

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.  
C12Q 1/68 (2006.01)



## [12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200580026512.4

[43] 公开日 2009年5月13日

[11] 公开号 CN 101432437A

[22] 申请日 2005.6.6

[21] 申请号 200580026512.4

[30] 优先权

[32] 2004.6.4 [33] US [31] 60/577,155

[86] 国际申请 PCT/US2005/019616 2005.6.6

[87] 国际公布 WO2005/118875 英 2005.12.15

[85] 进入国家阶段日期 2007.2.5

[71] 申请人 维里德克斯有限责任公司

地址 美国新泽西州

[72] 发明人 D·阿特金斯 J·巴库斯

R·贝利 S·洛森 R·怀特

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司  
代理人 李波 梁谋

权利要求书 5 页 说明书 28 页 序列表 15 页  
附图 1 页

[54] 发明名称

诊断或预测乳腺癌的进程

[57] 摘要

诊断乳腺癌的存在或预测乳腺癌的进程的方法，包括测量包含组织特异性基因和非组织特异性基因的标志基因的组合在源自患者的细胞或组织样品中的表达。在本发明的一个方面，基因是乳腺珠蛋白和 CK19。提供了试剂盒、核酸引物和探针以及对照。

1. 诊断乳腺癌的存在或预测乳腺癌的进程的方法，包括测量包含至少一种组织特异性基因和至少一种非组织特异性基因的标志基因的组合在源自患者的细胞或组织样品中的表达。

2. 根据权利要求1的方法，其中组织特异性基因选自：乳腺珠蛋白 (SEQ ID NO:1), PIP (SEQ ID NO: 3), B305D (SEQ ID NO: 4), B726 (SEQ ID NO: 5), GABA (SEQ ID NO: 6)和 PDEF (SEQ ID NO: 7)。

3. 根据权利要求1的方法，其中组织特异性基因是乳腺珠蛋白 (SEQ ID NO:1)。

4. 根据权利要求1的方法，其中非组织特异性基因编码与上皮细胞特异性地相关的蛋白。

5. 根据权利要求4的方法，其中基因选自：CK19 (SEQ ID NO: 2), 腔蛋白聚糖，含硒蛋白质 P, 结缔组织生长因子, EPCAM, E-钙粘着蛋白,和胶原, IV型, $\alpha$ -2。

6. 根据权利要求5的方法，其中基因是 CK19 (SEQ ID NO: 2)。

7. 根据权利要求1的方法，其中基因是乳腺珠蛋白 (SEQ ID NO: 1) 和 CK19 (SEQ ID NO: 2)。

8. 根据权利要求7的方法，还包括对照反应，其测量在样品中组成型表达的基因的表达。

9. 根据权利要求8的方法，其中基因是 PBGD (SEQ ID NO: 8)。

10. 根据权利要求1的方法，其用于鉴别具有转移风险的患者。

11. 权利要求1的方法，其用于检测转移。

12. 权利要求8的方法，其用于检测乳腺癌转移。

13. 权利要求1的方法，其中在手术操作的过程中进行所有步骤。

14. 根据权利要求13的方法，其中通过进行包含下述步骤的手术中的分子诊断测定而测量表达：从患者得到淋巴结组织样品；通过核酸扩增和检测而分析样品；和确定是否存在一种以上超过截止值的标志物。

15. 权利要求14的方法，其中通过聚合酶链式反应(PCR)进行核酸扩增和检测。

16. 根据权利要求3的方法，其中使用选自下组的寡核苷酸引物和探针检测乳腺珠蛋白表达：

AGTTGCTGATGGTCCTCATGC (SEQ ID NO:9),  
ATCACATTCTCCAATAAGGGGCA (SEQ ID NO:10),  
Fam -CCCTCTCCCAGCACTGCTACGCA- BHQ1-TT (SEQ ID NO:11);  
CAAACGGATGAAACTCTGAGCAATGTTGA (SEQ ID NO:18),  
TCTGTGAGCCAAAGGTCTTGCAGA (SEQ ID NO:19),  
TGTTTATGCAATTAATATATGACAGCAGTCTTTGT (SEQ ID NO:20); 和  
CGGATGAAACTCTGAGCAATGTTGA (SEQ ID NO: 42),  
GAGCCAAAGGTCTTGCAGAAAGT (SEQ ID NO: 43),  
TGTTTATGCAATTAATATATGACAGCAGTCTTTGTG (SEQ ID NO: 44)。

17. 根据权利要求 16 的方法，其中引物/探针组是：

AGTTGCTGATGGTCCTCATGC (SEQ ID NO:9),  
ATCACATTCTCCAATAAGGGGCA (SEQ ID NO:10),  
Fam -CCCTCTCCCAGCACTGCTACGCA- BHQ1-TT (SEQ ID NO:11)。

18. 根据权利要求 6 的方法，其中使用选自下组的引物和探针检测  
CK19 表达：

(SEQ ID NO: 12), (SEQ ID NO: 13), (SEQ ID NO: 49);  
(SEQ ID NO: 51), (SEQ ID NO: 13), (SEQ ID NO: 49);  
(SEQ ID NO: 12), (SEQ ID NO: 53), (SEQ ID NO: 49);  
(SEQ ID NO: 51), (SEQ ID NO: 53), (SEQ ID NO: 49);  
(SEQ ID NO: 47), (SEQ ID NO: 53), (SEQ ID NO: 14);  
(SEQ ID NO: 12), (SEQ ID NO: 53), (SEQ ID NO: 14);  
(SEQ ID NO: 51), (SEQ ID NO: 53), (SEQ ID NO: 14);  
(SEQ ID NO: 52), (SEQ ID NO: 53), (SEQ ID NO: 14);  
(SEQ ID NO: 12), (SEQ ID NO: 13), (SEQ ID NO: 14);  
(SEQ ID NO: 51), (SEQ ID NO: 13), (SEQ ID NO: 14); 和  
(SEQ ID NO: 52), (SEQ ID NO: 13), (SEQ ID NO: 14)。

19. 根据权利要求 18 的方法，其中引物和探针选自：

(SEQ ID NO: 12), (SEQ ID NO: 53), (SEQ ID NO: 14);  
(SEQ ID NO: 51), (SEQ ID NO: 53), (SEQ ID NO: 14);  
(SEQ ID NO: 52), (SEQ ID NO: 53), (SEQ ID NO: 14);  
(SEQ ID NO: 12), (SEQ ID NO: 13), (SEQ ID NO: 14);  
(SEQ ID NO: 51), (SEQ ID NO: 13), (SEQ ID NO: 14); 和  
(SEQ ID NO: 52), (SEQ ID NO: 13), (SEQ ID NO: 14)。

20. 根据权利要求 19 的方法，其中引物和探针选自：

(SEQ ID NO: 12), (SEQ ID NO: 53), (SEQ ID NO: 14);  
 (SEQ ID NO: 51), (SEQ ID NO: 53), (SEQ ID NO: 14);  
 (SEQ ID NO: 52), (SEQ ID NO: 53), (SEQ ID NO: 14); 和  
 (SEQ ID NO: 12), (SEQ ID NO: 13), (SEQ ID NO: 14)。

21. 根据权利要求20的方法,其中引物和探针是 (SEQ ID NO: 12),  
 (SEQ ID NO: 13), (SEQ ID NO: 14)。

22. 根据权利要求9的方法,其中引物和探针是(SEQ ID NO: 15),  
 (SEQ ID NO: 16)和(SEQ ID NO: 17)。

23. 组合物,其包含选自下组的核酸引物/探针组:

AGTTGCTGATGGTCCTCATGC (SEQ ID NO:9),  
 ATCACATTCTCCAATAAGGGGCA (SEQ ID NO:10),  
 Fam -CCCTCTCCCAGCACTGCTACGCA- BHQ1-TT (SEQ ID NO:11);  
 CAAACGGATGAAACTCTGAGCAATGTTGA (SEQ ID NO:18),  
 TCTGTGAGCCAAAGGTCTTGCAGA (SEQ ID NO:19),  
 TGTTTATGCAATTAATATATGACAGCAGTCTTTGT (SEQ ID NO:20); 和  
 CGGATGAAACTCTGAGCAATGTTGA (SEQ ID NO: 42),  
 GAGCCAAAGGTCTTGCAGAAAGT (SEQ ID NO: 43), 和  
 TGTTTATGCAATTAATATATGACAGCAGTCTTTGTG (SEQ ID NO: 44)。

24. 权利要求23的组合物,其中引物/探针组是:

AGTTGCTGATGGTCCTCATGC (SEQ ID NO:9),  
 ATCACATTCTCCAATAAGGGGCA (SEQ ID NO:10), 和  
 Fam -CCCTCTCCCAGCACTGCTACGCA- BHQ1-TT (SEQ ID NO:11)。

25. 组合物,其包含选自下组的核酸引物/探针组:

(SEQ ID NO: 12), (SEQ ID NO: 13), (SEQ ID NO: 49);  
 (SEQ ID NO: 51), (SEQ ID NO: 13), (SEQ ID NO: 49);  
 (SEQ ID NO: 12), (SEQ ID NO: 53), (SEQ ID NO: 49);  
 (SEQ ID NO: 51), (SEQ ID NO: 53), (SEQ ID NO: 49);  
 (SEQ ID NO: 47), (SEQ ID NO: 53), (SEQ ID NO: 14);  
 (SEQ ID NO: 12), (SEQ ID NO: 53), (SEQ ID NO: 14);  
 (SEQ ID NO: 51), (SEQ ID NO: 53), (SEQ ID NO: 14);  
 (SEQ ID NO: 52), (SEQ ID NO: 53), (SEQ ID NO: 14);  
 (SEQ ID NO: 12), (SEQ ID NO: 13), (SEQ ID NO: 14);  
 (SEQ ID NO: 51), (SEQ ID NO: 13), (SEQ ID NO: 14); 和  
 (SEQ ID NO: 52), (SEQ ID NO: 13), (SEQ ID NO: 14)。

**26. 根据权利要求 25 的组合物，其中引物和探针选自**

(SEQ ID NO: 12), (SEQ ID NO: 53), (SEQ ID NO: 14);  
 (SEQ ID NO: 51), (SEQ ID NO: 53), (SEQ ID NO: 14);  
 (SEQ ID NO: 52), (SEQ ID NO: 53), (SEQ ID NO: 14);  
 (SEQ ID NO: 12), (SEQ ID NO: 13), (SEQ ID NO: 14);  
 (SEQ ID NO: 51), (SEQ ID NO: 13), (SEQ ID NO: 14); 和  
 (SEQ ID NO: 52), (SEQ ID NO: 13), (SEQ ID NO: 14)。

**27. 根据权利要求 26 的组合物，其中引物和探针选自**

(SEQ ID NO: 12), (SEQ ID NO: 53), (SEQ ID NO: 14);  
 (SEQ ID NO: 51), (SEQ ID NO: 53), (SEQ ID NO: 14);  
 (SEQ ID NO: 52), (SEQ ID NO: 53), (SEQ ID NO: 14); 和  
 (SEQ ID NO: 12), (SEQ ID NO: 13), (SEQ ID NO: 14)。

**28. 根据权利要求 27 的组合物，其中引物和探针是(SEQ ID NO: 12), (SEQ ID NO: 13), (SEQ ID NO: 14)。**

**29. 组合物，其包含核酸引物/探针组(SEQ ID NO:15), (SEQ ID NO: 16)和(SEQ ID NO: 17)。**

**30. 用于进行权利要求 1 的手术中淋巴结测定的试剂盒，其包含核酸扩增和检测试剂。**

**31. 权利要求 30 的试剂盒，其中所述的试剂包含引物，所述引物具有用于检测选自 SEQ ID NO: 1-8 的一组标志物的存在的序列。**

**32. 权利要求 31 的试剂盒，其中引物/探针组选自：**

AGTTGCTGATGGTCCTCATGC (SEQ ID NO:9),  
 ATCACATTCTCCAATAAGGGGCA (SEQ ID NO:10),  
 Fam -CCCTCTCCCAGCACTGCTACGCA- BHQ1-TT (SEQ ID NO:11);  
 CAAACGGATGAAACTCTGAGCAATGTTGA (SEQ ID NO:18),  
 TCTGTGAGCCAAAGGTCTTGCAGA (SEQ ID NO:19),  
 TGTTTATGCAATTAATATATGACAGCAGTCTTTGT (SEQ ID NO:20); 和  
 CGGATGAAACTCTGAGCAATGTTGA (SEQ ID NO: 42),  
 GAGCCAAAGGTCTTGCAGAAAGT (SEQ ID NO: 43), 和  
 TGTTTATGCAATTAATATATGACAGCAGTCTTTGTG (SEQ ID NO: 44)。

**33. 根据权利要求 32 的方法，其中引物/探针组是：**

AGTTGCTGATGGTCCTCATGC (SEQ ID NO:9),  
ATCACATTCTCCAATAAGGGGCA (SEQ ID NO:10),  
Fam -CCCTCTCCCAGCACTGCTACGCA- BHQ1-TT (SEQ ID NO:11)。

**34. 权利要求 30 的试剂盒，其中引物/探针组选自：**

(SEQ ID NO: 12), (SEQ ID NO: 13), (SEQ ID NO: 49);  
(SEQ ID NO: 51), (SEQ ID NO: 13), (SEQ ID NO: 49);  
(SEQ ID NO: 12), (SEQ ID NO: 53), (SEQ ID NO: 49);  
(SEQ ID NO: 51), (SEQ ID NO: 53), (SEQ ID NO: 49);  
(SEQ ID NO: 47), (SEQ ID NO: 53), (SEQ ID NO: 14);  
(SEQ ID NO: 12), (SEQ ID NO: 53), (SEQ ID NO: 14);  
(SEQ ID NO: 51), (SEQ ID NO: 53), (SEQ ID NO: 14);  
(SEQ ID NO: 52), (SEQ ID NO: 53), (SEQ ID NO: 14);  
(SEQ ID NO: 12), (SEQ ID NO: 13), (SEQ ID NO: 14);  
(SEQ ID NO: 51), (SEQ ID NO: 13), (SEQ ID NO: 14); 和  
(SEQ ID NO: 52), (SEQ ID NO: 13), (SEQ ID NO: 14)。

**35. 根据权利要求 34 的试剂盒，其中引物和探针选自：**

(SEQ ID NO: 12), (SEQ ID NO: 53), (SEQ ID NO: 14);  
(SEQ ID NO: 51), (SEQ ID NO: 53), (SEQ ID NO: 14);  
(SEQ ID NO: 52), (SEQ ID NO: 53), (SEQ ID NO: 14);  
(SEQ ID NO: 12), (SEQ ID NO: 13), (SEQ ID NO: 14);  
(SEQ ID NO: 51), (SEQ ID NO: 13), (SEQ ID NO: 14); 和  
(SEQ ID NO: 52), (SEQ ID NO: 13), (SEQ ID NO: 14)。

**36. 根据权利要求 35 的试剂盒，其中引物和探针选自：**

(SEQ ID NO: 12), (SEQ ID NO: 53), (SEQ ID NO: 14);  
(SEQ ID NO: 51), (SEQ ID NO: 53), (SEQ ID NO: 14);  
(SEQ ID NO: 52), (SEQ ID NO: 53), (SEQ ID NO: 14); 和  
(SEQ ID NO: 12), (SEQ ID NO: 13), (SEQ ID NO: 14)。

**37. 根据权利要求 30 的试剂盒，其中引物和探针是 (SEQ ID NO: 12), (SEQ ID NO: 13), (SEQ ID NO: 14)。**

**38. 根据权利要求 30 的试剂盒，其中引物和探针是 (SEQ ID NO: 15), (SEQ ID NO: 16) 和 (SEQ ID NO: 17)。**

**39. 权利要求 30 的试剂盒，包含 RT-PCR 试剂。**

## 诊断或预测乳腺癌的进程

### 发明领域

本发明涉及分子诊断领域，特别是乳腺癌的分子诊断。

### 背景

淋巴结累及是许多实体瘤的最强预后因子，病理学家和外科医生对淋巴结微转移的检测非常感兴趣。目前的淋巴结评价包含 H&E-染色的组织切片的显微镜检查，且受到 3 个主要限制：(a) 容易错过单个的肿瘤细胞或细胞的小病灶；(b) 不能迅速地得到结果，意味着哨淋巴结 (SLN) 操作中的任何阳性结果需要去除腋窝淋巴结的二次手术，和 (c) 仅仅研究 1 个或 2 个组织切片，因而每个淋巴结的绝大部分未被检测。连续切片可以辅助克服取样误差的问题，且免疫组织化学(IHC)可以辅助鉴别单独的肿瘤细胞。但是，这些方法的组合，对于常规分析过于昂贵和耗时，被限于特殊的情况，例如 SLN 检查。

手术判断经常基于手术中的淋巴结的冷冻切片分析；但是，这些方法的灵敏度相对较差，相对于标准的 H&E 病理学，其范围为 50-70%，导致不可接受的二次手术高比例。不具有淋巴结累及的 0 和 I 期乳腺癌患者的 5 年存活率分别是 92% 和 87%。另一方面，具有淋巴结累及的晚期乳腺癌患者的 5 年存活率显著降低。例如，II 期乳腺癌的存活率仅仅是 75%，III 期是 46%，IV 期是 13%。尽管淋巴结阴性的乳腺癌患者具有提高的存活率，20-30% 组织学上淋巴结阴性的患者会遭受疾病复发。这很可能是由于目前的检测微转移的技术的限制，包括与淋巴结取样和检测单独的肿瘤细胞或小肿瘤病灶的较差灵敏度有关的问题。

除了对乳腺癌淋巴结转移的更精确和灵敏的检测的需要外，还存在对手术边缘的更精确检测的需要，尤其是在手术中的场合。聚合酶链式反应(PCR)是分子生物学领域的有力工具，其可以用于该场合。该技术允许复制/扩增小量的核酸片段，至可以以有意义方式分析的量。而且，随着实时定量 RT-PCR (Q-RT-PCR) 的发展，该技术已经变得更可靠，以及更容易自动化。Q-RT-PCR 不易受到污染，且会提供基因

表达的定量。在手术中的淋巴结测定中，这样的定量可以用于检测微转移。尽管存在它的优点，分子诊断中的 PCR 具有几个限制，使它难以应用于典型的临床诊断场合，尤其是在手术中的场合。

一个这样的限制是，进行 PCR 诊断典型地消耗的时间。典型的 PCR 反应消耗数小时，而不是几分钟。如果要在手术中使用该技术，必须缩短进行 PCR 反应所消耗的时间。而且，尽管 Q-RT-PCR 可以提供定量的结果，迄今为止尚不知道基于这样的技术区分阳性和阴性结果的截止值，也不清楚哪些核酸片段被最好地检测并与微转移的存在相关联。也存在扩增和检测核酸片段的其它方法，且都具有类似的问题。

能克服现存困难的手术中的分子淋巴结测定，会被医学界很好地接受。

细胞角蛋白 19 (也称作角蛋白 19, CK19 和 KRT19) 已经被公认为有用的检测上皮细胞的基因。几种身体区室(包括血液, 骨髓和淋巴结)中的这些细胞的检测, 与几种癌症的转移有关, 包括乳腺癌。CK19 mRNA 的检测, 经常伴有 4 个假基因的存在(1 个在染色体 6 上, 1 个在染色体 4 上, 2 个在染色体 12 上)。这些假基因的序列不具有允许区别剪接的 mRNA 和 DNA 的内含子区, 且与完整的 CK19 mRNA 序列具有最高达 90% 同源性。已经证实, 能区别 CK19 mRNA 和 CK19 DNA, 且也能区别 CK19 mRNA 和 4 个假基因的引物和探针的设计是一项挑战。尽管已经公开了能区别 CK19 mRNA 和 DNA 的引物, 其它研究组已经发现, 这些引物会与 DNA 交叉反应。为了避免与 DNA 的交叉反应性的问题, 许多研究组采用 RNA 纯化方法, 它: (1) 包括 DNA 降解步骤(用 DNA 酶), 或(2) 基于能去除 > 99% 污染 DNA 的方法, 例如 Trizol。

典型地, 不希望要求 DNA 降解步骤或要求采用基于 Trizol 的 RNA 纯化。两种方法都会增加 RNA 制备所需要的时间和复杂性。因而, 这些方法不适用于要求非常容易使用和快速的组合的用途, 例如手术中的用途的情况。在例如这样的情况下, 必须采用可以区别 mRNA 和 DNA 的 CK19 扩增方法。

## 发明简述

本发明是诊断乳腺癌的存在或预测乳腺癌的进程的测定。在一个



实施方案中，该测定诊断微转移。在另一个实施方案中，微转移的检测是在 SLN 中，尤其是在手术过程中。根据已知的方法，外科医生会在手术过程中鉴别 SLN。如下所述，取出和制备 SLN。然后，从 SLN 迅速提取核酸(例如，DNA 和 RNA)。然后，如果存在，扩增并检测指示微转移的标志物。然后，基于这样的标志物的检测结果，外科医生采取行动。

在本发明的另一个方面，标志物是对特定组织特异性的核酸片段和至少一种非组织特异性的标志物。

在本发明的另一个方面，标志物是指示恶性肿瘤的核酸片段。

在本发明的另一个方面，在乳腺癌诊断的情况下，标志物是乳腺珠蛋白(mammaglobin)(SEQ ID NO: 1 和 CK19 (SEQ ID NO: 2)或 PIP (SEQ ID NO: 3)、B305D (特别地，同种型 C, SEQ ID NO: 4)、B726 (SEQ ID NO: 5)、GABA (SEQ ID NO: 6)或 PDEF (SEQ ID NO: 7)的那些。分别见，Watson et al. (1996) *Cancer Res.* 56: 860-865, Hoffman-Fazel et al. (2003) *Anticancer Res.* 23: 917-920, Strausberg et al. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:16899-16903, Zehentner et al. (2002) *Clin. Chem.* 48:1225-1231 (B305D 和 B726), Mehta et al. (1999) *Brain Res. Brain Res. Rev.* 29: 196-217, Feldman et al. (2003) *Cancer Res.* 63:4626-4631,和 Grandchamp et al. (1987) *Eur. J. Biochem.* 162:105-110。

本发明定义了特异性的引物/探针组，其可以最佳地扩增乳腺珠蛋白 RNA，并检测扩增产物。

在本发明的另一个方面，公开了用于 CK19 mRNA 的特异性检测的最佳的引物和探针。

在本发明的另一个方面，通过包括下述步骤的方法检测微转移：从 SLN 得到 RNA；进行对 2 种或多种目标基因特异性的定量 RT-PCR 方法，和检测是否存在超过预定截止值的标志物。截止值可以是绝对值或相对于对照基因的表达的值。

在本发明的另一个方面，所述测定包括 DNA，其编码组成型表达的内部对照基因和用于提供反应质量控制和所有 RNA-相关的测定部分的充足性的标志物。在一个方面，内部对照基因是胆色素原脱氨酶(PBGD, SEQ ID NO: 8)。

在本发明的另一个实施方案中，试剂盒含有用于进行该测定的试

剂。

### 附图简述

图 1 是描述在 95%特异性的各标志物的灵敏度的柱形图。

### 详细描述

提出了癌症诊断和预测的方法。这些方法采用，从细胞或组织（例如淋巴结）提取核酸，和扩增和检测指示乳腺癌的核酸片段(这样的片段在本文中称作"标志物")的方法。

如果要在手术中进行测定，必须快速地扩增和检测指示某些基因的表达的标志物。假如可以在手术中的测定可接受的时间内(即不超过约 35 分钟)进行这样的方法，可以使用任何可靠的、灵敏的和特异性的方法。这包括 PCR 方法，滚环扩增方法(RCA)，连接酶链反应方法(LCR)，链置换扩增方法(SDA)，基于核酸序列的扩增方法(NASBA)，和其它方法。包含的快速分子诊断最优选地是定量 PCR 方法，包括 QRT-PCR。

不论采用的扩增方法是什么，重要的是，对用于进行测定的组织足够地取样。在 SLN 的情况下，这包括合适的切除，和 SLN 的加工，以及从它提取 RNA。一旦得到，重要的是合适地加工淋巴结，以便检测到存在的任何癌细胞。

可以得到许多从组织样品提取核酸的技术。在每种情况下，标准的实践都是耗时的，且是困难的，甚至当使用为该目的设计的可商业上得到的试剂盒时也是如此。典型的可商业上得到的核酸提取试剂盒需要至少 15 分钟来提取核酸。在本发明的方法中，核酸的提取需要小于 8 分钟，优选地小于 6 分钟。这些快速提取方法是美国专利申请系列号 10/427,217 的主题。

完整的 RNA 的成功分离通常包括 4 个步骤：细胞或组织的有效破碎，核蛋白复合物的变性，内源核糖核酸酶(RNA 酶)的灭活，和污染 DNA 和蛋白质的去除。硫氰酸胍(GTC)和 B-巯基乙醇灭活存在于细胞提取物中的核糖核酸酶的破碎和保护性质，使它们成为第一步的优选的试剂。当与表面活性剂例如十二烷基硫酸钠(SDS)组合使用时，会实现核蛋白复合物的破碎，允许 RNA 释放进溶液中，并分离至不含蛋白。

在有高浓度的 GTC 存在下，细胞提取物的稀释，会造成细胞蛋白的选择性沉淀，而 RNA 保留在溶液中。离心可以清除沉淀的蛋白的裂解物和细胞 DNA，且优选地通过柱进行。这样的柱也会剪切 DNA，并降低样品的粘度。优选地，在含有二氧化硅或其它材料的旋转柱上，进行 RNA 纯化。手工的细胞和组织破碎，可以借助于美国专利 4,715,545 所述的一次性组织磨碎器。匀浆时间是 1-2 分钟内，更优选地是 30-45 秒。

然后，可以用击碎柱(例如，QIAshredder, QIAGEN Inc., Valencia, CA, 或合适的底物)，或用 RNA 加工装置，例如可从 Omni International (Warrenton, VA) 商购的 PCR 组织匀浆试剂盒加工样品，以降低它的粘度。通过如上所述的旋转柱，沉淀出 RNA，离心时间不超过 30 秒。当使用商业的 RNA 提取试剂盒例如可从 Qiagen, Inc. 得到的那些时，使用过滤替代所有步骤的离心(除了柱干燥和 RNA 洗脱步骤以外)。典型地，在应用于柱上之前，用等体积的 70% 乙醇稀释样品。通过过滤洗涤后，通过离心干燥柱，在不含 RNA 酶的水中洗脱 RNA。将 RNA 选择性地从乙醇溶液中沉淀出来，并结合到底物(优选地，含有二氧化硅的膜或过滤器)上。由于离液盐对水分子的破坏而快速发生 RNA 向底物的结合，从而有利于核酸向二氧化硅的吸附。通过简单的洗涤步骤，从污染的盐、蛋白和细胞杂质中进一步纯化结合的总 RNA。最后，通过加入无核酸酶的水，从膜洗脱总 RNA。该快速方法的总时间少于 8 分钟，且优选地少于 6 分钟。

总之，该快速 RNA 提取方法包含下面的步骤：

- (a) 从生物系统得到含有细胞的样品，
- (b) 任选地，从样品去除没有目标 RNA 的细胞，得到工作样品，
- (c) 裂解含有目标 RNA 的细胞，并得到它们的匀浆，
- (d) 任选地，稀释匀浆，
- (e) 使浸湿的、匀浆的工作样品接触底物，所述底物含有或固定有与 RNA 结合的物质；
- (f) 使样品结合底物，
- (g) 去除污染物和干扰物，
- (h) 干燥底物，和
- (i) 从底物洗脱 RNA；

在使用离心的情况下，它可以在步骤 g, h, 或 I 之后进行，且优选地在提取步骤中应用真空/过滤。

在该快速提取过程中包含的试剂是：

裂解/结合缓冲液(优选地，4.5M 胍-HCl, 100mM NaP<sub>04</sub>),

洗涤缓冲液 I(优选地，5M 胍-HCl, 20mM Tris-HCl 中的 37% 乙醇),

洗涤缓冲液 II(优选地，20mM NaCl, 2mM Tris-HCl 中的 80% 乙醇),

洗脱缓冲液, 和

无核酸酶的无菌双蒸水。

由于癌细胞在淋巴结中的分布是不均匀的，优选地对淋巴结的多个切片取样。任选地，也可以基于病理学，检查一个或多个淋巴结。完成基于分子的实验和通过病理学检查相同的淋巴结样品的一种方法是，将淋巴结切成至少 4 个切片，一个外面的和里面的切片用于病理学，一个外面的和里面的切片用于分子试验。由于组织中的转移和微转移的分布在淋巴结或其它组织中是不均匀的，应当得到足够大的样品，以便不会错过转移。在本方法中，该取样问题的一种方法是，匀浆大组织样品，随后稀释要在随后的分子试验中使用的充分混合的匀浆的样品。

典型的 PCR 反应包括多个能选择性地扩增靶核酸种类的扩增步骤或循环。典型的 PCR 反应包括 3 个步骤：变性步骤，其中变性靶核酸；退火步骤，其中一组 PCR 引物(正向和反向引物)退火于互补的 DNA 链；和延伸步骤，其中热稳定的 DNA 聚合酶延伸引物。通过重复该步骤多次，扩增 DNA 片段，生成扩增子，其与靶 DNA 序列相对应。典型的 PCR 反应包括 20 或多个变性、退火和延伸的循环。在许多情况下，可以同时退火和延伸步骤，在该情况下，循环包含 2 个步骤。

在本发明的采用 RT-PCR 的方法中，在适于手术中的诊断的时间，进行 RT-PCR 扩增反应，每个这样的步骤的长度可以是在秒范围内，而不是分钟。更具体地，利用能产生至少约 5℃/秒的热变化速度的某些新热循环仪，使用在 30 分钟或更少时间内的 RT-PCR 扩增。更优选地，扩增进行小于 25 分钟。据此，为 PCR 循环的每个步骤提供的下述时间不包括变化时间。变性步骤可以进行 10 秒或更少的时间。事实上，有些热循环仪具有"0 秒"的设置，它可以是变性步骤的最佳持续时间。也就是说，它足以使热循环仪达到变性温度。退火和延伸步骤各

自最优选地小于 10 秒, 当在相同的温度进行时, 退火/延伸步骤的组合可以小于 10 秒。但是, 有些均匀的探针检测方法可能需要分开的延伸步骤, 以最大化快速测定性能。为了使总扩增时间和非特异性的副反应的形成最小化, 退火温度典型地大于 50℃。更优选地, 退火温度大于 55℃。

由于下面的几个原因, 没有实验人员干预的单组合的 RT-PCR 反应是合乎希望的: (1) 降低的实验误差风险, (2) 降低的靶或产物污染的危险, 和(3) 升高的测定速度。反应可以由一种或 2 种聚合酶组成。在两种聚合酶的情况下, 这些酶之一典型地是基于 RNA 的 DNA 聚合酶(逆转录酶), 且一种是热稳定的、基于 DNA 的 DNA 聚合酶。为了最大化测定性能, 优选地为这两种酶功能采用"热启动"技术的形式。美国专利 5,411,876 和 5,985,619 提供了不同的"热启动"方案的实例。优选的方法包括, 使用一种或多种热激活方法, 其会掩蔽有效的 DNA 聚合所需的一种或多种组分。美国专利 5,550,044 和 5,413,924 描述了制备用于这样的方法中的试剂的方法。美国专利 6,403,341 描述了一种掩蔽方法, 其包含 PCR 试剂组分之一化学改变。在最优选的实施方案中, RNA-依赖性和 DNA-依赖性的聚合酶活性存在于单一酶中。有效的扩增所需的其它组分包括三磷酸核苷, 二价盐和缓冲组分。在有些情况下, 非特异性的核酸和酶稳定剂可能是有益的。

任何给定的基于扩增的分子诊断的特异性很大程度上(但是非排它地)依赖于引物组的身份。引物组是正向和反向寡核苷酸引物对, 其会退火于靶 DNA 序列, 以允许靶序列的扩增, 从而生成靶序列特异性的扩增子。引物必须能扩增目标疾病状态的标志物。在本发明的情况下, 这些标志物针对乳腺癌。

在乳腺癌的情况下, 本发明的方法包含对乳腺组织或乳腺癌组织特异性的组织标志物的扩增, 和非组织特异性的标志物的扩增。非组织特异性标志物优选地是上皮细胞特异性的。合适的上皮细胞特异性的标志物包括但不限于, 腔蛋白聚糖, 含硒蛋白质 P, 结缔组织生长因子, 角蛋白 19 (CK19), EPCAM, E-钙粘着蛋白, 和胶原, IV 型,  $\alpha$ -2。使用至少 2 种标志物的组合, 以便当存在时, 会在临床上明显地且可靠地检测到淋巴结中的乳腺和/或癌细胞。优选地, 在单个反应容器中, 同时扩增和检测标志物(即, 它们是多路的)。最优选地, 引物/探针组

与对那些标志物特异性的核酸片段互补。

标志物包括乳腺珠蛋白 (SEQ ID NO:1)和细胞角蛋白 19 (CK19, SEQ ID NO: 2)或下述物质(优选其中之一), 其替代乳腺珠蛋白或补充乳腺珠蛋白: B305D (SEQ ID NO: 4), 催乳素诱导的蛋白 (PIP, SEQ ID NO: 3), B726 (SEQ ID NO: 5), GABA- $\pi$  (SEQ ID NO: 6)或前列腺来源的 Ets-转录因子(PDEF, SEQ ID NO: 7)。组织特异性标志物和癌症特异性标志物的组合, 提供分别超过 90%和 95%的灵敏度和特异性。令人惊奇地, 非组织特异性标志物(CK19, SEQ ID NO: 2)和癌症特异性标志物 (乳腺珠蛋白, SEQ ID NO: 1)的组合, 提供甚至更高的灵敏度和特异性, 分别是 91%和 97%。有些标志物存在于不同的同种型中, 某些同种型对一种组织或癌症比对其它的更有特异性。在 B305D 的情况下, 最优选的同种型是 B305D 同种型 C (SEQ ID NO: 4)。乳腺珠蛋白和 CK19 标志物的组合也是最优选的标志物。

反应也必须包含一些检测特定信号的工具。这优选地通过使用能检测源自目标靶序列的聚合的 DNA 序列区域的试剂来完成。在结合到特定的目的核酸序列上时, 优选的检测试剂会产生可测量的信号差别。通常, 这些方法包含当结合到目标序列上时会产生增强的荧光的核酸探针。典型地, 通过分析每个 PCR 引物组的扩增子生成的相对速度, 监测本发明的方法的 PCR 反应的进展。通过许多检测试剂和方法, 包括但不限于, 荧光引物, 发荧光的探针和结合双链 DNA 的荧光染料, 分子信标, Scorpions, 等, 可以监测扩增子生成。

监测 PCR 反应的普通方法采用荧光水解探针测定, 其利用某些热稳定的 DNA 聚合酶(例如 Taq 或 Tfl DNA 聚合酶)的 5'核酸酶活性, 在 PCR 过程中切割寡聚探针。选择的寡聚物在延伸条件会退火于扩增的靶序列。探针典型地在它的 5'端具有荧光报道物, 在它的 3'端具有报道物的荧光猝灭剂。只要寡聚物是完整的, 就会猝灭来自报道物的荧光信号。但是, 当在延伸过程中消化寡聚物时, 荧光报道物不再在猝灭剂附近。可以将给定的扩增子的游离荧光报道物的相对积累与对照样品的相同扩增子的积累和/或对照基因(例如, 但不限于,  $\beta$ -肌动蛋白和 PBDG (胆色素原脱氢酶))的积累相对比, 以确定 RNA 群体中的给定 RNA 的给定 cDNA 产物的相对丰度。用于荧光水解探针测定的产物和试剂是商业上可容易地得到的, 例如从 Applied Biosystems 得到。

其它检测试剂通常被称作 "Scorpions", 且记载在美国专利 6,326,145 和 5,525,494。这些试剂包括一种或多种分子, 其包含有尾的引物和集成的信号系统。引物具有模板结合区和尾, 后者包含接头和靶结合区。尾中的靶物结合区会与引物的延伸产物中的互补序列杂交。该靶特异性的杂交事件与信号系统相偶联, 其中杂交会导致可检测的变化。在 PCR 反应中, 有利地排列靶物结合区和尾区, 使得尾区保留单链, 即未复制。因而, 尾区在 PCR 扩增产物中是未扩增的。接头包含阻断部分, 其可以阻止聚合酶介导的引物模板上的链延伸。

也可以容易地得到用于控制和监测 PCR 和 QRT-PCR 中的扩增子积累的装置和软件, 包括可从 Cepheid of Sunnyvale, California 商业上得到的 Smart Cycler 热循环仪, 和可从 Applied Biosystems 商业上得到的 ABI Prism 7700 序列检测系统。

在优选的 RT-PCR 反应中, 为了利用有些热循环仪的更快的变化时间, 某些逆转录酶和 PCR 反应组分的量是不典型的。更具体地, 引物浓度非常高。

逆转录酶反应的典型的基因特异性的引物浓度小于约 20 nM。为了实现 1-2 分钟数量级上的快速的逆转录酶反应, 将逆转录酶引物浓度升高至大于 20 nM, 优选地至少约 50 nM, 典型地约 100 nM。标准的 PCR 引物浓度范围为 100 nM 至 300 nM。在标准的 PCR 反应中, 可以使用更高的浓度, 以补偿  $T_m$  变化。但是, 为了本文的目的, 提及的引物浓度用于其中不需要  $T_m$  补偿的情形。如果需要或希望  $T_m$  补偿, 可以凭经验确定和使用成比例地更高浓度的引物。为了实现快速的 PCR 反应, PCR 引物浓度典型地大于 250 nM, 优选地大于约 300 nM, 典型地约 500 nM。

提供了乳腺珠蛋白和 CK19 的优选的引物/探针组。对这样的引物/探针组合的要求是, 它能鉴别临床上显著量的 CK19 mRNA, 而不检测大量的基因组 DNA。这些引物和探针可以用于 CK19 mRNA 的特定检测的任何用途。意外地, 证实了该引物/探针组合的亚组显著优于测试的其它组合。细胞角蛋白 19 具有 4 种假基因, 它们具有约 86-91% 同一性。这些假基因位于染色体 4, 6, 和 12 上。通过必须整合外显子-内含子接点, 限制测定设计, 使得 CK19 DNA 不能被有效地扩增和检测。

在乳腺珠蛋白的情况下, 发现下述物质能提供最佳的结果:

**MG 正向引物(SEQ ID NO: 9) AGTTGCTGATGGTCCTCATGC**

**MG 反向引物(SEQ ID NO: 10) ATCACATTCTCCAATAAGGGGCA**

**MG 探针 (SEQ ID NO:11) Fam-CCCTCTCCCAGCACTGCTACGCA-BHQ1-TT**

在 CK19 的情况下, 发现下述物质能提供最佳的结果:

**CK19 正向引物(SEQ ID NO: 12) CACCCTTCAGGGTCTTGAGATT**

**CK19 反向引物(SEQ ID NO: 13) TCCGTTTCTGCCAGTGTGTC**

**CK19 探针 (SEQ ID NO: 14) Q570-ACAGCTGAGCATGAAAGCTGCCTT-BHQ2-TT**

当使用这些引物/探针组时, 下面的引物/探针组作为扩增和检测 PBGD 的对照是最佳的。

**PBGD 正向引物(SEQ ID NO: 15) GCCTACTTTCCAAGCGGAGCCA**

**PBGD 反向引物(SEQ ID NO: 16) TTGCGGGTACCCACGCGAA**

**PBGD 探针(SEQ ID NO: 17) Q670-AACGGCAATGCGGGCTGCAACGGCGGAA-BHQ2**

在本文的实施例中, 提供了其它引物、探针和其组合。

商业上使用的诊断也优选地采用一种或多种内部阳性对照, 其能证实阴性结果的特定扩增反应的操作。在 RT-PCR 反应中必须控制的假阴性结果的潜在原因包括: 不充分的 RNA 量, RNA 的降解, RT 的抑制和/或 PCR 和实验人员误差。在基因表达测定的情况下, 优选地利用在目标组织中组成型表达的基因。由于下述的几个因素, PBGD (SEQ ID NO: 7) 是经常用作内部对照的基因: 它不含有人类的已知假基因, 它在人组织中组成型表达, 和它以相对低水平表达, 因此不太可能造成目标靶序列的扩增的抑制。使用 PBGD 作为对照, 可以最小化或消除由假阴性结果的所有潜在来源产生的报告错误结果。

在描述的 QRT-PCR 方法的商业化中, 用于检测特定核酸的某些试剂盒是特有有用的。在一个实施方案中, 试剂盒包含用于扩增和检测标志物的试剂。任选地, 试剂盒包含样品制备试剂和/或从淋巴结组织提取核酸的物品(例如, 试管)。试剂盒也可以包含使样品污染的风险最小化的物品(例如, 用于淋巴结解剖和制备的一次性解剖刀和表面)。

在优选的试剂盒中, 包含上述的单管 QRT-PCR 过程必需的试剂, 例如逆转录酶, 逆转录酶引物, 对应的 PCR 引物组(优选地, 针对标志



物和对照), 热稳定的 DNA 聚合酶, 例如 Taq 聚合酶, 和合适的检测试剂, 例如但不限于, scorpion 探针, 用于荧光水解探针测定的探针, 分子信标探针, 对双链 DNA 特异的单染料引物或荧光染料, 例如溴化乙锭。引物的量优选地会产生上述的高浓度。热稳定的 DNA 聚合酶是常见的, 且可从许多生产商商业上得到。试剂盒中的其它物质可以包括: 合适的反应试管或管形瓶, 屏障结构, 典型地是蜡珠, 任选地包括镁; 用于逆转录酶和 PCR 阶段的反应混合物(典型地 10X), 包括必需的缓冲剂和试剂例如 dNTP; 不含核酸酶或 RNA 酶的水; RNA 酶抑制剂; 对照核酸和/或任何其它的缓冲剂, 化合物, 辅因子, 离子组分, 蛋白和酶, 聚合物, 等, 其可以用于 QRT-PCR 反应的逆转录酶和/或 PCR 阶段。任选地, 试剂盒包含核酸提取试剂和材料。

下面的非限制性实施例有助于进一步描述本发明。本文中引用的所有文献都在本文中引作参考。

## 实施例

### 实时 PCR

本发明中的实施例是基于实时 PCR 的使用。在实时 PCR 中, 在 PCR 指数期实时监测聚合酶链式反应的产物, 而不是终点测量。因此, DNA 和 RNA 的定量更精确和可再现。在每个循环的过程中, 记录荧光值, 并代表着在扩增反应中扩增至该点的产物的量。在反应开始时存在更多的模板, 达到荧光信号首次记录为统计上显著超过背景(它是(Ct)值的定义)的点需要更少的循环数。阈值循环(Ct)的概念允许使用基于荧光的 RT-PCR 的精确的且可再现的定量。PCR 产物的均匀检测优选地基于:(a) 双链 DNA 结合染料(例如, SYBR Green), (b) 发荧光的探针(例如, TaqMan®探针, 分子信标), 和(c) 直接标记的引物(例如, Amplifluor 引物)。合适的方法也记载在美国专利申请系列号 10/427,243。

### 实施例 1 - SLN 中的乳腺癌细胞的双基因鉴别

腋窝淋巴结(ALN) 转移的存在, 是乳腺癌患者的最重要的预后因子。SLN 状态是总体 ALN 累及的重要预示。SLN-阳性的患者在历史上已经在二次手术中经历了 ALN 解剖。已经实现了手术中的 SLN 分析方法, 以减少成本和二次手术的并发症, 但是这些方法具有较差的且

变动的灵敏度，且缺少标准化。下面的实施例证实了作为改善临床上有关的 SLN 转移的手术中诊断的基础的 RT-PCR 的可行性。

**方法:** 从乳腺和其它组织的基因组范围的基因表达分析，鉴别了 8 种分子标志物，包括乳腺珠蛋白。通过用于 RNA 提取的永久切片 H&E 或快速冷冻，分析了来自 254 个乳腺癌患者的 SLN 的替代连续切片。通过定量 RT-PCR，分析盲法的 SLN cDNA。将 PCR 信号与患者基础上的 H&E 结果相对比。使用多变量接收器操作特征(ROC)分析，选择与 H&E 结果最佳相关的 PCR 截止值。

**患者样品:** 在东卡罗莱纳州大学，从乳腺癌患者淋巴结的乳腺珠蛋白的临床终点 PCR 研究，得到 SLN RNA 样品。淋巴结 RNA 源自最初淋巴结的一半。通过 Agilent, 光谱学和管家基因 PCR 分析，评估样品质量。从研究中去掉其中存在被视作较差质量且认为是乳腺 PCR 阴性的样品的患者。在该研究中包含来自 254 个患者的所有 SLN。

**标志物验证:** 从文献和内部的生物信息学方法，鉴别了 7 种标志物，包括乳腺珠蛋白，并随后在原始乳腺组织样品上验证。采用 PBGD 和  $\beta$ -肌动蛋白作为管家基因。通过定量 PCR，利用 ABI Prism 7900HT 序列检测系统上的 TaqMan® 化学，分析淋巴结 cDNA。以 Ct 记录数据。将 Ct 定义为观察到标准化的报道物发射的统计学显著增加的循环。

**乳腺珠蛋白引物**(SEQ ID NO: 18 和 SEQ ID NO: 19)由 Invitrogen Corp. (Carlsbad, CA)合成，**乳腺珠蛋白 TaqMan® 探针** (SEQ ID NO: 20) 购自 Epoch Biosciences(San Diego, CA)。CK19 引物(SEQ ID NO: 21 和 SEQ ID NO: 22)和 TaqMan®探针 (SEQ ID NO: 23)。B726 引物(SEQ ID NO: 24 和 SEQ ID NO: 25)和 TaqMan®探针 (SEQ ID NO: 26)。B305D 引物(SEQ ID NO: 27 和 SEQ ID NO: 28)由 Invitrogen Corp 合成，**探针** (SEQ ID NO: 29)由 Applied Biosystems, Inc.合成。PIP 引物(SEQ ID NO: 30 和 SEQ ID NO: 31)和 TaqMan®探针 (SEQ ID NO: 32)。PDEF 引物(SEQ ID NO: 33 和 SEQ ID NO: 34)和 TaqMan® 探针 (SEQ ID NO: 35)。GABA 引物(SEQ ID NO: 36 和 SEQ ID NO: 37)和 TaqMan®探针 (SEQ ID NO: 38)。PBGD 引物(SEQ ID NO: 39 和 SEQ ID NO: 40)由 QIAGEN Operon (Alameda, CA)合成，**探针** (SEQ ID NO: 41) 由 Synthegen, LLC (Houston, TX)合成。对于所有 TaqMan®探针，使用羧基荧光素(FAM)和羧基四甲基若丹明 (TAMRA) 作为染料和猝灭

剂对。

SEQ ID NO:18 CAAACGGATG AA ACTCTGAG CAATGTTGA  
 SEQ ID NO:19 TCTGTGAGCC AAAGGTCTTG CAGA  
 SEQ ID NO:20 6-FAM – tgttatgca attaatat gacagcagtc tttgtg- TAMRA  
 SEQ ID NO:21 AGATGAGCAGGTCCGAGGTTA  
 SEQ ID NO:22 CCTGATTCTGCCGCTCACTATCA  
 SEQ ID NO:23 FAM-ACCCTTCAGGGTCTTGAGATTGAGCTGCA-TAMRA  
 SEQ ID NO:24 GCAAGTGCCAATGATCAGAGG  
 SEQ ID NO:25 ATATAGACTCAGGTATACACACT  
 SEQ ID NO:26 FAM TCCCATCAGAATCCAAACAAGAGGAAG  
 SEQ ID NO:27 TCTGATAAAG GCCGTACAAT G  
 SEQ ID NO:28 TCACGACTTG CTGTTTTTGC TC  
 SEQ ID NO:29 6-FAM-ATCAAAAACA AGCATGGCCTCA CACC- TAMRA  
 SEQ ID NO:30 GCTTGGTGGTTAAACTTACC  
 SEQ ID NO:31 TGAACAGTTCTGTTGGTGTA  
 SEQ ID NO:32 FAM-CTGCCTGCCTATGTGACGACAATCCGG-TAMRA  
 SEQ ID NO:33 GCCGCTTCATTAGGTGGCTCAA  
 SEQ ID NO:34 AGCGGCTCAGCTTGTTCGTAGTT  
 SEQ ID NO:35 AAGGAGAAGGGCATCTTCAAAATTGAGGACTCAGC  
 SEQ ID NO:36 CAATTTTGGTGGAGAACCCG  
 SEQ ID NO:37 GCTGTCGGAGGTATATGGTG  
 SEQ ID NO:38 FAM CATTTCAGAGAGTAACATGGACTACACA TAMRA  
 SEQ ID NO:39 CTGCTTCGCTGCATCGCTGAAA  
 SEQ ID NO:40 CAGACTCCTCCAGTCAGGTACA  
 SEQ ID NO:41 FAM-CCTGAGGCACCTGGAAGGAGGCTGCAGTGT-TAMRA

**数据分析:**在 PCR 试验结束时,使样品解盲。在这样的时间,使 H&E, IHC, 复发和其它病理学数据可得到。使用多变量接收器操作特征(ROC)分析和目视观察,建立 Ct 截止值,用于测定阳性淋巴结状态。对于所有假阴性的和假阳性的结果,进行有差异的分辨(基于病理学报告)。基于下述的标准,鉴别假定阳性的样品(可能代表着由于不充分的淋巴结取样导致的标准病理学错过的真阳性的样品):至少 4 种分子标志物是阳性的,至少 1 种标志物是强阳性的(Ct 至少 5 个循环低于单标志物测定截止值)。

结果见图 1 和表 1-2。在图 1 中, VBM1 是 CK19。

表 1 不同数目的标志物的最佳性能

标志物	1种基因	2种基因	3种基因	7种基因
乳腺珠蛋白		X	X	X
CK19	X	X	X	X
B726			X	X
B305D				X
PIP				X
PDEF				X
GABA				X
灵敏度 (%)	86	90	92	92
特异性 (%)	94	94	94	94
PPV (%)	85	85	86	86
NPV (%)	95	96	97	97

表 2 双基因标记与组织学的关联  
FFPE H&E 有/无 IHC

		+ve	-ve
测定标志物	+ve	64	11
	-ve	7	172
		71	183

在表 2 中,灵敏度是 90%,特异性是 93%,PPV 是 84%,且 NPV 是 96%。

表 3  
假定阳性的样品的鉴别

样品	MG	CK19	标志物 阳性	标志物 强阳性	假定 阳性
1		+	1	0	
2	++	++	7	6	+
3	+	+	5	0	
4	++	+	7	3	+
5	+	+	6	0	
6		++	5	4	+
7	++	++	7	3	+
8	++		2	1	
9	++		2	1	
10	++	++	4	3	+
11	++		4	1	+

+ PCR 阳性(Ct < 截止值)

++ 强 PCR 阳性(>5 个循环低于 Ct 截止值)

>4 个标志物是假定 PCR 阳性, 和  
具有至少 1 种标志物强 PCR 阳性

表 4 双基因标记与假定阳性的关联  
FFPE H&E(+)或假定(+)

		+ve	-ve
测定 标志物	+ve	71	5
	-ve	7	171
		78	176

在表 4 中, 灵敏度是 91 %, 特异性是 97%, PPV 是 93%, 且 NPV 是 96%。

结果: 双基因测定(乳腺珠蛋白和 CK19)检测了临床上可起作用的转移(在没有 IHC 的情况下, H&E-阳性的), 其具有 90% 灵敏度和 93% 特异性。第三个基因的添加, 对总性能具有最小的影响。

作为表征基因实现更好的灵敏度和特异性而进行的努力的一部

分,在这些淋巴结样品上进行 PDEF 和 CK19 测定。标志物的 CK19 + MG 组合增加了测定的灵敏度,如下面的表 5 所示。

**表 5 MG + B305D 标志物组合**

灵敏度 = 75%

特异性 = 94%

PPV = 83%

		永久切片 H&E>0.2mm	
		阳性	阴性
MG + B305D	阳性	53	11
	阴性	18	172
		71	183

NPV=91%

**表 6.CK19 + MG 标志物组合**

灵敏度 = 90%

		永久切片 H&E>0.2mm	
		阳性	阴性
CK19 + MG	阳性	64	11
	阴性	7	172
		71	183

特异性 = 94%

PPV = 85%

NPV = 96%

这些数据不仅证实, CK19 会增加测定的灵敏度; 具有乳腺珠蛋白的原始标志物是补充标志物。该标志物组合可提高测定性能。

结论: 该研究证实了 RT-PCR 作为手术中测定的基础的用途, 该测定用于检测临床上起作用的乳腺转移, 其乳腺珠蛋白/CK19 表达与

SLN 转移的标准的 H&E 检测密切相关，证实了双基因(一个乳腺癌特异性的和一个非-组织特异性)分子标记分析会检测出乳腺 SLN 中的临床上有关的转移。因而，该实验具有显著减少经历 SLN 活组织检查的患者的二次手术的潜力。

实施例 2-乳腺珠蛋白、CK19 和 PBGD mRNA 的特异性检测的最佳引物和探针

乳腺珠蛋白引物和探针

测定了 Tth 聚合酶为快速测定提供足够的链置换和核酸酶活性的能力，为适当的测定条件，优化引物和探针。第一组引物/探针是对外显子 2 和 3 特异性的。用或不用 Sybr Green 进行实验，以区分成功的扩增和检测。进行二价阳离子浓度的优化和镁(MgCl<sub>2</sub>)向锰(MnSO<sub>4</sub>)的添加，以改进 RT 和扩增。这些实验中的一个也证实，MgCl<sub>2</sub> 和 MnSO<sub>4</sub> 之间没有显著差异。这些实验导致使用 2 种二价阳离子的最佳测定：锰(MnSO<sub>4</sub>) 用于 RT，镁(MgCl<sub>2</sub>)用于 PCR，分别在 2.5mM 和 3.5mM。

第一次设计产生了 105bp 扩增子，并在相同区域重新设计，产生更小的 96bp 扩增子。第一次和第二次设计工作得非常好，但是表现出非常高的信号，和从 Fam 通道向 Cy3 通道中的溢出。

为跨外显子 1 和 2 的乳腺珠蛋白重新设计测定，因为跨外显子 2 和 3 的设计是在 AT 富集区，且在通过限制循环温度的柔性而进行多路努力的过程中可能存在问题。在相同的区域设计两种探针。在 Fam, Cy3, 和 Cy5 通道，测试两种探针。用或不用 Sybr Green 验证新设计，以确保在 RT 过程中不因为探针的存在而产生抑制。

乳腺珠蛋白设计历史

SEQ ID NO:18 CAAACGGATGAAACTCTGAGCAATGTTGA	外显子 2-3
SEQ ID NO:19 TCTGTGAGCCAAAGGTCTTGCAGA	105 bp
SEQ ID NO:20 TGTTTATGCAATTAATATATGACAGCAGTCTTTGT	产物
SEQ ID NO: 42 CGGATGAAACTCTGAGCAATGTTGA	外显子 2-3
SEQ ID NO: 43 GAGCCAAAGGTCTTGCAGAAAGT	96 bp
SEQ ID NO: 44 TGTTTATGCAATTAATATATGACAGCAGTCTTTGT	产物
SEQ ID NO: 9 AGTTGCTGATGGTCCTCATGC	外显子 1-2
SEQ ID NO: 10 ATCACATTCTCCAATAAGGGGC	82 bp
SEQ ID NO: 45 GCACTGCTACGCAGGCTCTGGC	产物
SEQ ID NO: 11 CCCTCTCCAGCACTGCTACGCA	产物

基于使用两种探针设计收集的数据，挑选 SEQ ID NO: 48 作为外显子 1-2 区域的最终设计。

来自单路测试的乳腺珠蛋白最终设计

在验证新设计的实验后，将乳腺珠蛋白置于 Fam 通道，使用下面的序列作为引物和探针。

SEQ ID NO: 9 AGTTGCTGATGGTCCTCATGC

SEQ ID NO: 10 ATCACATTCTCCAATAAGGGGCA

SEQ ID NO: 11 Fam -CCCTCTCCAGCACTGCTACGCA- BHQ1

一旦证实水解探针测定适用于 Tth 聚合酶，也为 B305D 和 CK19 测试该测定。

## CK19

第一个寡核苷酸组

测试的最初设计在设计中包含接点特异性的 PCR 引物，因为这似乎是 CK19 和它的假基因之间的最好区别。下面显示了为该设计测试的引物和双标记的水解探针序列：

正向引物 SEQ ID NO:21 AGATGAGCAGGTCCGAGGTTA

反向引物 SEQ ID NO: 46 GCAGCTTTCATGCTCAGCTGT

探针(5'FAM/3'BHQ) SEQ ID NO: 23 ACCCTTCAGGGTCTTGAGATTGAGCTGCA

如下面的表 7 所示，证实了该设计会与基因组 DNA 强烈地交叉反应：

表 7

靶	探针 Ct	调节的 Ct	探针荧光	SYBR Green Ct	调节的 SYBR Green Ct
15,500 个拷贝 DNA	26.6	23.9	225.1	22.8	20.1
100,000 个拷贝 RNA	25.3	25.3	252.0	23.0	23.0

当为解释靶浓度的差异而调节时，用 DNA 和 RNA 观察到的探针 Ct 基本上相同。另外，来自水解探针的终点荧光也是基本上相同。总之，这些结果证实，对 RNA 的引物和探针特异性比对 DNA 更差。来自分开的反应的 SYBR Green 信号暗示着，对 DNA 靶物的扩增实际上



优于 RNA 靶物，这可能是由于多个假基因序列的扩增或在一步 RT-PCR 过程中 RNA 向 DNA 的转化的无效。

### 第二个寡核苷酸组

测试的下一个设计在分开的外显子中包含接点特异性的探针和引物。下面显示了为该设计测试的引物和双标记的水解探针序列：

正向引物(SEQ ID NO: 47) CACCCTTCAGGGTCTTGAGA

反向引物(SEQ ID NO: 48) TCCGTTTCTGCCAGTGTGTC

探针 (SEQ ID NO:49) (5'FAM/3'BHQ) GCTGAGCATGAAAGCTGCCTTGGAA

在该情况下，DNA 的调节的 Ct 比 RNA 高 2.5 个循环，证实了与 DNA 相比，对 RNA 的一定水平的特异性。探针的 RNA 和 DNA 之间的 Ct 差异比 SYBR Green 更大(2.5 个循环和 0.2 个循环)，暗示着特异性提高是由于引物和探针。与以前的设计相比，引物特异性的提高(SYBR GreenCt)是 3.1 个循环(0.2 个循环和-2.9 个循环)。探针特异性的提高得到了与 DNA 相比，RNA 的荧光 2 倍增加的支持(表 8)。尽管该特异性的增加是合乎需要的，它可能不足以可靠地区别 RNA 信号和 DNA 信号。

表 8

靶	探针 Ct	调节的 Ct	探针 荧光	SYBR Green Ct	调节的 SYBR Green Ct
15,500 个拷贝 DNA	29.5	26.8	223.9	23.2	20.5
100,000 个拷贝 RNA	24.3	24.3	453.7	20.3	20.3

### 第三个寡核苷酸组

设计了其它的引物和探针，以进一步提高对 RNA 的特异性。

在相同的区域进行其它设计，对引物和探针的位置和长度进行最少的修改。在下面的表 9 中显示了测试的引物和双标记的水解探针序列。

## 正向引物

(SEQ ID NO:47) CACCCTTCAGGGTCTTGAGA  
 (SEQ ID NO:50) CACCCTTCAGGGTCTTGAGAT  
 (SEQ ID NO:12) CACCCTTCAGGGTCTTGAGATT  
 (SEQ ID NO:51) ACCCTTCAGGGTCTTGAGATTG  
 (SEQ ID NO:52) ACCCTTCAGGGTCTTGAGATTGA

## 反向引物

(SEQ ID NO:13) TCCGTTTCTGCCAGTGTGTC  
 (SEQ ID NO:53) CTCCGTTTCTGCCAGTGTGT

## 探针 (5'FAM/3'BHQ)

(SEQ ID NO:49) GCTGAGCATGAAAGCTGCCTTGGA  
 (SEQ ID NO:14) ACAGCTGAGCATGAAAGCTGCCTT

表 9

条件	正向引物 SEQ ID NO:	反向引物 SEQ ID NO:	探针 SEQ ID NO:	调节的 RNA/DNA 探针 Ct 差异	RNA/DNA 探针 荧光比
A	47	13	49	2.5	2.0
B	12	13	49	3.7	3.6
C	50	13	49	-0.6	1.3
D	51	13	49	2.5	3.4
E	52	13	49	2.5	2.6
F	47	53	49	1.4	2.0
G	12	53	49	4.1	3.7
H	50	53	49	-0.8	1.3
I	51	53	49	4.6	3.8
J	52	53	49	0.6	2.8
K	47	53	14	2.2	4.1
L	12	53	14	3.6	10.3
M	50	53	14	-0.8	2.1
N	51	53	14	4.4	10.9
O	52	53	14	4.1	8.4
P	12	13	14	未测试	
Q	51	13	14	未测试	
R	52	13	14	未测试	

与上述的条件(条件 A)相比,几个条件证实了调节的 RNA/DNA 探针 Ct 差异或 RNA/DNA 探针荧光比的改进。最佳的条件是 L, N 和 O。所有这些条件证实了至少 3.6 个循环的 Ct 差异和至少 8 的荧光比。所有三种条件证实了通过用于定义阳性的荧光截止值的最少操作,对 DNA 检测的所有消除足够的信号区别。条件 B, D, G, I 和 K 都具有  $> 2.2$  个循环的 Ct 差异和  $> 3.4$  的荧光比,暗示着使用这些组合来分辨 RNA 和 DNA 的合理的潜力。尽管未测试,也预测条件 P, Q 和 R (分别与 L, N, 和 O 类似,例外是使用反向引物 SEQ ID NO: 13)会导致最佳操作。

测试了条件 L 和 P, 以证实通过改变测定荧光截止值, 进一步增加对 RNA 的特异性的能力。下面显示了为该实施例测试的引物和双标记的水解探针序列:

正向引物

(SEQ ID NO: 12) CACCCTTCAGGGTCTTGAGATT

反向引物

(SEQ ID NO:13) TCCGTTTCTGCCAGTGTGTC

(SEQ ID NO: 53) CTCCGTTTCTGCCAGTGTGT

探针 (5'Q570/3'BHQ2)

(SEQ ID NO:14) ACAGCTGAGCATGAAAGCTGCCTT

如表 10 所示,通过将截止值从最大荧光的大约 1.5%的当前设定点增加到最大荧光的 6-7%的水平,在 40 个循环以外没有观察到 DNA 的 Ct, 而 RNA 的 Ct 增加了仅仅约 2 个循环。最少对于条件 L, N, O, P, Q, 和 R, 预测对截止值的这种类型的微小改变会导致最佳操作。

表 10

条件	正向引物 SEQ ID NO:	反向引物 SEQ ID NO:	探针 SEQ ID NO:	RNA Ct	DNA Ct
L	12	53	14	25.9	40.0
P	12	13	14	25.6	40.0

PBGD 引物/探针

SEQ ID NO: 15 GCCTACTTTCCAAGCGGAGCCA

外显子 1-2

SEQ ID NO: 54 ACCCACGCGAATCACTCTCA

83 bp

SEQ ID NO: 17 AACGGCAATGCGGCTGCAACGGCGGAA

产物

SEQ ID NO: 55 CAAGCGGAGCCATGTCTGG

外显子 1-2

SEQ ID NO: 54 ACCCACGCGAATCACTCTCA

93 bp

SEQ ID NO: 17 AACGGCAATGCGGCTGCAACGGCGGAA

产物

同样好地完成了两个设计，但是选择更长的产物作为最终设计。将 PBGD 置于 Cy5 通道。这是为了确认，不会由于从其它通道的溢出造成内部对照的任何阳性的结果。

来自单路测试的 PBGD 最终设计

SEQ ID NO: 55 CAAGCGGAGCCATGTCTGG

SEQ ID NO: 54 ACCCACGCGAATCACTCTCA

SEQ ID NO: 17 Q670-AACGGCAATGCGGCTGCAACGGCGGAA-BHQ2

### 多路测试

在单路测试后，在有和没有 Sybr Green 的情况下，以多路测试上面选择的设计，乳腺珠蛋白在 Fam 通道中，CK19 在 Cy3 通道中，PBGD 在 Cy5 通道中。观察到，无模板反应在多路中产生低得多的 Ct。依赖于用不同的引物-探针组合进行的进一步实验，观察到在 PBGD 下和 CK19 上引物之间存在 3'二聚作用。由于在多路混合中缺少这两种引物之一，无模板反应出现高得多的 Ct。

为了使引物相互作用最小化，为最终的多路测定选择下面的引物。

MG 正向引物 (SEQ ID NO:9) AGTTGCTGATGGTCCTCATGC  
MG 反向引物 (SEQ ID NO:10) ATCACATTCTCCAATAAGGGGCA  
MG 探针 (SEQ ID NO:11) Fam -CCCTCTCCCAGCACTGCTACGCA- BHQ1-TT  
CK19 正向引物 (SEQ ID NO:12) CACCCTTCAGGGTCTTGAGATT  
CK19 反向引物 (SEQ ID NO:13) TCCGTTTCTGCCAGTGTGTC  
CK19 探针 (SEQ ID NO:14) Q570 -ACAGCTGAGCATGAAAGCTGCCTT- BHQ2-TT  
PBGD 正向引物 (SEQ ID NO: 15) GCCTACTTTCCAAGCGGAGCCA  
PBGD 反向引物 (SEQ ID NO: 16) TTGCGGGTACCCACGCGAA  
PBGD 探针 (SEQ ID NO: 17) Q670-AACGGCAATGCGGCTGCAACGGCGGAA-BHQ2

在 CK19 的最终引物选择过程中，进行引物、探针和循环条件的对比。这些实验证实，由于 CK19 和它的假基因之间的荧光水平的 10 倍区别，在 Cy3 通道中不会检测出假基因。在可行性研究后，设计分开的实验，使用基因组 DNA 来观察假基因的扩增。在所有情况下，显然会扩增假基因，而不是基因组 DNA，因为在所有情况下，扩增的产物都有正确的长度，且不会表现出内含子的扩增。在有和没有 Sybr Green 的情况下进行该实验，以区别扩增和检测。使用不同浓度的基因

组 DNA 作为模板，连同无模板对照一起。用仅仅 PCR，以及 RT-PCR，进行反应。Cy3 通道中的水解探针化学没有挑选出假基因。

但是，从 SYBR 数据可以看出，使用在 Cy3 通道中的水解探针化学，甚至在  $10^6$  个拷贝的浓度，扩增了假基因，但是未检出。在凝胶上对所有产物进行电泳，来证实结果。在使用模板的所有情况下，观察到正确大小(81 bp)的带，包括没有检测到 Ct 的无 SYBR 的反应。为了证实 Cy3 通道中的信号缺失不是因为扩增的缺失，而是因为由于水解探针化学造成的区别，该确认是必需的。

表 11. 有和无 SYBR Green 的 CK19 反应的对比

基因组 DNA	SYBR Ct	Q570 Ct
<b>PCR</b>		
1.00E+06	22.99	40.00
1.00E+05	23.53	40.00
1.00E+04	26.65	40.00
1.00E+03	30.02	40.00
NT	37.85	40.00
<b>快速 TMRM-PCR</b>		
1.00E+06	22.61	40.00
1.00E+05	23.07	40.00
1.00E+04	25.85	40.00
1.00E+03	29.58	40.00
NT	37.42	40.00

### 实施例 3 - 通过标准方法纯化的样品的快速测定测试 样品

通过标准的 Trizol 方法，从乳腺淋巴结分离 RNA。通过在 260 nm 的吸光度，定量 RNA。将所有 RNA 稀释至 200ng/ul。使用管家基因 PBGD 和  $\beta$ -肌动蛋白，通过两步 RT-PCR，测定 RNA 质量。如果两种管家基因都在测试的所有样品的平均信号的 3 个循环内产生信号，认为样品具有足够的质量。测试的最后一组样品代表者来自 251 个患者的 487 个淋巴结样品。

#### 一步 RT-PCR 测试

使用快速的实时一步 RT-PCR，其含有乳腺珠蛋白 (MG)、角蛋白 19 (CK19) 和 PBGD 的引物和探针，扩增了上述的 RNA 样品。使用的引物和探针序列如下：

MG 正向引物 (SEQ ID NO:9) AGTTGCTGATGGTCCTCATGC  
MG 反向引物 (SEQ ID NO:10) ATCACATTCTCCAATAAGGGGCA  
MG 探针 (SEQ ID NO:11) Fam-CCCTCTCCCAGCACTGCTACGCA- BHQ1-TT  
CK19 正向引物 (SEQ ID NO:12) CACCCTTCAGGGTCTTGAGATT  
CK19 反向引物 (SEQ ID NO:13) TCCGTTTCTGCCAGTGTGTC  
CK19 探针 (SEQ ID NO:14) Q570-ACAGCTGAGCATGAAAGCTGCCTT- BHQ2-TT  
PBGD 正向引物 (SEQ ID NO:15) GCCTACTTTCCAAGCGGAGCCA  
PBGD 反向引物 (SEQ ID NO:16) TTGCGGGTACCCACGCGAA  
PBGD 探针 (SEQ ID NO:17) Q670-AACGGCAATGCGGCTGCAACGGCGGAA- BHQ2

### RT-PCR 扩增条件

在含有下述组分的 25  $\mu$ l 反应中, 扩增来自每个样品的 1  $\mu$ l (200 ng) RNA: 50 mM N,N-二(羟乙基)甘氨酸/ KOH, pH 8.2, 3.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2.5 mM 硫酸锰, 115 mM 醋酸钾, 12 mM 氯化钾, 6 mM 氯化钠, 0.8 mM 磷酸钠, 10% v/v 甘油, 0.2 mg/ml BSA, 150 mM 海藻糖, 0.2% v/v 吐温 20, 0.016% v/v Triton X-100, 50 mM Tris-Cl pH 8, 0.2 mM dATP, 0.2 mM dCTP, 0.2 mM dGTP, 0.2 mM TTP, 0.08% v/v ProClin 300, 5 单位 Tth 聚合酶 (从 *Thermos thermophilis* 克隆的重组 DNA 聚合酶/逆转录酶), 400 ng 抗体 TP6-25.3, MG 和 CK19 的每种引物各 450 nM, PBGD 的每种引物各 300 nM, 和 200 nM 每种探针。使用下面的方法, 在 Cepheid Smart Cycler II 上进行 RT-PCR 条件:

在 95 $^{\circ}$ C 温育 3 秒,

在 63 $^{\circ}$ C 温育 150 秒,

在下述温度温育 4 秒: 63.2 $^{\circ}$ C, 63.4 $^{\circ}$ C, 64.0 $^{\circ}$ C, 64.5 $^{\circ}$ C, 65.0 $^{\circ}$ C, 65.5 $^{\circ}$ C, 66.0 $^{\circ}$ C, 66.5 $^{\circ}$ C, 67.0 $^{\circ}$ C, 67.5 $^{\circ}$ C, 68.0 $^{\circ}$ C, 68.5 $^{\circ}$ C, 69.0 $^{\circ}$ C, 69.5 $^{\circ}$ C,

在 70 $^{\circ}$ C 温育 90 秒,

然后是下述的 40 个循环:

在 95 $^{\circ}$ C 温育 1 秒,

在 60.0 $^{\circ}$ C 温育 6 秒。

在 60.0 $^{\circ}$ C 过程中, 在 Smart Cycler II 的通道 1 (Fam), 2 (Q570) 和 4 (Q670) 中, 对于阳性的 Ct, 使用下面的阈荧光值, 监测荧光信号: 通道 1 的是 30, 通道 2 的是 20, 通道 3 的是 20。对于所有 3 个通道, 测定每个样品的 Ct 值, 然后测定最佳截止值, 以便将测定信号和无 IHC 情况下的 H&E-阳性进行关联。测得 5 个样品具有不可接受的 RNA 质量, 如通过 PBGD 信号所测得的, 并视作无测试结果。下面的表 12 总

结了得到了验证结果的 246 个患者的结果:

		无 IHC 的 H&E (+)		
		(+)	(-)	
测定	+	60	8	灵敏度 = 90%
插入物	-	7	171	特异性 = 96%
		67	179	PPV = 88%
				NPV = 96%

**实施例 4-通过快速样品制备方法纯化的样品的快速测定测试样品**

使用 Omni 匀浆器和用于匀浆的一次性探头，从乳腺淋巴结分离 RNA，随后使用下述方法，用 RNeasy (Qiagen) 试剂盒试剂纯化 RNA:

**匀浆**

如果以前没有记录，测定以毫克计的样品重量。将一张新蜡纸置于天平上，归零，称量样品。

注：小于 30 mg 的淋巴结不能提供足够的组织进行使用 BLN 测定的测试。

使用新解剖刀，将来自相同淋巴结的所有组织切碎成直径大约 1 mm 的碎块。在处理过程中，小心地避免污染组织。

将匀浆缓冲液加入匀浆试管(8 或 15 mL 聚丙烯培养管，对于小于 4 mL 的匀浆缓冲液体积，使用 8 mL 试管，否则使用 15 mL 试管)，使用表 13 确定需要的体积。

表 13. 需要的匀浆缓冲液的体积

组织重量 (mg)	匀浆缓冲液 (mL)
30-99	2
100-149	2
150-199	3
200-249	4
250-299	5
300-349	6
350-399	7
400-449	8
450-499	9
500-550	10
>550	见下面的注释

注：使用推荐的系统，不能充分地匀浆重量大于 550 mg 的组织。在匀浆之前，将组织分成等量部分，将每部分作为单独的样本，进行匀浆、纯化和测定。

1. 使用清洁的镊子，将组织转移进匀浆缓冲液。
2. 将新匀浆探头置于手动匀浆器上。
3. 彻底匀浆每个淋巴结。
4. 如 RNA 纯化部分所述，加工匀浆。
5. 去除匀浆探头。
6. 在 -65℃ 或以下保存任何残余的匀浆。

#### RNA 纯化

注：使用该方法，平行地加工多份匀浆。

1. 通过搅拌 10 秒，在 4.5 mL 试管中混合 400  $\mu$ L 匀浆和 400  $\mu$ L 70% 乙醇。
2. 对于每种样品，将 VacValve 连接到真空集合管上，将一次性 VacConnector 连接到每个阀门上。
3. 将旋转柱连接到 VacConnector 上，将盖子打开。
4. 将来自步骤 1 的匀浆/乙醇混合物等分到柱上。匀浆/乙醇混合物的体积是基于原始组织量，且提供在表 14 中。

表 14

组织重量 (mg)	匀浆/乙醇混合物的体积 ( $\mu$ L)
30-39	700
40-49	500
50-59	400
60-69	350
70-79	300
80-89	250
90-99	225
$\geq 100$	200

5. 将 VacValve 转至打开位置，应用真空(800-1000 mbar)，直到滤出样品(大约 30 秒)。
6. 停止真空；将 700 $\mu$ L 洗涤缓冲液 1 加到柱上。启动真空，并允许溶



液通过柱过滤。停止真空。

7. 将 700uL 洗涤缓冲液 2 加到柱上。启动真空，并允许溶液通过柱过滤。停止真空。

8. 从真空集合管移开每个柱，并置于 2 mL 收集试管中。

9. 在微量离心机中，在 13,200 RPM，离心含有旋转柱的试管 30 秒。

10. 弃去收集试管。取出柱，并置于新收集试管中。

11. 将 50 μL 无 RNA 酶的水直接加到柱的过滤膜上。

12. 在微量离心机中，在 13,200 RPM，离心 30 秒。

13. 弃去柱。在收集试管中含有大约 50uL 洗脱的 RNA 溶液。每 25ul 反应，使用 5uL 该溶液。

测试的最后组样品代表着来自岗哨淋巴结-阳性的乳腺癌患者的 30 H&E-阳性的和 25 H&E-阴性的腋窝淋巴结。

### 一步 RT-PCR 测试

如实施例 3 所述，使用源自在该实施例中测试的患者样品的截止值，例外是，标准化截止值，以解释采用的 2 种样品制备方法之间的差异，在 25 μl 快速的一步 RT-PCR 反应中，运行 5 μL 洗脱的 RNA。测得 3 个样品具有不可接受的 RNA 质量，如通过 PBGD 信号所测得的，并视作无测试结果。下面的表 15 总结了得到了验证结果的 52 个淋巴结的结果：

		无IHC的H&E (+)		
		(+)	(-)	
测定标志物	+	29	1	灵敏度 =100% 特异性 = 96% PPV = 97% NPV =100%
	-	0	22	
		29	23	

当前反应条件包括：  
乳腺淋巴结测定组分

## 主混合物

组分	单位	主混合物中的浓度	加至浓度 MM	在 25 $\mu$ l 中的最终 浓度 (from MM)
N, N-二(羟乙基)甘氨酸	mM	125	125	50
KOH	mM	48	48	19.2
醋酸钾	mM	287.5	287.5	115
D (+) 海藻糖	mM	375	375	150
Tris-Cl pH 8	mM	135	125	50
牛白蛋白	mg/ml	0.5	0.5	0.2 mg/ml
MnSO <sub>4</sub>	mM	7.5	7.5	3.0
MgCl <sub>2</sub>	mM	3.125	3.125	1.25
吐温 20	%	0.5%	0.5%	0.2%
ProClin 300	%	0.08%	0.08%	0.08%
甘油	%	15.0%	15.0%	6.0%
dNTP 混合物	mM	0.5	0.5	0.2
CK19 探针	nm	500	500	200
MgA 探针	nm	500	500	200
B305D 探针	nm	500	500	200
CK19 5'-3' 引物	nm	1125	1125	450
CK19 3'-5' 引物	nm	1125	1125	450
MgA 5'-3' 引物	nm	1125	1125	450
MgA 3'-5' 引物	nm	1125	1125	450
PBGS 5'-3' 引物	nm	750	750	300
PBGS 3'-5' 引物	nm	750	750	300

Tth 储存缓冲液		在 BM 体积中的浓度		
	单位	原液浓度	来自储存 缓冲液	其它的 (推荐的 EM 制剂)
Tth 聚合酶	单位	5/ $\mu$ l		
TP6-25 Ab	mg	1 mg		
甘油	%	50%	6.5%	3.5%
Tris-HCl	mM	10	1.3	9.0
KCl	mM	300	39.0	0
EDTA	mM	0.1	0.01	0.0
Triton X-100	%	0.1%	0.01%	0.0
二硫苏糖醇 (DTT)	mM	1	0.1	0.0
NaPO <sub>4</sub>	mM	20	2.6	x
NaCl	mM	150	19.5	x

7.69230769

<110> Veridex LLC  
Atkins, David  
Backus, John  
Belly, Robert  
Rosen, Steven  
White, Robert

<120> 诊断或预测乳腺癌的进程

<130> VDX5005WOPCT

<150> US 60/577,155

<151> 2004-06-04

<160> 55

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 503

<212> DNA

<213> 人

<400> 1  
gacagcggct tccttgatcc ttgccacccg cgactgaaca ccgacagcag cagcctcacc 60  
atgaagttgc tgatggctct catgctggcg gccctctccc agcactgcta cgcaggctct 120  
ggctgcccct tattggagaa tgtgatttcc aagacaatca atccacaagt gtctaagact 180  
gaatacaaag aacttcttca agagttcata gacgacaatg cactacaaa tgccatagat 240  
gaattgaagg aatgttttct taaccaaacy gatgaaactc tgagcaatgt tgaggtgttt 300  
atgcaattaa tatatgacag cagtctttgt gattttatfff aactttctgc aagacctttg 360  
gctcacagaa ctgcagggta tggtagaaa ccaactacgg attgctgcaa accacacctt 420  
ctctttctta tgtcttttta ctacaaacta caagacaatt gttgaaacct gctatacatg 480  
tttattttaa taaattgatg gca 503

<210> 2

<211> 1513

<212> DNA

<213> 人

<400> 2  
cgccccctgac accattcttc ccttcccccc tccaccggcc gcgggcataa aaggcgccag 60  
gtgagggcct cgccgctcct cccgcgaatc gcagcttctg agaccagggt tgctccgtcc 120  
gtgctccgcc tcgccatgac ttctacagc tctcggcagt cgtcggccac gtcgtccttc 180  
ggaggcctgg gcggcggtc cgtgcgtttt gggccggggg tcgcctttcg cgcgccagc 240  
attcacgggg gctccggcgg ccgcggcgta tccgtgtcct ccgcccgtt tgtgtcctcg 300  
tcctcctcgg gggcctacgg cggcggctac ggcggcgctc tgaccgcgtc cgacgggctg 360  
ctggcgggca acgagaagct aaccatgcag aacctcaac accgcctggc ctctacctg 420  
gacaagggtg gcgccctgga ggcggccaac ggcgagctag aggtgaagat ccgcgactgg 480

taccagaagc aggggcctgg gccctcccgc gactacagcc actactacac gaccatccag 540  
gacctgcggg acaagattct tggtgccacc attgagaact ccaggattgt cctgcagatc 600  
gacaatgccc gtctggctgc agatgacttc cgaaccaagt ttgagacgga acaggctctg 660  
cgcatgagcg tggaggccga catcaacggc ctgcgaggg tgctggatga gctgaccctg 720  
gccaggaccg acctggagat gcagatcgaa ggcctgaagg aagagctggc ctacctgaag 780  
aagaaccatg aggaggaaat cagtacgctg aggggccaag tgggaggcca ggtcagtgtg 840  
gaggtgatt ccgctccggg caccgatctc gccaagatcc tgagtgacat gcgaagccaa 900  
tatgaggcca tggccgagca gaaccggaag gatgctgaag cctggttcac cagccggact 960  
gaagaattga accgggaggt cgctggccac acggagcagc tccagatgag caggctccgag 1020  
gttactgacc tgcggcgcac ccttcagggt ctgagattg agctgcagtc acagctgagc 1080  
atgaaagctg ccttggaga cacactggca gaaacggagg cgcgctttgg agcccagctg 1140  
gcgcatatcc aggcgctgat cagcgggtatt gaagcccagc tgggcatgt gcgagctgat 1200  
agtgagcggc agaatcagga gtaccagcgg ctcatggaca tcaagtcgcy gctggagcag 1260  
gagattgcca cctaccgag cctgctcgag ggacaggaag atcactacaa caatttgtct 1320  
gcctccaagg tcctctgagg cagcaggctc tggggcttct gctgtccttt ggaggggtgc 1380  
ttctgggtag agggatggga aggaaggac ccttaccccc ggctcttctc ctgacctgcc 1440  
aataaaaatt tatggtccaa gggaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1500  
aaaaaaaaaa aaa 1513

<210> 3  
<211> 620  
<212> DNA  
<213> 人

<400> 3  
ggggacttct tctctgggac acattgcctt ctgttttctc cagcatgcyt ttgctccagc 60  
tcctgttcag ggccagccct gccaccctgc tcctggttct ctgcctgcag ttgggggcca 120  
acaaagctca ggacaacact cggaagatca taataaagaa ttttgacatt cccaagtcag 180  
tacgtccaaa tgacgaagtc actgcagtc ttgcagttca aacagaattg aaagaatgca 240  
tgggtggttaa aacttacctc attagcagca tccctctaca aggtgcattt aactataagt 300  
atactgectg cctatgtgac gacaatcaa aaaccttcta ctgggacttt tacaccaaca 360  
gaactgtgca aattgcagcc gtcgttgatg ttattcggga attagcatc tgcctgatg 420  
atgctgctgt aatccccatc aaaaacaatc ggttttatac tattgaaatc ctaaaggtag 480  
aataatggaa gccctgtctg tttgccacac ccaggtgatt tcctctaaag aaacttggct 540  
ggaatttctg ctgtggtcta taaaataaac ttcttaacat gcttctcctg aaaaaaaaaa 600  
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 620

<210> 4

<211> 1155  
 <212> DNA  
 <213> 人

<400> 4  
 atggtggttg aggttgattc catgccggct gcctcttctg tgaagaagcc atttggtctc 60  
 aggagcaaga tgggcaagtg gtgctgccgt tgcttcccct gctgcagga gagcggcaag 120  
 agcaacgtgg gcacttctgg agaccacgac gactctgcta tgaagacact caggagcaag 180  
 atgggcaagt ggtgccgcca ctgcttcccc tgctgcaggg ggagtggcaa gagcaacgtg 240  
 ggcgcttctg gagaccacga cgactctgct atgaagacac tcaggaaca gatgggcaag 300  
 tggtgctgcc actgcttccc ctgctgcagg gggagcagca agagcaaggt gggcgcttgg 360  
 ggagactacg atgacagtgc cttcatggag cccaggtacc acgtccgtgg agaagatctg 420  
 gacaagctcc acagagctgc ctggtggggg aaagtcccc aagagatct catcgtcatg 480  
 ctcagggaca ctgacgtgaa caagcaggac aagcaaaaga ggactgctct acatctggcc 540  
 tctgccaatg ggaattcaga agtagtaaaa ctctgctgg acagacgatg tcaacttaat 600  
 gtccttgaca acaaaaagag gacagctctg ataaaggccg tacaatgcca ggaagatgaa 660  
 tgtgcgttaa tgttgctgga acatggcact gatccaaata ttccagatga gtatggaaat 720  
 accactctgc actacgctat ctataatgaa gataaattaa tggccaaagc actgctctta 780  
 tatggtgctg atatcgaatc aaaaaacaag catggcctca caccactggt acttgggtga 840  
 catgagcaaa aacagcaagt cgtgaaattt ttaattaaga aaaaagcga ttaaatgca 900  
 ctggatagat atggaaggac tgctctcata cttgctgtat gttgtggatc agcaagtata 960  
 gtcagccttc tacttgagca aaatattgat gtatcttctc aagatctatc tggacagacg 1020  
 gccagagagt atgctgttct tagtcatcat catgtaattt gccagttact ttctgactac 1080  
 aaagaaaaac agatgctaaa aatctcttct gaaaacagca atccagaaaa tgtctcaaga 1140  
 accagaaata aataa 1155

<210> 5  
 <211> 3859  
 <212> DNA  
 <213> 人

<400> 5  
 tccgagctga ttacagacac caaggaagat gctgtaaaga gtcagcagcc acagccctgg 60  
 cttagctggcc ctgtgggcat ttattagtaa agttttaatg acaaaagctt tgagtcaaca 120  
 caccctgagg taattaacct ggtcatcccc accctggaga gccatcctgc ccatgggtga 180  
 tcaaagaagg aacatctgca ggaacacctg atgaggctgc acccttggcg gaaagaacac 240  
 ctgacacagc tgaagcttg gtggaaaaaa cacctgatga ggctgcacc ttggtggaaa 300  
 gaacacctga cacggctgaa agcttgggtg aaaaaacacc tgatgaggct gcatccttgg 360  
 tggagggaac atctgacaaa attcaatggt tggagaaagc gacatctgga aagttcgaac 420  
 agtcagcaga agaaacacct agggaaatta cgagtcctgc aaaagaaaca tctgagaaat 480

ttacgtggcc agcaaaagga agacctagga agatcgcctg ggagaaaaaa gaagacacac	540
ctagggaaat tatgagtccc gcaaaagaaa catctgagaa atttacgtgg gcagcaaaag	600
gaagacctag gaagatcgca tgggagaaaa aagaaacacc tgtaaagact ggatgcgtgg	660
caagagtaac atctaataaa actaaagttt tggaaaaagg aagatctaag atgattgcat	720
gtcctacaaa agaatacctt acaaaagcaa gtgccaatga tcagaggttc ccatcagaat	780
ccaaacaaga ggaagatgaa gaatattctt gtgattctcg gagtctcttt gagagtcttg	840
caaagattca agtgtgtata cctgagtcta tatatcaaaa agtaatggag ataaatagag	900
aagtagaaga gcctcctaag aagccatctg ccttcaagcc tgccattgaa atgcaaaact	960
ctgttccaaa taaagccttt gaattgaaga atgaacaaac attgagagca gatccgatgt	1020
tcccaccaga atccaaacaa aaggactatg aagaaaattc ttgggattct gagagtctct	1080
gtgagactgt ttcacagaag gatgtgtgtt tacccaaggc tacacatcaa aaagaaatag	1140
ataaaataaa tggaaaatta gaagagtctc ctaataaaga tggcttcttg aaggctacct	1200
gcggaatgaa agtttctatt ccaactaaag ccttagaatt gaaggacatg caaactttca	1260
aagcagagcc tccggggaag ccatctgcct tcgagcctgc cactgaaatg caaaagtctg	1320
tcccaataa agccttgga tggaaaatg aacaaacatt gagagcagat gagatactcc	1380
catcagaatc caaacaaaag gactatgaag aaagttcttg ggattctgag agtctctgtg	1440
agactgtttc acagaaggat gtgtgtttac ccaaggctcc atcaaaaaga aatagataaa	1500
ataaatggaa aattagaagg gtctcctggt aaagatggtc ttctgaaggc taactgcgga	1560
atgaaagttt ctattccaac taaagcctta gaattgatgg acatgcaaac tttcaaagca	1620
gagctcccc agaagccatc tgccttcgag cctgccattg aaatgcaaaa gtctgttcca	1680
aataaagcct tggaaatgaa gaatgaacaa acattgagag cagatgagat actcccatca	1740
gaatccaaac aaaaggacta tgaagaaagt tcttgggatt ctgagagtct ctgtgagact	1800
gtttcacaga aggatgtgtg tttacccaag gctccatcaa aaagaaatag ataaaataaa	1860
tggaaaatta gaagagtctc ctgataatga tggtttctg aaggctccct gcagaatgaa	1920
agtttctatt ccaactaaag ccttagaatt gatggacatg caaactttca aagcagagcc	1980
tcccgagaag ccatctgcct tcgagcctgc cattgaaatg caaaagtctg ttccaaataa	2040
agccttgga tgaagaatg aacaaacatt gagagcagat cagatgttcc cttcagaatc	2100
aaaacaaaag aagttgaaga aaattcttgg gattctgaga gtctccgtga gactgtttca	2160
cagaaggatg tgtgtgtacc caaggctaca catcaaaaag aaatggataa aataagtgga	2220
aaattagaag attcaactag cctatcaaaa atcttgata cagttcattc ttgtgaaaga	2280
gcaagggaac ttcaaaaaga tcaactgtgaa caacgtacag gaaaaatgga acaaatgaaa	2340
aagaagtttt gtgtactgaa aaagaaactg tcagaagcaa aagaaataaa atcacagtta	2400
gagaaccaa aagttaaatg ggaacaagag ctctgcagtg tgagattgac tttaaaccaa	2460

gaagaagaga agagaagaaa tgccgatata ttaaataaaa aaattagga agaattagga	2520
agaatcgaag agcagcatag gaaagagtta gaagtgaac aacaactga acaggctctc	2580
agaatacaag atatagaatt gaagagtgtta gaaagtaatt tgaatcaggt ttctcacact	2640
catgaaaatg aaaattatct cttacatgaa aattgcatgt tgaaaaagga aattgccatg	2700
ctaaaactgg aaatagccac actgaaacac caataccagg aaaaggaaaa taaatacttt	2760
gaggacatta agattttaaa agaaaagaat gctgaacttc agatgaccct aaaactgaaa	2820
gaggaatcat taactaaaag ggcattctcaa tatagtggc agcttaaagt tctgatagct	2880
gagaacacaa tgctcacttc taaattgaag gaaaaacaag acaaagaaat actagaggca	2940
gaaattgaat cacaccatcc tagactggct tctgctgtac aagaccatga tcaaattgtg	3000
acatcaagaa aaagtcaaga acctgcttc cacattgcag gagatgcttg tttgcaaaga	3060
aaaatgaatg ttgatgtgag tagtacgata tataacaatg aggtgctcca tcaaccactt	3120
tctgaagctc aaaggaaatc caaaagccta aaaattaatc tcaattatgc ggagatgctc	3180
taagagaaaa tacattgggt tcagaacatg cacaaagaga ccaacgtgaa acacagtgtc	3240
aaatgaagga agctgaacac atgtatcaaa acgaacaaga taatgtgaac aaacacactg	3300
aacagcagga gtctctagat cagaaattat ttcaactaca aagcaaaaat atgtggcttc	3360
aacagcaatt agttcatgca cataagaaag ctgacaacaa aagcaagata acaattgata	3420
ttcattttct tgagaggaaa atgcaacatc atctcctaaa agagaaaaat gaggagatat	3480
ttaattacaa taaccattta aaaaaccgta tatatcaata tgaaaaagag aaagcagaaa	3540
cagaaaactc atgagagaca agcagtaaga aacttctttt ggagaaacaa cagaccagat	3600
ctttactcac aactcatgct aggaggccag tcctagcatc accttatggt gaaaatctta	3660
ccaatagtct gtgtcaacag aatacttatt ttagaagaaa aattcatgat ttcttcctga	3720
agcctacaga cataaaataa cagtgtgaag aattacttgt tcacgaattg cataaagctg	3780
cacaggattc ccatctacc tgatgatgca gcagacatca ttcaatccaa ccagaatctc	3840
gctctgtcac tcaggctgg	3859

<210> 6  
 <211> 3282  
 <212> DNA  
 <213> 人

<400> 6	
gggacagggc tgaggatgag gagaaccctg gggaccaga agaccgtgcc ttgcccggaa	60
gtcctgcctg taggcctgaa ggacttgccc taacagagcc tcaacaacta cctggtgatt	120
cctacttcag cccttggtg tgagcagctt ctcaacatga actacagcct ccacttgccc	180
ttcgtgtgtc tgagtctctt cactgagagg atgtgcatcc aggggagtca gttcaacgtc	240
gaggtcggca gaagtgacaa gctttccctg cctggctttg agaacctcac agcaggatat	300
aacaaatctc tcaggcccaa ttttggtgga gaaccgtac agatagcgtc gactctggac	360

attgcaagta tctctagcat ttcagagagt aacatggact acacagccac catatacctc	420
cgacagcgct ggatggacca gcggtggtg tttgaaggca acaagagctt cactctggat	480
gcccgcctcg tggagttcct ctgggtgcca gatacttaca ttgtggagtc caagaagtec	540
ttcctccatg aagtcactgt gggaaacagg ctcatccgcc tcttctcaa tggcacggtc	600
ctgtatgccc tcagaatcac gacaactgtt gcatgtaaca tggatctgtc taaatacccc	660
atggacacac agacatgcaa gttgcagctg gaaagctggg gctatgatgg aaatgatgtg	720
gagttcacct ggctgagagg gaacgactct gtgcgtggac tggaacacct gcggcttgc	780
cagtacacca tagagcggta tttcacctta gtcaccagat cgcagcagga gacaggaaat	840
tacactagat tggctttaca gtttgagctt cggaggaatg ttctgtattt cattttggaa	900
acctacgttc cttccacttt cctggtgggtg ttgtcctggg tttcattttg gatctctctc	960
gattcagtcc ctgcaagaac ctgcattgga gtgacgaccg tgttatcaat gaccacactg	1020
atgatcgggt cccgcacttc tcttcccaac accaactgct tcatcaaggc catcgatgtg	1080
tacctgggga tctgctttag ctttggtttt ggggccttgc tagaatatgc agttgctcac	1140
tacagttcct tacagcagat ggcagccaaa gataggggga caacaaagga agtagaagaa	1200
gtcagtatta ctaatatcat caacagctcc atctccagct ttaaaccgaa gatcagcttt	1260
gccagcattg aaatttccag cgacaacggt gactacagt acttgacaat gaaaaccagc	1320
gacaagttca agtttgtctt ccgagaaaaag atgggcagga ttggtgatta tttcacaatt	1380
caaaacccca gtaatgttga tcaactattcc aaactactgt ttcctttgat ttttatgcta	1440
gccaatgtat tttactgggc atactacatg tatttttgag tcaatgttaa atttcttgca	1500
tgccataggt cttcaacagg acaagataat gatgtaaatg gtattttagg ccaagtgtgc	1560
accacatcc aatggtgcta caagtgactg aaataatatt tgagtctttc tgctcaagaa	1620
atgaagctcc aaccattggt ctaagctgtg tagaagtcct agcattatag gatcttgtaa	1680
tagaaacatc agtccattcc tctttcatct taatcaagga cattcccatg gagcccaaga	1740
ttacaaatgt actcagggct gtttattcgg tggctcctg gtttgcattt acctcatata	1800
aagaatggga aggagaccat tgggtaacc tcaagtgtca gaagttgttt ctaaagtaac	1860
tatacatggt ttttactaaa tctctgcagt gcttataaaa tacattgttg cctatttagg	1920
gagtaacatt ttctagtttt tgtttctggt taaaatgaaa tatgggctta tgtcaattca	1980
ttggaagtca atgcactaac tcaataccaa gatgagtttt taaataatga atattattta	2040
ataccacaac agaattatcc ccaatttcca ataagtccta tcattgaaaa ttcaaatata	2100
agtgaagaaa aaattagtag atcaacaatc taaacaaatc cctcggttct aagatacaat	2160
ggattcccca tactggaagg actctgaggc tttattcccc cactatgcat atcttatcat	2220
tttattatta tacacacatc catcctaaac tatactaaag cctttttccc atgcatggat	2280
ggaaatggaa gatTTTTTtg taacttgttc tagaagtctt aatatgggct gttgccatga	2340
aggcttgag aattgagtc attttctagc tgcctttatt cacatagtga tggggtacta	2400



```

aaagtactgg gttgactcag agagtcgctg tcattctgtc attgctgcta ctctaact 2460
gagcaact ctcccagtg cagatcccc gtatcattcc aagaggagca ttcattccct 2520
tgctctaata atcaggaatg atgcttatta gaaaacaaac tgcttgacc aggaacaagt 2580
ggcttagctt aagtaaactt ggctttgctc agatccctga tccttcagc tggctgctc 2640
tgagtggctt atccccgatg agcaggagcg tgctggccct gagtactgaa ctttctgagt 2700
aacaatgaga cacgttacag aacctatgtt caggttgctg gtgagctgcc ctctccaaat 2760
ccagccagag atgcacattc ctcgccagc ctccagccac agtaccaaaa gtgatttttg 2820
agtgtgccag ggtaaaggct tccagttcag cctcagttat tttagacaat ctcccatct 2880
ttaatttctt agcttctgt tctaataaat gcacggcttt acctttcctg tcagaaataa 2940
accaaggctc taaaagatga ttcccttct gtaactccct agagccacag gttctcattc 3000
ctttcccat tatacttctc acaattcagt ttctatgagt ttgatcacct gatttttta 3060
acaaaatatt tctaacggga atgggtggga gtgctggtga aaagagatga aatgtggtg 3120
tatgagccaa tcatatttgt gatttttta aaaaagtta aaaggaaata tctgttctga 3180
aaccctactt aagcattgtt tttatataaa aacaatgata aagatgtgaa ctgtgaaata 3240
aatataccat attagctacc caccaaaaaa aaaaaaaaaa aa 3282

```

```

<210> 7
<211> 1894
<212> DNA
<213> 人

```

```

<400> 7
gtctgacttc ctcccagcac attcctgcac tctgccgtgt ccactgccc ccacagacc 60
agtcctccaa gcctgctgcc agctccctgc aagcccctca ggttgggctt tgccaggtg 120
ccagcaggca gccctgggct ggggtaggg gactccctac aggcacgcag ccctgagacc 180
tcagagggcc acccctgag ggtggccagg ccccagtg ccaacctgag tgctgcctt 240
gccaccagcc ctgctggccc ctggtccgc tggccccca gatgcctggc tgagacacgc 300
cagtggcctc agctgcccac acctctccc gggccctgaa gttggcactg cagcagacag 360
ctccctgggc accaggcagc taacagacac agccgccagc ccaaacagca gcggcatggg 420
cagcgcagc ccgggtctga gcagcgtatc cccagccac ctctgctgc ccccgcacac 480
ggtgtcgcgg acaggcttg agaaggcggc agcggggca gtgggtctcg agagcggga 540
ctggagtccc agtccaccg ccacgccga gcaggcctg tccgccttct acctctccta 600
ctttgacatg ctgtaccctg aggacagcag ctgggcagcc aaggcccctg gggccagcag 660
tcgggaggag ccacctgagg agcctgagca gtgcccgtc attgacagcc aagcccagc 720
gggcagcctg gacttgggtc ccggcgggct gacctggag gacactcgc tggagcaggt 780
gcagtccatg gtggtggcg aagtgtcaa ggacatcag acggcctgca agctgtcaa 840
catcaccgca gatccatgg actggagccc cagcaatgtg cagaagtggc tcctgtggac 900

```

```

agagcaccaa taccggctgc ccccatggg caaggccttc caggagctgg cgggcaagga 960
gctgtgcgcc atgtcggagg agcagttccg ccagcgtcgc cccctgggtg gggatgtgct 1020
gcacgcccac ctggacatct ggaagtcagc ggcctggatg aaagagcggg cttcacctgg 1080
ggcgattcac tactgtgcct cgaccagtga ggagagctgg accgacagcg aggtggactc 1140
atcatgctcc gggcagccca tccacctgtg gcagttcctc aaggagttgc tactcaagcc 1200
ccacagctat ggccgcttca ttaggtggct caacaaggag aagggcatct tcaaaattga 1260
ggactcagcc caggtggccc ggctgtgggg catccgcaag aaccgtcccg ccatgaaacta 1320
cgacaagctg agccgctcca tccgccagta ttacaagaag ggcacatcc ggaagccaga 1380
catctcccag cgctcgtct accagttcgt gcaccccatc tgagtgcctg gccagggcc 1440
tgaaacccgc cctcaggggc ctctctcctg cctgcctgc ctcagccagg cctgagatg 1500
ggggaaaacg ggcagtctgc tctgctgctc tgacctcca gagcccaagg tcagggaggg 1560
gcaaccaact gccccagggg gatatgggtc ctctggggcc ttcgggacca tggggcaggg 1620
gtgcttcctc ctcaggccca gctgctccc tggaggacag agggagacag ggctgctccc 1680
caacacctgc ctctgacccc agcatttcca gagcagagcc tacagaaggg cagtgactcg 1740
acaaggcca caggcagtcc aggcctctct ctgctccatc cccctgcctc ccattctgca 1800
ccacacctgg catggtgcag ggagacatct gcaccctga gttgggcagc caggagtgcc 1860
cccggaatg gataataaag atactagaga actg 1894

```

```

<210> 8
<211> 1377
<212> DNA
<213> 人

```

```

<400> 8
cacacagcct actttccaag cggagccatg tctggtaacg gcaatgcggc tgcaacggcg 60
gaagaaaaca gccc aaagat gagagtgatt cgcgtgggta cccgcaagag ccagcttgct 120
cgcatacaga cggacagtgt ggtggcaaca ttgaaagcct cgtaccctgg cctgcagttt 180
gaaatcattg ctatgtccac cacaggggac aagattcttg atactgact ctctaagatt 240
ggagagaaaa gcctgtttac caaggagcct gaacatgccc tggagaagaa tgaagtggac 300
ctggttgttc actccttgaa ggacctgcc actgtgcttc ctctggctt caccatcgga 360
gccatctgca agcgggaaaa ccctcatgat gctgttgtct ttcacccaaa atttgttggg 420
aagaccctag aaaccctgcc agagaagagt gtggtgggaa ccagctccct gcgaagagca 480
gcccagctgc agagaaagt cccgcatctg gagttcagga gtattcgggg aaacctcaac 540
accggcttc ggaagctgga cgagcagcag gagttcagtg ccatcatcct agcaacagct 600
ggcctgcagc gcatgggctg gcacaaccgg gtggggcaga tctgcaccc tgagaaatgc 660
atgtatctg tgggccaggg ggccttgggc gtggaagtgc gagccaagga ccaggacatc 720
ttgatctgg tgggtgtgct gcacgatccc gagactctgc ttcgctgcat cgctgaaagg 780

```

gccttcctga ggcacctgga aggaggctgc agtgtgccag tagccgtgca tacagctatg	840
aaggatgggc aactgtacct gactggagga gtctggagtc tagacggctc agatagcata	900
caagagacca tgcaggctac catccatgtc cctgcccagc atgaagatgg ccctgaggat	960
gaccacagt tggtaggcat cactgctcgt aacattccac gagggcccca gttggctgcc	1020
cagaacttgg gcatcagcct ggccaacttg ttgctgagca aaggagccaa aaacatcctg	1080
gatgttgac ggcagcttaa cgatgcccat taactggttt gtggggcaca gatgcctggg	1140
ttgctgctgt ccagtgccta catcccgggc ctcagtgcc cattctcact gctatctggg	1200
gagtgattac cccgggagac tgaactgcag gttcaagct ttccagggat ttgcctcacc	1260
ttggggcctt gatgactgcc ttgcctctc agtatgtggg ggcttcatct ctttagagaa	1320
gtccaagcaa cagectttga atgtaaccaa tctactaat aaaccagttc tgaaggt	1377
<210> 9	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人	
<400> 9	
agttgctgat ggtcctcatg c	21
<210> 10	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> 人	
<400> 10	
atcacattct ccaataaggg gca	23
<210> 11	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人	
<400> 11	
ccctctcca gcactgctac gcatt	25
<210> 12	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 人	
<400> 12	
cacccttcag ggtcttgaga tt	22
<210> 13	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人	
<400> 13	
tccgtttctg ccagtgtgtc	20

<210> 14	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> 人	
<400> 14	
acagctgagc atgaaagctg cctttt	26
<210> 15	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 人	
<400> 15	
gcctactttc caagcggagc ca	22
<210> 16	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人	
<400> 16	
ttgcgggtac ccacgcgaa	19
<210> 17	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> 人	
<400> 17	
aacggcaatg cggctgcaac ggcggaa	27
<210> 18	
<211> 29	
<212> DNA	
<213> 人	
<400> 18	
caaacgatg aaactctgag caatgttga	29
<210> 19	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> 人	
<400> 19	
tctgtgagcc aaaggtcttg caga	24
<210> 20	
<211> 36	
<212> DNA	
<213> 人	
<400> 20	
tgtttatgca attaatatat gacagcagtc tttgtg	36
<210> 21	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人	

<400> 21 agatgagcag gtccgaggtt a	21
<210> 22 <211> 23 <212> DNA <213> 人	
<400> 22 cctgattctg ccgctcacta tca	23
<210> 23 <211> 29 <212> DNA <213> 人	
<400> 23 acccttcagg gtcttgagat tgagctgca	29
<210> 24 <211> 21 <212> DNA <213> 人	
<400> 24 gcaagtgccca atgatcagag g	21
<210> 25 <211> 23 <212> DNA <213> 人	
<400> 25 atatagactc aggtatacac act	23
<210> 26 <211> 27 <212> DNA <213> 人	
<400> 26 tcccatcaga atccaaacaa gaggaag	27
<210> 27 <211> 21 <212> DNA <213> 人	
<400> 27 tctgataaag gccgtacaat g	21
<210> 28 <211> 22 <212> DNA <213> 人	
<400> 28 tcacgacttg ctgtttttgc tc	22

<210> 29		
<211> 27		
<212> DNA		
<213> 人		
<400> 29		
atcaaaaaac aagcatggcc tcacacc		27
<210> 30		
<211> 21		
<212> DNA		
<213> 人		
<400> 30		
gcttggtggt taaaacttac c		21
<210> 31		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> 人		
<400> 31		
tgaacagttc tgttggtgta		20
<210> 32		
<211> 27		
<212> DNA		
<213> 人		
<400> 32		
ctgcctgcct atgtgacgac aatccgg		27
<210> 33		
<211> 22		
<212> DNA		
<213> 人		
<400> 33		
gccgcttcat taggtggctc aa		22
<210> 34		
<211> 22		
<212> DNA		
<213> 人		
<400> 34		
agcggctcag cttgtcgtag tt		22
<210> 35		
<211> 35		
<212> DNA		
<213> 人		
<400> 35		
aaggagaagg gcatcttcaa aattgaggac tcagc		35
<210> 36		
<211> 20		
<212> DNA		

<213> 人	
<400> 36 caattttggt ggagaacctg	20
<210> 37 <211> 20 <212> DNA <213> 人	
<400> 37 gctgtcggag gtatatggtg	20
<210> 38 <211> 28 <212> DNA <213> 人	
<400> 38 catttcagag agtaacatgg actacaca	28
<210> 39 <211> 22 <212> DNA <213> 人	
<400> 39 ctgcttcgct gcatcgctga aa	22
<210> 40 <211> 22 <212> DNA <213> 人	
<400> 40 cagactcctc cagtcaggta ca	22
<210> 41 <211> 30 <212> DNA <213> 人	
<400> 41 cctgaggcac ctggaaggag gctgcagtgt	30
<210> 42 <211> 25 <212> DNA <213> 人	
<400> 42 cggatgaaac tctgagcaat gttga	25
<210> 43 <211> 23 <212> DNA <213> 人	
<400> 43 gagccaaagg tcttgcagaa agt	23

<210> 44	
<211> 36	
<212> DNA	
<213> 人	
<400> 44	
tgtttatgca attaatatat gacagcagtc tttgtg	36
<210> 45	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 人	
<400> 45	
gcactgctac gcaggctctg gc	22
<210> 46	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人	
<400> 46	
gcagctttca tgctcagctg t	21
<210> 47	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人	
<400> 47	
cacccttcag ggtcttgaga	20
<210> 48	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人	
<400> 48	
tccgtttctg ccagtgtgtc	20
<210> 49	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> 人	
<400> 49	
gctgagcatg aaagctgcct tgga	24
<210> 50	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人	
<400> 50	
cacccttcag ggtcttgaga t	21
<210> 51	
<211> 22	



---

<212> DNA  
<213> 人  
<400> 51  
acccttcagg gtcttgagat tg 22

<210> 52  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> 人  
<400> 52  
acccttcagg gtcttgagat tga 23

<210> 53  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> 人  
<400> 53  
ctccgtttct gccagtgtgt 20

<210> 54  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> 人  
<400> 54  
accacgcga atcactctca 20

<210> 55  
<211> 19  
<212> DNA  
<213> 人  
<400> 55  
caagcggagc catgtctg 19

图 1