I799842

(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本 **(11)證書號數：TW I799842 B**

(45)公告日： 中華民國 112 (2023) 年 04 月 21 日

(21)申請案號：110114450 (22)申請日： 中華民國 110 (2021) 年 04 月 22 日

(51)Int. Cl.： ***G01N33/52 (2006.01)*** ***G01N33/566 (2006.01)***

(30)優先權：2020/04/22 日本 2020-076369

(71)申請人：日商日華化學股份有限公司 (日本) NICCA CHEMICAL CO., LTD. (JP)
日本

(72)發明人：岡部綾子 OKABE, AYAKO (JP) ；中社彩香 NAKASHA, AYAKA (JP) ；法木左近 NORIKI, SAKON (JP)

(74)代理人：林志剛

(56)參考文獻：

CN 104803865A CN 105263627A

審查人員：林佑霖

申請專利範圍項數：18 項 圖式數：5 共 58 頁

(54)名稱

核酸的檢測方法及寡核苷酸探針

(57)摘要

本發明提供一種方法，其係作為目標序列的檢測方法，其係具備：雜交步驟，係使具有針對存在於受測試料中的核酸之目標序列的雜交用序列，及在前述雜交用序列中與前述目標序列專一性地進行雜交時可藉由照光而與前述目標序列中的目標鹼基交聯的至少一個共價鍵性基之寡核苷酸探針與前述核酸接觸而形成真正雜交產物；照光步驟，係對前述雜交步驟後的受測試料照光，使前述真正雜交產物中的共價鍵性基與目標序列之間交聯而形成具有交聯結構之真正雜交產物；及變性步驟，係對照光步驟後的受測試料提供維持前述真正交聯雜交產物且可使非專一性雜交產物解離之變性條件，而分離出源自非專一性雜交產物之前述寡核苷酸探針。

專利案號：110114450

公告本

I799842

【發明摘要】

【中文發明名稱】

核酸的檢測方法及寡核苷酸探針

【英文發明名稱】

METHOD OF DETECTING AN NUCLEIC ACID AND OLIGONUCLEOTIDE PROBE

【中文】

本發明提供一種方法，其係作為目標序列的檢測方法，其係具備：雜交步驟，係使具有針對存在於受測試料中的核酸之目標序列的雜交用序列，及在前述雜交用序列中與前述目標序列專一性地進行雜交時可藉由照光而與前述目標序列中的目標鹼基交聯的至少一個共價鍵性基之寡核苷酸探針與前述核酸接觸而形成真正雜交產物；照光步驟，係對前述雜交步驟後的受測試料照光，使前述真正雜交產物中的共價鍵性基與目標序列之間交聯而形成具有交聯結構之真正雜交產物；及變性步驟，係對照光步驟後的受測試料提供維持前述真正交聯雜交產物且可使非專一性雜交產物解離之變性條件，而分離出源自非專一性雜交產物之前述寡核苷酸探針。

【指定代表圖】無

【代表圖之符號簡單說明】無

【特徵化學式】無

【發明說明書】

【中文發明名稱】

核酸的檢測方法及寡核苷酸探針

【英文發明名稱】

METHOD OF DETECTING AN NUCLEIC ACID AND OLIGONUCLEOTIDE PROBE

【技術領域】

【0001】本說明書係有關於一種核酸的檢測方法及寡核苷酸探針。

(相關申請之相互參照)

本申請案係主張基於2020年4月22日所申請之日本專利申請案2020-76369，將此日本專利申請案的內容援用於此作為構成本說明書的一部分者。

【先前技術】

【0002】寡核苷酸探針係屬供觀察基因的突變或擴增之疾病的有用診斷工具。例如與萃取自細胞或組織等檢體之DNA或mRNA等的雜交，在可藉由檢測此種DNA等而診斷出來之感染症或腫瘤等的診斷中屬有用者(專利文獻1)。

【0003】雜交雖為有用的方法，但仍存有各種問題。例如為了充分提高雜交效率，而於低溫下進行雜交，則雜交的專一性會降低。另一方面，若於更高溫下進行雜交，

雖可提升專一性，但靈敏度會降低。作為解決方式之一，現況在於設計高Tm探針，來謀求兼顧確保雜交效率及雜交專一性。又，要提升專一性，方法之一為在雜交後以高嚴謹度條件進行充分的洗淨。

[先前技術文獻]

[專利文獻]

【0004】

[專利文獻1]日本特開2015-142574號公報

【發明內容】

【0005】然而，為達Tm的高溫化而增加探針長度，由此會發生針對目標序列之專一性降低的問題。又，縱使採用藉由高嚴謹度條件的洗淨，仍有非專一性雜交產物殘留或專一性雜交產物被洗去等而明顯使疾病檢查的正確度降低的疑慮。另一方面，並非容易設定僅使專一性雜交產物殘留這類的嚴謹度條件。再者，為達Tm的高溫化，已有人開發出胜肽核酸(PNA)，但使用胜肽核酸時，仍不易藉由高嚴謹度條件進行洗淨。

【0006】由以上所述，不易藉由組合探針的Tm高溫化所致之雜交時的低嚴謹度及洗淨時的高嚴謹度，來提升檢查的正確度及確保再現性。

【0007】在根據雜交之檢查，例如原位(in situ)雜交等中，係要求確立無需大幅依賴習知嚴謹度調節，即可實現正確度及再現性優良之檢查的核酸的檢測方法。

【0008】本說明書係提供一種可實現高正確度及再現性之診斷的核酸的檢測方法。又，提供一種用於所述檢測

方法之寡核苷酸探針。

【0009】本案發明人等獲得以下見解：於寡核苷酸探針內具備可進行光交聯之官能基，於雜交步驟後取得藉由光交聯而交聯之雜交產物，其後，對受測試料提供雜交產物之變性條件，可解決上述課題。本說明書係基於此種見解而提供以下手段。

【0010】[1]一種核酸的檢測方法，其係具備：

雜交步驟，係使寡核苷酸探針與前述核酸接觸而形成真正雜交產物，前述寡核苷酸探針具有針對存在於受測試料中的核酸之目標序列的雜交用序列，及在前述雜交用序列中與前述目標序列專一性地進行雜交時可藉由照光而與前述目標序列中的目標鹼基交聯的至少一個共價鍵性基；

照光步驟，係對前述雜交步驟後的受測試料照光，使前述真正雜交產物中的共價鍵性基與目標序列之間交聯而形成具有交聯結構之真正雜交產物；及

變性步驟，係對照光步驟後的受測試料提供維持前述真正交聯雜交產物且可使非專一性雜交產物解離之變性條件，而分離出源自非專一性雜交產物之前述寡核苷酸探針。

[2]如[1]之方法，其中前述變性步驟係進一步包含亦促進真正雜交產物之雜交的解離，而分離出源自前述真正雜交產物之前述寡核苷酸探針與前述真正交聯雜交產物之步驟。

[3]如[1]或[2]之方法，其中前述雜交步驟係進行原位

(in situ)雜交之步驟。

[4]如[3]之方法，其中前述雜交步驟係對培養細胞或由癌症患者所採取之組織切片內供給前述寡核苷酸探針而實施之步驟。

[5]如[1]～[4]中任一項之方法，其中前述變性步驟包含藉由相對於前述雜交步驟後的受測試料為超過60體積%之濃度下的甲醯胺之水系介質混合液的變性。

[6]如[1]～[5]中任一項之方法，其中前述變性步驟包含使用室溫以上的液體之變性。

[7]如[1]～[6]中任一項之方法，其中前述變性步驟包含藉由含有甲醯胺以外的變性劑之變性液的變性。

[8]如[7]之方法，其中甲醯胺以外的變性劑為四甲基氯化銨。

[9]如[1]～[8]中任一項之方法，其中前述照光步驟係照射極大波長340～380nm的光之步驟。

[10]如[1]～[9]中任一項之方法，其中前述雜交用序列為5個鹼基以上且200個鹼基以下。

[11]如[1]～[10]中任一項之方法，其中前述目標序列為人類HER2蛋白質mRNA中的RNA序列。

[12]如[1]～[10]中任一項之方法，其中前述目標序列為Satb2蛋白質mRNA中的RNA序列。

[13]如[1]～[10]中任一項之方法，其中前述目標序列為EBER小RNA中的RNA序列。

[14]如[1]～[10]中任一項之方法，其中前述目標序列

為28SrRNA中的RNA序列。

[15]如[1]～[14]中任一項之方法，其中前述變性步驟包含藉由相對於前述雜交步驟後的受測試料為80體積%的甲醯胺之水系介質混合液的變性。

[16]一種探針，其係供檢測核酸的寡核苷酸探針，其係具備：

可與前述核酸之目標序列進行雜交的雜交用序列，及在前述雜交用序列中與前述目標序列專一性地進行雜交時可藉由照光而與前述目標序列中的目標鹼基交聯的至少一個共價鍵性基；

前述雜交用序列及至少一個共價鍵性基維持前述雜交用序列與前述目標序列雜交而得的真正雜交產物，且藉由前述照光交聯而得的真正交聯雜交產物，惟其構成可選擇性地去除非專一性雜交產物雜交產物。

[17]一種套組，其係標記寡核苷酸的檢測套組，其係具備：

如[16]之寡核苷酸探針；及

與濃度超過60體積%的甲醯胺之水系介質混合液同等或更高程度的變性劑。

【圖式簡單說明】

【0011】

[圖1]為表示針對Satb2蛋白質mRNA之探針設計的圖。

[圖2]為表示採取自小鼠之大腦切片中的Satb2蛋白質mRNA CISH的圖；(A)表示伴有具共價鍵性基之探針之共價鍵的雜交(以80體積%甲醯胺水溶液變性及洗淨後)；(B)表示伴有具共價鍵性基之探針之共價鍵的雜交(以80體積%甲醯胺TBS溶液變性及洗淨後)。

[圖3]為表示HER2蛋白質mRNA CISH之雜交的圖；(A)表示伴有具HER2陽性細胞中的共價鍵性基之探針之共價鍵的雜交(以80體積%甲醯胺水溶液變性及洗淨後)；(B)表示伴有具HER2陰性細胞中的共價鍵性基之探針之共價鍵的雜交(以80體積%甲醯胺水溶液變性及洗淨後)。

[圖4]為表示EBER(EB病毒產生小RNA)CISH之雜交的圖；(A)表示伴有具共價鍵性基之探針之共價鍵的雜交(以80體積%2×SSC溶液、55℃變性及洗淨後)；(B)表示伴有不具有共價鍵性基之探針之共價鍵的雜交(以80體積%2×SSC溶液、55℃變性及洗淨後)。

[圖5]為表示EBER(EB病毒產生小RNA)CISH之雜交的圖；(A)表示伴有具共價鍵性基之探針之共價鍵的室溫雜交(50體積%甲醯胺2×SSC(室溫)之變性及洗淨後)；(B)表示採市售PNA探針之55℃雜交(高嚴謹度緩衝液，55℃之變性及洗淨後)。

【實施方式】

[實施發明之形態]

【0012】本說明書之揭示內容係有關於一種核酸的檢

測方法及寡核苷酸探針。根據本說明書所揭示之核酸的檢測方法(以下簡稱為本檢測方法)，真正交聯雜交產物係高專一性且不可逆地結合於目標序列。從而，只要為維持真正交聯雜交產物且可使非專一性雜交產物解離之變性條件，即可容易地由非專一性雜交產物分離出真正交聯雜交產物而驗出。亦即，根據上述變性條件，無需大幅依賴嚴謹度強度，即能以優良的正確度及再現性檢測出目標序列的核酸。結果能以高靈敏度檢測出真陽性，並以高專一度檢測出真陰性。

【0013】以下針對本說明書之揭示的代表性且非限定性的具體例，適宜參照圖式詳細加以說明。此詳細說明僅意圖對本業者示出供實施本案之較佳實例的細節，而非意圖限定本案的範圍。又，以下所揭示之追加之特徵以及發明，為了進一步提供獲改善之核酸的檢測方法，可有別於其他特徵或揭示，或共同使用。

【0014】又，以下詳細說明所揭示之特徵或步驟的組合，以最廣意義實施本案實非為必須者，尤其是僅為了說明本案的代表具體例而記載者。再者，上述及下述之代表性具體例的各種特徵，以及獨立項及附屬項所記載者的各種特徵，在提供本案之追加且有用的實施形態時，必須如此處所記載之具體例，或者如列舉之順序地組合。

【0015】本說明書及/或請求項所記載之所有特徵係有別於實施例及/或請求項所記載之特徵的構成，針對申請當時之揭示以及請求之特定事項予以限定，意圖個別且

彼此獨立地揭示。再者，與所有數值範圍及群體或集團有關之記載係針對申請當時之揭示以及請求之特定事項加以限定，意圖揭示彼等的中間構成。

【0016】以下針對本說明書所揭示之核酸的檢測方法及寡核苷酸探針等加以詳細說明。

【0017】此外，本說明書中所稱受測試料，不特別限定，只要是要求檢測目標核酸的試料即可。從而，受測試料只要是可能含有所欲檢測之核酸的試料即可，除直接採取自天然或生物體的試料外，亦包含針對此種試料，萃取出試料中的DNA或RNA之試料及將此種試料中的DNA或RNA，藉由週知之核酸擴增方法等使其含量增大或經反轉錄的試料。受測試料可舉出例如由人類或家畜等動物人為採取或自然分離之血液、尿液等各種生物體液體試料、細胞試料及組織試料以及針對此等進行核酸的萃取、擴增或反轉錄等之加工試料等所謂醫療上或衛生上的檢體試料。又，受測試料包含由植物或其他生物人為採取或自然分離之各種部分或形態的生物體試料或加工試料。再者，受測試料包含屬非醫療目的且可能含有核酸的試料。

【0018】又，本說明書中所稱核酸，除保持生物體之DNA及RNA之天然核酸外，只要具有本說明書所揭示之與寡核苷酸探針的交聯鍵結性，則亦包含含有針對此等構成部分之修飾的修飾DNA及RNA。又，就DNA而言，只要是可保持生物體之源自天然的DNA或由外部人工導入的DNA則不特別限定，包含基因體或質體等載體上的DNA。再

者，就RNA而言，只要是可保持生物體之源自天然的RNA或由外部導入的RNA則不特別限定，包含mRNA、tRNA、rRNA、siRNA或miRNA等ncRNA、核糖核酸酵素及雙股RNA等。

【0019】例如目標序列不特別限定，包含作為週知之核酸的檢測方法之對象的核酸中的目標序列。作為目標序列，係例如與該生物中特定基因有關之核酸及其他序列上的特徵、與表徵該生物個體之基因有關之核酸上的突變及其他序列上的特徵、與表徵該動物或植物的疾病或病原體之基因有關之核酸、該核酸上的突變、其他序列上之特徵等的至少一部分的序列。

【0020】

(核酸的檢測方法)

本說明書所揭示之核酸的檢測方法係使用具有：針對存在於受測試料中的核酸之目標序列的雜交用序列，及在前述雜交用序列中與前述目標序列專一性地進行雜交時可藉由照光而與前述目標序列中的目標鹼基交聯的至少一個共價鍵性基的寡核苷酸探針。以下就寡核苷酸探針加以說明，其後針對本檢測方法加以說明。

【0021】

(寡核苷酸探針)

本說明書所揭示之寡核苷酸探針(下稱本探針)係以具有週知作為天然核酸或修飾核酸之骨架的單股核酸形式製備。去氧核糖或核糖以外的核酸骨架可舉出例如D-蘇胺醇

等週知之骨架。本探針係具有例如可經修飾之去氧核糖及/或核糖藉由磷酸酯鍵或其他類似之連結基所成之鍵結連結而成的骨架。又，就本探針而言，作為鹼基，典型上除後述之共價鍵性基外，亦具備構成可與受測試料中之DNA雜交的天然DNA之鹼基。

【0022】本探針係與週知之寡核苷酸探針同樣地具有針對目標序列之雜交用序列。於此，目標序列的長度不特別限定，係隨用途或目標核酸的種類，例如為約10mer以上300mer以下，又例如為10mer以上300mer以下，又例如為10mer以上200mer以下，又例如為10mer以上100mer以下，又例如為10mer以上50mer以下，又例如為5mer以上50mer以下。且例如為20mer以上200mer以下，又例如為20mer以上100mer以下，又例如為20mer以上80mer以下，又例如為20mer以上70mer，又例如為20mer以上50mer以下。根據本檢測方法，雜交用序列的長度縱為100mer或50mer以下，仍僅於完全匹配時形成真正交聯雜交產物，藉由後述之變性步驟可有效去除真正交聯雜交產物以外者，結果可確保高S/N比。

【0023】雜交用序列係具有可對目標序列專一性地進行雜交之程度的互補性。如後段所說明，本探針係具備至少1個共價鍵性基以供取代雜交用序列中的鹼基，因此對應該共價鍵性基的位置之至少1個鹼基除外的鹼基序列，相對於目標序列具備例如90%以上的同一性，又例如為95%以上的同一性，又例如為98%以上的同一性，又例如

為99%以上的同一性，又例如為100%的同一性。此外，就同一性係於後段說明。

【0024】此外，只要為本業者，除鹼基長度外，亦可適度考量雜交時的Tm來設定目標序列及雜交用序列。

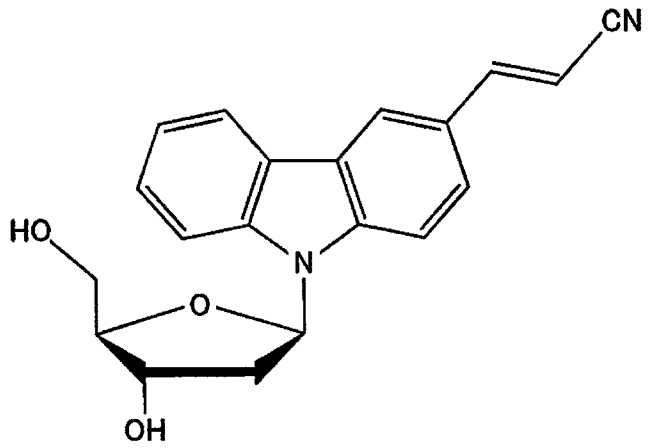
【0025】就本探針，於雜交用序列中，可具備在雜交用序列中與前述目標序列專一性地進行雜交時可藉由照光而與前述目標序列中的目標鹼基交聯的至少一個共價鍵性基。所述共價鍵性基係結合於鹼基序列中的骨架，例如去氧核糖或核糖而具備。

【0026】共價鍵性基不特別限定，可舉出例如日本特開2016-145229號公報、日本特開2017-210448號公報及日本特開2019-26569號公報等所揭示之週知光交聯性之交聯性官能基。此等均藉由照光，在與相鄰於與該共價鍵性基配對之目標序列中的鹼基的3’之鹼基位置(+1位：從配對鹼基錯開鹼基一個分3’側的位置)的嘧啶鹼基之嘧啶環之間形成交聯結構。

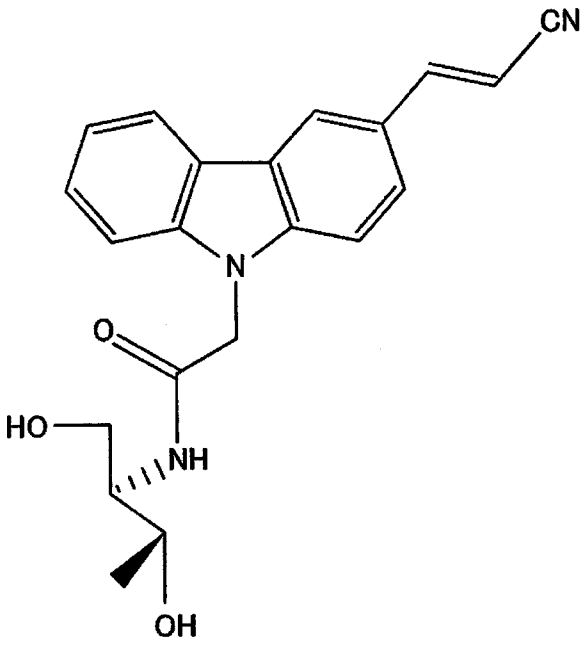
【0027】以下示出例如日本特開2016-145299號公報所揭示之具備共價鍵性基的去氧核糖核苷。當本探針為DNA探針時，係使所述核苷以(1’-5’)-磷酸二酯鍵於相鄰之核苷鍵結而具備。

【0028】

【化1】



【化2】



【0029】形成交聯結構的嘧啶鹼基不特別限定，若為DNA，係胸腺嘧啶(T)或胞嘧啶(C)；若為RNA，則為胞嘧啶(C)或尿嘧啶(U)。此外，此等鹼基，只要可與共價鍵性基進行光交聯則可經修飾，可舉出5-甲基胞嘧啶、5-羥甲基胞嘧啶等。

【0030】共價鍵性基，為了取代與相鄰於目標序列中

的例如目標序列中之嘧啶鹼基的5’側之鹼基位置(-1位)的鹼基配對之任意鹼基，而具備於雜交用序列。換言之，共價鍵性基係於雜交用序列中，為了取代相鄰於嘌呤鹼基(腺嘌呤(A)或鳥嘌呤(G))的3’側之鹼基位置(+1位)的任意鹼基而具備。又，共價鍵性基係為了取代與相鄰於目標序列中之嘧啶鹼基的3’側之鹼基位置(+1位)的鹼基配對之任意鹼基而具備於雜交用序列。換言之，共價鍵性基係於雜交用序列中，為了取代相鄰於嘌呤鹼基(腺嘌呤(A)或鳥嘌呤(G))的5’側之鹼基位置(-1位)的任意鹼基而具備。

【0031】共價鍵性基係於例如去氧核糖、核糖及D-蘇胺醇等骨架中結合鹼基之部分替代鹼基而具備。

【0032】只要為本業者，可基於日本特開2016-145229號公報、日本特開2017-210448號公報及日本特開2019-26569號公報等當中所記載，且與此等公報及本案申請時之DNA等的合成技術有關的技術常識及周知技術而容易地合成出在DNA或RNA中具備共價鍵性基之本探針。

【0033】本探針中的共價鍵性基的個數不特別限定，係隨雜交用序列的長度，且隨標記要素的種類或靈敏度而異。例如雜交用序列為約10～100mer時，共價鍵性基例如為1個以上10個以下，又例如為1個以上6個以下，又例如為1個以上5個以下，又例如為1個以上4個以下，又例如為1個以上3個以下，又例如為1個以上2個以下。當一個探針中具備2個以上之共價鍵性基相連的部位時，且進一步具備追加之共價鍵性基時，較佳為從相連之共價鍵性基隔開

至少10個鹼基以上而具備追加之共價鍵性基。

【0034】又，本探針中的共價鍵性基的位置不特別限定，例如為5’末端側及/或3’末端側，可採盡可能不抑制本探針對目標序列之雜交的位置。典型上為5’末端側區域或3’末端側區域。此處所稱5’末端側區域，係指例如從5’末端之端末起雜交用序列之總鹼基數的20%以內的數之鹼基內；所稱3’末端側區域，係指例如從3’末端之端末起雜交用序列之總鹼基數的20%以內的數之鹼基內。又，共價鍵性基若為例如5’末端側，只要是從末端起更靠內側即可；若為3’末端側，只要至少1個以上存在於內側即可。

【0035】另一方面，共價鍵性基的位置，例如雜交用序列若為約10mer以上100mer，則可位於其雜交用序列之中央部分，亦即自本探針之5’末端及3’末端起分別超過雜交用序列之鹼基長度的25%的範圍內。雜交用序列若為一定長度以上，即使位於雜交用序列之中央部分，仍可不妨礙與目標序列之專一性雜交地形成真正雜交產物及真正交聯雜交產物。

【0036】本探針亦能以例如長目標序列，典型上為相對於超過數百mer～數千mer之目標序列，具備約10～100mer之雜交用序列的多個(例如約數根～數十根)探針組形式製備。長探針其序列專一性較高，但S/N比略差；而10～100mer之本探針其序列專一性雖較低，但完全匹配時可進行光交聯，其後可藉由變性而去除非專一性雜交產物或未交聯真性雜交產物，因此，即使以多個探針檢測長目標

序列，仍可確保高S/N比，且可避免或充分抑制偽陽性之檢測結果。再者，約10～100mer之探針，與長探針相比合成成本較低，且對細胞的滲透性亦良好。

【0037】本探針可視需求具備標記要素。標記要素係其本身或可藉由激發等而產生訊號之訊號產生要素者，此外，亦可進一步為其本身雖不會產生訊號，但可與可和訊號產生要素結合之訊號產生要素結合的結合要素。此種訊號產生要素及結合要素，於本技術領域中對於本業者為周知者，本業者可視需求選擇標記要素而提供至本探針。

【0038】

(雜交步驟)

本檢測方法可具備使本探針與受測試料中的目標核酸接觸而形成真正雜交產物之雜交步驟。於雜交步驟中，藉由使目標核酸與本探針接觸，可獲得本探針與目標核酸專一性地雜交而得的真正雜交產物。

【0039】雜交步驟中的溫度、pH、鹽濃度、時間等條件可依據本探針的Tm或受測試料的種類等適宜設定其嚴謹度。例如就溫度而言，藉由設為本探針的Tm以上，而成為高嚴謹度，可提升雜交之專一性但雜交效率有降低之傾向。反之，藉由使其低於Tm，而成為低嚴謹度，可降低雜交專一性但雜交效率有提升之傾向。又，根據鹽濃度或pH，亦可調節嚴謹度。

【0040】於本檢測方法中，可藉由後段之照光步驟使真正雜交產物進行光交聯，並進一步實施變性步驟而高選

擇性地維持真正交聯雜交產物。因此，雜交步驟未必有以高嚴謹度進行之必要。從而，雜交步驟除可例如在後段所說明之室溫下行外，亦可於25℃以上40℃以下，又例如為30℃以上40℃以下實施。

【0041】此外，於實施雜交步驟之際，根據所用受測試料或檢測方法，有時需要可使目標核酸與本探針雜交用之前處理。依據受測試料或檢測方法等，前處理對本業者而言為周知者；只要為本業者，則可基於周知技術來決定前處理方法及雜交條件。

【0042】於雜交步驟中，需避免本探針之共價鍵性基的光交聯。從而，係依據共價鍵性基的種類，視需求在遮光狀態下實施雜交步驟。

【0043】雜交步驟之實施樣態，依據本檢測方法所適用之核酸的檢測方法而為各種樣態。作為此類核酸的檢測方法，可為例如使用供固定本探針之陣列或分離膠條(strip)等固相的檢測方法、根據進行in situ雜交之ISH、FISH的檢測方法。

【0044】in situ雜交可對採取之細胞或者培養細胞或生物體組織切片等實施。in situ雜交之適用對象，可例如對採取自乳癌患者之細胞或者其培養細胞或採取自乳癌患者之組織切片內供給本探針而實施。又，可舉出保持愛彼斯坦-巴爾病毒(EBV)感染之細胞或者其培養細胞或採取自EBV感染疾病所致之惡性腫瘤疾病患者的組織切片等。

【0045】核酸之雜交步驟可進一步舉出液相之雜交、

藉由使用供固定本探針之管柱或分離膠條等地層析法之雜交等。此等方法於本案申請時皆為周知者。只要為本業者，可基於周知技術，依據適用之檢測方法的種類來實施適當的雜交步驟。

【0046】

(照光步驟)

本步驟係對前述雜交步驟後的受測試料照光，使前述真正雜交產物中的共價鍵性基與目標序列之間交聯而形成具有交聯結構之真正雜交產物(稱為本說明書中的真正交聯雜交產物)的步驟。於先前的雜交步驟中，除真正雜交產物外，亦可形成包含失配但經雜交的非專一性非雜交產物。

【0047】於照光步驟中，係使包含共價鍵性基之雜交用序列與目標序列適當地雜交，而在與位於目標序列之配對鹼基的+1位側的嘧啶鹼基之間以高專一性形成交聯結構。若有失配時，則不易構成雜交用序列與目標序列之交聯對象的嘧啶鹼基可交聯的位置關係，即使進行適當的照光，亦不易形成交聯結構。因此，於真正雜交產物中可專一性地形成交聯結構。從而，根據本檢測方法，可抑制偽陰性之檢測結果，藉此可提高檢查靈敏度。

【0048】供形成交聯結構之照光條件係由所用共價鍵性基的種類等來決定。例如使用日本特開2016-145229號公報所揭示之共價鍵性基時，可採用在330～380nm、同340～380nm、同350～380nm所具有的光。又，使用日本

特開2019-26569號公報所揭示之共價鍵性基時，可照射例如350～600nm，又例如為400～600nm，又例如為400～550nm，又例如為400～450nm的光。

【0049】照光步驟中的溫度或時間不特別限定，例如為0℃～50℃，又例如為0～40℃，又例如為0～30℃，又例如為0～20℃，又例如為0～10℃，又例如為0～5℃。又，時間可定為例如1～120秒，又例如為1～60秒等。

【0050】此外，於照光步驟中，由於係利用光反應，而尤其不受pH、鹽濃度等的限制；除雜交產物等外，亦可採用生物體材料可穩定存在的pH及鹽濃度之條件。

【0051】

(變性步驟)

本步驟係對照光步驟後的受測試料提供維持真正交聯雜交產物且可使非專一性雜交產物解離之變性條件，而分離出源自非專一性雜交產物之前述寡核苷酸探針的步驟。此種變性條件可適用例如可使DNA等的雙股解離的各種條件。

【0052】根據本步驟，藉由上述變性條件，可容易地由真正交聯雜交產物分離、去除(洗去)非專一性雜交產物。以往，當非專一性雜交產物與真正雜交產物的穩定性無太大差異時，有以下問題：若以高嚴謹度清洗，則亦會使真正雜交產物變性並予以洗去；反之，若以低嚴謹度清洗，則無法充分洗去非專一性雜交產物。然而，由於真正交聯雜交產物具備共價鍵所產生的交聯結構，該產物在使

鹼基配對所產生的雜交產物解離這類的變性條件下仍不會解離。因此，即使應用高強度的變性條件，仍可保持真正交聯雜交產物，因此容易地設定變性條件，且可確實地僅維持真正交聯雜交產物。

【0053】變性步驟可進一步以亦促進未交聯之真正雜交產物之雜交的解離，而分離出源自未交聯之真正雜交產物之前述寡核苷酸探針與前述真正交聯雜交產物的方式實施。根據本檢測方法，與其說是嚴謹度的高低，不如說是可使用能區別交聯/非交聯之雜交產物這類的高強度變性條件，其結果，可抑制偽陽性之檢測結果，藉此可提升檢查的專一度。

【0054】根據本檢測方法，係如上述，亦可抑制偽陽性之檢測結果，結果可提升能正確檢測出真陽性及真陰性的正確度。本檢測方法即使為由基於例如訊號強度之檢查結果，而對多個階段的水準實施分類評定之方法，靈敏度、專一度、正確度的提升仍可有利於檢查的正確度及精度。

【0055】以往係根據每種探針進行洗淨，因此合宜的嚴謹度條件彼此不同；於本檢測方法中，只要維持真正交聯雜交產物即可，因而無需根據每種探針變更變性條件等設定細微的條件，且無需在不同變性條件下實施多次操作等；同時應用多個本探針時，由於可適用同一變性條件，亦有用於同時檢測多個目標核酸的檢測方法。

【0056】於變性步驟中，促進非專一性雜交產物及真

正雜交產物的解離之變性強度，除變性劑外，亦可藉由溫度、鹽濃度、pH等來調節。變性劑強度或變性劑濃度愈高、溫度愈高、pH愈高或鹽濃度(離子強度)愈低，則變性強度愈強。變性條件可單獨採用或組合採用2種以上之變性劑、溫度、鹼及pH等各種要因。

【0057】變性劑可利用週知作為可使DNA或RNA之雜交解離者的週知變性劑。雖不特別限定，此種變性劑可使用例如溶劑。溶劑可舉出例如甲醯胺、二甲基甲醯胺等醛類、吡啶類、哌啶類、二甲基亞碸、四氫呋喃及乙腈等。

【0058】變性要因採用溶劑時，除變性劑的種類外，根據變性劑的濃度及同時使用的稀釋劑，亦可調整變性條件。作為變性劑之溶劑不特別限定，可調成例如40體積%以上，又例如為50體積%以上，又例如為60體積%，又例如為70體積%以上，又例如為80體積%以上，又例如為90體積%以上，又例如為95體積%以上，又例如為100體積%的溶液使用。較佳為70體積%以上、80體積%以上。又，稀釋劑可為例如具生體相容性之磷酸緩衝生理食鹽水等的緩衝液，但可採用嚴謹度更高的水(純水等)之水系介質。亦即，可採用水系介質混合液。變性劑使用溶劑時，根據稀釋劑的種類，例如替代緩衝液而使用純水，亦可出乎意料地增大變性條件的強度。

【0059】例如使用溶劑之甲醯胺(FA)時，可使用50體積%FA水溶液或緩衝液溶液、60體積%FA水溶液或緩衝液溶液、70體積%FA水溶液或緩衝液溶液、80體積%FA水溶

液或緩衝液溶液等。較佳為50體積%以上的FA水溶液或緩衝液溶液，更佳為60體積%以上的FA水溶液或緩衝液溶液，再更佳為80體積%以上的FA水溶液或緩衝液溶液。又，未使用FA時，FA宜使用例如具有與60體積%以上或超過60體積%之水溶液或緩衝液溶液等的水系介質混合液、80體積%以上或超過80體積%之水溶液或緩衝液溶液等的水系介質混合液同等或更高之變性效果的變性劑(變性液)。

【0060】其他變性劑可舉出尿素、四甲基氯化銨等烷基胺類、NaOH等鹼、碘化物離子、胍、過氧化物、硫代硫化物等。此等變性劑可調整pH或鹼等。此等變性劑可溶解於適當的溶劑而使用。作為溶劑，除了例如具生體相容性的磷酸緩衝生理食鹽水等緩衝液、純水等水性介質外，亦可使用既已說明之作為變性劑的溶劑等。

【0061】適用於變性步驟之溫度條件可單獨以該條件實施變性步驟，而在其他所有變性要因下伴隨溫度條件。從而，適用於變性步驟之溫度條件係依據適用於變性步驟之變性要因的種類或其程度等的變性強度適宜設定。例如變性要因使用溶劑等變性劑等的變性劑時，適用之溫度條件，無需進行特殊的溫度控制，即可於本檢測方法之實施處的溫度，且未進行特殊之加熱或冷卻的溫度(本說明書中，將該溫度稱為室溫)以上實施。本說明書中所稱「室溫」，例如為1℃以上35℃以下，又例如為1℃以上30℃以下，又例如為1℃以上30℃以下，又例如為10℃以上30℃

以下，又例如為15℃以上25℃以下。所述室溫下的變性步驟，尤其在可抑制對實施in situ雜交等之組織等受測試料的障礙方面為較佳者；此外，在不需要特別的溫控裝置等方面係屬有利。變性步驟中的溫度條件可定為例如20℃以上，又例如為30℃以上，又例如為35℃以上，又例如為40℃以上，又例如為50℃以上等。另一方面，上限可定為例如70℃以下，又例如為60℃以下等。溫度條件又可例如為超過室溫之溫度，亦可為40℃以上60℃以下。

【0062】又，變性要因採用溫度時，可定為例如30℃以上90℃以下，又例如為40℃以上90℃以下、50℃以上90℃以下、70℃以上90℃以下等。例如採用70℃以上90℃以下之強溫度條件時，縱未使用變性劑或僅為水或緩衝液，亦可僅維持真正交聯雜交產物。

【0063】此種變性步驟可對雜交產物等適宜組合應用1種或2種以上的變性要因而實施。藉由實施變性步驟，可促進雜交之解離，而去除構成非專一性雜交產物之探針，甚而亦可去除構成真正雜交產物之探針，因此，可確實地存留真正交聯雜交產物，而容易地去除背景或偽陽性之要因。

【0064】對於變性步驟後中的真正交聯雜交產物，係依據雜交步驟之實施形態等適宜實施其檢測步驟。檢測步驟典型上係利用預先賦予至探針的標記要素，以週知之方法來進行。

【0065】根據以上所說明之本檢測方法，非專一性雜

交產物或真正雜交產物，可無需使用使Tm高溫化用的長探針，且無需依賴嚴謹度強度而去除，能以高準確度檢測出真正交聯雜交產物。

【0066】

(寡核苷酸探針)

本說明書所揭示之供檢測核酸的寡核苷酸探針可具備如上述之構成。而且，本探針中，雜交用序列及至少一個共價鍵性基可維持真正交聯雜交產物，惟可選擇性地去除非專一性雜交產物雜交產物而具備。如此，於本檢測方法中，可提升檢測的正確度與再現性。本探針又以與有用於本檢測方法之變性步驟的變性劑組合的套組形式提供。所述變性劑可具備例如與60體積%以上的甲醯胺水系介質混合液同等或更高的變性劑。

[實施例]

【0067】以下，為了更具體地說明本說明書之揭示而記載作為具體例之實施例。以下實施例係僅為了說明本說明書之揭示者，非限定其範圍。

[實施例1]

【0068】

(由乳癌患者所採取之組織切片中的細胞內28SrRNA FISH)

由人類28SrRNA之鹼基序列，以與作為以下所示共價鍵性基之交聯對象的胸腺嘧啶(T)交聯的方式設定以下所

示3種不同長度的雜交用序列。施予底線之鹼基係後段所說明之共價鍵性基的取代部位。

【0069】

雜交用序列1(34mer)：

tgctactaccaccaagatctgcacctgcggcggc(序列識別號1)

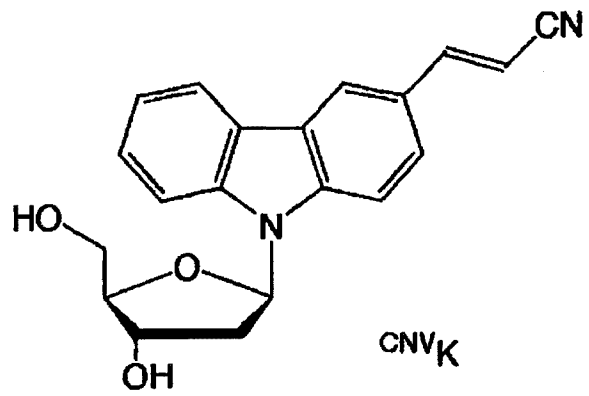
雜交用序列2(25mer)：gctactaccaccaagatctgcacct(序列識別號2)

雜交用序列3(17mer)：tgctactaccaccaaga(序列識別號3)

【0070】於上述3種序列中，對以下所示位置導入一個共價鍵性基(X)。另合成出5'末端經Cy3修飾的3種DNA寡核苷酸探針1～3。此外，X係以下述結構式表示。

【0071】

【化3】



【0072】

雜交用序列1X(34mer)：

Cy3-tgctactaccaccaagatctgcaxctgcggcggc(序列識別號4)

雜交用序列2X(25mer)：Cy3-gctactaccaccaagatctgcaxct(序列識別號5)

雜交用序列3X(17mer)：Cy3-tgctactaccaccaxga(序列識別號6)

【0073】將採取自乳癌患者之組織的石蠟切片，依循常用方法進行去石蠟及去除蛋白質，並以4%多聚甲醛固定後，將醛中和。使用不含遮蔽DNA之甲醯胺基底的緩衝液，將調製成探針的最終濃度達1μg/ml的探針溶液以80℃加熱3分鐘後，於冰浴上急速冷卻使探針單股化，並將其50μl滴加至切片上，覆上蓋玻片，於37℃的烘箱中靜置1小時而進行雜交。

【0074】雜交後，移去蓋玻片，對組織切片照射波長366nm的UV光60秒，其後在加熱至50℃的50體積%甲醯胺/SSC或80體積%甲醯胺/SSC中浸漬3次，接著在SSC中浸漬2次、在超純水中浸漬1次，各浸漬約1～3分鐘並洗淨後，以甘油封緘。

【0075】針對此等切片觀察Cy3訊號，任何長度的探針，經50體積%FA變性及80體積%FA變性，均於細胞質內確認良好的訊號。此外，對照組使用不具備合成之共價鍵性基的探針時，經50體積%FA變性，探針未經去除而維持；但經80體積%FA洗淨，探針全被洗去而幾乎看不出訊號。

【0076】又，34mer、25mer及17mer之探針1～3均呈現80體積%FA變性後的訊號，惟17mer之探針3的訊號最弱，34mer及25mer之探針1、2的訊號幾乎相等。由以上可知，宜為約20mer以上的雜交用序列。又，合成具有在雜

交用序列1(34mer)中於X位置將3’末端起第3個G取代為X之雜交序列1X’的DNA探針4，使用DNA探針1與該探針4，同時針對取自同一乳癌患者的組織切片，以與上述同樣的方式進行雜交、照光及80體積%FA洗淨並觀察切片的訊號。其結果，兩者的訊號相等。由以上可知，共價鍵性基即使未存在於3’末端側，仍可充分形成真正交聯雜交產物。

【0077】又，就50體積%FA洗淨及80體積%FA洗淨，80體積%FA洗淨其影像較為鮮明。研判此係非專一性雜交產物經完整地去除等而結果使S/N比提升。

[實施例2]

【0078】

(使用25mer之探針的照光條件的探討)

使用實施例1中合成之探針2，實施UV照射時間不同的28SrRNA FISH，評定照射時間的影響。除將照光條件設為0.1秒、5秒、60秒及300秒以外，係以與實施例1同樣的方式進行FISH。

【0079】其結果，顯然隨著照射時間延長，訊號強度有增大的傾向。另一方面，於60秒以上，訊號強度未大幅增大。

[實施例3]

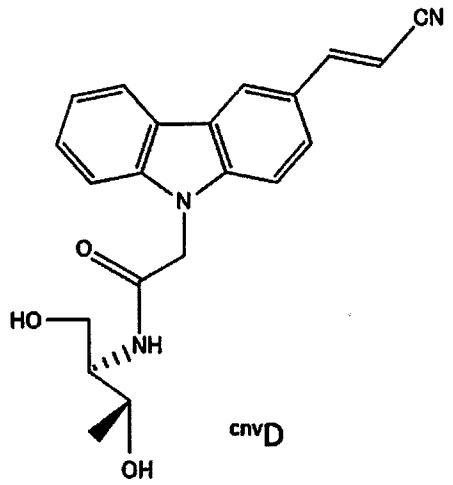
【0080】

(共價鍵性基的探討)

使用實施例1中合成之探針2，及在與導入至探針2之共價鍵性基X相同的位置導入以下述結構式表示之具有D-蘇胺醇骨架的其他共價鍵性基D之探針5，依循實施例1實施28SrRNA FISH，來評定共價鍵性基的種類的影響。照光時間係設為5秒或60秒，洗淨係使用80體積%FA，以與實施例1同樣的方式進行FISH。

【0081】

【化4】



【0082】其結果，就UV照射時間5秒及60秒任一者，探針5其訊號均強於探針2。研判此係比起導入有主骨架為去氧核糖之共價鍵性基X(CNV-K)的探針2，導入有D-蘇胺醇為主骨架之共價鍵性基D(CNV-D)的探針5效率更良好地與28SrRNA形成真正交聯雜交產物之結果。

[實施例4]

【0083】

(採取自小鼠之大腦切片中的Satb2蛋白質mRNA CISH)

針對作為目標序列之Satb2mRNA(約700鹼基)，如圖1所示設計約20mer的26根探針(序列識別號7～32)，可與目標序列中的胸腺嘧啶(T)進行光交聯地與實施例1同樣地導入共價鍵性基X。又，對DNA探針的5'末端加成DIG。

【0084】將小鼠腦部的冷凍切片以37℃解凍30分鐘後，於37℃浸漬於4%多聚甲醛10分鐘而予以後固定。以TBS緩衝液實施5分鐘的浸漬2次後，浸漬於2mg/ml甘胺酸/PBS溶液30分鐘後將醛中和，浸漬於55℃之40體積%的去離子化甲醯胺/4×SCC溶液30分鐘。其後，對此切片，將分別含有1μg/ml之上述各探針的雜交溶液以80℃加熱5分鐘，供給其50μl，於37℃使其進行雜交1小時。

【0085】其後，將承載此切片的載玻片載置於冰浴上並照射366nm(1000mV)的波長1分鐘。進而，以50℃的80體積%甲醯胺/TBS緩衝液溶液或同溫度的80體積%甲醯胺水溶液分別重複3分鐘浸漬變性及洗淨3次。

【0086】其後，以TBS緩衝液進行3分鐘浸漬洗淨2次、以該緩衝液進行1分鐘浸漬洗淨1次，滴加鹼性磷酸酶標記抗體的200倍稀釋液50μl，放置於室溫30分鐘，以TBS緩衝液進行3分鐘洗淨2次、以超純水進行1分鐘洗淨2次，添加BCIP/NBT溶液，於暗處使其反應60分後以流水洗淨並去水後予以封緘。

【0087】將針對此等切片試料確認發出藍至藍紫色的結果示於圖2。如圖2(B)所示，使用80體積%甲醯胺緩衝液溶液時，大腦皮質雖可看出Satb2專一性訊號的痕跡，但

不明確。相對於此，如圖2(A)所示，使用變性強度更強的80體積%甲醯胺水溶液時，可使非專一性訊號降低，大腦皮質確認有明確的Satb2專一性訊號。

[實施例5]

【0088】

(乳癌培養細胞中的HER2蛋白質mRNA CISH)

針對HER2mRNA中從Exon15橫跨至17的目標序列，設計成使以下2種探針進行雜交。此外，探針中作為以下序列中的X，係可與目標序列中的尿嘧啶(U)或胞嘧啶(C)進行光交聯地與實施例1同樣地導入共價鍵性基X，並對5'末端加成DIG。

探針1：GTCCACACAGGAGTGGGTGCAXTT(序列識別號33)

探針2：CGTCAGAGGGCTGGCTCTCTGXTC(序列識別號34)

【0089】培養2種乳癌細胞(BT474：HER2陽性、BT20：HER2陰性)而作成細胞塊。包埋石蠟後，準備薄切之載玻片。對HER2蛋白質實施免疫染色，並針對各者確認HER2陽性或陰性後，使用包含共價鍵性基X的探針1及2實施ISH。

【0090】進行去石蠟及親水化，將標本在60℃的烘箱中加熱而將石蠟熔解後，以Clear Plus(去石蠟劑，Pharma股份有限公司)洗淨6次，以100%EtOH洗淨3次，以95%

EtOH洗淨2次，以80%EtOH洗淨1次，進而以純水洗淨5次。進而，供給蛋白激酶溶液而於室溫下進行處理30分鐘後，以純水洗淨2次。其後，浸漬於95%EtOH，以乾燥機加以乾燥。

【0091】將以1μg/ml含有2種探針的雜交溶液(含40體積%甲醯胺之TE緩衝液)以80℃加熱3分鐘後急速冷卻，並將該溶液50μl供給至前述組織後，覆上蓋玻片，於55℃的恆溫槽中靜置1小時使其進行雜交。

【0092】雜交後，於冰浴上照射366nm(1000mV)1分鐘，其後浸漬於80體積%甲醯胺2×SSC溶液(55℃)3分鐘並實施變性及洗淨。

【0093】其後，以2×SSC洗淨1次，以TBS洗淨2次後，滴加抗DIG1次抗體溶液，靜置於室溫30分鐘。以TBS洗淨3次後，滴加專一性地結合於1次抗體的鹼性磷酸酶標記聚合物並靜置於室溫30分鐘。以TBS洗淨3次後，滴加BCIP/NBT，於暗處反應一夜後，進行流水洗淨並去水後予以封緘。將結果示於圖3。

【0094】如圖3所示，在使用含有共價鍵性基X之探針的ISH中，HER2陽性細胞確認明顯的訊號。另一方面，HER2陰性細胞則未看出訊號。ISH所得之結果，與事先實施之免疫染色的結果一致，可知可專一性地檢測出HER2mRNA。

[實施例6]

【0095】

(EBER(EB病毒產生小RNA)-ISH)[1]

針對EBER1中由約100mer所構成的目標序列，設計成以下2種探針。此外，探針中作為以下序列中的X，係使用目標序列中尿嘧啶之實施例1中所使用的單元來合成，並對5'末端加成DIG。此外，除替代X而具備鳥嘌呤或腺嘌呤以外係以與同樣方式合成出比較例之探針。

【0096】探針1：GTCTCCTCCCTAGCAAAXCC(序列識別號35)

探針2：GTCTGGGAAGACAACCAXAG(序列識別號36)

【0097】將採取自胃癌患者之EB病毒感染組織進行去石蠟及親水化，將標本在60℃的烘箱中加熱而將石蠟熔解後，以Clear Plus(去石蠟劑，Pharma股份有限公司)洗淨6次，以100%EtOH洗淨3次，以95%EtOH洗淨2次，以80%EtOH洗淨1次，進而以純水洗淨5次。進而，供給蛋白激酶溶液而於室溫下進行處理30分鐘後，以純水洗淨2次。其後，浸漬於95%EtOH，以乾燥機加以乾燥。

【0098】將以1μg/ml含有2種探針的雜交溶液(含40體積%甲醯胺之TE緩衝液)以80℃加熱3分鐘後急速冷卻，並將該溶液50μl供給至前述組織後，覆上蓋玻片，於室溫下靜置1小時使其進行雜交。以同樣方式，對於比較例之探針亦實施雜交。

【0099】雜交後，於冰浴上照射366nm(1000mV)1分鐘，其後浸漬於50體積%甲醯胺2×SSC溶液(室溫)及80體

積%甲醯胺2×SSC溶液(55℃)3分鐘並實施變性及洗淨。

【0100】其後，以2×SSC洗淨1次，以TBS洗淨2次後，滴加鹼性磷酸酶標記抗體溶液，靜置於室溫30分鐘。以TBS洗淨2次並以超純水洗淨2次後，滴加BCIP/NBT，於暗處反應60分鐘後，進行流水洗淨並去水後以甘油凝膠封緘。將結果示於圖4。

【0101】如圖4所示，使用含有共價鍵性基X的探針時，以50體積%甲醯胺2×SSC(室溫)或80體積%甲醯胺2×SSC溶液(55℃)均可發色，而80體積%甲醯胺其染色區域較少。另一方面，若為比較例之DNA探針時，以50體積%甲醯胺2×SSC(室溫)可發色，而以80體積%甲醯胺2×SSC溶液(55℃)則完全未發色。由以上可知，藉由根據80體積%甲醯胺2×SSC溶液(55℃)之強度更強的變性條件之變性，可僅檢測出交聯真性雜交產物。

【0102】由以上可確認具備共價鍵性基X之探針與不具備該X之探針的變性耐性。可知要以高準確度檢測出目標序列，需要具備共價鍵性基的探針與高強度的變性條件。

[實施例7]

【0103】

(EBER(EB病毒產生小RNA)-ISH)[2]

針對與實施例6同樣具備共價鍵性基X的探針與市售EBER檢測套組(Dako，PNA探針)評定檢測性能。就具備共

價鍵性基X的探針，係將變性條件設為80體積%甲醯胺2×SSC溶液(室溫)，其他操作則與實施例6相同。

【0104】對於PNA探針套組，則依循所附使用指南。此外，據此使用指南，其係雜交為55℃、30分鐘，洗淨使用55℃之嚴謹度緩衝液，且採用藉由鹼性磷酸酶之發色反應者。

【0105】針對具備共價鍵性基X的探針與實施藉由PNA探針套組之處理的切片進行評定。將結果示於圖5。如圖5所示，具備共價鍵性基X的探針，係根據室溫之雜交及室溫之變性的處理，但可確認明確的染色。又，就PNA探針套組，根據55℃的雜交及55℃的洗淨，可獲得與具備共價鍵性基X的探針同等的檢測結果。然而，就PNA套組，室溫之雜交其背景過高，檢測無法進行專一性檢測。

【0106】由以上可知，具備共價鍵性基X之探針可容易地控制溫度且可高準確度地檢測出目標核酸。

[序列表自由文字]

【0107】序列識別號1～36：探針

【序列表】

<110> 日華化學股份有限公司(Nicca Chemicall Co., Ltd.)

<120> 核酸的檢測方法及寡核苷酸探針

<130> K180991TW

<160> 36

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 34
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 探針

<400> 1
tgctactacc accaagatct gcacctgcgg cggc 34

<210> 2
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 探針

<400> 2
gctactacca ccaagatctg cacct 25

<210> 3
<211> 17
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 探針

<400> 3
tgctactacc accaaga 17

<210> 4
<211> 34
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 探針

<220>
<221> 修飾鹼基
<222> (24)..(24)
<223> n 為可光交聯之官能基

<220>
<221> misc_feature
<222> (24)..(24)
<223> n 為 a, c, g, 或 t

<400> 4
tgctactacc accaagatct gcanctgcgg cggc 34

<210> 5
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 探針

<220>
<221> 修飾鹼基
<222> (23)..(23)
<223> n 為可光交聯之官能基

<220>
<221> misc_feature
<222> (23)..(23)
<223> n 為 a, c, g, 或 t

<400> 5
gctactacca ccaagatctg canct 25

<210> 6
<211> 17
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 探針

<220>
<221> 修飾鹼基
<222> (15)..(15)
<223> n 為可光交聯之官能基

<220>
<221> misc_feature

<222> (15)..(15)
<223> n 為 a, c, g, 或 t

<400> 6
tgctactacc accanga 17

<210> 7
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 探針

<220>
<221> 修飾鹼基
<222> (18)..(18)
<223> n 為可光交聯之官能基

<220>
<221> misc_feature
<222> (18)..(18)
<223> n 為 a, c, g, 或 t

<400> 7
gagcgcggtc tccaccanct 20

<210> 8
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 探針

<220>
<221> 修飾鹼基
<222> (18)..(18)
<223> n 為可光交聯之官能基

<220>
<221> misc_feature
<222> (18)..(18)
<223> n 為 a, c, g, 或 t

<400> 8
gctgtgggaa taccccangg 20

<210> 9
<211> 20

<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 探針

<220>
<221> 修飾鹼基
<222> (18)..(18)
<223> n 為可光交聯之官能基

<220>
<221> misc_feature
<222> (18)..(18)
<223> n 為 a, c, g, 或 t

<400> 9
cctccctagc ttgattantc 20

<210> 10
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 探針

<220>
<221> 修飾鹼基
<222> (18)..(18)
<223> n 為可光交聯之官能基

<220>
<221> misc_feature
<222> (18)..(18)
<223> n 為 a, c, g, 或 t

<400> 10
cacataactg agggggangg 20

<210> 11
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 探針

<220>
<221> 修飾鹼基

<222> (18)..(18)
<223> n 為可光交聯之官能基

<220>
<221> misc_feature
<222> (18)..(18)
<223> n 為 a, c, g, 或 t

<400> 11
cggccacagt cgcatcangg 20

<210> 12
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 探針

<220>
<221> 修飾鹼基
<222> (18)..(18)
<223> n 為可光交聯之官能基

<220>
<221> misc_feature
<222> (18)..(18)
<223> n 為 a, c, g, 或 t

<400> 12
ggatcttcag cgtcacancg 20

<210> 13
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 探針

<220>
<221> 修飾鹼基
<222> (18)..(18)
<223> n 為可光交聯之官能基

<220>
<221> misc_feature
<222> (18)..(18)
<223> n 為 a, c, g, 或 t

<400> 13

cgcaggcaag tcttccanct 20

<210> 14
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 探針

<220>
<221> 修飾鹼基
<222> (18)..(18)
<223> n 為有可交聯之官能基的核糖核苷

<220>
<221> misc_feature
<222> (18)..(18)
<223> n 為 a, c, g, 或 t

<400> 14
acggtggcgt ggttccantg 20

<210> 15
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 探針

<220>
<221> 修飾鹼基
<222> (18)..(18)
<223> n 為可光交聯之官能基

<220>
<221> misc_feature
<222> (18)..(18)
<223> n 為 a, c, g, 或 t

<400> 15
gcagttcctt taaggcantg 20

<210> 16
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 探針

<220>
<221> 修飾鹼基
<222> (18)..(18)
<223> n 為可光交聯之官能基

<220>
<221> misc_feature
<222> (18)..(18)
<223> n 為 a, c, g, 或 t

<400> 16
taatgtgctc tggttcantt 20

<210> 17
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 探針

<220>
<221> 修飾鹼基
<222> (18)..(18)
<223> n 為可光交聯之官能基

<220>
<221> misc_feature
<222> (18)..(18)
<223> n 為 a, c, g, 或 t

<400> 17
ctctgggaga gagggcantc 20

<210> 18
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 探針

<220>
<221> 修飾鹼基
<222> (18)..(18)
<223> n 為可光交聯之官能基

<220>

<221> misc_feature
<222> (18)..(18)
<223> n 為 a, c, g, 或 t

<400> 18
tatttacaat ggatgaantc 20

<210> 19
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 探針

<220>
<221> 修飾鹼基
<222> (18)..(18)
<223> n 為可光交聯之官能基

<220>
<221> misc_feature
<222> (18)..(18)
<223> n 為 a, c, g, 或 t

<400> 19
gacacattgg catagtangt 20

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

<220>
<223> 探針

<220>
<221> 修飾鹼基
<222> (18)..(18)
<223> n 為可光交聯之官能基

<220>
<221> misc_feature
<222> (18)..(18)
<223> n 為 a, c, g, 或 t

<400> 20
ctcccaaact cctggcantt 20

<210> 21

<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 探針

<220>
<221> 修飾鹼基
<222> (18)..(18)
<223> n 為可光交聯之官能基

<220>
<221> misc_feature
<222> (18)..(18)
<223> n 為 a, c, g, 或 t

<400> 21
actttatct tcttatantt 20

<210> 22
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 探針

<220>
<221> 修飾鹼基
<222> (18)..(18)
<223> n 為可光交聯之官能基

<220>
<221> misc_feature
<222> (18)..(18)
<223> n 為 a, c, g, 或 t

<400> 22
gaacacaata gtctgaangg 20

<210> 23
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 探針

<220>

<221> 修飾鹼基
<222> (18)..(18)
<223> n 為可光交聯之官能基

<220>
<221> misc_feature
<222> (18)..(18)
<223> n 為 a, c, g, 或 t

<400> 23
catatttggt aaatgcantg 20

<210> 24
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 探針

<220>
<221> 修飾鹼基
<222> (18)..(18)
<223> n 為可光交聯之官能基

<220>
<221> misc_feature
<222> (18)..(18)
<223> n 為 a, c, g, 或 t

<400> 24
tttgcccagg gatgccanct 20

<210> 25
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 探針

<220>
<221> 修飾鹼基
<222> (18)..(18)
<223> n 為可光交聯之官能基

<220>
<221> misc_feature
<222> (18)..(18)
<223> n 為 a, c, g, 或 t

<400> 25
atttggctat gaggagantg 20

<210> 26
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 探針

<220>
<221> 修飾鹼基
<222> (18)..(18)
<223> n 為可光交聯之官能基

<220>
<221> misc_feature
<222> (18)..(18)
<223> n is a, c, g, or t

<400> 26
ggtttcggat tggagtantg 20

<210> 27
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 探針

<220>
<221> 修飾鹼基
<222> (18)..(18)
<223> n 為可光交聯之官能基

<220>
<221> misc_feature
<222> (18)..(18)
<223> n 為 a, c, g, 或 t

<400> 27
gctcatgatg ggctggantg 20

<210> 28
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 探針

<220>
<221> 修飾鹼基
<222> (18)..(18)
<223> n 為可光交聯之官能基

<220>
<221> misc_feature
<222> (18)..(18)
<223> n 為 a, c, g, 或 t

<400> 28
tgagctgcgg tgagaganga 20

<210> 29
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 探針

<220>
<221> 修飾鹼基
<222> (18)..(18)
<223> n 為可光交聯之官能基

<220>
<221> misc_feature
<222> (18)..(18)
<223> n 為 a, c, g, 或 t

<400> 29
ctatttgctg cctgacangc 20

<210> 30
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 探針

<220>
<221> 修飾鹼基
<222> (18)..(18)
<223> n 為可光交聯之官能基

<220>
<221> misc_feature
<222> (18)..(18)
<223> n 為 a, c, g, 或 t

<400> 30
tatctgttgg tttatcanat 20

<210> 31
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 探針

<220>
<221> 修飾鹼基
<222> (18)..(18)
<223> n 為可光交聯之官能基

<220>
<221> misc_feature
<222> (18)..(18)
<223> n 為 a, c, g, 或 t

<400> 31
atgctggtga gccaggantc 20

<210> 32
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 探針

<220>
<221> 修飾鹼基
<222> (18)..(18)
<223> n 為可光交聯之官能基

<220>
<221> misc_feature
<222> (18)..(18)
<223> n 為 a, c, g, 或 t

<400> 32
gggtgggtgg ttcaaganct 20

<210> 33
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 探針

<220>
<221> 修飾鹼基
<222> (22)..(22)
<223> n 為可光交聯之官能基

<220>
<221> misc_feature
<222> (22)..(22)
<223> n 為 a, c, g, 或 t

<400> 33
gtccacacag gagtgggtgc antt 24

<210> 34
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 探針

<220>
<221> 修飾鹼基
<222> (22)..(22)
<223> n 為可光交聯之官能基

<220>
<221> misc_feature
<222> (22)..(22)
<223> n 為 a, c, g, 或 t

<400> 34
cgtcagaggg ctggctctct gntc 24

<210> 35
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 探針

<220>
<221> 修飾鹼基
<222> (18)..(18)
<223> n 為可光交聯之官能基

<220>
<221> misc_feature
<222> (18)..(18)
<223> n 為 a, c, g, 或 t

<400> 35
gtctcctccc tagcaaancc 20

<210> 36
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 探針

<220>
<221> 修飾鹼基
<222> (18)..(18)
<223> n 為可光交聯之官能基

<220>
<221> misc_feature
<222> (18)..(18)
<223> n 為 a, c, g, 或 t

<400> 36
gtctgggaag acaaccanag 20

【發明申請專利範圍】

【請求項1】一種核酸的檢測方法，其係具備：

雜交步驟，係使寡核苷酸探針與前述核酸接觸而形成真正雜交產物，前述寡核苷酸探針具有針對存在於受測試料中的核酸之目標序列的雜交用序列，及在前述雜交用序列中與前述目標序列專一性地進行雜交時可藉由照光而與前述目標序列中的目標鹼基交聯的至少一個共價鍵性基；

照光步驟，係對前述雜交步驟後的受測試料照光，使前述真正雜交產物中的共價鍵性基與目標序列之間交聯而形成具有交聯結構之真正交聯雜交產物；及

變性步驟，係對照光步驟後的受測試料提供維持前述真正交聯雜交產物且可使非專一性雜交產物解離之變性條件，而分離出源自非專一性雜交產物之前述寡核苷酸探針。

【請求項2】如請求項1之方法，其中前述變性步驟係進一步包含亦促進真正雜交產物之雜交的解離，而分離出源自前述真正雜交產物之前述寡核苷酸探針與前述真正交聯雜交產物之步驟。

【請求項3】如請求項1或2之方法，其中前述雜交步驟係進行原位(in situ)雜交之步驟。

【請求項4】如請求項3之方法，其中前述雜交步驟係對培養細胞或由癌症患者所採取之組織切片內供給前述寡核苷酸探針而實施之步驟。

【請求項5】如請求項1或2之方法，其中前述變性步

驟包含藉由對前述雜交步驟後的受測試料以超過60體積%之濃度的甲醯胺之水系介質混合液的變性。

【請求項6】如請求項1或2之方法，其中前述變性步驟包含使用室溫以上的液體之變性。

【請求項7】如請求項1或2之方法，其中前述變性步驟包含藉由含有甲醯胺以外的變性劑之變性液的變性。

【請求項8】如請求項7之方法，其中甲醯胺以外的變性劑為四甲基氯化銨。

【請求項9】如請求項1或2之方法，其中前述照光步驟係照射極大波長340～380nm的光之步驟。

【請求項10】如請求項1或2之方法，其中前述雜交用序列為5個鹼基以上且200個鹼基以下。

【請求項11】如請求項1或2之方法，其中前述目標序列為人類HER2蛋白質mRNA中的RNA序列。

【請求項12】如請求項1或2之方法，其中前述目標序列為Satb2蛋白質mRNA中的RNA序列。

【請求項13】如請求項1或2之方法，其中前述目標序列為EBER小RNA中的RNA序列。

【請求項14】如請求項1或2之方法，其中前述目標序列為28SrRNA中的RNA序列。

【請求項15】如請求項1或2之方法，其中前述變性步驟包含藉由對前述雜交步驟後的受測試料以80體積%的甲醯胺之水系介質混合液的變性。

【請求項16】如請求項3之方法，其中前述變性步驟

包含藉由對前述雜交步驟後的受測試料以80體積%的甲醯胺之水系介質混合液的變性。

【請求項17】一種探針，其係供檢測核酸的寡核苷酸探針，其係具備：

可與前述核酸之目標序列進行雜交的雜交用序列，及在前述雜交用序列中與前述目標序列專一性地進行雜交時可藉由照光而與前述目標序列中的目標鹼基交聯的至少一個共價鍵性基；

前述雜交用序列及至少一個共價鍵性基維持前述雜交用序列與前述目標序列雜交而得的真正雜交產物且藉由前述照光交聯而得的真正交聯雜交產物，惟其構成可選擇性地去除非專一性雜交產物。

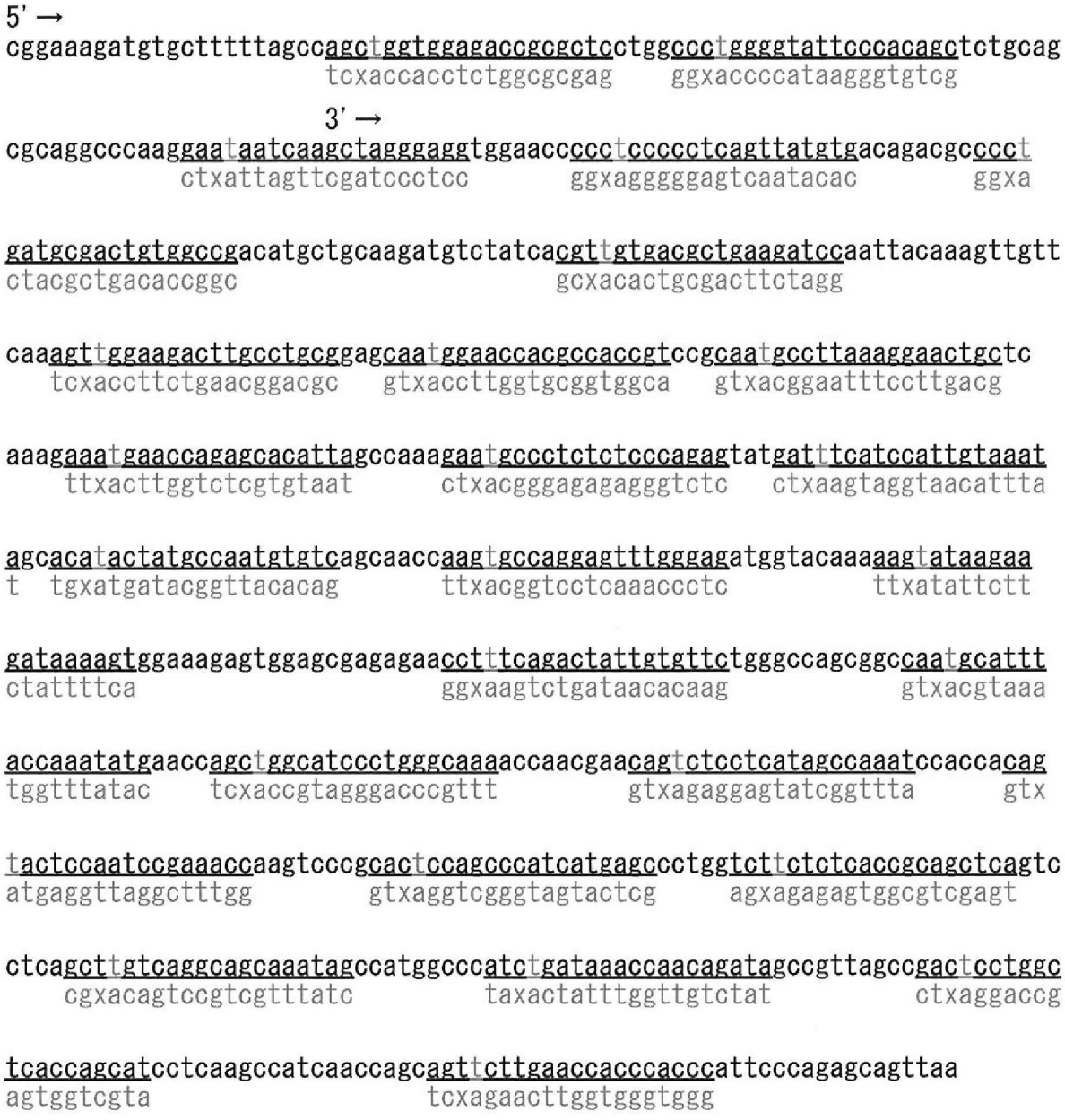
【請求項18】一種套組，其係標記寡核苷酸的檢測套組，其係具備：

如請求項17之寡核苷酸探針；及

與濃度超過60體積%的甲醯胺之水系介質混合液同等或更高程度的變性劑。

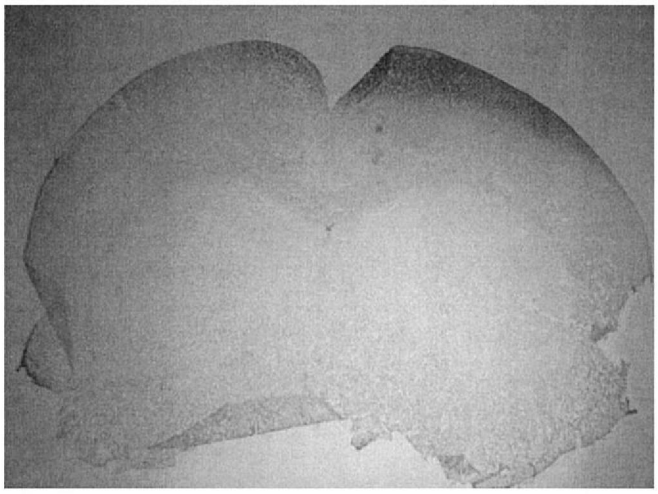
【發明圖式】

黑字：Satb2 mRNA（t=交聯目標）
灰字：寡探針（Satb2 mRNA 反義股、x=CNV-K）

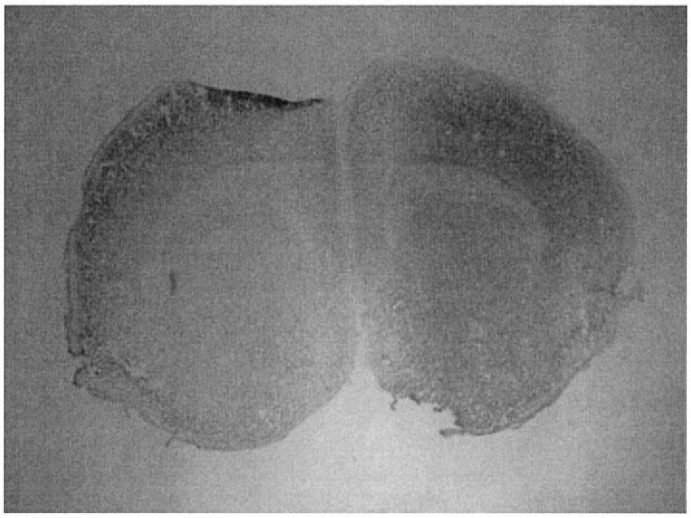


【圖 1】

(A)

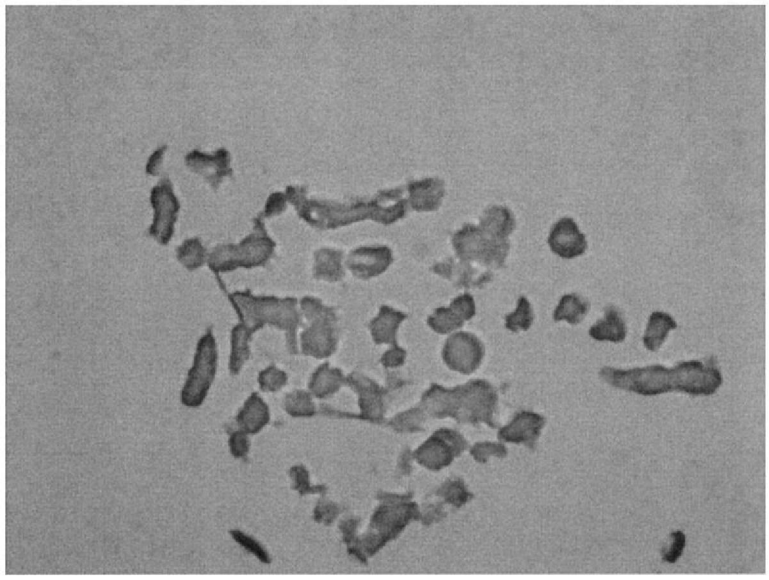


(B)

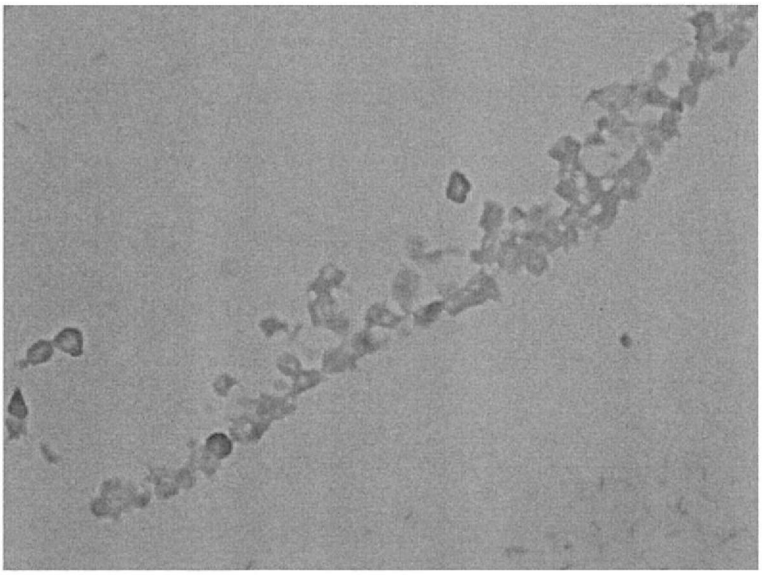


【圖 2】

(A)

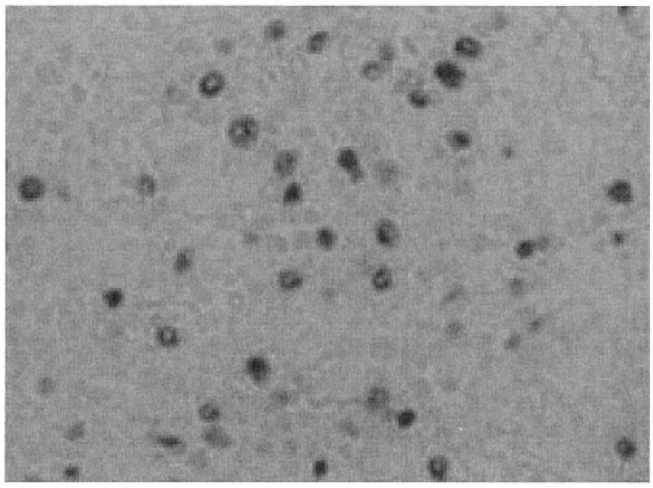


(B)

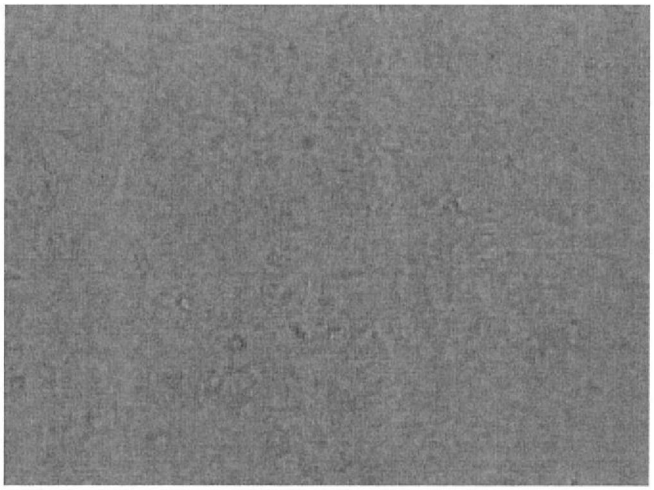


【圖 3】

(A)

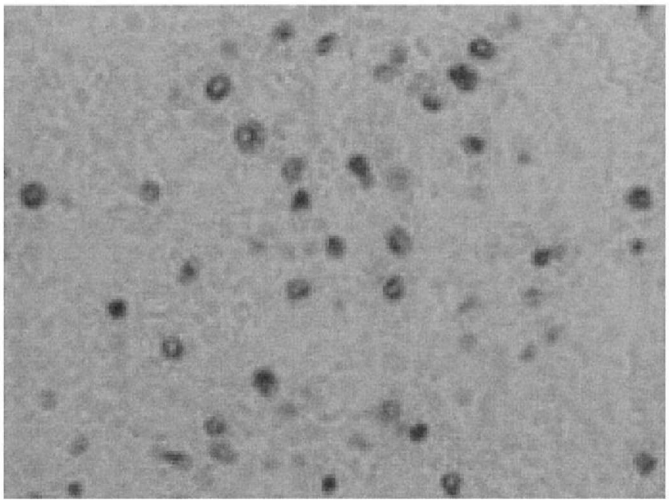


(B)

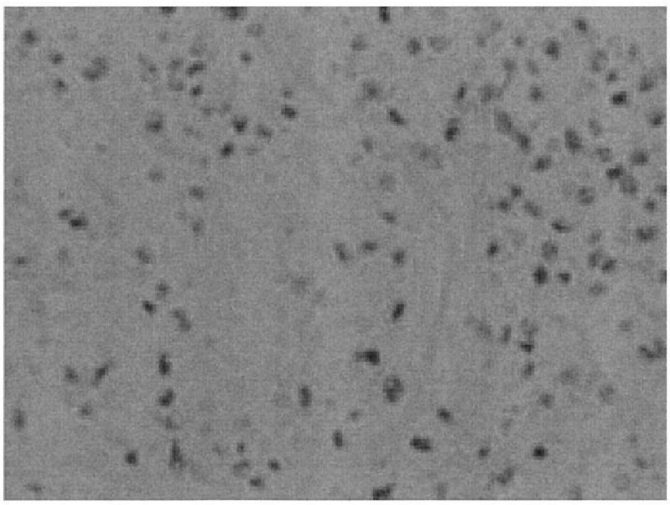


【圖 4】

(A)



(B)



【圖 5】