



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 114703288 B

(45) 授权公告日 2022.09.13

(21) 申请号 202210631750.3

C12N 15/11 (2006.01)

(22) 申请日 2022.06.06

(56) 对比文件

(65) 同一申请的已公布的文献号

CN 114277142 A, 2022.04.05

申请公布号 CN 114703288 A

审查员 徐丹

(43) 申请公布日 2022.07.05

(73) 专利权人 珠海圣美生物诊断技术有限公司

地址 519000 广东省珠海市香洲区同昌路
266号3栋3层

(72) 发明人 齐盼盼 唐东江

(74) 专利代理机构 北京超凡宏宇专利代理事务

所(特殊普通合伙) 11463

专利代理师 宋南

(51) Int. Cl.

C12Q 1/6886 (2018.01)

权利要求书1页 说明书14页

C12Q 1/6851 (2018.01)

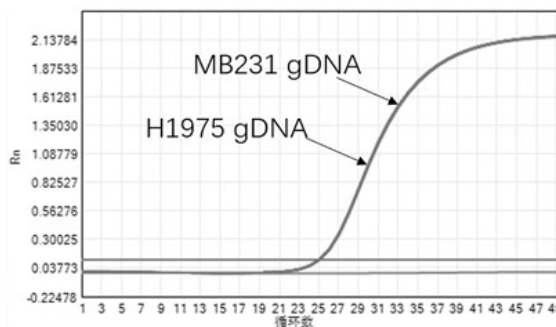
序列表6页 附图6页

(54) 发明名称

用于扩增EGFR-T790M基因变异的blocker探针、引物组及其应用

(57) 摘要

本发明涉及基因检测技术领域,尤其是涉及用于扩增EGFR-T790M基因变异的blocker探针、引物组及其应用。本发明提供的blocker探针长度小于20nts,同时突变位点两侧1或2nts范围内的锁核酸修饰又能够保证其与野生型模板结合的热稳定性。此外,本发明还提供了用于扩增EGFR-T790M基因变异的引物组,该引物组包含上述blocker探针,同时还包括与该blocker探针搭配使用的两条上游引物,两条上游引物的设置能够避免SNP位点rs1050171存在G>A突变时,假阴性结果的出现。



1. 用于扩增EGFR-T790M基因变异的blocker探针,其特征在於,所述blocker探针的核苷酸序列选自SEQ ID No.1~4中任一种,SEQ ID No.1所示核苷酸序列为CTCATCACGCCAGCTC,SEQ ID No.2所示核苷酸序列为CTCATCACGCCAGCTC,SEQ ID No.3所示核苷酸序列为CTCATCACGCCAGCTCATG,SEQ ID No.4所示核苷酸序列为CTCATCACGCCAGCTCATG;所述blocker探针的3'端经过延伸阻断修饰,所述blocker探针中斜体并字体加粗标出的核苷酸对应突变位点,下划线表示该核苷酸经过锁核酸修饰。

2. 用于扩增EGFR-T790M基因变异的引物组,其特征在於,所述引物组包括权利要求1所述的blocker探针、两条上游引物和至少一条下游引物;

所述两条上游引物的核苷酸序列均覆盖EGFR-T790M基因前的SNP位点rs1050171,其中第一上游引物的核苷酸序列为 $X_{m1}AX_{n1}$,所述 X_{m1} 为rs1050171位点上游m1个与EGFR-T790M基因片段匹配核苷酸,所述 X_{n1} 为rs1050171位点下游n1个与EGFR-T790M基因片段匹配核苷酸,第二上游引物的核苷酸序列为 $X_{m2}GX_{n2}$,所述 X_{m2} 为rs1050171位点上游m2个与EGFR-T790M基因片段匹配核苷酸,所述 X_{n2} 为rs1050171位点下游n2个与EGFR-T790M基因片段匹配核苷酸,所述n1和n2均选自3~7中任意数值;

所述两条上游引物的3'端与blocker探针的5'端存在核苷酸重叠,重叠的核苷酸数量为1~7。

3. 根据权利要求2所述的引物组,其特征在於,所述引物组还包括荧光探针,所述荧光探针结合EGFR-T790M基因的反义链。

4. 权利要求1所述blocker探针或权利要求2或3所述引物组的用途,所述用途包括:

- (1) 制备选择性扩增EGFR-T790M基因突变型的制剂、PCR反应体系或试剂盒;或者,
- (2) EGFR-T790M基因突变型检测前扩增富集;或者,
- (3) EGFR-T790M基因突变型检测前建库。

5. 非诊断目的的EGFR-T790M基因突变型选择性扩增方法,其特征在於,使用权利要求1所述blocker探针或权利要求2或3所述引物组配置PCR反应体系,待扩增样本经变性、退火和延伸后,分析扩增产物;

所述退火温度和延伸温度相同,选自54~62℃。

用于扩增EGFR-T790M基因变异的blocker探针、引物组及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及基因检测技术领域,尤其是涉及用于扩增EGFR-T790M基因变异的blocker探针、引物组及其应用。

背景技术

[0002] 目前在qPCR平台上,对肿瘤突变位点检测常用方法为突变扩增系统(amplification refractory mutation system, ARMS)法,本方法的上游引物和blocker为竞争性结合关系,利用引物/blocker与模板间的 T_m 值差使blocker和野生型模板优先结合,引物优先与突变型结合,阻断野生型扩增,不阻断突变型扩增,从而达到富集突变型模板的效果。

[0003] 基于此,申请人于2019年5月21日提交中国专利局、申请号为CN2019104222174、发明名称为“一种用于扩增变异型靶基因片段的非淬灭型寡核苷酸探针及其应用”的中国发明专利申请以及其多件同族发明申请中提供了用于EGFR-T790M基因突变型选择性扩增的blocker探针。

[0004] 然而,在后续使用过程中,申请人发现,(1)由于上述blocker探针过长,使得其在qPCR反应体系中表现较差,对突变型也有明显抑制,无法达到较好效果;(2)T790M位点前存在高频SNP位点rs1050171(G>A),在19.6%的亚洲人中,rs1050171位点是A(G>A),rs1050171的突变状态会影响基于ARMS的EGFR-T790M检测系统的灵敏度,从而产生假阴性或假阳性的结果。

[0005] 鉴于此,特提出本发明。

发明内容

[0006] 本发明的目的在于,在申请人现有EGFR-T790M基因变异的blocker探针基础上,对blocker探针进一步改进,得到迭代的blocker探针和扩增引物组,以进一步提高低频率基因变异的检测灵敏,同时期望该blocker探针能够在qPCR条件下取得不逊于数字PCR或高通量测序的检测效果,从而取得操作简单、成本低、性价比高的优势。

[0007] 为了解决上述技术问题,实现上述目的,本发明提供以下技术方案:

[0008] 第一方面,本发明提供用于扩增EGFR-T790M基因变异的blocker探针,(1)所述blocker探针的核苷酸序列覆盖EGFR-T790M基因突变位点,与野生型EGFR-T790M基因片段完全匹配,与突变型EGFR-T790M基因片段在突变位点错配;(2)所述blocker探针核苷酸序列长度小于20nts,其中突变位点及两侧1或2nts范围内对应碱基经过锁核酸修饰。

[0009] 在可选的实施方式中,所述blocker探针的核苷酸序列从5'端到3'端为(X_m)CACGC(X_n)或与其严格杂交的互补序列,所述 X_m 为突变位点上游m个与野生型EGFR-T790M基因片段完全匹配核苷酸,所述 X_n 为突变位点下游n个与野生型EGFR-T790M基因片段完全匹配核苷酸,所述 $m+n < 15$,所述blocker探针中斜体并字体加粗标出的核苷酸对应突变位点,下划线

表示该核苷酸经过锁核酸修饰,所述突变位点上游的CA和突变位点下游的GC中至少有一个核苷酸经过锁核酸修饰。

[0010] 在可选的实施方式中,所述 $m \leq 6$ 。

[0011] 在可选的实施方式中,所述blocker探针的核苷酸序列选自SEQ ID No.1~4中任一种,SEQ ID No.1所示核苷酸序列为CTCATCACGCCAGCTC,SEQ ID No.2所示核苷酸序列为CTCATCACGCCAGCTC,SEQ ID No.3所示核苷酸序列为CTCATCACGCCAGCTCATG,SEQ ID No.4所示核苷酸序列为CTCATCACGCCAGCTCATGC。

[0012] 在可选的实施方式中,所述blocker探针的3'端经过延伸阻断修饰。

[0013] 第二方面,本发明提供用于扩增EGFR-T790M基因变异的引物组,所述引物组包括前述实施方式任一项所述的blocker探针、两条上游引物和至少一条下游引物;

[0014] 所述两条上游引物的核苷酸序列均覆盖EGFR-T790M基因的SNP位点rs1050171,其中第一上游引物的核苷酸序列为(X_{m1})A(X_{n1}),所述 X_{m1} 为rs1050171位点上游 m_1 个与EGFR-T790M基因片段匹配核苷酸,所述 X_{n1} 为rs1050171位点下游 n_1 个与EGFR-T790M基因片段匹配核苷酸,第二上游引物的核苷酸序列为(X_{m2})G(X_{n2}),所述 X_{m2} 为rs1050171位点上游 m_2 个与EGFR-T790M基因片段匹配核苷酸,所述 X_{n2} 为rs1050171位点下游 n_2 个与EGFR-T790M基因片段匹配核苷酸,所述 n_1 和 n_2 均选自3~7中任意数值。

[0015] 在可选的实施方式中,所述两条上游引物的3'端与blocker探针的5'端存在核苷酸重叠,重叠的核苷酸数量为1~7。

[0016] 在可选的实施方式中,所述引物组还包括荧光探针,所述荧光探针结合EGFR-T790M基因的反义链。

[0017] 第三方面,本发明提供前述实施方式任一项所述blocker探针或前述实施方式任一项所述引物组的用途,所述用途包括:

[0018] (1)制备选择性扩增EGFR-T790M基因突变型的制剂、PCR反应体系或试剂盒;或者,

[0019] (2)EGFR-T790M基因突变型检测前扩增富集;或者,

[0020] (3)EGFR-T790M基因突变型检测前建库。

[0021] 第四方面,本发明提供EGFR-T790M基因突变型选择性扩增方法,使用前述实施方式任一项所述blocker探针或前述实施方式任一项所述引物组配置PCR反应体系,待扩增样本经变性、退火和延伸后,分析扩增产物;

[0022] 所述退火温度和延伸温度相同,选自54~62℃;

[0023] 所述待扩增样本来源于血液、体液、组织、循环肿瘤细胞或者cfDNA。

[0024] 本发明提供的blocker探针长度小于20nts,与引物配合,可显著提高反应的特异性和灵敏度,同时突变位点两侧1或2nts范围内的锁核酸修饰又能够保证其与模板结合的热稳定性,从而提高blocker探针识别突变型和野生型的特异性。

[0025] 本发明还提供了用于扩增EGFR-T790M基因变异的引物组,该引物组包含上述blocker探针,同时还包括与该blocker探针搭配使用的两条上游引物,两条上游引物的设置能够避免SNP位点rs1050171的G>A突变存在情况下,假阴性结果的出现。

[0026] 本发明还提供了使用上述blocker探针或引物组进行EGFR-T790M基因突变型选择性扩增的方法,该方法基于blocker探针与双上游引物的组合,经检测临床样本,制作ROC曲线,结果显示,临床样本的检测结果显示与数字PCR的结果相比,阳性符合率是96.3%,阴性符合

率是95.7%，并且，7.5ng/反应DNA且0.125%突变比例条件下，T790M位点检出率不低于95%，已经达到了数字PCR的检测水平。

附图说明

[0027] 为了更清楚地说明本发明具体实施方式或现有技术中的技术方案，下面将对具体实施方式或现有技术描述中所需要使用的附图作简单地介绍，显而易见地，下面描述中的附图是本发明的一些实施方式，对于本领域普通技术人员来讲，在不付出创造性劳动的前提下，还可以根据这些附图获得其他的附图。

[0028] 图1为本发明实验例1中不加blocker探针时扩增曲线；

[0029] 图2为本发明实验例1中添加blocker探针时扩增曲线；

[0030] 图3为本发明实验例4中使用NCI-H1975模板时的扩增曲线；

[0031] 图4为本发明实验例4中使用质粒002模板时的扩增曲线；

[0032] 图5为本发明实验例5中序号为123的引物的终浓度优化结果；

[0033] 图6为本发明实验例5中序号为111的引物的终浓度优化结果；

[0034] 图7为本发明实验例5中序号为211的引物的终浓度优化结果；

[0035] 图8为本发明实验例5中实施例1提供的探针终浓度优化结果；

[0036] 图9为本发明实验例5中荧光探针终浓度优化结果；

[0037] 图10为本发明实验例5中内参上、下游引物和内参探针终浓度优化结果；

[0038] 图11为本发明实验例5中反应体积优化结果；

[0039] 图12为本发明实验例5中反应循环数优化结果；

[0040] 图13为本发明实验例5中退火/延伸温度和时间优化结果；

[0041] 图14为应用例1中得到的ROC曲线。

具体实施方式

[0042] 为使本发明实施例的目的、技术方案和优点更加清楚，下面将结合本发明实施例中的附图，对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述，显然，所描述的实施例是本发明一部分实施例，而不是全部的实施例。通常在此处附图中描述和示出的本发明实施例的组件可以以各种不同的配置来布置和设计。

[0043] 因此，以下对在附图中提供的本发明的实施例的详细描述并非旨在限制要求保护的本发明的范围，而是仅仅表示本发明的选定实施例。基于本发明中的实施例，本领域普通技术人员在没有作出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例，都属于本发明保护的范围。

[0044] 应注意到：相似的标号和字母在下面的附图中表示类似项，因此，一旦某一项在一个附图中被定义，则在随后的附图中不需要对其进行进一步定义和解释。此外，术语“第一”、“第二”、“第三”等仅用于区分描述，而不能理解为指示或暗示相对重要性。

[0045] 在具体的实施方式中，第一方面，本发明提供用于扩增EGFR-T790M基因变异的blocker探针，(1)所述blocker探针的核苷酸序列覆盖EGFR-T790M基因突变位点，与野生型EGFR-T790M基因片段完全匹配，与突变型EGFR-T790M基因片段在突变位点错配；(2)所述blocker探针核苷酸序列长度小于20nts，其中突变位点及两侧1或2nts范围内对应碱基经

过锁核酸修饰。

[0046] 在可选的实施方式中,所述blocker探针的核苷酸序列从5'端到3'端为 $(X_m)CACGC(X_n)$ 或与其严格杂交的互补序列,所述 X_m 为突变位点上游 m 个与野生型EGFR-T790M基因片段完全匹配核苷酸,所述 X_n 为突变位点下游 n 个与野生型EGFR-T790M基因片段完全匹配核苷酸,所述 $m+n < 15$,所述blocker探针中斜体并字体加粗标出的核苷酸对应突变位点,下划线表示该核苷酸经过锁核酸修饰,所述突变位点上游的CA和突变位点下游的GC中至少有一个核苷酸经过锁核酸修饰。

[0047] 需要说明的是,本发明中记载的 m 、 n 、 m_1 、 n_1 、 m_2 或 n_2 均表示的为核苷酸数量,因此,均为自然数。因此,上述 $m+n$ 可以选自0、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13或14。

[0048] 上述严格杂交的互补序列是指互补序列中的每个核苷酸与序列 $(X_m)CACGC(X_n)$ 对应的核苷酸均满足碱基互补配对原则。

[0049] 在可选的实施方式中,所述 $m \leq 6$ 。

[0050] $m \leq 6$ 能够避免rs1050171位点被blocker探针遮盖,从而使blocker探针与rs1050171位点野生型模板和突变型模板结合的 T_m 值一致,在两种类型模板中表现一致,不会出现阻断效果差异,反应更加稳定,降低出现假阴性或假阳性结果的概率。所述 m 可以选自0、1、2、3、4、5或6。

[0051] 在可选的实施方式中,所述blocker探针的核苷酸序列选自SEQ ID No.1~4中任一种,SEQ ID No.1所示核苷酸序列为CTCATCACGCAGCTC,SEQ ID No.2所示核苷酸序列为CTCATCACGCAGCTC,SEQ ID No.3所示核苷酸序列为CTCATCACGCAGCTCATG,SEQ ID No.4所示核苷酸序列为CTCATCACGCAGCTCATGC。

[0052] 在可选的实施方式中,所述blocker探针的3'端经过延伸阻断修饰。所述延伸阻断修饰即以阻止blocker探针3'端在扩增过程中延伸为目的,对blocker探针的3'端进行的修饰,具体的修饰包括但不限于MGB修饰、双脱氧修饰、氨基修饰、磷酸化修饰或spacer C3。

[0053] 第二方面,本发明提供用于扩增EGFR-T790M基因变异的引物组,所述引物组包括前述实施方式任一项所述的blocker探针、两条上游引物和至少一条下游引物;

[0054] 所述两条上游引物的核苷酸序列均覆盖EGFR-T790M基因的rs1050171位点,其中第一上游引物的核苷酸序列为 $(X_{m_1})A(X_{n_1})$,所述 X_{m_1} 为rs1050171位点上游 m_1 个与EGFR-T790M基因片段匹配核苷酸,所述 X_{n_1} 为rs1050171位点下游 n_1 个与EGFR-T790M基因片段匹配核苷酸,第二上游引物的核苷酸序列为 $(X_{m_2})G(X_{n_2})$,所述 X_{m_2} 为rs1050171位点上游 m_2 个与EGFR-T790M基因片段匹配核苷酸,所述 X_{n_2} 为rs1050171位点下游 n_2 个与EGFR-T790M基因片段匹配核苷酸,所述 n_1 和 n_2 均选自3~7中任意数值。对于两条上游引物的 m_1 和 m_2 ,可以在确定了上游引物3'端于blocker探针的组合序列后,根据实际PCR反应体系的要求进行常规选择。

[0055] 在可选的实施方式中,所述两条上游引物的3'端与blocker探针的5'端存在核苷酸重叠,重叠的核苷酸数量为1~7,例如1、2、3、4、5、6或7。部分重叠的核苷酸序列,能够保证blocker探针结合于野生型模板后,直接阻碍上游引物与模板的结合,相较于常规的阻止野生型延伸,阻断效果更加明显。

[0056] 在可选的实施方式中,所述引物组还包括荧光探针,所述荧光探针结合EGFR-T790M基因的反义链。由于blocker探针的阻断作用,使得EGFR-T790M基因的正义链和反义

链经过扩增后数量存在显著差异,当荧光探针与blocker探针结合的EGFR-T790M基因的模板链为不同链时,可增加反应的特异性和敏感度。

[0057] 第三方面,本发明提供前述实施方式任一项所述blocker探针或前述实施方式任一项所述引物组的用途,所述用途包括:

[0058] (1) 制备选择性扩增EGFR-T790M基因突变型的制剂、PCR反应体系或试剂盒;或者,

[0059] (2) EGFR-T790M基因突变型检测前扩增富集;或者,

[0060] (3) EGFR-T790M基因突变型检测前建库。

[0061] 需要说明的是,对于上述制剂、PCR反应体系或试剂盒中使用的其他辅助试剂或耗材,本领域技术人员能够根据实际需求进行常规选择,包括但不限于加入内参引物,以验证扩增质量并辅助结果判读。

[0062] 第四方面,本发明提供EGFR-T790M基因突变型选择性扩增方法,使用前述实施方式任一项所述blocker探针或前述实施方式任一项所述引物组配置PCR反应体系,待扩增样本经变性、退火和延伸后,分析扩增产物;

[0063] 所述退火温度和延伸温度相同,选自54~62°C,例如54°C、55°C、56°C、57°C、58°C、59°C、60°C、61°C或62°C;

[0064] 所述待扩增样本来源于血液、体液、组织、循环肿瘤细胞或cfDNA。

[0065] 下面结合附图,对本发明的一些实施方式作详细说明。在不冲突的情况下,下述的实施例及实施例中的特征可以相互组合。

[0066] 实施例1~4及对比例1和2

[0067] 本组实施例分别提供了一种用于扩增EGFR-T790M基因变异的blocker探针,具体如下表所示,其中下划线表示该核苷酸被锁核酸修饰:

实施方式编号	blocker 探针核苷酸序列(5'-3')
实施例 1	CTCATC <u>A C G</u> CAGCTC (SEQ ID No. 1)
实施例 2	CTCATC <u>A C</u> GCAGCTC (SEQ ID No. 2)
实施例 3	CTCATCA <u>C G C</u> AGTCATG (SEQ ID No. 3)
实施例 4	CTCATC <u>A C</u> GCAGCTCATGC (SEQ ID No. 4)
对比例 1	GTCATCA <u>C</u> GCAGCTCAT (SEQ ID No. 5)
对比例 2	CA GTCATCA <u>C G</u> CAGCTCAT (SEQ ID No. 6)

[0069] 实施例5~8

[0070] 本组实施例为分别在实施例1~4所述blocker探针的3'端添加MGB修饰。

[0071] 对比例3和4

[0072] 对比例3和4分别在对比例1和2所述blocker探针的3'端添加MGB修饰。

[0073] 实施例9

[0074] 本实施例提供了一组针对EGFR-T790M基因的扩增引物,并予以编号,包括上游引物和下游引物,同时涵盖了rs1050171位点突变型和野生型,具体引物信息如下,表中引物序号“abc”中a选自1或2,其中1代表上游引物,2代表下游引物;b选自1或2,其中1代表rs1050171位点突变型,2代表rs1050171位点野生型;c代表某类引物的具体序号:

引物序号	引物类型	SNP 突变型	SNP 野生型
号	型		

111	上游引物	CCGTGCAACTCATCA (SEQ ID No.7)	
112	上游引物	ACCGTGCAACTCATCA (SEQ ID No.8)	
113	上游引物	CACCGTGCAACTCATCA (SEQ ID No.9)	
114	上游引物	CCACCGTGCAACTCATCA (SEQ ID No.10)	
121	上游引物		CCGTGCAACTCATCA (SEQ ID No.11)
122	上游引物		CACCGTGCAGCTCAT (SEQ ID No.12)
123	上游引物		CCGTGCAGCTCATC (SEQ ID No.13)
211	下游引物	GCAGGTACTGGGAGCCAATA (SEQ ID No.14)	GCAGGTACTGGGAGCCAATA (SEQ ID No.14)
212	下游引物	AGCAGGTACTGGGAGCCAATA (SEQ ID No.15)	AGCAGGTACTGGGAGCCAATA (SEQ ID No.15)
213	下游引物	GCAGGTACTGGGAGCCAAT <u>A</u> (SEQ ID No.16)	GCAGGTACTGGGAGCCAAT <u>A</u> (SEQ ID No.16)

[0076] 实施例10

[0077] 本实施例提供了一种用于EGFR T790M突变序列检测的试剂盒,试剂盒组成如下表所示:

[0078]

类型	成分	名称	特征
检测管	反应液	DNA 聚合酶	其特征为酶具有聚合酶具有 5'-3' 外切酶活性, 无 3'-5' 外切酶活性, 可用于延伸同时切除荧光探针产生信号
	引物	第一上游引物: 实施例 9 中引物序号 111~114 中任一条; 第二上游引物: 实施例 9 中引物序号 121~123 中任一条; 下游引物: 实施例 9 中引物序号 211~213 中任一条	其特征为针对 T790M 位点前的 rs1050171 位点设计两条上游引物, 同时上游引物在突变位点附近, 但不包含突变位点
	BLOCKER	实施例 5~8 中任一条	Blocker 进行锁核酸与 MGB 修饰, 同时与上游引物有一定的重叠, 与模板竞争性结合
	荧光探针	FAM- TGTCTTTGTGTTCCCGGACATAGT - MGB (SEQ ID No.17)	其特征为探针在上下游之间, 当聚合酶延伸时会将探针水解, 产生荧光信号。
	内参引物	内参上游引物: ACAAGACTTCCAGCCACAGAA (SEQ ID No.18) 内参下游引物: GGTGCCAAGGAGATAACAGAGA (SEQ ID No.19)	监测反应体系及模板质量, 辅助结果判读

[0079] 上述试剂盒的检测程序如下表所示:

	阶段	条件	循环数
[0080]	热启动	95°C, 5min	1
	变性	95°C, 15sec	50
	退火/延伸	58°C, 60sec	

[0081] 实验例1

[0082] 本实验例比较在使用一条上游引物的情况下,加入blocker探针和不加blocker探针检测结果,具体步骤如下:

[0083] 采用由MDA-MB231细胞提取的DNA作为野生型DNA模板,NCI-H1975细胞提取的DNA作为突变型模板。按照下表的配方配制PCR反应体系:

试剂名称	体积(ul)
2x Superstart Premix plus	25
T790M 上游引物:引物序号 111	1
T790M 下游引物:引物序号 211	1
Blocker (实施例 1) / 不加 blocker 组补水	1.5
PROBE	0.5
H ₂ O	6
DNA	15

[0085] PCR扩增程序如下:

	阶段	条件	循环数
[0086]	热启动	95°C, 5min	1
	变性	95°C, 15sec	50
	退火/延伸	58°C, 60sec	

[0087] 扩增结果如图1和图2所示,结果表明与不加blocker探针组相比,加了blocker探针后能明显抑制野生型的扩增,同时对突变型模板没有抑制。这证明加blocker探针后可明显的增加反应的特异性。

[0088] 实验例2

[0089] 本实验例随机选取实施例5~8提供的不同blocker探针与实施例9中提供的不同SNP突变型引物构成的4个不同引物组的检测结果,具体如下:

[0090] 采用由MDA-MB231细胞提取的DNA作为野生型DNA模板,NCI-H1975细胞提取的DNA作为突变型模板,每种模板均为15ng/反应。使用不同的引物和blocker进行组合筛选,同时设置不加blocker的对照组。引物和blocker的组合情况及序列见下表所示。备注:最小 Δ Ct值=野生型模板Ct值最小值-突变型模板Ct值最大值)。

[0091] 引物组组成及实验结果如下:

[0092]

引物组	引物组 1						
上游	序列: CCGTGCAACTCATCA; 编号 111						
下游	GCAGGTACTGGGAGCCAATA 编号 211						
探针	FAM- TGTCTTTGTGTTCCCGGACATAGT -MGB ((SEQ ID No.17))						
Blocker	—	实施例 5	实施例 6	实施例 7	实施例 8	对比例 3	对比例 4
Blocker 序列	—	CTCATC <u>ACGCAG</u> CTC	CTCATC <u>ACGCAG</u> CTC	CTCATCA <u>CGCAGCT</u> CATG	CTCATCA <u>C</u> GCAGCTC ATGC	GCTCATC <u>ACGCAGC</u> TCAT	CAGCTCAT <u>CACGCAGC</u> TCAT
T790M 野生型最小 Ct 值	25	38.18	38.02	37.68	37.8	33.99	45.4
T790M 突变型最大 Ct 值	24.95	25.43	25.36	25.3	25.43	26	34.24
最小 ΔCt 值	-0.05	-12.75	-12.66	-12.38	-12.37	-7.99	-11.16

[0093]

引物组	引物组 2						
上游	序列: ACCGTGCAACTCATCA; 编号 112						
下游	GCAGGTACTGGGAGCCAATA 编号 211						
探针	FAM- TGTCTTTGTGTTCCCGGACATAGT -MGB ((SEQ ID No.17))						
Blocker	—	实施例 5	实施例 6	实施例 7	实施例 8	对比例 3	对比例 4
Blocker 序列	—	CTCATCA <u>CGCAGC</u> TC	CTCATCA <u>CGCAGC</u> TC	CTCATCA <u>C</u> GCAGCTCA TG	CTCATCA <u>C</u> GCAGCTCA TGC	GCTCATCA <u>CGCAGCTC</u> AT	CAGCTCATC <u>ACGCAGCTC</u> AT
T790M 野生型最小 Ct 值	24.99	37.06	36.96	36.49	36.7	32	43.6
T790M 突变型最大 Ct 值	24.8	24.93	25.27	25.3	25.5	25.32	32.52
最小 ΔCt 值		-12.13	-11.69	-11.19	-11.2	-6.68	-11.08

[0094]

引物组	引物组 3						
上游	序列: CACCGTGCAACTCATCA; 编号 113						
下游	GCAGGTACTGGGAGCCAATA 编号 211						
探针	FAM- TGTCTTTGTGTTCCCGGACATAGT -MGB ((SEQ ID No.17))						
Blocker	—	实施例 5	实施例 6	实施例 7	实施例 8	对比例 3	对比例 4
Blocker 序列	—	CTCATCA <u>CGCAGC</u> TC	CTCATCA <u>CGCAGC</u> TC	CTCATCA <u>C</u> GCAGCTCA TG	CTCATCA <u>C</u> GCAGCTCA TGC	GCTCATCA <u>CGCAGCTC</u> AT	CAGCTCATC <u>ACGCAGCTC</u> AT
T790M 野生型最小 Ct 值	24.94	36.78	36	35.68	35.51	30.43	40.89
T790M 突变型最大 Ct 值	24.79	24.89	24.85	24.9	24.75	25.4	30.12
最小 ΔCt 值		-11.89	-11.15	-10.78	-10.76	-5.03	-10.77

引物组	引物组 4						
上游	序列: CCACCGTGCAACTCATCA; 编号 114						
下游	GCAGGTACTGGGAGCCAATA 编号 211						
探针	FAM-TGTCTTTGTGTTCCCGACATAGT-MGB (SEQ ID No.17)						
Blocker	—	实施例 5	实施例 6	实施例 7	实施例 8	对比例 3	对比例 4
Blocker 序列	—	CTCATCA CGCAGC TC	CTCATCA CGCAGC TC	CTCATCAC GCAGCTCA TG	CTCATCAC GCAGCTCA TGC	GCTCATCA CGCAGCTC AT	CAGCTCATC ACGAGCTC AT
T790M 野生型最小 Ct 值	2 4. 8	36.59	35.61	35.9	35.29	29.3	37.54
T790M 突变型最大 Ct 值	2 4. 6	24.92	24.4	24.59	24.8	25.28	26.9
最小 Δ Ct 值		-11.67	-11.21	-11.31	-10.49	-4.02	-10.64

[0095] 根据实验结果可知,对比例3对野生型抑制效果较弱,无法满足要求;对比例4对突变型模板抑制强烈,会使试剂盒的灵敏度降低,无法满足要求。实施例5~8均对突变型无明显抑制,对野生型模板有明显抑制,最小 Δ Ct值均小于-10,满足要求,其中效果最好的是实施例5。

[0097] 实验例3

[0098] 本实验例以实施例5提供的blocker探针,对实施例9中提供的3个不同SNP野生型上游引物的检测结果进行了对比,具体如下:

[0099] 采用由H441细胞提取的DNA作为野生型DNA模板,质粒002 (SEQ ID No.21)作为突变型模板,H441基因组DNA使用模板量为15ng/反应,质粒002为4000copy/反应。

[0100] 其中,H441 gDNA和质粒002都是rs1050171野生型,MB231 gDNA和H1975 gDNA都是rs1050171突变型。H441 gDNA和MB231 gDNA是T790M野生型,H1975 gDNA和质粒002是T790M突变型。

上游引物	引物序号 121		引物序号 122		引物序号 123	
下游引物	引物序号 211					
Blocker 探针	—	实施例 5	—	实施例 5	—	5
荧光探针	SEQ ID No.13					
T790M 野生型最小 Ct 值	25.90	36.18	25.89	30.67	26.01	36.80
T790M 突变型最大 Ct 值	26.18	26.26	26.1	26.25	26.25	26.47
最小 Δ Ct 值	0.28	-9.92	0.21	-4.42	0.24	-10.33

[0101] 根据实验结果可知,引物序号123时效果最好,最小 Δ Ct值绝对值最大,对突变型无抑制,对野生型抑制良好。

[0102] 实验例4

[0103] 本实验例考察单上游引物和双上游引物的扩增情况,具体如下:

[0104] 采用由H441细胞提取的DNA作为rs1050171野生型T790M野生型DNA模板,合成的质粒002作为rs1050171野生型T790M突变型模板;MDA-MB231细胞提取的DNA作为rs1050171突变型T790M野生型DNA模板,NCI-H1975细胞提取的DNA作为rs1050171突变型T790M突变型模板;每种模板均为15ng/反应。分别使用引物序号111 (rs1050171突变型引物)、引物序号123 (rs1050171野生型引物)以及两种引物混合 (T790M FP-1+ T790M FP-2)三种引物组

合情况,对四种模板进行测试。

[0106] 单引物组合分别按照下表的配方配制体系:

[0107]		体积 (μ l)
	2x Superstart Premix plus	25
	T790M FP-1/T790M FP-2 (111/123)	1
	T790M RP (211)	1
	Blocker (实施例 5)	1.5
	荧光 探针 (SEQ ID No.17)	0.5
	H ₂ O	6
	DNA	15

[0108] 双引物组合按照下表的配方配置体系:

[0109]		1X
	2x Superstart Premix plus	25
	T790M FP-1 (111)	0.75
	T790M FP-2 (123)	0.6
	T790M RP (211)	1
	Blocker (实施例 5)	1.5
	荧光 探针 (SEQ ID No.17)	0.5
	H ₂ O	5.65
	DNA	15

[0110] PCR反应程序如下:

	阶段	条件	循环数
	热启动	95°C, 5min	1
[0111]	变性	95°C, 15sec	50
	退火/延伸	58°C, 60sec	

[0112] 扩增结果如下:

	T790M FP-1		T790M FP-2		T790M FP-1 +T790M FP-2	
rs1050171 位点类型	突变型	野生型	突变型	野生型	突变型	野生型
[0113] T790M 野生型最小 Ct 值	37.77	40.51	42.07	37.8	38.7	37.84
T790M 突变型最大 Ct 值	25.24	34.65	29.77	26.32	25.59	26.68
最小 Δ Ct 值	-12.53	-5.86	-12.3	-11.48	-13.11	-11.16

[0114] 备注:最小 Δ Ct值= T790M突变型最大Ct值- T790M野生型最小Ct值。

[0115] 扩增曲线如图3和图4所示,可以看出,使用rs1050171突变型引物序号111扩增,模板是质粒002时,模板的扩增效率明显降低,且特异性也降低。使用rs1050171野生型引物序号123扩增,模板是NCI-H1975时扩增效率明显降低。而将两种模板组合使用时,两种类型的

模板均有较高的扩增效率和特异性,表现最佳。

[0116] 实验例5

[0117] 本实验例在实验例4得到的双上游引物体系基础上,对扩增体系参数进行优化,具体包括反应组分的浓度、反应体积和反应程序。

[0118] 5.1 反应组分浓度

[0119] 每个反应组分挑选3~4个浓度,使用4种模板(采用由H441细胞提取的DNA作为rs1050171野生型T790M野生型DNA模板,H441基因组DNA和质粒002按比例配置为0.25%T790M突变型的模板作为rs1050171野生型T790M突变型模板;MDA-MB231细胞提取的DNA作为rs1050171突变型T790M野生型DNA模板,MDA-MB231细胞提取的DNA和NCI-H1975细胞提取的DNA按比例配置成0.25%T790M突变的模板作为rs1050171突变型T790M突变型模板;每种模板均为15ng/反应)对其进行测试,检测每个条件下的特异性,选择特异性最好的浓度。

[0120] 各反应引物浓度的优化结果如图5~图10所示,具体结果如下:

引物序号	优化条件(组分终浓度)	结论(组分终浓度)
123	150nM 、 120nM 、 100nM 、 180nM	120nM (图 5)
111	150nM 、 100nM 、 200nM	150nM (图 6)
211	200nM 、 140nM 、 260nM	200nM (图 7)
实施例 1 的 blocker	300nM 、 200nM 、 400nM	300nM (图 8)
荧光 探针	100nM 、 70nM 、 130nM	100nM (图 9)
内参 上游 引物	50nM 、 70nM 、 30nM	30nM (图 10)
内参 下游 引物	50nM 、 70nM 、 30nM	30nM (图 10)
内参探针	50nM 、 70nM 、 30nM	30nM (图 10)

[0122] 5.2 反应体积优化

[0123] 反应体积选择50ul/40ul两种情况,使用4种模板(使用模板同上)对其进行测试,结果如图11所示,检测每个条件下的WT MIN-MT MAX Δ Ct (FAM-VIC),该值越大反应特异性越好。

[0124] 5.3 反应循环数优化

[0125] 分别使用40/45/50循环进行实验,选择特异性最佳的反应循环数。使用模板:rs1050171突变型:T790M野生型模板(MDA-MB231细胞提取获得基因组DNA)和0.25%突变频率的T790M突变型模板(用MDA-MB231 gDNA和NCI-H1975 gDNA配置的模板);rs1050171野生型:T790M野生型模板(H441细胞提取获得的基因组DNA)、0.25%突变频率的T790M突变型模板(用质粒002和H441 gDNA配置的模板),每种模板均为15ng/反应。使用上述4种模板对其进行测试,检测每个条件下的WT MIN-MT MAX Δ Ct (FAM-VIC),该值越大反应特异性越好。实验结果如图12所示,反应循环数是50时,反应的特异性更好,表现更佳。

[0126] 5.4 退火/延伸温度和时间优化

[0127] 主要对反应的退火/延伸温度和时间进行优化,选择特异性最佳的反应条件。待测试条件如下:①58℃,60s;②56℃,60s;③58℃,40s;④56℃,40s。使用模板:rs1050171突变型:T790M野生型模板(MDA-MB231细胞提取获得基因组DNA)和0.25%突变频率的T790M突变型模板(用MDA-MB231 gDNA和NCI-H1975 gDNA配置的模板);rs1050171野生型:T790M野生型模板(H441细胞提取获得的基因组DNA)、0.25%突变频率的T790M突变型模板(用质粒002

和H441 gDNA配置的模板),每种模板均为15ng/反应。使用上述4种模板对其进行测试,检测每个条件下的WT MIN-MT MAX Δ Ct (FAM-VIC),该值越大反应特异性越好。实验结果如图13所示,退火/延伸的温度和时间分别是58°C和60s时,反应的特异性更好,表现更佳。

[0128] 应用例1

[0129] 使用142例临床血液样本(样本来自珠海市圣美基因检测科技有限公司)进行阳性判断值确定。临床样本均是非小细胞肺癌晚期患者,经一代/二代EGFR TKI药物治疗后产生耐药的患者。临床样本收集后获得血浆并提取cfDNA。所有cfDNA经数字PCR检测确认T790M突变位点的信息。通过使用本试剂盒对临床样本进行检测,做ROC曲线,如图14所示,确定阳性判断值为12。样本的阳性符合率是96.3%,阴性符合率是95.7%,已经实现了与数字PCR相当的灵敏度。

[0130] 应用例2

[0131] 使用健康人血浆提取的cfDNA作为野生型DNA模板,NCI-H1975细胞提取的DNA过血浆基质后提取的DNA作为突变型模板,配制不同突变比例的样本,使用数字PCR方法对配置的样本进行定量检测。突变比例分别为0.5%,0.25%,0.125%。同时使用不同的上样量对样本进行检测。

[0132] 按照下表的配方配制体系:

[0133]		1X
	2x Superstart Premix plus	25
	T790M FP-1 (111)	0.75
	T790M FP-2 (123)	0.6
	T790M RP (211)	1
	Blocker (实施例 5)	1.5
	荧光探针 (序列 17)	0.5
	内参上游引物 (序列 18)	0.15
	内参下游引物 (序列 19)	0.15
	内参探针 (序列 20)	0.15
	H ₂ O	5.2
	DNA	15

[0134] PCR反应程序如下:

	阶段	条件	循环数
	热启动	95°C, 5min	1
[0135]	变性	95°C, 15sec	50
	退火/延伸	58°C, 60sec	

[0136] 结果如下:根据阈值12进行判断,该位点不低于95%检出率的最低检测限为7.5ng/反应DNA浓度下0.125%突变比例。

ΔCt (FAM-VIC)									
15ng			7.5ng			3.75ng			
[0137]	0.5%	0.25%	0.125%	0.5%	0.25%	0.125%	0.5%	0.25%	0.125%
	突变	突变	突变	突变	突变	突变	突变	突变	突变
	100%	100%	100%	100%	100%	95%	100%	100%	85%

[0138] 最后应说明的是：以上各实施例仅用以说明本发明的技术方案，而非对其限制；尽管参照前述各实施例对本发明进行了详细的说明，本领域的普通技术人员应当理解：其依然可以对前述各实施例所记载的技术方案进行修改，或者对其中部分或者全部技术特征进行等同替换；而这些修改或者替换，并不使相应技术方案的本质脱离本发明各实施例技术方案的范围。

- [0001] SEQUENCE LISTING
- [0002] <110> 珠海圣美生物诊断技术有限公司
- [0003] <120> 用于扩增EGFR-T790M基因变异的blocker探针、引物组及其应用
- [0004] <160> 21
- [0005] <170> PatentIn version 3.5
- [0006] <210> 1
- [0007] <211> 15
- [0008] <212> DNA
- [0009] <213> Artificial Sequence
- [0010] <220>
- [0011] <221>锁核酸修饰
- [0012] <222> (7) ... (9)
- [0013] <223> blocker 1
- [0014] <400> 1
- [0015] ctcatcacgc agctc 15
- [0016] <210> 2
- [0017] <211> 15
- [0018] <212> DNA
- [0019] <213> Artificial Sequence
- [0020] <220>
- [0021] <221>锁核酸修饰
- [0022] <222> (7) ... (8)
- [0023] <223> blocker 2
- [0024] <400> 2
- [0025] ctcatcacgc agctc 15
- [0026] <210> 3
- [0027] <211> 18
- [0028] <212> DNA
- [0029] <213> Artificial Sequence
- [0030] <220>
- [0031] <221>锁核酸修饰
- [0032] <222> (8) and (10)
- [0033] <223> blocker 3
- [0034] <400> 3
- [0035] ctcatcacgc agctcatg 18
- [0036] <210> 4
- [0037] <211> 19
- [0038] <212> DNA

- [0039] <213> Artificial Sequence
[0040] <220>
[0041] <221>锁核酸修饰
[0042] <222>(7)...(8)
[0043] <223> blocker 4
[0044] <400> 4
[0045] ctcatcacgc agctcatgc 19
[0046] <210> 5
[0047] <211> 18
[0048] <212> DNA
[0049] <213> Artificial Sequence
[0050] <220>
[0051] <221>锁核酸修饰
[0052] <222>(9)
[0053] <223> blocker 5
[0054] <400> 5
[0055] gctcatcacg cagctcat 18
[0056] <210> 6
[0057] <211> 20
[0058] <212> DNA
[0059] <213> Artificial Sequence
[0060] <220>
[0061] <221>锁核酸修饰
[0062] <222>(11)...(12)
[0063] <223> blocker 6
[0064] <400> 6
[0065] cagctcatcacg cagctcat 20
[0066] <210> 7
[0067] <211> 15
[0068] <212> DNA
[0069] <213> Artificial Sequence
[0070] <220>
[0071] <223> SNP突变型上游引物1
[0072] <400> 7
[0073] ccgtgcaact catca 15
[0074] <210> 8
[0075] <211> 16
[0076] <212> DNA
[0077] <213> Artificial Sequence

[0078] <220>
[0079] <223> SNP突变型上游引物2
[0080] <400> 8
[0081] accgtgcaac tcatca 16
[0082] <210> 9
[0083] <211> 17
[0084] <212> DNA
[0085] <213> Artificial Sequence
[0086] <220>
[0087] <223> SNP突变型上游引物3
[0088] <400> 9
[0089] cacctgcaa ctcatca 17
[0090] <210> 10
[0091] <211> 18
[0092] <212> DNA
[0093] <213> Artificial Sequence
[0094] <220>
[0095] <223> SNP突变型上游引物4
[0096] <400> 10
[0097] ccacctgca actcatca 18
[0098] <210> 11
[0099] <211> 15
[0100] <212> DNA
[0101] <213> Artificial Sequence
[0102] <220>
[0103] <223> SNP野生型上游引物1
[0104] <400> 11
[0105] ccgtgcaact catca 15
[0106] <210> 12
[0107] <211> 15
[0108] <212> DNA
[0109] <213> Artificial Sequence
[0110] <220>
[0111] <223> SNP野生型上游引物2
[0112] <400> 12
[0113] cacctgacg ctcat 15
[0114] <210> 13
[0115] <211> 14
[0116] <212> DNA

- [0117] <213> Artificial Sequence
[0118] <220>
[0119] <223> SNP野生型上游引物3
[0120] <400> 13
[0121] ccgtgcagct catc 14
[0122] <210> 14
[0123] <211> 20
[0124] <212> DNA
[0125] <213> Artificial Sequence
[0126] <220>
[0127] <223> 下游引物1
[0128] <400> 14
[0129] gcaggtactg ggagccaata 20
[0130] <210> 15
[0131] <211> 21
[0132] <212> DNA
[0133] <213> Artificial Sequence
[0134] <220>
[0135] <223> 下游引物2
[0136] <400> 15
[0137] agcaggtact gggagccaat a 21
[0138] <210> 16
[0139] <211> 20
[0140] <212> DNA
[0141] <213> Artificial Sequence
[0142] <220>
[0143] <221>锁核酸修饰
[0144] <222>(20)
[0145] <223> 下游引物3
[0146] <400> 16
[0147] gcaggtactg ggagccaata 20
[0148] <210> 17
[0149] <211> 24
[0150] <212> DNA
[0151] <213> Artificial Sequence
[0152] <220>
[0153] <223> 荧光探针
[0154] <400> 17
[0155] tgtctttgtg ttcccgaca tagt 24

[0156]	<210> 18	
[0157]	<211> 21	
[0158]	<212> DNA	
[0159]	<213> Artificial Sequence	
[0160]	<220>	
[0161]	<223> 内参上游引物	
[0162]	<400> 18	
[0163]	acaagacttc cagccacaga a	21
[0164]	<210> 19	
[0165]	<211> 22	
[0166]	<212> DNA	
[0167]	<213> Artificial Sequence	
[0168]	<220>	
[0169]	<223> 内参下游引物	
[0170]	<400> 19	
[0171]	ggtgccaagg agataacaga ga	22
[0172]	<210> 20	
[0173]	<211> 24	
[0174]	<212> DNA	
[0175]	<213> Artificial Sequence	
[0176]	<220>	
[0177]	<223> 内参探针	
[0178]	<400> 20	
[0179]	tctaagatct gcttcctggt gtgt	24
[0180]	<210> 21	
[0181]	<211> 892	
[0182]	<212> DNA	
[0183]	<213> Artificial Sequence	
[0184]	<220>	
[0185]	<223> 质粒002序列	
[0186]	<400> 21	
[0187]	cacaattgcc agttaacgtc ttccttctct ctctgtcata gggactctgg atcccagaag	60
[0188]	gtgagaaagt taaaattccc gtcgctatca aaacatctcc gaaagccaac aaggaaatcc	120
[0189]	tcgatgtgag tttctgcttt gctgtatgcg aagccacact gacgtgcctc tccctccctc	180
[0190]	caggaagcct acgtgatggc cagcgtggac aacccccacg tgtgccgcct gctgggcac	240
[0191]	tgccctacct ccaccgtgca gctcatcatg cagctcatgc ccttcggctg cctcctggac	300
[0192]	tatgtccggg aacacaaaga caatattggc tcccagtacc tgctcaactg gtgtgtgcag	360
[0193]	atcgcaaagg taatcaggga agggagatac ggggagggca gagcttcttc ccatgatgat	420
[0194]	ctgtccctca cagcagggtc ttctctgttt cagggcata ga actacttggg ggaccgtcgc	480

[0195]	ttggtgcacc gcgacctggc agccaggaac gtactggtga aaacaccgca gcatgtcaag	540
[0196]	atcacagatt ttgggcgggc caaactgctg ggtgcggaag agaaagaata ccatgcagaa	600
[0197]	ggaggcaaag taaggaggtg gctttaggtc agccagcatt ttcctgacac cagggaccag	660
[0198]	taacctgact ggttaacagc agtcctttgt aaacagtgtt ttaaactctc ctagtcaata	720
[0199]	tccaccccat ccaatttata aaggaagaaa tggttcagaa aatattttca gcctacagtt	780
[0200]	atgttcagtc acacacacat acaaaatggt ccttttgctt ttaaagtaat ttttgactcc	840
[0201]	cagatcagtc agagccccta cagcattggt aagaaagtat ttgatttttg tc	892

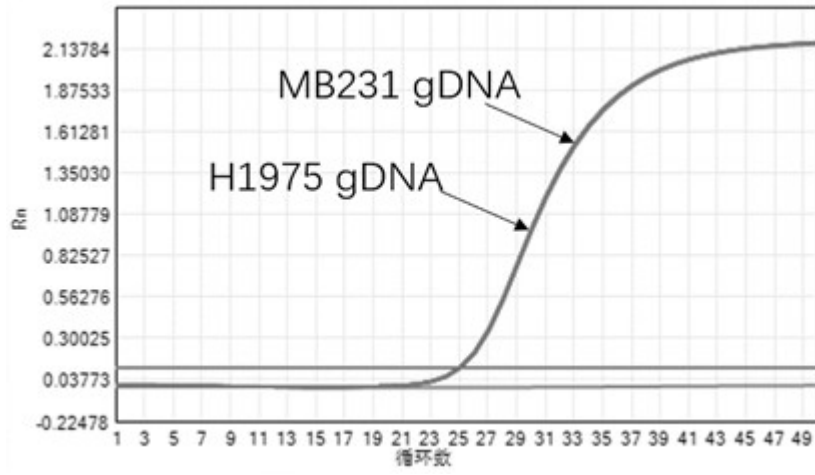


图1

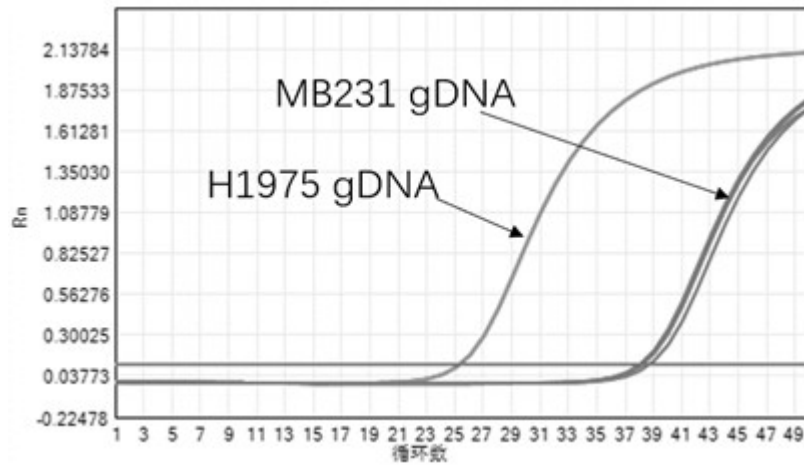


图2

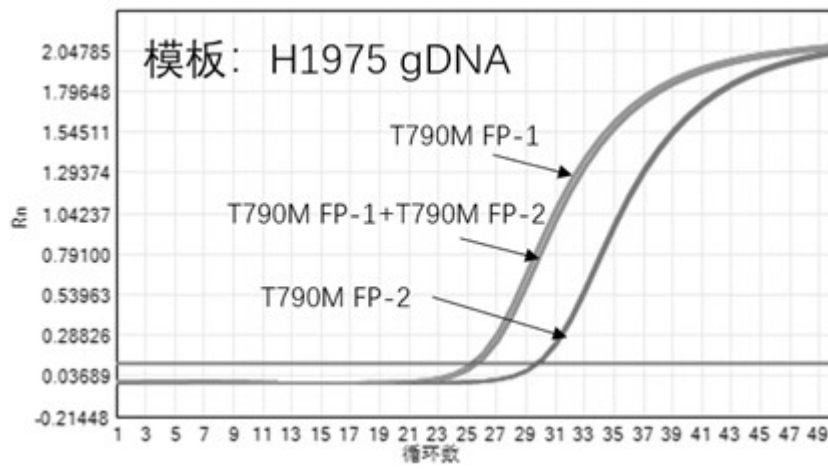


图3

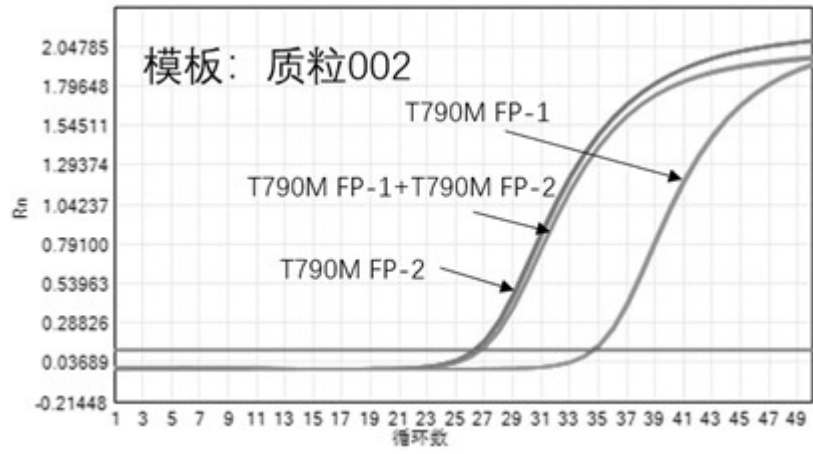


图4

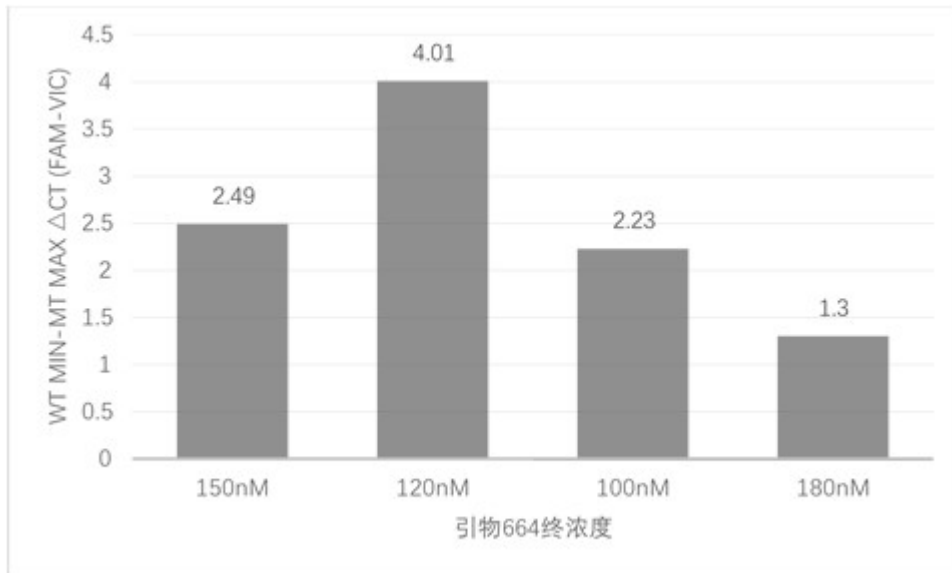


图5

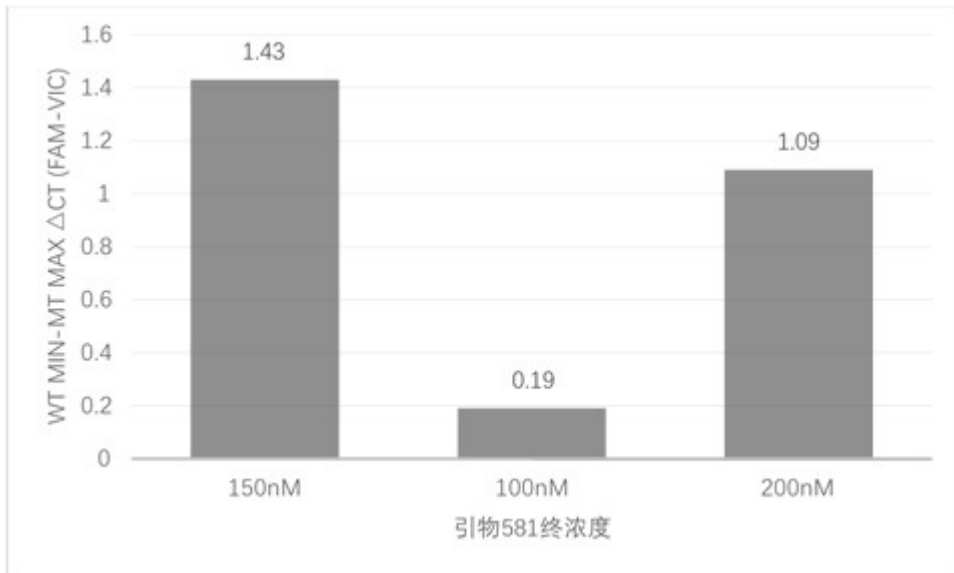


图6

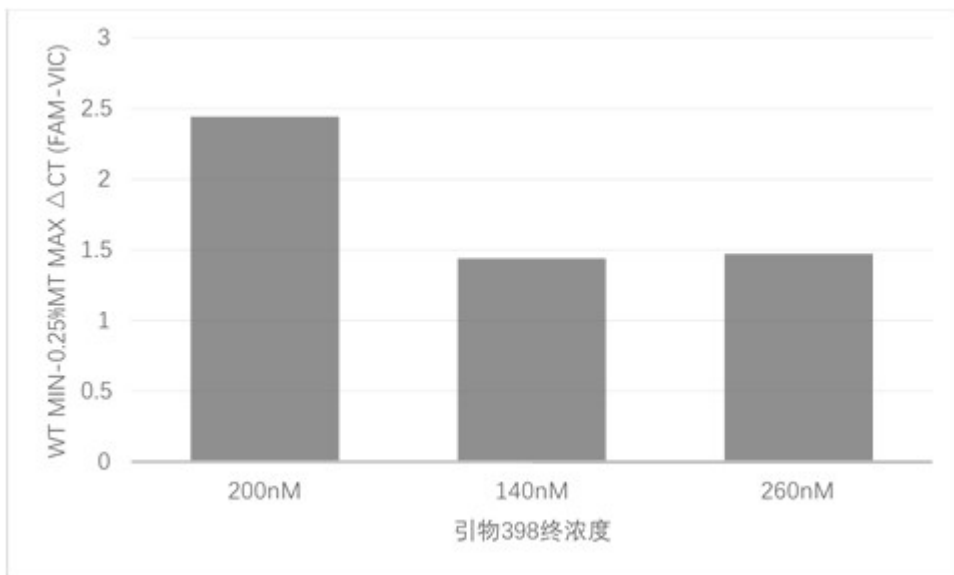


图7

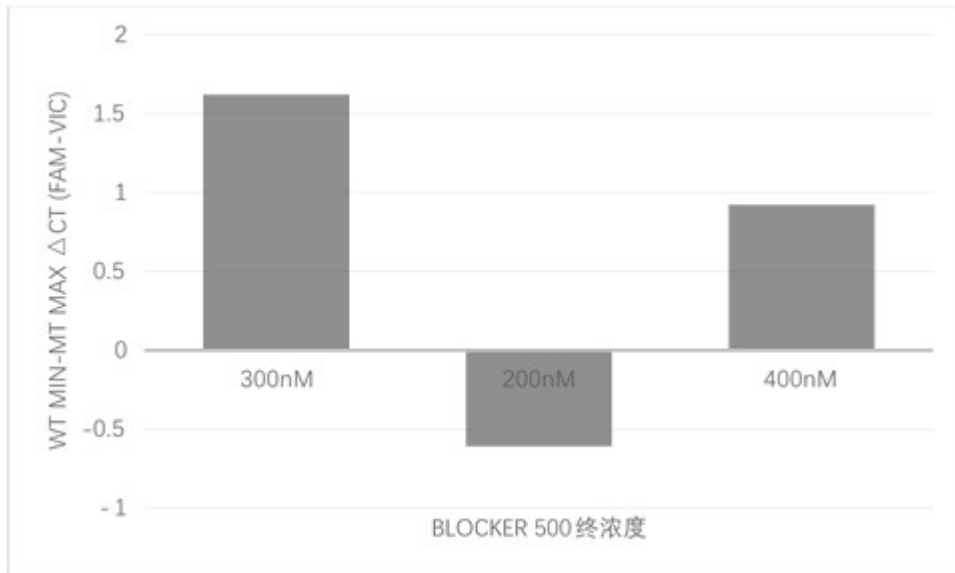


图8

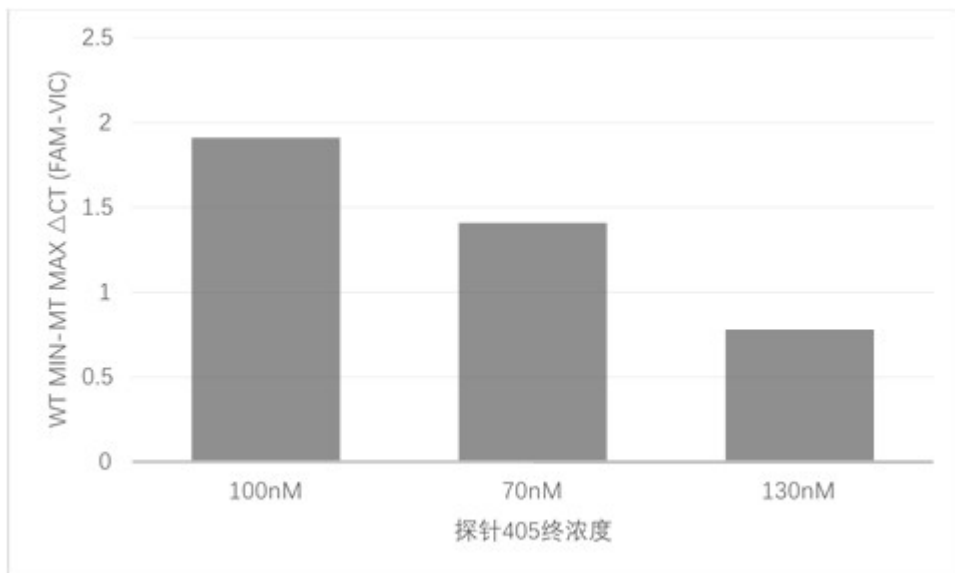


图9

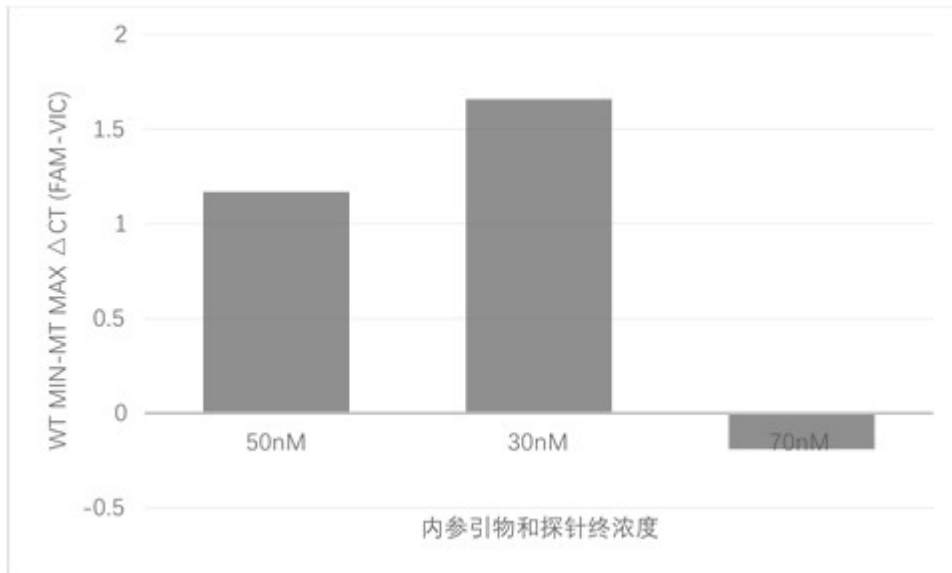


图10

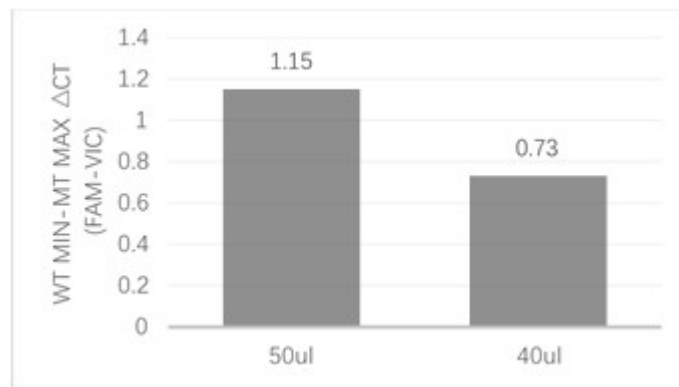


图11

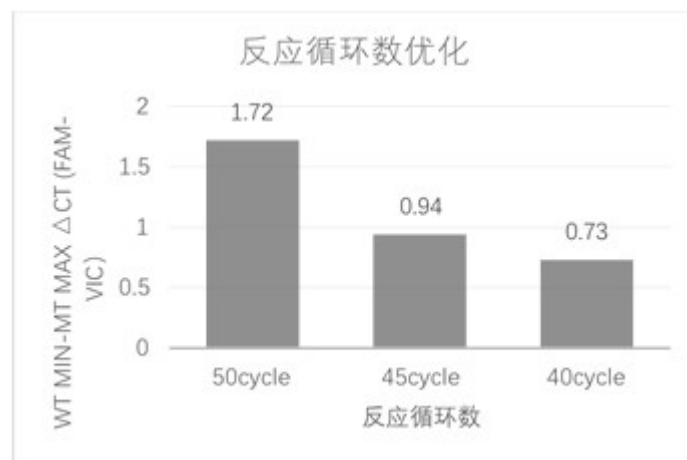


图12

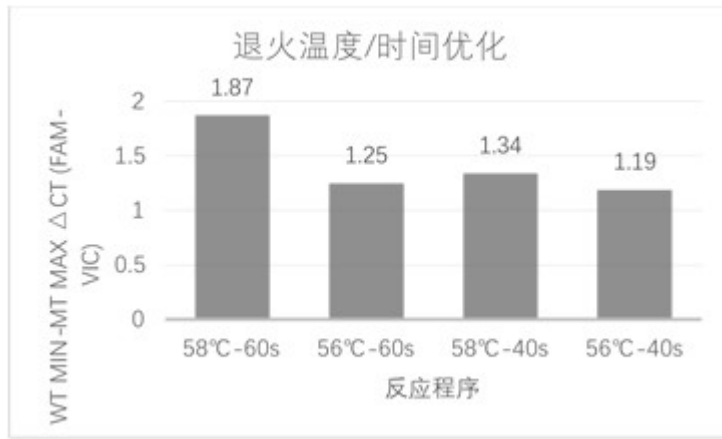


图13

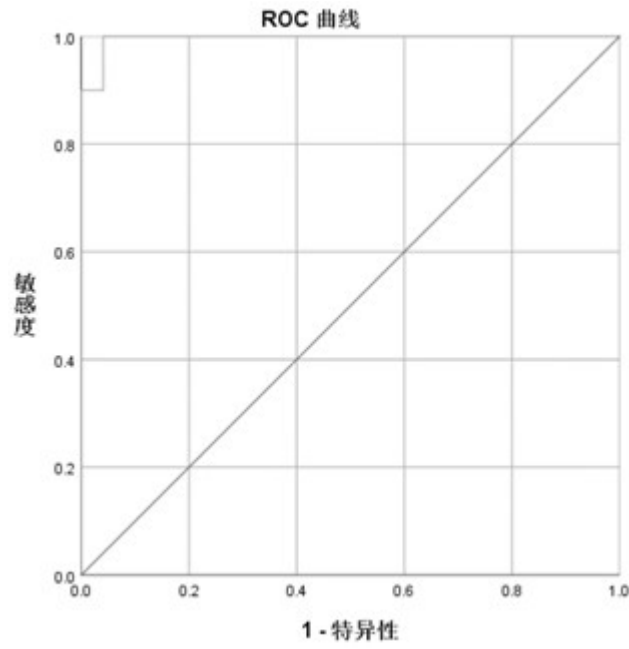


图14