



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 114075602 B

(45) 授权公告日 2024.06.14

(21) 申请号 202010830940.9

(22) 申请日 2020.08.18

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 114075602 A

(43) 申请公布日 2022.02.22

(73) 专利权人 派德洛格(天津)生物科技有限公司

地址 300042 天津市和平区小白楼街解放北路188号信达广场1105室

(72) 发明人 赵丹 王欢 彭波

(74) 专利代理机构 北京布瑞知识产权代理有限公司 11505

专利代理师 孟潭

(51) Int. Cl.

C12Q 1/6886 (2018.01)

C12Q 1/6841 (2018.01)

C12Q 1/682 (2018.01)

C12N 15/11 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 109971861 A, 2019.07.05

CN 109652505 A, 2019.04.19

CN 109652506 A, 2019.04.19

Tianwei Zhang等.An Evaluation and Recommendation of the Optimal Methodologies to Detect RET Gene Rearrangements in Papillary Thyroid Carcinoma.Genes Chromosomes Cancer.2015, 第54卷(第3期),摘要,第169-171页.

Tianwei Zhang等.An Evaluation and Recommendation of the Optimal Methodologies to Detect RET Gene Rearrangements in Papillary Thyroid Carcinoma.Genes Chromosomes Cancer.2015, 第54卷(第3期),摘要,第169-171页.

审查员 马璐

权利要求书1页 说明书13页

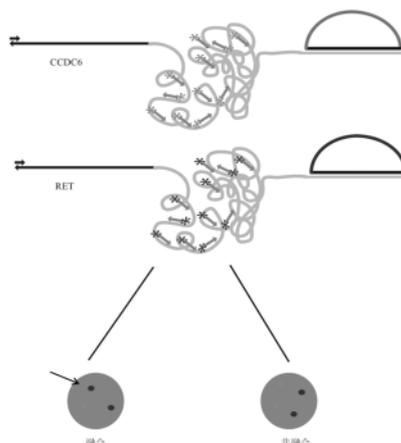
序列表6页 附图7页

(54) 发明名称

检测人CCDC6-RET融合基因的探针、试剂、试剂盒、检测方法及应用

(57) 摘要

本发明提供了一种检测人CCDC6-RET融合基因的探针、试剂、试剂盒、检测方法及应用,涉及分子生物学和肿瘤学技术领域。检测人CCDC6-RET融合基因的探针,包括检测CCDC6基因的探针A和检测RET基因的探针B,其中优选探针A检测CCDC6基因1号外显子,和/或所述探针B检测RET基因12号外显子。通过采用所述探针A和探针B组合使用对人CCDC6-RET融合基因进行原位检测,可直接通过判断两种探针的荧光位点是否靠近肉眼观察细胞或者临床组织样本中目标基因在细胞核内的定位和拷贝数。



说明: → 表示基因的5'端; * 表示荧光探针

1. 原位检测人CCDC6-RET融合基因的试剂盒,其特征在於,包括探针锁定处理体系、细胞通透处理体系、平末端处理体系、目的核苷酸暴露处理体系、信号放大处理体系、信号检测处理体系,和清洗处理体系;

所述探针锁定处理体系包含:检测CCDC6基因1号外显子的探针A、检测RET基因12号外显子的探针B、DNA连接酶、DNA Ligase buffer、ATP和无核酸酶超纯水;

所述探针A和探针B均包括三个区域:

- (1) 5' 端同源区,与目的基因的5' 端序列互补结合;
- (2) 3' 端同源区,与目的基因的3' 端序列互补结合;
- (3) 环化区,与荧光探针互补结合,环化区位于5' 端同源区和3' 端同源区之间;

所述探针A和探针B选自如下:核苷酸序列如SEQ ID NO.11所示的探针A和核苷酸序列如SEQ ID NO.16所示的探针B,或核苷酸序列如SEQ ID NO.15所示的探针A和核苷酸序列如SEQ ID NO.8所示的探针B,或核苷酸序列如SEQ ID NO.13所示的探针A和核苷酸序列如SEQ ID NO.18所示的探针B;

所述细胞通透处理体系包含:浓度为5mg/mL~30mg/mL的蛋白酶K、Tris-HCl缓冲液、EDTA、SDS;

所述平末端处理体系包含:选自FspI酶、Cac8I酶或CdiI酶的切割CCDC6基因1号外显子核酸内切酶,选自RsaI酶、Hpy18I酶、MslI酶或A1eI酶的切割RET基因12号外显子的核酸内切酶,CutSmart buffer,无核酸酶超纯水;

所述目的核苷酸暴露处理体系包含:LambdaExonuclease、Exonuclease buffer、无核酸酶超纯水;

所述信号放大处理体系包含:DNA聚合酶、DNA polymerase buffer、dNTPs、DTT和无核酸酶超纯水;

所述信号检测处理体系包含:荧光探针A' 和荧光探针B'、甲酰胺、氯化钠、柠檬酸钠、鲑鱼精子DNA和无核酸酶超纯水;所述荧光探针A' 和所述荧光探针B' 分别结合在含重复序列的单链环状探针A和探针B上;

所述清洗处理体系包括:Tris-HCl、NaCl、Tween20和无核酸酶超纯水。

检测人CCDC6-RET融合基因的探针、试剂、试剂盒、检测方法及应用

技术领域

[0001] 本发明涉及分子生物学和肿瘤学技术领域,具体涉及检测人CCDC6-RET融合基因的探针、试剂、试剂盒、检测方法及应用。

背景技术

[0002] 近年来,随着分子病理诊断的快速发展。恶性肿瘤的诊断和治疗都有了很明显的进步。恶性肿瘤的发生发展往往是由于抑癌基因的失活和原癌基因的激活共同导致的。RET(全名RET proto-oncogene)基因是一种原癌基因,位于10号染色体的长臂上,全长80kb左右(含21个外显子),它所编码表达的蛋白过度激活被认为是许多恶性肿瘤的驱动性因素。RET基因在癌细胞内有多种变异方式,从点突变到扩增再到重排。CCDC6(全名:coiled-coil domain containing 6)基因编码一种含卷曲螺旋结构域(coiled-coil domain)的蛋白,并被认为可能是一种抑癌基因,它位于10号染色体长臂,全长117kb左右(含9个外显子)。研究发现,CCDC6-RET融合基因表达的产物(部分CCDC6基因和RET激酶结构域的基因)是乳头状甲状腺癌发生的原因。根据COSMIC的数据库,进行过融合基因表达测试的乳头状甲状腺癌患者样本中,有约12%呈阳性。

[0003] 传统的检测方法需要从肿瘤组织提取RNA,进行逆转录,再进行PCR产物测序或者二代高通量测序,以此确定CCDC6-RET融合基因表达产物的存在,该检测方法步骤繁琐,耗时较长,且无法在细胞核内对目标基因进行定位。而采用原位检测(原位检测是指保持DNA在细胞核内天然的状态进行检测),如采用细胞核内定位的方法则更加简单方便和易于观察。目前细胞核内定位CCDC6-RET融合基因的方法没有传统的FISH技术(因为并不清楚它在基因组上具体的融合序列,从而无法进行FISH探针的设计)。目前也未见报道有关人CCDC6-RET融合基因的其他类型细胞核内定位的方法。

发明内容

[0004] 有鉴于此,本发明致力于提供检测人CCDC6-RET融合基因的探针,以直接在细胞核内定位的方式,肉眼观察判断细胞样本中CCDC6基因是否与RET基因发生融和,以此诊断癌症预后和靶向用药等。

[0005] 本发明一方面提供了检测人CCDC6-RET融合基因的探针,包括检测CCDC6基因的探针A和检测RET基因的探针B。

[0006] RET基因在许多肿瘤细胞中,会发生异位,进而导致基因的融合,能够表达出原本人体内并不存在的融合蛋白,导致癌细胞的恶性增殖和癌症的发展。其中RET基因与CCDC6基因发生融合较为常见,根据人类基因组测序的结果显示,CCDC6基因和RET基因均位于人的10号染色体长臂,两者之间相差17,925,554bp,17.9mb,17925kb,因此它们在细胞核内的空间定位是分散开的。在正常情况下(即CCDC6基因和RET基因不发生融合),检测两种基因的探针A和探针B与各自的荧光结合探针结合后会显示出分散的荧光点,即两种荧光点不会

聚集或靠近。只有CCDC6基因和RET基因融合时,两种荧光点才会聚集或靠近。

[0007] 需要说明的是,对于探针A检测CCDC6基因中哪段序列不作具体限定,对于探针B检测RET基因中哪段序列也不作具体限定。可以根据CCDC6-RET融合基因的具体融合位点进行探针的设计和序列选择。

[0008] 进一步,在本发明提供的技术方案的基础上,所述探针A检测CCDC6基因1号外显子,和/或所述探针B检测RET基因12号外显子。

[0009] CCDC6基因的1号外显子和RET基因的12号外显子发生融合,此种融合方式在两种基因发生融合的情况中较常出现。在一些甲状腺癌和肺癌中,CCDC6基因和RET基因会发生异位,导致能够表达出一种CCDC6基因的1号外显子和RET基因的12号外显子编码氨基酸拼接在一起的融合蛋白,此时它们在细胞核内的空间定位是紧挨一起,与在普通细胞内的定位截然不同。因此,针对探针A检测CCDC6基因1号外显子,探针B检测RET基因12号外显子,能够更好地检测出待测样本是否发生了基因融合。

[0010] 进一步,在本发明提供的技术方案的基础上,所述探针A和探针B均包括三个区域:(1)5'端同源区,与目的基因的5'端序列互补结合;(2)3'端同源区,与目的基因的3'端序列互补结合;(3)环化区,与荧光探针互补结合,环化区位于5'端同源区和3'端同源区之间。

[0011] 需要说明的是,此处探针A中的“目的基因”是指人CCDC6基因1号外显子,其核苷酸序列为SEQ ID NO.5所示:5'-agtgcaataactgcccagcccggcggggtctctgttctctggcagaggaggtcccttggcagcgggaagcgccctctctttctctcgcgcgctccgagctctgcgccctggtgccaggcgctcagctcggcgctcccctgtgctcgcggcgcccactcattcgcagcccggccttcgtcgcggccgctcccctgctgctcctcctctttcccagcccgcggccatggcggacagcgccagcgagagcgacacggacggggcggggggcaa cagcagcagctcggccgcatgcagtcgtcctgctcgtcgcacctcggggcggcggtggcggcgggggaggcggcggcggtgggaagtcggggggcattgtcatctcgcggttccgcctggaggagctcaccaaccgctggcctcgtgcagcaagagaacaaggtgctgaagatagagctggagacctacaaactgaagtgcaaggcactgcaggaggagaaccgcacctgcgcaaagccagcgtgaccatc-3'。

[0012] 此处探针B中的“目的基因”是指人RET基因的12号外显子,其核苷酸序列为SEQ ID NO.10所示:5'-gaggatccaaagtgggaattccctcgaagaacttggttcttgaaaaactctaggagaaggcgaatttgaaaagtggcaaggcaacggccttccatctgaaaggcagagcagggtacaccacggtggccgtgaagatgctgaaag-3'。

[0013] 所述探针A和探针B均为线性单链DNA,其组成可以表示为5'端同源区—环化区—3'端同源区,其中“—”可以表示为直接连接(通过磷酸二酯键)和/或通过连接子(例如几个连续的碱基)连接。

[0014] 在所述探针A和/或探针B与目的基因的单链DNA结合时,其中5'端同源区和3'端同源区同时向环化区折叠且分别与目标DNA结合,此时由于5'端同源区和3'端同源区之间的磷酸二酯键没有连接,所述探针形成不完全闭合的环状单链DNA。

[0015] 进一步,所述探针A中:3'同源区的碱基数量为14-18nt,GC含量为60-75%;5'同源区的碱基数量为11-15nt,GC含量为60-75%;3'同源区的Tm值比5'同源区的Tm值3-15°C,且5'端Tm值高于45°C。

[0016] Tm值是指把DNA的双螺旋结构在热变性过程中紫外吸收值达到最大值的1/2时的温度。探针的Tm值与其碱基数目和GC含量成正相关,与盐离子浓度也有关。此处,探针A的Tm

值是在探针A的浓度100 μ M,盐离子浓度50nM的条件下测得。

[0017] 示例性的,所述探针A的3'同源区的碱基数量可以为14nt、15nt、16nt、17nt、18nt,优选16nt。3'同源区的GC含量可以为60%、66.7%、68.8%、70.6%、75%,优选68.8%。

[0018] 示例性的,所述探针A的5'同源区的碱基数量可以为11nt、12nt、13nt、14nt、15nt,优选13nt。5'同源区的GC含量可以为60%、66.7%、69.2%、73.3%、75%,优选69.2%。

[0019] 示例性的,所述探针A的3'同源区T_m值比5'同源区T_m值高3 $^{\circ}$ C、3.5 $^{\circ}$ C、4 $^{\circ}$ C、4.5 $^{\circ}$ C、5 $^{\circ}$ C、5.5 $^{\circ}$ C、6 $^{\circ}$ C、6.5 $^{\circ}$ C、7 $^{\circ}$ C、7.5 $^{\circ}$ C、8 $^{\circ}$ C、8.5 $^{\circ}$ C、9 $^{\circ}$ C、9.5 $^{\circ}$ C、10 $^{\circ}$ C、10.5 $^{\circ}$ C、11 $^{\circ}$ C、11.5 $^{\circ}$ C、12 $^{\circ}$ C、12.5 $^{\circ}$ C、13 $^{\circ}$ C、13.2 $^{\circ}$ C、13.5 $^{\circ}$ C、14 $^{\circ}$ C、14.5 $^{\circ}$ C或15 $^{\circ}$ C。

[0020] 进一步,所述探针B中:3'同源区的碱基数量为20-24nt,GC含量为47.8-55%;5'同源区的碱基数量为12-15nt,GC含量为60-75%;3'同源区的T_m值比5'同源区的T_m值高-3-15 $^{\circ}$ C,且5'端T_m值高于45 $^{\circ}$ C。

[0021] 此处,探针B的T_m值是在探针B的浓度100 μ M,盐离子浓度50nM的条件下测得。

[0022] 示例性的,所述探针B的3'同源区的碱基数量可以为20nt、21nt、22nt、23nt、24nt,优选22nt。3'同源区的GC含量可以为47.8%、52.4%、50%、55%,优选50%。

[0023] 示例性的,所述探针B的5'同源区的碱基数量可以为12nt、13nt、14nt、15nt,优选13nt。5'同源区的GC含量可以为60%、64.3%、69.2%、75%,优选69.2%。

[0024] 示例性的,所述探针B的3'同源区T_m值比5'同源区T_m值高-3 $^{\circ}$ C、-2 $^{\circ}$ C、-1 $^{\circ}$ C、1 $^{\circ}$ C、2 $^{\circ}$ C、3 $^{\circ}$ C、4 $^{\circ}$ C、4.5 $^{\circ}$ C、5 $^{\circ}$ C、5.5 $^{\circ}$ C、6 $^{\circ}$ C、6.5 $^{\circ}$ C、7 $^{\circ}$ C、7.5 $^{\circ}$ C、8 $^{\circ}$ C、8.5 $^{\circ}$ C、9 $^{\circ}$ C、9.2 $^{\circ}$ C、9.5 $^{\circ}$ C、10 $^{\circ}$ C、10.3 $^{\circ}$ C、10.5 $^{\circ}$ C、11 $^{\circ}$ C、11.5 $^{\circ}$ C、12 $^{\circ}$ C、12.5 $^{\circ}$ C、13 $^{\circ}$ C、14 $^{\circ}$ C或15 $^{\circ}$ C。

[0025] 进一步,在本发明提供的技术方案的基础上,所述探针A中:5'同源区的T_m值为46-50 $^{\circ}$ C(优选47.1 $^{\circ}$ C),3'同源区的T_m值为58-62 $^{\circ}$ C(优选60.3 $^{\circ}$ C)。

[0026] 示例性的,探针A的3'同源区的T_m值为58 $^{\circ}$ C、58.5 $^{\circ}$ C、59 $^{\circ}$ C、59.5 $^{\circ}$ C、60 $^{\circ}$ C、60.3 $^{\circ}$ C、60.5 $^{\circ}$ C、61 $^{\circ}$ C、61.5 $^{\circ}$ C或62 $^{\circ}$ C,优选60.3 $^{\circ}$ C。

[0027] 示例性的,探针A的5'同源区的T_m值为46 $^{\circ}$ C、46.5 $^{\circ}$ C、47 $^{\circ}$ C、47.1 $^{\circ}$ C、47.6 $^{\circ}$ C、48 $^{\circ}$ C、48.5 $^{\circ}$ C、49 $^{\circ}$ C、49.5 $^{\circ}$ C或50 $^{\circ}$ C,优选47.1 $^{\circ}$ C。

[0028] 进一步,所述探针A的3'同源区的T_m值比5'同源区的T_m值高12-14 $^{\circ}$ C,优选高13.2 $^{\circ}$ C。

[0029] 所述探针A识别被II类核酸内切酶(优选能够识别CCDC6基因1号外显子中回文序列的FspI酶、Cac8I酶或CdiI酶)和核酸外切酶(优选Lambda Exonuclease)处理后暴露的DNA序列。FspI酶识别的回文序列为: TGCCGA;Cac8I酶识别的回文序列为:GCNNGC;CdiI酶识别的回文序列为:CATCG。更优选FspI酶。

[0030] 进一步,在本发明提供的技术方案的基础上,所述探针B中:5'同源区的T_m值为52-54 $^{\circ}$ C(优选53.1 $^{\circ}$ C),3'同源区的T_m值为62-65 $^{\circ}$ C(优选63.6 $^{\circ}$ C)。

[0031] 示例性的,探针B的3'同源区的T_m值为62 $^{\circ}$ C、62.5 $^{\circ}$ C、62.8 $^{\circ}$ C、63 $^{\circ}$ C、63.3 $^{\circ}$ C、63.6 $^{\circ}$ C、64 $^{\circ}$ C、64.2 $^{\circ}$ C、64.5 $^{\circ}$ C或65 $^{\circ}$ C,优选63.6 $^{\circ}$ C。

[0032] 示例性的,探针B的5'同源区的T_m值为52 $^{\circ}$ C、52.3 $^{\circ}$ C、52.5 $^{\circ}$ C、52.8 $^{\circ}$ C、53 $^{\circ}$ C、53.1 $^{\circ}$ C、53.3 $^{\circ}$ C、53.5 $^{\circ}$ C、53.8 $^{\circ}$ C或54 $^{\circ}$ C,优选53.1 $^{\circ}$ C。

[0033] 进一步,所述探针B的3'同源区的T_m值比5'同源区的T_m值高9-11 $^{\circ}$ C,优选高10.5 $^{\circ}$ C。

[0034] 所述探针B识别目的基因被II类核酸内切酶(优选能够识别RET基因的12号外显子中回文序列的RsaI酶、Hpy18I酶、MslI酶或AleI酶)和核酸外切酶(优选Lambda Exonuclease)处理后暴露的DNA序列。RsaI酶识别的回文序列为:gtac;Hpy18I酶识别的回文序列为:gtnnac;MslI酶识别的回文序列为:caynnnrtg (SEQ ID NO.21);AleI酶识别的回文序列为:cacnnnngtg (SEQ ID NO.22)。更优选RsaI酶。

[0035] 进一步,在本发明提供的技术方案的基础上,所述探针A和/或探针B的碱基数量为80-90nt;更优选地,所述探针A和/或探针B的环化区的碱基数量为40-55nt。

[0036] 在本发明的一种实施方式中,所述探针A的碱基数量为80-90nt,环化区的碱基数量为40-55nt。

[0037] 在本发明的一种实施方式中,所述探针B的碱基数量为80-90nt,环化区的碱基数量为40-55nt。

[0038] 控制整个探针的碱基数量和环化区的碱基数量,方便探针与目的基因结合后更容易成环,以使后续的成环的探针可以进行线性自我复制,提高探针的检测效率。

[0039] CCDC6基因与RTE基因融合位点靠近CCDC6基因1号外显子的3'端,所以设计的检测其的探针A靠近3'端,使两个本来物理距离较远的两个基因荧光点离的很近,而检测是否发生融合,检测更加准确。

[0040] 探针A

[0041] 进一步,所述探针A的5'端同源区的核苷酸序列包含或由如下序列组成:

[0042] 1) SEQ ID NO.1所示的核苷酸序列;或,

[0043] 2) SEQ ID NO.1所示的核苷酸序列的互补序列或同源序列;

[0044] 3) SEQ ID NO.1所示的核苷酸序列添加、缺失、替换一个或多个(例如1-3个)碱基且能与目的基因互补结合的核苷酸序列;和/或

[0045] 所述探针A的3'端同源区的核苷酸序列包含或由如下序列组成:

[0046] 1) SEQ ID NO.2所示的核苷酸序列;或,

[0047] 2) SEQ ID NO.2所示的核苷酸序列的互补序列或同源序列(优选具有90%相似性);

[0048] 3) SEQ ID NO.2所示的核苷酸序列添加、缺失、替换一个或多个(例如1-5个)碱基且能与目的基因互补结合的核苷酸序列

[0049] 所述探针A的5'端同源区的同源序列为与SEQ ID NO.1所示的核苷酸序列具有至少90%相似性的核苷酸序列。

[0050] 所述探针A的3'端同源区的同源序列为与SEQ ID NO.2所示的核苷酸序列具有至少90%相似性的核苷酸序列。

[0051] 在本发明的一种实施方式中,所述探针A的5'端同源区的核苷酸序列为SEQ ID NO.1所示的核苷酸:5'-ctcctgcagtgcc-3',和/或3'端同源区的核苷酸序列为SEQ ID NO.2所示的核苷酸:5'-gcaggtcgcggttctc-3'。

[0052] 在本发明的一种实施方式中,所述5'端同源区的核苷酸序列为SEQ ID NO.1所示的核苷酸序列的互补序列,和/或3'端同源区的核苷酸序列为SEQ ID NO.2所示的核苷酸序列的互补序列。互补序列为能够与SEQ ID NO.1和/或SEQ ID NO.2所示的核苷酸序列在严格条件下杂交的核苷酸序列。示例性地,所述“严格条件”是指探针将与其靶序列杂交至可

探测程度超过与其它序列杂交(如至少2倍于背景)的条件。严格条件具有序列依赖性,且因环境的不同而不同。通过控制杂交和/或洗涤条件的严格性,可以鉴定与探针100%互补的靶序列。

[0053] 在本发明的一种实施方式中,所述5'端同源区的核苷酸序列为SEQ ID NO.1所示的核苷酸序列的同源序列,和/或3'端同源区的核苷酸序列为SEQ ID NO.2所示的核苷酸序列的同源序列。所述5'端同源区的同源序列包括但不限于SEQ ID NO.1所示的核苷酸序列具有约90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%相似性的核苷酸序列;所述3'端同源区的同源序列包括但不限于SEQ ID NO.2所示的核苷酸序列具有约90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%相似性的核苷酸序列。

[0054] 在本发明的一种实施方式中,所述5'端同源区的核苷酸序列为SEQ ID NO.1所示的核苷酸序列(和/或3'端同源区的核苷酸序列为SEQ ID NO.2所示的核苷酸序列)添加、缺失、替换一个或多个(例如1-3个)的核苷酸序列。示例性的,由于环化区不与目的基因结合,在5'端同源区靠近环化区的一端添加1、2、3个(或更多个)与目的基因结合(或不结合)的碱基,或缺失1、2、3个碱基,或替换1、2、3个碱基都几乎不会影响5'端同源区与目的基因的结合。

[0055] 进一步,在本发明提供的技术方案的基础上,所述探针A的核苷酸序列包含或由如下序列组成:

[0056] 1) SEQ ID NO.3所示的核苷酸序列;或,

[0057] 2) SEQ ID NO.3所示的核苷酸序列的互补序列或同源序列(优选具有70%相似性);

[0058] 3) SEQ ID NO.3所示的核苷酸序列添加、缺失、替换一个或多个(例如1-10个)碱基的核苷酸序列;

[0059] 在本发明的一种实施方式中,所述探针A的核苷酸序列为SEQ ID NO.3所示的核苷酸:5'-ctcctgcagtgccccctcgcatcaataccgatcatTCTTccccctcgcatcaataccgatcatcgcaggtcgc ggttctc-3'。其中,靠近5'端的下划直线部分的核苷酸序列为5'同源区,靠近3'端的下划波浪线部分的核苷酸序列为3'同源区,中间为环化区。

[0060] 由于环化区不与目的基因结合,其作用在于与荧光探针结合而使所述探针显色,所以环化区的序列是任意可变的,序列SEQ ID NO.3中显示的环化序列只是示例性的而非限制性的。

[0061] 在本发明的一种实施方式中,所述探针的核苷酸序列为SEQ ID NO.3所示的核苷酸序列的互补序列。互补序列为能够与SEQ ID NO.3的核苷酸序列在严格条件下杂交的核苷酸序列。

[0062] 在本发明的一种实施方式中,所述探针的核苷酸序列为SEQ ID NO.3所示的核苷酸序列的同源序列。所述同源序列包括但不限于SEQ ID NO.3所示的核苷酸序列具有约70%、72%、75%、78%、80%、82%、85%、88%、90%、93%、95%、96%、97%、98%、99%相似性的核苷酸序列。

[0063] 在本发明的一种实施方式中,所述探针的核苷酸序列为SEQ ID NO.3所示的核苷酸序列添加、缺失、替换一个或多个(例如1-10个,优选1-5个,更优选1-3个)碱基的核苷酸序列。示例性的,在环化区添加1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个或更多个碱基,或缺失1、2、3、4、5、

6、7、8、9、10个碱基,或替换1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个碱基都不会影响探针与目的基因的结合紧密度。

[0064] 进一步,结合所述探针A的荧光探针A'的核苷酸序列包含或由如下序列组成:

[0065] 1) SEQ ID NO.4所示的核苷酸序列;或,

[0066] 2) SEQ ID NO.4所示的核苷酸序列的互补序列或同源序列;

[0067] 3) SEQ ID NO.4所示的核苷酸序列添加、缺失、替换一个或多个(例如1-10个)碱基且能够与所述的探针A互补结合的核苷酸序列。

[0068] 在本发明的一种实施方式中,所述荧光探针A'的核苷酸序列为SEQ ID NO.4所示的核苷酸:5'-ccctcgcatacaataccgatcat-3'。

[0069] 在本发明的一种实施方式中,所述荧光探针A'的核苷酸序列为SEQ ID NO.4所示的核苷酸序列的互补序列。互补序列为能够与SEQ ID NO.4的核苷酸序列在严格条件下杂交的核苷酸序列。

[0070] 在本发明的一种实施方式中,所述荧光探针A'的核苷酸序列为SEQ ID NO.4所示的核苷酸序列的同源序列。所述同源序列包括但不限于SEQ ID NO.4所示的核苷酸序列具有约70%、72%、75%、78%、80%、82%、85%、88%、90%、93%、95%、96%、97%、98%、99%相似性的核苷酸序列。

[0071] 在本发明的一种实施方式中,所述荧光探针A'的核苷酸序列为SEQ ID NO.4所示的核苷酸序列添加、缺失、替换一个或多个(例如1-10个)的核苷酸序列且能够与所述的探针A互补结合的核苷酸序列。示例性的,添加1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个或更多个碱基,或缺失1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个碱基,或替换1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个碱基,只要能够与所述的探针互补结合即可。

[0072] 所述1)或2)或3)的荧光探针A'的核苷酸序列连接有荧光标记。荧光标记包括但不限于Cy3、Cy5、6-FAM、6-TET、5-FITC、6-TRITC、5-TAMRA、6-TAMRA、AMC。

[0073] 对比荧光探针A' SEQ ID NO.4所示的核苷酸序列,以及检测CCDC6基因1号外显子的探针A SEQ ID NO.3所示的核苷酸序列,可以发现后者所述探针是由两个重复的序列串联而成,且重复序列与荧光探针的序列相同,重复序列之间存在补充序列。如此一来,一个拷贝的探针序列能够结合两个荧光探针,明显加大了荧光信号量,方便及时清楚地观察荧光信号。而且在两个重复序列之间用几个碱基组成的补充序列连接,使两个重复序列隔开,增加其空间距离,从而当两个重复序列均结合荧光探针时,可以避免因荧光探针连接的荧光基团较大而影响两个重复序列结合荧光探针,提高荧光探针和两个重复序列的结合效率。

[0074] 探针B

[0075] 进一步,所述探针B的5'端同源区的核苷酸序列包含或由如下序列组成:

[0076] 1) SEQ ID NO.6所示的核苷酸序列;或,

[0077] 2) SEQ ID NO.6所示的核苷酸序列的互补序列或同源序列;

[0078] 3) SEQ ID NO.6所示的核苷酸序列添加、缺失、替换一个或多个(例如1-3个)碱基且能与目的基因互补结合的核苷酸序列;优选地,所述同源序列为与SEQ ID NO.6所示的核苷酸序列具有至少90%相似性的核苷酸序列。

[0079] 在本发明的一种实施方式中,所述探针B的5'端同源区的核苷酸序列为SEQ ID

NO.6所示的核苷酸:5'-GGAAGCCGTTGC-3'。

[0080] 在本发明的一种实施方式中,所述探针B的5'端同源区的核苷酸序列为SEQ ID NO.6所示的核苷酸序列的互补序列。

[0081] 在本发明的一种实施方式中,所述探针B的5'端同源区的核苷酸序列为SEQ ID NO.6所示的核苷酸序列的同源序列。

[0082] 在本发明的一种实施方式中,所述探针B的5'端同源区的核苷酸序列为SEQ ID NO.6所示的核苷酸序列添加、缺失、替换一个或多个(例如1-3个)碱基且能与目的基因互补结合的核苷酸序列。示例性的,由于环化区不与目的基因结合,在5'端同源区靠近环化区的一端添加1、2、3个(或更多个)与目的基因结合(或不结合)的碱基,或缺失1、2、3个碱基,或替换1、2、3个碱基都几乎不会影响5'端同源区与目的基因的结合。

[0083] 进一步,在本发明提供的技术方案的基础上,所述探针B的3'端同源区的核苷酸序列包含或由如下序列组成:

[0084] 1) SEQ ID NO.7所示的核苷酸序列;或,

[0085] 2) SEQ ID NO.7所示的核苷酸序列的互补序列或同源序列;

[0086] 3) SEQ ID NO.7所示的核苷酸序列添加、缺失、替换一个或多个(例如1-5个)碱基且能与目的基因互补结合核苷酸序列;优选地,所述同源序列为与SEQ ID NO.7所示的核苷酸序列具有至少90%相似性的核苷酸序列

[0087] 在本发明的一种实施方式中,所述探针B的3'端同源区的核苷酸序列为SEQ ID NO.7所示的核苷酸:5'-ACCCTGCTCTGCCTTTCAGAT-3'。

[0088] 在本发明的一种实施方式中,所述3'端同源区的核苷酸序列为SEQ ID NO.7所示的核苷酸序列的互补序列。

[0089] 在本发明的一种实施方式中,所述3'端同源区的核苷酸序列为SEQ ID NO.7所示的核苷酸序列的同源序列。

[0090] 在本发明的一种实施方式中,所述3'端同源区的核苷酸序列为SEQ ID NO.7所示的核苷酸序列添加、缺失、替换一个或多个(例如1-5个)的核苷酸序列碱基且能与目的基因互补结合的核苷酸序列。示例性的,由于环化区不与目的基因结合,所以在3'端同源区靠近环化区的一端添加1、2、3、4、5个(或更多个)与目的基因结合(或不结合)的碱基,或缺失1、2、3、4、5个碱基,或替换1、2、3、4、5个碱基都几乎不会影响3'端同源区与目的基因的结合。

[0091] 进一步,所述探针B的核苷酸序列包含或由如下序列组成:

[0092] 1) SEQ ID NO.8所示的核苷酸序列;或,

[0093] 2) SEQ ID NO.8所示的核苷酸序列的互补序列或同源序列;

[0094] 3) SEQ ID NO.8所示的核苷酸序列添加、缺失、替换一个或多个(例如1-10个)碱基的核苷酸序列;

[0095] 优选地,所述同源序列为与SEQ ID NO.8所示的核苷酸序列具有至少70%相似性的核苷酸序列。

[0096] 在本发明的一种实施方式中,所述探针B的核苷酸序列为SEQ ID NO.8所示的核苷酸:5'-GGAAGCCGTTGCCTGCGAATAGCCATCCACTCCATTCTTCTGCGA ATAGCCATCCACTCCAT ACCCTGCTCTGCCTTTCAGAT-3'。其中,靠近5'端的下划直线部分的核苷酸序列为5'同源区,靠近3'端的下划波浪线部分的核苷酸序列为3'同源区,中间为环化区。

[0097] 由于环化区不与目的基因结合,其作用在于与荧光探针结合而使所述探针显色,所以环化区的序列是任意可变的,序列SEQ ID NO.8中显示的环化序列只是示例性的而非限制性的。

[0098] 在本发明的一种实施方式中,所述探针的核苷酸序列为SEQ ID NO.8所示的核苷酸序列的互补序列。

[0099] 在本发明的一种实施方式中,所述探针的核苷酸序列为SEQ ID NO.8所示的核苷酸序列的同源序列。

[0100] 在本发明的一种实施方式中,所述探针的核苷酸序列为SEQ ID NO.8所示的核苷酸序列添加、缺失、替换一个或多个(例如1-10个,优选1-5个,更优选1-3个)的核苷酸序列。

[0101] 进一步,结合所述探针B的荧光探针B'的核苷酸序列包含或由如下序列组成:

[0102] 1) SEQ ID NO.9所示的核苷酸序列;或,

[0103] 2) SEQ ID NO.9所示的核苷酸序列的互补序列或同源序列;

[0104] 3) SEQ ID NO.9所示的核苷酸序列添加、缺失、替换一个或多个(例如1-10个)碱基且能够与所述的探针B互补结合的核苷酸序列。

[0105] 在本发明的一种实施方式中,所述荧光探针B'的核苷酸序列为SEQ ID NO.9所示的核苷酸:5'-ccctcgcacatcaataccgatcat-3'。

[0106] 在本发明的一种实施方式中,所述荧光探针B'的核苷酸序列为SEQ ID NO.9所示的核苷酸序列的互补序列。

[0107] 在本发明的一种实施方式中,所述荧光探针B'的核苷酸序列为SEQ ID NO.9所示的核苷酸序列的同源序列。

[0108] 在本发明的一种实施方式中,所述荧光探针B'的核苷酸序列为SEQ ID NO.9所示的核苷酸序列添加、缺失、替换一个或多个(例如1-10个)的核苷酸序列且能够与所述的探针B互补结合的核苷酸序列。示例性的,添加1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个或更多个碱基,或缺失1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个碱基,或替换1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个碱基,只要能够与所述的探针互补结合即可。

[0109] 所述1)或2)或3)的荧光探针B'的核苷酸序列连接有荧光标记。荧光标记包括但不限于Cy3、Cy5、6-FAM、6-TET、5-FITC、6-TRITC、5-TAMRA、6-TAMRA、AMC。

[0110] 对比荧光探针B' SEQ ID NO.9所示的核苷酸序列,以及检测人RET基因12号外显子的探针B SEQ ID NO.8所示的核苷酸序列,可以发现后者所述探针是也是由两个重复的序列串联而成,且重复序列与荧光探针的序列相同,重复序列之间存在补充序列。

[0111] 本发明第二方面提供了原位检测人CCDC6-RET融合基因的试剂和/或试剂盒,包含所述的探针A和探针B。

[0112] 进一步,所述试剂盒还包括:细胞通透处理体系、平末端处理体系、目的核苷酸暴露处理体系、探针锁定处理体系、信号放大处理体系、信号检测处理体系中的一种或多种,任选地清洗处理体系。

[0113] 细胞通透处理体系

[0114] 所述通透处理体系包含:蛋白酶K(浓度为5mg/mL ~ 30mg/mL)、Tris-HCl缓冲液、EDTA、SDS。其作用是通透细胞膜和核膜,从而使反应试剂充分进入细胞核进行反应。

[0115] 平末端处理体系

[0116] 所述平末端处理体系包含:切割CCDC6基因1号外显子的FspI酶核酸内切酶(可以替换为Cac8I酶或CdiI酶);切割RET基因12号外显子的RsaI核酸内切酶(可以替换为Hpy18I酶、MslI酶或AleI酶)、CutSmart buffer、无核酸酶超纯水。其作用是在探针序列结合的基因组DNA靶点附近将基因组回文序列DNA切割,使其暴露平末端。

[0117] 目的核苷酸暴露处理体系

[0118] 目的核苷酸暴露处理体系包含:Lambda Exonuclease、Exonuclease buffer、无核酸酶超纯水。其作用是从平末端开始沿着5'-3'方向降解单链DNA,使探针结合的靶基因组单链DNA被暴露出来。

[0119] 探针锁定处理体系

[0120] 探针锁定处理体系包含所述的探针A和探针B、DNA连接酶、DNA Ligase buffer、ATP和无核酸酶超纯水。其作用是使探针A和探针B与各自目标单链DNA结合,并在连接酶的作用下在结合位点环化形成闭合环状单链DNA。

[0121] 信号放大处理体系

[0122] 信号放大处理体系包含:DNA聚合酶、DNA polymerase buffer、dNTPs、DTT和无核酸酶超纯水。其作用是在DNA聚合酶的作用下,闭合环状单链DNA线性自我复制,产生大量含重复序列的单链环状探针DNA。

[0123] 信号检测处理体系

[0124] 信号检测处理体系包含:荧光探针A'和B'、甲酰胺、氯化钠、柠檬酸钠、鲑鱼精子DNA和无核酸酶超纯水。其作用是荧光探针A'和B'分别结合在含重复序列的单链环状探针A和B上,可以显示出探针A和B在细胞核内的定位。

[0125] 清洗处理体系

[0126] 清洗处理体系具体包括:Tris-HCl、NaCl、Tween20和无核酸酶超纯水。其作用是作为清洗液,清洗掉各步骤反应后的反应液。

[0127] 本发明第三方面提供了一种原位检测人CCDC6-RET融合基因的方法,采用所述的探针A和探针B,或所述的试剂和/或试剂盒对CCDC6-RET融合基因进行细胞内定位。

[0128] 进一步,所述原位检测人CCDC6-RET融合基因的方法,包括以下步骤:

[0129] (a) 固定待测细胞样本后使用通透处理体系处理,任选地清洗;

[0130] (b) 将步骤(a)处理后的样本采用平末端处理体系处理,暴露平末端,任选地清洗;

[0131] (c) 将步骤(b)处理后的样本采用目的核酸暴露处理体系处理,从平末端开始沿着5'-3'方向降解单链DNA,保留另一条单链DNA,任选地清洗;

[0132] (d) 将步骤(c)处理后的样本采用探针锁定处理体系处理,探针结合目标单链DNA和环化同时进行,任选地清洗和干燥;

[0133] (e) 将步骤(d)处理后的样本采用信号放大处理体系处理,环化探针自我复制,产生大量含重复序列的单链环状探针DNA,任选地清洗;

[0134] (f) 将步骤(e)处理后的样本采用信号检测处理体系,荧光探针结合在含重复序列的单链环状探针上,任选地清洗和干燥;

[0135] (g) 封片和荧光显色观察。

[0136] 参照图1展示的工作示意图,所述原位检测CCDC6-RET融合基因的方法的工作原理是:首先利用蛋白酶K将细胞核膜打孔,然后通过II类限制性内切酶在探针序列结合的基因

组DNA靶点附近将基因组DNA切割,暴露出平末端。接着在核酸外切酶的作用下,从平末端开始降解双链DNA中的5`-3`端的一条链,探针结合的靶基因组单链DNA被暴露出来。最后,探针A和探针B在连接酶的作用下在结合位点分别环化形成闭合环状单链DNA;在DNA聚合酶的作用下,闭合环状单链DNA进行线性自我复制,产生的序列中有大量人类基因上没有的DNA重复序列,特异性荧光探针通过跟这些重复序列结合来显示探针在细胞核内的定位,从而检测出CCDC6-RET融合基因在细胞核内的定位。

[0137] 本发明第四方面提供了所述探针,或所述试剂和/或试剂盒,或所述方法在细胞核内定位CCDC6基因和RET基因融合鉴定中的应用。

[0138] 本发明采用上述技术方案具有以下有益效果:

[0139] 1、本发明提供的检测人CCDC6-RET融合基因的探针,结合原位检测方法,通过特异性的探针A和探针B组合使用放大目标信号,可直接通过判断两种探针的荧光位点是否靠近来肉眼观察细胞或者临床组织样本中CCDC6-RET融合基因在细胞核内的定位和拷贝数。

[0140] 2、本发明提供原位检测CCDC6-RET融合基因的探针外显子的探针或试剂盒,可以用于所有实体肿瘤中人CCDC6-RET融合基因的细胞核内定位突变的检测,可以用少量的细胞或者临床组织样本进行检测,具有广泛适用性的优点。

[0141] 3、本发明原位检测人CCDC6-RET融合基因的探针的方法,无需核酸提取,不需要机器进行数字信号的转化,成本低,灵敏度高,特异性好,操作更加简单。

附图说明

[0142] 图1所示为本发明检测人CCDC6-RET融合基因细胞核内定位方法的工作原理。

[0143] 图2所示为本发明实施例4在体外TPC-1细胞系中检测CCDC6-RET融合基因的结果图。

[0144] 图3所示为本发明实施例5在体外TPC-1细胞系中检测CCDC6-RET融合基因的结果图。

[0145] 图4所示为本发明实施例6在体外TPC-1细胞系中检测CCDC6-RET融合基因的结果图。

[0146] 图5所示为本发明实施例7在TPC-1细胞成瘤石蜡组织切片中检测CCDC6-RET融合基因的结果图。

[0147] 图6所示为本发明实施例8在TPC-1细胞成瘤石蜡组织切片中检测CCDC6-RET融合基因的结果图。

[0148] 图7所示为本发明实施例9在TPC-1细胞成瘤石蜡组织切片中检测CCDC6-RET融合基因的结果图。

具体实施方式

[0149] 除非另有定义,本发明中所使用的所有科学和技术术语具有与本发明涉及技术领域的技术人员通常理解的相同的含义。

[0150] 下面将结合本发明实施例中的附图,对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述,显然,所描述的实施例仅是本发明一部分实施例,而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其他实

施例,都属于本发明保护的范围。

[0151] 下述实施例中所用的材料、试剂等,如无特殊说明,均可从商业途径得到。

[0152] 下面结合具体实施例详细描述本发明,这些实施例用于理解而不是限制本发明。

[0153] 1×CutSmart buffer的配方:50mM/L乙酸钾、20mM/L Tri-acetate、10mM/L乙酸镁、0.1mg/mL BSA。

[0154] 1×Exonuclease buffer的配方:50mM/L乙酸钾、20mM/L Tri-acetate、10mM/L乙酸镁、0.1mg/mL BSA。

[0155] 1×DNA Ligase buffer配方:40mM/L Tris-HCl、10mM/L氯化镁、10mM/L DTT、0.5mM/L ATP、0.05Weiss U/μL DNA。

[0156] 1×DNA polymerase buffer的配方:33mM/L Tris-乙酸、10mM/L乙酸镁、66mM/L乙酸钾、0.1% (v/v) Tween20。

[0157] 其中,实施例1-6中探针A如表1所示(包括编号为1-6的六种探针),探针B如表2所示(包括编号为7-12的六种探针)。

[0158] 表1探针A

编号	核苷酸序列	5' 同源区			3' 同源区		
		碱基数	GC 含量	Tm 值	碱基数	GC 含量	Tm 值
1	SEQ ID NO.3	13	69.2%	47.1°C	16	68.8%	60.3°C
2	SEQ ID NO.11	15	66.7%	54.9°C	15	66.7%	58°C
3	SEQ ID NO.12	15	60%	51.9°C	16	68.8%	60.3°C
4	SEQ ID NO.13	15	60%	54.2°C	17	70.6%	64.3°C
5	SEQ ID NO.14	19	57.9%	62.3°C	11	81.8%	49.4°C
6	SEQ ID NO.15	14	57.1%	50°C	17	70.6%	63.4°C

[0160] 表2探针B

编号	核苷酸序列	5' 同源区			3' 同源区		
		碱基数	GC 含量	Tm 值	碱基数	GC 含量	Tm 值
7	SEQ ID NO.8	13	69.23%	53.1°C	22	50%	63.6°C
8	SEQ ID NO.16	15	60%	55.9°C	15	60%	53.2°C
9	SEQ ID NO.17	12	66.7%	46.7°C	18	55.56%	60.7°C
10	SEQ ID NO.18	14	57.14%	51.2°C	18	55.56%	60.7°C
11	SEQ ID NO.19	18	50%	60.4°C	14	64.29%	48.8°C
12	SEQ ID NO.20	12	58.33%	46.9°C	21	52.38%	63.6°C

[0162] 实施例1

[0163] 一种原位检测人CCDC6-RET融合基因的试剂盒,包括以下组分:

[0164] (1) 细胞通透处理体系:20μg/mL蛋白酶K、Tris-HCl缓冲液、EDTA、SDS;

[0165] (2) 平末端处理体系:0.5U/μL RsaI核酸内切酶、1×CutSmart buffer、无核酸酶超纯水;

[0166] (3) 目的核苷酸暴露处理体系:0.4U/μL Lambda Exonuclease、1×Exonuclease buffer、无核酸酶超纯水;

[0167] (4) 探针锁定处理体系:终浓度100μM/L特异性探针(探针A和探针B的组合)、0.05Weiss U/μL DNA连接酶、1×DNA Ligase buffer、0.5mM/L ATP和无核酸酶超纯水;

[0168] (5) 信号放大处理体系:终浓度1U/μL DNA聚合酶、1×DNA polymerase buffer、

2.5mM/L dNTPs、1mM/L DTT和无核酸酶超纯水；

[0169] (6) 信号检测处理体系：荧光探针（探针A' 和探针B'）、20% (v/v) 甲酰胺、0.3M/L氯化钠、0.03M/L柠檬酸钠、0.5 μ g/ μ L鲑鱼精子DNA和无核酸酶超纯水。

[0170] (7) 洗液处理体系：0.1M/L Tris-HCl、0.15M/L NaCl、0.05% (v/v) Tween20和无核酸酶超纯水。

[0171] 实施例2

[0172] 采用实施例1的试剂盒对人CCDC6-RET融合基因细胞核内定位的方法，包括以下步骤：

[0173] (1) 待检测细胞样本固定好后，使用通透处理体系处理细胞。体外细胞固定好后在37 $^{\circ}$ C环境下处理3-4分钟；完成后弃掉液体，放入超纯水中，最后依次用70%、85%、100%乙醇水溶液脱水晾干。

[0174] (2) 将步骤(1)处理后的样本采用平末端处理体系处理，37 $^{\circ}$ C处理1小时，暴露基因组DNA平末端；完成后弃掉液体，用清洗处理体系清洗，再弃掉清洗液。

[0175] (3) 将步骤(2)处理后的样本采用目的核酸暴露处理体系处理，37 $^{\circ}$ C处理0.5小时，从平末端开始沿着5'-3'方向降解单链DNA，保留另一条单链DNA；完成后弃掉液体，用清洗处理体系清洗，再弃掉清洗液。

[0176] (4) 将步骤(3)处理后的样本采用探针锁定处理体系处理，37 $^{\circ}$ C处理0.5小时，探针结合目标单链DNA和环化同时进行；完成后弃掉液体，用清洗处理体系清洗，再弃掉清洗液，最后依次用70%、85%、100%乙醇水溶液脱水晾干。

[0177] (5) 将步骤(4)处理后的样本采用信号放大处理体系处理，44 $^{\circ}$ C处理1小时，环状探针DNA以单链基因组DNA结合位置为起点，在聚合酶的作用下进行自我复制，产生含大量重复序列的单链DNA。完成后弃掉液体，用清洗处理体系清洗，再弃掉清洗液。

[0178] (6) 将步骤(5)处理后的样本采用信号检测处理体系，37 $^{\circ}$ C处理10分钟，荧光探针结合在含重复序列的单链DNA上。完成后弃掉液体，用清洗处理体系清洗，再弃掉清洗液，最后依次用70%、85%、100%乙醇水溶液脱水晾干。

[0179] (7) 将步骤(6)处理后的样本中加入含DAPI的封片剂，封片。

[0180] (8) 最终在荧光显微镜下观察记录结果。

[0181] 实施例3

[0182] 采用实施例1的试剂盒对人CCDC6-RET融合基因细胞核内定位的方法，包括以下步骤：

[0183] (1) 待石蜡组织切片预处理好后，使用通透处理体系处理细胞。组织样本在37 $^{\circ}$ C环境下处理15-20分钟；完成后弃掉液体，放入超纯水中，最后依次用70%、85%、100%乙醇水溶液脱水晾干。

[0184] (2) 将步骤(1)处理后的样本采用平末端处理体系处理，37 $^{\circ}$ C处理1小时，暴露基因组DNA平末端；完成后弃掉液体，用清洗处理体系清洗，再弃掉清洗液。

[0185] (3) 将步骤(2)处理后的样本采用目的核酸暴露处理体系处理，37 $^{\circ}$ C处理0.5小时，从平末端开始沿着5'-3'方向降解单链DNA，保留另一条单链DNA；完成后弃掉液体，用清洗处理体系清洗，再弃掉清洗液。

[0186] (4) 将步骤(3)处理后的样本采用探针锁定处理体系处理，37 $^{\circ}$ C处理0.5小时，探针

结合目标单链DNA和环化同时进行;完成后弃掉液体,用清洗处理体系清洗,再弃掉清洗液,最后依次用70%、85%、100%乙醇水溶液脱水晾干。

[0187] (5) 将步骤(4)处理后的样本采用信号放大处理体系处理,44℃处理1小时,环状探针DNA以单链基因组DNA结合位置为起点,在聚合酶的作用下进行自我复制,产生含大量重复序列的单链DNA。完成后弃掉液体,用清洗处理体系清洗,再弃掉清洗液。

[0188] (6) 将步骤(5)处理后的样本采用信号检测处理体系,37℃处理10分钟,荧光探针结合在含重复序列的单链DNA上。完成后弃掉液体,用清洗处理体系清洗,再弃掉清洗液,最后依次用70%、85%、100%乙醇水溶液脱水晾干。

[0189] (7) 将步骤(6)处理后的样本中加入含DAPI的封片剂,封片。

[0190] (8) 最终在荧光显微镜下观察记录结果。

[0191] 实施例4-6

[0192] 采用实施例1的试剂盒(实施例4-6的组合探针分别为编号2的A探针和编号8的B探针;编号6的A探针和编号7的B探针;编号4的A探针和编号10的B探针)和参照实施例2的方法对TPC-1细胞中的CCDC6-RET融合基因进行细胞核定位实验。

[0193] 实验结果图如图2-4所示。该结果在40倍物镜镜头下拍摄,蓝色(黑白图中显示为灰色)代表细胞核,绿色(黑白图中显示略小一点的白点)信号代表CCDC6在细胞核内的定位,红色(黑白图中显示略大一点的白点)信号代表RET在细胞核内的定位。视野内多个细胞内出现红色绿色信号空间位置相互接近的现象(如图2-4中白色箭头所指的几个位置),代表这些细胞内CCDC6-RET基因发生了融合。

[0194] 实施例7-9

[0195] 采用实施例1的试剂盒(结合探针分别为编号编号2的A探针和编号8的B探针;编号6的A探针和编号7的B探针;编号4的A探针和编号10的B探针)和参照实施例3的方法对TPC-1细胞成瘤石蜡组织切片中的CCDC6-RET融合基因进行细胞核定位实验。

[0196] 实验结果图如图5-7所示。该结果在100倍物镜镜头下拍摄,蓝色(黑白图中显示为灰色)代表细胞核,绿色信号代表CCDC6在细胞核内的定位,红色信号代表RET在细胞核内的定位。视野内多个细胞内出现红色绿色信号空间位置相互接近的现象(如图5-7中白色箭头所指的几个位置),代表这些细胞内CCDC6-RET基因发生了融合。

[0197] 以上所述仅为本发明的较佳实施例而已,并不用以限制本发明,凡在本发明的精神和原则之内,所作的任何修改、等同替换等,均应包含在本发明的保护范围之内。

- [0001] 序列表
- [0002] <110> 派德洛格(天津)生物科技有限公司
- [0003] <120> 检测人CCDC6-RET融合基因的探针、试剂、试剂盒、检测方法及应用
- [0004] <160> 22
- [0005] <170> PatentIn version 3.5
- [0006] <210> 1
- [0007] <211> 13
- [0008] <212> DNA
- [0009] <213> Artificial Sequence
- [0010] <220>
- [0011] <223> 检测CCDC6基因探针的5'端同源区
- [0012] <400> 1
- [0013] ctctctgcagt gcc 13
- [0014] <210> 2
- [0015] <211> 16
- [0016] <212> DNA
- [0017] <213> Artificial Sequence
- [0018] <220>
- [0019] <223> 检测CCDC6基因探针的3'端同源区
- [0020] <400> 2
- [0021] gcaggtcgcg gttctc 16
- [0022] <210> 3
- [0023] <211> 79
- [0024] <212> DNA
- [0025] <213> Artificial Sequence
- [0026] <220>
- [0027] <223> 检测CCDC6基因的探针
- [0028] <400> 3
- [0029] ctctctgcagt gccccctcgc atcaataaccg atcattcttc ccctcgcac aataccgatc 60
- [0030] atcgcaggtc gcggttctc 79
- [0031] <210> 4
- [0032] <211> 22
- [0033] <212> DNA
- [0034] <213> Artificial Sequence
- [0035] <220>
- [0036] <223> 结合检测CCDC6基因探针的荧光探针
- [0037] <400> 4
- [0038] ccctcgcac aataccgatc at 22

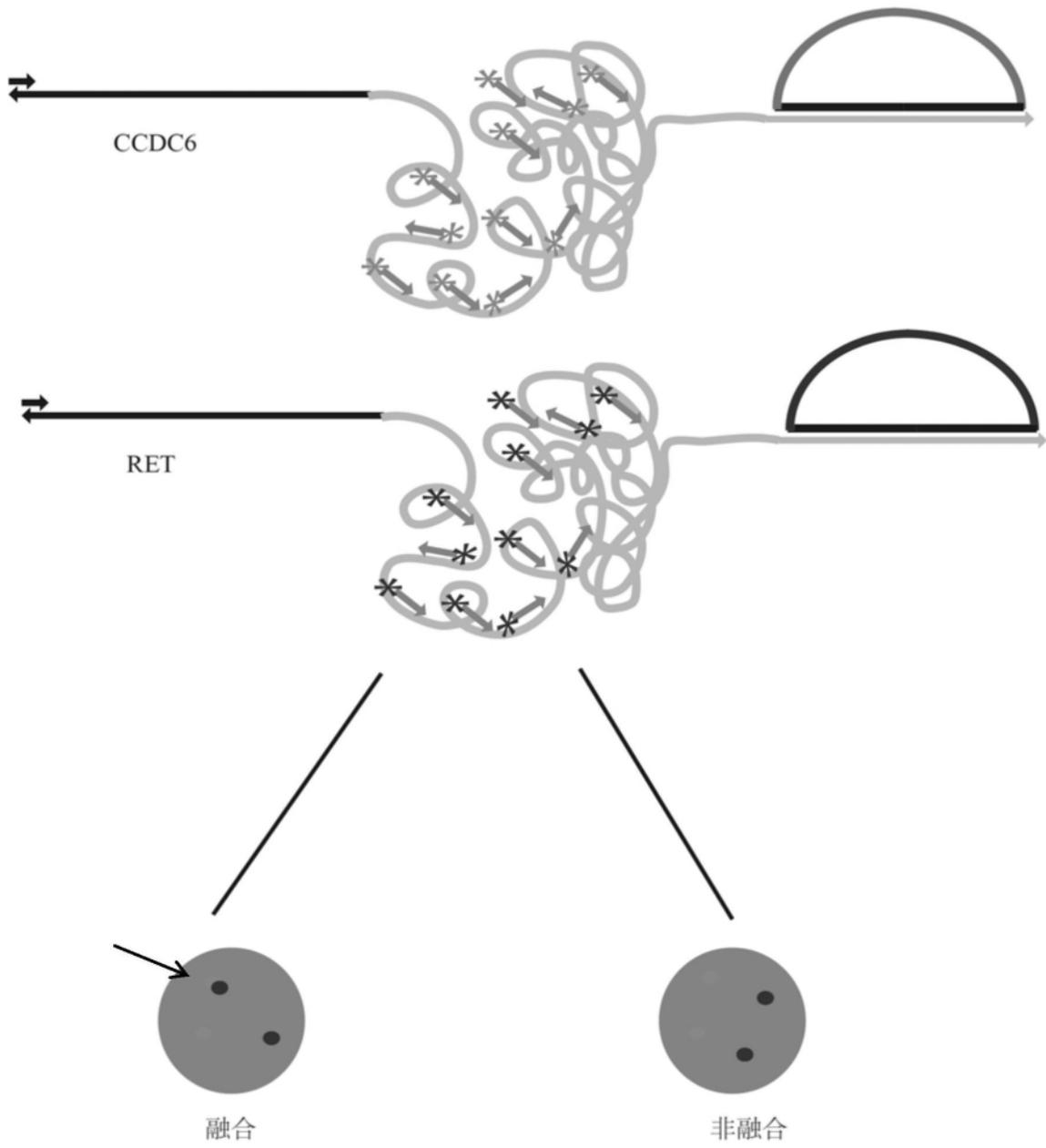
- [0039] <210> 5
[0040] <211> 535
[0041] <212> DNA
[0042] <213> 人CCDC6基因1号外显子
[0043] <400> 5
[0044] agtgaatac tgccaagcc cgggcggggt ctctgttctc tggcagagga ggtcccttgg 60
[0045] cagcgggaag cgccctctct ttctctcgcc gccgctccga gtctgcgccc tggtgccagg 120
[0046] cgctcagctc ggcgctcccc tgtgctcgcc cggcgccccac tcattcgtag cccggccttc 180
[0047] gtcgcccgcg cctccctgct gctcctcctc ctttccccag cccgccgcgg ccatggcgga 240
[0048] cagcgccagc gagagcgaca cggacggggc ggggggcaac agcagcagct cggccgcat 300
[0049] gcagtcgtcc tgctcgtcga cctcgggcgg cggcggtggc ggcgggggag gcggcgcgcg 360
[0050] tgggaagtgc gggggcattg tcatctcgcc gttccgctg gaggagctca ccaaccgcct 420
[0051] ggctctgctg cagcaagaga acaaggtgct gaagatagag ctggagacct acaaactgaa 480
[0052] gtgcaaggca ctgcaggagg agaaccgcga cctgcgcaaa gccagcgtga ccatc 535
[0053] <210> 6
[0054] <211> 13
[0055] <212> DNA
[0056] <213> Artificial Sequence
[0057] <220>
[0058] <223> 检测人RET基因12号外显子探针的5'端同源区
[0059] <400> 6
[0060] ggaaggccgt tgc 13
[0061] <210> 7
[0062] <211> 21
[0063] <212> DNA
[0064] <213> Artificial Sequence
[0065] <220>
[0066] <223> 检测人RET基因12号外显子探针的3'端同源区
[0067] <400> 7
[0068] accctgctct gcctttcaga t 21
[0069] <210> 8
[0070] <211> 84
[0071] <212> DNA
[0072] <213> Artificial Sequence
[0073] <220>
[0074] <223> 检测人RET基因12号外显子探针
[0075] <400> 8
[0076] ggaaggccgt tgctgcgaa tagccatcca ctccattctt ctgcgaatag ccatccactc 60
[0077] cataccctgc tctgcctttc agat 84

- [0078] <210> 9
- [0079] <211> 22
- [0080] <212> DNA
- [0081] <213> Artificial Sequence
- [0082] <220>
- [0083] <223> 结合检测人RET基因12号外显子探针的荧光探针
- [0084] <400> 9
- [0085] ccctcgcatc aataccgatc at 22
- [0086] <210> 10
- [0087] <211> 148
- [0088] <212> DNA
- [0089] <213> 人类RET基因的12号外显子
- [0090] <400> 10
- [0091] gaggatccaa agtgggaatt ccctcggaag aacttggttc ttggaaaaac tctaggagaa 60
- [0092] ggccaatttg gaaaagtggc caaggcaacg gccttccatc tgaaggcag agcagggtac 120
- [0093] accacggtgg ccgtgaagat gctgaaag 148
- [0094] <210> 11
- [0095] <211> 80
- [0096] <212> DNA
- [0097] <213> Artificial Sequence
- [0098] <220>
- [0099] <223> 检测人CCDC6基因的探针
- [0100] <400> 11
- [0101] cctcctgcag tgcctccctc gcatcaatac cgatcattct tcccctcgca tcaataccga 60
- [0102] tcatcgcagg tcgcggttct 80
- [0103] <210> 12
- [0104] <211> 81
- [0105] <212> DNA
- [0106] <213> Artificial Sequence
- [0107] <220>
- [0108] <223> 检测人CCDC6基因的探针
- [0109] <400> 12
- [0110] ctctcgcagt gccttccctc gcatcaatac cgatcattct tcccctcgca tcaataccga 60
- [0111] tcatcgcagg tcgcggttct c 81
- [0112] <210> 13
- [0113] <211> 82
- [0114] <212> DNA
- [0115] <213> Artificial Sequence
- [0116] <220>

- [0117] <223> 检测人CCDC6基因的探针
[0118] <400> 13
[0119] tcctgcagtg ccttgccctc gcatcaatac cgatcattct tcccctcgca tcaataccga 60
[0120] tcatcgcagg tcgcggttct cc 82
[0121] <210> 14
[0122] <211> 80
[0123] <212> DNA
[0124] <213> Artificial Sequence
[0125] <220>
[0126] <223> 检测人CCDC6基因的探针
[0127] <400> 14
[0128] ttctcctcct gcagtgccctc cctcgcataca ataccgatca ttcttcccct cgcatcaata 60
[0129] ccgatcatcg caggtecgcg 80
[0130] <210> 15
[0131] <211> 81
[0132] <212> DNA
[0133] <213> Artificial Sequence
[0134] <220>
[0135] <223> 检测人CCDC6基因的探针
[0136] <400> 15
[0137] tcctgcagtg ccttcctcctg catcaatacc gatcattctt cccctcgcac caataccgat 60
[0138] catcgcaggt cgcggttctc c 81
[0139] <210> 16
[0140] <211> 80
[0141] <212> DNA
[0142] <213> Artificial Sequence
[0143] <220>
[0144] <223> 检测人RET基因12号外显子探针
[0145] <400> 16
[0146] tcagatggaa ggccgctgcg aatagccatc cactccattc ttctgccaat agccatccac 60
[0147] tccataccct gctctgcctt 80
[0148] <210> 17
[0149] <211> 80
[0150] <212> DNA
[0151] <213> Artificial Sequence
[0152] <220>
[0153] <223> 检测人RET基因12号外显子探针
[0154] <400> 17
[0155] gatggaaggc cgctgccaat agccatccac tccattcttc tgccaatagc catccactcc 60

- [0156] ataccctgct ctgcctttca 80
[0157] <210> 18
[0158] <211> 82
[0159] <212> DNA
[0160] <213> Artificial Sequence
[0161] <220>
[0162] <223> 检测人RET基因12号外显子探针
[0163] <400> 18
[0164] gatggaaggc cgttctgcga atagccatcc actccattct tctgcgaata gccatccact 60
[0165] ccataccctg ctctgccttt ca 82
[0166] <210> 19
[0167] <211> 81
[0168] <212> DNA
[0169] <213> Artificial Sequence
[0170] <220>
[0171] <223> 检测人RET基因12号外显子探针
[0172] <400> 19
[0173] tttcagatgg aaggccgtct gcgaatagcc atccactcca ttcttctgcg aatagccatc 60
[0174] cactccatac cctgctctgc c 81
[0175] <210> 20
[0176] <211> 82
[0177] <212> DNA
[0178] <213> Artificial Sequence
[0179] <220>
[0180] <223> 检测人RET基因12号外显子探针
[0181] <400> 20
[0182] tggaaggccg ttctgcgaat agccatccac tccattcttc tgccaatagc catccactcc 60
[0183] ataccctgct ctgcctttca ga 82
[0184] <210> 21
[0185] <211> 10
[0186] <212> DNA
[0187] <213> Unknown
[0188] <220>
[0189] <223> MslI酶识别的回文序列
[0190] <220>
[0191] <221> misc_feature
[0192] <222> (4) .. (7)
[0193] <223> n is a, c, g, or t
[0194] <400> 21

-
- [0195] caynnnr₁₀tg 10
 - [0196] <210> 22
 - [0197] <211> 10
 - [0198] <212> DNA
 - [0199] <213> Unknown
 - [0200] <220>
 - [0201] <223> A1eI酶识别的回文序列
 - [0202] <220>
 - [0203] <221> misc_feature
 - [0204] <222> (4) .. (7)
 - [0205] <223> n is a, c, g, or t
 - [0206] <400> 22
 - [0207] cacnnnng₁₀tg 10



说明：➡ 表示基因的5'端； *➡ 荧光探针

图1

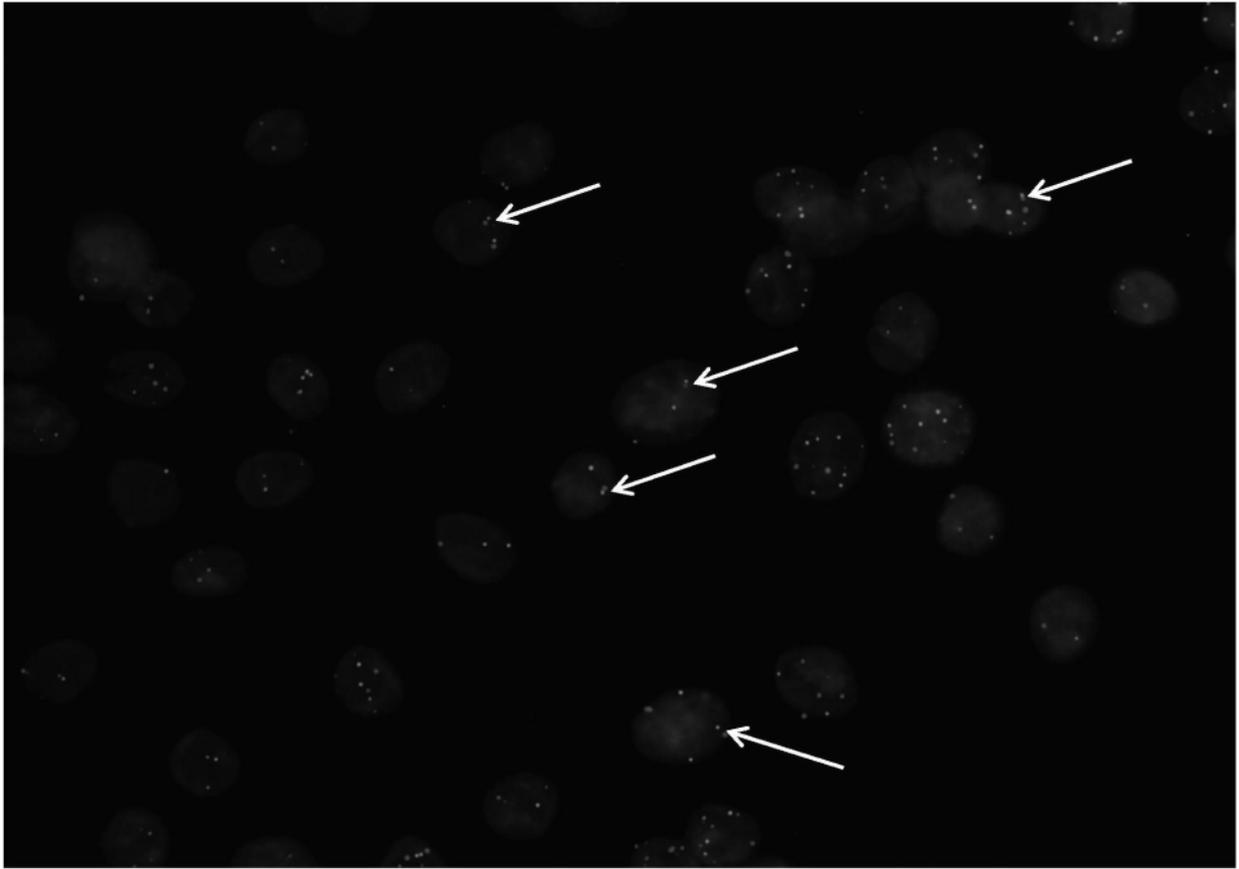


图2

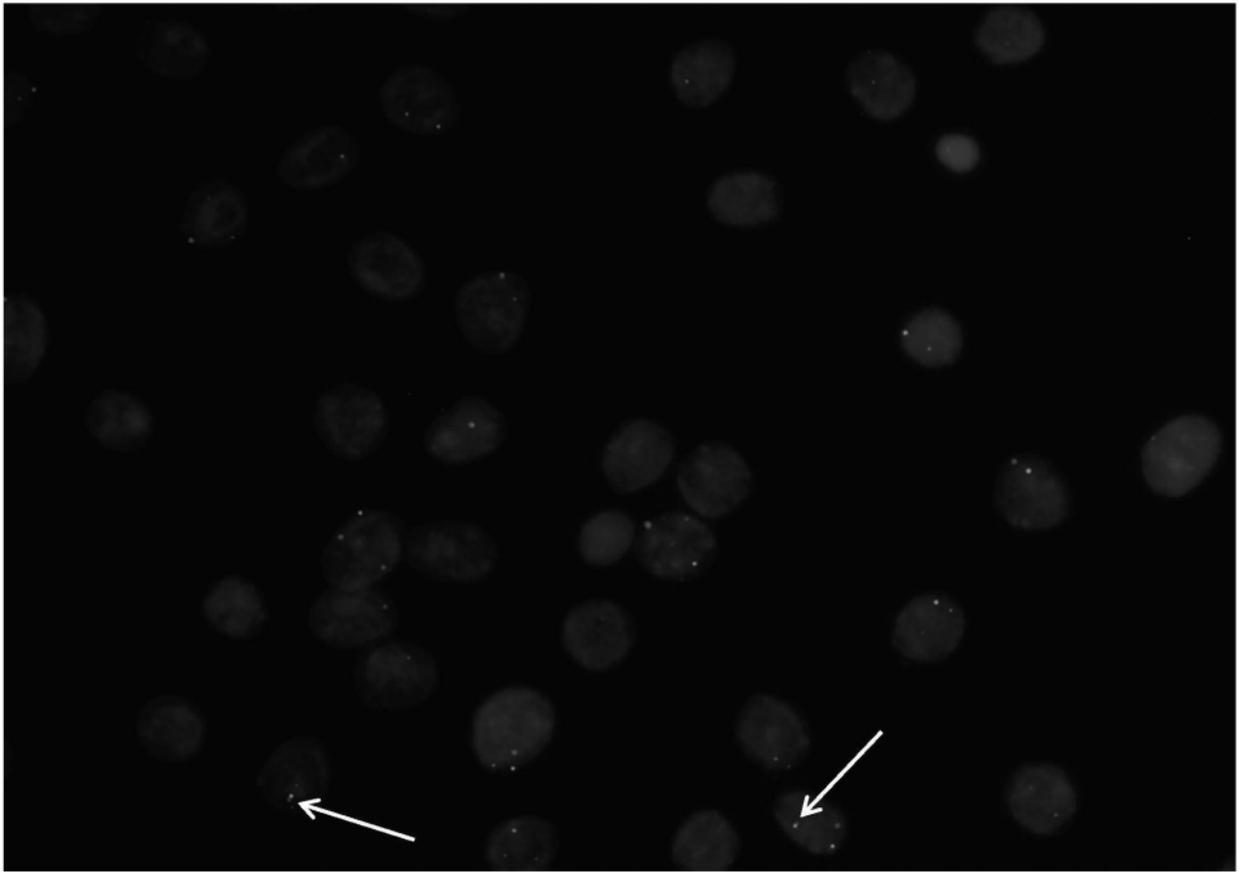


图3

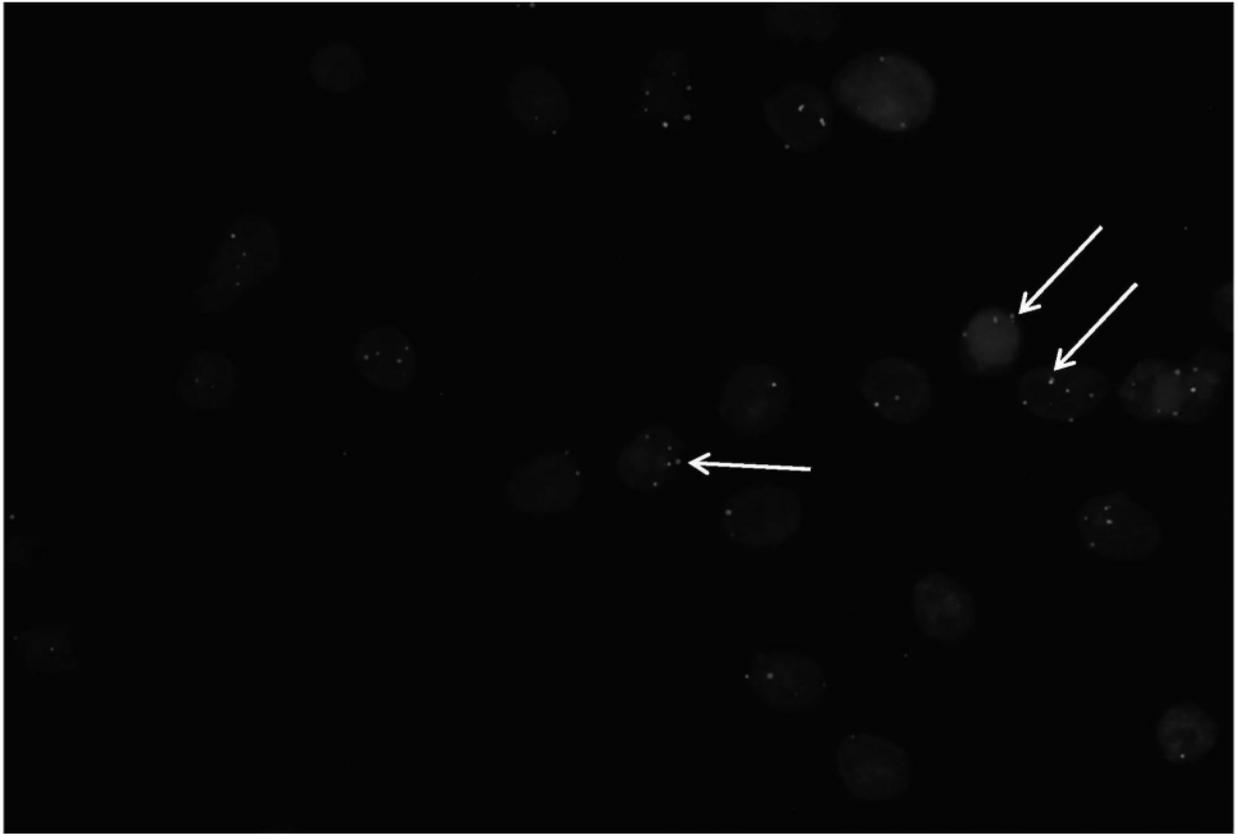


图4

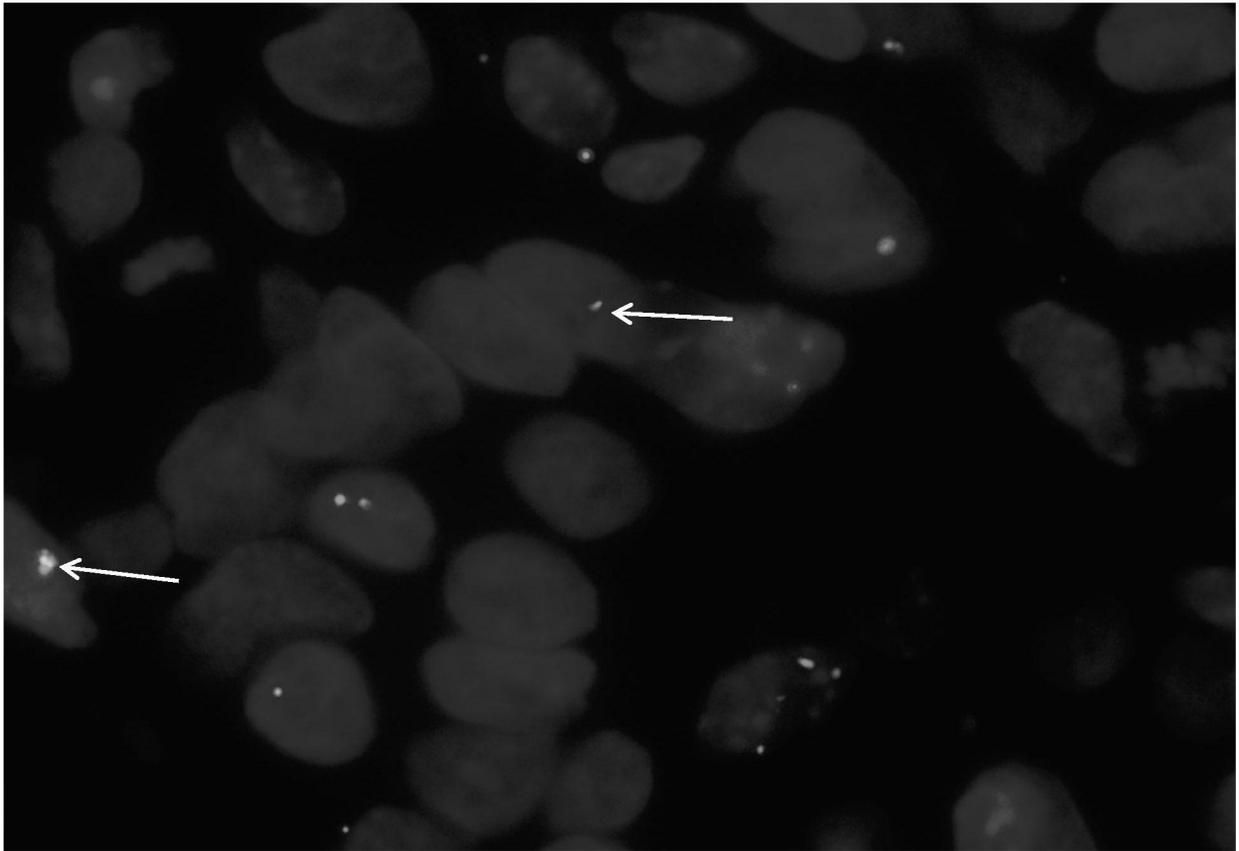


图5

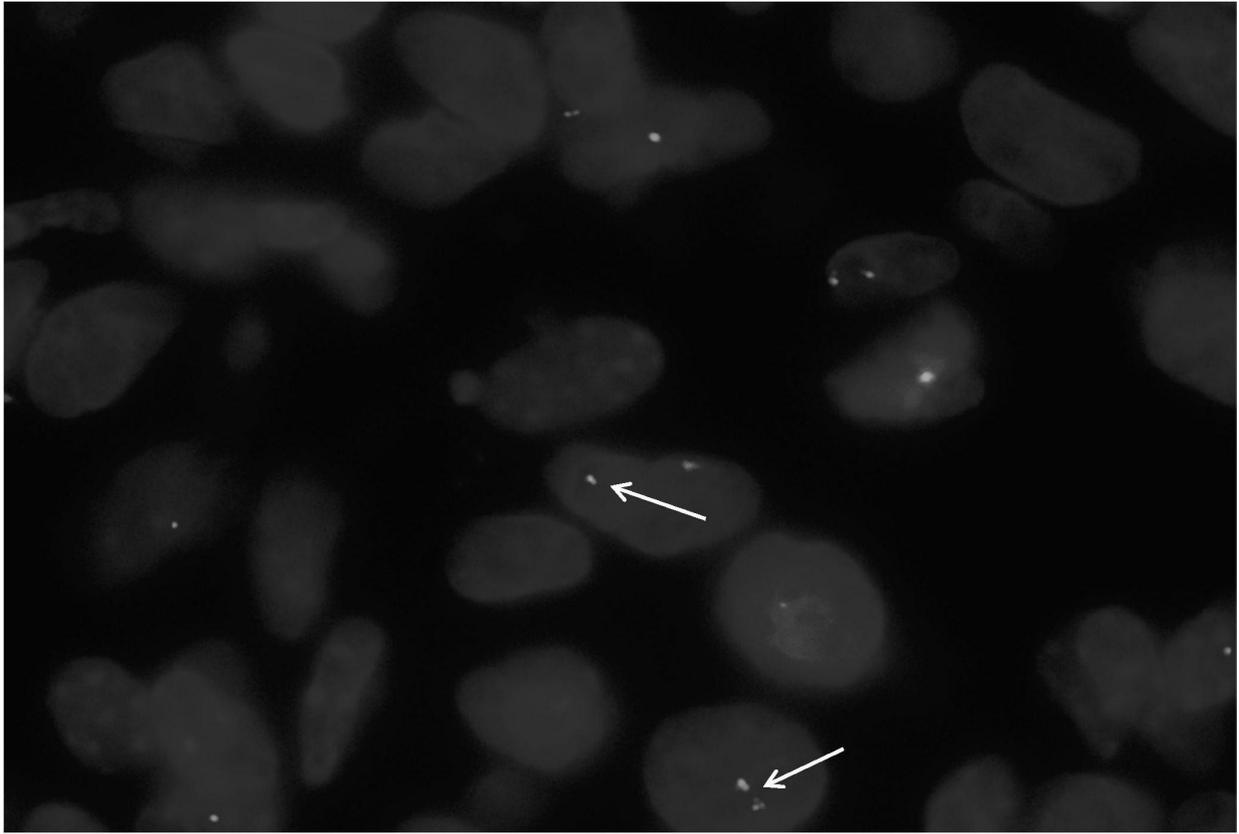


图6

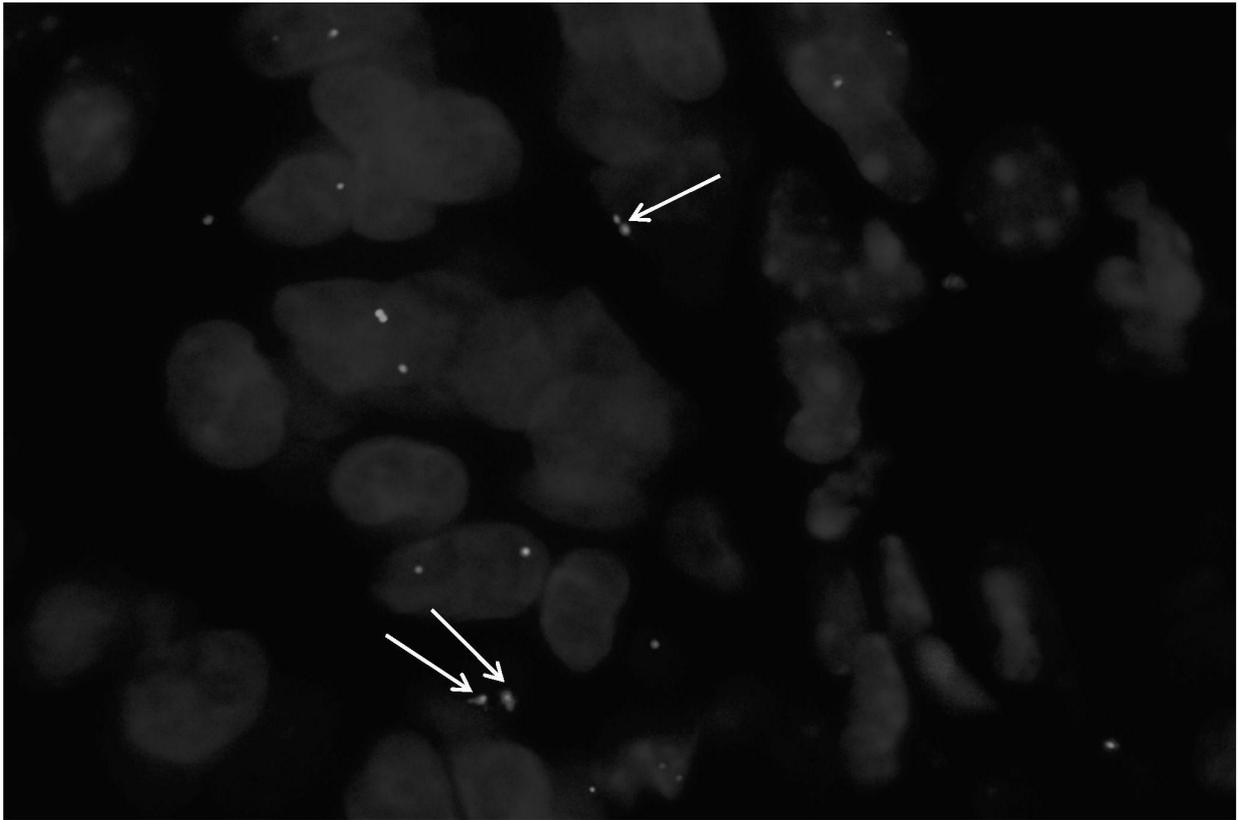


图7