



# (12)发明专利



(10)授权公告号 CN 105385757 B

(45)授权公告日 2020.04.03

(21)申请号 201510835512.4

(22)申请日 2012.12.12

(65)同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 105385757 A

(43)申请公布日 2016.03.09

(30)优先权数据  
61/569,656 2011.12.12 US

(62)分案原申请数据  
201280069016.7 2012.12.12

(73)专利权人 塞雷公司  
地址 美国马萨诸塞州

(72)发明人 J·奥里驰-科斯塔

(74)专利代理机构 北京市金杜律师事务所  
11256

代理人 陈文平

(51)Int.Cl.

C12Q 1/6841(2018.01)

(56)对比文件

W0 2006108627 A1,2006.10.19,全文.

W0 2009015359 A2,2009.01.29,全文.

M. Carbonari.Improved procedure for the measurement of telomere length in whole cells by PNA probe and flow cytometry.《Cell Proliferation》.2010,第43卷(第6期),553-561.

Andrea Camerini.Evaluation of HER2 and p53 expression in predicting response to docetaxel-based first-line chemotherapy in advanced breast cancer.《Journal of experimental & clinical cancer research》.2011,第30卷(第1期),38.

审查员 孙谦

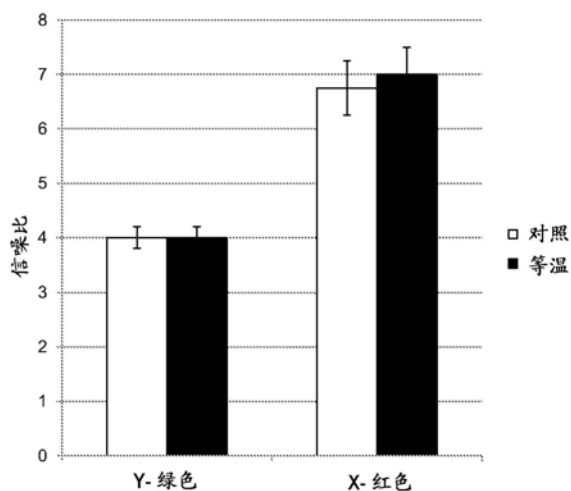
权利要求书1页 说明书22页 附图5页

(54)发明名称

用于室温原位检测生物样品中的目标核酸的方法和试剂盒

(57)摘要

本发明涉及用于检测生物样品中的目标核酸的原位杂交方法,包括在室温下进行一个或多个方法步骤(例如,预处理、变性、杂交、洗涤)。本发明进一步涉及用于进行这种方法的试剂盒。



1. 探针、包含0.07M氢氧化钠和70%乙醇的变性溶液、包含3mM氢氧化钠、30%甲酰胺和20%硫酸葡聚糖的杂交缓冲液和包含1.75mM氢氧化钠和2×SSC的洗涤缓冲液在制备用于检测生物样品中的目标核酸的试剂盒中的用途,其中所述探针包含与所述目标核酸中的核苷酸序列互补的核苷酸序列和至少一个可检测标记,所述检测包括步骤:

a) 通过用所述包含0.07M氢氧化钠和70%乙醇的变性溶液接触所述样品,使包含所述目标核酸的生物样品变性;

b) 使所述探针与所述目标核酸在所述包含3mM氢氧化钠、30%甲酰胺和20%硫酸葡聚糖的杂交缓冲液中杂交,其中所述杂交缓冲液的pH为10至13;

c) 在所述包含1.75mM氢氧化钠和2×SSC的洗涤缓冲液中洗涤所述样品,其中所述洗涤缓冲液的pH为10至13;和

d) 检测已与所述样品中的目标核酸杂交的探针上的所述至少一个可检测标记,由此检测所述样品中的目标核酸,

其中,步骤a)、b)和c)中的每一个均在19摄氏度至25摄氏度的温度下进行。

2. 一种用于检测生物样品中的目标核酸的试剂盒,其包括:

a) 包含0.07M氢氧化钠和70%乙醇的变性缓冲液;

b) 包含1-5mM氢氧化钠、20-60%甲酰胺和5-40%硫酸葡聚糖的杂交缓冲液,其中所述杂交缓冲液的pH为10至13;和

c) 包含1-3mM氢氧化钠的洗涤缓冲液,其中所述洗涤缓冲液的pH为10至13。

3. 权利要求2所述的试剂盒,进一步包含蛋白酶缓冲液,所述蛋白酶缓冲液包含0.2%胃蛋白酶。

4. 权利要求2所述的试剂盒,进一步包含至少一个包含与所述目标核酸中的核苷酸序列互补的核苷酸序列和至少一个可检测标记的探针。

5. 权利要求2-4任一项所述的试剂盒,其中所述杂交缓冲液包含3mM氢氧化钠、30%甲酰胺和20%硫酸葡聚糖。

6. 权利要求2-4任一项所述的试剂盒,其中所述洗涤缓冲液包括1.75mM NaOH和2×SSC。

## 用于室温原位检测生物样品中的目标核酸的方法和试剂盒

[0001] 本申请是申请日为2012年12月12日、申请号为2012800690167、发明名称为“用于室温原位检测生物样品中的目标核酸的方法和试剂盒”的发明专利申请的分案申请。

[0002] 相关申请

[0003] 本申请要求2011年12月12日提交的美国临时申请号61/569,656的权益。

[0004] 上述申请的全部教导通过引用并入本文中。

### 背景技术

[0005] 20多年来,荧光原位杂交(FISH)已用作检测人类染色体上DNA序列的分子技术(Bauman 1985;Pinkel 1986)。在过去的二十年,FISH技术各个方面的改进已促进人类细胞遗传学和分子诊断领域,使得能够鉴定与实性肿瘤和造血系统恶性肿瘤有关的染色体异常以及诊断感染性疾病。(Heim和Mitelman 1995;Klinger 1995;Timm,Podniesinski等.1995;Heselmeyer,Macville等.1997;Sauer,Wiedswang等.2003)。

[0006] 当前的FISH程序是劳动密集型和费时的,要求多个手动处理步骤和遵守精确的温度和时间要求。标准FISH技术通常要求十多个处理玻片样品的步骤,其中几个步骤在不同温度下进行,需要使用许多通常昂贵的温度设备如水浴器、加热板和孵育箱。这些及其它技术上的限制妨碍其在研究和临床实验室中更广泛地使用。

[0007] 目前,需要要求更少处理步骤、更少时间和更少设备的进行FISH的更简化且成本有效的方法。

[0008] 发明概述

[0009] 在一个实施方式中,本发明涉及用于检测生物样品中的目标核酸的方法,包括步骤:在约19摄氏度至约25摄氏度的温度下用包含蛋白酶的溶液预处理包含目标核酸的生物样品;使所述样品变性;使至少一个探针与所述样品中的目标核酸杂交,其中所述探针包含与所述目标核酸中的核苷酸序列基本上互补的核苷酸序列和至少一个可检测标记;和检测与所述目标核酸杂交后的寡核苷酸探针上的至少一个可检测标记,由此检测所述样品中的目标核酸。

[0010] 在另一实施方式中,本发明涉及用于检测生物样品中的目标核酸的方法,包括步骤:在约19摄氏度至约25摄氏度的温度下,使至少一个探针与所述样品中的目标核酸杂交,其中所述探针存在于包含约1-10mM碱且pH为约10至约13的杂交缓冲液中,并且包含与所述目标核酸中的核苷酸序列基本上互补的核苷酸序列和至少一个可检测标记;和检测与所述样品中的目标核酸杂交后的探针上的至少一个可检测标记,由此检测所述样品中的目标核酸。

[0011] 在另一实施方式中,本发明涉及用于检测生物样品中的目标核酸的方法,包括步骤:使包含目标核酸的生物样品变性;使至少一个探针与所述样品中的目标核酸杂交,其中所述探针包含与所述目标核酸中的核苷酸序列基本上互补的核苷酸序列和至少一个可检测标记;在约19摄氏度至约25摄氏度的温度下,在pH为约10至约13的洗涤缓冲液中洗涤所述样品,所述洗涤缓冲液包含约1-10mM的碱和最终浓度为约0.03M至约0.09M的一种或多种

盐;和检测已与所述样品中的目标核酸杂交的探针上的至少一个可检测标记,由此检测所述样品中的目标核酸。

[0012] 在另一实施方式中,本发明涉及用于检测生物样品中的目标核酸的方法,包括步骤:通过将所述样品与包含碱和约50%至约80%醇的溶液接触,使包含目标核酸的生物样品变性;使至少一个探针与所述样品中的目标核酸杂交,其中所述探针存在于包含约1-10mM的碱且pH为约10至约13的杂交缓冲液中,并且包含与所述目标核酸中的核苷酸序列基本上互补的核苷酸序列和至少一个可检测标记;在pH为约10至约13的洗涤缓冲液中洗涤所述样品,所述洗涤缓冲液包含约1-10mM的碱和最终浓度为约0.03M至约0.09M的一种或多种盐;和检测已与所述样品中的目标核酸杂交的探针上的至少一个可检测标记,由此检测所述样品中的目标核酸,其中步骤a)、b)和c)的每一步均在约19摄氏度至约25摄氏度的温度下进行。

[0013] 在另一个实施方式中,本发明涉及用于测定生物样品中是否存在目标核酸的方法,包括步骤:

[0014] 使包含目标核酸的生物样品变性;用所述样品孵育至少一个探针,其中所述探针包含与所述目标核酸中的核苷酸序列基本上互补的核苷酸序列和至少一个可检测标记;在洗涤缓冲液中洗涤所述样品;和通过检测一个或多个已与所述样品中的目标核酸杂交的探针来测定所述样品中是否存在所述目标核酸,其中步骤a)、b)和c)的至少一步在约19摄氏度至约25摄氏度的温度下进行。

[0015] 本文描述的所述方法中的任何步骤均可有效地在室温下进行。因此,在室温下进行全部方法步骤避免了对昂贵温度设备和遵守精确且可变的温度要求的需求。与标准的升温FISH技术相比,这种方法要求更少的步骤和更少的时间来完成。

[0016] 本发明还涉及以下项目:

[0017] 1.一种检测生物样品中的目标核酸的方法,包括步骤:

[0018] a) 在约19摄氏度至约25摄氏度的温度下用包含蛋白酶的溶液预处理包含所述目标核酸的生物样品;

[0019] b) 使所述样品变性;

[0020] c) 使至少一个探针与所述样品中的目标核酸杂交,其中所述探针包含与所述目标核酸中的核苷酸序列基本上互补的核苷酸序列和至少一个可检测标记;

[0021] d) 洗涤所述样品,以去除未与所述目标核酸杂交的探针;和

[0022] e) 检测与所述目标核酸杂交后的寡核苷酸探针上的所述至少一个可检测标记,由此检测所述样品中的目标核酸。

[0023] 2.项目1所述的方法,其中a)中的所述溶液包含约0.1%至约0.3%的胃蛋白酶。

[0024] 3.项目1或2所述的方法,其中a)中的所述溶液具有酸性pH。

[0025] 4.项目3所述的方法,其中a)中的所述溶液包含0.01N HCl。

[0026] 5.项目1、2或3所述的方法,其中使所述样品与a)中的所述溶液接触约5至约20分钟。

[0027] 6.项目5所述的方法,其中使所述样品与a)中的所述溶液接触约15分钟。

[0028] 7.项目1-6任一项所述的方法,其中步骤b)-d)的一个或多个在约19摄氏度至约25摄氏度的温度下进行。

[0029] 8. 项目1-7任一项所述的方法,其中所述探针为包含约20至约50个核苷酸的单链寡核苷酸探针。

[0030] 9. 项目1-7任一项所述的方法,其中所述探针由基因组片段制备。

[0031] 10. 项目1-9所述的方法,其中所述生物样品包含上皮细胞、皮肤细胞、骨髓细胞、分裂球、精细胞、卵母细胞或极体,或它们的组合。

[0032] 11. 一种检测生物样品中的目标核酸的方法,包括步骤:

[0033] a) 在约19摄氏度至约25摄氏度的温度下,使至少一个探针与所述样品中的目标核酸杂交,其中所述探针:

[0034] 1) 存在于包含约1-10mM碱且pH为约10至约13的杂交缓冲液中,和

[0035] 2) 包含与所述目标核酸中的核苷酸序列基本上互补的核苷酸序列和至少一个可检测标记;

[0036] b) 洗涤所述样品,以去除未与所述目标核酸杂交的探针;和

[0037] c) 检测与所述样品中的目标核酸杂交后的所述探针上的所述至少一个可检测标记,由此检测所述样品中的目标核酸。

[0038] 12. 项目11所述的方法,其中所述杂交缓冲液的pH为约11至约12。

[0039] 13. 项目11或12所述的方法,其中所述杂交缓冲液包含约1-5mM碱、约20-60%甲酰胺和约5-40%硫酸葡聚糖。

[0040] 14. 项目11、12或13所述的方法,其中所述碱为NaOH。

[0041] 15. 项目14所述的方法,其中所述杂交缓冲液包含约1.0-3.0mM NaOH、约30-50%甲酰胺和约10%硫酸葡聚糖。

[0042] 16. 项目14所述的方法,其中所述杂交缓冲液包含约4.2mM NaOH、约42%甲酰胺和约28%硫酸葡聚糖。

[0043] 17. 项目11-16任一项所述的方法,其中步骤a)的持续时间为约5分钟至约15分钟。

[0044] 18. 项目11-17任一项所述的方法,其中所述探针为包含约20至约50个核苷酸的单链寡核苷酸探针。

[0045] 19. 项目11-17任一项所述的方法,其中所述探针由基因组片段制备。

[0046] 20. 项目11-19任一项所述的方法,其中所述生物样品包含上皮细胞、皮肤细胞、骨髓细胞、分裂球、精细胞、卵母细胞或极体,或它们的组合。

[0047] 21. 项目11-20任一项所述的方法,其中步骤b)在约19摄氏度至约25摄氏度的温度下进行。

[0048] 22. 一种检测生物样品中的目标核酸的方法,包括步骤:

[0049] a) 使包含所述目标核酸的生物样品变性;

[0050] b) 使至少一个探针与所述样品中的目标核酸杂交,其中所述探针包含与所述目标核酸中的核苷酸序列基本上互补的核苷酸序列和至少一个可检测标记;

[0051] c) 在约19摄氏度至约25摄氏度的温度下,在pH为约10至约13的洗涤缓冲液中洗涤所述样品,所述洗涤缓冲液包含约1-10mM的碱;和

[0052] d) 检测已与所述样品中的目标核酸杂交的探针上的所述至少一个可检测标记,由此检测所述样品中的目标核酸。

[0053] 23. 项目22所述的方法,其中所述洗涤缓冲液的pH为约11。

- [0054] 24. 项目22或23所述的方法,其中所述洗涤缓冲液包含约1-3mM碱和约 $2 \times \text{SSC}$ 。
- [0055] 25. 项目22、23或24所述的方法,其中所述碱为NaOH。
- [0056] 26. 项目22-25任一项所述的方法,其中所述洗涤缓冲液包含约1.75至2mM NaOH和约 $2 \times \text{SSC}$ 。
- [0057] 27. 项目22-26任一项所述的方法,其中步骤c) 包含一次或多次洗涤,并且每次洗涤的持续时间为约2分钟至约5分钟。
- [0058] 28. 项目22-27任一项所述的方法,其中所述探针为包含约20至约50个核苷酸的单链寡核苷酸探针。
- [0059] 29. 项目22-27任一项所述的方法,其中所述探针由基因组片段制备。
- [0060] 30. 项目21-29所述的方法,其中所述生物样品包含上皮细胞、皮肤细胞、骨髓细胞、分裂球、精细胞、卵母细胞或极体,或它们的组合。
- [0061] 31. 项目21-30任一项所述的方法,其中步骤a) 和b) 的一个或多个在约19摄氏度至约25摄氏度的温度下进行。
- [0062] 32. 一种检测生物样品中的目标核酸的方法,包括步骤:
- [0063] a) 通过用包含碱和约50%至约80%的醇的溶液接触所述样品,使包含所述目标核酸的生物样品变性;
- [0064] b) 使至少一个探针与所述样品中的目标核酸杂交,其中所述探针:
- [0065] 1) 存在于包含约1-10mM碱且pH为约10至约13的杂交缓冲液中,和
- [0066] 2) 包含与所述目标核酸中的核苷酸序列基本上互补的核苷酸序列和至少一个可检测标记;
- [0067] c) 在pH为约10至约13的洗涤缓冲液中洗涤所述样品,所述洗涤缓冲液包含约1-10mM;和
- [0068] d) 检测已与所述样品中的目标核酸杂交的探针上的所述至少一个可检测标记,由此检测所述样品中的目标核酸,
- [0069] 其中,步骤a)、b) 和c) 中的每一个均在约19摄氏度至约25摄氏度的温度下进行。
- [0070] 33. 一种测定生物样品中是否存在目标核酸的方法,包括步骤:
- [0071] a) 使包含所述目标核酸的生物样品变性;
- [0072] b) 用所述样品孵育至少一个探针,其中所述探针包含与所述目标核酸中的核苷酸序列基本上互补的核苷酸序列和至少一个可检测标记;
- [0073] c) 在洗涤缓冲液中洗涤所述样品;和
- [0074] d) 通过检测已与所述样品中的目标核酸杂交的一个或多个探针,测定所述样品中是否存在所述目标核酸,
- [0075] 其中,步骤a)、b) 和c) 中至少一个在约19摄氏度至约25摄氏度的温度下进行。
- [0076] 34. 项目33所述的方法,其中步骤a)、b) 和c) 各自在约19摄氏度至约25摄氏度的温度下进行。
- [0077] 35. 一种用于检测生物样品中的目标核酸的试剂盒,其包括:
- [0078] a) 包含约0.03M至约0.17M碱和约50%至约80%的醇的变性缓冲液;
- [0079] b) 包含约1-10mM碱且pH为约10至约13的杂交缓冲液;和
- [0080] c) 包含约1-10mM碱的洗涤缓冲液,其中所述洗涤缓冲液的pH为约10至约13。

- [0081] 36. 项目35所述的试剂盒,进一步包含用于预处理所述样品的一种或多种蛋白酶。
- [0082] 37. 项目36所述的试剂盒,其中所述一种或多种蛋白酶包括胃蛋白酶。
- [0083] 38. 项目35、36或37所述的试剂盒,进一步包含至少一个包含与所述目标核酸中的核苷酸序列基本上互补的核苷酸序列和至少一个可检测标记的探针。
- [0084] 39. 项目35-38任一项所述的试剂盒,其中所述变性缓冲液包括约0.07M氢氧化钠和约70%乙醇。
- [0085] 40. 项目35-39任一项所述的试剂盒,其中所述杂交缓冲液包含约1-5mM碱、约20-60%甲酰胺和约5-40%硫酸葡聚糖。
- [0086] 41. 项目35-40任一项所述的试剂盒,其中所述洗涤缓冲液包括约1.75至2mM NaOH。
- [0087] 42. 项目41所述的试剂盒,其中所述洗涤缓冲液进一步包含约2×SSC。
- [0088] 附图简要说明
- [0089] 本专利或申请文件包含至少一个以彩色制作的图。将按要求通过办事处提供具有彩色附图的本专利或专利申请公开的副本和支付必要的费用。
- [0090] 图1为描述在使用常规变性条件(蓝色)或室温变性条件(灰色)的FISH后,由标记的Y和X染色体寡核苷酸探针所产生的信噪比(SNR)的对比的图。
- [0091] 图2为示出使用室温变性和杂交步骤以及标准洗涤条件的FISH后,**Oligo-FISH® X**(红色)和Y染色体(绿色)(箭头)探针所产生的信号的来自外周血液的中期染色体涂片和间期核的图像。
- [0092] 图3为描述未处理的外周血细胞上的室温(Iso Hyb(3.0mM NaOH缓冲液))或37℃(对照)下杂交后的染色体3(金色)、染色体6(浅绿色)、染色体7(绿色)和染色体20(红色)探针的信噪比的图。
- [0093] 图4为描述膀胱上皮细胞上的室温(Iso Hyb(3.0mM NaOH缓冲液))或37℃(对照)下杂交后的染色体3(金色)、染色体6(浅绿色)、染色体7(绿色)和染色体20(红色)探针的信噪比的图。
- [0094] 图5为根据本文实施例5中描述的FISH方案已用由BAC制备的单一序列染色体13探针在室温下杂交的外周血液玻片的图像。
- [0095] 发明详述
- [0096] 定义
- [0097] 除非另有定义,本文中使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域的普通技术人员通常理解的相同的含义。
- [0098] 如本文所使用,术语“室温”和“RT”是指约19摄氏度至约25摄氏度的温度。
- [0099] 如本文所使用,“室温方法”或“室温程序”(例如,“室温FISH”)是指在标准的现有技术原位检测方法中通常在高温(例如,大于25摄氏度的温度)下进行的至少一个方法步骤(例如,变性、杂交、杂交后洗涤)在约19摄氏度至约25摄氏度的范围内进行的方法。在本文中描述的室温方法中,优选至少两个、更优选至少三个、甚至更优选所有这种方法步骤在约19摄氏度至约25摄氏度的范围内进行。如果“室温方法”中的两个或更多个步骤在室温下进行,则那些步骤中每一个进行的温度不需要相同,只要所述温度在约19摄氏度至约25摄氏度的范围内。

[0100] 术语“核苷酸”是指天然存在的核糖核苷酸或脱氧核糖核苷酸单体,以及非天然存在的其衍生物和类似物。因此,核苷酸可包括,例如,包含天然存在的碱基(例如,A、G、C或T)的核苷酸和包含修饰的碱基(例如,7-去氮杂鸟苷(7-deazaguanosine)或肌苷)的核苷酸。

[0101] 关于核酸的术语“序列”是指通过共价键(例如磷酸二酯键)连接的连续系列的核苷酸。

[0102] 术语“核酸”是指具有多个核苷酸单体的聚合物。核酸可以是单链或双链的,可以是DNA(例如,cDNA或基因组DNA)、RNA或杂化聚合物(例如,DNA/RNA)。核酸可以是化学或生物化学修饰的和/或可包含非天然的或衍生的核苷酸碱基。核酸修饰包括,例如,甲基化,用类似物取代一种或多种天然存在的核苷酸,核苷酸间修饰如不带电的连接(例如,膦酸甲酯、磷酸三酯、氨基磷酸酯、氨基甲酸酯等)、带电的连接(例如,硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯等)、悬挂部分(例如,多肽)、嵌入剂(例如,吡啶、补骨脂素等)、螯合剂、烷基化剂和修饰的连接(例如, $\alpha$ 异头核酸等)。核酸还包括在其通过氢键键合和其它化学相互作用结合至指定序列的能力上模拟核酸的合成分子。通常,核苷酸单体通过磷酸二酯键连接,尽管核酸的合成形式可包含其它连接(例如,肽核酸(本文中也称为“PNA”),如Nielsen等,Science 254, 1497-1500, 1991中所描述)。核酸还可以包括,例如,构象限制的核酸(例如,“锁核酸”或“LNA”,如Nielsen等,J.Biomol.Struct.Dyn.17:175-91, 1999中所描述)、吗啉代、乙二醇核酸(GNA)和苏糖核酸(TNA)。“核酸”不限于任何特定长度的聚合物,因此基本上可以是任何长度,通常约6个核苷酸至约 $10^9$ 个核苷酸或更长。在双链聚合物情况下,“核酸”可以指任一条或两条链。

[0103] 术语“寡核苷酸”是指通过共价键如磷键(例如,磷酸二酯、膦酸烷基和芳基酯、硫代磷酸酯、磷酸三酯)和/或非磷键(例如,肽、氨基磺酸酯等)连接的长度通常为约6至100个核苷酸碱基的短核酸。

[0104] 如本文所使用,术语“基因组片段”是指从基因组DNA制备的片段,包括但不限于,克隆的基因组片段和扩增的基因组片段(例如,通过PCR扩增制备的基因组片段)。

[0105] 术语“目标核酸”是指期望检测其是否存在于样品中的核酸。

[0106] 术语“目标序列”是指能够与寡核苷酸探针上的互补序列(例如,基本上互补的序列)形成氢键键合的双链体(duplex)的目标核酸中的核苷酸序列。

[0107] 如本文所使用,“互补的”是指两个不同的核酸链之间或相同核酸链的两个区域之间的序列互补性。如果当以反平行方式排列两个区域时,第一区域的至少一个核苷酸残基能够与第二区域的残基碱基配对(即,氢键键合),从而形成氢键键合的双链体,则核酸的第一区域与相同或不同的核酸的第二区域是互补的。

[0108] 术语“基本上互补的”是指能够在严格的杂交条件下彼此碱基配对以形成稳定的氢键键合的双链体的两个核酸链(例如,目标核酸链和互补的单链寡核苷酸探针),所述严格的杂交条件包括本文中描述的室温杂交条件。通常,“基本上互补的”是指具有至少70%、例如约75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%或100%互补性的两个核酸。

[0109] “重复序列”或“重复的序列”是指人类基因组中非编码的串联重复的核苷酸序列,其包括,例如,来自 $\alpha$ 随体、随体1、随体2、随体3、 $\beta$ 随体、 $\gamma$ 随体和端粒的重复序列。重复序列是本领域已知的,例如在(Allshire等,Nucleic Acids Res 17(12):4611-27(1989);Cho等,Nucleic Acids Res 19(6):1179-82(1991);Fowler等,Nucleic Acids Res 15(9):



3929 (1987); Haaf等, Cell 70 (4): 681-96 (1992); Lee等, Chromosoma 109 (6): 381-9 (2000); Maeda和Smithies, Annu Rev Genet 20: 81-108 (1986); Meyne和Goodwin, Chromosoma 103 (2): 99-103 (1994); Miklos (1985). Localized highly repetitive DNA sequences in vertebrate genomes. Molecular evolutionary genetics. I. J. R. Macintyre. NY, Plenum Publishing Corp.: 241-321 (1985); Tagarro等, Hum Genet 93 (2): 125-8 (1994); Waye和Willard, PNAS USA 86 (16): 6250-4 (1989); 以及 Willard和Waye, J Mol Evol 25 (3): 207-14 (1987) 中描述。重复序列位于例如染色体的着丝粒区域、近着丝粒 (pericentromeric) 区域、异染色质区域和端粒区域。一致性重复序列在例如 Willard和Waye, J Mol Evol 25 (3): 207-14 (1987); Tagarro等, Hum Genet 93 (2): 125-8 (1994); Vissel和Choo, Nucleic Acids Res. 15 (16): 6751-6752 (1987); Cho等, Nucleic Acids Res 19 (6): 1179-82 (1991) 中描述。

[0110] 如本文所使用, 术语“染色体特异性核酸序列”或“染色体特异性核苷酸序列”是指对细胞基因组内的特定染色体特异性的核酸序列。

[0111] 术语“探针”是指包括与目标核酸中的目标序列基本上互补的目标结合区域因而能够与目标核酸形成氢键键合的双链体的寡核苷酸。通常, 所述探针为单链探针, 具有一个或多个可检测标记以允许在与其互补目标杂交后检测所述探针。

[0112] 如本文所使用, “目标结合区域”是指能够与互补目标核酸形成氢键键合的双链体的寡核苷酸探针的一部分。

[0113] 如本文所使用, 术语“可检测标记”是指表示其结合的相应分子 (例如, 探针) 存在的部分。

[0114] “间接标记”是指使用特异性结合所述间接标记的标记的二级试剂或结合配体的配偶体检测的部分或配体。

[0115] “直接标记”是指不存在结合配体的配偶体的相互作用的情况下可检测的部分。

[0116] 术语“生物样品”是指生物来源 (例如, 细胞、组织、器官、流体) 的材料。

[0117] 在两个分子 (无论是单体还是聚合分子) 的连接上下文中的“接头”表示插入在所连接的两个分子之间且与它们相邻的分子 (无论是单体还是聚合分子)。“接头”可用于连接例如寡核苷酸探针序列和标记 (例如, 可检测标记)。所述接头可以是核苷酸接头 (即, 在非相邻的序列之间且与它们相邻的核酸序列) 或非核苷酸接头。

[0118] 术语“杂合体 (hybrid)”是指通过互补的核苷酸之间的氢键键合而形成的双链核酸分子。

[0119] 术语“严格性”是指影响杂合体的稳定性的杂交条件, 例如温度、盐浓度、pH、甲酰胺浓度等。凭经验优化这些条件以使探针与目标核酸的特异性结合最大化, 并使探针与目标核酸的非特异性结合最小化。

[0120] 术语“荧光团”是指具有荧光性的化学基团。

[0121] 术语“任选”表示可包括或不包括所列举的步骤 (例如, 在本发明的方法的情况下) 或组分 (例如, 在本发明的试剂盒的情况下)。

[0122] 本发明部分基于发现了简化且有效的替代性荧光原位杂交 (FISH) 技术 (在本文中称为“室温FISH”), 其中样品变性、探针杂交、洗涤或它们的任何组合可在室温下进行。传统 FISH 方法与本发明的两种不同的室温 FISH 方法之间的对比显示于表 1 中。列出了完成所述

方法所需的不同步骤,以及要求的温度、装置和与寡核苷酸探针一起使用所需的时间。本发明的室温方法避免了对传统FISH方法通常要求的昂贵的精确温度设备(例如,水浴器、加热板、孵育箱、冷冻装置)的需要。

[0123] 表1. 传统FISH与室温FISH方法的对比

[0124]	传统FISH				RT FISH		快速RT FISH	
	处理	温度 (℃)	设备	时间 (min)	温度 (℃)	时间 (min)	温度 (℃)	时间 (min)
	蛋白酶	37	水浴	5-15*	RT	5-15*	N/A***	
	洗涤	RT	N/A	5	RT	5		
	甲醛 1%	RT	N/A	10	RT	10		
	洗涤	RT	N/A	5	RT	5		
	70%乙醇	RT	N/A	1	N/A	N/A		
	变性	RT	N/A	N/A	RT	10	RT	10
	85%乙醇	RT	N/A	1	RT	1	RT	1
	100%乙醇	RT	N/A	1	RT	1	RT	1
	空气干燥	RT	N/A	5	RT	5	RT	5
	杂交	37	加热板	5-10**	RT	5-10**	RT	5-10**
	洗涤	RT	N/A	5	RT	5	RT	5
	洗涤	50	水浴器	5	N/A	N/A	N/A	N/A
	洗涤	N/A	N/A	N/A	RT	5	RT	5
	洗涤	RT	N/A	5	RT	5	RT	5
	安装玻片	RT	N/A	10	RT	10	RT	10
[0125]	总时间 (min)	58-73			72-87		47-62	

[0126] \*取决于细胞类型或组织,可能要求更长的蛋白酶时间

[0127] \*\*取决于细胞类型或组织,可能要求更长的杂交时间

[0128] \*\*\*在大多数细胞类型情况下,由于变性试剂透过细胞膜并部分降解蛋白质,因而不需要预处理。

[0129] RT=室温 N/A=不适用

[0130] 用于检测目标核酸的方法/用于测定生物样品中是否存在目标核酸的方法

[0131] 在一个实施方式中,本发明涉及用于测定生物样品中是否存在目标核酸的室温方法。在另一实施方式中,本发明涉及用于检测生物样品中的目标核酸的室温方法。本发明的示例性方法包括在室温下进行的一个或多个步骤,其中所述步骤选自由下述组成的组:使样品变性;用所述样品中的目标核酸孵育至少一个可检测标记的探针(例如,单链寡核苷酸探针、BAC探针);洗涤所述样品以除去未杂交的探针,并检测所述探针上的可检测标记,由此检测所述样品中的目标核酸(如果存在)。在一个优选实施方式中,本文中描述的方法的所有步骤均在室温下、优选在约21°C的温度下进行。

[0132] 下文给出本发明所述方法各个步骤的详细说明。

[0133] 样品制备/预处理

[0134] 适合于本发明方法的生物样品包括,例如,细胞(例如,细胞系、外周血细胞、上皮细胞)、组织(福尔马林固定、石蜡包埋的组织(FFPE))、器官、血液、脊髓液、淋巴液、眼泪、唾液、痰、尿、精液、羊水、毛发、皮肤、肿瘤(例如,活组织检查)。所述生物样品优选包括染色体的DNA。在一个特定的实施方式中,本发明所述方法中使用的生物样品为包含动物(例如,人)或植物来源的细胞的细胞样品。所述样品中的细胞优选包含一种或多种下述细胞类型:上皮细胞(例如,膀胱上皮细胞、子宫内膜上皮细胞、剥落的前列腺上皮细胞、结肠上皮细胞)、外周血细胞、皮肤细胞(例如,来自FFPE皮肤组织切片的细胞)、骨髓细胞、来自胚胎的分裂球、精细胞、卵母细胞和极体。所述生物样品优选从人获得。

[0135] 在一个实施方式中,生物样品可包括单个目标核酸,或在替代的实施方式中,包括多种目标核酸(例如,两种或更多种不同的目标核酸)。目标核酸可以是DNA或RNA,并可包括基因内的、基因间的和/或转基因的核苷酸序列。因此,目标核酸可以是内生的基因组核苷酸序列或人造或外来的(例如,转基因的)核苷酸序列。通常,目标核酸包含染色体特异性核苷酸序列。示例性的染色体特异性核苷酸序列显示于表2中。

[0136] 表2. 示例性的染色体特异性核酸序列。

SEQ ID NO:	名称	序列(5'-3')
1	Y1	CCAGTCGAATCCATTCGAGTACATACC
2	Y2	CCTTTTGAATCCATTCATTGGAGTCC
3	Y3	ATTCATTGCATTCCGTTTCATGAAATTCGA
4	Y4	CTGCATACAATTTCACTCCATTCGTTCCCA
5	Y5	TCCATTGGAGTCAATTCCTTTTCGACACCCA
6	Y6	TTGATCCTATTTTATTAAATTGCATTCTAT
7	2.1.1	GTGCGCCCTCAACTAACAGTGTTGAAGCTT
8	2.2.2	GAAACGGGATTGTCTTCATATAAACTCTAG
9	2.5.1	GTATCTTCCAATAAAAAGCTAGATAGAAGCA
10	2.6.1	ATGTCAGAACTTTTTCATGATGTATCTAC
11	2.7.3	TATGTGTGATGTGCGCCCTCAACTAAGAGT
12	2.8.4	TCTCAGAAGCTTCATTGGGATGTTCAATT
13	2.10.1	GGAATACGGTGATAAAGGAAATATCTTCCA
14	4.3.2	TCTTTGTGTTGTGTGTACTCATGTAACAGT
15	4.6.2	TTTCTGCCCTACCTGGAAGCGGACATTTCG
16	4.7.5	GGTTATCTTCATATAAAATCCAGACAGGAG
17	4.10.2	CGGCACTACCTGGAAGTGATATTTTCGAGC
18	4.18.7	TCTGCACTACCTGGAAGAGGCCATTTTCGAG
19	4.22.10	CCTACGGGGAGAAAGGAAATATCTTCAAAAT

[0138] 目标核酸可包括单一或重复的核苷酸序列。所述目标核酸优选包括重复的基因组序列,例如,特异性的人染色体(即,染色体1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、X染色体或Y染色体)的重复序列。适合的重复序列包括,但不限于,着丝粒重复序列、近着丝粒重复序列、异染色体重复序列、端粒重复序列、 $\alpha$ 随体重复序列、 $\beta$ 随

体重重复序列、 $\gamma$  随体重重复序列和随体1、2或3重复序列。在一些实施方式中,所述目标核酸包括特定重复序列内的约20至约50个连续核苷酸的目标序列。

[0139] 通常,本发明所述方法中使用的生物样品为固定的样品(例如,固定细胞样品、固定组织样品、染色体涂片(spread))。各种适合的固定剂是本领域已知的,其包括,例如酸性丙酮溶液、各种醛溶液(例如,甲醛、多聚甲醛和戊二醛)和酸性醇溶液。用于染色体制剂的特定固定剂的实例例如在Trask等(Science 230:1401-1402,1985)中描述。所述生物样品可在溶液或固相载体上制备(例如,固定),所述固相载体例如但不限于,显微镜玻片、盖玻片和多孔板(例如,微孔板)。

[0140] 在一个实施方式中,在用所述样品孵育探针之前,使生物样品与包含至少一种碱(例如,NaOH)和至少一种醇(例如,乙醇)的溶液接触(例如,使变性)。通过使所述样品与包含碱和醇的所述溶液接触,使所述样品中的核酸变性,使得所述目标核酸更易接近互补探针。在某种类型的生物样品(例如,精细胞)中,包含碱和醇的所述溶液还可解聚(decondense)所述样品中的染色体,进一步促进目标核酸对互补探针的可接近性。

[0141] 用于本发明所述方法的适合的碱包括,但不限于,氢氧化钾、氢氧化钡、氢氧化铯、氢氧化钠、氢氧化锶、氢氧化钙、氢氧化锂、氢氧化铷、氢氧化镁、丁基锂、二异丙基氨基锂、二乙氨基锂、氨基钠、氢化钠、双(三甲基甲硅烷基)氨基锂、碳酸钠和氨水或它们的组合。所述碱优选为强碱(alkali base)。所述碱更优选为氢氧化钠。本发明所述方法中使用的碱/醇溶液中的碱的适合浓度通常为约0.03当量(N)至约0.17N,例如约0.05N、约0.06N、约0.07N、约0.08N、约0.09N或约0.1N。在一个特定实施方式中,所述溶液包含约0.07N NaOH,其相当于0.07M NaOH。

[0142] 用于本发明所述方法的示例性醇类包括,例如,乙醇、甲醇、丙醇、丁醇、戊醇和异戊醇,或它们的混合物。在一个特定实施方式中,所述溶液包含乙醇。所述碱/醇溶液优选包含约0.07N碱和约70%乙醇。所述醇可以以约50体积%至约90体积%、例如约60体积%、约70体积%或约80体积%的浓度存在于所述溶液中。所述醇优选以约70体积%的浓度存在。

[0143] 所述生物样品通常与所述碱/醇溶液接触约3分钟至约20分钟的时间,优选约11分钟至约17分钟,更优选约13分钟至约15分钟。在一个特定实施方式中,在约19℃至约25℃、优选约20℃至约22℃、更优选约21℃的温度下,在所述碱/醇溶液中孵育所述样品。

[0144] 在另一实施方式中,在高温(例如,72℃)下,在非碱性变性缓冲液(例如,70%甲酰胺)中使所述生物样品变性。

[0145] 本发明所述方法可任选包括常规原位杂交程序中通常使用以使样品中的核酸更容易接近探针的一个或多个额外步骤(例如,预处理步骤)。这种步骤包括,例如,用一种或多种蛋白酶(例如,蛋白酶K、胰蛋白酶、胃蛋白酶、胶原蛋白酶)和/或弱酸(例如,0.02-0.2N HCl、25%至75%乙酸)处理生物样品。还可以使用任选的用核糖核酸酶的预处理,以从所述生物样品中去除残余的RNA。其它任选的预处理步骤包括样品的用甲醛或多聚甲醛固定、洗涤剂透化、热变性和熟化。

[0146] 在一个实施方式中,本发明所述方法包括在使样品变性之前,在约19℃至约25℃、优选约20℃至约22℃、更优选约21℃的温度下,用一种或多种蛋白酶(例如胃蛋白酶)处理(例如,预处理、消解)所述生物样品的任选步骤。所述蛋白酶优选以约0.1%至约0.3%的浓度存在于缓冲液中。所述缓冲液优选为酸性缓冲液。用于本发明所述方法的适合的预处理

缓冲液包括,但不限于0.01N HCl。通常,用蛋白酶处理(例如,预处理、消解)所述生物样品约5分钟至约20分钟。在一个特定实施方式中,用胃蛋白酶在0.01N HCl中预处理所述生物样品约15分钟。

#### [0147] 探针杂交

[0148] 当目标核酸存在于样品中时,本发明所述方法进一步包括在室温下在适合于使探针与目标核酸杂交的条件下,用所述样品孵育至少一个探针(例如,寡核苷酸)的步骤。例如,杂交可在约19℃至约25℃、优选约20℃至约22℃、更优选约21℃的温度下进行。通常,在探针足以与生物样品中的互补的目标核酸杂交的条件(例如,温度、孵育时间、盐浓度等)下进行杂交。适合用于原位杂交技术的杂交缓冲液和条件通常是本领域已知的(参见,例如,Sambrook和Russell, *supra*; Ausubel等, *supra*。还参见Tijssen, *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*, Vol.24:Hybridization with Nucleic Acid Probes (Elsevier, NY 1993))。例如,在本发明的方法中,可使用包含甲酰胺、硫酸葡聚糖和柠檬酸钠盐水(SSC)的杂交缓冲液。所述杂交缓冲液中的甲酰胺的适合浓度包括,例如,约20体积%至约90体积%,例如约60体积%、约70体积%或约80体积%的浓度。杂交缓冲液中的硫酸葡聚糖的适合浓度包括,例如,约3%至约20%。杂交缓冲液中的SSC的适合浓度包括,例如,约0.1×至约4×。所述杂交缓冲液中的所有盐的浓度优选为约0.03M至约0.09M。

[0149] 在一个特定实施方式中,在碱性条件下进行所述杂交步骤。例如,使用含有一种或多种碱(例如,NaOH)且pH为约10至约13、优选约11至约12的杂交缓冲液。本文中描述为适合用于所述碱和醇变性溶液的任何碱也可以用于所述杂交缓冲液。本发明所述方法中可使用的适合的碱性杂交缓冲液包括,例如,约20-60%甲酰胺、约5-40%硫酸葡聚糖和约1-10mM NaOH,且具有约10至约13的pH。优选地,所述碱性杂交缓冲液包含约30-50%甲酰胺、约10%硫酸葡聚糖和约1-3mM NaOH,且具有约11至约12的pH。当在本文描述的方法中使用重复序列探针(例如,寡核苷酸探针)时,这种条件是特别适合的。当使用单一序列探针(例如,BAC探针)时,用于本发明所述方法的示例性杂交缓冲液包括,例如,约4.2mM NaOH、约42%甲酰胺和约28%硫酸葡聚糖。

[0150] 如本领域普通技术人员将理解的,给定目标序列及其互补探针的最佳杂交条件将取决于若干因素如盐浓度、孵育时间和探针的浓度、组成和长度。基于这些和其它已知的因素,本领域普通技术人员能够容易地确定适合的结合条件,以及如果必要,为根据本发明方法的应用进行优化。通常,在允许基本上互补的核苷酸序列的特异性结合的严格条件下进行杂交。可增加或降低严格性,以特定检测具有100%互补性的目标核酸或检测具有小于100%互补性(例如,约70%互补性、约80%互补性、约90%互补性)的相关核苷酸序列。可改变因素如探针序列的长度和性质(DNA、RNA、碱基组成)、目标核苷酸序列的性质(DNA、RNA、碱基组成、存在于溶液中或固定)和杂交缓冲液/溶液中杂交缓冲液的盐和其它组分的浓度(例如,甲酰胺、硫酸葡聚糖、聚乙二醇和/或盐的浓度),以形成低、中或高严格性的条件。可基于核苷酸碱基组成和长度以及使用环境,或者凭经验或基于用于确定这种变化的公式(参见,例如,Sambrook等, *supra*; Ausubel等, *supra*)改变这些条件。

[0151] 在某些实施方式中,用样品孵育两个或多个探针的群体(例如,鸡尾酒(cocktail))。通常,探针鸡尾酒组合物包括多个不同的标记探针,每种不同的标记探针具有(a)不同的染色体特异性序列和(b)可与鸡尾酒中对不同染色体具有特异性的其它探针

上的可检测标记区分开的不同的可检测标记。在一些实施方式中,所述探针上的可检测标记为具有光谱可区分的发射波长的荧光团。通过使用用可区分的标记物如光谱可区分的荧光团标记的不同探针,可同时使用探针的组合以检查样品中是否存在两种或更多种目标核酸(例如,在两种或更多种不同的染色体上)。可视情况调整杂交和洗涤条件,以区分可检测的标记物。

[0152] 可用于本发明所述方法的探针包含由与样品中目标核酸中的核苷酸序列(例如,目标序列)基本上互补的核苷酸序列组成的目标结合区域。虽然通常期望,但不要求探针中的目标结合区域与目标核酸具有100%的互补性。例如,在一些实施方式中,可用于本发明所述方法的探针可包含与目标核酸中核苷酸序列至少约70%、例如约80%、约90%、约95%或约99%互补的核苷酸序列。

[0153] 适合用于本发明所述方法的探针包括,但不限于,DNA探针、cDNA探针、RNA探针、肽核酸(PNA)探针、锁核酸(LNA)探针、吗啉代探针、乙二醇核酸(GNA)探针和苏糖核酸(TNA)探针。这种探针可以是化学或生物化学修饰的和/或可包含非天然的或衍生的核苷酸碱基。例如,探针可包含具有修饰的碱基(例如,5-甲基胞嘧啶)和/或修饰的糖基(例如,2'-O-甲基核糖基、2'-O-甲氧基乙基核糖基、2'-氟核糖基、2'-氨基核糖基)的修饰的核苷酸。虽然优选直链探针,但有用的探针可以是环状的或支链的,和/或包括能够形成稳定的二级结构(例如,茎-和-环和环-茎-环发夹结构)的域。

[0154] 适合用于包括本发明所述方法的原位杂交方法的探针是本领域众所周知的,其包括,例如,寡核苷酸探针(例如,合成的寡核苷酸)、使用基因组片段(例如,克隆的基因组片段、扩增的基因组片段)制备的探针和整个基因组阵列(例如,比较的基因组杂交阵列)。

[0155] 在一个特定实施方式中,用于本发明的探针为寡核苷酸探针(例如,单链DNA寡核苷酸探针)。可用于本发明所述方法的典型寡核苷酸探针为直链的,其尺寸为约20至约100个核苷酸,优选约30至约50个核苷酸。在一个特定实施方式中,在本发明所述方法中使用长度约为30个核苷酸的寡核苷酸探针。优选靶向重复的基因组DNA序列的寡核苷酸探针。

[0156] 在另一实施方式中,由基因组片段制备本发明所使用的探针。这种基因组片段可通过各种各样的程序获得,所述程序包括但不限于,基因组DNA的扩增(例如,通过聚合酶链式反应(PCR),如长链PCR),存在于例如质粒、粘粒、人造染色体(例如,细菌人造染色体(BAC)、酵母人造染色体(YAC)、P1衍生的人造染色体和哺乳动物的人造染色体)和噬菌体中的克隆DNA片段的核酸酶消解、染色体的显微解剖和通过流式细胞术的整个染色体的分选。由基因组片段制备的探针优选靶向单一、非重复的基因组序列。

[0157] 制备可用于本发明所述方法的探针的方法是本领域众所周知的,其包括,例如,生物化学方法、重组体方法、合成(例如,化学合成)方法和半合成方法。在一个实施方式中,本发明所述方法中使用的寡核苷酸探针是通过化学合成制备的。合成的寡核苷酸探针可使用用于核酸合成的已知方法(参见,例如,Glick和Pasternak,Molecular Biotechnology: Principles and Applications of Recombinant DNA (ASM Press 1998))来制备。例如,可使用溶液相或固相技术。合成程序通常是自动化的,其可包括,例如,亚磷酰胺法、亚磷酸三酯法、H-磷酸酯法或磷酸三酯法。

[0158] 可用于本发明所述方法的探针可进一步包含一种或多种可检测标记。根据本发明适合使用的标记是本领域已知的,其通常包括通过其化学性质以直接或间接方式提供允许

探针检测的可识别信号的任何分子。因此,例如,可通过常规方式,例如使用特定的报道分子、荧光团、放射性物质或酶(例如,过氧化物酶、磷酸酶)来标记探针。在一个特定实施方式中,本发明所述方法使用的探针包括一种或多种荧光团作为可检测标记。

[0159] 适合于连接探针的可检测标记可以是间接标记或直接标记。示例性间接标记包括,例如,半抗原、生物素或其它特异性可结合的配体。对于间接标记,结合配体的配偶体通常具有直接标记,或者,也间接地被标记。作为半抗原的间接标记的实例包括二硝基苯酚(DNP)、洋地黄毒苷、生物素和各种荧光团或染料(例如,荧光素、DY490、DY590、Alexa 405/Cascade蓝、Alexa 488、Bodipy FL、丹酰、俄勒冈绿、荧光黄、四甲基罗丹明/罗丹明红和得克萨斯红)。作为间接标记,通常使用抗半抗原抗体作为结合配体的配偶体来检测半抗原。然而,也可以使用可选择的结合配体的配偶体(例如,在生物素情况下,可使用例如抗生物素抗体或链霉亲和素作为结合配体的配偶体)来检测半抗原。此外,在某些实施方式中,还可以直接检测半抗原(例如,在荧光素情况下,可使用抗荧光素抗体或直接荧光检测)。

[0160] 示例性“直接标记”包括,但不限于,荧光团(例如,荧光素、罗丹明、得克萨斯红、藻红蛋白、Cy3、Cy5、DY氟(Dyomics GmbH, Jena, 德国)、Alexa 532、Alexa 546、Alexa 568或Alexa 594)。其它直接标记可包括,例如,放射性核素(例如,3H、35S、32P、125I和14C),酶如碱性磷酸酶、辣根过氧化物酶或 $\beta$ -半乳糖苷酶,发色团(例如,藻胆蛋白),发光剂(例如化学发光剂和生物发光剂)和镧系元素螯合物(例如, Eu<sup>3+</sup>或Tb<sup>3+</sup>的络合物)。在荧光标记的情况下,荧光团不限于单一类型的有机分子,可包括无机分子、有机和/或无机分子的多分子混合物、晶体、杂聚合物等。例如,可容易地衍生出包封在二氧化硅壳中的CdSe-CdS核-壳纳米晶体,用于与生物分子偶联(Bruchez等, Science, 281:2013-2016, 1998)。类似地,高度荧光的量子点(硫化锌包封的硒化镉)已与生物分子共价偶联,用于超灵敏的生物检测(Warren和Nie, Science, 281:2016-2018, 1998)。

[0161] 探针标记可例如在合成期间或者合成后例如使用5'-端标记来进行,其包括使用末端转移酶将标记的核苷酸酶促添加至探针的5'-端。可通过使用“链终止”核苷酸添加单一标记的核苷酸。或者,可使用非终止的核苷酸,导致添加的多个核苷酸形成“尾”。对于合成标记,可在化学合成期间将标记的核苷酸(例如,亚磷酰胺核苷酸)并入所述探针中。标记可添加至探针的5'端、3'端或两端(参见,例如,美国专利号5,082,830),或ODN内部的碱基位置。

[0162] 标记核酸的其它方法利用基于铂的标记。这种方法包括通用连接系统(ULS, Kreatech Biotechnology B.V., 阿姆斯特丹, 荷兰)。基于铂的标记法以及应用描述在下述文献中,例如,美国专利号5,580,990、5,714,327和6,825,330;国际专利公开号W0 92/01699、W0 96/35696和W0 98/15546;hernandez-Santos等, Anal. Chem. 77:2868-2874, 2005; Raap等, BioTechniques 37:1-6, 2004; Heetebrij等, ChemBioChem 4:573-583, 2003; Van de Rijke等, Analytical Biochemistry 321:71-78, 2003; Gupta等, Nucleic Acids Research 31:e13, 2003; Van Gijlswijk等, Clinical Chemistry 48:1352-1359, 2002; Alers等, Genes, Chromosomes & Cancer 25:301-305, 1999; Wiegant等, Cytogenetics and Cell Genetics 87:7-52, 1999; Jelsma 等, Journal of NIH Research 5:82, 1994; Van Belkum等, BioTechniques 16:148-153, 1994; 和Van Belkum等, Journal of Virological Methods 45:189-200, 1993。

[0163] 标记的核苷酸也可使用交联剂或间隔物(spacer)连接至探针。交联剂可以是同双官能或异双官能的。适合的同双官能交联剂包括,例如,在每端具有NHS酯的胺反应性交联剂(包括,例如,二硫代双(琥珀酰亚胺基丙酸酯)(DSP);3,3'-二硫代双(磺基琥珀酰亚胺基丙酸酯)(DTSSP);二琥珀酰亚胺基辛二酸酯(DSS);双(磺基琥珀酰亚胺基)辛二酸酯(BS3);乙二醇双(琥珀酰亚胺基琥珀酸酯)(EGS);乙二醇双(磺基琥珀酰亚胺基琥珀酸酯)(磺基EGS));在两端具有酰亚胺酯的胺反应性交联剂(包括,例如己二酰亚胺酸二甲酯(DMA);庚二酰亚胺酸二甲酯(DMP);辛二酰亚胺酸二甲酯(DMS);3,3'-二硫代双丙二酰亚胺酸二甲酯(DTBP));在每端具有二硫吡啶基的巯基反应性交联剂(包括,例如,1,4-二-[3'-(2'-吡啶基二硫代)丙酰氨基]丁烷(DPDPB));在每端具有马来酰亚胺基的巯基反应性交联剂(包括,例如,双马来酰亚胺基己烷(BMH));在每端具有酰肼基的羧基反应性交联剂(包括,例如,己二酸二酰肼和碳酰肼);在每端具有环氧基的多基团反应性交联剂(包括,例如,1,2:3,4-二环氧丁烷;1,2:5,6-二环氧己烷;双(2,3-环氧丙基)醚;1,4-(丁二醇)二缩水甘油醚)。适合的异双官能交联剂包括具有胺反应性端部和巯基反应性端部的交联剂(包括,例如,3-(2-吡啶基二硫代)丙酸N-琥珀酰亚胺基酯(SPDP);长链SPDP(SPDP);磺基-LC-SPDP;琥珀酰亚胺基氧羰基- $\alpha$ -甲基- $\alpha$ -(2-吡啶基二硫代)甲苯(SMPT);磺基-LC-SMPT;琥珀酰亚胺基-4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷(SMCC);磺基-SMCC;6-((4-碘代乙酰基)氨基)己酸琥珀酰亚胺基酯(SIAX);6-(6-(((4-碘代乙酰基)氨基)己酰基)氨基)己酸琥珀酰亚胺基酯(SIAXX));具有羰基反应性端部和巯基反应性端部的交联剂(包括,例如,4-(4-N-马来酰亚胺基苯基)丁酸酰肼(MPBH);4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-羧基-酰肼盐酸盐(M2C2H);3-(2-吡啶基二硫代)丙炔基酰肼(PDPH));具有胺反应性端部和光反应性端部的交联剂(包括,例如,2-(对-叠氮基水杨酸基氨基)乙基-1,3'-二硫代丙酸磺基琥珀酰亚胺基酯(SASD);2-(7-叠氮基-4-甲基香豆素-3-乙酰胺)乙基-1,3'-二硫代丙酸磺基琥珀酰亚胺基酯(SAED));具有巯基反应性端部和光反应性端部的交联剂(包括,例如,N-[4-对-叠氮基水杨酸基氨基]丁基]-3'-(2'-吡啶基二硫代)丙酰胺(APDP));具有羰基反应性端部和光反应性端部的交联剂(包括,例如,4-(对-叠氮基水杨酸基氨基)丁胺(ASBA))。适合的间隔物包括,5'ODN修饰如dNTP's;和胺反应性的间隔物如氨基-或磺基-亚磷酰胺,包括,例如,丁基亚磷酰胺、戊基亚磷酰胺、己基亚磷酰胺、庚基亚磷酰胺、辛基亚磷酰胺、壬基亚磷酰胺、癸基亚磷酰胺、十一基亚磷酰胺、十二基亚磷酰胺、十五基亚磷酰胺、十八基亚磷酰胺。其它适合的胺反应性间隔物包括例如,活化的聚乙二醇(PEG)如(单甲氧基)n乙二醇,其中n=3-18个单元重复序列。另外的适合的交联剂和间隔物在Herman."Bioconjugate Chemistry".Academic Press.New York,NY.1996中描述。

[0164] 洗涤、复染和固定

[0165] 通常,原位杂交技术在杂交步骤后使用一系列连续的洗涤步骤,以从样品中去除未结合和/或非特异性结合的探针。这种洗涤步骤可在本发明的室温方法中进行。例如,在探针与样品杂交后,可在适当严格性的溶液中洗涤所述杂交的样品,以去除未结合和/或非特异性结合的探针。适当的严格性可通过在依次较高严格性的溶液中洗涤样品并读取每次洗涤之间的信号强度来确定。以这种方式的数据组的分析可揭示洗涤严格性,高于该严格性时杂交模式没有明显改变,并且该严格性为特定目标探针提供足够的信号。

[0166] 适合用于原位杂交方法的洗涤缓冲液通常是本领域已知的(参见,例如,Sambrook



和Russell, supra; Ausubel等, supra. 还参见Tijssen, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Vol. 24: Hybridization with Nucleic Acid Probes (Elsevier, NY 钾盐)), 其通常包括, 但不限于, 一种或多种盐 (例如, 钠盐、锂盐、钾盐)。在一些实施方式中, 所述洗涤缓冲液还可包括一种或多种碱 (例如, NaOH)。在其它实施方式中, 所述洗涤缓冲液可进一步包括一种或多种洗涤剂 (例如, 离子型洗涤剂、非离子型洗涤剂)。适合用于洗涤缓冲液的洗涤剂包括, 例如, 十二烷基硫酸钠 (SDS)、Triton<sup>®</sup> X-100、吐温<sup>®</sup> 20、NP-40或Igepal CA-630。所述洗涤缓冲液优选包含浓度为约0.5mM至约5mM的碱 (例如, NaOH) 和总浓度为约0.03M至约0.09M的一种或多种盐 (例如, 柠檬酸钠)。

[0167] 在一个特定实施方式中, 本发明所述方法中的洗涤步骤在碱性条件下进行。例如, 可使用含有一种或多种碱 (例如, NaOH) 且pH为约10至13、优选约11至12的洗涤缓冲液。本文中描述为适合用于所述碱和醇变性溶液的任何碱也可用于所述洗涤缓冲液。在本文中描述的方法中可使用的适合的碱性洗涤缓冲液包括, 例如, 约1×至5×SSC和约1-10mM碱。在一个实施方式中 (例如, 当使用重复序列探针例如寡核苷酸探针时), 所述碱性洗涤缓冲液优选含有约2×SSC和约1.75mM NaOH, 并具有约11的pH。在另一实施方式中 (例如, 当使用单一序列探针例如BAC探针时), 所述碱性洗涤缓冲液优选含有约2×SSC和约3mM NaOH。

[0168] 本领域普通技术人员能够容易地确定洗涤的次数和每次洗涤的持续时间。本发明所述室温方法的示例性碱性洗涤条件包括, 例如, 一次或多次室温下 (例如, 约21℃) 在2×SSC/1.75mM NaOH中的杂交后洗涤, 每次洗涤至少约2分钟, 优选每次洗涤约5分钟。本发明所述室温方法的示例性非碱性洗涤条件包括, 例如, 在室温下 (例如, 约21℃) 在2×SSC中杂交后首次洗涤5分钟, 然后在室温下在0.03M至0.09M一价盐 (例如, SSC) 和0.1% SDS中一次或多次洗涤, 每次洗涤至少约2分钟, 优选每次洗涤为约2分钟至约5分钟。

[0169] 在样品进行杂交后洗涤之后, 优选使用光谱可区分的DNA特异性染色如4', 6-二脒-2-苯基吲哚 (DAPI)、碘化丙啶 (PI) 或Hoechst试剂/染料复染所述样品中的染色体DNA, 并使用抗褪色试剂固定。所述DNA染色剂可直接添加至抗褪色试剂, 或可在添加抗褪色试剂之前, 用所述样品孵育、排出并冲洗。用于复染和固定样品的试剂和技术通常是本领域已知的。

#### [0170] 目标核酸的检测

[0171] 本发明所述室温方法进一步包括检测样品中的一种或多种目标核酸。通过检测已与目标核酸杂交的标记的探针来检测所述目标核酸。探针标记的检测可使用适合于特定标记的方法来完成, 所述方法可由本领域普通技术人员容易地确定。例如, 荧光团标记可通过检测所使用的特定荧光团的发射波长来检测。检测荧光信号的典型方法包括, 例如, 荧光光度法、表荧光显微镜法、共聚焦显微镜法和流式细胞术分析。通常优选荧光标记用于检测低水平的目标, 因为它们提供具有低背景值的非常强的信号。此外, 荧光标记是通过快速扫描程序, 在高分辨率和敏感性下光学上可检测的, 并且具有不同发射波长的荧光团 (例如, 荧光素和罗丹明) 的不同杂交探针可用于单个样品以检测多个目标核酸。

[0172] 在利用荧光探针的FISH程序的特定情况下, 可利用各种不同的光学分析检测杂交复合物。光谱检测方法在例如美国专利号5,719,024; Schroeck等 (Science 273:494-497, 1996); 和Speicher等 (Nature Genetics 12:368-375, 1996) 中讨论。关于常规FISH程序的

进一步指导在例如Gall和Pardue (Methods in Enzymology 21:470-480,1981);Henderson (International Review of Cytology 76:1-46,1982);和Angerer等Genetic Engineering:Principles and Methods (Setlow和Hollaender编,Plenum Press,New York,1985)中描述。

[0173] 间接标记的检测通常包括结合配偶体或二级试剂的检测。例如,间接标记如生物素和其它半抗原(例如,洋地黄毒苷(DIG)、DNP或荧光素)可通过与作为二级试剂的链霉亲和素(即,在生物素的情况下)或抗体的相互作用来检测。在探针与目标结合后,可通过使用例如直接标记的链霉亲和素或抗体来检测目标-探针复合物。或者,未标记的二级试剂可与特异性地结合二级试剂的直接标记的“三级”试剂一起使用(例如,可使用未标记的抗DIG抗体,其可以用对第一抗体的种类和类别具有特异性的标记的第二抗体来检测)。用于二级试剂的标记通常为非同位素标记,尽管可使用放射性同位素标记。典型的非同位素标记包括,例如,可与二级或三级试剂结合的酶和荧光团。通常用于DNA诊断的酶包括,例如,辣根过氧化物酶和碱性磷酸酶。

[0174] 取决于所使用的酶标记的类型,酶标记的检测可例如通过检测颜色或染料沉积(例如,用于碱性磷酸酶的对硝基苯基磷酸酯或5-溴-4-氯-3-吲哚磷酸酯/四氮唑蓝,和用于辣根过氧化物酶的3,3'-二氨基联苯胺-NiCl<sub>2</sub>)、荧光(例如,用于碱性磷酸酶的4-甲基伞花基磷酸酯)或化学发光(例如,来自Lumigen Inc.,Detroit Mich.的碱性磷酸酶二氧杂环丁烷底物LumiPhos 530或来自Tropix,Inc.的AMPPD和CSPD)来实现。可用X射线或Polaroid膜或通过使用单光子计数光度计(例如,用于碱性磷酸酶标记的探针)进行化学发光检测。

[0175] 在某些实施方式中,使用数字增强或整合来检测来自探针上标记的信号。例如,标记的检测可包括采用使用安装在显微镜(例如,双目、单目或立体显微镜)的目镜管上的CCD相机的显微成像。在一些实施方式中,使用图像扫描显微镜术完成标记的检测。例如,计算机化图像扫描显微镜术的新进展已显著提高了使用荧光显微镜术检测稀有细胞的能力,允许在 $\sim 6 \times 10^5$ 个阴性细胞的环境中检测1个阳性细胞(参见,例如,Mehes等,Cytometry 42:357-362,2000)。已开发了先进的图像扫描软件,其不仅可以检测多种颜色,而且可以检测可用于例如DNA水平上易位的检测的融合或共局部化的信号(MetaSystems Group,Inc.)。扫描速度通常取决于用于单个阳性细胞的可靠检测的参数数量。图像扫描还允许人工检查评分为阳性的细胞的图像,以进行确认。已开发了用于自动化的基于玻片的分析的先进图像扫描软件,其不仅可以检测多种颜色,而且可以检测可用于例如DNA水平上易位的检测的融合或共局部化的信号(Meta Systems Group,Inc.)。扫描速度通常取决于用于单个阳性细胞的可靠检测的参数数量。自动化的基于玻片的扫描系统特别适合高通量测定。

[0176] 在一个实施方式中,使用扫描玻片显微镜术,例如,使用MetaCyte自动化生物成像系统(Meta System Group,Inc.)。该系统由下述组件组成:1) Carl Zeiss Axio Plan 2MOT 荧光显微镜,2) 扫描8-位置平台,3) PC奔腾III处理器,4) Jai照相机,5) 照相机接口,6) 平台控制,7) 轨迹球和鼠标,和8) 打印机。焦点分析从装载于显微镜上的玻片装置开始。随平台移动扫描玻片,并捕获图像。在扫描整个玻片后,创建图库。基于对于阳性或阴性的标准设置,图像分析产生阳性信号或阴性信号。如果为阴性,则重复扫描玻片进行稀有事件分析。如果为阳性,对适当的荧光信号更换滤镜,并捕捉和分析5-7个平面。对于8个玻片,可以离开/整夜操作(标准或具有任选的托盘变换器的100个玻片)。自适应性检测算法和自动曝光

控制功能补偿不均匀的染色条件。可同时检测几种标记物。标准光源覆盖从紫外到红外的宽阔的光谱。如果细胞的荧光强度允许以1/1,000秒检测,则高达每秒1,000个细胞的扫描速度可用于检测稀有细胞。对于强信号,较低的放大倍数可用于增加扫描速度。

[0177] 或者,探针的检测可在不存在数字增强或整合的情况下进行。

[0178] 用于检测目标核酸的试剂盒

[0179] 在另一实施方式中,本发明涉及用于在室温条件下检测生物样品中的目标核酸(例如,一种或多种目标核酸)的试剂盒。通常,所述试剂盒包括一个或多个探针、变性缓冲液、杂交缓冲液和洗涤缓冲液。在一些实施方式中,所述试剂盒可包括额外的任选组分,例如二级检测试剂、用于染色体DNA的染色剂、抗褪色试剂、说明书、协议或它们的组合。通常,为了便于使用,将试剂盒分区,其可包括含有试剂的一个或多个容器。在一个实施方式中,将所有试剂盒组分一起包装。或者,可将试剂盒的一种或多种单个组分提供于与其它试剂盒组分分开的包装中(例如,可与其它试剂盒组分分开地包装变性缓冲液)。

[0180] 在一个实施方式中,本发明所述试剂盒在一个容器中包括至少一种包含与目标核酸中目标序列基本上互补的目标结合区域的单链寡核苷酸探针。本发明所述试剂盒中的每种单链寡核苷酸探针优选为染色体特异性探针。所述单链寡核苷酸探针通常由约20至约50个核苷酸、优选约30个核苷酸组成。本文描述了用于本发明所述试剂盒中的适合类型的寡核苷酸探针(例如,DNA、RNA、PNA)。本发明所述试剂盒中的寡核苷酸探针优选为DNA探针。

[0181] 在某些实施方式中,本发明所述试剂盒中的单链寡核苷酸探针是标记的(例如,包含一种或多种可检测标记)。本文描述了用于单链寡核苷酸探针的示例性可检测标记。本发明所述试剂盒中的寡核苷酸探针优选包含一种或多种荧光团(例如,荧光素、罗丹明、得克萨斯红、藻红蛋白、Cy3、Cy5、Alexa 532、Alexa 546、Alexa 568或Alexa 594)。

[0182] 在一些实施方式中,本发明的试剂盒包括混合在相同容器中作为探针鸡尾酒组合物或提供于单独的容器中的多个不同的标记的探针。在这种实施方式中,每个探针对特定目标核酸是特异性的,并且包含可与对于不同目标核酸具有特异性的鸡尾酒或试剂盒中的其它探针上存在的可检测标记区分开的可检测标记。例如,每个探针可包含具有光谱可区分的发射波长的荧光团。适合用于具有多个不同的标记探针的本发明所述试剂盒中的荧光团包括,例如,Alexa 488(在492nm处具有最大激发和在520nm处具有最大发射)和Alexa 546(在555nm处具有最大激发和在570nm处具有最大发射)。

[0183] 在一个实施方式中,本发明所述试剂盒在单独的容器中包括包含碱(例如,NaOH)和醇的变性缓冲液。所述变性缓冲液优选包括约0.03N至约0.17N碱,例如约0.05N、约0.06N、约0.07N、约0.08N、约0.09N或约0.1N碱。所述变性缓冲液优选包含约0.07N NaOH(即,0.07M NaOH)。用于所述变性缓冲液的示例性碱包括,例如,氢氧化钾、氢氧化钡、氢氧化铯、氢氧化钠、氢氧化铷、氢氧化钙、氢氧化锂、氢氧化铷、氢氧化镁、丁基锂、二异丙基氨基锂、二乙氨基锂、氨基钠、氢化钠、双(三甲基甲硅烷基)氨基锂、碳酸钠和氨水或它们的组合。所述碱优选为强碱。所述碱更优选为氢氧化钠。所述变性缓冲液进一步包括浓度为约50体积%至约90体积%、例如约60体积%、约70体积%或约80体积%的至少一种醇。所述醇优选以约70体积%的浓度存在。用于所述变性缓冲液的示例性醇类包括,例如,乙醇、甲醇、丙醇、丁醇、戊醇和异戊醇,或它们的混合物。在一个特定实施方式中,所述变性缓冲液包含约70%乙醇。

[0184] 在另一个实施方式中,所述变性缓冲液包含甲酰胺(例如,70%甲酰胺)而不是醇或碱。

[0185] 在另一容器中,本发明所述试剂盒包括杂交缓冲液。在一个实施方式中,所述杂交缓冲液包含一种或多种碱(例如,NaOH),并具有约10至13、优选约11至12的pH。本文中描述为适合用于所述变性溶液的任何碱也可以用于所述杂交缓冲液。此外,所述杂交缓冲液可进一步包括约20-60%甲酰胺和约5-40%硫酸葡聚糖。在一个实施方式中,所述杂交缓冲液包含约30-50%甲酰胺、约10%硫酸葡聚糖和约1-3mM NaOH,并具有约11至约12的pH。在另一实施方式中,所述杂交缓冲液含有约4.2mM NaOH、约42%甲酰胺和约28%硫酸葡聚糖。

[0186] 在另一实施方式中,所述杂交缓冲液包含甲酰胺和最终浓度为约0.03M至约0.09M的一种或多种盐(例如,钠盐)而不是碱。所述一种或多种盐优选包括柠檬酸钠。用于所述杂交缓冲液的其它适合的盐包括氯化钠。

[0187] 本发明所述试剂盒进一步包括一种或多种洗涤缓冲液。在一个特定实施方式中,所述一种或多种洗涤缓冲液各自包含一种或多种碱(例如,NaOH),并具有约10至13、优选约11至12的pH。本文中描述为适合用于所述变性和杂交缓冲液的任何碱也可用于所述洗涤缓冲液。所述一种或多种洗涤缓冲液优选包括约1×至5×SSC和约1-10mM碱。在一个特定实施方式中,所述洗涤缓冲液包含约2×SSC和约1.75mM NaOH,并具有约11的pH。在另一实施方式中,所述洗涤缓冲液包含约2×SSC和约3mM NaOH。

[0188] 在另一实施方式中,所述一种或多种洗涤缓冲液各自包含最终浓度为约0.03M至约0.09M的一种或多种盐(例如,钠盐、锂盐或钾盐),并且不包含碱。在一个特定实施方式中,所述洗涤缓冲液包括柠檬酸钠和氯化钠。所述洗涤缓冲液可进一步包含洗涤剂,包括但不限于十二烷基硫酸钠(SDS)。所述洗涤缓冲液中的SDS的适合浓度通常为约0.01%至约1.0%SDS,优选约0.1%SDS。此外,本发明所述试剂盒中的洗涤缓冲液可任选包括甲酰胺。

[0189] 本发明所述试剂盒还可包括提供一种或多种用于检测标记探针的试剂的额外容器。这种额外容器可包括本领域技术人员知晓的、用于对应于探针上的标记类型的检测试验的试剂或其它元件。在一个实施方式中,试剂盒中的探针包含间接标记(例如,生物素),且所述试剂盒进一步包括至少一种用于检测所述间接标记的二级试剂(例如,提供用荧光团标记的链霉亲和素的容器)。

[0190] 下面是本发明实施例实施方式的描述。

## 具体实施方式

[0191] 实施例1:使用室温变性步骤和标准的升温杂交步骤和洗涤的FISH程序

[0192] 细胞遗传学玻片制备

[0193] 通过采集来自单个男性供体的外周血液培养物来制备人染色体玻片。在37℃和5%的CO<sub>2</sub>下,在10mL RPMI 1640、2mM L-谷氨酰胺、FBS 10%、250μL PHA中培养1mL来自所述供体的外周血液/25mL培养瓶。培养72小时后,通过每毫升培养物添加0.6μl秋水仙酰胺(Karyomax, invitrogen),使所述细胞的有丝分裂停止。在37℃下20分钟之后,在1750rpm下离心所述培养物10分钟,弃去上清液,并小心地添加10mL低渗溶液和75mM KCl。在37℃下孵育20分钟之后,将几滴卡诺依氏固定液(Carnoy's fixative)(甲醇:乙酸为3:1)添加至所述管,以进行细胞的预固定并促进进一步固定而没有细胞结块。在离心之后,将细胞重悬浮

于卡诺依氏固定液中。重复所述固定步骤3次,直到沉淀物明显为白色。在最终固定期间,确定玻片制备所需要的固定剂的正确用量。每片玻片使用一或两滴细胞悬液,在**SuperFrost<sup>®</sup>**玻片上在 $\sim 22^{\circ}\text{C}$ 和 $\sim 50\%$ 湿度下进行涂抹。将所述玻片保持在 $37^{\circ}\text{C}$ 下过夜,然后在 $-20^{\circ}\text{C}$ 、具有干燥剂的密封箱中储存,直到进行FISH。

[0194] 探针

[0195] 使用X和Y**Oligo-FISH<sup>®</sup>**探针(Cellay, Inc., Cambridge, MA)。通过Thermo Fisher Scientific (Ulm, 德国),使用来自Dyomics, GmbH (Jena, 德国)的DY氟,合成并标记所述探针。用DY590荧光染料标记染色体X探针,所述探针由10个ODN组成。2Kb序列重复的DXZ1在人X染色体的近着丝粒区域中出现约5,000次(Yang 1982)。该2Kb区域由12个排列在不完全直接重复序列中的171-bp $\alpha$ -单体组成,这允许设计X染色体 $\alpha$ -随体重复序列探针。为了避免与其它染色体 $\alpha$ -随体重复序列交叉杂交,设计探针以对应于与一致性 $\alpha$ -单体序列具有较低同源性的DXZ1基因座的区域。染色体Y探针由4个ODN组成,并用DY490氟标记。所述Yq12染色体带上的DYZ1区域由以500至3000个拷贝存在的3.4kb序列元件组成。在整个重复序列中,高拷贝数的TTCCA随体3五聚体序列重复散布于长度不同的单一Y染色体特异性序列元件中(Nakahori 1986; Weier 1990; Nakagome 1991)。理想地,为了最佳杂交,合成的ODN Y探针将不能充分代表TTCCA五聚体,其将主要由包含约50%的CG碱基的序列组成。为该区域设计30mer ODN探针,并使用基本局部比对工具(BLAST)与人整体基因组数据库(NCBI)进行比较。不使用过滤器,将所述序列与非冗余基因组数据库(nr)进行比较。

[0196] 使用室温变性和常规杂交步骤的FISH

[0197] 在 $21^{\circ}\text{C}$ 下在NaOH的70%乙醇溶液中使从人外周血液中采集的制备的细胞遗传学玻片变性,变性时间在3分钟至20分钟的范围内变化。测试0.03M至0.17M的不同浓度的NaOH。然后通过乙醇梯度(80%、90%和100%)使所述玻片各脱水2分钟,并空气干燥。将等体积的杂交缓冲液和探针鸡尾酒混合,以获得用于该程序的杂交混合物。以10 $\mu\text{L}$ 的工作体积使用鸡尾酒。用相差显微镜定位每片玻片上的目标区域,并将10 $\mu\text{L}$ 体积的**OligoFISH<sup>®</sup>** X、Yq12鸡尾酒滴到所述玻片上,并用22mm $\times$ 22mm的盖玻片覆盖。在 $37^{\circ}\text{C}$ 下进行杂交5分钟。杂交后,在搅拌下,在 $2\times\text{SSC}$ 中洗涤所述玻片,以去除盖玻片,然后在 $50^{\circ}\text{C}$ 下洗涤(0.2 $\times\text{SSC}$ , 0.1% SDS) 2分钟,搅拌30秒。最后,在 $2\times\text{SSC}$ 中收集玻片,用含有DAPI的抗褪色剂固定,并用50mm $\times$ 22mm的盖玻片(#1厚度)覆盖。将每个探针的使用由50个间期核获得的平均信噪比(SNR)的FISH数据进行比较。

[0198] 信号强度的测定

[0199] 通过信噪比(SNR)测定信号强度。使用NIS-Elements软件,通过灰度水平的阈值,将在相同条件下获得的来自50个间期核(统计分析所要求的最小数量)的FISH图像分段,以区分信号和细胞核。对于每个细胞,计算灰度水平平均值和标准偏差,所述灰度水平平均值定义为测量区段中的灰度水平之和除以以像素计的区段面积。然后将信噪比测定为信号平均灰度水平除以背景平均灰度水平。

[0200] 荧光显微镜术和图像获取

[0201] 使用装备有CoolSNAP HQ2 CCD相机(Photometrics Ltd., Tucson, AZ)的Nikon

Eclipse 90i显微镜(Nikon Instruments,Melville,NY)进行荧光显微镜术分析和数字图像获取。获取图像并使用Nikon NIS-Elements软件获取测量。

[0202] 结果

[0203] 所测试的不同NaOH浓度之中,70%乙醇中的0.07M NaOH产生最高的SNR。此外,发现10分钟是最佳的变性时间。图1表明,当在两个程序中使用常规杂交(37℃)和洗涤(50℃)温度时,与常规变性(72℃下70%甲酰胺)相比,对于X和Y探针,室温变性10分钟产生统计学类似的SNR。

[0204] 实施例2:使用室温变性和洗涤的FISH程序

[0205] 使用室温变性和洗涤的FISH

[0206] 在21℃下,在70%乙醇中的0.07M NaOH中,使从人外周血液中采集的制备的细胞遗传学玻片(实施例1中所述)变性15分钟。然后通过乙醇梯度(80%、90%和100%)使所述玻片各脱水2分钟,并空气干燥。用相差显微镜定位每片玻片上的目标区域,并将10μL体积的OligoFISH® X、Yq12鸡尾酒滴到所述玻片上,并用22mm×22mm的盖玻片覆盖。在室温(约21℃)下进行杂交10分钟。杂交之后,在搅拌下,在2×SSC中洗涤所述玻片5分钟,以去除所述盖玻片。杂交之后,在室温下,在具有不同浓度NaOH(1、2和3mM)的2×SSC缓冲液中洗涤所述玻片5分钟。最后,在2×SSC中收集玻片,用含有DAPI的抗褪色剂固定,并用50mm×22mm的盖玻片(#1厚度)覆盖。将每个探针的使用由50个间期核获得的平均信噪比(SNR)的FISH数据进行比较。1mM NaOH产生强信号,但一些二次信号是可见的,2mM产生较弱的信号,但非常特异性。因此,测试其它浓度的NaOH,1、1.25、1.50、1.75和2mM。室温下的1.75mM NaOH 2×SSC产生与48℃下0.2×SSC 0.1%SDS中热洗涤非常相似的结果。

[0207] 如实施例1中一般描述的,进行细胞遗传学玻片制备、探针、信号强度的测定、荧光显微镜术和图像获取。

[0208] 结果

[0209] 在确定室温变性的最优条件之后,使用用于实施例1中描述的常规FISH的相同杂交缓冲液,结合在室温下在0.07M NaOH/70%乙醇中预处理/变性10分钟,测试室温洗涤条件(21℃杂交,5分钟)。使用本文中实施例1中使用的相同OligoFISH® X和Y探针组和常规洗涤条件(0.2×SSC,0.1%SDS,50℃)。室温洗涤图像显示于图2中。在间期核中以及中期涂片中的相应染色体上明显看到X(红色)和Y(绿色)探针的FISH信号。

[0210] 实施例3:使用在室温和碱性条件下进行的杂交步骤的外周血细胞的FISH程序

[0211] 在使用实施例1中描述的室温变性步骤和实施例2中描述的室温洗涤的FISH程序中制备并测试具有各种浓度氢氧化钠的杂交缓冲液。还包括进行热的70%甲酰胺变性步骤和50℃洗涤的玻片,以表明室温杂交步骤相对于包括在室温(22.7℃)下进行探针杂交步骤5分钟的其它室温处理的独立性。所测试的杂交缓冲液中的NaOH浓度为1、2、3和4mM。甲酰胺和硫酸葡聚糖的浓度与实施例1中相同,但去除了所述2×SSC以避免缓冲pH。将在室温杂交条件下用每种氢氧化钠杂交缓冲液得到的结果(即,信噪比)与在37℃下用标准的杂交缓冲液(2×SSC、30%甲酰胺、20%硫酸葡聚糖)进行杂交5分钟而得到的结果进行比较。对于选择的缓冲液,如实施例1所述,进行信噪比分析。使用未处理的外周血液玻片进行全部实验。用于计数染色体3(金色)、6(浅绿色)、7(绿色)和20(红色)的一组OligoFISH®探针用于

所有的杂交。

[0212] 使用由3mM NaOH、30%甲酰胺和20%硫酸葡聚糖组成的杂交缓冲液的室温杂交产生了视觉上与在37℃下用标准缓冲液杂交所产生的信号无法区分开的信号。在室温条件下,使用3mM NaOH、30%甲酰胺和20%硫酸葡聚糖的杂交缓冲液获得的外周血液玻片的信噪比数据也与在37℃下使用标准杂交缓冲液(2×SSC、30%甲酰胺、20%硫酸葡聚糖)得到的数据非常相似(图3)。

[0213] 实施例4:使用室温下预处理、然后在室温和碱性条件下进行变性、杂交和洗涤步骤的膀胱上皮细胞的FISH程序

[0214] 在膀胱上皮细胞玻片上进行使用室温蛋白酶处理、变性、杂交和洗涤步骤的FISH程序。在室温下,用0.2%胃蛋白酶进行蛋白酶处理15分钟,然后在1%福尔马林中短暂固定。在室温下,在0.07M NaOH/70%乙醇中进行变性10分钟,然后分别在85%和100%乙醇中脱水1分钟。在室温条件下,在3mM NaOH、30%甲酰胺和20%硫酸葡聚糖的杂交缓冲液中,使用用于计数染色体3、6、7和20的 **OligoFISH<sup>®</sup>** 探针进行杂交10分钟。在室温下,在1.75mM NaOH 2×SSC中进行玻片洗涤5分钟。将结果与在高温下使用用于FISH的标准试剂进行的蛋白酶、变性、杂交和洗涤时得到的结果进行比较。对于两组条件,使探针与样品杂交10分钟。如实施例1所述进行信噪比分析。

[0215] 使用全部室温处理的程序产生了与通过在较高温度下使用标准缓冲液杂交所得到的信号无法区分开的信号。由每个程序产生的信噪比的分析(图4)显示一致的结果。因此,在膀胱上皮细胞上进行的FISH程序可成功地使用利用较高浓度的蛋白酶和碱性变性、杂交和洗涤的室温条件。

[0216] 实施例5:采用用BAC产生的单一序列探针,使用室温下的变性、杂交和洗涤的外周血细胞的FISH程序。

[0217] 在若干条件下成功地进行了包括位于染色体13上的BAC探针的FISH程序(例如,参见图5)。在72℃下,在70%甲酰胺2×SSC中,首先使玻片变性3分钟。将用绿色标记的BAC探针重悬于由42%甲酰胺、28%右旋糖酐和2.8×SSC组成的杂交缓冲液中。在72℃下,使所述BAC在该混合物中变性10分钟,并允许在37℃下与所述重复序列再杂交30分钟。将所述探针施加至所述玻片,并允许在37℃下杂交过夜。然后,在72℃下,在0.2×SSC 0.3%NP40中洗涤所述玻片5分钟。为了测试用于 **OligoFISH<sup>®</sup>** 探针的相同室温变性是否会起作用,用在70%乙醇中的0.07M NaOH处理外周血液玻片10分钟,然后进行如本文中实施例1中所述的常规方案。所述探针信号的特异性和强度无法与已用热甲酰胺变性的玻片区分开。

[0218] 接着,在1.75mM NaOH 2×SSC中,进行室温洗涤5分钟,得到相同的结果,产生了与在72℃下用0.2×SSC 0.3%NP40洗涤的所述玻片无法区分开的信号。最后,在所述杂交缓冲液中测试不同浓度的NaOH(2、3、4和5mM),以确定单一序列探针在室温下杂交的合适条件。在保持甲酰胺的浓度为42%和硫酸葡聚糖的浓度为28%的同时,去除2×SSC以避免NaOH的任何缓冲。在室温下使所述玻片杂交过夜。很明显,与在37℃下杂交的玻片相比,4mM产生十分相似、但稍微减弱的信号。因此,为了优化杂交缓冲液中的NaOH浓度,在新的玻片上测试4、4.2、4.4、4.8和5mM的浓度。具有4.2mM NaOH的缓冲液提供了视觉上与在37℃下用常规杂交缓冲液杂交的玻片无法区分开的信号。

[0219] 本文中引用的所有专利、公布的申请和参考文献的相关教导通过引用以它们的整体引入。

[0220] 虽然已参考其实施例实施方式特别示出并描述本发明,但本领域技术人员将理解,在不背离所附权利要求所涵盖的本发明范围的情况下,可在其中进行形式和细节上的各种改变。



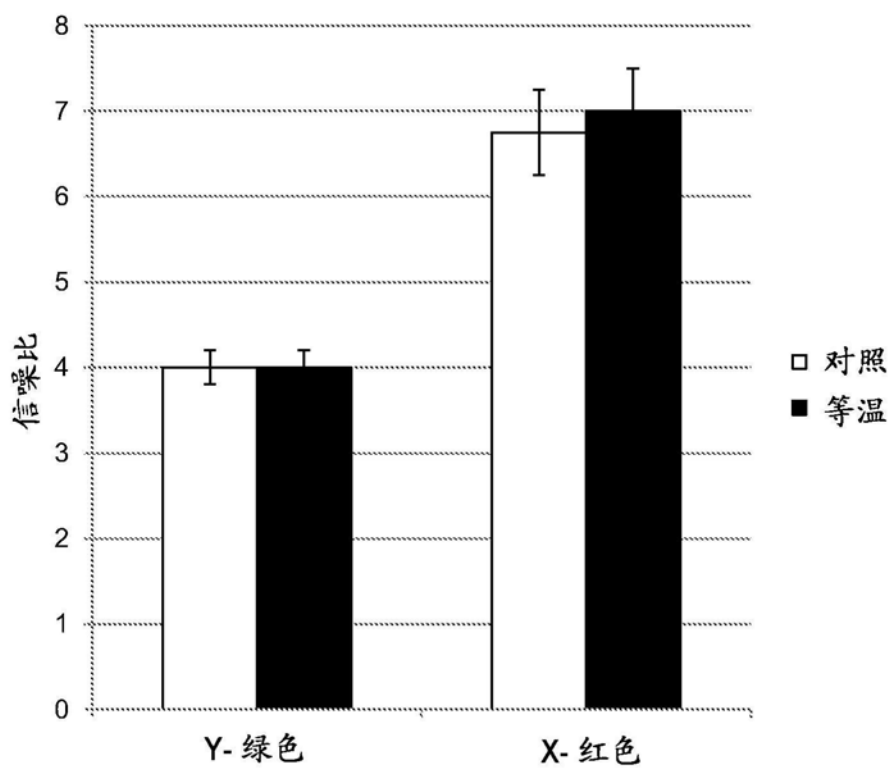


图1

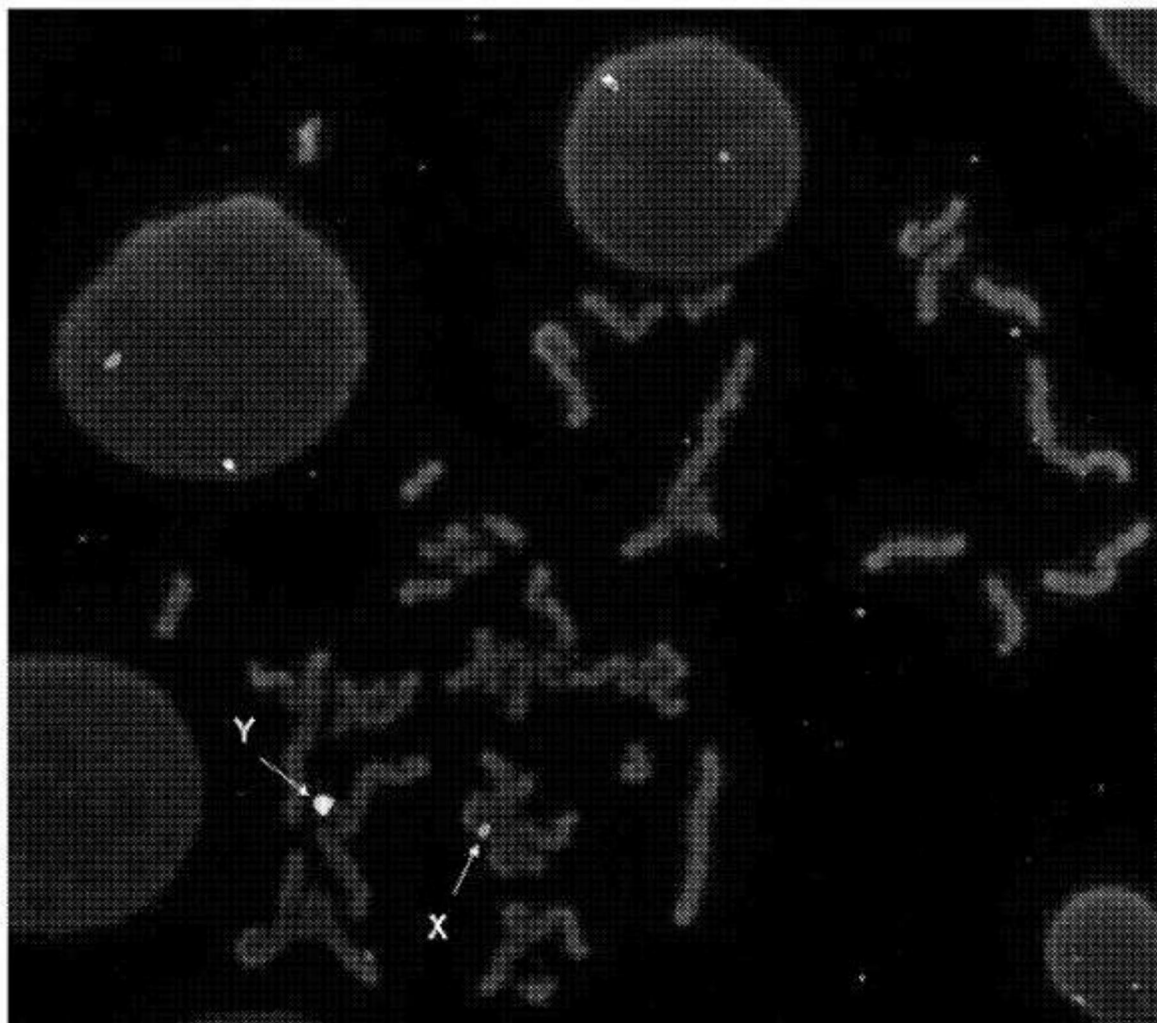


图2

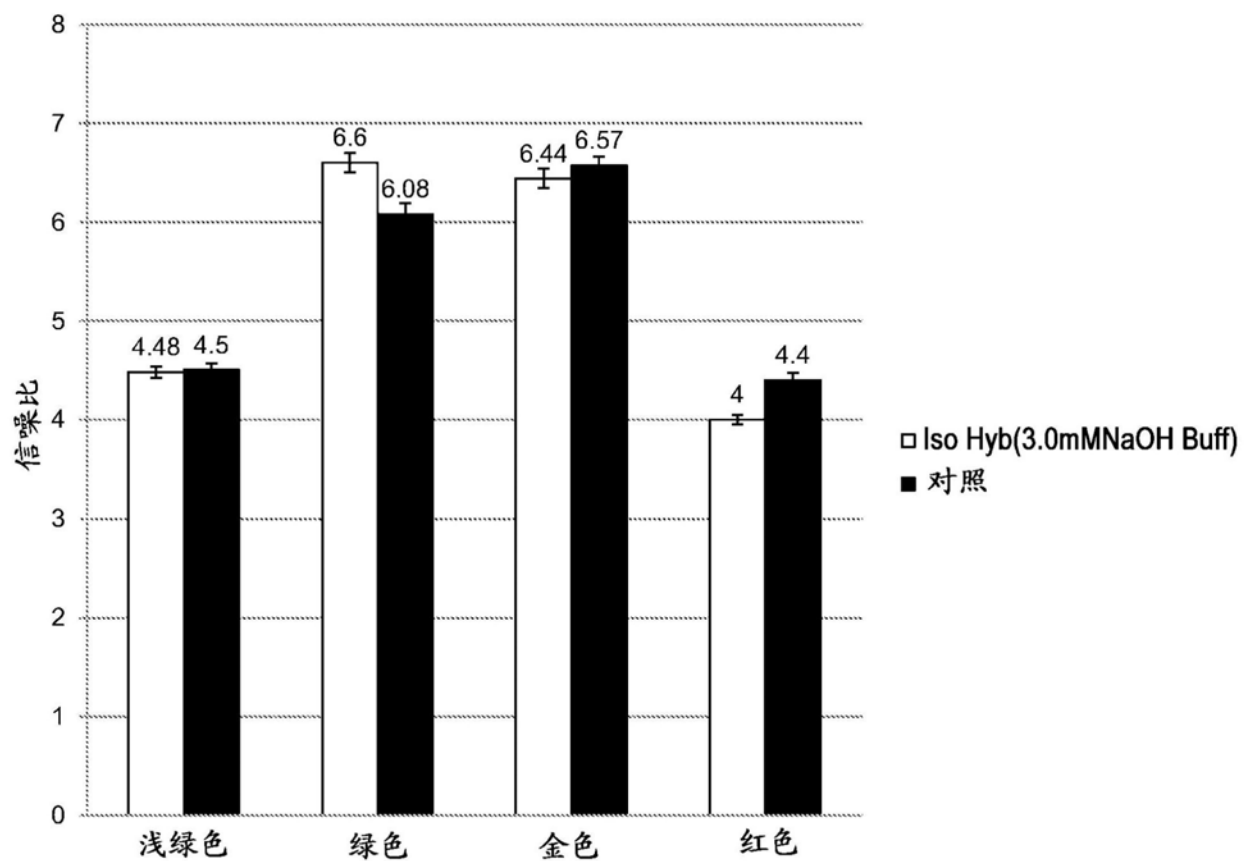


图3

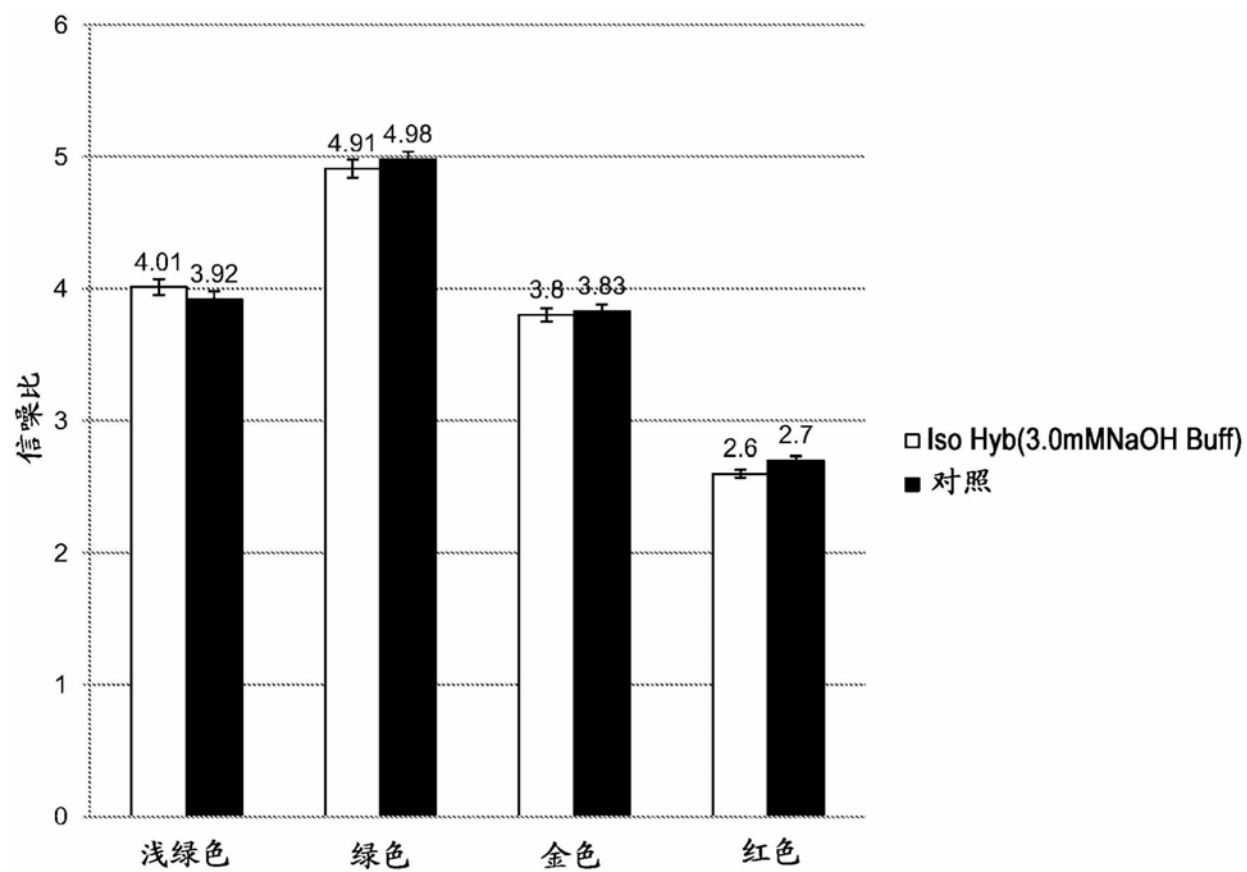


图4

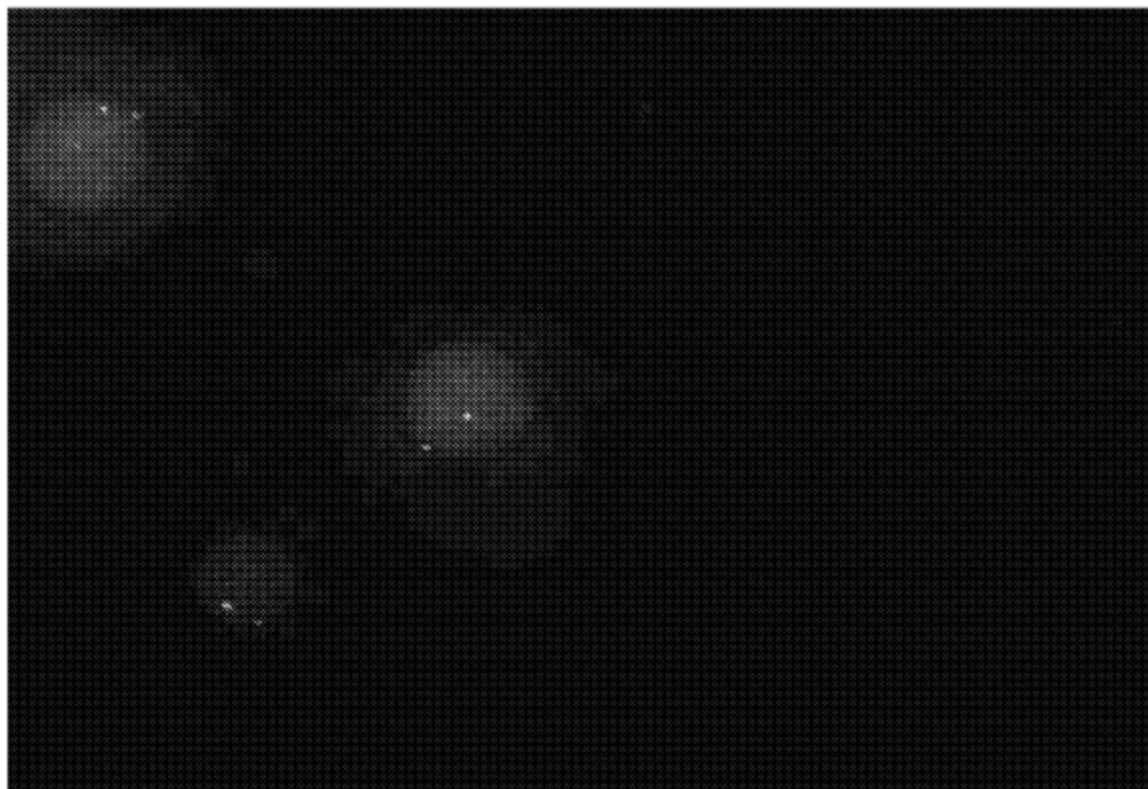


图5