



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 111850104 B

(45) 授权公告日 2023. 03. 14

(21) 申请号 202010828465.1
 (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 111850104 A
 (43) 申请公布日 2020.10.30
 (73) 专利权人 派德洛格(天津)生物科技有限公司
 地址 300041 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
 (74) 专利代理机构 天津市尚文知识产权代理有
 限公司 12222
 专利代理师 郭平平
 (51) Int. Cl.
 C12Q 1/686 (2018.01)

(56) 对比文件
 CN 109652505 A, 2019.04.19
 CN 109652506 A, 2019.04.19
 Tereza Halkova MSc等.A novel RET/PTC
 variant detected in a pediatric patient
 with papillary thyroid cancer without
 ionization history.《Human Pathology》
 .2015,第46卷

审查员 张艳青

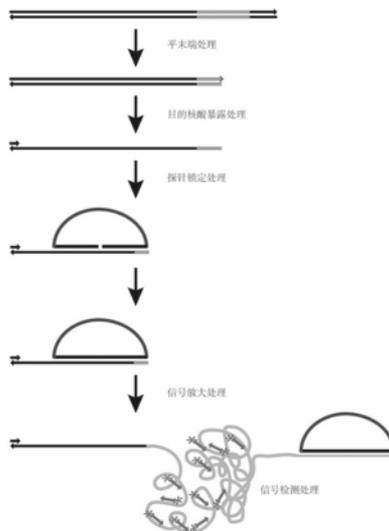
权利要求书1页 说明书8页
 序列表2页 附图12页

(54) 发明名称

一种检测人CCDC6基因1号外显子细胞核内定位的方法及其试剂盒

(57) 摘要

本发明提供了一种人CCDC6基因1号外显子细胞核内定位的方法及其试剂盒,包括通透处理体系、平末端处理体系、目的核酸暴露处理体系、探针锁定处理体系、信号放大处理体系、信号检测处理体系和洗液处理体系。本发明提供的方法无需核酸提取,可用于少量的细胞或样本的检测,通过特异性探针放大目标信号,可观察细胞或者临床组织样本中CCDC6基因1号外显子的定位和拷贝数,可广泛用于实体肿瘤中人CCDC6基因1号外显子细胞核内定位突变的检测。



说明: → 表示基因的5'端; — 表示限制性内切酶识别的位点; ◐ 表示荧光探针

1. 一种检测人CCDC6基因1号外显子细胞核内定位的试剂盒,包括通透处理体系、平末端处理体系、目的核酸暴露处理体系、探针锁定处理体系、信号放大处理体系、信号检测处理体系和洗液处理体系,其特征在于,所述探针锁定处理体系包括CCDC6 Exon1探针和DNA连接酶,CCDC6 Exon1探针序列包括荧光探针序列和基因组DNA结合序列,所述CCDC6 Exon1探针为如Seq ID N0:1、Seq ID N0:2、Seq ID N0:3、Seq ID N0:4、Seq ID N0:5、Seq ID N0:6或Seq ID N0:7任一项所述的核苷酸序列;所述平末端处理体系包括限制性内切酶,所述内切酶使在靠近CCDC6 Exon1基因3'端形成平末端,所述内切酶在CCDC6Exon1探针序列结合的基因组DNA靶点附近将基因组DNA切割。

2. 如权利要求1所述的检测人CCDC6基因1号外显子细胞核内定位的试剂盒,其特征在于,包括如下步骤:

- 1) 固定样本,通过通透处理体系通透细胞;
- 2) 使用平末端处理体系处理细胞基因组DNA,暴露平末端;
- 3) 使用目的核酸暴露处理体系,获得基因组单链DNA;
- 4) 使用探针锁定处理体系,将CCDC6 Exon1探针结合在上一步的单链DNA上同时形成环状DNA;
- 5) 使用信号放大处理体系,环状探针DNA自我复制,产生含重复序列的单链DNA;
- 6) 使用信号检测处理体系,荧光探针结合在含重复序列的单链DNA上;
- 7) 封片处理;
- 8) 观察记录结果。

3. 如权利要求2所述的检测人CCDC6基因1号外显子细胞核内定位的试剂盒,其特征在于,所述荧光探针为如Seq ID N0:8所述的核苷酸序列。

4. 如权利要求3所述的检测人CCDC6基因1号外显子细胞核内定位的试剂盒,其特征在于,所述目的核酸暴露处理体系包括核酸外切酶。

5. 如权利要求3所述的检测人CCDC6基因1号外显子细胞核内定位的试剂盒,其特征在于,所述核酸内切酶选自FspI酶、Cac8I酶或CdiI酶的至少一种。

一种检测人CCDC6基因1号外显子细胞核内定位的方法及其试剂盒

技术领域

[0001] 本发明属于分子生物学和肿瘤学领域,涉及核酸的检测,具体涉及人CCDC6基因1号外显子细胞核内定位的检测。

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,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。CCDC6基因是一种原癌基因,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。CCDC6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。在12%的甲状腺癌中能够检测到CCDC6重排后融合基因的表达,CCDC6基因的1号外显子和RET基因的12号外显子在同一条mRNA上。

[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。这些方法都无法在细胞核内对CCDC6基因的1号外显子进行定位。

发明内容

[0004] 本发明的目的在于提供一种人CCDC6基因1号外显子细胞核内定位的方法。本方法具有需求样本量少,无需提取RNA,成本低,灵敏度高,特异性好,操作简单便捷的特点。

[0005] 本发明提供了一种检测人CCDC6基因1号外显子细胞核内定位的方法,包括通透处理体系、平末端处理体系、目的核酸暴露处理体系、探针锁定处理体系、信号放大处理体系、信号检测处理体系和洗液处理体系,所述探针锁定处理体系包括CCDC6 Exon1探针和DNA连接酶。所述CCDC6 Exon1探针和DNA连接酶同时加入反应体系中,所述CCDC6 Exon1探针与基因组DNA结合的同时,发生CCDC6 Exon1探针的环化连接。

[0006] 优选的是,CCDC6 Exon1探针序列包括荧光探针序列和基因组DNA结合序列,所述基因组DNA结合序列分布于CCDC6 Exon1探针序列的5'端和3'端,CCDC6 Exon1探针5'端基因组DNA结合序列与CCDC6 Exon1探针3'端基因组DNA结合序列分别包括10-20个碱基,优选的是10bp,11bp,12bp,13bp,14bp,15bp,16bp,17bp,18bp,19bp,20bp;CCDC6 Exon1探针5'端基因组DNA结合序列与CCDC6 Exon1探针3'端基因组DNA结合序列在连接酶反应体系中退火温度的差值为3-15℃,优选的是3.1℃,10.1℃,14.3℃。且5'端T_m值大于等于48℃。

[0007] 上述任一项中优选的是,所述检测人CCDC6基因1号外显子细胞核内定位的方法包括如下步骤:

[0008] 1) 固定样本,通过通透处理体系通透细胞;

[0009] 2) 使用平末端处理体系处理细胞基因组DNA,暴露平末端;

[0010] 3) 使用目的核酸暴露处理体系,获得基因组单链DNA;

[0011] 4) 使用探针锁定处理体系,将CCDC6 Exon1探针结合在上一步的单链DNA上同时形成环状DNA(本发明称为环状探针DNA);

[0012] 5) 使用信号放大处理体系,所述环状探针DNA自我复制,产生含重复序列的单链DNA;

[0013] 6) 使用信号检测处理体系,荧光探针结合在所述含重复序列的单链DNA上;

[0014] 7) 封片处理;

[0015] 8) 观察记录结果。

[0016] 更为具体的优选步骤由以下步骤组成:

[0017] 步骤如下:

[0018] (1) 待检测样本固定好后,使用通透处理体系通透细胞,清洗。

[0019] (2) 使用平末端处理体系处理细胞基因组DNA,暴露平末端,清洗。

[0020] (3) 使用目的核酸暴露处理体系,从平末端开始沿着5`-3`方向降解单链DNA,保留另一条基因组单链DNA,清洗。

[0021] (4) 使用探针锁定处理体系,将CCDC6 Exon1探针结合在上一步的基因组单链DNA上并形成环状DNA(本发明称为环状探针DNA),清洗,梯度乙醇脱水,晾干。

[0022] (5) 使用信号放大处理体系,所述环状探针DNA以基因组单链DNA结合位置为起点,在聚合酶的作用下进行自我复制,产生70-100kb左右的含重复序列的单链DNA,清洗。

[0023] (6) 使用信号检测处理体系,荧光探针结合在所述含重复序列的单链DNA上,清洗。

[0024] (7) 加含有DAPI的封片剂封片处理。

[0025] (8) 最终在荧光显微镜下观察记录结果。

[0026] 上述任一项中优选的是,所述CCDC6 Exon1探针的基因组DNA结合序列为Seq ID N0:1所述的核苷酸序列的5`端15个碱基和3`端15个碱基,或者Seq ID N0:2所述的核苷酸序列的5`端13个碱基和3`端16个碱基,或者Seq ID N0:3所述的核苷酸序列的5`端15个碱基和3`端16个碱基,或者Seq ID N0:4所述的核苷酸序列的5`端15个碱基和3`端17个碱基,或者Seq ID N0:5所述的核苷酸序列的5`端19个碱基和3`端11个碱基,或者Seq ID N0:6所述的核苷酸序列的5`端14个碱基和3`端17个碱基。

[0027] 上述任一项中优选的是,所述CCDC6 Exon1探针的荧光探针序列数量至少为2个。进一步优选的是,CCDC6 Exon1探针上相邻两个荧光探针序列之间由DNA linker连接,进一步优选的DNA linker为TCTT四个碱基。其有益效果在于,在保证CCDC6 Exon1探针能够有效发生环化的前提下,既加强了荧光探针与所得重复序列的结合,提高了荧光信号的强度,又为荧光探针5`端携连接的荧光基团的留出足够的物理空间,确保荧光检测的效率。而CCDC6 Exon1探针中包括两个及以上荧光探针序列,在检测中有可能产生荧光基团结合的空间位阻,从而降低反应信号。本申请所提供的探针克服了上述缺陷,克服了荧光信号结合的空间位阻,并且将荧光信号增强。

[0028] 上述任一项中优选的是,所述CCDC6 Exon1探针为如Seq ID N0:1、Seq ID N0:2、Seq ID N0:3、Seq ID N0:4、Seq ID N0:5、Seq ID N0:6或Seq ID N0:7任一项所述的核苷酸序列。

[0029] 上述任一项中优选的是,所述荧光探针为如Seq ID N0:8所述的核苷酸序列。

[0030] 上述任一项中优选的是,所述平末端处理体系包括限制性内切酶。优选的是所述平末端处理体系由包括CutSmart buffer、限制性内切酶和无核酸酶超纯水,优选的限制性内切酶包括FspI酶、Cac8I酶或CdiI酶中的至少一种。

[0031] 上述任一项中优选的是,所述目的核酸暴露处理体系包括核酸外切酶。所述目的核酸暴露处理体系具体包括Exonuclease buffer、核酸外切酶和无核酸酶超纯水,所述核酸外切酶优选的是Lambda核酸外切酶;所述探针锁定处理体系具体包括DNA Ligase buffer、ATP、CCDC6 Exon1探针、DNA连接酶和无核酸酶超纯水;所述信号放大处理体系具体包括DNA polymerase buffer、DTT、dNTPs、DNA聚合酶和无核酸酶超纯水;所述信号检测处理体系具体包括甲酰胺、氯化钠、柠檬酸钠、鲑鱼精子DNA、荧光探针和无核酸酶超纯水;所述清洗处理体系具体包括:Tris-HCl、NaCl、Tween20和无核酸酶超纯水。所述通透处理体系具体包括:Tris-HCl、EDTA、SDS和蛋白酶K。

[0032] 本发明还提供了一种检测试剂盒,通过上述任一项所述检测人CCDC6基因1号外显子细胞核内定位的方法,检测人CCDC6基因1号外显子。

[0033] 本发明还提供了一种鉴定肿瘤细胞的方法,通过上述任一项所述的检测人CCDC6基因1号外显子细胞核内定位的方法,对细胞CCDC6基因1号外显子进行检测。

[0034] 本发明所述的一种检测人CCDC6基因1号外显子细胞核内定位的方法的工作原理是:CCDC6是定位于人10号染色体q11.21的编码基因。约12%甲状腺癌患者和0.4%肺癌患者的组织样本中检测到了CCDC6基因的重排后融合基因的表达,其mRNA上检测出CCDC6基因的1号外显子。本发明方法首先利用蛋白酶K将细胞核膜打孔,然后通过二类限制性内切酶在CCDC6 Exon1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。紧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。至此,CCDC6 Exon1探针结合的靶基因组单链DNA被暴露出来。最后,CCDC6 Exon1探针在连接酶的作用下在结合位点环化形成闭合环状单链DNA(本发明所述环状单链DNA即本发明所述环状探针DNA),这个DNA在聚合酶的作用下,线性自我复制,其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CCDC6 Exon1探针在细胞核内的定位。从而检测出CCDC6基因1号外显子在细胞核内的定位。

[0035] 本发明的具体实施例中,其操作步骤如下:

[0036] (1) 待检测样本固定好后,使用通透处理体系通透细胞,清洗。

[0037] (2) 使用平末端处理体系细胞基因组DNA,暴露平末端,清洗。

[0038] (3) 使用目的核酸暴露处理体系,从平末端开始降解双链DNA5'-3'方向的单链DNA,保留另一条基因组单链DNA,清洗。

[0039] (4) 使用探针锁定处理体系,在CCDC6 Exon1探针结合目的核酸同时连接酶将其环化,清洗,并用70%,85%,100%的乙醇-水溶液梯度脱水晾干。

[0040] (5) 使用信号放大处理体系,环化探针以单链基因组DNA结合位置为起点,在聚合酶的作用下进行自我复制,产生大量的含重复序列的单链DNA,清洗。

[0041] (6) 使用信号检测处理体系,荧光探针结合在含重复序列的单链DNA上,清洗,并用70%,85%,100%的乙醇-水溶液梯度脱水晾干。

[0042] (7) 使用封片剂。

[0043] (8) 最终在荧光显微镜下观察记录结果。

[0044] 所述平末端处理体系包括10×CutSmart buffer、二类核酸限制性内切酶和无核酸酶超纯水,所述核酸内切酶选自FspI酶、Cac8I酶或CdiI酶。本发明所提供的检测人CCDC6基因1号外显子细胞核内定位的方法可用于肿瘤细胞CCDC6基因1号外显子相关的基因融合

检测,优选的内切酶FspI酶、Cac8I酶或CdiI酶对于CCDC6 Exon1基因来说,使在靠近CCDC6 Exon1基因3'端形成平末端,从平末端开始降解双链DNA 5'-3'方向的单链DNA后,其保留的另一条基因组单链DNA,能够保留与CCDC6基因1号外显子融合的基因的序列,从而为进一步的检测提供了可能。所述的进一步检测可以是CCDC6基因其他外显子的检测,也可以是基因重排所造成的其他基因的融合。其方法可以与本发明所提供的CCDC6基因1号外显子原位检测方法相同或相似,即通过特异性探针与目标单链基因组DNA结合,通过探针的连接成环、聚合酶反应放大信号,最后由荧光探针检测信号;也可以是现有技术中其他原位或者非原位的检测方法。然而,无论后续检测的基因种类或检测方法或是否进行后续检测,利用本申请所提供的一种检测人CCDC6基因1号外显子细胞核内定位的方法及其试剂盒对CCDC6基因1号外显子进行的检测均落入本发明的保护范围。所述目的核酸暴露处理体系具体包括10×Exonuclease buffer、核酸外切酶,所述核酸外切酶优选为Lambda核酸外切酶;所述探针锁定处理体系具体包括10×DNA Ligase buffer、100mM ATP、50%PEG、100uM CCDC6 Exon1探针、DNA连接酶和无核酸酶超纯水;所述信号放大处理体系具体包括10×DNA polymerase buffer、100mM DTT、10mM dNTPs、DNA聚合酶和无核酸酶超纯水;所述信号检测处理体系具体包括20%甲酰胺、300mM氯化钠、30mM柠檬酸钠、0.5ug/uL鲑鱼精子DNA、100uM荧光探针和无核酸酶超纯水;所述清洗处理体系具体包括:Tris-HCl、NaCl、Tween20和无核酸酶超纯水。所述通透处理体系具体包括:Tris-HCl、EDTA、SDS和蛋白酶K。

[0045] 本发明的优点和积极效果是:

[0046] 1. 本发明提供的方法无需核酸提取。因此,可以用少量的细胞或者临床组织样本进行检测。

[0047] 2. 本发明提供的方法通过特异性的探针放大目标信号。因此,可以观察细胞或者临床组织样本中CCDC6基因1号外显子的定位和拷贝数。

[0048] 3. 本发明提供的方法可以用于所有实体肿瘤中人CCDC6基因1号外显子细胞核内定位突变的检测。因此,具有广泛适用性的优点。

附图说明

[0049] 图1为本发明一种检测人CCDC6基因1号外显子细胞核内定位的方法的工作示意图。

[0050] 图2为本发明一种检测人CCDC6基因1号外显子细胞核内定位的方法优选实施例2对KTC细胞的荧光检测结果

[0051] 图3为本发明一种检测人CCDC6基因1号外显子细胞核内定位的方法优选实施例2对TPC-1细胞的荧光检测结果

[0052] 图4为本发明一种检测人CCDC6基因1号外显子细胞核内定位的方法优选实施例3在KTC成瘤石蜡组织切片样本中的检测结果。

[0053] 图5为本发明一种检测人CCDC6基因1号外显子细胞核内定位的方法优选实施例3在TPC-1成瘤石蜡组织切片样本中的检测结果。

[0054] 图6为本发明一种检测人CCDC6基因1号外显子细胞核内定位的方法优选实施例5探针1检测KTC细胞的结果

[0055] 图7为本发明一种检测人CCDC6基因1号外显子细胞核内定位的方法优选实

实施例5探针2检测KTC细胞的结果图8为本发明本发明一种检测人CCDC6基因1号外显子细胞核内定位的方法优选实施例5探针3检测KTC细胞的结果

[0056] 图9为本发明本发明一种检测人CCDC6基因1号外显子细胞核内定位的方法优选实施例5探针4检测KTC细胞的结果

[0057] 图10为本发明本发明一种检测人CCDC6基因1号外显子细胞核内定位的方法优选实施例5探针5检测KTC细胞的结果

[0058] 图11为本发明本发明一种检测人CCDC6基因1号外显子细胞核内定位的方法优选实施例5探针6检测KTC细胞的结果

[0059] 图12为本发明本发明一种检测人CCDC6基因1号外显子细胞核内定位的方法优选实施例4探针7检测KTC细胞的结果

具体实施方式

[0060] 下面结合实例,对本发明进行进一步说明,下述实例是说明性的,不是限定性的,不能以下述实施例来限定本发明的保护范围。

[0061] 实施例1

[0062] 实施例1提供了一种人CCDC6基因1号外显子细胞核内定位的方法,由通透处理体系、平末端处理体系、目的核酸暴露处理体系、探针锁定处理体系、信号放大处理体系、信号检测处理体系组成。

[0063] 如图1所示,为本发明所提供的一种人CCDC6基因1号外显子细胞核内定位的方法的原理示意:首先利用蛋白酶K将细胞核膜打孔,然后通过二类限制性内切酶在CCDC6 Exon1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。紧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。至此,CCDC6 Exon1探针结合的靶基因组单链DNA被暴露出来。最后,CCDC6 Exon1探针在连接酶的作用下在结合位点环化形成闭合环状单链DNA,本发明所提供的方法中,CCDC6 Exon1探针与靶基因组单链DNA的结合与CCDC6 Exon1探针在结合位点环化形成闭合环状单链DNA的反应同时进行。CCDC6 Exon1探针所形成的闭合环状单链DNA在聚合酶的作用下,线性自我复制,其产生的序列中有大量人类基因上没有的DNA重复序列,其中CCDC6 Exon1探针所包括的荧光探针序列在复制过程中形成了与Seq ID NO:8所示的核苷酸互补的重复序列,特异性荧光探针通过与大量重复的Seq ID NO:8所示的核苷酸互补的序列结合,来显示CCDC6 Exon1探针在细胞核内的定位。从而检测出CCDC6基因1号外显子在细胞核内的定位。

[0064] 所述通透处理体系具体包括:Tris-HCl、EDTA、SDS和蛋白酶K,其中蛋白酶浓度为5ug/mL~30ug/mL。这些试剂均为本领域常用生化试剂。

[0065] 而且,所述平末端处理体系具体包括:1×CutSmart buffer、FspI酶和无核酸酶超纯水,其中1×CutSmart buffer的配方为50mM/L乙酸钾、20mM/L Tri-acetate、10mM/L乙酸镁、0.1mg/mL BSA,FspI酶0.5U/uL。这些试剂均为本领域常用生化试剂。

[0066] 而且,所述目的核酸暴露处理体系具体包括:1×Exonuclease buffer、Lambda核酸外切酶和无核酸酶超纯水,其中1×Exonuclease buffer的配方为50mM/L乙酸钾、20mM/L Tri-acetate、10mM/L乙酸镁、0.1mg/mL BSA,Lambda核酸外切酶0.4U/uL。这些试剂均为本领域常用生化试剂。

[0067] 而且,所述探针锁定处理体系具体包括:1×DNA Ligase buffer、500nM/L ATP、T₄DNA连接酶、CCDC6 Exon1探针和无核酸酶超纯水,其中1×DNA Ligase buffer配方为40mM/L Tris-HCl、10mM/L氯化镁、10mM/L DTT、0.5mM/L ATP,T₄DNA连接酶0.05Weiss U/μL,CCDC6 Exon1探针序列为如Seq ID NO:2所示的核苷酸序列,终浓度为100μM/L。这些试剂均为本领域常用生化试剂。

[0068] 而且,所述信号放大处理体系具体包括:1×DNA polymerase buffer、1mM/L DTT、2.5mM/L dNTPs、DNA聚合酶和无核酸酶超纯水,其中1×DNA polymerase buffer的配方为33mM/L Tris-乙酸、10mM/L乙酸镁、66mM/L乙酸钾、0.1% (v/v) Tween20,Phi29 DNA聚合酶1U/L。这些试剂均为本领域常用生化试剂。

[0069] 而且,所述信号检测处理体系具体包括:20% (v/v) 甲酰胺、0.3M/L NaCl、0.03M/L 柠檬酸钠、0.5ug/uL鲑鱼精子DNA、荧光探针序列和无核酸酶超纯水,其中荧光探针序列为5`Cy3-X-3`,其中X为Seq ID NO:8所示的核苷酸序列。终浓度为100μM/L。这些试剂均为本领域常用生化试剂。

[0070] 而且,所述清洗处理体系具体包括:Tris-HCl、NaCl和Tween20和无核酸酶超纯水,其中Tris-HCl的浓度为0.1M/L,NaCl的浓度为0.15M/L,Tween20浓度为0.05% (v/v)。这些试剂均为本领域常用生化试剂。

[0071] 实施例1所述的一种人CCDC6基因1号外显子细胞核内定位的方法,其步骤如下:

[0072] (1) 待检测样本固定好后,使用通透处理体系通透细胞。体外细胞固定好后在37℃环境下处理3~4分钟;临床组织样本在37℃环境下处理15至20分钟。完成后弃掉液体,放入超纯水中,最后70%、85%、100%乙醇水溶液脱水晾干。

[0073] (2) 使用平末端处理体系,暴露基因组DNA平末端。配制反应体系,将10×CutSmart buffer用无核酸酶超纯水稀释至1×,FspI酶的终浓度为0.5U/μL,37℃处理1小时。完成后弃掉液体,用清洗液清洗,再弃掉清洗液。

[0074] (3) 使用目的核酸暴露处理体系,从平末端开始沿着5`-3`方向降解单链DNA,保留另一条基因组单链DNA。配制核酸外切酶反应体系,将10×Exonuclease buffer用无核酸酶超纯水稀释至1×,Lambda核酸外切酶的终浓度为0.4U/μL,37℃处理0.5小时。完成后弃掉液体,用清洗液清洗,再弃掉清洗液。

[0075] (4) 使用探针锁定处理体系,将CCDC6 Exon1探针形成环状DNA。配制探针锁定处理体系,将10×DNA Ligase buffer用无核酸酶超纯水稀释至1×,10mM/L ATP稀释至0.5mM/L,T₄DNA连接酶的终浓度为0.05Weiss U/μL,37℃处理0.5小时。完成后弃掉液体,用清洗液清洗,再弃掉清洗液,最后70%、85%、100%乙醇水溶液脱水晾干。

[0076] (5) 使用信号放大处理体系,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。配制信号放大处理体系,将10×DNA polymerase buffer用无核酸酶超纯水稀释至1×,100mM/L DTT稀释至1mM/L,10mM/L dNTPs稀释至0.25mM/L,DNA聚合酶的终浓度为1U/μL,44℃处理1小时。完成后弃掉液体,用清洗液清洗,再弃掉清洗液。

[0077] (6) 使用信号检测处理体系,荧光探针结合在含重复序列的单链DNA上。配制探针结合处理体系,甲酰胺终浓度20% (v/v),NaCl终浓度为0.3M/L、柠檬酸钠终浓度为0.03M/L、10μg/uL鲑鱼精子DNA稀释至0.5μg/μL,荧光探针的终浓度为100μM/L,37℃处理10分钟。

完成后弃掉液体,用清洗液清洗,再弃掉清洗液,最后70%、85%、100%乙醇水溶液脱水晾干。

[0078] (7) 加入含DAPI的封片剂,封片。

[0079] (8) 最终在荧光显微镜下观察记录结果。

[0080] 实施例2

[0081] 为了更好的理解本发明试剂盒的使用方法和效果,实施例2提供了一种人CCDC6基因1号外显子细胞核内定位的检测试剂盒,利用实施例1中提供的人CCDC6基因1号外显子细胞核内定位的方法进行检测。实施例2中CCDC6 Exon1探针为如Seq ID NO:2所述的核苷酸序列(探针2)。

[0082] 实施例2对KTC和TPC-1体外细胞系进行检测。

[0083] 从美国ATCC处获得甲状腺癌细胞系KTC和TPC-1细胞系。两种细胞分别接种在诊断载玻片上,待细胞贴壁后,用4%PFA固定10分钟,接着在超纯水中处理3分钟,将样本拿出晾干后,滴加通透处理反应液20 μ L,湿盒中37 $^{\circ}$ C处理3分钟,放入洗液缸中清洗一次;加入平末端处理反应液15 μ L,湿盒中37 $^{\circ}$ C处理1小时,放入洗液缸中清洗一次;加入目的核酸暴露处理反应液15 μ L,湿盒中37 $^{\circ}$ C处理0.5小时,放入洗液缸中清洗一次;加入探针锁定处理反应液15 μ L,湿盒中37 $^{\circ}$ C处理0.5小时,放入洗液缸中清洗一次,乙醇梯度处理脱水;晾干后,加入信号放大处理反应液15 μ L,湿盒中44 $^{\circ}$ C处理1小时,放入洗液缸中清洗一次;加入信号检测处理反应液15 μ L,湿盒中37 $^{\circ}$ C避光处理15分钟,放入洗液缸中清洗一次,乙醇梯度处理脱水;晾干后,加入适量封片剂,封片;荧光显微镜下观察结果。以显微镜下蓝色的细胞核为定位,绿色荧光斑点为阳性结果,结果如图2和3所示。

[0084] 实施例3

[0085] 实施3与实施例2相似,不同的是,利用所述人CCDC6基因1号外显子细胞核内定位的检测试剂盒对石蜡组织切片样本进行检测。实施例3中CCDC6 Exon1探针为如Seq ID NO:2所述的核苷酸序列(探针2)。

[0086] 将TKC和TPC-1细胞接种在裸鼠背部形成肿瘤后,取出肿瘤包埋成石蜡样本,石蜡组织切片切5 μ m厚度,经过前期处理后,滴加通透处理反应液50 μ L,湿盒中37 $^{\circ}$ C处理15分钟,放入洗液缸中清洗一次;加入平末端处理反应液50 μ L,湿盒中37 $^{\circ}$ C处理1小时,放入洗液缸中清洗一次;加入目的核酸暴露处理反应液50 μ L,湿盒中37 $^{\circ}$ C处理0.5小时,放入洗液缸中清洗一次;加入探针锁定处理反应液50 μ L,湿盒中37 $^{\circ}$ C处理0.5小时,放入洗液缸中清洗一次,乙醇梯度处理脱水;晾干后,加入信号放大处理反应液50 μ L,湿盒中44 $^{\circ}$ C处理2小时,放入洗液缸中清洗一次;加入信号检测处理反应液50 μ L,湿盒中37 $^{\circ}$ C避光处理10分钟,放入洗液缸中清洗一次,乙醇梯度处理脱水;晾干后,加入适量封片剂,封片;荧光显微镜下观察结果。以显微镜下蓝色的细胞核为定位,绿色荧光斑点为阳性结果,结果如图4和5所示。

[0087] 实施例4

[0088] 实施例4与实施例1至3相似,不同的是CCDC6 Exon1探针序列为如Seq ID NO:7所述的核苷酸序列(探针7),采用的二类限制性核酸内切酶为Cac8I酶。如Seq ID NO:7所述的CCDC6 Exon1探针序列中,荧光探针序列的个数为1,检测结果如图12所示。

[0089] 实施例5

[0090] 实施例5的方法与实施例1至4相似,不同的是CCDC6 Exon1探针序列选用如Seq ID

NO:1 (探针1), Seq ID NO:3 (探针3), Seq ID NO:4 (探针4), Seq ID NO:5 (探针5), Seq ID NO:6 (探针6) 所述的核苷酸序列。采用的二类限制性核酸内切酶为FspI酶、Cac8I酶或CdiI酶。结果如图6、8、9、10、11所示。

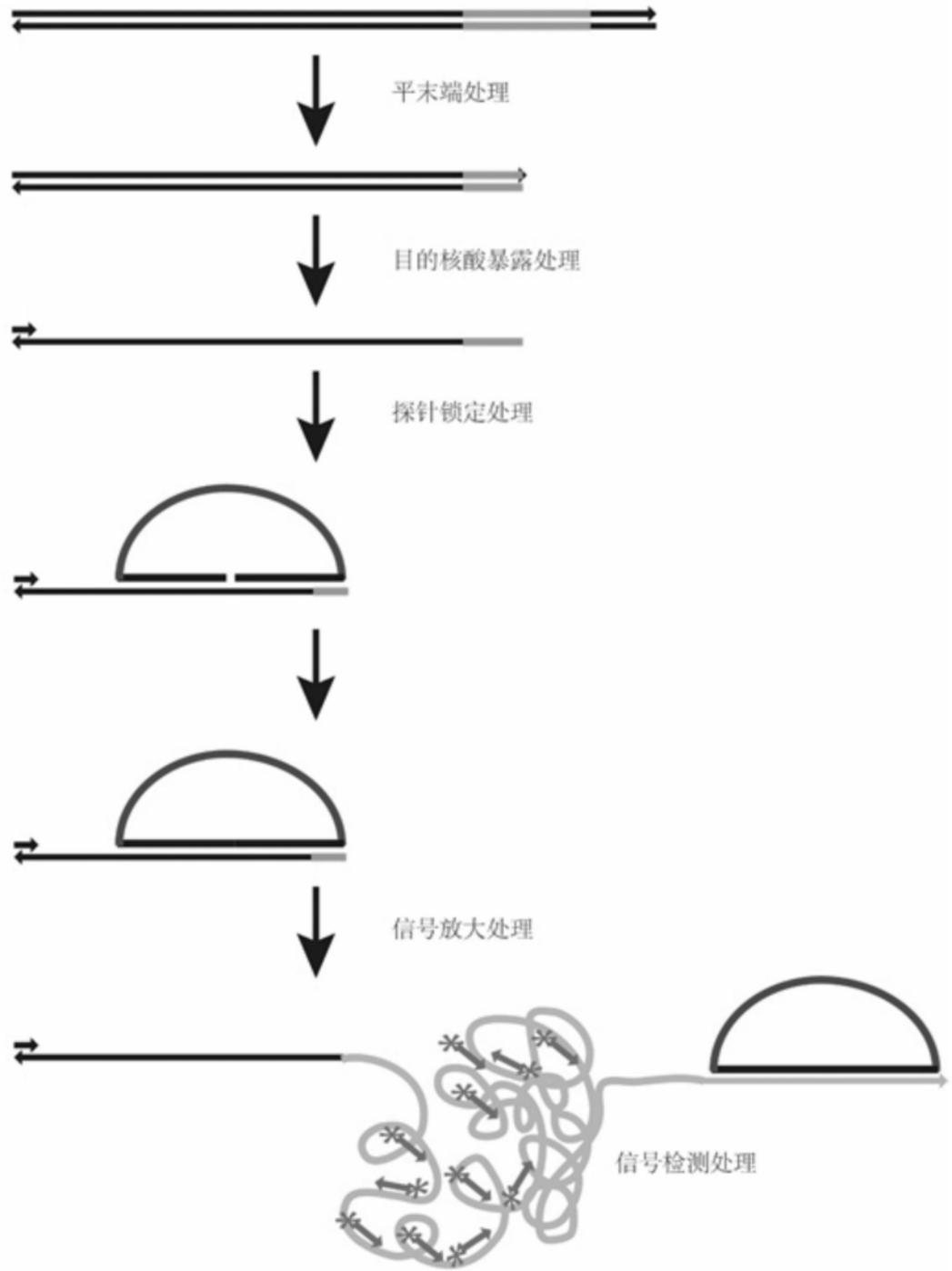
[0091] 如表一所示为各CCDC6 Exon1探针的基本信息, T_m值为在连接酶反应体系条件下计算。

探针编号	序列	5'端结合基因组DNA的碱基数	5'-T _m (°C)	5'-GC含量 (%)	3'端结合基因组DNA的碱基数	3'-T _m (°C)	3' GC含量 (%)
1	Seq ID NO:1	15	54.9	66.67	15	58	66.67
[0092] 2	Seq ID NO:2	13	47.1	69.2	16	60.3	68.8
3	Seq ID NO:3	15	51.9	60	16	60.3	68.8
4	Seq ID NO:4	15	54.2	60	17	64.3	70.6
5	Seq ID NO:5	19	61.3	57.9	11	49.4	81.8
6	Seq ID NO:6	14	50	57.1	17	64.3	70.6
7	Seq ID NO:7	13	47.1	69.2	16	60.3	68.8

[0093] 图6-12是本发明优选实施方式的7种探针检测结果的比较, 可见, 尽管探针1-7均能够检测到荧光信号, 但CCDC6 Exon1探针上基因组DNA结合序列的变化 (碱基数、识别位点、GC含量), 使其CCDC6 Exon1探针的检测效率及荧光强度产生差异。CCDC6 Exon1探针上所包含的荧光探针序列的个数也对探针的检测效率产生影响。本发明所提供的7种探针是在众多探针中筛选得到的能够有效的检测到荧光信号, 进一步优选CCDC6 Exon1探针5'端基因组DNA结合序列与CCDC6 Exon1探针3'端基因组DNA结合序列在连接酶反应体系中退火温度的差值为3-15°C, 且5'端T_m值大于等于48°C, 具有良好的检测结果。

- [0001] 序列表
- [0002] <110> 派德洛格(天津)生物科技有限公司
- [0003] <120> 一种检测人CCDC6基因1号外显子细胞核内定位的方法及其试剂盒
- [0004] <160> 8
- [0005] <170> SIPOSequenceListing 1.0
- [0006] <210> 1
- [0007] <211> 76
- [0008] <212> DNA
- [0009] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0010] <400> 1
- [0011] cctcctgcag tgccctccctc gcatcaatac cgatcatccc ctgcgcatcaa taccgatcat 60
- [0012] cgcaggtegc ggttct 76
- [0013] <210> 2
- [0014] <211> 79
- [0015] <212> DNA
- [0016] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0017] <400> 2
- [0018] ctctctgcagt gccccctcgc atcaataccg atcattcttc cctcgcgcatc aataccgatac 60
- [0019] atcgcaggtc gcggttctc 79
- [0020] <210> 3
- [0021] <211> 81
- [0022] <212> DNA
- [0023] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0024] <400> 3
- [0025] ctctctgcagt gccttccctc gcatcaatac cgatcattct tcccctcgca tcaataccga 60
- [0026] tcatcgcagg tcgcggttct c 81
- [0027] <210> 4
- [0028] <211> 82
- [0029] <212> DNA
- [0030] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0031] <400> 4
- [0032] tctctgcagtg ccttgccctc gcatcaatac cgatcattct tcccctcgca tcaataccga 60
- [0033] tcatcgcagg tcgcggttct cc 82
- [0034] <210> 5
- [0035] <211> 80
- [0036] <212> DNA
- [0037] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0038] <400> 5

- [0039] ttctctctct gcagtgccct cctcgcatca ataccgatca ttcttcccct cgcatacaata 60
- [0040] ccgatcatcg caggtcgcgg 80
- [0041] <210> 6
- [0042] <211> 81
- [0043] <212> DNA
- [0044] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0045] <400> 6
- [0046] tcctgcagtg ccttccctcg catcaatacc gatcattctt cccctcgcat caataccgat 60
- [0047] catcgcaggt cgcggttctc c 81
- [0048] <210> 7
- [0049] <211> 69
- [0050] <212> DNA
- [0051] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0052] <400> 7
- [0053] ctctgcagt gccttcttt tacgaccctc gcatcaatac cgatcatctc ttgcaggtc 60
- [0054] gcggttctc 69
- [0055] <210> 8
- [0056] <211> 23
- [0057] <212> DNA
- [0058] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0059] <400> 8
- [0060] ccctcgatc aataccgatc atc 23



说明： → 表示基因的5'端； — 表示限制性内切酶识别的位点； * → 荧光探针

图1

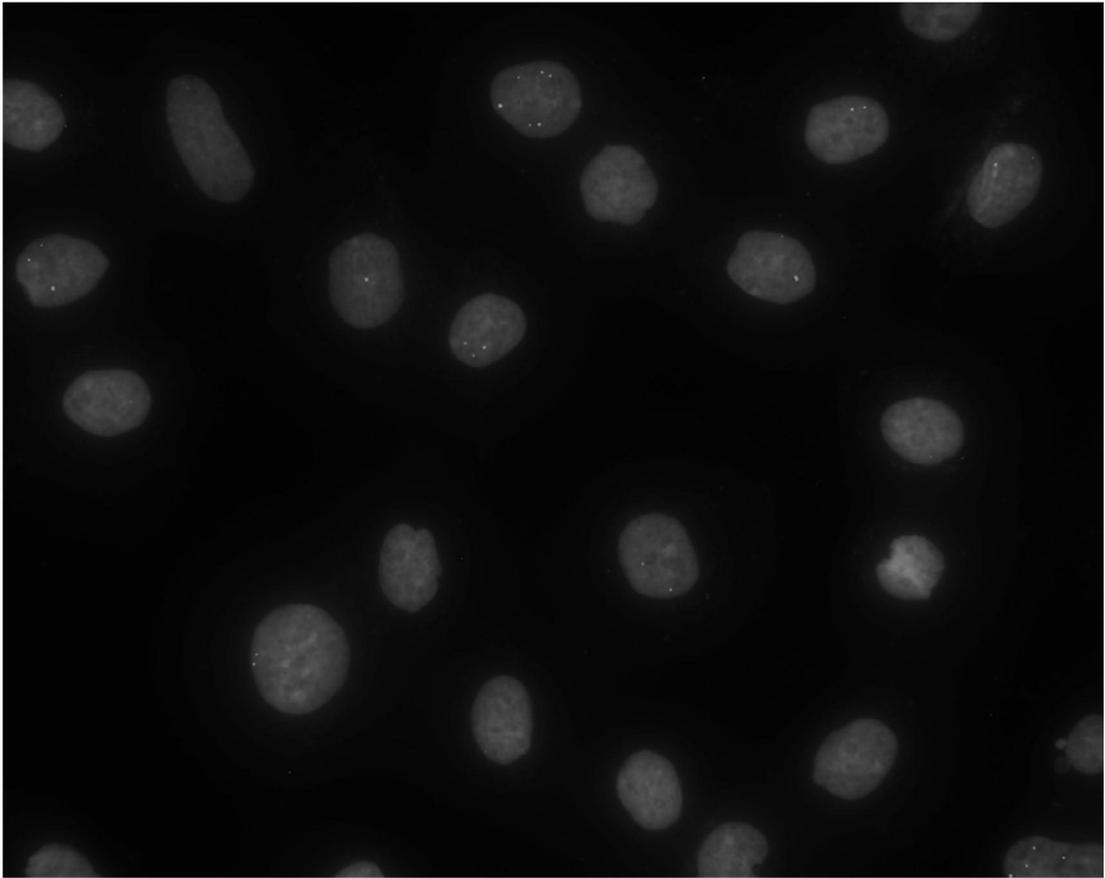


图2

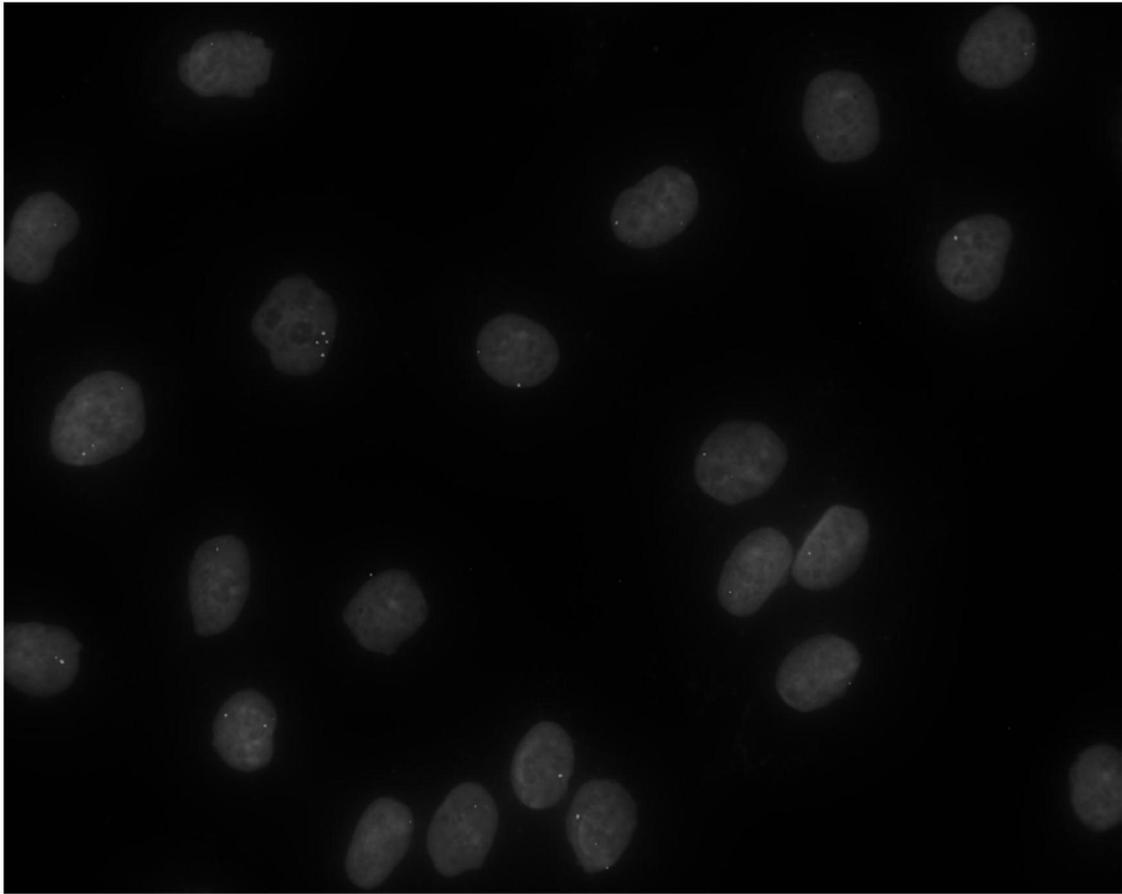


图3

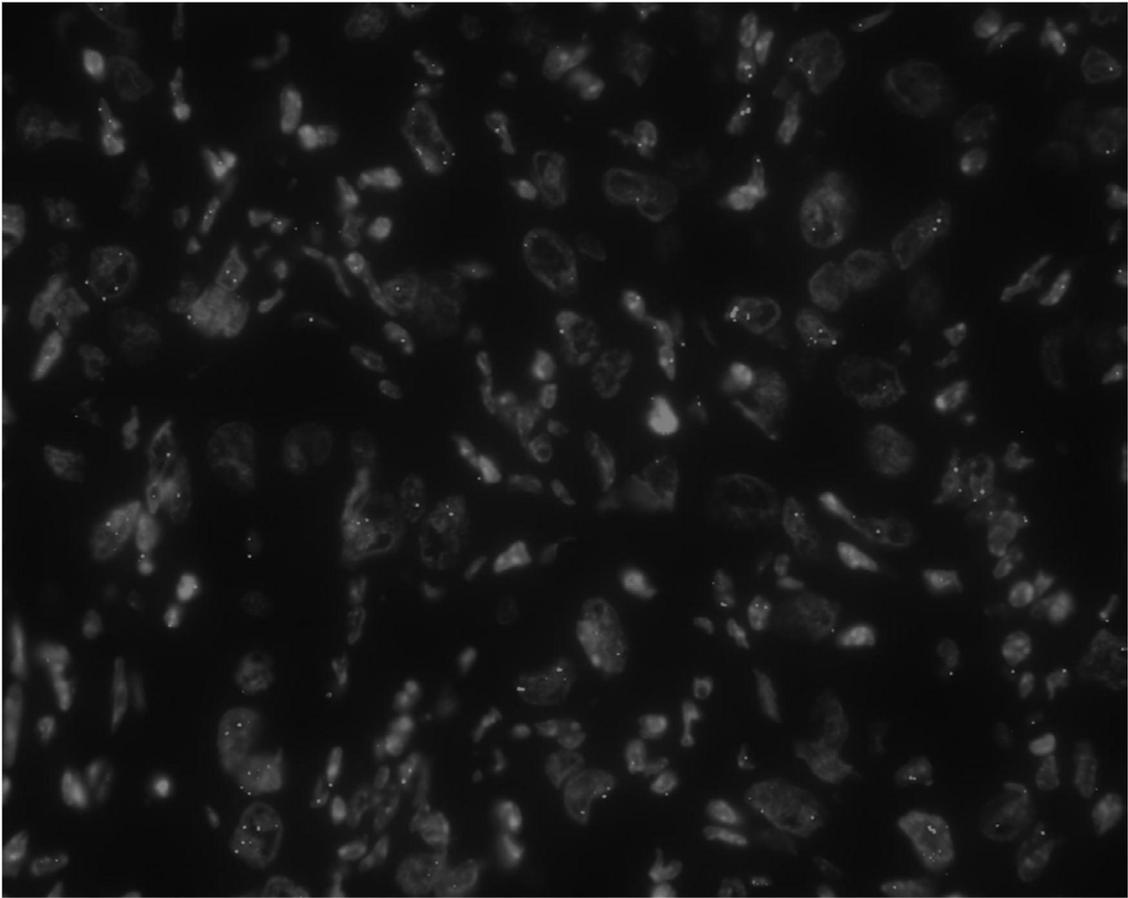


图4

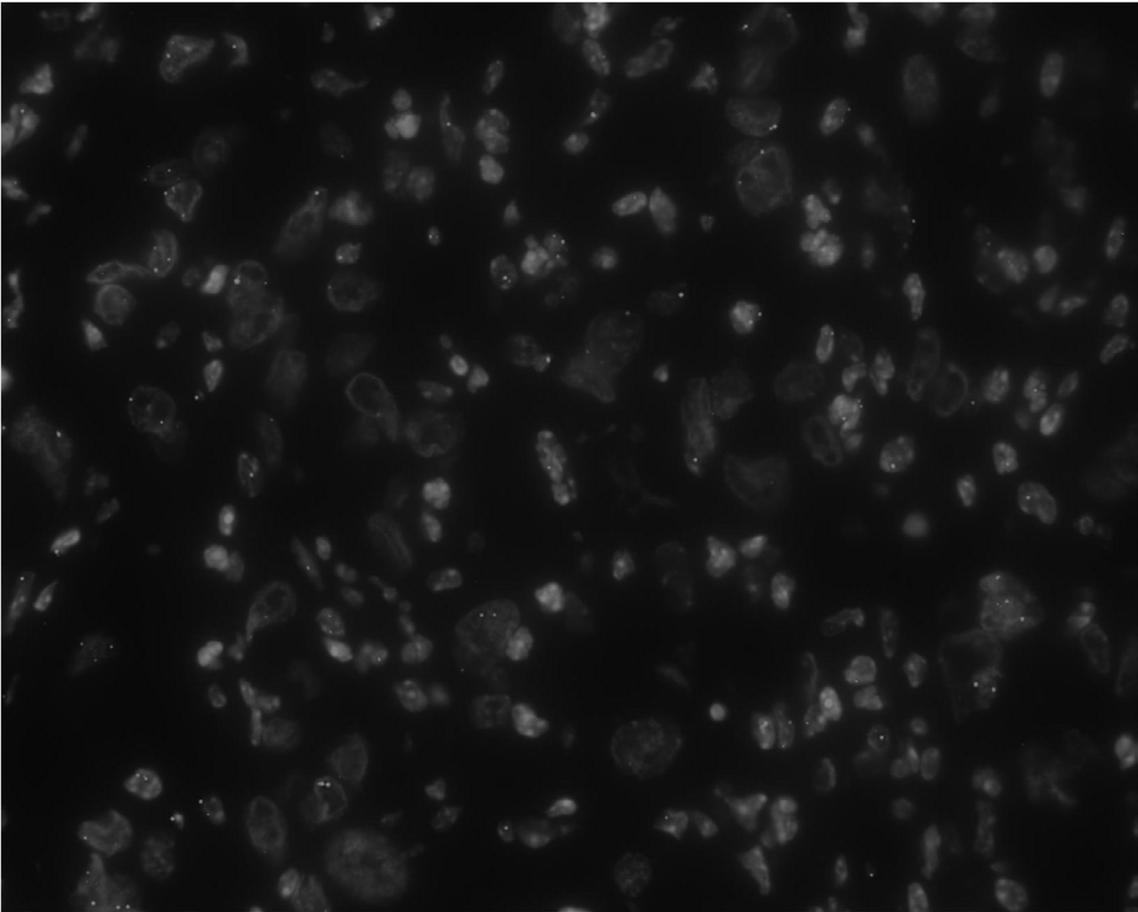


图5

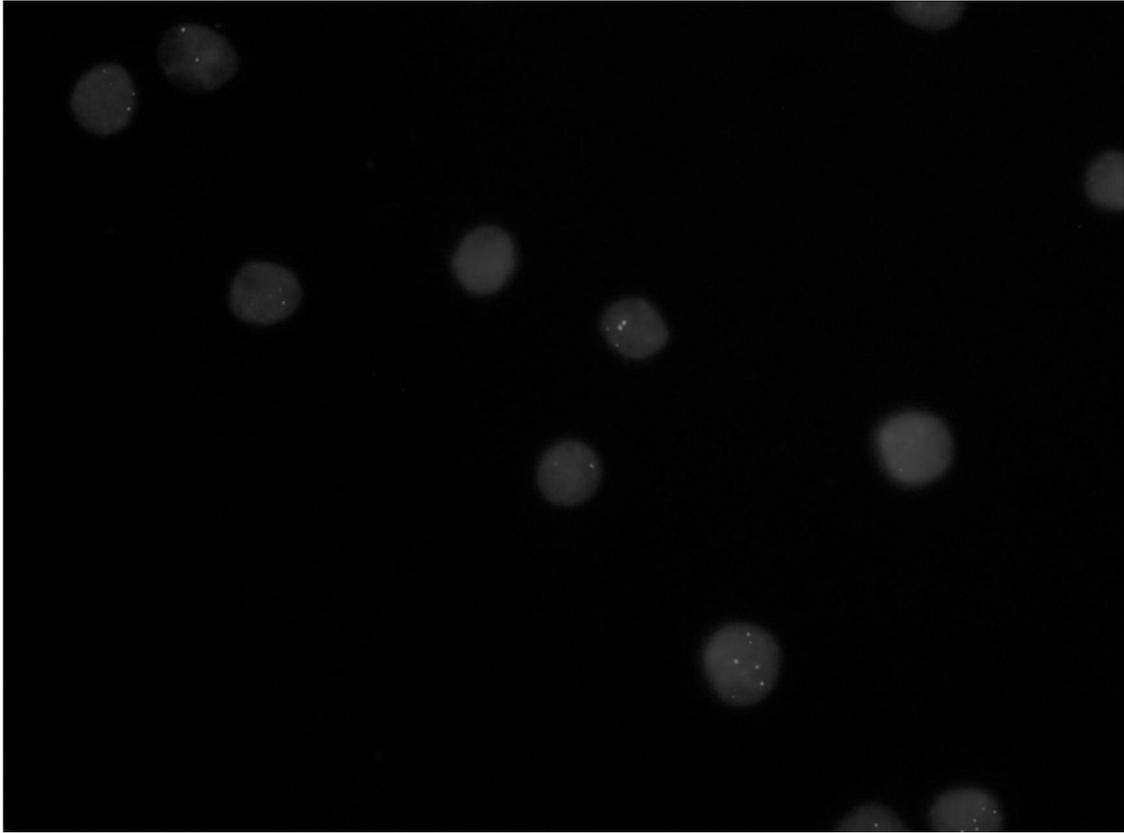


图6

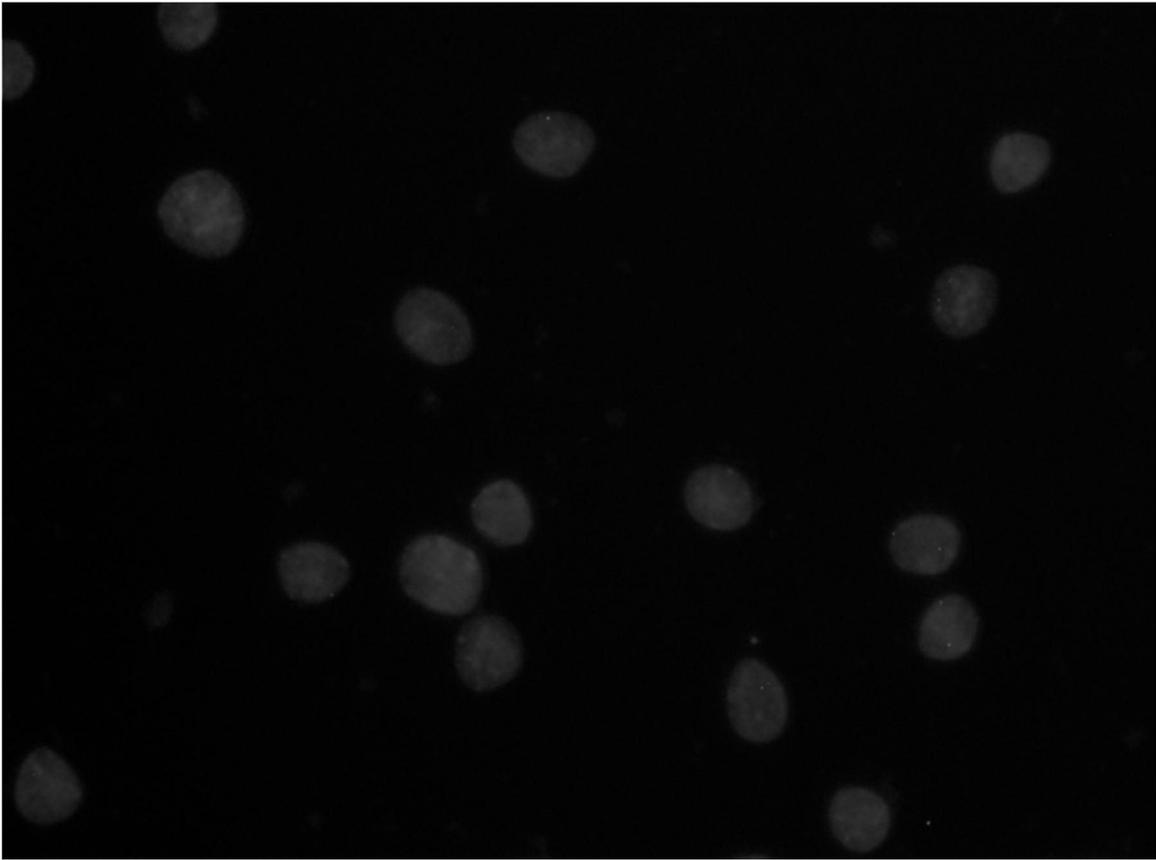


图7

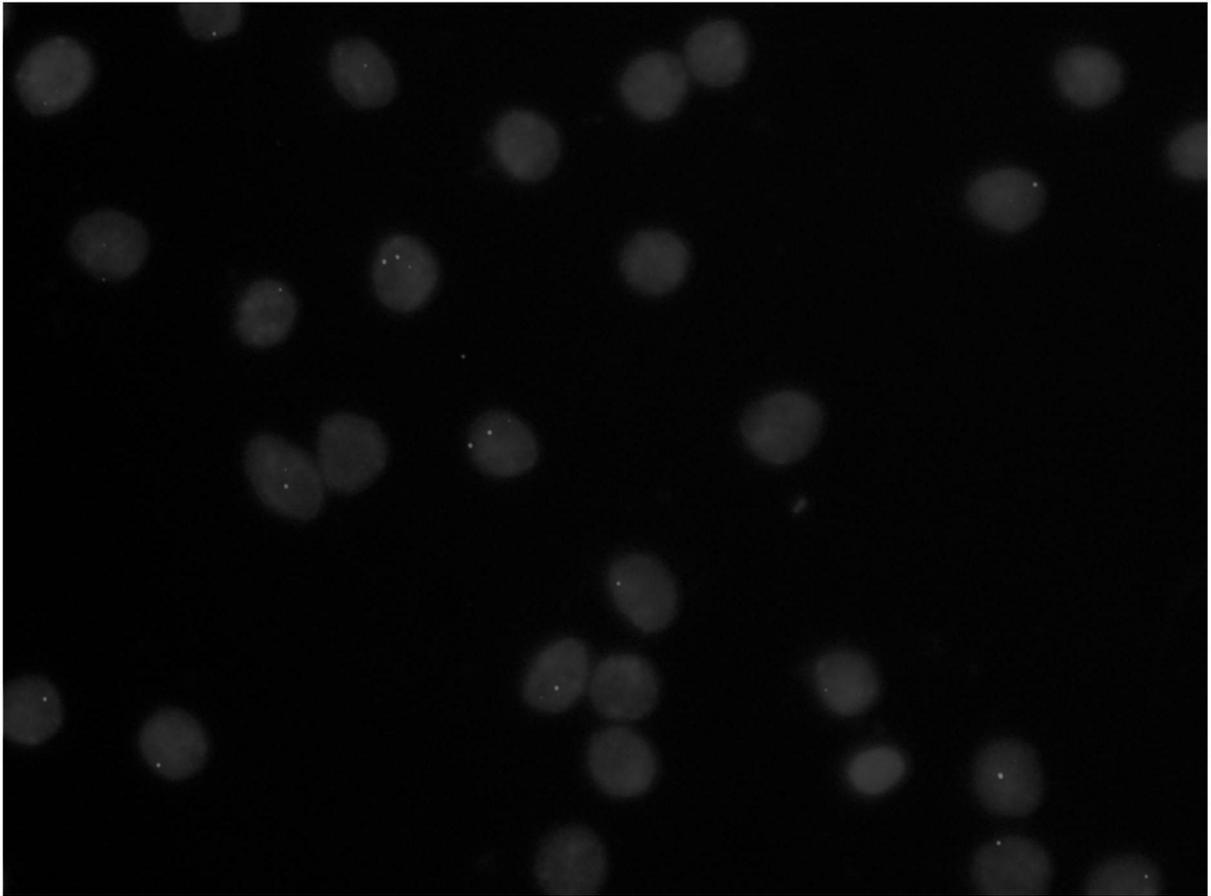


图8

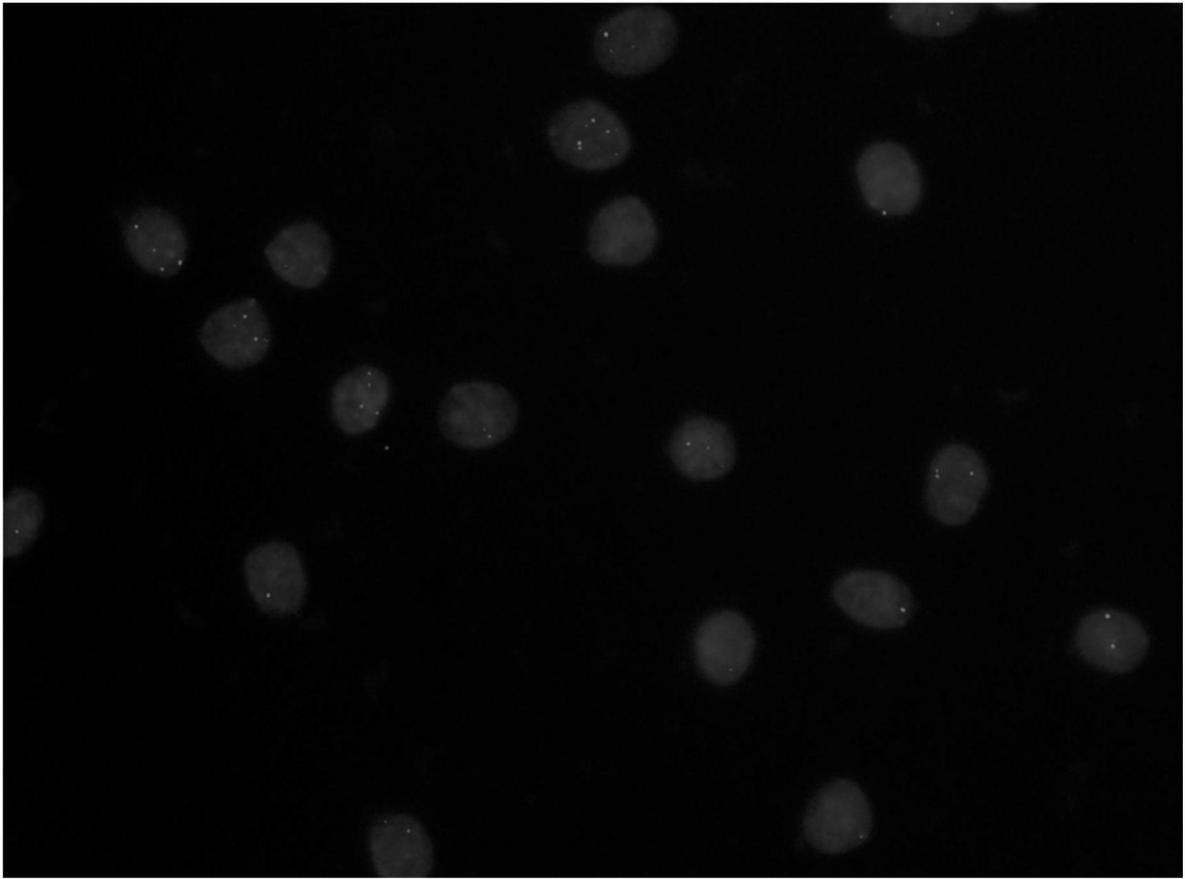


图9

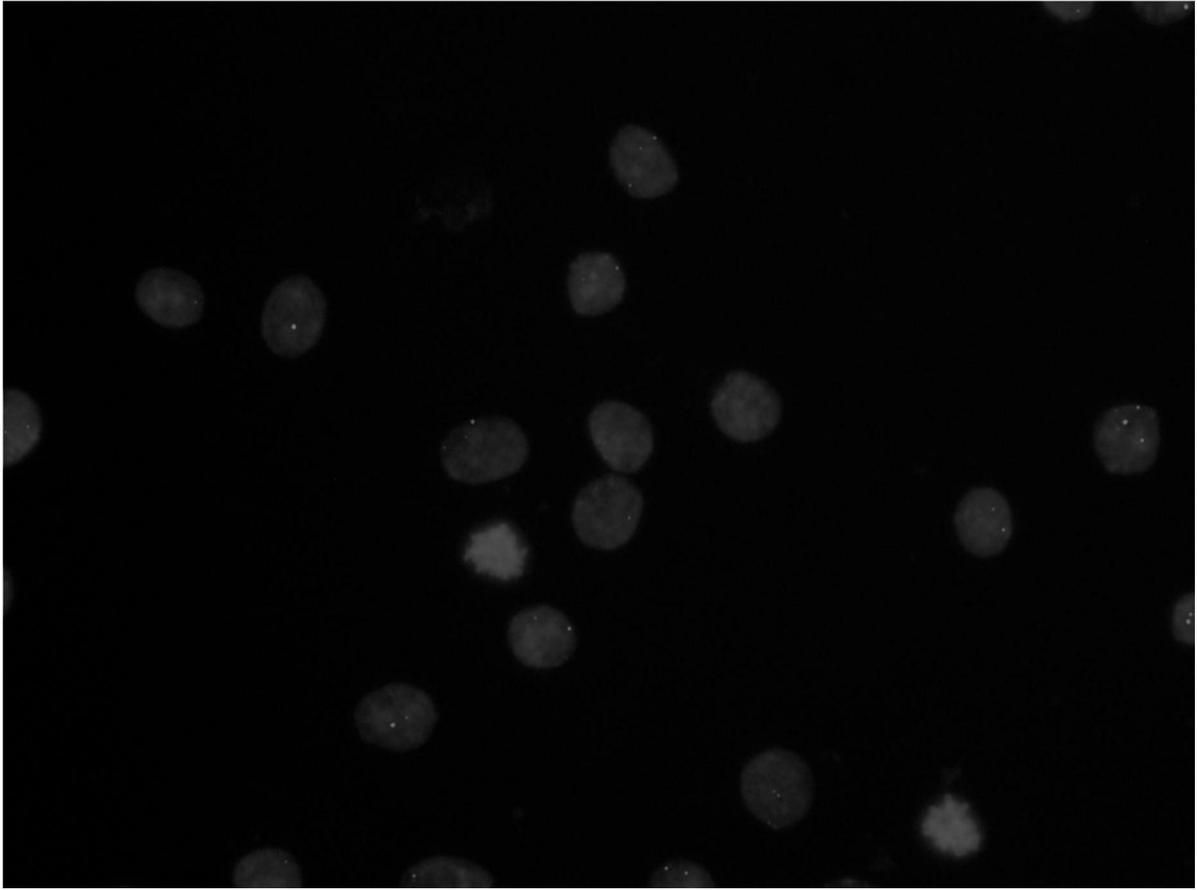


图10

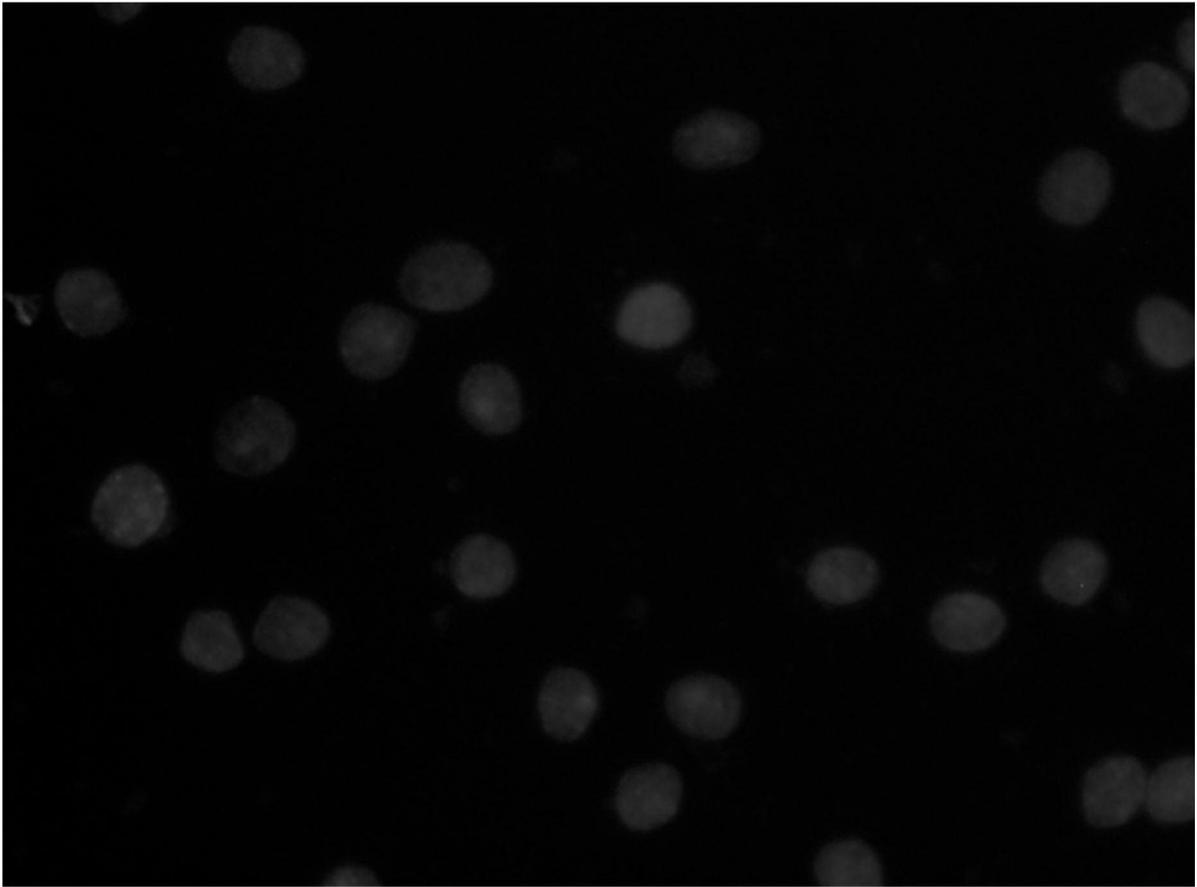


图11

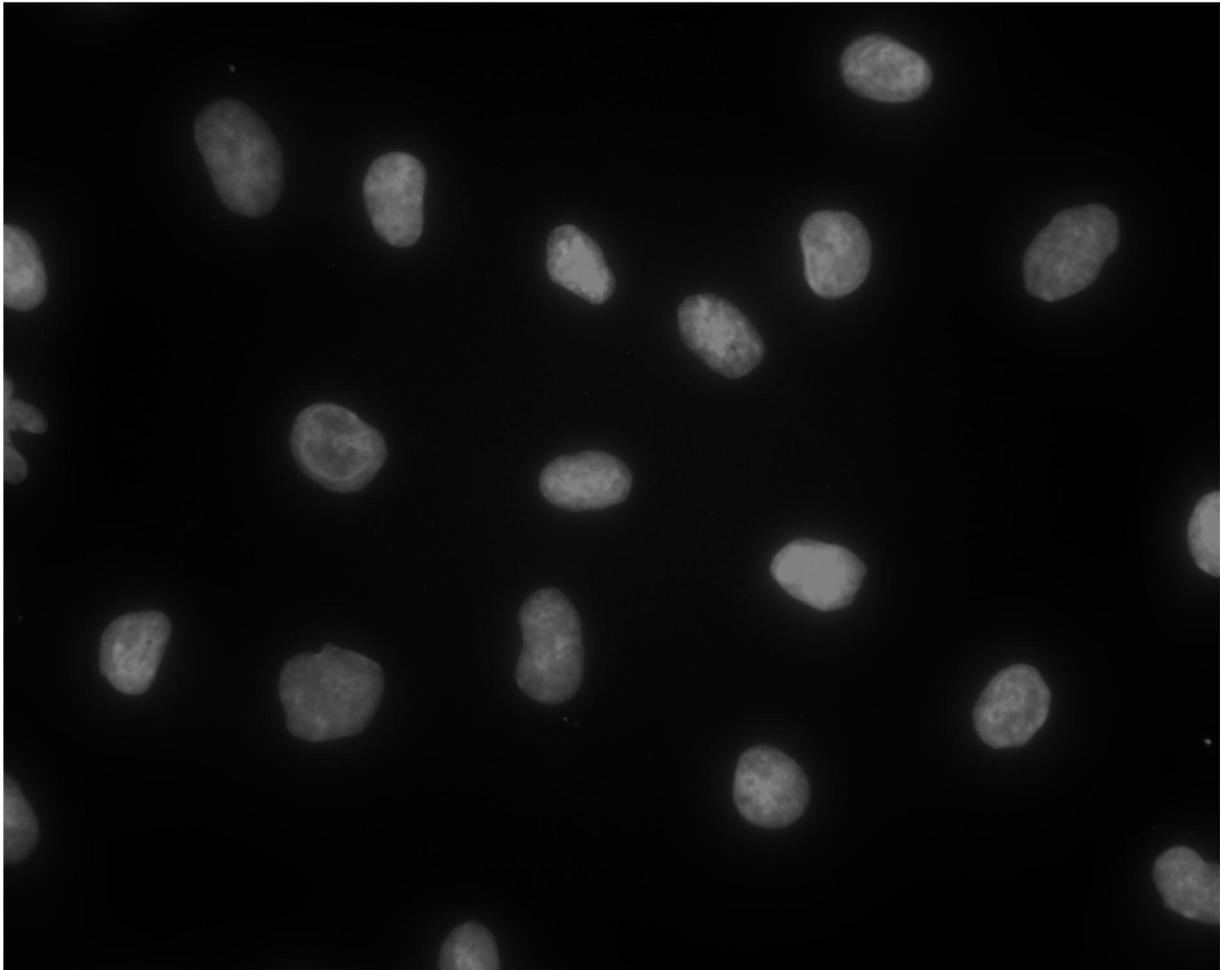


图12