

МОДИФИКАЦИЯ МУЛЬТИПЛЕКСНОЙ ПЦР В «РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ» ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ОЦЕНКИ ФРАКЦИЙ ВНЕКЛЕТОЧНОЙ ДНК РАЗНОГО РАЗМЕРА

Е. А. Соколова^{1,2}✉, И. В. Хлистун¹, Д. Н. Кушлинский³

¹ ООО «Биокод», Москва

² Лаборатория палеогеномики, факультет естественных наук, Новосибирский государственный университет, Новосибирск

³ Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н. Н. Блохина, Москва

Данные о распределении фрагментов внеклеточной ДНК (вкДНК) по фракциям в зависимости от их размера могут иметь диагностическую ценность. В статье описывается разработанный и валидированный авторами метод мультиплексной количественной полимеразной цепной реакции в «реальном времени» для исследования степени фрагментованности вкДНК плазмы крови. Метод основан на определении фрагментов Alu и hLINE-1 с помощью флуоресцентных зондов. Были подобраны последовательности праймеров и зондов, проведена оптимизация ПЦР и оценка динамического диапазона измерений и нижнего порога детекции. Аналитические характеристики метода: динамический диапазон измерений — 6 порядков, эффективность ПЦР — более 90 %. С использованием разработанного подхода было показано, что индекс фрагментированности вкДНК плазмы крови женщин с раком яичников стадий III–IV (n = 14) не отличается достоверно (p = 0,34) от этого показателя у здоровых женщин (n = 16). В дальнейшем следует проводить исследование на более крупной выборке, а также использовать электрофоретическую селекцию фрагментов вкДНК по фракциям.

Ключевые слова: внеклеточная ДНК, вкДНК, мультиплексная количественная ПЦР, Alu-повторы, hLINE-1-повторы, праймеры, флуоресцентный зонд

✉ **Для корреспонденции:** Соколова Екатерина Алексеевна
Новомещеренский проезд, д. 9, стр. 1, г. Москва, 119619; sokolovaea2608@yandex.ru

Статья получена: 25.08.2017 **Статья принята к печати:** 30.08.2017

MODIFIED MULTIPLEX REAL-TIME PCR FOR QUANTIFICATION OF DIFFERENTLY SIZED CELL-FREE DNA FRAGMENTS

Sokolova EA^{1,2}✉, Khlistun IV¹, Kushlinsky DN³

¹ Biocode Ltd., Moscow, Russia

² Laboratory of Paleogenomics, Faculty of Natural Sciences, Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

³ N. N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Moscow, Russia

There is evidence that size distribution of cell-free DNA (cfDNA) fragments can be diagnostically relevant. The present work describes a multiplex quantitative real-time polymerase chain reaction technique modified and validated by the authors to study the degree of cfDNA fragmentation in blood plasma. Based on the detection of Alu and hLINE-1 repeats, this technique employs fluorescent probes. We selected suitable primers and probes, optimized PCR conditions and estimated the dynamic range and sensitivity threshold of the assay. The modified PCR had a dynamic range of 6 logs, its efficiency being over 90 %. We demonstrated that cfDNA fragmentation index did not differ significantly between healthy women (n = 16) and women with stage III–IV ovarian cancer (n = 14). Therefore, further research on a larger sample is needed using electrophoretic cfDNA fractionation.

Keywords: cell-free DNA, cfDNA, multiplex quantitative PCR, Alu repeats, hLINE-1 repeats, primers, fluorescent probe

✉ **Correspondence should be addressed:** Ekaterina Sokolova
Novomereshensky proezd, d. 9, str. 1, Moscow, Russia, 119619; sokolovaea2608@yandex.ru

Received: 25.08.2017 **Accepted:** 30.08.2017

Количественный анализ циркулирующей внеклеточной ДНК (вкДНК) для оценки терапевтической эффективности новых антиметастатических препаратов в ксенотрансплантатах был предложен в 1998 г. [1]. Он был основан на ПЦР-амплификации последовательностей Alu генома человека с использованием ³²P-меченного 2'-дезокситидин-5'-трифосфата (dCTP) и обладал высокой чувствительностью (обнаружение эквивалента одной опухолевой клетки человека в 1 × 10⁶ мышинных клеток), достигаемой

за счет высокого содержания последовательностей Alu в геномной ДНК человека. Alu-повторы представляют собой характерные для приматов повторяющиеся элементы ДНК, рассеянные по геному в количестве от 500 тыс. до 1 млн копий. Ввиду высокой копийности и относительной консервативности они представляют собой отличную мишень для амплификации малых количеств ДНК человека [2]. В 2002 г. с целью адаптации к рутинному применению метод был модифицирован: было предложено применять

полимеразную цепную реакцию (ПЦР) в «реальном времени» с детекцией сигнала с помощью интеркалирующего красителя [3, 4]. Достоинства метода навели исследователей на мысль разработать аналогичную систему для семейства повторов hLINE-1, длина консенсусной последовательности которого около 6 тпн, а частота — примерно 200 тыс. копий на геном человека [5]. В 2007 г. была опубликована работа, описывающая подход к оценке количества вкДНК с помощью ПЦР в «реальном времени» для hLINE-1 [6].

Количественный анализ циркулирующей вкДНК ранее рассматривался как потенциальный метод выявления рака яичников у женщин. Несмотря на наличие отдельных публикаций с обнадеживающими результатами, в целом для метода характерны не очень высокие значения по ряду важных диагностических параметров [7]. Соотношение длинных (более 180 п. н.) и коротких фрагментов вкДНК может являться более перспективным маркером опухоли. Предполагается, что продуктом некроза клеток опухоли могут быть более длинные фрагменты ДНК, что изменяет соотношение различных форм вкДНК [8].

С помощью количественной ПЦР с различными размерами ампликона несколько исследователей показали, что более длинные фрагменты ДНК составляют значительную долю от общего количества вкДНК у больных раком [9, 10]. Эта доля уменьшалась на фоне лечения, а ее сохранение было связано с плохим прогнозом [9]. В то же время в других исследованиях при анализе одновременно длины ампликона и специфичных для опухолевой ДНК соматических мутаций было показано, что опухолевая вкДНК, напротив, короче [11]. Можно также предположить, что степень фрагментированности опухолевой вкДНК может зависеть от типа рака и преобладания какого-либо типа клеточной гибели.

В настоящей работе мы описываем метод мультиплексной количественной ПЦР, разработанный, валидированный и примененный нами для исследования степени фрагментированности опухолевой вкДНК при карциноме яичников.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

В исследовании приняли участие пациентки Национального медицинского исследовательского центра онкологии им. Н. Н. Блохина. Критерий включения в исследование — серозная аденокарцинома яичников стадий III–IV. Группу пациенток с раком яичников составили 14 женщин со средним возрастом 64,3 ± 5,6 года (медиана — 64 года), а контрольную — 16 условно здоровых женщин без онкологических заболеваний со средним возрастом 60,8 ± 8,2 года (медиана — 60,5 года). Исследование было одобрено локальным этическим комитетом НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина (протокол № 3 от 16.05.2016). Данные об участниках исследования были деперсонифицированы.

В качестве биологического материала для исследования использовали плазму крови. Образцы крови условно здоровых женщин были получены при проведении плановых биохимических анализов. Кровь отбирали в количестве 6 мл в вакутейнеры с ЭДТА. Затем пробы центрифугировали при 2 000 g в течение 10 мин, плазму переносили в новые пробирки и повторно центрифугировали при 2 000 g в течение 10 мин. Аликвоты плазмы после центрифугирования вновь переносили в новые пробирки и хранили при -70 °С. Аликвоты размораживали непосредственно перед выделением ДНК. Выделение ДНК проводили с помощью набора QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit (Qiagen, Нидерланды).

Дизайн праймеров и флуоресцентных зондов для Alu и hLINE-1

Для выбора олигонуклеотидных праймеров и флуоресцентного зонда для Alu нами было проведено выравнивание консенсусных последовательностей наиболее распространенных семейств Alu-повторов: Alu Sx, Alu Sp и Alu Y [12] (рис. 1).

Для hLINE-1 последовательности праймеров были заимствованы из статьи [6]. Флуоресцентный зонд разрабатывали самостоятельно с помощью программы UGENE

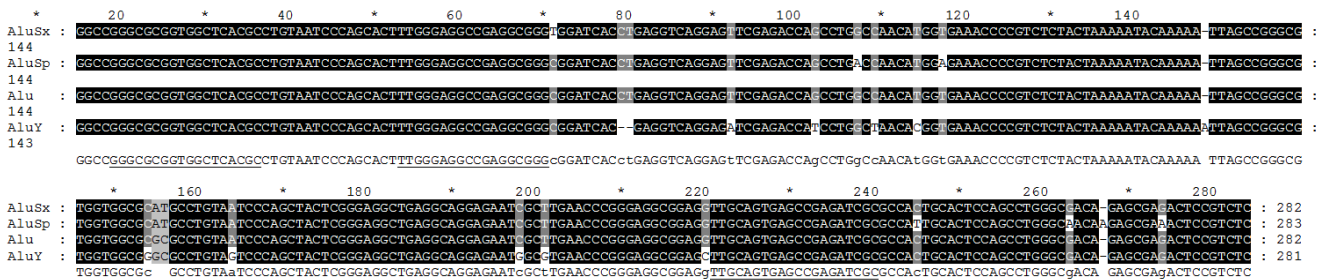


Рис. 1. Выравнивание консенсусных нуклеотидных последовательностей разных семейств Alu-повторов. Позиции выбранных олигонуклеотидных праймеров и флуоресцентного зонда выделены подчеркиванием. Темно-серым цветом выделены позиции, в которых нуклеотид совпадает с консенсусной последовательностью (нижняя строка), светло-серым — позиции с заменой в нуклеотидной последовательности. Прочерк — делеция нуклеотида по данной позиции

Таблица 1. Структуры праймеров и флуоресцентных зондов для Alu и hLINE-1

Наименование	Последовательность	Длина продукта амплификации, п. н.
Alu-U	5'-GGGCGCGGTGGCTCACGC-3'	235
Alu-R	5'-GCGATCTCGGCTCACTGCAA-3'	
Alu-Pr	5'-FAM-TTGGGAGGCCGAGGCGGG-BHQ-3'	
LN-U	5'-TCACTCAAAGCCGCTCAACTAC-3'	82
LN-R	5'-TCTGCCTTCATTCGTTATGTACC-3'	
LN-Pr	5'-HEX-TGGAAACTGAACACCTGCTCCTG-BHQ-3'	

software v1.14 [13] и OligoAnalyzer software v1.0.3 (Teemu Kuulasmaa, Финляндия). Для возможности мультиплексирования ПЦР для Alu и hLINE-1 флуоресцентные зонды содержали разные красители. Структура праймеров и флуоресцентных зондов для Alu и hLINE-1, а также длины амплификационных продуктов приведены в табл. 1.

Определение вкДНК в плазме крови методом ПЦР в «реальном времени»

ПЦР в «реальном времени» была проведена на приборе CFX96 Thermal Cycler (Bio-Rad, США). Объем амплификационной смеси составлял 25 мкл и содержал 65 мМ Tris-HCl (pH 8,9), 24 мМ сульфата аммония, 3,5 мМ хлорида магния, 0,05 % Tween-20, 0,2 мМ dNTP, 0,3 мМ каждого праймера, 0,1 мМ каждого флуоресцентного зонда (табл. 1) и 1 ед. акт. термостабильной модифицированной Taq-полимеразы («Интерлабсервис», Россия). ПЦР проводили по протоколу: денатурация — 15 мин при 96 °С с последующими 45 циклами по 10 с при 96 °С и 30 с при 58 °С. Оптимальную температуру отжига подбирали эмпирически.

Динамический диапазон измерений, нижний порог детекции мультиплексной ПЦР

Первоначальную концентрацию раствора двухнитевой ДНК проверяли спектрофотометрически на длине волны 260 нм (NanoDrop LITE, Thermo Fisher Scientific, США). Отношение поглощения на длинах волн 260 и 280 нм (A260/280) использовали для оценки чистоты препарата. Динамический диапазон измерений и нижний порог детекции мультиплексной ПЦР оценивали с помощью 7 последовательных 10-кратных разведений геномной ДНК человека известной концентрации (80 нг/мкл). Измерение каждого образца проводили в 3 повторностях. Нижний порог детекции использовали для демонстрации чувствительности детекции разработанного метода и определяли его как количество ДНК человека на 1 мкл образца.

Статистическая обработка данных

Оценку эффективности мультиплексной ПЦР (E) и динамического диапазона линейности (R^2) проводили с помощью программного обеспечения, поставляемого с прибором CFX96 Thermal Cycler — Bio-Rad CFX Manager Software v3.1. Статистическую значимость различий между соотно-

шениями фракций (R) в экспериментальной и контрольной группах оценивали с помощью непараметрического критерия Манна–Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Оптимизация условий мультиплексной ПЦР

Оптимизацию условий мультиплексной ПЦР проводили путем подбора оптимальной температуры отжига в диапазоне 55–68 °С. Наилучшее соотношение уровней флуоресценции и максимальная эффективность мультиплексной ПЦР была при температуре отжига 58 °С.

Динамический диапазон измерений, нижний порог детекции мультиплексной ПЦР

Мы провели эксперимент с использованием 7 последовательных 10-кратных разведений геномной ДНК человека в концентрации 80 нг/мкл, в результате были получены калибровочные кривые (рис. 2). Аликвота каждого разведения была оценена в 3 повторностях. Динамический диапазон линейности мультиплексной ПЦР составил 6 порядков (рис. 3). Эффективность ПЦР для фрагмента Alu составила 94,6 % (линейность $R^2 = 0,988$), для фрагмента hLINE-1 — 92,1 % (линейность $R^2 = 0,996$).

Нижний порог детекции был определен также с использованием 7 последовательных 10-кратных разведений геномной ДНК человека в концентрации 80 нг/мкл, каждая аликута — в 3 повторностях (в нг/мкл: A1 = 80, A2 = 8, A3 = 0,8, A4 = 0,08, A5 = 0,008, A6 = 0,0008, A7 = 0,00008, A8 = 0,000008) и при наличии отрицательного контроля реакции. Для обоих компонентов мультиплексной ПЦР (Alu и hLINE-1) нижний порог детекции составил 0,08 пг/мкл.

Анализ вкДНК в плазме крови женщин с раком яичников и здоровых женщин

Разработанный метод для количественного определения последовательностей Alu и hLINE-1 генома человека был применен для оценки соотношения фракций вкДНК в плазме крови женщин с раком яичников (n = 14) и условно здоровых женщин без онкологических заболеваний (n = 16). Значение соотношения фракций (R) рассчитывали, деля количество фрагмента Alu (размером 235 п. н.) в условных единицах на количество фрагмента hLINE-1

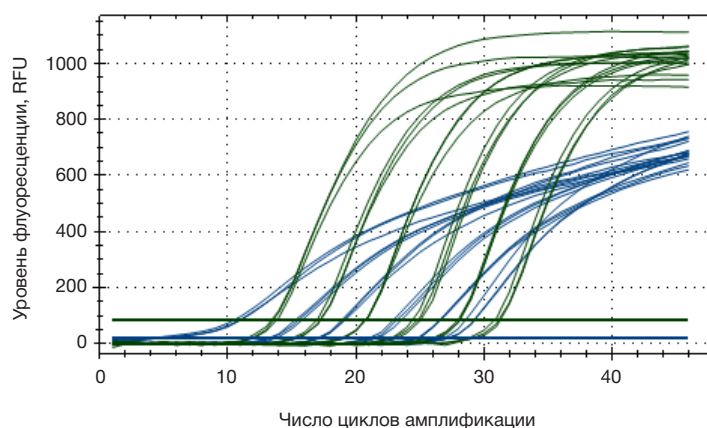


Рис. 2. График мультиплексной ПЦР для Alu и hLINE-1. По оси абсцисс указаны циклы ПЦР, по оси ординат — уровень флуоресценции в относительных единицах RFU. Кривые синего цвета — для зонда FAM, зеленого цвета — для зонда HEX

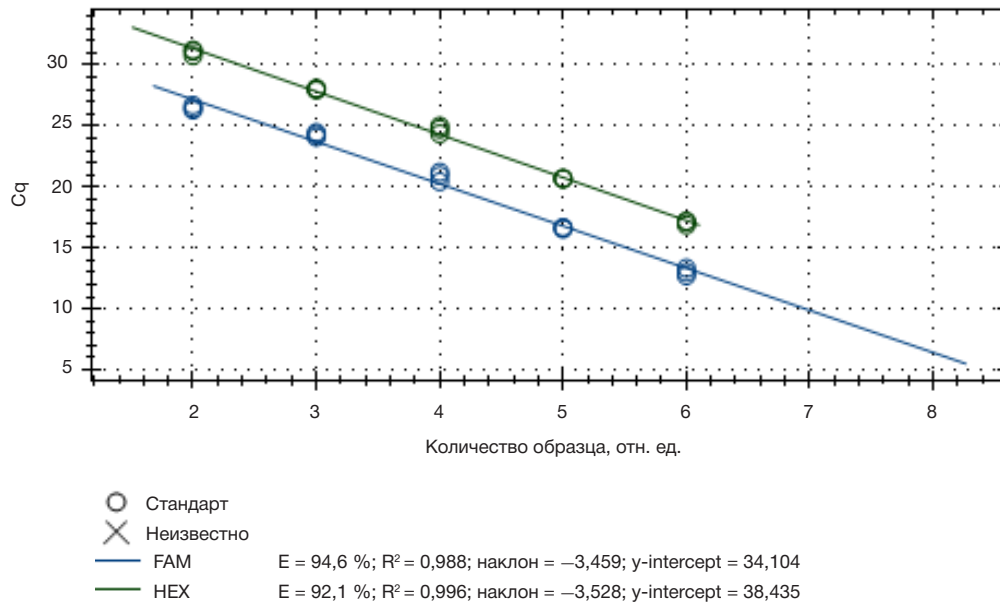


Рис. 3. Динамический диапазон измерений. Ось абсцисс — количество образца в относительных единицах, ось ординат — пороговый цикл Cq. Каждое измерение — в 3 повторностях

(размером 82 п. н.) также в условных единицах. Нами не были выявлены достоверные различия по R между группами (табл. 2, рис. 4).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Наше исследование показало, что разработанный метод мультиплексной ПЦР в «реальном времени» на основе Alu и hLINE-1 является надежным, точным и чувствительным методом количественного определения плазменной вкДНК по следующим причинам. Во-первых, по сравнению с уже существующими методами детекции вкДНК на основе Alu и hLINE-1 он предполагает использование флуоресцентных зондов. Это гарантирует специфичность детекции продуктов ПЦР в отличие от их детекции с помощью интеркалирующего красителя [3, 4, 14]. Во-вторых, использование флуоресцентных зондов дает возможность мультиплексирования ПЦР, что сокращает количество манипуляций и продолжительность анализа. В-третьих, метод имеет адекватные аналитические характеристики: динамический диапазон измерений — 6 порядков, эффективность ПЦР — более 90 %. В-четвертых, нижний порог детекции составил 0,08 пг/мкл образца, что на 4–5 порядков ниже концентрации вкДНК, обычно выделяемой из плазмы крови здоровых пациентов, например при выделении вкДНК с помощью коммерческого набора QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit из 1 мл плазмы с последующей элюцией ДНК в конечный объем 50 мкл концентрация образцов — 0,5–1,5 нг/мкл [15]. И, наконец, использование ампликонов различной длины в мультиплексной ПЦР позволяет оценить степень фрагментированности опухолевой вкДНК.

Мы применили разработанный метод на небольшой выборке пациенток с раком яичников (n = 14). Сравнение значений соотношения фракций вкДНК (R) между группой женщин с онкологическим заболеванием и контрольной группой условно здоровых женщин не выявило статистически значимых различий (p = 0,34). Тем не менее пока рано говорить о действительном отсутствии различий — и ввиду малой выборки, и ввиду довольно грубой оценки

распределения фракций с использованием всего двух референтных длин — 235 и 82 п. н. Дальнейшие исследования, в том числе включающие электрофоретическую селекцию фрагментов вкДНК по фракциям, с применением количественной ПЦР должны способствовать появлению более рационального дизайна диагностических систем для выявления соматических мутаций в опухолевой вкДНК.

ВЫВОДЫ

Нами разработан и валидирован метод мультиплексной ПЦР для количественной оценки разных по размеру

Таблица 2. Результаты статистического анализа данных о соотношении фракций длинных и коротких фрагментов вкДНК (R), полученной из плазмы крови женщин с раком яичников и здоровых женщин

Группа	Медиана R	m ± SD	p (критерий Манна-Уитни)
Женщины с раком яичников (n = 14)	2,56	2,9 ± 2,0	0,34
Здоровые женщины (n = 16)	3,08	3,2 ± 1,7	

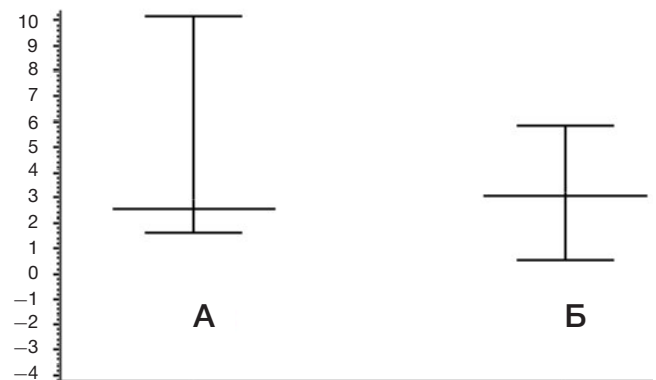


Рис. 4. Соотношение фракций длинных и коротких фрагментов вкДНК (R), в плазме крови женщин с раком яичников (А) и здоровых женщин (Б)

фракций внеклеточной ДНК с хорошими аналитическими характеристиками: динамический диапазон измерений — 6 порядков, эффективность ПЦР — более 90 %. С использованием разработанного метода показали, что индексы фрагментированности вкДНК в группе женщин с раком

яичников и в группе условно здоровых женщин без онкопатологий достоверно не различаются. Необходимы дальнейшие исследования на более значительных выборках и с применением электрофореза для разделения фракций вкДНК.

Литература

- Kim J, Yu W, Kovalski K, Ossowski L. Requirement for Specific Proteases in Cancer Cell Intravasation as Revealed by a Novel Semiquantitative PCR-Based Assay. *Cell*. 1998 Aug 7; 94 (3): 353–62.
- Deininger P. Alu elements: know the SINEs. *Genome Biol*. 2011 Dec 28; 12 (12): 236. DOI: 10.1186/gb-2011-12-12236.
- Zijlstra A, Mellor R, Panzarella G, Aimes RT, Hooper JD, Marchenko ND et al. A quantitative analysis of rate-limiting steps in the metastatic cascade using human-specific real-time polymerase chain reaction. *Cancer Res*. 2002 Dec 1; 62 (23): 7083–92.
- Schneider T, Osl F, Friess T, Stockinger H, Scheuer WV. Quantification of human Alu sequences by real-time PCR — an improved method to measure therapeutic efficacy of anti-metastatic drugs in human xenotransplants. *Clin Exp Metastasis*. 2002; 19 (7): 571–82.
- Boissinot S, Sookdeo A. The Evolution of LINE-1 in Vertebrates. *Genome Biol Evol*. 2016 Dec 1; 8 (12): 3485–507. DOI: 10.1093/gbe/evw247.
- Rago C, Huso DL, Diehl F, Karim B, Liu G, Papadopoulos N et al. Serial Assessment of Human Tumor Burdens in Mice by the Analysis of Circulating DNA. *Cancer Res*. 2007 Oct 1; 67 (19): 9364–70. DOI: 1.1158/0008-5472.Can-06-0705.
- Zhou Q, Li W, Leng B, Zheng W, He Z, Zuo M et al. Circulating Cell Free DNA as the Diagnostic Marker for Ovarian Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One*. 2016 Jun 2; 11 (6): e0155495. DOI: 10.1371/journal.pone.0155495.
- Jahr S, Hentze H, Englisch S, Hardt D, Fackelmayer FO, Hesch RD et al. DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. *Cancer Res*. 2001 Feb 15; 61 (4): 1659–65.
- Umetani N, Giuliano AE, Hiramatsu SH, Amersi F, Nakagawa T, Martino S et al. Prediction of breast tumor progression by integrity of free circulating DNA in serum. *J Clin Oncol*. 2006 Sep 10; 24 (26): 4270–6. DOI: 10.1200/JCO.2006.05.9493.
- Ellinger J, Bastian PJ, Haan KI, Heukamp LC, Buettner R, Fimmers R et al. Noncancerous PTGS2 DNA fragments of apoptotic origin in sera of prostate cancer patients qualify as diagnostic and prognostic indicators. *Int J Cancer*. 2009 Jan 1; 122 (1): 138–43. DOI: 10.1002/ijc.23057.
- Mouliere F, Robert B, Arnau Peyrotte E, Del Rio M, Ychou M, Molina F et al. High fragmentation characterizes tumour-derived circulating DNA. *PLoS One*. 2011; 6 (9): e23418. DOI: 10.1371/journal.pone.0023418.
- Britten RJ. Evolutionary selection against change in many Alu repeat sequences interspersed through primate genomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 Jun 21; 91 (13): 5992–6.
- Okonechnikov K, Golosova O, Fursov M, the UGENE team. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. *Bioinformatics*. 2012 Apr 15; 28: 1166–7. DOI: 10.1093/bioinformatics/bts091.
- Lou X, Hou Y, Liang D, Peng L, Chen H, Ma S et al. A novel Alu-based real-time PCR method for the quantitative detection of plasma circulating cell-free DNA: Sensitivity and specificity for the diagnosis of myocardial infarction. *Int J Mol Med*. 2015 Jan; 35 (1): 72–80. DOI: 10.3892/ijmm.2014.1991.
- Jung K, Fleischlacker M, Rabien A. Cell-free DNA in the blood as a solid tumor biomarker—a critical appraisal of the literature. *Clin Chim Acta*. 2010 Nov; 411 (21–22): 1611–24. DOI: 10.1016/j.cca.2010.07.032.
- Kim J, Yu W, Kovalski K, Ossowski L. Requirement for Specific Proteases in Cancer Cell Intravasation as Revealed by a Novel Semiquantitative PCR-Based Assay. *Cell*. 1998 Aug 7; 94 (3): 353–62.
- Deininger P. Alu elements: know the SINEs. *Genome Biol*. 2011 Dec 28; 12 (12): 236. DOI: 10.1186/gb-2011-12-12236.
- Zijlstra A, Mellor R, Panzarella G, Aimes RT, Hooper JD, Marchenko ND et al. A quantitative analysis of rate-limiting steps in the metastatic cascade using human-specific real-time polymerase chain reaction. *Cancer Res*. 2002 Dec 1; 62 (23): 7083–92.
- Schneider T, Osl F, Friess T, Stockinger H, Scheuer WV. Quantification of human Alu sequences by real-time PCR — an improved method to measure therapeutic efficacy of anti-metastatic drugs in human xenotransplants. *Clin Exp Metastasis*. 2002; 19 (7): 571–82.
- Boissinot S, Sookdeo A. The Evolution of LINE-1 in Vertebrates. *Genome Biol Evol*. 2016 Dec 1; 8 (12): 3485–507. DOI: 10.1093/gbe/evw247.
- Rago C, Huso DL, Diehl F, Karim B, Liu G, Papadopoulos N et al. Serial Assessment of Human Tumor Burdens in Mice by the Analysis of Circulating DNA. *Cancer Res*. 2007 Oct 1; 67 (19): 9364–70. DOI: 1.1158/0008-5472.Can-06-0705.
- Zhou Q, Li W, Leng B, Zheng W, He Z, Zuo M et al. Circulating Cell Free DNA as the Diagnostic Marker for Ovarian Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One*. 2016 Jun 2; 11 (6): e0155495. DOI: 10.1371/journal.pone.0155495.
- Jahr S, Hentze H, Englisch S, Hardt D, Fackelmayer FO, Hesch RD et al. DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. *Cancer Res*. 2001 Feb 15; 61 (4): 1659–65.
- Umetani N, Giuliano AE, Hiramatsu SH, Amersi F, Nakagawa T, Martino S et al. Prediction of breast tumor progression by integrity of free circulating DNA in serum. *J Clin Oncol*. 2006 Sep 10; 24 (26): 4270–6. DOI: 10.1200/JCO.2006.05.9493.
- Ellinger J, Bastian PJ, Haan KI, Heukamp LC, Buettner R, Fimmers R et al. Noncancerous PTGS2 DNA fragments of apoptotic origin in sera of prostate cancer patients qualify as diagnostic and prognostic indicators. *Int J Cancer*. 2009 Jan 1; 122 (1): 138–43. DOI: 10.1002/ijc.23057.
- Mouliere F, Robert B, Arnau Peyrotte E, Del Rio M, Ychou M, Molina F et al. High fragmentation characterizes tumour-derived circulating DNA. *PLoS One*. 2011; 6 (9): e23418. DOI: 10.1371/journal.pone.0023418.
- Britten RJ. Evolutionary selection against change in many Alu repeat sequences interspersed through primate genomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 Jun 21; 91 (13): 5992–6.
- Okonechnikov K, Golosova O, Fursov M, the UGENE team. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. *Bioinformatics*. 2012 Apr 15; 28: 1166–7. DOI: 10.1093/bioinformatics/bts091.
- Lou X, Hou Y, Liang D, Peng L, Chen H, Ma S et al. A novel Alu-based real-time PCR method for the quantitative detection of plasma circulating cell-free DNA: Sensitivity and specificity for the diagnosis of myocardial infarction. *Int J Mol Med*. 2015 Jan; 35 (1): 72–80. DOI: 10.3892/ijmm.2014.1991.
- Jung K, Fleischlacker M, Rabien A. Cell-free DNA in the blood as a solid tumor biomarker—a critical appraisal of the literature. *Clin Chim Acta*. 2010 Nov; 411 (21–22): 1611–24. DOI: 10.1016/j.cca.2010.07.032.