



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103189509 A

(43) 申请公布日 2013. 07. 03

(21) 申请号 201180053204. 6

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2011. 11. 04

C12N 15/09 (2006. 01)

C12Q 1/68 (2006. 01)

(30) 优先权数据

2010-252517 2010. 11. 11 JP

2011-201542 2011. 09. 15 JP

(85) PCT申请进入国家阶段日

2013. 05. 03

(86) PCT申请的申请数据

PCT/JP2011/006163 2011. 11. 04

(87) PCT申请的公布数据

W02012/063441 JA 2012. 05. 18

(71) 申请人 索尼公司

地址 日本东京

(72) 发明人 新田尚

(74) 专利代理机构 北京康信知识产权代理有限
责任公司 11240

代理人 余刚 吴孟秋

权利要求书1页 说明书26页

序列表6页 附图39页

(54) 发明名称

核酸的检测方法、样品的光学观察方法及荧光物质

(57) 摘要

一种简便地检测核酸的方法,不要求复杂的操作,例如在微观尺度流路内的液体的混合和清洗。提供了一种检测核酸的方法,包括以下步骤:使含核酸的样品与铜接触,并且检测从样品中发射的荧光。根据这种检测核酸的方法,仅通过将含核酸的样品与铜接触,就能简便地检测出源于核酸与铜的复合物的荧光。

1. 一种核酸的检测方法,包括以下步骤:
使含所述核酸的样品与铜接触,并且
检测从所述样品发射的荧光。
2. 根据权利要求1所述的检测方法,其中,
基于检测步骤中检测出的荧光的强度和 / 或光谱来分析所述核酸的碱基序列。
3. 根据权利要求1所述的检测方法,其中,
基于检测步骤中检测出的荧光的强度和 / 或光谱来分析形成所述核酸的双链中的错配。
4. 根据权利要求1所述的检测方法,包括以下步骤:
用硫酸氢盐处理所述样品,其中,
基于在检测步骤中从硫酸氢盐处理前的所述样品检测出的荧光的强度和 / 或光谱与从硫酸氢盐处理后的所述样品检测出的荧光的强度和 / 或光谱之间的差异来分析所述核酸中的胞嘧啶的甲基化或脱甲基化。
5. 根据权利要求2所述的检测方法,其中,
所述铜是固体铜。
6. 根据权利要求5所述的检测方法,其中,
接触步骤是在盐的共存下使所述样品与铜接触的步骤。
7. 根据权利要求6所述的检测方法,其中,
检测步骤是通过用 300 μm 至 420 μm 波长的光照射所述样品而检测从所述样品发射的荧光的步骤。
8. 一种含核酸的样品的光学观察方法,包括以下步骤:
使所述样品与铜接触,并且
检测从所述样品发射的荧光。
9. 根据权利要求8所述的光学观察方法,其中,
所述样品是细胞。
10. 一种荧光物质,其包含铜与核酸的复合物。

核酸的检测方法、样品的光学观察方法及荧光物质

技术领域

[0001] 本技术涉及核酸的检测方法、样品的光学观察方法及荧光物质。更具体地,本技术涉及核酸的检测方法和样品的光学观察方法,两种方法都是基于从与铜接触的核酸中发出的荧光,以及包括铜和核酸的荧光物质。

背景技术

[0002] 近年来,在包括医疗领域、药物研发领域、临床检查领域、食品领域、农业领域、工程领域、法医学领域和刑事鉴定领域的多个领域中广泛开展利用核酸的技术研究。最近,技术开发了芯片实验室(lab-on-chip),并且被实际应用于设置在微芯片中的微观尺度流路内进行核酸的染色、检测、扩增等。

[0003] 作为检测核酸的基本技术,有一种采用荧光染料染色核酸的方法。已知许多荧光染料,例如 hoechst33342、DAPI、溴化乙锭、SYBR 绿等。举例来说,hoechst33342 和 DAPI 在流式细胞仪或显微镜中用于细胞或组织中的核酸染色。溴化乙锭常常用于对电泳中的核酸分子染色。SYBR 绿等也被用于在例如聚合酶链反应的核酸扩增技术中,实时检测核酸的扩增过程。

[0004] 与本技术相关,通常已知的在荧光观察时由细胞显示的自发荧光将被描述。荧光之一是在铜存在的条件下,由紫外光照射的细胞所显示的橙色的自发荧光。例如,据报道当加入铜时,果蝇幼虫中肠内的特定部位的细胞发射橙色荧光(参照非专利文件 1 至 8)。在果蝇幼虫中肠内,观察到特别强烈橙色荧光的细胞被称之为“铜细胞”等。据报道,当所加入铜的浓度增加时,在铜细胞周围的细胞(参照非专利文件 4)以及幼虫的整个体壁(参照非专利文件 2)观察到荧光。

[0005] 描述了在细胞的细胞质和细胞核都可观察到上述的橙色荧光,并且,尤其是在细胞质的颗粒中被显著检测到(参照非专利文件 2~4,7)。描述了荧光的波长范围是 590nm~630nm 之间,峰值波长是 610nm,且最大激发波长是 340nm(参照非专利文件 3)。

[0006] 对于除果蝇外的有机体,具有相似性质的自发荧光也被观察到。例如,有报道在大鼠实验中,通过紫外光激发(激发波长是 310nm),在给铜的个体肝脏中观察到橙色荧光(具有 605nm 的峰值波长)(参照非专利文件 9)。此外,有报道在随着年龄增长在肾脏和肝脏中积累了铜的模型大鼠的肾脏中观察到类似的荧光(参照非专利文件 10)。同样,有报道在酵母(参照非专利文件 11)和 Wilson 病患者的人体肝脏组织(参照非专利文件 12)中观察到具有相似特征的自发荧光。Wilson 病是一种铜排泄不足并且在肝脏细胞中积累铜的遗传疾病。

[0007] 推测铜和金属硫因(MT)的复合物(在下文中简称为“Cu-MT”)为上述的发射橙色荧光的荧光物质(参照非专利文件 14~23)。Cu-MT 具有诸如非专利文件 13 中的 305nm 的激发波长和 565nm 的荧光波长,及非专利文件 17 中的 310nm 的激发波长和 570nm 的荧光波长的波长特性。可以想到的是,Cu-MT 包含一价铜离子(Cu(I))(参照非专利文件 13、15、17、19 和 23)。

[0008] 通过嘧啶或硫醇盐与铜相互作用而发射荧光的含嘧啶或硫醇盐的复合物作为含铜的荧光物质而广为人知(参照非专利文件 24 ~ 29)。

[0009] 另一方面,过去已研究了各种金属离子与核酸的相互作用。例如,已知当单价铜离子与核酸相互作用时,细胞核中包含的少量铜使核酸结构稳定,但是在过氧化氢共存下,细胞核中包含的少量铜使 DNA 受损(参照非专利文件 30)。还有报道,与铜的相互作用改变了 DNA 的吸收光谱(参照非专利文件 30 和 31)。此外,据报道,吸收光谱的改变依赖于 DNA 的碱基序列(具体地,具有 G-C 对的高分子及含 A-T 对的高分子)(参照非专利文件 30)。

[0010] 引文列表

[0011] 非专利文件

[0012] 非专利文件 1:Physiological genetic studies on copper metabolism in the genus *Drosophila*. (1950)*Genetics*35, 684-685

[0013] 非专利文件 2:Organization and function of the inorganic constituents of nuclei. (1952)*Exp. Cell Res., Suppl.* 2:161-179

[0014] 非专利文件 3:Ultrastructure of the copper-accumulating region of the *Drosophila* larval midgut. (1971)*Tissue Cell.* 3, 77-102

[0015] 非专利文件 4:Specification of a single cell type by a *Drosophila* homeotic gene. (1994)*Cell.* 76, 689-702

[0016] 非专利文件 5:Two different thresholds of wingless signalling with distinct developmental consequences in the *Drosophila* midgut. (1995)*EMBO J.* 14, 5016-5026

[0017] 非专利文件 6:Calcium-activated potassium channel gene expression in the midgut of *Drosophila*. (1997)*Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 118, 411-420

[0018] 非专利文件 7:Evidence that a copper-metallothionein complex is responsible for fluorescence in acid-secreting cells of the *Drosophila* stomach. (2001)*Cell Tissue Res.* 304, 383-389

[0019] 非专利文件 8:Peptidergic paracrine and endocrine cells in the midgut of the fruit fly maggot. (2009)*Cell Tissue Res.* 336, 309-323

[0020] 非专利文件 9:A luminescence probe for metallothionein in liver tissue: emission intensity measured directly from copper metallothionein induced in rat liver. (1989)*FEBS Lett.* 257, 283-286

[0021] 非专利文件 10:Direct visualization of copper-metallothionein in LEC rat kidneys: application of autofluorescence signal of copper-thiolate cluster. (1996)*J. Histochem. Cytochem.* 44, 865-873

[0022] 非专利文件 11:Incorporation of copper into the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Identification of Cu(I)--metallothionein in intact yeast cells. (1997)*J. Inorg. Biochem.* 66, 231-240

[0023] 非专利文件 12:Portmann B. Image of the month. Copper-metallothionein autofluorescence. (2009)*Hepatology.* 50, 1312-1313

[0024] 非专利文件 13:Luminescence properties of *Neurospora* copper

metallothionein. (1981)FEBS Lett. 127, 201-203

[0025] 非专利文件 14 :Copper transfer between Neurospora copper metallothionein and type3copper apoproteins. (1982)FEBS Lett. 142, 219-222

[0026] 非 专 利 文 件 15 :Spectroscopic studies on Neurospora copper metallothionein. (1983)Biochemistry. 22, 2043-2048

[0027] 非专利文件 16 :Metal substitution of Neurospora copper metallothionein. (1984)Biochemistry. 23, 3422-3427

[0028] 非 专 利 文 件 17 :(Cu,Zn)-metallothioneins from fetal bovine liver. Chemical and spectroscopic properties. (1985)J. Biol. Chem. 260, 10032-10038

[0029] 非专利文件 18 :Primary structure and spectroscopic studies of Neurospora copper metallothionein. (1986)Environ. Health Perspect. 65, 21-27

[0030] 非专利文件 19 :Characterization of the copper-thiolate cluster in yeast metallothionein and two truncated mutants. (1988)J. Biol. Chem. 263, 6688-6694

[0031] 非 专 利 文 件 20 :Luminescence emission from Neurospora copper metallothionein. Time-resolved studies. (1989)Biochem J. 260, 189-193

[0032] 非专利文件 21 :Establishment of the metal-to-cysteine connectivities in silver-substituted yeast metallothionein(1991)J. Am. Chem. Soc. 113, 9354-9358

[0033] 非专利文件 22 :Copper-and silver-substituted yeast metallothioneins : Sequential proton NMR assignments reflecting conformational heterogeneity at the C terminus. (1993)Biochemistry. 32, 6773-6787

[0034] 非 专 利 文 件 23 :Luminescence decay from copper(I)complexes of metallothionein. (1998)Inorg. Chim. Acta. 153, 115-118

[0035] 非专利文件 24 :Solution Luminescence of Metal Complexes. (1970)Appl. Spectrosc. 24, 319-326

[0036] 非 专 利 文 件 25 :Fluorescence of Cu,Au and Ag mercaptides. (1971)Photochem. Photobiol. 13, 279-281

[0037] 非专利文件 26 :Luminescence of the copper--carbon monoxide complex of Neurospora tyrosinase. (1980)FEBS Lett. 111, 232-234

[0038] 非专利文件 27 :Luminescence of carbon monoxide hemocyanins. (1980)Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 77, 2387-2389

[0039] 非专利文件 28 :Photophysical properties of hexanuclear copper(I)and silver(I)clusters. (1992)Inorg. Chem. , 31, 1941-1945

[0040] 非 专 利 文 件 29 :Photochemical and photophysical properties of tetranuclear and hexanuclear clusters of metals with d10and s2electronic configurations. (1993)Acc. Chem. Res. 26, 220-226

[0041] 非专利文件 30 :Interaction of copper(I)with nucleic acids. (1990)Int. J. Radiat. Biol. 58, 215-234

[0042] 非专利文件 31 :Copper(I)-Catalyzed Regioselective "Ligation" of Azides and Terminal Alkynes. (2002)Ang. Chem. Int. Ed. 41, 2596-2599

发明内容

[0043] 本发明要解决的问题

[0044] 当采用前述现有的荧光试剂对核酸染色时,要求将液态试剂与样品混合,从而操作变得复杂。尤其是,用于在微观尺度流路内进行核酸染色和检测的芯片实验室中,芯片的生产、储存及使用变得非常复杂。

[0045] 本技术的一个主要目的是提供一种简便地检测核酸的方法,无需复杂的操作,例如在微观尺度流路内混合液体和清洗。

[0046] 解决问题的手段

[0047] 为了解决上述问题,本技术提供一种检测核酸的方法,包括步骤:使含核酸的样品与铜接触,并且检测从样品发射的荧光。根据这种检测核酸的方法,仅仅通过使含核酸的样品与铜接触,就能简便检测出源于核酸与铜的复合物的荧光。此外,基于检测到的荧光强度和/或荧光光谱,可提供关于样品中所含核酸的浓度、分布或形状的信息。

[0048] 尤其是,源于核酸与铜的复合物的荧光强度和/或荧光光谱依赖于核酸的碱基序列和长度,以及在双链核酸中错配存在与否而改变。因此,这种检测核酸的方法可基于在检测步骤中检测到的荧光强度和/或荧光光谱来分析核酸的碱基序列和核酸的双链中的错配。

[0049] 另外,尿嘧啶中的源于核酸与铜的复合物的荧光比胞嘧啶中的高。因此,借助这种核酸检测方法,通过硫酸氢盐处理,使样品中包含的非甲基化的胞嘧啶选择性地转化为尿嘧啶,并且确定在检测步骤中检测到的荧光的强度和/或光谱的变化量,由此分析在核酸中胞嘧啶的甲基化或脱甲基化存在与否及其量,在碱基序列中甲基化胞嘧啶或脱甲基化胞嘧啶的位置等。

[0050] 在该核酸的检测方法中,铜可以是固体的。

[0051] 在改核酸的检测方法中,接触步骤优选在盐的共存下,通过使含核酸的样品与铜接触而实施。而且,接触步骤优选通过用波长为 $300\ \mu\text{m} \sim 420\ \mu\text{m}$ 的光照射样品以检测从样品中发射的荧光而实施。

[0052] 本发明技术提供一种样品的光学观察方法,包括以下步骤:使含核酸的样品与铜接触,并且检测从样品发射的荧光。

[0053] 在光学观察方法中,样品可以是细胞。在这种情况下,可提供关于细胞的细胞核的分布、位置、数量、大小、形状等信息。

[0054] 此外,本技术提供包括含铜和核酸的复合物的荧光物质。通过适当改变复合物中的核酸的碱基序列和长度,可提供各种具有不同光谱或强度的荧光物质。

[0055] 根据本技术,“核酸”包括天然核酸(DNA 和 RNA)。“核酸”广泛包括由人为改变天然核酸中核糖的化学结构或磷酸二酯键(phosphodiester linkage)的化学结构而提供的人工合成的核酸。人工合成核酸的非限制性实施例包括肽核酸(RNA)、硫代磷酸酯型低聚核苷酸(S-oligos)、桥接核酸(BNA)、锁核酸(LNA)等。

[0056] 发明效果

[0057] 本技术提供一种核酸的简便检测方法,无需诸如在微观尺度流路内混合液体和清洗的复杂操作。

附图说明

[0058] [图 1] 各个曲线图代替附图并示出在 S. A. 浓度为 50mM 的条件下通过使 ssDNA 与不同浓度的 CuSO₄ 相接触而获得的荧光光谱和 RFU 值。(A) 示出了荧光光谱,(B) 示出了 RFU 峰值(实施例 1)。

[0059] [图 2] 各个曲线图代替附图并示出在 S. A. 浓度为 50mM 的条件下通过使 ssDNA 与不同浓度的 CuSO₄ 相接触而获得的荧光光谱和 RFU 值。(A) 示出了荧光光谱,(B) 示出了 RFU 峰值(实施例 1)。

[0060] [图 3] 各个曲线图代替附图并示出在 S. A. 浓度为 4mM 的条件下通过使低聚 DNA 与浓度为 0.4mM 的 CuSO₄ 相接触而获得的荧光光谱和 RFU 值(实施例 1)。

[0061] [图 4] 各个曲线图代替附图并示出在 S. A. 浓度为 4mM 的条件下通过使低聚 DNA 与浓度为 0.4mM 的 CuSO₄ 相接触而获得的荧光光谱和 RFU 值(实施例 1)。

[0062] [图 5] 各个曲线图代替附图并示出在 CuSO₄ 浓度为 0.4mM 和 S. A. 浓度为 4mM 的条件下在低聚 DNA (oligo-DNA) T (20)、T (6) 和 T (3) 获得的荧光光谱和吸收光谱随时间的变化(实施例 1)。上面的各个图示出了以 RFU 值(绝对值)为纵坐标的荧光光谱,中间各个图示出了以 RFU 值(相对值)为纵坐标的荧光光谱,并且下面的各个图示出了吸收光谱。

[0063] [图 6] 各个曲线图代替附图并示出在 CuSO₄ 浓度 0.4mM 和 S. A. 浓度为 4mM 的条件下在低聚 DNA T (20)、T (6) 和 T (3) 获得的荧光光谱和吸收光谱随时间的变化(实施例 1)。(A) 示出了 RFU 峰值随时间的变化,(B) 示出了波长为 346nm 时随时间的变化。

[0064] [图 7] 各个曲线图代替附图并示出在低聚 DNA T (20)、T (6) 和 T (3) 获得的二维荧光光谱。

[0065] [图 8] 曲线图代替附图并示出在低聚 DNA T (20)、T (6) 和 T (3) 获得的激发光谱(虚线)和荧光光谱(实线)(实施例 1)。

[0066] [图 9] 各个曲线图代替附图并示出在包括腺嘌呤和胸腺嘧啶组成的三个碱基长度序列的低聚 DNA 获得的荧光光谱。

[0067] [图 10] 各个曲线图代替附图并示出在包括腺嘌呤和胸腺嘧啶组成的三个碱基长度序列的低聚 DNA 获得的荧光光谱的最高 RFU 值(A) 及最大 FRU 波长(B) (实施例 1)。

[0068] [图 11] 各个曲线图代替附图并示出从包括序列号为 SEQ ID NO :19 和 20 的低聚 DNA 中获得的荧光光谱(实施例 1)。

[0069] [图 12] 曲线图代替附图并示出通过使含 ssDNA 的样品与固体铜接触而获得的荧光光谱(实施例 2)。

[0070] [图 13] 曲线图代替附图并示出通过使含 ssDNA 的样品与具有不同浓度的固态铜接触而获得的荧光光谱(实施例 2)。

[0071] [图 14] 各个曲线图代替附图并示出通过使含 ssDNA 的样品与含不同类型或浓度的盐的反应溶液接触而获得的荧光光谱(实施例 2)。

[0072] [图 15] 各个曲线图代替附图并示出通过使含不同浓度的 ssDNA (A) 或 RNA (B) 的样品与固体铜接触而获得的荧光光谱(实施例 2)。

[0073] [图 16] 各个曲线图代替附图并示出通过使含具有不同序列的低聚 DNA 的样品与

固体铜接触而获得的荧光光谱(实施例 2)。

[0074] [图 17] 各个曲线图代替附图并示出通过使含具有不同序列的低聚 DNA 的样品与固体铜接触而获得的荧光光谱(实施例 2)。

[0075] [图 18] 各个曲线图代替附图并示出通过使含具有不同序列的低聚 DNA 的样品与固体铜接触而获得的激发-荧光光谱(实施例 2)。

[0076] [图 19] 曲线图代替附图并示出在具有 8- 碱基胞嘧啶和 12- 碱基胸腺嘧啶的组合序列的低聚 DNA 获得的荧光光谱(实施例 2)。

[0077] [图 20] 各个曲线图代替附图并示出在含错配的双链 DNA 获得的荧光光谱(实施例 2)。

[0078] [图 21] 各个曲线图代替附图并示出通过改变反应溶液的缓冲液类型和 pH 值而获得的 RFU 值(实施例 2)。

[0079] [图 22] 各个照片代表附图并示出使溅射在玻璃表面上的铜与 ssDNA 接触而获得的荧光图像(实施例 3)。

[0080] [图 23] 各个照片代表附图并示出使溅射在玻璃表面上的铜与 RNA 接触而获得的荧光图像(实施例 3)。

[0081] [图 24] 曲线图代替附图并示出使溅射在玻璃表面上的铜或银与包括 DNA 或 RNA 的样品接触而获得的荧光强度(实施例 3)。

[0082] [图 25] 曲线图代替附图并示出使溅射在玻璃表面上的铜与 ssDNA 接触而获得的荧光强度随时间的变化(实施例 3)。

[0083] [图 26] 曲线图代替附图并示出使溅射在玻璃表面上的铜与 ssDNA 接触后,当温度变化时,荧光强度的变化(实施例 3)。

[0084] [图 27] 各个照片代表附图并示出在溅射有铜的玻璃上的洋葱薄皮的荧光观察结果(实施例 4)。

[0085] [图 28] 各个照片代表附图并示出在溅射有铜的玻璃上的人类白细胞样品的荧光观察结果(实施例 4)。

[0086] [图 29] 各个照片代表附图并示出在溅射有铜的玻璃上的 Jurkat 细胞的荧光观察结果(实施例 4)。

[0087] [图 30] 各个照片代表附图并示出在溅射有铜的玻璃上的 Jurkat 细胞的荧光观察结果(实施例 4)。

[0088] [图 31] 各个曲线图代替附图并示出在具有不同浓度 T (20)的低聚 DNA 获得的荧光光谱(实施例 5)。

[0089] [图 32] 各个曲线图代替附图并示出在具有不同浓度 T (10)的低聚 DNA 获得的荧光光谱(实施例 5)。

[0090] [图 33] 各个曲线图代替附图并示出在具有不同浓度 T (6)的低聚 DNA 获得的荧光光谱(实施例 5)。

[0091] [图 34] 各个曲线图代替附图并示出在具有不同浓度 T (5)的低聚 DNA 获得的荧光光谱(实施例 5)。

[0092] [图 35] 各个曲线图代替附图并示出在具有不同浓度 T (4)的低聚 DNA 获得的荧光光谱(实施例 5)。

[0093] [图 36] 各个曲线图代替附图并示出在具有不同浓度 T (3) 的低聚 DNA 获得的荧光光谱(实施方式 5)。

[0094] [图 37] 各个曲线图代替附图并示出在具有不同浓度 T (2) 的低聚 DNA 获得的荧光光谱(实施例 5)。

[0095] [图 38] 各个曲线图代替附图并示出在包含不同胸腺嘧啶碱基数的低聚 DNA 获得的荧光光谱(实施例 5)。

[0096] [图 39] 各个曲线图代替附图并示出包含不同胸腺嘧啶碱基数的低聚 DNA 的浓度与荧光强度的最高值之间的相互关系(实施例 5)。

[0097] [图 40] 各个曲线图代替附图并示出在具有包括 T 和 C 的碱基序列的低聚 DNA 获得的荧光光谱(实施例 6)。

[0098] [图 41] 各个曲线图代替附图并示出在具有包括 T 和 C 的碱基序列的低聚 DNA 获得的荧光光谱(实施例 6)。

[0099] [图 42] 曲线图代替附图并示出在具有 T (10) 的低聚 DNA 以及具有用淬灭剂改性的 T (10) 的低聚 DNA 的荧光光谱(实施例 7)。

[0100] [图 43] 各个曲线图代替附图并示出在具有 T (10) 和 U (9)G 的低聚 DNA 获得的荧光光谱(实施例 8)。

[0101] [图 44] 曲线图代替附图并示出在具有 T (10)、C (10) 和 C (4) MeC (6) 的低聚 DNA 获得的荧光光谱(实施例 8)。

[0102] [图 45] 曲线图代替附图并示出在具有 T (10)、A (10) 和 I (9)G 的低聚 DNA 获得的荧光光谱(实施例 8)。

具体实施方式

[0103] 下文中,将参照附图对根据本技术的实施例进行描述。以下描述的实施方式只是用于示例性说明,而且仅描述本技术的典型实施方式,而不应解释为限制本技术的范围。实施方式将按下列顺序描述。

[0104] <A> 核酸的检测方法

[0105] 1、接触步骤

[0106] (1) 铜(Cu)

[0107] (2) 样品

[0108] (3) 反应溶液

[0109] (4) 接触条件

[0110] 2、检测步骤

[0111] (1) 光线照射

[0112] (2) 荧光检测

[0113] (3) 荧光光谱的检测

[0114] (4) 荧光空间分布的检测

[0115] 3、碱基序列分析

[0116] 4、应用

[0117] (1) 检测微细基因序列的差异

[0118] (2) 分析 DNA 分子的甲基化

[0119] (3) 细胞核的观察和测量

[0120] (4) 微细颗粒分析

[0121] (5) 应用至芯片实验室

[0122] 荧光颜料

[0123] <A> 核酸的检测方法

[0124] 发明者最新发现了核酸(DNA 或 RNA)与铜的复合物发射荧光,如以下实施例中详细描述。还发现荧光光谱和荧光强度取决于核酸的碱基序列和长度而改变,并且荧光光谱和荧光强度取决于在双链核酸中错配存在与否而改变。本技术由此新发现而获得。如上所述,以往公认的是 DNA 的吸收光谱通过与铜的相互作用而改变,并且吸收光谱的改变取决于 DNA 的碱基序列。然而,过去不知道核酸与铜的复合物发射荧光。由复合物发射的荧光具有与上述的由 Cu-MT 发射的荧光相似的波长特征,但是是在采用纯化的合成低聚核苷酸、不含金属硫因(metallothionein)的反应体系中观察到的,这与由 Cu-MT 所发射的荧光是完全不同的。在下文中,将对按照本技术的核酸检测方法、其应用及依照本技术的荧光物质进行具体说明。

[0125] 根据本技术的核酸检测方法包括以下步骤:使含核酸的样品与铜接触,并且检测由样品发射的荧光。在根据本技术的核酸检测方法中,根据目的,基于检测步骤中检测到的荧光强度和/或光谱,可分析核酸的碱基序列,并且可分析形成核酸的双链中的错配。

[0126] 1、接触步骤

[0127] 在接触步骤中,将含核酸的样品与铜相接触。

[0128] (1) 铜(Cu)

[0129] 在此步骤中使用的铜的形态最好是含铜的溶液或含铜的固体物质。在要求操作简便的情况下,优选使用固体物质。在检测放置在微芯片中的微观尺度流路内的核酸时,固体物质的使用可让铜并入微芯片中,从而更好地形成简化的芯片结构。而且,与溶液相比,固体物质具有对震动、冲击、热、光、时间等稳定的形状或性能。另一方面,当需要缩短反应时间时,溶液可能更适合。铜的形态可依据目的而恰当地选择。

[0130] 当使用铜溶液时,溶液优选包含足量的铜(I)离子。通常,二价的铜阳离子是稳定的,一价的铜阳离子不如二价铜阳离子稳定。基于这个原因,优选将能使铜(II)离子还原为铜(I)离子的还原剂与以 CuSO_4 溶液为例的含二价铜阳离子的溶液混合。抗坏血酸钠可用作还原剂。

[0131] 为溶液中供应足量铜(I)离子另一方法是用放射线照射含铜(II)离子的溶液,以产生铜(I)离子(参照非专利文件 30)。或者,期望在无氧条件下,将例如 CuI 、 $\text{CuOTf} \cdot \text{C}_6\text{H}_6$ 和 $[\text{Cu}(\text{NCCH}_3)_4][\text{PF}_6]$ 的盐溶解于含乙腈和含氮碱(nitrogen base)的等价物(2,6-二甲基吡啶、三乙胺、二异丙基乙胺、吡啶等)的溶液中来提供铜(I)离子溶液(参照非专利文件 31)。

[0132] 当使用固态铜(固体铜)时,除纯铜外,还可使用含铜合金。铜的形状的非限制性实例包括粉末、细颗粒、棒、丝、板和箔。还可以在将引入样品的微芯片的基板或容器的表面(内表面)上形成含铜的薄膜。

[0133] 优选的是固体铜具有一定形状并被放置为使得在如稍后所述的检测步骤中检测

到的光不被阻断,不被反射等。例如,固体铜可放置在基板或容器内或特定区域。固体铜可足够薄以透过足量的检测用光。可以配置为固体铜与样品接触的位置与测量从样品发射的荧光的位置分开,并且还提供能将样品在两个位置之间运送的样品运送装置。在此,测量从样品发射的荧光的位置是指通过用光线照射样品而测量样品发射的荧光的位置。

[0134] 与样品接触的铜的量没有特别限定,只要在检测步骤中能从样品检测到荧光即可。当使用固体铜时,含铜的固体物质的量依据样品与固体物质接触的面积、该面积相对样品体积的比例、保持样品的容器的形状、固体物质中所含铜的浓度、除了铜之外的污染物的类型或量等而适当地设定。例如,当使用实施例中所使用的铜粉时,铜粉的量优选每毫升样品 37.5mg 或更多。同样,例如,当固体铜薄膜在基板或容器的表面(内表面)上形成,并且样品被保持在夹在两玻璃板之间、深度大约为 20 微米的空间内时(参见实施例),至少在空间表面溅射厚度为 20nm 以上的铜。

[0135] (2) 样品

[0136] 作为含核酸的样品,可以使用能够含有诸如 DNA 和 RNA 的核酸的任何样品。例如,可以是核酸提取液、含核酸化合物的溶液、诸如 PCR 的核酸扩增反应的反应产物、电泳样品等。此外,不只是核酸溶液样品,还有细胞本身、包括细胞的组织切片等都可以作为样品使用。

[0137] (3) 反应溶液

[0138] 样品优选与铜在含盐的反应溶液中接触。只要不丧失本技术的优点,盐的类型没有特别的限制,可自由选择使用已知的盐。例如,可自由选择使用氯化钠(NaCl)、氯化钾(KCl)、氯化镁($MgCl_2$) 等中的一种或多种盐(参见实施例)。

[0139] 盐的浓度没有特别的限制,只要不丧失本技术的优点,可自由设定。优选地,盐的浓度设定为 0.025M 或更高(参见实施例)。

[0140] 优选地,反应溶液不含使铜(II) 离子稳定的螯合剂(例如 EDTA、Tris 等) 等成分。

[0141] (4) 接触条件

[0142] 样品与铜的接触时间没有特别的限制,可取决于所使用的样品或铜的形态而自由地设定。例如,当使用液体样品和铜粉时,他们被搅拌充分,因而可减少接触时间。当使用具有含铜的固体物质的薄膜的基板或容器时,通过改变基板或容器的结构来提高样品与铜的接触面积,从而减少接触时间。此外,当样品与铜接触时,反应溶液和含氧空气的接触面积和接触时间优选限定为尽可能小或短。

[0143] 2、检测步骤

[0144] 在检测步骤中,检测从接触步骤之后的样品发射的荧光。

[0145] (1) 光照射

[0146] 在含核酸的样品与铜接触后,只要可检测到从样品发射的荧光,对于为了检测来自样品的荧光而照射到样品的光(激发光) 没有特别的限制。

[0147] 例如,汞灯、卤素灯、氙灯、激光、LED、日光等可作为激发光的光源使用。还可以在光源和样品之间放置波长选择装置,用于选择理想波长。在这种情况下,波长选择装置包括滤光器、棱镜、光栅镜等。或者,只要从样品发射的荧光可被检测到,从相邻分子的诸如 FRET 和 BRET 的能量转移可用光照射取代。

[0148] 为从样品中有效产生荧光,激发光包括优选具有约为 300 $\mu m \sim 420 \mu m$ 波长的光,

更优选具有约为 $330\text{ }\mu\text{m} \sim 380\text{ }\mu\text{m}$ 波长的光。此外,在激发光中,优选波长约为 $420\text{ }\mu\text{m}$ 的光的强度足够低,并且更优选波长约为 500nm 以上的光的强度足够低,以使其不妨碍荧光的检测。

[0149] 优选地,激发光的强度要足够高以检测从样品发射的荧光。优选检测用光的强度根据以下因素适当设置:照射光的波长范围;要检测的核酸的大小、碱基序列、高级结构(higher order structure)、数量及浓度;要获取的信号数量;要检测的光的波长范围;检测器的灵敏度、类型及构造等。为调节激发光的强度,可适当调节例如光源类型、从光源发出的光的强度、棱镜等聚光装置的构造、波长选择装置的类型和构造、包括 ND 滤波器及光圈等光强度调节装置的照射光用光学系统的构造、照射用光的密度、照射范围和照射时间。

[0150] 光纤和镜子等光传播装置可放置在激发光的光源和样品之间。在光照射过程中使用的保持样品的容器没有特别的限制,但优选具有能透过足量的照射光和要检测的荧光的材料和结构。

[0151] (2) 荧光的检测

[0152] 从样品中发射的荧光可由任何非限制性的装置检测,例如过去公知的手段。作为检测手段,可使用例如光检测器、光电二极管、光电倍增器、CCD 摄像机及 CMOS 摄像机等用于将光信号转换为电信号的元件。或者,作为检测手段,可以采用拍摄为胶卷或用肉眼的观察。可以通过对与样品相邻的荧光分子诱发 FRET 等的能量转移,并接收从荧光分子发射的荧光来间接地检测从样品发射的荧光。

[0153] 为了高效检测从样品发射的荧光,优选将棱镜等集光装置放置在样品和检测手段之间。例如光纤和镜子等光传输装置可放置在样品和检测手段之间。

[0154] 可以在与光照射处于同一侧或不同侧的样品上检测荧光。尤其是,当在与光照射的同一侧检测荧光时,以不同方向放置镜面等光反射装置,从而提高从样品发射的荧光的收集效率。即使当在光照射的不同侧检测荧光时,也可以放置具有不阻碍光检测的构造的光反射装置,或可放置例如以下光反射装置:可透过具有照射波长的光且反射要检测的光的、具有波长选择性的双色镜。

[0155] 当检测从样品发射的荧光时,可能有要检测的光之外的光,包括照射到样品的光的散射光、来自样品或保持样品的容器的自发荧光、及来自外界的漏光。在这种情况下,优选在样品和光检测手段之间放置光选择装置,以使要检测的光之外的光不能到达检测手段。

[0156] 光选择装置的实例包括滤光器、棱镜、光栅镜等。而且,可预先处理引入样品的基板和容器的外表面或内表面中的荧光检测时光透过的区域,从而只透过期望波长的光,而对光照射没有任何影响。

[0157] 基于如下文所述的实施例中的结果,优选光选择装置能够只检测波长约为 420nm 以上的荧光,更优选只检测波长约为 500nm 以上的荧光。此外,为了将自发荧光的影响减到尽可能最小,如必要,只检测波长约为 600nm 以上的光。在根据本技术的检测核酸方法中,对于约 360nm 的紫外光激发波长,提供具有约 600nm 中心波长等的相对长的波长并且具有长的行程偏移(stroke shift)的荧光。因此,根据本技术的核酸检测方法具有散射光或其他物质发射的自发荧光对目标荧光的检测影响较小的优势。

[0158] 作为另一光选择手段,利用荧光寿命随分子不同而不同的性能,适当设定在光照

射之后检测荧光的时间,尽可能排除要检测的光之外的光,并且检测必需的荧光。

[0159] (3) 荧光光谱检测

[0160] 采用在光照射和荧光检测中适用于光谱测量的装置,测定从样品发射的荧光光谱(激发光谱或发射光谱)。

[0161] 利用如滤光器、棱镜、光栅镜等光选择装置,通过在空间上或时间上改变照射到样品的光的波长以测量要检测的荧光强度的空间或时间变化,可测量激发光谱。通过在空间上或时间上改变照射到样品的光的波长,以及通过将光引入到检测手段中,以测量要检测的荧光强度的空间或时间变化,可测量发射(荧光)光谱。通过将二者结合,可被测量激发光谱和发射光谱两者。

[0162] 用于在空间上改变照射到样品的光或从样品发射的荧光的波长的波长选择装置的具体实例有棱镜和光栅镜等根据波长来改变光传播方向的光学器件。

[0163] 用于在时间上改变照射到样品的光或从样品发射的荧光的波长的波长选择装置的具体实例包括:更换不同类型的滤光器,以及通过能控制透过光的波长的滤光器改变透过光的波长。或者,可放置棱镜和光栅镜等根据波长改变光传播方向的光学器件,以及能只选择透过光学器件的光中的沿特定方向传播的光的方向选择装置。光学器件和/或光的方向选择装置的位置或构造可以随时间控制及改变。这些装置可以是电控的,以随时间改变例如使用计算机自动选择的光的波长。光的方向选择装置可通过将如狭缝、透镜、镜子和光纤的光学器件适当地组合来配置。

[0164] 利用波长选择装置,通过时间上改变光的波长的激发光谱和/或发射光谱的检测方法,优选包括:运用计算机控制由波长选择装置选择的光的波长;利用光探测器等的能将光信号转换为电信号的装置作为光检测手段,将测量结果读入计算机;并且相互关联地记录照射光的波长和测量出的荧光强度。

[0165] 在利用波长选择装置通过空间上改变光的波长而检测激发光谱和/或发射光谱的方法中,作为光检测手段,接收光的元件以一维阵列排列,或将接收光的元件(如 CCD 和 CMOS)布置在一个平面上。

[0166] (4) 荧光空间分布的检测

[0167] 为获得关于样品中所含的核酸的空间分布和形状的信息,一次性地提供空间信息的一种方式可以是,对核酸扩散到一定程度的区域同时进行光的照射和荧光检测。或者,提供空间信息的另一种方式可以是随时间改变检测的位点,并依次扫描核酸在一定程度上扩散的区域的内部。

[0168] 在前一种情况下,优选利用光照射整个检测区域,并且更优选照射整个区域的光的强度是均匀的。作为光检测手段,可以利用胶卷或肉眼观察。而且,可使用包括二维布置的用于将光信号转化为电信号的光接收元件的光检测手段,例如 CCD 摄像机和 CMOS 摄像机。

[0169] 后一种情况的一个实例是使用激光进行照射,利用电流镜等随时间改变激光的照射位置,检测从激光的照射位置发射的荧光,并从将激光的照射位置与检测出的荧光强度关联的数据中获得荧光的空间分布。在这种情况下,优选通过利用电流镜控制光照射位置、由计算机记录光照射位置、并在计算机内构建将检测出的荧光强度与当时的光照射位置关联的数据,从而自动分析荧光强度的空间分布。

[0170] 获得关于空间分布的信息的另一方式是采用线性地光照射的光源和包括一维放

置的光接收元件(如线性传感器)的光检测手段来测量荧光的一维分布,并顺序地移动其位置。或者,通过使用诸如 CCD 摄像机和 CMOS 摄像机的能一次性地获得荧光强度的空间分布的光接收元件并且顺序地移动要观察的空间区域,能获得更宽区域的荧光强度的空间分布。在这些情况下,还期望适当地使用计算机来控制检测区域并记录荧光检测结果,并基于这些信息自动分析荧光强度的空间分布。

[0171] 3、碱基序列分析

[0172] 接下来,将描述基于在检测步骤中检测的荧光的信息分析核酸的碱基序列以及形成核酸的双链中的错配的方法。

[0173] 关于荧光的信息的具体例子包括荧光强度和 / 或光谱(激发光谱或发射光谱)、荧光寿命、荧光的空间分布和时间变化。这些信息可被转化为数字,记录在计算机上或在计算机上运算以供分析。

[0174] 在检测方法中获得的荧光强度取决于反应条件、光学系统和核酸的浓度、类型、大小、高级结构和碱基序列(参见实施例)。尤其是,当反应条件、整个光学系统、核酸的类型、大小、高级结构和碱基序列不变时,关于核酸的浓度的信息可通过荧光强度的测量结果提供。在这种情况下,分析方法包括以下步骤:提供关于要检测的核酸的已知浓度和荧光强度之间的关系的信息、测量期望的两个或更多浓度的核酸的荧光强度、建立校正曲线、将由检测提供的荧光强度应用到浓度与强度之间的关系中,并计算核酸的浓度。这一方法也可通过提前记录核酸浓度与荧光强度之间的关系,并在计算机上从荧光强度计算出核酸浓度而自动执行。

[0175] 此外,特别地,只要浓度、反应条件和高级结构不变,在检测步骤中获得的光谱和荧光强度取决于核酸的碱基序列和高级结构(参见实施例)。“高级结构”在这里是指核酸的单链结构或双链结构,并涉及由杂交引起的双链形成或无双链形成及其位点,以及在双链中的错配或无错配及其位点。这些特性可用于由荧光光谱和强度的测试结果提供关于核酸的碱基序列和高级结构的信息。更具体地,当已知样品中包含的核酸的序列和高级结构为已知的有限数目的候选中的任意一个,可通过提前测量每一个候选的荧光光谱和强度,并与测量结果比较而估计出荧光检测的样品中包含的核酸的序列和高级结构。比较两个或更多的光谱的方法包括计算特征值,例如最大激发波长和荧光强度、在两个或更多波长区域中的荧光强度的比率,并比较它们。此外,可计算出用于比较的两个光谱之间的差异,以量化相似度。或者,当只通过关注其形状来比较光谱时,可通过校正所测光谱的最大强度为相同值(uniform value)来进行比较。此外,荧光强度乘以变量并利用最小二乘法,在两个光谱之间的差异为最小处的变量值以及在该点的两个光谱之间的差异的大小可被量化。通过提前在计算机上记录核酸的序列和高级结构与光谱和荧光强度之间的关系,并从所测量的光谱和荧光强度的信息在计算机上估计核酸的序列和高级结构,这些操作可自动进行。

[0176] 当对在检测步骤中获得的荧光的空间分布和时间变化进行分析时,该空间可被肉眼检查、观察该空间的特征、并定性分类。或者,荧光图像可被输入到计算机中,并可通过图像处理进行定量分析。作为图像处理的实例之一,例如通过二进制编码处理来提取发射荧光的区域,并可以计算出数值,如荧光强度在此区域的面积、轮廓线长度、圆形度、中心或重心位置、总和、平均值、均值、中值、分散性和标准偏差。或者,图案匹配(pattern matching)、学习算法等可应用于具有特定形状的区域的认识或应用于形状归类。

[0177] 4、应用

[0178] 通过将上述的接触步骤和荧光步骤在必要时与碱基序列分析相结合,根据本技术的核酸检测方法可应用于各种领域中。在下文中,将描述根据本技术的核酸检测方法的应用。

[0179] (1) 检测微细的基因序列的差异

[0180] 根据本技术,通过测量荧光光谱和 / 或强度,可以提供关于样品中所含的核酸的碱基序列的信息。然而,当样品包含多种核酸时,检测到的荧光光谱和 / 或强度被平均,有微细的基因序列之间的差异不能被识别的可能性。因此,在必要时,优选如下文所述的将限定要检测的核酸的范围的多种方法进行组合。

[0181] 微细基因序列之间的差异的实施例包括单核苷酸多态性(SNPs)。已知分析核酸的碱基序列对于疾病诊断是非常有用的。众所周知,通过分析 SNPs 可评估包括心脏病在内的各种疾病的风险。

[0182] 限定待检测核酸的范围的一种方法的第一个实例包括从样品中所含的核酸中仅取出含待分析序列的部分的方法。具体地,这种方法包括采用固定在基板或珠子上的探针 DNA 进行的杂交、电泳、采用核酸扩增技术用于放大待分析序列的 PCR 等。此外,限制酶反应和连接反应可与这些方法相结合。

[0183] 第二个实例包括仅从样品中所含的核酸的特定碱基中选择性获得信号的方法。具体地,利用了在本技术中发现的现象,即在不含互补链的胸腺嘧啶(T)序列中检测到非常强的荧光。在此方法中,预先准备了与在样品所含的核酸中待检测突变的位点被排除的序列杂交以形成双链核酸的一个或多个探针核酸。探针核酸与要检测基因序列中的突变的核酸杂交以提供样品。在探针核酸中,当产生突变时,例如序列中要分析的腺嘌呤(A)被其他碱基取代时,T 将被置于与该位点对应的探针的序列中。这样,当此位点的碱基被 A 以外的任何碱基取代,T 的错配即产生,由此测量到强的荧光。或者,当产生突变时,例如序列中要分析的 T 被其他碱基取代时,A 之外的碱基将被置于与该位置对应的探针的序列中。这样,当没有突变时,从没有形成双链的 T 处测量到强的荧光。

[0184] 探针核酸可由 DNA、RNA、肽核酸(PNA)、硫代磷酸酯(phosphorothioate)型低聚核酸、BNA(LNA)等构成。

[0185] 第三个实例包括在检测步骤中限定要照射光或要检测荧光的物理区域的方法。例如,近场光如瞬逝光被用于照射样品,即光只照射在特别限定的特定区域。这种方法可与在特定位置保持或移动的核酸的手段(means, 装置)相结合。借助在特定位置保持或移动核酸的手段,核酸被固定在固体表面,通过如纳米孔这样的非常微细的流路,或在酶等蛋白质中移动。

[0186] 能量转移,如 FRET 和 BRET,可用作限定要照射光线或要检测荧光的物理区域的其他方法。在光照射下,用于诱发 FRET 和 BRET 的分子被布置于毗邻待检测区域,自该分子的能量转移被用于局部光照射。在荧光检测中,用于通过从样品中吸收荧光能量而诱发 FRET 的荧光分子被布置于毗邻待检测区域,检测出从荧光分子中产生的荧光以用于局部荧光检测。

[0187] (2) DNA 分子的甲基化分析

[0188] 已知在 DNA 分子中的胞嘧啶(C)在细胞内的基因组中被甲基化。胞嘧啶(C)的甲

基化存在与否可通过判定胞嘧啶(C)是否被尿嘧啶(U)取代而发现。换句话说,当用硫酸氢盐在适当条件下处理核酸时,只有未甲基化的胞嘧啶(C)可被选择性地转化为尿嘧啶(U)。因此,当检测到尿嘧啶(U)时,可检测出非甲基化胞嘧啶的存在。

[0189] 在尿嘧啶和胸腺嘧啶中,来自核酸与铜的复合物的荧光很强,但在胞嘧啶和甲基化胞嘧啶中检测不到(参照实施例)。因此,通过硫酸氢盐处理,将样品中包含的非甲基化胞嘧啶选择性地转化为尿嘧啶,并且确定样品中检测到的荧光强度和/或光谱的变化量,由此分析在核酸中胞嘧啶的甲基化或脱甲基化的存在与否以及其量。通过组合使用上述“微细基因序列的差异检测”中说明的方法,在核酸的碱基序列中甲基化胞嘧啶或脱甲基化胞嘧啶的位置等可被详尽地分析。

[0190] 甲基化分析可按以下步骤进行:首先,按照以往公知的技术,用硫酸氢盐处理含核酸的样品。然后,从硫酸氢盐处理前的样品和硫酸氢盐处理后的样品检测荧光的强度和/或光谱。之后,比较从硫酸氢盐处理前的样品和硫酸氢盐处理后的样品中检测出的荧光的强度和/或光谱。非甲基化胞嘧啶的量越多,由硫酸氢盐处理而产生的尿嘧啶的量就越多。通过比较硫酸氢盐处理前后的样品的荧光,可提供关于在核酸中的胞嘧啶的甲基化或脱甲基化存在与否及其量的信息。

[0191] 当样品中包含的核酸的碱基序列中包含大量的胸腺嘧啶时,胸腺嘧啶的荧光就变成噪声,来自尿嘧啶的荧光的信号/噪声比可能会减小。此外,通过硫酸氢盐处理而转化为尿嘧啶的多个非甲基化胞嘧啶可能存在于核酸的碱基序列。在这种情况下,通过下列方法相结合,可有效分析在特定区域的核酸的碱基序列的甲基化。

[0192] 首先,将在硫酸氢盐处理后的样品中包含的核酸在要分析甲基化的区域扩增或浓缩。具体地,使用PCR等核酸扩增发和利用核酸杂交反应的核酸浓缩法。

[0193] 其次,抑制从要分析甲基化的c区域之外的其他区域产生的荧光。来自核酸和铜的复合物的荧光在单链DNA内的胸腺嘧啶中有很高的强度,而在双链DNA内的胸腺嘧啶中被显著抑制(参照实施例)。因此,将具有分析以外区域的互补碱基序列的掩模(mask)用核酸链杂交,抑制来自分析以外的区域中的胸腺嘧啶的荧光,由此可以有效检测来自待分析区域的荧光。或者,猝灭剂可用于抑制从分析以外的区域产生的荧光。通过将猝灭剂放置于邻近复合物的位置,来自核酸与铜的复合物的荧光可被抑制(参照实施例)。因此,通过将猝灭剂放置在分析以外的区域,能够以高效率检测来自待分析区域的荧光。

[0194] 第三,只有待分析甲基化的区域被选择性地激发,或只有来自此区域的荧光被选择性地检测。具体地,可激发核酸与铜的复合物以产生荧光的施主探针被布置于与待分析区域相邻,并且通过FRET、BRET等的能量转移被用于仅选择性激发待分析区域。这样,只有来自待分析区域的荧光可被检测。或者,通过来自核酸与铜的复合物的荧光的能量转移而激发、并且发射具有不同波长的荧光的受体探针可被布置于与待分析区域相邻,而通过检测由受体探针发出的荧光,可检测来自待分析区域的荧光。如上所述的方法可以以任何组合应用。

[0195] (3) 细胞核的观察和测量

[0196] 根据本技术,核酸的检测方法可应用于包含有核细胞的样品,以检测核酸的空间分布。分析其分布和形状以提供关于在组织切片或细胞中的细胞核的分布、位置、数量、大小、形状等信息。

[0197] 可从这些信息计算出有核细胞的数量。样品被引入的容器的内部形状被适当设计,以在恒定面积中保持恒定体积的样品,这可用于测量样品中包含的有核细胞的浓度。此外,当同时测定细胞核的形状与数量时,可识别或计数包括不同形状的细胞核的多个类型的细胞。例如,已知白细胞有根据颗粒状白细胞、单核细胞和淋巴细胞而不同的核形状。根据本技术的核酸检测方法可用于识别或计数白细胞的种类。

[0198] 作为导致疟疾的寄生虫的已知疟原虫的类型,已知热带疟原虫、间日疟原虫、瘧疾疟原虫、卵形疟原虫等。此外,作为阶段,已知环状体(ring form)、营养体、裂殖体、配子母细胞。为了能适当地设计感染患者的治疗方案,适当识别这些类型是非常重要的。尽管有检测基因或抗原的简便方法,但是为了识别疟原虫的类型,通常,原则上通过姬姆萨染色来观察核的形状。然而,在此方法中,存在的问题是当染色不充分时,可能导致诊断失误。与此相反,一旦根据本技术的核酸检测方法被应用于疟原虫类型的识别,不再需要常规染色剂。因此,疟疾等可通过简单染色而不需清洗的更简便、可靠的方法诊断。

[0199] (4) 微细颗粒的分析

[0200] 当检测包含或固定在微细颗粒(例如包含在液体样品中的细胞或珠子)中的核酸时,颗粒可以是静止的,或在微流路中流动。例如,将液体样品连同鞘流一起引入流动池(flow cell)中,并被鞘流夹在中间以形成层流。由流过流动池的颗粒产生的荧光可被检测。流动池可具有任意作为流式细胞仪技术而被广泛研究、开发及实际应用的构造。

[0201] (5) 芯片实验室中的应用

[0202] 根据本技术的核酸检测方法可被结合到芯片实验室,用于处理或检测微流路芯片等容器中的样品。在这种情况下,根据使用目的,为了方便,预处理样品步骤被引入并组合在容器内。

[0203] 用于核酸的检测和序列分析的样品预处理步骤包括例如提取、分离和扩增核酸。更具体的实例包括利用电泳、凝胶过滤柱或吸收柱的分离、通过 PCR 反应的扩增等。这些手段可通过已知技术结合到微芯片中。

[0204] 或者,作为用于观测、检测和分析包含在细胞中的核的样品预处理步骤,可选择或浓缩特定细胞。作为选择或浓缩特定细胞的步骤,可利用取决于细胞种类的不同特性(例如大小、比重、韧性、对特定物质如抗体的结合力等。作为实例,对要观察的细胞或不要被观察的细胞有特异性结合的抗体被固定在容器的内表面或珠子上。通过利用对抗体的结合或不结合,可选择或浓缩细胞。此外,准备固定有抗体的磁性物质的微细颗粒。利用磁性,可以只选择吸附有磁性物质的细胞或没有吸附磁性物质的细胞。此外,使样品处于适当变化的渗透压、酸或碱中,借此可只将红细胞破坏并去除,以只选择白细胞。作为另一实例,例如,当观察人类血液中的疟原虫时,以往已知的是在被疟原虫感染的红细胞中形成被称为“疟原虫色素”的磁性物质。该红细胞可借助磁性被分离或浓缩。将这种方法与根据本技术的核酸检测方法相结合,可以简便、可靠地观察疟原虫。

[0205] 荧光染料

[0206] 接下来,将具体描述根据本技术的荧光物质。

[0207] 为了利用荧光显微镜、流式细胞仪、基因扩增反应、基因测序反应、定量测定包括蛋白质的生物分子、测定包括蛋白质的生物分子之间的结合能力观察和分析细胞、组织、生物分子,应用具有各种颜色的发射荧光的染料,如荧光素和藻红蛋白。荧光染料被用作工

具, 以提供关于颜料所结合的生物分子的局域化的信息, 以及提供关于通过抗体或核酸探针(例如, 通过将颜料结合在抗体或核酸探针上) 识别的感兴趣的分子的位置和量的信息。当准备具有不同颜色的若干颜料时, 可分析更多的感兴趣的分子。

[0208] 应用根据上文所述技术的核酸检测方法技术, 可生成具有多种光谱的荧光物质。换句话说, 核酸与铜的复合物根据核酸的碱基序列和长度而发射具有不同光谱或强度的荧光。通过利用核酸与铜的复合物的特性, 复合物可被用作发射多种光谱的荧光物质, 例如, 可被用作标记抗体的荧光颜料。

[0209] 本技术可具有以下配置:

[0210] (1) 一种包括以下步骤的核酸检测方法:

[0211] 使含核酸的样品与铜接触, 且

[0212] 检测从样品发射的荧光。

[0213] (2) 根据上述(1)的检测方法, 其中,

[0214] 基于在检测步骤中检测到的荧光的强度和 / 或光谱来分析核酸的碱基序列。

[0215] (3) 根据上述(1)的检测方法, 其中

[0216] 基于在检测步骤中检测到的荧光的强度和 / 或光谱, 分析形成核酸的双链中的错配。

[0217] (4) 根据上述(1)的检测方法, 包括以下步骤:

[0218] 用硫酸氢盐处理样品, 其中

[0219] 基于在检测步骤中, 从硫酸氢盐处理前的样品检测到的荧光的强度和 / 或光谱与从硫酸氢盐处理后的样品检测到的荧光的强度和 / 或光谱之间的差异(difference, 差), 分析核酸中的胞嘧啶的甲基化。

[0220] (5) 根据上述(1)至(4)中的任一检测方法, 其中铜是固体铜。

[0221] (6) 根据上述(1)至(5)中的任一检测方法, 其中接触步骤是在盐的共存下, 使样品与铜接触的步骤。

[0222] (7) 根据上述(1)至(6)中的任一检测方法, 其中

[0223] 检测步骤是检测通过用波长为 300 μm 至 420 μm 的光照射样品而从样品中发射的荧光的步骤。

[0224] 实施例 1

[0225] 实施例 1 示出当核酸与含用抗坏血酸还原 Cu (II) 离子而产生的 Cu (I) 离子的溶液混合后, 在特定条件下, 通过紫外光照射发射出橙色的荧光。

[0226] < 材料和方法 >

[0227] Cu : CuSO₄ 溶液和 (+) -L- 抗坏血酸钠(在下文中简称为“S.A.”) 是从 Sigma-Aldrich 公司购买的。

[0228] 核酸: 使用从 BioDynamics laboratory Inc. (东京, 日本) 购买的超声处理的鲑鱼精子 DNA (Sonicated Salmon Sperm DNA) (在下文中简称为“ssDNA”)。此外, 从 Invitrogen Corporation 购买的 Custom Oligo 被用作低聚 -DNA。

[0229] 缓冲液: 从 DOJINDO Laboratories (熊本, 日本) 购买的 HEPPSO 依照由厂商提供的指南调节 pH 到 8.5 后使用。

[0230] 荧光光度计: 使用 NanoDrop3300 (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham,

MA, USA) 或 F-4500 型荧光分光光度计 (Hitachi High-Technologies Corporation)。在 NanoDrop3300 中, 使用紫外 LED 光源来提供激发光。测量由激发光激发的荧光光谱。采用配套软件, 获得了荧光强度变为最大值的波长对应的相对荧光单位数 (RFU), 作为峰值 RFU 值。在 F-4500 型荧光分光光度计中, 使用了由 Helix Biomedical Accessories, Inc. 生产的石英毛细管和专用适配体细胞 (dedicated adapter cell)。除非下文另有说明, 否则使用的是 NanoDrop3300。

[0231] 分光光度计: NanoDrop1000 分光光度计被用于测定吸收光谱。

[0232] 样品准备和荧光测定: 50mM 的 HEPPSO 缓冲液与氯化钠 (250mM)、 CuSO_4 (0mM ~ 4mM)、S. A. (4, 50mM)、ssDNA (1mg/ml) 或低聚 DNA (50, 250, 500 μM) 混合以提供 20 μl 样品。已知 S. A. 具有将溶液中的 CuSO_4 所产生的 $\text{Cu}(\text{II})$ 离子还原为 $\text{Cu}(\text{I})$ 的作用 (参照非专利文件 31)。

[0233] < 结果 >

[0234] 图 1 和图 2 各自示出在 S. A. 浓度为 50mM 的条件下, 通过改变 CuSO_4 的浓度而获得的荧光光谱和 RFU 值; (A) 示出了荧光光谱, (B) 示出了峰值 RFU 值 (peak RFU value)。

[0235] 图 3 和图 4 各自示出在 CuSO_4 浓度为 0. 4mM 和 S. A. 浓度为 4mM 的条件下, 获得的荧光光谱。具有 20、10、6 和 3 的碱基长度的低聚 DNA 的浓度分别为 50 μM 、50 μM 、250 μM 和 500 μM 。图 3 示出具有序列编号 (SEQ ID NO): 1 ~ 6 中所描述的碱基序列的低聚 DNA 的结果。横轴表示波长, (A) 中的纵轴表示每一波长对应的 RFU 值, (B) 中的纵轴表示用最大 RFU 值除各个波长下的 RFU 值而得到的值。图 4 示出了具有序列编号 2 中描述的碱基序列的低聚 DNA (在下文中描述为 T (20)) 的结果 (A), 具有序列编号 10 中描述的碱基序列的低聚 DNA (在下文中描述为 T (6)) 的结果 (B), 具有序列编号: 12 中描述的碱基序列的低聚 DNA (在下文中描述为 T (3)) 的结果 (C), 具有序列编号 11 中描述的碱基序列的低聚 DNA (在下文中描述为 T (3)) 的结果 (D)。各自的横轴表示波长, 各自的纵轴表示各个波长下的 RFU 值。

[0236] 如图所示, 荧光光谱图的图案 (pattern, 模式) (峰值波长和强度) 取决于核酸的碱基序列而改变。

[0237] 接下来是, 在 CuSO_4 浓度 0. 4mM 和 S. A. 浓度为 4mM 的条件下, 测量在低聚 DNA T (20)、T (6) 和 T (3) 获得的荧光光谱和吸收光谱随时间的变化。在紧接第一次测量荧光光谱和吸收光谱之前, 加入 S. A. 。在 8、14、24 和 35 分钟后, 测量荧光光谱和吸收光谱。结果示于图 5 和图 6 中。在图 5 中, 上面的图各自示出纵轴为 RFU 值 (绝对值) 的荧光光谱, 中间的图各自示出纵轴为 RFU 值 (相对值) 的荧光光谱, 下面的图各自示出吸收光谱。图 6 示出峰值 RFU 值随时间的变化 (A), 并且示出波长为 346nm 时随时间的变化 (B)。

[0238] 如图所示, 在所有低聚 DNA T (20)、T (6) 和 T (3) 中, 30 分钟之后, 荧光几乎消失。尤其是, 在碱基长度短的低聚 DNA 中, 荧光迅速消失。35 分钟以后, 测试荧光光谱。此后立即再加入 1. 8 μl 浓度为 44mM 的 S. A. 溶液到样品中以进行测量。能再次检测出荧光。由此, 荧光的消失可认为是由于 $\text{Cu}(\text{I})$ 离子氧化为 $\text{Cu}(\text{II})$ 离子。在低聚 DNA T (6) 和 T (3) 各自的荧光光谱中, 随着峰值强度的减小, 在短波长侧观察到新的峰。

[0239] 另一方面, 在各低聚 DNA 各自的吸收光谱中, 观察到峰值强度随时间的降低。与荧光光谱相比, 吸收光谱更缓慢地降低。

[0240] 图 7 (A)至图 7 (C)示出由 F-4500 型荧光分光光度计检测的从低聚 DNA T (20)、T (6)和 T (3)获得的二维荧光光谱。图 8 示出在各低聚 DNA 获得的激发光谱(虚线)和荧光光谱(实线)。该光谱图是以 1nm 的荧光波长间隔及 2nm 的激发波长间隔测量的。

[0241] 如图所示,证实了荧光光谱的图案取决于低聚 DNA 的碱基长度而改变。也证实了激发光谱的图案取决于碱基长度而改变。

[0242] 为进一步考察碱基序列与光谱之间的关系,测量了各自具有由序列编号 11 和 18 描述的腺嘌呤(A)和胸腺嘧啶(T)组合获得的三碱基长度序列的低聚 DNA 的荧光。结果示于图 9 和图 10 中。在图 9 中,(A)的纵轴表示由 Nanodrop 测试的各波长下的 RFU 值,(B)的纵轴表示用最大 RFU 值除各波长下的 RFU 值而得到的值。图 10 示出 RFU 的最大值和峰值波长的三次测量的平均值和标准误差。

[0243] 如图所示,证实了荧光强度和峰值波长取决于低聚 DNA 的碱基序列而改变。

[0244] 图 11 示出在包括序列编号 19 和 20 描述的序列的低聚 DNA 获得的测试结果。证实了尽管在具有序列编号 20 描述的序列的低聚 DNA 中的荧光强度弱,但是具有含尿嘧啶(U)的序列编号 20 描述的序列的低聚 DNA 发射的荧光与含胸腺嘧啶(T)的具有序列编号 19 描述的序列的低聚 DNA 发射的荧光具有相似的光谱形状和峰位置。

[0245] < 讨论 >

[0246] 本实施例显示,当 DNA 与其中混有 CuSO_4 和 S. A. 的含氯化钠的 HEPPSO 缓冲溶液混合时,通过紫外光照射观察到波长大约为 500nm ~ 700nm 的橙色荧光。证实了荧光强度取决于 CuSO_4 的浓度,且荧光强度和光谱都受核酸的碱基序列影响。

[0247] 在至少包含胸腺嘧啶(T)、腺嘌呤(A)或尿嘧啶(U)的低聚 DNA 中观察到荧光。在使用各具有包含胸腺嘧啶(T)和腺嘌呤(A)的三个碱基长度的低聚 DNA 的试验中,在任何序列中都观察到荧光。此外,还显示荧光强度和光谱不仅受胸腺嘧啶(T)或腺嘌呤(A)的量影响,还受在低聚 DNA 上的位置(序列顺序)的影响。

[0248] 在加入 S. A. 后,随时间的延长,荧光强度随时间而减小,但是由于 S. A. 的再加入而恢复。同时, Cu (I) 离子在氧气的存在下非常不稳定,且一旦失去了 S. A. 的还原作用, Cu (I) 就转变为 Cu (II) 或固体铜。由此,认为荧光是源于 Cu (I) 离子与核酸的复合物。为了通过铜与核酸之间的相互作用检测荧光,期望把反应溶液与空气中的氧的接触减至最低。

[0249] 实施例 2

[0250] 实施例 2 示出当含核酸的溶液与固体铜接触时,在一定条件下,通过紫外光照射发射出与实施例 1 中观察到的荧光相似的橙色荧光。

[0251] < 材料和方法 >

[0252] 铜粉(铜,粉末, $-75\ \mu\text{m}$, 99.9%/Cat.No. 030-18352/ 由 Wako Pure Chemical Industries, Ltd. 生产,大阪,日本)被用作与核酸接触的铜。

[0253] 作为 RNA,使用大鼠脑总 RNA (Rat Brain Total RNA) (Cat.No. 636622, Takara Bio Inc., 大阪,日本),将其溶解于经 DEPC 处理的水(Cat. No. 312-90201/Wako 纯化学工业有限公司,日本)。

[0254] PIPES、ACES、BES、TAPSO、HEPPSO、EPPS、TAPS、CAPS、TES、三(羟甲基)甲基甘氨酸(Tricine)和 OPSO 是从 DOJINDO Laboratories (熊本,日本)购买的。其中的每个依照

由厂商提供的指南调节 pH 值后使用。其他试剂与实施例 1 中的一样。

[0255] 通过将各种核酸、盐和铜粉混合入总量为 40 毫升的溶液中,并搅拌 15 分钟,从而使核酸与铜接触。除非另有说明,否则铜粉的加入量为每毫升溶液 375mg。除非另有说明,否则盐或氯化钠(NaCl)的量是 500mM。

[0256] 在将样品离心以使铜粉沉降之后,测量上层清液的荧光光谱和强度。荧光光谱和强度的测量采用与实施例 1 中相似的步骤实施。

[0257] < 结果 >

[0258] 对加入了 1.5mg/ml 的 ssDNA 的反应溶液测 3 次荧光。结果示于图 12 中(横轴:波长,纵轴:RFU)。如图所示,当含核酸的样品与固体铜接触、然后用紫外光激发时,可检测到在大约 600nm 处具有峰的荧光。

[0259] 接下来,通过基于 1mL 的反应溶液加入数量分别为 375mg、250mg、125mg、62.5mg、37.5mg、12.5mg 和 0mg 的铜粉来配制反应溶液。将 1.5mg/ml 的 ssDNA 加入反应溶液中。测 3 次荧光。结果示于图 13 中。如图所示,荧光强度取决于铜粉的量。在本实施例中所使用的铜粉中,当含量为 37.5mg/ml 或更多时,可观察到明显的荧光。另一方面,当含量为 12.5mg/ml 或更少时,观察不到明显的荧光。

[0260] 然后,改变反应溶液中盐的类型和浓度。将 1.5mg/ml 的 ssDNA 加入到反应溶液中。比较测得的荧光强度。结果示于图 14 中。(A)示出在加入 0.5M、0.25M、0.1M、0.05M、0.025M 和 0M 氯化钠(NaCl)的反应溶液中测得的荧光强度。(B)示出在加入 0.45M 氯化钠(NaCl)、0.45M 氯化钾(KCl)、0.45M 氯化镁(MgCl₂)和 45% 乙醇(EtOH)的反应溶液中测得的荧光强度。荧光强度用 604nm 处的 RFU 表示,测 3 次。结果以平均值和标准误差来示出。如图所示,荧光强度取决于氯化钠的量。另外,在氯化钾和氯化镁以及氯化钠共存下检测出荧光。

[0261] 图 15 示出当加入到反应溶液中的核酸浓度改变时,测得的荧光强度的比较结果。(A)示出在加入 5mg/ml、2.5mg/ml、1mg/ml、0.5mg/ml、0.25mg/ml、0.1mg/ml、0.05mg/ml 和 0mg/ml 的 ssDNA 的反应溶液中测得的荧光强度。(B)示出在加入 2.5mg/ml、0.25mg/ml 和 0mg/ml 的 RNA 的反应溶液中测得的荧光强度。横轴表示核酸的浓度,纵轴表示在荧光波长为 604nm 处的 RFU。测试进行 3 次。氯化钠(NaCl)的浓度是 0.25M,铜粉的量是 200mg/ml。除非另有说明,否则在下面的实验中使用该条件。如图所示,荧光强度取决于 DNA 的浓度和 RNA 的浓度。

[0262] 接下来,测量加入了 0.1mM 具有序列编号:1、2、5、6 和 9 描述的不同序列的低聚 DNA 的反应溶液的荧光。结果示于图 16 中。(A)图的纵轴表示由 Nanodrop 测得的 RFU 值,(B)图的纵轴表示当峰高被设定为 1 时的相对 RFU 值。如图所示,荧光强度和峰值波长受碱基序列影响。尤其是,可证实当胸腺嘧啶(T)的百分比高时,荧光强度也高,且峰值波长变得更长。

[0263] 还采用 F-4500 型荧光分光光度计测试了具有序列编号:1、2、5 和 6 描述的序列的低聚 DNA 的反应溶液。图 17 示出当用 360nm 的激发光(狭缝宽度为 10nm)照射时,在 400nm~700nm 内的荧光光谱(狭缝宽度为 2.5nm)的结果。再次证实,在含胸腺嘧啶(T)和腺嘌呤(A)的序列中,当胸腺嘧啶(T)的百分比高时,荧光强度也高,且峰值波长变得更长。图 18 示出通过扫描 330nm~390nm(狭缝宽度为 3nm)及 400nm~700nm(狭缝宽度为 2.5nm)的激发光来测量激发-荧光光谱的结果。(A)示出三维图,而(B)示出等高线。EX 轴表示激

发波长(nm),EM轴表示荧光波长(nm),高度方向表示荧光强度。基于这些结果,可了解到激发和荧光光谱及强度由于DNA的不同碱基序列而改变。

[0264] 为了进一步考察碱基序列和光谱之间的关系,测量了各具有序列编号21和26描述的8个碱基的胞嘧啶(C)和12个碱基的胸腺嘧啶(T)的组合序列的低聚DNA的荧光。结果示于图19中。如图所示,当序列不同时,即使DNA的碱基组成是相同的,荧光强度也不同。

[0265] 接下来,测量了包括错配的双链DNA的荧光光谱的图案。作为双链DNA,使用以下三种类型:各具有序列编号1所示的序列的低聚DNA与各具有序列编号2所示的序列的低聚DNA的混合物((e)+(f)),各具有序列编号5所示的序列的低聚DNA与各具有序列编号2所示的序列的低聚DNA的混合物((d)+(f)),各具有序列编号1所示的序列的低聚DNA与各具有序列编号6所示的序列的低聚DNA的混合物((e)+(c))。任何低聚DNA都以0.5mg/ml的最终浓度混合。结果示于图20中。(A)的纵轴表示由Nanodrop测得的RFU值,(B)的纵轴表示当峰高被设定为1时的相对RFU值。横轴表示波长(nm)。如图所示,双链DNA中的荧光强度比单链DNA中的低。然而,在具有胸腺嘧啶(T)的错配的双链DNA中,证实有强的荧光。

[0266] 比较了当缓冲液类型和反应溶液中的pH值改变时测得的荧光强度。结果示于图21中。(A)示出含ssDNA的样品(+)和不含核酸的样品(-)在各个缓冲条件下的峰值RFU值的相对值。(B)示出在相同条件下,含具有有序列编号1所示的序列的低聚DNA的样品的峰值RFU值的相对值。(C)示出在相同条件下,含具有有序列编号2所示的序列的低聚DNA的样品的峰值RFU值的相对值。各缓冲液的浓度是50mM,ssDNA的最终浓度是0.5mg/ml,低聚DNA的最终浓度是25mM。峰值RFU值的相对值是指将在无缓冲的条件下测得的峰值RFU值设定为1。荧光强度取决于缓冲液的类型。当在缓冲液中无核酸存在时几乎不能检测到荧光。

[0267] <讨论>

[0268] 基于本实施例中的结果,表明当核酸与固体铜粉接触时,在包括含盐浓度的适当条件下,与核酸与Cu(I)离子接触的情况一样,可检测到荧光。似乎在铜离子和固体铜的各种情况中观察到的荧光是以相同的机理提供的,因为它们的特性,如波长特性和序列依赖性,几乎是相同的。另外,当RNA被用作核酸时,也观察到荧光。此外,在双链DNA中,尤其是在胸腺嘧啶(T)中存在错配时,观察到强的荧光。这表明,与互补序列的结合可能抑制由核酸与铜结合导致的荧光物质的生成。另外,认为在错配位点的荧光强度的增加可应用于检测在核酸的碱基序列中的变异的方法。

[0269] 在用于比较各种缓冲条件下的荧光的实验中,在PIPES、BES、HEPPSO、EPPS、TAPS、CAPS、TES和POPSO的缓冲液中观察到荧光。尤其是,在PIPES、HEPPSO、EPPS和POPSO的缓冲液中,检测到强的荧光。在7.0~10.5之间的pH范围内,可观察到荧光。发现取决于缓冲液类型和pH值的荧光强度的变化呈现取决于核酸的碱基序列的不同图案。另一方面,具有螯合及稳定Cu(II)离子特性的缓冲液有观察不到荧光的倾向。尽管在本实施例中没有提供数据,但当使用含例如Tris缓冲液、EDTA等的反应溶液时,几乎观察不到荧光。

[0270] 实施例3

[0271] 在实施例3中,证实了在使核酸与溅射在玻璃表面的铜接触后,可检测到荧光,并且分析了荧光的特性。

[0272] < 材料和方法 >

[0273] 作为 DNA, 使用实施例 1 中描述的 ssDNA。作为 RNA, 使用实施例 2 中描述的 RNA。

[0274] 采用由 ULVAC, Inc. (神奈川, 东京) 制造的装有 99.99% 的 Cu 靶 (Kojundo Chemical Laboratory Co., Ltd., 埼玉, 日本) 的 SH-350 装置在玻璃表面上溅射铜。在溅射中, 设定厚度为 40nm, 基于预先测定的沉积速度, 设定适当的溅射时间。用于溅射银的玻璃是由日本神奈川的 Kyodo International, Inc. 生产的。

[0275] 在溅射了铜或银的玻璃载片或未处理的玻璃载片上, 放置样品溶液, 在其上覆盖间隙盖玻片 (gap cover glass) (24×25No. 4/#CG00024/Matsunami Glass Ind., Ltd., 大阪, 日本)。在静置大约 5 分钟后, 观察荧光。倒置显微镜 Ti-U (Nikon Co., 东京, 日本) 用于观察。滤波器组 UV-1A (Ex :365/10, DM :400, BA :400/Nikon) 用于获取荧光。数字 CCD 摄像机 Retiga2000R (QImaging, BC, 加拿大) 和 20× 物镜用于捕获和记录图像。

[0276] < 结果 >

[0277] 图 22 示出在含 5mg/ml 的 DNA 和 0.5M 的 NaCl 的样品在溅射有铜的玻璃表面上静置 5 分钟后捕获的图像。图 23 示出在含 5mg/ml 的 RNA 和 0.5M 的 NaCl 的样品在溅射有铜的玻璃表面上静置 5 分钟后捕获的图像。

[0278] 如图 22(A) 所示, 当使用含 DNA 的样品时, 在整个捕获图像上观察到平滑 (smooth) 的荧光。另一方面, 如图 23 (A) 和 (B) 所示, 当使用含 RNA 的样品时, 在捕获的图像内观察到具有独特的波状图案的荧光。RNA 所特有的图案的预计原因是单链 RNA 彼此杂交以生成高级结构。

[0279] 接下来, 将在捕获图像内的荧光强度转化为数字。如图 22 (B) 所示, 每一个捕获图像被分为九个部分。九个部分中的一个 (图中的 C) 被设定为测量范围。计算出在测量范围内的荧光强度的平均值。对于每个样品, 捕获载片上的五个部分以计算每个图像的平均值。将所得五个平均值进一步平均并计算标准偏差。

[0280] 图 24 示出当含 DNA 或 RNA 的样品与溅射在玻璃上的铜或银接触时, 获得的荧光强度。在图 24 中, “DNA/Cu”、“RNA/Cu”、和 “(-)/Cu” 表示含 5mg/ml 的 DNA 的样品、含 5mg/ml 的 RNA 的样品及不含核酸的样品; 荧光强度是在溅射有铜的玻璃表面上测量的。此外, “DNA/Ag”、“RNA/Ag”、和 “(-)/Ag” 表示含 5mg/ml 的 DNA 的样品、含 5mg/ml 的 RNA 的样品及不含核酸的样品; 荧光强度是在溅射银的玻璃表面上测量的。每个样品含 0.5M 的 NaCl。由于 “DNA/Cu” 中的荧光强度明显高于其他样品, 它的曝光时间为 1 秒。除了 “DNA/Cu” 以外的所有样品中, 曝光时间为 5 秒。

[0281] 如图所示, 在溅射有铜的玻璃上, “DNA/Cu” 和 “RNA/Cu” 具有高于 “(-)/Cu” 的荧光强度。尤其是在 DNA 样品中, 检测到强的荧光。另一方面, 在溅射银的玻璃上, 与 “(-)/Ag” 相比, “DNA/Ag” 和 “RNA/Ag” 没有显示出荧光强度的增加。与 “(-)/Cu” 相比, “(-)/Ag” 显示了更高的测量值。这可能是由来自溅射银的表面上的反射光、散射光或自发荧光的背景引起的。

[0282] 接下来, 考察了荧光强度随核酸与铜的接触时间的变化。将含 5mg/ml 的 ssDNA 和 0.5M 的 NaCl 的样品放置在溅射有铜的玻璃和间隙盖玻片之间的时间点被指定为每隔预定时间测量荧光强度的起点。每隔 15 秒捕获图像, 每个捕获阶段打开和关闭激发光快门。使用 ×10 物镜, 曝光时间为 1 秒。在每一次, 捕获的一幅图像被用于测量荧光强度。结果示

于图 25 中。

[0283] 如图所示,在引入样品之后的几分钟内,荧光强度逐渐增加,并在大约 3 分钟以内达到最大值。

[0284] 从核酸与铜接触起,经过一段预定时间之后,考察由温度变化而引起的荧光强度的变化。捕获图像之后,立即将它保持在室温下。50 秒之后,将加热至 65℃ 的加热块轻轻地放在溅射有铜的玻璃上。100 秒之后,将热块移开。每隔 5 秒捕获图像。150 秒之后,暂时停止测量并关闭激发光快门。900 秒之后,再次开始测量。结果示于图 26 中。

[0285] 如图所示,在最初的 50 秒内,荧光强度逐渐减小。这可能是由荧光光褪色引起的。在接下来的 50 秒期间,荧光以明显不同于荧光光褪色的速度消失。在加热块被移开并且回到室温之后,荧光逐渐恢复。900 秒之后,荧光强度回到从初始荧光强度中扣除褪色的荧光强度的水平。这些结果显示从与铜接触的核酸中发射的荧光是热敏的,且随着温度升高而可逆消失。

[0286] 实施例 4

[0287] 实施例 4 示出通过将含细胞的样品引入到溅射有铜的玻璃上,可荧光观测细胞核。

[0288] < 材料和方法 >

[0289] 无 Ca/Mg 的 Dulbecco 磷酸盐缓冲盐水 (Invitrogen Corporation, CA, USA) 被用作 PBS。

[0290] 在洋葱薄皮实验中,用一对镊子将市售洋葱的薄皮小心剥离,浸入到蒸馏水中清洗以供使用。将洋葱薄皮放置于溅射有铜的玻璃上,浸入 PBS 中,用盖玻片覆盖,然后再观察。

[0291] 在人类白细胞样品的实验中,对 IMMUNO-TROL Cells (Cat.No.6607077, Beckman Coulter, Inc., Fullerton, CA, USA) 作如下处理:首先,分离 500 毫升 IMMUNO-TROL Cells,用 PBS 清洗,并采用离心机 (1200rpm, 5 分钟) 沉降。此后,弃去上层清液以剥离 (flake) 颗粒 (pellet),重复两次水溶血处理以提供样品。样品用 PBS 稀释,由此配制白细胞样品。水溶血处理按如下方式进行:在充分剥离作为离心产物而获得的沉淀之后,加入 9ml 去离子水,倒转混合 30 秒,加入 1ml 的 10×PBS 缓冲液 (Nippon Gene Co., Ltd., 东京, 日本) 并充分搅拌。细胞被离心分离 (1200rpm, 5 分钟),并沉降以除去上层清液。白细胞样品被放置于溅射有铜的玻璃上,用盖玻片覆盖,然后再观察。

[0292] 溅射有铜的玻璃、盖玻片、显微镜等与实施例 3 中的相同。在溅射中,厚度设定为 20nm、40nm 或 100nm。除非另有说明,否则在以下实验中厚度设定为 40nm。当只在玻璃载片表面的一部分溅射铜时,在玻璃载片表面粘贴聚酰亚胺带,在中心部位留出 5mm 的正方形,从而实施溅射。然后除去聚酰亚胺带。这样,就制作成只在中心部位的 5mm 正方形上生成了 Cu 层的溅射有铜的玻璃。

[0293] 采用激发滤光器 (365/10nm)、二向色镜 (400nm) 和荧光滤光器 (590LP) 对洋葱薄皮进行荧光观察。采用滤光器组 UV-1A (Ex :365/10, DM :400, BA :400/Nikon) 对白细胞样品和 Jurkat 细胞进行荧光观察。

[0294] < 结果 >

[0295] 图 27 示出在溅射有铜的玻璃上的洋葱薄皮的荧光观察并捕获的图像。(a)和(b)

示出在溅射有铜的玻璃上观察到的图像。(c)和(d)示出在其上未溅射有铜的玻璃载片上观察到的图像。(a)和(c)是明视场观察到的图像。(b)和(d)是荧光图像。(a)~(d)是采用 $\times 10$ 物镜捕获的图像。(e)是采用 $\times 40$ 物镜捕获的图像。

[0296] 如图所示,在溅射有铜的玻璃上的细胞上观察到细胞核所特有的强荧光。尽管在部分细胞壁等上观察到微弱的荧光,但认为是细胞壁等的自发荧光,因为其在未溅射有铜的玻璃载片上的细胞上也被发现。

[0297] 接下来,观察动物细胞。图 28 示出在溅射有铜的玻璃上的人类白细胞样品的荧光观察和捕获的图像。(a)是明视场观察到的图像。(b)是荧光图像。使用了 $\times 40$ 的物镜。

[0298] 在荧光图像中,明显观察到白细胞所特有的分页核中性白细胞(segmented neutrophils)。

[0299] 图 29 示出使用只在玻璃载片表面的一部分溅射铜的铜溅射玻璃观察到的图像。在铜溅射玻璃上,散布人类白细胞细胞珠,即 Jurkat 细胞,用盖玻片覆盖,然后用 $\times 20$ 的物镜观察。在铜溅射玻璃上沉积铜的区域和没有沉积铜的区域之间的边界上捕获图像。(a)和(c)是明视场观察的图像;占据超过一半的黑色区域是不能透光的区域,因为形成了铜膜。(b)和(d)是荧光图像。

[0300] 在沉积铜的区域中,只在细胞的细胞核上观察到强荧光。图 30 示出使用其上生成厚度为 20nm (a)或 100nm (b)的铜层的铜溅射玻璃观察 Jurkat 细胞的结果。在两种厚度下都观察到来自细胞核的荧光。

[0301] < 讨论 >

[0302] 本实施例中的结果显示通过使细胞核与铜接触,也能检测到荧光。显然这种现象只发生在其上溅射有铜的玻璃基板上,并且是细胞核与铜之间的作用结果。

[0303] 洋葱薄皮细胞和白细胞的荧光观察结果明显显示出各细胞中的细胞核的形状之间的差异。由此,根据本技术的核酸检测方法,可识别取决于细胞类型的细胞核的不同形状。

[0304] 尽管在本实施例中未示出,但是在使用在其一部分上溅射有铜的玻璃载片的实验中,在观察仅来自沉积铜的区域上的细胞的荧光之后,倾斜玻璃载片以使细胞从沉积铜的区域移动到未沉积铜的区域。移动之后,继续观察到荧光。由此,即使铜与细胞接触的位置与荧光观察细胞的位置分隔,发现通过在两个部位之间放置用于移动细胞的装置可以检测到荧光。

[0305] 在证实来自位于铜溅射玻璃和盖玻片之间的细胞的细胞核的荧光之后,移去盖玻片,含细胞的溶液被暴露在空气中。然后,荧光迅速消失。同样,在实施例 1 中使用 Cu(II) 离子和 S. A. 的实验中,发现在反应溶液暴露于空气中较长时间之后,荧光消失。荧光的消失可认为是由于与空气接触而导致的 Cu(I) 离子的氧化。因此,可能通过使样品溶液与空气接触而抑制荧光的产生(尤其是,暴露于空气中所含的氧气)。认为通过限制与空气的接触(例如在微芯片中)实施根据本技术的核酸检测方法是优选的。

[0306] 实施例 5

[0307] 在实施例 5 中,证实了在与实施例 1 中相似的实验条件下,可从具有两个碱基长度的低聚 DNA 发射荧光。

[0308] < 材料和方法 >

[0309] 采用与实施例 1 中相似的材料和方法,测量了从 Invitrogen 公司购买的七种类型的低聚 DNA 的荧光。使用的低聚 DNA 中的碱基序列是 T (20) (序列编号:1)、T (10) (序列编号:19)、T (6) (序列编号:10)、T (5) (序列编号:27)、T (4) (序列编号:28)、T (3) (序列编号:12)、T (2) (序列编号:29)。在这里, CuSO_4 浓度设定为 0.4mM, S. A. 浓度设定为 4mM, NanoDrop3300 被用于测量。

[0310] < 结果 >

[0311] 图 31 示出 T (20) 的测量结果。低聚 DNA 的各自浓度为 (a) 100 μM 、(b) 50 μM 、(c) 50 μM 、(d) 25 μM 、(e) 12.5 μM 和 (f) 6.25 μM 。在各图中,横轴表示波长(nm),纵轴表示荧光强度(RFU 值)。图 32 至图 37 示出各低聚 DNA T (10)、T (6)、T (5)、T (4)、T (3) 和 T (2) 的测量结果。图中各曲线中示出的数值表示低聚 DNA 的浓度。

[0312] 图 38 示出在荧光强度为最高的浓度条件下各低聚 DNA 所获得的荧光光谱。横轴表示波长(nm),纵轴表示相对值(峰值 RFU 值设为 1)。(a) 表示 T (20) 的荧光光谱,(b) 表示 T (10) 的荧光光谱,(c) 表示 T (6) 的荧光光谱,(d) 表示 T (5) 的荧光光谱,(e) 表示 T (4) 的荧光光谱,(f) 表示 T (3) 的荧光光谱,(g) 表示 T (2) 的荧光光谱。

[0313] 图 39 示出了标绘了各低聚 DNA 在各浓度的峰值 RFU 值的图。横轴表示各低聚 DNA 的浓度(μM),纵轴表示峰值 RFU 值(对数值)。(a) 表示 T (20) 的结果,(b) 表示 T (10) 的结果,(c) 表示 T (6) 的结果,(d) 表示 T (5) 的结果,(e) 表示 T (4) 的结果,(f) 表示 T (3) 的结果,(g) 表示 T (2) 的结果。

[0314] < 讨论 >

[0315] 本实施例的结果揭示了从具有胸腺嘧啶两个碱基长度的低聚 DNA 观察到荧光。发现即使当低聚 DNA 的浓度改变时,荧光光谱的形状也几乎不变,但是荧光峰倾向于随着碱基长度变短而向短波长侧移动(参照图 38)。可以看出,荧光光谱的强度倾向于依赖低聚 DNA 的浓度,但当浓度超过某一值时,到达稳定水平(plateau),并反向下降(参照图 39)。而且,在实施例 2 中使用铜粉的实验中观察到,当 DNA 的浓度太高时,荧光强度是减小的(参照图 15)。

[0316] 实施例 6

[0317] 在实施例 6 中,在与实施例 1 中相似的实验条件下,采用具有由 T 和 C 或 T 和 G 构成的三个碱基长度的低聚 DNA 进行实验。

[0318] < 材料和方法 >

[0319] 采用与实施例 1 中相似的材料和方法,测量从 Invitrogen Corporation 购买的低聚 DNA 的荧光。所用低聚 DNA 的序列为 TTT (序列编号:12)、TTC、TCT、CTT、TCC、CTC、CCT、CCC、TTG、TGT、GTT、TGG、GTG、GGT、GGG。 CuSO_4 浓度设定为 0.4mM, S. A. 浓度设定为 4mM,低聚 DNA 浓度设定为 0.5mM, NanoDrop3300 被用于测量。

[0320] < 结果 >

[0321] 结果示于图 40 和 41 中。在图 40 中,(a) 表示 TTT (序列编号:12) 的结果,(b) 表示 TTC 的结果,(c) 表示 TCT 的结果,(d) 表示 CTT 的结果,(e) 表示 TCC 的结果,(f) 表示 CTC 的结果,(g) 表示 CCT 的结果,且(h) 表示 CCC 的结果。在图 41 中,(a) 表示 TTT (序列编号:12) 的结果,(b) 表示 TTG 的结果,(c) 表示 TGT 的结果,(d) 表示 GTT 的结果,(e) 表示 TGG 的结果,(f) 表示 GTG 的结果,(g) 表示 GGT 的结果,且(h) 表示 GGG 的结果。横轴表

示波长(nm),且纵轴表示荧光强度(RFU 值)的对数值。

[0322] 在具有 T 和 C 的混合序列的低聚 DNA 中,荧光强度在 TTT 序列最强,然后是 CTT、CCT 和 TCT。在 TTC 和 CTC 中确定有弱荧光(参照图 40)。另一方面,确定在 TCC 和 CCC 中没有在大约 600nm 处有峰的荧光。在具有 T 和 G 的混合序列的低聚 DNA 中,确定了在 TTG 序列有中等强度的荧光,在 GTT 有弱荧光,但在其他序列,确定没有在大约 600nm 处有峰的荧光(参照图 41)。

[0323] < 讨论 >

[0324] 在具有 T 和 C 的混合序列的低聚 DNA 中,在第二和第三位包括 T 的 CTT 序列显示荧光强度比 TCT 和 TTC 高。而且,在第三位包括 T 的 TCT 和 CCT 显示荧光强度比在第二位包括 T 的 TTC 和 CTC 高。由此可认为在具有 T 和 C 的混合序列的低聚 DNA 中,在第三碱基位的 T 对荧光做出非常大的贡献,而在第二碱基位的 T 对荧光做出次要贡献。

[0325] 在具有 T 和 G 的混合序列的低聚 DNA 中,除了 TTG 和 GTT 之外,确定没有在大约 600nm 处有峰的荧光。荧光强度通常比具有有 C 和 T 的混合序列的低聚 DNA 低。由此,可认为 G 具有吸收荧光能量和猝灭荧光的作用。

[0326] 实施例 7

[0327] 在实施例 7 中,证实了荧光被淬灭染料淬灭。

[0328] < 材料和方法 >

[0329] 采用与实施例 1 中相似的材料和方法,从 Invitrogen Corporation 购买的低聚 DNA T (10) (序列编号 :19)和由 Black Hole Quencher-2 (BHQ2)修饰低聚 DNA T (10)的 3' 末端而提供的低聚 DNA (T (10)BHQ2) (Sigma-Aldrich Corporation)被用于测量荧光。CuSO₄ 浓度设定为 0.4mM, S. A. 浓度设定为 4mM,低聚 DNA 浓度设定为 0.05mM, NanoDrop3300 被用于测量。

[0330] < 结果 >

[0331] 结果示于图 42 中。横轴表示波长(nm),纵轴表示荧光强度(RFU 值)。在 T (10) 中观察到明显的荧光,但是在淬灭剂修饰的 T (10)BHQ2 中没有检测到荧光。

[0332] < 讨论 >

[0333] BHQ2 是已知有效吸收尤其是大约 560nm ~ 650nm 范围内的光的淬灭剂。认为是由于 BHQ2 的作用而导致在 T (10) 中观察到的荧光在 T (10)BHQ2 中不再能观察到。结果表明可以将铜的作用与 FRET 结合。

[0334] 实施例 8

[0335] 在实施例 8 中,胸腺嘧啶(T)和尿嘧啶(U)的荧光强度和光谱形状被再次比较,证实了强度是不同的,但两者的光谱形状是相同的。此外,考察了甲基化胞嘧啶(MeC)和肌苷(I)的荧光产生,且揭示了二者均不产生荧光。

[0336] < 材料和方法 >

[0337] 采用与实施例 1 中相似的材料和方法,测量了多种低聚 DNA 的荧光。从 Invitrogen Corporation 购买的 T (10) (序列编号 :19)、U (9)G (序列编号 :20)、A (10) (序列编号 :30) 和 I (9)G (序列编号 :31) 被用作低聚 DNA。而且,从 Sigma-Aldrich Corporation 购买的 C (10) (序列编号 :32)、C (4) MeC (6) (序列编号 :33, MeC 是 5- 甲基 2- 脱氧胞苷) 被用作低聚 DNA。CuSO₄ 浓度设定为 0.4mM, S. A. 的浓度设定为 4mM,低聚 DNA 浓度设定为

0.05mM, NanoDrop3300 被用于测量。

[0338] < 结果 >

[0339] T (10) 和 U (9) 各三次的测量结果示于图 43 中。(a)是具有代表波长(nm)的横坐标及代表荧光强度(RFU 值)的纵坐标的曲线。(b)是具有代表作为相对值(各低聚 DNA 的峰值 RFU 值设定为 1)的荧光强度(RFU 值)的平均值的纵坐标的曲线。确认了 U (9G)发射比 T (10)强度低的荧光,但具有与 T (10)相似的光谱形状。

[0340] T (10)、C (10)和 C (4)MeC (6)的测量结果示于图 44 中。横轴代表波长(nm),且纵轴表示荧光强度(RFU)。从 T (10)中观察到明显的荧光,但从 C (10)和 C (4)MeC (6)中观察不到荧光。

[0341] T (10)、A (10)和 I (9)G 的测量结果示于图 45 中。横轴代表波长(nm),且纵轴表示荧光强度(RFU)。从 T (10)中观察到明显的荧光,从 A (10)中观察到弱荧光,但从 I (9)G 中观察不到荧光。

[0342] < 讨论 >

[0343] 与从具有胸腺嘧啶序列的核酸中发射的荧光相比,从具有尿嘧啶序列的核酸中发射的荧光强度较低,但具有类似的光谱形状。实施例 1 支持此结果。此外,证实了具有胞嘧啶的序列或具有胞嘧啶和甲基化胞嘧啶序列的核酸不发射荧光。

[0344] 这些结果显示,通过用铜检测荧光,可将尿嘧啶从胞嘧啶和甲基化胞嘧啶中识别出来。这表明根据本发明的核酸检测方法可检测通过硫酸氢盐反应进行的尿嘧啶(U)对胞嘧啶(C)的取代,以及分析 DNA 分子的甲基化。

[0345] 工业实用性

[0346] 根据本技术,仅通过使样品与铜接触,就可以简便检测或测量核酸是否存在及数量、样品中的碱基序列;及样品中细胞核的形状、分布、数量和大小。

[0347] 这一技术对改善在包括医疗领域(病理学、肿瘤免疫学、移植、遗传学、再生医学、化学治疗等)、药物发现领域、临床检查领域、食品领域、农业领域、工程领域、法医学领域和刑事鉴定领域的多个领域中的核酸或细胞的分析和分析研究作出贡献。

[0001]

<110> 索尼公司
<120> 核酸的检测方法
<130> P46839SONY
<160> 33
<170> PatentIn version 3.5
<210> 1
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 低聚DNA
<400> 1
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa 20

<210> 2
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 低聚DNA
<400> 2
tttttttttt tttttttttt 20

<210> 3
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 低聚DNA
<400> 3
gggggggggg gggggggggg 20

<210> 4
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 低聚DNA
<400> 4
ccccccccc ccccccccc 20

<210> 5
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 低聚DNA
<400> 5
aaaaataaa taataaaaaa 20

<210> 6
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>

[0002]

<223> 低聚DNA	
<400> 6 ttttttatta tttatttttt	20
<210> 7 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 低聚DNA	
<400> 7 ggggggcggg cggcgggggg	20
<210> 8 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 低聚DNA	
<400> 8 cccccgccg ccgcgggggg	20
<210> 9 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 低聚DNA	
<400> 9 aaaatttttt ttttttaaaa	20
<210> 10 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 低聚DNA	
<400> 10 tttttt	6
<210> 11 <211> 3 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 低聚DNA	
<400> 11 aaa	3
<210> 12 <211> 3 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 低聚DNA	
<400> 12 ttt	3

[0003]

<210>	13	
<211>	3	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	低聚DNA	
<400>	13	
tta		3
<210>	14	
<211>	3	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	低聚DNA	
<400>	14	
tat		3
<210>	15	
<211>	3	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	低聚DNA	
<400>	15	
att		3
<210>	16	
<211>	3	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	低聚DNA	
<400>	16	
taa		3
<210>	17	
<211>	3	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	低聚DNA	
<400>	17	
ata		3
<210>	18	
<211>	3	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	低聚DNA	
<400>	18	
aat		3
<210>	19	
<211>	10	

[0004]

<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 低聚DNA	
<400> 19	
tttttttttt	10
<210> 20	
<211> 10	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 低聚DNA	
<400> 20	
uuuuuuuuug	10
<210> 21	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 低聚DNA	
<400> 21	
ccccctttttt ttttttcccc	20
<210> 22	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 低聚DNA	
<400> 22	
cccccccett tttttttttt	20
<210> 23	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 低聚DNA	
<400> 23	
tttttttttt ttcccccccc	20
<210> 24	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 低聚DNA	
<400> 24	
ccttttttcc ccttttttcc	20
<210> 25	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	

[0005]

<223>	低聚DNA	
<400>	25	
	ctttcccttc ctttcccttc	20
<210>	26	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	低聚DNA	
<400>	26	
	cctttcttctt ctttcttctt	20
<210>	27	
<211>	5	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	低聚DNA	
<400>	27	
	ttttt	5
<210>	28	
<211>	4	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	低聚DNA	
<400>	28	
	ttttt	4
<210>	29	
<211>	2	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	低聚DNA	
<400>	29	
	tt	2
<210>	30	
<211>	10	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	低聚DNA	
<400>	30	
	aaaaaaaaa	10
<210>	31	
<211>	10	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	低聚DNA, n是指i.	
<400>	31	
	nnnnnnnnng	10

[0006]

<210> 32
<211> 10
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 低聚DNA

<400> 32
ccccccccc 10

<210> 33
<211> 10
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 低聚DNA, n是指5-甲基-2-脱氧胞苷.

<400> 33
cennnnnncc 10

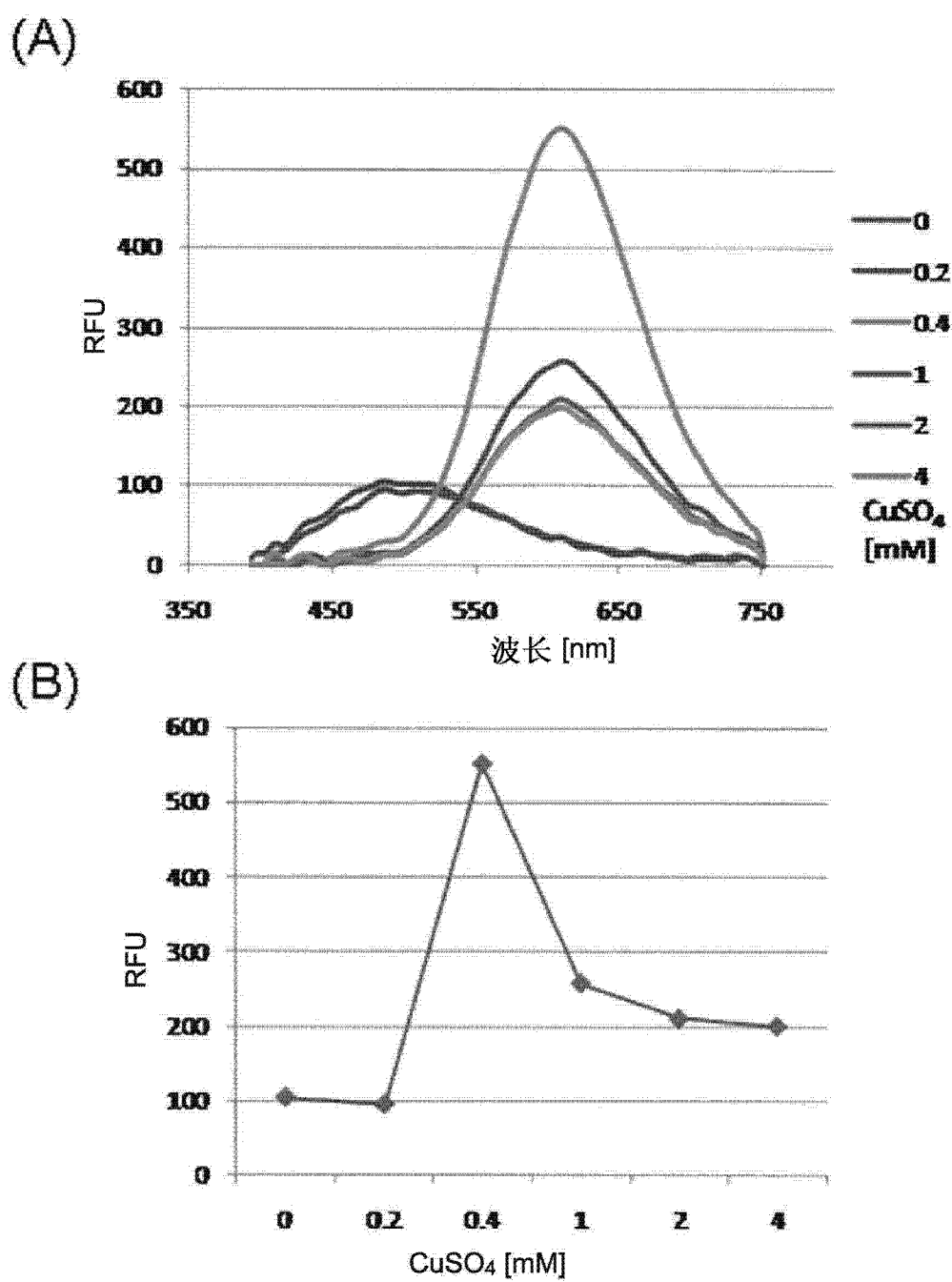


图 1

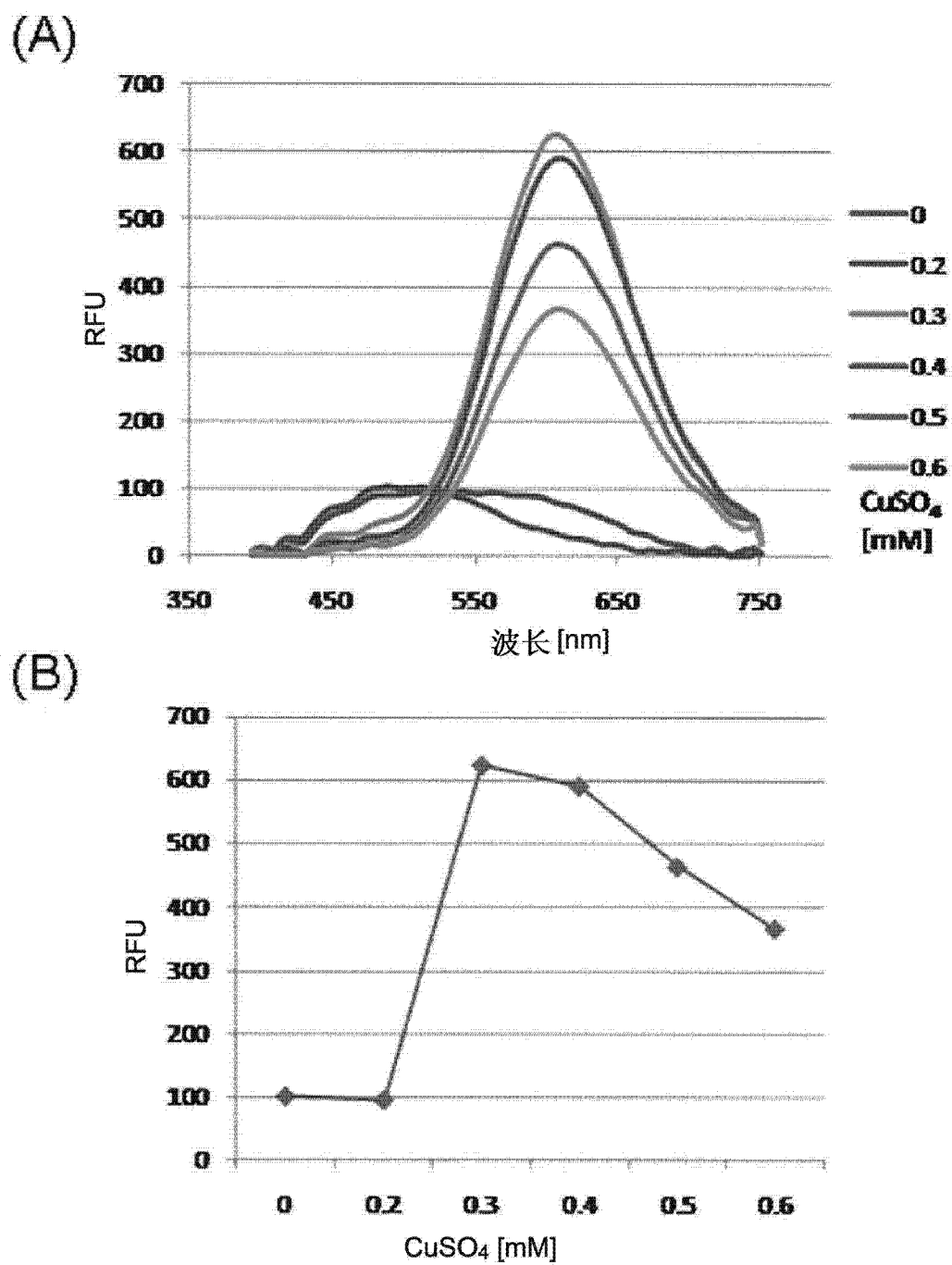


图 2

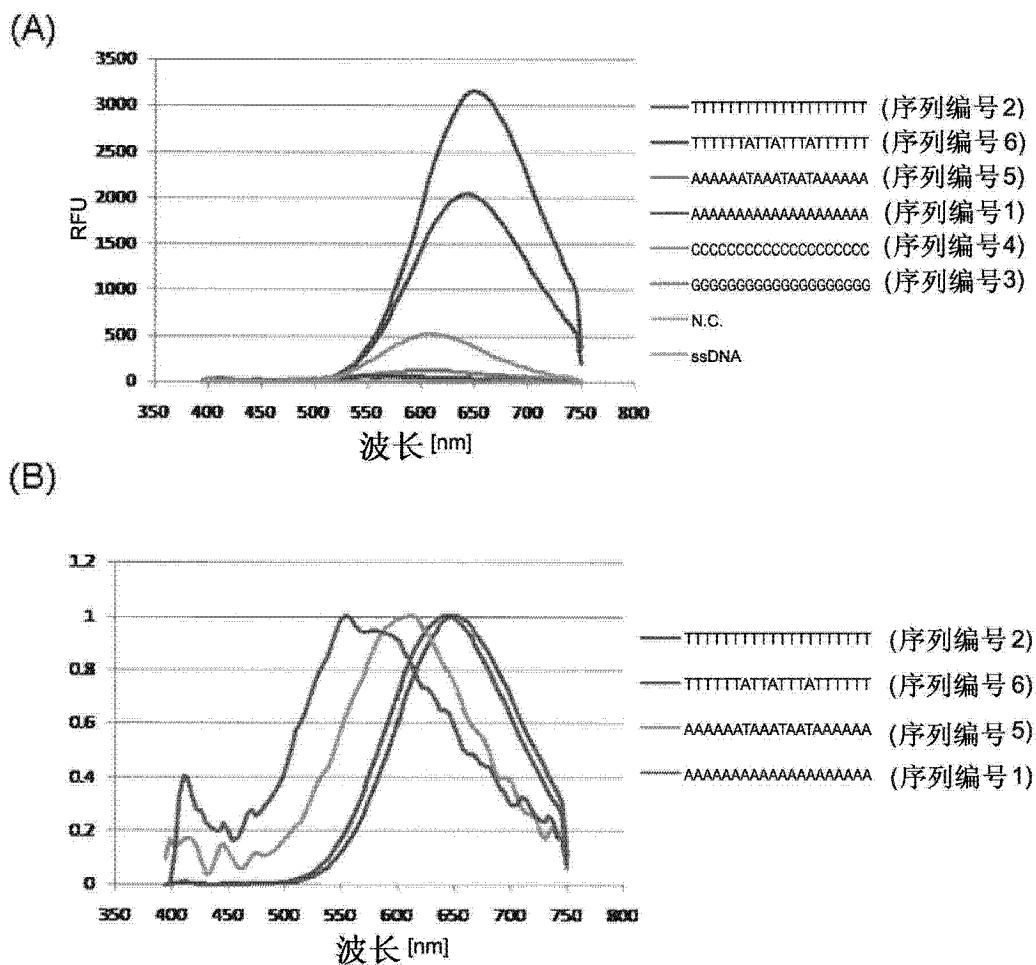


图 3

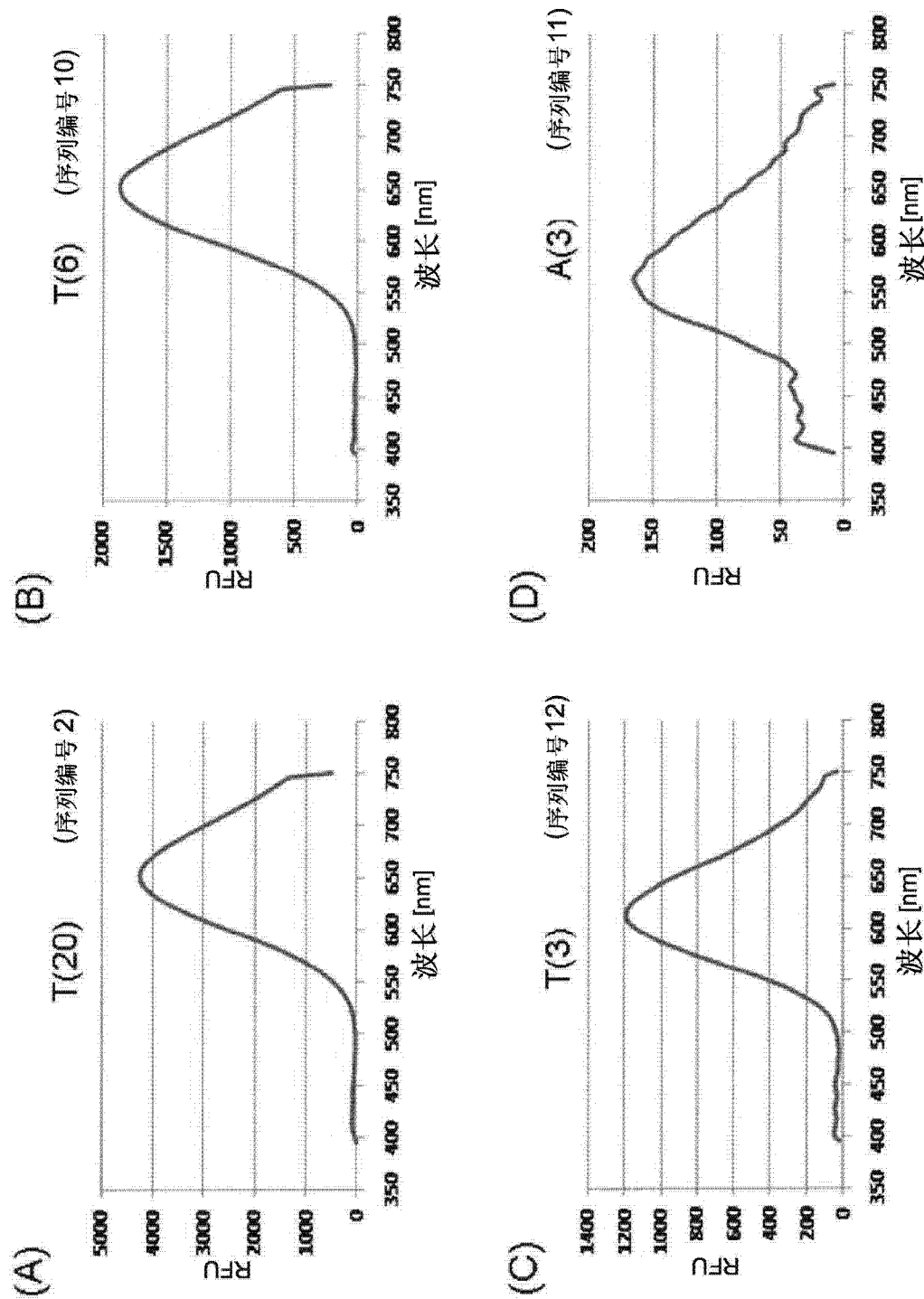


图 4

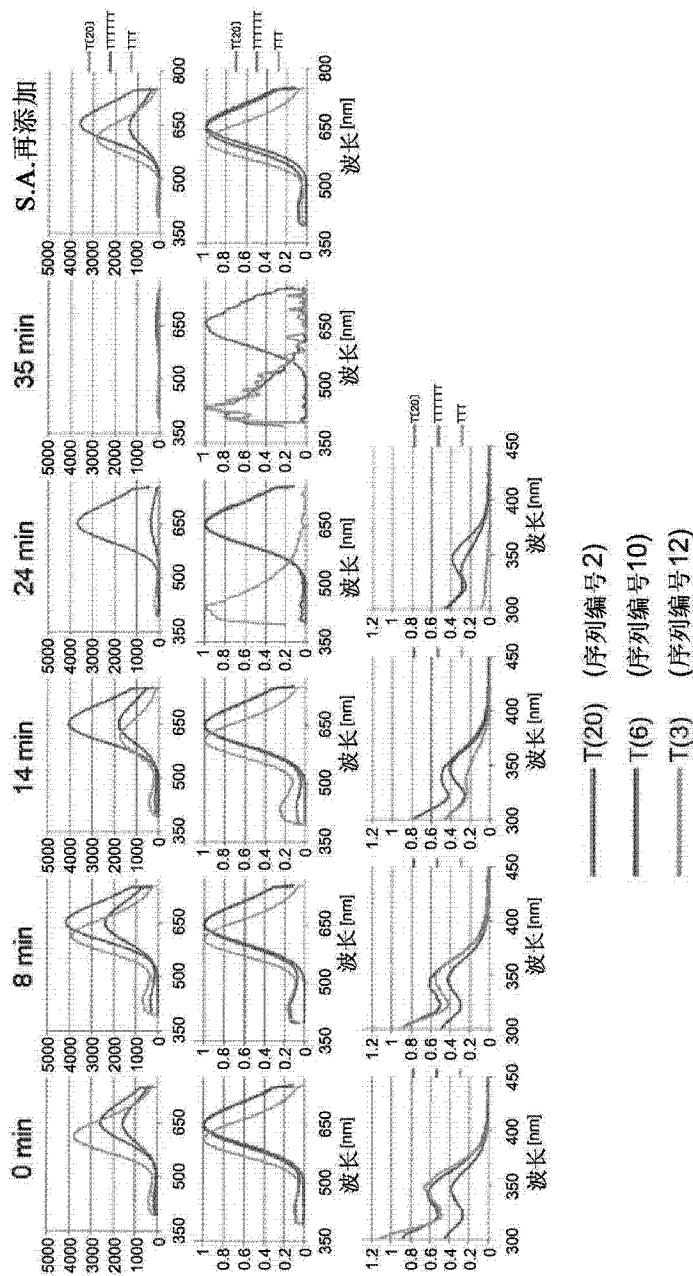


图 5

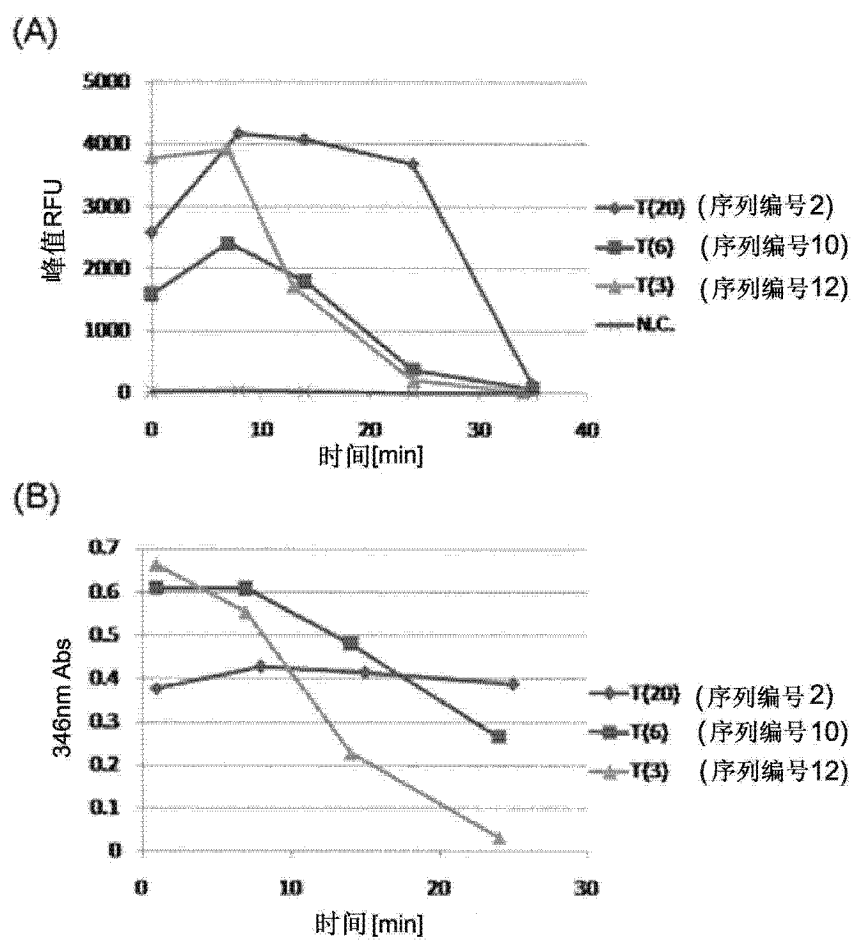


图 6

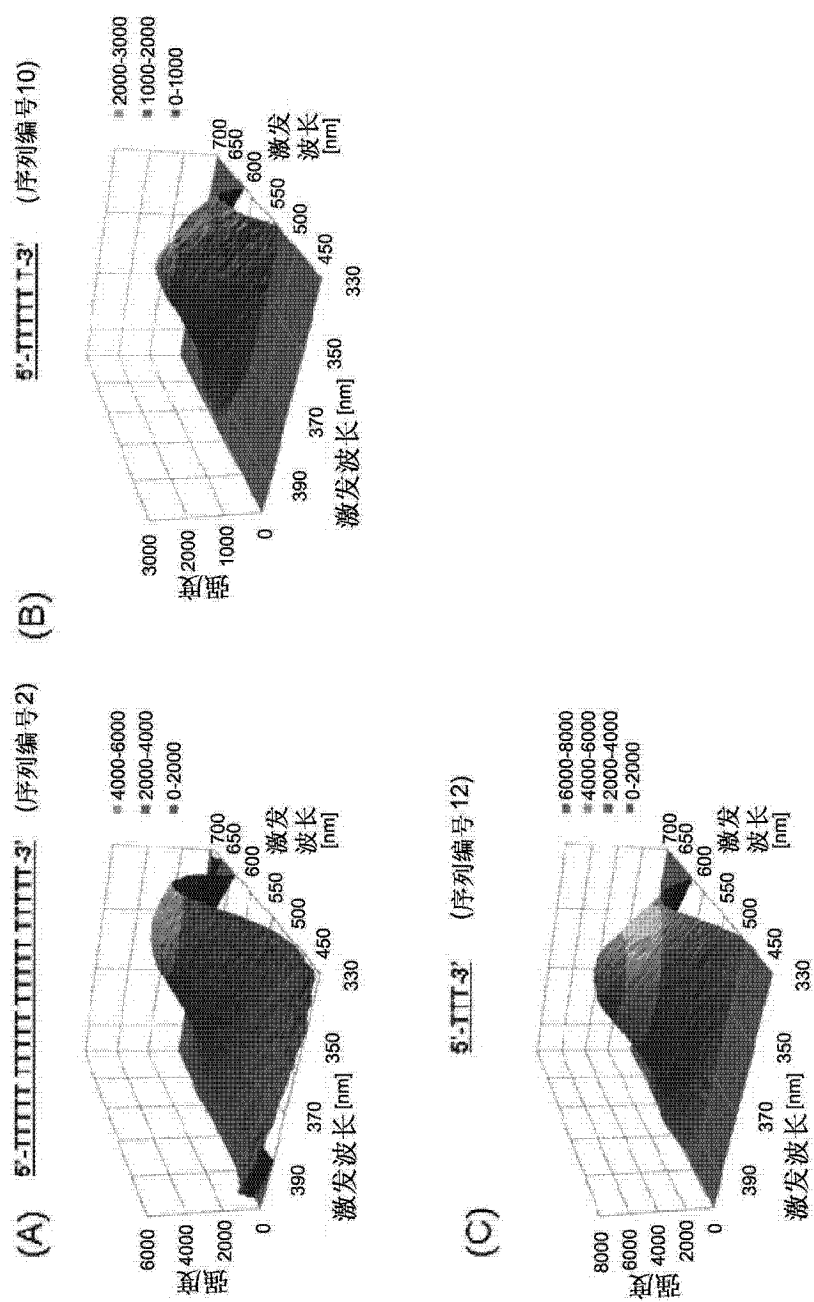


图 7

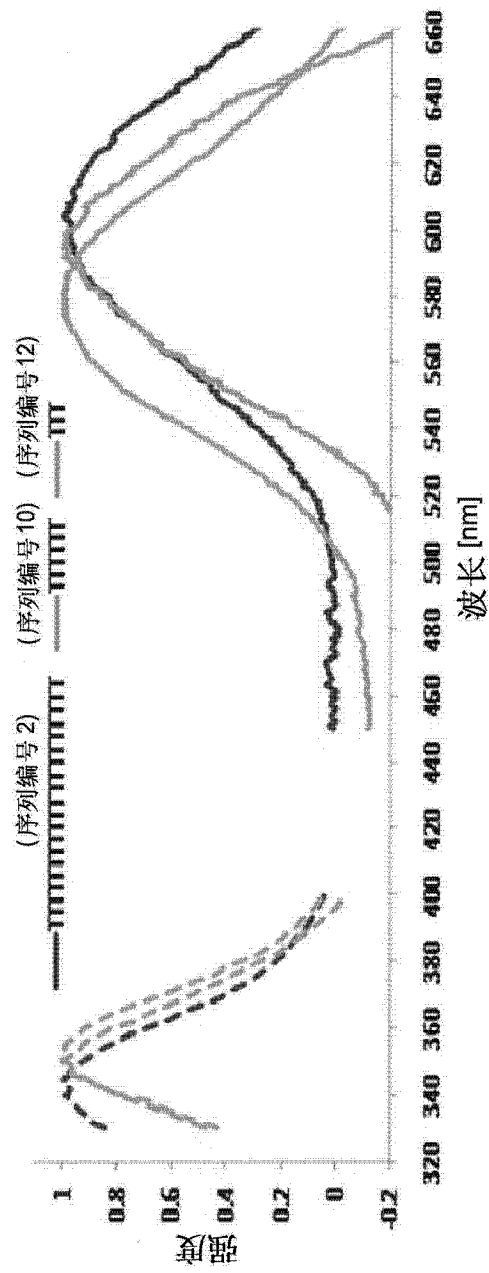


图 8

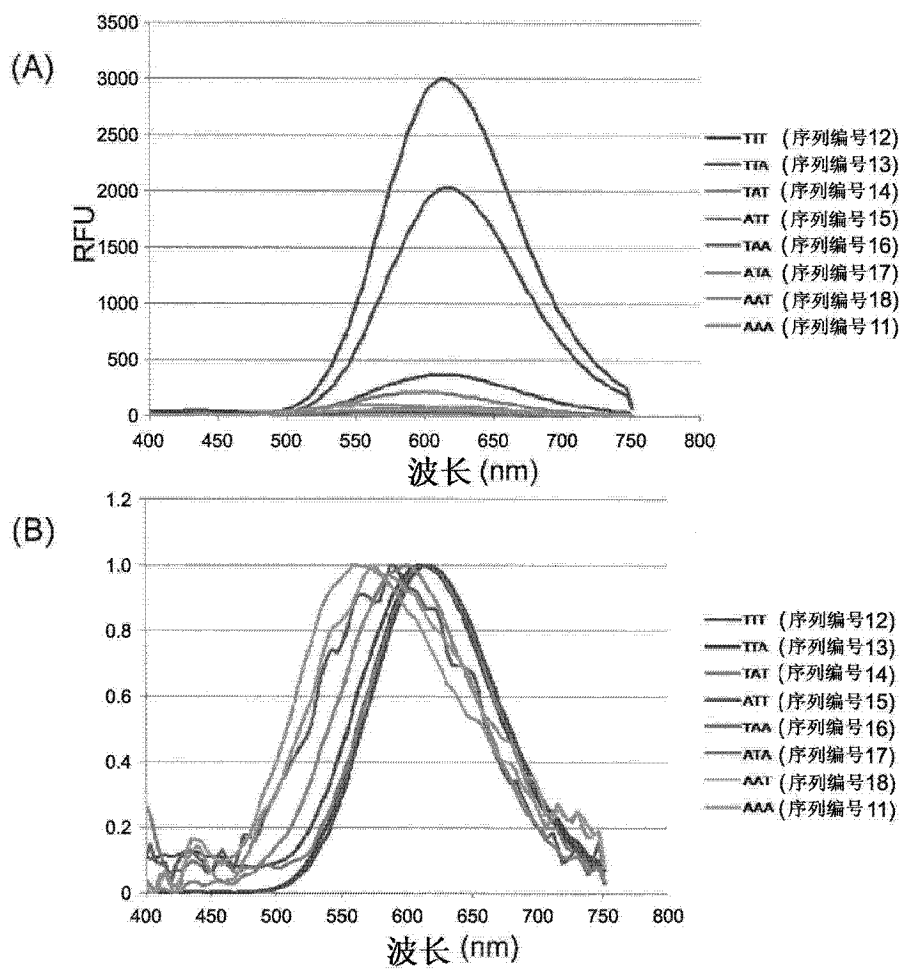


图 9

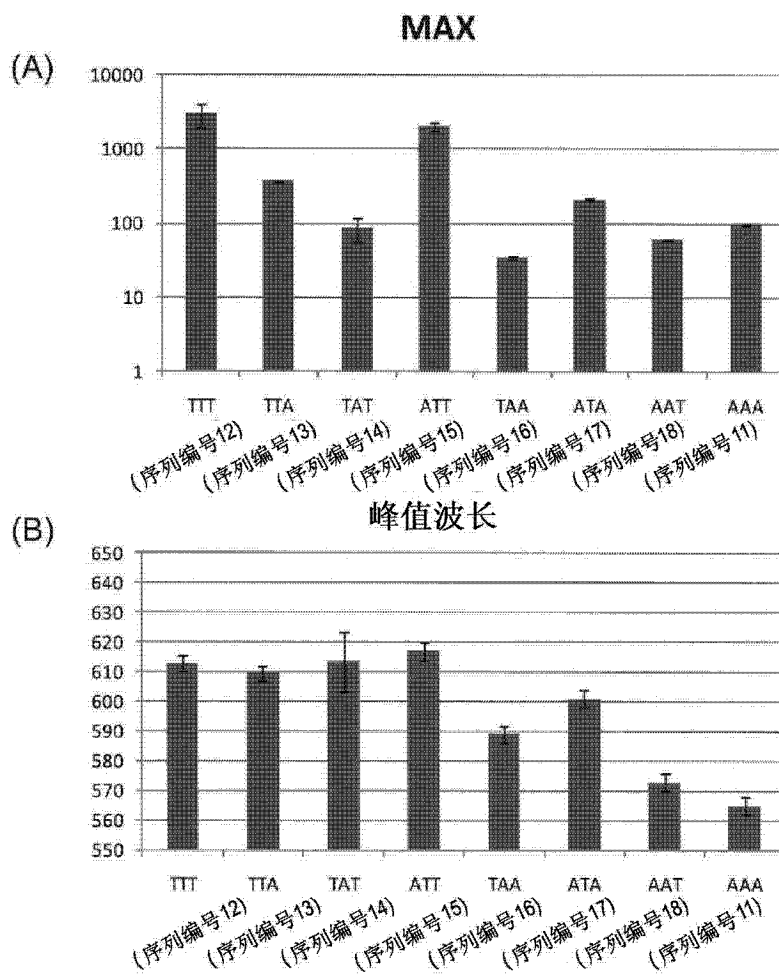


图 10

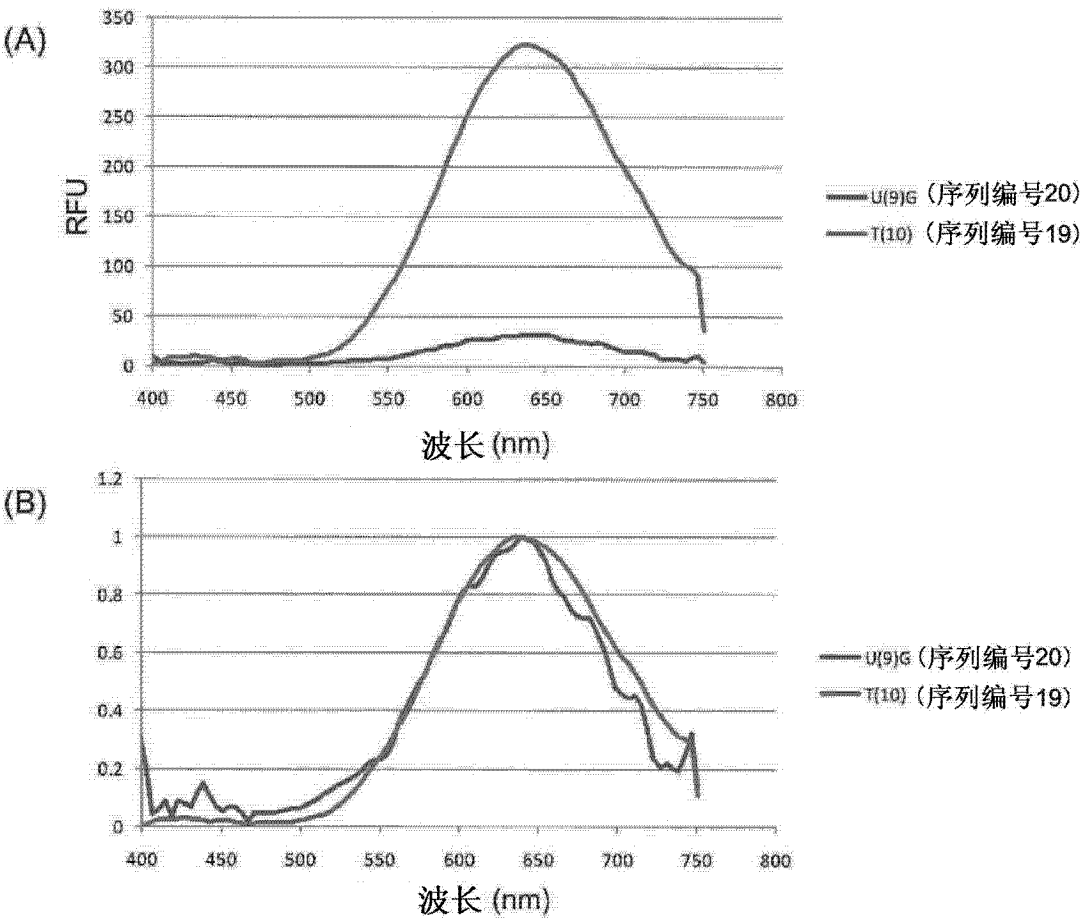


图 11

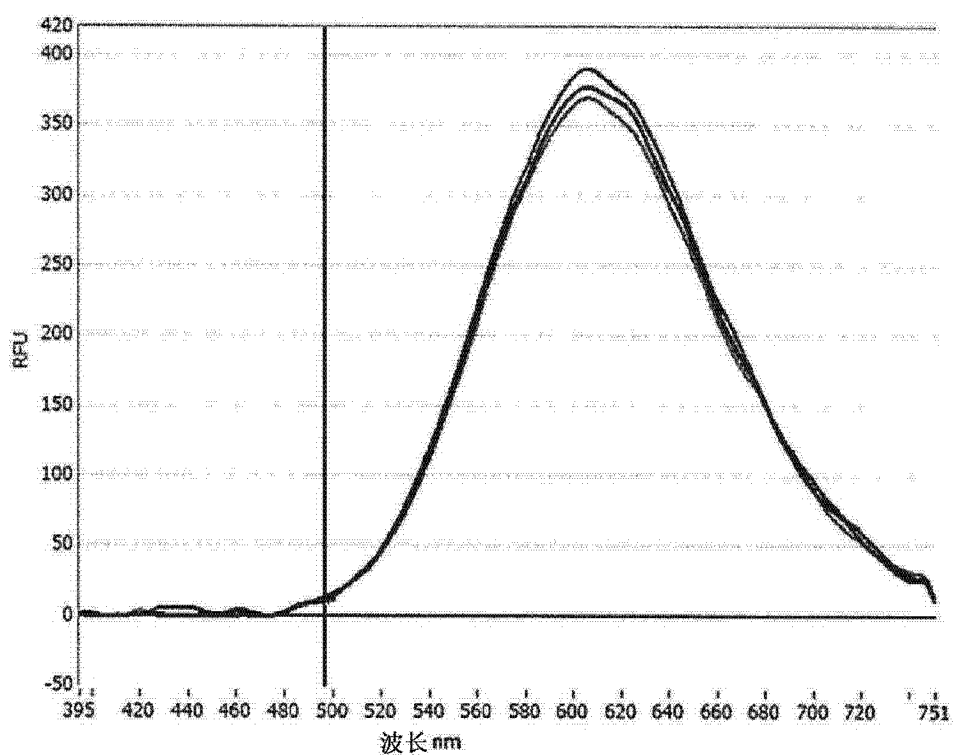


图 12

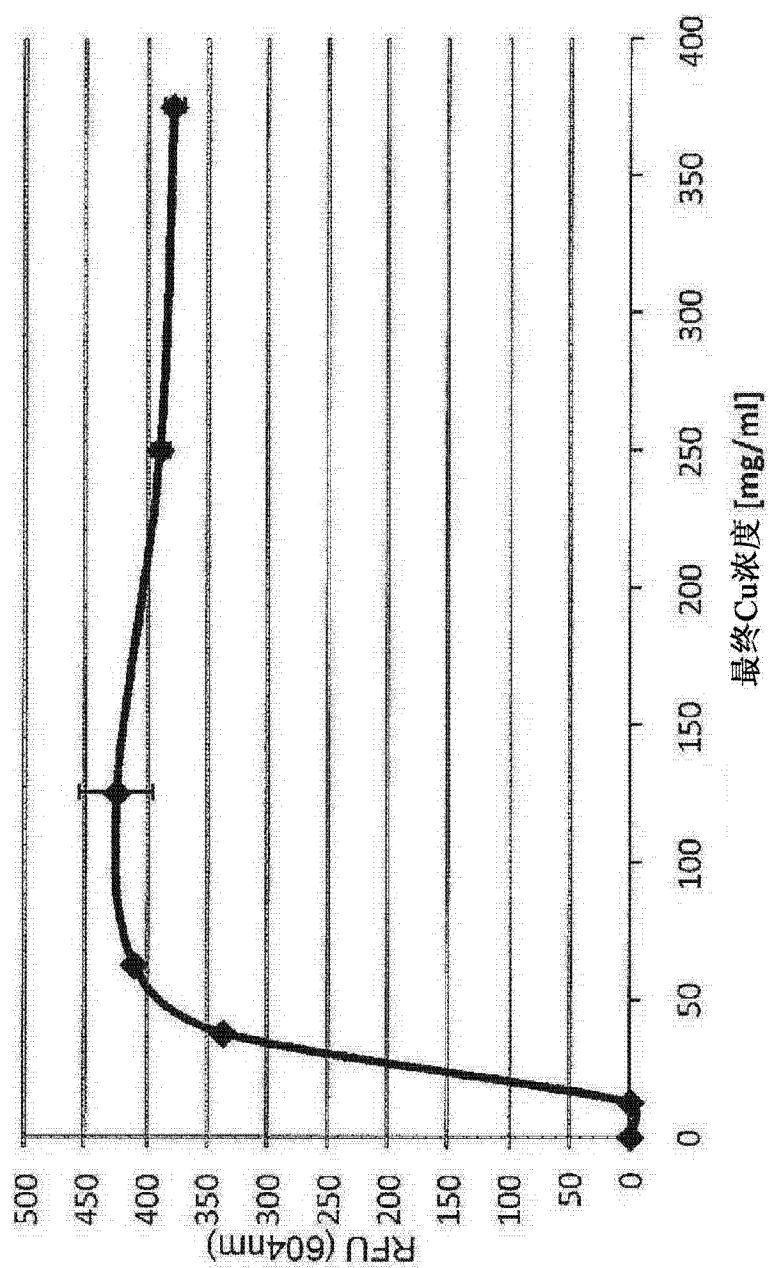


图 13

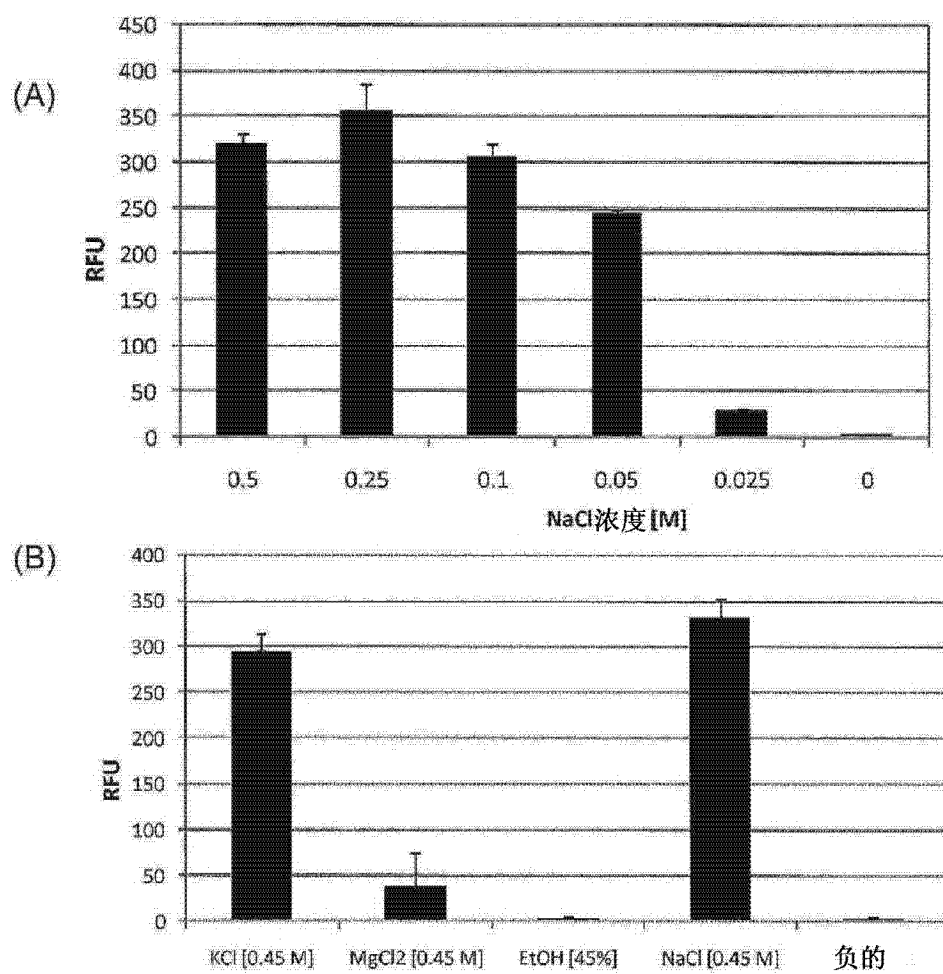


图 14

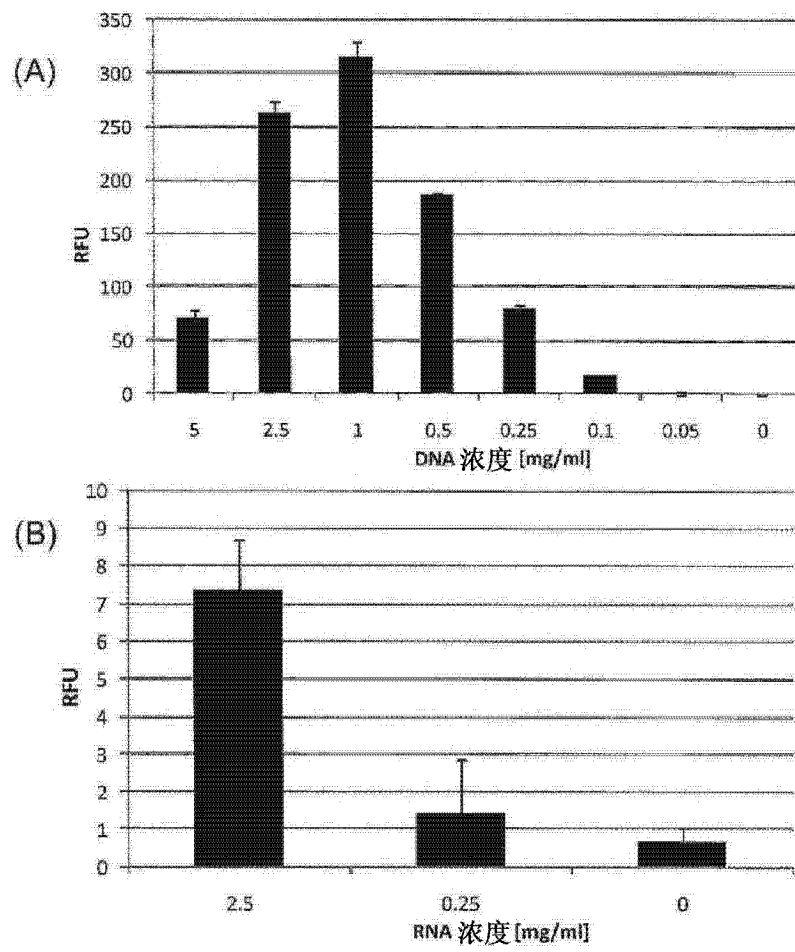


图 15

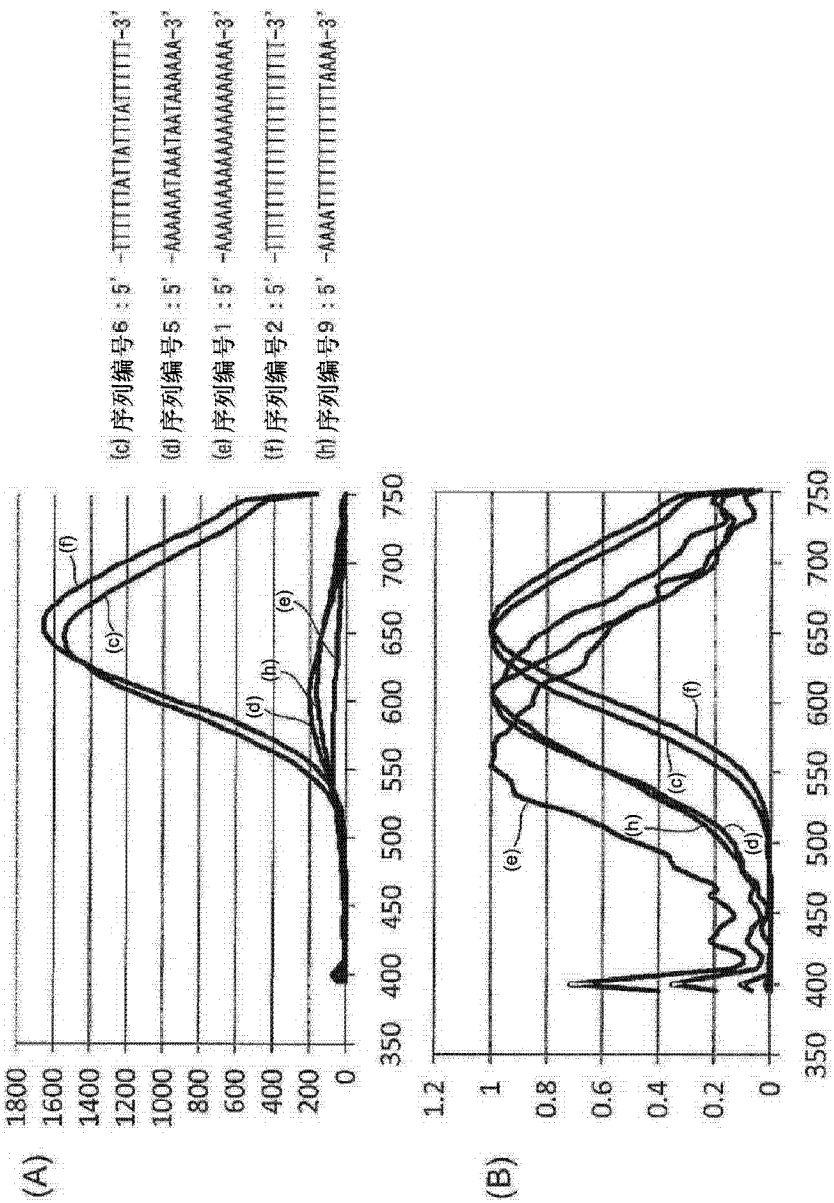


图 16

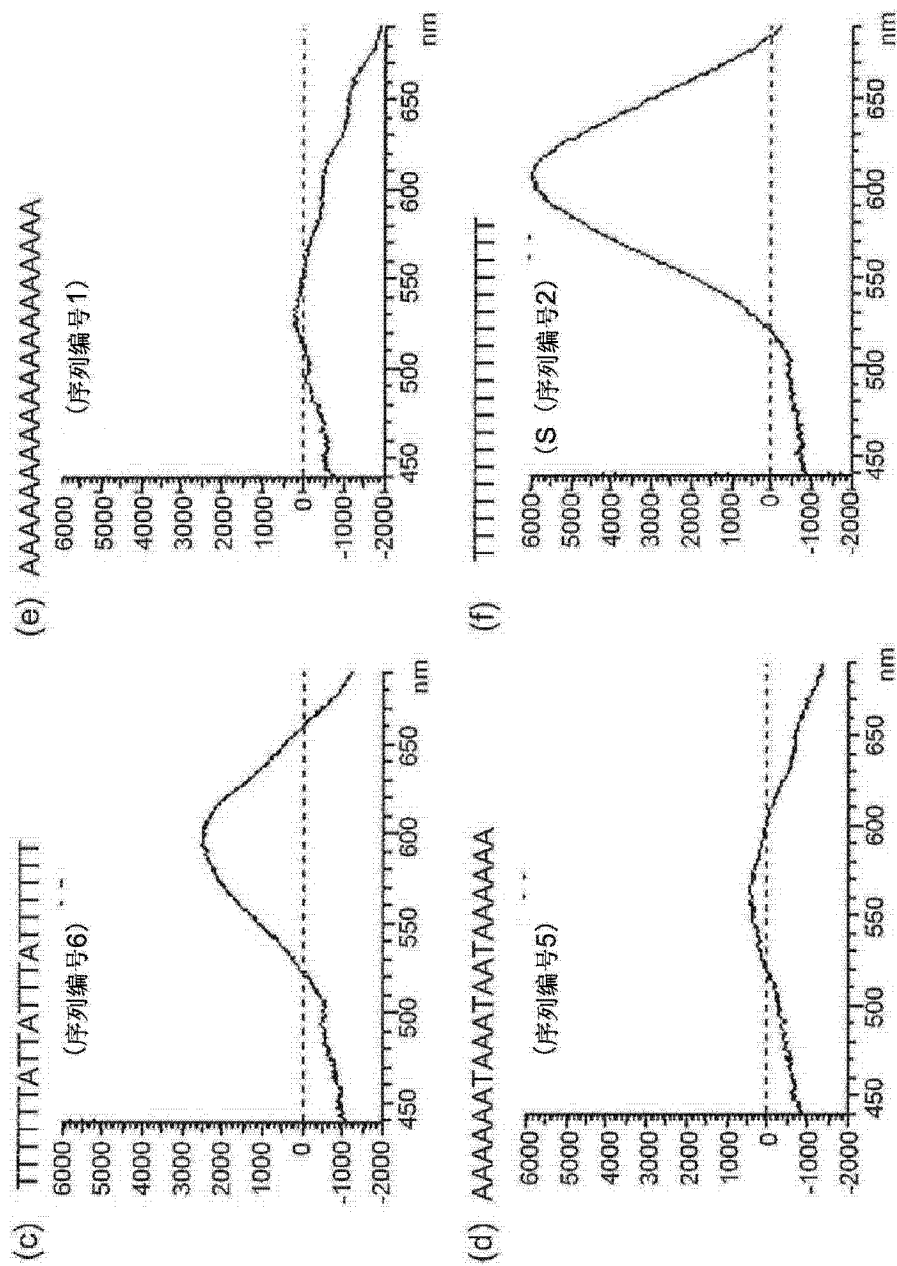


图 17

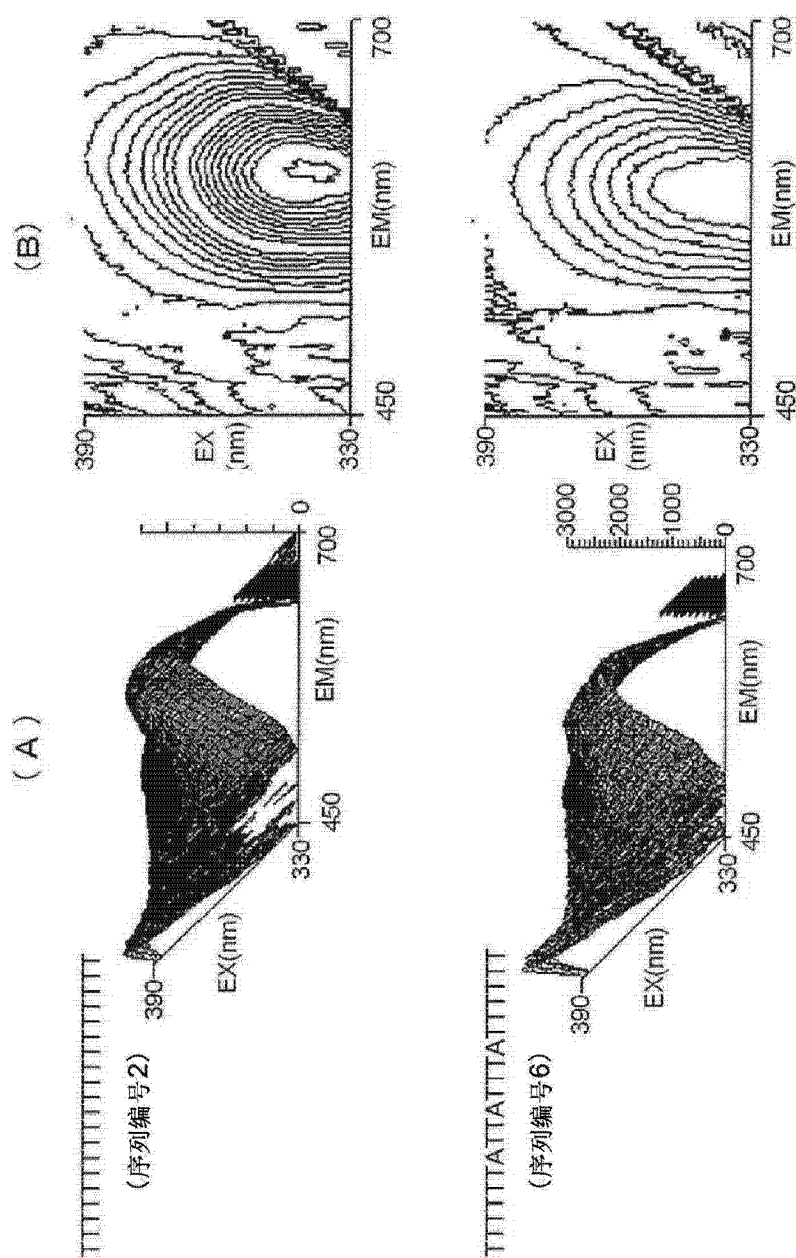


图 18

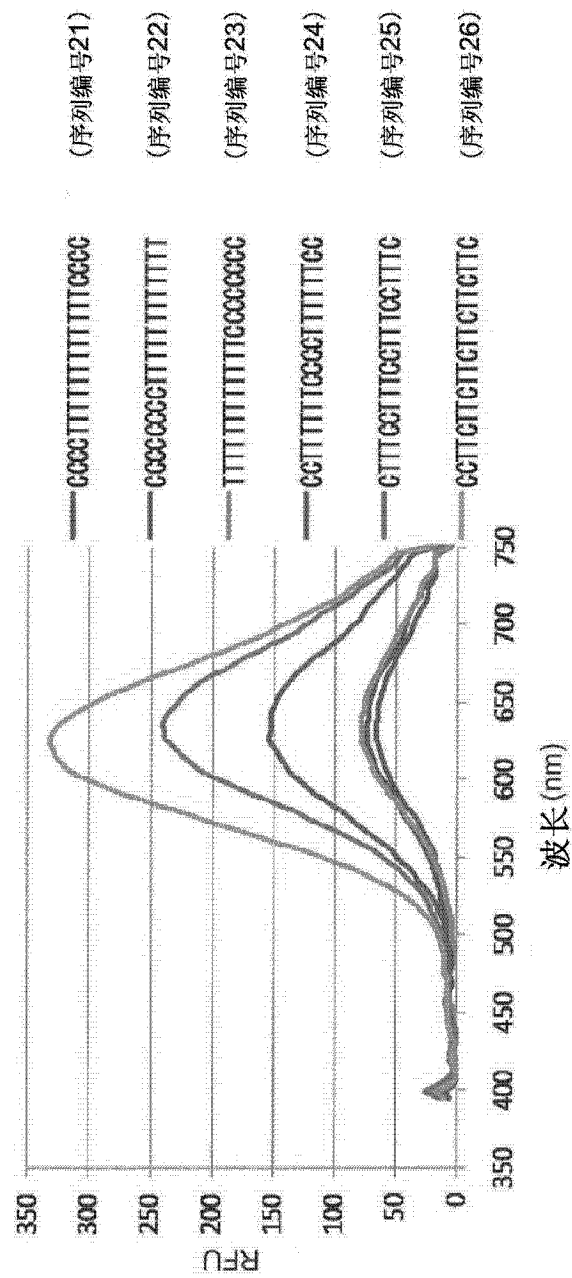


图 19

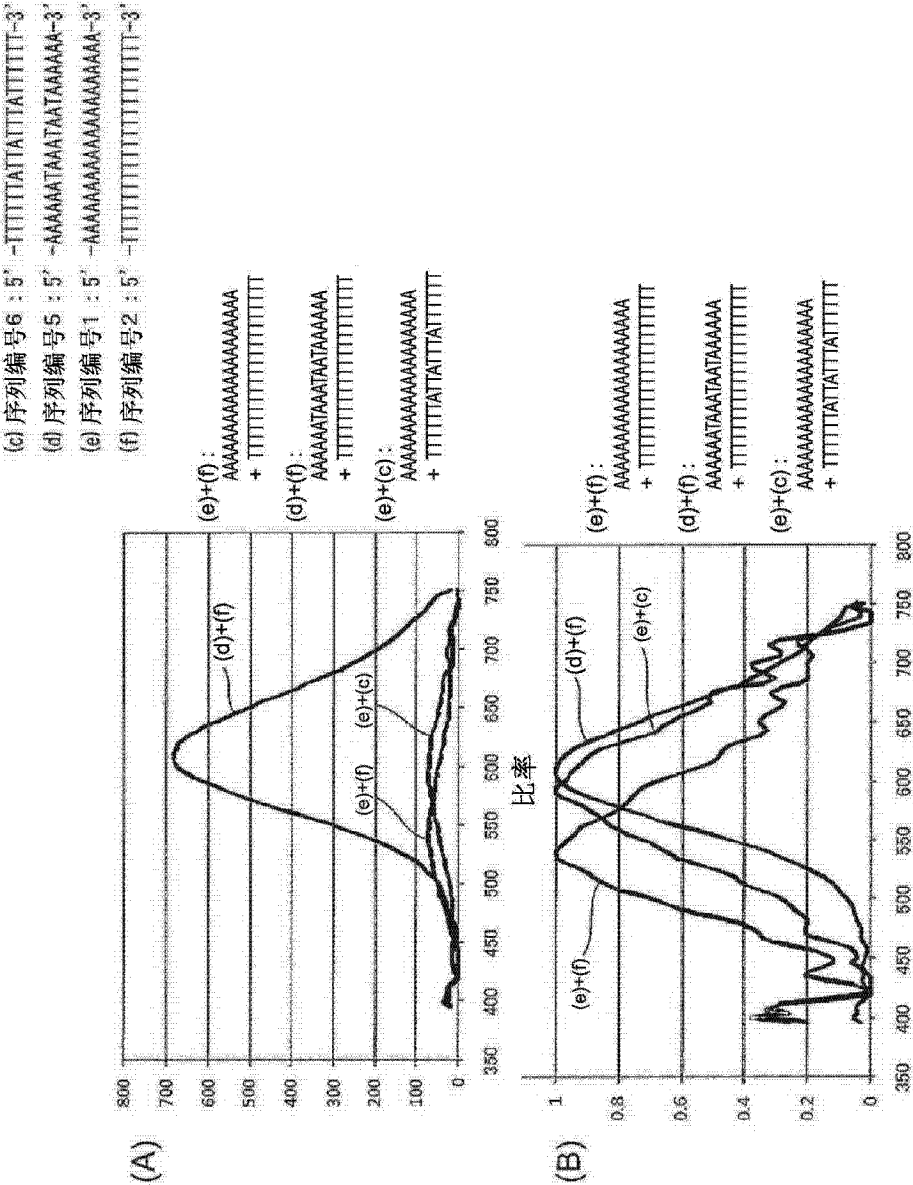


图 20

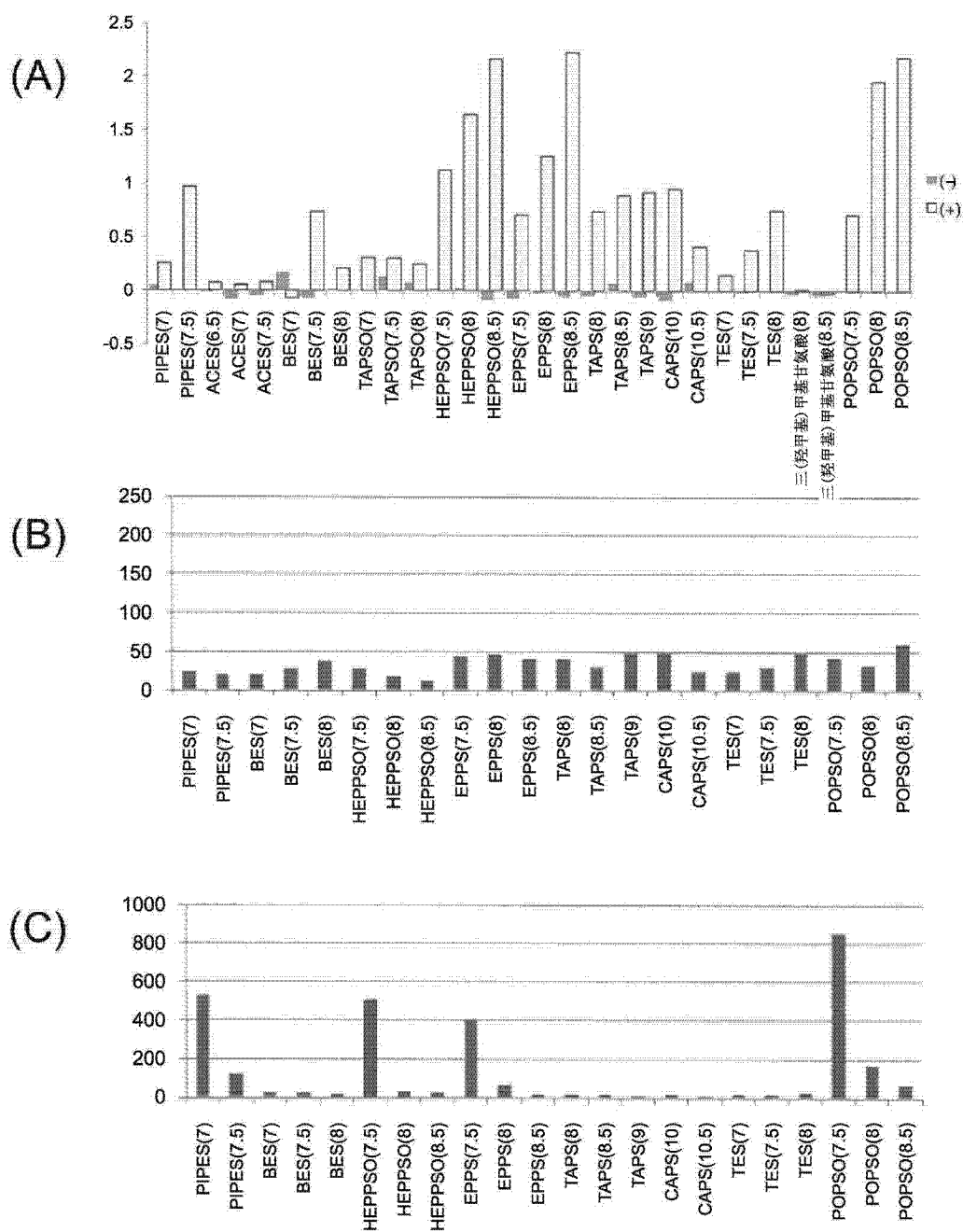


图 21

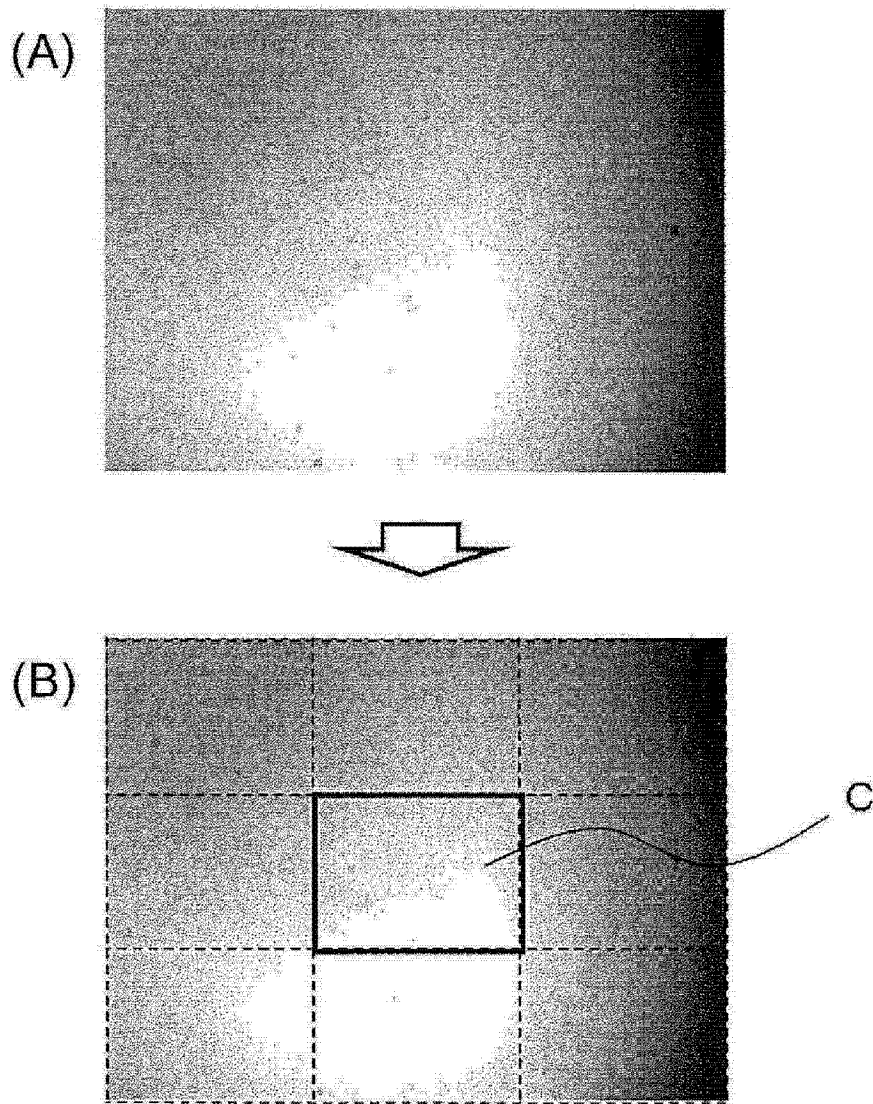


图 22

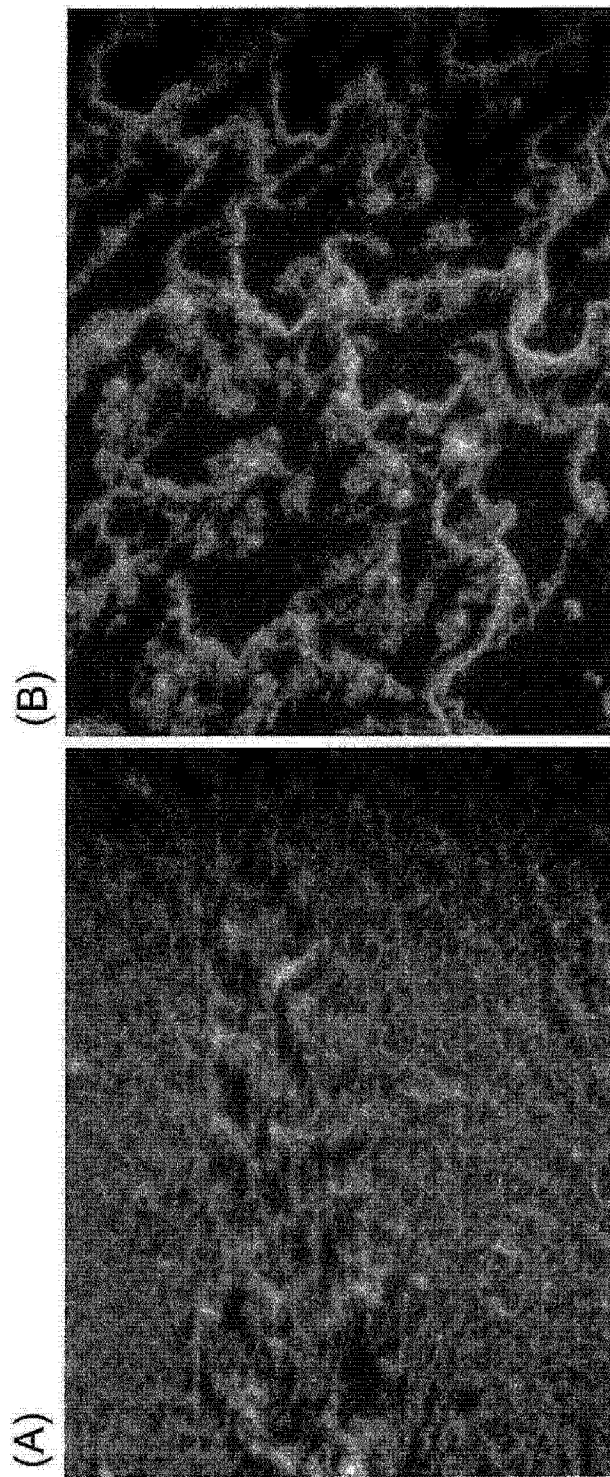


图 23

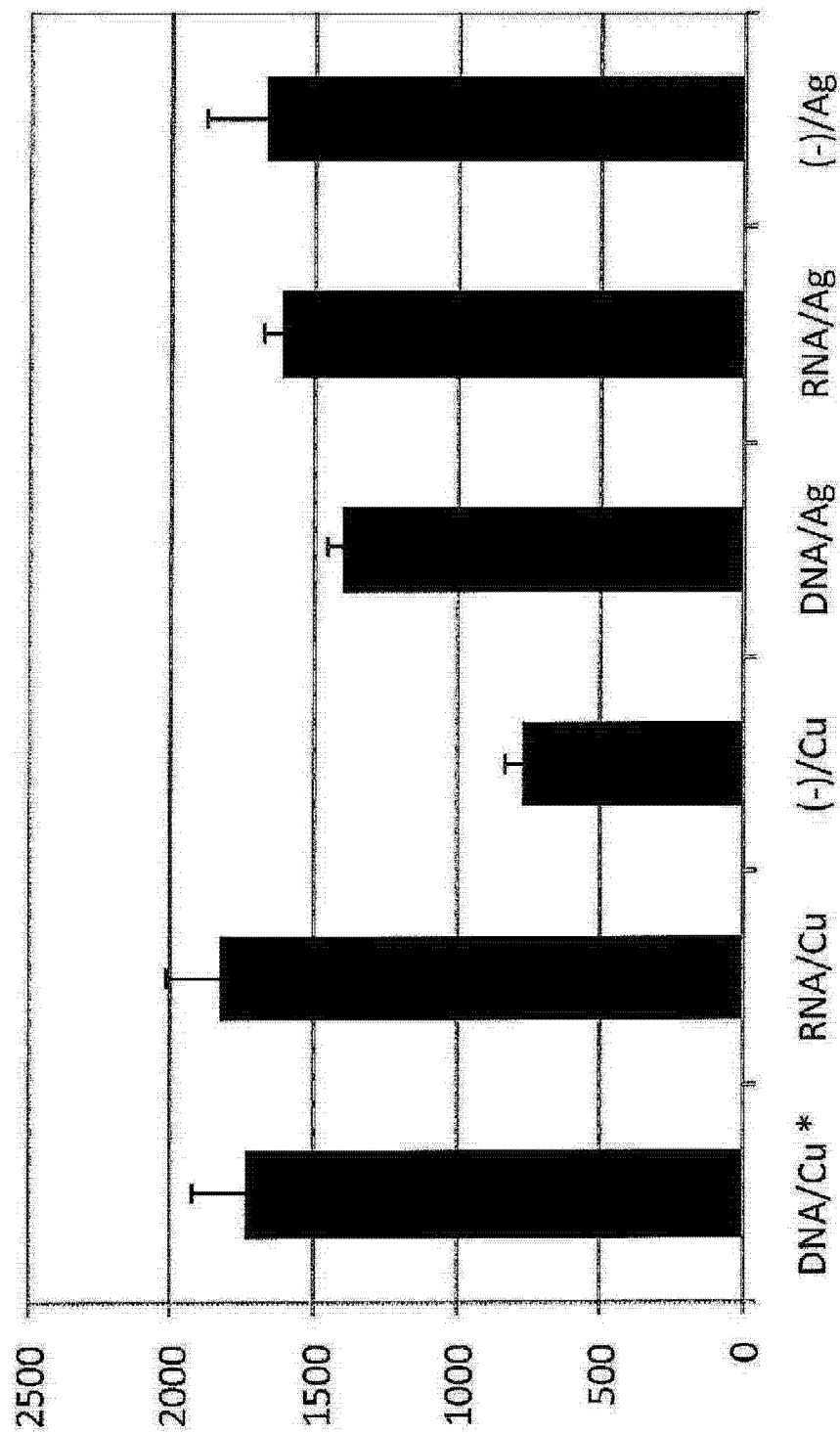


图 24

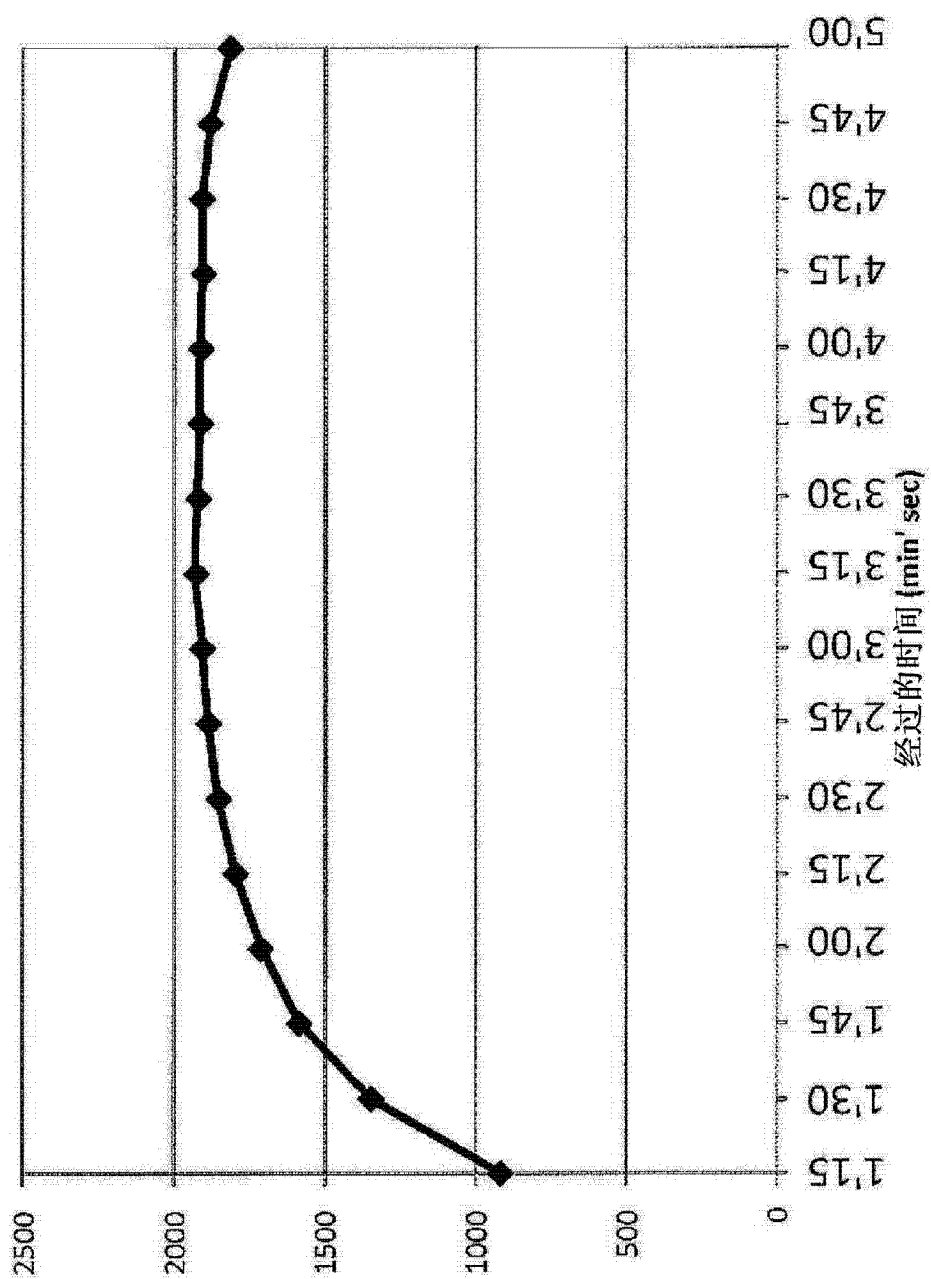


图 25

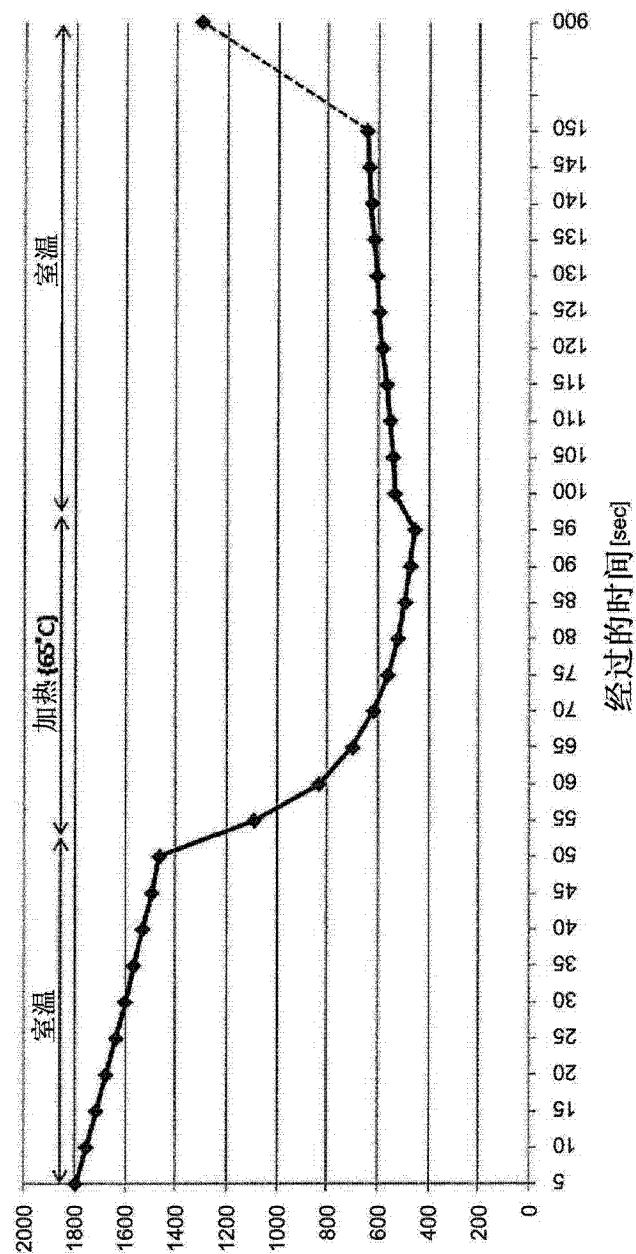


图 26

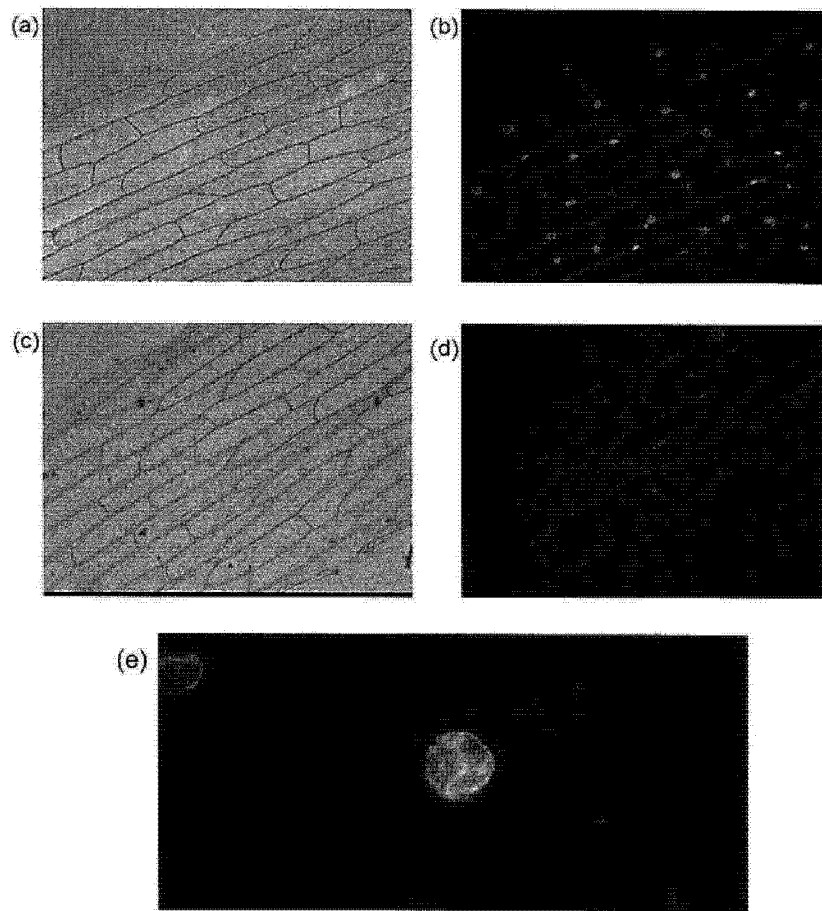


图 27

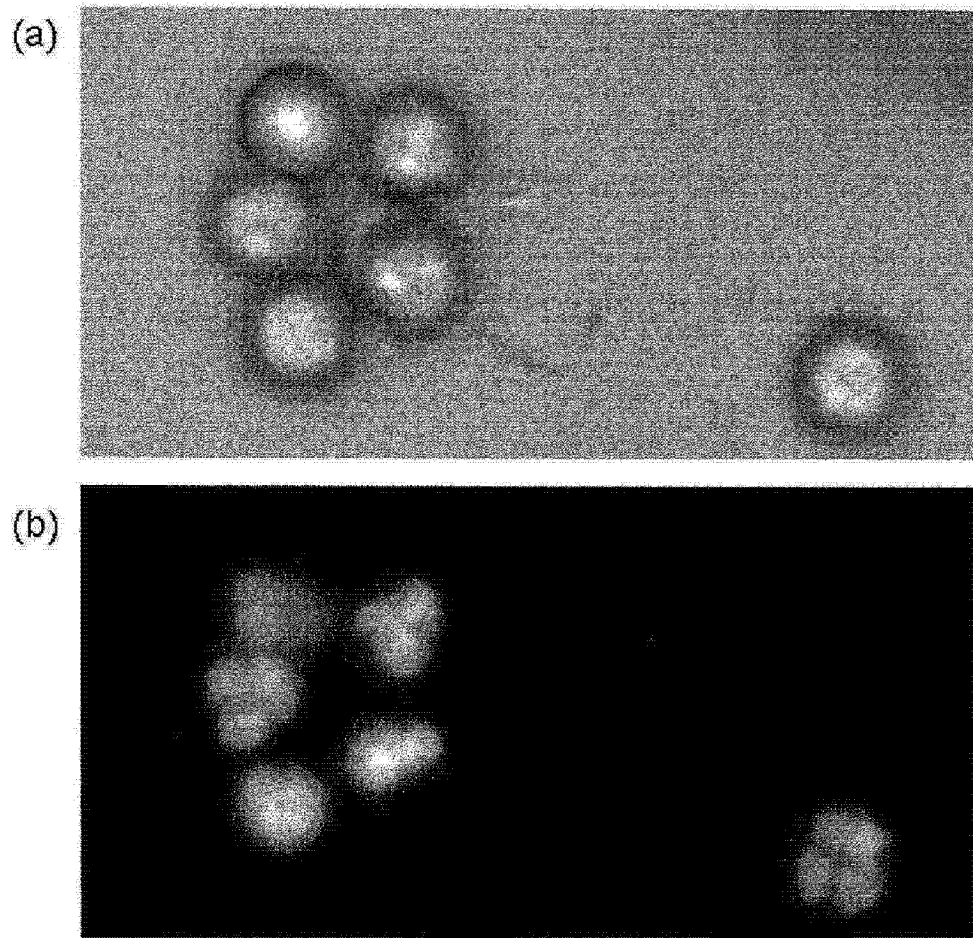


图 28

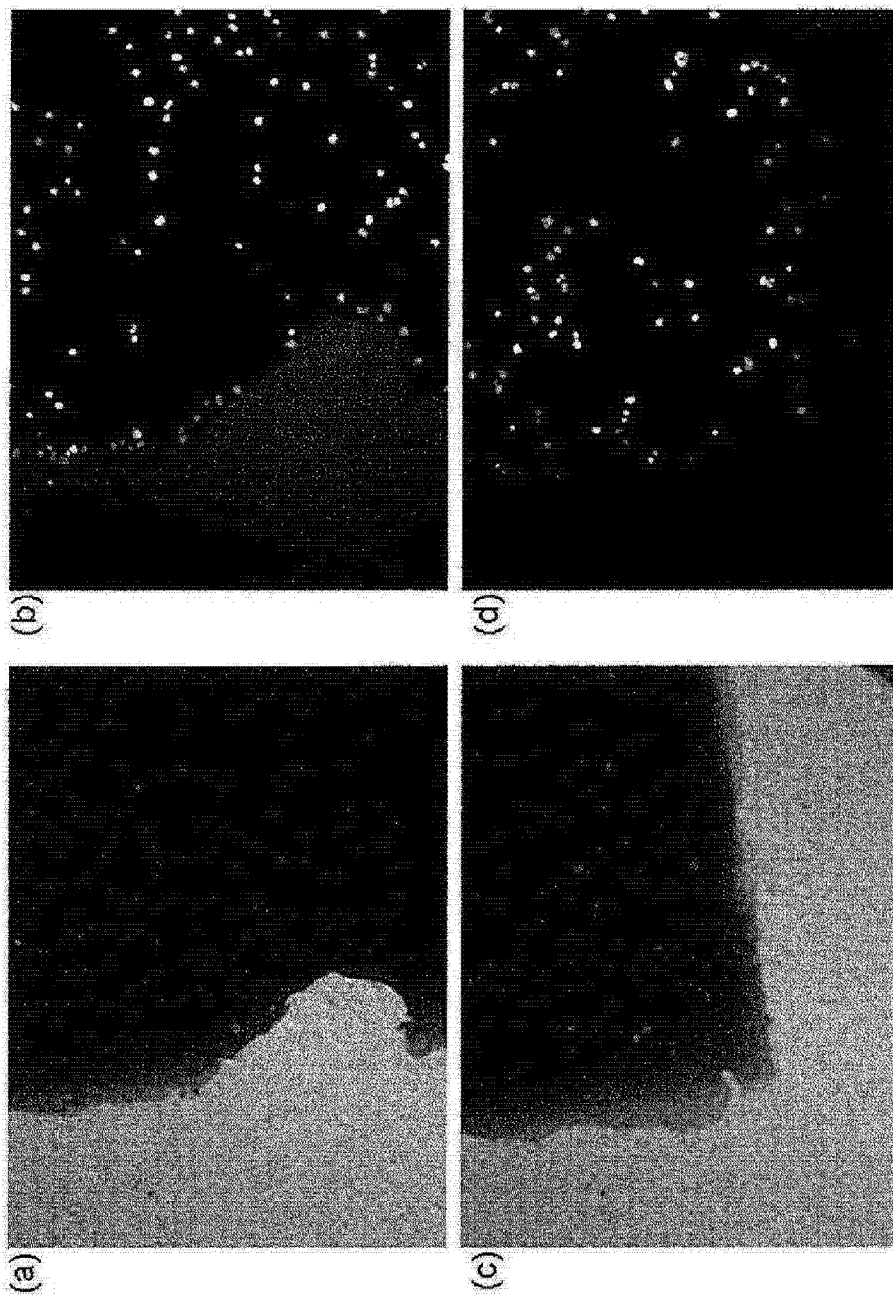


图 29

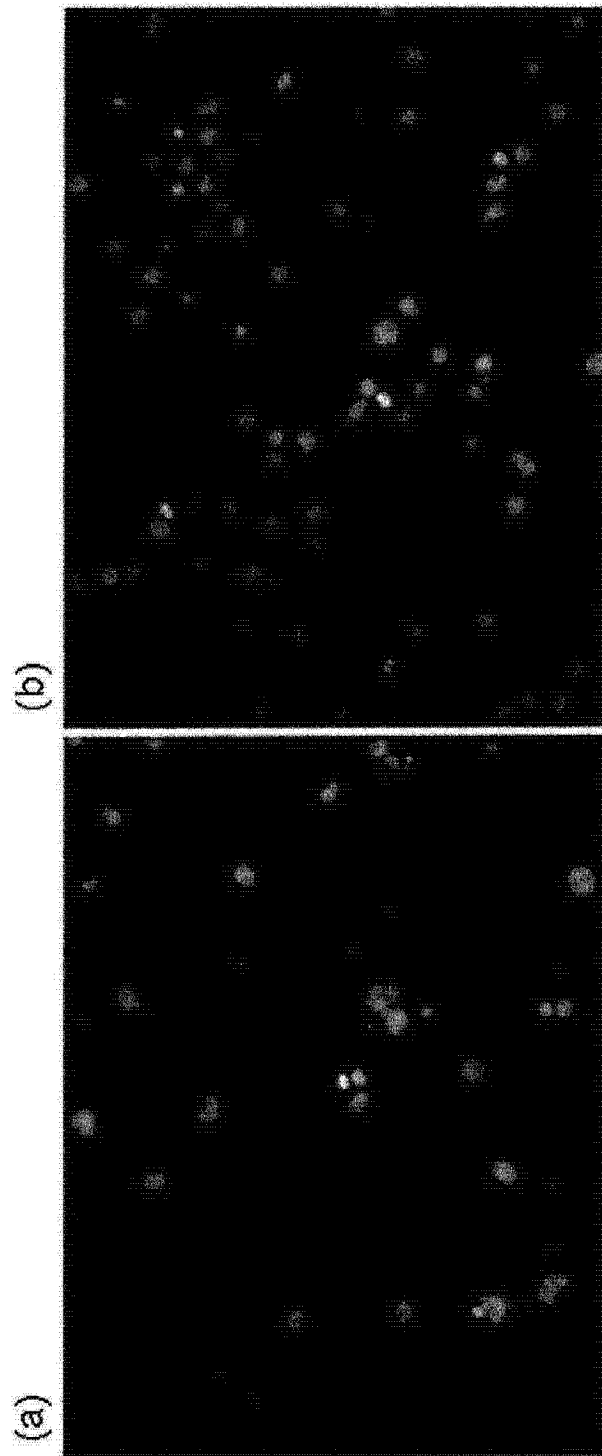


图 30

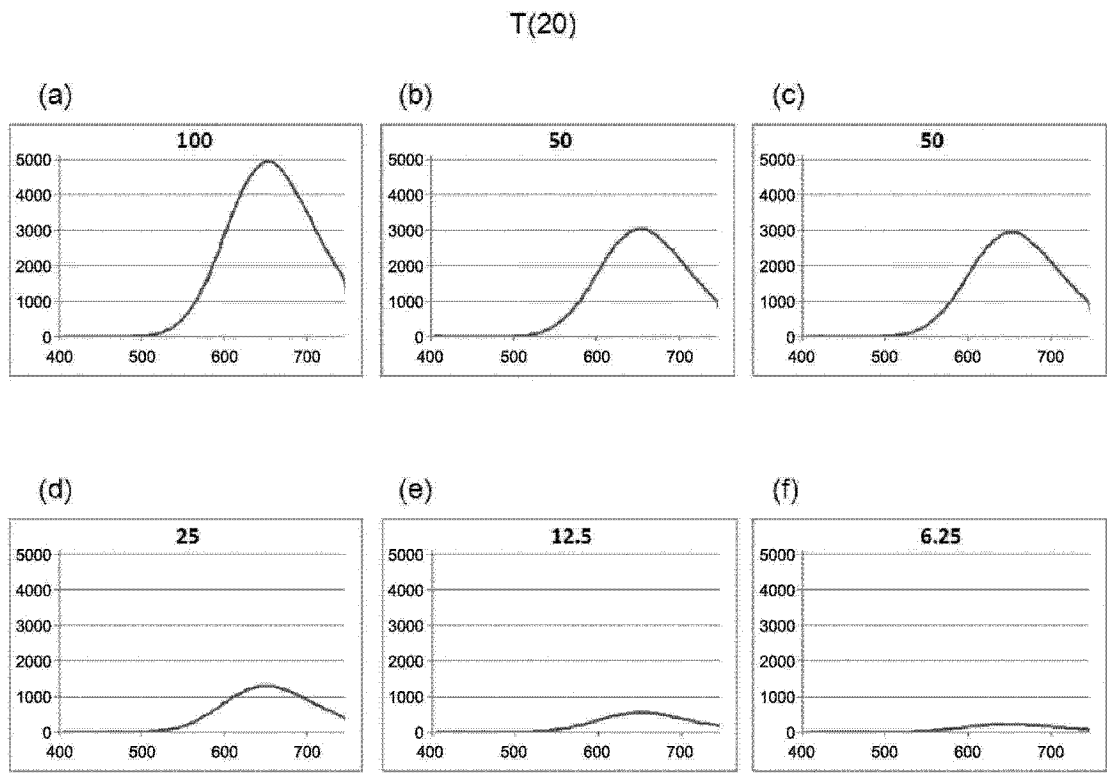


图 31

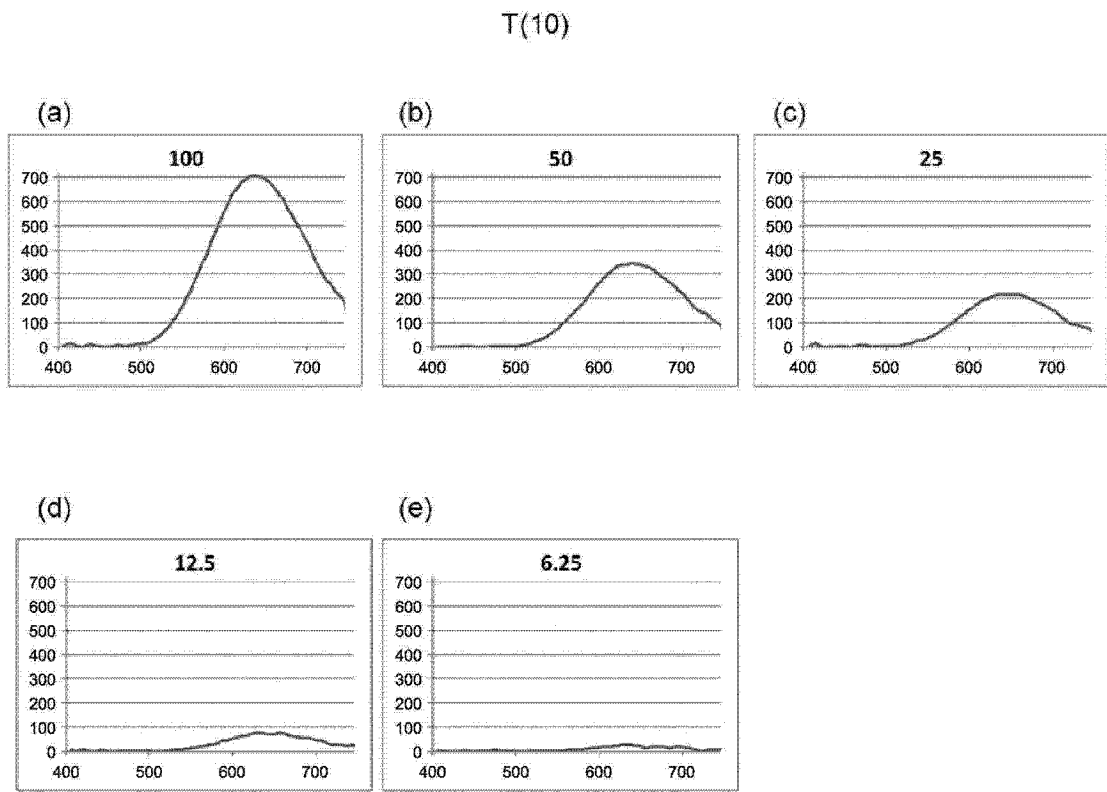


图 32

T(6)

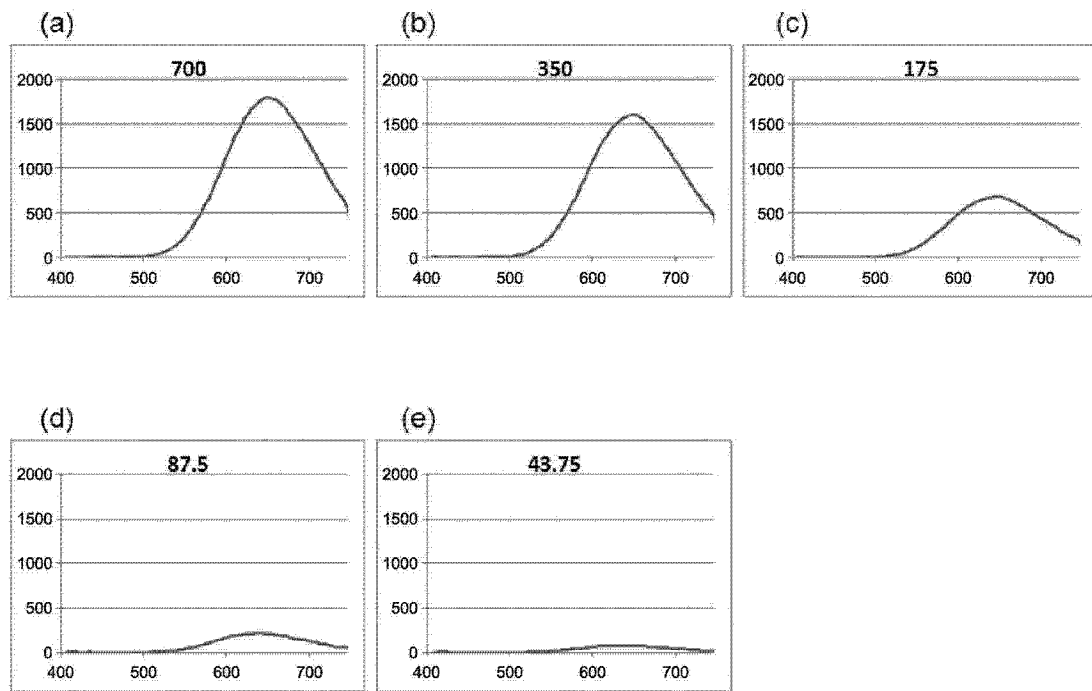


图 33

T(5)

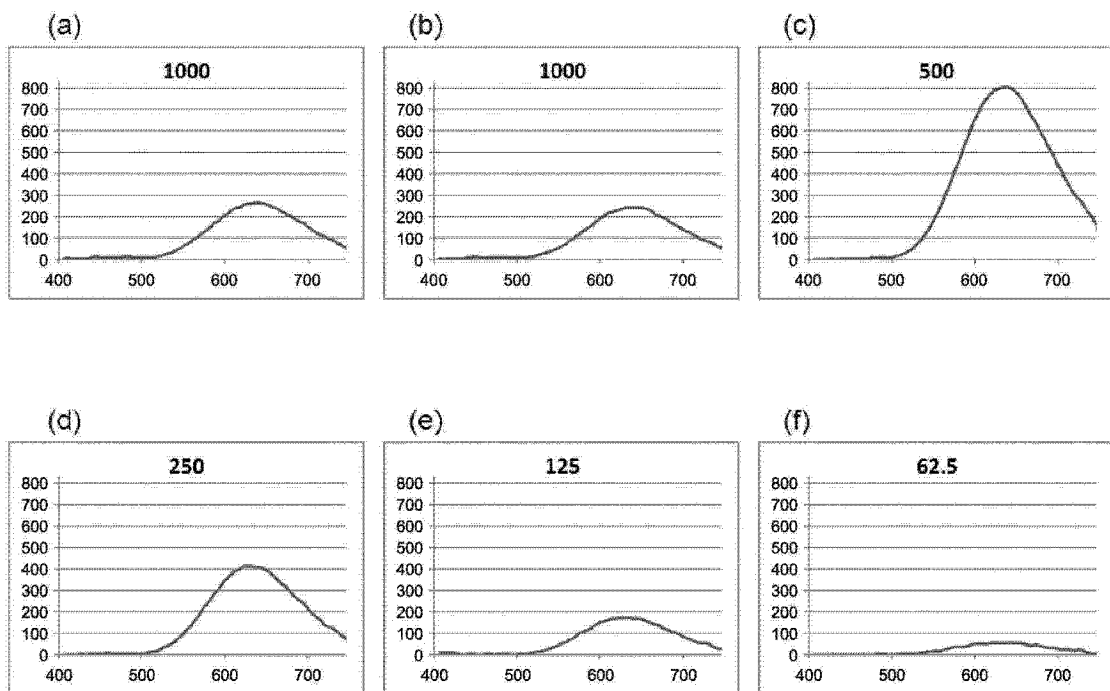


图 34

T(4)

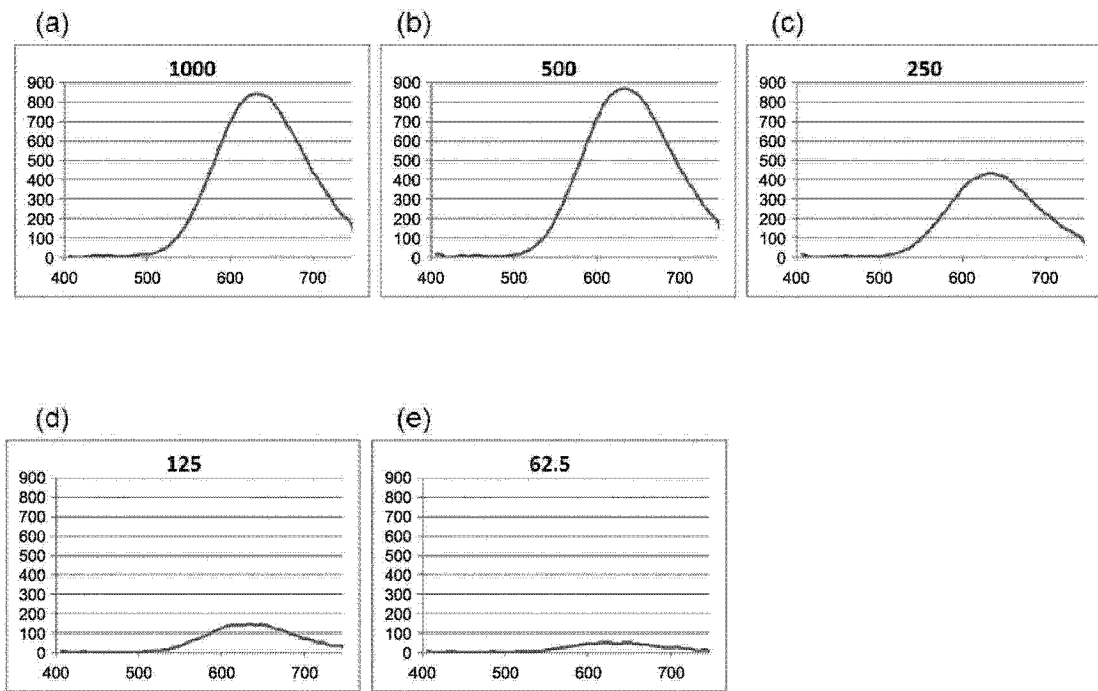


图 35

T(3)

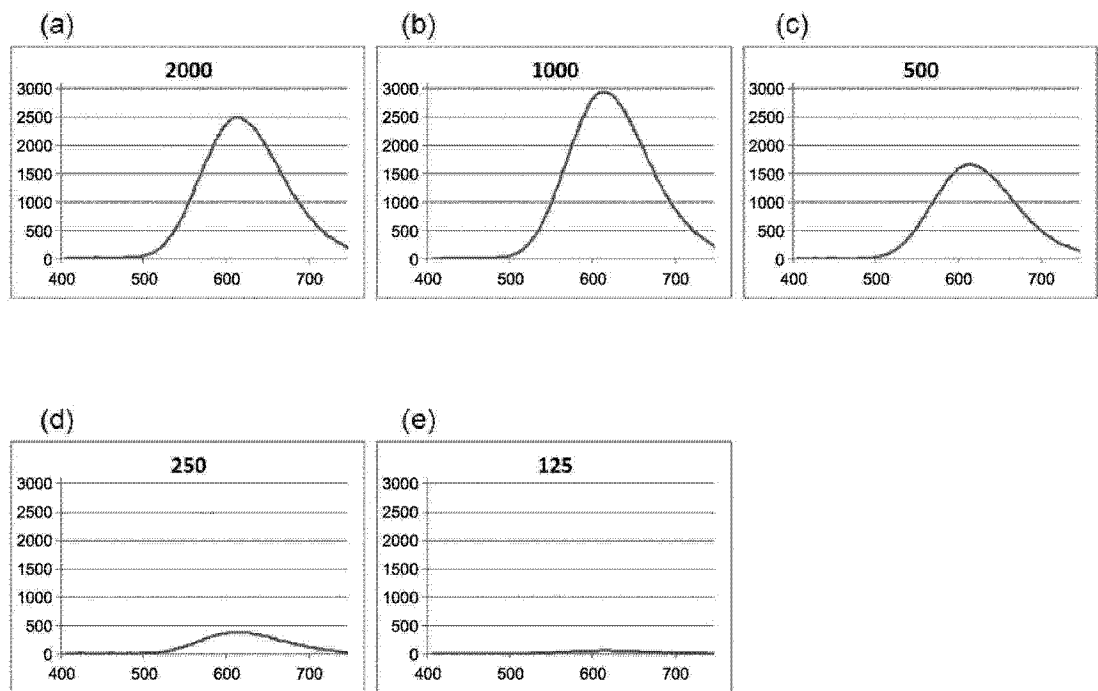


图 36

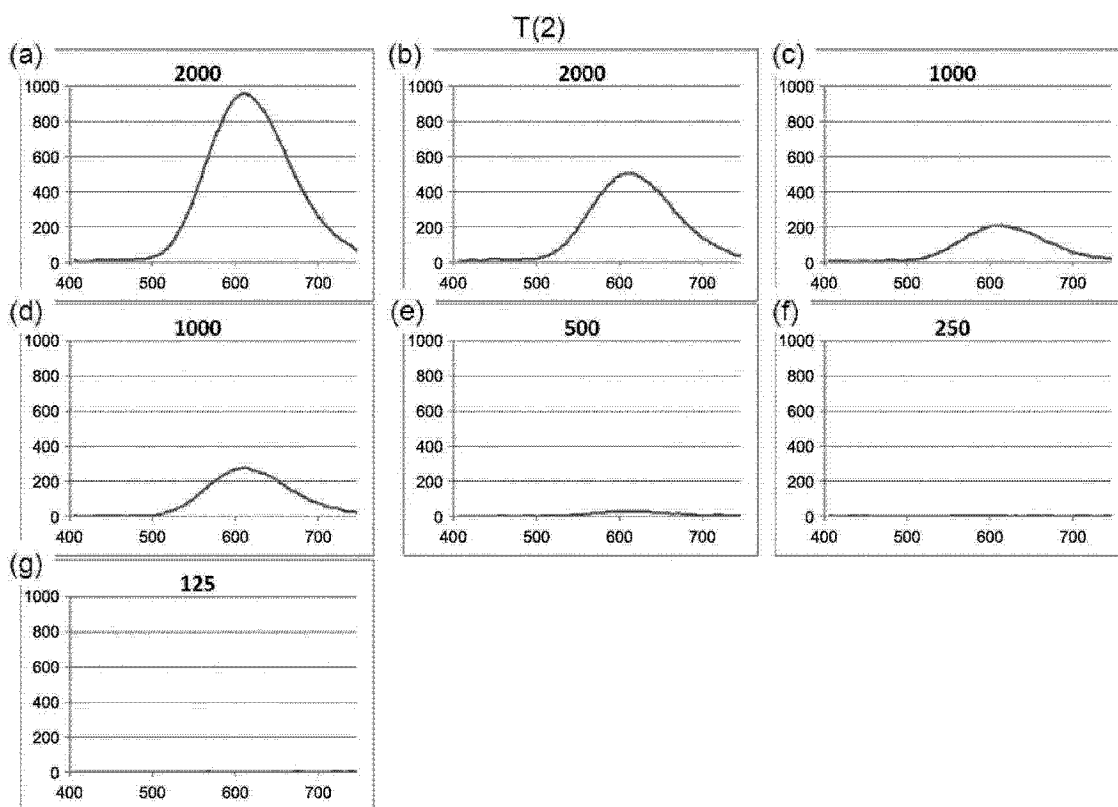


图 37

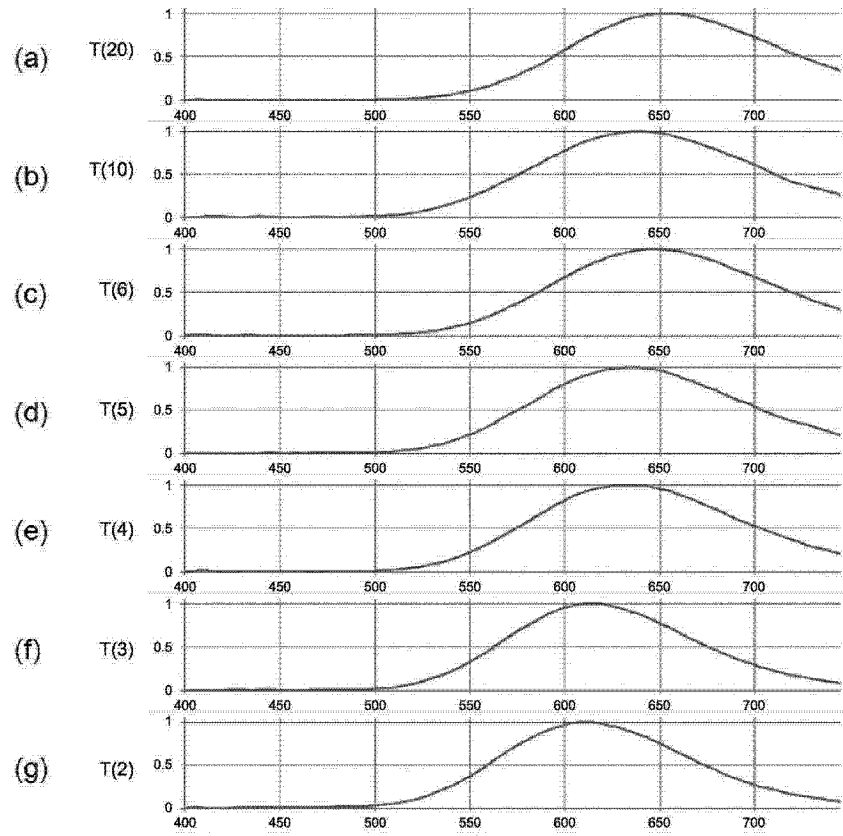


图 38

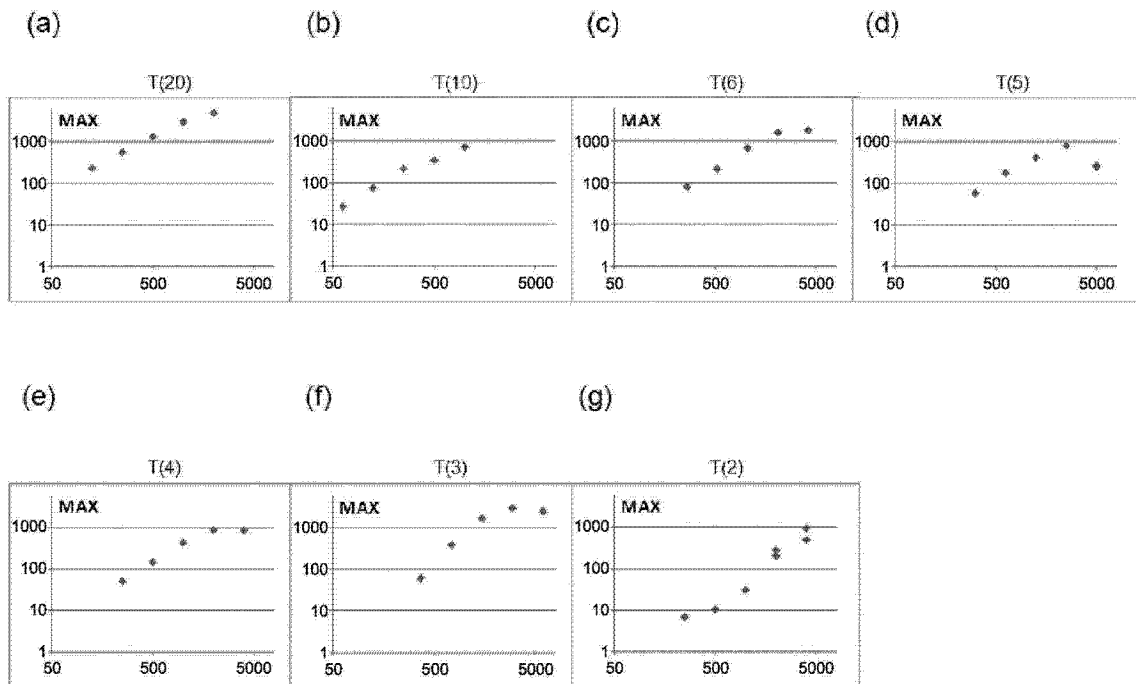


图 39

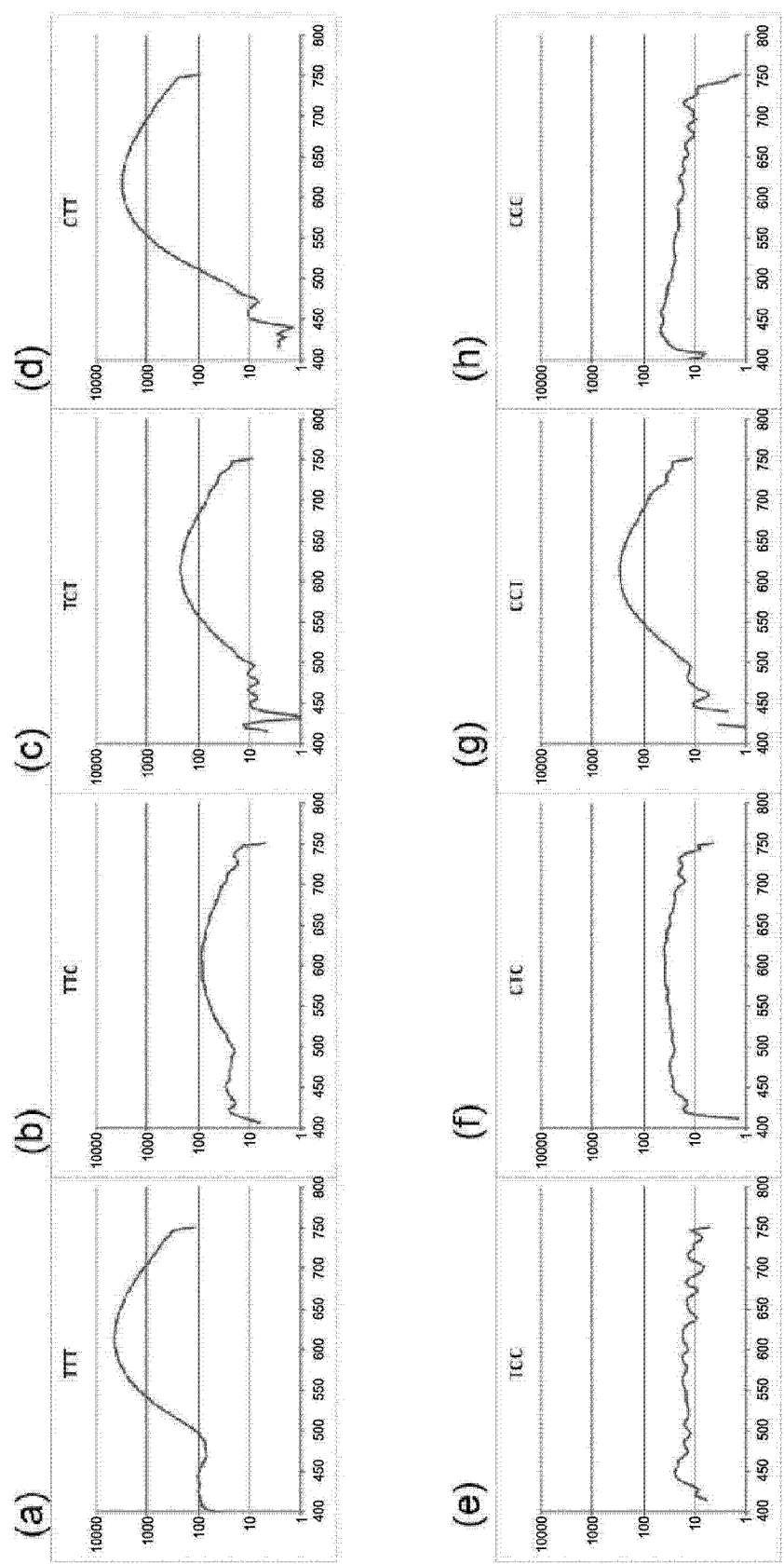


图 40

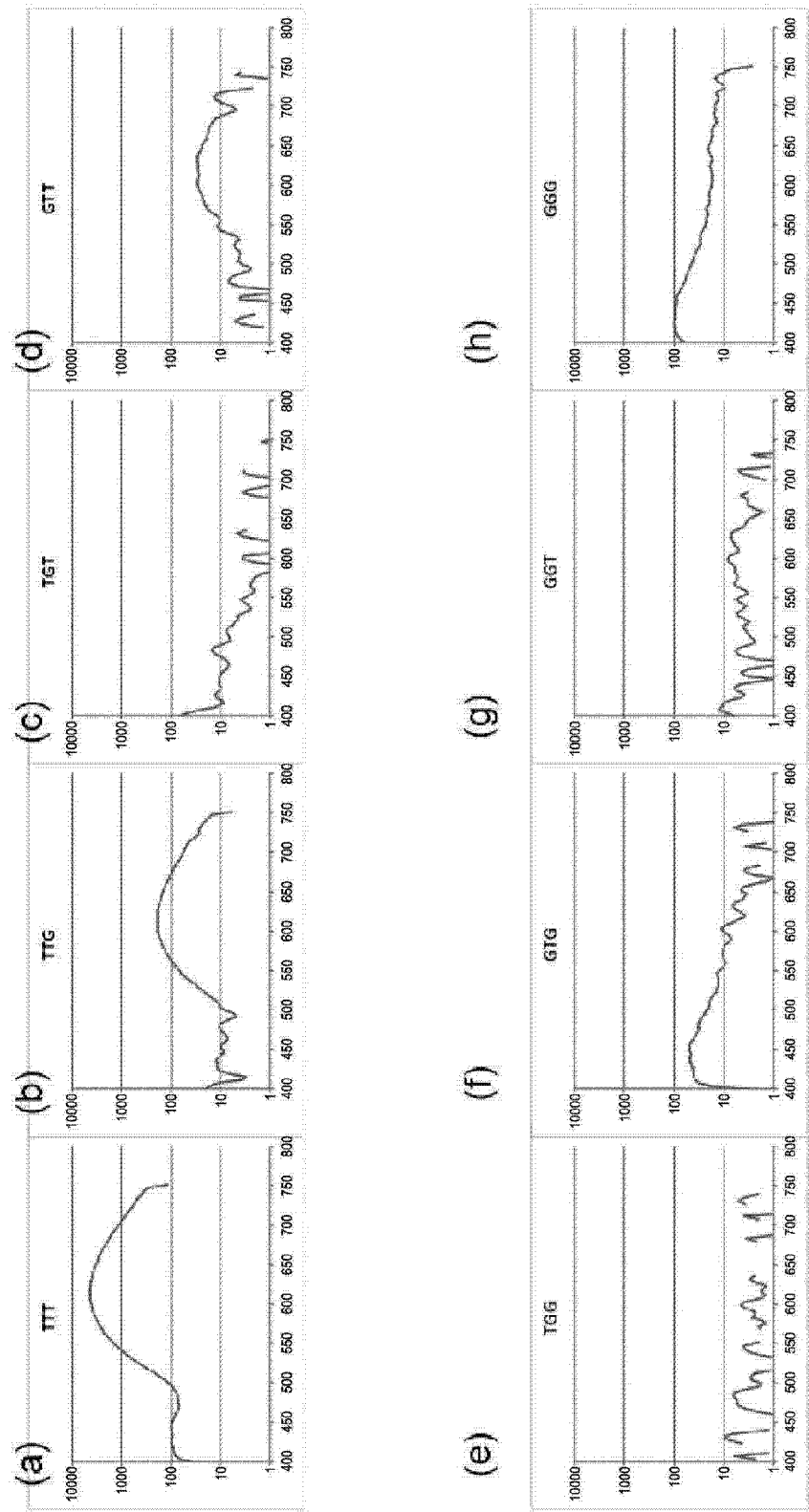


图 41

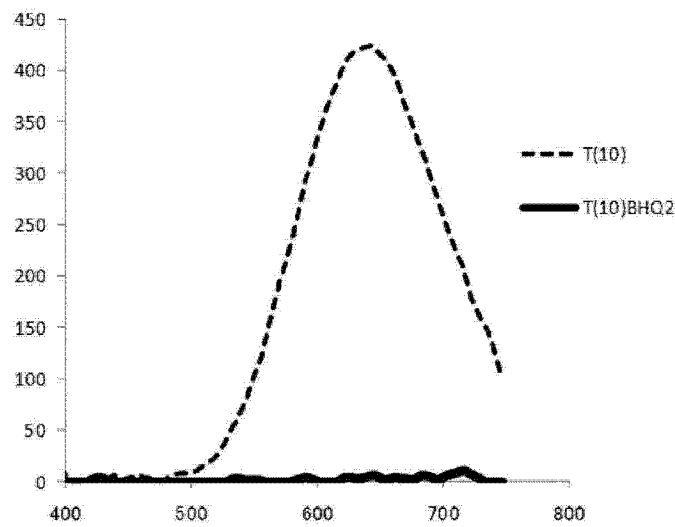


图 42

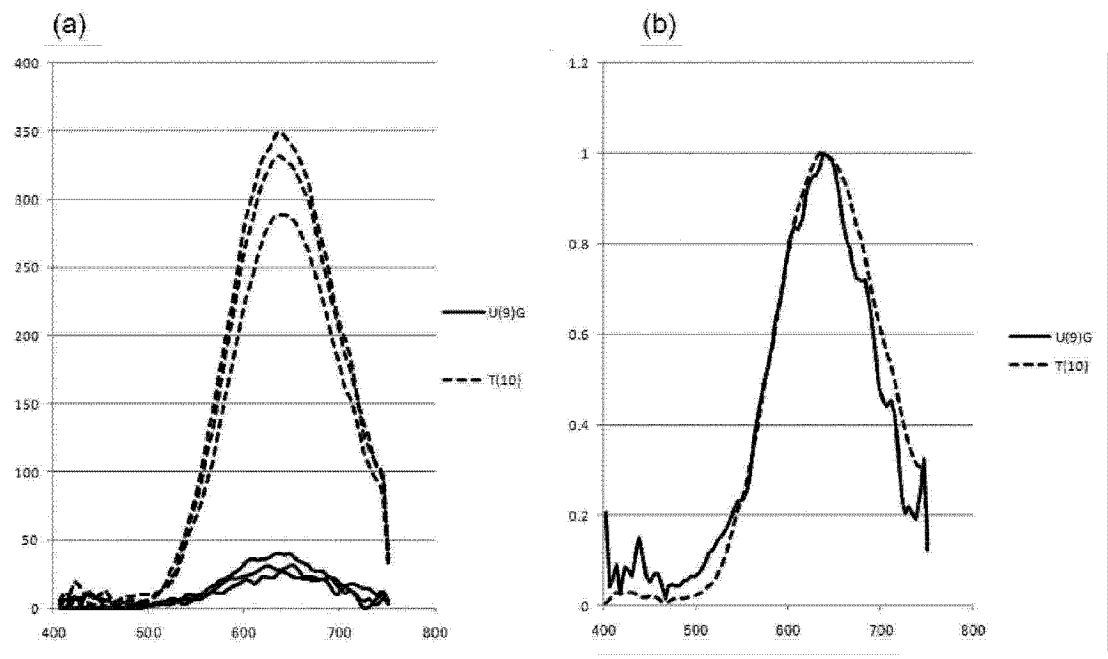


图 43

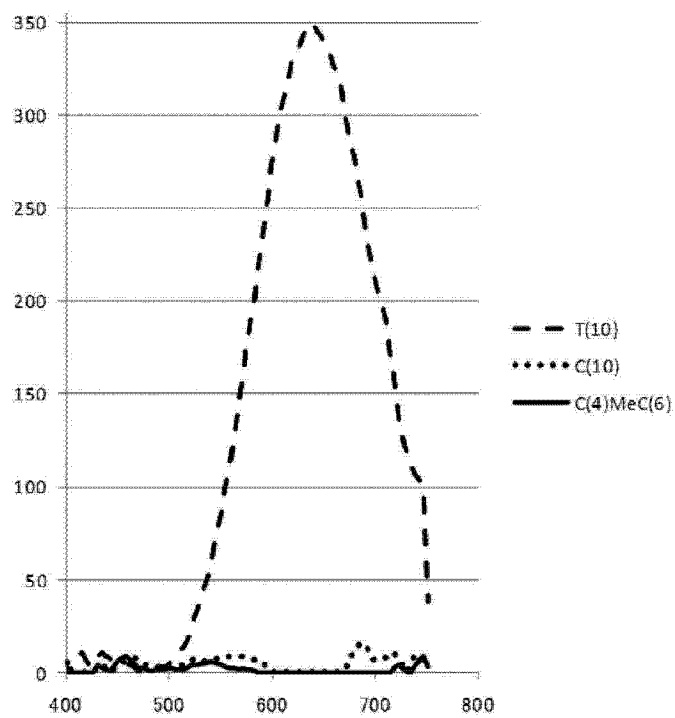


图 44

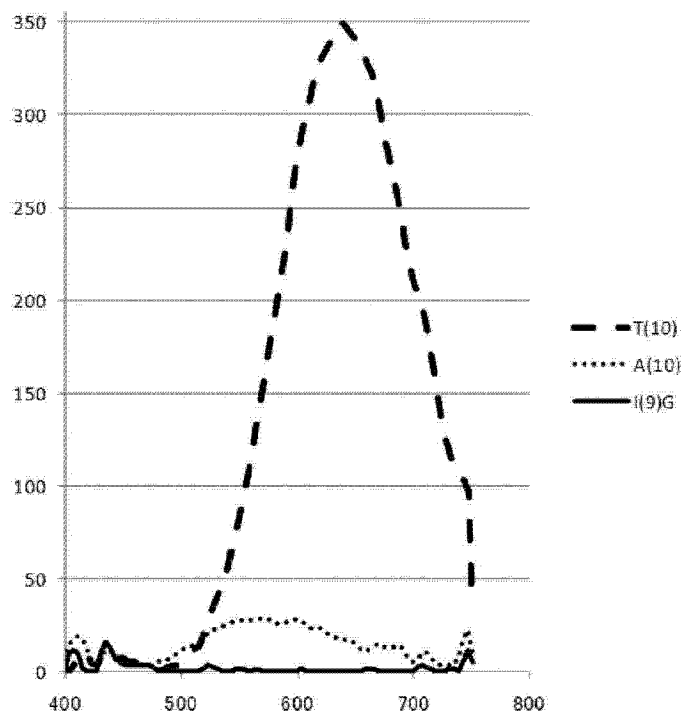


图 45