



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102943107 A

(43) 申请公布日 2013. 02. 27

(21) 申请号 201210113604. 8

(22) 申请日 2012. 04. 09

(30) 优先权数据

61/473, 182 2011. 04. 08 US

(71) 申请人 蒂莫西·刘

地址 美国加利福尼亚州凯普莱特圈佛蒙特
33961 号

(72) 发明人 蒂莫西·Z·刘

(74) 专利代理机构 北京律诚同业知识产权代理
有限公司 11006

代理人 徐金国

(51) Int. Cl.

C12Q 1/68 (2006. 01)

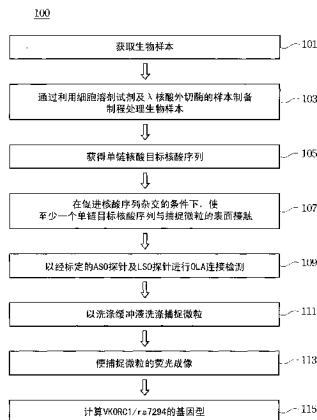
权利要求书 2 页 说明书 12 页
序列表 1 页 附图 4 页

(54) 发明名称

分析生物样本的目标核酸序列的方法

(57) 摘要

本发明提供一种分析生物样本的目标核酸序列的方法, 以在生物医学研究与临床诊断学中, 于生物样本的疾病相关遗传变异方面进行多重核酸分析。



1. 一种分析目标核酸分析物的方法,所述方法包含以下步骤:
 - a. 在促进核酸序列杂交的条件下,使包含至少一个目标核酸序列的该核酸分析物与一表面接触,其中该表面包含至少一簇的多个目标特异性捕捉探针,该簇的这些目标特异性捕捉探针的每一个与另一簇的多个目标特异性捕捉探针为空间上分开的,且该簇的目标特异性捕捉探针相对于该另一簇的目标特异性捕捉探针的相对位置为彼此固定,且该目标特异性捕捉探针的每一个更包含:
 - (i) 一核酸序列,其中该核酸序列与核酸分析物的目标核酸序列的一部分互补;以及
 - (ii) 一识别序列 (IS) 标签,其中该识别序列标签是指定为一识别 (ID) 代码,且该识别代码是代表一预定目标核酸序列;
 - b. 分析杂交至该表面上的目标特异性捕捉探针的至少一个目标核酸序列的至少一序列变异;
 - c. 判定嵌入该表面上的目标特异性捕捉探针内的识别序列标签的识别代码;以及
 - d. 对步骤 b 中获得的所述序列变异与步骤 c 中判定的所述目标特异性捕捉探针的识别代码进行关联,以推导出所述至少一目标核酸序列的序列变异。
2. 如权利要求 1 所述的方法,其中不同簇的目标特异性捕捉探针为附着至一连续式表面且彼此在空间上分开的。
3. 如权利要求 1 所述的方法,其中不同簇的目标特异性捕捉探针为附着至不同微粒的表面。
4. 如权利要求 1 所述的方法,其中所述的各簇的目标特异性捕捉探针包含相同 IS 卷标及相同目标特异捕捉核酸序列。
5. 如权利要求 1 所述的方法,其中所述的目标核酸序列的该序列变异为通过探针杂交、探针连接、单核苷酸延长或 DNA 测序来分析。
6. 如权利要求 1 所述的方法,其中所述的目标特异性捕捉探针的识别代码可通过 DNA 测序或依序成对探针连接判定。
7. 如权利要求 1 所述的方法,其中所述对序列变异与识别代码进行关联的步骤更包含以下步骤:

计算含有该目标核酸序列的每一目标特异性捕捉探针的簇数,以便定量至少两种目标核酸序列。
8. 一种分析生物样本的目标核酸序列的方法,该方法包含以下步骤:
 - a. 利用一样本制备方法处理该生物样本,以从处理过的该生物样本获得数个单链目标核酸序列,其中该样本制备方法利用 λ 核酸外切酶;
 - b. 在促进核酸序列杂交的条件下,使所述目标核酸序列与一表面接触,其中该表面包含至少一簇的多个目标特异性捕捉探针,该簇的目标特异性捕捉探针的每一个与另一簇的多个目标特异性捕捉探针为空间上分开的,且该簇的目标特异性捕捉探针相对于另一簇的目标特异性捕捉探针的相对位置为彼此固定,且这些目标特异性捕捉探针的每一个更包含:
 - (i). 一核酸序列,该核酸序列与核酸分析物中的目标核酸序列的一部分互补;
 - (ii). 一识别序列标签,其中该识别序列标签对应于一识别代码,且该识别代码为指定为一预定目标核酸序列;以及

c. 分析杂交至该表面上的目标特异性捕捉探针的至少一个目标核酸序列的至少一序列变异；

d. 判定嵌入该表面上的目标特异性捕捉探针内的识别序列标签的该识别代码；以及

e. 对步骤c中获得的序列变异与步骤d中判定的目标特异性捕捉探针的识别代码进行关联,以推导出至少一目标核酸序列的序列变异。

9. 如权利要求8所述的方法,其中在步骤b中使目标核酸序列与表面接触之前,所述方法更包含以下步骤:

利用一非对称核酸扩增方法,从步骤a的处理过的生物样本之中产生数个单链目标核酸序列。

分析生物样本的目标核酸序列的方法

[0001] 本申请主张 2011 年 4 月 8 日申请的美国临时专利申请第 61/473,182 号的权利及优先权,所述美国临时专利申请的全部内容列为本文的参考文献。

技术领域

[0002] 本发明涉及来自生物样本中的核酸分子的检测及分析,本发明尤其涉及目标核酸分子的单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphisms ;SNP)、突变及其他疾病相关变化的判定。

背景技术

[0003] 基因组 DNA 可用于各种临床诊断应用,诸如相关疾病的 DNA 测序、单核苷酸多态性 (Single nucleotide polymorphism ;SNP) 基因分型及突变筛选。来自这类检测的信息可用于疾病易感性筛选 (disease predisposition screening)、疾病治疗划分及个人化医疗管理。十年前完成人类基因组测序计划后,个人化医学的出现为未来人类保健及保健管理提供极大可能性。尤其在肿瘤学领域,用于疾病预防与管理中的个体易感性的遗传性检测及用于个人化疾病治疗的遗传性检测都正在发展中。这类遗传性检测的成功实例包括:编码及调节细胞色素 P450 酶的基因的 SNP 基因分型 (例如 CYP2D6、CYP2C19 及 CYP2C9), ; 以及涉及家族型乳腺癌及卵巢癌综合症的 BRCA1 及 BRCA2 基因的遗传突变筛选。细胞色素 P450 酶调节各种药物的新陈代谢,其 SNP 基因分型可应用于改善药物反应并减少副作用。一般而言,基因位点 (loci) 是由两个等位基因 (alleles) 组成,而 SNP 基因分型是分析特定基因位点 (loci) 处的单碱基对突变。单核苷酸多态性为与人类疾病相关联的最普遍的遗传变异之一,且单核苷酸多态性广泛应用于生物医学研究及临床诊断学。

[0004] 诸如癌症的复合性疾病涉及许多基因的遗传变异。许多研究已显示,与目前仅分析单一或少数几个生物指标的检测方法相比,特别是对于使用临床体液样本的非侵袭性早期癌症检测而言,利用多个生物指标的批量检测 (panel testing) 为准确诊断癌症的更好方法。

[0005] 目前用于医学遗传性检测的技术主要包括定量 PCR、微数组及 DNA 测序。这类技术需要目标 DNA 的大量样本制备,以用于提纯及标记。

[0006] 而且,在临床诊断学中用于核酸分析的方法通常包括许多步骤,这些步骤包括 DNA 提取及提纯、扩增,以及检测及定量。自生物样本提取及提纯核酸的当前方法需要费力及费时工序,这些工序通常涉及细胞的溶解、细胞碎片的沉淀,继之以在多个步骤及试管中使用化学溶剂及离心或真空的 DNA 沉淀及再悬浮。当前方法已成为自动化临床分子诊断系统的瓶颈。

发明内容

[0007] 在一个方面,本发明提供一种分析目标核酸分析物的方法,该方法涉及来自生物样本的核酸分子的检测与分析的简化方法。在所揭示的方法中,通过与在表面上含有目标

特异性捕捉探针的捕捉微粒上进行杂交,而分离来自生物样本的目标核酸分子。各捕捉微粒含有附着在捕捉微粒表面上至少一簇 (cluster) 的目标特异性捕捉探针,其中捕捉微粒上的各目标特异性捕捉探针包含识别序列 (IS) 标签,该识别序列 (IS) 标签是指定为一识别代码 (ID 代码),且该识别代码是代表一预定基因 (预定目标核酸序列)。通过各种方法,诸如经标定的单碱基延长,或探针杂交及连接,来并行分析捕捉微粒上的上述被捕捉的目标核酸分子的序列状态。随后,判定检测中的各捕捉微粒上嵌入目标特异性捕捉探针的 IS 标签的识别代码 (ID 代码)。对捕捉微粒上的 IS 标签的识别代码与捕捉的目标核酸分子的序列变异进行关联 (mapping),可在单一多重检测中同时分析多个感兴趣基因。在单一检测中,本发明的方法所分析的目标核酸分子的数目,可轻易地自数个扩展为数千个。

[0008] 根据一个实施例,本发明提供一种分析目标核酸分析物的方法。在此方法中,通过在表面上含有目标特异性捕捉探针的捕捉微粒上进行接触与杂交,以分离来自生物样本 (诸如临床血液样本) 的目标核酸分子。捕捉微粒含有附着在各捕捉微粒表面上的至少一簇的多个目标特异性捕捉探针,其中捕捉微粒上的各目标特异性捕捉探针包含识别序列 (IS) 标签,该识别序列 (IS) 标签系指定为一识别 (ID) 码,且该识别代码是代表在该检测中感兴趣的一预定目标核酸序列。通过各种方法,诸如经标定的单碱基延长或探针杂交及连接,可并行分析捕捉微粒上的上述被捕捉的目标核酸分子的序列变异。随后,可通过依序成对探针连接化学反应 (sequential paired-probe ligation chemistry) 在来自检测的各捕捉微粒上,并行地判定嵌入目标特异性捕捉探针中的 IS 标签的识别代码 (ID 代码)。对捕捉微粒上的 IS 标签的识别代码与捕捉的目标核酸分子的序列变异进行关联,可在单一多重检测中同时分析多个感兴趣基因。可通过此揭示的方法分析的目标序列的数目在单一检测中可容易地自几个扩展为数千个。序列成对探针连接化学反应在美国专利申请第 US 13/252,095 号中有更详细说明,此处所述的美国专利申请列为本文的参考文献。

[0009] 根据另一实施例,本发明提供一种分析生物样本的目标核酸序列的方法。在此揭示的方法中,通过在表面上含有目标特异性捕捉探针的捕捉微粒上进行杂合选出 (hybridization pullout) 试验之前,利用溶解缓冲液及 λ 核酸外切酶处理样本,以分离来自生物样本 (诸如临床血液样本) 的单链目标核酸分子。捕捉微粒含有附着在捕捉微粒表面上至少一簇的多个目标特异性捕捉探针,其中捕捉微粒上的目标特异性捕捉探针的每一个包含识别序列 (IS) 标签,该识别序列 (IS) 标签对应于一识别代码 (ID 代码),且该识别代码系指定为在该检测中感兴趣的一预定目标核酸序列。根据本申请所揭示的方法,捕捉微粒进行进一步的分析。

[0010] 根据另一实施例,本发明提供一种实现所揭示的方法的系统。在实施例中,该系统包含:流动室,在该流动室处可分析捕捉的目标分子;热控制单元,该热控制单元可调节流动室的部分的温度;磁场控制组件,该磁场控制组件可向流动室中的表面施加磁场;检测器,该检测器可选择性地检测来自不同标记的信号;流体控制系统,该流体控制系统可传送进行样本处理及检测化学所需的试剂;以及电子单元,该电子单元可控制该系统的操作并计算来自分析的结果。上述系统于美国专利申请第 US 13/252,095 号有更详细说明,此处所述的美国专利申请列为本文的参考文献。

[0011] 可理解的是,前述发明内容与以下实施方式仅为例举并提供进一步的说明,并非用以限定本发明。

[0012] 附图简述

[0013] 可通过阅读实施例之实施方式及参考以下附随图式来全面了解本发明。

[0014] 图 1 为根据本发明的实施例的分析目标核酸分析物的方法的示意图。

[0015] 图 2 为根据本发明的实施例的捕捉微粒上的例示性基因分型检测。

[0016] 图 3 为根据本发明的实施例的用于在捕捉微粒上实施基因分型检测的例示性系统。

[0017] 图 4A 至图 4D 为在捕捉微粒上的 VKORC1 的 OLA 的数个照片,其中在显微镜下通过白光(图 4A)显现各图像或通过诸如 FAM(图 4B)、CY3(图 4C)及 CY5(图 4D)的各种染料来标定的各照片。

[0018] 附图符号说明

[0019] 100 :方法

[0020] 101 :获取生物样本的步骤

[0021] 103 :通过利用细胞溶解试剂及 λ 核酸外切酶的样本制备制程处理生物样本的步骤

[0022] 105 :获得单链目标核酸序列的步骤

[0023] 107 :在促进核酸序列杂交的条件下,使至少一个单链目标核酸序列与捕捉微粒的表面接触的步骤

[0024] 109 :以经标定的 ASO 探针及 LSO 探针进行 OLA 连接检测的步骤

[0025] 111 :以洗涤缓冲液来洗涤捕捉微粒的步骤

[0026] 113 :使捕捉微粒的荧光成像的步骤

[0027] 115 :计算 VKORC1/rs7294 的基因型的步骤

[0028] 201 :目标特异性捕捉探针

[0029] 203 :捕捉微粒

[0030] 205 :IS 标签

[0031] 207 :目标捕捉序列区域

[0032] 211 :目标基因组 DNA 片段

[0033] 213a :ASO 探针

[0034] 213b :ASO 探针

[0035] 215 :LSO 探针

[0036] 217 :杂交选出捕捉区域

[0037] 221 :染料

[0038] 223 :染料

[0039] 225 :染料

[0040] 300 :系统

[0041] 360 :检测窗

[0042] 361 :入口

[0043] 362 :出口

[0044] 363 :流动室

[0045] 370 :热电加热及冷却单元

- [0046] 371 :热控制单元
- [0047] 372 :绝热层
- [0048] 373 :支座
- [0049] 375 :检测单元
- [0050] 380 :磁场控制组件
- [0051] 385 :x-y 精确移动台
- [0052] 390 :试剂单元
- [0053] 395 :流体系统
- [0054] 398 :电子单元

具体实施方式

[0055] 将详细参考本发明的实施例,在附图中说明本发明的实施例。只要有可能,在图式及说明书中使用相同组件符号以指代相同或类似零件。

[0056] 在一个实施方式中,本发明提供一种在生物医学研究与临床诊断学中用于目标核酸分子的多重分析的经揭示的方法及系统。

[0057] 本文使用的「核酸」或「寡核苷酸」或文法同义语意谓共价键联在一起的至少两个核苷酸。本发明的核酸大体上会含有磷酸二酯键,但在一些情况中,例如当引物含有标记时,可使用核酸类似物。核酸可为 DNA(基因组 DNA 与 cDNA)、RNA 或杂合物,其中核酸含有脱氧核糖核苷酸与核糖核苷酸的任何组合及碱基的任何组合,这些碱基包括尿嘧啶、腺嘌呤、胸腺嘧啶、胞嘧啶、鸟嘌呤、肌苷、黄嘌呤、次黄嘌呤等。本文使用的「核苷」一词包括核苷酸及核苷与核苷酸类似物,以及诸如标记修饰核苷(label-modified nucleosides)的经修饰核苷。

[0058] 本文所用的「目标核酸分子」或「目标核酸序列」或「目标序列」或文法同义语意谓核酸单链或双链的核酸序列。目标序列可为基因的部分、调节序列、基因组 DNA、cDNA、RNA(包括 mRNA 及 rRNA)或其他。目标序列可为任何长度,但认为较长序列的特异性较高。在一些实施例中,可能需要将样本核酸碎裂或裂解为 100 至 10,000 个碱基对的片段,然而在一些实施例中,约 500 个碱基对的片段为较佳的。本领域技术人员应可理解,互补目标序列可采用许多形式。举例而言,在较大核酸序列(即全部或部分基因或 mRNA)、质粒的限制片段或基因组 DNA 中可包含上述的互补目标序列。

[0059] 概言之,在一些实施例中,目标序列包含所需序列信息的位置,该位置在本文中通称为「检测位置」或「检测基因位点」。在一个实施例中,检测位置为单核苷酸,但在一些实施例中,该位置可包含数个核苷酸,该数个核苷酸可以是彼此邻近或由一或多个核苷酸分离。

[0060] 本文所用的「数个」意谓至少两个。

[0061] 本文所称与杂合物中的检测位置碱基配成碱基对的碱基被称为「目标捕捉序列」或「杂交选出捕捉区域(“hybridization pullout capture region)”,因此,本发明的许多探针包含目标捕捉序列。

[0062] 本文所用的「单链目标核酸」、「单链目标」、「单链目标序列」或其文法同义语系指用于本发明的扩增方法的起始材料。在另一实施例中,本发明的目标序列含有实质上与探

针序列互补的区域,如本文中所界定。

[0063] 本文所用包含目标核酸序列的样本实际上可来自任何生物体及任何来源,而这些来源包括但不限于体液 [包括但不限于血液、骨髓、尿液、粪便、泪水、血清、淋巴液、唾液、肛门及阴道分泌物、汗水、精液及实际上任何生物体(诸如包括人类的哺乳动物样本)的其他体液];包括病毒、细菌及病原体的细胞溶解物;硬组织(例如肝脏、脾脏、肾脏、心脏、肺等器官);环境样本(包括但不限于空气样本、农业样本、水样本及土壤样本);生物战剂样本;研究样本(即,样本可为扩增反应的产物,该扩增反应包括如大体上描述的目标扩增与信号扩增两者,诸如 PCR 扩增反应);提纯样本,诸如提纯基因组 DNA、RNA、蛋白质等;粗样本(细菌、病毒、基因组 DNA 等);正如本领域技术人员所理解的,实际上已对此样本完成任何实验操作。

[0064] 若有需要,可使用已知技术制备目标序列。举例而言,正如本领域技术人员所理解的,可使用已知溶解缓冲液、电穿孔等来处理样本以溶解细胞,并视需求而进行提纯及/或扩增。

[0065] 在一些实施例中,使用包含与目标特异性捕捉探针序列互补的序列以及与至少部分目标核酸序列互补的序列的引物,经由酶反应而从多个目标核酸分子产生第一模板分子及第二模板分子,其中上述样本中的两个目标核酸序列系维持二者之数量比。

[0066] 在一些实施例中,第一目标核酸序列及第二目标核酸序列在丰度上类似。在一些实施例中,第一目标核酸序列是第二目标核酸序列的至少 100 倍、1000 倍或 10,000 倍。

[0067] 在一些实施例中,本发明的方法包含使用目标特异性捕捉探针,这些目标特异性捕捉探针的序列包含识别序列(IS)卷标及与部分目标核酸序列互补的序列。

[0068] 本文所用的「识别序列(IS)标签」系指短人工 DNA 序列,其系用以编码目标分子,而作为识别样本中的分析物之间的特异目标序列。在一些实施例中,IS 标签长度小于 10 个碱基或小于 6 个碱基。IS 卷标亦可包含在译码制程期间探针杂合所需的额外核酸序列。在核酸分析中,IS 标签通常设计为专属于感兴趣的基因体的序列。在一些实施例中,在制备目标特异性捕捉探针时,将上述 IS 卷标导入,而成为目标特异性捕捉探针的一部分。

[0069] 本文所用的「识别(ID)代码」系指定给一 IS 标签的代码。各 IS 标签的碱基组成系对应于特定 ID 代码。

[0070] 本文所用的「空间上分开设置」意谓二簇或二簇以上的目标特异性捕捉探针在空间上分开设置。举例而言,不同簇的目标特异性捕捉探针可设置在相同表面(例如连续式表面)上的不同点,或设置在不同表面,诸如设置在本文所述的不同捕捉微粒的表面。

[0071] 在一些实施例中,多簇的目标特异性捕捉探针系附着在一表面上。目标特异性捕捉探针可直接或间接附着至表面。在一些实施例中,目标特异性捕捉探针系附着至捕捉微粒(亦即顺磁微粒)的表面,且捕捉微粒可通过物理力(例如磁场)或通过本文所述或熟知技术已知的化学键结而固定在表面上。

[0072] 在一些实施例中,识别 IS 标签的 ID 代码经确认后用来判定本文所述的目标核酸序列。

[0073] 本文的「序列变异」意谓序列的特性,诸如单核苷酸多态性(SNP)、突变或甲基化。可通过此项技术中已知的方法或本文所揭示的方法来判定序列变异,这些方法包括(但不限于)标记探针连接、单碱基延长、DNA 测序及熔融曲线分析。

[0074] 本文所用的术语「单核苷酸多态性」或「SNP」系指沿核苷酸序列上的具有一或多个变异体核苷酸的任何位置。单核苷酸多态性 (SNP) 为人类基因组中发现的 DNA 序列变异的最常见形式,且 SNP 通常定义为与已形成为人类基因组测序计划 (Human Genome Project) 之部分的基线参考 DNA 序列的差异,或 SNP 定义为全部人口中得到的个体的子集之间存在的差异,当比较任何两个随机选出的人类染色体时,SNP 的平均发生率为约 1 SNP/1000 碱基对。在一般人群中 (或在许多无关个体中出现) 极为罕见的 SNP,却局限于特定个体或家族中,即可确认出 SNP,反之亦然。SNP 可由于 DNA 复制 (亦即自发地) 中的错误或由于诱变剂 (即来自于特异 DNA 损伤材料) 而产生,而且 SNP 可在生物体的繁殖期间传递至个体之后代。

[0075] 以下揭示一种从生物样本中利用杂交选出、选择性扩增出并分析目标核酸分子的方法。

[0076] 使用 λ 核酸外切酶的目标 DNA 序列提取及分离

[0077] 核酸外切酶为在多核苷酸链的末端处通过磷酸二酯键的水解作用而依序裂解核苷酸的酶。一些核酸外切酶是沿着 3' 至 5' 方向工作,而其他核酸外切酶则沿着 5' 至 3' 方向工作。 λ 核酸外切酶为高度持续性沿着 5' 至 3' 方向消化双链 DNA (dsDNA) 的 5' 磷酸化核酸外切酶,以产生单链 DNA (ssDNA) 片段。可在 Avci-Adali M. 等人的「通过在单链 DNA 产生中使用 λ 核酸外切酶消化而升级 SELEX 技术」(Upgrading SELEX Technology by Using Lambda Exonuclease Digestion for Single-Stranded DNA Generation) (Molecules 15 :1-11,2010) 中对于利用 λ 核酸外切酶的消化产生 ssDNA 的应用有更详细说明,此处所述的论文列为本文的参考文献。反之, λ 核酸外切酶对于单链 DNA (ssDNA) 之活性较低。在诸如 DNA 测序及微数组的各种应用中,核酸外切酶可用于从 PCR 产物中产生 ssDNA。

[0078] 常在临床诊断学中使用人类血液样本。人类血液中的含有基因组 DNA (gDNA) 的白血球组成全部血液细胞的仅 1% 至 2%。通常可使用市售 DNA 提取方法自 1mL 全血样本分离约 3 μ g 基因组 DNA,该 3 μ g 基因组 DNA 对应于约 1×10^7 至 10^8 个 gDNA。在某些比较灵敏的核酸诊断应用中,使用血液样本但不进一步 PCR 是有可能的。

[0079] 在本发明之方法中,在捕捉微粒上溶解细胞并利用杂交选出 (hybridization pullout) 而分离出 DNA,可在单一反应容器中合并成连续制程。在此制程中,可使用 λ 核酸外切酶以产生单链 DNA 片段,这些单链 DNA 片段可用于选择性杂交选出 (selective hybridization pullout) 血液样本中的目标核酸序列。可使用图 1 中概述的方法,在捕捉微粒上有效地分离目标核酸序列。

[0080] 请参照图 1,其为根据本发明一实施例的分析目标核酸分析物的方法的示意流程图。以下方法 100 为从血液样本中例举提取及分离 SNP 以进行 SNP 基因分型,其中该方法 100 包含以下步骤:

[0081] 步骤 101. 获取生物样本。在一实施例中,生物样本可为人类血液样本。然而,在其他实施例中,生物样本可为其他类型之样本。

[0082] 步骤 103 及步骤 105. 利用样本制备制程处理生物样本,以获得单链目标核酸序列。将生物样本 (例如人类血液样本) 添加至反应容器中的样本处理缓冲液混合物中。在实施例中,包括溶解试剂及 λ 核酸外切酶的样本处理缓冲液混合物可同时处理生物样本

以获得单链目标核酸序列。通过 λ 核酸外切酶的 5' 至 3' 核酸酶活性而随机产生单链基因组 DNA (gDNA) 片段 (或称为「单链目标核酸序列」或「目标 ssDNA 序列」)。

[0083] 上述溶解试剂进一步包括 NaOH、吐温 80 (tween 80)、EDTA、PEG、十二烷基肌胺酸盐,并选择性使用蛋白酶 K。将反应混合物置于室温或 37°C 下反应一段时间,通常少于 10 分钟,从而溶解血液样本。在进行所有下列步骤之前,可选择性调整此样本溶解混合物之 pH 值。

[0084] 在其他实施例中,利用细胞溶解试剂溶解生物样本之后,在同一反应容器中添加 λ 核酸外切酶进一步处理生物样本,以获得单链目标核酸序列。在将 λ 核酸外切酶及 λ 核酸外切酶的相关缓冲液混合物添加至同一反应容器后,此反应混合物置于 37°C 下反应一段时间,通常少于 30 分钟。

[0085] 步骤 107. 在促进核酸序列杂交的条件下,使至少一个单链目标核酸序列与捕捉微粒的表面接触。在步骤 105 的同一反应容器中,将捕捉微粒及杂合缓冲液添加至反应混合物中。在添加杂交缓冲液后,混合物的 pH 就维持在可发生核酸杂交的范围内。各捕捉微粒包含至少一簇的多个目标特异性捕捉探针。各目标特异性捕捉探针包含 IS 标签及与感兴趣的目标核酸序列的部分互补的序列。各簇的目标特异性捕捉探针与另一簇的目标特异性捕捉探针为空间上分开的,且该簇的目标特异性捕捉探针相对于另一簇的目标核酸序列之一相对位置为彼此固定。

[0086] 这些捕捉微粒可为顺磁微粒 (paramagnetic microparticles)。在 SNP 基因分型检测中应存在与感兴趣的目标核酸序列的数目一样多的捕捉微粒的类型。将此混合物充分混合并反应一段时间,通常少于一小时。在这段期间可视情况调节容器之温度。因此,通过杂交选出试验来将选定目标 DNA 片段保留在捕捉微粒上。

[0087] 对于不同目标核酸序列而言,为定量的目的,不同类型的捕捉微粒的比率可相同或不同,应视检测设计而定。

[0088] 视情况,在使目标核酸序列与捕捉微粒杂交 (或接触) 之前,可以诸如非对称 PCR 的核酸非对称扩增方法自步骤 105 的经处理的生物样本产生数个单链目标核酸序列。

[0089] 使用识别序列标签之多重核酸分析

[0090] 来自步骤 107 的顺磁微粒上的捕捉的目标 DNA 片段可进行遗传变异的进一步序列分析。

[0091] 步骤 109. 利用经标定的 ASO 探针及 LSQ 探针进行 OLA 连接检测。来自步骤 107 的所有顺磁捕捉微粒被随机分布于一流动室表面,而且在整个确认的分析制程中,所有顺磁捕捉微粒亦保持在流动室表面的适当的位置上,换言之,捕捉微粒各者的位置相对于彼此为已知的。通过各种方法 (诸如在流动室中的捕捉微粒上的经标定寡核苷酸探针杂交与连接),可分析在感兴趣基因的特定基因位点处的核酸序列,这些感兴趣基因亦包含在从样本中选出的 DNA 片段中。寡核苷酸探针上的标记可为不同荧光染料。

[0092] 举例而言,在 SNP 基因分型中,一个颜色可表示特定等位基因,而另一颜色可表示另一特定等位基因。捕捉微粒可在表面上成像。然而,在本发明中,在同一检测中,同一组染料可用于全部感兴趣目标基因位点。每个微粒将仅检测一特定感兴趣之基因位点,且微粒与其他微粒为空间上分开的。

[0093] 步骤 109 中在捕捉微粒上获得的标记信息可与步骤 113 中获得的 ID 代码共同使

用。

[0094] 步骤 111. 利用洗涤缓冲液洗涤捕捉微粒。利用前述标记探针进行序列分析后,可在变性条件下[诸如在高 pH 条件下或使用离液剂(例如胍)时],从顺磁捕捉微粒中分离出捕捉的 DNA 片段,而在顺磁微粒上仅留下目标特异性捕捉探针。剩余的捕捉微粒可在流动室中利用洗涤缓冲液来洗涤,其中这些捕捉微粒彼此的位置仍维持固定。

[0095] 步骤 113. 使捕捉微粒表面上的荧光成像。随后可通过在专利申请 WO/2010/115100A1 中揭示的依序成对探针连接化学反应来判定嵌入在附着于这些微粒的表面上的目标特异性捕捉探针中的 IS 标签,此处所述的专利申请列为本文的参考文献。简言之,在同一流动室中,可利用经标定的寡核苷酸探针库(pool)来进行依序成对探针连接化学反应,其中这些经标定的寡核苷酸探针库(pool)包括 5' 标定的 IS 探针(5' _LISP)组及 3' 标定的 IS 探针(3' -LISP)组。关于依序成对探针连接化学反应,在美国专利申请第 US 13/252,095 号中亦有更详细说明,此处所述之美国专利申请列为本文的参考文献。

[0096] 在步骤 109 中自各捕捉微粒上的标记获得的颜色表示(诸如 SNP 等位基因及突变变异)可与步骤 113 中的来自 IS(识别序列)标签的识别代码结合,以显示各感兴趣目标核酸序列的遗传变异,这些 IS(识别序列)标签系嵌入附着在捕捉微粒上的目标特异性捕捉探针中。本领域技术人员应可轻易理解,在检测中 ID 代码与自各捕捉微粒显示的遗传变异信息之间的关联性。识别代码与嵌入目标特异性捕捉探针内的 IS 标签在美国专利申请第 US 13/252,095 号中有更详细说明,该案列为本文的参考文献。

[0097] 在检测设计中,将由捕捉微粒上的 IS 标签表示的识别代码指定给规定的感兴趣基因。在本发明的方法中,这些感兴趣基因可轻易在单一检测中自几个扩展为数千个。

[0098] 步骤 115. 计算 VKORC1/rs7294 的基因型。对已杂交至表面上的目标特异性捕捉探针上的至少一个目标核酸序列的序列变异进一步分析如下。判定嵌入表面上的目标特异性捕捉探针中的 IS 标签的识别代码。随后,可将这些簇标定为「阳性」群,可通过在序列变异分析步骤(例如图 1 之步骤 109)中使用的探针标记来识别这些簇。样本中的各目标核酸序列的量与各别目标特异性捕捉探针的「阳性」簇之数目成正比。通过比较各目标特异性捕捉探针的「阳性」簇的量,可计算分析物中的目标核酸序列的相对丰度。校准曲线亦可用于定量。

[0099] 在其他实施例中,可在图 3 所说明的系统中实施上述方法。系统 300 包含流动室 363,在该流动室 363 处,可分析捕捉的目标分子。安置于流动室 363 之下的热控制单元 371 可调节流动室 363 的部分的温度。热控制单元 371 包括经附着以用于调节流动室内侧的反应表面的温度的一个或视情况两个热电加热及冷却单元 370,及视情况放置在导热板 371 之间且由支座 373 支撑的绝热层 372。磁场控制组件 380 可向流动室 363 中的表面施加磁场。

[0100] 整个组件可安装在 x-y 精确移动台 385 上,该 x-y 精确移动台 385 可容纳流动室 363 中的检测窗 360 的扫描区域。检测单元 375 系直接面对流动室 363 的检测窗 360 安装,且检测单元 375 能在检测中自动维持焦点及选择性地检测来自不同标记的信号。可使用习知方法进行荧光成像,例如具有不同激发及发射光谱的滤光立方体的荧光显微镜。此外,检测单元 375 亦可包含 CCD 成像摄像头(图未绘示)。

[0101] 流体系统 395 连接至试剂单元 390,在该试剂单元 390 中储存此检测进行样本处

理及检测化学所需的全部必要试剂,且流体系统 395 可选择性维持在规定温度下。流体系统 395 控制试剂自流动室 363 的入口 361 及出口 362 的传送及移除,同时也控制废物。全部控制及数据处理系由电子单元 398 进行,该电子单元 398 控制系统的操作、处理数据及计算来自分析的结果。

[0102] 可以理解的是,本文所述的实施例及例示实施例仅为说明性的,且熟习此项技术者将了解根据这些实施例及例示的各种修改或改变,且这些各种修改或改变都包括在本申请之精神及范围以及附随申请专利范围的范畴内。本文用于各种目的所引用的所有公开案、专利及专利申请均列为本文的参考文献。

[0103] 实施例

[0104] 实施例 1. 个人化医疗之 SNP 分析

[0105] 华法林 (Warfarin) 为用于治疗及预防动脉及静脉血栓栓塞之最常处方用抗凝剂。华法林对于不同患者的治疗剂量范围较狭窄,是因为包括 VKORC1 的各种 SNP 已知会影响对华法林的敏感性,且可导致对华法林剂量需求的 35% 至 50% 的变化性。在 Chen 等人的 US 2011/0236885A1「预测华法林敏感性之遗传变异体」(Genetic Variants Predicting Warfarin Sensitivity) 中详细说明关于华法林敏感性,此处所述的美国专利申请列为本文的参考文献。再者, FDA 在 2007 年批准华法林的更新标记,此举为保健提供者凸显机会,以使用遗传性检测改善个体患者之初始药物剂量预估。(FDA, <http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/2007/ucm108967.htm>)。

[0106] 在此实施例中,通过所揭示的方法选择 VKORC1/rs7294 的基因位点作为用于 SNP 基因分型的目标核酸序列。自因特网 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>) 上可得的 NCBI SNP 数据库获得 VKORC1r/s7294SNP 基因位点的参考序列。

[0107] 寡核苷酸连接检测法 (Oligonucleotide ligation assay ;OLA) 为判定单核苷酸多态性 (SNP) 的特异且灵敏的方法。具体言之,OLA 方法系基于在目标基因位点的 SNP 位置处用连接酶连接两个相邻的寡核苷酸探针。在 OLA 检测中,有一个共同寡核苷酸探针称为基因位点特异探针 (locus specific probe ;LSO),该共同寡核苷酸探针与 SNP 位置一侧的目标 DNA 模板序列互补,另外还有两个标定报导寡核苷酸探针称为等位基因特异探针 (allele specific probes ;ASO),该两个标定报导寡核苷酸探针包含在连接位置处的两个可能的互补碱基中之一者。两个等位基因特异探针 (ASO) 上的标记可为两种不同的荧光染料。含有处于目标核酸序列的 SNP 位置的互补碱基的 ASO 探针仅由 DNA 连接酶连接。通过连接后的 ASO 标记,可指出经连接产物的存在,进而显示出目标 DNA 序列的等位基因变异。OLA 的特异性系由检测中使用的连接酶赋予。

[0108] 在此实施例中,VKORC1/rs7294SNP 为 A/G 等位基因。针对各 SNP 基因位点合成四个寡核苷酸探针的集合:一个 5' 生物素标定的目标特异性捕捉探针 (SEQ ID No. 1);一个基因位点特异寡核苷酸 (LSO) 探针 (SEQ ID No. 2),该基因位点特异寡核苷酸 (LSO) 探针为 5' 磷酸化及 3' FAM 标定的;以及在 5' 端由花青染料 Cy3 或 Cy5 标定的两个等位基因特异寡核苷酸 (ASO) 探针 SEQ ID No. 3 及 SEQ ID No. 4,该 SEQ ID No. 3 及 SEQ ID No. 4 分别表示目标 VKORC1/rs7294 序列的 A 等位基因或 G 等位基因。不同于 OLA 中先前报导的未标定的 LSO,本发明的方法中的 LSO 经标定后作为连接化学反应的指示物。

[0109] 此实施例中用于分析的 VKORC1/rs7294 的寡核苷酸探针序列如下:

[0110] 表 1

[0111]

名称	序列	SEQ ID NO.
5' 生物素标定的捕捉探针	5' 生物素-c12-CTT TGG AGA CCA GCC CAT GGG GAC AGA GTC AGA 3'	1
基因位点特异寡核苷酸 (LSO) 探针	5' Phos-GGG TAT GGC AGG AGG AGG-FAM 3'	2
等位基因特异寡核苷酸 (ASO) 探针	5' Cy3-CAC ATT TGG TCC ATT GTC ATG TGT 3'	3
	5' Cy5-ACA TTT GGT CCA TTG TCA TGT GC 3'	4

[0112] 对 VKORC1/rs7294 片段而言,目标特异性捕捉探针为 33 个碱基长的 5' 生物素标定的寡核苷酸 (SEQ ID NO. 1),距 SNP 的位置约 55 个碱基远。在用于 SNP 基因分型检测之前,目标特异性捕捉探针附着至经抗生蛋白链菌素 (streptavidin) 涂覆的顺磁微粒上。

[0113] 图 2 显示一例示性基因分型检测中捕捉微粒上的 VKORC1 SNP 的示意图。在此例示性方法中,捕捉微粒 203 为直径 1 μ m 的顺磁微粒。目标特异性捕捉探针 201 的序列具有嵌入在目标特异性捕捉探针 201 中接近捕捉微粒 203 的表面的 IS 标签 205,及杂交至目标基因组 DNA 片段 211 的杂交选出捕捉区域 217 的目标捕捉序列 207。两个 SNP 用的目标特异性捕捉探针 201 为相同的以确保两个片段的有效选出。

[0114] 人类血液样本用作此实施例的基因组 DNA 的来源。使用上述样本处理方法,以溶解试剂及 λ 核酸外切酶而无 PCR 扩增,将来自血液样本的目标基因组 DNA 片段 211 分离在捕捉微粒 203 上。随后使来自以上之经处理样本与捕捉微粒 203 接触,这些捕捉微粒 203 具有附着在表面上的 5' 生物素标定的目标特异性捕捉探针 201 且使其目标捕捉序列区域 207 杂合以选出含有 VKORC1SNP 基因位点的杂交选出捕捉区域 217 的 DNA 片段 211。随后,通过添加 ASO 探针 213a、另一 ASO 探针 213b 及 LSO 探针 215 来对这些捕捉微粒 203 进行 OLA,其中 ASO 探针 213a 具有处于 SNP 连接位置且由染料 221 (例如 Cy5 染料) 标定的一个可能的互补碱基 C,ASO 探针 213b 具有处于 SNP 连接位置且由染料 223 (例如 Cy3 染料) 标定的另一可能的互补碱基 T,且 LSO 探针 215 具有处于 SNP 连接位置且由另一染料 225 (例如 FAM 染料) 标定的互补序列。通过使连接的 OLA 探针 (包括 ASO 探针 213a、ASO 探针 213b 及 LSO 探针 215) 的这些捕捉微粒 203 成像,及分析各捕捉微粒 203 的颜色信号来判定 VKORC1SNP 等位基因。根据图 1 来概述此例示性检测方法。

[0115] 该检测方法包括以下步骤:

[0116] 步骤 101. 获取生物样本。举例而言,生物样本可为 25 μ l 体积的人类血液样本。

[0117] 步骤 103 及步骤 105. 以样本制备制程处理生物样本,以获得单链目标核酸序列,其中该样本制备制程利用细胞溶解试剂及 λ 核酸外切酶。举例而言,通过添加 5 μ l 溶解缓冲液来溶解血液样本,且在 37°C 下保温血液样本 10 分钟。随后用 λ 核酸外切酶及缓冲液来进一步处理血液样本,且在 37°C 下将血液样本以 35 μ l 保温 20 分钟以产生单链基因组

DNA (gDNA) 片段。

[0118] 步骤 107. 在促进核酸序列杂交的条件下,使至少一个单链目标核酸序列与捕捉微粒的表面接触。每个捕捉微粒的表面包含至少一簇的目标特异性捕捉探针,该簇的目标特异性捕捉探针的每一者与另一簇的目标核酸序列为空间上分开的,且该簇的目标特异性捕捉探针相对于该另一簇的目标核酸序列之一相对位置为彼此固定。举例而言,通过添加总量 40 μ L 的杂交缓冲液、具有附着在表面上的生物素标定的目标特异性捕捉探针 (SEQ ID NO. 1) 的捕捉微粒、具有 FAM 染料的经标定的 LSO 探针 (SEQ ID NO. 2) 及具有 Cy3 染料及 Cy5 染料的经标定的 ASO 探针 (SEQ ID No. 3 & 4) 来进行目标 ssDNA 片段之杂交选出。且在 65°C 下保温杂交混合物 1 分钟且随后在 45°C 下保温 19 分钟。

[0119] 在步骤 107 中使目标核酸序列与捕捉微粒的表面接触之前,可选择地以目标核酸序列的非对称扩增方法,视情况在步骤 107 中自经处理的生物样本产生数个单链目标核酸序列。

[0120] 步骤 109. 以经标定的 ASO 探针及 LSO 探针进行 OLA 连接检测,其中通过添加总共 50 μ L 的连接缓冲液及 T4 连接酶来引发 OLA 连接反应。在 25°C 下使 OLA 连接反应物保温 20 分钟。

[0121] 步骤 111. 在 60°C 下以洗涤缓冲液来洗涤捕捉微粒两次至三次。

[0122] 步骤 113 及步骤 115. 在荧光显微镜下使捕捉微粒的荧光成像,且分析荧光影像以根据各捕捉微粒的颜色图谱,来计算目标基因组 DNA 片段的 VKORC1/rs7294 的基因型。

[0123] LSO 探针及 ASO 探针系根据 OLA 原理专为各 SNP 基因位点设计。LSO 探针上的 FAM 标记系用以监视连接反应。以 T4 DNA 连接酶进行连接化学反应。在严格条件下洗涤来自 OLA 的捕捉微粒以移除未连接的 LSO 探针及 ASO 探针。微粒随后在荧光显微镜下的玻璃载片上成像。随机分布的捕捉微粒的选择性亮点系经由 4 个颜色通道 (亦即白光、Cy3、Cy5 及 FAM) 成像。在图 4A 至图 4D 中展示 OLA 实验后的 VKORC1 捕捉微粒的例示性影像。图 4A 至图 4D 中的各影像系由获取这些影像之颜色信道标记。具有 FAM 信号的捕捉微粒亦提供 Cy3 信号及 Cy5 信号。

[0124] 由于 FAM 信号来自 LSO 的标记,所以 FAM 信号的存在表明这些捕捉微粒含有来自样本的 VKORC1 DNA 片段。Cy3 信号与 Cy5 信号在这些捕捉微粒上的共存表明 VKORC1 的两个 SNP 等位基因处于来自血液样本的 DNA 片段中,亦即,在此实施例,在检测中的血液样本的 VKORC1/rs7294 SNP 为杂合子 (heterozygous)。

[0125] 通过了解 VKORC1 的基因型,保健专业人士在为个体患者制定华法林剂量时将处于更有利的位置。

[0126] 当用于检测的捕捉微粒存在一种以上类型时,随后可通过包括成对探针连接化学反应的各种方法来判定嵌入目标特异性捕捉探针内的 IS 标签。通过相互关联 IS 标签的识别代码与在各微粒上获得的序列变异,可在单一检测中同时分析多个基因。

[0127] 尽管已参考本发明之某些实施例来相当详细地描述本发明,但其他实施例为可能的。举例而言,通过设计各种 ASO 探针及 LSO 探针,或通过使用在空间上个别定位的目标特异性捕捉探针的许多簇,或通过以其他荧光染料标记彼等探针,或在其他系统 (例如数组) 中实施,本方法及系统可用于分析针对其他基因 (诸如 CYP2D6、CYP2C19、CYP2C9 等) 的 SNP 基因分型。通过相互关联 IS 标签的识别代码与感兴趣基因的序列变异,即使相同染料用作

ASO 探针的不同集合上的标记,亦可在单一检测中同时分析多个基因。因此,附随申请专利范围之精神及范畴应不限于本文所含之实施例的描述。

[0128] 熟习此项技术者将显而易见,在不背离本发明之范畴或精神的情况下,可对本发明之结构做出各种修改及变化。鉴于上述,在本发明之修改及变化属于以下申请专利范围之范畴的条件下,意欲本发明涵盖本发明之修改及变化。

[0001]

序列表.txt

<110> 蒂莫西·Z·刘
 <120> 分析生物样本的目标核酸序列的方法
 <130> 无
 <150> US 61/473,182
 <151> 2011-04-08
 <160> 4
 <170> PatentIn ver. 3.5.1
 <210> 1
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 化学合成之序列
 <400> 1
 ctttgagac cagcccatgg ggacagagtc aga 23
 <210> 2
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 化学合成之序列
 <400> 2
 gggatatggca ggaggagg 18
 <210> 3
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 化学合成之序列
 <400> 3
 cacatttggc ccattgtcat gtgt 24
 <210> 4
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 化学合成之序列
 <400> 4
 acatttggtc cattgtcatg tgc 23

100

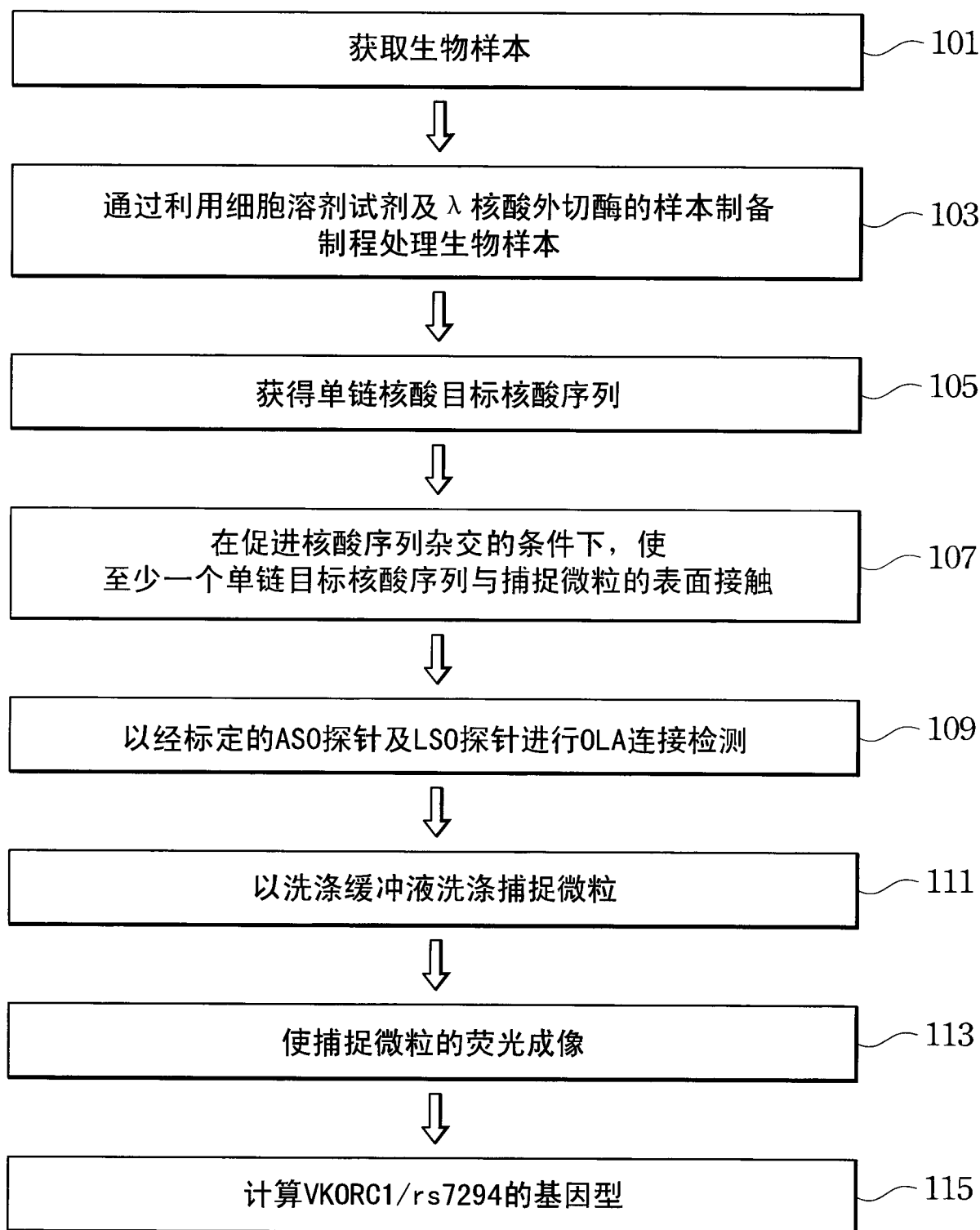


图 1

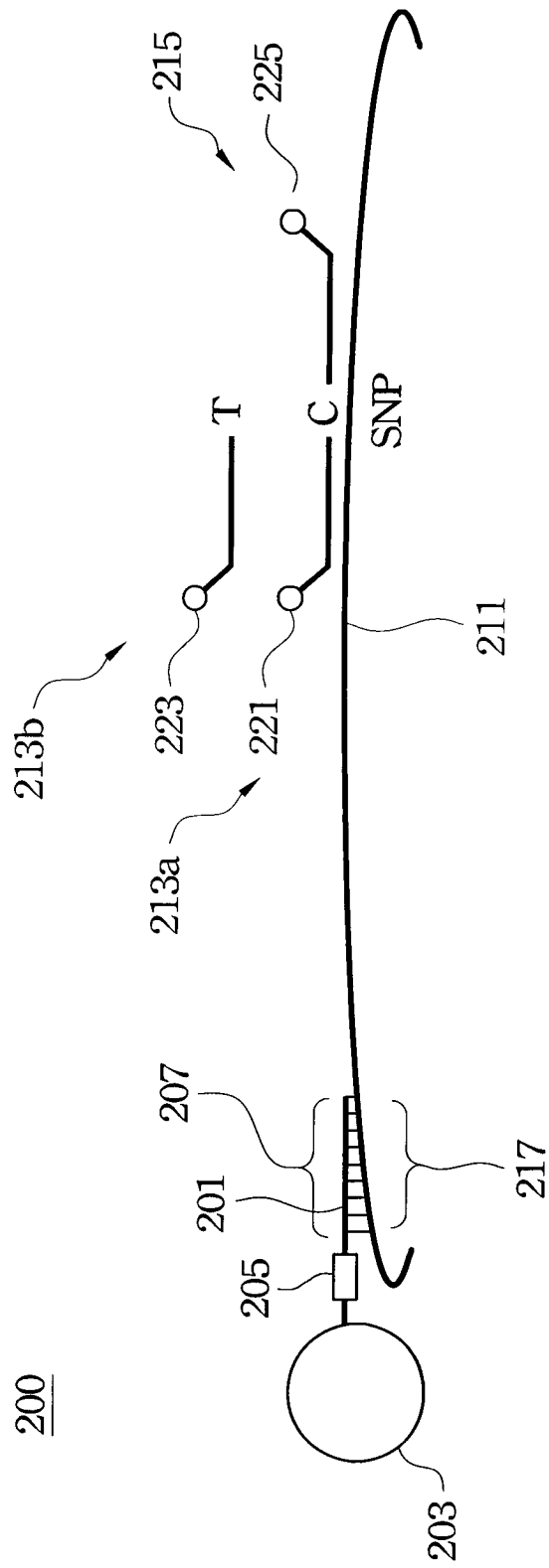


图 2

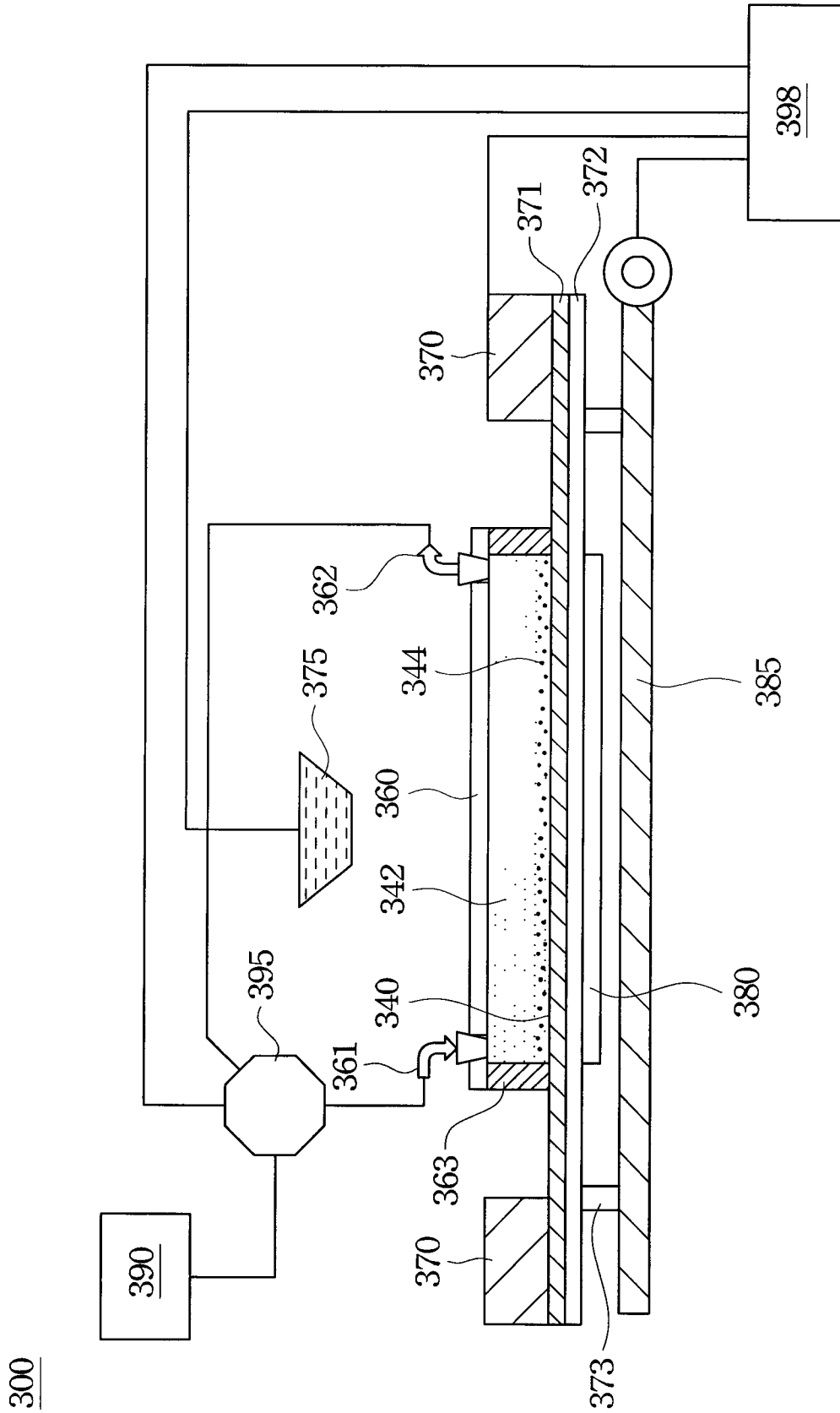


图 3

400

图 4A

图 4B

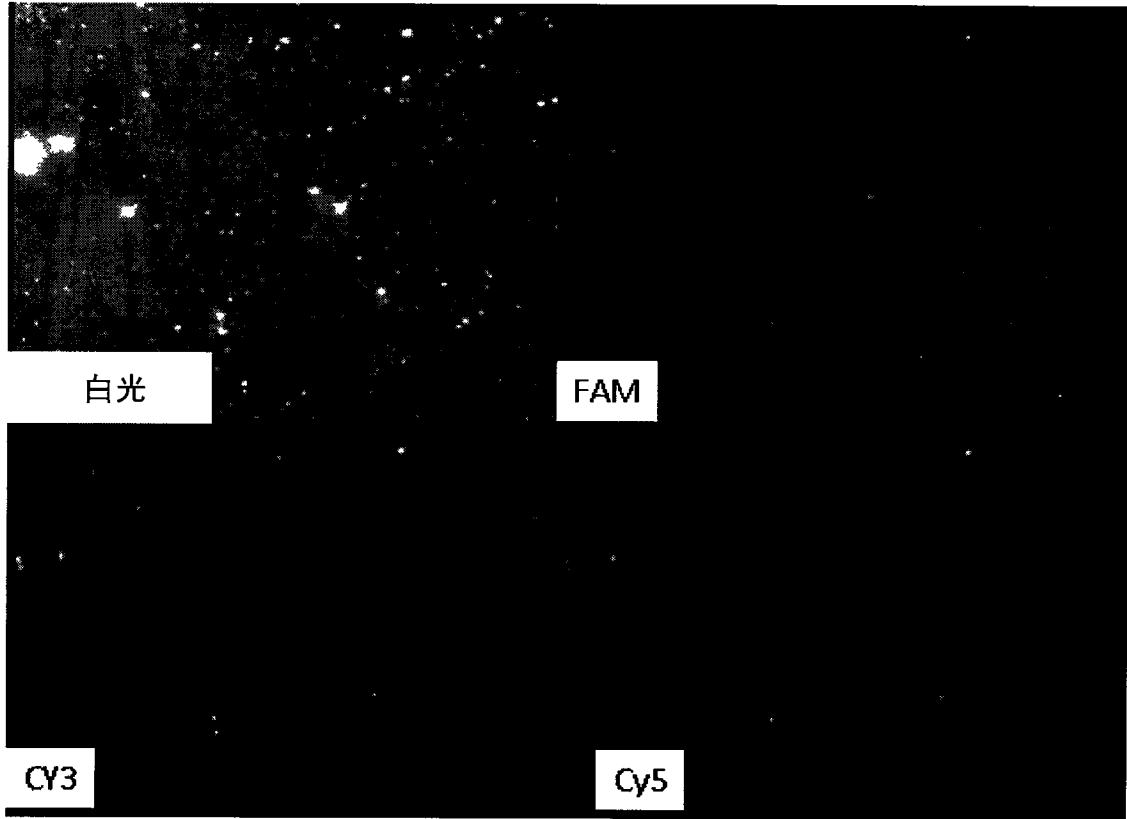


图 4C

图 4D