



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112609001 A

(43) 申请公布日 2021.04.06

(21) 申请号 202110029407.7

(22) 申请日 2021.01.11

(71) 申请人 福州艾迪康医学检验所有限公司

地址 350008 福建省福州市仓山区盖山镇  
阳岐53号3号楼

(72) 发明人 陈雪青 王淑一

(74) 专利代理机构 浙江杭州金通专利事务所有  
限公司 33100

代理人 黄素萍

(51) Int. Cl.

C12Q 1/6886 (2018.01)

C12Q 1/6851 (2018.01)

C12N 15/11 (2006.01)

权利要求书1页 说明书6页  
序列表2页 附图1页

### (54) 发明名称

检测TP63-NTRK2融合基因及其相对表达水平的引物、探针和方法

### (57) 摘要

本发明公开了一种利用荧光定量PCR技术检测肿瘤患者体内TP63-NTRK2融合基因及其相对NTRK2基因的表达水平的引物、探针和方法,可筛查肿瘤患者体内是否有TP63-NTRK2融合基因,同时检测NTRK2基因的相对表达量,对于肿瘤患者及时调整治疗方案、指导拉罗替尼用药、评价治疗效果、预测预后和预防临床复发具有重要意义。

1. 检测肿瘤患者体内TP63-NTRK2融合基因和其相对NTRK2基因的表达水平的引物和探针,其特征在于,所使用的扩增TP63-NTRK2融合基因和NTRK2基因的引物和探针分别为:

TP63-E6-F:GACAGGAAGGCGGATGAAGA

NTRK2-E12-R:AGTGGGCTGGCAGAGTCATC

NTRK2-E12-P:FAM-TCATTGCTGATAACGGAGGCTGGG-TAMRA

NTRK2-E11-F:TTTTGGTAATGCTGTTTCTGCTT。

2. 根据权利要求1所述的检测肿瘤患者体内TP63-NTRK2融合基因和其相对NTRK2基因的表达水平的引物和探针,其特征在于,还包括扩增Actin内参基因的引物和探针,分别为:

Actin-F:TGAGCGAGGCTACAGCTT

Actin-R:TCCTTGATGTCGCGCACGATTT

Actin-P:FAM-ACCACCACGGCCGAGCGG-TAMRA。

3. 根据权利要求1所述的引物和探针,其特征在于,TP63-E6-F:NTRK2-E12-R:NTRK2-E12-P的摩尔比为2:2:1。

4. 根据权利要求1所述的引物和探针,其特征在于,NTRK2-E11-F:NTRK2-E12-R:NTRK2-E12-P的摩尔比为2:2:1。

5. 根据权利要求1所述的引物和探针,其特征在于,Actin-F:Actin-R:Actin-P的摩尔比为1:1:1。

6. 检测肿瘤患者体内TP63-NTRK2融合基因和其相对NTRK2基因的表达水平的方法,包括以下步骤:

(1) 抽提组织中的总RNA并逆转录为cDNA;

(2) 以步骤1中的cDNA为模板,利用检测用上/下游引物TP63-E6-F/NTRK2-E12-R和探针NTRK2-E12-P,检测样本中是否有TP63-NTRK2融合基因;利用检测用上/下游引物NTRK2-E11-F/NTRK2-E12-R和探针NTRK2-E12-P,检测样本中的NTRK2基因的相对表达量;利用内参基因上/下游引物Actin-F/Actin-R探针Actin-Probe定量检测样本中的Actin的表达量,其中,

TP63-E6-F:GACAGGAAGGCGGATGAAGA

NTRK2-E12-R:AGTGGGCTGGCAGAGTCATC

NTRK2-E12-P:FAM-TCATTGCTGATAACGGAGGCTGGG-TAMRA

NTRK2-E11-F:TTTTGGTAATGCTGTTTCTGCTT

Actin-F:TGAGCGAGGCTACAGCTT

Actin-R:TCCTTGATGTCGCGCACGATTT

Actin-P:FAM-ACCACCACGGCCGAGCGG-TAMRA;

(3) 根据Real-time PCR结果来分析样本是否有TP63-NTRK2基因融合及其相对NTRK2基因的表达水平。

7. 根据权利要求6所述的方法,其特征在于,步骤(3)的结果分析,具体为:在一块板上同时进行内参(Actin)和目的基因TP63-NTRK2、NTRK2的Real-time PCR:

1) 内参阳性时,检测结果才认为有效;

2) 阳性判断标准: $C_t < 36$ ,为阳性,样本中有TP63-NTRK2基因融合; $36 \leq C_t \leq 38$ ,为疑似阳性,需要再次验证; $C_t > 38$ ,为阴性,样本中无TP63-NTRK2基因融合。

## 检测TP63-NTRK2融合基因及其相对表达水平的引物、探针和方法

### 技术领域

[0001] 本发明属生物技术检测领域,特别涉及一种筛查融合基因的方法,采用探针实时荧光PCR技术检测肿瘤患者体内TP63-NTRK2融合基因及其相对NTRK2基因的表达水平。

### 背景技术

[0002] 恶性肿瘤是目前全球疾病死亡的首位原因,严重威胁人类的健康。NTRK融合是一种致癌驱动基因,TP63-NTRK2融合基因是由TP63基因第6外显子和NTRK2基因第12外显子之间的融合形成的,其融合产物为嵌合蛋白,发挥非配体依赖性组成型激活作用,引发永久性信号级联反应,驱动癌细胞的生长。NTRK基因融合类型在多种成人和儿童的实体瘤中被发现。据报道,在比较常见的恶性肿瘤如肺癌、结直肠癌中NTRK基因融合的频率远低于5%,而在罕见的肿瘤类型如先天性婴儿纤维肉瘤、先天性中胚层肾癌、分泌型乳腺癌、涎腺乳腺样分泌癌中基因融合频率较高。其他的实体瘤还包括脑部恶性肿瘤、胰腺癌、黑色素瘤、甲状腺癌、胃肠道间质瘤等,在所有实体瘤中NTRK2基因融合的频率低于1%。

[0003] 近年来,随着技术的发展,以肿瘤驱动基因为靶点的个体化精准医疗彻底改变了恶性肿瘤的治疗格局,越来越多的分子靶向药物不断涌现。拉罗替尼(larotrectinib)是一种新型口服小分子、高选择性原肌球蛋白受体激酶(tropomyosin receptor kinase,TRK)抑制剂。拉罗替尼主要通过和细胞内TRKB(NTRK2编码)的ATP位点竞争性结合,进而抑制TRK的催化活性和自磷酸化,阻断下游的信号通路传导,从而发挥抗肿瘤的作用。

[0004] 因此检测肿瘤患者体内TP63-NTRK2融合基因和NTRK2基因的相对表达量,对于肿瘤患者及时调整治疗方案、指导拉罗替尼用药、评价治疗效果、预测预后和预防临床复发具有重要意义。

[0005] 目前,检测NTRK基因融合的方法主要有免疫组织化学(IHC)、荧光原位杂交法(FISH)、第二代测序(NGS)和逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)。免疫组化方法(IHC)尽管原理简单,但是试验过程过于繁琐,需要的试剂种类繁多,且试验结果需要经验丰富的专家来判读,判读结果存在较大的主观性,对弱阳性结果的判断需要进一步用FISH等技术来验证;荧光原位杂交技术(FISH)被认为是检测基因融合的金标准。具有稳定性高、灵敏度高、特异性好,实验周期短等优点,但是它一次只能检测一个靶标,需要专门的组织和多目标部位检测,目前没有商业化的探针,有显著的假阳性(FP)或假阴性(FN),且只能从DNA层面进行检测,且检测费用高;高通量测序技术可以并行地对数百万条短序列进行测序,已被广泛应用至对肿瘤突变的检测,然而目前的NGS方法只针对DNA测序进行判断,容易造成RNA层面的漏检;相对于二代测序后期数据处理复杂,实时荧光定量PCR检测结果直观,容易判断,同时具有操作简单,成本低廉等特点。本研究采用实时荧光定量PCR技术,具有特异性好、灵敏度高、线性关系好、操作简单、自动化程度高、防污染、有较大的线性范围等优点,可以检测微小残留病灶,为了解病情进展和治疗效果提供依据,同时实时荧光定量PCR也存在假阳性和假阴性率较高、引物设计不好会影响检出等缺点。但是该技术在检测上已经相当成熟,实用

好,结果比较可靠稳定,可作为检测TP63-NTRK2基因融合和NTRK2基因的相对表达量的首选方法,用于指导拉罗替尼用药、评价治疗效果、预测预后。实时荧光定量PCR中常见的方法有SYBR GreenI染料法,双探针杂交法以及Taqman技术等。其中SYBR GreenI由于是非饱和染料,特异性不如双探针杂交法以及Taqman法,必须通过观察溶解曲线来判断其特异性;而双探针杂交法成本又较为昂贵。因此本研究采用实时荧光PCR技术结合Taqman探针法应用于TP63-NTRK2基因融合和NTRK2基因的相对表达量的检测。

[0006] 前人对融合基因的研究只关注融合基因本身的情况,而没有考虑相关正常基因的表达情况,无法得知融合基因表达量相对正常基因表达量的水平。

## 发明内容

[0007] 本发明设计了检测内参/目的基因用引物、探针序列,采用实时荧光PCR技术,筛查患者体内TP63-NTRK2融合基因及其相对NTRK2基因的表达水平。该方法快速准确,灵敏度高,特异性好,检测通量大。本发明提供正常基因的表达量做参考,可为拉罗替尼临床用药及相关治疗提供更多的参考。

[0008] 用于筛查患者体内TP63-NTRK2融合基因及其相对NTRK2基因的表达水平的检验试剂中,包括红细胞裂解液、TRIzol、氯仿、无水乙醇、ReverTra AceqPCR RT Kit (TOYOBO公司)、检测体系PCR反应液、阳性对照品和阴性对照品。

[0009] 检测体系PCR反应液包括THUNDERBIRD qPCR MIX (TOYOBO, QPS-101)、检测目的基因用上下游引物分别为:TP63-E6-F、NTRK2-E11-F、NTRK2-E12-R,探针为NTRK2-E12-P,检测内参基因Actin用引物为Actin-F,Actin-R,探针为Actin-P。其中,

[0010] TP63-E6-F:GACAGGAAGGCGGATGAAGA

[0011] NTRK2-E12-R:AGTGGGCTGGCAGAGTCATC

[0012] NTRK2-E12-P:FAM-TCATTGCTGATAACGGAGGCTGGG-TAMRA

[0013] NTRK2-E11-F:TTTTGGTAATGCTGTTTCTGCTT

[0014] Actin-F:TGAGCGAGGCTACAGCTT

[0015] Actin-R:TCCTTGATGTCGCGCACGATTT

[0016] Actin-P:FAM-ACCACCACGGCCGAGCGG-TAMRA。。

[0017] 具体地,所述阳性对照品分别为含有TP63-NTRK2融合基因和NTRK2基因的溶液;所述阴性对照品为不含TP63-NTRK2融合基因和NTRK2基因组溶液。

[0018] 本发明还提供了一种检测TP63-NTRK2融合基因及其相对NTRK2基因的表达水平的方法,包括如下步骤:

[0019] 1) 抽提组织中的总RNA并逆转录为cDNA;

[0020] 2) 以步骤1中的cDNA为模板,利用检测用上/下游引物TP63-E6-F/NTRK2-E12-R和探针NTRK2-E12-P,检测样本中是否有TP63-NTRK2融合基因;利用检测用上/下游引物NTRK2-E11-F/NTRK2-E12-R和探针NTRK2-E12-P,检测样本中的NTRK2基因的相对表达量;利用内参基因上/下游引物Actin-F/Actin-R探针Actin-Probe定量检测样本中的Actin的表达量;

[0021] 3) 根据Real-time PCR结果来分析样本是否有TP63-NTRK2基因融合及其相对NTRK2基因的表达水平;

[0022] 步骤1)中,所述的提取方法为常规的TRIZOL法提取血液RNA,然后用TOYOBO公司的Rever Tra Ace qPCR RT Kit试剂盒反转录成cDNA。

[0023] 步骤2)所述的Real-time PCR扩增方法如下:

[0024] 一例样本的qPCR体系为25ul:

[0025] 2\*qPCR MIX 12.5ul、ROX Reference Dye (50\*) 0.5ul、引物TP63-E6-F、NTRK2-E12-R各0.4ul、探针NTRK2-E12-P 0.2ul、灭菌水7.8ul、cDNA模板2ul。

[0026] 2\*qPCR MIX 12.5ul、ROX Reference Dye (50\*) 0.5ul、引物NTRK2-E11-F、NTRK2-E12-R各0.4ul、探针NTRK2-E12-P 0.2ul、灭菌水7.8ul、cDNA模板2ul。

[0027] 内参的qPCR体系为25ul:

[0028] 2\*qPCR MIX 12.5ul、ROX Reference Dye (50\*) 0.5u、引物Actin-F、Actin-R各0.4ul、探针Actin-Probe 0.4ul、灭菌水8.8ul、cDNA模板2ul。

[0029] Real-time PCR反应程序:95℃1min预变性;95℃15s,58℃35s循环40次。

[0030] 步骤3)的结果分析,具体为:在一块板上同时进行内参(Actin)和目的基因TP63-NTRK2及NTRK2的Real-time PCR:

[0031] a、内参阳性时,检测结果才认为有效;

[0032] b、阳性判断标准:Ct<36,为阳性,样本中有TP63-NTRK2基因融合;36≤Ct≤38,为疑似阳性,需要再次验证;Ct>38,为阴性,样本中无TP63-NTRK2基因融合。

[0033] 本发明还提供了一种检测TP63-NTRK2融合基因及其相对NTRK2基因的表达水平的试剂盒,包括检测体系PCR反应液,所述PCR反应液包括THUNDERBIRD qPCR MIX (TOYOBO, QPS-101)、检测目的基因用上下游引物分别为:TP63-E6-F、NTRK2-E11-F、NTRK2-E12-R,探针为NTRK2-E12-P,检测内参基因Actin用引物为Actin-F,Actin-R,探针为Actin-P。

[0034] 本发明的有益效果:一、本发明不仅筛查患者体内TP63-NTRK2融合基因,还同时检测其相对NTRK2基因的表达水平,可为拉罗替尼临床用药及相关治疗提供更多的参考。二、本发明中TP63-NTRK2融合基因和NTRK2基因共用相同的下游引物和探针,节约了实验成本。三、本发明将反应体系所需的引物、探针进行合理配比和优化,使实验条件达到最佳,从而省去了繁琐的条件摸索环节,大大提升了实验效率。该方法经测试特异性好,灵敏度高,操作简便。有助于监测临床上肿瘤患者体内TP63-NTRK2融合基因及其相对NTRK2基因的表达水平,对于指导拉罗替尼用药、评价治疗效果、预测预后都具有重要意义。

## 附图说明

[0035] 图1是使用本发明引物探针及方法对20例样本,TP63-NTRK2阳性样品和阴性对照检测的扩增曲线图。

[0036] 图2是使用本发明引物探针及方法对20例样本,NTRK2阳性样品和阴性对照检测的扩增曲线图。

## 具体实施方式

[0037] 下面结合具体实施例和附图,进一步阐述本发明。应当注意的是,实施例中未说明的常规条件和方法,通常按照所属领域实验人员常规采用方法:譬如,奥斯柏和金斯頓主编的《精编分子生物学实验指南》第四版,或者按照制造厂商所建议的步骤和条件。

[0038] 实施例1

[0039] 本发明用于辅助临床上肿瘤患者体内TP63-NTRK2融合基因诊断及个性化治疗方案的制定。试剂包括：红细胞裂解液、TRIzol、氯仿、无水乙醇、ReverTra Ace qPCR RT Kit (TOYOBO公司)。

[0040] 检测体系PCR反应液：ReverTra AceqPCR RT Kit (TOYOBO公司)；THUNDERBIRD Probe qPCR Mix (2×)、Actin内参基因及TP63-NTRK2目的基因的引物和探针浓度均为10μM；其中检测内参基因ABL和目的基因RET-PTC的引物和探针，分别为：

[0041] TP63-E6-F：GACAGGAAGGCGGATGAAGA；

[0042] NTRK2-E12-R：AGTGGGCTGGCAGAGTCATC；

[0043] NTRK2-E12-P：FAM-TCATTGCTGATAACGGAGGCTGGG-TAMRA；

[0044] NTRK2-E11-F：TTTTGGTAATGCTGTTTCTGCTT；

[0045] Actin-F：TGAGCGAGGCTACAGCTT；

[0046] Actin-R：TCCTTGATGTCGCGCACGATTT；

[0047] Actin-P：FAM-ACCACCACGGCCGAGCGG-TAMRA；

[0048] 阳性对照品：分别含TP63-NTRK2融合基因和NTRK2基因的溶液；阴性对照品：不含TP63-NTRK2融合基因和NTRK2基因的溶液。

[0049] 实施例2

[0050] 本方法的操作流程：

[0051] (1) 将组织在液氮中磨碎。每50-100mg组织加1ml裂解液RZ，用匀浆仪进行匀浆处理。样品体积不应超过裂解液RZ体积的十分之一。将匀浆样品在15-30℃放置5min，使得核蛋白复合物完全分离。4℃12,000rpm (~13,400×g) 离心5min，取上清，转入一个新的无RNase的离心管中。加入200μl氯仿，盖好管盖，剧烈振荡15sec，室温放置3min。4℃12,000rpm (~13,400×g) 离心10min，样品会分成三层：黄色的有机相，中间层和无色的水相，RNA主要在水相中，水相的体积约为所用裂解液RZ试剂的50%。把水相转移到新管中。缓慢加入0.5倍体积无水乙醇，混匀(此时可能会出现沉淀)。将得到溶液和沉淀一起转入吸附柱CR3中，4℃12,000rpm (~13,400×g) 离心30sec，若一次不能将全部溶液和混合物加入吸附柱CR3，请分两次转入吸附柱CR3中，4℃12,000rpm (~13,400×g) 离心30sec，弃掉收集管中的废液。向吸附柱CR3中加入500μl去蛋白液RD(使用前请先检查是否已加入乙醇)，4℃12,000rpm (~13,400×g) 离心30sec，弃废液，将CR3放入收集管中。向吸附柱CR3中加入500μl漂洗液RW(请先检查是否已加入乙醇)，室温静置2min，4℃12,000rpm (~13,400×g) 离心30sec，弃废液。重复上一步操作步骤。将吸附柱放入2ml收集管中，4℃12,000rpm (~13,400×g) 离心2min，去除残余液体。将吸附柱CR3转入一个新的1.5ml离心管中，加30-100μl RNase-Free ddH2O，室温放置2min，4℃12,000rpm (~13,400×g) 离心2min。

[0052] (2) 参考TOYOBO公司的ReverTra Ace qPCR RT Kit试剂盒说明书，将RNA反转为cDNA。

[0053] (3) 试剂配置：按检测人份数配置检测体系PCR反应液各X μl，每人份23μl分装：

[0054]  $X = 23\mu\text{l 反应液} \times (\text{n份标本} + 1\text{份阳性对照} + 1\text{份阴性对照} + 1\text{份空白对照})$ ；

[0055] (4) 加样：加入检测体系PCR反应液中2μlcDNA；阳性对照和阴性对照直接加2μl阳性对照品和阴性对照品；空白对照加2μl生理盐水或不加任何物质。

[0056] (5) 检测:检测在实时荧光PCR仪上进行,可用仪器包括ABI7300,7500(美国Applied Biosystems公司)等。反应条件:95℃预变性1min;95℃15s,58℃35sec 40个循环,荧光信号于58℃35sec时采集。

[0057] (6) 结果判断:将阈值线调整至背景信号及阴性扩增线以上,系统根据CT值来判断。

[0058] 1) 内参阳性时,检测结果才认为有效;

[0059] 2) 阳性判断标准: $Ct < 36$ ,为阳性; $36 \leq Ct \leq 38$ ,为疑似阳性,需要再次验证; $Ct > 38$ ,为阴性。

[0060] 实施例3

[0061] 采用本发明核酸检测方法检测临床标本

[0062] 取待检的临床肿瘤样本20例,按实施例2所述方法提取基因组、配制试剂并检测。每份样品加入检测体系PCR反应液中2 $\mu$ L。同时做阳性,阴性,空白对照。每个样本2次重复,3份阳性对照,1份阴性对照,检测时间仅为60分钟。

[0063] 20例筛查样本中所有样本的Actin均起线,说明样本正常可用。所有样本中均有NTRK2基因表达,但表达量较低,查阅资料可知NTRK2基因在大脑和甲状腺正常组织中有表达,在其它组织中表达量极低,与本实验结果一致。TP63-NTRK2融合基因除3个阳性对照品起线,20个检测样本都没有起线。实验结果如表1、图1和图2所示:

[0064] 表1 20例临床样本TP63-NTRK2表达水平

| 样品编号     | CT 值  |          |            | 结果 |
|----------|-------|----------|------------|----|
|          | Actin | NTRK2 基因 | TP63-NTRK2 |    |
| 1        | 25.37 | 34.10    | Undet      | 阴性 |
| 2        | 26.33 | 33.45    | Undet      | 阴性 |
| 3        | 24.14 | 31.02    | Undet      | 阴性 |
| 4        | 26.10 | 34.39    | Undet      | 阴性 |
| [0065] 5 | 23.97 | 35.41    | Undet      | 阴性 |
| 6        | 24.93 | 34.64    | Undet      | 阴性 |
| 7        | 26.27 | 37.79    | Undet      | 阴性 |
| 8        | 25.22 | 35.57    | Undet      | 阴性 |
| 9        | 24.25 | 35.67    | Undet      | 阴性 |
| 10       | 26.72 | 33.19    | Undet      | 阴性 |
| 11       | 25.48 | 34.29    | Undet      | 阴性 |

|        |    |       |       |       |    |
|--------|----|-------|-------|-------|----|
| [0066] | 12 | 27.13 | 36.02 | Undet | 阴性 |
|        | 13 | 23.72 | 35.68 | Undet | 阴性 |
|        | 14 | 24.48 | 35.10 | Undet | 阴性 |
|        | 15 | 27.13 | 33.40 | Undet | 阴性 |
|        | 16 | 23.72 | 31.68 | Undet | 阴性 |
|        | 17 | 25.48 | 30.62 | Undet | 阴性 |
|        | 18 | 24.13 | 31.30 | Undet | 阴性 |
|        | 19 | 26.35 | 32.85 | Undet | 阴性 |
|        | 20 | 23.47 | 33.29 | Undet | 阴性 |

## 序列表

<110> 福州艾迪康医学检验所有限公司

<120> 检测TP63-NTRK2融合基因及其相对表达水平的引物、探针和方法

<160> 7

<170> SIP0SequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 1

gacaggaagg cggatgaaga 20

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 2

agtgggctgg cagagtcac 20

<210> 3

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 3

tcattgctga taacggaggc tggg 24

<210> 4

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 4

ttttggtaat gctgtttctg ctt 23

<210> 5

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 5

tgagcgaggc tacagctt 18

<210> 6

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 6

tccttgatgt cgcgcacgat tt 22

<210> 7

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 7

accaccacgg ccgagcgg 18



图1



图2