



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 01810299.9

[43] 公开日 2003 年 8 月 6 日

[11] 公开号 CN 1434875A

[22] 申请日 2001.4.12 [21] 申请号 01810299.9

[30] 优先权

[32] 2000. 4. 13 [33] AU [31] PQ6876

[86] 国际申请 PCT/AU01/00429 2001. 4. 12

[87] 国际公布 WO01/79534 英 2001. 10. 25

[85] 进入国家阶段日期 2002. 11. 28

[71] 申请人 莫诺昆特股份有限公司

地址 澳大利亚南澳大利亚

[72] 发明人 A·A·莫利 P·J·赛克斯

M·J·布里斯科

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利
商标事务所

代理人 程 泳

权利要求书 3 页 说明书 27 页 附图 3 页

[54] 发明名称 检测肿瘤转化性或非肿瘤转化性细胞的方法

[57] 摘要

本发明涉及在哺乳动物中定性和/或定量地监视淋巴瘤转化性进程的方法，具体地说，是用分子筛选技术监视淋巴瘤转化性进程的方法。本发明的方法适合于在一定的领域中应用，其包括但不限于监视肿瘤转化性淋巴疾病病情的发展，监视恢复过程中肿瘤转化性淋巴细胞的水平，预测受试者由恢复状态复发到疾病状态的可能性，或估计现有的治疗药物和/或新的治疗试剂的有效性。与此相关，本发明还提供在哺乳动物中定性和/或定量检测克隆淋巴细胞群的方法，更具体地说，是在具有下述情况的受试者中检测多克隆淋巴细胞群，即受试者中肿瘤转化性淋巴细胞已进行体细胞基因重排由此形成新的遗传上不同的克隆群，或所述受试者中一个或多个克隆群对一种免疫应答起作用。

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

1. 一种在哺乳动物中监视淋巴瘤性转化疾病的方法，所述的方法包括将来自所述哺乳动物样品中所包含的核酸分子和与标识核酸分子或其类似物互补的参照核酸分子、或其衍生物或类似物在足以使所述参照分子与所述标识分子相互作用的条件下接触一段时间，所述的标识分子具有肿瘤性转化细胞的特性，通过减少未杂交核酸分子和杂交错配核酸分子的浓度富集所述的标识分子，定性和/或定量地检测所富集的标识核酸分子。

2. 如权利要求 1 所述的方法，其中，所述的参照核酸分子是驱动核酸分子。

3. 如权利要求 1 或 2 所述的方法，其中，通过减少未杂交核酸分子和杂交错配核酸分子的浓度富集所述的标识分子的步骤进一步包括降低参照核酸分子浓度的步骤。

4. 如权利要求 3 所述的方法，其中，富集步骤是通过下述步骤进行的：去除未与经标记的驱动核酸分子杂交的非标识核酸分子，酶法切除任何错配杂交核酸分子，和去除驱动分子。

5. 如权利要求 3 所述的方法，其中，富集步骤是通过下述步骤进行的：基于下述双链通过凝胶或大小排阻或亲和或其它基质时的不同迁移率，从杂交和错配的异源双链中分离参照标识同源双链。

6. 如权利要求 5 所述的方法，其中，所述的基质包含在柱或毛细管中。

7. 如权利要求 4 所述的方法，其中，所述的驱动分子是通过使用 UNG 去除的。

8. 如权利要求 1-7 中任意一项中所述的方法，其中，所述的标识是经重排的 TCR 或免疫球蛋白可变区核酸分子或其衍生物或类似物。

9. 如权利要求 8 所述的方法，其中，所述的可变区核酸分子是经重排的可变区基因节段的基因组形式。

10. 如权利要求 9 所述的方法，其中，所述的淋巴瘤性转化疾病是淋巴恶性疾病。

11. 如权利要求 10 所述的方法，其中，所述的监视是对最低限残留疾病状况的监视。

12. 一种检测和/或定量生物样品中的克隆细胞群的方法，所述的细胞以标识核酸分子为特征，所述的标识核酸分子在所述的细胞群中是电泳共迁移的，该方法包括将包含在所述样品中的核酸分子电泳分离、以及检测经分离的核酸分子，其中所述的分离基于核酸的长度和序列。

13. 如权利要求 12 所述的方法，其中，所述的克隆细胞群是肿瘤转化性细胞群。

14. 如权利要求 13 所述的方法，其中，所述的肿瘤转化性细胞是恶性的。

15. 如权利要求 13 或 14 所述的方法，其中，所述的肿瘤转化性细胞是肿瘤转化性淋巴细胞。

16. 如权利要求 15 所述的方法，其中，所述的标识是经重排的 TCR 或免疫球蛋白可变区核酸分子或其衍生物或类似物。

17. 如权利要求 16 所述的方法，其中，所述的可变区核酸分子是经重排的可变区基因节段的基因组形式。

18. 如权利要求 12-17 中的任意一项中所述的方法，其中，所述的分离是二维变性梯度凝胶电泳。

19. 如权利要求 12-18 中的任意一项中所述的方法，其中，所述的肿瘤转化性疾病是肿瘤转化性细胞的克隆演化。

20. 一种检测和/或定量生物样品中的多重非肿瘤转化性淋巴细胞的方法，所述的非肿瘤转化性细胞以标识核酸分子为特征，所述的标识核酸分子在所述的细胞群中是电泳共迁移的，该方法包括将包含在所述样品中的核酸分子电泳分离以及检测经分离的核酸分子，其中，所述的分离基于核酸的长度和序列。

21. 如权利要求 20 中所述的方法，其中，所述的分离是二维变

性梯度凝胶电泳。

22. 如权利要求 1-21 中的任意一项中所述的方法，其基本上如上所述并参考附图和/或实施例。

检测肿瘤转化性或非肿瘤转化性细胞的方法

发明领域

本发明涉及在哺乳动物中定性和/或定量地监视淋巴样瘤形成进程的方法，具体地说，是用分子筛选技术监视淋巴样瘤形成进程的方法。本发明的方法适合于在一定的领域中应用，其包括但不限于监视肿瘤转化性淋巴疾病病情的发展，监视恢复过程中肿瘤转化性淋巴细胞的水平，预测受试者由恢复状态复发到疾病状态的可能性，或估计现有的治疗药物和/或新的治疗试剂的有效性。与此相关，本发明还提供在哺乳动物中定性和/或定量检测克隆淋巴细胞群的方法，更具体地说，是在具有下述情况的受试者中检测多克隆淋巴细胞群，即受试者中肿瘤转化性淋巴细胞已进行体细胞基因重排，由此形成新的遗传上不同的克隆群，或所述受试者中一个或多个克隆淋巴细胞群对一种免疫应答起作用。

背景技术

本说明书中对任何现有技术的参考不是，也不应当视为一种认可或任何形式的暗示所述的现有技术构成在澳大利亚的公知常识的一部分。

淋巴细胞是在免疫应答中起作用的细胞，其分为两种类型—产生抗体的B淋巴细胞和参与细胞免疫的T淋巴细胞。在发育过程中，为形成特定的免疫应答，每种淋巴细胞均通过独特的方式对一个或一些特定基因进行重排，对于B淋巴细胞来说涉及重排的是免疫球蛋白基因，对T淋巴细胞来说是T细胞受体基因。所有这些淋巴细胞的后代也进行同样的重排。

据认为，肿瘤是由单一细胞中遗传改变总和的结果所引起的。上述细胞接下来的增殖引起子代种群的形成。因此，由B或T淋巴细胞

中的恶性变化形成的瘤（常称为“癌”）主要包含这样的细胞克隆，其中每一细胞均存在与生成细胞中相同的基因重排。所述的肿瘤克隆中也可能出现次级基因重排，形成遗传上不同的亚克隆。

因此淋巴瘤是克隆性病征。它们在单一的细胞中出现一个或多个突变后产生，使所述细胞及其子代不断地以指数形式增殖。例如当淋巴细胞性白血病克隆数在体内达 10^{11} 到 10^{12} 时则继发临床症状。若不进行治疗，所述克隆继续扩增，达 10^{13} 白血病细胞时即导致死亡。但是，如果病人接受了细胞毒性治疗，所述克隆大小上会减少，当其所包含的细胞少于约 10^{10} 时就不能再用常规的技术进行鉴定了。此时，病人被判定为临床和血液学上的缓解，尽管术语“缓解”事实上仅指向白血病细胞数连续体一端的某一任意点。由于在恢复期所保留的白血病细胞数是未知的，可以在 0 到 10^{10} 之间的范围，恢复期后的治疗是经验性的，治疗强度基于诊断或早期治疗所确定的不同临床或实验预测因素。结果一些病人可能接受的治疗不足，而另一些病人则可能接受了过多的治疗。

目前的恶性淋巴细胞定量的方法包括使用克隆中所有细胞所共有的“标识”。所述的标识可以是表面抗原或几种表面抗原的模式，或者是分子转变。上述应用的分子转变可大致分为两种类型—包括染色体易位或倒位的一类，和利用免疫球蛋白或 T 细胞受体基因重排的一类。

目前的方法在复杂性、操作简便性、敏感性和适应性方面各不相同。一般，复杂性和敏感性之间有着直接的关系，最敏感的方法通常非常复杂而且耗时。鉴于它们的复杂性，目前用基因重排作为分子标识以测定肿瘤转化性淋巴细胞数量的方法还仅适于作为研究工具，而不适合于进行广泛地临床应用。

关于最低限度的残留疾病进行检测和定量，关键的问题是来源于异源的、正常多克隆淋巴细胞的异源标识背景下，对肿瘤转化性淋巴细胞克隆特定标识所进行的检测和定量。大多数提高检测水平的方法都是基于对直接、正面检测所述肿瘤转化性淋巴细胞标识本身的方法

的改进。例如已经采用了基于 PCR 的方法，其中用标记的序列特异性探针探测，或是用肿瘤转化性淋巴细胞序列特异性的 PCR 引物启动扩增。一种不同的方法依赖对所述肿瘤转化性淋巴细胞表型的直接检测。

目前所用到的大多数基于探测或扩增所需 DNA 的分子技术的一个重要的缺点在于，需要预先了解核苷酸序列的信息以设计并合成特定的探针或引物。这一需要使得上述技术既复杂又昂贵。

因此，需要发展一种改进的定性和/或定量检测受试者中的肿瘤转化性淋巴细胞水平的方法，这种方法需既灵敏又简单易行。在得出本发明的工作中，本发明人提供了一种在哺乳动物中检测淋巴样瘤形成进程的简单且灵敏的方法。该方法的简便性和易行性是缘于本发明人已研究出一种基于在分子水平上对生物样品是否存在肿瘤转化性淋巴细胞特异性标识进行筛选，而无需首先获得与受试标识相关的核苷酸序列信息的检测方法，具体说来所述的分子标识是指经重排的编码 T 细胞受体和免疫球蛋白区域的核酸分子。而且，本方法是高度灵敏的。

本发明人已确定：通过减少非标识的背景 DNA，而非试图从异源 DNA 群中特异性地探测或特异性地扩增所需的 DNA 片段，可以形成一种高度灵敏且简便地筛选肿瘤转化性细胞的方法。具体地说，本发明人已经确定将在诊断中获得的肿瘤转化性淋巴细胞 DNA 样品与病人的检测 DNA 杂交，将未杂交的检测 DNA 或错配杂交有效地去除，由此可以有效地富集肿瘤转化性 DNA 标识群。然后相对于降低的非标识背景 DNA 水平进行肿瘤转化性信号的检测。检测包括一般性检测系统，如 PCR，荧光检测，免疫检测或酶学检测。非肿瘤转化性背景分子的去除提高了与检测系统无关的检测灵敏度。

这一方法避免了通常情况下为利用分子筛选技术而对核苷酸序列信息的需要，由此大大简化了操作技术，同时保持并在一定程度上提高应用这些技术目前所能获得的灵敏度上限水平。

在与此相关的方面，基于肿瘤转化性淋巴细胞中 T 细胞受体 (TCR) 或免疫球蛋白可变基因的特定分子重排，本发明人还修改了二维凝胶

电泳技术，提供了一种有效且灵敏的诊断淋巴瘤的方法，具体地说是对在初次诊断后变得明显的体肿瘤转化性淋巴细胞重排（即，克隆演化）的诊断。

发明概述

本说明书及随后的权利要求中，除非是上下文需要，用语“包含”或该用语的变形“包括”或“含”应理解为指包含所阐述的整体或步骤，或者整体或步骤所构成的组，但不排除其他整体或步骤或者整体或步骤所构成的组。

本发明的一个方面提供一种在哺乳动物中监视淋巴瘤性转化的方法，所述的方法包括：将来自所述哺乳动物的样品中所包含的核酸分子和与标识核酸分子或其类似物互补的参照核酸分子或其衍生物或类似物相在足以使所述参照分子与所述标识分子相互作用的条件下接触一段时间，所述的标识分子具有肿瘤转化性细胞的特性，通过减少未杂交的核酸分子和杂交错配核酸分子的浓度富集所述的标识分子，再定性和/或定量地检测所富集的标识核酸分子。

本发明的另一方面提供一种在哺乳动物中监测肿瘤转化性淋巴瘤的方法，所述的方法包括：将来自所述哺乳动物的样品中所包含的核酸分子和与经重排的 TCR 或免疫球蛋白可变区核酸分子的一部分或其衍生物或类似物互补的参照核酸分子或其衍生物或类似物在足以使所述参照分子与所述可变区域核酸分子相互作用的条件下相接触一段时间，通过减少未杂交的核酸分子和杂交错配核酸分子的浓度富集所述的可变区域核酸分子，再定性和/或定量地检测所富集的可变区域核酸分子。

本发明的再一方面涉及监视哺乳动物中淋巴恶性肿瘤的方法，所述的方法包括：将来自所述哺乳动物的样品中所包含的核酸分子和与经重排的 TCR 或免疫球蛋白可变区核酸分子或其衍生物或类似物互补的参照核酸分子或其衍生物或类似物在足以使所述参照分子与所述可变区域核酸分子相互作用的条件下相接触一段时间，通过减少未杂交

的核酸分子和杂交错配核酸分子的浓度富集所述的可变区域核酸分子，再定性和/或定量地检测所富集的可变区域核酸分子。

本发明的又一方面涉及监视人淋巴恶性肿瘤的方法，所述的方法包括将来自所述人样品中所包含的核酸分子和与经重排的 TCR 或免疫球蛋白可变区核酸分子或其衍生物或类似物互补的参照核酸分子或其衍生物或类似物在足以使所述参照分子与所述可变区域核酸分子相互作用的条件下相接触一段时间，通过减少未杂交的核酸分子和杂交错配核酸分子的浓度富集所述的可变区域核酸分子，再定性和/或定量地检测所富集的可变区域核酸分子。

本发明的另一方面提供一种在哺乳动物中检测肿瘤转化性淋巴疾病的方法，所述的方法包括将来自所述哺乳动物的测试样品中所包含的核酸分子和与经重排的 TCR 或免疫球蛋白可变区核酸分子或其衍生物或类似物互补的核酸驱动分子 (nucleic driver molecule) 或其衍生物或类似物在足以使所述驱动分子 (driver molecule) 与所述可变区域核酸分子相互作用的条件下相接触一段时间，通过减少未杂交的核酸分子和杂交错配核酸分子的浓度富集所述的可变区域核酸分子，再定性和/或定量地检测所富集的可变区域核酸分子。

本发明的又一方面涉及检测和/或定量生物样品中克隆细胞群的方法，所述的细胞以标识核酸分子为特征，所述的标识分子在所述细胞群内电泳共迁移，所述的方法包括：将包含于所述样品中的核酸分子通过电泳分离，其中所述的分离基于核酸的长度和序列，再检测所述的经分离的核酸分子。

本发明的又一方面更具体地提供了一种检测和/或定量生物样品中的肿瘤转化性淋巴细胞群的方法，所述的样品以标识核酸分子为特征，所述的标识分子在所述细胞群内电泳共迁移，所述的方法包括：将包含于所述样品中的核酸分子通过电泳分离，其中所述的分离是基于核酸的长度和序列，再检测所述的经分离的核酸分子。

本发明的又一方面提供一种检测和/或定量生物样品中的肿瘤转化性淋巴细胞群的方法，所述的肿瘤转化性细胞以标识核酸分子为特

征, 所述的标识分子在所述细胞群内电泳共迁移, 所述的方法包括: 将包含于所述样品中的核酸分子通过电泳分离, 其中所述的分离是二维变性梯度凝胶电泳、并且是基于核酸的长度和序列进行的, 再检测所述的经分离的核酸分子。

本发明的又一方面更具体地提供了一种检测和/或定量哺乳动物中的肿瘤转化性细胞的方法, 所述的肿瘤转化性细胞以标识核酸分子为特征, 所述的标识分子在所述细胞群内电泳共迁移, 所述的方法包括: 将包含于所述来自所述哺乳动物的样品中的核酸分子通过电泳分离, 其中所述的分离是基于核酸的长度和序列, 再检测所述的经分离的核酸分子。

本发明的又一方面更具体地提供了一种检测和/或定量生物样品中多重非肿瘤转化性淋巴细胞的方法, 所述的非肿瘤转化性细胞以标识核酸分子为特征, 所述的标识分子在所述细胞群内电泳共迁移, 所述的方法包括: 将包含于所述样品中的核酸分子通过电泳分离, 其中所述的分离是基于核酸的长度和序列, 再检测所述的经分离的核酸分子。

优选地, 所述的分离是二维变性梯度凝胶电泳。

附图说明

图 1 是两次实验的图示说明, 其中, 将不同量的未知的标识白血病 DNA 添加到正常的 DNA 中, 未知的量由实施例 2 中所述的方法进行测定。

图 2 是通过遗传标识的鉴定, 对以不同的比例与来自外周血单核细胞的 DNA 相混合的细胞系 DNA 的检测图。免疫球蛋白重链基因的 CDR3 区作为克隆特异性标识。将来自 B 细胞系的 DNA 以不同的比例与由外周血细胞抽提的 DNA 相混合, 使细胞系细胞与血细胞的比例由 1: 3 到 1: 3000。用 GC 夹持型引物 (clamped-primer) 通过 PCR 扩增 CDR3 区域。所得产物通过 6% 的聚丙烯酰胺凝胶电泳。箭头指示来自细胞系的两个标识产物, 分别是 130 和 120bp, 它们的大小是细胞系特异性

的。这可以在 1 比 3, 1 比 10, 和 1 比 30 混合方式中观察到, 再高的稀释度下就观察不到了。

M : 标识, 其左侧是其大小 (bp) ;

C : 单独的细胞系 DNA

P : 单独的外周血细胞 DNA;

-ve : 阴性对照 (无 DNA)

其它泳道 : 每血细胞细胞系的细胞。

图 3 是图 2 中的产物经二维变性梯度凝胶电泳分析的结果图。上述产物首先经标准的聚丙烯酰胺凝胶电泳分析。切下含有产物的胶条, 置于变性梯度凝胶的顶部, 所述的变性凝胶含按标准配方的尿素和甲酰胺浓度梯度, 从顶部的 0% 饱和度到底部的 80%。电泳过夜。

→ 第一次二维分离的方向: 通过大小, 在标准的 6%聚丙烯酰胺凝胶上;

↓ 第二次二维分离的方向: 通过融解特性, 在聚丙烯酰胺凝胶变性浓度梯度中。

A : 单独的细胞系, 给出一个主要产物 (圈出)

B : 经稀释的细胞系, 以高分辨率在凝胶的相应区域给出与细胞系产物相似的产物 (圈出的), 其大小和融解特性均相似。

经 1/3 到 1/300 稀释的细胞系 DNA 也给出这一产物, 但无论是单独的血液 DNA 还是阴性对照 (无 DNA) 均没有给出这一产物。

结果, 与一维分离相比, 二维分离产生了近 30 倍的提高。

发明详述

本发明部分地预言了通过参照核酸分子以鉴定肿瘤转化性标识核酸分子的用途, 和提供一种减少存在于测试样品中的非标识背景核酸分子的方法。这促使行成了一种简便且高灵敏度监视肿瘤转化性淋巴疾病的方法。与此相关, 本发明开发了一种鉴定和/或监视克隆细胞群, 如肿瘤转化性细胞的技术, 所述技术基于核酸分子长度和序列的二维电泳分离的标识核酸分子共迁移模式。

由此，本发明一方面提供一种在哺乳动物中监视肿瘤转化性淋巴疾病的方法，所述的方法包括将来自所述哺乳动物的样品中所包含的核酸分子和与标识核酸分子或其类似物互补的参照核酸分子或其衍生物或类似物在足以使所述参照分子与所述标识分子相互作用的条件下相接触一段时间，所述的标识分子具有肿瘤转化性细胞的特性，通过减少未杂交的核酸分子和杂交错配核酸分子的浓度富集所述的标识分子，再定性和/或定量地检测所富集的标识核酸分子。

关于具有受试肿瘤转化性淋巴细胞“特征性”的“标识核酸分子”应理解为是一种分子参照，所述的分子可在肿瘤转化性淋巴细胞中发现，但不能在非肿瘤转化性细胞存在或明显存在。所谓“明显的”是指对受试标记的检测，对存在于受试哺乳动物中的肿瘤转化性淋巴细胞水平的提供了一种有用指示。所述的标识可以是编码蛋白分子的核酸分子或其中的区域，所述的蛋白质分子可以是胞内的，分泌的或跨膜的分子。另外，其可包含具有受试肿瘤转化性细胞特性的非编码序列。所述的标识分子可以是 DNA 或 RNA，如 mRNA。

当所述的标识分子是编码蛋白质分子的 DNA 分子时，其表达可以是组成型的，或需要通过肿瘤转化性细胞接收刺激信号以诱导其转录和翻译。由于本发明的方法针对筛选标识分子本身，当基因组 DNA 作为检测目标时，所述的标识是否表达并不重要。但是当受试方法涉及对 mRNA 的检测且由所述标识编码的蛋白不是组成型表达，则需要在筛选前对受试肿瘤转化性细胞进行适当的刺激。这种刺激可以在从哺乳动物中获得含受试肿瘤转化性细胞的生物样品后在体外进行，或者在从哺乳动物获取生物样品前即对该哺乳动物进行刺激。而且，所述的标识核酸分子可以是转化前正常存在于受试肿瘤转化性细胞中的。另外所述的标识核酸分子也可以是在转化时被引入到受试肿瘤转化性细胞中的。例如，当用病毒感染非肿瘤转化性细胞诱导转化时，所述的标识可以是病毒衍生的或病毒特异性的分子。

优选地，所述的标识是重排的基因组可变区核酸分子或 T 细胞受体（此处指“TCR”）链或免疫球蛋白链的衍生物。在不对本发明进行

任何形式的限制的情况下，每一淋巴细胞经历其种系可变区基因节段（V和J或者V，D和J节段）的体细胞重组，所述的重组依赖特定的基因重排，以产生约 10^{16} 不同可变区结构的总抗原多样性。在任意给定的淋巴细胞中，如T细胞或B细胞，由于两个或更多个含TCR或免疫球蛋白分子的双链的重排，至少可以出现两个不同的可变区基因节段重排。特别是TCR的 α ， β ， γ 或 δ 链和/或免疫球蛋白分子的重链和轻链。除对任意给定的免疫球蛋白或TCR基因的VJ或VDJ节段的重排外，核苷酸也随机地去除和/或插入到节段的连接处。由此也形成了大量的多样性。

因此，更具体地说，本发明提供了一种监视哺乳动物中肿瘤转化性淋巴疾病的方法，所述的方法包括将来自所述哺乳动物的样品中所包含的核酸分子和与经重排的TCR或免疫球蛋白可变区核酸分子、或其衍生物或类似物互补的参照核酸分子、或其衍生物或类似物在足以使所述参照分子与所述可变区域核酸分子相互作用的条件下接触一段时间，通过减少未杂交的核酸分子和杂交错配核酸分子的浓度富集所述的可变区域核酸分子，再定性和/或定量地检测所富集的可变区域核酸分子。

优选地，所述的可变区核酸分子是重排的可变区基因节段的基因组形式。

应当理解所述的“淋巴细胞”是指至少免疫球蛋白或TCR可变区基因节段的一个种系组发生重排的任何细胞。可能发生重排的编码基因组DNA的所述免疫球蛋白可变区包括与重链或 κ 或 λ 轻链相关的可变区，可能发生重排的所述TCR链可变区编码基因组DNA的包括 α ， β ， γ 和 δ 链。在这方面，若所述的细胞中至少一个免疫球蛋白或TCR基因节段区域的编码DNA的可变区域发生重排，则该细胞应当理解为包含在“淋巴细胞”定义的范围。但上述细胞无需转录和翻译经重排的DNA。在这一方面“淋巴细胞”的范围，包含但不限于，其中TCR或免疫球蛋白可变区基因节段经过重排但经过重排的链不表达的未成熟T和B淋巴细胞（如TCR⁻胸腺细胞），或者TCR或免疫球蛋白可变

区基因节段的链均未经重排的未成熟 T 和 B 细胞。这一定义进一步扩展到淋巴样细胞，所述的细胞中至少经历某些 TCR 或免疫球蛋白可变区的重排，但该细胞并不表现通常与成熟 T 细胞或 B 细胞相关的全部表型或功能特性。因此，本发明的方法可以用于监视细胞瘤形成，所述的细胞包括但不限于任何发育分化阶段的淋巴细胞、激活的淋巴细胞、非淋巴/淋巴样细胞，条件是：上述细胞中至少一部分可变区基因发生重排。

可以理解尽管优选至少一个可变区基因区域已完成重排，本发明的方法适合于监视表现仅部分重排的肿瘤转化性。例如，仅经历 DJ 重组的 B 细胞就是仅经历部分重排的细胞。DJ 重组节段进一步与 V 节段重新组合后才能实现完全重排。本发明的方法可因此设计为检测部分或全部的 TCR 或免疫球蛋白链可变区重排，所述的方法利用与上述标识序列互补的参照分子；或者，例如当需要特异性更高或肿瘤转化性细胞中的 TCR 或免疫球蛋白链的可变区均发生重排时，可以使用同时针对两种形式的重排之参照分子。

关于“肿瘤转化性细胞”应理解为指表现出非正常“生长”的细胞。术语“生长”应以其最广义含义理解，其包括增殖。在这一方面，细胞增殖失控可作为一个非正常生长的例子。淋巴细胞增殖失控将导致以实体肿瘤或单细胞悬液（如在白血病病人血液中所观察到的）形式存在的细胞群。肿瘤转化性细胞可能是良性细胞或恶性细胞。在一个优选的实施方案中，所述的肿瘤转化性细胞是恶性细胞。在此方面，“肿瘤转化性疾病”是指在受试哺乳动物中存在肿瘤转化性细胞。尽管“肿瘤转化性淋巴疾病”包括涉及以存在大量非正常肿瘤转化性细胞为特征的疾病状态，例如在白血病，淋巴瘤和骨髓瘤中出现的情况，此外，这一用语还应理解为包括哺乳动物中的肿瘤转化性细胞数在通常作为区分哺乳动物由明显的疾病状态到缓解状态（或反之亦然）进行转换的阈值以下的情况。（在缓解过程中存在的细胞数通常是指所谓“最低限度残余疾病”）。进一步，甚至当存在于哺乳动物中的肿瘤转化性细胞数低于可由在本发明的方法出现之前的筛选方法检测到的阈值

时，所述的哺乳动物也视为表现“肿瘤转化性疾病”。

在一个优选的实施方案中，本发明涉及哺乳动物中的淋巴恶性疾病的方法，所述的方法包括将来自所述哺乳动物的试验样品中所包含的核酸分子和与经重排的 TCR 或免疫球蛋白可变区核酸分子或其衍生物或类似物互补的参照核酸分子或其衍生物或类似物在足以使所述参照分子与所述可变区域核酸分子相互作用的条件下相接触一段时间，通过减少未杂交的核酸分子和杂交错配核酸分子的浓度富集所述的可变区域核酸分子，再定性和/或定量地检测所富集的可变区域核酸分子。

更优选地，所述的监视是对最低限度疾病状态的监视。

关于来自受试哺乳动物的“试验样品”应按其最广义理解，其包括来自哺乳动物的任何样品材料。这既包括天然存在于哺乳动物体内的样品，如组织和体液（例如活组织检查如淋巴样本，血液，淋巴液，粪便或支气管分泌物）和导入哺乳动物体内后再将其去除的样品，例如，在肺灌洗后从肺部（或经灌肠后由结肠）抽提出的盐溶液。依照本发明的方法检测的生物样品可以进行直接检测，也可能在检测前需要经过一定形式的处理。例如，活组织检查样品在检测前可能需要匀浆化。当所述的样品包含细胞物质时，可能需要抽提或使存在于细胞物质中的核酸暴露出来，以便使其与参照的核酸分子相互作用。如上所述，如果所述的检测是设计为检测 mRNA 标识序列，则所述的样品在进行检测前可能需要一定形式的刺激。

选择对于依照本发明的方法所进行的检测最适合的样品类型需依被检测的瘤形成疾病的性质而定。例如，如果所述的肿瘤转化性疾病是淋巴样白血病，血液样品，淋巴液样品或骨髓抽出物可能作为合适的检测样品。当肿瘤转化性疾病是淋巴瘤时，淋巴结活组织检查，或者血液或骨髓样品可作为用于检测的合适的组织来源。还需要考虑到是否检测肿瘤转化性细胞最初的来源，或是否将观察由起点开始的瘤转移或其他形式的瘤形成扩散。对此种情况，可取的做法是收获并检测一定数量来自任一哺乳动物的不同样品。对于任何给定的检测方

案选择合适的样品是本领域的普通技术人员所能够做到的。

此处所用的术语“哺乳动物”包括人，灵长类，家畜动物（如马、牛、羊、猪、驴），实验动物（如小鼠、大鼠、兔、豚鼠），宠物（如狗、猫）和被俘获的野生动物（如袋鼠、鹿、狐狸）。优选地，所述哺乳动物是人或实验动物。更优选地，所述的哺乳动物是人。

根据这一优选实施方案，本发明涉及监视人淋巴恶性肿瘤的方法，所述的方法包括将来自所述人的样品中所包含的核酸分子和与经重排的 TCR 或免疫球蛋白可变区核酸分子或其衍生物或类似物互补的参照核酸分子或其衍生物或类似物在足以使所述参照分子与所述可变区域核酸分子相互作用的条件下相接触一段时间，通过减少未杂交的核酸分子和杂交错配核酸分子的浓度富集所述的可变区域核酸分子，再定性和/或定量地检测所富集的可变区域核酸分子。

本发明的方法是基于应用如上述定义的可与标识核酸分子相互作用的参照核酸分子，监视实际的或推定的肿瘤转化性淋巴疾病。在此方面，所述的“监视”应理解为对有关受试者在肿瘤转化性疾病初期诊断后受试肿瘤转化性淋巴存在或水平的检测。“检测”包括进行相关的某一项试验以及在一定的天、周、月或年的时间段中进行一系列的实验。为在应用治疗方案之前或之后监视肿瘤转化性疾病的进程，以有助于对合适的治疗方案作出结论或试验新的治疗方案，所述的试验可因许多原因而进行，其包括但不限于：预测处于恢复期的哺乳动物病症复发的可能性，监视某一治疗方法的效果，检查处于恢复期的病人的状态。因此，本发明的方法作为临床工具或研究工具都是有用的。

所述的“核酸”应理解为脱氧核糖核酸和核糖核酸，或其衍生物或类似物。

所述的参照核酸分子可以是天然地，或经重组或合成产生的。当有关受试标识分子的序列信息已知时，所述的参照核酸分子可以是经重组或合成产生的。然而，在一个优选的实施方案中，本发明适用于不可能和/或不需要获得有关标识分子的核苷酸序列信息的情况下。这

对当本发明的方法应用于在临床状态下监视许多肿瘤转化性淋巴疾病患者的情况具有特别的意义。具体说来，由于所述的 TCR 或免疫球蛋白可变区域重排是肿瘤转化性淋巴细胞的特别适合的标识，很可能由给定病人的肿瘤转化性淋巴细胞所表现的特定可变区重排是独特性的。甚至当一个病人表现两次初级肿瘤转化性淋巴疾病，可能来自第一初级肿瘤转化性淋巴疾病的肿瘤转化性细胞的可变区重排也不同于第二初级肿瘤转化性淋巴疾病的肿瘤转化性细胞的可变区重排。

在优选的实施方案中，所述的参照核酸分子是天然存在的分子，如驱动核酸分子。所述的“驱动”核酸分子是指用本发明的方法监视的、从哺乳动物中分离出的参照核酸分子。所述的分子需在开始施行本发明的方法前分离出来。尽管对本领域的技术人员来说，本发明中适用的定位、鉴定和分离驱动分子的方法是已知的，但在一个优选的实施方案中，所述的驱动分子是经重排的 TCR 或免疫球蛋白可变区基因组 DNA，该 DNA 来自在诊断时由受试哺乳动物中获得的肿瘤转化性淋巴细胞样品。适用于本发明的方法中的驱动分子可以通过如下制备例如，由诊断时获得的细胞中抽提的 DNA 或 RNA 中存在的经重排的 TCR 或免疫球蛋白基因的核酸扩增。在不对本发明的操作做任何形式限定的前提下，肿瘤转化性淋巴疾病的诊断作为呈现异常症状病人结果的而出现。这些症状经常是由与存在高浓度的肿瘤转化性淋巴细胞（在瘤形成骨髓，如 B 细胞白血病中，通常高于 99%，在胸腺细胞白血病的胸腺中通常通常高于 95%，在含实体淋巴肿瘤细胞中通常高于 99%）所导致的。因此，肿瘤转化性细胞的样品可以在诊断时或治疗方案开始前的任何时候简便、快速地分离出来。可以从任意给定的病人获得并贮存足够的细胞或 DNA 或 RNA 或驱动核酸分子样品，以便在需要或希望对该病人进行肿瘤转化性淋巴疾病进行监视时可持续进行监视。

由此，本发明的方法优选提供一种在哺乳动物中监视肿瘤转化性淋巴疾病的方法，所述的方法包括将来自所述哺乳动物的检测样品中所包含的核酸分子和与经重排的 TCR 或免疫球蛋白可变区核酸分子或

其衍生物或类似物互补的驱动核酸分子或其衍生物或类似物在足以使所述驱动分子与所述可变区域核酸分子相互作用的条件下接触一段时间，通过减少未杂交的核酸分子和杂交错配核酸分子的浓度富集所述的可变区域核酸分子，再定性和/或定量地检测所富集的可变区域核酸分子。

优选地，所述的肿瘤转化性疾病是恶性疾病，更优选所述的哺乳动物是人。

所述的“衍生物”和“类似物”应当理解为包括天然的，合成的，或重组来源的片段、部分、部件、突变体、同系物、模拟物和类似物。所述核酸分子的衍生物包括具有所述核酸序列特定表位或部分的片段。例如，所述的参照分子可仅编码足以作为标识的部分可变区。类似地，仅仅可变区的一部分也可以提供充分地标识，如仅仅免疫球蛋白重排或连接点的DJ区域。这一定义还包括与其他蛋白或非蛋白分子融合的核酸分子。受试的核酸分子可以与标记物(tag)融合，例如其可以使所述核酸分子的分离和检测易于进行的标记物。此处所包含的类似物包括但不限于对所述核酸序列的修饰，如对其化学组成或总体构象的修饰。例如，所述的参照核酸分子可以带有尿嘧啶核苷酸，它为接下来去除不需要的参照分子提供酶切的靶位点。还包括，例如对核酸序列与其他核酸序列在如主链形成和互补碱基对杂交水平的相互作用方式的修饰。核苷酸或核酸序列的生物素酰化是此处所定义的衍生物的例子。核酸序列的衍生物可以来自单或多核苷酸替换、缺失和/或添加。术语“衍生物”应理解为包含表现任一或多个核酸序列活性的核酸分子，例如，由下述天然产物筛选所获得的产物，也包含在不同主链上的核苷酸序列，如肽核酸。

将所述的参照核酸分子和所述的测试样品核酸分子相接触，以使与存在于测试样品中的任何标识分子的相互作用便于通过任意合适的方法进行。这些方法对本领域的技术人员而言是已知的。在这一方面所述的“相互作用”应当理解为任何形式的相互作用，如互补的碱基对之间的杂交，或一些其他形式的相互作用，如在受试的核酸分子的

核酸部分之间的成键作用。所述的相互作用可以通过键的形成出现，例如但不限于共价键、氢键、范德华力或其它的相互作用机制。此处所有涉及的两核酸分子之间的“杂交”应理解为包含所述分子之间的任何形式的相互作用。为使这一相互作用易于进行，优选在足以使单链的参照分子和单链的标识分子杂交的条件下，使参照核酸分子和检测样品中的核酸分子的部分或全部单链化一段时间。应当理解所述的杂交可以出现在所述参照核酸分子的编码链和与之互补的所述标识核酸分子链之间，或所述参照核酸分子的非编码链和与之互补的所述标识核酸分子链之间。

上下文中与参照分子有关的术语“核酸分子”是指任何包含具有下述功能的核苷酸序列或其衍生物分子，所述的功能包括所述核苷酸序列的至少一个区域与标记核酸序列的杂交。因此，术语“标识核酸分子”包括任何使该分子成为如上所述的肿瘤转化性细胞所特有的分子的核酸序列，并可由此作为通过接触步骤鉴定的主题。核酸参照分子和标识核酸分子均可以包含非核酸组分，如使检测和/或富集这些分子易于进行的标记物。所述的标记物可以在实施本发明方法过程中的任意合适的时间点掺入。

在不对本发明的操作理论或模式作任何形式地限定的前提下，使测试样品核酸分子和参照核酸分子在杂交条件下相接触将导致同源双链的形成：参照：标识同源双链、参照：参照同源双链、或标识：标识同源双链。当参照分子以错配的方式与非标识分子杂交时，或者标记或非标识核酸分子与不同序列的核酸分子杂交时将形成异源双链。形成标识：标识同源双链的浓度可通过使所述的测试样品与过量的参照核酸分子相接触以降到最低。

在不对本发明作任何限定的前提下，所述参照核酸分子与存在于测试样品中的标识核酸分子的杂交使以简单且特异的方式富集标识核酸分子易于进行。特异性是通过下述的事实提供的：标识分子与参照分子杂交形成同源双链，由此将标识分子与其它非标识分子、构成所述测试样品一部分的异源分子区分开。

关于“富集”应当理解为提高标识核酸分子相对于测试样品中所含的背景非标识核酸分子的比例。这可以通过例如降低，去除或减少非标识核酸分子达到。依照本发明的方法，所述的富集步骤是采取降低包含在样品中的非标识核酸分子的浓度的形式，而不是由扩增所述的标识分子提高测试样品中的标识核酸分子的浓度。在不以任何形式限制本发明的操作理论和模式的前提下，本发明人已发现通过利用预期以降低样品中非标识核酸分子浓度，而非试图提高标识分子群的富集步骤使所述的检测方法成为一种没有非特异性扩增危险的高灵敏性检测方法。而且，此处所用的富集类型的可行性在于使用靶向受试标识核酸分子的参照核酸分子。类似地，这种分子筛选方法的总体简便性也与有关参照分子的使用相关，这使得不需要对预期的标识核酸分子进行序列分析，由此简化了对高特异性的探针和/或引物分子的设计。

应当理解此处所述的“富集”并不局限于从测试样品中去除所有非标识核酸分子的富集步骤。更确切地说，依照前述的定义，其涉及降低样品中非标识核酸分子的浓度。浓度的降低可以有多种程度。本发明的方法应当理解为进行一个或多个连续的富集步骤，以改善标识核酸分子群的纯度。本领域的技术人员能够确定基于不同的情况决定需要进行一个还是多个富集步骤。当肿瘤转化性淋巴细胞的数量大时，例如在治疗的早期阶段，用单一的简单富集步骤即足以检测以高浓度存在的标识核酸分子。但是，当受试的是处于恢复阶段的病人时，则需要通过两种或多种不同的富集技术，以最大限度地纯化受试的标识核酸分子。

对标识核酸分子的富集可以通过一种或多种合适的技术进行，所述的技术包括但不限于：

(i) 将标记物掺入到参照核酸分子或来自测试样品的核酸分子中。可使用标记物通过共价键（或非共价键）将分子偶联到固相，以便于通过洗或其它方式将不需要的分子去除。可以用标记物在来自测试样品的核酸分子或参照核酸分子中提供抗酶切的核酸序列。这些标

记物是本领域的技术人员已知的，常用的包括生物素、地高辛和荧光素。另一个常用的标记包括抗酶作用的肽或硫代磷酸酯主链。适用的固相包括，塑料表面，凝胶基质和包被的磁珠，其上可以附着捕获分子如链霉抗生物素或抗体。

(ii) 将杂交错配的异源双链与参照：标识同源双链相分离是基于双链在通过包含于设备（如柱或毛细管）中的凝胶或大小排阻或亲和或其他基质时的不同迁移率而进行的。

(iii) 通过将下述的异源双链与错配修复蛋白相缔合，去除如那些部分与非标识核酸分子杂交的参照核酸分子所形成的杂交错配的异源双链。所述的去除可以通过任何适宜的技术进行，如所述的错配蛋白与固相表面如柱或板相偶联。在另一实施例中，可通过错配修复蛋白有差别地改变异源双链通过凝胶或基质的迁移率。

(iv) 用化学或酶切技术去除未配合的单链核酸分子和/或杂交错配异源双链。优选地，所用的酶切技术是用例如 S1 核酸酶和/或 T4 内切酶消化受试的核酸分子。

(v) 将标记的同源二聚体和异源二聚体偶联到固相上，并去除未杂交的单链分子、异源二聚体或同源二聚体。这一去除步骤可以通过例如洗涤，而后加热或对所余核酸分子群进行化学处理，以去除单链的和以错配方式与参照分子杂交的非标识分子。在不对本发明做任何形式的限定的前提下，与完美地杂交的标识分子相比，杂交错配的非标识分子在较低的温度下解链。新的单链分子即可通过洗涤步骤去除。

可以理解所述的富集步骤可以通过一种或多种合适的技术进行，如一种或多种如上述 (i)-(v) 中所概述的技术。所述的技术可以通过多种方式进行，包括在溶液中，通过分离胶或柱，或者通过将参照核酸分子或测试核酸分子附着到固相上。确定最合适的富集方法是本领域的技术人员所能做到的。当需要使用一种以上的富集技术时，优选使所述的技术依次进行。

除了应用一种或多种以上详细描述富集技术外，优选在检测标识分子前将所述的驱动分子去除。这进一步富集了所述的标识核酸分

子。其可通过下述的任意一种技术实现：

(i) 使分离的核酸分子双螺旋成为单链，通过向所述分子中掺入的标记物分离所述的参照核酸分子。例如以上所描述的生物素标记或磁珠。

(ii) 通过已掺入到参照核酸分子中的合适的鉴定标记物特异性地降解参照核酸分子。例如，将尿嘧啶类似物掺入到参照分子 DNA 中，用所述的尿嘧啶 N 糖基化酶 (UNG) 特异性地降解参照核酸分子。在不对本发明做任何形式限定的前提下，到参照：参照分子同源双链已经形成或驱动：非标记异源双链未被富集步骤去除的程度，这一步骤可以去除这些多余的分子。

(iii) 利用仅附着于来自测试样品的核酸分子的酶-抗性标记物使这些分子扩增而不使参照分子扩增。这极大地降低了参照分子的相对比例。

在最优选的实施方案中，通过降低未杂交的核酸分子和杂交错配核酸分子的浓度富集所述标识分子的步骤进一步包括降低参照分子浓度的步骤。

依照这一最优选的实施方案，提供了一种在哺乳动物中监视肿瘤转化性淋巴疾病的方法，所述的方法包括将来自所述哺乳动物的样品中所包含的核酸分子和与经重排的 TCR 或免疫球蛋白可变区核酸分子、或其衍生物或类似物互补的驱动核酸分子、或其衍生物或类似物在足以使所述驱动分子与所述可变区域核酸分子相互作用的条件下接触一段时间，通过减少未杂交的核酸分子、杂交错配核酸分子和核酸驱动分子的浓度富集所述的可变区域核酸分子，再定性和/或定量地检测所富集的可变区域核酸分子。

在最优选的实施方案中，所述的富集步骤是通过下述方式进行的：去除未与所述的标记物标记的驱动核酸分子杂交的非标识核酸分子，酶法切除错配杂交核酸分子和去除驱动分子，如通过利用 UNG。

对标识核酸分子的“检测”可以通过本领域技术人员已知的任何合适的方法进行。在此方面相关的“定性”检测应理解为对肿瘤转化

性淋巴细胞群在受试哺乳动物中存在与否的检测。而“定量”检测应理解为检测受试哺乳动物中肿瘤转化性淋巴细胞的水平。适合应用于本发明中的检测技术包括但不限于：

(i) 用可以发出信号的检测标记物（或者与可发出信号的检测系统相偶联的检测标记物）标记所富集的标识核酸分子，然后检测所述的信号。这包括例如比色检测，荧光检测，酶检测或放射性标记物的检测；或

(ii) 在检测前扩增所富集的标识核酸分子。这在例如，当标识核酸分子的拷贝数低（例如病人已处于恢复期）时可能需要。由于标识核酸分子群已被富集，则无需合成特异性针对受试标识分子的扩增引物。更确切地说，可以用通用引物扩增受试标识核酸分子群，所得的扩增产物可以通过电泳检测。

(iii) 可以通过下述方法定量地检测（未知）的标识：向起始测试样品中加入已知量的标准的不同序列，用两参照驱动分子，一个针对标准分子，一个针对标识分子，进行起始富集，确定最终获得的未知标识分子与所富集的标准分子的相对量。由此即可计算出起始的未知标识分子的量。

(iv) 可以用如下所述的 2-维电泳分离。

在不以任何形式对本发明进行限制的前提下，本发明人已展示出本发明的方法能检测并定量在血液样品中每总细胞数低至 10^{-5} 水平、在骨髓样品中每样品总细胞数低至 10^{-5} 到 10^{-6} 水平的疾病。这一同样操作简便的技术比现有的技术有千倍以上的改进（参见表 1）。

在相关的方面，本发明人已确定上文中所定义的标识核酸分子由于其大小和核苷酸序列上的差异表现独特的电泳迁移模式。由此本发明人研究出一种定性或定量检测生物样品中是否存在标识核酸分子群的方法，该方法是基于标识群与测试样品中所含的异源非标识核酸分子通过电泳分离，以形成分离的且由此可检测的群体。通过对存在的单独标识分子群进行筛选可以确定是否克隆的细胞如在肿瘤转化性的疾病中所观察到的那样出现扩增。

因此本发明的另一方面涉及检测和/或定量生物样品中的克隆细胞群的方法，所述的细胞以标识核酸分子为特征，所述的标识核酸分子在所述的细胞群中是电泳共迁移的，该方法包括将包含在所述样品中的核酸分子电泳分离，以及检测经分离的核酸分子，其中所述的分离基于核酸的长度和序列。

应当理解术语“以……为特征”是指受试的细胞表现所定义的特征，但其并不作为所述细胞是否表现其它特性的限定。还应当理解的是，所述的特征不必仅是由受试细胞所表现的独特特性，但在优选的实施方案中所述的特性是将所感兴趣的细胞与样品中的那些不感兴趣的细胞鉴别开来的一个特性。

“克隆”是指受试的细胞群是由共同的细胞来源衍生而来。例如肿瘤转化性细胞群是由已经历转化的单细胞衍生而来的。在此方面，经过进一步核重排或突变以产生遗传上不同的肿瘤转化性细胞群的肿瘤转化性细胞也是“克隆”细胞群。在另一个实施例中，对急性或慢性感染或免疫刺激应答中扩增的T或B细胞也落入此处所定义的“克隆”细胞群。优选地，所述的克隆细胞群是肿瘤转化性细胞群，更优选地是肿瘤转化性淋巴细胞。

由此，本发明更具体地说提供一种检测和/或定量生物样品中的肿瘤转化性淋巴细胞群的方法，所述的细胞以标识核酸分子为特征，所述的标识核酸分子在所述的细胞群中是电泳共迁移的，该方法包括将包含在所述样品中的核酸分子电泳分离以及检测经分离的核酸分子，其中所述的分离是基于核酸的长度和序列的。

所述的“肿瘤转化性”和“淋巴的”的含义应当理解为与上文中的定义一致。

所述的“标识核酸分子”的含义也与上文中所定义的相同。在所述的范围内受试的肿瘤转化性细胞是淋巴细胞。受试的标识分子优选地是经重排的TCR或免疫球蛋白可变区核酸分子。

根据这一优选的实施方案，提供了一种检测和/或定量生物样品中的肿瘤转化性淋巴细胞群的方法，所述的肿瘤转化性细胞以标识核

酸分子为特征，所述的标识核酸分子在所述的细胞群中是电泳共迁移的，该方法包括将包含在所述样品中的核酸分子电泳分离，以及检测经分离的核酸分子，其中所述的分离基于核酸的长度和序列，所述的肿瘤转化性淋巴细胞中的重排 TCR 或免疫球蛋白可变区核酸分子共迁移。

所述的“生物样品”应理解为，如上文中所定义的来自哺乳动物的测试样品。在这一范围内，所述的样品包括细胞物质，其可能需要经过提取或者分离或暴露于包含在所述样品中的核酸材料。如上文中所详细描述，在此范围内受试的标识核酸分子是 mRNA 分子，其可能需要在开始时对所述测试样品施用某种刺激信号以上调这一转录产物的产量。也可能需要在检测前扩增标识核酸分子群，其间可以利用特异性引物，或者若为了提供大量的起始核酸分子群，要总体上扩增测试样品中的核酸群也可以使用通用引物。

在不将本发明限定到任何理论或作用模式的前提下，标识核酸分子，如重排的 TCR 或免疫球蛋白可变区基因表现为编码独特的 TCR 或免疫球蛋白可变区的独特核苷酸序列。本发明人已经确定当将这样的核酸分子的核酸样品进行基于单独分子的长度及核酸序列的电泳分离时，所述的标识分子共迁移到凝胶上共同的端点。最终获得的核酸迁移模式可以在进行电泳时或电泳后凝胶上通过下述的技术进行观察，所述的技术例如放射自显影、荧光显影或对已事先掺入到所述测试样品中的核酸分子中的某种分子（如荧光素标记物、或抗原）进行观察。

由于构成测试样品的大量核酸群中的每一种都将迁移到特定的长度/序列电泳位置，而且由于可以相对或绝对地确定出现在任意位置的核酸材料，因此可以根据相对于非标识核酸分子群的水平的高浓度受试标识核酸分子群的存在，迅速且简便地确定在被测试的生物样品中是否存在某种肿瘤转化性淋巴细胞群。

在这一方面，在“所述的细胞群中共迁移的”标识核酸分子是指所述的受试标识核酸分子，在此范围内，它们是由相同的克隆群衍生的细胞所衍生的，当所述的电泳分离是基于长度（即总的碱基对数）

和序列（即受试核酸分子的实际核苷酸序列）参数时，它们迁移到相同的端点。在不将本发明限定到任何理论或作用模式的前提下，本发明是建立在下述的基础上的：即利用肿瘤转化性细胞群的标识核酸分子和非肿瘤转化性异源细胞群之间存在的序列差异，电泳分离克隆的核酸分子群。

基于长度和序列的分子电泳分离可以用任何合适的技术进行。在优选的实施方案中，所述的技术是二维变性梯度凝胶电泳，其中所述的检测核酸分子群首先按长度分离，然后将所述分子跑尿素梯度凝胶。因为尿素与核酸分子的氢键之间的差别相互作用是序列依赖性的，则由此提供了一种基于核酸序列不同分离核酸分子的合适的方法。温度也可用作变性剂。可以使用恒定的或梯度变性条件。

因此，本发明更具体地提供了一种检测和/或定量生物样品中的肿瘤转化性淋巴细胞群的方法，所述的肿瘤转化性细胞以标识核酸分子为特征，所述的标识核酸分子在所述的细胞群中是电泳共迁移的，该方法包括将包含在所述生物样品中的核酸分子电泳分离以及检测经分离的核酸分子，其中所述的分离是基于核酸的长度和序列的二维变性梯度凝胶电泳。

优选地，所述的肿瘤性转移细胞是恶性的。

在不对本发明做任何形式限定的前提下，本发明人已确定二维电泳提高了在非标识核酸分子群中检测标识核酸分子的灵敏度达到 10^{-100} 因子。

本发明的这一方面提供了一种简便且灵敏的在哺乳动物中检测克隆细胞群存在的方法。通过如相对于在其它端点位置的比较检测的核酸分子浓度或相对于定量标准，已共迁移到特定端点的高核酸分子浓度所证实的，所述的方法特别适合于筛选大的克隆群。尽管本发明的方法可以用作诊断工具，其就检测哺乳动物中肿瘤转化性细胞群大小的调整而言，对监视肿瘤转化性疾病或监视肿瘤转化性细胞的克隆演化发生率特别有用。

在不对本发明作任何形式限定的前提下，由于在细胞的早期分化

阶段，初始种系基因重排时并非需要将所有未使用的可变区节段剪接掉，所以肿瘤转化性淋巴细胞可进行可变区基因的进一步重排。例如，进入缓解期已恢复了2到5年的白血病人时而表现出新的TCR或免疫球蛋白重排。这通常是由于诊断前或诊断后起始的肿瘤转化性细胞的克隆演化。用本发明的方法，可以在不需要核酸序列信息的情况下以灵敏的方式鉴定克隆群，如新的克隆群。当该方法用作监视工具一段时间，可以追踪细胞群大小和来源的变化。例如，对于特定的肿瘤转化性疾病，在骨髓中肿瘤转化性细胞的存在可能与不良的预后相关。在另一实施例中，其可作为在治疗肿瘤转化性疾病过程中有用的预测工具。具体地说，治疗5周后，仍表现出高水平肿瘤转化性细胞的病人一般比肿瘤转化性细胞已降低到低水平的病人具有更为不良的预后。

本发明这一方面所述的方法可用作除本发明的第一方面所述的检测方法之外的方法，或替代本发明第一方面所述的方法。在不对本发明做任何形式限定的前提下，本发明的第一方面可能较后者提供更为灵敏的结果，这是由于利用检测标记分子的参照分子检测肿瘤转化性细胞，因而不需要为了获得阳性的结果而要求相对于其他正常的克隆细胞群存在更多数量的肿瘤转化性细胞。尽管两种方法均无需获得相对于肿瘤转化性细胞的标识核酸分子的序列信息，本发明的后一方面甚至不需要参照分子。由此，这对于检测的主题在于克隆演化且相应于新克隆的参照核酸分子尚未获得的情况特别有用。在这一方面，本发明的后一方面提供了一种有效的监视和诊断工具。

在与此相关的一个方面，本发明提供了一种检测和/或定量哺乳动物中的肿瘤转化性细胞的方法，所述的肿瘤转化性细胞以标识核酸分子为特征，所述的标识核酸分子在所述的细胞群中是电泳共迁移的，该方法包括将包含在由所述哺乳动物中获得的样品中的核酸分子电泳分离以及检测经分离的核酸分子，其中，所述的分离基于核酸的长度和序列。

优选地，所述的肿瘤转化性疾病是肿瘤转化性细胞的克隆演化。

最优选，所述的检测是诊断。

更优选地是，所述的电泳分离是二维变性梯度凝胶电泳。

另一方面本发明提供一种检测和/或定量生物样品中的多重非肿瘤转化性淋巴细胞群的方法，所述的非肿瘤转化性细胞以标识核酸分子为特征，所述的标识核酸分子在所述的细胞群中是电泳共迁移的，该方法包括将包含在所述样品中的核酸分子电泳分离，以及检测经分离的核酸分子，其中，所述的分离基于核酸的长度和序列。

优选地是，所述的电泳分离是二维变性梯度凝胶电泳。

本发明的进一步的特征由下述非限定性的实施例做更为全面地描述。

实施例 1

在诊断中获得的白血病的重排，称作“驱动分子”过量地添加到所述的测试 DNA 中。这一驱动分子经几种方法之一进行修饰以便在后续的操作中将其去除。然后使所述的 DNA 变性，再使其退火。结果，上述的驱动分子或与白血病测试分子相结合，或与正常的测试分子相结合。与白血病测试分子相结合将产生很好的匹配，而与具有不同序列的正常的异源重排相结合将产生错配。可以通过物理的方法，或基于通过过柱或毛细管时的不同迁移率，或利用通过物理附着与柱表面或塑料表面的相关错配修复蛋白，去除上述的错配。去除了所述的驱动分子后，即可对由正常分子“噪音”中分离出来而富集的白血病分子进行检测和定量（参见实施例 2）。

实施例 2

起始的步骤同实施例 1。向所述的测试 DNA 加入过量的白血病驱动分子，然后进行变性和退火。同样，所述的驱动分子或与白血病测试分子相结合或与正常的测试分子相结合。现在通过化学方法或识别错配的酶处理，结果去除了错配。结果被切除的分子将不会在后续聚合酶链式反应中扩增。所述白血病驱动分子可通过多种酶去除，如

尿嘧啶-N-糖基化酶、核酸酶或限制性酶。通过向最初的测试 DNA 中添加已知量的标准克隆 DNA 进行定量。标准的驱动分子也用于保护标准 DNA。在去除了异源正常重排和驱动 DNA 后，用荧光素标记的引物进行最终的 PCR。标准和标识的相对的量用如基因测序仪一类的仪器和合适软件进行测定，并在凝胶电泳的过程中检测荧光。已表明该方法本身能够检测和定量每样品中的总细胞数，在血液中低至至 10^{-5} 水平，在骨髓中低至至 10^{-5} - 10^{-6} 水平的白血病细胞的疾病。相对于目前对大多数病人应用的简单方法（参见表 1）有着千倍以上的改进。

实施例 3

这是基于利用白血病的和异源正常重排之间的序列差异的原理。序列差异可以通过变性梯度凝胶电泳检测。在所述被测物中的白血病和正常基因重排可以用带有 GC 夹子的引物通过聚合酶链式反应扩增，然后用二维梯度凝胶电泳分离。靶重排和任何参照重排在二维凝胶上可以迁移到更特异的点上。为具有灵敏性，将凝胶上的 DNA 转移到膜上然后通过放射性或化学方法检测。

尽管二维变性梯度凝胶电泳不是一个新方法，并且一维 DGGE 已用于检测克隆淋巴细胞重排，使用二维变性梯度凝胶电泳检测恶性淋巴克隆，就其结果而言是一种新的用途。但是，在某种情况下，检测 PCR 产物的简单方法的灵敏性常常不够。如果是这样，则需要更灵敏的方法，如用标记探针探测或应用带有灵敏的二级检测的标记引物。定量可以通过使用参照单克隆 DNA 实现。当这一方法用于研究来自实施例 1 和/或 2 的材料，所述的 PCR 应使用带有 GC 夹子的引物而非上述实施例 2 中所提及的引物。

实施例 4

速测法方案

1. 用 λ 核酸外切酶使驱动分子成为单链：将驱动 DNA， λ 核酸外切酶， $10\times\lambda$ 缓冲液和 H_2O 混合，温育。

所述的驱动分子是诊断中获得的白血病 DNA。通过掺入尿嘧啶进行修饰，由此可去除任何痕量的驱动分子以实现该方法。

2. 使驱动分子和标识分子变性、退火以形成异源双链或同源双链。

所述的驱动分子是过量的，以便于所有的标识分子链与驱动分子链形成双链。因此可能存在一些过量的单链驱动分子。

3. 用 S1 核酸酶处理：添加 S1 酶和 10×S1 缓冲液，温育。

所述的 S1 核酸酶消化其中有大量错配的异源双链。这也去除过量的单链驱动分子。

4. 结合样品以制备结合或洗涤缓冲液 (B & W) 中的链霉抗生物素蛋白包被的小珠，在旋转振荡器上温育，用 B&W 洗 3 次和 H₂O 洗 1 次。

所述的标识用生物素标记的引物制备。因此，由标识分子构成其中一条链的异源和同源的双链由于可与链霉抗生物素蛋白结合而结合到固相。

5. 用 T4 内切核酸酶处理：加入 T4 酶，T4 磷酸缓冲液，温育，用 B&W 洗 3 次和 H₂O 洗 1 次。这个酶消化异源双链。

6. 用 Cel I 核酸内切酶处理：加入 Cel I 酶，10×H 缓冲液，Klenow 和 H₂O，温育，用 B&W 洗 3 次和 H₂O 洗 1 次，和 H₂O 在较高的温度下洗 3 次。

这个酶消化异源双链。

7. 用 S1 核酸酶处理：加入 S1 酶，10×S1 缓冲液和 H₂O。温育，用 B&W 洗 3 次和 H₂O 洗 1 次。

这个酶消化异源双链。

8. 用 λ 外切核酸酶处理：加入 λ 外切核酸酶，10×λ 缓冲液和 H₂O，温育，用 B&W 洗 3 次和 H₂O 洗 1 次。

所述的外切核酸酶消化任何剩余的驱动分子。

9. 用氢氧化钠洗 1 次，B&W 洗 3 次和水在较高的温度下洗 3 次。这一步骤的目的是去除与小珠结合的任何双链的第二链。

10. 用尿嘧啶 DNA 糖基化酶 (UNG) 处理：加入 UNG 酶，UNG 缓冲液

和 H₂O，温育。

用 UNG 处理的目的是消化任何掺入到尿嘧啶中的顽固的驱动分子。

11. 对链霉抗生素蛋白包被的小珠级分进行 PCR，将 PCR 产物跑丙烯酰胺凝胶。

在最后的阶段，通过所述的方法应获得由于与驱动分子很好地匹配而在整个过程中存留下来的标识 DNA 单链，也就是说，它们具有上述的白血病序列。

定量可以利用具有其自身的参照驱动的参照 DNA 分子进行相同的过程。在上述程序的开始，将不同量的参照分子与标识分子相混合，然后进行上述程序。在上述程序的最后所进行的 PCR 利用荧光标记引物，白血病标识分子和参照分子的相对量通过 DNA 片段分析定量而确定。

本领域的技术人员可以对本发明进行改变和修饰，而非仅仅局限于此处对本发明的特定描述。应当理解为本发明包括了所有这些改变和修饰。本发明还包括在上述说明书中所单独或共同参考或引用的所有步骤，特征，组分和化合物，以及上述两种或更多步骤或特征的任意或全部结合。

表 1 现有的检测和定量细胞群中肿瘤转化性淋巴细胞的方法

标识	方法	适用性	复杂性	灵敏性
1 表面/细胞内抗原	流动血细胞记数	50%-70%	中等	中等 (10 ⁻⁴)
2 分子标识				
(a) 易位	PCR	少数	简单	高 (10 ⁻⁶)
(b) 基因重排				
通过-单克隆 检测	PCR	≈90%	简单	低 (10 ⁻³)
-特异性探针	PCR	90%	高	中等
-特异性的引物扩增	PCR	90%	高	高 (10 ⁻⁶)

图1

快速定量: 标准克隆预期的和观察的水平
(两次实验)

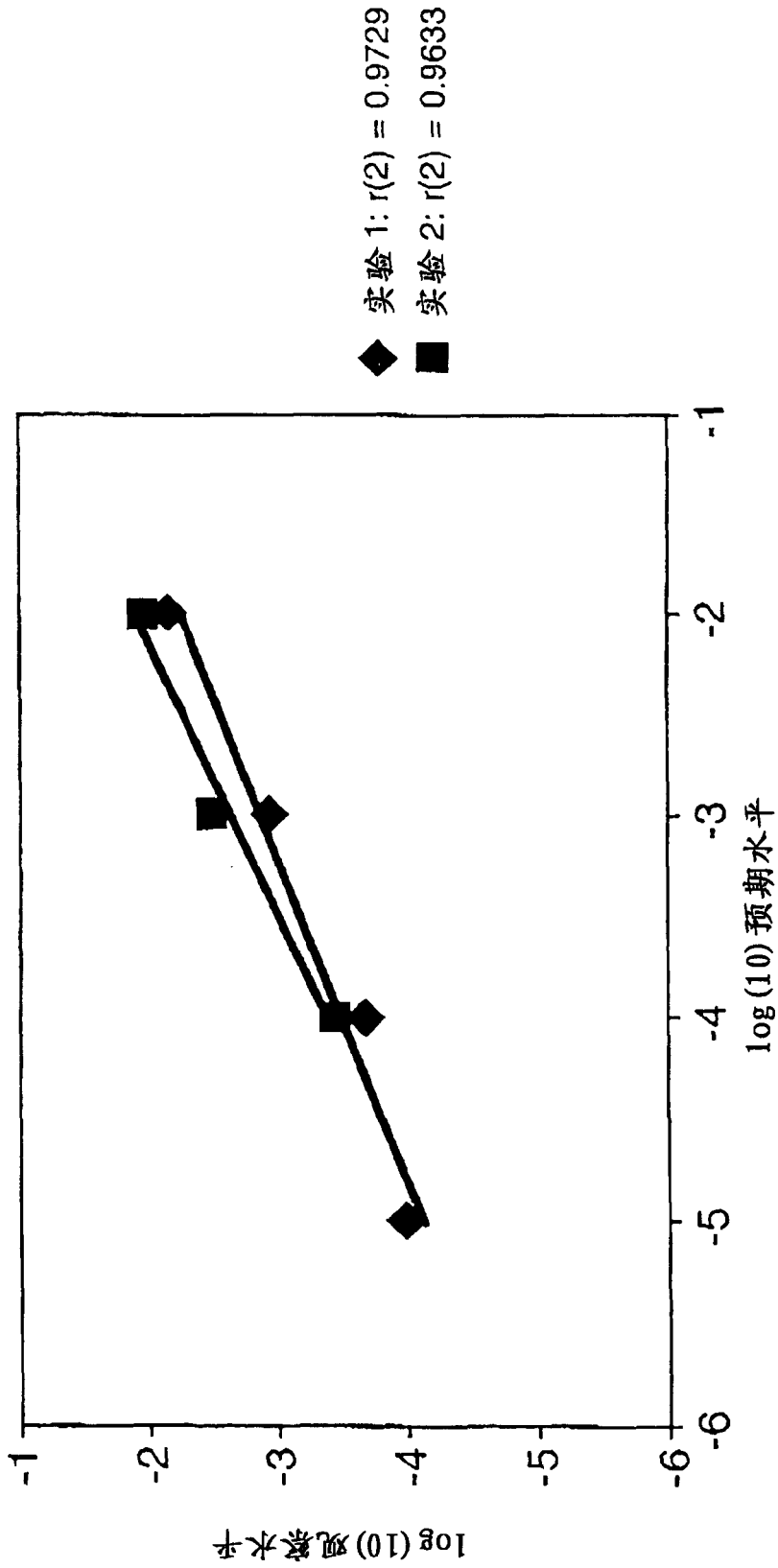


图2

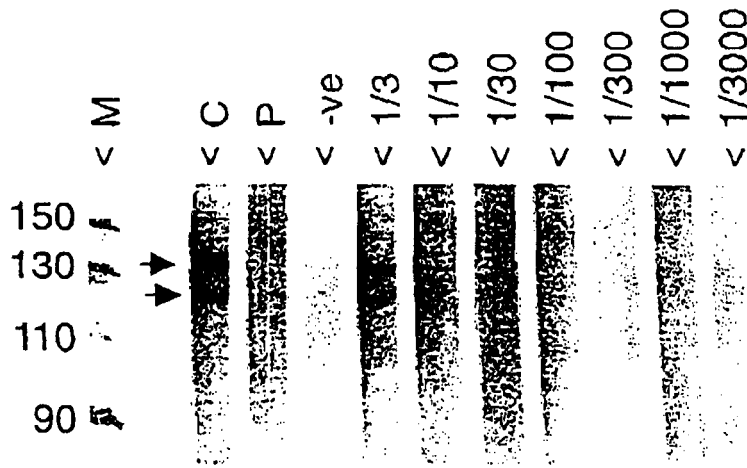
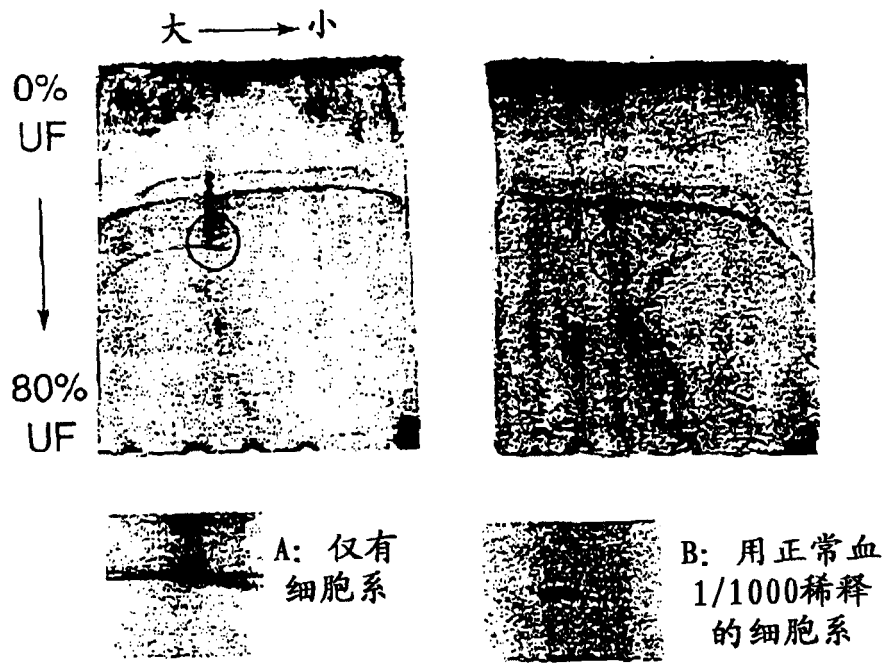


图3



专利名称(译)	检测肿瘤转化性或非肿瘤转化性细胞的方法		
公开(公告)号	CN1434875A	公开(公告)日	2003-08-06
申请号	CN01810299.9	申请日	2001-04-12
[标]发明人	AA莫利		
发明人	A·A·莫利 P·J·赛克斯 M·J·布里斯科		
IPC分类号	G01N33/53 C12N15/09 C12Q1/68 C12Q1/6809 C12Q1/6886 G01N27/447 G01N30/88 G01N33/566		
CPC分类号	C12Q1/6886 C12Q1/6809 C12Q2539/101		
代理人(译)	程泳		
优先权	2000PQ6876 2000-04-13 AU		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及在哺乳动物中定性和/或定量地监视淋巴肿瘤转化性进程的方法，具体地说，是用分子筛选技术监视淋巴肿瘤转化性进程的方法。本发明的方法适合于在一定的领域中应用，其包括但不限于监视肿瘤转化性淋巴疾病病情的发展，监视恢复过程中肿瘤转化性淋巴细胞的水平，预测受试者由恢复状态复发到疾病状态的可能性，或估计现有的治疗药物和/或新的治疗试剂的有效性。与此相关，本发明还提供在哺乳动物中定性和/或定量检测克隆淋巴细胞群的方法，更具体地说，是在具有下述情况的受试者中检测多克隆淋巴细胞群，即受试者中肿瘤转化性淋巴细胞已进行体细胞基因重排由此形成新的遗传上不同的克隆群，或所述受试者中一个或多个克隆群对一种免疫应答起作用。