

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C12Q 1/00

C12Q 1/68

G01N 33/53

C07H 21/04

C07K 16/00



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02826131.3

[43] 公开日 2005 年 4 月 27 日

[11] 公开号 CN 1610752A

[22] 申请日 2002. 10. 28 [21] 申请号 02826131.3

[30] 优先权

[32] 2001. 10. 26 [33] US [31] 60/330,669

[32] 2002. 4. 4 [33] US [31] 60/369,945

[86] 国际申请 PCT/US2002/034570 2002. 10. 28

[87] 国际公布 WO2003/035895 英 2003. 5. 1

[85] 进入国家阶段日期 2004. 6. 25

[71] 申请人 免疫公司

地址 美国德拉华州

[72] 发明人 S·M·奥哈拉 D·兹维茨

B·福尔克

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 顾晋伟 孟凡宏

权利要求书 7 页 说明书 49 页 附图 27 页

[54] 发明名称 多参数全面分析核酸以及同样样品上的形态学特征

[57] 摘要

公开了一种高敏感性的分析法,其利用了一种方法来从血液中发现的稀有细胞和稀有转录本进行基因特异性的 mRNA 库的引物扩增。该分析法通过免疫磁法富集的方式可以检测到 1 到 10 个细胞分离的稀有的 mRNA(10 个拷贝/细胞)。该分析法是多重 PCR 的改进,可以有效检测血液中的循环癌细胞的稀有编码序列。该方法适用于分离自组织或体液的细胞的分析,以及作为临床检测各种癌的辅助手段,包括循环癌细胞的早期检测和分类。以传统的或者微阵列方式进行的细胞核酸和蛋白质图谱的监视,有助于治疗介入的管理,包括病情分期、治疗响应的监测、症状缓解的确认以及恢复的检测。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 一种诊断受试患者的疾病严重性的方法，该方法包括：
 - a. 从疑有癌症的受试患者的血液中获得样品，样品包括怀疑包含上皮来源的癌细胞的混合细胞群体；
 - 5 b. 将所述样品与特异性结合所述癌细胞的免疫磁学微粒混合，基本排除其它样品组分；
 - c. 将样品-免疫磁学微粒混合物经高梯度磁场处理以产生富集有磁微粒结合癌细胞的分离细胞部分；以及
 - d. 分析所述富集部分中所述癌细胞的存在，所述样品中所述癌细胞的存在预示着癌症。
- 10 2. 根据权利要求 1 所述的方法，其中所述受试患者是用于评估循环癌细胞的存在。
3. 根据权利要求 1 所述的方法，其中所述受试患者对癌症根除方法的响应通过所述循环癌细胞的存在进行评估。
- 15 4. 根据权利要求 1 所述的方法，其中所述受试患者已经诊断为患有选自下面的组的癌症，包括前列腺癌、乳腺癌、结肠癌 apud 瘤、迷芽瘤、支气管瘤、恶性类癌综合征、良性肿瘤性心脏病、恶性肿瘤例如 Walker 氏瘤、基细胞瘤、基底鳞状瘤、Brown-Pearce 氏瘤、导管瘤、埃利希瘤、原位瘤、Krebs 2 瘤、merkel 氏细胞瘤、粘蛋白状瘤、
- 20 非小细胞肺癌、小细胞瘤、乳头瘤、硬癌瘤、支气管瘤、支气管源磷状上皮细胞瘤、以及转变性细胞网状内皮组织增殖瘤、黑素瘤、成软骨细胞瘤、软骨瘤、软骨肉瘤、纤维瘤、纤维肉瘤、巨细胞瘤、组织细胞瘤、脂肪瘤、脂肪肉瘤、间皮瘤、粘液瘤、粘液肉瘤、骨瘤、骨肉瘤、Ewing 氏肉瘤、关节骨液瘤、腺纤维瘤、腺淋巴瘤、癌肉瘤、
- 25 脊索瘤、间质瘤、中肾瘤、肌肉瘤、成釉细胞瘤、牙骨质瘤、牙瘤、畸胎瘤、throphoblastic 瘤、腺癌、腺瘤、胆管瘤、珠光瘤、圆柱瘤、囊腺癌、囊腺瘤、淀粉粒质细胞瘤、两性体胚细胞瘤、肝细胞瘤、汗腺腺瘤、岛细胞瘤、leydig 细胞瘤、乳突淋瘤、滋养细胞瘤、卵泡膜细胞瘤、平滑肌瘤、平滑肌肉瘤、成肌细胞瘤、肌瘤、肌肉瘤、横纹肌
- 30 瘤、横纹肌肉瘤、室鼓膜瘤、神经节细胞瘤、神经胶质瘤、成神经管细胞瘤、脑膜瘤、神经鞘瘤、成神经细胞瘤、神经上皮瘤、纤维神经瘤、神经瘤、副神经节瘤、副神经节瘤、非嗜铬细胞、非角质瘤、硬

化性血管瘤、多发性血管瘤、血管球瘤、血管内皮瘤、血管瘤、血管外皮细胞瘤、血管肉瘤、淋巴管瘤、淋巴管肌瘤、淋巴管肉瘤、松果体瘤、癌肉瘤、软骨肉瘤、叶状囊性肉瘤、纤维肉瘤、血管肉瘤、平滑肌肉瘤、白色肉瘤、脂肪肉瘤、淋巴管肉瘤、肌肉瘤、粘液肉瘤、

5 卵巢瘤、横纹肌肉瘤、肉瘤（Kaposi 氏肉瘤和肥大细胞肉瘤）、肿瘤（例如骨癌、消化系统癌、肝癌、胰腺癌、垂体癌、睾丸癌、眼窝瘤、头颈瘤、中枢神经系统瘤、声觉瘤、骨盆瘤、呼吸道瘤、以及泌尿生殖道瘤）、neurobromatosis、以及子宫颈非典型增生。

5.根据权利要求1的方法，其中所述的分析所述的富集部分中所述

10 癌细胞的存在包括：

- a.从所述癌细胞中释放胞质生物分子；
- b.分离所述的胞质生物分子；以及
- c.分析所述的胞质生物分子。

6.根据权利要求1的方法，其中所述的获得所述流体样品是通过细

15 胞分级分离。

7.根据权利要求5的方法，其中所述的释放是通过加入渗透剂实现的。

8.根据权利要求7的方法，其中所述的渗透剂选自由去污剂、表面活性剂及它们的结合组成的组。

20 9.根据权利要求7的方法，其中所述的渗透剂选自由皂角苷、Immuniperm 及它们的结合组成的组。

10.根据权利要求7的方法，其中所述的渗透剂是 Immuniperm。

11.根据权利要求1的方法，其中所述的获得所述流体样品是通过用细胞稳定剂处理。

25 12.根据权利要求11的方法，其中所述的稳定剂选自由醛、脲及它们的结合组成的组。

13.根据权利要求12的方法，其中所述的醛选自由甲醛、多聚甲醛及它们的结合组成的组。

14.根据权利要求11的方法，其中所述的稳定剂是二醛。

30 15.根据权利要求14的方法，其中所述的二醛选自由戊二醛、乙二醛及它们的结合组成的组。

16.根据权利要求11的方法，其中所述的稳定剂选自由 Cyto-

chexTM、 StabilocyteTM 以及
TransfixTM 组成的组。

17.根据权利要求 11 的方法,其中所述胞质生物分子的所述释放涉及通过所述稳定剂处理形成大分子复合物。

5 18.根据权利要求 17 的方法,其中所述胞质生物分子从所述细胞的所述释放是由酶消化产生的。

19.根据权利要求 18 的方法,其中所述的酶消化是通过包括蛋白酶、亲核试剂及它们的结合而发生的。

20.根据权利要求 19 的方法,其中所述的蛋白酶选自由蛋白酶 K 消
10 化、V8 蛋白酶消化、链霉蛋白酶消化及它们的结合组成的组。

21.根据权利要求 19 的方法,其中所述的亲核试剂选自由磷酸基缓冲液、tris 基缓冲液、乙酰肼、羟胺及它们的结合组成的组。

22.根据权利要求 5 的方法,其中所述的胞质生物分子是蛋白质。

23.根据权利要求 22 的方法,其中所述蛋白质的所述分离选自由化
15 学提取、电泳、层析、免疫分离以及亲和技术组成的组。

24.根据权利要求 5 的方法,其中所述的胞质生物分子是核酸。

25.根据权利要求 24 的方法,其中所述的核酸选自由胞质 RNA、细胞核和线粒体 RNA、细胞核和线粒体 DNA 及它们的结合组成的组。

26.根据权利要求 24 的方法,其中所述的核酸是胞质 mRNA。

20 27.根据权利要求 24 的方法,其中所述核酸的所述分离选自由 RNA 或 DNA 化学提取、电泳、层析、免疫分离以及亲和技术组成的组。

28.根据权利要求 24 的方法,其中所述核酸的所述分离是通过用粘附到寡聚(dT)上的磁珠捕获进行的。

29.根据权利要求 5 的方法,其中所述靶细胞的分析是用于表型表
25 达,而不是在获得所述流体样品后以所述胞质生物分子进行的。

30.根据权利要求 29 的方法,其中所述的表型表达选自由形态检查、细胞成分染色、免疫分析及它们的结合组成的组。

31.根据权利要求 1 的方法,其中所述的分析是通过选自下面组的方法进行的,包括多参数流式细胞计数、免疫荧光显微镜方法、激光
30 扫描细胞计数、明视场基本图像分析法、毛细管容量分析法、光谱图像分析法、手工细胞分析法以及自动细胞分析法。

32.根据权利要求 5 的方法,其中所述胞质生物分子的所述分析是

通过功能蛋白质学方法进行的。

33.根据权利要求 32 的方法，其中所述的功能蛋白质学方法选自下面的组，包括蛋白质表达谱、Western 印迹、氨基酸序列分析、电泳、2-D 电泳、质谱、气相色谱、液相色谱、核磁共振、红外光谱、原子吸收及它们的结合。

34.根据权利要求 5 的方法，其中所述胞质生物分子的所述分析是通过功能基因组学方法进行的。

35.根据权利要求 34 的方法，其中所述的功能基因组学方法选自下面的组，包括 mRNA 谱分析、蛋白质表达谱分析、聚合酶链式反应、Northern 印迹、Western 印迹、核苷酸或氨基酸序列分析、微阵列上的基因表达、电泳、2-D 电泳、质谱、气相色谱、液相色谱、核磁共振、红外光谱以及原子吸收。

36.根据权利要求 5 的方法，其中分析所述胞质 RNA 中至少两个遗传标记的存在是通过多基因 RT-PCR 进行的。

37.根据权利要求 5 的方法，其中所述遗传标记确定了所述癌细胞的组织来源。

38.根据权利要求 5 的方法，其中所述遗传标记诊断已知的癌症。

39.根据权利要求 5 的方法，其中所述遗传标记确定了选自由乳腺癌、前列腺癌、肺癌、结肠癌、肾癌以及膀胱癌组成的组的癌症。

40.根据权利要求 5 的方法，其中所述遗传标记确定了癌症，所述遗传标记选自 MGB1、MGB2、PIP、CEA、PSA、PSMA、hK2、AR、DD3、Her-/Neu、BCL2、EGFR、TS、DPYD、IGF2、ER、PR、cyp19、TERT、常规上皮组织特异的基因、CK19、CK8、CK20、EpCAM、MUC1、拓扑异构酶、uPA、uPAR、MMP、常规白细胞特异的 mRNA、 α -1-球蛋白、CD16、CD45、以及 CD31。

41.根据权利要求 5 的方法，其中分析所述胞质 RNA 中的所述遗传标记包括：

a.用至少一组都在 5'端具有通用引物延伸的基因特异性引物逆转录所述遗传标记；

b.除去所述基因特异性引物；

c.用所述的通用引物延伸在 PCR 扩增中扩增基因特异性扩增子；
以及

d.鉴别所述的基因特异性扩增子。

42.根据权利要求 41 的方法，其中所述基因特异性引物的所述去除是使用下面组的方法完成的，包括分子大小排阻、固体支持物选择性附着、单链特异性 DNase、以及结合尿嘧啶-N-糖基化酶与由脱氧尿苷合成的 DNA 寡核苷酸引物。

43.根据权利要求 41 的方法，其中所述基因特异性引物的所述去除是用尿嘧啶-N-糖基化酶处理由脱氧尿苷合成的 DNA 寡核苷酸引物而完成的。

44.根据权利要求 43 的方法，其中所述的尿嘧啶-N-糖基化酶处理之后加入不含 DNase 的 RNase。

45.根据权利要求 41 的方法，其中所述的基因特异性引物是在高的引物-靶退火特异性条件下使用的。

46.根据权利要求 45 的方法，其中所述的高的引物-靶退火特异性是使用来自细胞修复机制的天然重组的蛋白质实现的。

46.根据权利要求 46 的方法，其中所述的高的引物-靶退火特异性是用 recA 实现的。

48.根据权利要求 41 的方法，其中所述基因特异性扩增子的所述鉴别是通过其在基于大小的分析系统中的独特 Rf 值进行的。

49.根据权利要求 48 的方法，其中所述的基于大小的分析系统选自由 PAGE、琼脂糖凝胶电泳、毛细管凝胶电泳、SELDI、MALDI、以及 cDNA 阵列组成的组。

50.根据权利要求 5 的方法，其中所述的分析包括：

a.通过线性扩增预扩增所述提取的核酸，其中所述的预扩增造成所有库转录本以 aRNA 的形式增加至少 1000 倍；

b. 从所述 aRNA 合成最多仅 1000 个独立选择的相关基因的第二链；以及

c.使用下面组的方法识别扩增产物，包括阵列分析、电泳以及它们的结合。

51.根据权利要求 50 的方法，其中所述的预扩增是通过由 SP6 RNA 聚合酶启动子、T3 RNA 聚合酶启动子、以及 T7 RNA 聚合酶启动子组成的组进行的。

52.根据权利要求 50 的方法，其中所述预扩增是由使用随机引物的

RNA 聚合酶进行的。

53.根据权利要求 50 的方法，其中所述的第二链的所述合成是在高的引物-靶退火特异性条件下进行的。

54.根据权利要求 53 的方法，其中所述的高的引物-靶退火特异性
5 是使用来自细胞修复机制的天然重组的蛋白质实现的。

55.根据权利要求 54 的方法，其中所述的高的引物-靶退火特异性是用 recA 实现的。

56.根据权利要求 50 的方法，其中所述的识别是通过使用不含 DNase 的 RNase 预处理进行的。

10 57.根据权利要求 56 的方法，其中所述的预处理选自由酚萃取、二氧化硅结合以及它们的结合组成的组。

58.根据权利要求 50 的方法，其中所述的识别是通过所有的双链产物的扩增进行的。

15 59.根据权利要求 50 的方法，其中所述的识别选自由阵列分析、电泳以及它们的结合组成的组。

60.一种用于筛选患者样品中循环癌细胞存在的测试试剂盒，包括

a.免疫磁学微粒，其中所述微粒特异性结合癌细胞；

b.细胞渗透剂；

c.细胞稳定剂；

20 d.核酸释放试剂；

e.核酸扩增试剂；

f.纯化试剂，其中选择所述的纯化试剂用于双链产物；

g.核苷酸特异性检测试剂，其中所述的检测试剂能够确定双链产物；以及

25 h.使用权利要求 1 的方法的说明书。

61.如权利要求 60 所述的试剂盒，其中所述的试剂盒进一步包括具有对所述癌细胞的结合特异性的免疫磁学微粒。

62.如权利要求 60 所述的试剂盒，其中所述的细胞渗透剂选自由皂角苷、去污剂、表面活性剂以及它们的结合组成的组。

30 63.如权利要求 60 所述的试剂盒，其中所述的渗透剂是 Immuniperm。

64.如权利要求 60 所述的试剂盒，其中所述的稳定剂选自由醛、二

醛、脲以及它们的结合组成的组。

65.如权利要求 60 所述的试剂盒,其中所述的稳定剂选自由 CytochexTM、StabilocyteTM 以及 TransfixTM组成的组。

5 66.如权利要求 60 所述的试剂盒,其中所述的释放试剂选自由蛋白酶、亲核试剂以及它们的结合组成的组。

67.如权利要求 66 所述的试剂盒,其中所述的蛋白酶选自由蛋白酶 K、V8 蛋白酶、链霉蛋白酶以及它们的结合组成的组。

68.如权利要求 66 所述的试剂盒,其中所述的亲核试剂选自由磷酸基缓冲液、tris 基缓冲液、乙酰肼、羟胺以及它们的结合组成的组。

10 69.如权利要求 60 所述的试剂盒,其中所述的纯化试剂是对所述核酸具有结合特异性的免疫磁学微粒。

70.如权利要求 60 所述的试剂盒,其中所述的纯化试剂选自由 RNA 或 DNA 化学提取剂、电泳剂、层析剂、免疫分离剂以及核苷酸亲和剂组成的组。

15 71.如权利要求 60 所述的试剂盒,其中所述的扩增试剂选自由 SP6 RNA 聚合酶/启动子、T3 RNA 聚合酶/启动子、以及 T7 RNA 聚合酶/启动子组成的组,所述的扩增试剂将核酸量增加 1000 倍。

72.如权利要求 60 所述的试剂盒,其中所述的扩增试剂是 RNA 聚合酶/随机引物,所述的扩增试剂将核酸量增加 1000 倍。

20 73.如权利要求 60 所述的试剂盒,其中所述的扩增试剂是聚合酶/具有高的引物-靶退火特异性的引物。

74.如权利要求 60 所述的试剂盒,其中所述的纯化试剂是不含 DNase 的 RNase。

25 75.如权利要求 60 所述的试剂盒,其中所述的纯化试剂选自由酚萃取试剂和二氧化硅结合试剂组成的组。

76.如权利要求 60 所述的试剂盒,其中所述的核苷酸特异性检测试剂选自由双链核苷酸扩增试剂、阵列分析试剂、和电泳试剂组成的组。

多参数全面分析核酸以及同样样品上的形态学特征

根据 U.S.C.119 (e), 本申请要求美国临时申请 No: 60/369,945 (申请日 2002 年 4 月 4 日) 和 60/330,669 (申请日 2002 年 10 月 26 日) 以及 PCT/US02/26867 (申请日 2002 年 8 月 23 日) 的优先权。

发明领域

本发明一般地涉及用于肿瘤领域和诊断测试的胞质生物分子的基因特异性扩增、分析和图谱。本发明特别适用于这些领域, 如癌症普查、化疗选择和监测、或者癌症复发。更特别地, 本发明提供了有助于来自生物样品的肿瘤细胞或其它稀有细胞的 mRNA 和 DNA 的全面分析的方法、装置和试剂盒, 同时保持细胞的完整用于计数和形态图像分析。为实现这点, 本发明也提供了方法以允许分析从细胞例如肿瘤细胞释放的可溶性胞质生物分子, 其用渗透试剂来确定释放的核酸分子的表达谱, 同时仍然保持细胞的形态学和抗原性特征以用于随后的或者并行的多参数流体细胞计数、成像、以及免疫细胞化学分析 (参见 US 6,365, 362)。本发明也提供了方法以允许使用由基于醛和醛-脲衍生物的固定剂稳定的样品进行同样的全面分析。

相关现有技术的说明

任何特定的细胞仅仅表达其基因组中存在的总基因的一部分。被表达的总基因的部分决定了细胞的功能, 诸如发育和分化、自体调节、细胞循环的调节、老化、凋亡, 等等。基因表达的改变决定了正常细胞发育的进程以及疾病状态例如癌症的出现。特异性基因的表达对于任何特定细胞的本质将具有深远的影响。因此, 分析基因表达的方法, 例如本发明提供的那些方法, 在基本分子生物学研究和肿瘤生物学中是重要的。特异性基因特别是稀有基因的鉴定能够为诊断、预后和治疗各种反映这些基因表达水平的疾病提供关键信息 (Levsky, et al., Single-Cell Gene Expression Profiling, Science, 297: 836-840, (2002))。

差异基因表达是一种通用的评估细胞中基因表达的方法。特别是, 用 cDNA 微阵列分析比较获自健康个体和患病个体的细胞或器官的 cDNA 靶序列水平。然后将这些靶序列与一系列固定在膜上的探针片段杂交。然后检测所得的杂交图案的区别并关联到两种来源基因表达的

差别(US 6,383, 749)。这种方法要求缓慢的并且耗时的分析成百上千的基因特异性探针。而且竞争作用可能干扰杂交而导致信噪比的降低,例如非互补的靶序列之间的相互作用、靶与探针之间的非特异性结合以及靶序列的二级结构。

- 5 基因特异性引物组已经在分析差异性表达中公开(US 5,994, 076 和 US 6,352, 829)。这里,基因特异性引物组用于特异性扩增复合文库中的 mRNA 分库组以获得与全库标记扩增相比的 cDNA 阵列信号的改善。这种类型的分析的关键是比较样品阵列表达谱作为基因发现研究的一部分,而不是开发在诊断中具有实用性的用于实践的细胞 RNA
10 分析的方法。

因此,尽管基因特异性引物组已经用于从 mRNA 库选择性扩增特定的 mRNA 亚组,仍然存在降低扩增过程中的信噪比的明确需求,特别是应用于诊断治疗的稀有细胞检测以包括定量和定性分析两者。

- 现在普遍接受的是,患者血液中循环肿瘤细胞(CTC)的存在提
15 供了评估治疗介入需求的早期检测体系。可以精确计数循环癌细胞的高敏感性分析法已经表明,外周血肿瘤细胞的量与疾病状态相关(Terstappen 等人,外周血肿瘤细胞的量反映了乳腺癌患者的疾病的临床活性, *International J. of Oncology*, 17: 573-578,2000)。

- 此外,细胞类型和来源的分类将提供更全面的治疗平台。对几例癌
20 症例如扩散性大 B 细胞淋巴瘤(DLBCL)的治疗基于两种不同的与临床预后相关的疾病类型(Rosenwald 等人,使用分子图谱预测扩散性大 B 细胞淋巴瘤的化疗后的存活率, *New England Journal of Medicine*, 346: 1937-1947, (2002))。在 DLBCL 中,源自生发中心 B 细胞的肿瘤对化疗是敏感的,具有更高的存活机会,而来自活性 B 细胞的那些可能
25 更难治疗。因而这些细胞亚型依赖于肿瘤细胞的来源。

- 这些亚型的分层依赖于肿瘤的细胞来源。尽管在几个例子中亚型的差别可以通过分析单一基因而确定,基因组合的完整阵列还是更加具有决定性。通过微阵列分析基因表达水平而制作的基因表达谱将是其它疾病的肿瘤性质的期望指标,例如淋巴瘤、急性白血病、乳腺癌、
30 肺癌以及肝癌。然而,要适应这一点,诊断用遗传信息需要解决现有技术状况下固有的明显信噪问题。

因此,具有很大的兴趣来开发分析基因表达的新方法,特别是这样

的方法提供了快速杂交、高特异性结合靶与互补探针、以及极大改善信噪比。此外，当分析与癌和相关状态疾病有关的基因表达时，这些方法具有额外的重要性（参见美国申请 10/079,939 和美国申请 09/904,472，二者均在此全文引入作为参考）。

5 发明概述

本发明提供了对分离自循环稀有细胞的扩增 mRNA 的基因表达进行分析的方法、装置以及试剂盒（参见图 1），其克服了上文描述的现有技术的缺点。本发明提供了从单一靶细胞或者细胞群分离可溶性或者可释放的胞质生物分子的方法，它同时保持结构上的细胞完整性或者表型特征。因此，细胞是新鲜的，或者是稳定的并用交联剂固定，与形成孔道的可渗透成分接触，并回收核酸。来自固定化细胞的 RNA（PCT/US02/26867）通过蛋白酶与亲核逆转试剂的结合进行回收，用于扩增以及随后的定性和定量 PCR 分析，或者通过融合逆转录（RT）引物的基因特异性亚组并随后进行通用引物的 PCR 扩增而用于定量分析。因此，本发明的一个焦点是制备用于胞质生物分子分析以及表型细胞分析的细胞，其通过在渗透之前稳定和固定化细胞，然后从同一稳定化细胞释放核酸来制备。

本发明也涉及分离靶细胞中的细胞核和/或线粒体 DNA、RNA、蛋白质以及其它可溶性组分，其通过将细胞或细胞群与渗透性组分接触并分别分析一个或多个成分的释放和/或未释放部分，诸如细胞核和/或线粒体 DNA、总 RNA、mRNA、可溶性蛋白、以及其它靶物质（美国申请 60/330,669）。

本发明包括对来自同一细胞或细胞群的胞质生物分子以及膜或表面生物分子都进行分析，其通过将细胞与渗透试剂接触并分别分析胞质生物分子和表面生物分子以形成包括源自基因型和表型细胞特征的特征在内的功能性细胞图谱，用于区分正常的和转化的细胞。

本发明的分离方法和稀有细胞分析方法相结合，提供了能够从稀有细胞获得全面分析 mRNA 的方法和试剂。例如，那些定义为循环肿瘤细胞（CTC）的细胞群将是在癌症患者外周血和骨髓中发现的稀有细胞类型。mRNA 通过本发明描述的细胞制备方法而获得，但是也将包括现有技术中通用的任何方案。

从包含相关细胞的样品分离并纯化 mRNA 后，检测带有低 mRNA

拷贝数的非常稀有的细胞，这通过带有或不带有基于 T7 RNA 聚合酶 (T7 RNAP) 的预扩增步骤的基因特异性 RT-PCR 仪而完成(美国专利 60/369,945)。预扩增通过使用修正的 Eberwine aRNA 方法进行完整 mRNA 库的线性扩增而完成(Van Gelder 等人, 1990)。在一个优选的具体实施方式中，反义 mRNA 库 (aRNA) 预扩增的形成导致了分离自铁磁流体富集的循环细胞的初始 mRNA 中存在的所有信息增加了至少一千倍。然后基因特异性引物仅仅用于扩增相关的基因。这些引物设计来扩增标志着已知稀有事件例如循环肿瘤细胞的转录产物。靶序列的数量可以小至两个或者大至必须能够与稀有事件的一些标志特征相关联。这可以作为分开的各自反应或者在单独的反应瓶中进行。随后的分析产生靶序列的至少定性评估，其由诸如这些方法获得，但不限于，我们在这里提供的基因特异性引物 (GSP) 阵列和/或 GSP 系列-RT (通用 PCR) 的两种类型多基因分析方法之一。

通用 PCR 在带有或不带有 mRNA 库预扩增的单独反应管中从样品回收的 mRNA 中获得多基因分析。不带预扩增只能允许同时分析一个基因。预扩增增加了在最多 1000 个不同的反应中分析一个样品的优点，这样就可以在不同的时间来检查许多不同的基因。尽管注意到其它方法也可以使用，但是通用 PCR 分析仪的分析是由阵列或者毛细管凝胶电泳 (CGE) 完成的。因此，当以 cDNA 微阵列方式进行测定时，该系统可同时用于 1 到上千个单独的 mRNA 类型的定量以及定性鉴定。

因此，本发明包括上述分离方法和图谱分析涉及的方案和试剂盒的结合，包括一些或所有必须的试剂，包括渗透性组分，在交联后 RNA 回收剂，表面共价结合寡聚 (dT) 探针的磁微球，以及用于捕获并进行全面性分析的 RNA 分析的其它基因特异性结合磁微球的探针，其使用小的或者大的微阵列、毛细管凝胶电泳 (CGE)、HPLC、电泳以及其它分析平台。

附图的简要说明

图 1 显示了一个流程图，描述了由本申请公开的发明所允许的用于单一样品多参数分析的各种可能性以及可选择性。表型和基因型分析在固定的或者不固定的细胞上获得。

图 2 显示了变性总 RNA 的反相图像 (负染)，其通过 SYBR 金染

大约 1600 个 SKBR3 乳腺癌细胞后以 2% 琼脂糖凝胶电泳进行分析, 所述细胞在以 Trizol 加小球状颜料共沉淀从所得的上清液中分离出总 RNA 之前, 用 Immuniperm 进行处理。

5 图 3 显示了以溴乙锭染色的 1% 变性总 RNA 琼脂糖凝胶, 包括全细胞、来自细胞沉淀丸粒部分的 Immuniperm (皂角苷)-渗透的细胞、以及来自 Immuniperm[®]-渗透的 SKBR3 乳腺癌细胞的上清液部分的细胞。

图 4 显示了图 3 所示的凝胶被多核苷酸激酶处理过的 ³²P-标记寡聚 (dT) (25 mer) 探针杂交的 Northern 印迹荧光图谱。放射性信号相应于来自全细胞的总 RNA 的所有多聚 (A)⁺ mRNA 转录产物以及图 3 所示凝胶中两种 Immuniperm[®]-处理的细胞部分。

图 5 显示了图 4 的条带经常规洗脱和去除标记的寡聚 (dT) 探针并用细胞核特异的前体 rRNA 探针再杂交的 Northern 印迹。

15 图 6 显示了图 5 的 Northern 印迹经剥脱并用线粒体特异性的 12s rRNA 探针再杂交。

图 7 显示了 cDNA 阵列点印迹杂交模式的比较, 用于产生图 3 凝胶图谱的相应 mRNA 是在第一链寡聚 (dT) 引物 cDNA 合成中进行过 α -³²P 核苷酸标记的。然后将标记的第一链 cDNA 用作杂交探针。图谱比较显示出同样相对丰度的 mRNA 存在于所有三种 RNA 细胞部分中。

20 图 8 显示了相关胞质总 RNA 的凝胶图谱, 既定量也定性, 所述 RNA 是分别处理均被 Immuniperm[®]处理的多个包含大约 770 个 PC-3 细胞的试样后而获得。

图 9 显示了使用 CytoChex[™] 和其它醛基固定剂对 90-100% 的总 RNA 库进行保存、回收和 RNA 完整性分析, 然后酶消化。在该实验中, 300,000 个 SKBR3 细胞系细胞的大多数标准化部分首先掺入到新鲜提取的 7.5 ml 外周血 (EDTA Vacutainer 管) 中, 包括无固定剂的对照道以及具有三种不同固定剂 Cyto-Chex[™]、Stabilocyte[™] 和 Transfix[™] 的道。它们混合后在室温 (20-25°C) 孵育 24 小时。随后使用 VU-1 D9 (EpCAM)-铁磁流体免疫磁学选择将这些 SKBR3 细胞富集。每份处理的富集细胞分成 3 等份, 用蛋白酶 K 处理 (标记为 “Post” 的道) 或者不用蛋白酶 K 处理 (标记为 “Pre” 的道立即进行 RNA 分离, 标记为 “No” 的道表示其与 Post 的唯一区别就是不加入蛋白酶 K

成分,所有的其它处理与 Post 相同)。所得的标准化 RNA 分离物用 1 % 变性琼脂糖分离,用 SYBR 金染色,α 图像密度仪照相,然后进行 Northern 印迹,最后以寡聚 (dT) 探针显示回收的总 RNA 和 mRNA 库各自的相对质量和数量。

- 5 图 10A 和 B 显示了 Cyto-ChexTM、StabilcyteTM、TransfixTM、多聚甲醛、甲醛、戊二醛和乙二醛在 1、2 和 4 小时期间固定的相对速度。在该实验中, Cyto-ChexTM、StabilcyteTM、TransfixTM、多聚甲醛、甲醛、戊二醛和乙二醛固定的时间过程相对速度在第 1、2 和 4 小时进行分析。用如图 9 中所述的同样方法从单个供体制备 7.5ml 的血液样品。
- 10 唯一的区别是它们在第 1、2 和 4 小时的时间端点对 RNA 分离物进行选择 and 加工。所得的标准化 RNA 分离物用 1 % 变性琼脂糖分离,用 SYBR 金染色,α 图像密度仪照相,然后进行 Northern 印迹,最后以寡聚 (dT) 探针显示回收的总 RNA 和 mRNA 库各自的相对质量和数量。
- 15 图 10C 显示了 Cyto-ChexTM 和多聚甲醛在 15、30 和 45 分钟时间过程的相对固定速度。在该实验中, Cyto-ChexTM 和多聚甲醛固定的时间过程相对速度在第 15、30 和 45 分钟进行分析。用如图 9 中所述的同样方法从单个供体制备 7.5ml 的血液样品。唯一的区别是它们在第 15、30 和 45 分钟的时间端点进行选择。显示相对 mRNA 库质量和数量的寡聚 (dT) 探针印迹的荧光图像定量表明相对速度为: 甲醛=多聚甲醛 (~4 倍) > TransfixTM (~2 倍) > StabilcyteTM (~1.5 倍) > Cyto-ChexTM (~1 倍) = 戊二醛和乙二醛, 过慢就不能排序了。所得的标准化 RNA 分离物用 1 % 变性琼脂糖分离,用 SYBR 金染色,α 图像密度仪照相,然后进行 Northern 印迹,最后以寡聚 (dT) 探针显示回收的总 RNA 和 mRNA 库各自的相对质量和数量。
- 20
- 25

- 图 11 显示了亲核试剂和酶的改变对由 Cyto-ChexTM 保存回收的 RNA 质量和数量的影响,证明当用于复合处理以改善序列分析质量是可能的。所得的标准化 RNA 分离物用 1 % 变性琼脂糖分离,用 SYBR 金染色,α 图像密度仪照相,然后进行 Northern 印迹,最后以寡聚 (dT) 探针显示回收的总 RNA 和 mRNA 库各自的相对质量和数量。
- 30

图 12A 显示了诊断应用的可行性,这是通过检测来自 10 个 SKBR3 细胞/7.5ml 血液的特异性 mRNA 而证实,所述的血液是经 Cyto-ChexTM

稳定 24 小时用蛋白酶回收以及 aRNA 预扩增。诊断应用的可行性在此通过敏感和可再现地检测特异性 mRNA 三次,其来自 10 或 20 个 SKBR3 细胞掺入的 7.5ml 外周血来证实。掺入后的血液立即用 Cyto-Chex™ 处理进行稳定以稳定化细胞 RNA。在室温 (20-25°C) 孵育一天后,稳定化的细胞使用 VU-1 D9 (EpCam)-铁磁流体免疫磁学选择进行选择性富集。富集后用蛋白酶 K 消化以释放 RNA,以便在二氧化硅结合 RNA 分离之后进行 aRNA 预扩增以及能够对 CK19 和 EpCAM 进行基因特异性定量 RT-PCR。

图 12B 和 12C 分别显示了 CK19 和 EpCAM 的 Q-PCR,其来自 SKBR 细胞掺入,铁磁流体选择,以及 CytoChex™ 处理,接着用蛋白酶逆转。该实验显示了定量 RT-PCR 分析的结果,其在作图前对初始总 RNA 量进行标准化。这样,显示的数值相当于在 aRNA 扩增前包含在初始 RNA 分离物中的起始 mRNA 量。

图 12D 和 12E 分别显示了 CD19 和 EpCAM 在 aRNA 上的 Q-PCR,其来自用细胞稳定剂处理的 SKBR 细胞。这些实验显示来自三种不同固定剂的 RNA,在图 9 中显示为 Cyto-Chex™、Stabilocyte™ 和 Transfix™。这些蛋白酶 K 回收的 RNA 样品也对 CK19 和 EpCAM 进行了 aRNA 预扩增和基因特异性定量 RT-PCR 的同样 mRNA 模板分析,如分别示于图 12B 和 12C。这里显示的这些数据都对总 RNA 量进行了标准化,其等于该实验中产生的 aRNA 量。这样该固定剂导致的相对 RNA 数量和质量对照是 aRNA (图 12A) 和此处显示的其后定量 RT-PCR 的测量。这些对照都是在仅使用蛋白酶 K 方法回收 RNA 后各自的固定剂依赖 RT 模板质量。

图 13A 显示了包含 CK19 mRNA 转录本的 3'-最多 800 个碱基序列的 aCK19-cRNA 标准的 RT-PCR 扩增效率。包含 200、100、50、12、5 个拷贝的 CK19-cRNA 标准物的连续两倍稀释物掺入到来自白细胞的 2 ng CK19 总 RNA 中,重复三次,得到最大 27% 的变化系数。显示了标准偏差数值条。cRNA 稀释到少于一个拷贝以及没有模板的对照没有产生可检测到的信号。

图 13B 显示了琼脂糖凝胶电泳后的相对 RT-PCR 基因表达水平。CK19 cRNA 掺入到来自白细胞的总 RNA 中,在第 1 格、第 2 格、第 3 格和第 4 格中分别具有 25 拷贝、250 拷贝、2500 拷贝和 25000 拷贝的

水平。

图 13C 比较了同一 mRNA 库中未扩增的和基于 T7 启动子扩增的 mRNA 转录本的相对表现。通过使用 RT-PCR 动力学曲线方法检测 8 个不同 mRNA 转录本(PSA, PSM, MGB1, MGB2, CK8, CK19, PIP, EpCam)估计了相对丰度。

图 14A 显示了标志循环上皮细胞存在的基因测定的散点条形图。免疫磁学富集有在其细胞表面表达 EpCAM 抗原的细胞的人类血作为样品首先进行 aRNA 预扩增, 然后逆转录 25 ng。然后通过在选择基因组上进行 RT-PCR 后以琼脂糖凝胶电泳对各份进行分析。13 个健康供体 (7 个男性, 6 个女性) 每个检测的基因标记为 N 柱, 9 个连续取样的含有循环肿瘤细胞 (CTC) 的 HRPC 患者经流式细胞计数确定, 每个测定的基因标记为 P 柱。每个柱的水平线表示开始值, 在其上面的计为实际的正值。

图 14B 描述了表示原始状态的前列腺瘤器官的基因一览, 其通过如 14A 中所述的同样方法得到。

图 14C 描述了表示存在治疗目标状态的基因一览, 其通过如 14A 中所述的同样方法得到。

图 15A、15B、以及 15C 显示了在新的化疗之前、其间以及之后对单独的 HRPC 患者的 CTC 和 RT-PCR 多基因分析进行的纵向监视。X 轴显示以周为单位的取样时间, 左边的 y 轴以实心圆符号显示 CTC 水平。右边的 y 轴以相应的符号显示相对 mRNA 表达水平, 雄性激素受体 (AR) 为空心方块, Hepsin (HPN) 为空心圆, 多药抗药性 (MDR1) 为空心三角。在治疗期间仅用利普安的相对 mRNA 水平示于图 15A, 用利普安结合服用 Taxotere 和雌氨芥 (由 x 轴上的竖向箭头表示) 化疗的 2 个患者示于图 15B 和图 15C。顶部的条表示长期激素消除治疗正在进行中。

优选具体实施方式的详述

如前述探讨中指出的, 更全面和实用形式的癌症诊断还必须包括胞内和胞外膜抗原分析以及在相同细胞或细胞群体中细胞 RNA 含量和 DNA 含量的分析, 这些到现在为止还是互相排斥的方法 (US 6,365, 362)。这种排他性是由于分析结构性胞内抗原的分析前细胞制备方法, 其主要目标是保持细胞完整, 与分离胞质生物分子的方法之间的

基本不相容性。可选择地，分析前的细胞制备也可以限定为可溶性胞质 RNA、总细胞 RNA、总细胞 DNA 和/或蛋白质，其主要目标是均质化细胞以释放可溶性胞内成分(US 6,329,179)。特别是，传统的表型表征需要细胞结构的固定，其通过将细胞暴露于交联剂而实现，例如多聚甲醛、甲醛、戊二醛等。这些苛刻的细胞固定条件同时引起了不期望的共价交联和/或所有可分离 RNA 种类的破碎。类似的胞内 DNA-蛋白质交联最近已经报道(Quievryn 和 Zhitkovick, 通过自发水解和与蛋白体功能相关的活性修复过程使暴露于甲醛的细胞的 DNA-蛋白质交联产生丧失, Carcinogenesis, 21: 1573-1580 (2000))。所谓的非甲醛或非多聚甲醛固定剂(例如 Cyto-ChexTM, Streck Labs, Omaha, NE)是包含甲醛-脲衍生的供体化合物的细胞稳定化添加剂。它用作循环肿瘤细胞在运输或贮藏期间的防腐剂，如在一份共同未决的申请中所公开的(PCT/US02/26867, 在此引入作为参考)。不过，本发明人进行的研究已经表明，仅仅包含微量水平游离甲醛的 Cyto-ChexTM 也明显减慢了释放可交联胞内 RNA 的甲醛到胞内蛋白质。这种交联通过本发明的方法完全逆转以能够进行全面的 RNA 分析。因此细胞 RNA 和 DNA 分析可按常规方法在不固定的新鲜细胞上或者在由不交联的试剂保存的细胞上进行，或者在 mRNA 从细胞释放期间逆转交联。RNA laterTM (Ambion)是一种可商业获得的 RNA 稳定溶液，它稳定了 RNA 但是不能在同样的样品上进行免疫磁法、免疫化学或者图像分析，对血液来说是无效的。PreAnalytiX 提供了一种血液 RNA 稳定剂，但是它只不过是 VacutainerTM 管中的离液剂异硫氰酸胍溶液(GITC)，仅仅能够进行基于单独的总 RNA 分离的常规匀浆。

总的来说，由固定细胞回收的 mRNA 是不定量的、严重降解的或者破碎的、降低了完整 RNA 的大小，是大约 1750 个碱基的平均大小，这是高可变度的大约 200 碱基的平均大小的十倍，而且包含了许多无法很好理解的复杂化学修饰。然而，由固定剂得到的 RNA 的有效效果被 RNA 分析严重抵消了(Current Protocols in Molecular Biology, Wiley, (2002))。结合逆转录酶聚合酶链式反应(RT-PCR)分析的单调非定量 mRNA 获取技术显示出了有限的价值，尽管是以定性的而不是定量的方式，其计划用作长度小于 100 碱基对的扩增子(US 5,346,994)。进一步地，这种固定细胞上的限制性 RNA 分析必须接着进行表

型分析。这样，这两个过程不能在同一细胞样品上连续进行，因为常规 RNA 分离技术需要完全的细胞溶胞或者匀浆，破坏了细胞结构并进一步由于混合了细胞 DNA 和 RNA 群而使分析复杂化(Maniatis 等, Molecular Cloning-A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Press (1989))。以前的报道已经显示需要在组织中的 RNA 回收的改进方法(Godfrey 等, 使用 5'核酸酶的定量逆转录-聚合酶链式反应定量分析由甲醛固定获得的、石蜡包埋的组织的 mRNA 表达, J. of Molecular Diagnostics, 2: 84-91 (2000))。基于甲醛和脲的固定剂的应用是本发明一个方面的基础, 所述固定剂稳定了来自血液的可回收的定量的、高质量的 5 全长完整总 mRNA 和 mRNA 库, 并因此能够进行全面分析。

相当出乎意料的是, 发现用作渗透剂的皂角苷是一种胞质 RNA 和其它生物分子的高度选择性的以及有效的释放剂, 因而避免了细胞溶胞或匀浆的需求。皂角苷作为 RNA 释放剂的这种新用途是本发明的特别有益的部分。诸如皂角苷的表面活性剂传统上用于检查胞内抗原的表达, 其通过渗透细胞膜而允许在保持细胞完整性的同时掺入染色剂。例如, 通过荧光原位杂交 (FISH) 分析染色体或基因, 或者用细胞核染色剂 DAPI 染色胞内组分例如细胞核 DNA, 或者用特殊标记的抗体免疫染色细胞角蛋白, 在这些方面起着关键作用。胞内蛋白质、RNA 或 DNA 的释放一般通过增溶或者以更强的表面活性剂例如 TritonX-100 完全细胞溶胞。不过, 皂角苷迄今为止尚未用于研究可溶性胞内抗原包括 RNA 的表达, 也未用于研究同样样品的个体细胞或细胞群的表型分析。因此, 允许连续的表型分析以及同一细胞样品的胞质完整 RNA 和可溶性蛋白质分析的方法是非常值得期望的, 这是本发 15 明的主题。

因此, 本发明提供了用于所有细胞特别是生物样品中发现的靶细胞的快速并有效的 RNA 分析的优越方法、装置和试剂盒。本发明提供了用于允许分别进行表型和基因型分析的方法。表型通过抗体抗原蛋白质和质谱图方法以及全面分析来自同一细胞或细胞群的完整胞质 RNA 而提供并分析。样品基因组和线粒体 DNA 的基因型可通过本领域技术 25 人员可获得的任何手段进行单独分析。类似于 mRNA 库的扩增, 基因组和线粒体库可分别预扩增, 使能够进行许多分析而不丧失临床敏感性, 多重移位扩增 (MDA) 技术使第一个有效的全基因组扩增方法成 30

为可能。MDA 是一种快速、可靠的从几个细胞产生无限 DNA 的方法。

此处所述的发明可用于有效分离和表征细胞表型，例如表面抗原、胞质内抗原和任何类型的 RNA，以及基因型。表型和基因型分析都可在完全相同的样品上连续进行。例如在细胞表面分析和 RNA 提取后，
5 剩下的完整细胞核和线粒体可以用所有基于 RNA (mt RNA, hRNA)、DNA 和蛋白质的标准分析技术进行下游分析，例如 S1 核酸酶、核糖核酸酶保护、RT-PCR、SAGE、DD-RT-PCR、微阵列 cDNA 杂交、ISH、FISH、SNP、所有基于 RNA 和所有基于基因组的 PCR 技术以及任何蛋白质分析系统。

10 这种类型的细胞分析的许多应用之一是在癌症诊断中。许多临床医生相信癌症在限于其早期时是器官特异性的疾病。这种疾病在它首次可用现有的方法检测到的时候就变成全身性的了。因此，提示循环系统中肿瘤细胞存在的证据将提供第一线的检测机制，它可以或者替代其它检验，或者与其它检验共同起作用，例如乳房 X 射线照射术或者
15 前列腺特异性抗原的测定。经由这些细胞特异性标记而分析细胞表型（蛋白质和 RNA）和基因型，这种细胞的组织来源就可以容易确定，例如乳腺、前列腺、结肠、肺、卵巢或者其它非造血细胞癌症。这样在蛋白质、RNA 和基因组可被分析的位置，特别是未获得肿瘤临床信号的地方，确定特异性肿瘤的存在以及来源器官是可能的。因为这些
20 图谱说明了细胞功能，它们还预示了用于癌细胞检测的最合适的治疗类型和方法应该是什么。进一步地，在那些外科手术或者其它成功的治疗之后没有检测到循环肿瘤细胞的证据的监视病例中，从进一步的临床研究来确定是否需要进一步治疗也是可能的。

25 为了准备更全面和早期的诊断，本发明的一个具体实施方式包括以下方法：从细胞或细胞群分离胞质生物分子，用渗透剂化合物接触细胞，在保持细胞完整性用于随后的表型和形态分析的同时，从细胞分离相关的胞质生物分子。

30 本发明的目标性稀有事件涉及任何预示至少部分已知稀有事件的生物材料的表达。因此，激素、蛋白质、肽、凝集素、寡核苷酸、药物、化学物质、核酸分子（例如 RNA 和/或 DNA）以及生物微粒例如细胞、凋亡小体、细胞碎片、核、线粒体、病毒、细菌、以及它们的类似物都将包括在本发明的具体实施方式中。

流体样品包括而不限于含有细胞的体液、外周血、骨髓、尿、唾液、痰、精液、组织匀浆、乳头吸出物、以及从人患者获取的稀有细胞的任何其它来源。

“胞质生物分子”包括相关的细胞靶分子，例如但不限于蛋白质、多肽、糖蛋白、寡糖、脂质、基质、RNA、DNA 及其类似物，它们位于细胞的胞质区。一旦用渗透剂化合物接触细胞以及随后的细胞分离，胞质生物分子存在于上清中用于下游分析。所有的可溶性胞质生物分子都可以被分离和分析，例如完整的胞质 RNA 库或者能够穿越膜孔的目标组分。在一个优选的具体实施方式中，焦点集中在转录的 mRNA 和翻译的蛋白质的分析上，例如在 CTC 中作为癌症诊断和治疗管理中相关的癌基因转移的标志。

“膜生物分子”包括相关的任何胞外的、膜内的、或者胞内的结构域分子，它们与细胞膜结合或者包埋在细胞膜中，包括但不限于细胞外膜、核膜、线粒体和其它细胞器的膜。一旦用本发明的渗透剂化合物渗透，目标膜生物分子通常不被溶解或者从膜上离开，也就是说膜生物分子仍然与被渗透的细胞结合。膜生物分子包括但不限于蛋白质、糖蛋白、脂质、碳水化合物、核酸以及它们的复合物，它们与细胞膜结合，包括那些暴露在外膜外部的或胞外表面的和那些存在于外膜内表面的，以及那些与细胞核、线粒体和所有其它胞内细胞器膜结合的蛋白质。膜生物分子也包括细胞骨架蛋白。

“基因型”或者“基因型分析”是指鉴别胞内遗传物质如 DNA 的过程，DNA 存储内部编码的可遗传指令来构建和控制细胞生活和死亡的所有方面。“表型”或“表型分析”定义为在可观察到的外部结构要素及其产物（即包括中间 RNA）的基础上对细胞的分类。它们包括拓扑结构、形态结构和其它表面特征，所有这些都是由结合到本发明方法中的内部编码的基因型信息产生的。相反，在常规 RNA 分离技术中不能保持细胞结构和完整性，其涉及在 NP-40 的存在下至少是除了细胞核和线粒体之外的所有细胞结构的完全溶解，通常是通过离液盐处理和/或机械性细胞匀浆来分解所有细胞结构。

关于细胞结构的形态结构或形态学根据通常定义使用，与细胞和细胞核拓扑结构以及表面特征相关，包括胞内或表面标记或抗原决定簇，它们允许用组织化学试剂染色或者与可检测的标记性结合配基例

如抗体相互作用。此外形态结构包括“形态测量学”的全部领域，其定义为：在细胞核内的染色质分布的定量测定。

术语基因组和蛋白质组按照通常定义的使用。“功能性”在这里用作凭经验可检测的细胞生物特征或性质的一个形容词，例如“功能性细胞组”更广泛地包括基因组和蛋白质组两者以及其它目标类别，包括但不限于用于碳水化合物的“糖组”以及用于脂质的“脂组”。所得的细胞特征提供了可以区别正常细胞和转化细胞的图谱。

“接触”意指直接或间接地将化合物或试剂一起达到细胞的物理接近。细胞和/或化合物可存在于任何数量的缓冲液、盐、溶液等之中。接触包括例如将试剂溶液放进含有细胞的管、微量滴定板、微阵列、细胞培养瓶或者类似物中。微量滴定板和微阵列的形式可进一步允许同时分析细胞目标化合物或组分的多样性的多元分析，包括但不限于核酸和蛋白质。

“渗透剂化合物、试剂或组分”意指在细胞膜中形成小孔的任何试剂，包括脂-胆固醇双层，它同时要保持足够的膜、胞质和细胞核结构以便可以在渗透后的细胞上进行随后的表型分析。例如，皂角苷是一种已知的“孔形成”化合物，它与细胞膜组分结合从而在细胞壁或膜中形成许多跨膜的大约 8 nm 大小的孔，这样就允许小的可溶性胞质成分向外扩散，例如酶、蛋白质、糖蛋白、球蛋白、电解质和类似物，以及与胞外试剂成分例如电解质的内部平衡。

“免疫磁珠”是磁标记的纳米微粒或微米微粒，它也具有共价附着的结合试剂（如抗体），对细胞上的表面标记或抗原决定簇具有相当选择性的亲和力，由此，当暴露于诸如在高梯度磁分离系统（HGMS）中产生的磁场时，就可以实现磁标记细胞的选择性捕获。这里使用的其它方法学、试剂和仪器的术语都是常规定义的，并为本领域技术人员公知。

优选的用于鉴别来源组织、诊断、预后、治疗目标特征和监视的基因表达目标（mRNA 和蛋白质）包括但不限于源自这些癌症的细胞：乳腺癌、前列腺癌、肺癌、结肠癌、卵巢癌、肾癌、膀胱癌，以及用于检测和监视敏感性或者抗性基因表达标记的类似物，例如乳球蛋白 1（MGB1）、乳球蛋白 2（MGB2）、促乳素诱导蛋白（PIP）、癌胚抗原（CEA）、前列腺特异性抗原（PSA）、前列腺特异性膜抗原

(PSMA)、腺激素 2 (hK2)、雄性激素受体 (AR)、前列腺素、Hespin (HPN)、DD3、Her-2/Neu、BCL2、表皮生长因子受体 (EGFR)、酪氨酸激酶型受体 (HER2)、胸苷酸合成酶 (TS)、血管内皮生长因子 VEGF、胰粘液素 (Muc1)、鸟苷酸环化酶 (GC-C)、磷脂酰肌醇 3 激酶 (PIK3CG)、蛋白激酶 B γ (AKT)、切补修复蛋白 (ERCC1)、 α -1 球蛋白 (F6)、巨噬细胞抑制性细胞因子-1 (G6)、二氢嘧啶脱氢酶 (DPYD)、胰岛素生长因子受体 (IGF2)、雌激素受体 α 和 β (ER)、孕酮受体 (PR)、芳香酶 (cyp19)、末端酶 (TERT)、通用上皮组织特异性基因、细胞角蛋白 19 (CK19)、细胞角蛋白 5 (CK5)、细胞角蛋白 8 (CK8)、细胞角蛋白 10 (CK10)、细胞角蛋白 20 (CK20)、上皮细胞粘附分子 (EpCAM)、粘液素包括粘液素 1 (MUC1)、拓扑异构酶、尿激酶纤维蛋白溶酶原活化因子 (uPA)、尿激酶纤维蛋白溶酶原活化因子受体 (uPAR)、基质金属蛋白酶 (MMP)、通用白细胞特异性 mRNA、 α -1 球蛋白、CD16、CD45、和 CD31, 以及类似物。这些列举打算举例说明 mRNA 特异性基因阵列的一般差异性, 其能够组合来区分不同来源、类型和疾病的细胞, 但并不打算是全面性的。

稳定、释放和回收

使用此前公开的美国专利 No. 6,365,362 和美国申请 No.10/079,939 (均在此引入作为参考) 的方法, 循环上皮细胞可富集到相对于白细胞为至少 2,500 倍到大约 10,000 倍的程度。血液中的循环上皮细胞经免疫磁学选择后进行本发明包括的核苷酸分析。富集仅仅是本领域已知的选择用于本发明具体实施方式的特定细胞群的许多方法的例子之一。

在染色和免疫染色之前用皂角苷进行常规细胞渗透的过程中, 出乎意料地、令人惊讶地发现了从这些细胞释放完整的胞质总 RNA 和 mRNA 从而分离并纯化它们的方法, 这样就可能在完全同样的细胞、细胞群或样品上连续地或者平行地进行胞质 RNA 和胞内抗原表型分析以及 DNA 基因型分析。

渗透的进行可以在这个标准下使用 3 类普通表面活性剂或去污剂之一: 孔形成试剂, 如皂角苷, 或者皂角苷成分如 QS-21、七叶皂苷、毛地黄皂苷, 卡烯内酯等。所有这些试剂都增加膜的孔隙度并释放小

的可溶性胞内组分。另一组试剂是表面活性剂。这些试剂不必溶胞就具有相当高的亲水-亲脂性平衡以渗透膜。其它具有更低亲水-亲脂平衡的更溶胞的表面活性剂可能释放 RNA，但是其倾向于将膜溶解。这些试剂包括但不限于聚氧乙烯脱水山梨糖醇（商业上公知为吐温 20、40 或者 80）、壬基苯氧基-聚乙氧基乙醇（NP-40）、以及类似物、t-辛基-苯氧基乙氧基乙醇、或者 SDS。

随后可以通过所有的基于 RNA、DNA 和蛋白质的标准分析技术进行下游的胞质 RNA（以及其它 RNA 如 mtRNA 和 hnRNA）、细胞表面和可溶性胞内抗原、细胞器如线粒体以及残余细胞核的分析。这些技术包括所有类型的 cDNA、RNA 和蛋白质微阵列的图谱分析、质谱、荧光原位杂交（FISH）、单核苷酸多态性（SNP），所有基于基因组的扩增技术如 PCR 和类似技术、微卫星分析、限制性片段长度多态性（RFLP, ALFP）、SAGE、DD-RT-PCR、以及类似技术。

这样的分析可以在少至每次 1-10 个 RNA 分子以及任何 RNA 序列类型上进行，但是优选在几万直到上百万拷贝的靶上进行，以能够检测到作为临床上疾病状态标志的细胞翻译或转录图谱的微小改变。其它可释放的和不可释放的细胞组分如蛋白质、糖蛋白、脂蛋白、寡糖及类似物的功能性细胞图谱可以类似地通过分析这两种组分而产生，其通过常规的微阵列、HPLC、电泳方法包括高分辨率 2D 电泳方法、或者抗体阵列图谱进行。

本发明的渗透剂化合物包括但不限于皂角苷，它是一类由类胆固醇糖苷配基或配质（不含任何碳水化合物部分的三萜或甾体类）连接到脂肪酸和一个或多个糖基而构成的天然产物，其易分散到水中形成球状胶束，这是孔形成的活性物质。这些物质以及上述列举的其它合适的孔形成物，聚氧乙烯脱水山梨糖醇（商业上公知为吐温 20、40 或 80）、壬基苯氧基-聚乙氧基乙醇（NP-40）、以及 t-辛基-苯氧基乙氧基乙醇，具有高 HLB（亲水-亲脂平衡）值，必须使用足够低的浓度以最小化不期望的细胞组分溶解和膜溶解。当使用包含约 10% 皂角苷配基的皂角苷时，渗透剂化合物的浓度范围是大约 0.01-0.5%（w/v）。优选的渗透剂化合物是皂角苷（Sigma 目录号 S-7900）。其它来源和更高纯度的皂角苷也可以使用，例如大约 20-25% 皂角苷配基纯度的皂角苷（SigmaS-4521）以及高度纯化的大约 99% 纯度的皂角苷 QS-21，其购

自 Aquila Biopharmaceuticals, Framingham, MA。其它可使用的化合物是 α -七叶皂角苷和 β -七叶皂角苷 (Sigma E-1378)，二者均来自七叶树。渗透剂化合物可存在于组合物中，例如磷酸缓冲液，还包含抗菌剂如叠氮化钠、Proclin 300 (Rohm & Haas, Philadelphia, PA)、以及类似物。另一种优选的渗透剂是 ImmunipermTM，它单独释放大约 50 % 的胞质 RNA (细胞中所有 RNA 的 85 %) 而对细胞核或线粒体核苷酸池没有影响。剩余 50 % 的细胞总 RNA 和固定细胞中的所有 DNA 可用包含 SDS、蛋白酶以及甲醛清除剂的释放性混合物进行释放，该混合物构成本发明的具体实施方式之一。尽管单独的混合物组分的确切作用模式是未知的，不过可以推测 SDS 用来溶解交联于结构性胞内蛋白的胞内 RNA 和 DNA，这样就使得甲醛交联的核酸更有效的进行蛋白质水解并释放。新的甲醛清除剂例示但不限于羟胺、羧甲氧基胺、胼、乙酰胼和其它酰胼、或者胼衍生物、以及胺如 tris，发现它们增加了释放的核酸的数量和“质量”，这里的质量是通过增加的扩增率和产量而测定的。由 Immuniperm 和释放性混合物释放的两个部分可以各自分析或者在分析前合并。

因此，加入或不加入甲醛清除剂的任何表面活性剂或蛋白酶 (或者它们的结合) 都将包括在本发明的范围之内，所述的甲醛清除剂能够释放胞内核苷酸并维持合适的形态用于共同的分析。

不象可能严重破碎细胞 RNA 的现有细胞固定和 RNA 回收方法，本发明能够用渗透细胞膜同时保持细胞完整性的渗透剂如皂角苷处理细胞，并从中提取和分离超过 90 % 的完整胞质总 RNA 和 mRNA。mRNA 分离物还兼容于免疫磁学细胞富集和免疫荧光细胞标记方法。细胞的全面 RNA 表达谱分析能够用于直接证实、补充和扩展表达谱并增加由此获得的信息，所述的分析是通过细胞分析平台进行鉴别和表征的，例如采用 T7、SP6、或 T3 启动子的基于 RNA 聚合酶启动子的线性扩增方法、流式细胞计数、微阵列以及在 Cell Spotter[®] 或 CellTracks 系统中 (二者均由 Immunicon Corp, PA 制造) 进行。

尽管不限于特定的固定剂，被渗透的细胞用交联剂处理以维持如上所述的形态、抗原和核苷酸完整性。Cyto-ChexTM、StabilCyteTM 和 TRANSfixTM 是商业上提供的三种稳定剂的例子，它们用于在延长时期限的血样中稳定血细胞。这些稳定剂被优化以维持细胞大小 (主要

是通过最低化皱缩)并保护细胞表面抗原, 主要根据流式细胞计数进行确定。打算的应用一般涉及直接分析, 不需要延长样品操作或者对特定细胞群的富集。相反, 本发明中分离和检测的循环肿瘤细胞或其它稀有靶细胞, 包括并且定义为极低频率存在的病理异常或者稀有细胞, 则需要在检测前大量富集。

Cyto-ChexTTM 稳定剂可用作细胞稳定剂以及, 如本发明的应用中所证明的, 胞内 RNA 的醛释放固定剂, 其导致与胞内蛋白质的大分子复合物的形成。我们意外地发现, 优选用甲醛供体如 CytochexTM 进行的固定对于在随后的样品加工中保持和保护 RNA 是必要的, 完整的功能性 RNA 的全部或最佳释放需要皂角苷与上述的释放性混合物联合使用。

理想的“稳定剂”或“保护剂”(这里可交换使用)定义为这样的成分, 它能够快速保护生物样品中存在的相关靶细胞, 同时在生物样品中使形成干扰性聚集体和/或细胞碎片最小化, 这些聚集体或碎片在任何情况下都可能阻碍靶细胞的分离、检测和计数以及它们与非靶细胞的区别。换句话说, 当与抗凝剂组合时, 稳定剂不应该阻碍抗凝剂的性能。反过来, 抗凝剂也不应该干扰稳定剂的性能。此外, 公开的稳定剂还起固定从而稳定渗透细胞的第三功能, 其中表达方式“被渗透的”或“渗透”以及“固定”、“被固定的”或“固定化”按照细胞生物学中通常定义的使用。这里稳定剂的描述意味着以适当的浓度或数量使用这些试剂, 这对于细胞生物学技术人员来说将是非常显而易见的, 这里的浓度或数量对稳定靶细胞是有效的而不引起损伤。为保护稀有细胞的目的而使用本发明的组合物、方法以及装置的人显然不会以损伤或破坏这些稀有细胞的方式使用它们, 并因此将自然选择适当的浓度或数量。例如, 甲醛供体咪唑烷基脲被发现有效的优选浓度是 0.1-10%, 更优选 0.5-5% 以及最优选大约 1-3% 的所述样品体积。另外的试剂例如聚乙二醇也发现能有效稳定细胞, 加入的优选浓度是大约 0.1%-5%。使用这样的试剂公开于 PCT/US02/26867, 在此引入作为参考。

本发明令人惊奇的方面是, 作为大分子复合物一部分的胞内 RNA 能够回收扩增, 并与以前用细胞稳定剂和固定剂处理的细胞有几乎等量的产量。交联 RNA 的完全释放需要在溶胞去污剂和甲醛清除剂存在

时皂角苷与酶消化的结合。例如，经 Cyto-ChexTM 处理的细胞通过蛋白酶 K、V8 蛋白酶、链霉蛋白酶消化可得到完全回收或者包括全长可分析的 RNA。本发明公开的甲醛清除剂的存在被发现进一步改善了 RNA 回收。

- 5 在本发明的具体实施方式中，靶细胞如循环癌细胞或胎儿细胞可如此分析，通过将它们与非靶细胞有效分离、纯化它们的核酸、然后扩增相关的靶用于微阵列分析。

因此，胞质生物分子的分离可以首先通过离心或免疫磁珠富集将被渗透的细胞与渗透剂化合物分开而进行。然后胞质生物分子混合物就存在于上清中了。胞质生物分子的分离可以通过用磁珠捕获而实现。例如，如果胞质生物分子是 mRNA，寡聚 (dT) 附着的磁珠或非磁性载体可用来捕获从而从细胞分离 mRNA，进行离心或者不进行离心。如果胞质生物分子是蛋白质，就可以使用能够结合特定蛋白质的抗体，其中抗体可被附着到磁珠或非磁性载体上。其它分离技术是本领域技术人员公知的，诸如标准的蛋白质和 RNA 化学提取、电泳、层析、免疫分离以及亲和技术。用于分离细胞和生物分子的免疫磁学富集试剂和装置由几家制造商提供，包括但不限于 Immunicon Corp. (Huntingdon Valley, PA)、DynaI (New Hyde Park, NY) 以及 Miltenyi Biotec Inc. (Auburn, CA)。细胞可以是原核细胞例如细菌细胞，或者是真核细胞例如哺乳动物细胞，最优选的是人源细胞。在优选的具体实施方式中，细胞是癌或肿瘤细胞。优选相关的癌包括但不限于那些源自乳腺、前列腺、肺、结肠、以及卵巢组织的癌，以及类似物，如在组织切片或体液中发现的，例如在血液和骨髓中的循环肿瘤细胞。

公开了用于制备在完全同样的样品上连续进行胞质和/或完整细胞生物分子分析以及膜生物分子分析的细胞的方法，共同定义为分别分析核酸或蛋白质的功能性基因组或者功能性蛋白质组。如上所述，这样的分析在本发明的方法之前还不可能在同一细胞上进行。如上所述，将细胞与渗透剂化合物接触以释放胞质生物分子而不改变结构生物分子和膜生物分子。

- 30 正如本发明中所公开的，分析细胞样品的胞质生物分子和分析同一细胞样品的膜生物分子的方法是如上所述提供的，在细胞与渗透剂化合物接触、稳定并回收胞质生物分子之后进行。胞质生物分子可以与

相关生物分子同时或依次进行分离和分析。

本发明还提供了用于分离胞液或全部细胞 RNA 特别是 mRNA 的试剂和试剂盒。该试剂盒包含渗透剂化合物和 RNA 提取试剂或者用于 RNA 分离和检测的杂交探针，例如寡聚 (dT) 或者基因特异性序列或者不同长度的随机 (变性) 寡核苷酸。该试剂盒还可包含与细胞结合的蛋白质进行结合的抗体，例如结合膜生物分子的抗体。抗体和探针可被酶标记、荧光标记、或者放射性标记以能够检测。抗体和探针还可附着到例如磁珠或类似物上以方便分离。

分析

胞质生物分子分析包括涉及细胞胞质分离的生物分子的任何类型的分析。胞质生物分子分析进一步包括但不限于功能性基因组表达谱、其包括但不限于 mRNA 谱、蛋白质表达谱、逆转录酶聚合酶链式反应、Northern 印迹、Western 印迹、核苷酸或氨基酸序列分析、基因表达连续分析 SAGE、竞争性基因组杂交 (CGH)、电泳、2-D 电泳、MALDI 或 SELDI 质谱、气相色谱、液相色谱、核磁共振、红外光谱、原子吸收、以及类似方法。在核苷酸或氨基酸水平的序列分析能够显示和鉴别蛋白质、DNA/cDNA 或者 mRNA 序列的突变。例如，初始基因或蛋白质谱分析可以显示转化细胞或肿瘤细胞中癌基因的存在。适当癌症治疗后的再次分析可以显示出缓解期间更低的肿瘤症状，或者显示为恶化，后者是癌基因进一步突变以及药物抗性或者更厉害的肿瘤细胞的产生导致的结果。

膜生物分子分析包括涉及结合到细胞中细胞膜上的生物分子的任何类型的分析，所述生物分子就是胞外和胞内生物分子或标记物。合适的分析方法包括但不限于流式细胞计数、酶联免疫吸附测定、形态染色、细胞分类、以及类似方法。被渗透的细胞可以通过例如基于特定可检测蛋白质表达的荧光活化细胞分类 (FACS) 技术进行分类。细胞分类技术是本领域技术人员已知的并已经用于简单计数可检测的标记细胞，例如在癌症诊断中。被渗透的细胞也可以在特殊蛋白质表达的基础上进行分类，例如 CD4 或 CD8 细胞。膜生物分子分析也可在下游膜组分上进行，然后进行下述的分析，包括但不限于蛋白质表达谱、Western 印迹、氨基酸序列分析、质谱、气相色谱、液相色谱、核磁共振、红外光谱、原子吸收、表面血浆共振 (SPR) 以及适于分析膜组分

的任何其它技术。

功能性基因组分析或测定可以在保留于渗透细胞中的遗传物质上进行。例如基因组 DNA、细胞核 RNA(hnRNA)、线粒体 RNA(mtRNA) 和任何其它 RNA、或者细胞器含有的 DNA 可以进行分析, 它们在细胞渗透时仍然结合或固定在细胞中。这样, 上述用于胞质生物分子的分析类型可以用于进行基因组 DNA、hnRNA 和 mtRNA 的分析, 使用的方法或分析法包括但不限于原位杂交、聚合酶链式反应、差别显示 PCR、任意引物 PCR、微卫星分析、单核苷酸多态性(SNP)、竞争性基因组杂交(CGH)、限制性片段长度多态性分析、细胞核和线粒体连缀转录分析、以及体外蛋白质翻译分析。然而, 为获得基因组 DNA、细胞核 hnRNA 和线粒体 mtRNA, 渗透细胞必须或者暴露于本发明的释放性混合物进行完全溶胞、或者进一步通过本领域技术人员已知的常规手段进行分级分离。对于稳定性细胞, 蛋白酶和亲核试剂的组合可用于逆转并去除包含了感兴趣核酸的大分子复合物, 从而释放 RNA 和 DNA 核酸组分。此外, 渗透时保留的细胞器可随后进一步分级分离, 用于例如线粒体和类似物的代谢功能性分析。

因此, 本发明的另一个具体实施方式提供了从胞液 RNA 分离细胞核或线粒体遗传物质的方法。包含细胞核或线粒体遗传物质以及胞液 RNA 的细胞与渗透剂化合物如上所述进行接触。细胞核或线粒体遗传物质可通过例如随后的合适亚细胞分级分离以及分级分离的细胞物质的完全细胞/细胞器溶解而进行分离。所得的细胞器特异性组分(DNA、RNA、蛋白质、脂质、碳水化合物等)可以从匀浆中提取或分离, 并进行分析。也可以使用细胞器特异的免疫磁珠, 如上所述进行分离。

本发明还产生了几重要的实用的自动化优点。例如, 在渗透溶液从细胞中去除后, mRNA 可用寡聚(dT)-磁珠进行捕获, 这理想地适于类似于微阵列的下游自动化操作和全面分析。此外, 仅仅需要稍微改变通用的 mRNA 分析程序就可以产生蛋白质和 mRNA 图谱, 因而减少了时间和试剂需求。而且, 细胞核和线粒体中的相应完整的细胞基因组 DNA 仍然包含在渗透细胞中并且容易取得, 能够通过常规的 DNA、RNA 和蛋白质方法进行下游分析, 例如 FISH、NP、SAGE、DD-PCR、PCR、RFLP、RT-PCR、CGH、cDNA 微阵列、质谱以及蛋白质阵列等。对 DNA、RNA、蛋白质、脂质、碳水化合物以及(它

们的前体、代谢物和辅助因子)的多组分同时分析策略,例如在大型微阵列上,可以广泛应用于任何真核细胞、组织样品或体液。通过多细胞组分或者与多元(例如微阵列)分析结合而得的这种类型的细胞表达谱在从药物候选物的高通量筛选到疾病诊断和管理的技术中是极其重要的目标。

本发明还提供了用于分离胞液或全部细胞 RNA 特别是 mRNA 的试剂和试剂盒。该试剂盒可以包含渗透剂化合物和 RNA 提取试剂或者用于 RNA 分离和检测的杂交探针,例如寡聚(dT)或者基因特异性序列或者不同长度的随机(变性)寡核苷酸。该试剂盒还可包含与细胞结合的蛋白质进行结合的抗体,例如结合膜生物分子的抗体。抗体和探针可被酶标记、荧光标记、或者放射性标记以能够检测。抗体和探针还可附着到例如磁珠或类似物上以方便分离。

然后对完整文库探查任何涉及识别上皮细胞存在和/或确定这些上皮细胞来源组织存在的信息。为此,样品中存在的所有 mRNA 都必须对相关的每个特殊基因进行分析,每个都具有彼此相同的敏感性/选择性并具有能够在同一时间观察所有 mRNA 的能力。

在上述标准下,采用微阵列的所有基因表达分析将对稀有事件不敏感。特别是,样品的信噪比将很低,因为在任何特定的富集样品中存在与白细胞免疫磁学携带的污染同样的问题。例如在通过免疫磁学选择富集了一种特定靶细胞群的流体样品中,潜在地可能大约 10,000 个白细胞带有 1 到 10 个靶细胞群。靶细胞表达的相关稀有事件将被白细胞中发现的核苷酸所掩盖。过量白细胞来源的背景 RNA 干扰与靶 mRNA 的相当稀有的拷贝水平相结合,导致了可能检测不到的潜在信号。

为避免这个问题,总 RNA(或者纯化的 mRNA)采用基于 SP6、T3、或 T7 RNA 聚合酶启动子的体外线性预扩增方法进行预扩增。一个典型的例子是 T7 RNA 聚合酶(T7RNAP)、启动子(T7RNAPP)以及酶扩增体系,但是任何等价体系都可被本领域技术人员所显而易见的体系代替。对所有信息的线性预扩增将初始 mRNA 库展示增加至少 1000 倍,而 RNA 群体中各个 mRNA 序列的相对丰度是最小限度失真的。同样的预扩增方法也已知为转录扩增、线性扩增或者体外扩增。因此,完整 mRNA 库的 1000 倍线性预扩增正是本发明具体实施方式的

特别特征之一。单链 mRNA 在包含寡核苷酸的 T7 启动子的寡聚 (dT) 部分进行多聚 A 尾巴的退火。RNA 聚合酶产生了完整 mRNA 库 (aRNA) 的反义拷贝。这样总体来说, 在完整库中具有多聚 A 尾巴的 mRNA 拷贝的数量至少有 1000 倍的增加, 以及与之相关联的任何特定 mRNA 序列类型的敏感性增加 1000 倍。

例如, T7 启动子寡核苷酸引物, 其用作第一链 RT 引物和随后的 T7RNAP 扩增引物, 由具有 3'-寡聚 (dT) 部分的 67 个碱基组成, 包含 5'-T7 RNA 聚合酶启动子序列, 具有如下的碱基对顺序: (5'-TCTAGTCGACGGCCAGTGAATTGTAATACGACTCACTATAGGG CG (T)₂₁-3')。预扩增反应是这样完成的, 首先通过逆转录反应, 然后通过随机引物 DNA 聚合酶依赖的第二链合成, 最后用 T7RNAP 进行过夜保温。随后, 该全部反应混合物的一部分用在 PCR 反应分析中, 其产生特定的单一条带扩增子, 具有合适设计的相关基因特异性引物 (GSP's), 或者可以选择任何其它合适的 RNA 分析方法。

本领域技术人员所公认的是, 基因特异性引物的设计和合成将依赖于特定的待扩增靶序列, 并能够通过本领域已知和接受的任何方法进行设计。例如, 基因特异性引物使用 NCBI (国家生物技术信息中心) BLASTS (基本局部排序检索工具) 软件和 GenBank 人类 cDNA 序列数据库进行设计。引物优化退火温度为大约 55°C 到 65°C, 显示出仅从复合 mRNA 库产生无 DNA 的 RT-PCR 依赖性单一条带, 这公知为对特定 mRNA 是阳性的。复合 mRNA 库经常提取自正常的和患癌症的人类组织以及体外细胞系。设计的引物产生期望的靶序列特异性 PCR 条带, 它们都经琼脂糖凝胶电泳以同已知分子量的标准比较。使用凝胶分析软件上确定的 Rf 值完成计算。扩增子序列可进一步通过直接测序、印迹探测、限制性酶切图谱等进行序列验证。

为避免如上所述的 cDNA 阵列分析所固有的信噪比 (S/N) 局限, 发展了一种新修正的 RNA 聚合酶启动子驱动的线性扩增策略。可选择地, 单管即在单个反应管中进行的基于 cDNA 多基因特异性逆转录的通用 PCR 扩增的多基因 RT-PCR 分析体系可充分减少背景干扰。这两种信噪比改进是本发明包括的特定组成。

预扩增库的第二链合成仅仅在被选择的区域进行, 可以在单个样品中包括 1 到 1000 个相关独立区域, 而仍然保持初始库的 100% 敏感性。

第二链合成通过仅仅选择性扩增那些相关基因而完成。因此，用于第二链合成的基因特异性引物（GSP）设计为仅仅包括相关区域。所述区域包括但不限于例如前列腺特异性抗原（PSA）、PSM、CK19、EpCam、AR、HPN、F6、乳球蛋白、和/或所有的细胞角蛋白。GSP设计为在它们的末端添加通用引物。

与现有技术中第一链合成使用基因特异性引物组进行相比，本发明的新方面的一部分是将基因特异性引物仅仅用于第二链合成，而不使用 CAPswitchTM 寡核苷酸（美国专利 No. 6,352,829）。现有技术教导，基因特异性引物设计为在它们的 5'端添加任意的锚定序列，包括 CAPswitch 寡核苷酸。所以会惊讶于本发明披露于此的是，引物通用部分并不包括 CAPswitch 部分。

基因特异性引物的长度典型地在大约 15 到 30 个核苷酸的范围，而通用引物部分典型地长为大约 15 个。

小部分 T7 扩增的反义 RNA（aRNA）库的逆转录通过使用本领域已知的循环条件进行。所有的 RTPCR 结果首先在包含溴乙啶的 2% 琼脂糖凝胶上根据本领域已知的程序进行初步分析。

在扩增的 aRNA 库所选择部分进行扩增后，以阵列方式或者通过本领域已知的任何电泳方式对产物进行分析。

除了如上所述的预扩增后的第二链扩增，通用 PCR 多基因扩增可以在单一管中完成，加入基因特异性引物组（P1）用于同时的逆转录酶反应，同时结合适当的反向引物组（P2）进行同时的第二链合成。它们共同定义了两个（ α 和 β ）末端并形成了完整的等同于相关 GSP 多基因的基因特异性扩增子组。用于两种基因特异性第一链和第二链合成的 GSP1 和 GSP2 引发是使用适当的酶在高度引物-靶退火特性条件下进行的，这是本领域技术人员所已知的。获得合适引物特异性的其它标准和方法可以通过使用来自天然重组细胞修复机制例如 recA 的蛋白质而实现。这些修复体系的合适体外应用能够形成更好的、甚至绝对的引物模板特异性。模板标准是 mRNA、或 mRNA:cDNA 异源双链核酸、或者双链的双股 cDNA。此外，利用细胞的天然修复机制这一创新性思想，正如本申请中所述的，可以应用到其它基因特异性引物方法，例如下面所述的一种，用于改变信噪比的 GSP-RT 亚组使得能够在稀有细胞事件上进行 cDNA 阵列分析。任何一种 GSP 多基因 PCR

引物组的每种 P1 和 P2 引物都包含 5' 末端的通用引物序列, 它们是所有基因特异性 P1 和 P2 共有的 (或者仅是 P1 的, 而所有 P2 共有不同的通用序列)。为了在第二链合成后控制不期望的副反应和竞争性反应, 所有的 GSP1 和 2 都要从欲得到的双链 cDNA 扩增子组中去除, 以消除它们对下游程序的非特异性影响。许多策略对本领域技术人员来说都是可能的, 例如由 Sephadex 和 Centricon 等提供的基于分子大小的排阻, 层析, 固相载体选择性附着, 单链特异性 DNase (Mung Bean, S1 等) 引物序列特异性策略, 例如尿嘧啶-N-糖基化酶 (UNG) 与由脱氧尿苷 (U) 代替胸苷 (T) 而合成的 DNA 寡核苷酸引物的结合。可选择地, RNA-DNA 寡聚引物杂合体可用于代替 DNA-尿嘧啶, 类似地可在第一和/或第二链合成后通过不含 DNase 的 RNase 处理而去除。包含尿嘧啶的 DNA-引物与 UNG 降解的 PCR 整合的结合提供了一种去除不期望的复杂引物交互作用的有效方法。该 UNG 降解策略将产生短得多的寡聚物, 它们不能够在所选择的 PCR 退火温度下进行退火。经 UNG 处理后, cDNA 模板混合物也可能受益于不含 DNase 的 RNase 处理以去除所有不期望的可能由高复杂性 RNA 引起的副反应。在 UNG 处理后 (可选择使用 RNase 处理以去除所有 RNA), 唯一剩下的核酸是杂交的第 1 链与互补的第 2 链形成的 dsDNA 双链, 其构成了现在的样品可取得的 PCR 模板。下一步, 加入不含 UMP 的通用引物 (至多 1 或 2) 重复 PCR。净效果就是用一种或 2 种 PCR 兼容的高效率引物捕获任何期望的 mRNA (或不含 RT 的 DNA) 序列组, 使得能够在单一管中进行定量 RT-PCR 多基因同时扩增和随后的分析。由于引物是通用的, 它们以完全同样的效率引发每种 GSP 扩增子, 排除了混杂多元 GSP 引物的性能问题。具有一板或一组扩增子的每种 GSP 定义的扩增子可具有不同的预定片段大小, 使得每种 GSP 序列都能够在基于大小的分析体系中通过其独特 Rf 值进行分离和鉴别, 所述体系是例如垂直和水平 PAGE 以及琼脂糖凝胶电泳、毛细管凝胶电泳、SELDI、MALDI、cDNA 阵列等。这样, 快速的多基因 RNA/DNA 板可应用于快速探查用于不同系列的诊断治疗和监视的大量样品。该方法可以在进行或不进行 mRNA 库预扩增的情况下, 在单一反应管中获得单独的 mRNA 样品的多基因分析。不进行预扩增就只能允许对一个样品的一板基因进行一次测定分析。预扩增增加了可以对单个样品进行多达

1000 次不同测定的分析的优点, 这样许多不同的基因板就能够在不同的时间在一个样品上进行探查。尽管不限于任何特定方法, 通过 cDNA 阵列或毛细管凝胶电泳 (CGE) 进行的通用 PCR 板分析是优选的方法。

因此, 区分本发明与现有技术中的常规技术的一个关键特征就是通过选择性预扩增稀有靶 mRNA 样本而改善了信噪比, 使得该方法在现有的多元 mRNA 分析上有了新的进展。已知的多元分析体系例如多元 RT-PCR 可充分改变信噪比, 然而设计和优化有意义的多元体系的困难使得它们一般是不实用的, 特别是用在一个反应器中有两个以上的目标亚组时。

10 本发明还利用高信噪比改善来选择代表性的转录本, 在一个反应管中扩增待检测的完整靶序列组。

因此, 尽管本发明不限于下面的特定用途, 代表性的基因特异性引物组可用来产生已知疾病状态中发现的靶基因亚组。代表性的组将包括至少两种不同的标志感兴趣疾病状态的靶基因。对每个反应瓶来说, 基因特异性引物组的数目将由疾病状态和已知的可定义疾病状态的特征来确定。

下面的实施例用来例证性说明所公开的发明的实用性并证明本发明对诊断技术的影响。这些实施例不打算限定发明的范围。此外, 本文引用或描述的每份专利、专利申请和出版物的公开都是全文引入作为参考。在全部的这些实施例中, 分子克隆反应、以及其它标准重组分子生物学技术都是根据下面出版物描述的方法进行的: Maniatis 等, 《分子克隆-实验室手册》, 第 2 版, 冷泉港出版社 (1989) (下文中称为“Maniatis 等”), 以及《现代分子生物学手册》, Wiley, 2002, 使用商品化可购买的试剂, 除非另外指出。

25 实施例 1

胞质 RNA 的分离

发现获自铁磁流体选择的未固定细胞的上清中包含超过 80% 的细胞总 RNA 留在细胞胞质中, 所述的未固定细胞用 Immuniperm、包含 0.05% 皂角苷和 0.1% 叠氮化钠的磷酸缓冲液渗透。从该上清分离的 RNA 没有显示出如天然和变性琼脂糖凝胶电泳以及溴乙锭染色判定的降解证据。意外地发现该上清包含完整的或未降解的全长形式 RNA, 从而提供了还可用于形态分析的同样细胞的 mRNA 图谱, 而这些上清

液通常在铁磁流体选择细胞的胞内染色后是被丢弃的。图 2 图解说明了这些发现,表明总 RNA 释放的发生少于一分钟,而大约 95%的胞质总 RNA 可以容易地可重复地分离。

对比之下,使用常规方法即使用商业可获得的基于苯酚的 RNA 溶
5 胞缓冲液 Trizol[®] Reagent (Gibco BRL, Gaithersburg, MD, 目录号 10296)从乳腺癌细胞系 SKBR3 分离的 RNA 将完全溶解和匀浆全部细胞结构,从而也导致了基因组和线粒体 DNA、以及胞质、线粒体和细胞核 RNA 的释放。来自用 EpCAM 铁磁流体选择的 SKBR3 细胞进行
10 Immuniperm (皂角苷)处理(详细步骤见实施例 2)的细胞沉淀进行的检测表明存在几乎 100%的基因组和线粒体 DNA,以及细胞核和线粒体 RNA,后者总计占可望来自同样数量非渗透完整细胞的总细胞 RNA 的大约 15-20%。大约 95%的期望胞质 RNA 从 Immuniperm 上清层中被回收。

如图 3 所示,包含大约 250,000 个乳腺癌细胞系 SKBR3 细胞的两
15 支相同的管首先经免疫磁学富集,然后在不存在(仅有 PBS)和存在 Immuniperm (+IP)的情况下室温孵育 15 分钟。经 Immuniperm 处理的渗透细胞随后通过在 $800 \times g$ RCF 的速度离心 5 分钟而作为可见的渗透细胞沉淀被分离。包含所有胞质可溶性组分的 Immuniperm 上清部分被转移到第二管中。分离自全部未处理细胞的 RNA、Immuniperm
20 处理的渗透细胞沉淀以及 Immuniperm 处理的细胞上清部分使用 RNeasy[®] (Qiagen Inc., Valencia, CA) 二氧化硅结合方法进行分离。这些总 RNA 部分随后用 DNase 处理以去除微量 DNA。DNase 处理的 RNA 部分的分光光度定量产生平均 20 皮克的总 RNA/细胞(全部细胞)(= 100%), 4 皮克总 RNA/来自沉淀部分的渗透细胞(20%), 以及 16
25 皮克总 RNA/来自上清部分的细胞(80%)。来自这三种 DNase 处理的总 RNA 部分的相当 2.5×10^4 个细胞的群体被随后进行甲酰胺变性和通过 1% 琼脂糖凝胶然后以溴乙锭染色的电泳,如图 3 所示。通过琼脂糖凝胶光密度分析的定量与分光光度法分析的回收值一致。图 3 的凝胶图还显示 rRNA 是全长的并具有高度完整性,这是由 4.4 kb ssRNA 同
30 28S rRNA 条带共迁移与 2 kb ssRNA 标准同 18S rRNA 条带共迁移的相对比率证明。总体来说,所观察到的 28S rRNA 与 18S rRNA 为 2 的相对比率是 mRNA 完整性的一个极好的标志,这一点也通过如图 4 所示

的 Northern 印迹该凝胶并用寡聚 (dT) 探查而证明。总 RNA 来自细胞核的百分比的文献值范围在 15 到 25%。Immuniperm[®]处理的细胞部分包含 20% 的 RNA, 因而是与公开的细胞核分布一致的。

5 总之, 基于 Immuniperm 的渗透意外地显示出细胞核和胞质总 RNA 的完全分离, 将近 100% 的胞液总 RNA 可容易地从 Immuniperm 处理的未固定细胞的上清中回收。而且, 惊奇地发现总 RNA 的细胞核部分在经 Immuniperm 处理后所得的渗透细胞结构中保持完整。

使用多聚 A 尾巴杂交, 将来自两种 Immuniperm[®]细胞组分的 RNA 的 mRNA 部分对全细胞进行分析, 通过将示于图 3 的变性 RNA 的 Northern 印迹转移到带正电的尼龙滤纸上。寡聚 (dT) 25-mer 探针用 10 ³⁵P 进行标记, 然后将多聚核苷酸激酶杂交到 Northern 印迹上。包含多聚 A 尾巴的单链 RNA 分子量梯度用作标准, 使得能够形成 mRNA 相对定性大小的分子量条带梯度。图 4 的寡聚 (dT) 杂交结果显示, 没有观察到三种样品的 mRNA 库之间大小范围的明显差别。

15 来自全细胞 mRNA 库的完整 mRNA 印迹区 (即完整的 dT 杂交信号区) 的比较定量磷光图谱分析几乎等于 Immuniperm 处理的渗透细胞沉淀 (细胞核部分) 加上源自 Immuniperm 的胞液部分的总和。进一步地, 由磷光图谱确定的来自 dT-探针信号的 mRNA 的细胞部分百分比等于由琼脂糖凝胶图谱光密度分析确定的 28S/18S rRNA 的百分比。20 这些数据证明源自 Immuniperm 的胞液总 RNA 及其 mRNA 组分二者都是定量分离的, 呈现出高度完整性, 并且是全长的。源自 Immuniperm 的 mRNA 的释放不受转录本大小的限制, 因为几乎 100% 的胞液 mRNA 都能够从 Immuniperm 上清中获取, rRNA 28S/18S 的完整性是 mRNA 完整性完全保持的标志。

25 将示于图 4 的 Northern 印迹切下, 用细胞核特异性前体 rRNA 探针再次探测。图 5 显示 Immuniperm 处理的细胞获得了细胞核和胞液总 RNA 群的完全分离。这样, 核膜结构在 Immuniperm 处理期间保持完整, 细胞核保留了它所有的可溶性组分。

将示于图 5 的 Northern 印迹切下, 用线粒体特异性 12S rRNA 探针再次探测。示于图 6 的结果证明 Immuniperm 处理的细胞获得了线粒体和胞液总 RNA 群的完全分离。这样, 线粒体膜结构在 Immuniperm 处理期间保持完整。

用于产生图 3-6 图谱的相同总 RNA 储备液进一步用来产生相等的量和特异性活性的 ^{32}P -标记的第一链 cDNA 库。这三种标记的第一链库探针用于杂交以获得分离的但同样也是制备好的 cDNA 阵列点印迹图, 如图 7 所示。此处的目的在于通过比较每张成像滤纸的每种 cDNA 杂交信号图案的相对比例来估计每种 Immuniperm 来源的细胞组分的 mRNA 相对丰度。随机选择的模板上的 cDNA 基因阵列成分示于图 7。最上面一排的点是一系列持家基因, 用缩写命名为 23 kd=23 千道尔顿蛋白, a-tub= α 微管蛋白, b-act= β 肌动蛋白, b2mic= β -2-微球蛋白, phos=磷脂酶 A2。第二排命名为 f6= α -1-球蛋白, CD16 = 簇决定子 16, CD12, CD38, CD45, 和 CD31。底排包括普通上皮特异性基因, 命名为 g6-巨噬细胞抑制性细胞因子, CK8 = 细胞角蛋白 8, CK18 = 细胞角蛋白 18, CK19 = 细胞角蛋白 19, EpCam = 上皮细胞粘附分子, uPA = 尿激酶纤维蛋白溶酶原活化因子。每个部分的定性和定量荧光图谱比较没有显示出阵列上基因的相对丰度有明显差别。有趣的是, 这些数据显示完整细胞的相对 mRNA 丰度大概相当于其胞液所占分数, 反过来胞液所占分数相当于其细胞核所占分数, 总 RNA 量可在大约细胞核的 20% 到胞液的 80% 之间变化。该 cDNA 阵列中的转录本的各自长度在 1 到 5 kb 之间变化, 再次加强了 Northern 印迹的发现, 即 Immuniperm 处理细胞的释放中看不到大小偏差。图 7 中同样的相对表现模式也意外地证明了 Immuniperm[®] 来源的 mRNA 是与传统方法来源的完整细胞 mRNA 同样有效的第一链合成的逆转录酶模板。

全部的这些数据显示了意外的发现, Immuniperm 来源的胞液 RNA 产生了大约 80% 量的完整匀浆细胞的全部细胞总 RNA, 基本上是所有胞液总 RNA 的 >95%, 它们是全长的, 并且具有与由传统的苯酚和二氧化硅提取方法分离的总 RNA 相同效率的逆转录。因此, 与传统的全细胞高质量 RNA 分离方法相比, Immuniperm 来源的胞液总 RNA 及其伴随的异核 RNA 组分在所有常规下游 RNA 分析方法中是同样有效的模板。

图 8 显示了通过用 Immuniperm 处理大约 770 个 PC-3 细胞而获得的胞液 RNA 的凝胶图谱。数据显示来自低细胞数量的 Immuniperm 来源的胞液 mRNA 具有如图 3、4、5、6 和 7 所证明的同样比例的 RNA。因此, Immuniperm 介导的细胞释放胞液 RNA 不是细胞数量依赖性

的。

实施例 2

从外周血分离循环肿瘤细胞

- 从外周血分离循环肿瘤细胞,然后通过流式细胞计数和基因表达进行细胞分析,这可以如下进行: EDTA 抗凝的血液 (7.5 ml) 转移到 15 ml 的圆锥管中,加入 6.5 ml 系统缓冲液 (PBS, 还包含 0.05% 的叠氮化钠, 目录号 # 7001, Immunicon Corp., Huntingdon Valley, PA)。将管子牢固盖好,颠倒混合几次。血液-缓冲液混合物在 $800 \times g$ 的速度于室温离心 10 分钟。经抽吸小心去除上清,注意不要搅动淡黄色膜层。可以留下一些上清在管中。吸出的上清抗原丢弃。向管中加入 AB 缓冲液 (系统缓冲液, 含作为可逆聚集试剂的抗生物素蛋白链菌素, Immunicon Corp., Huntingdon Valley, PA) 到终体积 10 ml。将管子盖好,颠倒混合几次。通过轻轻颠倒管子几次悬浮 VU/脱硫生物素 EpCAM 铁磁流体微粒 (结合到抗 EpCAM 单克隆抗体上的免疫磁学纳米微粒, 还缀合到脱硫生物素上用于抗生物素蛋白链菌素的生物素逆转聚集, Immunicon Corp., Huntingdon Valley, PA)。向 AB 缓冲液中的样品加入 100 μ l 的 VU/脱硫生物素 EpCAM 铁磁流体,颠倒混合管子几次。避免摇动,以免产生泡沫。立即将管子插入到 QMS17 (目录号 # AS017, Immunicon Corp., Huntingdon Valley, PA) 磁力分离器,保持 10 分钟。从分离器中取出管子,颠倒管子几次重新悬浮管内容物。再次将管子插入到 QMS17 磁力分离器中,保持 10 分钟。从分离器中取出管子,颠倒管子几次重新悬浮管内容物。取下盖子,将管子置于 QMS17 分离器中额外的 20 分钟。将管子放在 QMS17 中,用巴斯德吸管小心吸取细胞-缓冲液混合物,将吸出的上清丢弃。然后立即将管子从分离器中取出,加入 3 ml 系统缓冲液。短暂涡旋将磁选择的细胞重新悬浮。在涡旋过程中应该升高液体以便顶部附近的细胞被冲洗下去。不盖盖子的管子再次置于 QMS17 分离器中 10 分钟,用巴斯德吸管吸出上清。丢弃吸出的上清。在 200 μ l 还包含 RNase 抑制剂 (RNase OUT, 目录号 # 10777019, Invitrogen, Rockville, MD) 的 Immuniperm/RNase 抑制剂 (渗透剂, Immunicon Corp., Huntingdon Valley, PA) 中涡旋重新悬浮磁选择的细胞。在涡旋过程中应该升高液体以便顶部附近的细胞被冲洗下去。可以加入抗体并涡旋混合,所述抗体为例如 25 μ l 体

- 积的抗细胞角蛋白的单克隆抗体 (C11-PE, 0.25 ug) (缀合到 R-藻红蛋白上的识别细胞角蛋白 4、5、6、8、10、13、18 的抗体混合物; Immunicon Corp., Huntingdon Valley, PA) 和 10 µl 的 CD45 PerCP (Pan 抗白细胞标记, 目录号 # 347464, Becton Dickinson, San Jose, CA) 或者任何
- 5 其它合适的抗体。孵育 15 分钟后, 轻敲管底而轻轻搅动样品。将管子放回 QMS17 等待 5 分钟。轻轻吸出上清, 将 Immuniperm-RNA 部分转移到适当标记的管子中。

实施例 3

对来自外周血的循环肿瘤细胞进行细胞分析

- 10 将来自实施例 2 的细胞重新悬浮在 200 µl 的 CellFix (PBS 基缓冲液, 包含作为解聚试剂和细胞防腐组分的生物素, Immunicon Corp., Huntingdon Valley, PA) 中, 孵育 5 分钟。将样品转移到 12 × 75 mm 的流管中, 混合 300 µl 的 PBS, 然后加入核酸染料硫核黄素 T (Sigma # T3516, 10 µl) 和大约 10 µl 的荧光珠 (10,000 个珠; Flow-Set
- 15 Fluorospheres, 目录号 # 6607007 Coulter, Miami, FL)。涡旋混合样品。优选地, 荧光珠管在吸取珠之前涡旋混合。然后在流式细胞计数仪上分析样品。

实施例 4

来自外周血的循环肿瘤细胞的基因表达分析

- 20 使用寡聚 (dT) 标记的磁珠 (Dynabeads[®] mRNADirect[®] Micro Kit, Dynal, 产品号 # 610.21, New Hyde Park, NY) 分离多聚 (A)⁺ 的 mRNA。可选的, 总 RNA 分离可以通过使用适于本领域技术人员的任何其它方法进行, 例如二氧化硅结合、聚合物结合、以及更常规的苯酚提取如 Trizol[®] 试剂 (GibcoBRL, 目录号 # 10296)。使用诸如 DNase I
- 25 (GibcoBRL) 的 DNase 处理去除基因组 DNA。制备由 2:1 的 10 × DNase (1U/:1)、1:1 的 RNase 抑制剂 (cloned)、5:1 的 dH₂O 和 10:1 的 RNA 或对照 (250 ng 基因组 DNA) 的酶混合物。该酶混合物在 37 °C 保温 20 分钟。DNase 处理的 RNA 经寡聚 (dT) 标记的磁珠或 Trizol[®] 重新纯化, 重新悬浮于 10:1 的不含 RNase 的水中。DNase 酶的活性确定通过在 2% 琼脂糖凝胶上电泳跑胶对照基因组 DNA (+/- DNase 处理)、用溴乙锭染色。
- 30

特定的 mRNA 序列的扩增可以使用 rTth (产热性嗜热菌) RT-

PCR。可制备由 10:1 的 5x EZ 缓冲液、1.5:1 的 dATP、1.5:1 的 dCTP、1.5:1 的 dGTP、1.25:1 的 dUTP、5:1 的 Mn^{++} (25 mM)、2:1 的 rTth (2.5 U/ : 1)、0.5:1 的 UNG (1U/ : 1)、12.25:1 的 dH_2O 、2.25:1 的反义引物、以及 2.25:1 的逆反义引物组成的主混合物来逆转录特定的 mRNA 种类。40:1 体积的主混合物加入到包含 10:1 DNase 处理的 RNA 样品以及相应的含 10:1 H_2O 的阴性对照管中。PCR 热循环如下进行 40 个循环: 50℃ 下 2 分钟 (PCR 前), 62/65℃ 下 30 分钟 (PCR 前), 95℃ 下 1 分钟 (PCR 前), 94℃ 下 15 秒 (PCR), 62/65℃ 下 30 秒 (PCR), 以及 62/65℃ 下 7 分钟 (PCR 后)。热循环完成后, 立即将样品管置于 -20℃ 中 2 分钟。完成后, 将样品管置于 4℃ 中直到进行凝胶分析为止。以 20:1 的体积在 2% 琼脂糖凝胶上跑胶, 用溴乙锭染色。特定 mRNA 转录本的定性和定量基因表达测定通过使用 UV 透射仪和 α -成像仪检查凝胶图谱进行, 来确定期望分子量的扩增子的存在。

除了此处描述的那些, 本发明的各种修正对本领域技术人员来说将是在上述描述中显而易见的。这样的修正也打算落入所附的权利要求的范围中。

实施例 5

来自外周血的循环肿瘤细胞的蛋白质分离和分析

从大约一百万个铁磁流体选择的 SKBR3 细胞获得的上清除了包括实施例 1 到 4 中分析的核酸组分外, 还包含被释放的存在于细胞胞质中的胞液蛋白质, 所述 SKBR3 细胞是用 Immuniperm、含 0.05% 皂角苷和 0.1% 叠氮化钠的磷酸缓冲液渗透过的。该上清溶液中的可溶性蛋白质和留在细胞内或者表面上的不溶性蛋白质就因而提供了一种用来确定总蛋白质表达谱或细胞的蛋白质组图谱以及细胞形态学的方法。

首先, 确定由于用 Immuniperm 处理而从胞质释放的总胞液可溶性蛋白质部分相对于从用 NP-40 处理的同样细胞制品中释放的蛋白质总量的比例, 所述的 NP-40 是一种表面活性剂, 是从细胞释放总胞液蛋白质的优选试剂。两种处理过的细胞制品在以常规方法确定总可溶性蛋白质之前经离心或磁分离去除膜碎片, 所述的常规方法是例如分光光度分析的 Lowry 和 Bradford 方法。

第二, 两份样品制剂在 4 到 20% 的梯度 SDS 聚丙烯酰胺凝胶上电泳, 以便 (a) 确定源于 Immuniperm 的胞液蛋白质的分子量截止点以

及 (b) 比较两种制品的蛋白质条带图案和每条带的蛋白质相对量。

第三, 试样进一步经 2D 电泳和常规染色或者可检测标记进行分析, 以提供两种组分的蛋白质大小和等电点的“指纹”信息, 其基于可识别和未经识别组分的定量和定性点图案。得到的信息就产生了正常和转化细胞群体的胞液和总蛋白质部分中的相对和绝对蛋白质表达图案的蛋白质组表达谱。

实施例 6

基于基因特异性引物 (GSP) RNA 聚合酶的 mRNA 库亚组扩增使得能够进行具有固有信噪比 (S/N) 限制的诊断形式, 例如稀有细胞事件和稀有转录本的 cDNA 阵列分析

在 RNA 分离后, 可以应用几种 RNA 分析方法。传统的 RT-PCR 或者更合意的定量方案是可以应用的, 不过一般认为它们是在个别样品中少量使用的, 因为这些样品产生了很少量的起始材料。作为结果, 折衷了临床敏感性来进行多基因分析。这样, 未扩增的 mRNA/cDNA 库只能对一个基因分析一次, 而不能折衷临床的 (以及最大的技术性) 敏感性。由于个别样品的稀少, 发展了几种更高通量的方法。

这里, 我们表明了极大的期望能够通过高通量形式同时测定多基因 (2 到 1000 个) 的表达水平, 例如只在一个反应管中进行全部的微阵列形式。这是通过不明显降低工作量和丧失敏感性而完成的。在单一管中对稀有细胞事件及其稀有 mRNA 样品进行 cDNA 微阵列分析的一个重要障碍就是它们在起始 mRNA 样品中固有的不利 S/N 比。

对放射标记的 cDNA 阵列来说, 这些限制源于 (a) 当一个特定的已知靶掺入时液相中可检测到的靶拷贝数下限 (大约 5×10^5), (b) 最大量标记的非特异性 (背景干扰) 靶 ($20 \text{ ng} = 2 \times 10^{11}$ 随机标记的靶分子库), 这些靶可以同时杂交到尼龙滤纸阵列体系上而不会增加 S/N 比的背景滤纸 (载体) 干扰成分。

对免疫磁学富集的样品来说, 明显的背景干扰 mRNA 是由于在富集过程中不可避免地遗留下来的 WBC 的存在。为了从稀有细胞中得到期望的稀有 mRNA, 溶液要改变 S/N 比 1000 倍, 这可以通过只选择预定基因的一个亚组进行第二轮 RNA 聚合酶扩增 (RNAPA)。

该 GSP 亚组 RNAPA 选择过程在本实施例中简化进行, 使用一个反映临床样品中发现的典型 WBC mRNA 拷贝数比值的模型体系进行

(在大约 5000 WBC 中为 10 ng 总 RNA) /CTC (在大约 50 CTC 中为 0.5 ng 总 RNA)。在由 50 个 CTC 组成的该起始样品原料的等量试样中, 通过实时定量 RT-PCR 确定所有可检测 mRNA 的数目, 前列腺特异性抗原 (PSA=2650)、前列腺特异膜抗原 (PSM=1750)、雄性激素受体 (AR=100) 以及上皮细胞粘附分子 (EpCAM=1163) 示于表 1。与非特异性背景干扰成比例的起始 WBC mRNA 总拷贝数是大约 10^8 到 10^9 。对该特殊实施例来说, 起始总 RNA/mRNA 首先进行一轮扩增, 成比例增加所有 mRNA 种类, 大约等于如实时定量 RT-PCR 所确定的 (表 1)。随后, 25 ng 首轮扩增的 aRNA 试样进行第二轮 GSP 亚组的 RNAPA, 如下所述改变 4 个 GSP 靶的信噪比 (表 1)。

在第二轮 GSP RNAPA 中, 关键的选择步骤发生在单一 RT 反应的过程中, 只对包括基因特异性 RT 引物的预定 mRNA 库亚组同时形成第一链。在该实施例中, GSP RT 引物亚组是上述 4 种 mRNA (PSA、PSM、AR、EpCAM)。GSP-RT 选择性第一链合成后, 使用合适的 DNA 聚合酶和具有 T7RNAP 启动子的寡聚 (dT) 引物合成互补的第二链, 这样就产生了 T7RNAP 适用的选择性双链 DNA 模板组。

这样, 期望的 RNAPA 适用的模板亚组已经通过 GSP 第一和第二链的合成进行了选择。在此, 所有剩下的 RNA 通过将第二链反应混合物暴露于不含 DNase 的 RNase 而进行降解。可选择地, 任何剩下的单链 RNA 和在 dT 依赖的第二链合成期间形成的任何无关的 (非多聚 U/非多聚 A 依赖的) 单链 cDNA 都可以通过单链特异性核酸酶例如绿豆核酸酶而除去。然后, 双链 cDNA 模板组经苯酚提取和/或二氧化硅结合而纯化。选中的 RNAPA 适用的模板经 RNAP 过夜扩增以便仅仅产生 4 种相关基因的大约 1000 倍增加, 它们的 S/N 对于其它可能的模板发生了改变, 这些模板例如 F6 ($\alpha 1$ 球蛋白序列) 代表了源自 WBC mRNA 的干扰。表 1 显示了这 4 种相关基因在全部过程中包括随后的 GSP-第二轮 S/N 改变的实时定量 RT-PCR 结果, 这里 F6 定义为 $\alpha 1$ 球蛋白序列, 发现它在该体系中是 WBC 高度丰富的而在上皮细胞中是检测不到的。这些结果清楚显示, 选中的四种 GSP 靶平均增加了 844 倍而非靶的 F6 WBC 干扰仅仅增加 5.9 倍。这样当区分增加的 GSP 靶信号与 F6 WBC 干扰时, 就形成了最终每种 GSP 靶信噪比的改善。有必要指出的是, 进一步的改善可以期望通过进行修饰, 例如上述绿豆核

酸酶和 GSP-RT 引物序列的选择进行优化。

基因	TRNA 起始拷贝数	在第 1 轮后的 aRNA 总拷贝数	在 GSP 第 2 轮后的总拷贝数	第 1 轮 : 第 2 轮	GSP S/N (F6)
PSA	2650	2.10×10^7	3.00×10^{10}	1238	210
PSM	1750	7.80×10^6	4.03×10^9	517	87
AR	100	64200	2.90×10^7	458	78
EpCAM	375	5.20×10^6	6.05×10^9	1163	197
F6	NA	1.40×10^{10}	8.30×10^{10}	5.9	1

实施例 7

- 5 基于蛋白酶和亲核试剂的从固定化样品回收细胞 RNA 产生用于下游 RT 依赖分析的高质量 RNA 模板

令人惊奇的是,与相应的未固定对照相比,对暴露于醛和脲为基础的
 的稳定剂或固定剂的样品来说, Cyto-ChexTM 和其它以甲醛和甲醛-脲
 10 衍生物为基础的固定剂能够稳定几乎 100% 的全长总 RNA、mRNA 以及其它在全血中发现的所有细胞的核酸。固定为大分子复合物的完整 RNA 改变了它的 RNA 化学性质,不受目前常用的细胞溶胞和离液盐为基础的 RNA 分离方法的影响,例如苯酚提取、二氧化硅结合以及寡聚 (dT) 杂交。

15 这些大分子复合物 (共价和非共价的) 通过酶消化和/或化学亲核试剂孵育相结合而解离和逆转。从而核酸被释放,使得能够充分完整地分离近乎 100% 的起始 DNA 和 RNA 库。这些固定剂来源的 RNA 库提供了用于逆转录酶 (RT) 依赖的形成第一链 cDNA 的高质量模板。

20 这些固定剂回收的 RNA 与本申请中描述的 aRNA 预扩增或通用 PCR 方法相结合,用于下游全面分析或者允许总体的和 mRNA 库的普通功能性分析。

图 9 证实 Cyto-ChexTM 象其它醛基固定剂那样起作用。经 24 小时固定化暴露,少于 1% 的 mRNA 和不成比例的量的 18S-rRNA 是可回收的 (大约 10%)。即使在应用极端离液盐变性化学 (即 GITC 和苯酚、二氧化硅或 (dT) 杂交、BRL's Trizol Reagent、Qiagen's RNA 微型

二氧化硅结合以及 Dynal's Dynabeads mRNA 直接寡聚(dT)多聚(A)⁺试剂盒)的时候,回收也是极低的。

令人惊讶的是,用诸如蛋白酶 K 的蛋白酶和诸如 Tris 基的亲核试剂进行处理,就恢复了足够的核酸化学性质使得能够以充分完整的状态回收超过 90% 的起始总 RNA 和 mRNA,所述试剂去除了大多数共价结合到其它大分子包括核酸上的蛋白质和多肽。来自图 9 中发现的总 RNA 的大规模标准化试样的 25 ng aRNA 试样(图 12A)进行 CK19 和 EpCAM 两者的定量 RT-PCR 比较分析。这个比较显示固定剂来源的 RNA 相对于非固定 RNA 有 3.8 和 3.9 倍的更低拷贝数。这是可以理解的,因为常用的蛋白酶 K 处理恢复了至少 25% 的最大 RT-模板活性用于 RT-PCR 分析。

当不同的操作人员通过 RT-PCR 进行同样的程序并且分析 Percoll 来源白细胞相对于非固定的相应样品的特定 mRNA (α 球蛋白)时,通过固定-回收体系恢复最大 RT-模板活性的 25% 是可再现的。

此外,在这里使用 TransfixTM 配方获得了每单位体积血液 0.1% 的多聚甲醛固定剂最终浓度,这是已知的。

因为 Cyto-ChexTM 暴露的 RNA 的损失和回收状态与 TransfixTM 和其它醛是同样的,如下所述,极为可能的是,在 Cyto-ChexTM 和 StabilcyteTM 配方中发现的甲醛脲衍生物组分的甲醛供体成分是造成核酸共价连接到蛋白质的原因。

在生物体系(即蛋白质和核酸)中发现在大量大分子亲核试剂的存在下,甲醛-脲衍生物导致了这些衍生物解离速度的增加。

解离发生在接近生物亲核试剂复合物的地方,可能特异性结合 RNA 的调节蛋白造成了共价连接。这些连接和结合随后被蛋白酶和更强的亲核试剂处理而去除和逆转。已知交联试剂 TransfixTM 从 24 小时稳定的全血细胞产生全长的高度完整性 mRNA 库证明,所有的醛基稳定剂都将产生类似高质量的核酸。这样就可保存和回收后产生可再现产量的核酸。

使用这些以及大多数其它醛和/或脲衍生物固定剂分析 90-100% 的总 RNA 及其相应的 mRNA 库是可能的,正如下面图 10A、10B 和 10C 所进一步显示的。此外,大多数这些类型的固定核酸可通过蛋白酶和亲核试剂混合物的结合加热到诸如 60℃ 的高温而去除,如图 11 所示。

这些结果显示，在缓冲液中单独高温加热固定 RNA 一个小时就产生 mRNA 库的一部分。这种高温回收效果以前已经显示在福尔马林固定的、石蜡包埋的组织 RNA 获取中，不过这个结果从未在全血中报道过。而且，在本申请中回收的 mRNA 库的质量和数量即使在那些使用福尔马林固定的、石蜡包埋的组织 RNA 获取的报道中也没有获得。

该 mRNA 库与那些使用其它亲核试剂（Tris、乙酰胂以及羟胺）回收的相比，每种亲核试剂的 mRNA 转录本大小分布比例是不同的，即使这些样品没有显示 RNA 降解。这暗示不同类型的 mRNA 序列都可通过特定亲核试剂和孵育条件而获取（即不同类型的甲醛修饰被逆转）。使用的各种酶也显示了不同的回收比例（图 11，凝胶底部）。

蛋白酶 K 消化仅仅恢复 25 % 最大 RT-模板活性的事实，结合观察到的不同固定化逆转试剂产生不同比例的 mRNA 库，强有力的支持一种想法，即通过采用亲核试剂和酶的组合明显改善回收是可行的。

为证实 mRNA 应用于诊断癌症，特别是使用相对地为非侵入性外周血模型的可行性，图 12A 显示了从单一 T7RNAP 预扩增总 RNA/mRNA 得到的 aRNA 的相对质量和数量，所述 RNA/mRNA 是通过在室温用 Cyto-ChexTM 稳定 24 小时后将 10 和 20 个 SKBR3 细胞掺入 7.5 ml 外周血而分离的，重复三次。然后这些平行测定的每个样品经免疫磁学富集，来自它们的细胞溶解产物用蛋白酶逆转条件处理，随后通过二氧化硅结合分离总 RNA。标准化等量 aRNA 用于两个特定基因 CK19 和 EpCAM 的定量 RT-PCR 反应。结果示于图 12B 和 12C。可从图 12B 和图 12C 看到的是，正如由 CK19 所测定的，所有的掺入样品相对于供体的相应重复样品（未掺入的对照）都是阳性。类似地，EpCAM 在所有的掺入样品中都具有同样的 100 % 阳性，尽管在该供体的未掺入对照重复样品中发现了异常的（内源的）和极低水平的表达。实际上，由 RT-PCR 检测到的这种低水平 EpCAM mRNA 对这种序列来说是常见的，并不是因为 PCR 污染的假阳性。

图 12D 和 12E 显示了源自三种不同的醛基固定剂 Cyto-ChexTM、StabilcyteTM 和 TransfixTM 的各种 mRNA RT-模板的质量。如图示，TransfixTM 产生的 mRNA 模板可能具有比 Cyto-ChexTM 或 StabilcyteTM 稍微低的 RT 质量。而且，当这些数据对掺入细胞数进行标准化并与未修饰细胞在时间=0 的时候在完全同样的 SKBR3 细胞培养瓶中进行对

比,固定与未固定的 CK19 和 EpCAM mRNA 之间的差别只有 4 倍(来自图 9 的 RNA 数据未显示)。这被认为是意味着以蛋白酶 K 单独回收和 aRNA 扩增相结合的 24 小时稳定化过程产生了 25% 的可能 RT 模板质量。进一步地,低于 100% RT 质量的原因可能是由于醛修饰,这不是蛋白酶 K 单独能够去除的。因此,正如这些实验所证实,蛋白酶和亲核试剂混合物的结合将明显地改善这些模板的质量超过 25%。为了在类似的条件下与相关文献进行比较,对来自福尔马林固定多聚甲醛包埋组织的 RT RNA 模板质量的相同参数进行分析的研究表明,与未固定组织相比,RT 模板质量降低了 13 到 60 倍(Godfrey 等,使用 5' 核酸酶定量逆转录-聚合酶链式反应对来自福尔马林固定石蜡包埋的组织进行定量 mRNA 表达分析。J. of Molecular Diagnostics, 2: 84-91 (2000))。因此,4 倍降低相对于现有技术是明显的改善。

图 12A、12B、12C、12D 和 12E 确定了用于血液 RNA 样品保存和循环上皮细胞全面分析的一套可再现的、具有产物活性的程序,所述循环上皮细胞最可能是癌细胞。高水平的 mRNA 保存经得起这样的质量分析,其能够检测到掺入 7.5 ml 血液中的单个细胞的存在,只要所述细胞中存在的任何 mRNA 有至少 50 mRNA 分子/细胞(即仅仅 50 拷贝/样品)。

总起来说,全血中的共价固定速度和类型随固定剂类型而不同。同样地,共价固定的逆转或恢复速度和类型将随使用的蛋白酶和亲核试剂类型或组合而不同。对用于相关 mRNA 的半寿期比固定速度快的应用来说,固定速度将是关键点。迅速固定和逆转恢复反应(过程)两者都可以进一步优化以产生更高的 RNA 质量和数量。不过,目前稳定和回收的 RNA 质量和数量在此被证实在血液中是远远超过任何以前出现的那些。

实施例 8

从新鲜的未固定血液 CTC 中富集和分析 mRNA

人类血液是从 9 个患有晚期激素顽固性前列腺癌(HRPC)的患者和 13 个健康志愿者中分离的,对循环上皮细胞特异性 mRNA 的基因表达进行了分析。

患者

血液抽吸进 10 ml 的 EDTA Vacutainer™ 管(Becton-Dickinson,

NJ) 中, 9 个患有晚期激素顽固性前列腺癌 (HRPC) 的患者和 13 个健康志愿者, 后者有 7 个男性 (年龄在 24 到 73 岁之间, 平均 45 岁) 和 6 个女性 (年龄在 27 到 61 岁之间, 平均 39 岁)。在 9 个 HRPC 患者中, 2 个患者具有 5 个连续采样, 1 个具有 4 个, 3 个具有 2 个, 以及 3 个具有 1 个的采样时间点。患者年龄在 60-81 岁之间 (平均 74 岁), 他们的初步诊断是在本研究 2-10 年之前。经过紫杉醇/雌氮芥和/或利普安治疗的患者的连续样品作为连续系列进行制备和分析。患者和志愿者签署了认可进行研究的赞同意见。

靶细胞分离

10 血样保存于室温, 在采集后 2-3 小时之内进行处理, 除非另外指出。15 ml 血分成 7.5 ml 的等份, 转移到内径 17 mm 的一次性管 (Fisher Scientific) 中, 800 g 不制动离心 10 分钟。加入含牛血清白蛋白 (BSA) 的磷酸缓冲盐 (PBS), 使体积达到 10 ml, 颠倒混合样品。识别上皮细胞粘附分子 (EpCAM) 的 Mab VU-1D9 与上皮细胞来源的组织具有广泛的反应性, 将其连接到磁性纳米微粒 (铁磁流体, Immunicon, Huntingdon Valley, PA)。

为增加 EpCAM 阳性细胞的磁负载并减少由于细胞表面 EpCAM 密度差异而产生的捕获效率的可变性, 将脱硫生物素连接到 EpCAM-标记的磁性纳米微粒上形成 CA-EpCAM, 如在申请号 09/351, 515 和 20 09/702, 188 中描述的, 这两份申请在此引入作为参考。然后将 CA-EpCAM 铁磁流体和含有抗生物素蛋白链菌素的缓冲液加入到样品中以获得磁标记细胞的增加。在 CA-EpCAM 铁磁流体上的脱硫生物素随后被生物素取代, 所述生物素包含在下述的渗透缓冲液中。从而逆转了 CA-EpCAM 铁磁流体微粒之间的交联。立即将样品置于四重磁力分离器中 10 分钟 (QMS17, Immunicon)。10 分钟后, 从分离器中取出管子, 倒转 5 次, 放回磁力分离器再 10 分钟。重复该步骤一次, 将管子放回分离器 20 分钟。分离后, 将上清吸出并丢弃。从磁力分离器中取出管子, 用包含牛血清白蛋白 (BSA) 的磷酸缓冲盐 (PBS) 3 ml 重新悬浮, 从器壁上收集组分。

30 每个样品的两个 7.5 ml 等份分别处理。一份通过流式细胞计数进行制备和分析 (实施例 12), 如下所述分析另一份的 RNA。

核苷酸纯化和扩增

在优选具体实施方式中利用本发明的一种方式首先是首先纯化核苷酸样品。这里，总 RNA 或 mRNA 是从富集的细胞群体中分离的。分离可以通过本领域中能够保持 mRNA 完整性并防止降解的任何方法完成。例如，来自两份血样的富集循环肿瘤细胞在 100 μ l 的 Trizol 试剂 (BRL) 或 100 μ l 的 RNA 提取缓冲液 (ZYMO Research) 中进行胞溶，涡旋匀浆的样品，储存在 -80 $^{\circ}$ C 直到 RNA 的使用。按照制造商的说明使用匀浆来分离总 RNA。总 RNA 用 DNaseI 进行简单处理。在 DNase 处理后检验 DNase 活性，使得不会产生溴乙锭凝胶可检测到的基因组 DNA。DNase 处理的 RNA 再次用 Trizol 分离程序进行清洗。十分之一所得的总 RNA 在 1% 琼脂糖凝胶上沿总 RNA 群和分子量标准进行电泳，然后进行 Northern 印迹，与等摩尔的核糖体 18S 和 28S 寡聚体混合物进行杂交。所得的杂交印迹用 32 P 标记，荧光成像 (Packard Cyclone) 并分析确定 RNA 完整性和大小。然后将每个样品的剩余总 RNA 量的值 (90%) 认为是样品的 7.5 ml 血液供体的总 RNA 等价物，其中的 1.5% 计为 mRNA。

实施例 9

免疫磁学选择后在患者中进行流式细胞计数分析

取自人血液的白细胞的流式细胞计数分析用于估计循环上皮细胞中的基因表达。然后将所述制备的分离细胞重悬浮在含有生物素 (Immunicon Corporation) 的 200 μ l 渗透缓冲液中，在饱和条件下加入单克隆抗体 (Mab)-荧光染料复合物。单克隆抗体由藻红蛋白 (PE) 缀合的识别细胞角蛋白 4、6、8、10、13 和 18 的抗细胞角蛋白单克隆抗体 (Mab C11) 以及多甲藻素叶绿素蛋白 (PerCP)-标记的抗-CD45 (Hle-1, BDIS, San Jose, CA) 组成。在细胞与 Mab 孵育 15 分钟后，加入 2 ml 细胞缓冲液 (PBS, 1% BSA, 50 mM EDTA)，细胞悬浮液磁分离 10 分钟。丢弃掉无法分离的悬浮液后，将收集的细胞重悬浮在 0.5 ml 的 PBS 中，向其中加入 Procount SystemTM 使用的核酸染料 (Procount, BDIS)。此外，向悬浮液中加入 10,000 个荧光计数珠以检验分析样品的体积 (Flow-Set Fluorospheres, Coulter, Miami, FL)。

样品在配备 488 nm 氩离子激光器 (BDIS) 的 FACSCalibur 流式细胞计数仪上进行分析。使用核酸染料的荧光阈值以 CellQuestTM (BDIS) 进行数据获取。在 800 个珠或者 80% 的样品被分析后停止获取。

在 listmode 数据 (Paint-A-Gate, BDIS) 上进行多参数数据分析。分析标准包括由前端光散射定义的大小、由直角光散射定义的粒度。用核酸染料和 PE-标记的 Pan 抗角蛋白 MabC11 (CK4、5、6、8、10、13 和 18) 进行的阳性染色, 结合用 PerCP-标记的抗-CD45 Mab 进行的染色用于差异性 CTC/WBC 荧光染色和分析。通过核酸染料和细胞角蛋白抗原的存在以及 CD45 染色的缺少来识别 CTC。对每个样品来说, 区域中存在的事件数目要乘以 1.25 来计算未被流式细胞计数分析的样品体积, 这是上皮细胞典型的。

在健康的、没有癌症的供体样品中, 免疫磁学选择留下来的白细胞在 655 到 5,560 之间 (中值为 4350; 平均值 1759)。在 HRPC 患者样品中, 留下来的白细胞在 813 到 92,000 之间 (中值为 4350; 平均值 12,300)。来自健康的、没有癌症的对照组的 7 个男性和 6 个女性的血液显示没有 CTC, 而来自 HRPC 的血液则显示出 7.5 ml 血液有 4-283 个 CTC 的范围。

15 实施例 10

来自扩增库的 mRNA 转录本的定量

mRNA/aRNA 量的标准化通过首先定量从每个免疫磁学富集的 7.5 ml 血样体积分离的总 RNA 量而确定。它的完成通过对每个样品总 RNA 的 10% 进行 Northern 印迹, 然后进行 28S 和 18S 放射标记的寡聚探针杂交, 并与已知的总 RNA 量细胞系标准进行比较。接着进行荧光成像定量(Cyclone, Packard Instruments)。所得的总 RNA 量定义为 1 个供体样品 mRNA 当量=1 个供体样品 aRNA 当量:

$$[(\text{总 RNA 量}) \times (1.5\% \text{ mRNA})] / 3^* = 1 \text{ 个供体样品 aRNA 当量}$$

* (发现 aRNA 库平均分子量低于未扩增的 mRNA 分子量 3 倍)

0、1、2、3 和 4 的相对基因表达水平确定为未知的扩增产品的琼脂糖凝胶动力学曲线密度, 包括已知拷贝数的 CK19 体外转录 RNA 构建体(CK19-cRNA)标准。该 CK19-cRNA 标准包含 CK19 野生型 mRNA 序列的 3'-末端 800 个碱基。覆盖 1000 倍动力学范围的标准 CK19-cRNA 曲线进行三次重复, 每一种是以 20,000; 2,000; 200; 100; 50; 25 和 12.5 个拷贝掺入到 2 ng 分离自 Percoll-来源的 WBC 的总 RNA 中。进行 40 轮循环的标准动力学曲线显示出对 13-200 个拷贝的 CK19-cRNA 转录本的 RNA 拷贝数的线性信号响应的图形条带密度 (见图 13A 和

13B)。对任何三次重复分析的标准，外部标准曲线具有 27% 的最大 CV。对多元基因分析来说，比较了 CK19 的外部标准曲线，相对基因表达水平 0-4 确定为：

0-检测不到的

- 5 1-大约 25-50 拷贝的 CK19,
- 2-大约 250-500 拷贝的 CK19,
- 3-大约 2,500-5,000 拷贝的 CK19, 以及
- 4-超过 25,000 拷贝的 CK19.

10 图 13B 显示了相应于标准曲线上 CK19 cRNA 的近似拷贝数的典型带密度，用于确定相对基因表达水平 1-4。

CTC 计数和基因转录表达谱是使用 23 个不同的 PCR 扩增产物确定的，所述扩增产物来自 13 个健康供体和 9 个 HPRC 患者的 Ep-CAM 免疫磁学富集血样。微阵列在分析这些类型的样品时是无效的，这是因为在免疫磁学富集过程中非特异性留下的 WBC 来源的信噪比不相容。在这些样品中 CTC 特异性信号与 WBC 留下的干扰的比值在 1 到 15 1000 CTC/ 10^3 到 10^4 WBC 的范围。这些微阵列限制的克服可通过：结合使用来自每个免疫磁学富集血样的 90% 完整 mRNA 库进行 10,000 倍预扩增步骤，然后进行多基因 RT-PCR 分析代替阵列。这项创新提供了足够的起始材料用于每份 7.5 ml 血样进行几百个单独的 PCR 反
20 应。这样，人们就能够进行单个患者的 CTC 多元 RT-PCR 谱分析，而不会影响每个 CTC mRNA 库的每种 mRNA 成员的分析敏感性或临床敏感性。

在进行上述的体积标准化程序后，剩下的来自每种样品的 90% 总 RNA 使用 SMART PCR cDNA 合成仪进行逆转录 (RT)，但是使用的是上述 67 个碱基的寡聚 (dT) 引物。反应在 42℃ 孵育 90 分钟。全部 25 10 μ l RT 转移到使用 Advantage cDNA PCR 仪(Clontech)的 50 μ l PCR 反应中，用 P1-SMART 引物和 P2-T7 的 18 个碱基引物进行 PCR:

(5'-TCTAGTCGACGGCCAGTGAATT-3')

使用的是 PE-9600，热循环程序为：95℃ 1 分钟，10 个循环的 95 30 ℃ 15 秒，65℃ 1 秒，68℃ 6 分钟，然后在 72℃ 20 分钟。全部 PCR 反应物加载到 Sephadex G-50 Quick Spin (TE) 柱(Roche Diagnostics) 上，根据制造商的说明产生洗脱液。

- 洗脱液在 Vacufuge (Eppendorf) 上于 60℃ 真空浓缩大约 30 分钟到 3 μl。根据制造商的说明使用 AmpliScribe 试剂盒 (Epicenter Technologies) 组装可生产典型 aRNA 库的 T7 RNA 聚合酶转录扩增反应，在 20 μl 体积中于 37℃ 孵育 6-12 小时。进一步重复 Trizol 分离程序清理 RNA 转录反应。

- RNA 大小标准、RNA 量标准和每个样品的十分之一转录反应产物在 60℃ 甲酰胺变性 15 分钟，上样到 2% 琼脂糖凝胶上，在 5 伏/厘米跑胶 15 分钟，在使用 Almager™ (A Innotech Corp.) 进行凝胶成像密度计量之前用 SYBR Gold™ (Molecular Probes) 后染色一小时。确定每个转录库的量。

- 基因特异性引物如上述设计。所有引物组设计为扩增每个特异性基因靶的 3'-末端的 500 个碱基（平均 344 bp，226-513 bp 长度范围）中的特异性基因靶 cDNA。为避免扩增基因组 DNA，所有 RNA 样品如上述用 DNase 进行处理。表 1 显示了用于相对 RT-PCR 分析的每个扩增子的引物对。前导引物 P1 显示为各自引物对的上面的序列。反向引物是下面的序列。所有序列写为 5'→3'。

表 1: 引物对

基因	GenBank 登录号	距 3' 末端的 P1 距离	选择的引物对的序列	扩增子长度
α 1- 球蛋白	V00491	580	AAGACCTACTTCCCGCACTT TATTTGGAGGTCAGCACGGT	451
AR	NM_000044	513	ATCTCTGTGCAAGTGCCCAAGAT CAGGAACATGTTTCATGACAGACTGT	207
BCL2	XM_008738	440	GCAAGAGTGACAGTGGATTGCAT CTAATGGTGGCCAACTGGAGACT	330
CK05	NM_000424	353	AGTCACTGCCTTCCAAGTGCAGCAA GGAAACCTGAAGGCTGATTTGAAGCAG	212
CK08	M34225	429	GTGGTTTGAGCTCGGCCTATGG CCAGTGCTACCCTGCATAGCG	275
CK10	NM_000421	305	GACGGTAGAGTTCTTTCATCTACGGTTG GGAAACCACAAAACACCTTGTAGACACC	196
CK18	NM_000224	331	ACCTTGAGTCAGAGCTGGCACAGA	275

CK19	NM_002276	320	GCTTCTGCTGGCTTAATGCCTCAG CATATCCAGGCGCTGATCAGCG CAAAGGACAGCAGAAGCCCCAG	228
DD3	AF103908	2160	GTAAGCCTGGGATGTGAAGCAAAGG GAACCCCTAAAGTGGCTCACAAGAGTG	260
EGFR	NM_005228	265	CCTGTAACCTGACTGGTTAACAGCAG GGCTCTGACTGATCTGGGAGTCA	200
EpCam	M33011	432	GAGATGCATAGGGAACCTCAATGC ACGATGGAGTCCAAGTTCTGGAT	275
ER-a	NM_000125	382	AGCAGGTGCCTGAGACACAGA TCGAGCATCCCGCTGGATTCTT	328
ER-b	NM_001437	323	GGAAGCTGGCTCACTTGCTGAA GAAGCACGTGGGCATTGAGCAT	232
Her2Neu	M11730	426	TCGTTGGAAGAGGAACAGCACTG AGCCTGGATACTGACACCATTGC	266
HK2	XM_008996	334	CACACCATGCAGGATGACAT GCATTCCACAAGGTTCTCAG	190
MDR1	AF016535	263	AGTGTCCAGGCTGGAACAAAG CTCCACTTGATGATGTCTCTCAC	215
MGB1	XM_006409	408	CTCCCAGCACTGCTACGCAGGC GACATAAGAAAGAGAAGGTGTGGT	340
MGB2	NM_002407	420	CTCCTCCTGCACTGCTATGCAGAT ACACCAAATGCTGTCGTACACTGTATGCA	264
Mic1	AF019770	352	CTACAATCCCATGGTGCTCA ACACAGTTCCATCAGACCAG	289
MMP2	NM_004530	332	ACTGCTGGCTGCCTTAGAACCTT GAGAAGAGACTCGGTAGGGACAT	216
MMP9	NM_004994	327	CGTCTTCCAGTACCGAGAGAAAG TGTATCCGGCAAACCTGGCTCCTT	215
MRP	L05628	328	GGTGATCGTCTTGGACAAAGGAG TCTTCACAGCCAGTTCCAGGCAG	300
MUC1	J05582	361	AACGGTGGCAGCAGCCTCTCTTA GCTTCCACACACTGAGAAGTGTCCG	238
NKX3A	NM_006167	284	GGAAGTTCAGCCATCAGAAGTAC GGTATGGGTAGTAAGGATAG	246
p53	AF307851	334	CTGCCTCAGCCTCCGGAGTAGCT GTGGGGTGAAAATGCAGATGTGC	243
PIP	J03460	226	CAGAACTGTGCAAATTGCAGCCGTC AGACCACAGCAGAAATTCCAGCCAAG	201
PSA	M26663	236	TGAAGCACTGAGCAGAAGCTGGA GAGGGTTGTCTGGAGGACTTCAA	236

PSGR	AF311306	425	ACACCGCTTTGGAAACAGCCTTCATC	281
			GTA CTGATGTGCTTATGGGCAACTGG	
PSM	M99487	459	AGTTCAGTGAGAGACTCCAGGAC	286
			CTGCACTGTGAAGGCTGCAACAT	
TERT	NM_003219	347	AGCACACCTGCCGTCTTCACTT	234
			GGCACACCTTTGGTCACTCCAA	
Timp1	NM_003254	302	CCAAGACCTACACTGTTGGCTGT	240
			ACTGTGCAGGCTTCAGTTCCACT	
Timp2	NM_003255	325	TGGGCTGCGAGTGCAAGATCAC	219
			CTGCTTATGGGTCCTCGATGTC	
Topo2a	NM_001067	356	GCCATCCACTTCTGATGATTCTG	244
			ACCAGTCTTGGGCTTGGTAAGA	
Topo2b	NM_001068	366	AAGCCCAAGAGAGCCCCAAAAC	279
			TGGCAGAGAAGGTGGCTCAGTA	
TROP2	X77753	334	TGTTGCTACTCTGGTGTGTCCCAAG	245
			CTGGGATTCAAAGGAGGTACAGCTC	
uPA	NM_002658	387	TGGGCTGTGAGTGTAAGTGTGAG	285
			CACCCAGTGAGGATTGGATGAAC	

逆转录(RT)在 25 纳克 T7 预扩增 aRNA 库上用随机 9 碱基 50 ng、
 1 μ l 的 SuperscriptTM (BRL)根据制造商的说明进行。RT 孵育于 25℃
 5 10 分钟、37℃10 分钟、42℃20 分钟、50℃60 分钟。每个样品 aRNA
 (50-1300 pg 的范围)的十个供体当量用于包含 1 单位 platinum taq 酶
 (BRL)的随后每个 50 μ l PCR 反应。通过在热循环程序的第 31、35
 和 40 轮时取样 15 μ l 由每个单独的 PCR 反应管产生各自的 PCR 曲
 线,所述热循环程序是使用 PE-9600 热循环仪进行: 95℃1 分钟, 31、
 10 35 和 40 个循环的 95℃1 秒、65℃1 秒、72℃1 分钟;然后在 72℃20 分
 钟。每个 PCR 批次的每个扩增子包括一个细胞系 cDNA 扩增阳性对
 照,以及主要混合的 PCR 试剂扩增阴性对照,它包括除了 cDNA 样品
 外的所有组分。所有 RT-PCR 结果在含有溴乙啶的 2%琼脂糖凝胶上
 15 进行分析,同时用 AlphaEaseTM软件的 5.04 版进行 BRL 低分子量和点
 密度分析。

基因鉴定的目的是用最高临床特异性和敏感性检测上皮细胞来识
 别 CTC 中的 mRNA 表达谱。首先,在 WBC 中发现的基因表达水平是
 从健康供体的富集进行估测的。候选基因的选择是根据已知文献数据
 所显示的显著上皮特异性表达水平进行的。WBC 阴性候选者的识别可

使得 CTC 图谱能够用于三种基本组织水平的分类/表征,就是上皮来源的(图 14A),肿瘤/器官来源的(图 14B),以及肿瘤治疗的靶特征(图 14C)。

RT-PCR 作图是在所有样品上根据图 14A、14B 和 14C 中的扩增子组进行的。图 14A 显示上皮标记 CK19 在本发明 HRPC 样品体系中 100 % 特异的,而 0/13 个健康供体是 CK19 阳性的,与此相比,18/23 (78 %) 个 HRPC 患者样品得到 CK19 阳性结果。CD5 和 TROP2 也是 100 % 特异性的。然而,它们的敏感性分别为 1/23 (4 %) 和 2/23 (9 %),不能增加足够的图像价值以证明其用途。在没有 100 % 特异性的基因 (EpCAM、Muc-1 和 MIC-1) 中, WBC 背景阈值可用在水平 1 和 2 之间,超过后,所有患者来源的信号都比可认为真正阳性的值大。在用这组基因进行最大上皮敏感性分析时, CK19、EpCAM 和 Muc-1 敏感性的结合在 23/23 (100 %) 的患者样品中得到上皮阳性的结果。由于所有血样因铁磁流体富集过程中的低特异性结合而产生 WBC 的遗留, WBC 特异性基因 (F6= α 1-球蛋白基因) 用作全体系 RNA 处理和扩增的阳性对照。所有 36 个样品都得到大于水平 4 的结果(见图 14A)。

实施例 11

分析在预扩增的敏感性下限的可再现性

为评估修正的 T7 转录预处理扩增程序的可再现的下限敏感性性能,构建了一个模型体系,其中包括临床 RNA 样品上进行的所有操作。来自乳腺和前列腺癌细胞系 SKBR3 和 LNCaP (America Type Culture Collection, Manassas, VA) 的总 RNA 是使用 Trizol 试剂 (Life Technologies Inc.) 按照制造商的说明进行分离的。在第一链合成前,进行相应的 2、0.2、0.02 的 SKBR-3 细胞当量的连续稀释,每份稀释液掺入到 2 ng 的 Percoll 来源的 WBC 总 RNA 中。RT-PCR 外部 CK19 标准曲线确定与 SKBR-3 稀释曲线同时进行,得到存在于每份 SKBR-3 细胞当量中的大约 1,000 个野生型 CK19 mRNA 拷贝。CK19 表征的 SKBR3 稀释曲线用作两类特异性转录本之一来模拟这种基于 T7 的 mRNA 库扩增体系的全过程下限敏感性和可再现性。第二种转录本是基于外源 Lambda DNA 的构建体(Walker Biotech Publication),其产生 1.2 kb 的多聚 A (30) 转录本。掺入 SKBR-3 细胞的 WBC 曲线的分析是在 2000、200 和 20 个 CK19 mRNA 拷贝水平进行,每份三次重复。

Lambda 曲线的分析是在 500、50 和 5 个拷贝水平掺入到 2 ng 的 Percoll 来源的 WBC 总 RNA 中，重复三次。在最后的分析中，从 50 个拷贝或更高水平 (N=12) 获得了可再现的 RT-PCR 扩增，其中各个样品通过完整 T7-转录预扩增进行，每个都产生了可测量的信号。而且，仅仅以任一序列的 50 个 mRNA 转录本起始，这种检测下限在随后的细胞系掺入模型中是可重复的，其中在 aRNA 和定量 RT-PCR 分析 (实施例 6) 之前将所有六个序列类型(PSA, PSM, AR, HPN CK19 和 EpCam)连续稀释到已知拷贝水平。

在 RT-PCR 后，用 AlphaImager 在 31、35 和 40 循环的动力学曲线试样上进行分子量和点密度凝胶分析。从 12 个掺入水平的 11 个 (92 %) 中计算得到 19.25 % 的 CV。200 个拷贝样品中只有一个 (8 %) 具有低于预期 14 倍的密度，但是这个样品仍然是可检测的，确定为水平 1。

在分开的研究中，本发明的 T7 预扩增方法对相对 mRNA 丰度的影响通过与同样制备的未扩增库比较进行了模拟。没有检测到 N=8 的基因(PSA, PSM, MGB1, MGB2, PIP, CK8, CK19, 和 EpCAM)在带密度比值上的明显差别，其中使用 15 个细胞当量的前列腺癌细胞系 LNCaP 和 15 个细胞当量的乳腺癌细胞系 SKBR-3 掺入到 1000 个细胞当量的 WBC 总 RNA (2 ng) 中起始，然后进行 T7 预扩增方法和随后的多基因 RT-PCR 动力学曲线分析，如图 13C 所示。在这些研究与每个批次同时进行的 cDNA 模板阴性扩增对照没有显示出可检测的信号。

使用本发明的修正 T7 方法进行一轮总 RNA 库的成比例扩增，产生的 aRNA 库比初始 mRNA 量平均增加了 10,000 倍以上。这是基于初始 mRNA 水平估计为确定的总 RNA 量的 1.5 %。转录扩增过程产生了中等转录长度为 600 碱基的库，长度范围在 550-800 碱基之间。每个库中的各个转录本的大小在 300-3000 碱基的范围。各个 aRNA 库随机引发 RT，由此使用 10 个 aRNA/cDNA 供体当量进行各个 PCR 反应的多基因分析。

健康、没有癌症的样品中来自遗留的 WBC 的总 RNA 量在 0.8-11.12 ng 之间 (平均 3.5 ng)。来自 HRPc 患者样品的总 RNA 量在 0.8-35.12 ng 之间 (平均 7.2 ng)。所有总 RNA 样品随后产生的 aRNA 库的量与起始总 RNA 值直接成比例。

每个样品 10% 总 RNA 的 Northern 印迹与 28S 和 18S 放射性标记寡聚探针、并同时与来自细胞系标准的已知量总 RNA 进行杂交，然后通过荧光成像确定数量和质量。质量估计通过 28S 与 18S 的比例进行，其中 SKBR-3 细胞系标准平均为 1.55（在 1.50-1.64 的范围），对富集样品来说，13 个健康供体平均为 1.36（在 1.16-1.60 的范围），HRPC 平均为 1.10（在 0.57-1.80 的范围）。

此外，我们观察到来自 HRPC 患者的 80% 铁磁流体富集的 CTC/WBC 样品具有比期望值少 6 倍的总 RNA 量（在 1.5 到 15 倍的范围）。这些期望值基于 WBC 平均总 RNA 量=2 pg/个细胞，以及平均的上皮细胞总 RNA 量=20 pg/个细胞。这在估测诊断和治疗状态的个体中可能是有意义的，特别是在治疗过程中。

实施例 12

使用组织特异性基因进行 CTC 肿瘤组织来源和患者特异性治疗表征的确认

36 个样品进一步用 N=8 个扩增子进行分析以确定最佳特异性和敏感性表达谱来识别循环上皮肿瘤细胞的器官来源。对前列腺特异性识别，我们估测了 PSA, PSM, HK2, HPN, PSGR, DD3, MGB1 和 MGB2（见图 14B）。这些扩增子没有显示出任何来自 WBC 组的信号，除了一个有 Hepsin (HPN) 的 #3 女性的例外。如图 14B 所示，PSA 是该前列腺组最敏感的，有 20/23（89%）的样品是阳性结果，其后是 PSM 为 17/23（74%），HPM 为 13/23（57%），hK2 为 7/23（30%），PSGR 为 2/23（9%），以及 DD3 为 1/23（4%）。出乎意料的是，两种“乳腺特异的”基因乳球蛋白 1 和 2 在前列腺中有强信号水平的阳性结果，MBG1 为 1/23（4%）和 MBG2 为 2/23（9%），不过在健康供体群中没有。结合这两种以及最高敏感性的标记 PSA 和 PSM 产生了 20/23（87%）的敏感性。加入 HPN 后，敏感性增加到 21/23（91%）。Hepsin 和 PSM 是两种标记，它们对治疗策略也是重要的，因为它们两种都是组织特异性的和跨膜的，使得特异性细胞靶向输送策略成为可能。

基于 CTC RNA 图谱对潜在治疗分析进行了各个患者的表征，结果示于图 14C。在该样品组的个体特异性得分显示 AR、NKX3A、EGFR 和 ER 都是 100%。MDR1、MRP 和 Topo2a 都受到了 WBC 组背景信号的明显影响。AR 检测 HRPC CTC 的敏感性是 16/23（70%），其后

是 NKX3A 为 4/23 (17%)，Topo2a 为 5/23 (22%)，MDR1 为 5/23 (22%)，EGFR 为 4/23 (17%)，以及 ER 为 1/23 (4%)。出乎意料的是，MDR 和 MRP 在分辨这两组方面看起来是无用的。

在 18-26 周期间从三个患者连续提取样品。一个患者只用利普安治疗，而两个用利普安结合紫杉烷/雌氮芥治疗。连续样品显示出基因相关的治疗敏感性/抗性表达的改变，而其他仍然没有改变。这些改变与 CTC 和白细胞数目无关，如图 15A、15B 和 15C 所示。对只用利普安治疗的患者，在 0、5、10 和 18 周时提取 4 个连续样品，没有检测到 MDR1 (图 15A)，AR 保持相对恒定，而 Hepsin 有波动。图 15B 和 15C 进一步显示出在 TX/ES 治疗过程中 MDR1 mRNA 水平相对于健康供体的一致降低。在 HRPC 发展中起重要作用的 AR 表达水平在 TX/ES 治疗过程中完全消失，如图 15B 所示。相比之下，图 15C 显示 AR 在类似治疗过程中相对不受影响。检测到了 Hepsin mRNA 的惊人变化，在图 15B 和 15C 中，两个患者在未治疗时的高表达水平在 TX/ES 治疗过程中都完全消失了。

实施例 13

用来自同样样品的血浆来源 (非 CTC) 的 RNA 作图分析疾病状态以提供 CTC 补充数据

迄今为止，已经描述了用于分析来自血样富集的 CTC 的 mRNA 的方法。该方法重要的步骤是 T7 预扩增步骤，它可以允许分析只有几个拷贝的转录本，能够进行多达 1000 个不同的单独基因特异性 RT-PCR 反应。典型 mRNA 库的 T7 预扩增有效去除了有限样品 mRNA 量的主要限制。这种同样的预扩增可以应用到非 CTC RNA。其实，特定血样中有众多 RNA 来源，这些非 CTC RNA 中的一些将提供有价值的信息。

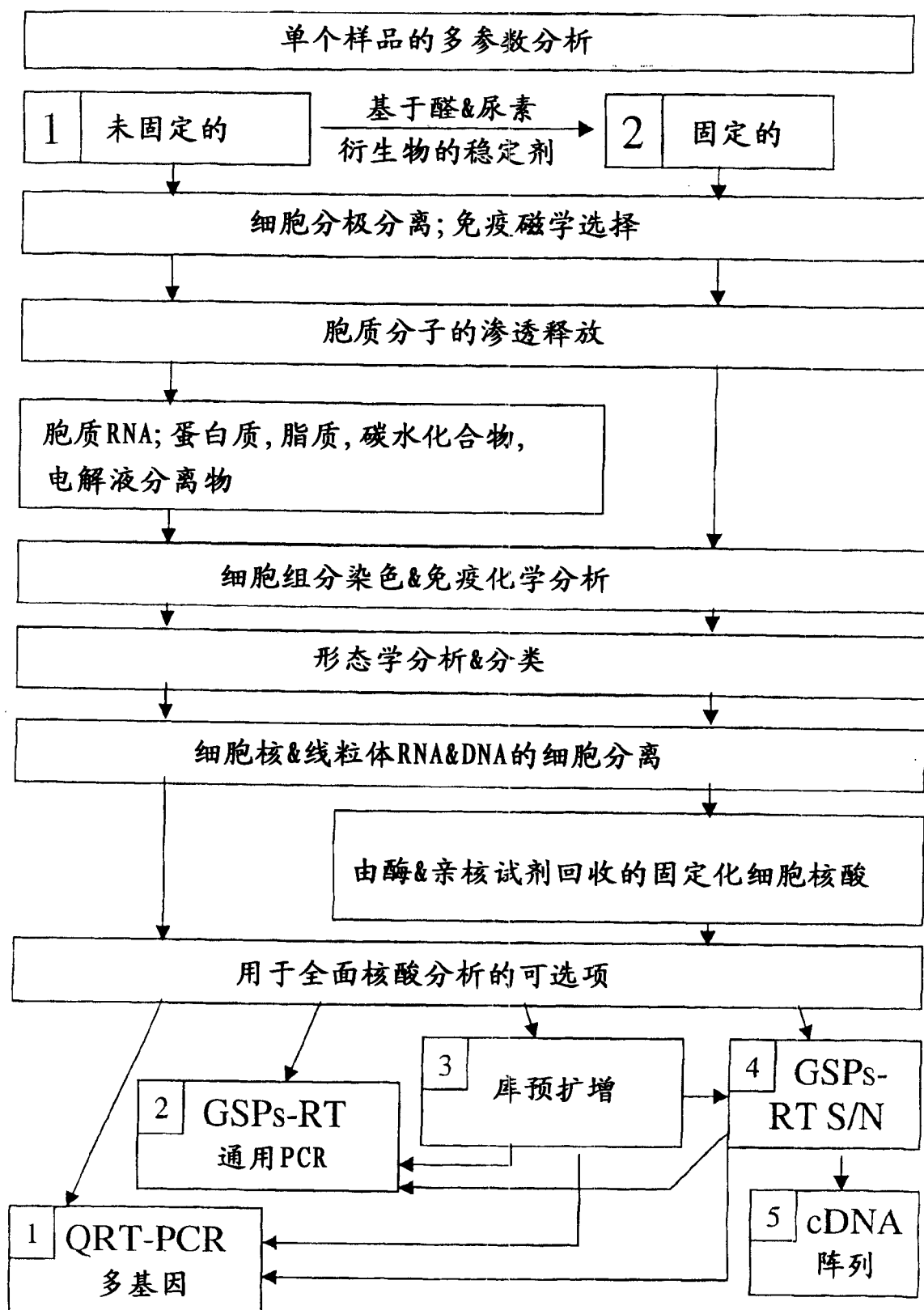
CTC 存在的证实和肿瘤来源组织的确定以及疾病机制的全面表征都可以使用来自血浆组分的 RNA 而实现，所述组分是在铁磁流体富集过程中获得的。优选地，这可以与上述富集 CTC 的实施例中描述的 T7 预扩增方法结合。铁磁流体富集方法首先分离出每个样品的血浆组分。典型地，这种组分在 CTC 富集时是被丢弃的。

不过血浆和血清来源的 mRNA 和 DNA 最近已经出现在文献中，提供了有价值的癌症表达 (表型) 和基因型 (DNA 分析) 数据。血浆来

源的 mRNA 和 DNA 是通过用于下游分析的常规分子生物学方法分离的。因为 mRNA 容易从血浆得到，而且已经证明提供了有价值的 RT-PCR 数据，因此这些同样的 RNA 转录本可以使用这里表述的修正 T7 扩增程序进行更全面的分析。因此不依赖 CTC 和/或 CTC 补充的 mRNA 表达谱可以用与 CTC 相同的程序产生，通过使用来自每个样品的血浆来源部分的 RNA。

进一步地，基于 T7 的表达谱方法可应用于上述富集方法，使得 CTC 废弃组分的分析能够用于区分 WBC 表达谱和 CTC 特异性图谱，其中前者是富集过程中非特异性遗留的。这可以通过差异模式比较和随后的扣除而完成，从而提供了额外机制在分析过程中正确识别 CTC。此外，CTC 废弃的图谱本身可提供有价值的关于特定治疗应答和敏感性患者的特异性信息。

本领域技术人员可以理解本发明所涉及的，本发明不限于此处公开的说明书和优选具体实施方式的探讨，而是此处特定描述的程序可以进行许多修正和改变，只要不脱离由下面权利要求所定义的本发明的精神和范围。



注: 所有步骤都是可选的, 可以依次组合进行。

图 1

SKBR细胞经Immuniperm(皂角苷)
渗透而释放总RNA的动力学

1600个SKBR细胞/泳道，以分钟为单位的时间过程

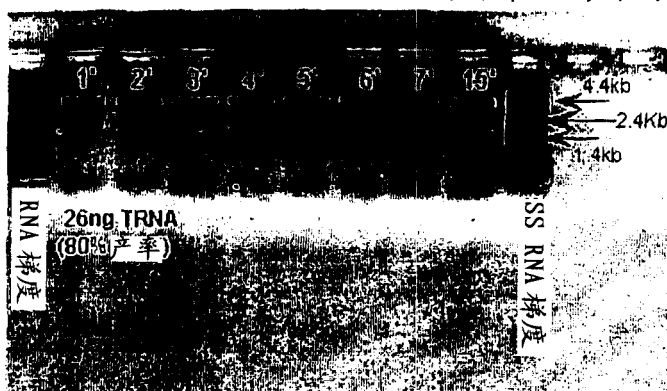


图 2

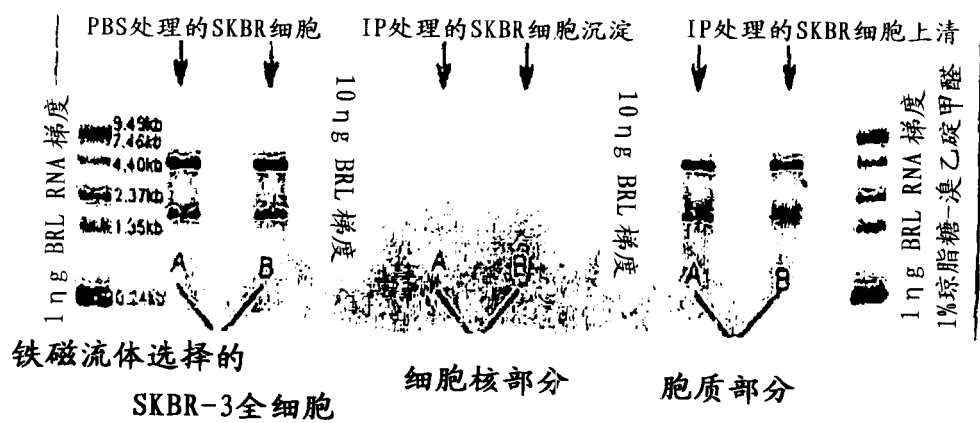


图 3

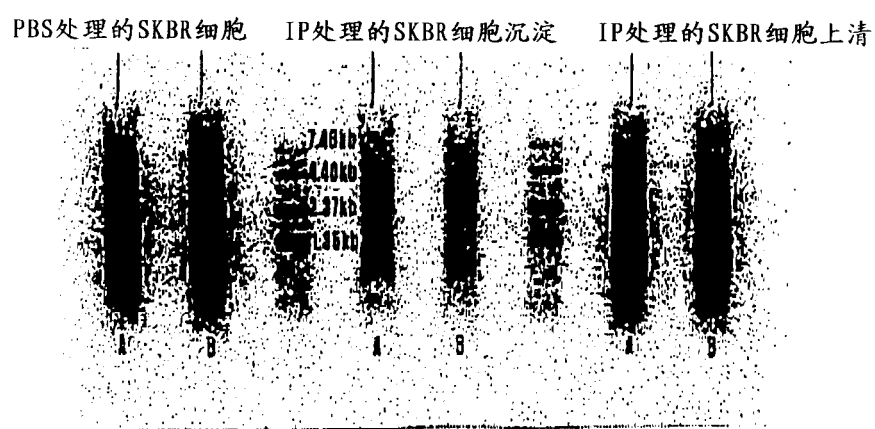


图 4

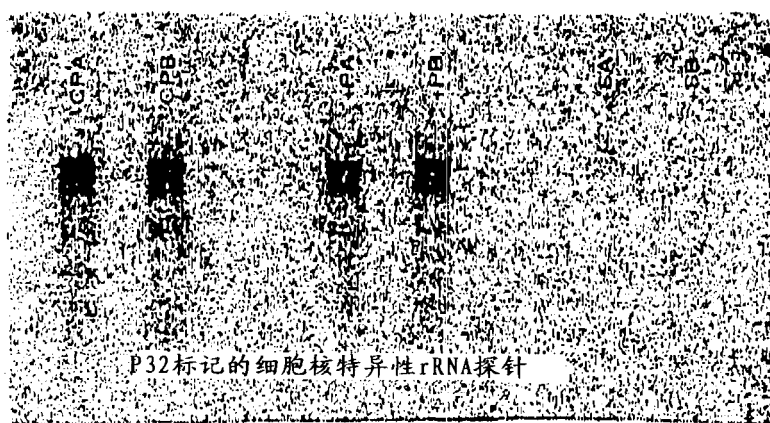


图 5

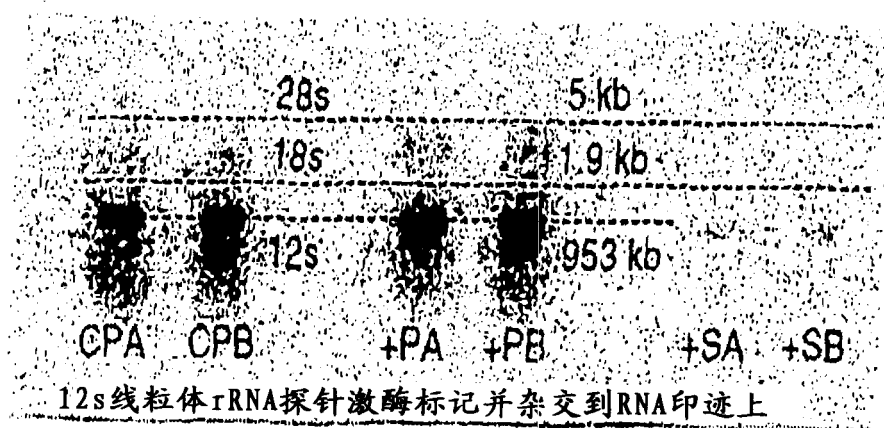


图 6

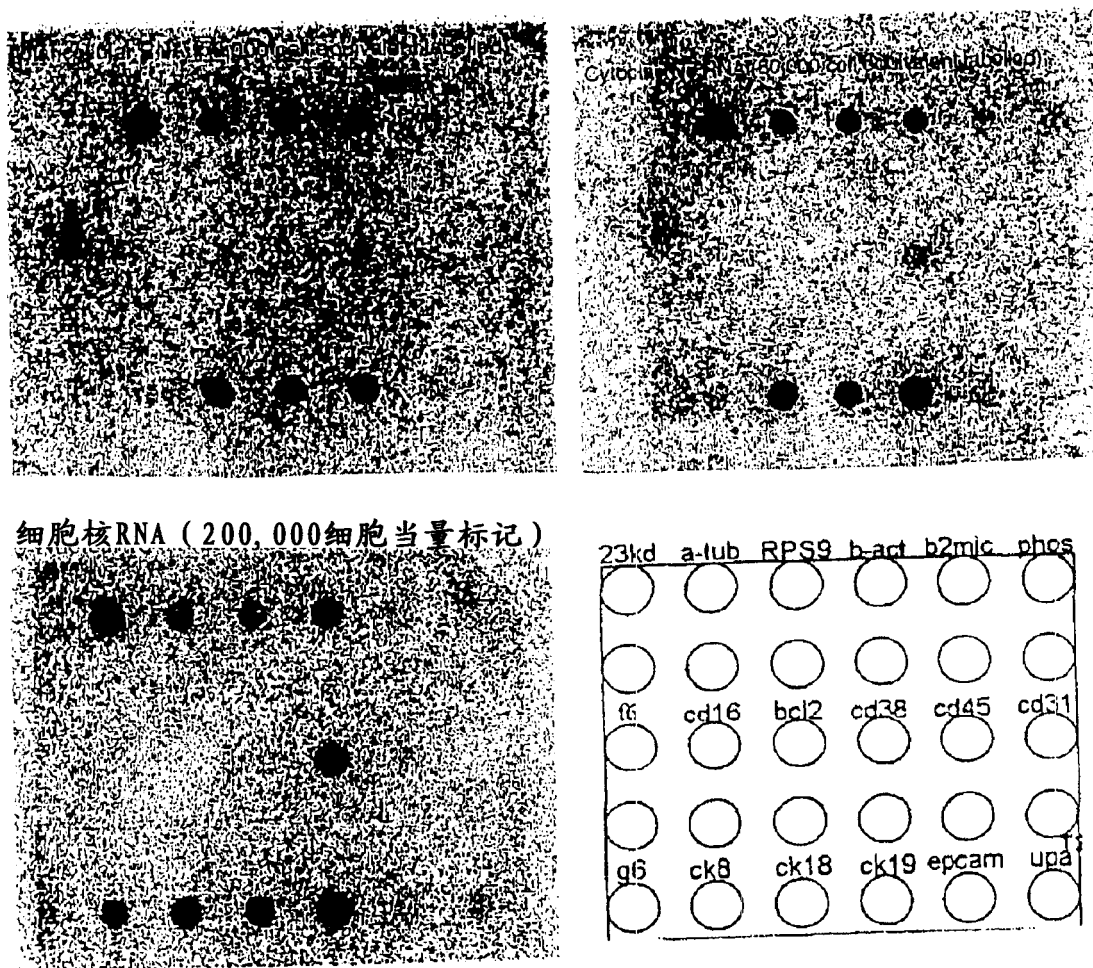


图 7

从完整PC3活细胞用ImmuniPerm+产生胞液TRNA的确认

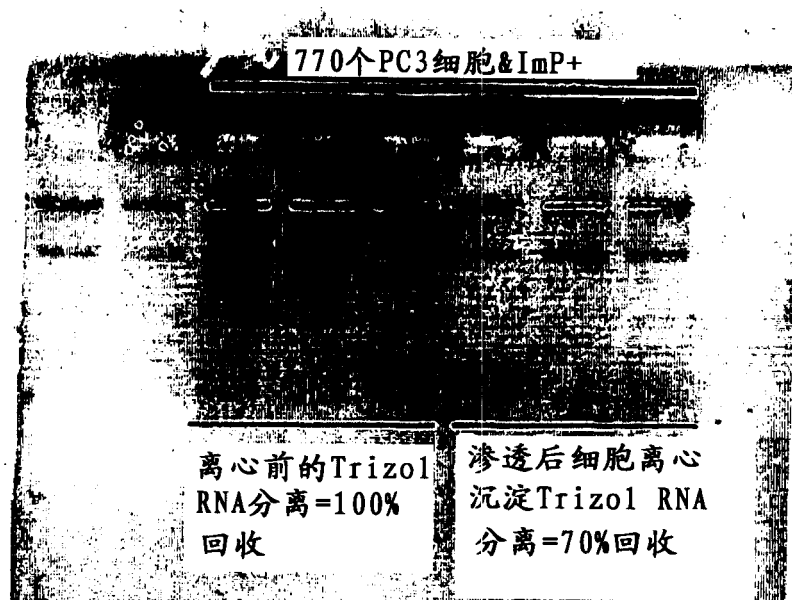


图 8

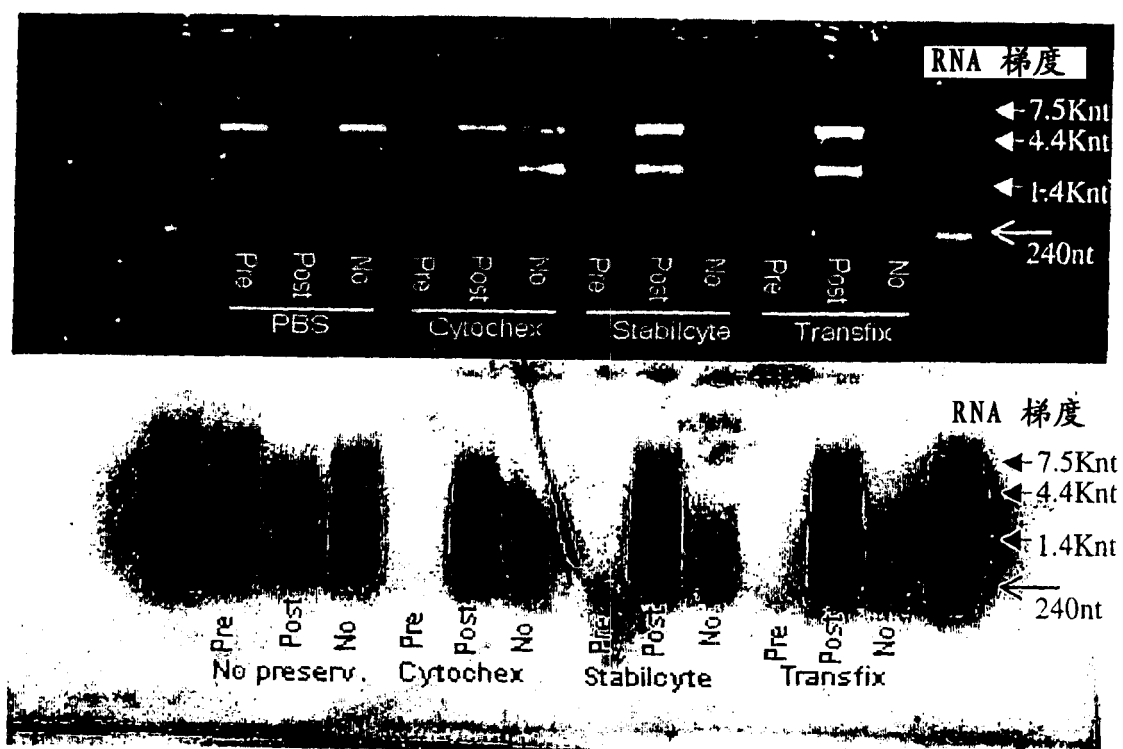


图 9

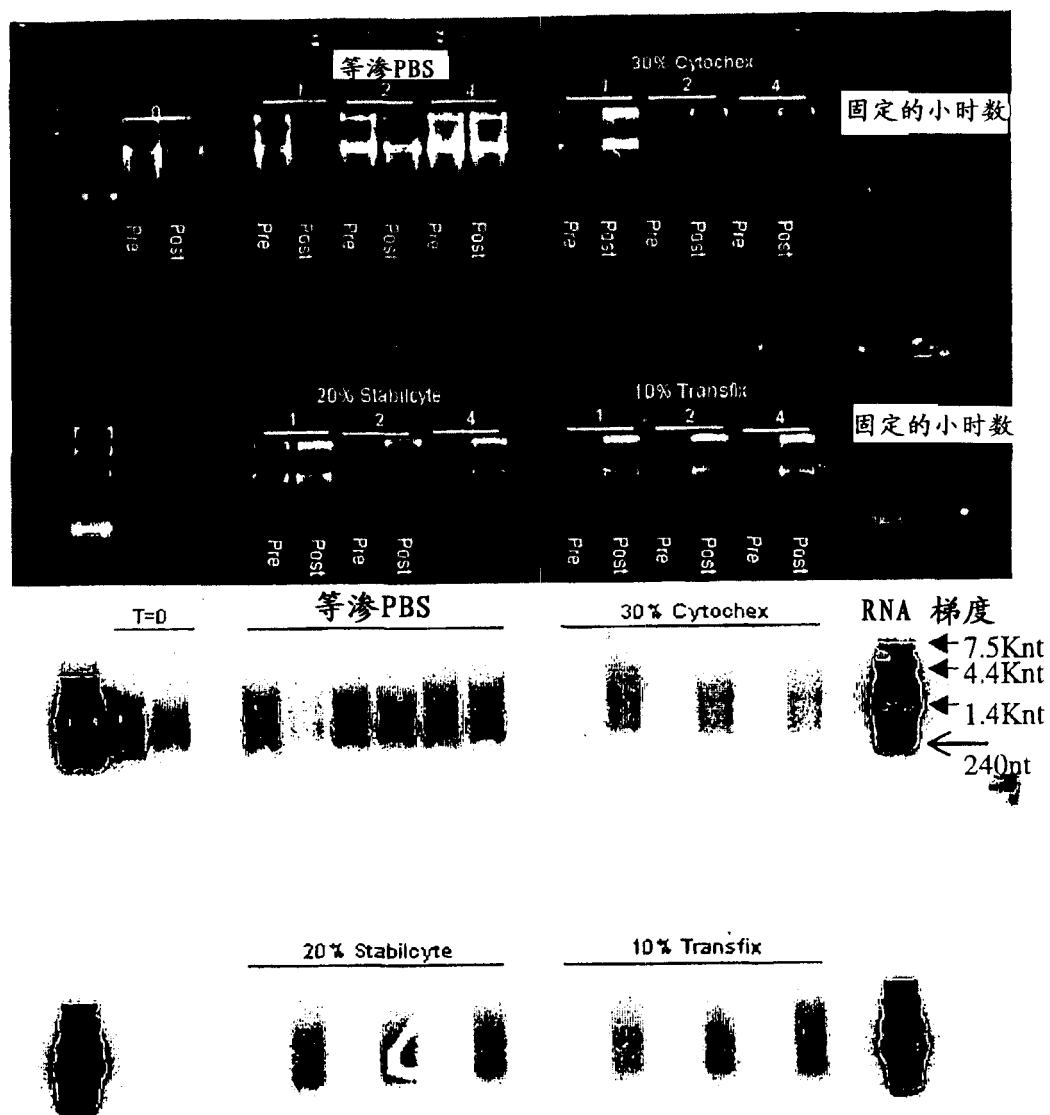


图 10A

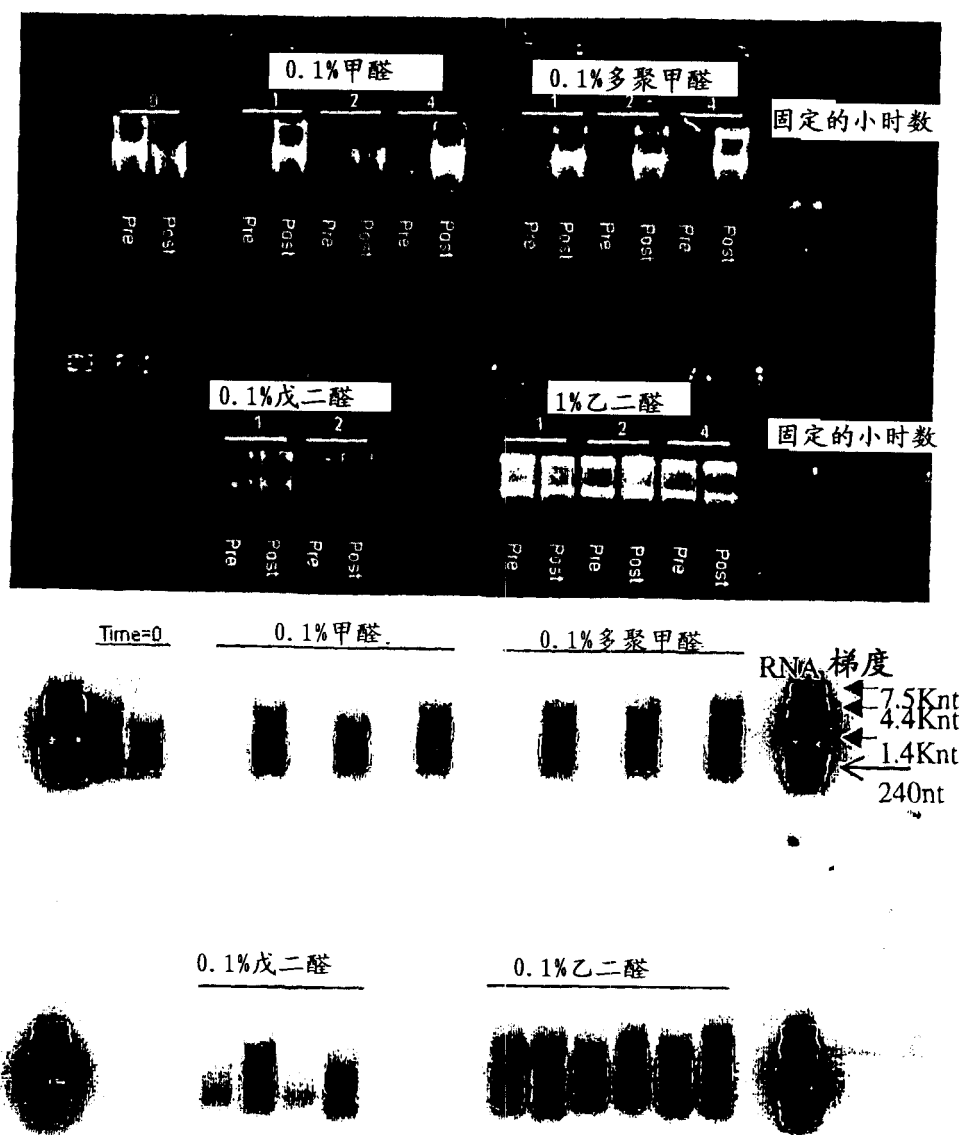


图 10B

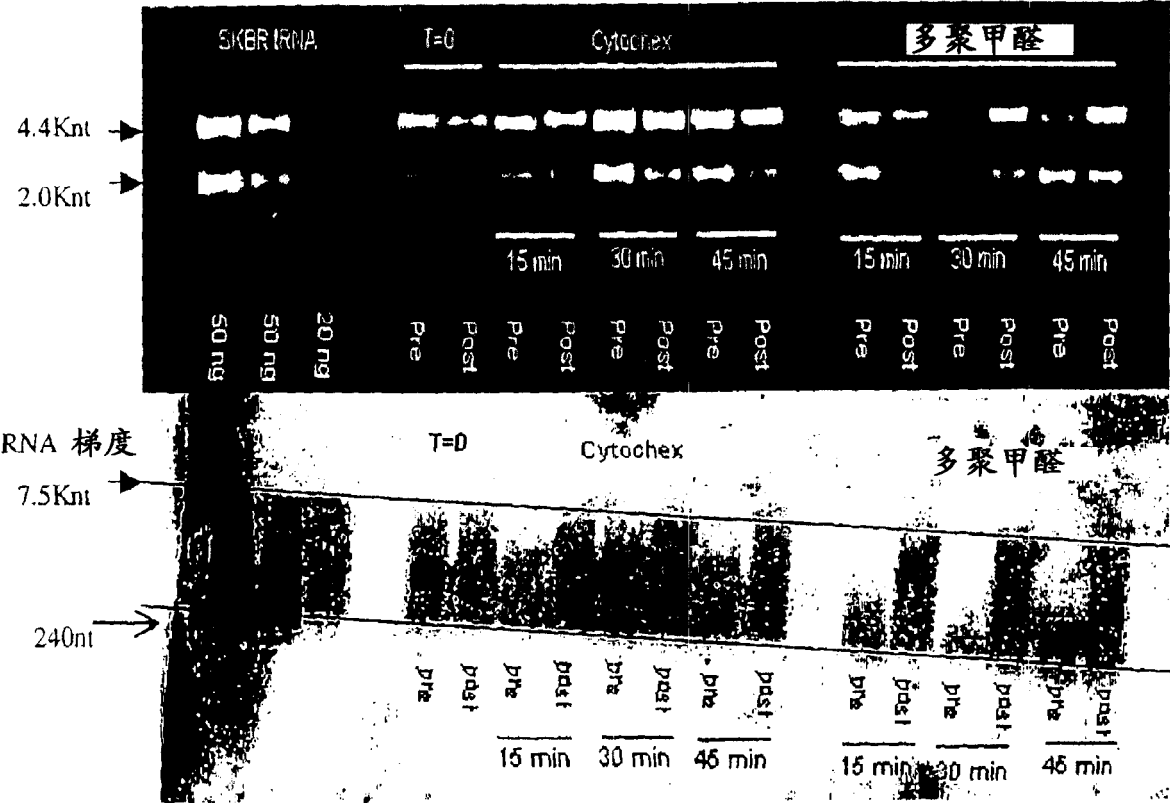


图 10 C

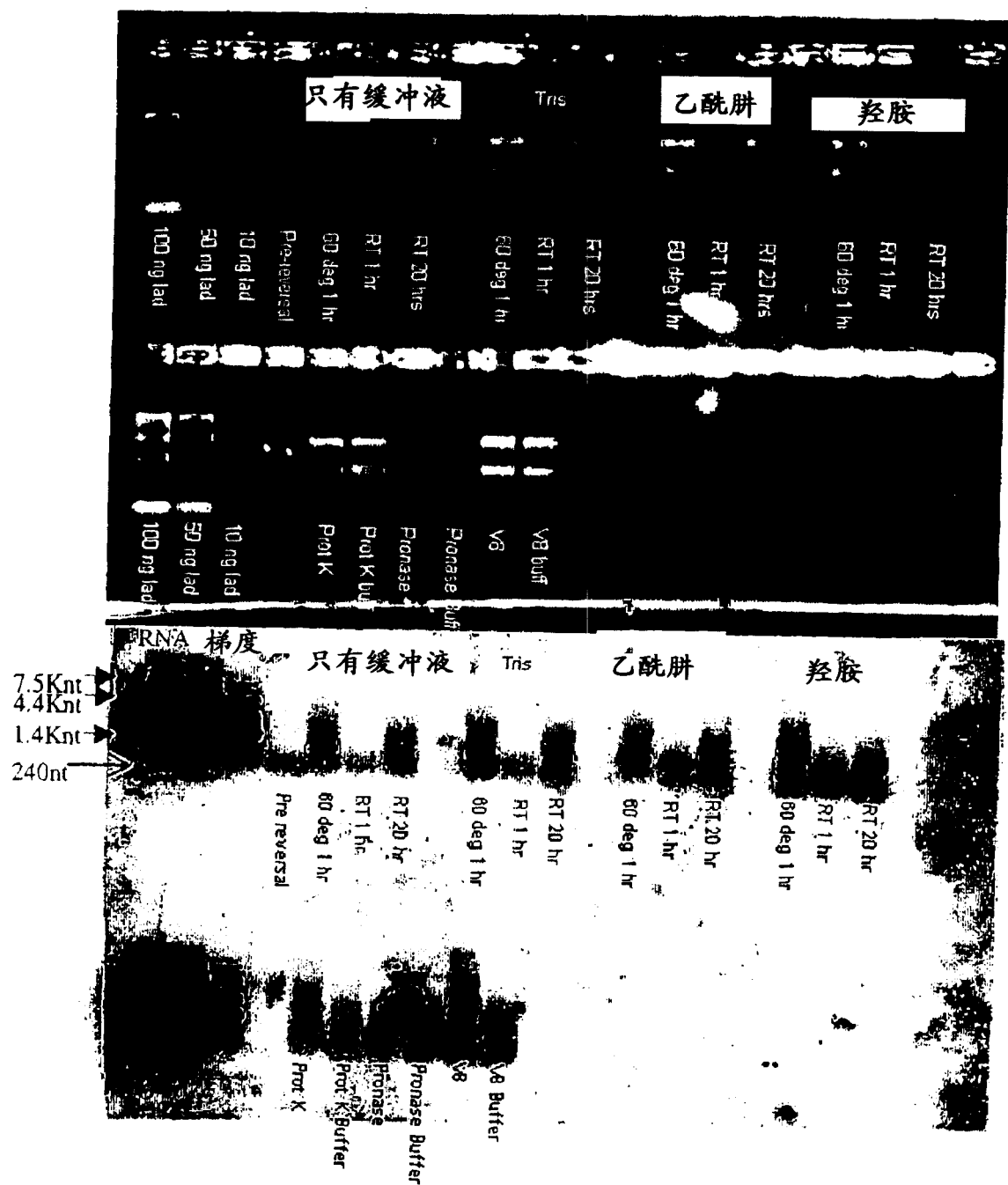


图 11

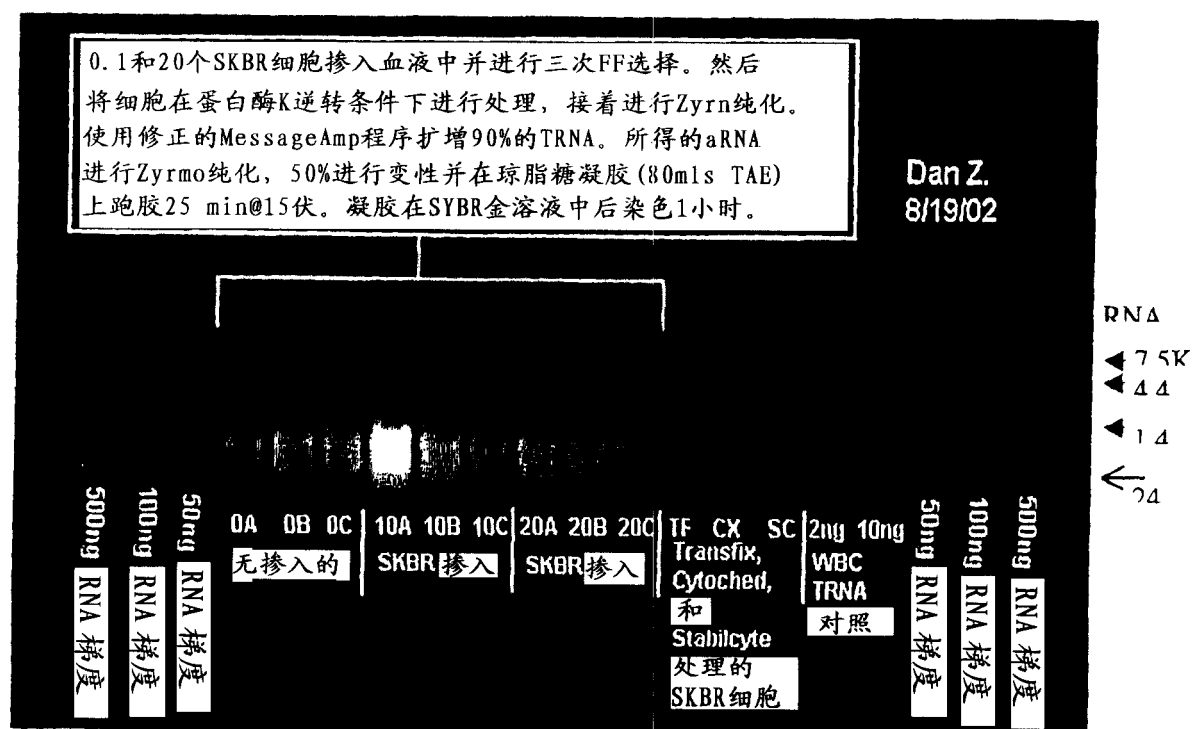


图 12 A

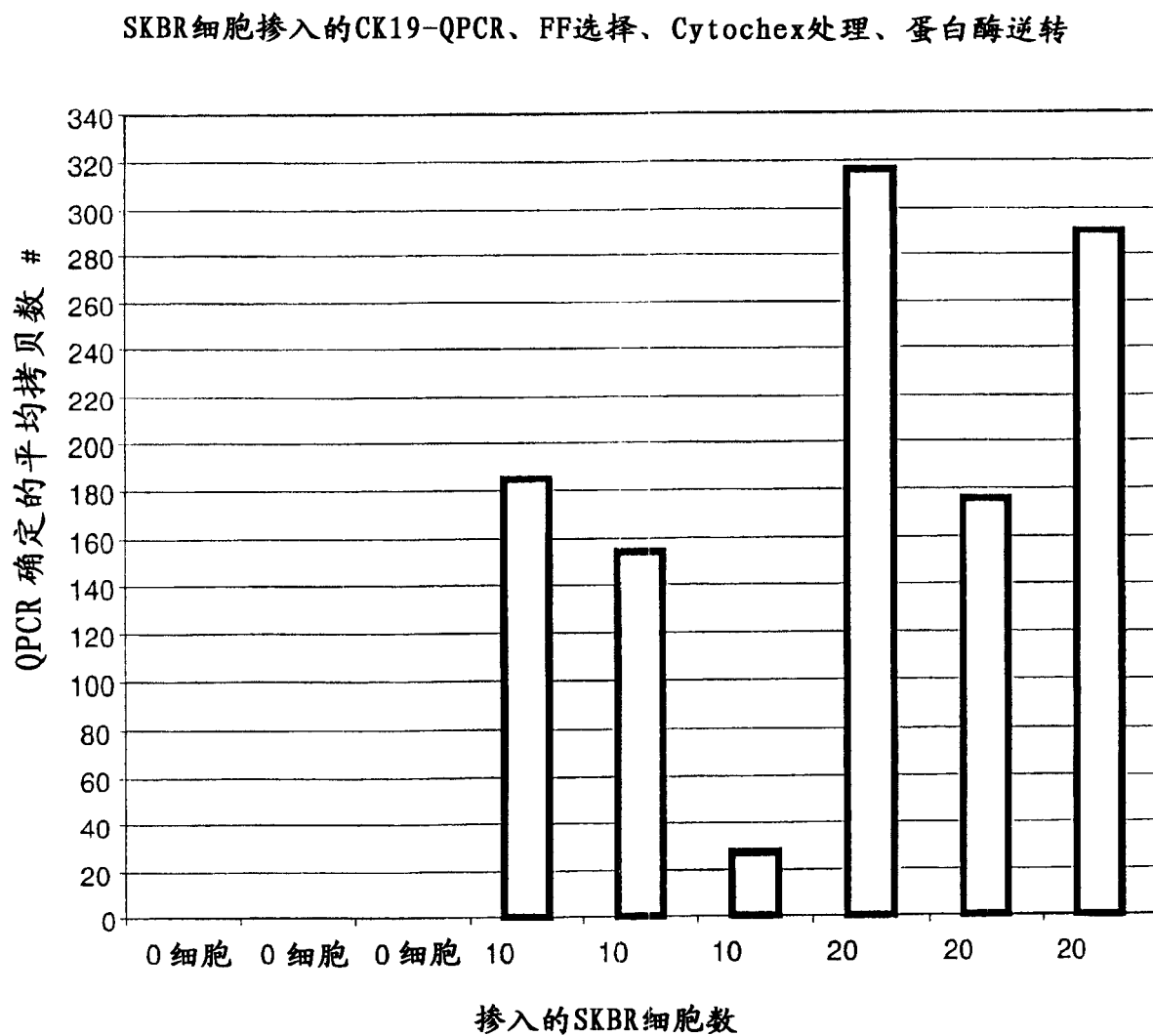


图 12 B

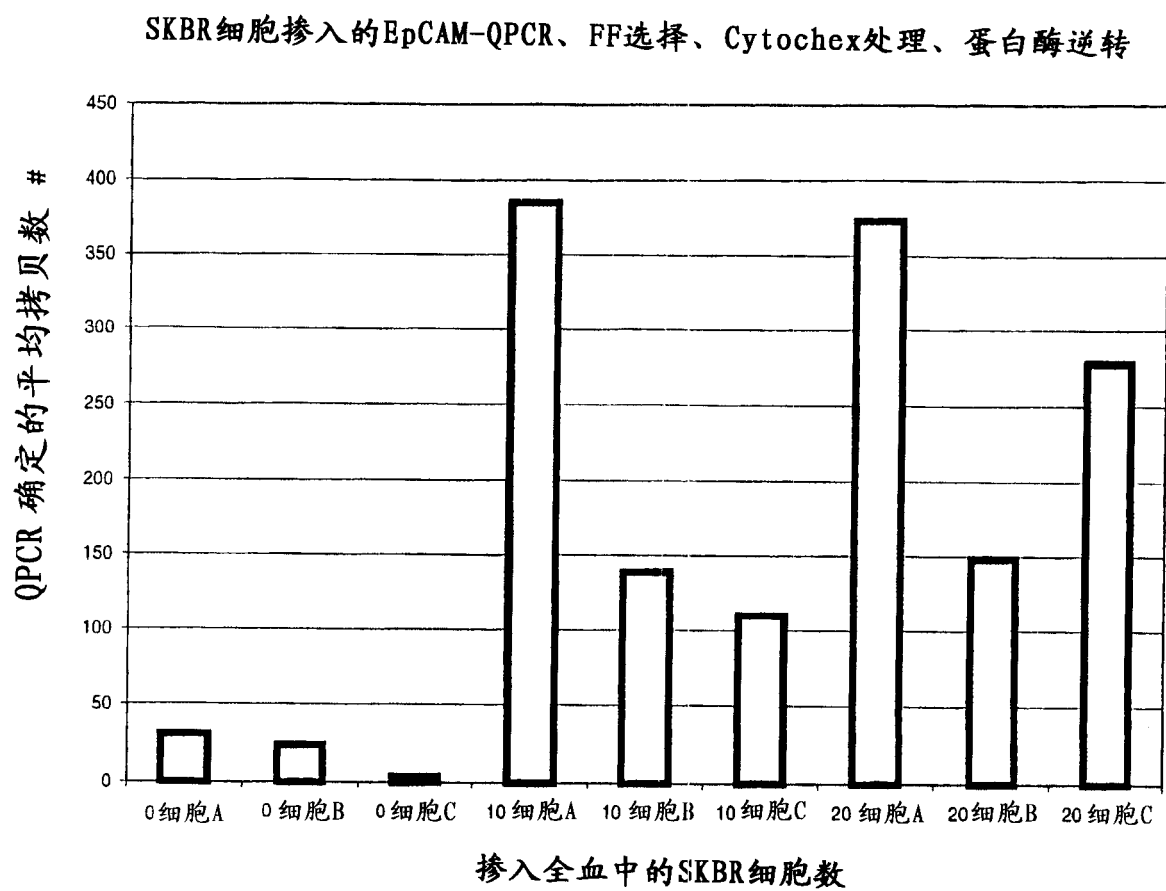


图 12 C

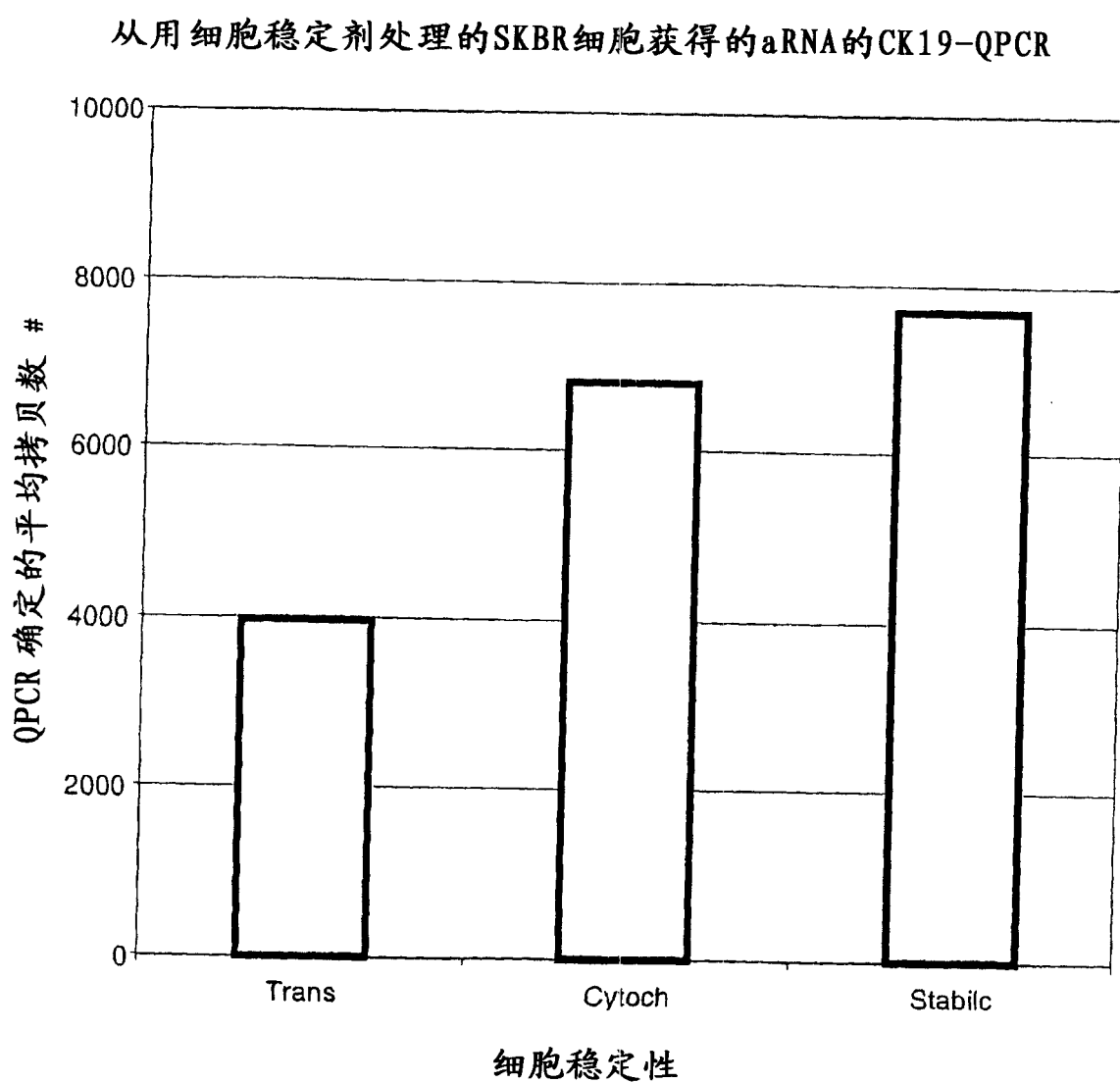


图 12 D

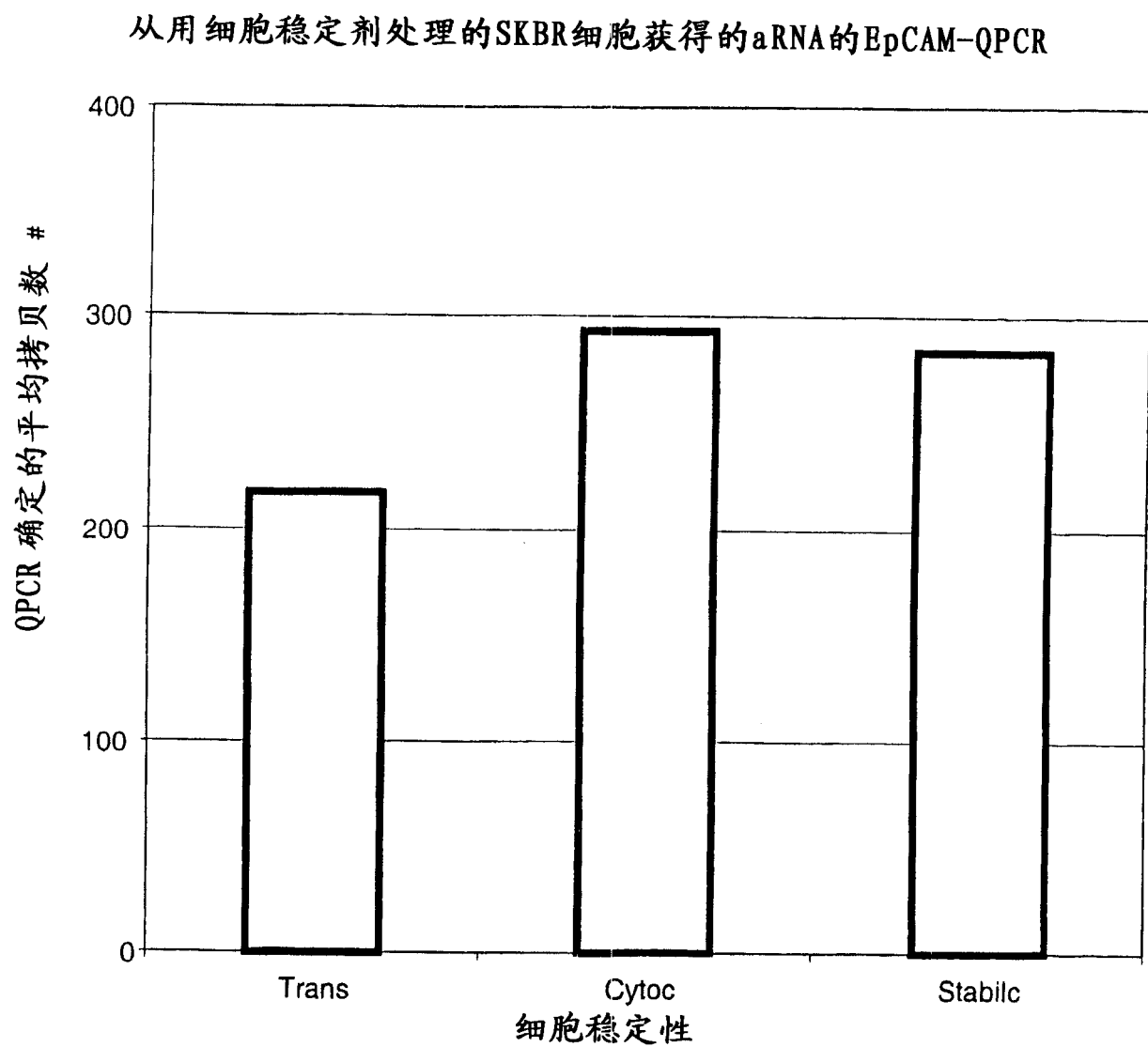


图 12 E

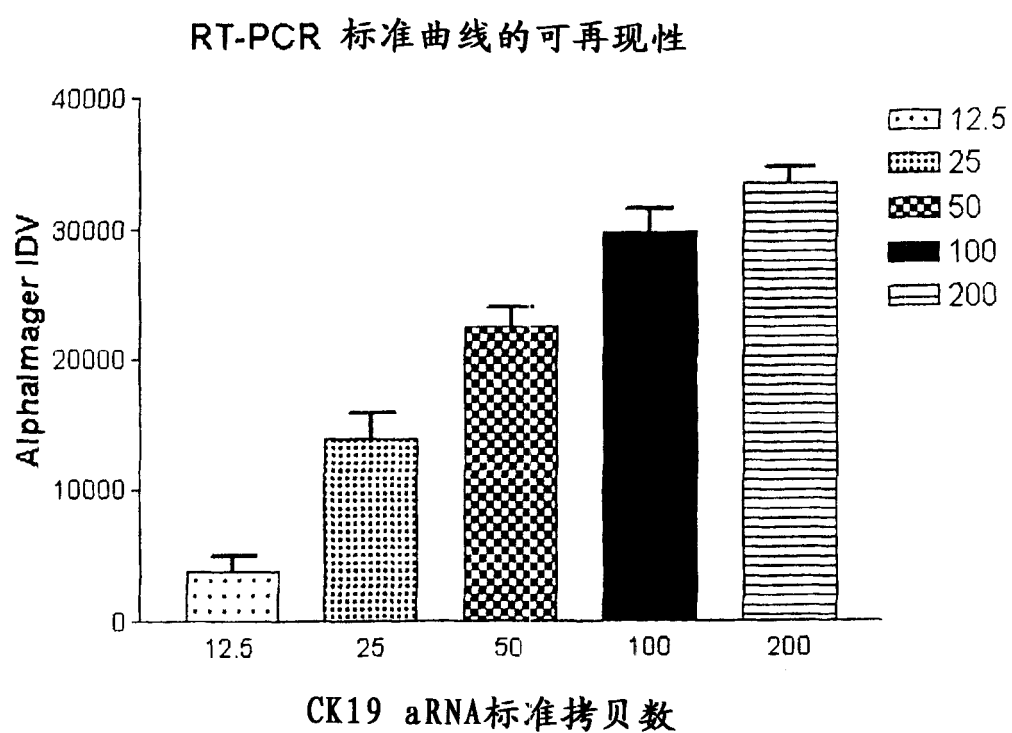
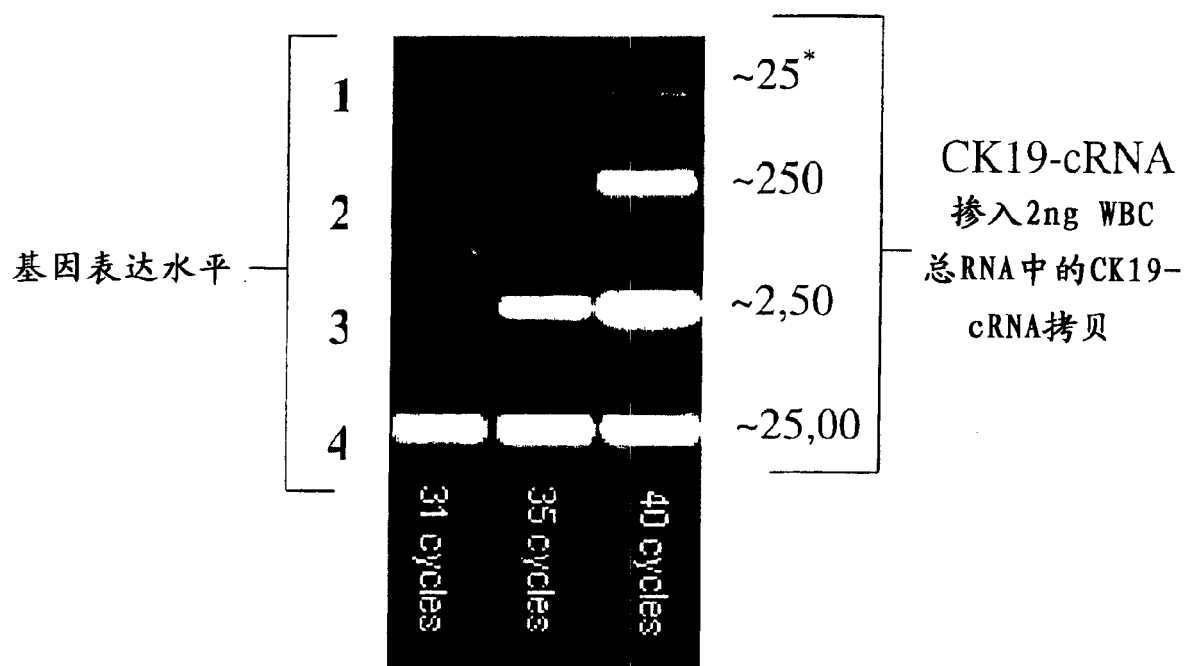


图 13A



* N=10 次平行测定显示出CV

图 13B

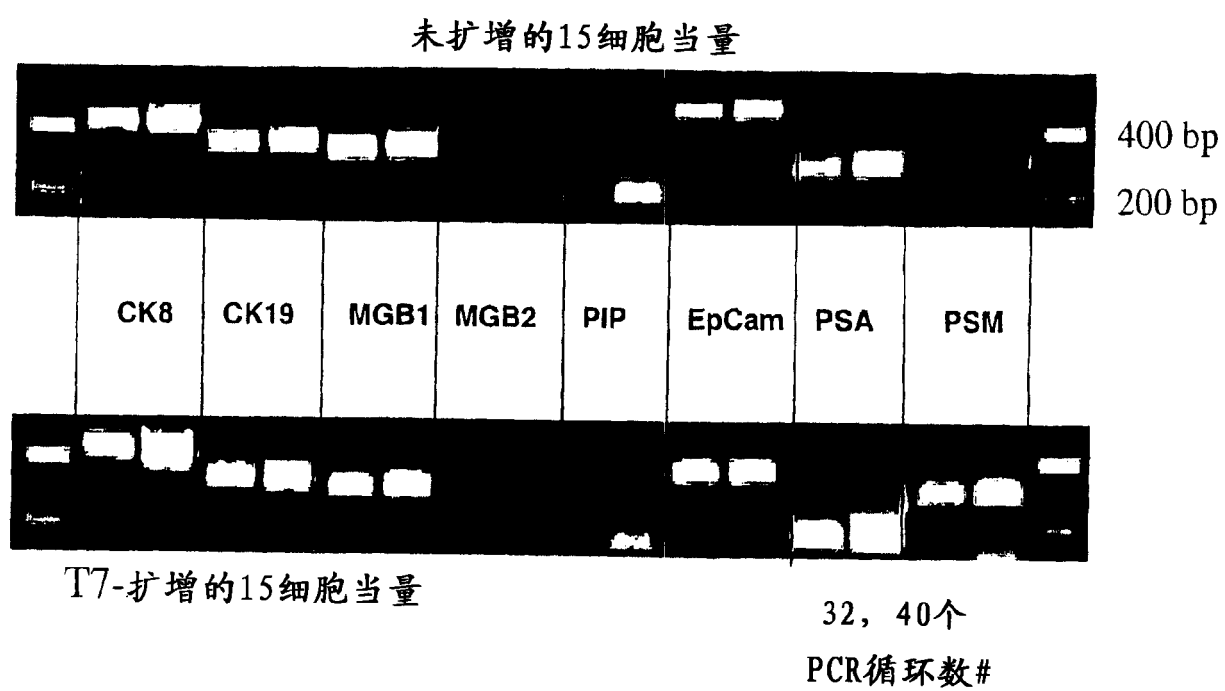


图 13 C

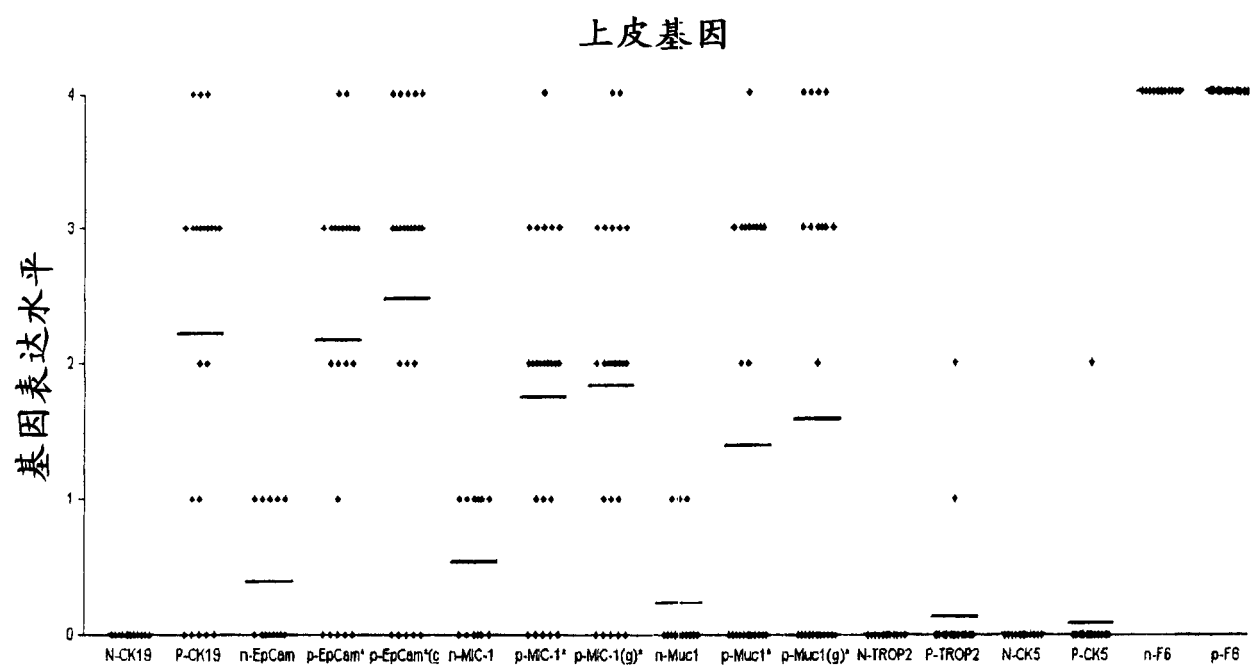


图 14 A

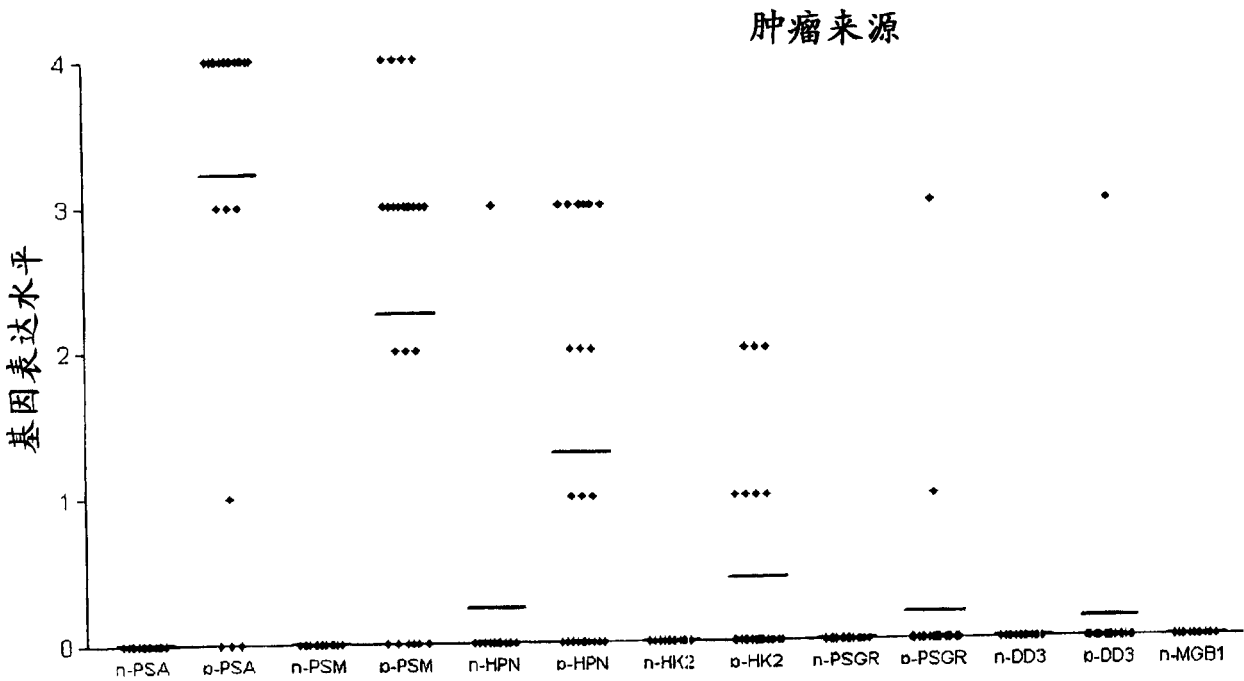


图 14 B

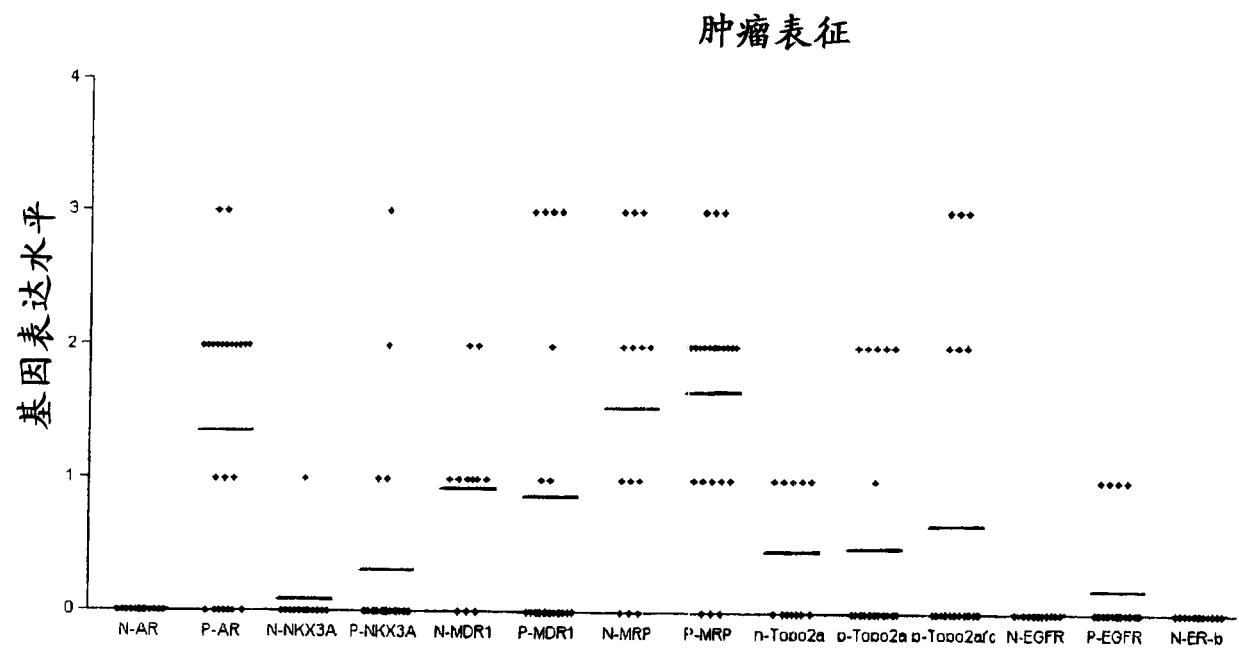


图 14C

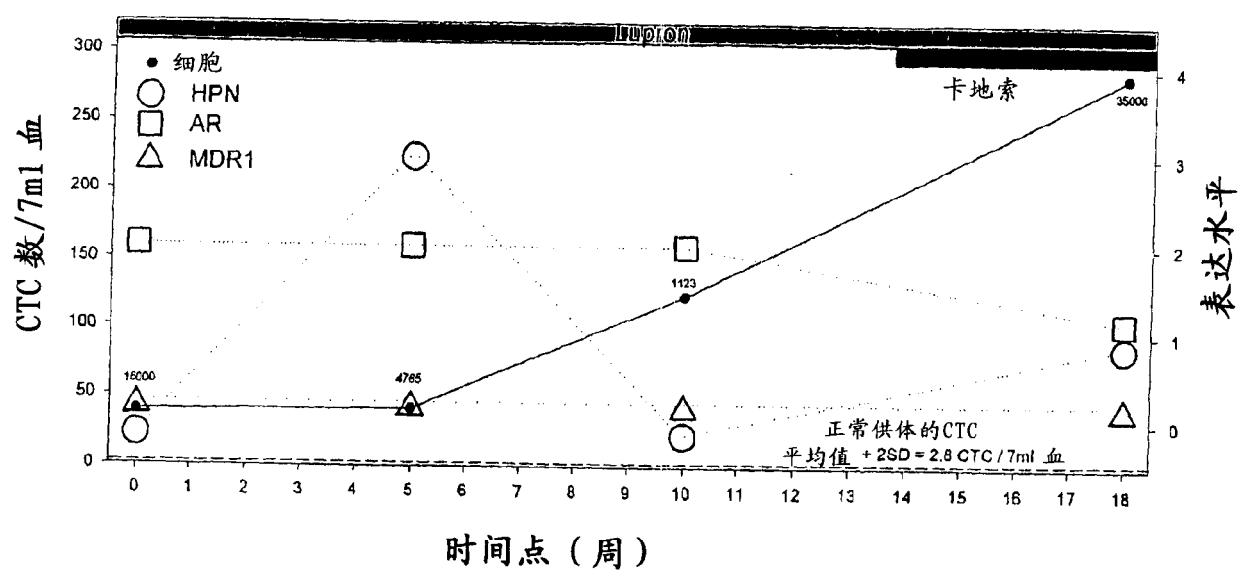


图 15A

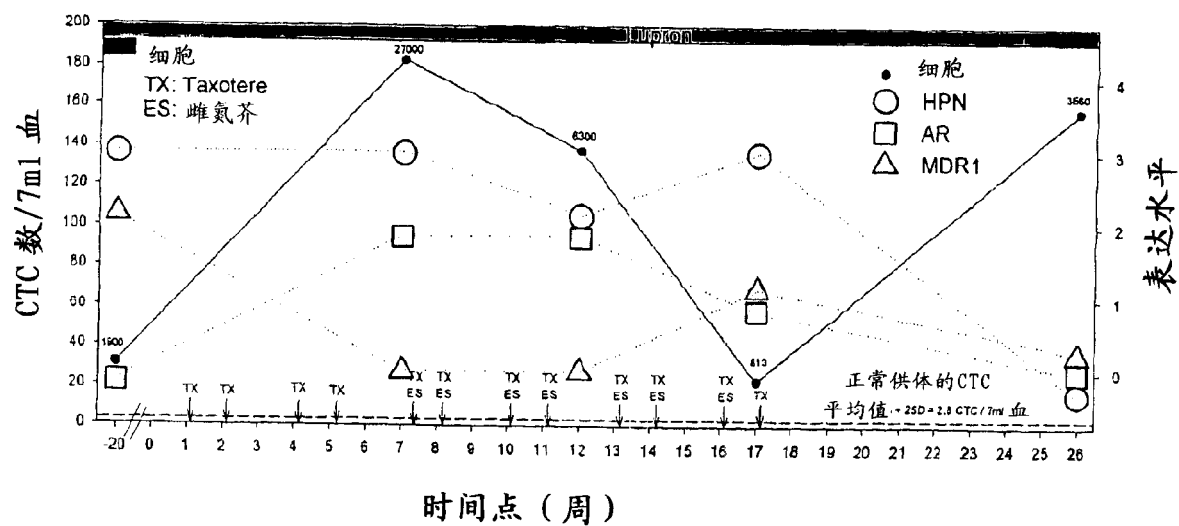


图 15B

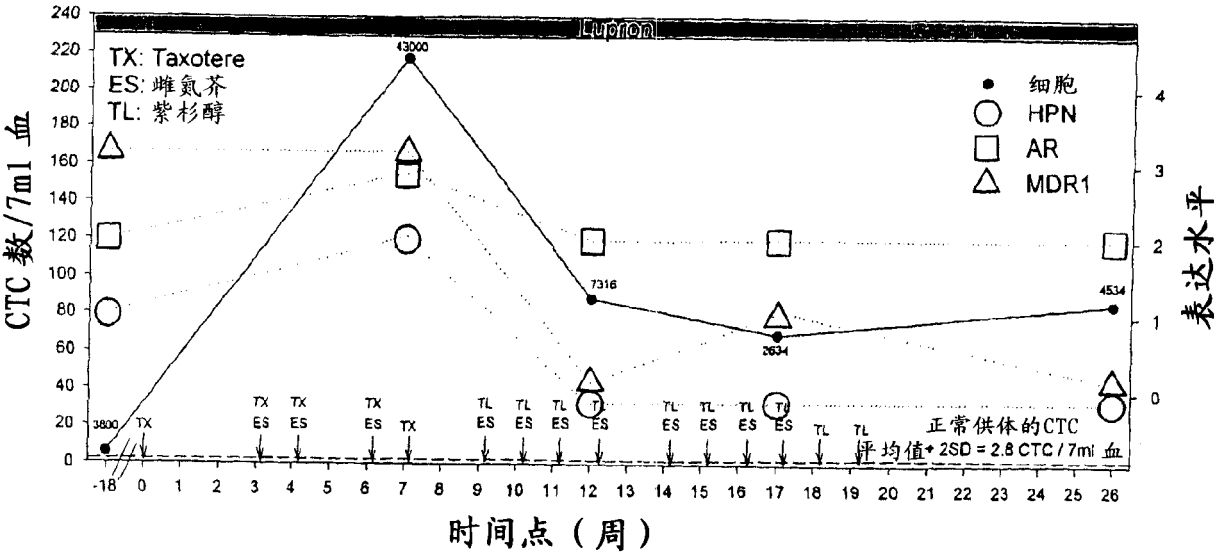


图 15C

专利名称(译)	多参数全面分析核酸以及同样样品上的形态学特征		
公开(公告)号	CN1610752A	公开(公告)日	2005-04-27
申请号	CN02826131.3	申请日	2002-10-28
[标]发明人	SM奥哈拉 D兹维茨 B福尔克		
发明人	S·M·奥哈拉 D·兹维茨 B·福尔克		
IPC分类号	C12N15/09 C12Q1/68 G01N33/53 G01N33/543 G01N33/553 G01N33/574 G01N37/00 C12Q1/00 C07H21/04 C07K16/00		
CPC分类号	G01N33/57488 G01N2550/00 C12Q2600/158 C12Q1/6806 G01N33/54326 A01N1/00		
优先权	60/330669 2001-10-26 US 60/369945 2002-04-04 US		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

公开了一种高敏感性的分析法，其利用了一种方法来从血液中发现的稀有细胞和稀有转录本进行基因特异性的mRNA库的引物扩增。该分析法通过免疫磁法富集的方式可以检测到1到10个细胞分离的稀有的mRNA (10个拷贝/细胞)。该分析法是多重PCR的改进，可以有效检测血液中的循环癌细胞的稀有编码序列。该方法适用于分离自组织或体液的细胞的分析，以及作为临床检测各种癌的辅助手段，包括循环癌细胞的早期检测和分类。以传统的或者微阵列方式进行的细胞核酸和蛋白质图谱的监视，有助于治疗介入的管理，包括病情分期、治疗响应的监测、症状缓解的确认以及恢复的检测。

