(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 105441549 A
(43)申请公布日 2016.03.30

(21)申请号 201510970816.1

(22)申请日 2008.03.26

(30)优先权数据
60/920939 2007.03.30 US
60/954721 2007.08.08 US

(62)分案原申请数据
200880010876.7 2008.03.26

(71)申请人 霍夫曼-拉罗奇有限公司
地址 瑞士巴塞尔

(72)发明人 S·G·威尔 V·博德普迪
E·H·菲斯 R·沙希尼安

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001
代理人 权陆军 石克虎

(51)Int.Cl.
C12Q 1/68(2006.01)

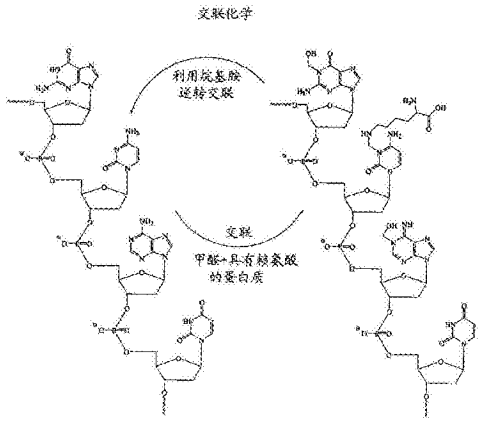
权利要求书1页 说明书8页
序列表2页 附图10页

(54)发明名称

烷基胺改进甲醛固定的生物样品组分的检测

(57)摘要

本发明涉及烷基胺改进甲醛固定的生物样品组分的检测。烷基胺起作用以释放在生物样品中发生的甲醛交联。因此,将烷基胺接触甲醛固定的样品是可以用于使得样品的生物组分,包括核酸或蛋白质更易于检测和表征的方法。



CN 105441549 A

1.用于分析甲醛交联的生物样品的一种或多种组分的方法，该方法包括：

(1)在室温下，将样品与充足量的选自乙二胺、乙醇胺和丙胺的烷基胺接触以释放至少一部分交联的组分，从而提高一种或多种组分对于分析的可检测度；

(2)在检测步骤之前，将烷基胺基本上从样品中除去；和

(3)检测组分，

其中组分是核酸。

2.权利要求1的方法，其中烷基胺的量在2mM至800mM之间。

3.权利要求1的方法，其中在检测步骤之前，将烷基胺的浓度降低至小于80mM。

4.权利要求1的方法，其中检测步骤包括扩增核酸。

5.权利要求1的方法，其中在允许形成探针和核酸的条件下，使核酸组分接触探针，并且检测双链体的存在。

6.权利要求1的方法，其中在接触步骤前，样品被包埋在石蜡中。

7.权利要求1的方法，其中与如果不进行接触步骤可用于分析的部分相比，可用于分析的核酸的部分被提高到至少约两倍。

8.权利要求1的方法，所述方法进一步包括将样品与蛋白酶接触以降解样品中的蛋白质，从而使得核酸更可用于分析。

9.试剂盒，其用于提高甲醛交联的生物样品的一种或多种核酸组分的利用度，该试剂盒包括：

(1)选自乙二胺、乙醇胺和丙胺的烷基胺；

(2)用于从生物样品除去烷基胺的设备，其中用于除去的所述设备是用于纯化核酸的柱；和

(3)用于检测或改进检测所述核酸组分的试剂。

10.权利要求9的试剂盒，所述试剂盒进一步包括核苷酸和/或热稳定聚合酶。

11.反应混合物，所述反应混合物包括

甲醛交联的生物样品；和

充足量的选自乙二胺、乙醇胺和丙胺的烷基胺以释放至少一部分交联的核酸组分，其中烷基胺的量在约2mM至约800mM之间。

烷基胺改进甲醛固定的生物样品组分的检测

[0001] 本申请是国际申请日为2008年3月26日的国际申请PCT/EP2008/002356进入中国、申请号为200880010876.7的题为“烷基胺改进甲醛固定的生物样品组分的检测”的发明专利申请的分案申请。

[0002] 技术领域和背景技术

[0003] 在过去的100年中，病理学家已经常规地通过用甲醛固定生物样品来保存它们如组织。虽然甲醛处理保持了组织的细胞特征，但甲醛处理也会导致化学交联，这使得样品的许多生物组分不能充分适于或不适于检测、量化和表征。甲醛通过使蛋白质中的伯胺基团与蛋白质或DNA中的其它附近的氮原子通过-CH_2-键交联，而保存或固定组织或细胞。因此，例如尽管聚合酶链式反应(PCR)可用于检测和量化生物样品中的核酸，但PCR通常不能充分地或不能有效地分析甲醛交联的样品中的核酸，特别是在期望定量结果时。

[0004] 因此，在甲醛的作用下核酸交联到细胞组分对检测各种细胞组分提出了挑战、包括检测核酸和蛋白质。虽然已经描述了一些途径用于改进从甲醛交联的样品扩增核酸，但该改进通常仅仅包括降解样品中的蛋白质或提供通常不改变形成交联的共价键的洗涤剂。本发明解决这个及其他问题。

发明内容

[0005] 本发明提供了用于分析甲醛交联的生物样品的一种或多种组分的方法。在一些实施方案中，该方法包括使样品与充足量的烷基胺接触，以释放至少一部分交联的组分，从而改进用于分析的一种或多种组分的可检测度(accessibility)。

[0006] 在一些实施方案中，生物样品来自动物的组织样品。

[0007] 在一些实施方案中，烷基胺的量在0.01％(约2mM)至5％(约800mM)之间。

[0008] 在优选的实施方案中，样品和烷基胺被加热一段时间。

[0009] 在一些其它的优选的实施方案中，该方法进一步包括检测组分。

[0010] 在一些实施方案中，在检测步骤之前，将烷基胺基本上从样品中除去。在一些实施方案中，在检测步骤前，烷基胺的浓度降低至小于约0.5％(约80mM)(例如小于约0.2％或0.1％)。

[0011] 在一些实施方案中，检测步骤包括定量检测组分。

[0012] 在一些实施方案中，组分是核酸。在一些实施方案中，核酸是DNA。在一些实施方案中，组分是RNA。

[0013] 在一些实施方案中，该方法进一步包括检测核酸。在一些实施方案中，检测步骤包括扩增核酸。在一些实施方案中，在允许形成探针和核酸的条件下，使核酸组分接触探针，并且检测双链体的存在。在一些实施方案中，探针连接到固相载体上。在一些实施方案中，扩增步骤包括聚合酶链式反应。

[0014] 在一些实施方案中，组分是蛋白质。在一些实施方案中，该方法进一步包括检测蛋白质。在一些实施方案中，检测步骤包括质谱或电泳。在一些实施方案中，质谱包括基质辅助激光解吸/离子化(MALDI)。

[0015] 在一些实施方案中，在接触步骤前，样品被包埋在石蜡中。

[0016] 在一些实施方案中，烷基胺选自乙二胺、乙醇胺和丙胺。

[0017] 在一些实施方案中，与如果不进行接触步骤可用于分析的部分相比，可用于分析的组分的部分被提高到至少约两倍。在一些实施方案中，与如果不进行接触步骤可用于分析的部分相比，可用于分析的组分的部分被提高到至少约十倍。

[0018] 在一些实施方案中，该方法进一步包括使样品与蛋白酶接触以降解样品中的蛋白质，从而使得核酸更可用于分析。

[0019] 本发明还提供了试剂盒，其用于改进甲醛交联的生物样品的一种或多种组分的利用度。在一些实施方案中，该试剂盒包括烷基胺；和用于从生物样品除去烷基胺的设备，例如蛋白酶或试剂或设备。

[0020] 在一些实施方案中，该试剂盒包括用于从生物样品除去烷基胺的试剂或设备。在一些实施方案中，该设备是用于纯化核酸的柱。

[0021] 在一些实施方案中，该试剂盒包括蛋白酶。在一些实施方案中，蛋白酶是蛋白酶K。

[0022] 在一些实施方案中，该试剂盒进一步包括核苷酸和/或热稳定聚合酶。在一些实施方案中，热稳定聚合酶是Taq聚合酶。

[0023] 本发明还提供了反应混合物。在一些实施方案中，反应混合物包括甲醛交联的生物样品；和充足量的烷基胺以释放至少一部分交联的组分。

[0024] 在一些实施方案中，烷基胺的量在0.01％至5％之间。在一些实施方案中，烷基胺选自乙二胺、乙醇胺和丙胺。在一些实施方案中，生物样品来自动物的组织样品。

[0025] 定义

[0026] “甲醛交联的生物样品”是指已经被甲醛处理成在蛋白质中的氮与其他含氮的蛋白质和/或核酸之间形成交联的生物样品。生物样品典型地包含细胞。生物样品可以是例如，来自动物的组织样品。通过将它们包埋在石蜡中而存储许多甲醛处理的样品。

[0027] 如本文中使用的，术语“烷基胺”是指直或支链的、饱和或不饱和的分子，其具有1-10或更多碳原子和一个或多个氨基。烷基胺的烷基部分可以是甲基、乙基、丙基、丁基、戊基、己基、异丙基、异丁基、仲丁基、叔丁基等。氨基可以是伯氨基或仲氨基。烷基胺可进一步被不大于2(即0、1或2)个取代基取代，其包括但不限于一个或多个羟基基团。可用于本发明的烷基胺包括但不局限于乙胺、丙胺、异丙胺、乙二胺和乙醇胺。本领域技术人员会理解其它烷基胺也可用于本发明。

[0028] 短语“检测组分”是指至少测定组分的存在或不存在，并可以包括组分或部分组分的进一步定量测定或其它表征。

[0029] 生物样品的“组分”是指一类分子(例如蛋白质、核酸等)或人们希望检测的具体的目标如具体的蛋白质或核酸序列。

[0030] 如本文中使用的，术语“核酸”是指脱氧核糖核苷酸的聚合物(包含2-脱氧-D-核糖)(即DNA)、多核苷酸(包含D-核糖)(即RNA)和任何其它嘌呤或嘧啶碱类的N-糖苷类似物、或经修饰的嘌呤或嘧啶碱基。

[0031] 短语“以释放至少一部分交联的组分”是指改变在生物样品的两种组分(例如核酸和蛋白)指尖形成交联的共价键，以便这两种组分不再通过共价键连接。该短语包括但不限于完全逆转交联过程。

[0032] 如本文中使用的，短语“用于分析的可检测度”是指测定特定的靶分子存在或不存在和/或量的检测方法。例如许多检测方法为至少部分阻止检测甲醛交联的生物样品中的蛋白质或核酸，因此某些交联的组分不″可用于″检测。一旦通过用烷基胺处理释放交联，则组分的提高量(例如至少多约10％和典型地是至少约2倍，或有时是约至少10或100倍)可以被检测和定量测定。

附图说明

[0033] 图1描绘了核酸甲醛交联到赖氨酸以及在添加烷基胺后交联逆转的实例。

[0034] 图2描绘了实施例1中所述未经处理的低聚核苷酸的质谱分析。

[0035] 图3描绘了实施例1中所述福尔马林处理的低聚核苷酸的质谱分析。

[0036] 图4描绘了实施例1中所述福尔马林处理的低聚核苷酸和赖氨酸的质谱分析。

[0037] 图5描绘了如实施例1中所述使用乙醇二胺(ethanoldiame)处理从而从交联的DNA再生起始DNA后福尔马林处理的低聚核苷酸和赖氨酸混合物的质谱分析。

[0038] 图6描绘了未经处理的合成RNA的质谱分析。

[0039] 图7描绘了在与福尔马林孵育1小时后合成RNA的质谱分析。

[0040] 图8描绘了与福尔马林孵育5小时后合成RNA的质谱分析。

[0041] 图9描绘了与福尔马林孵育24小时后合成RNA的质谱分析。

[0042] 图10描绘了在与福尔马林和赖氨酸孵育1小时后合成RNA的质谱分析。

[0043] 图11描绘了在于福尔马林和赖氨酸孵育1小时以及随后利用乙醇二胺(ethanoldiame)(EDA)释放解除交联化学后合成RNA的质谱分析。该图显示从交联的核糖核酸-赖氨酸加合物再生起始RNA。

[0044] 图12描绘了乙醇二胺(EDA)的作用。所使用EDA的浓度是作为百分数显示的。值得注意地，在这个系统中，发现0.2％(约50mM)和更高的EDA会抑制PCR反应。

[0045] 图13描绘了在福尔马林固定的石蜡包埋组织(FFPET)样品中利用EDA逆转交联。图的上面部分显示较低浓度的EDA，无论是否进行QIAquick™纯化都发生扩增。然而，扩增的量与其他泳道相比低。在抑制扩增(例如高于0.1％(大约25mM))的EDA浓度下，仅仅在进行QIAquick™纯化时才发生扩增，这证明了在扩增之前除去或以其他方式灭活EDA的优点。图的一部分提供了循环极限对比信号的图表，并证明提高EDA的量结合EDA除去步骤能有效地显著提高样品中可用于进行PCR扩增的DNA的量。

[0046] 图14还描绘了在样品制备物中利用提高量的EDA处理达到了核酸用于扩增的利用度的改进。在图的上面部分，将循环极限(x-轴)针对扩增信号进行作图。在下面部分中，循环极限是y-轴，EDA的浓度是x-轴。

[0047] 图15描绘了SDS-PAGE凝胶，并显示福尔马林交联牛血清白蛋白(BSA)和后续通过用EDA处理而逆转交联的结果。

具体实施方式

[0048] I.介绍

[0049] 如图1所示，甲醛导致蛋白中的核酸与伯胺，特别是氨基酸例如赖氨酸和精氨酸的交联。作为交联的结果，甲醛固定的样品中各种生物组分不能被现代检测方法检测。本发明

提供了逆转交联，由此使得有更多的生物组分能够被检测的方法。

[0050] 逆转甲醛处理的样品的交联是通过将样品与充足量烷基胺接触以释放交联反应来实现的。图1描绘了交联逆转的一个实例(在该实例中显示了核酸通过甲醛与赖氨酸交联，随后用烷基胺使反应逆转。

[0051] 一旦交联的样品与烷基胺接触，则核酸和蛋白质的交联减少或消除，从而允许改进这些组分的检测。

[0052] II.使得交联的组分更可使用的方法

[0053] 本发明提供了用于使得生物样品的甲醛交联的组分更可用于检测的方法，其通过使样品与烷基胺接触。用于使得组分更可使用的烷基胺的数量可以变化，并且部分依赖于所使用具体的烷基胺、待检测的组分，和所使用的检测方法，因为不同的检测方法具有不同的敏感性因此可能需要程度不同的可使用的组分。

[0054] 理想地，使得可用于特定的检测方法的组分的量是样品中组分的全部量。然而，通常被使得可用于检测的组分的量低于样品中组分的全部量。在本发明的一些实施方案中，在与不使用烷基胺处理样品相比，可用于检测的可使用组分的量为至少约2倍(使用相同的检测方法)的条件下，使用充足量的烷基胺。在一些实施方案中，在与不使用烷基胺处理样品相比，可用于检测的可使用组分的量为至少约5、10、20、100倍(使用相同的检测方法)的条件下，使用充足量的烷基胺。在一些实施方案中，用于释放样品交联的烷基胺的浓度在约0.01％至约5％(或更多)之间，例如在约0.01％至约1％之间、在约0.05％至约2％之间，约0.05％至约1％之间，约0.1％至约1％之间。

[0055] 本领域技术人员能够理解样品和烷基胺结合的状态(例如时间和温度)将影响交联逆转的能力和量。烷基胺处理在环境温度(例如在20-40或50℃)之间下是有效的，因此不必然地需要加热步骤以释放交联。这在检测相对不稳定的组分时是特别有用的，如RNA。然而，较高的温度(例如80～100℃、90-100℃、90-99℃等)可以进一步改进核酸或蛋白质用于检测的可检测度。

[0056] 此外，烷基胺与样品孵育的时间的量将影响被使得可用于检测的组分的量。例如，样品可以与烷基胺孵育至少约5、10、20、30、60、120分钟或更多。虽然更长的孵育时间可以提高从交联释放的组分的量，但这需要与特定组分的不稳定程度相平衡。例如，当将检测不稳定的组分如RNA时，可期望使用较短的孕育时间。相反，较稳定的组分如蛋白质或DNA可以被暴露较长的事件而不损害组分。

[0057] 需要认识到可使用不同的烷基胺释放交联。在不限制本发明范围的前提下，所选择的烷基胺通常能够从甲醛诱导的交联键释放组分并且复原组分(例如核酸和/或蛋白质)成与甲醛交联之前所存在的基本上相同的组分。交联反应被认为是通过甲醛的反应所进行的可逆过程，第一胺形成半缩醛胺(hemiaminal)，随后脱水得到亚胺。亚胺与第二胺反应，得到产物缩醛胺(aminal)。该方法通过亚胺与水代替第二胺的反应回复到起始原料。相信本发明的烷基胺从甲醛诱导的交联键释放组分，其通过作为亚胺和缩醛胺(aminal)形成中的竞争性反应物。当交联键作为部分平衡过程释放时，亚胺中间体和甲醛与烷基胺反应，从而将组分从甲醛诱导的交联键释放。通常，任何烷基胺与伯胺(和有时仲胺)将是有效的。需要理解可以对烷基胺进行各种取代，而基本上不影响胺逆转交联或产生其它将与样品组分反应的反应性部分的能力，只要这样的取代基本上不妨碍胺进行反应的能力。例如乙醇胺

能有效地逆转交联键。乙二胺也是有效的，尽管需要承认其它二胺将同样能有效地用于本发明的方法。进一步，虽然有时可以优选较短的烷基链(例如具有1、2、3、4、5个碳)，但较长的碳链也可以使用。

[0058] 根据本发明的方法，可以使用任何类型的甲醛交联的生物样品。通常，组织样品源自于动物组织。在一些实施方案中，样品包埋在石蜡中。例如样品可以是福尔马林固定石蜡包埋的组织(FFPET)。在一些实施方案中，样品是从动物(例如人)中获得并随后保存在包含甲醛的溶液中，以在分析之前稳定样品，从而交联样品中的核酸和/或蛋白质。例如子宫颈或其它妇科拭子(例如用于检测性传播疾病)可以被保存在包含甲醛的溶液中，从而交联样品中的核酸和/或蛋白质。随后可以根据本发明的方法使用烷基胺逆转交联。

[0059] 为了进一步使得样品组分可用于检测，在本发明的方法中包括额外的纯化或其他步骤。例如，如果将要检测样品的核酸组分，可能有帮助的是使用蛋白酶处理样品(例如在烷基胺处理之前或之后)，或者以其他方式降解样品中的蛋白质。示范性的蛋白酶是蛋白酶K，尽管需要理解可以替换成各种其他的蛋白酶。

[0060] 同样依赖于随后使用的检测方法，期望除去或至少减少与检测组分之前与样品结合的烷基胺的量。例如，发明人已经发现有帮助的是从样品的其他组分以及从烷基胺纯化样品中的核酸，其通过使用试剂或设备例如离心柱以从样品的其他部分纯化核酸。示范性的设备是与核酸具有亲和力的硅基离心柱(例如来自Qiagen，Valencia，CA的Qiaquick™离心柱)，尽管当然也可以使用其他纯化方法除去烷基胺。

[0061] 或者，胺可以被化学中和以不再能够显著干扰特定组分的检测。

[0062] II.交联生物样品的组分的检测

[0063] 可以将上述烷基胺处理与任何检测方法结合以检测之前交联的样品的组分。正如下面进一步详细描述的，样品中交联干扰检测的组分包括核酸和蛋白质。组分的检测可以包括仅仅确定特定组分或组分一部分(例如特定蛋白质或核酸序列)的存在或不存在。可替换的，检测可以包括定量测定组分，和/或表征组分。表征可以包括例如肽或核酸测序和/或确定饭以后或翻译修饰包括例如糖基化、磷酸化等。

[0064] A.核酸

[0065] 本领域中已知许多用于检测核酸的方法。DNA或RNA(包括mRNA、rRNA等)或者二者都可以被检测。检测可以包括定量测定特定的序列或RNA和/或表征核酸，例如通过核苷酸测序或序列特异性杂交技术(例如诸如用于检测单核苷酸多态性(SNP)等)。

[0066] 由于许多石蜡包埋的甲醛处理的样品相对小，因此，通常希望使用扩增方法扩增特定的核酸以辅助检测核酸。可以使用任何类型的扩增方法，包括指数扩增方法，线性扩增，热循环，等温方法等。适当的扩增方法包括但不限于聚合酶链式反应(PCR)(Principles and Applications for DNA Amplification(ed.H.A.Erlich，Freeman Press，NY，N.Y.，1992)；PCR Protocols:A Guide to Methods and Applications(eds.Innis，等人，Academic Press，San Diego，Calif.，1990)；Current Protocols in Molecular Biology，Ausubel，1994-1999，including supplemental updates through April 2004；Sambrook&Russell，Molecular Cloning，A Laboratory Manual(3rd Ed，2001))，连接酶链式反应(LCR)(美国专利No.5，185，243，5，679，524和5，573，907；EP 0 320 308 B1；WO 90/01069；WO 89/12696；和WO 89/09835)，循环探针技术(美国专利No.5，011，769，5，403，711，5，660，

988,和4,876,187,和PCT公开申请WO 95/05480,WO 95/1416,和WO 95/00667),Invader™技术(美国专利No.5,846,717;5,614,402;5,719,028;5,541,311;和5,843,669),Q-β复制酶技术(美国专利No.4,786,600),NASBA(美国专利No.5,409,818;EP-0 329 822),TMA(美国专利No.5,399,491,5,888,779,5,705,365,5,710,029),SDA(美国专利No.5,455,166和5,130,238)。在扩增中可以使用多种不同的聚合酶。从栖热水生菌(Thermus aquaticus)(Taq)分离的代表性热稳定酶描述于美国专利No.4,889,818中,在常规PCR中使用它的方法描述于Saiki等人,1988,Science 239:487-91中。另一种代表性热稳定酶包括栖热菌属(Thermus)物种Z05DNA聚合酶。参见例如美国专利No.5,674,738。任选地,可以使用实时PCR或其他定量技术以定量测定特定的核酸序列。定量扩增的方法公开在例如美国专利No.6,180,349;6,033,854;和5,972,602,以及在例如Gibson等人,Genome Research 6:995-1001(1996);DeGraves,等人,Biotechniques 34(1):106-10,112-5(2003);Deiman B,等人,Mol Btotechnol.20(2):163-79(2002)中。遵循反转录反应(RT-PCR)特别有用的,以便可以测量样品中一种或者多种基因的RNA水平。RT-PCR方法是本领域技术人员公知的(参见例如Current Protocols in Molecular Biology(Ausubel等人,eds.,2002)),并且容易被改造用于定量扩增方法。

[0067] 也可以使用其他方法用于检测核酸。例如,可以从样品分离核酸并与探针杂交。在某些情况中,探针可以连接到固体载体(例如微阵列)。

[0068] B.蛋白质

[0069] 也可以在使用烷基胺后检测样品的蛋白质组分。根据本发明的方法可以采用各种任何蛋白质检测和表征方法。

[0070] 示范性的蛋白质检测方法是质谱。示范性的质谱方法包括但不限于电喷射离子化和基质辅助激光解吸/离子化(MALDI)包括MALDI飞行时间(MALDI-TOF)方法。参见例如Karas,M;Hillencamp,F.Anal.Chem.60:2301 1988);Beavis,R.C.Org.Mass Spec.27:653(1992);Creel,H.S.Trends Poly.Sci.1(11):336(1993)。

[0071] 利用质谱检测的替代是利用电泳以分离和随后检测感兴趣的蛋白质。电泳法包括双向电泳方法。该方法可能任选地包括随后的利用抗体Western印迹检测蛋白质。

[0072] 其他选项包括免疫检测蛋白质。各种ELISA及用于免疫检测蛋白质的其他形式是公知的。

[0073] III.试剂盒

[0074] 本发明还提供了试剂盒,其可以用于使用本发明上述的方法。因而,试剂盒可以包括一种或多种本文中所述的试剂。任选地,试剂盒可以包括用于使用它们的书写(纸)或电子的说明书。

[0075] 在一些实施方案中,本发明的试剂盒将包括烷基胺以及至少一种额外的试剂用于检测或改进检测核酸或蛋白质。例如,在一些实施方案中,试剂盒包括烷基胺和蛋白酶(包括但不限于蛋白酶K)用于降解蛋白质和使得核酸更可以用于检测。用于检测或改进检测核酸或蛋白质的其它试剂包括例如可用于扩增的试剂。例如典型的聚合酶链式反应可以包括但不限于作为试剂的上游和下游引物、至少一种模板、脱氧核糖核苷三磷酸包括(dATP、dCTP、dGTP、TTP、dUTP)、聚合酶、缓冲液、金属阳离子和盐。用于RT-PCR反应的试剂盒还可以包括逆转录酶和/或引物。对于定量(例如“实时”)扩增,使用一种或多种多核苷酸探针以杂

交到期望的目标。探针典型地被可检测的标签例如荧光标记所标记。示范性的探针是Taqman™探针，尽管可以理解能够使用其他类型的探针以监控定量扩增反应中的目标。基于核酸序列的扩增(NASBA)反应可以包括引物、反转录酶、RNase H和DNA聚合酶。转录介导的扩增(TMA)反应可以包括引物、反转录酶和RNA聚合酶。链置换扩增(SDA)反应可以包括修饰的核苷酸和限制性内切核酸酶。某些扩增反应还可以包括脱氧尿苷糖基化酶(UNG)作为辅助扩增试剂(例如Amperase®，Roche Molecular Sciences，Alameda，CA)(参见，Kleiboeker，Virol J(2005)11:29)。

[0076] 用于检测或改进检测核酸或蛋白质的其他试剂包括例如用于纯化蛋白质或核酸的试剂或设备，例如本文所描述的。

[0077] IV.反应混合物

[0078] 本发明还提供了反应混合物。如这里所述，示范性的反应混合物将包括甲醛固定的样品，任选地包括石蜡，和烷基胺。反应混合物可以包括上述浓度的烷基胺。进一步，反应混合物任选地是以上述温度的。反应混合物可能任选地进一步包括蛋白酶(例如蛋白酶K)。

[0079] 实施例

[0080] 实施例1

[0081] 该实施例描绘了利用烷基胺逆转核酸的交联化学。

[0082] 在存在赖氨酸(0.3M)时，使用福尔马林(福尔马林缓冲溶液，10％，Sigma-Aldrich，HT50-1-1)处理合成寡聚核苷酸(DNA序列：AAG TCA GAA GGE AAA[E＝5-甲基-dC]，SEQ ID NO:1;3μM)或RNA序列：FCC CUC GCA GCC GUC CAA CAA CUC A[F＝荧光素]，SEQ ID NO:2;3μM)并在4℃下孵育24小时。通过LC-MS分析监控交联化学的动力学。MS数据暗示反应混合物中的产物由通过亚甲基桥与赖氨酸交联的寡聚核苷酸，以及寡聚核苷酸-福尔马林加合物构成。在24小时后，所有被检测的寡聚核苷酸似乎在反应混合物都被交联。在亚乙基胺处理之前，从反应混合物分离过量的福尔马林和赖氨酸。向该反应混合物(400μl)中，加入亚乙基胺(100μl，2.0M)，并在室温下孵育1.0小时。样品的LC-MS分析确认了交联化学的定量逆转，从所有交联的加合物再生起始寡聚核苷酸。改程序各个步骤中LC-MS分析的结果描绘于图2～5中。交联逆转的其他实施例描绘于图6～11中，这时使用合成RNA分子作为例子。

[0083] 实施例2

[0084] 下面提供检测DNA的示范性规程：

[0085] 步骤1：组织切片

[0086] 使用Microtom RM2255切出20μ组织切片，并将切片置于1.5mL微量离心管(Eppendorf)或螺旋盖管中.0.0。

[0087] 步骤2：裂解试剂

[0088] 将EDA加入到裂解试剂达到终浓度为500mM/225μL。向每个含有样品的试管中加入200μL裂解试剂/EDA。

[0089] 步骤3：加热步骤

[0090] 在设置在98℃的加热块中孵育每一种样品30分钟。在最初5分钟之后，从加热块除去每一种样品并且轻微涡旋。在涡旋之后，在20，817rcf下离心(例如Eppendorf 5417C，14，000rpm)5秒，以使得全部石蜡和组织进入溶液中。确保在管的侧面上没有剩下石蜡与组织。

回到加热块持续剩余25分钟。

[0091] 在25分钟之后，从加热块除去样品并且在20,817rcf下离心(例如Eppendorf 5417C,14,000rpm)5秒，以使得全部石蜡和组织进入溶液中。在室温下冷却每一种样品5分钟。

[0092] 步骤4:裂解+蛋白酶K步骤

[0093] 向每一个含有样品的试管中加入20μL PK。轻微涡旋，接着在20,817rcf下离心(例如Eppendorf 5417C,14,000rpm)5秒，以使得全部石蜡和组织进入溶液中。确保在管的侧面上没有剩下石蜡与组织。

[0094] 在设置在65℃的加热块中孵育每一种样品1小时。轻微涡旋，接着在20,817rcf下离心(例如Eppendorf 5417C,14,000rpm)5秒，以使得全部石蜡和组织进入溶液中。

[0095] 步骤5:蛋白酶K灭活步骤

[0096] 在设置在98℃的加热块中孵育每一种裂解样品10分钟。

[0097] 孵育10分钟后，快速从设定在98℃的加热快移出每一种样品并在20,817rcf(例如Eppendorf 5417C,14,000rpm)离心20分钟，以从裂解液除去碎片。如果将裂解液在离心前进行过分地冷却，则将不会形成石蜡固化顶层，并且石蜡将会连同裂解液被移出。优选，石蜡形成固化的顶层。

[0098] 步骤6:离心步骤以除去碎片

[0099] 用合适的样品鉴别，对每种样品标记一个新的1.5mL螺旋盖管。

[0100] 将裂解液转移到新标记的1.5mL试管。避免石蜡顶层和沉淀中的细胞碎片出现在试管的底层。

[0101] 如果样品需要进一步清理，将裂解液进一步离心额外的15分钟，20,817rcf(例如Eppendorf 5417C,14,000rpm)。将裂解液转移到新标记的1.5mL试管。

[0102] PCR前裂解液清理

[0103] 将100μL裂解液转到新标记的1.5mL试管中。根据QIAquick®PCR纯化试剂盒(QIAGEN Sciences)的方法。使用最终100μL的体积洗脱样品。

[0104] 实施例3

[0105] 本实施例描绘了利用乙二胺逆转蛋白质蛋白质交联化学。

[0106] 将牛血清白蛋白(BSA)蛋白质(100μg,10μg/mL)加入到甲醛液(65μl,甲醛缓冲液，10％,Sigma-Aldrich,HT50-1-1)中并且在4℃孵育。在14小时和36小时之后取等分的样品(每个点取25μL)。接着，将乙二胺(25μl,2.0M)加入到这些等分中，并在室温下孵育1小时。接着通过SDS凝胶分析样品(图15)。如图15的泳道4所示(在福尔马林中在4℃下孵育蛋白质14小时)，蛋白质-蛋白质交联是完全的。图15的泳道5(在室温下蛋白质-蛋白质交联的产物与乙二胺孵育1小时)表明蛋白质-蛋白质交联化学在存在乙二胺下是可逆的。然而、如果延长在福尔马林中的交联，则交联会不完全逆转(图15的泳道6-8)。

[0107] 需要理解本文中所述的实施例和实施方案仅仅是为了说明的目的，对于本领域技术人员在本文的教导下会暗示各种改变与变化，并且也包括在该应用的主旨和范围内，以及在所附权利要求的范围内。

序列表

<110> Roche Diagnostics GmbH, F. Hoffmann-La Roche AG

<120> 烷基胺改进甲醛固定的生物样品组分的检测

<130> 24201WO

<140> US Not yet assigned
<141> Not yet assigned

<150> US 60/920,939
<151> 2007-03-30

<150> US 60/954,721
<151> 2007-08-08

<160> 2

<170> PatentIn version 3.3

[0001] <210> 1
<211> 15
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸 DNA 序列

<220>
<221> 经修饰的碱基
<222> (12)..(12)
<223> n = m5c

<400> 1
aagtcagaag gnaaa 15

<210> 2
<211> 25
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸 RNA 序列

<220>
[0002] <221> 经修饰的碱基
<222> (1)..(1)
<223> 被荧光素（F）修饰的 c

<400> 2
cccucgcagc cguccaacca acuca 25

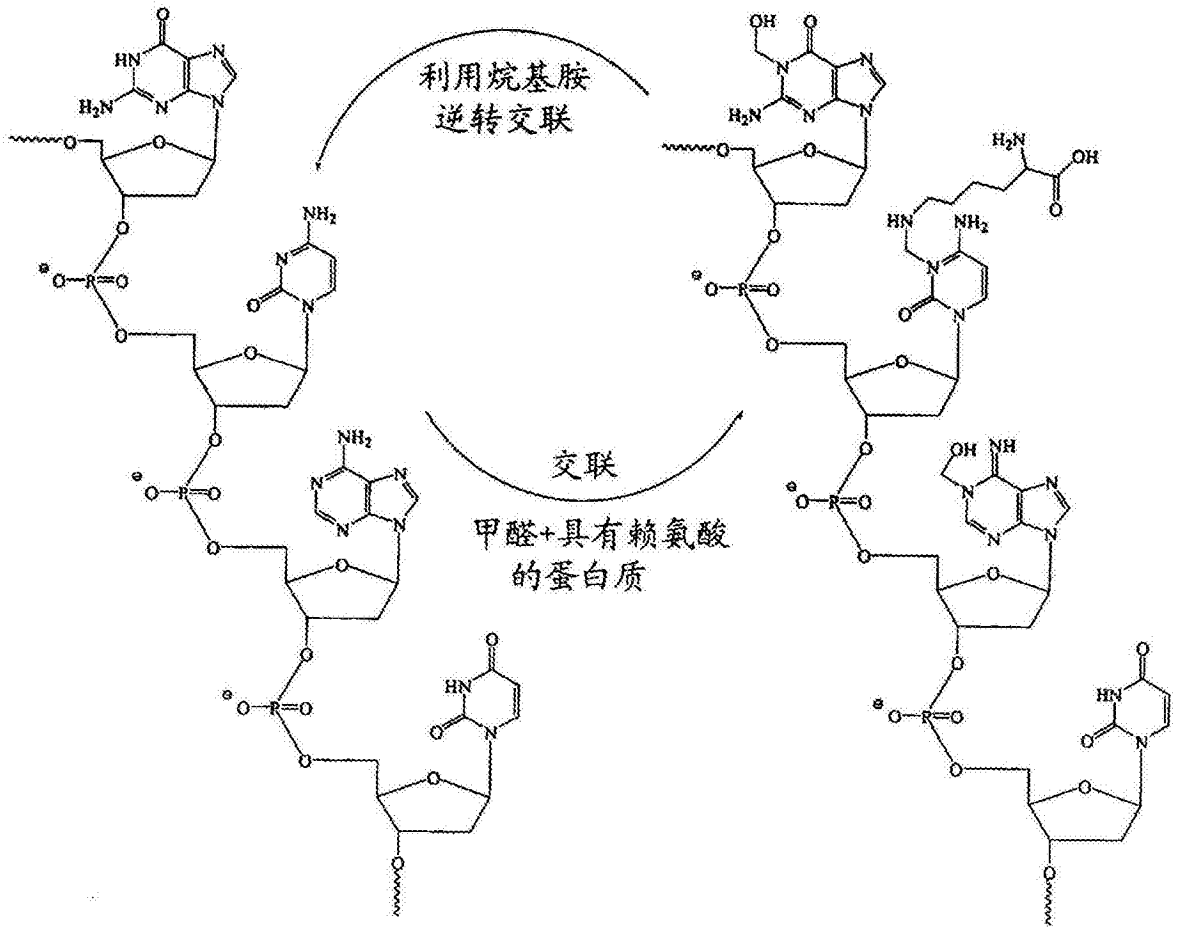


图1

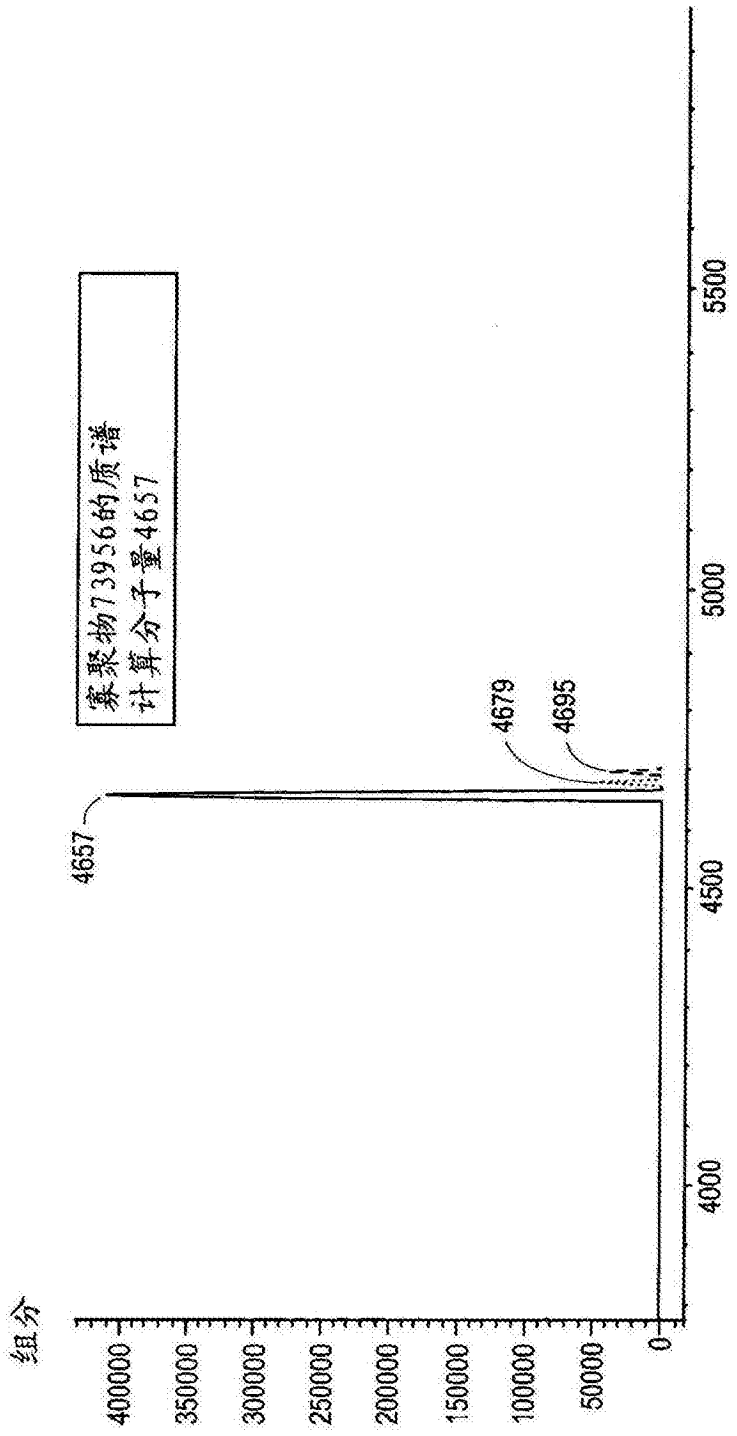

寡聚物73956的质谱
计算分子量4657
组分
400000
350000
300000
250000
200000
150000
100000
50000
0
4000
4500
5000
5500
4657
4679
4695

图2

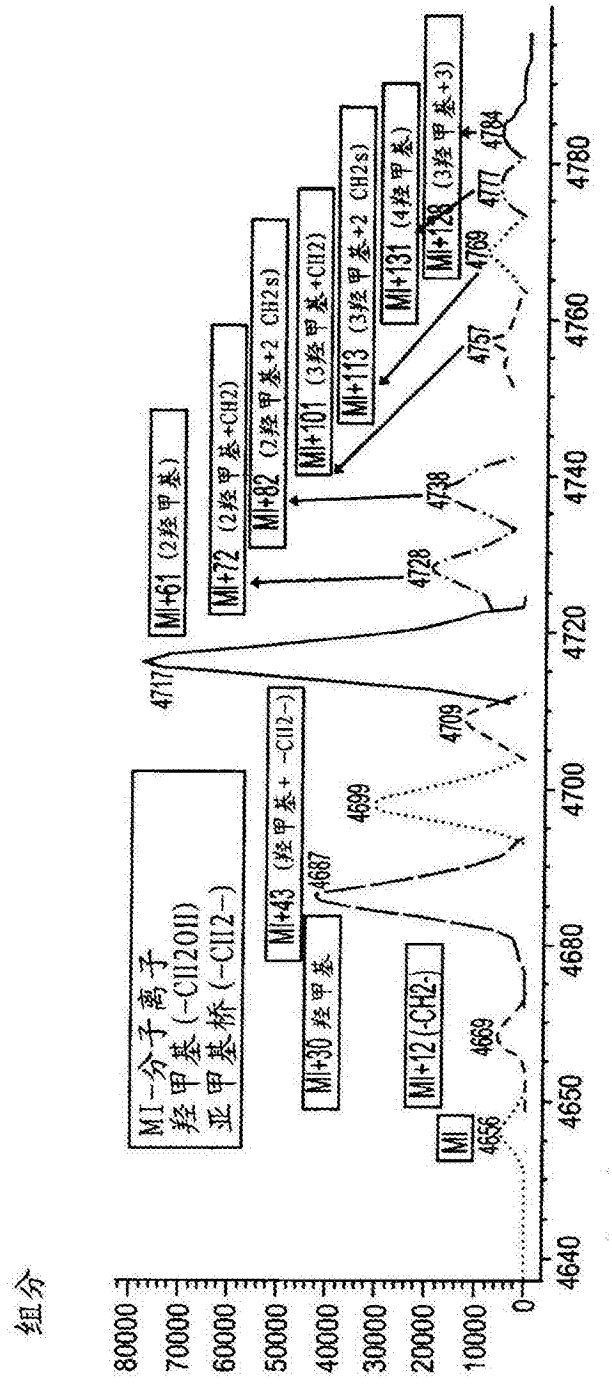

组分
MI-分子离子
羟甲基(-CH2OH)
亚甲基桥(-CH2-)
MI+61 (2羟甲基)
MI+72 (2羟甲基+CH2)
MI+82 (2羟甲基+2 CH2s)
MI+101 (3羟甲基+CH2)
MI+113 (3羟甲基+2 CH2s)
MI+131 (4羟甲基)
MI+128 (3羟甲基+3)
MI+43 (羟甲基+ -CH2-)
MI+30 羟甲基
MI+12(-CH2-)
MI
4656
4669
4687
4699
4709
4717
4728
4738
4757
4769
4777
4784
80000
70000
60000
50000
40000
30000
20000
10000
0
4640
4650
4660
4680
4700
4720
4740
4760
4780

图3

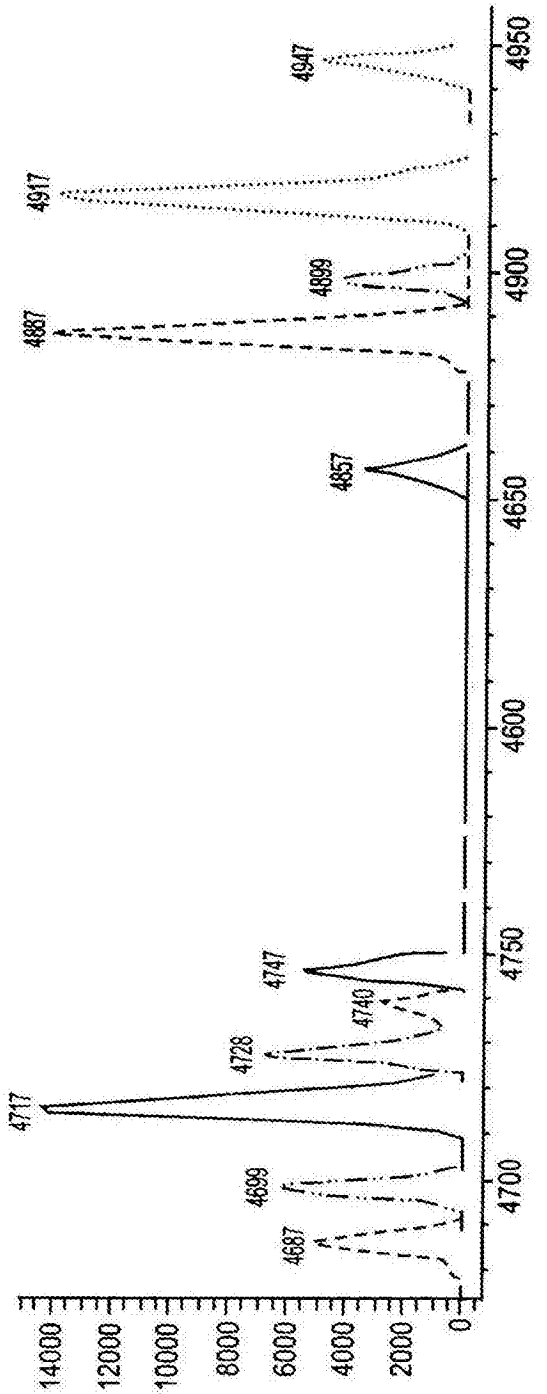

4687
4699
4717
4728
4740
4747
4857
4887
4899
4917
4947
14000
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
4700
4750
4600
4650
4900
4950

图4

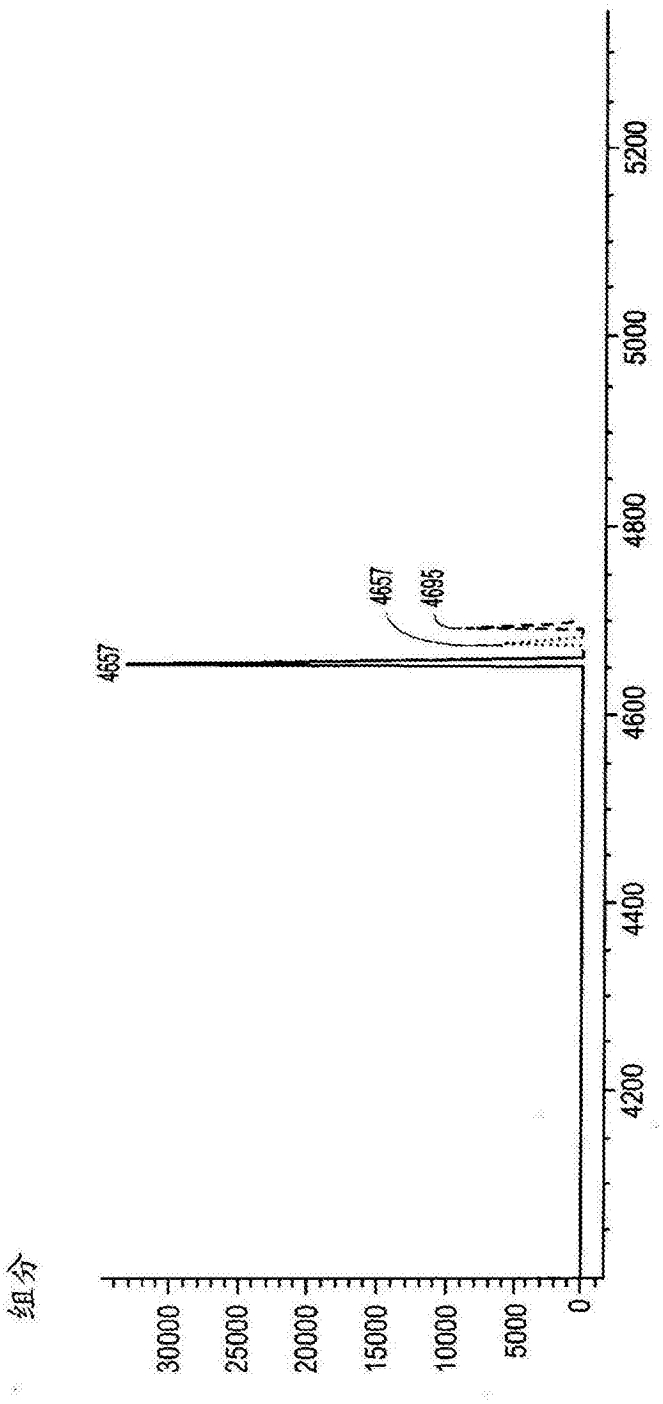

4657
4685
4657
5200
5000
4800
4600
4400
4200
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
组分

图5

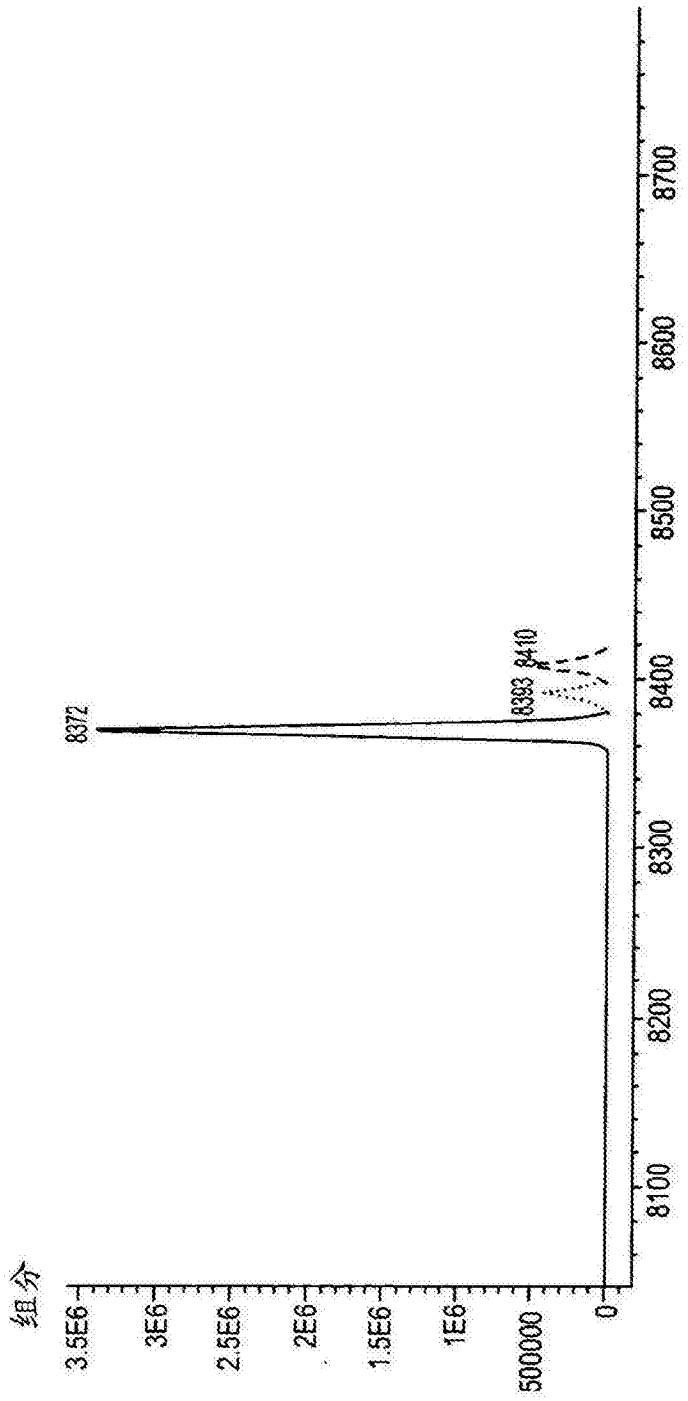

组分
3.5E6
3E6
2.5E6
2E6
1.5E6
1E6
500000
0
8100
8200
8300
8400
8500
8600
8700
8372
8393
8410

图6

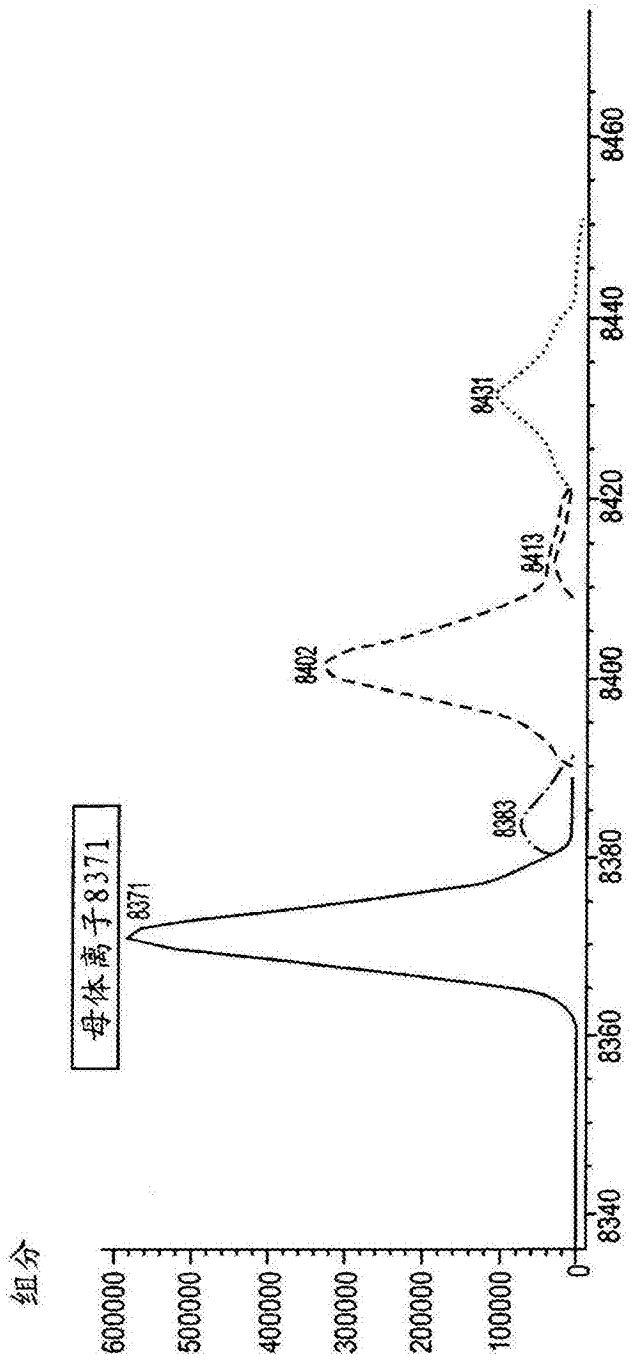

母体离子8371
8371
8383
8402
8413
8431
组分
600000
500000
400000
300000
200000
100000
0
8340
8360
8380
8400
8420
8440
8460

图7

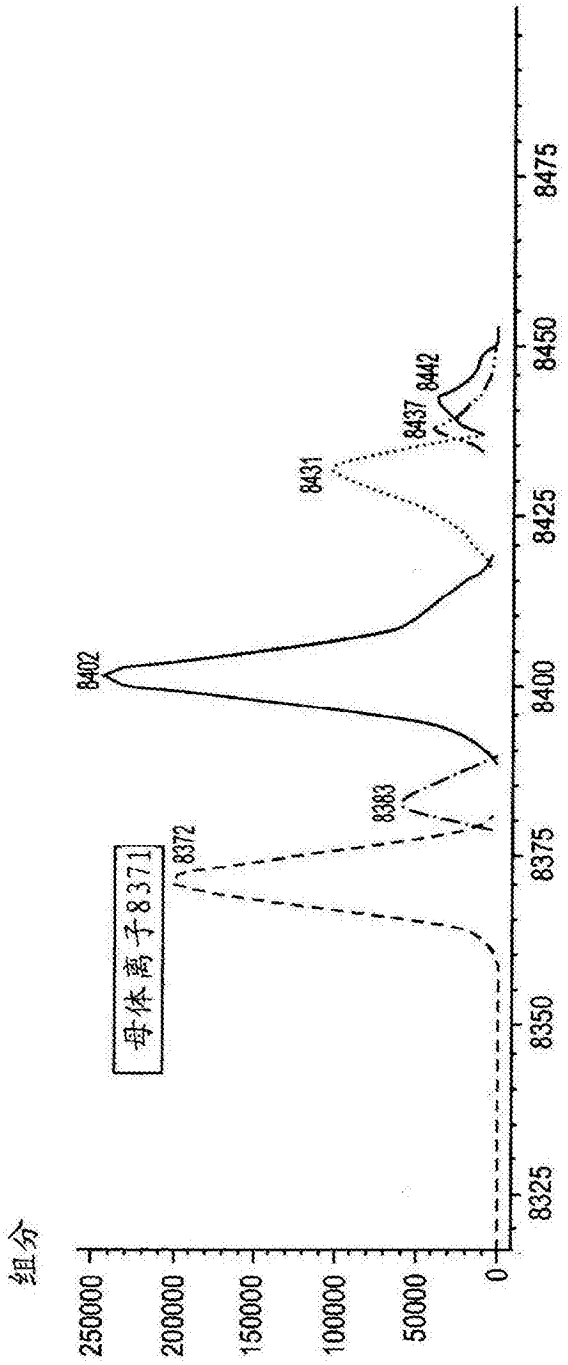

母体离子8371
8372
8383
8402
8431
8437
8442
组分
250000
200000
150000
100000
50000
0
8325
8350
8375
8400
8425
8450
8475

图8

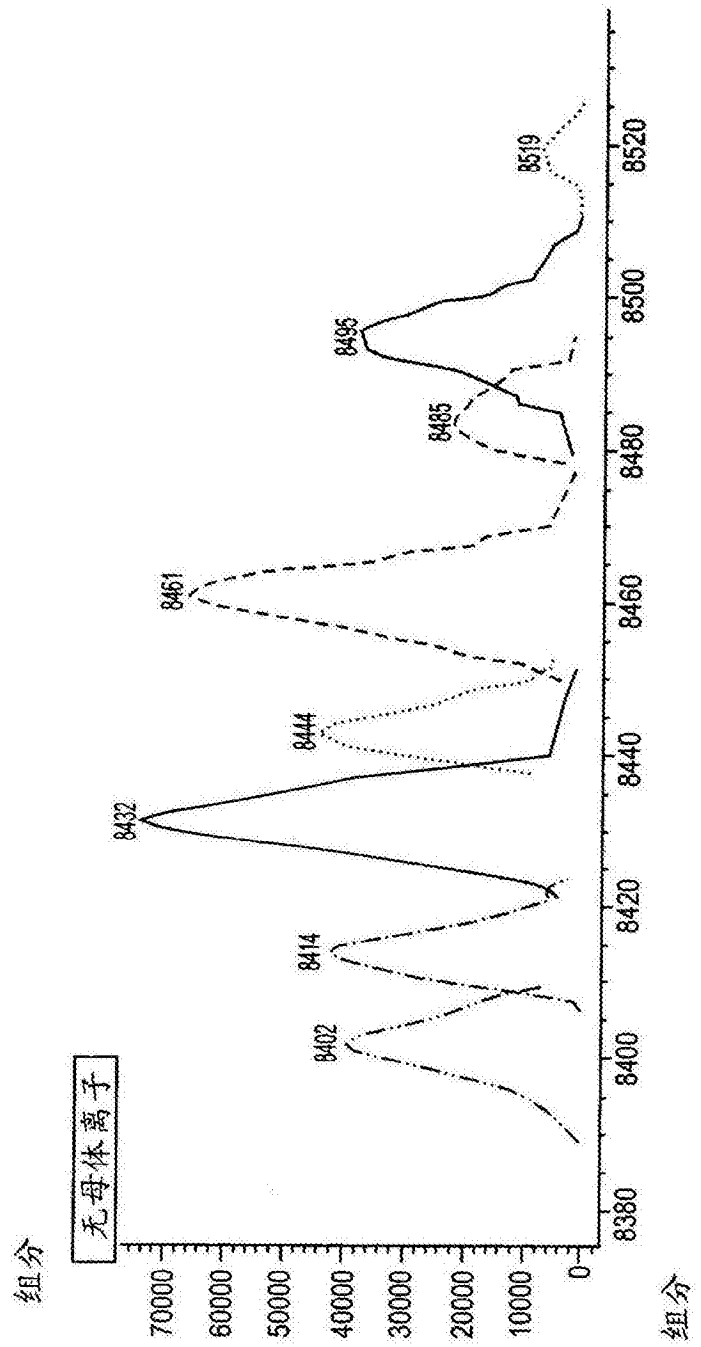

无母体离子
组分
组分
70000
60000
50000
40000
30000
20000
10000
0
8380
8400
8420
8440
8460
8480
8500
8520
8402
8414
8432
8444
8461
8485
8496
8519

图9

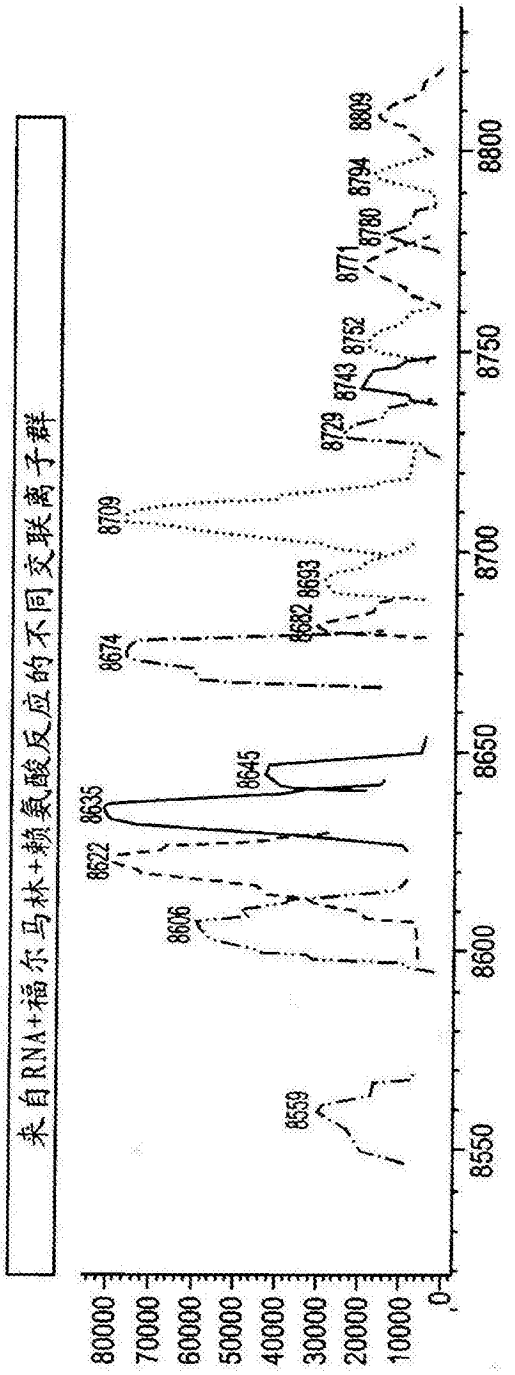

来自RNA+福尔马林+赖氨酸反应的不同交联离子群
80000
70000
60000
50000
40000
30000
20000
10000
0
8550
8600
8650
8700
8750
8800
8539
8606
8622
8635
8645
8674
8682
8693
8709
8729
8743
8752
8771
8780
8794
8809

图10

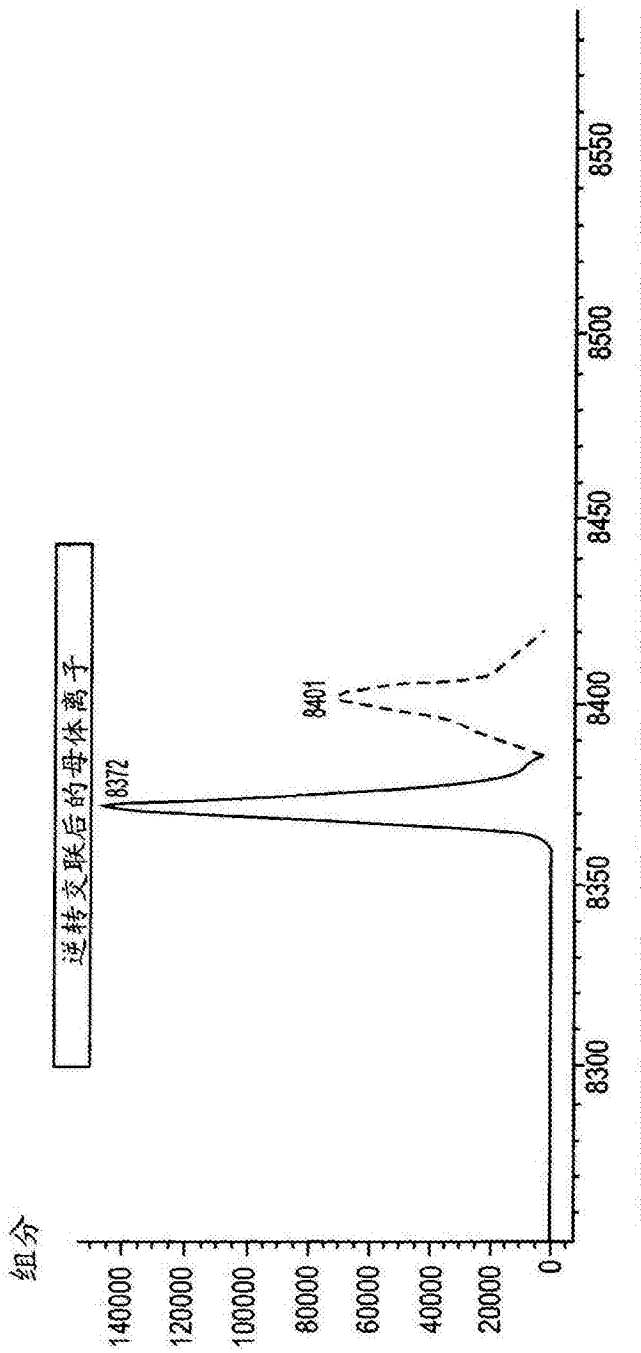

逆转交联后的母体离子
8372
8401
组分
140000
120000
100000
80000
60000
40000
20000
0
8300
8350
8400
8450
8500
8550

图11

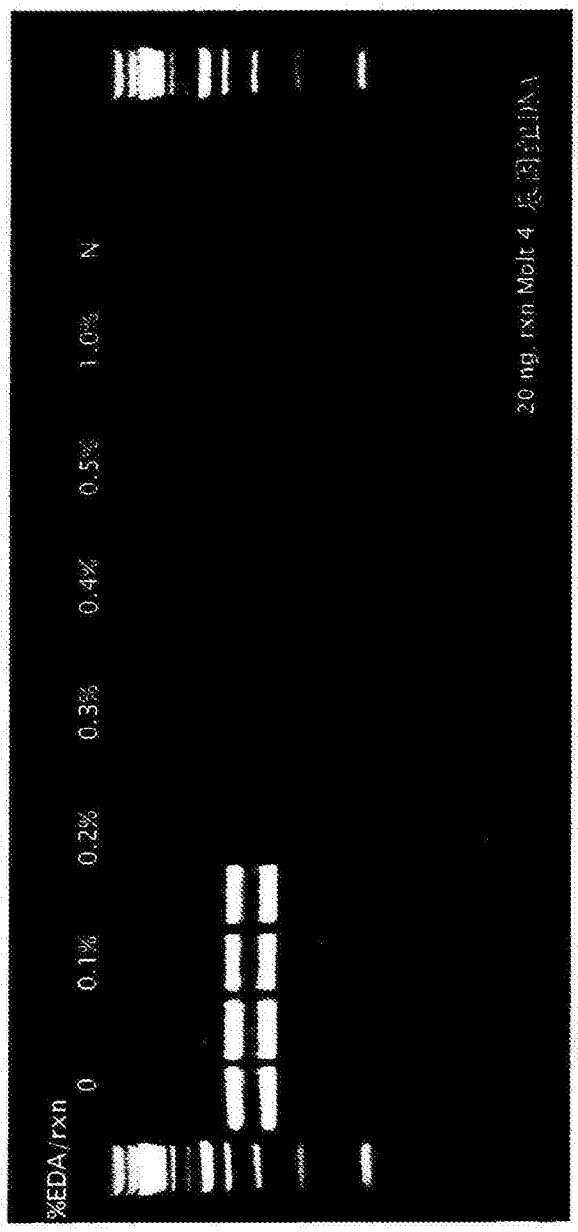

%EDA/rxn
0
0.1%
0.2%
0.3%
0.4%
0.5%
1.0%
N
20 ng rxn Molt 4

图12

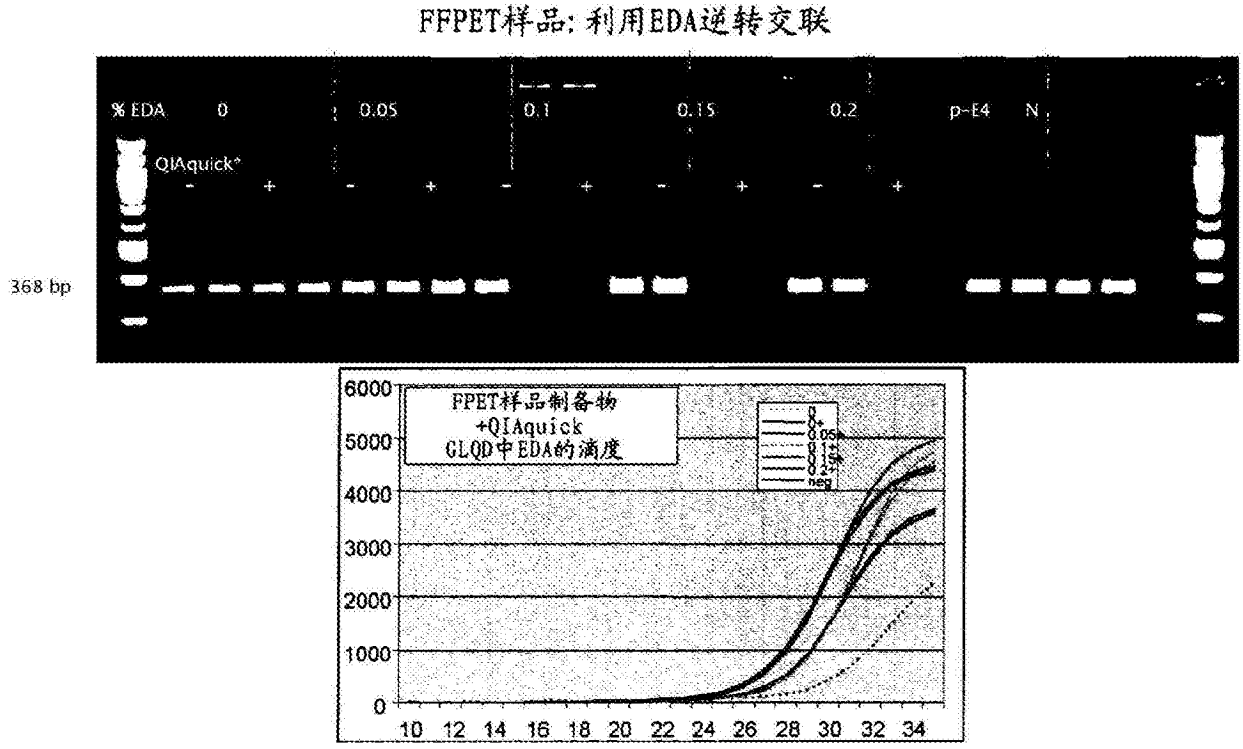

FFPET样品：利用EDA逆转交联
% EDA
0
0.05
0.1
0.15
0.2
p-E4
N
QIAquick*
368 bp
FPET样品制备物
+QIAquick
GLQD中EDA的滴度
neg

图13

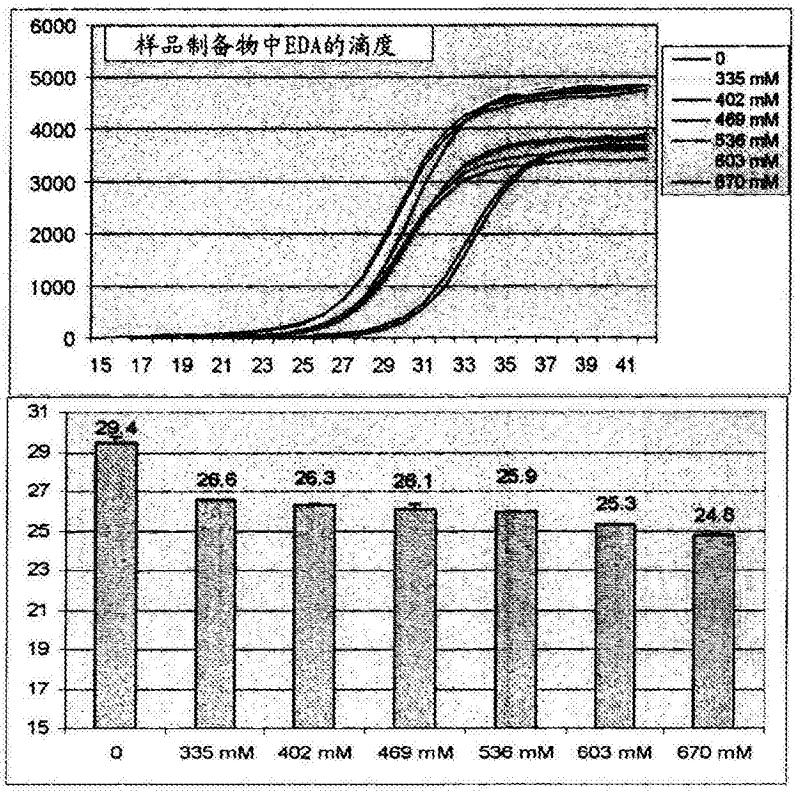
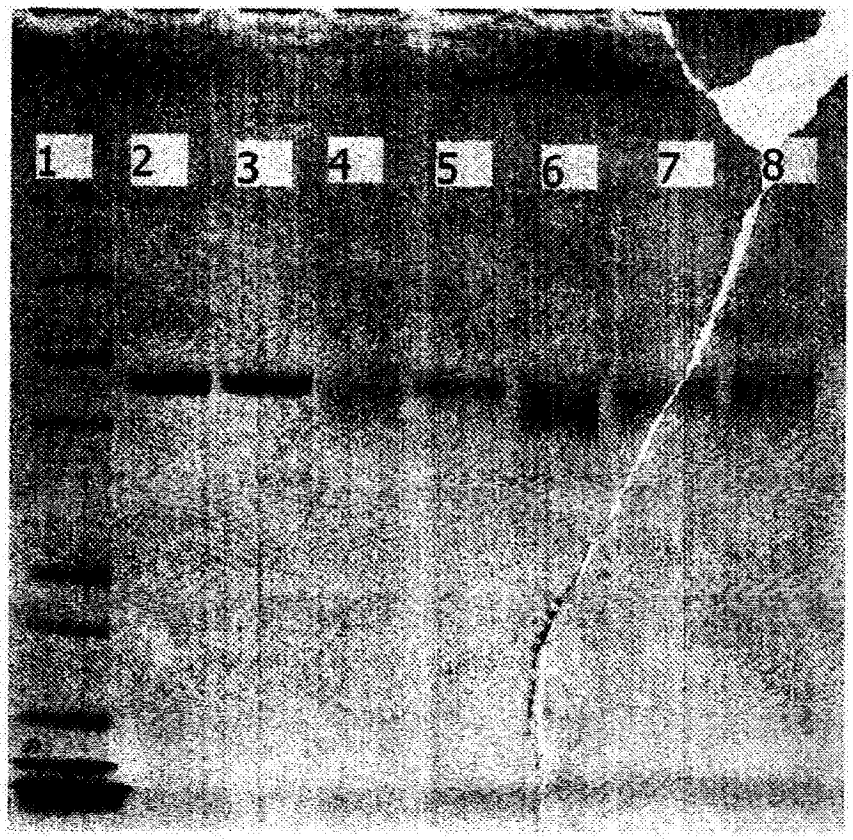

样品制备物中使用提高量的EDA处理FFPET样品
样品制备物中EDA的滴度
0
335 mM
402 mM
469 mM
536 mM
603 mM
670 mM
29.4
26.6
26.3
26.1
25.9
25.3
24.6

图14



道1: 标记
道2和3: BSA
道4: BSA+福尔马林, 14小时
道5: BSA+福尔马林(14小时)+EDA
道6: BSA+福尔马林(36小时)+EDA
道7: BSA+福尔马林(36小时)+EDA
道8: BSA+福尔马林(36小时)+EDA

图15