



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102084004 B

(45) 授权公告日 2016. 01. 20

(21) 申请号 200980121810. X

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2009. 05. 27

C12Q 1/68(2006. 01)

(30) 优先权数据

(56) 对比文件

PA200800727 2008. 05. 27 DK

WO 92/07956 A1, 1992. 05. 14, 说明书第 9 页

PA200900278 2009. 02. 27 DK

倒数第 1 段, 权利要求 1.

61/056, 089 2008. 05. 27 US

审查员 樊颖

61/155, 683 2009. 02. 26 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2010. 12. 10

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/IB2009/005893 2009. 05. 27

(87) PCT国际申请的公布数据

W02009/144581 EN 2009. 12. 03

(73) 专利权人 丹麦达科有限公司

地址 丹麦葛洛斯楚普

(72) 发明人 S·H·马希森 K·H·皮特森

T·S·普尔森 C·M·汉森

(74) 专利代理机构 北京尚诚知识产权代理有限

公司 11322

代理人 顾小曼

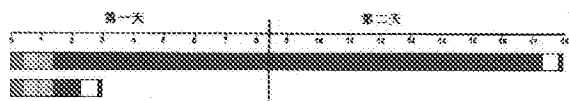
权利要求书5页 说明书43页 附图1页

(54) 发明名称

杂交组合物和方法

(57) 摘要

本发明提供用于使至少一种分子与靶标杂交的方法和组合物。本发明可以例如在杂交中不用甲酰胺或减少对甲酰胺的依赖性。用于本发明的组合物包含含水组合物, 其含有至少一种核酸序列和足以变性双链核苷酸序列的有效量的至少一种极性非质子溶剂。



1. 一种原位杂交组合物,所述组合物包含:至少一种核酸序列、足以变性双链核苷酸序列的有效量的极性非质子溶剂和杂交溶液,其中所述极性非质子溶剂是碳酸亚乙酯;并且其中所述极性非质子溶剂浓度以体积计为 5% 至 60%;

其中所述原位杂交是荧光原位杂交或显色原位杂交。

2. 权利要求 1 的杂交组合物,其中所述极性非质子溶剂浓度以体积计为 5% 至 10%。

3. 权利要求 1 的杂交组合物,其中所述极性非质子溶剂浓度以体积计为 10% 至 20%。

4. 权利要求 1 的杂交组合物,其中所述极性非质子溶剂浓度以体积计为 20% 至 30%。

5. 权利要求 1-4 中任一项的杂交组合物,条件是所述组合物不含甲酰胺。

6. 权利要求 1 的杂交组合物,条件是所述组合物含有小于 10% 甲酰胺。

7. 权利要求 6 的杂交组合物,条件是所述组合物含有小于 2% 甲酰胺。

8. 权利要求 7 的杂交组合物,条件是所述组合物含有小于 1% 甲酰胺。

9. 权利要求 1-4 和 6-8 中任一项的杂交组合物,其中所述极性非质子溶剂的分散度参数介于 $17.7-22.0\text{MPa}^{1/2}$ 之间,极性溶度参数介于 $13-23\text{MPa}^{1/2}$ 之间,氢键溶度参数介于 $3-13\text{MPa}^{1/2}$ 之间。

10. 权利要求 1-4 和 6 中任一项的杂交组合物,所述组合物还包含选自以下的至少一种额外组分:缓冲剂、盐、促进剂、螯合剂、去垢剂和封闭剂。

11. 权利要求 10 的杂交组合物,其中所述促进剂是硫酸葡聚糖,所述盐是 NaCl,和 / 或所述缓冲剂是磷酸缓冲液。

12. 权利要求 11 的杂交组合物,其中硫酸葡聚糖浓度是 5% 至 40%, NaCl 浓度是 0mM 至 1200mM,和 / 或所述磷酸缓冲液浓度是 0mM 至 50mM。

13. 权利要求 12 的杂交组合物,其中硫酸葡聚糖浓度是 10% 至 30%, NaCl 浓度是 300mM 至 600mM,和 / 或所述磷酸缓冲液浓度是 5mM 至 20mM。

14. 权利要求 10 的杂交组合物,其中所述促进剂选自:甲酰胺、甘油和二醇,所述缓冲剂是柠檬酸缓冲剂。

15. 权利要求 10 的杂交组合物,其中所述促进剂选自:甲酰胺、甘油、丙二醇、二甘醇和乙二醇,所述缓冲剂是柠檬酸缓冲剂。

16. 权利要求 10 的杂交组合物,其中所述促进剂选自:甲酰胺、甘油、1,2-丙二醇和 1,3-丙二醇,所述缓冲剂是柠檬酸缓冲剂。

17. 权利要求 14 的杂交组合物,其中所述甲酰胺浓度是 0.1-5%,甘油和二醇的浓度是 0.1% 至 10%,所述柠檬酸缓冲剂浓度是 1mM 至 50mM。

18. 权利要求 15 的杂交组合物,其中所述甲酰胺浓度是 0.1-5%,所述甘油、丙二醇、二甘醇和乙二醇的浓度是 0.1% 至 10%,所述柠檬酸缓冲剂浓度是 1mM 至 50mM。

19. 权利要求 16 的杂交组合物,其中所述甲酰胺浓度是 0.1-5%,所述甘油、1,2-丙二醇和 1,3-丙二醇的浓度是 0.1% 至 10%,所述柠檬酸缓冲剂浓度是 1mM 至 50mM。

20. 权利要求 10 的杂交组合物,其中所述封闭剂选自:人类总 DNA、鲑鱼精子 DNA、鲑鱼精子 DNA 和小牛胸腺 DNA。

21. 权利要求 20 的杂交组合物,其中所述人类总 DNA、鲑鱼精子 DNA、鲑鱼精子 DNA 和小牛胸腺 DNA 的浓度是 $0.01-10\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 。

22. 权利要求 7 的杂交组合物,所述组合物还包含选自以下的至少一种额外组分:缓冲

剂、盐、促进剂、螯合剂、去垢剂和封闭剂。

23. 权利要求 22 的杂交组合物,其中所述促进剂是硫酸葡聚糖,所述盐是 NaCl,和 / 或所述缓冲剂是磷酸缓冲液。

24. 权利要求 23 的杂交组合物,其中硫酸葡聚糖浓度是 5% 至 40%, NaCl 浓度是 0mM 至 1200mM,和 / 或所述磷酸缓冲液浓度是 0mM 至 50mM。

25. 权利要求 24 的杂交组合物,其中硫酸葡聚糖浓度是 10% 至 30%, NaCl 浓度是 300mM 至 600mM,和 / 或所述磷酸缓冲液浓度是 5mM 至 20mM。

26. 权利要求 22 的杂交组合物,其中所述促进剂选自:甲酰胺、甘油和二醇,所述缓冲剂是柠檬酸缓冲剂。

27. 权利要求 22 的杂交组合物,其中所述促进剂选自:甲酰胺、甘油、丙二醇、二甘醇和乙二醇,所述缓冲剂是柠檬酸缓冲剂。

28. 权利要求 22 的杂交组合物,其中所述促进剂选自:甲酰胺、甘油、1,2- 丙二醇和 1,3- 丙二醇,所述缓冲剂是柠檬酸缓冲剂。

29. 权利要求 26 的杂交组合物,其中所述甲酰胺浓度是 0.1% 至小于 2%,甘油和二醇的浓度是 0.1% 至 10%,所述柠檬酸缓冲剂浓度是 1mM 至 50mM。

30. 权利要求 27 的杂交组合物,其中所述甲酰胺浓度是 0.1% 至小于 2%,所述甘油、丙二醇、二甘醇和乙二醇的浓度是 0.1% 至 10%,所述柠檬酸缓冲剂浓度是 1mM 至 50mM。

31. 权利要求 28 的杂交组合物,其中所述甲酰胺浓度是 0.1% 至小于 2%,所述甘油、1,2- 丙二醇和 1,3- 丙二醇的浓度是 0.1% 至 10%,所述柠檬酸缓冲剂浓度是 1mM 至 50mM。

32. 权利要求 22 的杂交组合物,其中所述封闭剂选自:人类总 DNA、鲑鱼精子 DNA、鲑鱼精子 DNA 和小牛胸腺 DNA。

33. 权利要求 32 的杂交组合物,其中所述人类总 DNA、鲑鱼精子 DNA、鲑鱼精子 DNA 和小牛胸腺 DNA 的浓度是 0.01-10 μ g/ μ l。

34. 权利要求 8 的杂交组合物,所述组合物还包含选自以下的至少一种额外组分:缓冲剂、盐、促进剂、螯合剂、去垢剂和封闭剂。

35. 权利要求 34 的杂交组合物,其中所述促进剂是硫酸葡聚糖,所述盐是 NaCl,和 / 或所述缓冲剂是磷酸缓冲液。

36. 权利要求 35 的杂交组合物,其中硫酸葡聚糖浓度是 5% 至 40%, NaCl 浓度是 0mM 至 1200mM,和 / 或所述磷酸缓冲液浓度是 0mM 至 50mM。

37. 权利要求 36 的杂交组合物,其中硫酸葡聚糖浓度是 10% 至 30%, NaCl 浓度是 300mM 至 600mM,和 / 或所述磷酸缓冲液浓度是 5mM 至 20mM。

38. 权利要求 34 的杂交组合物,其中所述促进剂选自:甲酰胺、甘油和二醇,所述缓冲剂是柠檬酸缓冲剂。

39. 权利要求 34 的杂交组合物,其中所述促进剂选自:甲酰胺、甘油、丙二醇、二甘醇和乙二醇,所述缓冲剂是柠檬酸缓冲剂。

40. 权利要求 34 的杂交组合物,其中所述促进剂选自:甲酰胺、甘油、1,2- 丙二醇和 1,3- 丙二醇,所述缓冲剂是柠檬酸缓冲剂。

41. 权利要求 38 的杂交组合物,其中所述甲酰胺浓度是 0.1% 至小于 1%,甘油和二醇的浓度是 0.1% 至 10%,所述柠檬酸缓冲剂浓度是 1mM 至 50mM。

42. 权利要求 39 的杂交组合物,其中所述甲酰胺浓度是 0.1%至小于 1%,所述甘油、丙二醇、二甘醇和乙二醇的浓度是 0.1%至 10%,所述柠檬酸缓冲剂浓度是 1mM 至 50mM。

43. 权利要求 40 的杂交组合物,其中所述甲酰胺浓度是 0.1%至小于 1%,所述甘油、1,2-丙二醇和 1,3-丙二醇的浓度是 0.1%至 10%,所述柠檬酸缓冲剂浓度是 1mM 至 50mM。

44. 权利要求 34 的杂交组合物,其中所述封闭剂选自:人类总 DNA、鲑鱼精子 DNA、鲑鱼精子 DNA 和小牛胸腺 DNA。

45. 权利要求 44 的杂交组合物,其中所述人类总 DNA、鲑鱼精子 DNA、鲑鱼精子 DNA 和小牛胸腺 DNA 的浓度是 0.01-10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 。

46. 权利要求 1 和 6-8 中任一项的杂交组合物,所述组合物包含 40%的极性非质子溶剂、10%硫酸葡聚糖、300mM NaCl 和 5mM 磷酸缓冲液。

47. 权利要求 1、3 和 6-8 中任一项的杂交组合物,所述组合物包含 15%的极性非质子溶剂、20%硫酸葡聚糖、600mM NaCl、10mM 磷酸缓冲液和 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 人类总 DNA。

48. 权利要求 1、3 和 6-8 中任一项的杂交组合物,所述组合物包含 15%的极性非质子溶剂、20%硫酸葡聚糖、600mM NaCl、10mM 柠檬酸缓冲剂 pH 6.2 以及 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 鲑鱼精子 DNA、或鲑鱼精子 DNA、或小牛胸腺 DNA、或 0.5%甲酰胺、或 1%乙二醇、或 1% 1,3-丙二醇。

49. 权利要求 1-4 和 6-8 中任一项的杂交组合物,所述组合物在室温下包含不止一相。

50. 权利要求 49 的杂交组合物,所述组合物在室温下包含两相。

51. 权利要求 49 的杂交组合物,所述组合物在室温下包含三相。

52. 极性非质子溶剂在制备用于核酸序列的原位杂交的组合物中的用途,所述用途包括:

- 提供第一核酸序列,
- 提供第二核酸序列,
- 提供包含足以变性双链核苷酸序列的有效量的极性非质子溶剂的原位杂交组合物,

和

- 将所述第一、第二核酸序列和所述原位杂交组合物混合在一起,其时间至少足以使所述第一和第二核酸序列杂交,

其中所述极性非质子溶剂是碳酸亚乙酯;并且其中所述极性非质子溶剂浓度以体积计为 5%至 60%;

其中所述原位杂交是荧光原位杂交或显色原位杂交。

53. 极性非质子溶剂在制备用于核酸序列的原位杂交的组合物中的用途,所述用途包括:

- 提供在原位生物样品中的第一核酸序列,和
- 将包含第二核酸序列和足以变性双链核苷酸序列的有效量的极性非质子溶剂的原位杂交组合物用于所述第一核酸序列,其时间至少足以使所述第一和第二核酸序列杂交,

其中所述极性非质子溶剂是碳酸亚乙酯;并且其中所述极性非质子溶剂浓度以体积计为 5%至 60%;

其中所述原位杂交是荧光原位杂交或显色原位杂交。

54. 权利要求 52 或 53 的用途,其中所述极性非质子溶剂按照权利要求 3 中定义。

55. 权利要求 52 或 53 的用途,其中所述极性非质子溶剂按照权利要求 4 中定义。

56. 权利要求 52 或 53 的用途,其中所述极性非质子溶剂按照权利要求 9 中定义。

57. 极性非质子溶剂在制备用于核酸序列的原位杂交的组合物中的用途,所述用途包括:

- 提供第一核酸序列,
- 提供第二核酸序列,
- 提供权利要求 1-51 中任一项的原位杂交组合物,和
- 将所述第一、所述第二核酸序列与所述原位杂交组合物混合在一起,其时间至少足以使所述第一和第二核酸序列杂交。

58. 极性非质子溶剂在制备用于核酸序列的杂交的组合物中的用途,所述用途包括:

- 提供第一核酸序列,和
- 将权利要求 1-51 中任一项的原位杂交组合物用于所述第一核酸序列,其时间至少足以使所述第一和第二核酸序列杂交。

59. 权利要求 52-53 和 57-58 中任一项的用途,其中提供足够量的能量使所述第一和第二核酸杂交。

60. 权利要求 59 的用途,其中通过加热所述原位杂交组合物和核酸序列而提供能量。

61. 权利要求 60 的用途,其中通过使用微波、热浴、加热板、加热线、珀耳帖元件、感应加热或加热灯来进行所述加热步骤。

62. 权利要求 52-53 和 57-58 中任一项的用途,其中所述第一核酸序列是双链的,而所述第二核酸是单链的。

63. 权利要求 52-53 和 57-58 中任一项的用途,其中所述变性和杂交步骤单独发生。

64. 权利要求 52-53 和 57-58 中任一项的用途,其中所述杂交步骤包括加热和冷却所述原位杂交组合物和核酸序列的步骤。

65. 权利要求 52-53 和 57-58 中任一项的用途,所述杂交步骤需要不到 8 小时。

66. 权利要求 65 的用途,其中所述杂交步骤需要不到 1 小时。

67. 权利要求 66 的用途,其中所述杂交步骤需要不到 30 分钟。

68. 权利要求 67 的用途,其中所述杂交步骤需要不到 15 分钟。

69. 权利要求 68 的用途,其中所述杂交步骤需要不到 5 分钟。

70. 权利要求 64 的用途,其中所述冷却步骤需要不到 1 小时。

71. 权利要求 70 的用途,其中所述冷却步骤需要不到 30 分钟。

72. 权利要求 71 的用途,其中所述冷却步骤需要不到 15 分钟。

73. 权利要求 72 的用途,其中所述冷却步骤需要不到 5 分钟。

74. 权利要求 52-53 和 57-58 中任一项的用途,其中所述第一核酸序列是在生物样品中。

75. 权利要求 74 的用途,其中所述生物样品是细胞学或组织学样品。

76. 权利要求 52-53 和 57-58 中任一项的用途,其中所述原位杂交组合物在室温下包含一相。

77. 权利要求 52-53 和 57-58 中任一项的用途,其中所述原位杂交组合物在室温下包含多相。

78. 权利要求 77 的用途,其中所述原位杂交组合物在室温下包含两相。

-
79. 权利要求 77 或 78 的用途,其中所述原位杂交组合物的各相混合在一起。
80. 权利要求 52-53 和 57-58 中任一项的用途,所述用途还包括封闭步骤。

杂交组合物和方法

发明领域

[0001] 本发明涉及用于杂交例如用于原位杂交 (ISH) 的含水组合物。

[0002] 在一个实施方案中,本发明涉及 DNA 和 RNA 分子检测领域。具体地讲,本发明涉及细胞学、组织学和分子生物学领域。一方面,本发明涉及在核酸之间杂交期间所需能量(例如孵育时间和热),例如在原位杂交靶向 DNA 和 RNA 中。

[0003] 背景和描述

[0004] 当碱基以一种特定方式配对(A+T 或 G+C)时,DNA 双螺旋结构通过相对链的碱基之间氢键结合而达到稳定。这种互补碱基配对(杂交)对于涉及核酸的所有过程来说都是至关重要的。

[0005] 在杂交的基本实例中,核酸片段或序列与互补核酸片段或序列结合。例如,杂交可使用核酸探针,所述探针经设计用于与靶标(例如 DNA 或 RNA)结合或“杂交”。一类杂交,原位杂交(ISH),包括与标本中的靶标杂交,其中所述标本可以在体内,或例如固定或粘附在载玻片上。探针可被标记,以便通过使用荧光或明视野显微镜/扫描仪来识别探针-靶标杂合体。片段或序列通常是双链或单链核酸,例如 DNA、RNA 或类似物。在某些实施方案中,片段或序列可以用放射性标记(例如 ^{31}P 、 ^{33}P 或 ^{32}S)、非放射性标记(例如地高辛配基和生物素)或荧光标记而标记的探针。这种标记的探针可用于检测靶序列中的遗传异常,提供有关例如出生前障碍、癌症和其它遗传性或感染性疾病的有价值信息。

[0006] 核酸杂交测定的效率和准确度主要取决于以下 3 个因素中的至少一个:a) 变性(即例如两条核酸链的分离)条件,b) 复性(即例如两条核酸链重新退火)条件,和 c) 杂交后的洗涤条件。

[0007] 传统的杂交实验,例如 ISH 测定,使用含甲酰胺的溶液,以使双链核酸链变性。甲酰胺是一种溶剂,它通过置换松散而均匀结合的水合分子而对例如 DNA、RNA 及其类似物的螺旋状态具有去稳定效应。此外,甲酰胺通过碱基 Watson-Crick 结合位点的‘甲酰胺化’而使 DNA、RNA 及其类似物的卷曲状态稳定。然而,甲酰胺是有毒有害物质,其使用和废料都受到严格的法规管制。

[0008] 此外,尽管已经接受使用甲酰胺作为杂交标准技术,但是使用甲酰胺受到完成杂交所需长时间的限制,这取决于条件和所用核酸片段或序列。例如,变性步骤之后接着是更耗时间的杂交步骤,所述步骤例如在传统的荧光原位杂交(FISH)方案中需要 14-24 小时,并且甚至至多需要 72 小时。传统杂交时间的实例见图 1 和图 2。

[0009] 两条核酸链互补链的重新退火步骤(即杂交)是使用杂交的测定中最耗时间的。迄今为止,认为使用干扰核酸碱基 Watson-Crick 结合位点并因而破坏互补核酸碱基间氢键的离液剂,例如甲酰胺、胍离子(guanidinium hydrogen)和尿素,是降低互补链的解链温度(T_m)的唯一方式。然而,尽管使用离液剂降低了 T_m ,与在不含离液剂的含水溶液中进行的杂交相比,这些试剂看来能明显延长杂交时间。此外,除了长时间处理的不利因素之外,使用高浓度甲酰胺看来会导致细胞结构、核结构和/或染色体结构的形态学上的破坏。最终,认为甲酰胺对人类是有毒有害的化学药品。

[0010] 本发明提供与现有技术相比的若干潜在优势,例如更快的杂交时间,更低的杂交温度和毒性更小的杂交溶剂。

[0011] 发明概述

[0012] 本发明的一个目的是提供可导致至少一个以下优势的组合物:高灵敏度、技术简单、灵活而可靠的杂交程序,以及快速分析。在某些实施方案中,例如,一个优势可以通过比用现有技术方法程度大得多地改变杂交反应的温度,提供定制杂交时间的能力。例如,杂交可在室温下进行。

[0013] 在一个实施方案中,本发明的组合物和方法降低了杂交所需能量。本发明的组合物和方法可用于任何杂交技术。本发明的组合物和方法也可用于使用碱基配对而杂交或结合的任何分子系统,例如,DNA、RNA、PNA、LNA 及其合成和天然类似物。

[0014] 本发明的另一个目的是提供保持生物样品形态学的杂交方法和组合物。本发明的又一个目的是提供无毒杂交组合物和程序。本发明的还一个目的是提供低蒸发杂交技术。本发明的另一个目的是提供可用 20x 物镜检测的杂交技术。本发明的还一个目的是提供具有低探针浓度的组合物。本发明的又一个目的是减少和 / 或消除对封闭非特异性结合的需要。本发明的组合物和方法也可允许使用多相探针,而无需封闭、去除或用其它方法破坏例如生物样品中的重复序列的结合。

[0015] 在一个实施方案中,本发明的核酸杂交方法和组合物可用于基因组 DNA、染色体、染色体片段、基因以及与正常情况或疾病相关的染色体畸变例如易位、缺失、扩增、插入、突变或倒位的体内或体外分析。此外,所述方法和组合物可用于检测感染性因子以及 RNA 例如 mRNA 及其互补 DNA (cDNA) 表达水平的改变。

[0016] 其它应用包括对以下进行体内或体外分析:信使 RNA (mRNA)、病毒 RNA、病毒 DNA、小干扰 RNA (siRNA)、小核 RNA (snRNA)、非编码 RNA (ncRNA, 例如 tRNA 和 rRNA)、转移信使 RNA (tmRNA)、微小 RNA (miRNA)、piwi- 相互作用 RNA (piRNA)、长的非编码 RNA、小核仁 RNA (snoRNA)、反义 RNA、双链 RNA (dsRNA)、甲基化和其它碱基修饰、单核苷酸多态性 (SNP)、拷贝数变异 (CNV) 以及单独或与未标记核酸组合的标记核酸 (其带有例如放射性同位素、荧光分子、生物素、地高辛配基 (DIG) 或抗原标记)。

[0017] 本发明的核酸杂交方法和组合物可用于核酸的体内或体外分析,使用例如以下技术:PCR、原位 PCR、RNA 印迹、DNA 印迹、流式细胞术、放射自显影、荧光显微镜术、化学发光、免疫组织化学、虚拟核型 (virtual karyotype)、基因测定、DNA 微阵列 (例如阵列比较基因组杂交 (阵列 CGH)、基因表达谱、基因 ID、叠瓦阵列 (Tiling array)、凝胶电泳、毛细管电泳和原位杂交例如 FISH、SISH、CISH。本发明的方法和组合物可用于体外和体内样品,例如骨髓涂片、血涂片、石蜡包埋的组织制备物、经酶解的组织样品、骨髓、羊水细胞、细胞离心 (cytospin) 制备物、印迹 (imprint) 等。

[0018] 在一个实施方案中,本发明提供用于使至少一种分子与靶标杂交的方法和组合物。本发明可例如不用甲酰胺或减少对甲酰胺的依赖性。例如,本发明的方法和组合物可降低杂交的能障,而不用甲酰胺。降低能障可减少杂交所需时间和 / 或降低杂交所需温度。例如,本发明可允许在较低温度杂交,或可允许在较高温度快速杂交。因此,在某些方面,本发明克服了杂交测定中的主要耗时步骤。

[0019] 本发明一方面是用于杂交的组合物或溶液。用于本发明的组合物包含含水组合

物,其含有至少一种核酸序列和足以变性双链核苷酸序列的有效量的至少一种极性非质子溶剂。变性双链核苷酸序列的有效量是能够杂交的量。例如,用于测定极性非质子溶剂的量是否对杂交有效的一种方式,是确定所述极性非质子溶剂,当用于本文所述的杂交方法和组合物例如实施例 1 时,是否能产生可检测信号和 / 或扩增的核酸产物。

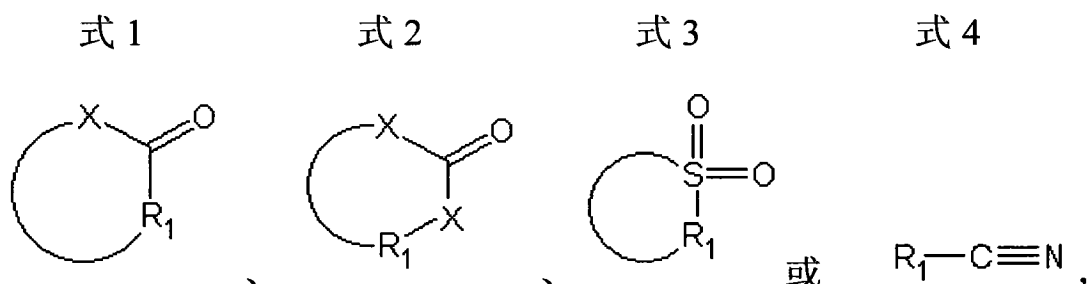
[0020] 极性非质子溶剂有效量的非限制性实例包括例如约 1% 至约 95% (v/v)。在某些实施方案中,极性非质子溶剂的浓度为 5% 至 60% (v/v)。在其它实施方案中,极性非质子溶剂的浓度为 10% 至 60% (v/v)。在再一些实施方案中,极性非质子溶剂的浓度为 30% 至 50% (v/v)。1% 至 5%、5% 至 10%、10%、10% 至 20%、20% 至 30%、30% 至 40%、40% 至 50%、或 50% 至 60% (v/v) 的浓度也是合适的。在某些实施方案中,极性非质子溶剂的浓度可以是 0.1%、0.25%、0.5%、1%、2%、3%、4% 或 5% (v/v)。在其它实施方案中,极性非质子溶剂的浓度可以是 7%、7.5%、8%、8.5%、9%、9.5%、10%、10.5%、11%、11.5%、12%、12.5%、13%、13.5%、14%、14.5%、15%、15.5%、16%、16.5%、17%、17.5%、18%、18.5%、19%、19.5% 或 20% (v/v)。

[0021] 依据本发明的另一方面,包含极性非质子溶剂的含水组合物具有降低的毒性。比传统杂交溶液毒性更低的组合物可包含组合物,条件是所述组合物不含甲酰胺,或条件是所述组合物含有小于 10%、或小于 5%、或小于 2%、或小于 1%、或小于 0.5%、或小于 0.1%、或小于 0.05%、或小于 0.01% 的甲酰胺。一种低毒的组合物也可包含组合物,条件是所述组合物不含二甲基亚砜 (DMSO),或条件是所述组合物含有小于 10%、5%、2% 或小于 1%、或小于 0.5%、或小于 0.1%、或小于 0.05%、或小于 0.01% DMSO。

[0022] 在本发明的一方面,可根据极性非质子溶剂的 Hansen 溶度参数,来选择用于本发明的合适极性非质子溶剂。例如,合适的极性非质子溶剂可具有的分散溶度参数介于 17.7-22.0MPa^{1/2} 之间,极性溶度参数介于 13-23MPa^{1/2} 之间,氢键溶度参数介于 3-13MPa^{1/2} 之间。

[0023] 依据本发明的一方面,用于本发明的合适极性非质子溶剂是环状化合物。环状化合物具有环状基本结构。实例包括本文所公开的环状化合物。在其它实施方案中,所述极性非质子溶剂可选自下式 1-4:

[0024]

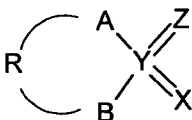


[0025] 其中 X 为 O, R1 为烷基二基。

[0026] 依据本发明的另一方面,用于本发明的合适极性非质子溶剂可选自下式 5:

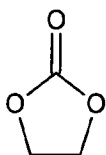
[0027]

式 5

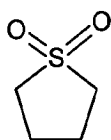


- [0028] 其中 X 是任选的, 如果存在则选自 O 或 S ;
 [0029] 其中 Z 是任选的, 如果存在则选自 O 或 S ;
 [0030] 其中 A 和 B 独立地为 O 或 N 或 S 或烷基二基的一部分或伯胺 ;
 [0031] 其中 R 为烷基二基 ; 和
 [0032] 其中 Y 为 O 或 S 或 C。
 [0033] 依据式 5 的合适极性非质子溶剂的实例在下式 6-9 中提供 :
 [0034]

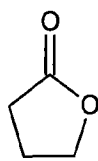
式 6



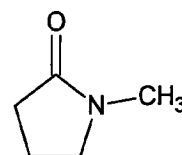
式 7



式 8



式 9



- | | | | |
|----------------------|--------------|---------------|----------|
| [0035] 其中 : | 其中 : | 其中 : | 其中 : |
| [0036] X 不存在 ; | Z 和 X 为 O ; | X 不存在 ; | X 不存在 ; |
| [0037] A、B 和 Z 为 O ; | A 和 B 为烷基二 | A 为烷基二基的 | A 为烷基二基的 |
| [0038] Y 为 C ; 和 | 基的一部分 ; | 一部分 ; | 一部分 ; |
| [0039] R 为乙烷 -1,2 二 | Y 为 S ; 和 | Y 为 C ; | Y 为 C ; |
| [0040] 基 ; | R 为丁烷 -1,4 二 | B 和 Z 为 O ; 和 | B 为甲胺 ; |
| [0041] 基 ; | R 为丙烷 -1,3 二 | Z 为 O ; 和 | |
| [0042] 基 ; | R 为丙烷 -1,3 二 | | |
| [0043] | | | |
- 基。

[0044] 依据本发明的又一方面, 所述极性非质子溶剂具有内酯、砜、腈、亚硫酸或碳酸官能团。这类化合物的特征是具有相当高的介电常数、高偶极距和水溶性。

[0045] 依据本发明的另一方面, 具有内酯官能团的极性非质子溶剂是 γ -丁内酯 (GBL), 具有砜官能团的极性非质子溶剂是环丁砜 (SL), 具有腈官能团的极性非质子溶剂是乙腈 (AN), 具有亚硫酸官能团的极性非质子溶剂是亚硫酸乙二醇酯 (GS), 具有碳酸官能团的极性非质子溶剂是碳酸亚乙酯 (EC)、碳酸异丙二醇酯 (PC) 或硫代碳酸亚乙酯 (ETC)。

[0046] 依据又一方面, 本发明公开了核酸序列的杂交方法, 所述方法包括 :

- [0047] - 提供第一核酸序列,
 [0048] - 提供第二核酸序列,
 [0049] - 提供包含足以变性双链核苷酸序列的有效量的至少一种极性非质子溶剂的含水组合物, 和
 [0050] - 将所述第一和第二核酸序列以及所述含水组合物混合在一起, 其时间至少足以使所述第一和第二核酸序列杂交。

[0051] 在一个实施方案中,提供足够量的能量使所述第一和第二核酸杂交。

[0052] 在一个实施方案中,所述第一核酸序列与第二核酸序列的杂交发生在不到 8 小时内,例如不到 6 小时、不到 5 小时、不到 4 小时、不到 3 小时、不到 2 小时或不到 1 小时。

[0053] 所述方法可包括例如:

[0054] - 提供第一核酸序列,和

[0055] - 将包含第二核酸序列和足以变性双链核苷酸序列的有效量的至少一种极性非质子溶剂的含水组合物用于所述第一核酸序列,其时间至少足以使所述第一和第二核酸序列杂交。

[0056] 在一个实施方案中,提供足够量的能量使所述第一和第二核酸杂交。

[0057] 在一个实施方案中,所述第一核酸序列与第二核酸序列的杂交发生在不到 8 小时内,例如不到 6 小时、不到 5 小时、不到 4 小时、不到 3 小时、不到 2 小时或不到 1 小时。

[0058] 依据本发明的还一方面,通过加热所述含水组合物和核酸序列而提供杂交能量。因此,所述杂交步骤可包括加热和冷却所述含水组合物和核酸序列的步骤。

[0059] 依据本发明的又一方面,所述变性和杂交步骤可单独发生。例如,可用不含探针的溶液使标本变性,然后再与探针杂交。

[0060] 本发明的另一方面包括以下方法,其中提供足够量的能量以使核酸杂交的步骤包括通过使用微波、热浴、加热板、加热线、珀耳帖元件、感应加热或加热灯来进行加热步骤。

[0061] 依据又一方面,本发明涉及这样的方法:其中所述杂交进行不到 1 小时。在其它实施方案中,所述杂交进行不到 30 分钟。在再一些实施方案中,所述杂交进行不到 15 分钟。在其它实施方案中,所述杂交进行不到 5 分钟。

[0062] 依据另一方面,本发明涉及在杂交测定中使用包含 1-95% (v/v) 的至少一种极性非质子溶剂的组合物。

[0063] 依据还一方面,本发明涉及包含本发明所述的含水组合物的组合物在杂交测定中的用途。

[0064] 附图简述

[0065] 图 1 描绘了用第一标记的 FISH 探针对甲醛固定石蜡包埋的组织切片(组织学标本)进行单基因座检测的典型时间进程。条带代表用传统溶液进行的杂交(上)和用本发明组合物进行的杂交(下)的典型时间进程。每个时间进程的左边第一条带代表脱蜡步骤;第二条带代表加热-预处理步骤;第三条带代表消化步骤;第四条带代表变性和杂交步骤;第五条带代表严格性洗涤步骤;和第六条带代表封固步骤。

[0066] 图 2 描绘了用第一标记的 FISH 探针对细胞学标本进行单基因座检测的典型时间进程。条带代表用传统溶液进行的杂交(上)和用本发明组合物进行的杂交(下)的典型时间进程。每个时间进程的左边第一条带代表固定步骤;第二条带代表变性和杂交步骤;第三条带代表严格性洗涤步骤;和第四条带代表封固步骤。

[0067] 发明详述

[0068] A. 定义

[0069] 在本发明范围内,下列术语可理解如下:

[0070] “生物样品”可理解为一种或多种细胞或细胞碎片的任何体内、体外或原位样品。它可以是例如单细胞生物或多细胞生物、组织切片、细胞学样品、染色体铺片、纯化的核酸

序列、通过例如基于生物的系统或通过化学合成而制备的人工制备核酸序列、微阵列或其它形式的核酸芯片。在一个实施方案中,样品是哺乳动物样品,例如人、小鼠、大鼠、猫或犬的样品。

[0071] “核酸”、“核酸链”和“核酸序列”是指利用碱基配对而结合或杂交的任何核酸,包括寡聚物或聚合物,其具有由天然核苷酸和/或包含非标准核碱的核酸类似物而形成的主链和/或非标准主链(例如肽核酸(PNA)或锁核酸(LNA))或核酸的任何衍生形式。

[0072] 本文所用的术语“肽核酸”或“PNA”是指具有携带悬垂核碱基(天然和经修饰的)的聚酰胺主链的合成聚合物,包括但不限于例如在以下文献中涉及或声称是肽核酸的任何寡聚物或聚合物区段:美国专利号 5,539,082、5,527,675、5,623,049、5,714,331、5,718,262、5,736,336、5,773,571、5,766,855、5,786,461、5,837,459、5,891,625、5,972,610、5,986,053、6,107,470、6,201,103、6,228,982 和 6,357,163、W096/04000,所有文献或其中所引用的任何参考文献都通过引用结合到本文中。PNA 上的悬垂核碱基例如嘌呤碱基或嘧啶碱基,可通过接头与主链连接,所述接头例如是在 PCT/US02/30573 或其中所引用的任何参考文献中提及的接头之一。在一个实施方案中,PNA 具有 N-(2-氨基乙基)-甘氨酸)主链。可按照 PCT/US02/30573 或其中所引用的任何参考文献所述,来合成(并任选标记)PNA。PNA 与 DNA 和 RNA 杂交紧密,并具有高度序列特异性,因为 PNA 主链不带电荷。因此,短 PNA 探针可表现出与较长 DNA 或 RNA 探针相当的特异性。PNA 探针在与互补 DNA 或 RNA 结合中也可表现出更高特异性。

[0073] 本文所用的术语“锁核酸”或“LNA”是指包含至少一个或多个 LNA 亚基的寡聚物或聚合物。本文所用的术语“LNA 亚基”是指含有连接核糖的 2'-氧与 4'-碳的亚甲基桥的核糖核苷酸。通常可参见 Kurreck, Eur. J. Biochem., 270:1628-44 (2003)。

[0074] 核酸和核酸类似物的实例也包括核苷酸单体聚合物,包括双链和单链脱氧核糖核苷酸(DNA)、核糖核苷酸(RNA)、其 α -异头物形式、其合成和天然类似物等。核酸链可完全由脱氧核糖核苷酸、核糖核苷酸、肽核酸(PNA)、锁核酸(LNA)、其合成或天然类似物、或其混合物组成。DNA、RNA 或本文所定义的其他核酸都可用于本发明的方法和组合物。

[0075] “极性非质子溶剂”是指有机溶剂,其偶极距为约 2 德拜单位或更高,在或邻近环境温度即约 20°C 时水溶性为至少约 5% (体积),并且在大约中性 pH (即 5-9 的范围,或在 6-8 的范围)不经历明显的氢交换。极性非质子溶剂包括以下所讨论的按照 Hansen 溶度参数定义的那些。

[0076] “烷基二基”是指通过从母体烷、烯或炔的两个不同碳原子中的每一个除去一个氢原子而得到的、具有两个一价基团中心的饱和或不饱和的支链、直链或环状烃基。

[0077] “含水溶液”可理解为含有水、至少少量水的溶液。例如,含 1% 水的溶液就可理解为含水溶液。

[0078] 除非另有说明,否则“杂交”可理解为结合了杂交程序的变性和重新退火步骤。

[0079] “杂交组合物”是指用于进行杂交程序(例如使探针与核酸序列结合)的本发明含水溶液。杂交组合物可包含例如至少一种极性非质子溶剂、至少一种核酸序列和杂交溶液。杂交组合物不包含酶或其它成分,例如用于扩增生物样品中的核酸的三磷酸脱氧核苷(dNTP)。

[0080] “杂交溶液”是指用于本发明杂交组合物的含水溶液。杂交溶液的详细讨论如下,

并且可包含例如缓冲剂、促进剂、螯合剂、盐、去垢剂和封闭剂。

[0081] “PCR 组合物”是指用于进行杂交程序以扩增核酸序列的本发明含水溶液。PCR 组合物可包含例如至少一种极性非质子溶剂、至少一种用于扩增核酸的酶、一组核酸寡核苷酸引物、dNTP 混合物和 PCR 溶液。

[0082] “PCR 溶液”是指用于本发明 PCR 组合物的含水溶液。PCR 溶液可包含例如缓冲剂、促进剂、螯合剂、盐和去垢剂。

[0083] “Hansen 溶度参数”和“HSP”是指以下内聚能（溶解度）参数：(1) 分散溶度参数（ δ_D ，“D 参数”），其度量得自原子力的非极性相互作用；(2) 极性溶度参数（ δ_P ，“P 参数”），其度量永久偶极-永久偶极之间的相互作用；和(3) 氢键溶度参数（ δ_H ，“H 参数”），其度量电子交换。Hansen 溶度参数进一步定义如下。

[0084] “重复序列”可理解为是指快速重新退火（大约 25%）和 / 或中速重新退火（大约 30%）的哺乳动物基因组组分。快速重新退火组分含有小的（长度为几个核苷酸）高度重复序列，通常以串联形式存在（例如卫星 DNA），而中速重新退火组分含有散在分布的重复 DNA。散在分布的重复序列可分为 SINE（短的散在分布的重复序列）或 LINE（长的散在分布的重复序列），这两者都属于灵长类的反转录转座子。SINE 和 LINE 包括但不限于 Alu 重复序列、Kpn 重复序列、二核苷酸重复序列、三核苷酸重复序列、四核苷酸重复序列、五核苷酸重复序列和六核苷酸重复序列。Alu 重复序列构成大部分人类 SINE，其特征是大约 280-300bp 的共有序列，由排列成头尾相连的两个类似序列组成。除了 SINE 和 LINE 之外，重复序列也存在于染色体末端的染色体端粒和染色体着丝粒，其含有仅存在于染色体中心区的独特重复序列。然而，不同于随机分散在整个基因组中的 SINE 和 LINE，端粒和着丝粒重复序列位于染色体的某区域内。

[0085] 对于甲酰胺的毒性标识，“无毒”和“降低的毒性”是按照“1999 年 5 月 31 日欧洲议会和委员会的各成员国涉及危险制剂的分类、包装和标识的法律、法规和管理规定的指令 1999/45/EC”（ecb.jrc.it/legislation/1999L0045EC.pdf）（“指令 (Directive)”）来定义的。按照该指令，用以下分类级别来定义毒性：T+ “剧毒”；T “有毒”；C “腐蚀”；Xn “有害”；Xi “刺激”。风险术语（“R 术语”）描述了所分类毒性的风险。甲酰胺被列为 T（有毒）和 R61（对未出生胎儿可导致伤害）。下列所有化学品的毒性均低于甲酰胺：乙腈（Xn、R11、R20、R21、R22、R36）；环丁砜（Xn、R22）； γ -丁内酯（Xn、R22、R32）；和碳酸亚乙酯（Xi、R36、R37、R38）。在本申请提交时，三硫代碳酸亚乙酯和亚硫酸乙二醇酯尚未被标识。

[0086] B. 溶剂选择

[0087] 可根据 Hansen 溶度参数，选择用于本发明的合适极性非质子溶剂。实验测定和 / 或计算溶剂 HSP 的方法是本领域已知的，已经报道了超过 1200 种化学品的 HSP。

[0088] 例如，可根据折射率，以合理的准确度计算 D 参数，或可在建立了临界温度和摩尔体积之后，通过与类似大小、形状和组成的已知溶液进行比较，从图表中得到 D 参数。可从已知偶极距估计 P 参数（参见例如 McClellan A.L., Tables of Experimental Dipole Moments (W. H. Freeman 1963)），使用公式 1：

[0089] 公式 1： $\delta_P = 37.4 (\text{偶极距}) / V^{1/2}$

[0090] 其中 V 是摩尔体积。对于计算 H 参数，没有公式。而是通常根据基团贡献来确定 H 参数。

[0091] HSP 表征可方便地用球形示意图来直观表示,实验所测合适参考溶剂的 HSP 在球心。球的半径 (R) 表示仍然能允许“良”相互作用发生的参考溶剂 HSP 的最大可容许变异。良溶剂在球内,而不良溶剂在外。用公式 2 可确定基于它们相应 HSP 值的两种溶剂间的距离 R_a :

$$[0092] \quad \text{公式 2: } (R_a)^2 = 4(\delta_{D1} - \delta_{D2})^2 + (\delta_{P1} - \delta_{P2})^2 + (\delta_{H1} - \delta_{H2})^2$$

[0093] 其中下标 1 表示参考样品,下标 2 表示试验化学品,所有值的单位都是 $\text{MPa}^{1/2}$ 。良溶度需要 R_a 小于溶度球的实验所测半径 R_o 。两种溶剂间相对能量差,即 RED 数,可通过获取 R_a 与 R_o 之比而求得,见公式 3。

$$[0094] \quad \text{公式 3: } \text{RED} = R_a / R_o$$

[0095] RED 数小于 1.0 表示高亲和性;RED 数等于或接近 1.0 表示边界条件;RED 数逐渐升高表示亲和性逐渐降低。

[0096] 在某些实施方案中,本发明极性非质子溶剂的 D 参数介于 $17.7\text{--}22.0\text{MPa}^{1/2}$ 之间。这种相对高的 D 参数通常与具有环状结构和 / 或具有硫或卤素结构的溶剂有关。线状化合物可能不属于用于本发明的最合适溶剂,但如果它们的 P 参数和 H 参数在下述范围内,则可以考虑。因为在公式 2 中 D 参数乘以 4,所以限制是一半 R_o 。另外,应当注意,在 21 上下或更高的 D 值通常代表固体。

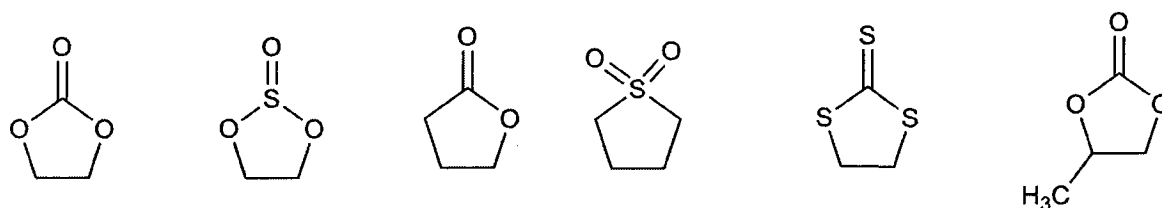
[0097] 在某些实施方案中,本发明极性非质子溶剂的 P 参数介于 $13\text{--}23\text{MPa}^{1/2}$ 之间。这种特别高的 P 参数通常与具有高偶极距并可能也具有相对低分子体积的溶剂有关。例如,对于接近 60cc/mole 的 V,偶极距应介于 $4.5\text{--}3.1$ 之间。对于接近 90cc/mole 的 V,偶极距应介于 $5.6\text{--}3.9$ 之间。

[0098] 在某些实施方案中,本发明极性非质子溶剂的 H 参数介于 $3\text{--}13\text{MPa}^{1/2}$ 之间。通常,具有醇基的极性非质子溶剂不用于本发明的组合物和方法,因为这类溶剂的 H 参数太高。

[0099] 极性非质子溶剂的摩尔体积也可能有关,因为它进入到所有三个 Hansen 溶度参数的评价中。随着摩尔体积变小,液体倾向于快速蒸发。随着摩尔体积变大,液体倾向于进入上述 D 参数和 P 参数范围的固体区。因此,本发明的极性非质子溶剂相当接近 HSP 空间的液体 / 固体分界线。

[0100] 在某些实施方案中,本发明的极性非质子溶剂具有内酯、砜、腈、亚硫酸和 / 或碳酸官能团。这类化合物的特征是具有相当高的介电常数、高偶极距和水溶性。具有内酯官能团的示例性极性非质子溶剂是 γ -丁内酯 (GBL),具有砜官能团的示例性极性非质子溶剂是环丁砜 (SL;四氢噻吩-二氧化物),具有腈官能团的示例性极性非质子溶剂是乙腈 (AN),具有亚硫酸官能团的示例性极性非质子溶剂是亚硫酸乙二醇酯 (GS),而具有碳酸官能团的示例性的极性非质子溶剂是碳酸亚乙酯 (EC)、碳酸异丙二醇酯 (PC) 或三硫代碳酸亚乙酯 (ETC)。这些示例性溶剂的结构提供如下,它们的 Hansen 溶度参数、RED 数和摩尔体积见表 1。

[0101]



[0102]

碳酸亚乙酯	亚硫酸乙二醇酯	γ -丁内酯	环丁砜	三硫代碳酸亚乙酯	碳酸异丙二醇酯
-------	---------	---------------	-----	----------	---------

[0103] 表 1

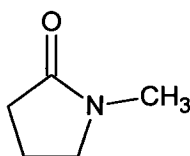
[0104]

	D	P	H	RED	摩尔体积 (cm ³ /mole)
相关性 (R ₀ =3.9)	19.57	19.11	7.71	-	-
GBL	19.0	16.6	7.4	0.712	76.5
PC	20.0	18.0	4.1	0.993	85.2
SL	20.3	18.2	10.9	0.929	95.7
EC	19.4	21.7	5.1	0.946	66.0
ETC	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
GS	20.0	15.9	5.1	n/a	75.1

[0105] n/a = 不适用。

[0106] 可用于本发明的其它合适极性非质子溶剂是环状化合物, 例如 ϵ -己内酯。另外, 取代的吡咯烷酮 (pyrrolidinone) 和氮在 5- 元或 6- 元环内的相关结构, 以及具有两个腈基、或一个溴和一个腈基的环状结构, 也可适用于本发明。例如, N- 甲基吡咯烷酮 (如下所示) 可以是用于本发明方法和组合物的合适的极性非质子溶剂。

[0107]



[0108] 其它合适的极性非质子溶剂可含有环尿烷基 (NHCOO-)。然而, 并非所有这样的化合物都是合适的, 因为当用于本发明的杂交组合物时 1,3- 二甲基 -2- 咪唑烷酮不产生信号。本领域技术人员可按本文所述筛选可用于本发明组合物和方法的化合物。适用于本发明的示例性化学品见下表 2 和表 3。

[0109] 表 2

[0110]

溶剂	D	P	H
乙酰苯胺	20.6	13.3	12.4
N- 乙酰基吡咯烷酮	17.8	13.1	8.3

4- 氨基吡啶	20.4	16.1	12.9
苯甲酰胺	21.2	14.7	11.2
苯并咪唑	20.6	14.9	11.0
1,2,3- 苯并三唑	18.7	15.6	12.4
二氧化丁二烯	18.3	14.4	6.2
碳酸 2,3- 丁二醇酯	18.0	16.8	3.1
己内酯 (ϵ)	19.7	15.0	7.4
氯马来酸酐	20.4	17.3	11.5
2- 氯环己酮	18.5	13.0	5.1
氯硝甲烷	17.4	13.5	5.5
柠康酸酐	19.2	17.0	11.2
巴豆酸内酯	19.0	19.8	9.6
环丙腈	18.6	16.2	5.7
硫酸二甲酯	17.7	17.0	9.7
二甲砒	19.0	19.4	12.3

[0111]

二甲亚砒	18.4	16.4	10.2
1,2- 二硝基苯	20.6	22.7	5.4
2,4- 二硝基甲苯	20.0	13.1	4.9
二苯砒	21.1	14.4	3.4
1,2- 二硝基苯	20.6	22.7	5.4
2,4- 二硝基甲苯	20.0	13.1	4.9
ϵ - 己内酰胺	19.4	13.8	3.9
乙磺酰氯	17.7	14.9	6.8

糠醛	18.6	14.9	5.1
2- 呋喃甲腈	18.4	15.0	8.2
异噁唑	18.8	13.4	11.2
马来酸酐	20.2	18.1	12.6
丙二腈	17.7	18.4	6.7
4- 甲氧基苄腈	19.4	16.7	5.4
1- 甲氧基 -2- 硝基苯	19.6	16.3	5.5
1- 甲基咪唑	19.7	15.6	11.2
3- 甲基异噁唑	19.4	14.8	11.8
N- 甲基吗啉 -N- 氧化物	19.0	16.1	10.2
苯甲砒	20.0	16.9	7.8
甲基环丁砒	19.4	17.4	5.3
4- 甲苯磺酸甲酯	19.6	15.3	3.8
3- 硝基苯胺	21.2	18.7	10.3
2- 硝基噻吩	19.7	16.2	8.2
9,10- 菲醌	20.3	17.1	4.8
邻苯二甲酸酐	20.6	20.1	10.1
1,3- 丙磺酸内酯	18.4	16.0	9.0
β - 丙醇酸内酯	19.7	18.2	10.3

[0112]

2- 吡咯烷酮	19.4	17.4	11.3
糖精	21.0	13.9	8.8
琥珀腈	17.9	16.2	7.9
对氨基苯磺酰胺	20.0	19.5	10.7

环丁砜	20.3	18.2	10.9
2,2,6,6-四氯环己酮	19.5	14.0	6.3
噻唑	20.5	18.8	10.8
3,3,3-三氯丙烯	17.7	15.5	3.4
1,1,2-三氯丙烯	17.7	15.7	3.4
1,2,3-三氯丙烯	17.8	15.7	3.4

[0113] 表 2 根据它们的 Hansen 溶度参数, 给出用于本发明组合物和方法的潜在化学品的示例性列表。其它化合物当然也满足这些要求。这些化学品中的某些已经用于现有技术的杂交和 / 或 PCR 溶液 (例如二甲亚砜 (DMSO) 已经用于杂交和 PCR 溶液, 环丁砜 (SL) 已经用于 PCR 溶液), 但大部分还没有用。然而, 现有技术并不认为这些化合物可有利地用于减少杂交时间和 / 或降低温度, 正如本申请所公开的。

[0114] 表 3

[0115]

化学品 (偶极距)	RED	熔点℃
碳酸氯代乙二醇酯 (4.02)	0.92	—
2-噁唑烷酮 (5.07)	0.48	86-89
2-咪唑	1.49	90-91
1,5-二甲基四唑 (5.3)	~ 1.5	70-72
N-乙基四唑 (5.46)	~ 1.5	
硫杂环丁烷-二氧化物 (4.49)	—	—
硫杂环丁烷 (3.63)	—	—
1,3-二甲基-5-四唑 (4.02)	—	—

[0116]

哒嗪(3.97)	1.16	-8
2-硫尿嘧啶(4.21)	-	-
N-甲基咪唑(6.2)	1.28	-
1-亚硝基-2-吡咯烷酮	~1.37	-
亚磷酸二乙酯(3.51)	-	-
5-氰基-2-硫尿嘧啶(5.19)	-	-
4H-吡喃-4-硫酮(4.08)	1.35	32-34
4H-吡喃-4-酮=γ-吡喃酮(4.08)	1.49	沸点(BP) 80
2-硝基呋喃(4.41)	1.14	29
α溴代特窗酸甲酯(6.24)	-	-
四氢噻喃氧化物(4.19)	1.75	60-64
皮考啉腈(2-氰基吡啶) (5.23)	0.40	26-28 (BP 212-215)
硝基苯并咪唑(6.0)	0.52	207-209
靛红(5.76)	-	193-195
N-苯基悉尼酮(6.55)	-	-
硫酸乙二醇酯(乙二醇)	-	99°C
注意：在 40%不溶		

[0117] 并非所有列于表 2 和表 3 的化学品都适用于本发明的组合物和方法。例如，尽管 DMSO 列于表 2，因为其 Hansen 溶度参数 (HSP) 落入上述范围，但是 DMSO 在本发明组合物和方法中不能起到减少杂交时间和 / 或降低温度的作用。因此，在某些实施方案中，含水组合物不含 DMSO 作为极性非质子溶剂。然而，用本文提供的指导来筛选合适化合物，包括测试实施例之一所提供的化合物，在普通技术人员的技术范围之内。例如，在某些实施方案中，合适的极性非质子溶剂所具有的 HSP 应在上述范围之内，其结构示于上式 1-9。

[0118] C. 组合物、缓冲剂和溶液

[0119] (1) 杂交溶液

[0120] 传统的杂交溶液是本领域已知的。这类溶液可包括例如缓冲剂、促进剂、螯合剂、盐、去垢剂和封闭剂。

[0121] 例如，缓冲剂可包括 SSC、HEPES、SSPE、PIPES、TMAC、TRIS、SET、柠檬酸、磷酸盐缓冲液如磷酸钾或焦磷酸钠等。缓冲剂浓度可以是 0.5x 至 50x。通常，缓冲剂浓度是 2x 至 10x。

[0122] 促进剂可包括聚合物（例如 FICOLL、PVP、肝素、硫酸葡聚糖）、蛋白质（例如 BSA）、二醇类（例如乙二醇、甘油、1,3-丙二醇、丙二醇或二甘醇）、其组合（例如 Dernhardt 氏溶

液和 BLOTTO)、以及有机溶剂(例如甲酰胺、二甲基甲酰胺、DMSO 等)。促进剂浓度可以是 1%至 80%或 0.1x 至 10x。通常,甲酰胺浓度是 25%至 75%,而 DMSO、硫酸葡聚糖和二醇浓度是 5%至 10%。

[0123] 螯合剂可包括 EDTA、EGTA 等。螯合剂浓度可以是 0.1mM 至 10mM。通常,螯合剂浓度是 0.5mM 至 5mM。

[0124] 盐可包括氯化钠、磷酸钠、磷酸镁等。盐浓度可以是 1mM 至 750mM。通常,盐浓度是 10mM 至 500mM。

[0125] 去垢剂可包括吐温、SDS、Triton、CHAPS、去氧胆酸等。去垢剂浓度可以是 0.01%至 10%。通常,去垢剂浓度是 0.1%至 1%。

[0126] 核酸封闭剂可包括酵母 tRNA、均聚物 DNA、变性的鲑鱼精子 DNA、鲑鱼精子 DNA、人类总 DNA、COT1 DNA 等。封闭核酸的浓度可以是 0.05mg/mL 至 100mg/mL。

[0127] 在文献中,传统的杂交溶液有很大差异。例如,传统的杂交溶液可包含 5x 或 6x SSC、0.01M EDTA、5x Denhardt 氏溶液、0.5% SDS 和 100mg/mL 剪切变性的鲑鱼精子 DNA。另一种传统的杂交溶液可包含 50mM HEPES、0.5M NaCl 和 0.2mM EDTA。用于生物标本 RNA 检测的 FISH 的典型杂交溶液可包含例如 2x SSC、10%硫酸葡聚糖、2mM 氧钒基-核糖核苷复合物、50%甲酰胺、0.02%无 RNA 酶的 BSA 和 1mg/mL 大肠杆菌 tRNA。用于生物标本 DNA 检测的 FISH 的典型杂交溶液可包括例如 2x SSC、10%硫酸葡聚糖、50%甲酰胺和例如 0.3mg/mL 鲑鱼精子 DNA 或 0.1mg/mL COT1 DNA。其它典型杂交溶液可包含 40%甲酰胺、10%硫酸葡聚糖、30mM NaCl、5mM 磷酸缓冲液、Alu-PNA(封闭 PNA)或 COT-1 DNA,和在某些情况下 0.1 μ g/ μ l 人类总 DNA(THD)。

[0128] 本发明的组合物可包含含有上述传统杂交溶液的任何组分以及至少一种极性非质子溶剂的杂交溶液。传统组分的浓度可以是与传统杂交溶液中所用的相同浓度,或者可以是更高或更低浓度,或者可完全省略不用。

[0129] 例如,如果本发明的组合物包括盐例如 NaCl 和 / 或磷酸缓冲液时,盐浓度可以是 0-1200mM NaCl 和 / 或 0-200mM 磷酸缓冲液。在某些实施方案中,盐浓度可以是例如 300mM NaCl 和 5mM 磷酸缓冲液,或 600mM NaCl 和 10mM 磷酸缓冲液。

[0130] 如果本发明的组合物包含促进剂例如硫酸葡聚糖、二醇或 DMSO 时,硫酸葡聚糖浓度可以是 5%至 40%,二醇浓度可以是 0.1%至 10%,DMSO 可以是 0.1%至 10%。在某些实施方案中,硫酸葡聚糖的浓度可以是 10%或 20%,乙二醇、1,3-丙二醇或甘油的浓度可以是 1%至 10%。在某些实施方案中,DMSO 的浓度可以是 1%。在某些实施方案中,含水组合物不包含 DMSO 作为促进剂。在某些实施方案中,含水组合物不包含甲酰胺作为促进剂,或者包含甲酰胺,条件是所述组合物含有小于 10%、或小于 5%、或小于 2%、或小于 1%、或小于 0.5%、或小于 0.1%、或小于 0.05%、或小于 0.01%。

[0131] 如果本发明的组合物包含柠檬酸,其浓度范围可以是 1mM 至 50mM, pH 范围可以是 5.0 至 8.0。在某些实施方案中,柠檬酸浓度可以是 10mM, pH 可以是 6.2。

[0132] 本发明的组合物可包含能减少与例如细胞膜的非特异性结合的试剂,例如鲑鱼精子或少量人类总 DNA,或者例如,它们可包含能封闭例如重复序列与靶标的结合的封闭剂,例如大量人类总 DNA 或重复序列富集 DNA 或特定封闭剂例如 PNA 或 LNA 的片段和序列。这些试剂的浓度可以是 0.01-100 μ g/ μ l 或 0.01-100 μ M。例如,在某些实施方案中,这些试

剂可以是 $0.1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ 人类总 DNA 或 $0.1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ 非人类 DNA, 例如鲱鱼精子、鲑鱼精子或小牛胸腺 DNA 或 $5 \mu\text{M}$ 封闭 PNA。

[0133] 本发明一方面是用于杂交的组合物或溶液。用于本发明的组合物包含含水组合物, 其含有核酸序列和足以变性双链核苷酸序列的有效量的至少一种极性非质子溶剂。变性双链核苷酸序列的有效量是能够杂交的量。例如, 用于测定极性非质子溶剂的量是否对杂交有效的一种方式, 确定所述极性非质子溶剂, 当用于本文所述的杂交方法和组合物例如实施例 1 时, 是否能产生可检测信号和 / 或扩增的核酸产物。

[0134] 极性非质子溶剂有效量的非限制性实例包括例如约 1% 至约 95% (v/v)。在某些实施方案中, 极性非质子溶剂的浓度为 5% 至 60% (v/v)。在其它实施方案中, 极性非质子溶剂的浓度为 10% 至 60% (v/v)。在再一些实施方案中, 极性非质子溶剂的浓度为 30% 至 50% (v/v)。1% 至 5%、5% 至 10%、10%、10% 至 20%、20% 至 30%、30% 至 40%、40% 至 50%、或 50% 至 60% (v/v) 的浓度也是合适的。在某些实施方案中, 极性非质子溶剂的浓度可以是 0.1%、0.25%、0.5%、1%、2%、3%、4% 或 5% (v/v)。在其它实施方案中, 极性非质子溶剂的浓度可以是 7%、7.5%、8%、8.5%、9%、9.5%、10%、10.5%、11%、11.5%、12%、12.5%、13%、13.5%、14%、14.5%、15%、15.5%、16%、16.5%、17%、17.5%、18%、18.5%、19%、19.5% 或 20% (v/v)。

[0135] 如果本发明的组合物用于杂交测定, 它们还可包含一种或多种核酸探针。所述探针可用可检测化合物 (例如酶、生色团、荧光染料和半抗原) 直接或间接标记。DNA 探针浓度可以是 $0.1\text{--}100\text{ng}/\mu\text{L}$ 。例如, 在某些实施方案中, 探针浓度可以是 $1\text{--}10\text{ng}/\mu\text{L}$ 。PNA 探针浓度可以是 $0.5\text{--}5000\text{nM}$ 。例如, 在某些实施方案中, 探针浓度可以是 $5\text{--}1000\text{nM}$ 。

[0136] 在一个实施方案中, 本发明的组合物包含 40% 极性非质子溶剂 (v/v) (例如碳酸亚乙酯, “EC”)、10% 硫酸葡聚糖、300mM NaCl、5mM 磷酸缓冲液和 $1\text{--}10\text{ng}/\mu\text{L}$ 探针的混合物。本发明的另一种示例性组合物包含 15% EC、20% 硫酸葡聚糖、600mM NaCl、10mM 磷酸缓冲液和 $0.1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ 人类总 DNA 的混合物。又一种示例性组合物包含 15% EC、20% 硫酸葡聚糖、600mM NaCl、10mM 柠檬酸 pH 6.2 和 $0.1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ 非人类 DNA (例如鲱鱼精子、鲑鱼精子或小牛胸腺) 或 0.5% 甲酰胺或 1% 二醇 (例如乙二醇、1,3- 丙二醇或甘油)。

[0137] (2) 极性非质子溶剂

[0138] 不同的极性非质子溶剂可赋予本发明组合物不同特性。例如, 极性非质子溶剂的选择可有助于组合物的稳定性, 因为某些极性非质子溶剂会随时间降解。例如, 极性非质子溶剂碳酸亚乙酯分解成乙二醇 (其是相当稳定的分子) 和二氧化碳 (其可与水反应形成碳酸, 改变本发明组合物的酸度)。不受理论的束缚, 据信在碳酸亚乙酯分解时 pH 的改变使本发明组合物的杂交效果降低。然而, 可通过降低组合物的 pH, 通过添加柠檬酸作为缓冲液 (pH 6.2), 替代传统的磷酸缓冲液 (其通常使用约 pH 7.4), 和 / 或通过添加乙二醇 (浓度例如介于 0.1% 至 10%, 之间或介于 0.5% 至 5% 之间, 例如 1%、2%、3% 等), 改善稳定性。例如, 使用 10mM 柠檬酸缓冲液, 本发明组合物在 $2\text{--}8^\circ\text{C}$ 可保持稳定大约 8 个月。如果组合物贮存在低温 (例如 -20°C) 时也可改善稳定性。

[0139] 另外, 在某些条件下, 某些极性非质子溶剂可使本发明组合物分离成多相体系。对于不同的极性非质子溶剂而言, 得到多相体系的条件可以不同。然而, 通常, 随着极性非质子溶剂浓度增加, 相数增加。例如, 包含低浓度碳酸亚乙酯 (即小于 20%) 的组合物可以单

相形式存在,而包含更高浓度碳酸亚乙酯的组合物可分离成两相、或甚至三相。举例来说,包含 15%碳酸亚乙酯的组合物在室温下以单相存在,而包含 40%碳酸亚乙酯的组合物在室温下由粘稠的下相(大约占总体积的 25%)和不太粘稠的上相(大约占总体积的 75%)组成。

[0140] 另一方面,某些极性非质子溶剂在室温下可以两相形式存在,甚至在低浓度时。例如,环丁砜、 γ -丁内酯、三硫代碳酸亚乙酯、亚硫酸乙二醇酯和碳酸异丙二醇酯在浓度为 10%、15%、20%或 25%(20%硫酸葡聚糖、600mM NaCl、10mM 柠檬酸缓冲液)时,在室温下以两相形式存在。

[0141] 也可通过调节本发明组合物的温度来改变相数。通常,随着温度上升,相数减少。例如,在 2-8°C,包含 40%碳酸亚乙酯的组合物可分离成三相体系。

[0142] 也可通过调节组合物中硫酸葡聚糖和/或盐的浓度,来改变相数。一般而言,降低硫酸葡聚糖浓度(传统浓度为 10%)和/或盐浓度,可减少相数。然而,根据组合物中具体的极性非质子溶剂及其浓度的不同,可产生单相,甚至是在更高浓度的盐和硫酸葡聚糖时。例如,通过增加硫酸葡聚糖和盐的浓度,包含少量 EC(例如 15%、10%或 5%)的组合物可工作良好,同时仍然保持单相体系。在一个具体的实施方案中,包含 HER2 基因 DNA 探针、CEN7PNA 探针、15% EC、20%硫酸葡聚糖、600mM NaCl 和 10mM 磷酸缓冲液的组合物在 -20°C 冷冻。在其它实施方案中,组合物在 -20°C 是液体。

[0143] 某些极性非质子溶剂在一相或另一相中可产生更强信号。例如,40%亚硫酸乙二醇酯在下相产生强烈信号,而在上相无信号。同样,某些种类的探针在一相或另一相中可产生更强烈的信号。例如,PNA 探针倾向于在下相显示出比上相更强的信号。

[0144] 因此,本发明的多相体系可用于方便地检查样品的不同方面。例如,两相体系可用于将带有 PNA 探针标记的样品与带有 DNA 探针的样品分离开。其它用途包括分离具有例如某些杂交优势的特定相,使得所分离的相可用作单相体系。在分离特定相之前或之后,可加入探针和/或样品。

[0145] 可用本发明的单相组合物、用本发明多相组合物的单一相、或用本发明多相组合物的任何一相或多相的混合物,来进行杂交。例如,在单相体系中,可提取一定体积的样品,用于杂交。在多相体系中,可从目标相(例如上相、下相或中相)中提取一定体积的样品,用于杂交。或者,在提取混合一定体积的样品用于杂交之前,可将多相体系中的各相混合。然而,根据组合物的不同,多相体系可产生强烈而不稳定的局部背景染色。尽管,加入少量甲酰胺将会减低单相体系中的背景,但它对具有高浓度(例如 40%)极性非质子溶剂的多相体系却没什么效果。另外,随着甲酰胺浓度的增加,需要更高浓度的探针和/或更长的杂交时间来保持强烈信号强度。

[0146] (3) 对于具体应用的优化

[0147] 可以改变本发明的组合物,以优化具体应用的结果。例如,可以改变极性非质子溶剂、盐、促进剂、封闭剂和氢离子(即 pH)的浓度,以改善具体应用的结果。

[0148] 例如,可改变极性非质子溶剂浓度,以改善信号强度和背景染色。通常,随着极性非质子溶剂浓度增加,信号强度增加,背景染色降低。例如,与包含 5% EC 的组合物相比,包含 15% EC 的组合物倾向于显示出更强的信号和更少背景。然而,对于具有低浓度极性非质子溶剂(例如 0%至 20%)的组合物,如果盐和/或硫酸葡聚糖的浓度增加,可改善信

号强度。例如,用 5%至 10% EC,当盐浓度比传统盐浓度升高大约 8-16 倍(即大约 1200mM NaCl、20mM 磷酸缓冲液)时,可观察到强烈信号。同样,当使用较低浓度的极性非质子溶剂时,通常需要较高浓度的硫酸葡聚糖以保持良好信号和背景强度。

[0149] 因此,也可改变盐和硫酸葡聚糖的浓度,以改善信号强度和背景染色。通常,随着盐和硫酸葡聚糖的浓度增加,信号强度增加,背景染色降低。例如,传统盐浓度的大约 2-4 倍的盐浓度(即 300mM NaCl 15mM 磷酸缓冲液)产生强烈信号和低背景。然而,令人惊奇的是,使用甚至完全不含盐的本发明组合物可发生杂交。在无盐条件下,通过增加促进剂和/或极性非质子溶剂的浓度,可改善信号强度。

[0150] 同样,随着硫酸葡聚糖浓度从 0%增至 20%,信号强度增加。然而,甚至在硫酸葡聚糖浓度为 0%时,都可观察到良好信号。在低硫酸葡聚糖条件下,可通过增加极性非质子溶剂和/或盐的浓度改善信号强度。

[0151] 另外,可改变用于本发明组合物的探针类型,以改善结果。例如,在本发明某些方面,与本发明组合物中的 DNA/PNA 探针组合相比,DNA/DNA 探针组合可表现出低背景,或反之亦然。另一方面,在低盐和/或低极性非质子溶剂的浓度下,与 DNA 探针相比,PNA 探针倾向于显示更强烈信号。事实上,在没有极性非质子溶剂时,PNA 探针也显示信号,而在没有极性非质子溶剂时,DNA 探针则显示微弱信号或无信号。

[0152] D. 应用、方法和使用

[0153] (1) 分析样品

[0154] 本发明的方法和组合物可全部或部分用于细胞学、组织学或分子生物学领域的所有类型的杂交应用。依据一个实施方案,本发明方法中的第一或第二核酸序列存在于生物样品中。这些样品的实例包括组织样品、细胞制备物、细胞碎片制备物、以及分离或富集的细胞组分制备物。样品可源自不同组织(例如乳房、肺、结直肠、前列腺、肺、头颈部、胃、胰脏、食道、肝脏和膀胱或其它相关组织及其赘生物)、任何细胞悬液、血液样品、细针吸出物、腹水、痰、腹膜洗液、肺部洗液、尿、粪、细胞刮取物、细胞涂片、细胞离心涂片或细胞涂片离心(cytoprep)细胞。

[0155] 可用标准方案分离和处理样品。细胞碎片制备物可通过例如细胞匀浆、冻融处理或细胞破碎而获取。可根据获取样品的目的并根据其场所的常规方法的不同,采用多种不同方式处理分离的样品。通常用不同试剂处理样品,以保藏组织,用于随后的样品分析,或者可直接分析样品。广泛用于保藏样品的方法实例是经福尔马林固定,然后石蜡包埋和冷冻保藏。

[0156] 对于中期铺片,细胞培养物通常经秋水仙酰胺或其它合适纺锤体极破坏剂处理,将细胞周期终止在中期。然后将细胞固定并印迹到(spotted onto)载玻片上,用甲醛处理,洗涤并在乙醇中脱水。然后加入探针,通过下述任何技术分析样品。

[0157] 细胞学包括检查来自生物样品的单个细胞和/或染色体铺片。样品的细胞学检查首先是获取细胞标本,这通常是通过以下方式而达到:通过刮取、擦拭或刷取某区域(例如就宫颈标本而言)、或通过采集体液(例如得自胸腔、膀胱或脊柱的那些)、或通过细针吸出或穿刺活检(例如就内部肿瘤而言)。在常规手工细胞学制备中,将样品移至液体悬浮材料中,再将液体中的细胞直接转移或通过基于离心的处理步骤,转移到显微镜载玻片上,进行观察。在典型的自动化细胞学制备中,将过滤装置放入液体悬液中,过滤装置同时可分散细

胞并将细胞捕获到滤膜上。再取出滤膜并贴放在载玻片上。再将细胞固定在显微镜载玻片上,然后通过下述任何技术进行分析。

[0158] 在使用细胞学样品的传统杂交实验中,将含有标本的玻璃片浸泡在甲醛缓冲液中,洗涤,然后在乙醇中脱水。再加入探针,给标本盖上盖玻片。将玻片在足以变性标本中的任何核酸的温度下孵育(例如 5 分钟,在 82℃),然后在足以允许杂交的温度下孵育(例如在 45℃过夜)。杂交之后,除去盖玻片,对标本进行高严格性洗涤(例如 10 分钟,在 65℃),接着是一系列低严格性洗涤(例如 2x3 分钟,在室温下)。然后样品经脱水和封固,用于分析。

[0159] 组织学包括检查组织薄片中的细胞。为了制备组织样品用于组织学检查,将组织片固定在合适固定剂(通常是醛,例如甲醛或戊二醛)中,然后包埋在融化石蜡中。再在切片机上对含有组织样品的蜡块进行切片,得到含有组织的石蜡薄片,通常厚度为 2-10 微米。再将标本放在载玻片上,风干并加热,使标本粘附在载玻片上。再将残余石蜡溶于合适溶剂(通常是二甲苯、甲苯或其它)中。这些所谓的脱蜡溶剂再用洗涤-脱水类试剂除去,然后通过下述任何技术来分析样品。或者,可从冷冻标本制备切片,快速固定在 10%福尔马林或其它合适的固定剂中,再用脱水剂浸泡,然后分析样品。

[0160] 在用组织学样品的传统杂交实验中,将经福尔马林固定的石蜡包埋的组织标本切成 2-6 μm 的切片并收集在载玻片上。石蜡被融化(例如 30-60 分钟,在 60℃)并通过用二甲苯(或二甲苯替代品)洗涤例如 2x5 分钟而除去(脱蜡)。使样品复水,洗涤和预处理(例如 10 分钟,在 95-100℃)。载玻片经洗涤并用胃蛋白酶或其它合适的渗透剂在 37℃处理例如 3-15 分钟。载玻片经洗涤(例如 2x3 分钟),脱水并使用探针。给标本盖上盖玻片,并将玻片在足以变性标本中的任何核酸的温度下孵育(例如 5 分钟,在 82℃),然后在足以允许杂交的温度下孵育(例如在 45℃过夜)。杂交之后,除去盖玻片,对标本进行高严格性洗涤(例如 10 分钟,在 65℃),接着是一系列低严格性洗涤(例如 2x3 分钟,在室温下)。然后样品经脱水和封固,用于分析。

[0161] (2) 杂交技术

[0162] 本发明的组合物和方法可全部或部分用于本领域已知用于细胞学和组织学样品的所有类型的核酸杂交技术。这种技术包括例如原位杂交(ISH)、荧光原位杂交(FISH;包括多色 FISH、纤维-FISH 等)、显色原位杂交(CISH)、银染原位杂交(SISH)、比较基因组杂交(CGH)、染色体涂染和原位阵列。

[0163] 适用于本发明杂交的分子探针描述于例如美国专利公布号 2005/0266459,其通过引用结合到本文中。一般而言,探针可制备如下:即通过化学合成,或通过克隆扩增特定 DNA 序列,将所述 DNA 插入载体,并在合适宿主细胞中扩增载体和插入片段。常用载体包括细菌质粒、粘粒、细菌人工染色体(BAC)、PI 衍生的人工染色体(PAC)或酵母人工染色体(YAC)。然后提取所扩增的 DNA 并纯化,用作探针。用于制备和/或合成探针的方法是本领域已知的,例如公开于 PCT/US02/30573。

[0164] 一般而言,探针类型决定了在杂交测定中可检测的特征。例如,总核 DNA 或基因组 DNA 的探针可用作物种特异性探针。染色体涂染是单一染色体类型的 DNA 序列的集合,可识别分裂中期和间期核中的特定染色体类型,统计某条染色体的数目,显示易位,或识别染色体外的染色质片段。不同染色体类型也具有独特重复序列,其可被探针杂交靶向,以检测和

统计特定染色体。大的插入探针可用于靶向独特单拷贝序列。使用这些大探针,杂交效率与探针大小成反比。但是,可使用至小 2kb 的探针。较小的探针也可用于检测畸变,例如缺失、扩增、倒位、重复和非整倍性。例如,不同颜色的基因座特异性探针可用于通过信号分离原位杂交来检测易位。

[0165] 一般而言,区分密切相关序列的能力与杂交探针的长度成反比,因为随着探针长度增加,野生型复合物和突变型复合物之间的热稳定性差异下降。通常需要长度大于 10bp 的探针,以获取正确识别独特有机体或目标临床状态所需的序列多样性。另一方面,在非常短的寡聚物(< 10 个碱基对)中精细至单个碱基(点突变)的序列差异都足以区别与互补核酸靶序列的杂交,当与非靶序列相比较时。

[0166] 在一个实施方案中,至少一组原位杂交探针可包含一种或多种 PNA 探针,如上所定义和如美国专利号 7,105,294 所述,其通过引用结合到本文中。合成 PNA 探针的方法描述于 PCT/US02/30573。或者或另外,上述任何技术中的至少一组杂交探针都可包含一种或多种锁核酸(LNA)探针,正如 W0 99/14226 所述,其通过引用结合到本文中。因为在 2' 和 4' 碳之间的额外桥连键,LNA 主链被预组织,用于杂交。LNA/DNA 和 LNA/RNA 的相互作用比相应的 DNA/DNA 和 DNA/RNA 的相互作用更强烈,正如更高解链温度所示。因此,降低杂交所需能量的本发明的方法和组合物特别适用于用 LNA 探针的杂交。

[0167] 在一个实施方案中,探针可包含可检测标记(提供分析上可识别信号并允许检测探针-靶复合体的分子),正如美国专利公布号 2005/0266459 所述,其通过引用结合到本文中。可将可检测标记与探针直接连接,或通过使用接头而与探针间接连接。本领域技术人员已知的任何标记方法,包括酶促方法和化学方法,都可用于标记本发明方法和组合物所用的探针。在其它实施方案中,探针未标记。

[0168] 一般而言,原位杂交技术例如 CGH、FISH、CISH 和 SISH 使用大的、主要是非特异性核酸探针,所述探针以不同的严格性与细胞染色体中的基因或基因片段杂交。使用大探针使原位杂交技术非常灵敏。然而,在传统杂交测定中成功使用大基因组探针取决于封闭来自例如广泛存在于基因组中的重复序列的不想要背景染色。这种封闭步骤是耗时而昂贵的。如以下所述,本发明的方法和组合物有利地减少和/或消除对这种封闭步骤的需要。然而,在一个实施方案中,按照本领域已知方法例如公开于 PCT/US02/30573 的方法,重复序列可被封闭。

[0169] 可直接或间接使用荧光染料(例如 FISH)、有机显色剂(例如 CISH)、银颗粒(例如 SISH)或其它金属颗粒(例如金促进的荧光原位杂交, GOLDFISH),来检测细胞学和组织学样品中的结合探针。因此,根据检测方法,得自待检样品的细胞群体可通过荧光显微镜术或常规明视野显微镜来观察。

[0170] 对细胞学和组织学样品的杂交测定是测定特定 DNA 序列的数目、大小和/或位置的重要工具。例如,在 CGH 中,将全基因组染色并与正常参考基因组比较,用于检测具有异常拷贝数的区域。通常,来自受试者组织和正常对照组织的 DNA 用不同颜色的探针来标记。将 DNA 混合物合并并加入到正常染色体的中期铺片(或加入到微阵列芯片,对于阵列 CGH 或基质-CGH)中。然后比较颜色比例,识别具有异常拷贝数的区域。

[0171] 当需要多色图像和/或当方案要求定量信号时,通常使用 FISH。该技术通常要求制备细胞学样品,标记探针,变性靶染色体和探针,将探针与靶序列杂交并检测信号。通常,

杂交反应对靶序列进行荧光染色,使它们的位置、大小或数目可用荧光显微镜术、流式细胞术或其它合适仪器来测定。范围从全基因组到几千碱基对的 DNA 序列都可用 FISH 来研究。FISH 也可用于中期铺片和间期核。

[0172] FISH 已经成功用于对中期染色体、间期核、染色质纤维和裸露 DNA 分子上的重复 DNA 序列和单拷贝 DNA 序列作图,并通过大的重复家族、尤其是核糖体 DNA 和主要串联排列家族 (major tandem array family) 的定位而用于染色体识别和核型分析。FISH 的最重要应用之一就是在人和其它真核模型物种的特定疾病相关基因中检测单拷贝 DNA 序列,并检测感染因子。FISH 可用于在出生前诊断、造血系统癌症和实体瘤中检测例如染色体非整倍性;检测基因异常例如癌基因扩增、基因缺失或基因融合;检测染色体结构异常例如易位、重复、插入或倒位;邻近基因综合征例如微缺失综合征;各种治疗的遗传效应;体细胞中的病毒核酸和染色体中的病毒整合位点等。在多色 FISH 中,每条染色体染上不同颜色,使得可以确定异常染色体从中衍生出来的正常染色体。这种技术包括多重 FISH(m-FISH)、光谱核型分析 (SKY)、组合二元定量标记 (combined binary ration labeling, COBRA)、变色核型分析、多色显带分析、高分辨率多色显带分析、端粒多色 FISH(TM-FISH)、信号分离 FISH(ssFISH) 和信号融合 FISH。

[0173] CISH 和 SISH 可用于与 FISH 相同的许多应用,并具有允许分析基础组织形态学的额外优势,例如用于组织病理学应用。如果进行 FISH,杂交混合物可含有不同且对称的探针对 (distinct and balanced pair of probes) 组,正如美国专利号 6,730,474 所述,其通过引用结合到本文中。对于 CISH,杂交混合物可含有专为用一种或多种常规有机显色剂来检测而设计的至少一组探针,而对于 SISH,杂交混合物可含有专为用银颗粒检测而设计的至少一组探针,正如以下文献所述:Powell RD 等,“Metallographic in situ hybridization(金相原位杂交),”Hum. Pathol.,38:1145-59(2007)。

[0174] 本发明的组合物也可全部或部分用于涉及杂交的所有类型的分子生物学技术,包括印迹和探针技术(例如 DNA 印迹、RNA 印迹等)、阵列和扩增技术(包括传统的 PCR、RT-PCR、突变 PCR、不对称 PCR、热启动 PCR、反向 PCR、多重 PCR、巢式 PCR、定量 PCR 和原位 PCR)。原位 PCR 是在载玻片上的细胞(例如上述细胞学和组织学样品)内发生的聚合酶链式反应。通常,当样品粘附到显微镜载玻片上之后,使细胞复水和渗透,然后与包含聚合酶、dNTP 和引物的合适 PCR 试剂混合物混合。PCR 可在专用仪器例如 GeneAmp 原位 PCR 系统 1000(Perkin Elmer Biosystems,Foster City,CA) 上进行,并可用标记探针或通过扩增期间掺入标记 dNTP 来检测扩增产物。本发明的组合物将会改善传统的和原位 PCR 分析的效率,例如通过降低变性和杂交的温度和/或减少进行扩增循环的所需时间。

[0175] (3) 杂交条件

[0176] 本发明的方法涉及在核酸链杂交中使用极性非质子溶剂。本发明的组合物尤其可用于所述方法。

[0177] 使用本发明组合物的杂交方法可包括将所述组合物用于包含靶核酸序列(很可能呈双链形式)的样品。通常,为了保证探针与靶序列杂交,将样品和组合物加热,以变性靶核酸。变性期间,极性非质子溶剂与序列相互作用并促进靶的变性和探针重新退火到靶标。与甲酰胺相比,本发明所述的极性非质子溶剂显著地加速了该过程并降低了杂交条件的苛刻性和毒性。

[0178] 可采用与使用传统组合物进行杂交的同样测定方法,使用本发明组合物进行杂交。然而,本发明的组合物允许更短的杂交时间。例如,加热预处理、消化、变性、杂交、洗涤和封固步骤可使用与传统组合物所用的体积、温度、试剂和孵育时间相同的条件。本领域已知的传统杂交方案中存在大的变化。例如,某些方案规定了在没有探针存在时的可能双链核苷酸的单独变性步骤,然后接着是杂交步骤。本发明的组合物可用于本领域已知的任何传统的杂交方案。

[0179] 或者,可以从传统方法来改变并优化使用本发明组合物的测定,例如通过减少杂交时间,升高或降低变性和 / 或杂交的温度、和 / 或增加或减少杂交体积。

[0180] 例如,在某些实施方案中,当变性温度是 60-100℃,杂交温度是 20-60℃时,本发明的组合物将会产生强烈信号。在其它实施方案中,当变性温度是 60-70℃、70-80℃、80-90℃或 90-100℃,杂交温度是 20-30℃、30-40℃、40-50℃或 50-60℃时,本发明的组合物将会产生强烈信号。在其它实施方案中,当变性温度是 72、82 或 92℃,杂交温度是 37、40、45 或 50℃时,本发明的组合物将会产生强烈信号。

[0181] 在其它实施方案中,当变性时间是 0-10 分钟,杂交时间是 0 分钟至 24 小时时,本发明的组合物将会产生强烈信号。在其它实施方案中,当变性时间是 0-5 分钟,杂交时间是 0 分钟至 8 小时时,本发明的组合物将会产生强烈信号。在其它实施方案中,当变性时间是 0、1、2、3、4 或 5 分钟,杂交时间是 0 分钟、5 分钟、15 分钟、30 分钟、60 分钟、180 分钟或 240 分钟时,本发明的组合物将会产生强烈信号。本领域技术人员将会理解,在某些情况下,例如 RNA 检测时,不需要变性步骤。

[0182] 因此,使用本发明组合物的杂交可以在不到 8 小时内完成。在其它实施方案中,杂交可以在不到 6 小时内完成。在再一些实施方案中,杂交可以在 4 小时内完成。在其它实施方案中,杂交可以在 3 小时内完成。在又一些实施方案中,杂交可以在 2 小时内完成。在其它实施方案中,杂交可以在 1 小时内完成。在再一些实施方案中,杂交可以在 30 分钟内完成。在其它实施方案中,它们的杂交可发生在 15 分钟内。杂交甚至可发生在 10 分钟内或不到 5 分钟内。图 1 和图 2 分别说明了在组织学和细胞学样品上进行的杂交的典型时间进程,比较了使用本发明组合物与使用传统组合物进行的杂交。

[0183] 随着杂交时间的改变,探针浓度也可不同,以产生强烈信号和 / 或降低背景。例如,随着杂交时间减少,探针量可增加,以改善信号强度。另一方面,随着杂交时间减少,探针量可以减少,以改善背景染色。

[0184] 本发明的组合物令人惊奇地消除了杂交期间对封闭步骤的需求,即通过封闭例如重复序列与靶 DNA 的结合而改善信号和背景强度。因此,不需要使用人类总 DNA、封闭 PNA、COT-1 DNA 或来自任何其它来源的 DNA 作为封闭剂。然而,在使用本发明组合物时,还可通过向杂交反应中加入能减少非特异性结合(例如与细胞膜结合)的试剂,进一步降低背景水平,所述试剂例如少量人类总 DNA 或非人类来源的 DNA(例如鲑鱼精子 DNA)。

[0185] 本发明的含水组合物还提供了明显降低组合物所含的核酸序列浓度的可能性。通常,与传统的浓度相比,探针浓度可降低 2-8 倍。例如,如果 HER2 DNA 探针和 CEN17 PNA 探针用于本发明的组合物,相对于其在传统杂交组合物中浓度它们的浓度可分别降低 1/4 和 1/2。该特征,以及不需要封闭 DNA(例如封闭 PNA 或 COT1),允许在自动化仪器系统中增加探针体积(与传统组合物系统所用的传统 10 μ L 体积相比),这减少了因蒸发而带来的损

失, 详细讨论如下。

[0186] 降低探针浓度也降低了背景。然而, 降低探针浓度与杂交时间成负相关, 即浓度越低, 所需杂交时间越长。然而, 甚至当极低浓度的探针与本发明含水组合物一起使用时, 杂交时间仍然比用传统组合物更短。

[0187] 本发明的组合物通常允许比传统杂交组合物更好的信噪比。与在传统组合物中杂交过夜相比, 使用某些探针, 使用本发明组合物的一小时杂交将会产生类似背景和更强烈信号。当不加探针时没有观察到背景。

[0188] 当使用本发明组合物时, 也可改变和优化传统的测定方法, 这取决于系统是否是手动、半自动或自动化的。例如, 半自动或自动化系统将会从使用本发明组合物而得到的短杂交时间中受益。短杂交时间可减少在这类系统中使用传统组合物所遇到的困难。例如, 使用半自动和自动化系统的一个问题就是, 杂交期间样品会发生明显蒸发, 因为这类系统需要小的样品体积 (例如 10–150 μ L)、升高的温度和延长的杂交时间 (例如 14 小时)。因此, 在传统杂交组合物中的组分比例相当恒定。然而, 因为本发明组合物允许更快的杂交, 所以减少了蒸发, 允许在用于半自动和自动化系统的杂交组合物中组分比例的灵活性增加。

[0189] 例如, 两种自动化仪器用于使用本发明组合物来进行杂交。包含 40% 碳酸亚乙酯 (v/v) 的组合物已经用于仪器, 其公开于 PCT 申请 DK2008/000430, 而包含 15% 碳酸亚乙酯 (v/v) 的组合物已经用于 HYBRIMASTER HS-300 (Aloka CO. LTD, Japan)。当本发明的组合物用于 HYBRIMASTER HS-300 时, 该仪器可进行快速 FISH 杂交, 用水代替传统有毒的甲酰胺混合物, 因而改善了安全性并减少了蒸发。如果将水润湿的条带贴到 Aloka 仪器的反应单元 (杂交室) 的内部盖子上, 例如按照美国专利申请号 11/031, 514 所述 (其通过引用结合到本文中), 甚至会进一步减少蒸发。

[0190] 自动化图像分析的另一个问题就是所需的图像数, 所需的大量存储空间和采集图像所需的时间。与传统组合物相比, 本发明的组合物通过产生非常强烈信号, 而解决了该问题。因为本发明组合物产生非常强烈信号, 所以可以用比传统组合物所需的更低的放大倍数来作图, 并且仍然可以对其进行检测和分析, 例如通过算法。因为放大倍数更低, 焦平面更宽, 所以本发明组合物减少或消除了对采集样品连续切片的需要。作为结果, 总体成像快得多, 因为本发明组合物需要更少连续切片或不需要连续切片, 并且各图像覆盖大得多的面积。另外, 总体分析时间更快, 因为总图像文件小得多。

[0191] 因此, 本发明的组合物和方法解决了传统的杂交组合物和方法相关的许多问题。

[0192] 通过以下非限制性实施例, 可以更清楚地理解本说明书, 所述实施例构成了本说明书的组合物优选实施方案。除非在实施例中或其它地方另有说明, 否则在本说明书和权利要求书中所用的表示成分数量、反应条件等的所有数字都可理解为在所有情况下被术语“约”修饰。因此, 除非另有相反说明, 否则以下说明书和所附权利要求书中给出的数字参数都是近似值, 其可因确定在本文中获取的所需性质的不同而异。至少而并非试图将等同方案原则的应用限制在权利要求书的范围之内, 每个数字参数都应当视为按照有效数字的数值和通常的四舍五入方式。

[0193] 尽管宽范围给出的数字范围和参数是近似值, 但是在具体实施例中给出的数值是尽可能精确地报告的。然而, 任何数值必定具有来自其各自测试的标准偏差的某些误差。以下实施例说明了本发明, 并且不应视为以任何方式限制本发明。

实施例

[0194] 对于本发明具体的实施方案,将会详细给出参考。尽管参考这些实施方案描述了本发明,但可以理解,它们不得视为将本发明限制在这些实施方案中。相反,本发明覆盖了替代、修改和等同方案,其可按照所附权利要求书的定义而包括在本发明之内。

[0195] 以下实施例中所用的试剂来自 Dako 的组织学 FISH 辅助试剂盒 (K5599) 和细胞学 FISH 辅助试剂盒 (K5499) (Dako Denmark A/S, Glostrup Denmark)。试剂盒含有完成经福尔马林固定、石蜡包埋的组织切片标本的 FISH 程序所需的所有关键试剂,除了探针之外。按照制造商描述制备所有样品。Dako 杂交仪 (S2450, Dako) 用于消化、变性和杂交步骤。

[0196] 在杂交后一周内,使用装有 DAPI、FITC、德克萨斯红单滤色镜和 FITC/ 德克萨斯红双滤色镜的 Leica DM6000B 荧光显微镜,在 10x、20x、40x 物镜和 100x 油镜下,对 FISH 载玻片进行评价。

[0197] 使用 Olympus BX51 光学显微镜,在 4x、10x、20x、40x 和 60x 物镜下,对 CISH 载玻片进行评价。

[0198] 在以下实施例中,“硫酸葡聚糖”是指分子量 $M_w > 500,000$ 的硫酸葡聚糖的钠盐 (D8906, Sigma)。所有浓度的极性非质子溶剂都以体积 (v/v) 百分比计。磷酸缓冲液是指含有 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (磷酸二氢钠 - 二水合物) 和 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (磷酸氢二钠 - 一水合物) 的磷酸缓冲溶液。柠檬酸缓冲液是指含有柠檬酸钠 ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7, 2\text{H}_2\text{O}$; 1.06448, Merck) 和柠檬酸 - 一水合物 ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7, \text{H}_2\text{O}$; 1.00244, Merck) 的柠檬酸缓冲溶液。

[0199] 通用组织学 FISH/CISH 程序 (实施例 1-20)

[0200] 将来自人 (扁桃体、乳腺癌、肾和结肠) 的经福尔马林固定、石蜡包埋的 (FFPE) 多组织排列切片的载玻片在 60°C 加热 30-60 分钟,在二甲苯浴中脱蜡,在乙醇浴中复水,然后移入洗涤缓冲液中。再将样品在预处理溶液至少在 95°C 预处理 10 分钟并洗涤 2x3 分钟。然后将样品用胃蛋白酶 RTU 在 37°C 消化 3 分钟,洗涤 2x3 分钟,在一系列乙醇中脱水,蒸发并风干。按照所述,在单独实验下,将样品与 10 μL FISH 探针一起孵育。将样品再通过严格性洗涤,在 65°C 洗涤 10 分钟,再洗涤 2x3 分钟,然后在一系列乙醇中脱水,蒸发并风干。最终,将载玻片用 15 μL 抗褪色封固剂封固。完成染色之后,观察人员经训练后来评价染色载玻片的信号强度、形态学和背景,进行评分。

[0201] 通用细胞学 FISH 程序 (实施例 21-22)

[0202] 将带有中期制备物的载玻片在 3.7% 甲醛中固定 2 分钟,洗涤 2x5 分钟,在一系列乙醇中脱水,蒸发并风干。按照所述,在单独实验下,将样品与 10 μL FISH 探针一起孵育。将样品再通过严格性洗涤,在 65°C 洗涤 10 分钟,再洗涤 2x3 分钟,然后在一系列乙醇中脱水,蒸发并风干。最终,将载玻片用 15 μL 抗褪色封固剂封固。最终,将载玻片用 15 μL 抗褪色封固剂封固。完成染色之后,观察人员经训练后来评价染色载玻片的信号强度、形态学和背景,按照组织切片评分指南所述进行评分。

[0203] 组织切片评分指南

[0204] 在 0-3 级量表上评价信号强度,其中 0 表示无信号,3 表示强烈信号。在 0-3 级量表上评价细胞 / 组织结构,其中 0 表示无结构和无核边界,3 表示完整结构和清晰核边界。介于 0 和 3 之间,有额外的 0.5 级,由此观察人员可评价信号强度、组织结构和背景。

- [0205] 根据 0-3 级量表上的分级系统,对信号强度进行评分。
- [0206] 0 无信号可见。
- [0207] 1 信号强度微弱。
- [0208] 2 信号强度中等。
- [0209] 3 信号强度强烈。
- [0210] 该评分系统允许使用 1/2 级。
- [0211] 根据 0-3 级量表上的分级系统,对组织和核结构进行评分。
- [0212] 0 组织结构和核边界完全被破坏。
- [0213] 1 组织结构和 / 或核边界差。该级别包括某些区域具有空核的情况。
- [0214] 2 组织结构和 / 或核边界可见,但核边界不清晰。该级别包括少量核是空的情况。
- [0215] 3 组织结构和核边界完整而清晰。
- [0216] 该评分系统允许使用 1/2 级。
- [0217] 根据 0-3 级量表上的分级系统,对背景进行评分。
- [0218] 0 无或几乎无背景可见。
- [0219] 1 有些背景。
- [0220] 2 中等背景。
- [0221] 3 高背景。
- [0222] 该评分系统允许使用 1/2 级。
- [0223] 实施例 1
- [0224] 本实施例比较了经本发明组合物或传统杂交溶液处理的样品的信号强度和细胞形态学,作为变性温度的函数。
- [0225] FISH 探针组合物 I :10% 硫酸葡聚糖、300mM NaCl、5mM 磷酸缓冲液、40% 甲酰胺 (15515-026, Invitrogen)、5 μ M 封闭 PNA (参见 Kirsten Vang Nielsen 等, PNA Suppression Method Combined with Fluorescence In Situ Hybridisation (FISH) Technique in PRINS and PNA Technologies in Chromosomal Investigation, 第 10 章 (Franck Pellestor 编著) (Nova Science Publishers, Inc. 2006))、10ng/ μ L 德克萨斯红标记的 CCND1 基因 DNA 探针 (RP11-1143E20, 大小 192kb)。
- [0226] FISH 探针组合物 II :10% 硫酸葡聚糖、300mM NaCl、5mM 磷酸缓冲液、40% 碳酸亚乙酯 (03519, Fluka)、5 μ M 封闭 PNA、10ng/ μ L 德克萨斯红标记的 CCND1 基因 DNA 探针 (RP11-1143E20, 大小 192kb)。
- [0227] 如果存在,不同粘度的各相在使用前混合。按照指示,将 FISH 探针变性 5 分钟并在 45°C 杂交 60 分钟。
- [0228] 结果 :
- [0229]

变性温度	信号		细胞形态学	
	(I) 甲酰胺	(II) EC	甲酰胺	EC
72°C	0	2	好	好
82°C	½	3	好	好
92°C	½	3	不好	不好

[0230] 信号评分为“3”分,是在 20x 物镜下清晰可见。

[0231] 实施例 2

[0232] 本实施例比较了经本发明组合物或传统杂交溶液处理的样品的信号强度和背景染色,作为杂交时间的函数。

[0233] FISH 探针组合物 I:10%硫酸葡聚糖、300mM NaCl、5mM 磷酸缓冲液、40%甲酰胺、5 μM 封闭 PNA、10ng/μL 德克萨斯红标记的 CCND1 基因 DNA 探针。

[0234] FISH 探针组合物 II:10%硫酸葡聚糖、300mM NaCl、5mM 磷酸缓冲液、40%碳酸亚乙酯、5 μM 封闭 PNA、10ng/μL 德克萨斯红标记的 CCND1 基因 DNA 探针。

[0235] 如果存在,不同粘度的各相在使用前混合。将 FISH 探针在 82°C 孵育 5 分钟,然后在 45°C 孵育 14 小时、4 小时、2 小时、60 分钟、30 分钟、15 分钟、0 分钟。

[0236] 结果:

[0237]

杂交时间	信号		背景染色	
	(I) 甲酰胺	(II) EC	甲酰胺	EC
14 小时	3	3	+½	+2
4 小时	1	3	+½	+1
2 小时	½	3	+0	+1
60 分钟	½	3	+0	+1
30 分钟	0	2½	+0	+1
15 分钟	0	2	+0	+1
0 分钟	0	1	+0	+½

[0238] 信号评分为“3”分,是在 20x 物镜下清晰可见。

[0239] 实施例 3

[0240] 本实施例比较了经具有不同极性非质子溶剂的本发明组合物或传统杂交溶液处理的样品的信号强度。

[0241] FISH 探针组合物 I :10%硫酸葡聚糖、300mM NaCl、5mM 磷酸缓冲液、40%甲酰胺、5 μM 封闭 PNA、10ng/ μL 德克萨斯红标记的 CCND1 基因 DNA 探针。

[0242] FISH 探针组合物 II :10%硫酸葡聚糖、300mM NaCl、5mM 磷酸缓冲液、40%碳酸亚乙酯 (EC)、5 μM 封闭 PNA、10ng/ μL 德克萨斯红标记的 CCND1 基因 DNA 探针。

[0243] FISH 探针组合物 III :10%硫酸葡聚糖、300mM NaCl、5mM 磷酸缓冲液、40%碳酸异丙二醇酯 (PC) (540013, Aldrich)、5 μM 封闭 PNA、10ng/ μL 德克萨斯红标记的 CCND1 基因 DNA 探针。

[0244] FISH 探针组合物 IV :10%硫酸葡聚糖、300mM NaCl、5mM 磷酸缓冲液、40%环丁砜 (SL) (T22209, Aldrich)、5 μM 封闭 PNA、10ng/ μL 德克萨斯红标记的 CCND1 基因 DNA 探针。

[0245] FISH 探针组合物 V :10%硫酸葡聚糖、300mM NaCl、5mM 磷酸缓冲液、40%乙腈 (AN) (C02CIIX, Lab-Scan)、5 μM 封闭 PNA、10ng/ μL 德克萨斯红标记的 CCND1 基因 DNA 探针。

[0246] FISH 探针组合物 VI :10%硫酸葡聚糖、300mM NaCl、5mM 磷酸缓冲液、40% γ-丁内酯 (GBL) (B103608, Aldrich)、5 μM 封闭 PNA、7.5ng/ μL 德克萨斯红标记的 CCND1 基因 DNA 探针。

[0247] 如果存在,不同粘度的各相在使用前混合。将 FISH 探针在 82℃ 孵育 5 分钟,然后在 45℃ 孵育 60 分钟。

[0248] 结果 :

[0249]

信号					
(I) 甲酰胺	(II) EC	(III) PC	(IV) SL	(V) AN	(VI) GBL
½	3	3	3	2	3

[0250] 信号评分为“3”分,是在 20x 物镜下清晰可见。

[0251] 实施例 4

[0252] 本实施例比较了经具有不同浓度极性非质子溶剂的本发明组合物处理的样品的信号强度。

[0253] FISH 探针组合物 :10%硫酸葡聚糖、300mM NaCl、5mM 磷酸缓冲液、10-60%碳酸亚乙酯 (按照指示)、5 μM 封闭 PNA、7.5ng/ μL 德克萨斯红标记的 IGK- 恒定区 DNA 基因探针 ((CTD-3050E15、RP11-1083E8 ;大小 227kb) 和 7.5ng/ μL FITC 标记的 IGK- 可变区基因 DNA 探针 (CTD-2575M21、RP11-122B6、RP11-316G9 ;大小 350 和 429kb)。

[0254] 如果存在,不同粘度的各相在使用前混合。将 FISH 探针在 82℃ 孵育 5 分钟,然后在 45℃ 孵育 60 分钟。

[0255] 结果 :

[0256]

		碳酸亚乙酯(EC)				
		10%	20%	30%	40%	60%
信号	德克萨斯红	1½	2	3	3	2
强度	FITC	1	1½	2	2½	2

[0257] 信号评分为“3”分,是在 20x 物镜下清晰可见。

[0258] 实施例 5

[0259] 本实施例比较了经有或没有 PNA 封闭的组合物处理的样品的信号强度和背景强度。

[0260] FISH 探针组合物:10%硫酸葡聚糖、300mM NaCl、5mM 磷酸缓冲液、40%碳酸亚乙酯、7.5ng/μL 德克萨斯红标记的 CCND1 基因 DNA 探针。

[0261] 如果存在,不同粘度的各相在使用前混合。将 FISH 探针在 82℃孵育 5 分钟,然后在 45℃孵育 60 分钟。

[0262] 结果:

[0263]

	碳酸亚乙酯(EC)	
	PNA-封闭	无-PNA 封闭
信号强度	3	3
背景强度	½ +	½ +

[0264] 信号评分为“3”分,是在 20x 物镜下清晰可见。

[0265] 实施例 6

[0266] 本实施例比较了经本发明组合物处理的样品的信号强度,作为探针浓度和杂交时间的函数。

[0267] FISH 探针组合物:10%硫酸葡聚糖、300mM NaCl、5mM 磷酸缓冲液、40%碳酸亚乙酯,以及 10、7.5、5 或 2.5ng/μL 德克萨斯红标记的 CCND1 基因 DNA 探针(按照指示)。

[0268] 如果存在,不同粘度的各相在使用前混合。将 FISH 探针在 82℃孵育 5 分钟,然后在 45℃孵育 3 小时、2 小时和 1 小时。

[0269] 结果:

[0270]

杂交时间	信号强度			
	(I) 10 ng/ μ L	(II) 7.5ng/ μ L	(III) 5 ng/ μ L	(IV) 2.5 ng/ μ L
3 小时	3	3	3	3
2 小时	3	3	3	1
1 小时	3	3	3	$\frac{1}{2}$

[0271] 信号评分为“3”分,是在 20x 物镜下清晰可见。

[0272] 实施例 7

[0273] 本实施例比较了经本发明组合物处理的样品的信号强度,作为盐、磷酸盐和缓冲液的浓度的函数。

[0274] FISH 探针组合物:10%硫酸葡聚糖、([NaCl]、[磷酸缓冲液]、[TRIS 缓冲液],如结果中所示)、40%碳酸亚乙酯、7.5ng/ μ L 德克萨斯红标记的 CCND1 基因 DNA 探针。

[0275] 如果存在,不同粘度的各相在使用前混合。将 FISH 探针在 82℃ 孵育 5 分钟,然后在 45℃ 孵育 60 分钟。

[0276] 结果:

[0277]

	[NaCl]		
	300 mM	100 mM	0 mM
信号强度 磷酸盐[0 mM]	2	1	$\frac{1}{2}$
信号强度 磷酸盐[5 mM]	3	$2\frac{1}{2}$	$\frac{1}{2}$
信号强度 磷酸盐[35 mM]	-	-	3
信号强度 TRIS [40 mM]	-	-	2

[0278] 信号评分为“3”分,是在 20x 物镜下清晰可见。

[0279] 实施例 8

[0280] 本实施例比较了经本发明组合物处理的样品的信号强度,作为硫酸葡聚糖浓度的函数。

[0281] FISH 探针组合物:0、1、2、5 或 10 % 硫酸葡聚糖(按照指示)、300mM NaCl、5mM 磷酸缓冲液、40 % 碳酸亚乙酯、5ng/ μ L 德克萨斯红标记的 SIL-TAL1 基因 DNA 探针(RP1-278013;大小 67kb)和 6ng/ μ L FITC SIL-TAL1(ICRFc112-112C1794、RP11-184J23、

RP11-8J9、CTD-2007B18、133B9 ;大小 560kb)。

[0282] 如果存在,不同粘度的各相在使用前混合。将 FISH 探针在 82℃ 孵育 5 分钟,然后在 45℃ 孵育 60 分钟。不封闭。

[0283] 结果:

[0284]

%硫酸葡聚糖	信号强度	
	德克萨斯红探针	FITC 探针
0%	1	1
1%	1	1
2%	1 ½	1 ½
5%	2	2 ½
10%	2	2 ½

[0285] 注意:本实验没有产生评分为“3”的结果,因为 SIL-TAL1 德克萨斯红标记的探针仅为 67kb 且来自未优化制备物。

[0286] 实施例 9

[0287] 本实施例比较了经本发明组合物处理的样品的信号强度,作为硫酸葡聚糖、盐、磷酸盐和极性非质子溶剂浓度的函数。

[0288] FISH 探针组合物 Ia :34%硫酸葡聚糖、0mM NaCl、0mM 磷酸缓冲液、0%碳酸亚乙酯、10ng/μL 德克萨斯红标记的 HER2 基因 DNA 探针(大小 218kb)和 50nM FITC 标记的 CEN-7PNA 探针。

[0289] FISH 探针组合物 Ib :34%硫酸葡聚糖、300mM NaCl、5mM 磷酸缓冲液、0%碳酸亚乙酯、10ng/μL 德克萨斯红标记的 HER2 基因 DNA 探针(大小 218kb)和 50nM FITC 标记的 CEN-7PNA 探针。

[0290] FISH 探针组合物 Ic :34%硫酸葡聚糖、600mM NaCl、10mM 磷酸缓冲液、0%碳酸亚乙酯、10ng/μL 德克萨斯红标记的 HER2 基因 DNA 探针(大小 218kb)和 50nM FITC 标记的 CEN-7PNA 探针。

[0291] FISH 探针组合物 IIa :32%硫酸葡聚糖、0mM NaCl、0mM 磷酸缓冲液、5%碳酸亚乙酯、10ng/μL 德克萨斯红标记的 HER2 基因 DNA 探针(大小 218kb)和 50nM FITC 标记的 CEN-7PNA 探针。

[0292] FISH 探针组合物 IIb :32%硫酸葡聚糖、300mM NaCl、5mM 磷酸缓冲液、5%碳酸亚乙酯、10ng/μL 德克萨斯红标记的 HER2 基因 DNA 探针(大小 218kb)和 50nM FITC 标记的 CEN-7 PNA 探针。

[0293] FISH 探针组合物 IIc :32%硫酸葡聚糖、600mM NaCl、10mM 磷酸缓冲液、5%碳酸亚乙酯、10ng/μL 德克萨斯红标记的 HER2 基因 DNA 探针(大小 218kb)和 50nM FITC 标记的 CEN-7PNA 探针。

[0294] FISH 探针组合物 IIIa :30%硫酸葡聚糖、0mM NaCl、0mM 磷酸缓冲液、10%碳酸亚乙酯、10ng/μL 德克萨斯红标记的 HER2 基因 DNA 探针(大小 218kb)和 50nM FITC 标记的

CEN-7PNA 探针。

[0295] FISH 探针组合物 IIIb :30%硫酸葡聚糖、300mM NaCl、5mM 磷酸缓冲液、10%碳酸亚乙酯、10ng/ μ L 德克萨斯红标记的 HER2 基因 DNA 探针 (大小 218kb) 和 50nM FITC 标记的 CEN-7 PNA 探针。

[0296] FISH 探针组合物 IIIc :30%硫酸葡聚糖、600mM NaCl、10mM 磷酸缓冲液、10%碳酸亚乙酯、10ng/ μ L 德克萨斯红标记的 HER2 基因 DNA 探针 (大小 218kb) 和 50nM FITC 标记的 CEN-7PNA 探针。

[0297] FISH 探针组合物 IVa :28%硫酸葡聚糖、0mM NaCl、0mM 磷酸缓冲液、15%碳酸亚乙酯、10ng/ μ L 德克萨斯红标记的 HER2 基因 DNA 探针 (大小 218kb) 和 50nM FITC 标记的 CEN-7PNA 探针。

[0298] FISH 探针组合物 IVb :28%硫酸葡聚糖、300mM NaCl、5mM 磷酸缓冲液、15%碳酸亚乙酯、10ng/ μ L 德克萨斯红标记的 HER2 基因 DNA 探针 (大小 218kb) 和 50nM FITC 标记的 CEN-7PNA 探针。

[0299] FISH 探针组合物 IVc :28%硫酸葡聚糖、600mM NaCl、10mM 磷酸缓冲液、15%碳酸亚乙酯、10ng/ μ L 德克萨斯红标记的 HER2 基因 DNA 探针 (大小 218kb) 和 50nM FITC 标记的 CEN-7 PNA 探针。

[0300] FISH 探针参考 V :标准售卖的含有封闭 PNA 的 HER2 PharmDx 探针混合物 (K5331, Dako) 小管。杂交过夜 20 小时。

[0301] 所有组合物以单相存在。将 FISH 探针在 82°C 孵育 5 分钟,然后在 45°C 孵育 60 分钟,不封闭,除了 FISH 探针参考 V 之外,后者具有 PNA 封闭并杂交 20 小时。

[0302] 结果 :

[0303]

	信号强度	
	DNA 探针	PNA 探针
组合物 Ia	0	½
组合物 Ib	0	½
组合物 Ic	½	2 ½
组合物 IIa	½	3
组合物 IIb	1	2
组合物 IIc	½	3
组合物 IIIa	1	2 ½
组合物 IIIb	1 ½	2 ½
组合物 IIIc	2	3
组合物 IVa	2 ½-3	3
组合物 IVb	3	3
组合物 IVc	3	3
参考 V	2	2 ½

[0304] 注意：组合物 Iva 给出强烈 DNA 信号，其中无盐。这用标准 FISH 组合物（其中 DNA 结合是盐依赖型的）是不可能的。

[0305] 实施例 10

[0306] 本实施例比较了经本发明组合物处理的样品的信号强度，作为高盐（4x 正常）条件下的极性非质子溶剂和硫酸葡聚糖浓度的函数。

[0307] FISH 探针组合物 I：0% 碳酸亚乙酯、29% 硫酸葡聚糖、1200mM NaCl、20mM 磷酸缓冲液、10ng/μL 德克萨斯红标记的 HER2 基因 DNA 探针和 50nM FITC 标记的 CEN-7 PNA 探针。组合物是单相。

[0308] FISH 探针组合物 II：5% 碳酸亚乙酯、27% 硫酸葡聚糖、1200mM NaCl、20mM 磷酸缓冲液、10ng/μL 德克萨斯红标记的 HER2 基因 DNA 探针和 50nM FITC 标记的 CEN-7 PNA 探针。组合物是单相。

[0309] FISH 探针组合物 III：10% 碳酸亚乙酯、25% 硫酸葡聚糖、1200mM NaCl、20mM 磷酸缓冲液、10ng/μL 德克萨斯红标记的 HER2 基因 DNA 探针和 50nM FITC 标记的 CEN-7 PNA 探针。组合物是单相。

[0310] FISH 探针组合物 IV（未测试）：20% 碳酸亚乙酯、21% 硫酸葡聚糖、1200mM NaCl、20mM 磷酸缓冲液、10ng/μL 德克萨斯红标记的 HER2 基因 DNA 探针和 50nM FITC 标记的 CEN-7 PNA 探针。组合物具有两相。

[0311] 结果：

[0312]

	信号强度	
	DNA 探针	PNA 探针
组合物 I	½	3
组合物 II	2	2 ½
组合物 III	3	3
组合物 IV	-	-

[0313] 注意：组合物 II 仅用 5% EC 就产生良好 DNA 信号，用 10% EC 就产生强烈 DNA 信号。

[0314] 实施例 11

[0315] 本实施例比较了经本发明组合物的不同相处理的样品的信号强度和背景。

[0316] FISH 探针组合物：10% 硫酸葡聚糖、300mM NaCl、5mM 磷酸缓冲液、40% 碳酸亚乙酯、8ng/μL 德克萨斯红标记的 HER2 基因 DNA 探针和 600nM FITC 标记的 CEN-17PNA 探针。将 FISH 探针在 82℃ 孵育 5 分钟，然后在 45℃ 孵育 60 分钟。不封闭。

[0317] 结果：

[0318]

	信号强度		
	DNA 探针	PNA 探针	背景
上相	3	1 ½	+2
下相	3	2 ½	+1
上下相混合物	2 ½	3	+½

[0319] 注意：在这些实验中，上相比下相具有更多背景。

[0320] 实施例 12

[0321] 本实施例类似于上一个实施例，但使用不同 DNA 探针并用 GBL 替代 EC。

[0322] FISH 探针组合物：10% 硫酸葡聚糖、300mM NaCl、5mM 磷酸缓冲液、40% GBL、10ng/μL 德克萨斯红标记的 CCND1 基因 DNA 探针和 600nM FITC 标记的 CEN-17PNA 探针。

[0323] 将 FISH 探针在 82℃ 孵育 5 分钟，然后在 45℃ 孵育 60 分钟。不封闭。

[0324] 结果：

[0325]

	信号强度		背景
	DNA 探针	PNA 探针	
上相	3	0-½	+1 ½
下相	2	½	+3
混合相	2 ½	½	+2 ½

[0326] 实施例 13

[0327] 本实施例检查了本发明组合物中的相数,作为极性非质子溶剂和硫酸葡聚糖的浓度的函数。

[0328] FISH 探针组合物:10 或 20%硫酸葡聚糖;300mM NaCl;5mM 磷酸缓冲液;0、5、10、15、20、25、30% EC;10ng/μL 探针。

[0329] 结果:

% EC	相数	
	10% 葡聚糖	20% 葡聚糖
0	1	1
5	1	1
10	1	1
15	1	1
20	2	2
25	2	2
30	2	2

[0331] 注意:15% EC、20%硫酸葡聚糖产生以上单相溶液中最好的高信号强度。两相 20% EC 比 15%甚至具有更高信号强度(数据未显示)。

[0332] 实施例 14

[0333] 本实施例比较了经本发明不同组合物处理的样品的信号强度和背景,作为探针浓度和杂交时间的函数。

[0334] FISH 探针组合物 I:10ng/μL HER2 TxRed 标记的 DNA 探针(标准浓度)和标准浓度的 CEN7 FITC 标记的 PNA 探针(50nM);15% EC;20%硫酸葡聚糖;600mM NaCl;10mM 磷酸缓冲液。

[0335] FISH 探针组合物 II:5ng/μL HER2 TxRed 标记的 DNA 探针(1/2 的标准浓度)和标准浓度(50nM)FITC 标记的 CEN7 PNA 探针;15% EC;20%硫酸葡聚糖;600mM NaCl;10mM 磷酸缓冲液。

[0336] FISH 探针组合物 III:2.5ng/μL HER2 TxRed 标记的 DNA 探针(1/4 的标准浓度)和 1/2 标准浓度(25nM)CEN7 PNA 探针;15% EC;20%硫酸葡聚糖;600mM NaCl;10mM 磷酸

缓冲液。

[0337] 组合物 I-III 以单相形式存在。将 FISH 探针在 82℃ 孵育 5 分钟,然后在 45℃ 孵育 3 小时、2 小时和 1 小时。

[0338] 结果:

[0339]

杂交 时间	信号强度								
	I			II			III		
	DNA	PNA	B.G.	DNA	PNA	B.G.	DNA	PNA	B.G.
3 小时	3	3	+3	3	3	+2.5	3	3	+1.5
2 小时	2.5	2.5	+3	3	3	+3	3	3	+1.5
1 小时	2.5	2.5	+3	3	3	+1.5	2.5	3	+1

[0340] 信号评分为“3”分,是在 20x 物镜下清晰可见。B. G. :背景。

[0341] 实施例 15

[0342] 本实施例比较了经本发明组合物处理的样品的信号强度和背景,作为封闭剂的函数。

[0343] FISH 探针组合物:15 % EC ;20 % 硫酸葡聚糖 ;600mM NaCl ;10mM 磷酸缓冲液 ;2.5ng/ μ L HER2 TxRed 标记的 DNA 探针 (1/4 的标准浓度) 和 1/2 的标准浓度 (300nM) FITC 标记的 CEN17 PNA 探针。样品用以下试剂封闭:(a) 无 ;(b) 0.1 μ g/ μ l COT1 (15279-011, Invitrogen) ;(c) 0.3 μ g/ μ l COT1 ;或 (d) 0.1 μ g/ μ l 人类总 DNA,然后用本发明组合物杂交。

[0344] 所有样品都以单相形式存在。将 FISH 探针在 82℃ 孵育 5 分钟,然后在 45℃ 孵育 60 分钟。

[0345] 结果:

[0346]

封闭剂	背景	信号强度	
		DNA	PNA
无	+1-1.5	3	2.5
0.1 μ g/ μ l COT1	+1	3	2.5
0.3 μ g/ μ l COT1	+1.5	3	2.5
0.1 μ g/ μ l 人类总 DNA	+1/2	3	2.5

[0347] 注意:无封闭的背景水平明显低于无封闭的标准 FISH 通常观察到的水平。相比之下,如果标准 FISH 组合物不含封闭剂,信号通常不能读出。

[0348] 实施例 16

[0349] 本实验比较了用本发明的组合物去除背景染色的不同方式。

[0350] 所有组合物都含有 15 % EC、20 % 硫酸葡聚糖、600mM NaCl、10mM 磷酸缓冲液、2.5ng/ μ L HER2 DNA 探针 (1/4 的标准浓度)、300nMCEN17PNA 探针 (1/2 的标准浓度) 和一种以下背景降低剂：

[0351] A) 5 μ M 封闭 PNA (参见 Kirsten Vang Nielsen 等, PNA Suppression Method Combined with Fluorescence In Situ Hybridisation (FISH) Technique in PRINS and PNA Technologies in Chromosomal Investigation, 第 10 章 (Franck Pellestor 编著) (Nova Science Publishers, Inc. 2006))

[0352] B) 0.1 μ g/ μ l COT-1 DNA

[0353] C) 0.1 μ g/ μ l 人类总 DNA (THD) (经超声处理的未标记的 THD)

[0354] D) 0.1 μ g/ μ l 剪切鲑鱼精子 DNA (AM9680, Ambion)

[0355] E) 0.1 μ g/ μ l 小牛胸腺 DNA (D8661, Sigma)

[0356] F) 0.1 μ g/ μ l 鲑鱼精子 DNA (D7290, Sigma)

[0357] G) 0.5 % 甲酰胺

[0358] H) 2 % 甲酰胺

[0359] I) 1 % 乙二醇 (1.09621, Merck)

[0360] J) 1 % 甘油 (1.04095, Merck)

[0361] K) 1 % 1,3- 丙二醇 (533734, Aldrich)

[0362] L) 1 % H₂O (对照)

[0363] 所有样品都以单相形式存在。将探针在 82°C 孵育 5 分钟, 然后在 45°C 在 FFPE 组织切片上孵育 60 分钟和 120 分钟。

[0364] 结果：

[0365]

背景封闭	杂交/分钟	背景	信号强度	
			DNA	PNA
封闭 PNA	60	+1	3	2.5
封闭 PNA	120	+1-1½	3	2.5
COT-1	60	+½	3	2.5
COT-1	120	+0-½	3	2.5
THD	60	+0	3	3
THD	120	+½	3	2.5
鲑鱼精子 DNA	60	+0	3	3
鲑鱼精子 DNA	120	+0	3	3
小牛胸腺 DNA	60	+0	2.5	3
小牛胸腺 DNA	120	+½	3	2.5
鲱鱼精子 DNA	60	+0	3	3
鲱鱼精子 DNA	120	+½	2.5	3
0.5%甲酰胺	60	+0	2.5	3
0.5%甲酰胺	120	+0	3	3
2%甲酰胺	60	+½	2.5	3
2%甲酰胺	120	+½	3	3
1%乙二醇	60	+½	2.5	3
1%乙二醇	120	+1½	3	2.5
1%甘油	60	+½	0.5	3
1%甘油	120	+1	3	2.5
1% 1,3-丙二醇	60	+0	3	2.5
1% 1,3-丙二醇	120	+1	3	2.5
无	60	+1	2.5	2.5
无	120	+1½	3	2.5

[0366] 注意：所有背景降低剂，除了封闭 PNA 以外，都表现出降低背景的效果。因此，针对重复 DNA 序列的特异性封闭是不需要的。

[0367] 实施例 17

[0368] 本实验比较了使用两种不同极性非质子溶剂的上相和下相的信号强度。

[0369] FISH 探针组合物 I :10%硫酸葡聚糖、300mM NaCl、5mM 磷酸缓冲液、40%三硫代碳酸亚乙酯 (ET) (E27750, Aldrich)、5 μ M 封闭 PNA、10ng/ μ L 德克萨斯红标记的 CCND1 基因 DNA 探针。

[0370] FISH 探针组合物 II :10%硫酸葡聚糖、300mM NaCl、5mM 磷酸缓冲液、40%亚硫酸乙二醇酯 (GS) (G7208, Aldrich)、5 μ M 封闭 PNA、10ng/ μ L 德克萨斯红标记的 CCND1 基因 DNA 探针。

[0371] 将 FISH 探针在 82℃ 孵育 5 分钟,然后在 45℃ 孵育 60 分钟。

[0372] 结果 :

[0373]

	信号强度	
	I (ET)	II (GS)
上相	1 ½	0
下相	0	3
上下相混合物	2 ½	3

[0374] 实施例 18.

[0375] 本实验检查了不同极性非质子溶剂形成单相体系的能力。

[0376] 所有组合物都含有 :20%硫酸葡聚糖、600mM NaCl、10mM 磷酸缓冲液、以及 10、15、20 或 25%的以下极性非质子溶剂之一 :

[0377] 环丁砜

[0378] γ -丁内酯

[0379] 三硫代碳酸亚乙酯

[0380] 亚硫酸乙二醇酯

[0381] 碳酸异丙二醇酯

[0382] 结果 :所检查的所有浓度的所有极性非质子溶剂在所用的组合物中都产生至少两相体系。然而,这并不排除这些化合物可在其它组合物条件下产生单相体系。

[0383] 实施例 19

[0384] 本实验检查了本发明组合物在多 FFPE 组织切片的显色原位杂交 (CISH) 分析中的用途。

[0385] FISH 探针组合物 I :4.5ng/ μ L TCRAD FITC 标记的基因 DNA 探针 (1/4 的标准浓度) (RP11-654A2、RP11-246A2、CTP-2355L21、RP11-158G6、RP11-780M2、RP11-481C14 ;大小 1018kb) ;15% EC ;20%硫酸葡聚糖 ;600mM NaCl ;10mM 柠檬酸缓冲液, pH 6.0。

[0386] FISH 探针组合物 II :4.5ng/ μ L TCRAD FITC 标记的基因 DNA 探针 (1/4 的标准浓度) (大小 1018kb) ;15% EC ;20%硫酸葡聚糖 ;600mMNaCl ;10mM 柠檬酸缓冲液, pH 6.0 ;0.1ug/uL 剪切鲑鱼精子 DNA。

[0387] FISH 探针组合物 III :300nM 各种单独的 FITC 标记的 PNACEN17 探针 (1/2 的标准浓度) ;15% EC ;20%硫酸葡聚糖 ;600mMNaCl ;10mM 柠檬酸缓冲液, pH 6.0。

[0388] 使用 Dako DuoCISH 方案 (SK108) 和用于分离探针的组合物分析所有样品,除了严

格性洗涤进行 20 分钟而不是 10 分钟,而且不用 DuoCISH 红色显色剂步骤之外。

[0389] 结果:

组合物	信号强度	
	FITC DNA	FITC PNA
I	3	-
II	3	-
III	-	3

[0391] 注意:信号强度非常强烈。因为高水平的背景,所以无法判断将鲑鱼精子 DNA 加入到组合物 II 中是否减低了背景。使用 10x 物镜观察例如扁桃体(其通常具有较少背景)信号清晰可见。如果组织具有高背景,使用 20x 物镜,信号清晰可见。

[0392] 实施例 20

[0393] 本实施例比较了经具有两种 DNA 探针的本发明组合物处理的 FFPE 组织切片的信号强度和背景。

[0394] FISH 探针组合物 I:9ng/ μ L IGH FITC 标记的基因 DNA 探针(RP11-151B17、RP11-112H5、RP11-101G24、RP11-12F16、RP11-47P23、CTP-3087C18;大小 612kb);6.4ng/ μ L MYC Tx Red 标记的 DNA 探针(CTD-2106F24、CTD-2151C21、CTD-2267H22;大小 418kb);15% EC;20%硫酸葡聚糖;600mM NaCl;10mM 柠檬酸缓冲液,pH 6.0。

[0395] FISH 探针组合物 II:9ng/ μ L IGH FITC 标记的基因 DNA 探针;6.4ng MYC TxRed 标记的 DNA 探针;15% EC、20%硫酸葡聚糖;600mM NaCl;10mM 柠檬酸缓冲液,pH 6.0;0.1ug/ μ L 剪切鲑鱼精子 DNA。

鲑鱼 DNA	信号强度		
	FITC 探针	德克萨斯红探针	背景
-	2 ½	2 ½	+2.5
+	3	3	+1.5

[0397] 注意:高背景可能是因为使用标准探针浓度这一事实。

[0398] 实施例 21

[0399] 本实验检查了本发明组合物在细胞学样品中的使用。

[0400] FISH 探针组合物:15% EC;20%硫酸葡聚糖;600mM NaCl;10mM 磷酸缓冲液;5ng/ μ L HER2 TxRed 标记的 DNA 探针(1/2 的标准浓度)和 1/2 标准浓度的 CEN7(25nM)。

[0401] 将 FISH 探针在中期染色体铺片上在 82℃ 孵育 5 分钟,然后在 45℃ 孵育 30 分钟,都不封闭。

[0402] 结果:

[0403]	信号强度		背景
	DNA 探针	PNA 探针	
	3	3	+1

[0404] 用本发明组合物没有观察到染色体显带 (R 显带模式), 与传统 ISH 溶液相反, 后者通常显示 R 显带。观察到间期核和中期染色体的低的均匀红色背景染色。

[0405] 实施例 22

[0406] 本实施例比较了来自 DNA 探针对细胞学样品、中期铺片的信号强度和背景, 有或无封闭。

[0407] FISH 探针组合物 I : 6ng/ μ L TCRAD 德克萨斯红标记的基因 DNA 探针 (标准浓度) (CTP-31666K20、CTP-2373N7 ; 大小 301kb) 和 4.5ng/ μ L FITC 标记的基因 DNA 探针 (1/4 的标准浓度) ; 15% EC、20% 硫酸葡聚糖 ; 600mM NaCl ; 10mM 柠檬酸缓冲液, pH 6.0。

[0408] FISH 探针组合物 II : 6ng/ μ L TCRAD 德克萨斯红标记的基因 DNA 探针 (标准浓度) (大小 301kb) 和 4.5ng/ μ L FITC 标记的基因 DNA 探针 (1/4 的标准浓度) ; 15% EC、20% 硫酸葡聚糖 ; 600mM NaCl ; 10mM 柠檬酸缓冲液, pH 6.0 ; 0.1 μ g/uL 剪切鲑鱼精子 DNA。

[0409] 将 FISH 探针在中期铺片上在 82°C 孵育 5 分钟, 然后在 45°C 孵育 60 分钟。

[0410] 结果 :

[0411]

封闭剂	背景	信号强度	
		Tx Red	FITC
无	+0	3	3
0.1 μ g/ μ l 鲑鱼 DNA	+0	3	3

[0412] 用本发明组合物又没有观察到染色体显带 (R 显带模式)。另外, 没有观察到间期核或中期染色体的背景染色。

[0413] 更多的实施方案

[0414] 实施方案 1. 一种杂交组合物, 所述组合物包含 : 至少一种核酸序列、足以变性双链核苷酸序列的有效量的至少一种极性非质子溶剂和杂交溶液, 其中所述极性非质子溶剂不是二甲基亚砜 (DMSO)。

[0415] 实施方案 2. 实施方案 1 的杂交组合物, 其中所述极性非质子溶剂浓度约为 1% 至 95% (v/v)。

[0416] 实施方案 3. 实施方案 1 或 2 的杂交组合物, 其中所述极性非质子溶剂浓度为 5% 至 10% (v/v)。

[0417] 实施方案 4. 实施方案 1 或 2 的杂交组合物, 其中所述极性非质子溶剂浓度为 10% 至 20% (v/v)。

[0418] 实施方案 5. 实施方案 1 或 2 的杂交组合物, 其中所述极性非质子溶剂浓度为 20% 至 30% (v/v)。

[0419] 实施方案 6. 实施方案 1-5 中任一项的杂交组合物, 其中所述极性非质子溶剂是无毒的。

[0420] 实施方案 7. 实施方案 1-6 中任一项的杂交组合物, 条件是所述组合物不含甲酰胺。

[0421] 实施方案 8. 实施方案 6 的杂交组合物, 条件是所述组合物含有小于 10% 甲酰胺。

[0422] 实施方案 9. 实施方案 8 的杂交组合物, 条件是所述组合物含有小于 2% 甲酰胺。

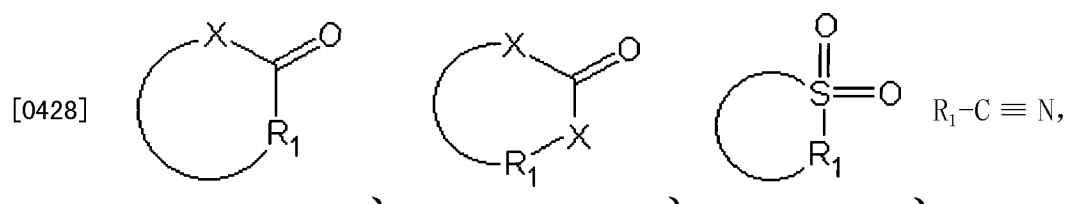
[0423] 实施方案 10. 实施方案 9 的杂交组合物, 条件是所述组合物含有小于 1% 甲酰胺。

[0424] 实施方案 11. 实施方案 1-10 中任一项的杂交组合物, 其中所述极性非质子溶剂具有内酯、砜、腈、亚硫酸和 / 或碳酸官能团。

[0425] 实施方案 12. 实施方案 1-11 中任一项的杂交组合物, 其中所述极性非质子溶剂的分散溶度参数介于 $17.7-22.0 \text{ MPa}^{1/2}$ 之间, 极性溶度参数介于 $13-23 \text{ MPa}^{1/2}$ 之间, 氢键溶度参数介于 $3-13 \text{ MPa}^{1/2}$ 之间。

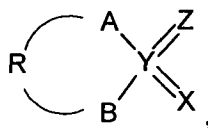
[0426] 实施方案 13. 实施方案 1-12 中任一项的杂交组合物, 其中所述极性非质子溶剂具有环状基本结构。

[0427] 实施方案 14. 实施方案 1-13 中任一项的杂交组合物, 其中所述极性非质子溶剂选自:



[0429] 其中 X 为 O, R1 为烷基二基, 和

[0430]



[0431] 其中 X 是任选的, 如果存在则选自 O 或 S,

[0432] 其中 Z 是任选的, 如果存在则选自 O 或 S,

[0433] 其中 A 和 B 独立地为 O 或 N 或 S 或烷基二基的一部分或伯胺,

[0434] 其中 R 为烷基二基, 和

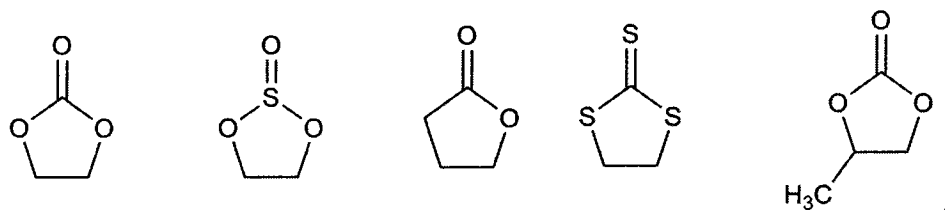
[0435] 其中 Y 为 O 或 S 或 C。

[0436] 实施方案 15. 实施方案 1-14 中任一项的杂交组合物, 其中所述极性非质子溶剂选自: 乙酰苯胺、乙腈、N-乙酰基吡咯烷酮、4-氨基吡啶、苯甲酰胺、苯并咪唑、1,2,3-苯并三唑、二氧化丁二烯、碳酸 2,3-丁二醇酯、 γ -丁内酯、己内酯 (ϵ)、氯马来酸酐、2-氯环己酮、碳酸氯代乙二醇酯、氯硝甲烷、柠康酸酐、巴豆酸内酯、5-氰基-2-噻尿嘧啶、环丙腈、硫酸二甲酯、二甲砜、1,3-二甲基-5-四唑、1,5-二甲基四唑、1,2-二硝基苯、2,4-二硝基甲苯、二苯砜、1,2-二硝基苯、2,4-二硝基甲苯、二苯砜、 ϵ -己内酰胺、乙磺酰氯、亚磷酸二乙酯、N-乙基四唑、碳酸亚乙酯、三硫代碳酸亚乙酯、硫酸乙二醇酯、亚硫酸乙二醇酯、糠醛、2-呋喃甲腈、2-咪唑、靛红、异噁唑、丙二腈、4-甲氧基苄腈、1-甲氧基-2-硝基苯、 α -溴代特窗酸甲酯、1-甲基咪唑、N-甲基咪唑、3-甲基异噁唑、N-甲基吗啉-N-氧化物、苯甲砜、N-甲基

吡咯烷酮、甲基环丁砜、4- 甲苯磺酸甲酯、3- 硝基苯胺、硝基苯并咪唑、2- 硝基呋喃、1- 亚硝基-2- 吡咯烷酮、2- 硝基噻吩、2- 噁唑烷酮、9,10- 菲醌、N- 苯基悉尼酮、邻苯二甲酸酐、皮考啉腈(2- 氰基吡啶)、1,3- 丙磺酸内酯、 β - 丙醇酸内酯、碳酸异丙二醇酯、4H- 吡喃-4- 硫酮、4H- 吡喃-4- 酮(γ - 吡喃酮)、哒嗪、2- 吡咯烷酮、糖精、琥珀腈、对氨基苯磺酰胺、环丁砜、2,2,6,6- 四氯环己酮、四氢噻喃氧化物、四氢噻吩砜(环丁砜)、噻唑、2- 硫尿嘧啶、3,3,3- 三氯丙烯、1,1,2- 三氯丙烯、1,2,3- 三氯丙烯、硫杂环丁烷- 二氧化物和硫杂环丁烷。

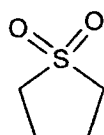
[0437] 实施方案 16. 实施方案 1-14 中任一项的杂交组合物, 其中所述极性非质子溶剂选自:

[0438]



[0439] 实施方案 17. 实施方案 1-14 中任一项的杂交组合物, 其中所述极性非质子溶剂是:

[0440]



[0441] 实施方案 18. 实施方案 1-17 中任一项的杂交组合物, 所述组合物还包含选自以下的至少一种额外组分: 缓冲剂、盐、促进剂、螯合剂、去垢剂和封闭剂。

[0442] 实施方案 19. 实施方案 18 的杂交组合物, 其中所述促进剂是硫酸葡聚糖, 所述盐是 NaCl 和 / 或磷酸缓冲液。

[0443] 实施方案 20. 实施方案 19 的杂交组合物, 其中硫酸葡聚糖浓度是 5% 至 40%, NaCl 浓度是 0mM 至 1200mM, 和 / 或所述磷酸缓冲液浓度是 0mM 至 50mM。

[0444] 实施方案 21. 实施方案 20 的杂交组合物, 其中硫酸葡聚糖浓度是 10% 至 30%, NaCl 浓度是 300mM 至 600mM, 和 / 或所述磷酸缓冲液浓度是 5mM 至 20mM。

[0445] 实施方案 22. 实施方案 18 的杂交组合物, 其中所述促进剂选自: 甲酰胺、甘油、丙二醇、1,2- 丙二醇、二甘醇、乙二醇、二醇和 1,3- 丙二醇, 所述缓冲剂是柠檬酸缓冲剂。

[0446] 实施方案 23. 实施方案 22 的杂交组合物, 其中所述甲酰胺浓度是 0.1-5%, 甘油、丙二醇、1,2- 丙二醇、二甘醇、乙二醇、二醇和 1,3- 丙二醇的浓度是 0.1% 至 10%, 所述柠檬酸缓冲剂浓度是 1mM 至 50mM。

[0447] 实施方案 24. 实施方案 18 的杂交组合物, 其中所述封闭剂选自: 人类总 DNA、鲑鱼精子 DNA、鲑鱼精子 DNA 和小牛胸腺 DNA。

[0448] 实施方案 25. 实施方案 24 的杂交组合物, 其中所述人类总 DNA、鲑鱼精子 DNA、鲑鱼精子 DNA 和小牛胸腺 DNA 的浓度是 0.01-10 μ g/ μ l。

[0449] 实施方案 26. 实施方案 1-25 中任一项的杂交组合物, 所述组合物包含 40% 的至少一种极性非质子溶剂、10% 硫酸葡聚糖、300mM NaCl 和 5mM 磷酸缓冲液。

[0450] 实施方案 27. 实施方案 1-25 中任一项的杂交组合物,所述组合物包含 15%的至少一种极性非质子溶剂、20%硫酸葡聚糖、600mMNaCl、10mM 磷酸缓冲液和 0.1 μ g/ μ l 人类总 DNA。

[0451] 实施方案 28. 实施方案 1-25 中任一项的杂交组合物,所述组合物包含 15%的至少一种极性非质子溶剂、20%硫酸葡聚糖、600mMNaCl、10mM 柠檬酸缓冲剂 pH 6.2 以及 0.1 μ g/ μ l 鲑鱼精子 DNA、或鲑鱼精子 DNA、或小牛胸腺 DNA、或 0.5%甲酰胺、或 1%乙二醇、或 1% 1,3- 丙二醇。

[0452] 实施方案 29. 实施方案 1-28 中任一项的杂交组合物,所述组合物在室温下包含不止一相。

[0453] 实施方案 30. 实施方案 29 的杂交组合物,所述组合物在室温下包含两相。

[0454] 实施方案 31. 实施方案 29 的杂交组合物,所述组合物在室温下包含三相。

[0455] 实施方案 32. 一种核酸序列的杂交方法,所述方法包括:

[0456] - 提供第一核酸序列,

[0457] - 提供第二核酸序列,

[0458] - 提供包含足以变性双链核苷酸序列的有效量的至少一种极性非质子溶剂的杂交组合物,和

[0459] - 将所述第一和第二核酸序列和所述杂交组合物混合在一起,其时间至少足以使所述第一和第二核酸序列杂交,

[0460] 其中所述极性非质子溶剂不是二甲基亚砜 (DMSO)。

[0461] 实施方案 33. 一种核酸序列的杂交方法,所述方法包括:

[0462] - 提供在原位生物样品中的第一核酸序列,和

[0463] - 将包含第二核酸序列和足以变性双链核苷酸序列的有效量的至少一种极性非质子溶剂的杂交组合物用于所述第一核酸序列,其时间至少足以使所述第一和第二核酸序列杂交,

[0464] 其中所述极性非质子溶剂不是二甲基亚砜 (DMSO)。

[0465] 实施方案 34. 一种核酸序列的杂交方法,所述方法包括:

[0466] - 提供第一核酸序列,

[0467] - 提供第二核酸序列,

[0468] - 提供实施方案 1-31 中任一项的杂交组合物,和

[0469] - 将所述第一和所述第二核酸序列与所述杂交组合物混合在一起,其时间至少足以使所述第一和第二核酸序列杂交。

[0470] 实施方案 35. 一种核酸序列的杂交方法,所述方法包括:

[0471] - 提供第一核酸序列,和

[0472] - 将实施方案 1-31 中任一项的杂交组合物用于所述第一核酸序列,其时间至少足以使所述第一和第二核酸序列杂交。

[0473] 实施方案 36. 实施方案 30 或 31 的方法,其中所述极性非质子溶剂按照实施方案 2-6 或 11-17 中的任一项定义。

[0474] 实施方案 37. 实施方案 30-36 中任一项的方法,其中提供足够量的能量使所述第一和第二核酸杂交。

- [0475] 实施方案 38. 实施方案 37 的方法,其中通过加热所述杂交组合物和核酸序列而提供能量。
- [0476] 实施方案 39. 实施方案 38 的方法,其中通过使用微波、热浴、加热板、加热线、珀耳帖元件、感应加热或加热灯来进行所述加热步骤。
- [0477] 实施方案 40. 实施方案 32-39 中任一项的方法,其中所述第一核酸序列是双链的,而所述第二核酸是单链的。
- [0478] 实施方案 41. 实施方案 32-40 中任一项的方法,其中所述变性和杂交步骤单独发生。
- [0479] 实施方案 42. 实施方案 32-41 中任一项的方法,其中所述杂交步骤包括加热和冷却所述杂交组合物和核酸序列的步骤。
- [0480] 实施方案 43. 实施方案 32-42 中任一项的方法,其中所述杂交步骤需要不到 8 小时。
- [0481] 实施方案 44. 实施方案 43 的方法,其中所述杂交步骤需要不到 1 小时。
- [0482] 实施方案 45. 实施方案 44 的方法,其中所述杂交步骤需要不到 30 分钟。
- [0483] 实施方案 46. 实施方案 45 的方法,其中所述杂交步骤需要不到 15 分钟。
- [0484] 实施方案 47. 实施方案 46 的方法,其中所述杂交步骤需要不到 5 分钟。
- [0485] 实施方案 48. 实施方案 32-47 中任一项的方法,其中所述冷却步骤需要不到 1 小时。
- [0486] 实施方案 49. 实施方案 48 的方法,其中所述冷却步骤需要不到 30 分钟。
- [0487] 实施方案 50. 实施方案 49 的方法,其中所述冷却步骤需要不到 15 分钟。
- [0488] 实施方案 51. 实施方案 50 的方法,其中所述冷却步骤需要不到 5 分钟。
- [0489] 实施方案 52. 实施方案 32-51 中任一项的方法,其中所述第一核酸序列在生物样品中。
- [0490] 实施方案 53. 实施方案 52 的方法,其中所述生物样品是细胞学或组织学样品。
- [0491] 实施方案 54. 实施方案 32-53 中任一项的方法,其中所述杂交组合物在室温下包含一相。
- [0492] 实施方案 55. 实施方案 32-53 中任一项的方法,其中所述杂交组合物在室温下包含多相。
- [0493] 实施方案 56. 实施方案 55 的方法,其中所述杂交组合物在室温下包含两相。
- [0494] 实施方案 57. 实施方案 55 或 56 的方法,其中所述杂交组合物的各相混合在一起。
- [0495] 实施方案 58. 实施方案 32-57 中任一项的方法,所述方法还包括封闭步骤。
- [0496] 实施方案 59. 杂交组合物在杂交测定中的用途,所述组合物包含 1-95% (v/v) 之间的至少一种极性非质子溶剂。
- [0497] 实施方案 60. 实施方案 59 的组合物的用途,其中所述杂交组合物是按照实施方案 1-31 中任一项。

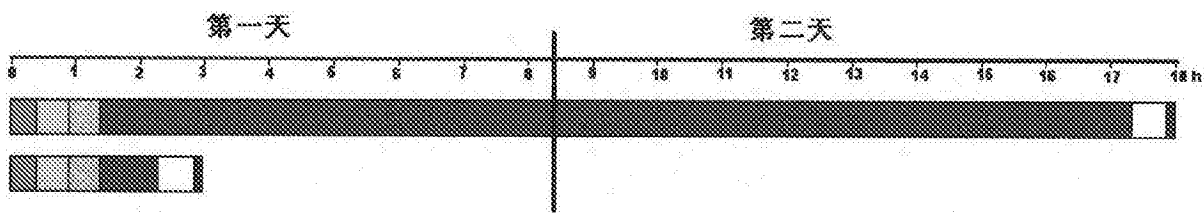


图 1

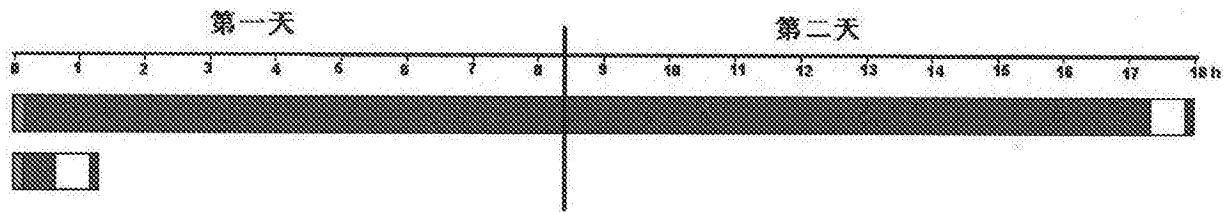


图 2