序列杂交的 T_m 值(T_{mL}),可以确定上述检测序列含有上述野生型多态性和上述突变型多态性中的某一个。此外,通过预先确定上述野生型探针对上述野生型检测序列强杂交的 T_m 值(T_{mH}),使用上述野生型探针得到比上述 T_m 值(T_{mH})更低的 T_m 值(T_{mL})时,可以确定为上述突变型检测序列。另一方面,通过预先确定上述突变型探针对上述突变型检测序列强杂交的 T_m 值(T_{mH}),使用上述突变型探针得到比上述 T_m 值(T_{mH})更低的 T_m 值(T_{mL})时,可以确定为上述野生型检测序列。

[0297] 例如,使用突变型探针作为上述探针时,显示出与预定的突变型检测序列的 T_m 值(T_{mH})时,可判断多态性为突变型,显示出比与预定的突变型检测序列的 T_m 值(T_{mH})更低的 T_m 值(T_{mL})时,可判断多态性为野生型。另一方面,例如,使用野生型探针作为上述探针时,显示出与预定的野生型检测序列的 T_m 值(T_{mH})时,可判断多态性为野生型,显示出比与预定的野生型检测序列的 T_m 值(T_{mH})更低的 T_m 值(T_{mL})时,可判断多态性为突变型。

[0298] 此外,如前文所述,作为本发明中的方法(升高含有上述多态性检测用探针的反应体系的温度(对杂交形成体进行加热)、测定伴随温度升高的信号值的变化)的替代方法,例如也可以测定杂交体形成时信号值的变化。即,也可以降低含有上述多态性检测用探针的反应体系的温度以形成杂交形成体时,测定伴随上述温度降低的信号值的变化。

[0299] 作为具体实施方式,使用单独存在时显示出信号、形成杂交体后不显示信号的标记探针(例如鸟嘌呤淬灭探针)的情况下,单链DNA与上述标记探针在保持解离的状态下发出荧光,降低温度形成杂交体时,上述荧光减少(或淬灭)。因此,例如,可以逐渐降低上述反应液的温度,测定伴随温度的荧光强度减少。另一方面,使用单独存在时不显示信号、形成

杂交体后显示信号的标记探针的情况下,上述单链DNA与上述标记探针在保持的解离状态下不发出荧光,降低温度形成杂交体时开始发出荧光。因此,例如,可以逐渐降低上述反应液的温度,测定伴随温度降低的荧光强度的增加。

[0300] 本发明中,如前文所述,例如可以在同一反应体系中使用两种以上的多态性检测用探针。使用多种多态性检测用探针对情况下,各探针的添加时机,例如与前文所述相同,在上述(A)步骤之前加入、同时加入是优选的,在进行扩增反应的情况下,在扩增反应进行前加入、同时加入是优选的。

[0301] 多种探针例如是上述EGFR858用探针和上述外显子19用探针的组合,具体地,例如,可举例为上述EGFR858用探针和上述外显子19用野生型探针的组合,上述EGFR858用探针和上述外显子19用突变型(de1)探针的组合,上述EGFR858用探针和上述外显子19用野生型探针以及上述外显子19用突变型(de1)探针的组合。本发明中,例如,还可组合所述EGFR790用探针。

[0302] 在同一体系中检测上述EGFR858多态性和外显子19多态性二者时,可以组合使用上述EGFR858用探针和上述外显子19用探针。此时,上述EGFR858用探针和上述外显子19用探针,如前文所述,优选地分别具有不同的标记物质。然后,可以通过改变上述反应液的温度,对应于各标记物质的测定条件检测信号,来分别确定 T_m 值。

[0303] 此外,针对上述EGFR858多态性或上述EGFR790多态性的检测,分别地,例如,可组合使用针对目标多态性的上述野生型探针和突变型探针。此时,例如,可根据哪个探针显示出完全互补匹配的杂交体的 T_m ,来确定上述多态性的种类。例如,使用具有不同标记物质的突变型探针和野生型探针的情况下,突变型探针显示出完全互补的匹配杂交体的 T_m 值的话,则可判断多态性为突变型,野生型探针显示出完全互补的匹配杂交体的 T_m 值的话,则可判断多态性为野生型。

[0304] 此外,本发明的多态性检测方法,例如可以组合使用用于检测EGFR基因多态性的本发明的多态性检测用探针和用于检测其他基因多态性的探针。通过组合使用本发明的多态性检测用探针和用于检测其他基因的探针,能够在同一反应体系中检测出包括EGFR基因在内的两种以上基因的多态性。EGFR基因的上述其他多态性无特别限制,其例如是上述EGFR790多态性。

[0305] <判定方法>

[0306] 本发明的判定方法特征在于使用本发明的多态性检测用探针的多态性检测方法,其他步骤和条件无任何特别限制。此外,根据多态性对针对EGFR-TKI的耐药性或药效的判断,例如可以按照公知的基准进行。

[0307] <试剂盒>

[0308] 本发明所用的试剂盒是用于检测EGFR基因中多态性的试剂盒,其特征在于含有上述的本发明的探针。本发明的试剂盒含有本发明的探针即可,对其他构成无特别限制。本发明试剂盒中含有的本发明的探针可以是一种也可以是两种以上,其组合例如如前文所述。本发明的试剂盒例如还优选含有前文所述的本发明的引物,引物的组合无特别限制,如前文所述。本发明的试剂盒,例如还可含有核酸扩增反应必需的成份和使用说明书等。

[0309] <引物试剂>

[0310] 本发明的引物试剂中可以含有上述的本发明引物中的任意一种,也可以含有两种

以上。上述引物的种类,例如可以根据目标扩增区域来合适地确定。扩增含有上述EGFR858多态性的检测序列的情况下,所述引物优选地包含包括上述P8、P9以及P10的寡核苷酸的引物中的至少一种;特别地,优选地包含选自上文所述的序列编号15、序列编号16以及序列编号17所示的寡核苷酸构成的组中的至少一种引物。此外,在扩增含有上述外显子19多态性的检测序列的情况下,优选地包含包括上述P11、P12以及P13的寡核苷酸的引物中的至少一种,特别地,优选地包含选自序列编号18、序列编号19以及序列编号20所示的寡核苷酸构成的组中的至少一种引物。本发明的引物试剂,例如通过含有上述P8的寡核苷酸、和P9或P10的寡核苷酸、和P11或P12的寡核苷酸、和P13的寡核苷酸作为引物,可对含有上述EGFR 858多态性的检测序列以及含有上述外显子19多态性的检测序列进行扩增。此外,上述引物的组合,可如前文所述示例,但是不限于此。

[0311] <多态性检测用试剂>

[0312] 本发明的多态性检测用试剂是用于检测EGFR基因的多态性的试剂,其特征在于含有本发明的多态性检测用探针。本发明中,特征在于含有上述的本发明的多态性检测用探针,其他构成、条件无任何特别限制。而且,本发明的多态性检测用试剂,例如也被称为EGFR基因多态性检测用探针试剂盒。

[0313] 上述多态性检测用探针例如可以含有一种上述的多态性检测用探针,也可以含有两种以上,这可以根据检测目标多态性来合适地确定。在仅检测上述EGFR858多态性的情况下,例如优选地包含上述EGFR858用探针。上述EGFR858用探针可以是EGFR858用野生型探针,也可以是EGFR858用突变型探针,也可以同时含有两者。此外,在仅检测上述外显子19多态性的情况下,例如优选包含上述外显子19用探针。上述外显子19用探针例如可以是外显子19用野生型探针、外显子19用突变型(sub)探针、外显子19用突变型探针(del)中的任意一种,也可以是两种,也可以全部都含。上述探针的组合,可如前文所述示例,但是不限于此。

[0314] <多态性检测用试剂盒>

[0315] 本发明的EGFR基因多态性检测用试剂盒是EGFR基因多态性检测用的试剂盒,其特征在于含有本发明的探针。本发明的试剂盒中,本发明的探针可以为一种,也可以为两种以上。对于后者的情况,两种以上的探针可以以混合状态被包含,也可以作为单独的试剂被包含。此外,两种以上的本发明的探针以混合状态包含于本发明的探针试剂盒中的情况下,或者当作为分别的试剂被包含、但例如使用时在同一反应体系中进行对各探针和各检测对象序列的 T_m 分析的情况下,对各探针用分别的荧光物质进行标记是优选的。这样通过改变荧光物质的种类,即使在同一反应体系中也针对各探针进行检测。上述荧光物质,例如优选为检测波长不同的物质。

[0316] 此外,EGFR基因多态性检测用试剂盒也可以包括用于扩增含有上述多态性位点的序列(探针杂交的区域)的探针组。

[0317] 实施例

[0318] 下面说明本发明的实施例。但是,本发明不限于下述实施例。

[0319] 实施例1

[0320] 在野生型质粒和突变型质粒的共存下,进行 T_m 分析,检测了EGFR基因的EGFR858多态性。

[0321] 制备EGFR858野生型质粒(L858WT)和EGFR858突变型质粒(L858R)作为上述野生型质粒和突变型质粒。上述EGFR858野生型质粒(L858WT)中插入作为EGFR基因的部分序列的、序列编号1的第112位~第411位的寡核苷酸,其中序列编号1的第261位碱基(k)为胸腺嘧啶(t)。上述EGFR858突变型质粒(L858R)中插入作为EGFR基因的部分序列的、序列编号1的第112位~第411位的寡核苷酸,其中序列编号1的第261位碱基(k)为鸟嘌呤(g)。将这些质粒按照如下所示的设定比例进行混合,制备3种样品。每1 μ L上述样品包含250个拷贝的质粒。

[0322] [表3]

[0323]	样品	各质粒的混合比例	
		L858WT	L858R
[0324]	L858WT 100%	100%	0%
	L858R 5%	95%	5%
	L858R 10%	90%	10%

[0325] 针对50 μ L下述表4的PCR反应液,使用全自动SNPs检测装置(商品名i-densy(商标)IS-5310,ARKRAY公司制造)进行PCR和T_m分析。上述PCR是:在95 $^{\circ}$ C处理1分钟后,以95 $^{\circ}$ C1秒以及58 $^{\circ}$ C15秒作为一个循环重复50个循环,然后95 $^{\circ}$ C处理1秒,40 $^{\circ}$ C处理60秒。接下来,以1 $^{\circ}$ C/3秒的温度上升速度,将上述反应液从40 $^{\circ}$ C加热至75 $^{\circ}$ C,在检测波长为585~700nm处,测定伴随时间的荧光强度变化,进行T_m分析。

[0326] [表4]

[0327] (PCR反应液组成:单位 μ L)

[0328]	蒸馏水	33.61
	0.94U/ μ L Taq 聚合酶	2
	10w/v% NAN ₃	0.23
	100mmol/L MgCl ₂	0.75
	1mol/L KCl	1.25
	1mol/L Tris-HCl (pH8.6)	1.25
	2.5mmol/L dNTP	4
	20w/v% BSA	0.5
	80w/v% 甘油	1.56
	100 μ mol/L EGFR858 用探针	0.1
	100 μ mol/L EGFR858 用 F 引物	0.5
	100 μ mol/L EGFR858 用 R 引物	0.25
	样品	4
	总计	50 μ L

[0329] 上述EGFR858用探针的序列如下所示。

[0330] F引物(序列编号15)(EGFR-L858R-F2)

[0331] 5'-aggaacgtactggtgaaaacaccgc-3'

[0332] R引物(序列编号16)(EGFR-L858R-R2)

[0333] 5'-ttactttgcctccttctgcatggtattc-3'

[0334] 使用下述序列的EGFR858用突变型探针作为上述EGFR858用探针。下述EGFR858用突变型探针是EGFR858突变型的EGFR858基因的正义链中的突变型探针,上述序列中,下划线的碱基是与EGFR858突变型互补的碱基。上述EGFR858用突变型探针的3'末端被荧光色素TAMRA标记。

[0335] EGFR用突变型探针(序列编号7)(3T-EGFR-858-R2)

[0336] 5'-ttggcccgcgccc aaaatc-(TAMRA)-3'

[0337] 上述结果如图1所示。图1是显示伴随温度上升的荧光强度变化的T_m分析图。图1中,(A)为L858WT 100%的结果、(B)为L858R 5%的结果、(C)为L858R 10%的结果。横轴显示了测定时的温度(°C),纵轴显示了荧光强度的变化(下文中也称为“荧光变化量”),单位采用“d荧光强度增加量/dt”(dF/dt)。此外,L858WT与EGFR858突变型探针的T_m值为55°C左右,L858R与EGFR858突变型探针的T_m值为64°C左右。

[0338] 如图1(A)所示,针对L858WT 100%仅在L858WT的T_m值处确认到峰。另一方面,如图1(C)所示,含有10%突变型质粒的L858R 10%在L858WT的T_m值以及L858R的T_m值两者处均确认到峰。此外,如图1(B)所示,突变型质粒含有量降低至5%的L858R 5%也在L858WT的T_m值以及L858R的T_m值两者处确认到峰。

[0339] 实施例2

[0340] 本实施例,分别针对对野生型人工核酸以及突变型人工核酸进行了T_m分析,检测了EGFR基因的EGFR858多态性。

[0341] 如下述序列所示,制备了与序列编号1中第241位~第290位同源的EGFR858野生型人工核酸(EGFR-L858R(WT)-F)以及EGFR858突变型人工核酸(EGFR-L858R(MT)-F)。以下两条序列中,下划线对应序列编号1中的第261位碱基。各个人工核酸调节至5μ/L,用作为样品。

[0342] EGFR-L858R(WT)-F(序列编号32)

[0343] caagatcacagat t t t t t g g g c t g g c c a a a c t g c t g g g t g c g g a a g a g a a a g

[0344] EGFR-L858R(MT)-F(序列编号33)

[0345] caagatcacagat t t t t t g g g c g g g c c a a a c t g c t g g g t g c g g a a g a g a a a g

[0346] 针对25μL下述表5的PCR反应液,使用全自动SNPs检测装置(商品名i-densy(商标)IS-5310,ARKRAY公司制造)进行T_m分析。上述T_m分析是:在95°C处理1秒,40°C处理60秒。接下来,以1°C/3秒的温度上升速度,将上述反应液从40°C加热至75°C,在检测波长为585~700nm处,测定伴随时间的荧光强度变化。

[0347] [表5]

[0348] (反应液组成:单位μL)

	蒸馏水	21
	×10 GeneTaq 缓冲液 ^{*1}	2.5
[0349]	5 μmol/L EGFR858 用突变型探针	0.5
	5 μmol/L 样品	1
	总计	25μL

[0350] 下述EGFR858用突变型探针是EGFR858突变型的EGFR858基因的正义链中的突变型探针,上述序列中,下划线的碱基是与EGFR858突变型互补的碱基。上述EGFR858用突变型探针的3'末端被荧光色素TAMRA标记。

[0351] EGFR858用突变型探针(序列编号9)(3T-EGFR-858-R1)

[0352] 5'-cagtttg^gcccc^gccc-(TAMRA)-3'

[0353] 上述结果如图2所示。图2是显示伴随温度上升的荧光强度变化的T_m分析图。图2中,(A)为EGFR-L858R(WT)-F的结果、(B)为EGFR-L858R(MT)-F的结果。横轴显示了测定时的温度(°C),纵轴显示了荧光强度的变化(下文中也称为“荧光变化量”),单位采用“d荧光强度增加量/dt”(dF/dt)。此外,EGFR-L858R(WT)-F与EGFR858突变型探针的T_m值为54°C左右,EGFR-L858R(MT)-FL与EGFR858突变型探针的T_m值为66°C左右。

[0354] 如图2(A)所示,针对EGFR-L858R(WT)-F仅确认了EGFR-L858R(WT)-F的T_m值的峰,如图2(B)所示,针对EGFR-L858R(MT)-F仅确认了EGFR-L858R(MT)-F的T_m值的峰。

[0355] 实施例3

[0356] 该实施例针对野生型寡核苷酸和突变型寡核苷酸进行了T_m分析,检测了EGFR基因的外显子19的多态性。BODIPY FL的检测波长采用520~555nm,TAMRA的检测波长采用585~700nm。

[0357] (1)寡核苷酸

[0358] 制备下表6所示的寡核苷酸1~18,作为上述野生型和突变型寡核苷酸。这些寡核苷酸是与EGFR基因的正义链互补的序列。下述寡核苷酸1是野生型寡核苷酸,其与含有上述外显子19对多态性1的正义链的部分序列互补。下述的寡核苷酸2~18是突变型寡核苷酸,它们分别与含有外显子19的多态性2~18的正义链的部分序列互补。下表6中,针对各寡核苷酸显示了与序列编号2的碱基序列对应的区域。此外,Δ后接的碱基序列范围是缺失位点。

[0359] [表6]

(寡核苷酸) No.	碱基序列	Tm 值 (°C)	与序列 2 中的对应区域	
1	5'-ttccttggcttggccttcggagatgttgccttcttaattccttgatagcgcgggaatttt-3'	74	98-157	
2	5'-tcgaggatttccttggcttgccttcggagatgttggatagcgcgggaattttaactttc-3'	57	91-157 (Δ118-132)	
3	5'-tcgaggatttccttggcttgccttcggagatgttggatagcgcgggaattttaactttc-3'	60	91-165 (Δ119-133)	
4	5'-gatttccttggcttgccttcggagatgttggcttgccttgatagcgcgggaattttaactttc-3'	65	92-160 (Δ122-130, G131C)	
5	5'-tcgaggatttccttggcttgccttcggagattccttgatagcgcgggaattttaactttc-3'	60	91-165 (Δ123-137)	
6	5'-atcaggatttccttggcttgccttcggagattccttgatagcgcgggaattttaactttc-3'	66	89-166 (Δ123-140)	
7	5'-aggatttccttggcttgccttcggagatgttgccttgccttgatagcgcgggaattttaactttc-3'	66	91-162 (Δ122-133, A134C)	
8	5'-catcaggatttccttggcttgccttcggagattccttgatagcgcgggaattttaactttc-3'	65	90-167 (Δ122-140)	
[0360]	9	5'-catcaggatttccttggcttgccttcggaaccttgatagcgcgggaattttaactttc-3'	64	90-167 (Δ120-137, C138T)
10	5'-ggatttccttggcttgccttcggagatgttgccttgatagcgcgggaattttaactttc-3'	67	90-161 (Δ123-134)	
11	5'-catcaggatttccttggcttgccttcggagattccttgatagcgcgggaattttaactttc-3'	65	90-167 (Δ123-140)	
12	5'-catcaggatttccttggcttgccttcggagattccttgatagcgcgggaattttaactttc-3'	65	90-167 (Δ122-139, C141A)	
13	5'-tcgaggatttccttggcttgccttcggagataccttgatagcgcgggaattttaactttc-3'	63	91-165 (Δ120-134, C135T)	
14	5'-acatcaggatttccttggcttgccttcggaaccttgatagcgcgggaattttaactttc-3'	64	91-168 (Δ121-138, A120T)	
15	5'-acatcaggatttccttggcttgccttcggaatttgatagcgcgggaattttaactttc-3'	58	91-168 (Δ118-135, T137A, C137T)	
16	5'-tcgaggatttccttggcttgccttcggagatataccttaattgcgcgggaattttaactttc-3'	50	91-165 (Δ112-119, Δ129-135, G128T)	
17	5'-tcgaggatttccttggcttgccttcggagattccttgatagcgcgggaattttaactttc-3'	65	91-165 (Δ122-131, Δ135-139)	
18	5'-cgaggatttccttggcttgccttccttaattccttgatagcgcgggaattttaactttc-3'	66	90-164 (Δ137-151)	

[0361] 上述1~18的序列分别如序列编号49~66所示

[0362] (2) Tm分析

[0363] 针对25μL下述表7的PCR反应液,使用全自动SNPs检测装置(商品名i-densy(商标) IS-5310, ARKRAY公司制造)进行Tm分析。上述Tm分析是:95℃处理1秒,40℃处理60秒。接下来,以1℃/3秒的温度上升速度,将上述反应液从40℃加热至75℃,在各荧光色素对应的检测波长处,测定伴随时间的荧光强度变化。此外,添加5μL蒸馏水代替5μL样品得到的25μL反应液用作为阴性对照,以同样的方式测定荧光强度的变化。

[0364] [表7]

[0365] (反应液组成:单位μL)

[0366]	蒸馏水	17.4
	×10 GeneTaq 缓冲液*1	2.5
	100 μmol/L 外显子 19 用探针	0.1
[0367]	5 μmol/L 样品	5
	总计	25 μL

[0368] ※1ニツポンジーン公司制造

[0369] 实施例3-1

[0370] 将上述寡核苷酸1~18调节至5μmol/L。然后,将上述寡核苷酸1单独的样品1s、上述寡核苷酸1与上述寡核苷酸2~18以体积比1:4混合得到的样品2m~18m,用作为上述反应液的样品。

[0371] 使用下述序列的探针作为上述外显子19用探针。上述探针是与野生型寡核苷酸1

完全互补的序列,上述探针与上述野生型寡核苷酸1的 T_m 值在74℃左右。

[0372] 外显子19用野生型探针(序列编号5)(5FL-EGFR-EX19-F2)

[0373] 5'-(BODIPY FL)-cccgtcgctatcaaggaattaagagaagc-3'

[0374] 上述结果如图9所示。图9是显示伴随温度上升的荧光强度变化的 T_m 分析图。图9中,(A)~(Q)依次为针对上述样品1s、2m~17m的荧光色素检测结果,(R)为阴性对照的结果。各图中,横轴显示了测定时的温度(℃),纵轴显示了荧光强度的变化(下文中也称为“荧光变化量”),单位采用“d荧光强度增加量/dt”(dF/dt)。

[0375] 此外,下表8显示了 T_m 分析的结果——针对各样品而言的峰数、各峰的 T_m 值以及上述各峰的 T_m 值与上述野生型寡核苷酸1的 T_m 值(74℃)的差值(Δ ℃)。如下表8以及图9所示,对于仅含有野生型寡核苷酸1样品1s,仅在野生型寡核苷酸1的 T_m 值(74℃)处确认到峰。另一方面,针对含有野生型寡核苷酸1以及突变型寡核苷酸2~17的样品2m~17m,分别在两个 T_m 值处确认到峰。即,针对上述样品2m~17m,在野生型寡核苷酸1和外显子19用野生型探针的 T_m 值以及低于其的温度处确认了两个峰。此外,针对含有突变型寡核苷酸18的样品,仅能在野生型寡核苷酸1的 T_m 值(74℃)处确认到峰,在除此之外的温度未能确认到峰。

[0376] [表8]

样品	峰数	峰 1		峰 2	
		T_m (°C)	Δ (°C)	T_m (°C)	Δ (°C)
1s	1	74	-		
2m	2	74	-	57	17
3m	2	74	-	60	14
4m	2	74	-	65	9
5m	2	74	-	60	14
6m	2	74	-	66	8
7m	2	74	-	66	8
8m	2	74	-	65	9
9m	2	74	-	64	10
10m	2	74	-	67	7
11m	2	74	-	65	9
12m	2	74	-	65	9
13m	2	74	-	63	11
14m	2	74	-	64	10
15m	2	74	-	58	16
16m	2	74	-	50	24
17m	2	74	-	65	9
18m	1	74	-	×	×

[0377]

[0378] 实施例3-2

[0379] 将上述寡核苷酸1~18调节至5 μ mol/L。然后,将上述寡核苷酸1单独的样品1s、上述寡核苷酸1与上述寡核苷酸2~18以体积比1:4混合得到的样品2m~18m,用作为上述反应液的样品。

[0380] 使用下述序列的探针作为上述外显子19用探针。上述探针是与突变型寡核苷酸18完全互补的序列,上述探针与上述突变型寡核苷酸18的T_m值在58 $^{\circ}$ C左右。

[0381] 外显子19用突变型(de1)探针(序列编号6)(3T-EGFR-EX19-No18-F1)

[0382] 5'-agcaacaaaggaaatc-(TAMRA)-3'

[0383] 上述结果如图10所示。图10是显示伴随温度上升的荧光强度变化的T_m分析图。图10中,(A)~(R)依次为针对上述样品1s、2m~18m的荧光色素检测结果。各图中,横轴显示了测定时的温度($^{\circ}$ C),纵轴显示了荧光强度的变化(下文中也称为“荧光变化量”),单位采用“d荧光强度增加量/dt”(dF/dt)。

[0384] 此外,下表9显示了T_m分析的结果——针对各样品而言的峰数、各峰的T_m值以及上述各峰的T_m值与上述突变型寡核苷酸18的T_m值(58 $^{\circ}$ C)的差值(Δ $^{\circ}$ C)。如下表9以及图10所示,对于仅含有突变型寡核苷酸18的样品18m,仅在突变型寡核苷酸18的T_m值(58 $^{\circ}$ C)处确认到峰。另一方面,针对仅含有野生型寡核苷酸的样品1s,没有检测到峰。此外,针对含有突变型寡核苷酸18以外的寡核苷酸的样品2m~17m,分别在比样品18低的温度处确认到峰。

[0385] [表9]

样品	峰数	峰 1	
		T _m ($^{\circ}$ C)	Δ ($^{\circ}$ C)
1s	×	×	×
2m	1	46	12
3m	1	46	12
4m	1	46	12
5m	1	47	11
6m	1	47	11
7m	1	47	11
8m	1	47	11
9m	1	47	11
10m	1	47	11
11m	1	47	11

[0386]

[0387]	12m	1	46	12
	13m	1	47	11
	14m	1	46	12
	15m	1	46	12
	16m	1	47	11
	17m	1	46	12
	18m	1	58	-

[0388] 实施例3-3

[0389] 将上述寡核苷酸1~18调节至 $5\mu\text{mol/L}$,并将其单独用作为上述PCR反应液的样品(1s~18s)。

[0390] 使用下述序列的探针作为上述外显子19用探针。上述探针是除了序列编号1中碱基编号119的碱基为t之外与野生型寡核苷酸1互补的序列,上述探针与上述野生型寡核苷酸1的 T_m 值在 67°C 左右。

[0391] 外显子19用突变型(sub)探针(序列编号4)(5FL-EGFR-EX19-No19-F2-3)

[0392] $5'-(\text{BODIPY FL})-\text{cccgtcgctatcaagtaattaagagaagcaaca}-3'$

[0393] 上述结果如图11所示。图11是显示伴随温度上升的荧光强度变化的 T_m 分析图。图11中,(A)~(Q)依次为针对上述样品1s~17s的荧光色素检测结果,(R)为阴性对照结果。各图中,横轴显示了测定时的温度($^\circ\text{C}$),纵轴显示了荧光强度的变化(下文中也称为“荧光变化量”),单位采用“d荧光强度增加量/dt”(dF/dt)。

[0394] 此外,下表10显示了 T_m 分析的结果——针对各样品而言的峰数、各峰的 T_m 值以及上述各峰的 T_m 值与上述野生型寡核苷酸1的 T_m 值(67°C)的差值($\Delta^\circ\text{C}$)。如下表10以及图11所示,对于仅含有野生型寡核苷酸1的样品1s,仅在野生型寡核苷酸1的 T_m 值(67°C)处确认到峰。另一方面,针对仅含有突变型寡核苷酸2~15以及17的样品2s~15s以及17s,分别在低于野生型寡核苷酸1的 T_m 值的温度确认到峰。此外,针对仅含有突变型寡核苷酸16或18的样品16s以及18s,未确认到峰。

[0395] [表10]

样品	峰数	峰 1	
		T _m (°C)	Δ (°C)
1s	1	67	-
2s	1	53	14
3s	1	56	11
4s	1	56	11
5s	1	55	12
6s	1	56	11
7s	1	56	11
8s	1	56	11
9s	1	56	11
10s	1	56	11
11s	1	56	11
12s	1	56	11
13s	1	56	11
14s	1	56	11
15s	1	56	11
16s	×	×	×
17s	1	55	12
18s	×	×	×

[0396]

[0397] 比较例3

[0398] 将上述寡核苷酸1~18调节至5μmol/L,并将其单独用作为上述PCR反应液的样品(1s~18s)。

[0399] 使用下述序列的探针作为上述外显子19用探针。上述探针是与野生型寡核苷酸1强杂交的序列,上述探针与上述野生型寡核苷酸1的T_m值在72°C左右。

[0400] 外显子19用野生型(sub)探针(序列编号28)(5FL-EGFR-EX19-WT-F1)

[0401] 5'-(BODIPY FL)-caaggaattaagagaagcaacatctccg-3'[0402] 上述结果如图12所示。图12是显示伴随温度上升的荧光强度变化的T_m分析图。图12中,(A)~(R)依次为针对上述样品1s~18s的荧光色素检测结果。各图中,横轴显示了测定时的温度(°C),纵轴显示了荧光强度的变化(下文中也称为“荧光变化量”),单位采用“d荧光强度增加量/dt”(dF/dt)。此外,下表11显示了T_m分析的结果——针对各样品而言的最大的峰的T_m值以及上述峰的T_m值与上述野生型寡核苷酸1的T_m值(72°C)的差值(Δ°C)。

[0403] 如下图12所示,与样品1s仅含有野生型寡核苷酸1无关,由于出现了肩峰,因此无法判别是野生型寡核苷酸还是突变型寡核苷酸。此外,针对仅含有突变型寡核苷酸2~18的样品2s~18s,也确认了多个峰。并且,样品2s~18s如下表11所示,示出最大峰的T_m值与上述野生型寡核苷酸1的T_m值几乎没有差别。

[0404] [表11]

样品	峰数	峰 1	
		T _m (°C)	Δ (°C)
1s	1	72	-
2s	1	70	2
3s	1	71	1
4s	1	71	1
[0405] 5s	1	71	1
6s	1	71	1
7s	1	71	1
8s	1	71	1
9s	1	71	1
10s	1	71	1
11s	1	71	1
12s	1	71	1
13s	1	71	1
[0406] 14s	1	71	1
15s	1	72	0
16s	×	71	1
17s	1	71	1

[0407] 实施例4

[0408] 该实施例中,在野生型质粒和突变型质粒共存的情况下,进行T_m分析,检测EGFR基因的外显子19多态性。

[0409] 准备插入上表6的寡核苷酸的质粒,作为EGFR858基因的部分序列。具体地,准备了插入上述野生型寡核苷酸1的外显子19野生型质粒(ex19WT),插入上述突变型寡核苷酸2的外显子19突变型质粒2(ex19mt2),插入上述突变型寡核苷酸4的外显子19突变型质粒4(ex19mt4)以及插入突变型寡核苷酸6的外显子19突变型质粒6(ex19mt6)。将这些质粒按照下表12所示的设定比例进行混合,制备了4种样品。每1μL上述样品中包含250个拷贝的质

粒。

[0410] [表12]

[0411]

样品	各质粒的混合比例			
	ex19WT	ex19mt2	ex19mt4	ex19mt6
ex19WT 100%	100%	0%	0%	0%
ex19mt2 5%	95%	5%	0%	0%
ex19mt4 5%	95%	0%	5%	0%
ex19mt6 5%	95%	0%	0%	5%

[0412] 针对50 μ L下述表13的PCR反应液,使用全自动SNPs检测装置(商品名i-densy(商标)IS-5310,ARKRAY公司制造),除检测波长为520~555nm和585~700nm之外,按照与上述实施例1相同的方式进行PCR和T_m分析。

[0413] [表13]

[0414] (PCR反应液组成:单位 μ L)

蒸馏水	32.36
0.94U/ μ L Taq 聚合酶	2
10w/v% NaN ₃	0.23
100mmol/L MgCl ₂	0.75
1mol/L KCl	1.25
1mol/L Tris-HCl (pH8.6)	1.25
2.5mmol/L dNTP	4
[0415] 20w/v% BSA	0.5
80w/v% 甘油	1.56
100 μ mol/L 外显子 19 用 F 引物	0.5
100 μ mol/L 外显子 19 用 R 引物	1
100 μ mol/L 外显子 19 用野生型探针	0.4
100 μ mol/L 外显子 19 用突变型 (del) 探针	0.2
样品	4
总计	50 μ L

[0416] 上述外显子19用引物的序列如下所示。而且,上述外显子19用引物是使用了实施例3的外显子19用野生型探针以及外显子19用突变型(del)探针。

[0417] F引物(序列编号18)(EGFR-EX19-F1)

[0418] 5'-gatcccagaaggtgagaaag-3'

[0419] R引物(序列编号20)(EGFR-EX19-R1)

[0420] 5'-gaaactcacatcgaggatttc-3'

[0421] 外显子19用野生型探针(序列编号5)(5FL-EGFR-EX19-F2)

[0422] 5'-(BODIPY FL)-cccgtcgctatcaaggaattaagagaagc-3'

[0423] 外显子19用突变型(de1)探针(序列编号6)(3T-EGFR-EX19-No18-F1)

[0424] 5'-agcaacaaaggaaatc-(TAMRA)-3'

[0425] 上述结果如图3所示。图3显示伴随温度上升的荧光强度变化的T_m分析图。图3中，(A)为ex19WT 100%的结果、(B)为ex19mt2 5%的结果、(C)为ex19mt4 5%的结果、(D)为ex19mt6 5%的结果。横轴显示了测定时的温度(°C)，纵轴显示了荧光强度的变化(下文中也称为“荧光变化量”)，单位采用“d荧光强度增加量/dt”(dF/dt)。此外，ex19WT与外显子19用野生型探针的T_m值为68°C左右，ex19mt2、ex19mt4以及ex19mt6和外显子19用突变型(de1)探针的T_m值都低于ex19WT和外显子19用突变型(de1)探针的T_m值的温度，它们分别为51°C、59°C、60°C。

[0426] 如图3(A)所示，针对ex19WT 100%仅在ex19W的T_m值处确认到峰。另一方面，如图3(B)~(D)所示，针对含有野生型质粒和突变型质粒的样品均确认到处于两个T_m值处的峰。即，如图3(B)~(D)所示，在比野生型ex19WT和外显子19用野生型探针的T_m值以及低于该T_m值的温度处均分别确认到峰。这样，使用本实施例的F引物、R引物以及外显子19用探针的话，即使在野生型和突变型的多态性混合存在的情况下，也能够将野生型和突变型区别开，检测出外显子19的多态性。

[0427] 实施例5

[0428] 该实施例中，在野生型质粒和突变型质粒的共存下，进行T_m分析，检测EGFR基因的EGFR858多态性。Pacific Blue的检测波长为445~480nm，BODIPY FL的检测波长为520~555nm，TAMRA的检测波长为585~700nm。

[0429] 实施例5-1

[0430] 制备实施例1的3种样品(L858WT 100%、L858R 5%以及L858R10%)。每1μL上述样品中含有250个拷贝的质粒。

[0431] 针对50μL下述表14的PCR反应液，使用全自动SNPs检测装置(商品名i-densy(商标)IS-5310, ARKRAY公司制造)进行PCR和T_m分析。上述PCR是：在95°C处理1分钟后，以95°C 1秒以及60°C 30秒作为一个循环重复50个循环，然后95°C处理1秒，40°C处理60秒。接下来，以1°C/3秒的温度上升速度，将上述反应液从40°C加热至75°C，在各探针的荧光色素对应的检测波长处，测定伴随时间的荧光强度变化，进行T_m分析。

[0432] [表14]

[0433] (PCR反应液组成：单位μL)

	蒸馏水	31.06
	0.94U/ μ L Taq 聚合酶	2
	10w/v% NaN_3	0.23
	100mmol/L MgCl_2	0.75
	1mol/L KCl	1.25
	1mol/L Tris-HCl (pH8.6)	1.25
	2.5mmol/L dNTP	4
	20w/v% BSA	0.5
	80w/v% 甘油	1.56
[0434]	100 μ mol/L 外显子 19 用 F 引物	0.5
	100 μ mol/L 外显子 19 用 R 引物	1
	100 μ mol/L EGFR858 用 F 引物	0.5
	100 μ mol/L EGFR858 用 R 引物	0.25
	100 μ mol/L EGFR790 用 F 引物	0.5
	100 μ mol/L EGFR790 用 R 引物	0.25
	100 μ mol/L EGFR858 用探针	0.1
	100 μ mol/L 外显子 19 用探针	0.2
	100 μ mol/L EGFR790 用探针	0.1
	样品	4
	总计	50 μ L

[0435] 上述F引物以及R引物的序列如下所示。

[0436] (EGFR858用引物)

[0437] F引物(序列编号15)(EGFR-L858R-F2)

[0438] 5'-aggaacgtactggtgaaaacaccgc-3'

[0439] R引物(序列编号17)(EGFR-L858R-R1)

[0440] 5'-gcctccttctgcatggtattctttctc-3'

[0441] (外显子19用引物)

[0442] F引物(序列编号19)(EGFR-EX19-F2)

[0443] 5'-tctctctgtcataggactc-3'

[0444] R引物(序列编号20)(EGFR-EX19-R1)

[0445] 5'-gaaactcacatcgaggatttc-3'

[0446] (EGFR790用引物)

[0447] F引物(序列编号25)(EGFR-T790M-F2)

[0448] 5'-tccaggaagcctacgtgatggccag-3'

[0449] R引物(序列编号26)(EGFR-T790M-R1)

[0450] 5'-ccaatattgtctttgtgttcccggacatagtc-3'

[0451] 使用经Pacific Blue(代替TAMRA)标记的与上述实施例1序列相同的EGFR858用突变型探针(序列编号7)作为上述EGFR858用探针。使用上述实施例3的外显子19用野生型探针(序列编号5),作为上述外显子19用探针。此外,使用下述序列的探针作为上述EGFR790用探针。下述EGFR790用突变型探针是与EGFR790突变型的EGFR基因的正义链中的检测序列强杂交的探针,上述序列中,下划线的碱基为与EGFR790突变型互补的碱基。上述EGFR790用突变型探针的3'末端被荧光色素TAMRA标记。

[0452] EGFR858用突变型探针(序列编号7)(3PB-EGFR-858-R2)

[0453] 5'-ttggcccgc^{ccc}aaaatc-(Pacific Blue)-3'

[0454] 外显子19用野生型探针(序列编号5)(5FL-EGFR-EX19-F2)

[0455] 5'-(BODIPY FL)-cccgtcgctatcaaggaattaagagaagc-3'

[0456] EGFR790用突变型探针(序列编号23)(3T-EGFR-790M-mt-R3)

[0457] 5'-tgagctgcatgatgaggtgcac-(TAMRA)-3'

[0458] 上述结果如图4所示。图4是显示伴随温度上升的荧光强度变化的T_m分析图。图4中,(A)为L858WT 100%的结果、(B)为L858R5%的结果、(C)为L858R 10%的结果,它们分别是EGFR858用突变型探针的Pacific Blue的检测结果。横轴显示了测定时的温度(°C),纵轴显示了荧光强度的变化(下文中也称为“荧光变化量”),单位采用“d荧光强度增加量/dt”(dF/dt)。此外,L858WT与EGFR858突变型探针的T_m值为51°C左右,L858R与EGFR858突变型探针的T_m值为61°C左右。

[0459] 如图4(A)所示,针对L858WT 100%仅能在L858WT的T_m值处确认到峰。另一方面,如图4(C)所示,含有10%的突变型质粒的L858R10%在L858WT的T_m值以及L858R的T_m值二者处均确认到峰。此外,如图4(B)所示,针对突变型质粒含有量降低至5%的L858R 5%,在L858WT的T_m值以及L858R的T_m值二者处均确认到峰。

[0460] 实施例5-2

[0461] 该实施例中,使用以下3种样品作为所述样品,除检测波长为520~555nm以外,按照与上述实施例5-1相同的方式进行PCR以及T_m分析,检测EGFR基因的外显子19多态性。

[0462] 将上述实施例4的上述外显子19野生型质粒(exon19WT)以及外显子19突变型质粒6(exon19mt6)按照下文所示的设定比例进行混合,来制备上述样品。每1μL上述样品中含有250个拷贝的质粒。

[0463] [表15]

样品	各个质粒的混合比例	
	ex19WT	ex19mt6
ex19WT 100%	100%	0%
ex19mt6 5%	95%	5%
ex19mt6 10%	90%	10%

[0465] 上述结果如图5所示。图5是显示伴随温度上升的荧光强度变化的T_m分析图。图5

中,(A)为ex19WT 100%的结果、(B)为ex19mt65%的结果、(C)为ex19mt6 10%的结果,它们分别是外显子19用野生型探针的BODIPY FL检测结果。横轴显示了测定时的温度(°C),纵轴显示了荧光强度的变化(下文中也称为“荧光变化量”),单位采用“d荧光强度增加量/dt”(dF/dt)。此外,ex19WT与外显子19用野生型探针的T_m值为68°C左右,ex19mt6与外显子19用野生型探针的T_m值为59°C左右。

[0466] 如图5(A)所示,针对ex19WT 100%仅在ex19WT的T_m值处确认到峰。另一方面,如图5(C)所示,针对含有10%突变型质粒的ex19mt610%,在ex19WT的T_m值以及ex19mt6的T_m值二者处均确认到峰。此外,如图5(B)所示,针对突变型质粒含有量降低至5%的ex19mt6 5%,在ex19WT的T_m值以及ex19mt6的T_m值二者处均确认到峰。

[0467] 实施例5-3

[0468] 该实施例中,使用以下3种样品作为所述样品,除检测波长为585~700nm以外,按照与所述实施例5-1相同的方式进行PCR以及T_m分析,检测EGFR基因的EGFR790多态性。

[0469] 作为上述野生型质粒和突变型质粒,可以制备EGFR790野生型质粒(T790WT)和EGFR790突变型质粒(T790M)。上述EGFR790野生型质粒(T790WT)中,插入序列编号21的第197位~第496位的寡核苷酸作为EGFR基因的部分序列,其中序列编号21的第347位碱基(y)为胞嘧啶(c)。上述EGFR790突变型质粒(T790M)中插入序列编号21的第197位~第496位的寡核苷酸作为EGFR基因的部分序列,其中序列编号21的第347位碱基(y)为胸腺嘧啶(t)。将这些质粒按照如下设定的比例进行混合,制备了3种样品,每1μL上述样品含有250个拷贝的质粒。

[0470] [表16]

样品	各质粒的混合比例	
	T790WT	T790M
[0471] T790WT 100%	100%	0%
T790M 5%	95%	5%
T790M 10%	90%	10%

[0472] 上述结果如图6所示。图6是显示伴随温度上升的荧光强度变化的T_m分析图。图6中,(A)为L790WT 100%的结果、(B)为T790M5%的结果、(C)为T790M 10%的结果,它们分别是EGFR790用突变型探针的TAMRA检测结果。横轴显示了测定时的温度(°C),纵轴显示了荧光强度的变化(下文中也称为“荧光变化量”),单位采用“d荧光强度增加量/dt”(dF/dt)。此外,T790WT与EGFR790用突变型探针的T_m值为60°C左右,T790M与EGFR790用突变型探针的T_m值为66°C左右。

[0473] 如图6(A)所示,针对T790WT 100%仅在T790WT的T_m值处确认到峰。另一方面,如图6(C)所示,针对含有10%突变型质粒的T790M10%,在T790WT的T_m值以及T790M的T_m值二者处均确认到峰。此外,如图6(B)所示,针对突变型质粒含有量降低至5%的T790M 5%,在T790WT的T_m值以及T790M的T_m值二者处均确认到峰。

[0474] 比较例1

[0475] 该比较例中,除了使用下述EGFR858用野生型探针作为上述EGFR858用探针之外,按照与上述实施例2相同的方式,检测EGFR基因的EGFR858的多态性。

[0476] 下述EGFR858用野生型探针与EGFR858野生型的EGFR858基因的正义链中的检测序列强杂交,上述序列中,下划线的碱基为与EGFR858野生型互补的碱基。上述EGFR858用野生型探针的5'末端被荧光色素Pacific Blue标记。

[0477] EGFR858用野生型探针(序列编号27)(5PB-EGFR858861WT-R1)

[0478] 5'-(Pacific Blue)-ccagcagtttgccagc--3'

[0479] 上述结果如图7所示。图7是显示伴随温度上升的荧光强度变化的T_m分析图。图7中,(A)为EGFR-L858R(WT)-F(序列编号32)、(B)为EGFR-L858R(MT)-F(序列编号33)、(C)为EGFR-L858R(WT)-F(序列编号32)与EGFR-L858R(MT)-F(序列编号33)按1:1比例混合的样品的结果。横轴显示了测定时的温度(°C),纵轴显示了荧光强度的变化(下文中也称为“荧光变化量”),单位采用“d荧光强度增加量/dt”(dF/dt)。

[0480] 如图7(A)所示,针对L858WT 100%,仅在68°C处确认到峰;如图7(B)所示,针对L858R 100%,仅在71°C确认到峰。但是,两峰的温度差为3°C,该差值较小。此外,如图7(C)所示,针对EGFR-L858R(WT)-F(序列编号32)与EGFR-L858R(MT)-F(序列编号33)的混合样品,在71°C出现L858WT与L858R的峰的重叠,无法将两者分别检测出来。这样,由于EGFR858野生型的检测峰和EGFR858突变型的检测峰接近,例如,在野生型和突变型混合存在的情况下,很难准确地将其检测出来。

[0481] 比较例2

[0482] 该比较例中,使用了4种样品,使用下述外显子19用野生型探针作为上述外显子19用探针,除检测波长为520~555nm以外,按照与实施例3相同的方式,检测EGFR基因的外显子19的多态性。此外,为制备上述样品,调节实施例3的寡核苷酸1、2、4以及6至5μmol/L,将寡核苷酸1单独作为样品1,寡核苷酸1与寡核苷酸2、4或6按照体积比5:1进行混合,制备得到样品2、样品4以及样品6。

[0483] 下述外显子19用野生型探针,与外显子19野生型的EGFR基因的反义链中的检测序列强杂交。上述序列中,下划线的碱基为与外显子19野生型互补的碱基。上述外显子19用野生型探针的5'末端被荧光色素BODDIPY FL标记。

[0484] 外显子19用野生型探针(序列编号28)(5FL-EGFR-EX19-WT-F1)

[0485] 5'-(BODDIPY FL)-caaggaat_{taagagaagcaacatctccg}-3'

[0486] 上述结果如图8所示。图8是显示伴随温度上升的荧光强度变化的T_m分析图。图8包括使用上述外显子19用野生型探针的结果,其中(A)为样品1、(B)为样品2、(C)为样品4、(D)为样品6的检测结果。横轴显示了测定时的温度(°C),纵轴显示了荧光强度的变化(下文中也称为“荧光变化量”),单位采用“d荧光强度增加量/dt”(dF/dt)。而且,寡核苷酸1与外显子19用野生型探针的T_m值为71°C左右,寡核苷酸2与外显子19用野生型探针的T_m值为71°C左右,寡核苷酸4与外显子19用野生型探针的T_m值为49°C左右,寡核苷酸6与外显子19用野生型探针的T_m值为71°C左右。

[0487] 如图8(A)所示,针对仅含有野生型寡核苷酸1的样品1,仅在寡核苷酸1的T_m值处确认到峰。此外,如图8(C)所示,针对含有野生型寡核苷酸1和突变型寡核苷酸4的样品4,在野生型寡核苷酸1的T_m值和突变型寡核苷酸4的T_m值二者处均确认到峰。但是,如图8(B)以及(D)所示,针对含有野生型寡核苷酸1和突变型寡核苷酸2或6的样品2和6,虽然在野生型寡核苷酸1的T_m值处确认到峰,但针对各突变型寡核苷酸的T_m值均未确认到峰。

[0488] 实施例6

[0489] 本实施例中,除了使用下表17中示出的探针、分别针对下述野生型人工核酸和突变型人工核酸进行T_m分析之外,按照与实施例2相同的方式,检测EGFR基因的EGFR858多态性。而且,下表17中,序列编号71及序列编号87所示的探针并非对应本发明探针的探针。

[0490] 制备与序列编号1中第217位~第306位同源的EGFR858野生型人工核酸(序列编号67:EGFR-L858R(WT)-F90)和EGFR858突变型人工核酸(序列编号68:EGFR-L858R(MT)-F90)。下述两条序列中,下划线的碱基对应序列编号1中的第261位碱基。将各人工核酸制备为5μmol/L,用作为858野生型样品及858突变型样品。

[0491] EGFR-L858R(WT)-F90(序列编号67)

[0492]

actggtgaaaacaccgcagcatgtcaagatcacagat tttgggctggccaaactgctgggtgcggaagagaaagaat
accatgcagaagg

[0493] EGFR-L858R(MT)-F90(序列编号68)

[0494]

actggtgaaaacaccgcagcatgtcaagatcacagat tttgggctggccaaactgctgggtgcggaagagaaagaat
accatgcagaagg

[0495] T_m分析中,针对各探针,测定与上述野生型样品的T_m值和与上述突变型样品的T_m值,计算出差值(ΔT_m)。然后,按照下述评价基准,从该计算出的值,来评价各探针是否可被判别为EGFR858的野生型及突变型。上述结果示于下表17中。

[0496] (评价基准)

[0497] ○: ΔT_m为3℃以上,则可有效判别野生型和突变型

[0498] ×: ΔT_m不到3℃,则不可有效判别野生型和突变型

[0499] [表17]

[0500]

	SEQ ID NO.	名称	序列 (5'→3')	元	结果
比较例	71	3T-EGFR-858-R3	cCgccccaaatctgtgatcttgacatgctgc-(TAMRA)	31	×
实施例	P15-1	3T-EGFR-858-R4	gccCgccccaaatctgtgatcttgacatgc-(TAMRA)	30	○
	P15-2	3T-EGFR-858-R5	gccCgccccaaatctgtgatcttgac-(TAMRA)	26	○
	P15-3	3T-EGFR-858-R6	iggccCgccccaaatctgtgatc-(TAMRA)	23	○
	P15-4	3T-EGFR-858-R7	agcagttggccCgcc-(TAMRA)	16	○
	P15-5	3T-EGFR-858-R8	accagcagttggccCgc-(TAMRA)	19	○
	P16-1	5T-EGFR-858-R9	(TAMRA)-ccCgccccaaatctgtga	18	○
	P16-2	5T-EGFR-858-R10	(TAMRA)-cCgccccaaatctgtgat	18	○
	P16-3	5T-EGFR-858-R11	(TAMRA)-cagttggccCgccccaaatct	22	○
	P16-4	5T-EGFR-858-R12	(TAMRA)-cagcagttggccCgccccaaa	22	○
	P16-5	5T-EGFR-858-R13	(TAMRA)-ccagcagttggccCgccccaaa	23	○
	P16-6	5T-EGFR-858-R14	(TAMRA)-cccagcagttggccCgccccaaa	24	○
	P16-7	5T-EGFR-858-R15	(TAMRA)-caccagcagttggccCgccc	24	○
	P16-8	5T-EGFR-858-R16	(TAMRA)-cgcaccagcagttggccCgccc	24	○
	P16-9	5T-EGFR-858-R17	(TAMRA)-cgcaccagcagttggccCgccc	24	○
P16-10	5T-EGFR-858-R18	(TAMRA)-cttccgaccagcagttggccCgcc	27	○	
实施例	P19	35T-EGFR-858-R21	(TAMRA)-cagcagttggccCgccc-(TAMRA)	18	○
比较例	87	5T-EGFR-858-R20	(TAMRA)-ctttcttccgaccagcagttggccCg	31	×

[0501] 如上表17所示,针对实施例的各探针,对应于野生型样品及突变型样品中的任一种确认到1个峰,与上述突变型样品的 T_m 值也显示出比与上述野生型样品的 T_m 值高 3°C 以上的值($\Delta T_m \geq 3^{\circ}\text{C}$)。另一方面,比较例的探针虽然也对应于野生型样品及突变型样品中的任一种确认到1个峰,但 ΔT_m 不到 3°C 。因此,通过使用实施例的探针,例如,在野生型检测序列与突变型检测序列共存时,能有效判别两者。

[0502] 实施例7

[0503] 本实施例中,除了使用下表18中示出的探针、分别针对下述野生型人工核酸和突变型人工核酸进行 T_m 分析之外,按照与实施例2相同的方式,检测EGFR基因的EGFR858多态性。而且,下表18中,序列编号93所示的探针并非对应本发明探针的探针。

[0504] 制备与序列编号1中第217位~第306位互补的EGFR858野生型人工核酸(序列编号69:EGFR-L858R(WT)-R90)和EGFR858突变型人工核酸(序列编号70:EGFR-L858R(MT)-R90)。下述两条序列中,下划线的碱基对应序列编号1中的第261位碱基。将各人工核酸制备为 $5\mu\text{mol/L}$,用作为858野生型样品及858突变型样品。

[0505] EGFR-L858R(WT)-R90(序列编号69)

[0506]

ccttctgcatggtattctttctcttccgcaccagcagtttgccagcccaaaatctgtgatcttgacatgctgcggtgttttcaccagt

[0507] EGFR-L858R(MT)-R90(序列编号70)

[0508]

ccttctgcatggtattctttctcttccgcaccagcagtttgccagcccaaaatctgtgatcttgacatgctgcggtgttttcaccagt

[0509] T_m 分析中,针对各探针,测定与上述野生型样品的 T_m 值和与上述突变型样品的 T_m 值。然后,按照与上述实施例6相同的方式,对各探针进行评价。上述结果示于下表18中。

[0510] [表18]

[0511]

		SEQ ID NO.	名称	序列(5'→3')	元	结果
实施例	P17-1	89	5T-EGFR-858-F1	(TAMRA)-catgtcaagatcacagattttgggcGggc	29	○
	P17-2	90	5T-EGFR-858-F2	(TAMRA)-caagatcacagattttgggcGggc	24	○
	P17-3	91	5T-EGFR-858-F3	(TAMRA)-cacagattttgggcGggccaaa	22	○
	P17-4	92	5T-EGFR-858-F4	(TAMRA)-cagattttgggcGggccaaa	20	○
比较例		93	5T-EGFR-858-F5	(TAMRA)-cGggccaaacTgctgggtgc	20	×
实施例	P18-1	94	3T-EGFR-858-F6	atcacagattttgggcGggc-(TAMRA)	20	○
	P18-2	95	3T-EGFR-858-F7	atcacagattttgggcGggcc-(TAMRA)	21	○
	P18-3	96	3T-EGFR-858-F8	atttgggcGggccaaac-(TAMRA)	18	○
	P18-4	97	3T-EGFR-858-F9	atttgggcGggccaaacTgc-(TAMRA)	21	○
	P18-5	98	3T-EGFR-858-F10	ggcGggccaaacTgctgggtgc-(TAMRA)	22	○

[0512] 如上表17所示,针对实施例的各探针,对应于野生型样品及突变型样品中的任一种确认到1个峰,与上述突变型样品的 T_m 值也显示出比与上述野生型样品的 T_m 值高 3°C 以上的值($\Delta T_m \geq 3^{\circ}\text{C}$)。另一方面,比较例的探针虽然也对应于野生型样品及突变型样品中的任一种确认到1个峰,但 ΔT_m 不到 3°C 。因此,通过使用实施例的探针,例如,在野生型检测序列与突变型检测序列共存时,能有效判别两者。

[0513] 通过上面的实施例1~7和比较例1~3的结果可以看出,使用这些实施例中的F引

物、R引物以及探针,例如即使在野生型和突变型混合存在的情况下,也能够将野生型和突变型区分开,能检测出EGFR基因的EGFR858多态性、外显子19多态性以及EGFR790多态性。

[0514] 使用本发明的多态性检测方法,通过利用本发明的多态性检测用探针,例如能够简便且以优秀的可信度来判别EGFR基因的多态性。具体地说,例如,即使在目标多态性是野生型的EGFR基因和目标多态性是突变型的EGFR基因共存的情况下,也能简便且以优秀的可信度检测野生型和突变型的多态。而且,本发明的引物,例如,能够特异地扩增含有EGFR基因的多态性的区域。这样,通过本发明能够简便且以优秀的可信度来判别EGFR的多态性,例如,能将检测结果反映于对上述的疾病治疗方法的选择中,因此,本发明对医疗领域来说特别有用。此外,本发明例如不仅适用于医疗领域,同时,还适用于在生物化学等广泛的领域中检测EGFR基因的多态性。

[0515] 本发明可以以其他形式实施,而不偏离本发明的宗旨和必要特征。本申请中公开的具体实施方式在所有方面均被考虑为阐述性的,而非限制性的。本发明的范围由所附权利要求示出,而非由前述说明书示出。权利要求的含义和等同范围内的所有变化均意欲包括在本发明的范围内。

序列表

	<110> 爱科来株式会社	
	<120> EGFR 基因的多态性检测用探针、扩增用引物及其应用	
	<130> TF11032CN	
	<150> JP2010-244643	
	<151> 2010-10-29	
	<160> 98	
	<170> PatentIn version 3.1	
	<210> 1	
	<211> 410	
	<212> DNA	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 1	
[0001]	ctttccattc tttggatcag tagtcactaa cgttccag ccataagtcc tcgacgtgga	60
	gaggctcaga gcctggcatg aacatgaccc tgaattcgga tgcagagctt ctccccatga	120
	tgatctgtcc ctacagcag ggtcttctct gtttcagggc atgaactact tggaggaccg	180
	tcgcttggtg caccgcgacc tggcagccag gaacgtactg gtgaaaacac cgcagcatgt	240
	caagatcaca gattttgggc kggccaaacd gctgggtgcg gaagagaaag aataccatgc	300
	agaaggagge aaagtaagga ggtggcttta ggtcagccag cattttcctg acaccaggga	360
	ccaggctgcc ttcccactag ctgtattggt taacacatgc aggggaggat	410
	<210> 2	
	<211> 287	
	<212> DNA	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 2	
	tcactgggca gcatgtggca ccatctcaca attgccagtt aacgtcttcc ttctctctct	60
	gtcataggga ctctggatcc cagaaggtga gaaagttaaa attcccgtcg ctatcaagga	120
	attaagagaa gcaacatctc cgaaagccaa caaggaaatc ctcgatgtga gtttctgctt	180
	tgctgtgtgg gggtcctatgg ctctgaacct caggcccacc tttctcatg tctggcagct	240
	gctctgctct agaccctgct catctccaca tctaaatgt tcacttt	287
	<210> 3	
	<211> 272	
	<212> DNA	
	<213> Homo sapiens	

	<400> 3	
	tcactgggca gcatgtggca ccatctcaca attgccagtt aacgtcttcc ttctctctct	60
	gtcatagggga ctctggatcc cagaaggtga gaaagttaa attcccgtcg ctatcaagga	120
	attaagagaa gcaacaaagg aaatcctcga tgtgagtttc tgctttgctg tgtgggggtc	180
	catggctctg aacctcaggc ccaccttttc tcatgtctgg cagctgctct gctctagacc	240
	ctgctcatct ccacatccta aatgttcaact tt	272
	<210> 4	
	<211> 33	
	<212> DNA	
	<213> 人工	
	<220>	
	<223> 探针	
	<400> 4	
	cccgtcgcta tcaagtaatt aagagaagca aca	33
	<210> 5	
	<211> 29	
	<212> DNA	
	<213> 人工	
[0002]	<220>	
	<223> 探针	
	<400> 5	
	cccgtcgcta tcaaggaatt aagagaagc	29
	<210> 6	
	<211> 16	
	<212> DNA	
	<213> 人工	
	<220>	
	<223> 探针	
	<400> 6	
	agcaacaaag gaaatc	16
	<210> 7	
	<211> 17	
	<212> DNA	
	<213> 人工	
	<220>	
	<223> 探针	
	<400> 7	
	ttggcccgcc caaaatc	17

	<210> 8	
	<211> 17	
	<212> DNA	
	<213> 人工	
	<220>	
	<223> 探针	
	<400> 8	
	ttgccagcc caaaatc	17
	<210> 9	
	<211> 15	
	<212> DNA	
	<213> 人工	
	<220>	
	<223> 探针	
	<400> 9	
	cagtttgccc cgccc	15
[0003]	<210> 10	
	<211> 15	
	<212> DNA	
	<213> 人工	
	<220>	
	<223> 探针	
	<400> 10	
	ctgtttgccc cgccc	15
	<210> 11	
	<211> 15	
	<212> DNA	
	<213> 人工	
	<220>	
	<223> 探针	
	<400> 11	
	ccgtttgccc cgccc	15
	<210> 12	
	<211> 15	
	<212> DNA	
	<213> 人工	
	<220>	
	<223> 探针	

	<400> 12 cagtttgccc agccc	15
	<210> 13 <211> 15 <212> DNA <213> 人工	
	<220> <223> 探针	
	<400> 13 ctgtttgccc agccc	15
	<210> 14 <211> 15 <212> DNA <213> 人工	
	<220> <223> 探针	
	<400> 14 ccgtttgccc agccc	15
[0004]	<210> 15 <211> 25 <212> DNA <213> 人工	
	<220> <223> 引物	
	<400> 15 aggaacgtac tggtagaaaac accgc	25
	<210> 16 <211> 28 <212> DNA <213> 人工	
	<220> <223> 引物	
	<400> 16 ttactttgcc tccttctgca tggtattc	28
	<210> 17 <211> 27 <212> DNA <213> 人工	
	<220>	

	<223> 引物	
	<400> 17	
	gcctccttct gcatggatt ctttctc	27
	<210> 18	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 18	
	gatcccagaa ggtgagaaag	20
	<210> 19	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工	
	<220>	
	<223> 正向引物	
	<400> 19	
[0005]	tctctctgtc atagggactc	20
	<210> 20	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工	
	<220>	
	<223> 反向引物	
	<400> 20	
	gaaactcaca tcgaggattt c	21
	<210> 21	
	<211> 1020	
	<212> DNA	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 21	
	tggccactgt tgctgggcc tctctgtcat ggggaatccc cagatgcacc caggaggggc	60
	cctctcccac tgcattctgtc acttcacagc cctgcgtaaa cgtcctctgtg ctaggtcttt	120
	tgcaggcaca gcttttctc catgagtacg tattttgaaa ctcaagatcg cattcatgcg	180
	tcttcacctg gaaggggtcc atgtgccct ccttctggcc accatgcgaa gccacactga	240
	cgtgcctctc cctccctcca ggaagcctac gtgatggcca gcgtggacaa cccccactg	300

```

tgccgcctgc tgggeatctg cctcacctcc accgtgcagc tcatcaygca gctcatgccc 360
ttcggtgcc tectggacta tgtccgggaa cacaaagaca atattggctc ccagtacctg 420
ctcaactggt gtgtgcagat cgcaaaggta atcaggaag ggagatacgg ggaggggaga 480
taaggagcca ggatcctcac atgcggctctg cgctcctggg atagcaagag tttgcatgg 540
ggatatgtgt gtgcgtgcat gcagcacaca cacattcctt tattttggat tcaatcaagt 600
tgatcttctt gtgcacaaat cagtgcctgt cccatctgca tgtggaaact ctcatcaatc 660
agctaccctt gaagaatttt ctctttattg agtgetcagt gtggtctgat gtctctgttc 720
ttatttctct ggaattcttt gtgaatactg tgggtatttg tagtggagaa ggaatattgc 780
ttccccatt caggacttga taacaaggta agcaagccag gccaaggcca ggaggacca 840
ggtgatagtg gtggagtgga gcaggtgcct tgcaggaggc ccagtgagga ggtgcaagga 900
gctgacagag ggcgcagctg ctgctgctat gtggtgggg ccttggtctaa gtgtccccct 960
ttccacaggc tcgctccaga gccagggcgg ggctgagaga gcagagtggc caggtagccc 1020

```

[0006]

```

<210> 22
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> 探针

<400> 22
tgagctgcrt gatgaggtgc ac 22

<210> 23
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> 探针

<400> 23
tgagctgcat gatgaggtgc ac 22

<210> 24
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> 探针

<400> 24

```

	tgagctgcgt gatgaggtgc ac	22
	<210> 25	
	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> 人工	
	<220>	
	<223> 正向引物	
	<400> 25	
	tccaggaagc ctacgtgatg gccag	25
	<210> 26	
	<211> 32	
	<212> DNA	
	<213> 人工	
	<220>	
	<223> 反向引物	
	<400> 26	
	ccaatattgt ctttgtgttc ccgacatag tc	32
[0007]	<210> 27	
	<211> 17	
	<212> DNA	
	<213> 人工	
	<220>	
	<223> 探针	
	<400> 27	
	ccagcagttt ggccagc	17
	<210> 28	
	<211> 28	
	<212> DNA	
	<213> 人工	
	<220>	
	<223> 探针	
	<400> 28	
	caaggaatta agagaagcaa catctccg	28
	<210> 29	
	<211> 61	
	<212> DNA	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 29	
	cccgtcgcta tcaaggaatt aagagaagca acatctccga aagccaacaa ggaaatcctc	60

	g	61
	<210> 30	
	<211> 33	
	<212> DNA	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 30	
	cccgtcgcta tcaaaacatc tccgaaagcc aac	33
	<210> 31	
	<211> 45	
	<212> DNA	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 31	
	cccgtcgcta tcaagacatc tccgaaagcc aaaaggaaat cctcg	45
	<210> 32	
	<211> 50	
	<212> DNA	
	<213> Homo sapiens	
[0008]	<400> 32	
	caagatcaca gattttgggc tggccaaact gctgggtgcg gaagagaaag	50
	<210> 33	
	<211> 50	
	<212> DNA	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 33	
	caagatcaca gattttgggc gggccaaact gctgggtgcg gaagagaaag	50
	<210> 34	
	<211> 52	
	<212> DNA	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 34	
	cccgtcgcta tcaaggaacc aacatctccg aaagccaaca aggaaatcct cg	52
	<210> 35	
	<211> 46	
	<212> DNA	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 35	
	cccgtcgcta tcaaggaatc tccgaaagcc aacaaggaaa tcctcg	46

	<210> 36	
	<211> 43	
	<212> DNA	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 36	
	cccgtcgcta tcaaggaatc gaaagccaac aaggaaatcc tcg	43
	<210> 37	
	<211> 49	
	<212> DNA	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 37	
	cccgtcgcta tcaaggaacc atctccgaaa gccacaagg aaatcctcg	49
	<210> 38	
	<211> 43	
	<212> DNA	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 38	
	cccgtcgcta tcaaggaacc gaaagccaac aaggaaatcc tcg	43
[0009]	<210> 39	
	<211> 43	
	<212> DNA	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 39	
	cccgtcgcta tcaaggttcc gaaagccaac aaggaaatcc tcg	43
	<210> 40	
	<211> 49	
	<212> DNA	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 40	
	cccgtcgcta tcaaggaatc atctccgaaa gccacaagg aaatcctcg	49
	<210> 41	
	<211> 43	
	<212> DNA	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 41	
	cccgtcgcta tcaaggaatc gaaagccaac aaggaaatcc tcg	43
	<210> 42	
	<211> 43	
	<212> DNA	
	<213> Homo sapiens	

	<400> 42 cccgtcgcta tcaaggaaca gaaagccaac aaggaaatcc tcg	43
	<210> 43 <211> 46 <212> DNA <213> Homo sapiens	
	<400> 43 cccgtcgcta tcaaggtatc tccgaaagcc aacaaggaaa tcctcg	46
	<210> 44 <211> 43 <212> DNA <213> Homo sapiens	
	<400> 44 cccgtcgcta tcaaggttcc gaaagccaac aaggaaatcc tcg	43
	<210> 45 <211> 44 <212> DNA <213> Homo sapiens	
[0010]	<400> 45 cccgtcgcta tcaaaatctc cgaagccaa caaggaaatc ctcg	44
	<210> 46 <211> 46 <212> DNA <213> Homo sapiens	
	<400> 46 cccgtcgcaa ttaagatata tccgaaagcc aacaaggaaa tcctcg	46
	<210> 47 <211> 46 <212> DNA <213> Homo sapiens	
	<400> 47 cccgtcgcta tcaaggaaca accgaaagcc aacaaggaaa tcctcg	46
	<210> 48 <211> 46 <212> DNA <213> Homo sapiens	
	<400> 48 cccgtcgcta tcaaggaatt aagagaagca acaaaggaaa tcctcg	46

	<210> 49		
	<211> 60		
	<212> DNA		
	<213> Homo sapiens		
	<400> 49		
	ttccttggtg gctttcggag atgttgcttc tcttaattcc ttgatagcga cggaatttt	60	
	<210> 50		
	<211> 60		
	<212> DNA		
	<213> Homo sapiens		
	<400> 50		
	tcgaggattt ccttggttgc tttcggagat gttttgatag cgacgggaat ttaactttc	60	
	<210> 51		
	<211> 60		
	<212> DNA		
	<213> Homo sapiens		
	<400> 51		
	tcgaggattt ccttggttgc tttcggagat gtcttgatag cgacgggaat ttaactttc	60	
[0011]	<210> 52		
	<211> 60		
	<212> DNA		
	<213> Homo sapiens		
	<400> 52		
	gatttccttg ttgcttttcg gagatgttgg ttccttgata gcgacgggaa ttttaacttt	60	
	<210> 53		
	<211> 60		
	<212> DNA		
	<213> Homo sapiens		
	<400> 53		
	tcgaggattt ccttggttgc tttcggagat tccttgatag cgacgggaat ttaactttc	60	
	<210> 54		
	<211> 60		
	<212> DNA		
	<213> Homo sapiens		
	<400> 54		
	atcgaggatt tccttggttgc ctttcgattc cttgatagcg acgggaattt taactttctc	60	
	<210> 55		
	<211> 60		
	<212> DNA		

	<213> Homo sapiens	
	<400> 55	
	aggatttcct tgttgcttt cggagatggt tccttgatag cgacgggaat ttaactttc	60
	<210> 56	
	<211> 60	
	<212> DNA	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 56	
	catcgaggat ttccttggtg gctttcggtt ccttgatagc gacgggaatt ttaactttct	60
	<210> 57	
	<211> 60	
	<212> DNA	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 57	
	catcgaggat ttccttggtg gctttcgaa ccttgatagc gacgggaatt ttaactttct	60
	<210> 58	
	<211> 60	
	<212> DNA	
	<213> Homo sapiens	
[0012]	<400> 58	
	ggatttcctt gttggcttc ggagatgatt ccttgatagc gacgggaatt ttaactttct	60
	<210> 59	
	<211> 60	
	<212> DNA	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 59	
	catcgaggat ttccttggtg gctttcgatt ccttgatagc gacgggaatt ttaactttct	60
	<210> 60	
	<211> 60	
	<212> DNA	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 60	
	catcgaggat ttccttggtg gctttctggt ccttgatagc gacgggaatt ttaactttct	60
	<210> 61	
	<211> 60	
	<212> DNA	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 61	
	tcgaggattt ccttggtggt tttcggagat accttgatag cgacgggaat ttaactttc	60

	<210> 62		
	<211> 60		
	<212> DNA		
	<213> Homo sapiens		
	<400> 62		
	acatcgagga tttccttggt ggctttcgga accttgatag cgacgggaat ttaactttc	60	
	<210> 63		
	<211> 60		
	<212> DNA		
	<213> Homo sapiens		
	<400> 63		
	acatcgagga tttccttggt ggctttcgga attttgatag cgacgggaat ttaactttc	60	
	<210> 64		
	<211> 60		
	<212> DNA		
	<213> Homo sapiens		
	<400> 64		
	tcgaggattt ccttggtggc tttcgggat atcttaattg cgacgggaat ttaactttc	60	
[0013]	<210> 65		
	<211> 60		
	<212> DNA		
	<213> Homo sapiens		
	<400> 65		
	tcgaggattt ccttggtggc tttcgggtgt tccttgatag cgacgggaat ttaactttc	60	
	<210> 66		
	<211> 60		
	<212> DNA		
	<213> Homo sapiens		
	<400> 66		
	cgaggatttc ctttggtgct tctcttaatt ccttgatagc gacgggaatt ttaactttct	60	
	<210> 67		
	<211> 90		
	<212> DNA		
	<213> 人工		
	<220>		
	<223> 寡核苷酸		
	<400> 67		
	actggtgaaa acaccgcagc atgtcaagat cacagatttt gggctggcca aactgctggg	60	

	tgcggaagag aaagaatacc atgcagaagg	90
	<210> 68	
	<211> 90	
	<212> DNA	
	<213> 人工	
	<220>	
	<223> 寡核苷酸	
	<400> 68	
	actggtgaaa acaccgcagc atgtcaagat cacagatddd gggcgggcca aactgctggg	60
	tgcggaagag aaagaatacc atgcagaagg	90
	<210> 69	
	<211> 90	
	<212> DNA	
	<213> 人工	
	<220>	
	<223> 寡核苷酸	
	<400> 69	
	ccttctgcat ggtattcttt ctcttcgca cccagcagtt tggccagccc aaaatctgtg	60
[0014]	atcttgacat gctgcggtgt tttcaccagt	90
	<210> 70	
	<211> 90	
	<212> DNA	
	<213> 人工	
	<220>	
	<223> 寡核苷酸	
	<400> 70	
	ccttctgcat ggtattcttt ctcttcgca cccagcagtt tggcccgcc aaaatctgtg	60
	atcttgacat gctgcggtgt tttcaccagt	90
	<210> 71	
	<211> 31	
	<212> DNA	
	<213> 人工	
	<220>	
	<223> 探针	
	<400> 71	
	ccgcccaaaa tctgtgatct tgacatgctg c	31
	<210> 72	

	<211> 30	
	<212> DNA	
	<213> 人工	
	<220>	
	<223> 探针	
	<400> 72	
	gccccccaa aatctgtgat cttgacatgc	30
	<210> 73	
	<211> 26	
	<212> DNA	
	<213> 人工	
	<220>	
	<223> 探针	
	<400> 73	
	gccccccaa aatctgtgat cttgac	26
	<210> 74	
	<211> 23	
	<212> DNA	
	<213> 人工	
[0015]	<220>	
	<223> 探针	
	<400> 74	
	tggccccccc aaaatctgtg atc	23
	<210> 75	
	<211> 16	
	<212> DNA	
	<213> 人工	
	<220>	
	<223> 探针	
	<400> 75	
	agcagtttgg cccgcc	16
	<210> 76	
	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> 人工	
	<220>	
	<223> 探针	
	<400> 76	
	accagcagt ttggcccgc	19

	<210> 77	
	<211> 18	
	<212> DNA	
	<213> 人工	
	<220>	
	<223> 探针	
	<400> 77	
	ccgccc aaa atctgtga	18
	<210> 78	
	<211> 18	
	<212> DNA	
	<213> 人工	
	<220>	
	<223> 探针	
	<400> 78	
	ccgccc aaa tctgtgat	18
	<210> 79	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> 人工	
[0016]	<220>	
	<223> 探针	
	<400> 79	
	cagtttg gcc cgccc aaaat ct	22
	<210> 80	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> 人工	
	<220>	
	<223> 探针	
	<400> 80	
	cagcagtttg gccccc aa aa	22
	<210> 81	
	<211> 23	
	<212> DNA	
	<213> 人工	
	<220>	
	<223> 探针	
	<400> 81	

	ccagcagttt ggcccgccca aaa	23
	<210> 82	
	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> 人工	
	<220>	
	<223> 探针	
	<400> 82	
	cccagcagtt tggcccgcc aaaa	24
	<210> 83	
	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> 人工	
	<220>	
	<223> 探针	
	<400> 83	
	caccagcag ttggcccgc ccaa	24
[0017]	<210> 84	
	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> 人工	
	<220>	
	<223> 探针	
	<400> 84	
	cgaccagc agtttgccc gcc	24
	<210> 85	
	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> 人工	
	<220>	
	<223> 探针	
	<400> 85	
	ccgaccag cagtttgcc cgcc	24
	<210> 86	
	<211> 27	
	<212> DNA	
	<213> 人工	
	<220>	
	<223> 探针	

	<400> 86 cttccgcacc cagcagtttg gcccgcc	27
	<210> 87 <211> 31 <212> DNA <213> 人工	
	<220> <223> 探针	
	<400> 87 ctttctcttc cgcacccagc agtttgccc g	31
	<210> 88 <211> 18 <212> DNA <213> 人工	
	<220> <223> 探针	
	<400> 88 cagcagtttg gcccgccc	18
[0018]	<210> 89 <211> 29 <212> DNA <213> 人工	
	<220> <223> 探针	
	<400> 89 catgtcaaga tcacagattt tggcgggc	29
	<210> 90 <211> 24 <212> DNA <213> 人工	
	<220> <223> 探针	
	<400> 90 caagatcaca gattttgggc gggc	24
	<210> 91 <211> 22 <212> DNA <213> 人工	

	<220>		
	<223>	探针	
	<400>	91	
		cacagatttt gggcgggcca aa	22
	<210>	92	
	<211>	20	
	<212>	DNA	
	<213>	人工	
	<220>		
	<223>	探针	
	<400>	92	
		cagattttgg gcgggcaaaa	20
	<210>	93	
	<211>	20	
	<212>	DNA	
	<213>	人工	
	<220>		
	<223>	探针	
[0019]	<400>	93	
		cgggcaaac tgctgggtgc	20
	<210>	94	
	<211>	20	
	<212>	DNA	
	<213>	人工	
	<220>		
	<223>	探针	
	<400>	94	
		atcacagatt ttgggcgggc	20
	<210>	95	
	<211>	21	
	<212>	DNA	
	<213>	人工	
	<220>		
	<223>	探针	
	<400>	95	
		atcacagatt ttgggcgggc c	21
	<210>	96	
	<211>	18	
	<212>	DNA	

	<213> 人工	
	<220>	
	<223> 探针	
	<400> 96	
	at t t t t g g g c g g c c a a a c	18
	<210> 97	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工	
[0020]	<220>	
	<223> 探针	
	<400> 97	
	at t t t t g g g c g g c c a a a c t g c	21
	<210> 98	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> 人工	
	<220>	
	<223> 探针	
	<400> 98	
	g g c g g g c c a a a c t g c t g g g t g c	22

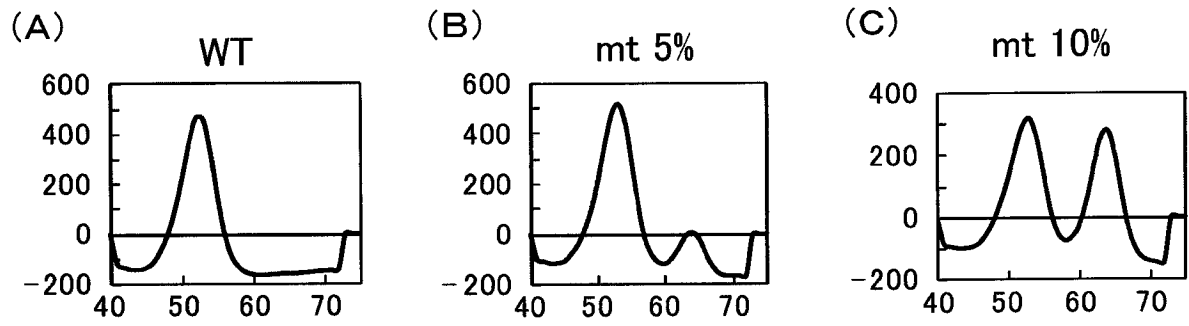


图1

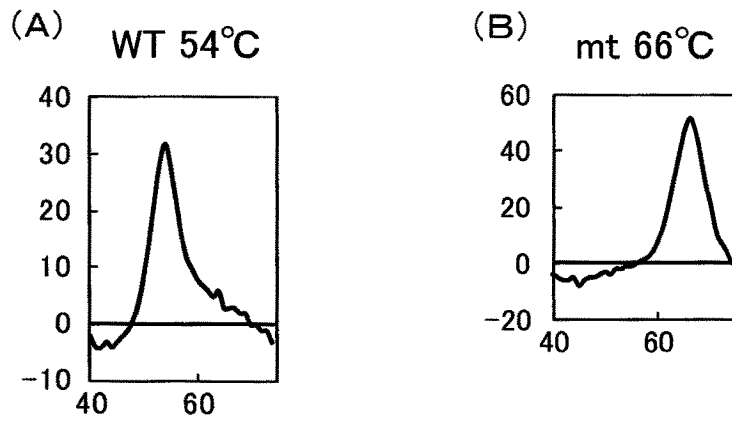


图2

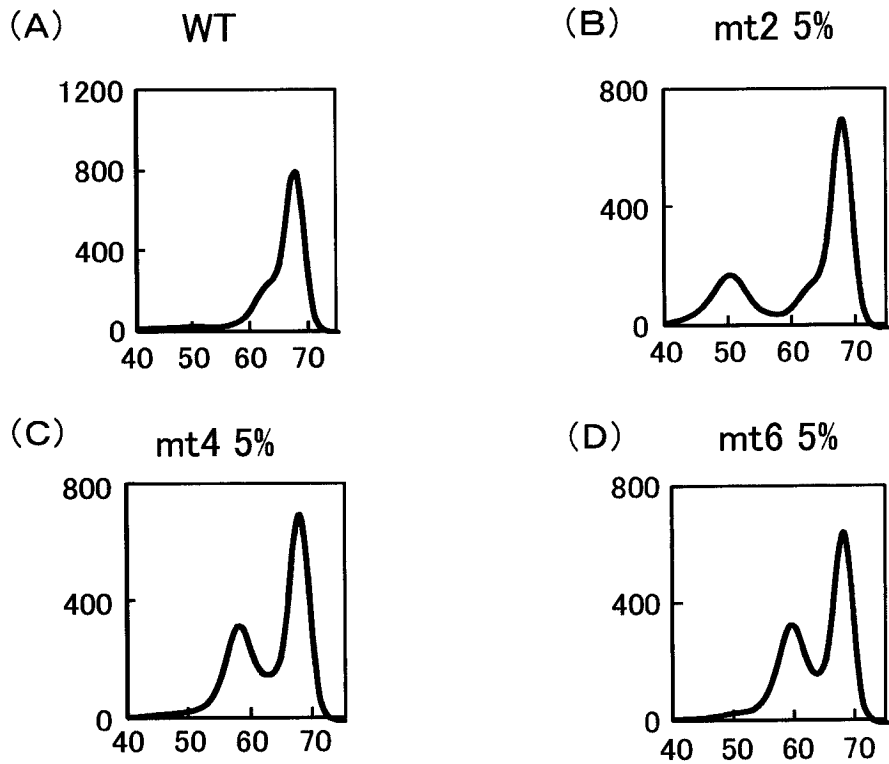


图3

L858R

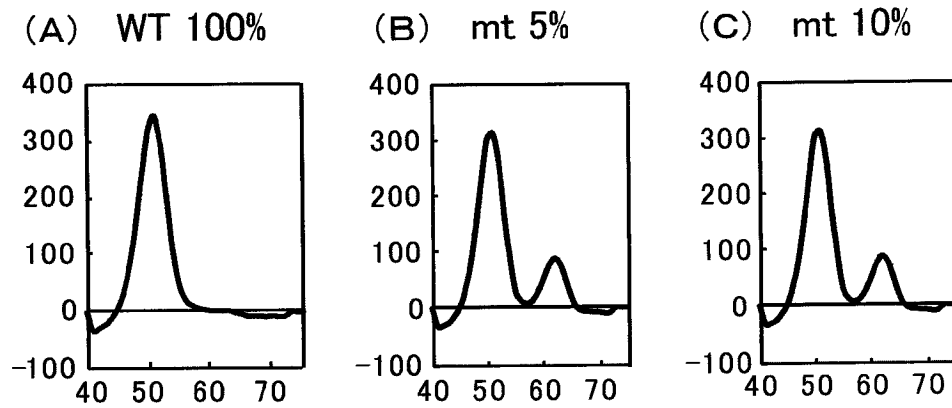


图4

缺失

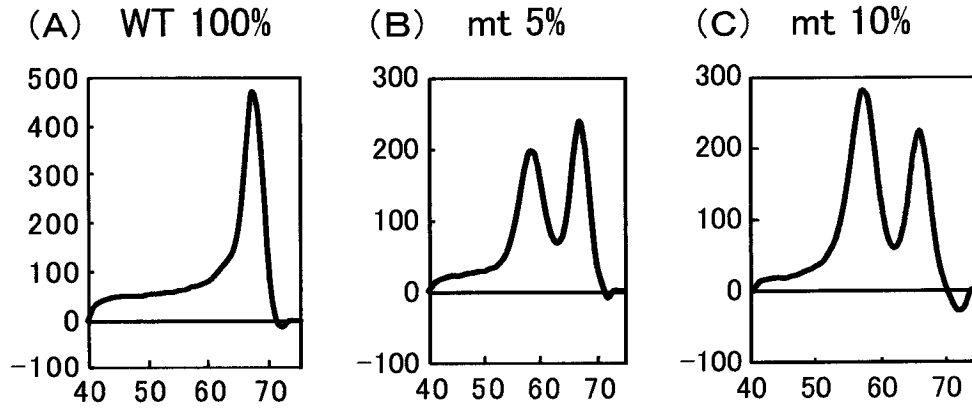


图5

T790M

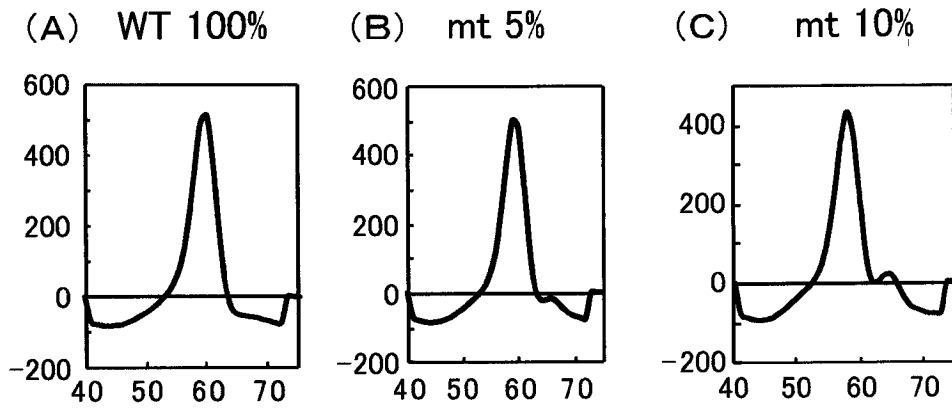


图6

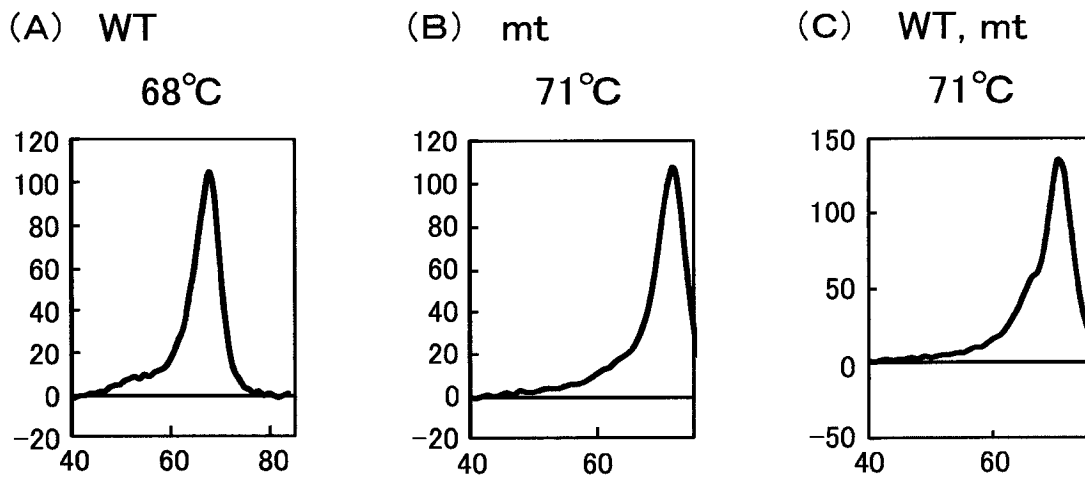
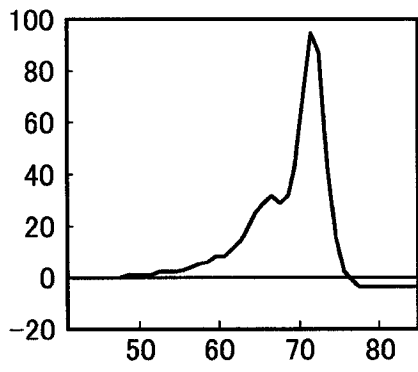
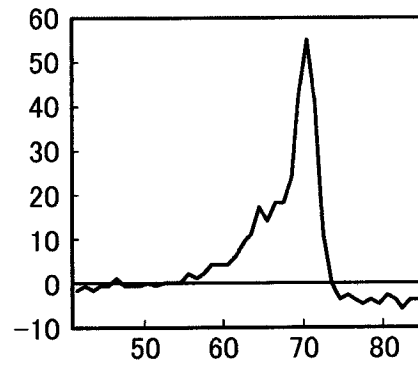


图7

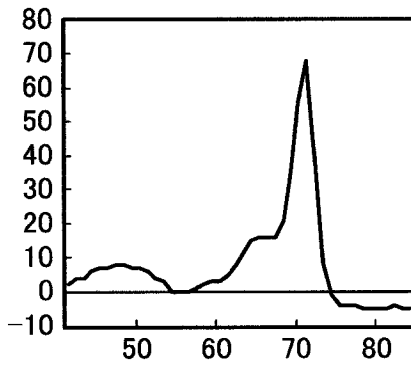
(A)



(B)



(C)



(D)

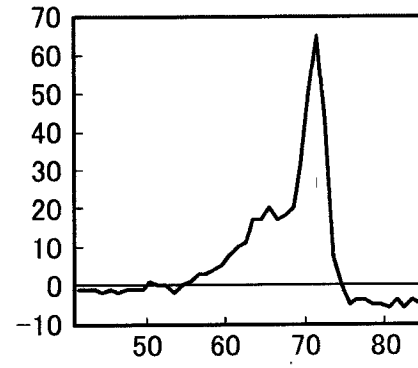


图8

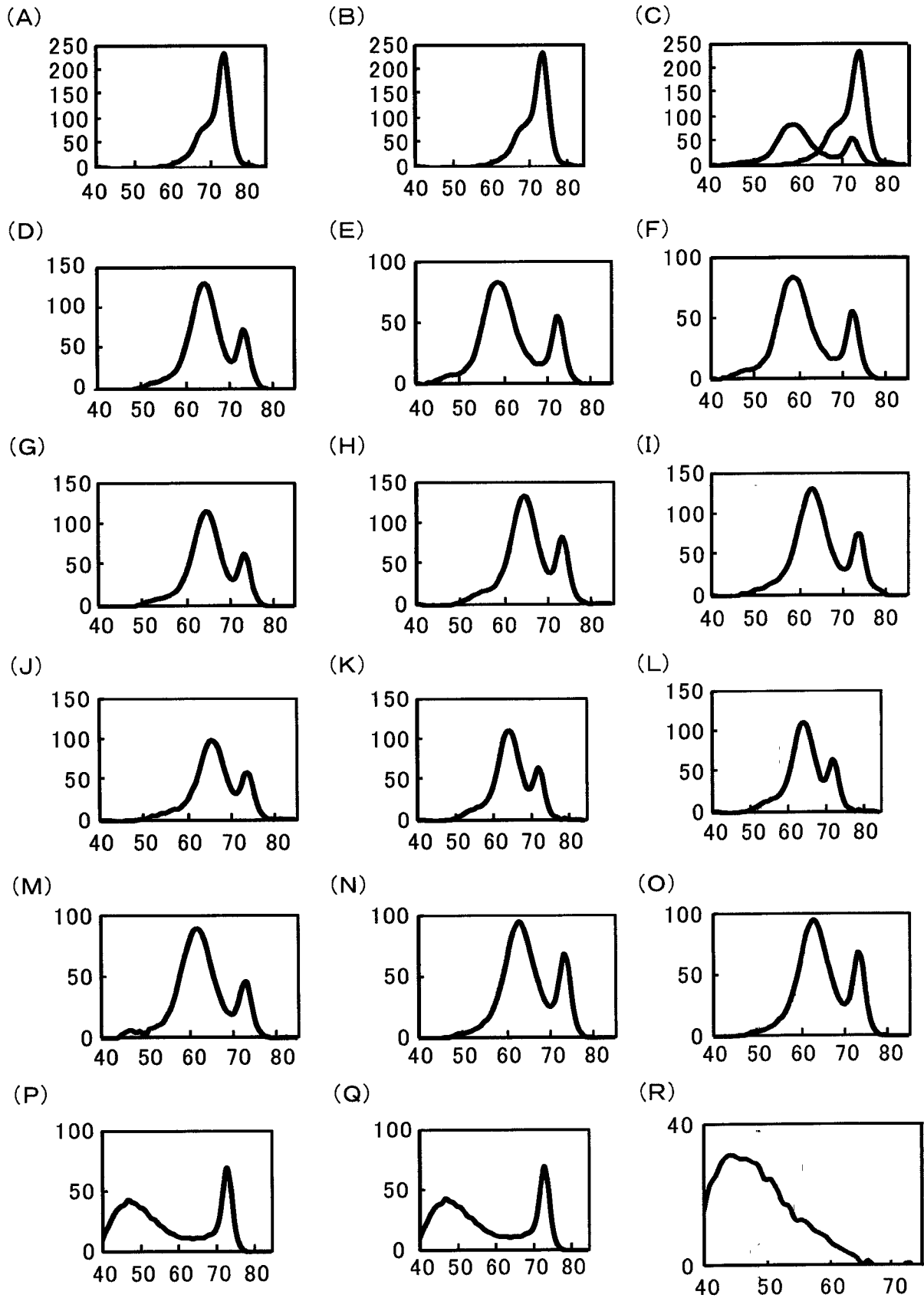


图9

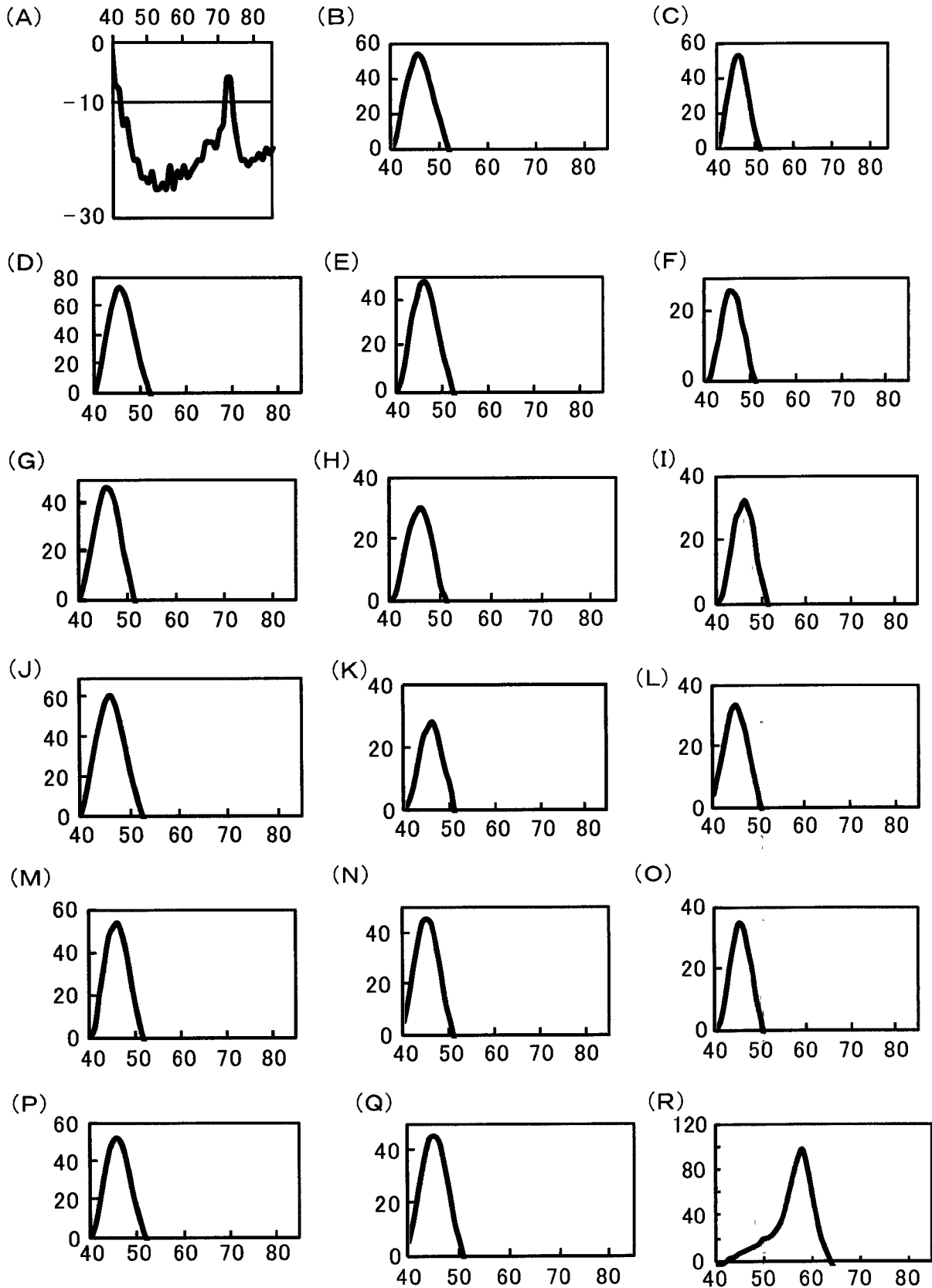


图10

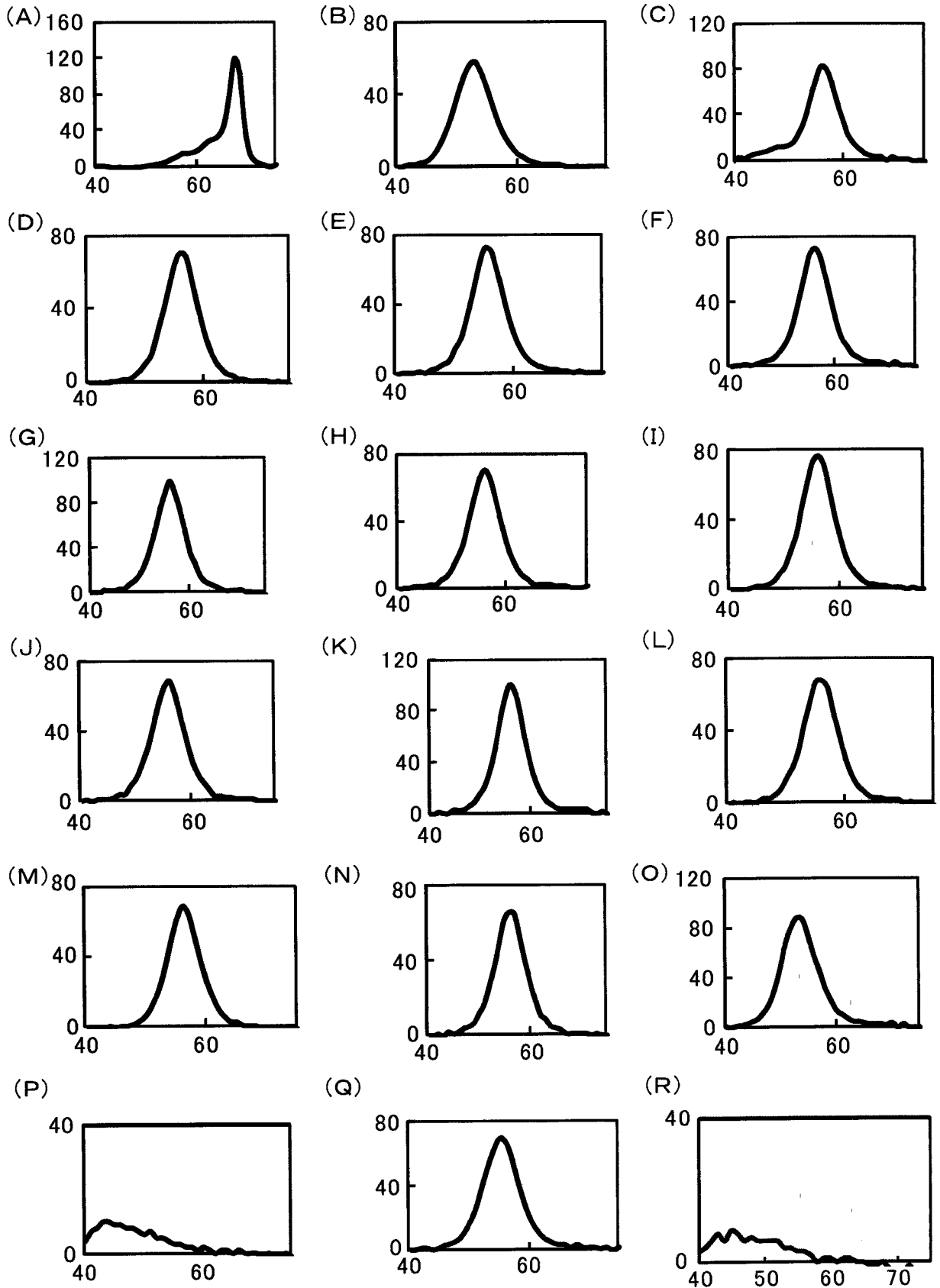


图11

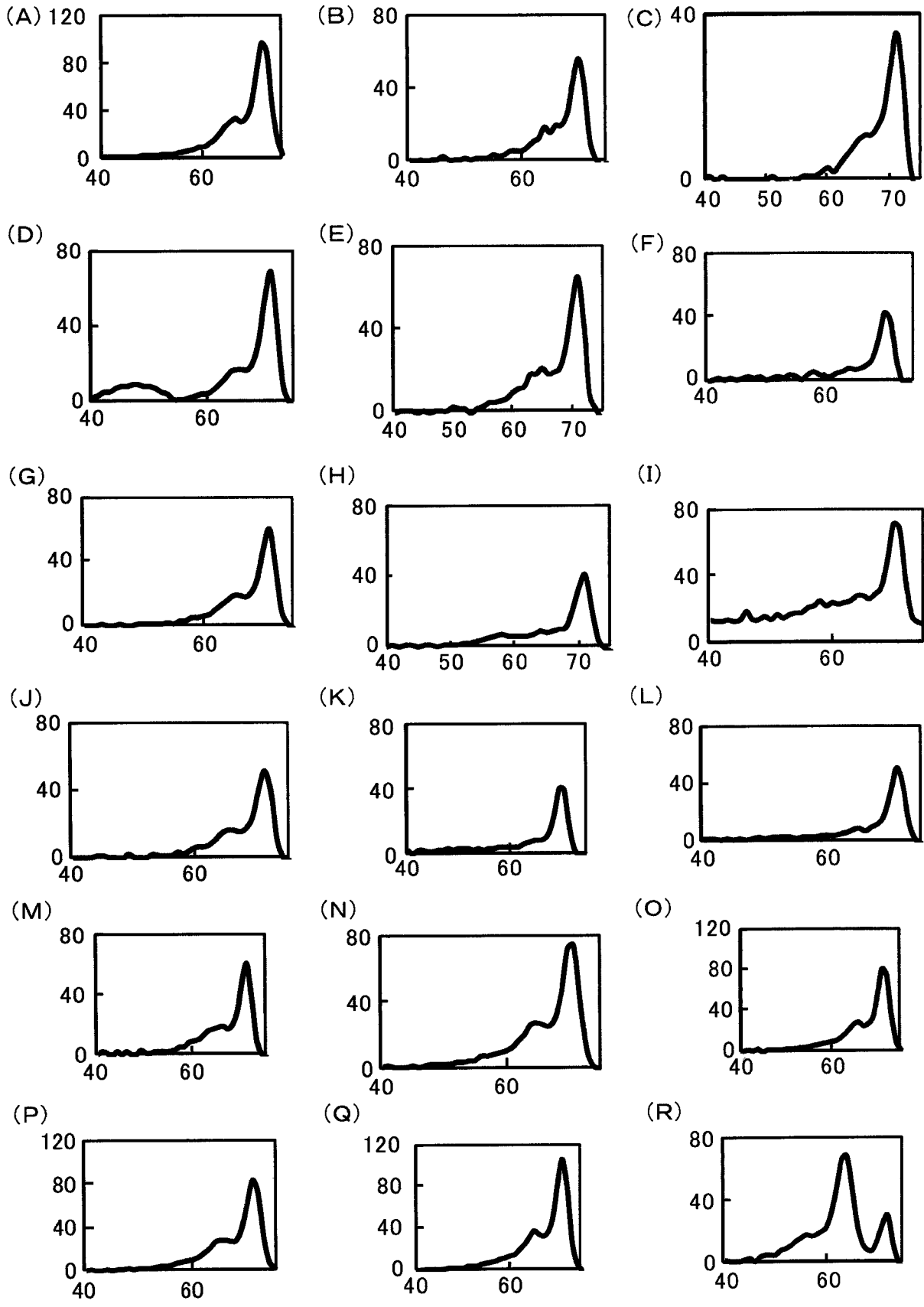


图12