



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 110678729 B

(45) 授权公告日 2023. 04. 11

(21) 申请号 201880034973.3	(73) 专利权人 豪夫迈·罗氏有限公司
(22) 申请日 2018.05.30	地址 瑞士巴塞尔
(65) 同一申请的已公布的文献号 申请公布号 CN 110678729 A	(72) 发明人 A. 尼尔特
(43) 申请公布日 2020.01.10	(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001
(30) 优先权数据 62/512324 2017.05.30 US	专利代理师 权陆军 黄希贵
(85) PCT国际申请进入国家阶段日 2019.11.27	(51) Int.Cl. G01N 1/30 (2006.01)
(86) PCT国际申请的申请数据 PCT/EP2018/064161 2018.05.30	(56) 对比文件 WO 2016044313 A1, 2016.03.24
(87) PCT国际申请的公布数据 W02018/219997 EN 2018.12.06	审查员 范伟

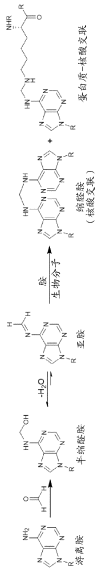
权利要求书2页 说明书9页 附图3页

(54) 发明名称

用于逆转甲醛加合物和交联的催化剂

(57) 摘要

催化剂发挥作用以释放在生物样品中发生的甲醛交联。因而,使催化剂与甲醛固定的样品接触是使样品的生物组分(包括核酸或蛋白质)对于检测和表征更可行的有用方法。



1. 用于释放甲醛交联的生物样品中的一种或多种组分的方法,所述方法包括使所述生物样品与足够量的催化剂接触以释放至少一部分所述一种或多种组分,从而改善所述一种或多种组分对于分析的可及性;

其中所述催化剂选自2-氨基苯硼酸、苯并氧硼杂六环类、膦酸二乙酯和铋盐,其中所述催化剂的量为0.2 mM至5.0 mM。

2. 权利要求1的方法,其中所述生物样品是来自动物的组织样品。

3. 权利要求1-2中任一项的方法,其中将所述样品和催化剂于25℃-60℃的温度加热至少10分钟的时间段。

4. 权利要求1-3中任一项的方法,其进一步包括检测已释放的所述一种或多种组分。

5. 权利要求4的方法,其中在所述检测步骤之前,将所述催化剂基本上从样品中去除。

6. 权利要求4的方法,其中所述检测步骤包括定量已释放的所述一种或多种组分。

7. 权利要求1-6中任一项的方法,其中所述样品和催化剂于4.5-8.0的pH范围接触。

8. 权利要求1-7中任一项的方法,其中已释放的所述一种或多种组分是核酸,且其中所述方法进一步包括检测所述核酸。

9. 权利要求8的方法,其中所述检测步骤包括扩增所述核酸。

10. 权利要求9的方法,其中所述扩增步骤包括聚合酶链反应。

11. 权利要求1-10中任一项的方法,其中在所述接触步骤之前将所述生物样品包埋在石蜡中。

12. 权利要求1-11中任一项的方法,其中所述催化剂选自(2-氨基-5-氟苯基)硼酸,2-氨基苯硼酸,(2-氨基-5-甲基苯基)硼酸,1,3-二氢-1-羟基-2,1-苯并氧杂硼戊环-7-胺,3,4-二氢-1-羟基-1H-2,1-苯并氧杂硼杂六环-7-胺,(氨基苯基甲基)膦酸二乙酯,三溴化铋(III),铋(III),碘化物,柠檬酸铋(III)和水杨酸铋(III)。

13. 权利要求1-11中任一项的方法,其进一步包括使所述生物样品与蛋白酶接触以降解所述生物样品中的蛋白质,从而使所述核酸更可用于分析。

14. 用于改善甲醛交联的生物样品的一种或多种组分的可用性的试剂盒,所述试剂盒包括

催化剂;和

蛋白酶或用于从生物样品中去除催化剂的试剂或设备;

其中所述催化剂选自2-氨基苯硼酸、苯并氧硼杂六环类、膦酸二乙酯和铋盐。

15. 权利要求14的试剂盒,其中所述试剂盒包括用于从生物样品中去除催化剂的试剂或设备。

16. 权利要求15的试剂盒,其中所述设备是用于纯化核酸的柱。

17. 权利要求14的试剂盒,其中所述试剂盒包括蛋白酶。

18. 权利要求14-17中任一项的试剂盒,其进一步包括核苷酸和/或热稳定的聚合酶。

19. 权利要求14-18中任一项的试剂盒,其中所述催化剂选自(2-氨基-5-氟苯基)硼酸,2-氨基苯硼酸,(2-氨基-5-甲基苯基)硼酸,1,3-二氢-1-羟基-2,1-苯并氧杂硼戊环-7-胺,3,4-二氢-1-羟基-1H-2,1-苯并氧杂硼杂六环-7-胺,(氨基苯基甲基)膦酸二乙酯,三溴化铋(III),铋(III),碘化物,柠檬酸铋(III)和水杨酸铋(III)。

20. 反应混合物,其包含

甲醛交联的生物样品;和
量为0.2 mM至5.0 mM的催化剂以释放至少一部分一种或多种交联的组分,
其中所述催化剂选自(2-氨基-5-氟苯基)硼酸,2-氨基苯硼酸,(2-氨基-5-甲基苯基)硼酸,1,3-二氢-1-羟基-2,1-苯并氧杂硼戊环-7-胺,3,4-二氢-1-羟基-1H-2,1-苯并氧杂六环-7-胺,(氨基苯基甲基)膦酸二乙酯,三溴化铋(III),铋(III),碘化物,柠檬酸铋(III)和水杨酸铋(III)。

用于逆转甲醛加合物和交联的催化剂

[0001] 发明背景

[0002] 一百多年来,病理学家已通过用甲醛固定诸如组织样品的生物样品来常规地保存它们。尽管甲醛处理保存了组织的细胞特征,但甲醛处理也导致化学交联,其使得样品的许多生物组分对于检测、定量和表征可及差或不可及。甲醛通过经由-CH₂-键使蛋白质中的伯胺基团与蛋白质或DNA中其他附近的氮原子交联来保存或固定组织或细胞。因此,例如,尽管聚合酶链反应(PCR)对检测和定量生物样品中的核酸有用,但是PCR在分析甲醛交联的样品中的核酸中通常效果差或无效,尤其是在期望定量结果的场合。

[0003] 因此,通过甲醛的作用使核酸与细胞组分的交联对各种细胞组分的检测提出了挑战,包括核酸和蛋白质的检测。尽管一些人已经描述了改善来自甲醛交联的样品的核酸扩增的方法,但是这些改进通常仅涉及降解样品中的蛋白质或提供通常不改变形成交联的共价键的去污剂。本发明处理这个和其他问题。

[0004] 发明概述

[0005] 本发明提供了用于分析甲醛交联的生物样品的一种或多种组分的方法。在一些实施方案中,所述方法包括使所述样品与足够量的催化剂接触以释放至少一部分交联的组分,从而改善所述一种或多种组分对于分析的可及性。

[0006] 在一些实施方案中,生物样品是来自动物的组织样品。

[0007] 在一些实施方案中,催化剂的量约为0.2 mM至约5.0 mM。

[0008] 在一些实施方案中,将样品和催化剂加热至少10分钟的时间段。

[0009] 在一些实施方案中,所述方法进一步包括检测所述组分。

[0010] 在一些实施方案中,在检测步骤之前,将催化剂基本上从样品中去除。在一些实施方案中,在检测步骤之前,催化剂的浓度降低到小于约0.1 mM。

[0011] 在一些实施方案中,检测步骤包括定量所述组分。

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

[0013] 在一些实施方案中,所述方法进一步包括检测核酸。在一些实施方案中,检测步骤包括扩增核酸。在一些实施方案中,在允许探针和核酸形成并检测双链体存在的条件下,使核酸组分与探针接触。在一些实施方案中,探针连接至固相支持体。在一些实施方案中,扩增步骤包括聚合酶链反应。

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

[0015] 在一些实施方案中,在接触步骤之前将样品包埋在石蜡中。

[0016] 在一些实施方案中,催化剂选自(2-氨基-5-氟苯基)硼酸(boronic acid),2-氨基苯硼酸,(2-氨基-5-甲基苯基)硼酸,1,3-二氢-1-羟基-2,1-苯并氧杂硼戊环-7-胺(1,3-Dihydro-1-hydroxy-2,1-benzoxaborol-7-amine),3,4-二氢-1-羟基-1H-2,1-苯并氧杂硼杂六环-7-胺(3,4-Dihydro-1-hydroxy-1H-2,1-benzoxaborin-7-amine),(氨基苯基甲基)膦

酸二乙酯,三溴化铋(III),铋(III),碘化物,柠檬酸铋(III)和水杨酸铋(III)。

[0017] 在一些实施方案中,如果不执行接触步骤,则可用于分析的组分的部分与对于分析可及的部分相比增加到至少约两倍。在一些实施方案中,如果不执行接触步骤,则可用于分析的组分的部分与对于分析可及的部分相比增加到至少约十倍。

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

[0019] 本发明还提供了用于改善甲醛交联的生物样品的一种或多种组分的可用性的试剂盒。在一些实施方案中,试剂盒包括催化剂;和蛋白酶或用于从生物样品中去除催化剂的试剂或设备,其中所述催化剂选自氨基苯硼酸、环硼酸酯、膦酸酯和铋盐。

[0020] 在一些实施方案中,试剂盒包括用于从生物样品中去除催化剂的试剂或设备。在一些实施方案中,所述设备是用于纯化核酸的柱。

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

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

[0023] 在一些实施方案中,催化剂选自(2-氨基-5-氟苯基)硼酸,2-氨基苯硼酸,(2-氨基-5-甲基苯基)硼酸,1,3-二氢-1-羟基-2,1-苯并氧杂硼戊环-7-胺,3,4-二氢-1-羟基-1H-2,1-苯并氧杂硼杂六环-7-胺,(氨基苯基甲基)膦酸二乙酯,三溴化铋(III),铋(III),碘化物,柠檬酸铋(III)和水杨酸铋(III)。

[0024] 本发明还提供了反应混合物。在一些实施方案中,反应混合物包含甲醛交联的生物样品;和足够量的催化剂以释放至少一部分交联的组分,其中所述催化剂选自氨基苯硼酸、环硼酸酯、膦酸酯和铋盐。

[0025] 在一些实施方案中,催化剂的量为0.2 mM至5.0 mM。在一些实施方案中,催化剂选自(2-氨基-5-氟苯基)硼酸,2-氨基苯硼酸,(2-氨基-5-甲基苯基)硼酸,1,3-二氢-1-羟基-2,1-苯并氧杂硼戊环-7-胺,3,4-二氢-1-羟基-1H-2,1-苯并氧杂硼杂六环-7-胺,(氨基苯基甲基)膦酸二乙酯,三溴化铋(III),铋(III),碘化物,柠檬酸铋(III)和水杨酸铋(III)。在一些实施方案中,生物样品是来自动物的组织样品。

[0026] 定义

[0027] “甲醛交联的生物样品”是指已经用甲醛处理的生物样品,从而使得在蛋白质或核酸中的氮与其他含氮蛋白质和/或核酸之间形成交联。生物样品将一般含有细胞。生物样品可以是例如来自动物例如来自人的组织样品。许多甲醛处理的样品通过将其包埋在石蜡中进行贮藏。

[0028] 如本文所用的,术语“催化剂”是指在与具有醛固定的生物分子的样品(例如FFPE生物样品)接触时,催化从固定的生物分子(例如,醛固定的生物分子,甲醛固定的生物分子)去除加合物和/或交联的试剂。可以说催化剂去除了交联以及其他加合物(例如,醛固定相关的加合物,甲醛固定相关的加合物)。在一些情况下,催化剂的pKa在2.5至9.0的范围内。在一些实施方案中,催化剂选自表1中的化合物。本领域技术人员将理解,其他催化剂可用于本发明。

[0029] 短语“检测组分”是指至少确定组分的存在或不存在,并且可以包括组分或组分的一部分的进一步定量或其他表征。

[0030] 生物样品的“组分”是指人们希望检测的一类分子(例如,蛋白质、核酸等)或特定靶,例如特定蛋白质或核酸序列。

[0031] 如本文所用的,术语“核酸”是指脱氧核糖核苷酸(含有2-脱氧-D-核糖)(即,DNA)、多核糖核苷酸(含有D-核糖)(即,RNA)和嘌呤或嘧啶碱基或修饰的嘌呤或嘧啶碱基的任何其他N-糖苷类似物的多聚体。

[0032] 短语“释放至少一部分交联的组分”是指这样改变形成生物样品的两种组分(例如,核酸和蛋白质)之间的交联的共价键,以使这两种组分不再通过共价键连接。所述短语包括但不限于交联过程的完全逆转。

[0033] 如本文所用的短语“对于分析的可及性”是指检测方法确定特定靶分子的存在或不存在和/或数量的能力。例如,许多检测方法至少部分地不能检测甲醛交联的生物样品中的蛋白质或核酸,且因此某些交联的组分对于检测不“可及”。一旦通过用催化剂处理释放了交联,就可以检测和定量增加量(例如,至少多约10%,并且一般至少约2-倍,或者有时至少约10或100-倍)的组分。

[0034] 附图简述

[0035] 图1举例说明了甲醛将游离胺转化为其半缩醛胺(hemiaminal)加合物和亚胺中间体的反应,所述亚胺中间体可进一步与其他胺反应以形成缩醛胺交联。

[0036] 图2举例说明了通过本发明的催化剂“去交联(de-crosslinking)”的实例。

[0037] 图3举例说明了在实施例2中所述的反应条件下,在没有催化剂的情况下或在有化合物2(2APB)、化合物3(2A5MPB)、化合物6(APMPDE)和化合物7(BiBr₃)的情况下,dAMP二聚体向dAMP单体的逆转。

[0038] 发明详述

[0039] I. 引言

[0040] 如图1中所示的,甲醛容易与核酸(腺嘌呤、鸟嘌呤)和蛋白质(蛋白质主链中的 α -氨基或赖氨酸的 ϵ -氨基)的氮亲核体反应。半缩醛胺加合物形成亚胺中间体,其进一步与其他胺反应,从而产生分子内和分子间的缩醛胺交联。作为交联的结果,甲醛固定的样品中的各种生物组分对于现代检测方法不可及。本发明提供了使交联逆转的方法,从而使更多的生物组分对于检测可及。

[0041] 通过使样品与足够量的催化剂接触以释放交联反应实现了甲醛处理的样品中交联的逆转。交联的实例在图1中描绘。

[0042] 一旦交联的样品与催化剂接触,就可以减少或消除核酸和蛋白质的交联,从而允许这些组分的改善的检测。

[0043] II. 使交联的组分更可及的方法

[0044] 本发明提供了通过使样品与催化剂接触而使生物样品的甲醛交联的组分对于检测更可及的方法。用于使组分更可及的催化剂的数量可以变化,并且将部分取决于所用的特定催化剂、要检测的组分以及要使用的检测方法,这是因为不同检测方法具有不同的灵敏度,且因此可能需要更多或更少的组分可及。

[0045] 理想地,使得对于特定检测方法可及的组分的量将是样品中组分的总量。然而,通常来说,使得对于检测可及组分的量将少于样品中组分的总量。在本发明的一些实施方案中,在一定条件下使用足够量的催化剂,以使得至少约两倍于如果不使用催化剂处理样品

的话将可及(使用相同的检测方法)的量的组分对于检测可及。在一些实施方案中,在一定条件下使用足够量的催化剂,以使得至少约5倍、10倍、20倍、100倍于如果不使用催化剂处理样品的话将可及(使用相同的检测方法)的量的组分对于检测可及。在一些实施方案中,用于释放样品的交联的催化剂的浓度为约0.2 mM至约5.0 mM(或更高)。

[0046] 本领域普通技术人员将理解,将样品和催化剂组合的条件(例如,时间和温度)将影响交联逆转的能力和量。催化剂处理在环境(例如,20-40或50°C)温度是有效的,且因此不必定需要加热步骤以释放交联。这在检测相对不稳定的组分(例如RNA)时特别有用。尽管如此,较高的温度(例如,80-100°C、90-100°C、90-99°C等)可能进一步改善核酸或蛋白质对于检测的可及性。

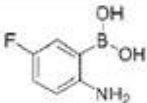
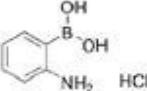
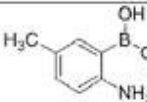
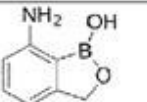
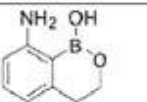
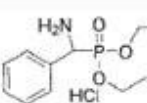
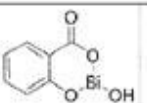
[0047] 此外,催化剂与样品一起温育的时间量将影响使得对于检测可及的组分的量。例如,样品可以与催化剂一起温育至少约5、10、20、30、60、120分钟或更长。虽然较长的温育时间可能增加从交联释放的组分的量,但这可能需要与特定组分可能多么不稳定相平衡。例如,当要检测不稳定组分例如RNA时,可能期望使用较短的温育时间。另一方面,较不稳定的组分(例如蛋白质或DNA)可以在不损害所述组分的情况下暴露于更长时间的温育。

[0048] 将认识到,可以使用不同的催化剂以释放交联。在不意图限制本发明的范围的情况下,选择的催化剂通常将能够从甲醛诱导的交联释放组分并将组分(例如,核酸和/或蛋白质)复原为与在甲醛交联之前存在的基本上相同的组分。交联反应是可逆过程,其通过甲醛和第一胺反应以形成半缩醛胺继之以通过脱水以生产亚胺而进行。亚胺与第二胺反应以生产产物缩醛胺。这个过程通过亚胺与水而不是第二胺的反应复原为原材料。据信本发明的催化剂通过在亚胺和缩醛胺的形成中充当竞争性反应物而从甲醛诱导的交联释放组分。当交联作为平衡过程的一部分而释放时,亚胺中间体和甲醛与催化剂反应,从而从甲醛诱导的交联释放组分。

[0049] 用于实施本发明方法的催化剂可包括氨基苯硼酸、环硼酸酯(苯并氧硼杂六环(benzoxaborines))、膦酸酯和铋盐以及络合物。这些催化剂在温和的反应条件下加速甲醛加合物和交联的裂解,从而提高了来自FFPET样品的核酸的质量。可用于本发明的催化剂的具体实施方案选自表1中所示的化合物。

[0050] 表1

[0051]

No.	化合物名称	化学式	描述符	CAS 编号	分子量 [g/摩尔]
硼酸和酯					
1	(2-氨基-5-氟苯基)硼酸		2A5FPB	1040400-87-0	154.93
2	2-氨基苯硼酸		2APB	5570-18-3 863753-30-4 (HCl)	173.40
3	(2-氨基-5-甲基苯基)硼酸		2A5MPB	948592-72-1	150.97
4	1,3-二氢-1-羟基-2,1-苯并氧杂硼戊环-7-胺		BOB7A	947165-27-7	148.96
5	3,4-二氢-1-羟基-1H-2,1-苯并氧杂硼杂六环-7-胺		BOBN	N/A	162.98
膦酸酯					
6	(氨基苯基甲基)膦酸二乙酯		APMPDE	16814-08-7 16656-50-1 (HCl)	279.70
铋盐以及络合物					
7	三溴化铋 (III)	BiBr ₃	BiBr ₃	7787-58-8	448.69
8	三碘化铋 (III)	BiI ₃	BiI ₃	7787-64-6	589.69
9	柠檬酸铋 (III)	Bi(柠檬酸)	Bi(柠檬酸)	813-93-4	398.08
10	水杨酸铋 (III)		Bi(sal)OH	14882-18-9	362.09

[0052] 本发明中描述的催化剂的关键性质是：催化缩醛胺裂解（即，逆反应或“去交联”）、对核酸和其他生物分子无不利影响、足够的水溶性、与核酸纯化规程的相容性、对自动化的适应性以及安全的处理（即，无毒性）。此外，催化剂应在将核酸、蛋白质或生物分子损害减至最小的反应条件下（例如，4.5-8.0的pH范围，25℃-60℃的温度范围，至少10分钟且少于60分钟的时间段）运行。期望添加允许在温和的反应条件下进行核酸和其他生物分子的提取的催化剂，以显著提高提取的材料的质量。因此，这些化合物可在手动和自动核酸和蛋白质提取和回收规程中广泛应用。

[0053] 根据本发明的方法，可以使用任何类型的甲醛交联的生物样品。通常，组织样品将来源于动物组织。在一些实施方案中，样品将被包埋在石蜡中。例如，样品可以是福尔马林

固定的石蜡包埋的组织 (FFPET)。在一些实施方案中,样品已经获自动物(例如,人),且然后在分析之前贮藏在含甲醛的溶液中以稳定样品,从而使样品中的核酸和/或蛋白质交联。例如,可以将子宫颈或其他妇科拭子(例如,用于检测性传播疾病)贮藏在含有甲醛的溶液中,从而使样品中的核酸和/或蛋白质交联。其后可以根据本发明的方法使用催化剂使交联逆转。

[0054] 为了进一步使样品组分对于检测可及,在本发明的方法中可以包括额外的纯化或其他步骤。例如,如果要检测样品的核酸组分,则用蛋白酶处理样品(例如,在催化剂处理之前或之后)或者以其他方式降解样品中的蛋白质可以是有帮助的。示例性的蛋白酶是蛋白酶K,尽管将理解的是,各种其他蛋白酶也可以替代。

[0055] 同样取决于其后要使用的检测方法,可期望在检测组分之前去除或至少减少与样品缔合的催化剂的量。例如,发明人已发现通过使用试剂或设备例如离心柱(spin column)以使核酸纯化不含样品的其他部分,来使样品中的核酸纯化不含样品的其他组分以及不含催化剂是有帮助的。示例性的设备是对核酸具有亲和力的基于二氧化硅的离心柱(例如,来自Qiagen, Valencia, CA的Qiaquick™离心柱),尽管当然也可以使用其他纯化方法来去除催化剂。

[0056] II. 交联的生物样品组分的检测

[0057] 任何检测方法都可以与上述催化剂处理结合使用以检测先前交联的样品的组分。如下文进一步详细描述,交联与检测相干扰的样品的示例性组分包括核酸和蛋白质。组分的检测可以仅仅涉及确定特定组分或所述组分的一部分(例如,特定蛋白质或核酸序列)的存在或不存在。另一方面,检测可以涉及组分的定量和/或组分的表征。表征可以包括例如肽或核酸测序和/或转录后或翻译后修饰的确定,包括,例如,糖基化、磷酸化等。

[0058] A. 核酸

[0059] 用于检测核酸的多种方法是本领域已知的。可以检测DNA或RNA(包括mRNA、rRNA等)或两者。检测可以包括例如通过核苷酸测序或序列特异性杂交技术(例如,诸如用于检测单核苷酸多态性(SNPs)等的那些)的特定序列或RNA的定量和/或核酸的表征。

[0060] 因为许多石蜡包埋的、甲醛处理的样品相对较少,所以经常期望使用扩增方法来扩增特定的核酸,以辅助核酸的检测。可以使用任何类型的扩增方法,包括指数式扩增方法、线性扩增、热循环或等温方法等。合适的扩增方法包括,但不限于,聚合酶链反应(PCR)(Principles and Applications for DNA Amplification (ed. H. A. Erlich, Freeman Press, NY, N.Y., 1992); PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (eds. Innis等人, Academic Press, San Diego, Calif., 1990); Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel, 1994-1999, 包括一直到2004年4月的补充更新; Sambrook & Russell, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (第3版, 2001)), 连接酶链反应(LCR)(美国专利Nos. 5,185,243、5,679,524和5,573,907; EP 0 320 308 B1; WO 90/01069; WO 89/12696; 和 WO 89/09835), 循环探针技术(美国专利Nos. 5,011,769、5,403,711、5,660,988和4,876,187, 以及 PCT 公开的申请 WO 95/05480, WO 95/1416 和 WO 95/00667), Invader™ 技术(美国专利Nos. 5,846,717、5,614,402、5,719,028、5,541,311 和 5,843,669), Q-β 复制酶技术(美国专利No. 4,786,600), NASBA(美国专利No. 5,409,818; EP-0 329 822), TMA(美国专利Nos. 5,399,491、5,888,779、5,705,365、5,710,029), SDA(美国

专利Nos. 5,455,166和5,130,238)。扩增中可以使用许多不同的聚合酶。从水生栖热菌(*Thermus aquaticus*) (Taq)分离的代表性的热稳定酶描述于美国专利No. 4,889,818中,且将其在常规PCR中使用的方法描述于Saiki等人,1988,*Science* 239:487-91中。另一代表性的热稳定酶包括栖热菌属(*Thermus*)物种Z05 DNA聚合酶。参见,例如,美国专利No. 5,674,738。任选地,实时PCR或其他定量扩增技术可用于定量特定核酸序列。定量扩增的方法公开于例如美国专利Nos. 6,180,349、6,033,854和5,972,602,以及,例如,Gibson等人,*Genome Research* 6:995-1001 (1996);DeGraves等人,*Biotechniques* 34(1):106-10,112-5 (2003);Deiman B等人,*Mol Biotechnol.* 20(2):163-79 (2002)。这在逆转录反应(RT-PCR)之后特别有用,以致于可以在样品中测量一种或多种基因的RNA水平。RT-PCR方法是本领域技术人员众所周知的(参见,例如,*Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel等人, eds., 2002)),并且容易适用于定量扩增方法。

[0061] 其他方法也可以用于检测核酸。例如,可以从样品中分离核酸并与探针杂交。在一些情况下,探针将与固相支持体(例如,微阵列)连接。

[0062] B. 蛋白质

[0063] 用催化剂处理后,也可以检测样品中的蛋白质组分。根据本发明的方法,可以采用多种蛋白质检测和表征方法中的任何一种。

[0064] 示例性的蛋白质检测方法是质谱分析法。示例性质谱分析法方法包括,但不限于,电喷射离子化和基质辅助激光解吸/离子化(MALDI),包括MALDI飞行时间(MALDI-TOF)方法。参见,例如,Karas, M.; Hillencamp, F. *Anal. Chem.* 60:2301 (1988);Beavis, R. C. *Org. Mass Spec.* 27:653 (1992);Creel, H. S. *Trends Poly. Sci.* 1(11):336 (1993)。

[0065] 对用质谱分析法检测的一种可供选择的方法是使用电泳以分离并接着检测感兴趣的蛋白质。电泳方法包括二维电泳方法。所述方法可以任选地包括后来用抗体进行蛋白质的蛋白质印迹检测。

[0066] 其他选择方案包括蛋白质的免疫检测。用于蛋白质的免疫检测的各种ELISA和其他形式是众所周知的。

[0067] III. 试剂盒

[0068] 本发明还提供了用于采用本发明上述方法的试剂盒。因此,试剂盒可以包括一种或多种本文所述的试剂。任选地,试剂盒可包括对于其使用的书面(纸质)或电子说明书。

[0069] 在一些实施方案中,本发明的试剂盒将包括催化剂与至少一种另外的用于检测或改善核酸或蛋白质的检测的试剂。例如,在一些实施方案中,试剂盒包括催化剂和用于降解蛋白质并使核酸对于检测甚至更可及的蛋白酶(包括但不限于蛋白酶K)。用于检测或改善核酸或蛋白质的检测的其他试剂包括,例如,用于扩增的试剂。例如,典型的聚合酶链反应可包括但不限于上游和下游引物、至少一个模板、脱氧核糖核苷三磷酸(包括dATP、dCTP、dGTP、TTP、dUTP)、聚合酶、缓冲剂、金属阳离子和盐作为试剂。用于RT-PCR反应的试剂盒还可以包括逆转录酶和/或引物。对于定量(例如,“实时”)扩增,采用一种或多种多核苷酸探针以与所期望的靶杂交。探针一般用可检测的标记例如荧光标记进行标记。示例性的探针是Taqman™ 探针,尽管将理解的是,可以使用其他类型的探针以监控定量扩增反应中的靶。基于核酸序列的扩增(NASBA)反应可以包括引物、逆转录酶、RNA酶H和DNA聚合酶。转录介导

的扩增(TMA)反应可以包括引物、逆转录酶和RNA聚合酶。链置换扩增(SDA)反应可以包括修饰的核苷酸和限制性内切核酸酶。某些扩增反应还可以包括脱氧尿苷N-糖基化酶(UNG)作为辅助扩增试剂(例如,Amperase[®], Roche Molecular Sciences, Alameda, CA)(参见, Kleiboeker, *Virology* (2005) 11:29)。

[0070] 用于检测或改善核酸或蛋白质的检测的其他试剂包括例如用于纯化蛋白质或核酸的试剂或设备,例如如本文所述的。

[0071] IV.反应混合物

[0072] 本发明还提供了反应混合物。示例性反应混合物将包含甲醛固定的样品,任选地包括石蜡,和如本文所述的催化剂。反应混合物可包括上文所述的催化剂浓度。此外,反应混合物任选地处于上述温度。反应混合物可以任选地进一步包含蛋白酶(例如,蛋白酶K)。

实施例

[0073] 实施例1

[0074] 这个实施例举例说明了单核苷酸的甲醛加合物的制备和分析。

[0075] 材料和试剂。

[0076] 脱氧腺苷一磷酸(dAMP)、高氯酸锂和所有有机催化剂均购自Sigma-Aldrich或VWR。EM级无甲醇10%甲醛购自Thermo Fisher Scientific。溶剂和试剂购自Sigma-Aldrich或VWR。化合物(催化剂)的名称、CAS编号和分子量如下:

[0077] 化合物1:(2-氨基-5-氟苯基)硼酸;CAS编号1040400-87-00;分子量154.93。

[0078] 化合物2:2-氨基苯硼酸;CAS编号5570-18-3/863753-30-4(HCl);分子量173.40。

[0079] 化合物3:(2-氨基-5-甲基苯基)硼酸;CAS编号948592-72-1;分子量150.97。

[0080] 化合物4:1,3-二氢-1-羟基-2,1-苯并氧杂硼戊环-7-胺;CAS编号947165-27-7,分子量148.96。

[0081] 化合物5:3,4-二氢-1-羟基-1H-2,1-苯并氧杂硼杂六环-7-胺;CAS编号N/A;分子量162.98。

[0082] 化合物6:(氨基苯基甲基)膦酸二乙酯;CAS编号16814-08-7/16656-50-1(HCl);分子量279.70。

[0083] 化合物7:三溴化铋(III);CAS编号7787-58-8;分子量448.69

[0084] 化合物8:三碘化铋(III);CAS编号7787-64-6;分子量589.69

[0085] 化合物9:柠檬酸铋(III);CAS编号813-93-4;分子量398.08

[0086] 化合物10:水杨酸铋(III);CAS编号14882-18-9;分子量362.09。

[0087] 表征。通过ESI-MS证实了N⁶-羟甲基-dAMP的形成,这与文献一致。发现N⁶-羟甲基-dAMP的高分辨质量为362.0852([M+H]⁺, C₁₁H₁₇N₅O₇P,计算的362.0860)。

[0088] 亚甲基-双-脱氧腺苷-5'-一磷酸(二聚体)的合成。将0.06 M的dAMP溶液(在去离子水中)和0.3 M的10%甲醛(无甲醇)在0.2 M乙酸钠缓冲剂(pH 4.8)中的溶液等体积混合。于室温搅拌几分钟后,浑浊的反应混合物变得非常清澈,并于室温继续搅拌2-3天。将反应混合物猝灭并通过于-20℃冷冻短暂贮藏。解冻后,将粗混合物从冰冷的在丙酮中的2%LiClO₄沉淀,并于4℃离心15分钟。倾析出上清液,并用冰冷的丙酮进一步洗涤(两次)。在真空下将粗混合物蒸发至干燥以获得白色固体。粗混合物通过反相HPLC纯化。

[0089] 亚甲基-双-脱氧腺苷-5'-一磷酸酯(二聚体)的HPLC纯化。将一小部分(~30 mg)粗混合物溶解于~500 μ L的0.1 M磷酸钠缓冲剂(pH 7.0)中,并通过HPLC纯化。使用在0.1 M TEAA缓冲剂(pH 7.5)中的乙腈不连续线性梯度:前3分钟为0-1.0%,紧接的22分钟为1.0-8.0%,最后3分钟为8.0-95.0%。采用3 ml/分钟的洗脱速度。分离用于亚甲基-双-AMP的HPLC纯化的级分(保留时间-25-26分钟),并在真空下蒸发至干燥。

[0090] 亚甲基-双-dAMP(二聚体)的表征。

MALDI-HRMS m/z 707.1339

$[(M+H)^+]$, $C_{21}H_{29}N_{10}O_{14}P_2$, 计算的707.1340; 1H NMR (D_2O): 8.35 (s, 2H, H2), 8.20 (s, 2H,

[0091] H8), 5.95-5.97 (d, 2H, $J = 5.6$ Hz, H1'), 5.24 (s, 2H, N6-CH₂N6), 4.61 (t, 2H, $J = 5.3$ Hz, H2'), 4.39-4.41 (m, 2H, H3'), 4.28-4.29 (m, 2H, H4'), 4.04-4.07 (m, 4H, H5')。

[0092] 实施例2

[0093] 这个实施例举例说明了用催化剂对dAMP二聚体的交联化学的逆转。

[0094] 通过HPLC监控亚甲基-双-dAMP二聚体的逆交联(如图2所示的)。反应于60 $^{\circ}C$ 在50 mM磷酸盐缓冲剂,pH 5.0中进行。将1.0 mM浓度的dAMP二聚物与无催化剂或与5.0 mM浓度的化合物2、3、6和7混合。对于每种反应混合物,在10分钟、20分钟、40分钟、60分钟和90分钟时取等分试样(10 μ l)。图3显示了这个实验的结果,并证明了所有测试的催化剂都能够以比未添加催化剂时快得多的速率逆转交联(显示为产生的dAMP的%)。

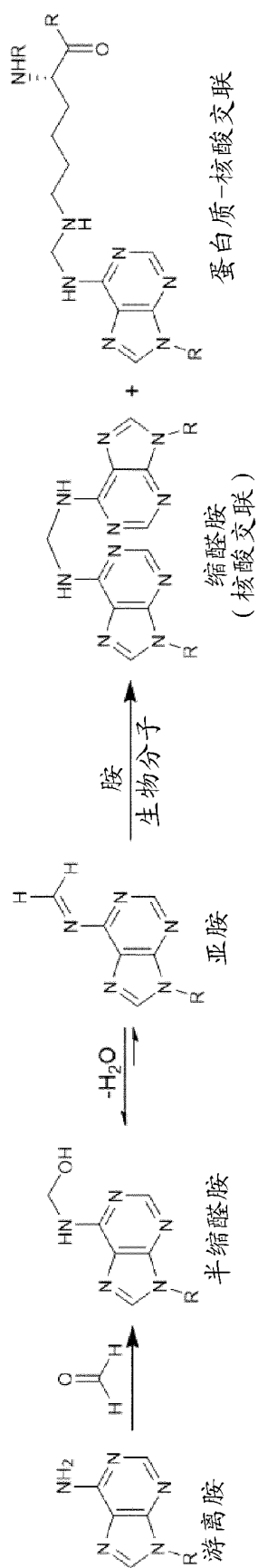


图 1

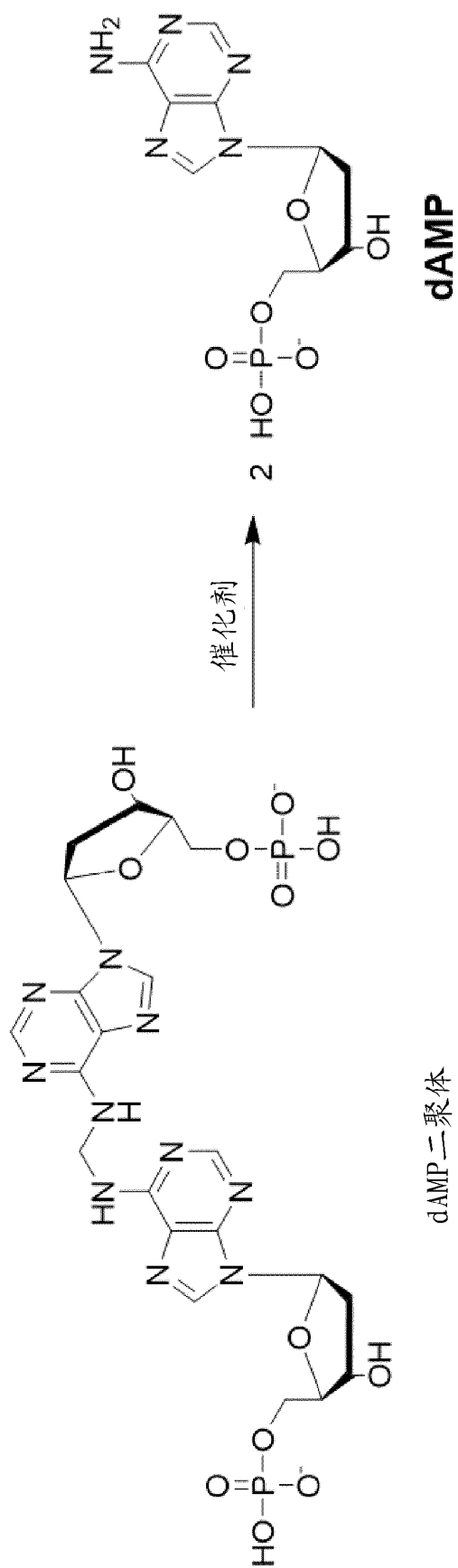


图 2

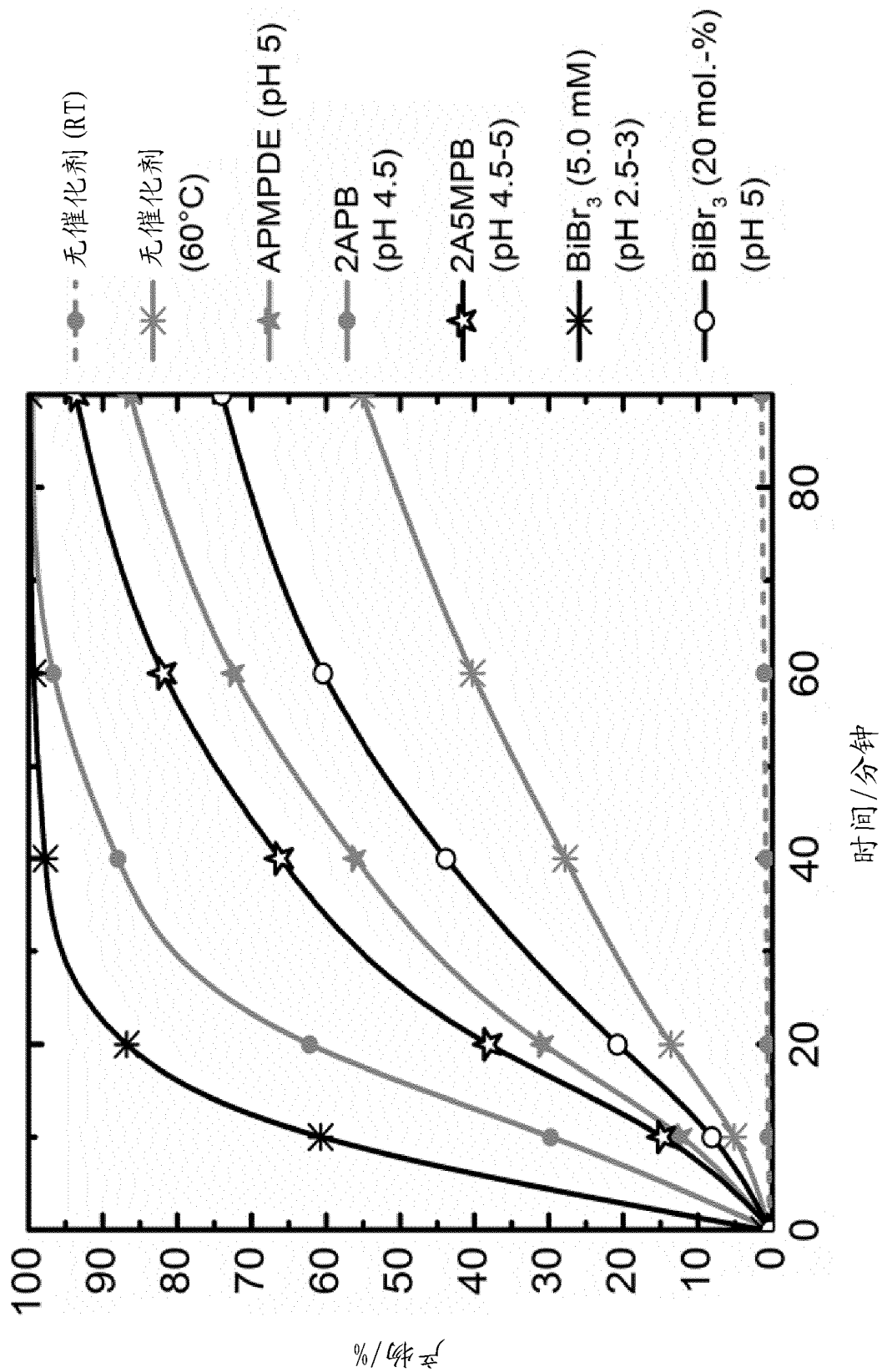


图 3