(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 115803462 A
(43)申请公布日 2023.03.14

(21)申请号 202180037170.5
(22)申请日 2021.04.20
(30)优先权数据
2020-076369 2020.04.22 JP
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2022.11.22
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/JP2021/015991 2021.04.20
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2021/215428 JA 2021.10.28
(71)申请人 日华化学株式会社
地址 日本福井县
(72)发明人 冈部绫子 中社彩香 法木左近
(74)专利代理机构 北京汇思诚业知识产权代理有限公司 11444
专利代理师 张黎 龚敏
(51)Int.Cl.
C12Q 1/6883(2006.01)
C12N 15/09(2006.01)

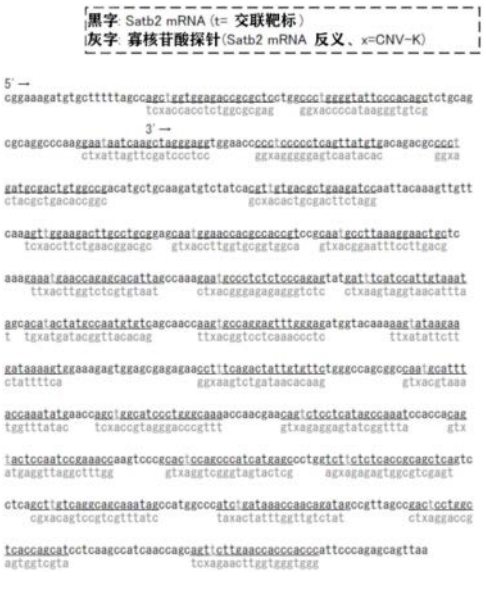
权利要求书2页 说明书14页
序列表15页 附图5页

(54)发明名称

核酸的检测方法及寡核苷酸探针

(57)摘要

本发明提供一种方法,作为靶序列的检测方法,其具备:杂交工序,所述杂交工序使寡核苷酸探针与所述核酸接触而形成真正杂交产物,所述寡核苷酸探针具有针对存在于被测试样中的核酸的靶序列的杂交用序列和在所述杂交用序列中与所述靶序列特异性地进行杂交时可通过光照射而与所述靶序列中的靶碱基交联的至少一个共价键合性基团;光照射工序,所述光照射工序对所述杂交工序后的被测试样进行光照射,使所述真正杂交产物中的共价键合性基团与靶序列之间交联而形成具有交联结构的真正杂交产物;以及变性工序,所述变性工序对光照射工序后的被测试样赋予可维持所述真正交联杂交产物且使非特异性杂交产物解离的变性条件,分离出源自非特异性杂交产物的所述寡核苷酸探针。



CN 115803462 A

1.一种核酸的检测方法,其具备:

杂交工序,其中,使寡核苷酸探针与存在于被测试样中的核酸接触而形成真正杂交产物,所述寡核苷酸探针具有针对所述核酸的靶序列的杂交用序列、以及在所述杂交用序列中与所述靶序列特异性地进行杂交时可通过光照射而与所述靶序列中的靶碱基交联的至少一个共价键合性基团;

光照射工序,其中,对所述杂交工序后的被测试样进行光照射,使所述真正杂交产物中的共价键合性基团与靶序列之间交联而形成具有交联结构的真正杂交产物;以及

变性工序,其中,对光照射工序后的被测试样赋予能够维持所述真正交联杂交产物且使非特异性杂交产物解离的变性条件,分离出源自非特异性杂交产物的所述寡核苷酸探针。

2.根据权利要求1所述的方法,其中,所述变性工序进一步包括如下工序:也促进真正杂交产物的杂交的解离,将源自所述真正杂交产物的所述寡核苷酸探针与所述真正交联杂交产物分离。

3.根据权利要求1或2所述的方法,其中,所述杂交工序是进行原位杂交的工序。

4.根据权利要求3所述的方法,其中,所述杂交工序是对培养细胞或从癌症患者采取的组织切片内供给所述寡核苷酸探针而实施的工序。

5.根据权利要求1～4中任一项所述的方法,其中,所述变性工序包含对于所述杂交工序后的被测试样用浓度超过60体积%的甲酰胺的水性介质混合液进行的变性。

6.根据权利要求1～5中任一项所述的方法,其中,所述变性工序包含使用室温以上的液体进行的变性。

7.根据权利要求1～6中任一项所述的方法,其中,所述变性工序包含用含有除甲酰胺以外的变性剂的变性液进行的变性。

8.根据权利要求7所述的方法,其中,除甲酰胺以外的变性剂为四甲基氯化铵。

9.根据权利要求1～8中任一项所述的方法,其中,所述光照射工序是照射最大波长340～380nm的光的工序。

10.根据权利要求1～9中任一项所述的方法,其中,所述杂交用序列为5个碱基以上且200个碱基以下。

11.根据权利要求1～10中任一项所述的方法,其中,所述靶序列为人类HER2蛋白质mRNA中的RNA序列。

12.根据权利要求1～10中任一项所述的方法,其中,所述靶序列为Satb2蛋白质mRNA中的RNA序列。

13.根据权利要求1～10中任一项所述的方法,其中,所述靶序列为EBER小RNA中的RNA序列。

14.根据权利要求1～10中任一项所述的方法,其中,所述靶序列为28SrRNA中的RNA序列。

15.根据权利要求1～14中任一项所述的方法,其中,所述变性工序包含对于所述杂交工序后的被测试样用80体积%的甲酰胺的水性介质混合液进行的变性。

16.一种用于检测核酸的寡核苷酸探针,其具备:可与所述核酸的靶序列进行杂交的杂交用序列、以及在所述杂交用序列中与所述靶序列特异性地进行杂交时可通过光照射而与

所述靶序列中的靶碱基交联的至少一个共价键合性基团，

所述杂交用序列及至少一个共价键合性基团被构成为:能够维持真正交联杂交产物，并选择性地去除非特异性杂交产物，

所述真正交联杂交产物为所述杂交用序列与所述靶序列进行杂交而得到的真正杂交产物且通过所述光照射进行了交联。

17.一种标记寡核苷酸的检测试剂盒,其具备:

权利要求16所述的寡核苷酸探针;和

与浓度超过60体积%的甲酰胺的水性介质混合液同等以上的变性剂。

核酸的检测方法及寡核苷酸探针

技术领域

[0001] (相关申请的相互参照)

本申请主张基于2020年4月22日申请的日本专利申请2020-76369的优先权,在此,作为构成本说明书的一部分,援用该日本专利申请的内容。

本说明书涉及一种核酸的检测方法及寡核苷酸探针。

背景技术

[0002] 寡核苷酸探针逐渐成为在观察基因的突变或扩增的疾病方面有用的诊断工具。例如,与从细胞或组织等被检体提取的DNA或mRNA等的杂交对于通过检测这样的DNA等而能够诊断出来的感染症或肿瘤等的诊断是有用的(专利文献1)。

[0003] 杂交虽然是有用的方法,但仍存有各种问题。例如,若为了充分提高杂交效率,在低温下进行杂交,则杂交的特异性会降低。另一方面,若在更高温度下进行杂交,则虽然提升了特异性,但灵敏度会降低。作为一个解决方案,现状是设计高Tm的探针,实现兼顾杂交效率的确保与杂交特异性。另外,为了提升特异性,在杂交后在高严格性条件下进行充分的清洗也是一个方法。

现有技术文献

[0004] 专利文献

专利文献1:日本专利特开2015-142574号公报

[0005] 然而,为了Tm的高温化而增长探针长度,由此会发生针对靶序列的特异性降低的问题。另外,即使采用在高严格性条件下的清洗,仍有非特异性杂交产物残留或清洗掉特异性杂交产物等明显使疾病的检查的准确度降低的可能性。另一方面,并非容易设定仅使特异性杂交产物残留这样的严格性条件。另外,为了Tm的高温化,开发出肽核酸(PNA),但即使在使用肽核酸时,也不易在高严格性条件下进行清洗。

[0006] 由以上所述,不易通过组合由探针的Tm高温化所致的杂交时的低严格性及清洗时的高严格性来提升检查的准确度及确保再现性。

[0007] 在利用杂交的检查,例如原位(in situ)杂交等中,要求确立无需大幅依赖以往的严格调节,而实现准确度及再现性优良的检查的核酸的检测方法。

发明内容

[0008] 本说明书提供一种实现高准确度及再现性的诊断的核酸的检测方法。另外,提供一种在该检测方法中使用的寡核苷酸探针。

[0009] 本发明人等获得以下见解:在寡核苷酸探针内具备可进行光交联的官能团,在杂交工序后取得通过光交联而交联的杂交产物,其后,对被测试样赋予杂交产物的变性条件,可解决上述课题。本说明书基于这样的见解而提供以下的手段。

[0010] [1]一种核酸的检测方法,其具备:

杂交工序,所述杂交工序使寡核苷酸探针与所述核酸接触而形成真正杂交产物,

所述寡核苷酸探针具有针对存在于被测试样中的核酸的靶序列的杂交用序列和在所述杂交用序列中与所述靶序列特异性地进行杂交时可通过光照射而与所述靶序列中的靶碱基交联的至少一个共价键合性基团；

光照射工序，所述光照射工序对所述杂交工序后的被测试样进行光照射，使所述真正杂交产物中的共价键合性基团与靶序列之间交联而形成具有交联结构的真正杂交产物；以及

变性工序，所述变性工序对光照射工序后的被测试样赋予可维持所述真正交联杂交产物且使非特异性杂交产物解离的变性条件，分离出源自非特异性杂交产物的所述寡核苷酸探针。

[2]根据[1]所述的方法，其中，所述变性工序进一步包括如下工序：也促进真正杂交产物的杂交的解离，将源自所述真正杂交产物的所述寡核苷酸探针与所述真正交联杂交产物分离。

[3]根据[1]或[2]所述的方法，其中，所述杂交工序是进行原位杂交的工序。

[4]根据[3]所述的方法，其中，所述杂交工序是对培养细胞或从癌症患者等采取的组织切片内供给所述寡核苷酸探针而实施的工序。

[5]根据[1]～[4]中任一项所述的方法，其中，所述变性工序包含对于所述杂交工序后的被测试样利用浓度超过60体积％的甲酰胺的水性介质混合液进行的变性。

[6]根据[1]～[5]中任一项所述的方法，其中，所述变性工序包含使用室温以上的液体进行的变性。

[7]根据[1]～[6]中任一项所述的方法，其中，所述变性工序包含利用含有除甲酰胺以外的变性剂的变性液进行的变性。

[8]根据[7]所述的方法，其中，除甲酰胺以外的变性剂为四甲基氯化铵。

[9]根据[1]～[8]中任一项所述的方法，其中，所述光照射工序是照射最大波长340～380nm的光的工序。

[10]根据[1]～[9]中任一项所述的方法，其中，所述杂交用序列为5个碱基以上且200个碱基以下。

[11]根据[1]～[10]中任一项所述的方法，其中，所述靶序列为人类HER2蛋白质mRNA中的RNA序列。

[12]根据[1]～[10]中任一项所述的方法，其中，所述靶序列为Satb2蛋白质mRNA中的RNA序列。

[13]根据[1]～[10]中任一项所述的方法，其中，所述靶序列为EBER小RNA中的RNA序列。

[14]根据[1]～[10]中任一项所述的方法，其中，所述靶序列为28SrRNA中的RNA序列。

[15]根据[1]～[14]中任一项所述的方法，其中，所述变性工序包含对于所述杂交工序后的被测试样利用80体积％的甲酰胺的水性介质混合液进行的变性。

[16]一种探针，其是用于检测核酸的寡核苷酸探针，

具备：可与所述核酸的靶序列进行杂交的杂交用序列；和在所述杂交用序列中与所述靶序列特异性地进行杂交时可通过光照射而与所述靶序列中的靶碱基交联的至少一

个共价键合性基团，

所述杂交用序列及至少一个共价键合性基团被构成为:能够维持真正交联杂交产物,并选择性地去除非特异性杂交产物，

所述真正交联杂交产物为所述杂交用序列与所述靶序列进行杂交而得到的真正杂交产物且通过所述光照射进行了交联。

[17]一种试剂盒,其是标记寡核苷酸的检测试剂盒,具备:

[16]所述的寡核苷酸探针;和

与浓度超过60体积%的甲酰胺的水性介质混合液同等以上的变性剂。

附图说明

[0011] 图1为表示针对Satb2蛋白质mRNA的探针的设计的图。

图2为表示采取自小鼠的大脑切片中的Satb2蛋白质mRNA CISH的图,(A)表示利用具有共价键合性基团的探针进行的伴随着共价键合的杂交(以80体积%甲酰胺水溶液变性/清洗后),(B)表示利用具有共价键合性基团的探针进行的伴随着共价键合的杂交(以80体积%甲酰胺TBS溶液变性/清洗后)。

图3为表示基于HER2蛋白质mRNA CISH的杂交的图,(A)表示HER2阳性细胞中的利用具有共价键合性基团的探针进行的伴随着共价键合的杂交(以80体积%甲酰胺水溶液变性/清洗后),(B)表示HER2阴性细胞中的利用具有共价键合性基团的探针进行的伴随着共价键合的杂交(以80体积%甲酰胺水溶液变性/清洗后)。

图4为表示基于EBER(EB病毒产生小RNA)CISH的杂交的图,(A)表示利用具有共价键合性基团的探针进行的伴随着共价键合的杂交(以80体积%2×SSC溶液、55℃变性/清洗后),(B)表示利用不具有共价键合性基团的探针进行的伴随着共价键合的杂交(以80体积%2×SSC溶液、55℃变性/清洗后)。

图5为表示基于EBER(EB病毒产生小RNA)CISH的杂交的图,(A)表示利用具备共价键合性基团的探针进行的伴随着共价键合的室温杂交(基于50体积%甲酰胺2×SSC(室温)的变性/清洗后),(B)表示利用市售PNA探针进行的55℃杂交(基于严格缓冲液、55℃的变性/清洗后)。

具体实施方式

[0012] 本说明书的公开涉及一种核酸的检测方法及寡核苷酸探针。根据本说明书所公开的核酸的检测方法(以下,简称为本检测方法),真正交联杂交产物为高特异性且不可逆地键合于靶序列。因此,只要为可维持真正交联杂交产物且使非特异性杂交产物解离的变性条件,即可容易地从非特异性杂交产物分离出真正交联杂交产物并进行检测。即,根据上述变性条件,无需大幅依赖严格性强度,能以优良的准确度及再现性检测出具备靶序列的核酸。作为结果,能以高灵敏度检测出真阳性,并以高特异度检测出真阴性。

[0013] 以下,针对本说明书的公开的代表性且非限定性的具体例,适当参照附图,详细进行说明。此详细说明仅意图对本领域技术人员示出用于实施本公开的优选例的细节,而非意图限定本公开的范围。另外,对于以下所公开的追加的特征以及发明,为了进一步提供得以改善的核酸的检测方法,可有别于其他特征或公开,或共同使用。

[0014] 另外，以下详细说明所公开的特征或工序的组合并非是以最广意义实施本公开时必须的内容，而是仅为了特别说明本公开的代表具体例而记载的内容。此外，上述及下述的代表性具体例的各种特征以及在独立及从属权利要求中记载的各种特征，在提供本公开的追加且有用的实施方式时，并不必须是如此处所记载的具体例，或者如列举的顺序地组合。

[0015] 在本说明书和/或权利要求中记载的所有特征有别于实施例和/或在权利要求中记载的特征的构成，针对申请当时的公开以及权利要求的特定事项加以限定，意图个别且彼此独立地公开。进而，与所有数值范围及群组或集团有关的记载针对申请当时的公开以及权利要求的特定事项加以限定，是有意图公开这些的中间构成而作出的。

[0016] 以下，针对本说明书所公开的核酸的检测方法及寡核苷酸探针等进行详细说明。

[0017] 此外，本说明书中，被测试样并没有特别限定，只要是要求检测作为靶标的核酸的试样即可。因此，被测试样只要是可能含有想要检测的核酸的试样即可，除直接采取自天然或生物体的试样外，也包含针对这样的试样，提取出试样中的DNA或RNA的试样及将这样的试样中的DNA或RNA，通过公知的核酸扩增方法等使其含量增大或经反转录的试样。被测试样可举出例如由人类或家畜等动物人为采取或自然分离的血液、尿液等各种生物体液体试样、细胞试样及组织试样以及针对这些进行核酸的提取/扩增/反转录等的加工试样等所谓医疗上或卫生上的被检体试样。另外，在被测试料中包含由植物或其他生物人为采取或自然分离的各种部分或方式的生物体试样或加工试样。进而，在被测试样中包含是非医疗目的且可能含有核酸的试样。

[0018] 另外，在本说明书中，核酸除生物体保持的DNA及RNA即天然核酸外，只要具有本说明书所公开的与寡核苷酸探针的交联键合性，则也包含含有针对这些的构成部分的修饰的修饰DNA及RNA。另外，作为DNA，只要是生物体可保持的源自天然的DNA或由外部人工导入的DNA，则没有特别限定，包含基因组或质体等载体上的DNA。另外，作为RNA，只要是生物体可保持的源自天然的RNA或由外部导入的RNA，则并没有特别限定，包含mRNA、tRNA、rRNA、siRNA或miRNA等ncRNA、核酶及双链RNA等。

[0019] 例如，作为靶序列，并没有特别限定，包含作为公知的核酸的检测方法的对象的核酸中的靶序列。作为靶序列，例如为与该生物中特定基因有关的核酸及其他序列上的特征、与表征该生物个体的基因有关的核酸上的突变及其他序列上的特征、与表征该动物或植物的疾病或病原体的基因有关的核酸、该核酸上的突变、其他序列上的特征等的至少一部分的序列。

[0020] (核酸的检测方法)

本说明书所公开的核酸的检测方法使用寡核苷酸探针，所述寡核苷酸探针具有针对存在于被测试样中的核酸的靶序列的杂交用序列和在所述杂交用序列中与所述靶序列特异性地进行杂交时可通过光照射而与所述靶序列中的靶碱基交联的至少一个共价键合性基团。以下，对寡核苷酸探针加以说明，其后，针对本检测方法加以说明。

[0021] (寡核苷酸探针)

本说明书所公开的寡核苷酸探针(以下，也称为本探针)以具有作为天然核酸或修饰核酸已知的骨架的单链核酸进行制备。作为脱氧核糖或核糖以外的核酸骨架，可举出例如D-苏氨醇等公知的骨架。本探针具有例如可以被修饰的脱氧核糖和/或核糖通过磷酸二酯键或其他类似的连结基团所致的键合连结而成的骨架。另外，对于本探针而言，作为碱

基，代表性地除后述的共价键合性基团外，还具备构成可与被测试样中的DNA杂交的天然DNA的碱基。

[0022] 本探针与公知的寡核苷酸探针同样地具有针对靶序列的杂交用序列。在此，靶序列的长度并没有特别限定，根据用途或作为靶标的核酸的种类而也有所不同，例如，为约10mer以上300mer以下，另外例如为10mer以上300mer以下，另外例如为10mer以上200mer以下，另外例如为10mer以上100mer以下，另外例如为10mer以上50mer以下，另外例如为5mer以上50mer以下。另外例如为20mer以上200mer以下，另外例如为20mer以上100mer以下，另外例如为20mer以上80mer以下，另外例如为20mer以上70mer以下，另外例如为20mer以上50mer以下。根据本检测方法，即使杂交用序列的长度为100mer或50mer以下，由于仅在完全匹配时形成真正交联杂交产物，通过后述的变性工序可有效去除真正交联杂交产物以外的物质，因此作为结果，也可确保高S/N比。

[0023] 杂交用序列具有可对靶序列特异性地进行杂交的程度的互补性。如在后段说明那样，本探针具备至少1个共价键合性基团以取代杂交用序列中的碱基，因此对于除了与该共价键合性基团的位置对应的至少1个碱基以外的碱基序列，相对于靶序列具备例如90％以上的同一性，另外例如95％以上的同一性，另外例如98％以上的同一性，另外例如99％以上的同一性，另外例如100％的同一性。此外，对于同一性在后段说明。

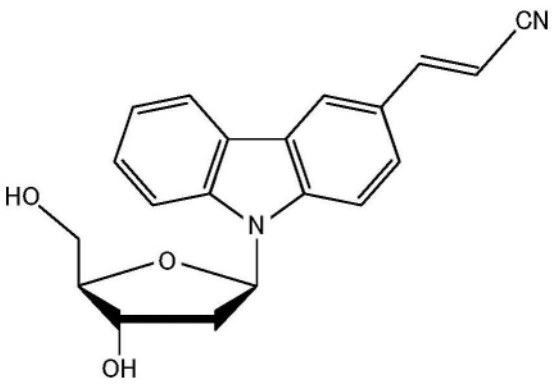
[0024] 此外，作为本领域技术人员，除碱基长度外，也可适度考虑杂交时的Tm来设定靶序列及杂交用序列。

[0025] 本探针在杂交用序列中，可具备在杂交用序列中与所述靶序列特异性地进行杂交时可通过光照射而与所述靶序列中的靶碱基交联的至少一个共价键合性基团。该共价键合性基团以键合于碱基序列中的骨架，例如脱氧核糖或核糖的方式具备。

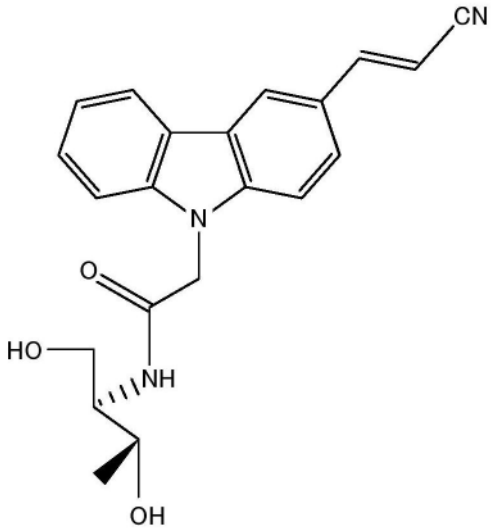
[0026] 共价键合性基团并没有特别限定，可举出例如日本特开2016-145229号公报、日本特开2017-210448号公报及日本特开2019-26569号公报等所公开的公知的光交联性的交联性官能团。这些均通过光照射，在与邻接于与该共价键合性基团配对的靶序列中的碱基的3’的碱基位置(+1位：从配对碱基在3’侧错开一个份碱基的位置)的嘧啶碱基的嘧啶环之间形成交联结构。

[0027] 以下，示出例如日本特开2016-145299号公报所公开的具备共价键合性基团的脱氧核糖核苷。本探针为DNA探针时，以通过(1’-5’)-磷酸二酯键由邻接的核苷键合的方式具备该核苷。

[0028] [化学式1]



[化学式2]



[0029] 形成交联结构的嘧啶碱基并没有特别限定，若为DNA，则为胸腺嘧啶(T)或胞嘧啶(C)，若为RNA，则为胞嘧啶(C)或尿嘧啶(U)。此外，这些碱基只要可与共价键合性基团进行光交联，则可进行修饰，可举出5-甲基胞嘧啶、5-羟甲基胞嘧啶等。

[0030] 以取代与邻接于靶序列中的例如靶序列中的嘧啶碱基的5’侧的碱基位置(-1位)的碱基配对的任意碱基的方式在杂交用序列中具备共价键合性基团。换言之，在杂交用序列中，以取代邻接于嘌呤碱基(腺嘌呤(A)或鸟嘌呤(G))的3’侧的碱基位置(+1位)的任意碱基的方式具备共价键合性基团。另外，以取代与邻接于靶序列中的嘧啶碱基的3’侧的碱基位置(+1位)的碱基配对的任意碱基的方式在杂交用序列中具备共价键合性基团。换言之，在杂交用序列中，以取代邻接于嘌呤碱基(腺嘌呤(A)或鸟嘌呤(G))的5’侧的碱基位置(-1位)的任意碱基的方式具备共价键合性基团。

[0031] 在例如脱氧核糖、核糖及D-苏氨醇等骨架中在键合碱基的部分替代碱基而具备共价键合性基团。

[0032] 作为本领域技术人员，可基于日本特开2016-145229号公报、日本特开2017-210448号公报及日本特开2019-26569号公报等中记载，且与这些公报及本公开申请时的DNA等的合成技术有关的技术常识及公知技术而容易地合成出在DNA或RNA中具备共价键合性基团的本探针。

[0033] 本探针中的共价键合性基团的个数并没有特别限定，随着杂交用序列的长度，另外，随着标记要素的种类或灵敏度而有所不同。例如，杂交用序列为约10～100mer时，共价键合性基团例如为1个以上10个以下，另外例如为1个以上6个以下，另外例如为1个以上5个以下，另外例如为1个以上4个以下，另外例如为1个以上3个以下，另外例如为1个以上2个以下。当一个探针中具备2个以上的共价键合性基团连续的部位时，且进一步具备追加的共价键合性基团时，优选从连续的共价键合性基团隔开至少10个碱基以上而具备追加的共价键合性基团。

[0034] 另外，本探针中的共价键合性基团的位置并没有特别限定，例如为5’末端侧和/或3’末端侧，可设为尽可能不抑制本探针对靶序列的杂交的位置。代表性地为5’末端侧区域或3’末端侧区域。此处，5’末端侧区域是指例如从5’末端的末端起杂交用序列的总碱基数的20％以内的数量的碱基内，3’末端侧区域是指例如从3’末端的末端起杂交用序列的总碱

基数的20％以内的数量的碱基内。另外，共价键合性基团例如若为5’末端侧，则只要是比末端更位于内侧即可；若为3’末端侧，则只要至少1个以上存在于内侧即可。

[0035] 另一方面，共价键合性基团的位置例如若杂交用序列为10mer以上100mer左右，则可在其杂交用序列的中央部分，即自本探针的5’末端及3’末端起分别超过杂交用序列的碱基长度的25％的范围内。若杂交用序列为一定长度以上，则即使位于杂交用序列的中央部分，也可不妨碍与靶序列的特异性杂交地形成真正杂交产物及真正交联杂交产物。

[0036] 本探针对于例如长靶序列，代表性地为相对于超过数百mer～数千mer的靶序列，可以作为具备约10～100mer的杂交用序列的多个(例如约数根～数十根)探针组而进行准备。长探针虽然序列特异性高，但大体上S/N比差，而10～100mer的本探针虽然序列特异性低，但完全匹配时可进行光交联，其后可通过变性而去除非特异性杂交产物或未交联真性杂交产物，因此，即使要以多个探针检测长靶序列，也可确保高S/N比，并且可避免或充分抑制假阳性的检测结果。另外，约10～100mer的探针与长探针相比合成成本也低，并且对细胞的渗透性也良好。

[0037] 本探针可根据需求具备标记要素。标记要素为其本身或通过激发等而可产生信号的信号产生要素，除此以外，还可进一步为虽然其本身不产生信号，但可与能够和信号产生要素结合的信号产生要素结合的结合要素。这样的信号产生要素及结合要素在本技术领域中对于本领域技术人员是公知的，本领域技术人员可根据需求选择标记要素而赋予于本探针。

[0038] (杂交工序)

本检测方法可具备使本探针与被测试样中的靶核酸接触而形成真正杂交产物的杂交工序。在杂交工序中，通过使靶核酸与本探针接触，可获得本探针与靶核酸特异性地进行了杂交的真正杂交产物。

[0039] 杂交工序中的温度、pH、盐浓度、时间等条件可根据本探针的Tm或被测试样的种类等适当设定其严格性。例如，温度通过设为本探针的Tm以上，从而成为高严格性，杂交的特异性提升，另一方面，杂交效率有降低的倾向。反之，通过使其低于Tm，从而成为低严格性，杂交特异性降低，但杂交效率有提升的倾向。另外，根据盐浓度或pH，也可调节严格性。

[0040] 在本检测方法中，可通过后段的光照射工序而将真正杂交产物进行光交联，并进一步实施变性工序而高选择性地维持真正交联杂交产物。因此，未必有以高严格性进行杂交工序的必要。因此，杂交工序除可例如在后段所说明的室温下进行外，也可在25℃以上40℃以下，另外例如在30℃以上40℃以下实施。

[0041] 此外，在实施杂交工序时，根据所用被测试样或检测方法，有时需要用于可使靶核酸与本探针杂交的前处理。根据被测试样或检测方法等，前处理对本领域技术人员而言是公知的，作为本领域技术人员，可基于公知技术来决定前处理方法及杂交条件。

[0042] 在杂交工序中，需要避免本探针的共价键合性基团的光交联。因此，根据共价键合性基团的种类，根据需求，在遮光的状态下实施杂交工序。

[0043] 杂交工序的实施方式根据适用本检测方法的核酸的检测方法而为各种方式。作为这样的核酸的检测方法，例如可为使用固定有本探针的阵列或胶条(strip)等固相体的检测方法、基于进行原位杂交的ISH、FISH的检测方法。

[0044] 原位杂交可对采取的细胞或者培养细胞或者生物体组织切片等实施。作为原位杂

交的适用对象，可例如对采取自乳腺癌患者的细胞或其培养细胞或者采取自乳腺癌患者的组织切片内供给本探针而实施。另外，可举出保持爱泼斯坦-巴尔病毒(EBV)感染的细胞或其培养细胞或者采取自EBV感染疾病引起的恶性肿瘤疾病患者的组织切片等。

[0045] 核酸的杂交工序可进一步举出液相中的杂交、基于使用固定有本探针的管柱或胶条等的层析法的杂交等。这些方法在本公开申请时都是公知的。作为本领域技术人员，可基于公知技术，根据适用的检测方法的种类来实施适当的杂交工序。

[0046] (光照射工序)

本工序是对所述杂交工序后的被测试样进行光照射，使所述真正杂交产物中的共价键合性基团与靶序列之间进行交联而形成具有交联结构的真正杂交产物(称为本说明书中的真正交联杂交产物)的工序。在此前的杂交工序中，除真正杂交产物外，也可形成包含失配但经杂交的非特异性失配杂交产物。

[0047] 在光照射工序中，使包含共价键合性基团的杂交用序列与靶序列适当地杂交，在与位于靶序列的配对碱基的+1位侧的嘧啶碱基之间以高特异性形成交联结构。在具有失配时，杂交用序列与靶序列的交联对象即嘧啶碱基不易构成可交联的位置关系，即使进行适当的光照射，也不易形成交联结构。因此，在真正杂交产物中可特异性地形成交联结构。因此，根据本检测方法，可抑制假阴性的检测结果，由此可提高检查灵敏度。

[0048] 用于形成交联结构的光照射条件由所用共价键合性基团的种类等来决定。例如，在使用日本特开2016-145229号公报所公开的共价键合性基团时，可采用在330～380nm、同340～380nm、同350～380nm所具有的光。另外，在使用日本特开2019-26569号公报所公开的共价键合性基团时，可照射例如350～600nm，另外例如400～600nm，另外例如400～550nm，另外例如为400～450nm的光。

[0049] 光照射工序中的温度或时间并没有特别限定，例如为0℃～50℃，另外例如为0～40℃，另外例如为0～30℃，另外例如为0～20℃，另外例如为0～10℃，另外例如为0～5℃。另外，时间可设为例如1～120秒，另外例如为1～60秒等。

[0050] 此外，在光照射工序中，由于利用光反应，因此对于pH、盐浓度等，没有特别限制，除杂交产物等外，也可采用生物体材料可稳定存在的pH及盐浓度的条件。

[0051] (变性工序)

本工序对光照射工序后的被测试样赋予可维持真正交联杂交产物且使非特异性杂交产物解离的变性条件，分离出源自非特异性杂交产物的所述寡核苷酸探针的工序。这样的变性条件可适用例如可使DNA等的双链解离的各种条件。

[0052] 根据本工序，通过上述的变性条件，可容易地由真正交联杂交产物分离、去除(清洗)非特异性杂交产物。以往，当非特异性杂交产物与真正杂交产物的稳定性没有太大差异时，具有以下问题：若以高严格性清洗，则也会使真正杂交产物变性并进行清洗，反之，若以低严格性清洗，则无法充分清洗非特异性杂交产物。然而，由于真正交联杂交产物具备共价键合所产生的交联结构，因此该产物在使碱基配对所产生的杂交产物解离这样的变性条件下也不会解离。因此，即使应用高强度的变性条件，也可保持真正交联杂交产物，因此可容易地设定变性条件，并且切实地仅维持真正交联杂交产物。

[0053] 变性工序可进一步以也促进未交联的真正杂交产物的杂交的解离、使源自未交联的真正杂交产物的所述寡核苷酸探针与所述真正交联杂交产物分离的方式实施。根据本检

测方法，与其说是严格性的高低，不如说是可使用能区别交联/非交联的杂交产物这样的高强度变性条件，其结果是，可抑制假阳性的检测结果，由此可提升检查的特异度。

[0054] 根据本检测方法，如上所述，由于也可抑制假阳性的检测结果，因此作为结果，可提升能正确检测出真阳性及真阴性的准确度。本检测方法即使为由例如基于信号强度的检查结果，在多个阶段的水平实施分类评定的方法，灵敏度、特异度、准确度的提升也可对检查的准确度及精度作出贡献。

[0055] 以往，对于每种探针，为了进行清洗所合适的严格条件不同，而在本检测方法中，只要维持真正交联杂交产物即可，因而也无需对于每种探针变更变性条件等细微的条件设定，另外，无需在不同变性条件下实施多次操作等，即使在同时应用多个本探针时，也可适用同一变性条件，因此也有用于同时检测多个靶核酸的检测方法。

[0056] 在变性工序中，促进非特异性杂交产物乃至真正杂交产物的解离的变性强度，除变性剂外，也可通过温度、盐浓度、pH等来调节。变性剂强度或变性剂浓度越高、温度越高、pH越高、盐浓度(离子强度)越低，则变性强度越强。变性条件可将变性剂、温度、碱及pH等各种因素单独采用或组合采用两种以上。

[0057] 作为变性剂，可利用作为可使DNA或RNA的杂交解离的物质已知的公知变性剂。虽然没有特别限定，但这样的变性剂例如可使用溶剂。作为溶剂，可举出例如甲酰胺、二甲基甲酰胺等醛类、吡啶类、哌啶类、二甲基亚砜、四氢呋喃及乙腈等。

[0058] 在采用溶剂作为变性因素时，除变性剂的种类外，根据变性剂的浓度及同时使用的稀释剂，也可调整变性条件。作为变性剂的溶剂，并没有特别限定，可调成例如40体积％以上，另外例如50体积％以上，另外例如60体积％，另外例如70体积％以上，另外例如80体积％以上，另外例如90体积％以上，另外例如95体积％以上，另外例如100体积％的溶液使用。优选为70体积％以上、80体积％以上。另外，作为稀释剂，可为例如具有生物相容性的磷酸缓冲生理盐水等的缓冲液，但可采用严格性更高的水(纯水等)的水性介质。即，可采用水性介质混合液。使用溶剂作为变性剂时，根据稀释剂的种类，例如通过替代缓冲液而使用纯水，也可出乎意料地增大变性条件的强度。

[0059] 例如使用作为溶剂的甲酰胺(FA)时，可使用50体积％FA水溶液或缓冲液溶液、60体积％FA水溶液或缓冲液溶液、70体积％FA水溶液或缓冲液溶液、80体积％FA水溶液或缓冲液溶液等。优选为50体积％以上的FA水溶液或缓冲液溶液，更优选为60体积％以上的FA水溶液或缓冲液溶液，进一步优选为80体积％以上的FA水溶液或缓冲液溶液。另外，未使用FA时，FA适合使用例如具有与60体积％以上或超过60体积％的水溶液或缓冲液溶液等的水性介质混合液、80体积％以上或超过80体积％的水溶液或缓冲液溶液等的水性介质混合液同等以上的变性效果的变性剂(变性液)。

[0060] 作为其他变性剂，可举出尿素、四甲基氯化铵等烷基胺类、NaOH等碱、碘化物离子、胍、过氧化物、硫代硫化物等。这些变性剂可调整pH或碱等。这些变性剂可溶解在适当的溶剂而使用。作为溶剂，除了例如具生物相容性的磷酸缓冲生理盐水等缓冲液、纯水等水性介质外，也可使用已经说明的作为变性剂的溶剂等。

[0061] 适用于变性工序的温度条件可单独以该条件实施变性工序，但在其他所有变性因素下伴随温度条件。因此，适用于变性工序的温度条件根据适用于变性工序的变性因素的种类或其程度等的变性强度适当设定。例如使用溶剂等变性剂等的变性剂作为变性因素

时,适用的温度条件是无需进行特殊的温度控制而可在作为实施本检测方法的场所的温度且未进行特殊的加热或冷却的温度(本说明书中,将该温度也称为室温)以上实施。本说明书中所称“室温”是例如为1℃以上35℃以下,另外例如为1℃以上30℃以下,另外例如为1℃以上30℃以下,另外例如为10℃以上30℃以下,另外例如为15℃以上25℃以下。该室温下的变性工序特别适合于抑制对实施了原位杂交等的组织等被测试样的障碍方面,除此以外,在不需要特别的温控装置等方面是有利的。变性工序中的温度条件可设为例如20℃以上,另外例如为30℃以上,另外例如为35℃以上,另外例如为40℃以上,另外例如为50℃以上等。另一方面,作为上限,可设为例如70℃以下,另外例如为60℃以下等。温度条件又可例如为超过室温的温度,也可为40℃以上60℃以下。

[0062] 另外,作为变性因素,在采用温度时,可设为例如30℃以上90℃以下,另外例如为40℃以上90℃以下、50℃以上90℃以下、70℃以上90℃以下等。例如采用70℃以上90℃以下的强的温度条件时,即使并未使用变性剂,即使仅为水或缓冲液,也可仅维持真正交联杂交产物。

[0063] 这样的变性工序可通过对杂交产物等适当组合应用一种或两种以上的变性因素而实施。通过实施变性工序,可促进杂交的解离,去除构成非特异性杂交产物的探针,进而也可去除构成真正杂交产物的探针,因此,可切实地残留真正交联杂交产物,容易地去除背景或假阳性的因素。

[0064] 对在变性工序后的真正交联杂交产物,根据杂交工序的实施方式等适当实施其检测工序。检测工序代表性地利用预先赋予至探针的标记要素,以公知的方法来进行。

[0065] 根据以上所说明的本检测方法,可无需使用使Tm高温化用的长探针,且无需依赖严格性强度而去除非特异性杂交产物或真正杂交产物,能以高准确度检测出真正交联杂交产物。

[0066] (寡核苷酸探针)

本说明书所公开的用于检测核酸的寡核苷酸探针可具备如上所述的构成。而且,本探针以可维持真正交联杂交产物,但可选择性地去除非特异性杂交产物杂交产物的方式具备杂交用序列及至少一个共价键合性基团。如此,在本检测方法中,可提升检测的准确度与再现性。本探针也以与在本检测方法的变性工序中有用的变性剂组合的试剂盒的形式提供。该变性剂可具备例如与60体积%以上的甲酰胺水性介质混合液同等以上的变性剂。

实施例

[0067] 以下,为了更具体地说明本说明书的公开而记载作为具体例的实施例。以下实施例仅是为了说明本说明书的公开,并非限定其范围。

实施例1

[0068] (从乳腺癌患者采取的组织切片中的细胞内28SrRNA FISH)

由人类28SrRNA的碱基序列,以与作为以下所示的共价键合性基团的交联对象的胸腺嘧啶(T)交联的方式设定以下所示的三种不同长度的杂交用序列。施予下划线的碱基是基于后段所说明的共价键合性基团的取代部位。

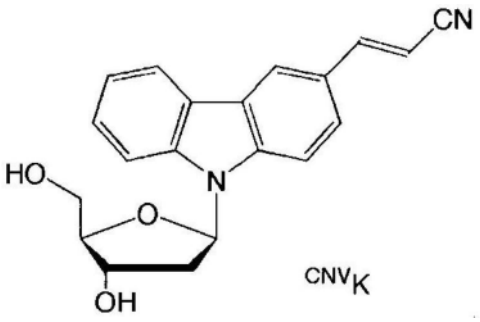
[0069] 杂交用序列1(34mer):tgctactaccaccaagatctgcacctgcggcggc(序列号1)

杂交用序列2(25mer):gctactaccaccaagatctgcacct(序列号2)

杂交用序列3(17mer):tgctactaccaccaaga(序列号3)

[0070] 在上述三种序列中，对以下所示的位置导入一个共价键合性基团(X)。另外，合成出将5’末端经Cy3修饰的三种DNA寡核苷酸探针1～3。此外，X由下述结构式表示。

[0071] [化学式3]



[0072] 杂交用序列1X(34mer)：

Cy3-tgctactaccaccaagatctgcaxctgcggcggc(序列号4)

杂交用序列2X(25mer)：Cy3-gctactaccaccaagatctgcaxct(序列号5)

杂交用序列3X(17mer)：Cy3-tgctactaccaccaxga(序列号6)

[0073] 将采取自乳腺癌患者的组织的石蜡切片按照常规方法进行脱蜡及去除蛋白质，并以4％多聚甲醛固定后，将醛中和。使用不含阻断DNA的甲酰胺基底的缓冲液，将以探针的最终浓度达1μg/ml的方式制备的探针溶液以80℃加热3分钟后，在冰上急速冷却，使探针单链化，并将其50μl滴加至切片上，覆盖盖玻片，在37℃的烘箱中静置1小时而进行杂交。

[0074] 杂交后，移去盖玻片，对组织切片照射波长366nm的UV光60秒，其后在加热至50℃的50体积％甲酰胺/SSC或80体积％甲酰胺/SSC中浸渍3次，接着在SSC中浸渍两次、在超纯水中浸渍1次，各浸渍约1～3分钟并清洗后，以甘油密封。

[0075] 针对这些切片观察Cy3信号，结果任何长度的探针在经50体积％FA变性及80体积％FA变性中，均可在细胞质内确认到良好的信号。此外，在使用作为对照合成的不具备共价键合性基团的探针时，在经50体积％FA变性中，探针未被去除而得以维持，但在经80体积％FA清洗中，探针全被清洗而几乎无法确认到信号。

[0076] 另外，34mer、25mer及17mer的探针1～3均呈现80体积％FA变性后的信号，但17mer的探针3的信号最弱，34mer及25mer的探针1、2的信号几乎相等。由以上可知，优选为约20mer以上的杂交用序列。另外，合成具有在杂交用序列1(34mer)中对X位置将从3’末端起第3个G取代为X的杂交序列1X’的DNA探针4，使用DNA探针1与该探针4，同时针对源自同一乳腺癌患者的组织切片，以与上述同样的方式进行杂交、光照射及80体积％FA清洗并观察切片的信号。其结果是，两者的信号相等。由以上可知，共价键合性基团即使未存在于3’末端侧，也可充分形成真正交联杂交产物。

[0077] 另外，对于50体积％FA清洗及80体积％FA清洗，80体积％FA清洗的图像更为鲜明。认为这是由于非特异性杂交产物被完整地去除等而使S/N比提升的结果。

实施例2

[0078] (使用25mer的探针的光照射条件的研究)

使用实施例1中合成的探针2，实施UV照射时间不同的28SrRNA FISH，评定照射时间的影响。除将光照射条件设为0.1秒、5秒、60秒及300秒以外，以与实施例1同样的方式进行FISH。

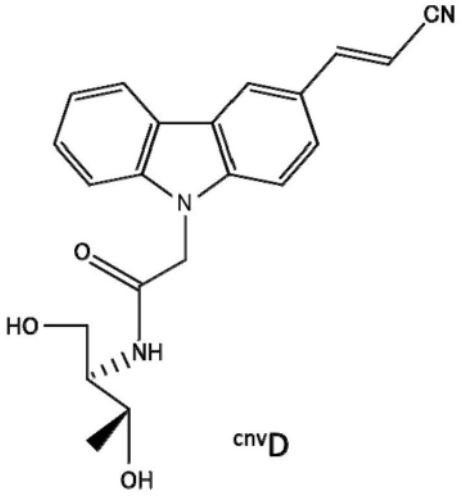
[0079] 其结果是，显然随着照射时间延长，信号强度有增大的倾向。另一方面，在60秒以上，信号强度未大幅增大。

实施例3

[0080] (共价键合性基团的研究)

使用在实施例1中合成的探针2和在与导入至探针2的共价键合性基团X相同的位置导入以下述结构式表示的具有D-苏氨醇骨架的其他共价键合性基团D的探针5，按照实施例1实施28SrRNA FISH，评定共价键合性基团的种类的影响。光照射时间设为5秒或60秒，清洗使用80体积％FA，以与实施例1同样的方式进行FISH。

[0081] [化学式4]



[0082] 其结果是，在UV照射时间5秒及60秒中的任一个中，探针5的信号均强于探针2。认为这是相较于导入有主骨架为脱氧核糖的共价键合性基团X(CNV-K)的探针2，导入有D-苏氨醇为主骨架的共价键合性基团D(CNV-D)的探针5更有效率地与28SrRNA形成真正交联杂交产物的结果。

实施例4

[0083] (采取自小鼠的大脑切片中的Satb2蛋白质mRNA CISH)

针对作为靶序列的Satb2mRNA(约700碱基)，如图1所示，设计约20mer的26根探针(序列号7～32)，可与靶序列中的胸腺嘧啶(T)进行光交联地以与实施例1同样的方式导入共价键合性基团X。另外，对DNA探针的5’末端附加DIG。

[0084] 将小鼠脑部的冷冻切片以37℃解冻30分钟后，在37℃浸渍于4％多聚甲醛10分钟并进行后固定。以TBS缓冲液实施两次5分钟的浸渍后，浸渍于2mg/ml甘氨酸/PBS溶液30分钟后将醛中和，浸渍于55℃的40体积％的去离子化甲酰胺/4×SCC溶液30分钟。其后，对于该切片，将分别含有1μg/ml的上述各探针的杂交溶液以80℃加热5分钟，供给其50μl，在37℃使其进行杂交1小时。

[0085] 其后，将载有该切片的载玻片载置在冰上并照射366nm(1000mV)的波长1分钟。进而，以50℃的80体积％甲酰胺/TBS缓冲液溶液或同温度的80体积％甲酰胺水溶液分别重复3分钟浸渍变性/清洗3次。

[0086] 其后，以TBS缓冲液进行3分钟浸渍清洗两次、以该缓冲液进行1分钟浸渍清洗1次，滴加碱性磷酸酶标记抗体的200倍稀释液50μl，放置在室温30分钟，以TBS缓冲液进行3分钟

清洗两次、以超纯水进行1分钟清洗两次，添加BCIP/NBT溶液，在暗处使其反应60分后以流水清洗并脱水，加以密封。

[0087] 对于这些切片试样，将确认发出蓝至蓝紫色的结果示于图2。如图2(B)所示，使用80体积％甲酰胺缓冲液溶液时，大脑皮质虽然可观察到Satb2特异性信号的痕迹，但不明确。相对于此，如图2(A)所示，使用变性强度更强的80体积％甲酰胺水溶液时，可使非特异性信号降低，大脑皮质确认有明确的Satb2特异性信号。

实施例5

[0088] (乳腺癌培养细胞中的HER2蛋白质mRNA CISH)

针对HER2mRNA中从Exon15横跨至17的靶序列，设计成使以下两种探针进行杂交。此外，对于探针而言，作为以下序列中的X，可与靶序列中的尿嘧啶(U)或胞嘧啶(C)进行光交联地以与实施例1同样的方式导入共价键合性基团X，并对5’末端附加DIG。

探针1:GTCCACACAGGAGTGGGTGCAXTT(序列号33)

探针2:CGTCAGAGGGCTGGCTCTCTGXTC(序列号34)

[0089] 培养两种乳腺癌细胞(BT474:HER2阳性，BT20:HER2阴性)并作成细胞块。包埋石蜡后，准备薄切的载玻片。对HER2蛋白质实施免疫染色，并针对各自确认HER2阳性或阴性后，使用包含共价键合性基团X的探针1及2来实施ISH。

[0090] 进行脱蜡/亲水化，将标本在60℃的烘箱中加热而将石蜡熔解后，以Clear Plus(脱蜡剂，株式会社Pharma)清洗6次，以100％EtOH清洗3次，以95％ EtOH清洗两次，以80％EtOH清洗1次，进而以纯水清洗5次。进而，供给蛋白激酶溶液而在室温下处理30分钟后，以纯水清洗两次。其后，浸渍于95％EtOH，以干燥机加以干燥。

[0091] 将以1μg/ml含有两种探针的杂交溶液(含40体积％甲酰胺的TE缓冲液)以80℃加热3分钟后急速冷却，并将该溶液50μl供给至所述组织后，覆盖盖玻片，在55℃的恒温槽中静置1小时，使其进行杂交。

[0092] 杂交后，在冰上照射366nm(1000mV)1分钟，其后浸渍于80体积％甲酰胺2×SSC溶液(55℃)3分钟并实施变性/清洗。

[0093] 其后，以2×SSC清洗1次，以TBS清洗两次后，滴加抗DIG1次抗体溶液，静置于室温30分钟。以TBS清洗3次后，滴加特异性地结合在1次抗体的碱性磷酸酶标记聚合物并静置于室温30分钟。以TBS清洗3次后，滴加BCIP/NBT，在暗处反应一夜后，进行流水清洗并脱水后进行密封。将结果示于图3。

[0094] 如图3所示，在使用含有共价键合性基团X的探针的ISH中，HER2阳性细胞确认到明显的信号。另一方面，HER2阴性细胞则未确认到信号。以ISH所得的结果，与事先实施的免疫染色的结果一致，可知可特异性地检测出HER2mRNA。

实施例6

[0095] (EBER(EB病毒产生小RNA)-ISH)[1]

针对EBER1中由约100mer所构成的靶序列，设计成以下两种探针。此外，对于探针而言，作为以下序列中的X，使用靶序列中尿嘧啶的实施例1中所使用的单元来合成，并对5’末端附加DIG。此外，除替代X而具备鸟嘌呤或腺嘌呤以外以同样的方式合成出比较例的探针。

[0096] 探针1:GTCTCCTCCCTAGCAAAXCC(序列号35)

探针2:GTCTGGGAAGACAACCAXAG(序列号36)

[0097] 对采取自胃癌患者的EB病毒感染组织进行脱蜡及亲水化,将标本在60℃的烘箱中加热而将石蜡熔解后,以Clear Plus(脱蜡剂,株式会社Pharma)清洗6次,以100%EtOH清洗3次,以95%EtOH清洗两次,以80% EtOH清洗1次,进而以纯水清洗5次。进而,供给蛋白激酶溶液而在室温下处理30分钟后,以纯水清洗两次。其后,浸渍于95%EtOH,以干燥机加以干燥。

[0098] 将以1μg/ml含有两种探针的杂交溶液(含40体积%甲酰胺的TE缓冲液)以80℃加热3分钟后急速冷却,并将该溶液50μl供给至所述组织后,覆盖盖玻片,在室温下静置1小时,使其进行杂交。以同样的方式,对于比较例的探针也实施杂交。

[0099] 杂交后,在冰上照射366nm(1000mV)1分钟,其后,浸渍于50体积%甲酰胺2×SSC溶液(室温)及80体积%甲酰胺2×SSC溶液(55℃)3分钟并实施变性/清洗。

[0100] 其后,以2×SSC清洗1次,以TBS清洗两次后,滴加碱性磷酸酶标记抗体溶液,静置于室温30分钟。以TBS清洗两次并以超纯水清洗两次后,滴加BCIP/NBT,在暗处反应60分钟后,进行流水清洗并脱水后以甘油凝胶密封。将结果示于图4。

[0101] 如图4所示,使用含有共价键合性基团X的探针时,无论是50体积%甲酰胺2×SSC(室温),还是80体积%甲酰胺2×SSC溶液(55℃),均发色,但80体积%甲酰胺的染色区域减少。另一方面,在为比较例的DNA探针时,若是50体积%甲酰胺2×SSC(室温),则发色,而若是80体积%甲酰胺2×SSC溶液(55℃),则完全未发色。由以上可知,通过利用80体积%甲酰胺2×SSC溶液(55℃)的强度更强的变性条件进行变性,可仅检测出交联真性杂交产物。

[0102] 由以上可确认到具备共价键合性基团X的探针与不具备该X的探针的变性耐性。可知为了以高准确度检测出靶序列,需要具备共价键合性基团的探针与高强度的变性条件。

实施例7

[0103] (EBER(EB病毒产生小RNA)-ISH)[2]

针对与实施例6同样具备共价键合性基团X的探针与市售EBER检测试剂盒(Dako,PNA探针)评定检测性能。对于具备共价键合性基团X的探针,将变性条件设为80体积%甲酰胺2×SSC溶液(室温),其他操作则与实施例6相同。

[0104] 对于PNA探针试剂盒,按照所附使用指南。此外,根据使用指南,杂交为55℃、30分钟,清洗使用55℃的严格缓冲液,且采用利用碱性磷酸酶的发色反应。

[0105] 针对实施了利用具备共价键合性基团X的探针与PNA探针试剂盒进行的处理的切片进行评定。将结果示于图5。如图5所示,若是具备共价键合性基团X的探针,则虽然是利用室温的杂交及室温的变性进行的处理,但可确认到明确的染色。另外,对于PNA探针试剂盒,若采用55℃的杂交及55℃的清洗,则可获得与具备共价键合性基团X的探针同等的检测结果。然而,用PNA试剂盒时,若为室温的杂交,则背景过高,检测无法进行特异性检测。

[0106] 由以上可知,具备共价键合性基团X的探针可容易地控制温度且可高准确度地检测出靶核酸。

序列表自由文本

[0107] 序列号1～36:探针。

序列表

<110> 日华化学株式会社(Nicca Chemicall Co., Ltd.)

<120> 核酸的检测方法及寡核苷酸探针

<130> FP224581JP

<150> JP2020-076369

<151> 2020-04-22

<160> 36

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 34

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 探针

<400> 1

tgctactacc accaagatct gcacctgcgg cggc 34

<210> 2

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 探针

<400> 2

gctactacca ccaagatctg cacct 25

<210> 3

<211> 17

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 探针

<400> 3

tgctactacc accaaga 17

<210> 4

<211> 34

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 探针

<220>
<221> modified_base
<222> (24)..(24)
<223> n 是可光致交联的官能团
<220>
<221> misc_feature
<222> (24)..(24)
<223> n是a、c、g或t
<400> 4
tgctactacc accaagatct gcanctgcgg cggc 34
<210> 5
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 探针
<220>
<221> modified_base
<222> (23)..(23)
<223> n 是可光致交联的官能团
<220>
<221> misc_feature
<222> (23)..(23)
<223> n是a、c、g或t
<400> 5
gctactacca ccaagatctg canct 25
<210> 6
<211> 17
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 探针
<220>
<221> modified_base
<222> (15)..(15)
<223> n 是可光致交联的官能团
<220>
<221> misc_feature
<222> (15)..(15)

<223> n是a、c、g或t
<400> 6
tgctactacc accanga 17
<210> 7
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 探针
<220>
<221> modified_base
<222> (18)..(18)
<223> n 是可光致交联的官能团
<220>
<221> misc_feature
<222> (18)..(18)
<223> n是a、c、g或t
<400> 7
gagcgcggtc tccaccanct 20
<210> 8
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 探针
<220>
<221> modified_base
<222> (18)..(18)
<223> n 是可光致交联的官能团
<220>
<221> misc_feature
<222> (18)..(18)
<223> n是a、c、g或t
<400> 8
gctgtgggaa taccccangg 20
<210> 9
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 探针
<220>
<221> modified_base
<222> (18)..(18)
<223> n 是可光致交联的官能团
<220>
<221> misc_feature
<222> (18)..(18)
<223> n是a、c、g或t
<400> 9
cctccctagc ttgattantc 20
<210> 10
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 探针
<220>
<221> modified_base
<222> (18)..(18)
<223> n 是可光致交联的官能团
<220>
<221> misc_feature
<222> (18)..(18)
<223> n是a、c、g或t
<400> 10
cacataactg agggggangg 20
<210> 11
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 探针
<220>
<221> modified_base
<222> (18)..(18)
<223> n 是可光致交联的官能团
<220>

<221> misc_feature
<222> (18)..(18)
<223> n是a、c、g或t
<400> 11
cggccacagt cgcatcangg 20
<210> 12
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 探针
<220>
<221> modified_base
<222> (18)..(18)
<223> n 是可光致交联的官能团
<220>
<221> misc_feature
<222> (18)..(18)
<223> n是a、c、g或t
<400> 12
ggatcttcag cgtcacancg 20
<210> 13
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 探针
<220>
<221> modified_base
<222> (18)..(18)
<223> n 是可光致交联的官能团
<220>
<221> misc_feature
<222> (18)..(18)
<223> n是a、c、g或t
<400> 13
cgcaggcaag tcttccanct 20
<210> 14
<211> 20

<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 探针
<220>
<221> modified_base
<222> (18)..(18)
<223> n是具有可光致交联的官能团的核糖核苷
<220>
<221> misc_feature
<222> (18)..(18)
<223> n是a、c、g或t
<400> 14
acggtggcgt ggttccantg 20
<210> 15
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 探针
<220>
<221> modified_base
<222> (18)..(18)
<223> n 是可光致交联的官能团
<220>
<221> misc_feature
<222> (18)..(18)
<223> n是a、c、g或t
<400> 15
gcagttcctt taaggcantg 20
<210> 16
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 探针
<220>
<221> modified_base
<222> (18)..(18)

<223> n 是可光致交联的官能团
<220>
<221> misc_feature
<222> (18)..(18)
<223> n是a、c、g或t
<400> 16
taatgtgctc tggttcantt 20
<210> 17
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 探针
<220>
<221> modified_base
<222> (18)..(18)
<223> n 是可光致交联的官能团
<220>
<221> misc_feature
<222> (18)..(18)
<223> n是a、c、g或t
<400> 17
ctctgggaga gagggcantc 20
<210> 18
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 探针
<220>
<221> modified_base
<222> (18)..(18)
<223> n 是可光致交联的官能团
<220>
<221> misc_feature
<222> (18)..(18)
<223> n是a、c、g或t
<400> 18
tatttacaat ggatgaantc 20

<210> 19
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 探针
<220>
<221> modified_base
<222> (18)..(18)
<223> n 是可光致交联的官能团
<220>
<221> misc_feature
<222> (18)..(18)
<223> n是a、c、g或t
<400> 19
gacacattgg catagtangt 20
<210> 20
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 探针
<220>
<221> modified_base
<222> (18)..(18)
<223> n 是可光致交联的官能团
<220>
<221> misc_feature
<222> (18)..(18)
<223> n是a、c、g或t
<400> 20
ctcccaaact cctggcantt 20
<210> 21
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 探针
<220>

<221> modified_base
<222> (18)..(18)
<223> n 是可光致交联的官能团
<220>
<221> misc_feature
<222> (18)..(18)
<223> n是a、c、g或t
<400> 21
actttatct tcttatantt 20
<210> 22
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 探针
<220>
<221> modified_base
<222> (18)..(18)
<223> n 是可光致交联的官能团
<220>
<221> misc_feature
<222> (18)..(18)
<223> n是a、c、g或t
<400> 22
gaacacaata gtctgaangg 20
<210> 23
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 探针
<220>
<221> modified_base
<222> (18)..(18)
<223> n 是可光致交联的官能团
<220>
<221> misc_feature
<222> (18)..(18)
<223> n是a、c、g或t

<400> 23
catatttggt aaatgcantg 20
<210> 24
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 探针
<220>
<221> modified_base
<222> (18)..(18)
<223> n 是可光致交联的官能团
<220>
<221> misc_feature
<222> (18)..(18)
<223> n是a、c、g或t
<400> 24
tttgcccagg gatgccanct 20
<210> 25
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 探针
<220>
<221> modified_base
<222> (18)..(18)
<223> n 是可光致交联的官能团
<220>
<221> misc_feature
<222> (18)..(18)
<223> n是a、c、g或t
<400> 25
atttggctat gaggagantg 20
<210> 26
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>

<223> 探针
<220>
<221> modified_base
<222> (18)..(18)
<223> n 是可光致交联的官能团
<220>
<221> misc_feature
<222> (18)..(18)
<223> n是a、c、g或t
<400> 26
ggtttcggat tggagtantg 20
<210> 27
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 探针
<220>
<221> modified_base
<222> (18)..(18)
<223> n 是可光致交联的官能团
<220>
<221> misc_feature
<222> (18)..(18)
<223> n是a、c、g或t
<400> 27
gctcatgatg ggctggantg 20
<210> 28
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 探针
<220>
<221> modified_base
<222> (18)..(18)
<223> n 是可光致交联的官能团
<220>
<221> misc_feature

<222> (18)..(18)
<223> n是a、c、g或t
<400> 28
tgagctgcgg tgagaganga 20
<210> 29
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 探针
<220>
<221> modified_base
<222> (18)..(18)
<223> n 是可光致交联的官能团
<220>
<221> misc_feature
<222> (18)..(18)
<223> n是a、c、g或t
<400> 29
ctatttgctg cctgacangc 20
<210> 30
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 探针
<220>
<221> modified_base
<222> (18)..(18)
<223> n 是可光致交联的官能团
<220>
<221> misc_feature
<222> (18)..(18)
<223> n是a、c、g或t
<400> 30
tatctgttgg tttatcanat 20
<210> 31
<211> 20
<212> DNA

<213> 人工序列
<220>
<223> 探针
<220>
<221> modified_base
<222> (18)..(18)
<223> n 是可光致交联的官能团
<220>
<221> misc_feature
<222> (18)..(18)
<223> n是a、c、g或t
<400> 31
atgctggtga gccaggantc 20
<210> 32
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 探针
<220>
<221> modified_base
<222> (18)..(18)
<223> n 是可光致交联的官能团
<220>
<221> misc_feature
<222> (18)..(18)
<223> n是a、c、g或t
<400> 32
gggtgggtgg ttcaaganct 20
<210> 33
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 探针
<220>
<221> modified_base
<222> (22)..(22)
<223> n 是可光致交联的官能团

<220>
<221> misc_feature
<222> (22)..(22)
<223> n是a、c、g或t
<400> 33
gtccacacag gagtgggtgc antt 24
<210> 34
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 探针
<220>
<221> modified_base
<222> (22)..(22)
<223> n 是可光致交联的官能团
<220>
<221> misc_feature
<222> (22)..(22)
<223> n是a、c、g或t
<400> 34
cgtcagaggg ctggctctct gntc 24
<210> 35
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 探针
<220>
<221> modified_base
<222> (18)..(18)
<223> n 是可光致交联的官能团
<220>
<221> misc_feature
<222> (18)..(18)
<223> n是a、c、g或t
<400> 35
gtctcctccc tagcaaancc 20
<210> 36

<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 探针
<220>
<221> modified_base
<222> (18)..(18)
<223> n 是可光致交联的官能团
<220>
<221> misc_feature
<222> (18)..(18)
<223> n是a、c、g或t
<400> 36
gtctgggaag acaaccanag 20

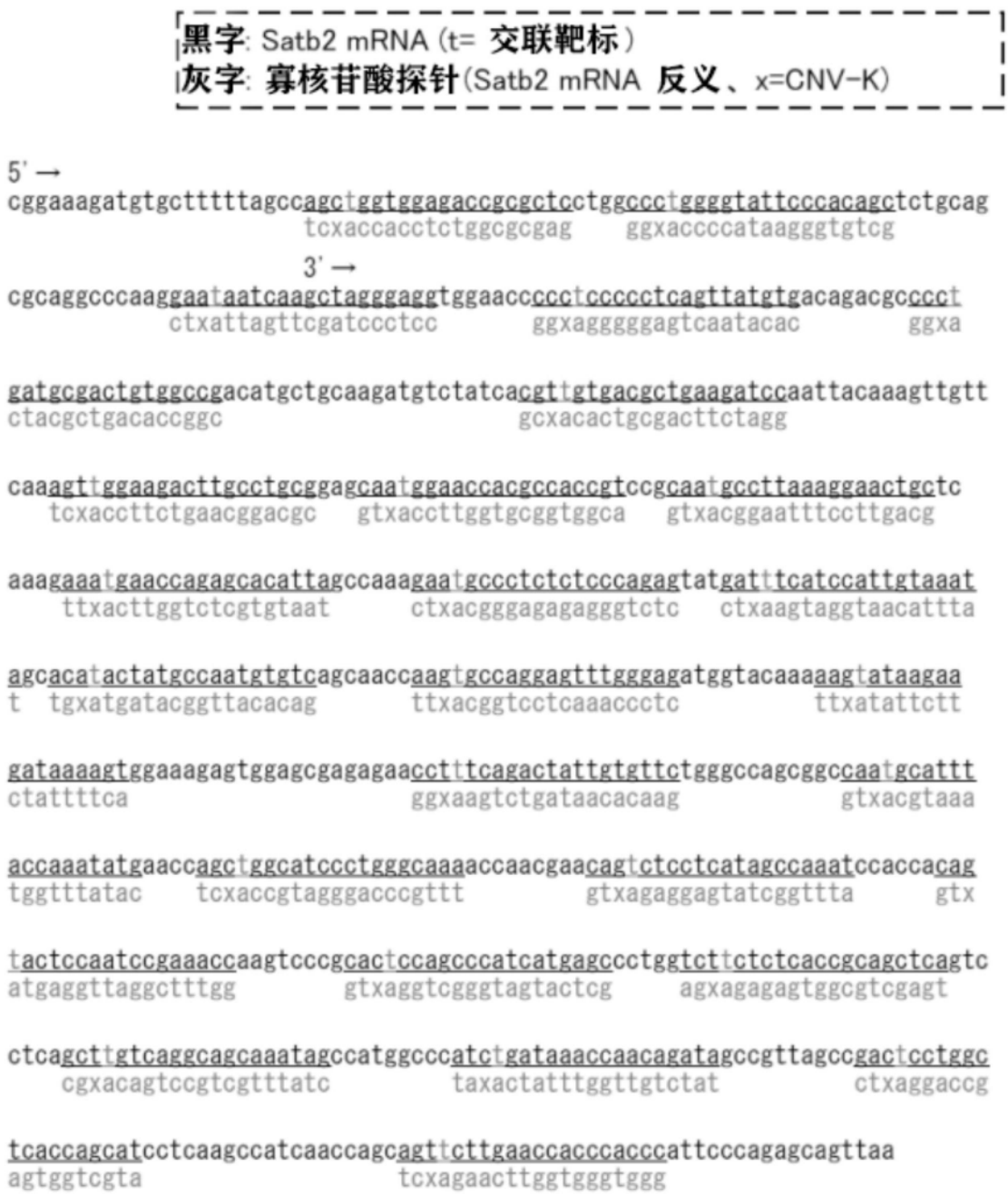
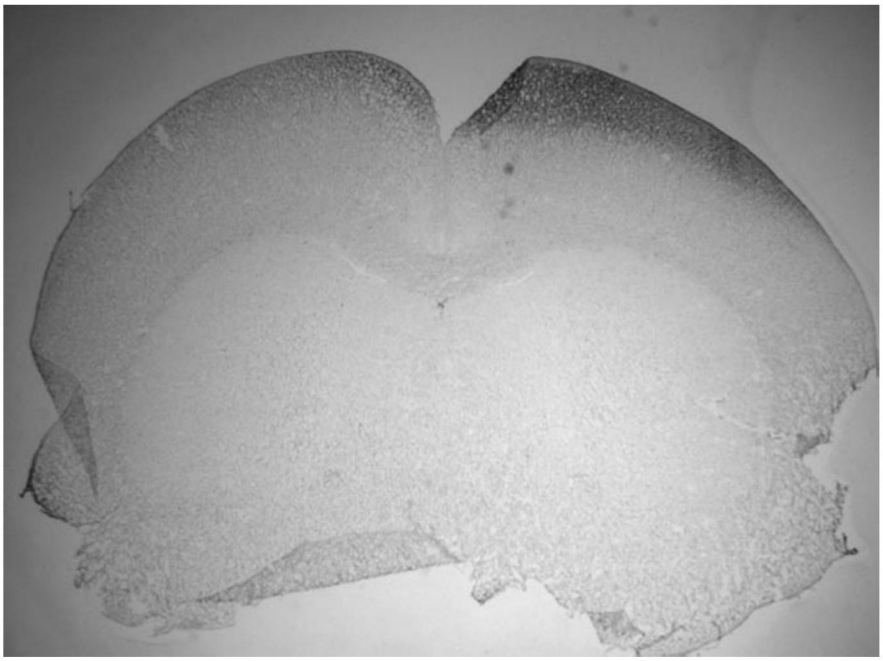

黑字: Satb2 mRNA (t= 交联靶标)
灰字: 寡核苷酸探针(Satb2 mRNA 反义、x=CNV-K)
5'→
cggaaagatgtgctttttagccagctggtggagaccgcgctcctggcccctggggtattcccacagctctgcag
tcxaccacctctggcgcgag ggxaccccataagggtgtcg
3'→
cgcaggcccaaggaataatcaagctagggaggtggaaccccctcccctcagttatgtgacagacgccccct
ctxattagttcgatccctcc ggxaggggagtcaatacac ggxa
gatgcgactgtggccgacatgctgcaagatgtctatcacgttgtgacgctgaagatccaattacaaagttgtt
ctacgctgacaccggc gcxacactgcgacttctagg
caaagttggaagacttgcctgcggagcaatggaaccacgccaccgtccgcaatgccttaaaggaactgctc
tcxaccttctgaacggacgc gtxaccttggtgcggtggca gtxacggaatttccttgacg
aaagaaatgaaccagagcacattagccaaagaatgccctctctcccagagtatgatttcatccattgtaaat
ttxacttggtctcgtgtaat ctxacgggagagagggtctc ctxaagtaggtaacattta
agcacatactatgccaatgtgtcagcaaccaagtgccaggagtttgggagatggtacaaaaagtataagaa
t tgxatgatacggttacacag ttxacggtcctcaaaccctc ttxatattctt
gataaaagtggaaagagtggagcgagagaacctttcagactattgtgttctgggccagcggccaatgcattt
ctattttca ggxaagtctgataacacaag gtxacgtaaa
accaaatatgaaccagctggcatccctgggcaaaaccaacgaacagtctcctcatagccaaatccaccacag
tggtttatac tcxaccgtagggacccgttt gtxagaggagtatcggttta gtx
tactccaatccgaaaccaagtcccgcactccagcccatcatgagcctggtcttctctcaccgcagctcagtc
atgaggttaggctttgg gtxaggtcgggtagtactcg agxagagagtggcgtcgagt
ctcagcttgtcaggcagcaaatagccatggcccatctgataaaccaacagatagccgttagccgactcctggc
cgxacagtccgtcgtttatc taxactatttggttgtctat ctxaggaccg
tcaccagcatcctcaagccatcaaccagcagttcttgaaccacccacccattcccagagcagttaa
agtggtcgta tcxagaacttggtgggtggg

图1

（A）



（B）

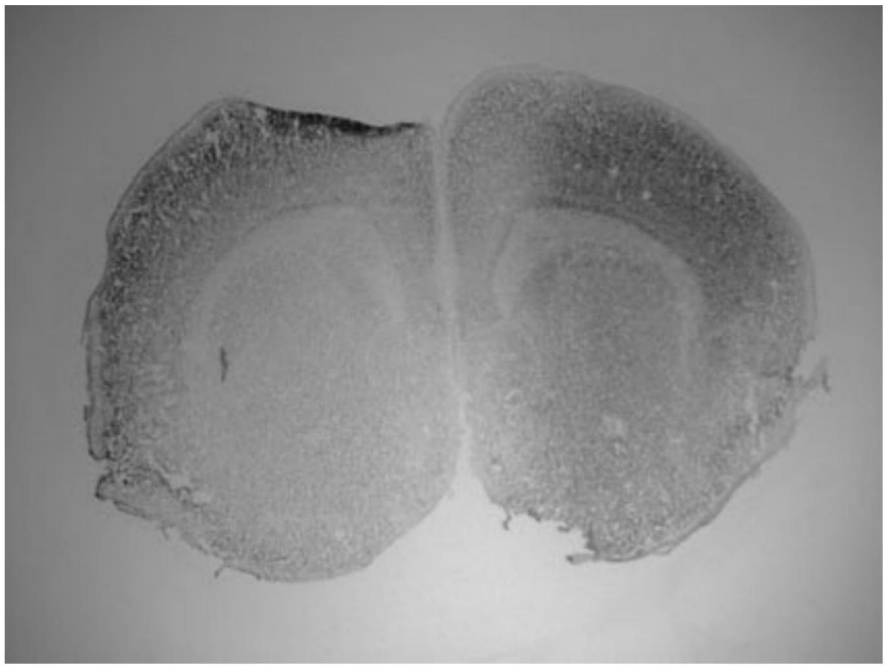
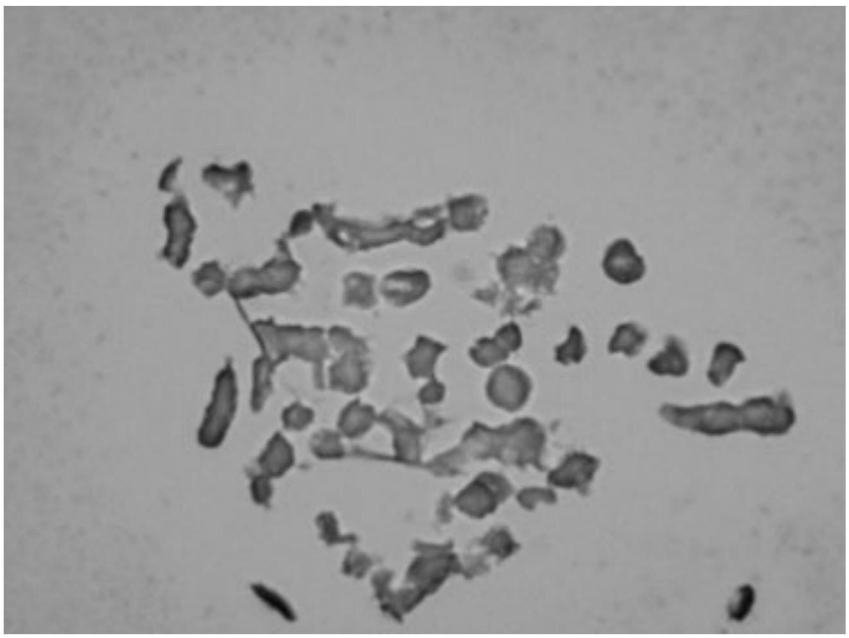


图2

（A）



（B）

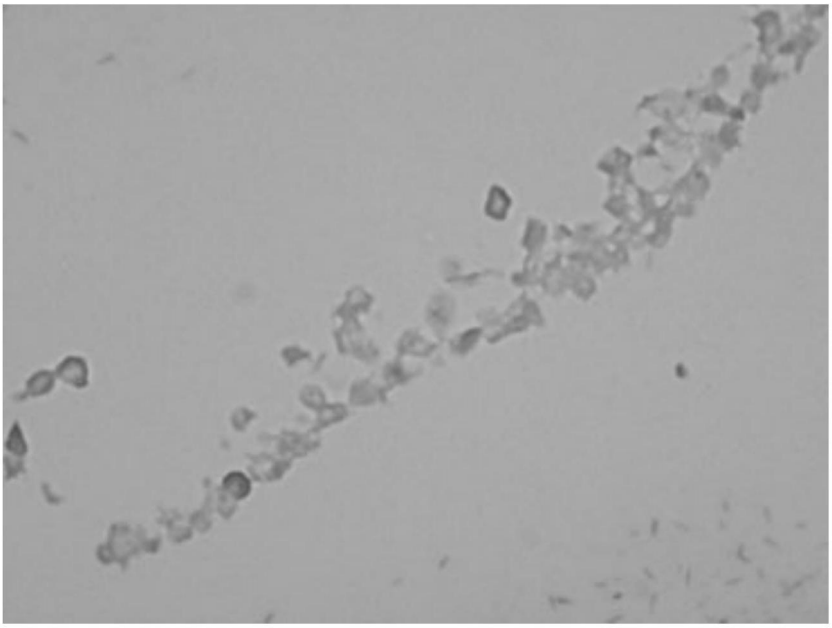
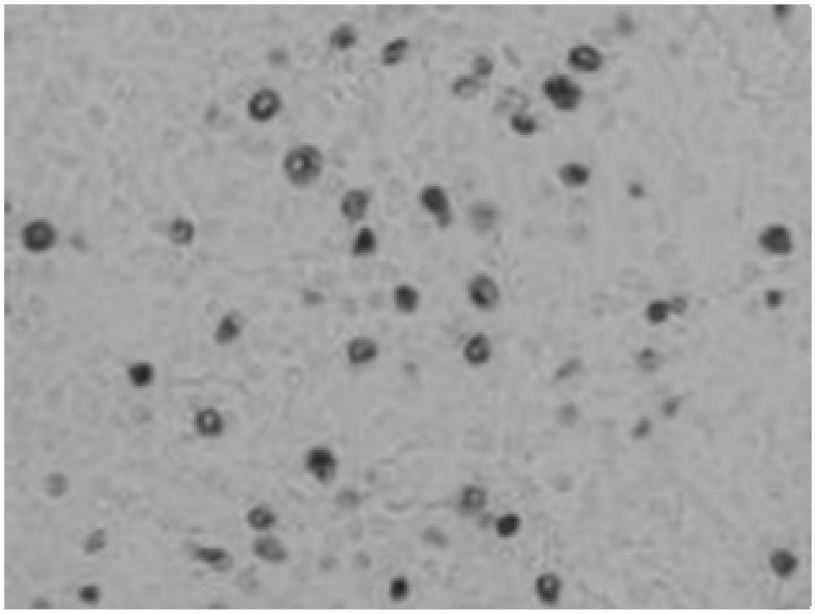


图3

(A)



(B)

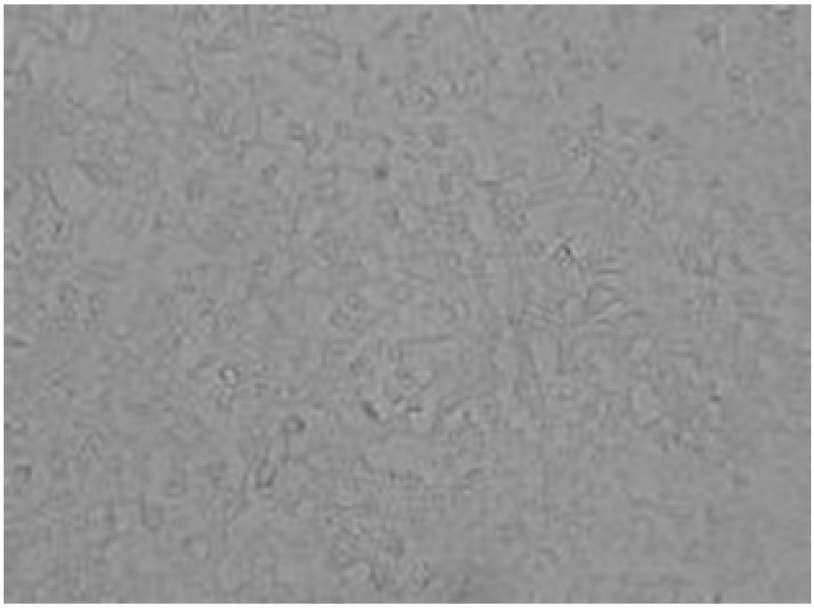
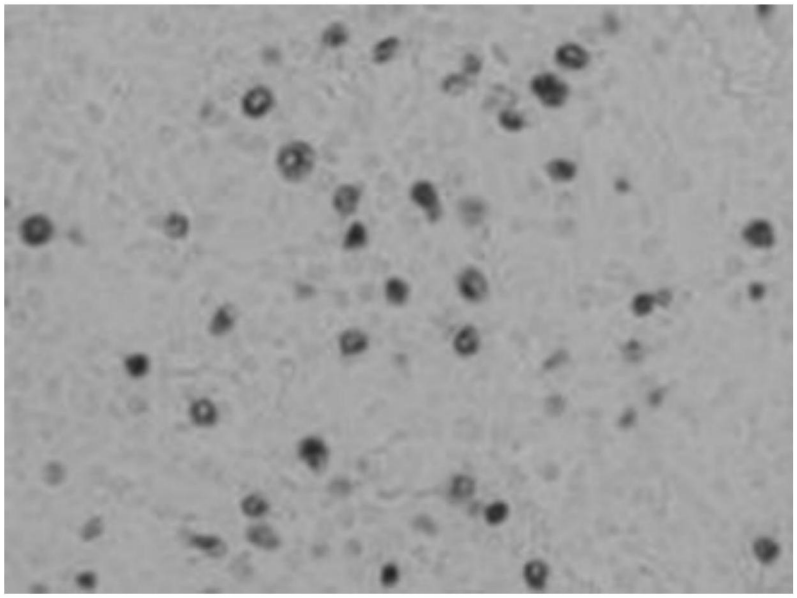


图4

(A)



(B)

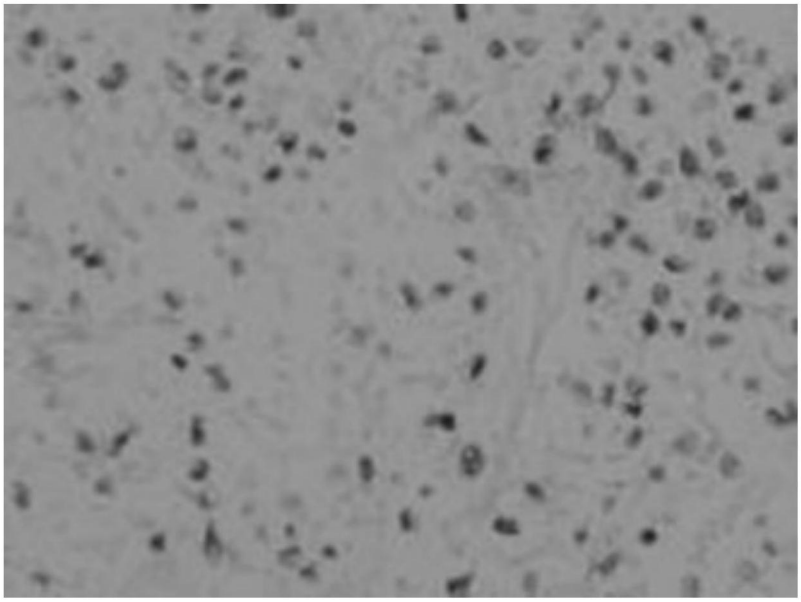


图5