

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 01812204.3

[51] Int. Cl.

C12Q 1/68 (2006.01)

C12N 15/09 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

[45] 授权公告日 2009年6月10日

[11] 授权公告号 CN 100497655C

[22] 申请日 2001.4.25 [21] 申请号 01812204.3

[30] 优先权

[32] 2000.5.1 [33] JP [31] 132667/00

[86] 国际申请 PCT/JP2001/003572 2001.4.25

[87] 国际公布 WO2001/083817 日 2001.11.8

[85] 进入国家阶段日期 2002.12.31

[73] 专利权人 荣研化学株式会社

地址 日本东京都

[72] 发明人 森安义 长岭宪太郎

[56] 参考文献

WO 9323564 A1 1993.11.25

WO 9828440 A1 1998.7.2

EP0297379A2 1989.1.4

EP0663447A2 1995.7.19

审查员 温庭江

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
代理人 段晓玲 孟凡宏

权利要求书4页 说明书21页 附图10页

[54] 发明名称

检测核酸合成的反应产物的方法

[57] 摘要

通过使用产生的不溶物质作为指示剂检测使用酶合成核酸的發生的方法。

1. 检测核酸扩增的發生的方法，该方法包括：

扩增多核苷酸链中的目标区域；

检测焦磷酸的不溶盐存在与否，所述焦磷酸的不溶盐是 DNA 扩增是否在反应溶液中發生的指示剂；

其中焦磷酸的不溶盐存在与否的检测是通过测定浊度或直观检测沉淀进行的。

2. 权利要求 1 的方法，其中用下列步骤进行扩增：

(a) 以从目标区域的 3'末端到多核苷酸链 3'末端的顺序，选择第一条任意序列 F1c，第二条任意序列 F2c 和第三条任意序列 F3c，和以从目标区域的 5'末端到核苷酸链 5'末端的顺序，选择第四条任意序列 R1，第五条任意序列 R2 和第六条任意序列 R3；

(b) 制备含有与 F2c 互补的序列 F2 的引物，F2 的 5'端，序列与 F1c 相同；含有与 F3c 互补的序列 F3 的引物；含有与 R2 序列相同的引物和在序列的 5'端，序列 R1c 与 R1 互补；和含有与 F3 序列相同的引物；和

(c) 在链移位型聚合酶、引物、底物和缓冲液存在下，使用核苷酸链作为模板合成 DNA。

3. 权利要求 1 的方法，其中用下列步骤进行扩增：

(a) 以从目标区域的 3'末端到多核苷酸链 3'末端的顺序，选择第一条任意序列 F1c 和第二条任意序列 F2c，和以从目标区域的 5'末端到核苷酸链 5'末端的顺序，选择第三条任意序列 R1 和第四条任意序列 R2；

(b) 制备含有与 F2c 互补的序列 F2 的引物，F2 的 5'端，序列与 F1c 相同；含有与 R2 序列相同的引物在该序列的 5'端，序列 R1c 与 R1 互补；和

(c) 在链移位型聚合酶、引物、底物和缓冲液存在下，使用核苷酸链作为扩增模板合成 DNA。

4. 权利要求 2 或 3 的方法，其中在解链温度调节剂存在下合成 DNA。

5. 权利要求 4 的方法，其中解链温度调节剂是甜菜碱、三甲胺 N-氧化物、脯氨酸、二甲基亚砷或甲酰胺中任何一个。

6. 权利要求 1 的方法, 其中进一步加入凝结剂来测定浊度或检测沉淀。

7. 权利要求 6 的方法, 其中凝结剂是聚丙烯酸或羧甲基葡聚糖。

8. 权利要求 1 的方法, 该方法用于监测核酸扩增, 其中扩增多核苷酸链中的目标区域, 随时间检测扩增产生的焦磷酸的不溶盐。

9. 权利要求 8 的方法, 其中用下列步骤进行扩增:

(a) 以从目标区域的 3'末端到多核苷酸链 3'末端的顺序, 选择第一条任意序列 F1c, 第二条任意序列 F2c 和第三条任意序列 F3c, 和以从目标区域的 5'末端到核苷酸链 5'末端的顺序, 选择第四条任意序列 R1, 第五条任意序列 R2 和第六条任意序列 R3;

(b) 制备含有与 F2c 互补的序列 F2 的引物, F2 的 5'端, 序列与 F1c 相同; 含有与 F3c 互补的序列 F3 的引物; 含有与 R2 序列相同的引物和在该序列的 5'端, 序列 R1c 与 R1 互补; 和含有与 F3 序列相同的引物; 和

(c) 在链移位型聚合酶、引物、底物和缓冲液存在下, 使用核苷酸链作为模板合成 DNA。

10. 权利要求 8 的方法, 其中用下列步骤进行扩增:

(a) 以从目标区域的 3'末端到多核苷酸链 3'末端的顺序, 选择第一条任意序列 F1c 和第二条任意序列 F2c, 和以从目标区域的 5'末端到核苷酸链 5'末端的顺序, 选择第三条任意序列 R1 和第四条任意序列 R2;

(b) 制备含有与 F2c 互补的序列 F2 的引物, F2 的 5'端, 序列与 F1c 相同; 含有与 R2 序列相同的引物和在该序列的 5'端, 序列 R1c 与 R1 互补; 和

(c) 在链移位型聚合酶、引物、底物和缓冲液存在下, 使用核苷酸链作为扩增模板合成 DNA。

11. 权利要求 9 或 10 的方法, 其中在解链温度调节剂存在下合成 DNA。

12. 权利要求 11 的方法, 其中解链温度调节剂是甜菜碱、三甲胺 N 氧化物、脯氨酸、二甲基亚砷或甲酰胺中任何一个。

13. 权利要求 8 的方法, 其中通过测定浊度来进行使用焦磷酸的不溶盐作为指示剂的检测。

14. 权利要求 13 的方法，其中进一步加入凝结剂来测定浊度。

15. 权利要求 14 的方法，其中凝结剂是聚丙烯酸或羧甲基葡聚糖。

16. 通过使用产生的焦磷酸的不溶盐作为指示剂检测使用酶合成核酸的发生的试剂盒，包括下列元件：

(a) 当以从目标区域的 3'末端到多核苷酸链 3'末端的顺序，选择了第一条任意序列 F1c，第二条任意序列 F2c 和第三条任意序列 F3c，和以从目标区域的 5'末端到核苷酸链 5'末端的顺序，选择了第四条任意序列 R1，第五条任意序列 R2 和第六条任意序列 R3 时，

含有与 F2c 互补的序列 F2 的引物，在 F2 的 5'端，序列与 F1c 相同；

含有与 F3c 互补的序列 F3 的引物；

含有与 R2 序列相同的引物，在序列的 5'端，序列 R1c 与 R1 互补；

和

含有与 R3 序列相同的引物；

(b) 催化互补链的链移位型合成的聚合酶；

(c) 作为元件 (b) 底物的核苷酸；

(d) 解链温度调节剂；和

(e) 凝结剂。

17. 通过使用产生的焦磷酸的不溶盐作为指示剂检测使用酶合成核酸的发生的试剂盒，包括下列元件：

(a) 当以从目标区域的 3'末端到多核苷酸链 3'末端的顺序，选择了第一条任意序列 F1c 和第二条任意序列 F2c，和以从目标区域的 5'末端到核苷酸链 5'末端的顺序，选择了第三条任意序列 R1 和第四条任意序列 R2 时，

含有与 F2c 互补的序列 F2 的引物，在 F2 的 5'端，序列与 F1c 相同；和

含有与 R2 序列相同的引物和在该序列的 5'端，序列 R1c 与 R1 互补；

(b) 催化互补链的链移位型合成的聚合酶；

(c) 作为元件 (b) 底物的核苷酸；

(d) 解链温度调节剂；和

(e) 凝结剂。

18. 权利要求 16 或 17 的试剂盒, 其中解链温度调节剂是甜菜碱、三甲胺 N-氧化物、脯氨酸、二甲基亚砷或甲酰胺的任一种, 和凝结剂是聚丙烯酸或羧甲基葡聚糖。

检测核酸合成的反应产物的方法

技术领域

本发明涉及检测核酸发生扩增的方法。

背景技术

可以利用基于核酸核苷酸序列互补性的分析方法直接分析遗传特性。因此，这个分析方法是鉴定遗传疾病、癌变、微生物等的非常有力的方法。而且，因为基因本身是检测的对象，可以省去耗时和繁琐的步骤如培养。

然而，由于在样品中存在很少量的目标基因的检测通常不容易，需要扩增目的基因本身、其检测信号等等。

在核酸扩增中，检测发生扩增的最普遍方法是通过扩增后溶液进行琼脂糖凝胶电泳和扩增产物结合荧光嵌入剂如溴化乙脞，由此观察特殊荧光来实施的。当没有其它 DNA 污染的可能且仅出现感兴趣的扩增产物时，扩增后向溶液中添加荧光嵌入剂而省略电泳，可观察到荧光。尽管这些方法简单，还需要 UV 灯和暗室观察荧光。

而且，当使用用各种标记物质包括荧光染料标记引物或核苷酸进行扩增时，存在检测掺入扩增产物中的标记的方法。然而这个方法需要分离没有掺入扩增产物中的游离标记引物(或核苷酸)。因此，这个方法不适合使用很少量反应溶液的基因扩增。而且，标记的引物和核苷酸昂贵。

发明描述

本发明的目的是提供检测核酸发生扩增的方法。

为了达到上述目的，本发明人进行了专心的研究。结果，他们发现使用由核酸扩增过程本身产生的不溶物质作为指示剂能以简单高敏感的方式检测核酸发生扩增。这引导了本发明的完成。

更特别地是，本发明涉及通过使用产生的不溶物质作为指示剂检测使用酶发生核酸合成的方法。此外，本发明涉及通过扩增多核苷酸链上目标区域和使用扩增产生的不溶物质作为指示剂来检测核酸发生扩增的方法。使用不溶物质作为指示剂的检测可通过测定浊度或检测沉淀来实施。浊度的测定或沉淀的检测可通过添加凝结剂(如聚丙烯酸

或羧甲基葡聚糖)来实施。

扩增方法包括实施下列步骤:

(a)以从目标区域的3'末端到多核苷酸链3'末端的顺序,选择第一条任意序列F1c,第二条任意序列F2c和第三条任意序列F3c,和以从目标区域的5'末端到核苷酸链5'末端的顺序,选择第四条任意序列R1,第五条任意序列R2和第六条任意序列R3;

(b)制备含有与F2c互补的序列F2的引物,在F2的5'端,序列与F1c相同;含有与F3c互补的序列F3的引物;含有与R2序列相同的引物和在该序列的5'端,序列R1c与R1互补;和含有与F3序列相同的引物;和

(c)在链移位型聚合酶、引物、底物和缓冲液存在下,使用核苷酸链作为模板合成DNA。这个方法称作“环介导的等温扩增(LAMP)方法”。

也可以用LAMP方法进行扩增,按照与上面LAMP不同的实施方案的下列步骤:

(a)以从目标区域的3'末端到多核苷酸链3'末端的顺序,选择第一条任意序列F1c和第二条任意序列F2c,和以从目标区域的5'末端到核苷酸链5'末端的顺序,选择第三条任意序列R1和第四条任意序列R2;

(b)制备含有与F2c互补的序列F2的引物,在F2的5'端,序列与F1c相同;含有与R2序列相同的引物和在其5'端,序列R1c与R1互补;和

(c)在链移位型聚合酶、引物、底物和缓冲液存在下,使用核苷酸链作为扩增模板合成DNA。

根据步骤(c)的DNA合成可在解链温度调节剂(如甜菜碱、三甲胺N-氧化物、脯氨酸、二甲基亚砷和甲酰胺)存在下进行。

本发明进一步涉及监测核酸扩增的方法,其中扩增多核苷酸链中的目标区域和随时间检测扩增产生的不溶物质。可用例如上述LAMP方法进行扩增。

此外,本发明涉及检测核酸发生扩增或监测核酸扩增的试剂盒,包括下列元件:

(a)当以从目标区域的3'末端到多核苷酸链3'末端的顺序,选择了第一条任意序列F1c,第二条任意序列F2c和第三条任意序列F3c,和

以从目标区域的 5'末端到核苷酸链 5'末端的顺序, 选择了第四条任意序列 R1, 第五条任意序列 R2 和第六条任意序列 R3 时,

含有与 F2c 互补的序列 F2 的引物, 在 F2 的 5'端, 序列与 F1c 相同;

含有与 F3c 互补的序列 F3 的引物;

含有与 R2 序列相同的引物, 在序列的 5'端, 序列 R1c 与 R1 互补;

和

含有与 R3 序列相同的引物;

(b) 催化互补链的链移位型合成的聚合酶;

(c) 作为元件 (b) 底物的核苷酸;

(d) 解链温度调节剂 (如甜菜碱、三甲胺 N 氧化物、脯氨酸、二甲基亚砷和甲酰胺); 和

(e) 凝结剂 (如聚丙烯酸或羧甲基葡聚糖)。

本发明进一步涉及检测核酸发生扩增或监测核酸扩增的试剂盒, 包括下列元件:

(a) 当以从目标区域的 3'末端到多核苷酸链 3'末端的顺序, 选择了第一条任意序列 F1c 和第二条任意序列 F2c, 和以从目标区域的 5'末端到核苷酸链 5'末端的顺序, 选择了第三条任意序列 R1 和第四条任意序列 R2 时,

含有与 F2c 互补的序列 F2 的引物, 在 F2 的 5'端, 序列与 F1c 相同; 和

含有与 R2 序列相同的引物和在该序列的 5'端, 序列 R1c 与 R1 互补;

(b) 催化互补链的链移位型合成的聚合酶;

(c) 作为元件 (b) 底物的核苷酸;

(d) 解链温度调节剂 (如甜菜碱、三甲胺 N 氧化物、脯氨酸、二甲基亚砷和甲酰胺); 和

(e) 凝结剂 (如聚丙烯酸或羧甲基葡聚糖)。

用于表征组成本发明引物的核苷酸序列的术语“相同”和“互补”不是指绝对相同或绝对互补。也就是说, 相同序列是包括能够与某一序列退火的与核苷酸序列互补的某一序列。另一方面, 互补序列是指在严格条件下能够退火以提供互补链合成来源的序列。在本发明中,

术语“相同”是指核苷酸序列的同源性，例如90%或更高，通常95%或更高，更优选98%或更高。术语“互补”是指与互补序列相同的核苷酸序列。特别的是，当核苷酸序列与互补序列的同源性是例如90%或更高，通常95%或更高，更优选98%或更高，可以说“互补”。优选，当互补核苷酸序列作为互补链合成源时，在其3'末端具有至少一个与互补序列完全一致的核苷酸。

下面将详细描述本发明。

根据本发明，合成或扩增多核苷酸链上的目标区域，然后检测合成或扩增产物的不溶物质的存在，由此与核酸发生扩增关联。

1. 检测目标

根据本发明的检测目标包括所有不溶于水的焦磷酸盐。当核苷酸掺入核酸链末端时，产生焦磷酸。术语“焦磷酸”和“焦磷酸盐离子”这里用作同义词。与焦磷酸形成不溶盐的物质中，镁离子是聚合酶所需的必要成分。因此，焦磷酸镁适用于这种检测。当除了焦磷酸镁的焦磷酸是检测目标时，方法中需要一些设计方案，添加与焦磷酸形成不溶盐的物质。更特别的是，可在扩增前添加对聚合酶具有微弱抑制作用或不具有抑制作用的物质。尽管一种物质强烈抑制聚合酶，如果其量少至不产生抑制作用的程度的话，它也可在扩增前加入。当意欲加入大量强烈抑制聚合酶的物质时，可在扩增后向反应溶液中添加该物质进行类似检测。除了焦磷酸镁外的检测目标包括焦磷酸钙、焦磷酸钡和焦磷酸铅。

本发明中的术语“多核苷酸”是指待扩增的核酸，通常包括DNA和RNA。生物样品中通常包括该核酸。生物样品是指动物、植物或微生物组织、细胞、培养物和分泌物，或来自它们的提取物。生物样品包括细胞内寄生基因组DNA或RNA如病毒或支原体。该核酸可以来源于生物样品中所含的核酸。其实例包括由mRNA合成的cDNA和在来源于生物样品的核酸基础上扩增的核酸。

2. 使用酶合成核酸

在使用酶合成核酸中，在酶协助下将核苷酸添加到核酸末端的过程中有时产生焦磷酸。根据本发明，使用这种核酸合成产生的焦磷酸作为指示剂可检测核酸发生扩增。

酶包括下列：

大肠杆菌 DNA 聚合酶;
Taq DNA 聚合酶;
T4 DNA 聚合酶;
逆转录酶;
SP6 RNA 聚合酶;
T7 RNA 聚合酶;
末端脱氧核苷酰转移酶;
Poly(A) 聚合酶;
Bst DNA 聚合酶; 和
Vent DNA 聚合酶。

可在任何常规条件下 (T. Maniatis et al., *Molecular cloning, A Laboratory Manual, Second Edition*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) 实施使用每种酶的反应。

3. 扩增

本发明中待检测的不溶物质是焦磷酸盐。因此, 本发明中可使用的扩增没有特别限制, 只要焦磷酸由核苷酸掺入核酸链而产生。而且, 不特别限制聚合酶。例如, 除了可利用聚合酶链式反应 (PCR), 可利用扩增方法如 LAMP 方法, 链移位扩增 (SDA) 方法 (例如, 日本专利审查出版 (kokoku) 号 7-114718), 和基于核酸序列的扩增 (NASBA) 方法 (日本专利号 2, 650, 159)。目前, PCR 是体外扩增核酸技术的最普遍方法。

在 LAMP 方法中, 环结构在待扩增核苷酸序列末端形成, 同时伴随从那里起始的聚合酶引起的延伸, 与环内区域杂交的引物将延伸产物解散为单链, 通过链移位来延伸核酸链。由于产生的单链核酸在其末端具有自身互补区域, 它在末端形成环, 开始新的延伸。实际的 LAMP 方法在等温条件下进行, 因此, 上述反应同时或并列发生。LAMP 方法以除了等温条件下进行的链移位型反应之外的大量扩增产物为特征。其原因之一是 LAMP 方法不包括灭活聚合酶的热变性。大量扩增产物是指产生大量焦磷酸, 即大量不溶物质。因此, LAMP 方法适合作为本发明使用的核酸扩增的方法。

(1) LAMP 方法

首先, 示出了 LAMP 方法方案 (图 1 和图 2)。在 LAMP 方法中, 制备作为扩增目标的模板多核苷酸。可用化学合成方法, 或按照常规方

法从生物材料如组织或细胞制备模板多核苷酸(DNA或RNA)。在这种情况下,制备模板多核苷酸使得扩增的目标区域两端(5'端和3'端)存在合适长度的序列(称作“双侧序列”)(图1A)。术语“双侧序列”是指包含目标区域5'末端到多核苷酸链5'末端区域的序列和目标区域3'末端到多核苷酸链3'末端区域的序列(图1A中双向箭头($\leftarrow\rightarrow$)指出的部分)。双侧序列的长度是在目标区域5'端和3'端有10至1,000个核苷酸,和优选30至500个核苷酸。

预先确定的区域从含目标区域的和双侧序列的模板多核苷酸链(图1A)中的双侧序列中任意选择。特别是,以从目标区域的3'末端到多核苷酸链的3'末端的顺序选择第一条任意序列F1c,第二条任意序列F2c和第三条任意序列F3c(图1B)。类似地,以从目标区域的5'末端到多核苷酸链的5'末端的顺序选择第四条任意序列R1,第五条任意序列R2和第六条任意序列R3(图1B)。当选择任意序列F1c和任意序列R1时,F1c和R1之间的距离可以是0个核苷酸,即是相邻的。可供选择地,可以以F1c和R1允许部分重叠的方式进行选择。第一至第六区域是根据制备的多核苷酸链的序列独自和任意选择的。每个待选择区域优选包含5至100个核苷酸,和更优选10至50个核苷酸。核苷酸长度的选择利于下述引物退火。

优选选择每个任意序列使得LAMP方法得到的扩增产物优先启动序列F1c和F1之间以及序列R1和序列R1c之间的分子内退火,而不是分子间退火,如图2L所示,并形成末端环结构。例如,为了优先启动分子内退火,当选择任意序列时,考虑序列F1c和序列F2c之间的距离以及序列R1和序列R1c之间的距离是重要的。更特别的是,优选两个序列位于0至500个核苷酸的距离内,优选0至100个核苷酸,和最优选10至70个核苷酸。数值分别代表不含序列F1c和F2c以及序列R1和R2的核苷酸数量。

随后,设计和合成称作“FA引物”的引物,且它与F2c退火。术语“FA引物”包括与F2c区互补的序列F2和与F1c相同的另一个序列(为了方便,这可以称作“F1c”)。其实例包括具有F1c的3'末端与F2的5'末端相连的结构的那些序列(图1C)。术语“退火”是指核苷酸链通过基于Watson-Crick模型的核苷酸配对形成双链结构。FA引物与模板多核苷酸链中的序列F2c退火后,DNA链合成从FA引物中的F2

开始启动(图 1D)。随后, 含与 F3c 互补的序列 F3 的引物(以下这可以称作“F3 引物”)与模板多核苷酸链的序列 F3c 退火(图 1D)。然后从退火的 F3 引物(图 1E)开始进行链移位型 DNA 合成。当通过多核苷酸与用于合成互补链的模板杂交已产生的双链结构, 进行从引物开始合成互补链的反应, 同时多核苷酸与模板分离时, 这个过程术语称作“链移位型 DNA 合成”。其具体的例子包括合成进行使得 FA 引物合成的链移位到 F3 引物合成的链的反应。换句话说, FA 引物合成的模板多核苷酸的互补链可以以互补链分离的方式被从 F3 引物延伸的链移位。

上述合成可得到两种类型的核苷酸链, 下列的 (i) 和 (ii)。

(i) 含有与模板多核苷酸链的序列“(3')F3c-F2c-F1c-目标区域-R1-R2-R3(5')”互补的序列“(5')F3-F2-F1-目标区域-R1c-R2c-R3c(3')”的核苷酸链(图 1F)。

(ii) 核苷酸链移位(分离)而形成单链, 即含有在其 5' 末端具有与 F1c 相同序列的“(5')F1c-F2-F1-目标区域-R1c-R2c-R3c(3')”的核苷酸链(图 1G)。

根据上述 (ii), F1 和 F1c 在核苷酸链中彼此互补, 因此, 它们基于 F1 和 F1c 之间分子内氢键彼此杂交, 由此形成发夹环(图 1G)。F2 包含在发夹环中。

随后, 根据上述 (ii), 称作“RA 引物”的引物与核苷酸链中序列 R2c 退火。在 RA 引物中, 与序列 R1 互补的序列 R1c 的 3' 端与序列 R2 的 5' 端连接。然后 DNA 链合成从 RA 引物开始启动(图 1H)。当从 RA 引物开始合成的延伸 DNA 到达 F1 和 F1c 形成的双链末端时, 延伸 DNA 以如图 1E 所示的移位相同的模式移位 F1c 序列(图 1I)。含与序列 R3c 互补的序列 R3 的引物(以下它可以称作“R3 引物”)接着与模板多核苷酸链的 R3c 退火(图 1I)。然后从退火的 R3 引物开始进行链移位型 DNA 合成(图 2J)。基于上述合成, 合成两种类型的核苷酸链, 即下列 (iii) 和 (iv)。

(iii) 与序列“(5')F1c-F2-F1-目标区域-R1c-R2c-R3c(3')”互补的核苷酸链“(3')F1-F2c-F1c-目标区域-R1-R2-R3(5')” (图 2K)。

(iv) 核苷酸链“(3')F1-F2c-F1c-目标区域-R1-R2-R1c(3')”, 具有与 3' 末端最接近的 F1, 和与 5' 末端最接近的 R1c(图 2L)。

上述 (iv) 的序列通过 3' 端存在的序列 F1 和 F1c 间和 5' 端的序列

R1 和 R1c 间的链内氢键形成发夹环(图 2L)。

随后,上述(iv)的核苷酸链,FA引物的F2区域在3'端发夹环部分与F2c退火(图2M)。DNA链合成由链内氢键从F1开始启动。在图1M中,从F1开始合成的延伸链到达R1-R2-R1c形成的开放发夹环5'末端。相比之下,当反应从F2开始时,合成了与“F1c-目标区域-R1-R2-R1c”组成的链互补的一条链。在这种情况下,从F1开始合成的链F1和“F1c-目标区域-R1c-R2c-R1”被从F2开始合成的链移位。这提供了具有单链伸出结构“-目标序列-R1c-R2c-R1”的双链DNA(图2N)。这个构建体启动由链内氢键引起的从R1开始的DNA链合成(图2N)。基于上述合成,得到了两种类型的核苷酸序列,下列的(v)和(vi)。

(v)序列“(3')R1-R2-R1c-目标区域-F1-F2-F1c-目标区域-R1-R2c-R1c-目标区域-F1-F2c-F1c-目标区域-R1-R2-R1c(5')”(图2O)。

(vi)F1c位于最接近3'末端和R1位于最接近5'末端的序列“(3')F1c-F2-F1-目标区域-R1c-R2c-R1(3')”(图2P)。

上述(v)和(vi)的核苷酸链通过链内氢键分别形成R2c作为环部分的发夹环和F2和R2c作为另一个环部分的发夹环。RA引物与两个序列,即上述(v)和(vi)中形成发夹环的R2c部分的退火,启动从该引物开始的DNA合成,进行含目标序列的核苷酸链(含(vi)所示序列的互补链)合成。这条互补链与图2L所示的序列相同,因此,根据图2L至P的反应其后重复。相比之下,图1A的反应可继续进行,因此,重复这一系列合成进行多核苷酸链的扩增。

使用四种类型引物,即FA引物、RA引物、F3引物和R3引物进行上述扩增。可供选择地,仅使用两种类型的引物,FA引物和RA引物,不使用F3引物和R3引物可启动等温条件下的扩增。在这个可供选择的扩增中,优选反应系统中存在解链温度(T_m)调节剂,例如,甜菜碱、三甲胺N-氧化物(TMANO)、脯氨酸、二甲基亚砷(DMSO)或甲酰胺。

(2) 反应条件

在反应中按照LAMP方法,下列成分加入模板单链核苷酸中,在缓冲液中可形成组成FA或RA的核苷酸序列和其互补核苷酸序列间稳定的核苷酸配对,通过在能够保持酶活性的室温温育进行反应。温育温度是50至75℃,优选55至70℃,温育时间是1分钟至10小时和优

选 5 分钟至 4 小时。

(i) 四种类型的寡核苷酸 (FA, RA, 外引物 F3 和外引物 R3)

(ii) DNA 聚合酶引起的链移位型互补链合成

(iii) 作为 DNA 聚合酶底物的核苷酸

根据上面两个实施方案的 LAMP 方法中, FA 引物和 RA 引物也称作“内引物”, F3 引物和 R3 引物也称作“外引物”。

从外引物的核苷酸链合成应该在从内引物的核苷酸链合成之后开始。满足这个条件的方法包括设置内引物的浓度高于外引物的浓度。更特别的是, 可设置内引物的浓度高于外引物 2-50 倍, 优选 4 至 25 倍。

催化链移位型互补链合成的聚合酶(这可以称作“链移位型聚合酶”)包括 Bst DNA 聚合酶、Bca(exo-)DNA 聚合酶、大肠杆菌 DNA 聚合酶 I 的 Klenow 片段、Vent DNA 聚合酶、Vent(Exo-)DNA 聚合酶(从 Vent DNA 聚合酶去除了核酸外切酶活性)、Deep Vent DNA 聚合酶、Deep Vent(Exo-)DNA 聚合酶(从 Deep Vent DNA 聚合酶去除了核酸外切酶活性)、 ϕ 29 噬菌体 DNA 聚合酶、MS-2 噬菌体 DNA 聚合酶、Z-Taq DNA 聚合酶(Takara Shuzo Co., Ltd.), 和 KOD DNA 聚合酶(Toyobo Co., Ltd.)。

这个反应在例如, 给出酶反应合适 pH 的缓冲液、维持酶催化活性或退火所需的盐、酶的保护性试剂, 和如果需要, 解链温度(T_m)调节剂存在下进行。使用缓冲液, 如在弱碱至中性范围内具有缓冲作用的 Tris-HCl。根据使用的 DNA 聚合酶调节 pH。对于盐, 适合添加 $MgCl_2$ 、KCl、NaCl、 $(NH_4)_2SO_4$ 等来维持酶的活性并调节核酸的解链温度(T_m)。牛血清白蛋白或糖可用作酶的保护性试剂。此外, 甜菜碱(N, N, N-三甲基甘氨酸)、三甲胺 N-氧化物(TMANO)、脯氨酸、二甲基亚砷(DMSO)或甲酰胺用作解链温度(T_m)的调节剂。通过使用解链温度(T_m)的调节剂, 可在限制的温度条件下调节寡核苷酸退火。特别是, 甜菜碱和三甲胺 N-氧化物(TMANO)由于其均衡稳定的特性, 也可有效提高链移位的效率。通过 0.2 至 3.0 M 量的甜菜碱, 优选大约 0.5 至 1.5 M 添加到反应溶液中, 可期望它促进本发明核酸扩增的作用。因为这些对解链温度作用而降低解链温度的这些调节剂, 不得不考虑其它反应条件如盐浓度和反应温度, 根据经验确定给出合适严格性和反应性的条件。

4. 检测

根据本发明检测核酸发生扩增的方法中，反应产物中的不溶物质用作检测指示剂。此外，随时间检测扩增产生的不溶物质能够监测核酸扩增。待检测的不溶物质是用于扩增的核苷酸产生的焦磷酸和反应溶液中的金属离子结合产生的焦磷酸盐，例如，焦磷酸镁。

(1) 直观检测

检测扩增产生的这个不溶物质的最简单方法是扩增后直观检测反应溶液的浊度。第二个最简单的方法是扩增后反应溶液离心和直观检测沉淀的不溶物质。

(2) 浊度检测

测定反应产物的吸光度或分散光强度来确定反应溶液的浊度。得到的浊度可用作检测核酸扩增的指示剂。当测定吸光度时，可使用普遍使用的测定装置。测定吸光度的波长可适当确定，通常在 300 至 800nm 进行测定，优选在 340 至 400 nm 的主波长，和补充波长 600 至 800 nm。当测定分散光强度时，可使用普遍使用的测定装置。

根据本发明，特别是，测定吸光度对时间的改变能够根据反应持续时间监测核酸扩增的进程。

(3) 使用过滤器检测

反应产物可通过滤色器过滤，可直观检测或基于光反射比改变来检测过滤器上的残留物。

添加凝结剂如聚丙烯酸或羧甲基葡聚糖可增加沉淀产量并可提高检测敏感性。而且，这些不溶物质可被染色或标记，由此利于检测或提高检测敏感性。例如，添加酸性橙染色不溶物质，因此利于检测。

5. 检测核酸发生扩增或监测核酸扩增的试剂盒

根据上面 4 条在检测核酸发生扩增的方法或监测核酸扩增的方法中，可包装实施所需的试剂并作为试剂盒供应。具体的例子包括含下列元件的试剂盒。

[试剂盒元件]

(a) 当以从目标区域的 3' 末端到多核苷酸链 3' 末端的顺序，选择了第一条任意序列 F1c，第二条任意序列 F2c 和第三条任意序列 F3c，和以从目标区域的 5' 末端到核苷酸链 5' 末端的顺序，选择了第四条任意序列 R1，第五条任意序列 R2 和第六条任意序列 R3 时，

含有与 F2c 互补的序列 F2 的引物, 和在 F2 的 5'端, 序列与 F1c 相同;

含有与 F3c 互补的序列 F3 的引物;

含有与 R2 序列相同的引物, 在序列的 5'端, 序列 R1c 与 R1 互补; 和含有与 R3 序列相同的引物;

(b) 催化互补链的链移位型合成的聚合酶;

(c) 作为元件 (b) 底物的核苷酸; 和

(d) 凝结剂 (如聚丙烯酸或羧甲基葡聚糖)。

试剂盒元件可根据待使用的 LAMP 方法的实施方案变化。特别是, 含有与序列 F3c 互补的序列 F3 的引物和含有与任意序列 R3 相同的引物可任选地从元件 (a) 中省去。优选, 加入解链温度调节剂 (例如, 甜菜碱、三甲胺 N-氧化物、脯氨酸、二甲基亚砷或甲酰胺) 作为元件。此外, 可任选加入给出酶反应的合适条件的缓冲液和检测反应产物合成所需的试剂。根据本发明优选的实施方案, 反应所需的试剂可以以分装在反应容器的状态提供。

附图简述

图 1 显示了 LAMP 方法的扩增方案。

图 2 显示了 LAMP 方法的扩增方案。

图 3 显示了 LAMP 方法扩增得到的白色沉淀产物的照片。

图 4 显示了 LAMP 反应溶液的吸收光谱的线图。

图 5 显示了白色沉淀和商业上得到的 $Mg_3(PO_4)_2$ 和 $Mg_2P_2O_7$ 的红外线吸收光谱的线图。

图 6 显示了波长 400 nm 下, 浊度与焦磷酸盐离子浓度之间的关系。

图 7 显示了在波长 500 nm 下, LAMP 反应溶液浊度随时间变化的线图。

图 8 显示了在波长 400 nm 下, LAMP 反应溶液浊度随时间变化的线图。

图 9 显示了浊度与合成 DNA 的量之间的关系的线图。

图 10 显示了阈时间和模板 DNA 量之间的关系的线图。

发明最佳实施方式

将参考下列实施例更详细描述本发明, 然而, 本发明的技术范围不限于这些实施例。

[实施例 1]

(1) LAMP 反应

反应溶液的组分 (100 μ l)

20 mM Tris-HCl pH 8.8

10 mM KCl

10 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 4 mM MgSO_4

1 M 甜菜碱

0.4 mM dNTP

8 U Bst DNA 聚合酶

未变性 1×10^4 分子 λ DNA (SEQ ID NO: 1) 用作待扩增的多核苷酸。
 5'-GCTTATCTTTCCCTTATTTTTGCTGCGGTAAGTCGCATAAAAACCATTCCTTCATAATT
 CAATCCATTACTATGTTATGTTCTGAGGGGAGTGAAAATTCCCCTAATTCGATGAAGAT
 TCTTGCTCAATTGTTATCAGCTATGCGCCGACCAGAACACCTTGCCGATCAGC-3' (SEQ
 ID NO: 1)

SEQ ID NO: 1 中相当于目标区域、F1c、F2c、F3c、R1、R2 和 R3 的区域如下。

目标区域：仅仅是“G”，SEQ ID NO: 1 所示核苷酸序列中的第 92 位

F1c: SEQ ID NO: 1 所示核苷酸序列中的第 68-91 位 (24 bp)

F2c: SEQ ID NO: 1 所示核苷酸序列中的第 25-50 位 (26 bp)

F3c: SEQ ID NO: 1 所示核苷酸序列中的第 1-24 位 (24 bp)

R1: SEQ ID NO: 1 所示核苷酸序列中的第 93-115 位 (23 bp)

R2: SEQ ID NO: 1 所示核苷酸序列中的第 129-152 位 (24 bp)

R3: SEQ ID NO: 1 所示核苷酸序列中的第 153-172 位 (20 bp)

具有下列序列的引物放入反应溶液中并允许在 65 $^{\circ}\text{C}$ 反应 1 小时。

引物:

1600 nM 内引物 FA

5'-TCCCCTCAGAACATAACATAGTAATGCGGTAAGTCGCATAAAAACCATTC-

3' (SEQ ID NO: 2)

1600 nM 内引物 RA

5'-TGAAAATTCCTTAATTCGATGAGGTTCGGCGCATAGCTGATAACAAT-3' (SEQ ID NO: 3)

400 nM 外引物 F3

5'-GCTTATCTTTCCTTTATTTTGC-3' (SEQ ID NO: 4)

400 nM 外引物 R3

5'-GCTGATCGGCAAGGTGTTCT-3' (SEQ ID NO: 5)

(2) LAMP 产生的白色沉淀

LAMP 反应完成后, 以 10,000rpm 离心 5 分钟。离心后, 在管底检测白色沉淀 (0.2 μ l 管) (在图 3 右侧)。图 3 左侧的管是阴性对照 (无模板)。

(3) LAMP 反应产物吸光度的测定

测定设备: Ultrospec 2000, Pharmacia Biothech Ltd.

光径长度: 1 cm

细胞含量: 100 μ l

LAMP 反应完成后, 测定在 500 nm 的吸光度。当在先反应样品显示 1.21 的吸光度, 反应失败的样品 (阴性对照) 显示 0.25。

使用 1 cm 细胞在室温测定吸收光谱的结果, LAMP 反应溶液显示出从 300 nm 至 600 nm 的宽吸收光谱 (图 4)。

由于 dNTPs 或 DNA 在这种波长长度域内不具有吸收性, 推论这个宽的吸收是基于反应溶液中细小颗粒对入射光的散射。为了证实上述推论, 使用光散射颗粒分析仪分析反应溶液。结果, 证实了具有平均直径大约 2 μ m 的细小颗粒形成。

因此, 发现使用吸光度 (浊度) 作为指示剂可证实通过 LAMP 反应核酸发生扩增。

[实施例 2] 沉淀分析

假定 LAMP 方法得到的白色沉淀是焦磷酸镁, 首先检测它是否是焦磷酸盐。100 μ l 1N NaOH 加入实施例 1 得到的沉淀中, 混合物在 65 $^{\circ}$ C 温育 5 分钟。离心后, 上清转移到另一个管中, 为了中和溶液, 向其中加入 100 μ l 1N HCl。向溶液中添加 0.1 N AgNO₃, 混合物变白 (产生 Ag₄P₂O₇)。这表明该物质是焦磷酸盐。

随后，使用钛黄试剂检测该金属是否是镁。钛黄试剂用来检测镁或硼。然而，检测的反应系统中不含硼，因此，阳性结果将意味着仅存在镁。

加入 20 μl 0.1N HCl 并溶解沉淀后，加入 1 μl 2mg/ml 钛黄试剂。为了碱化溶液，加入 20 μl 1N NaOH。结果，观察到沉淀，钛黄试剂检测显示浅红褐色。这证明在白色沉淀中存在镁。

对沉淀进行 IR 光谱分析。具体地，离心凝结实施例 1 得到的沉淀。凝结的产物用水洗涤三次，然后在硅胶干燥器中干燥 1 周。用 KBr 方法在室温获得的时间内，对得到的干燥物质进行 IR 光谱测定；64 次/测定。商业上可获得的焦磷酸镁 ($\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7$) 和单磷酸镁 ($\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2$) (Merck 制造) 用作对照。结果，沉淀的 IR 光谱与商业上可获得的 $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7$ 一致如图 5 所示。由于没有观察到有机化合物特定的 CH 突出峰 (一般 $2,900\text{cm}^{-1}$; 图 5 中破折号箭头周围)，得出结论沉淀基本不含有机物质。

这个结果证明白色沉淀是焦磷酸镁。

[实施例 3] 镁离子和焦磷酸盐离子沉淀的产生

$\text{K}_2\text{P}_2\text{O}_7$ 加入下列反应溶液，使浓度达到期望水平，让混合物在 65°C 反应 1 小时。测定反应溶液的吸光度检测由此产生的沉淀 (A 440 nm)。

反应溶液的组分

20 mM Tris-HCl pH 8.8

10 mM KCl

10 mM (NH₄)₂SO₄

4 mM MgSO₄

结果在图 6 中显示。如图 6 所示，当 P₂O₇ 离子浓度超过 0.5 mM 时，产生沉淀。为了产生 0.5 mM 或更多 P₂O₇ 离子，应该合成 4 μg/25 μl 或更多 DNA。一般来说，LAMP 可合成 20μg/25 μl 或更多 DNA。相比之下，PCR 合成的 DNA 量是 LAMP 合成的大约 1/100，因此，普通 PCR 不产生焦磷酸镁沉淀。当将来发明扩增方法如能合成大量 DNA 的 LAMP 时，这个方法在检测扩增发生中 useful。

[实施例 4] LAMP 反应中吸光度随时间的变化(监测)

在石英池(1 cm 细胞)中 65℃ 进行 LAMP 反应 1.5 小时。反应溶液的组分和材料如引物与实施例 1 中使用的那些相同。在反应过程中，随时间在 500 nm 测定吸光度。结果，阴性对照的吸光度不显示任何改变，然而，阳性对照显示吸光度增加，在 60 分钟具有一个峰(图 7)。在图 7 中，符号“○”代表反应溶液，符号“●”代表阴性对照(无模板)。

类似地，使用 1×10^{-20} mol 前列腺特异性抗原(PSA)作为模板，在石英池中 65℃ 进行 LAMP 反应 40 分钟，随时间在 A400 nm 测定吸光度。
 5'-TGCTTGTGGCCTCTCGTGGCAGGGCAGTCTGCGGCGGTGTTCTGGTGCACCCCCAG
 TGGGTCTCACAGCTGCCACTGCATCAGGAACAAAAGCGTGATCTTGCTGGGTCGGC
 ACAGCCTGTTTCATCCTGAAGACACAGGCCAGGTATTTTCAGGTCAGCCACAGCTTCAC
 ACACCC-3' (SEQ ID NO: 6)

在 SEQ ID NO: 6 中，相当于目标区域、F1c、F2c、F3c、R1、R2 和 R3 的区域如下。

目标区域: SEQ ID NO: 6 所示核苷酸序列中的第 91-102 位(12 bp)

F1c: SEQ ID NO: 6 所示核苷酸序列中的第 68-90 位(23 bp)

F2c: SEQ ID NO: 6 所示核苷酸序列中的第 26-44 位(19 bp)

F3c: SEQ ID NO: 6 所示核苷酸序列中的第 1-18 位(18 bp)

R1: SEQ ID NO: 6 所示核苷酸序列中的第 103-122 位 (22 bp)

R2: SEQ ID NO: 6 所示核苷酸序列中的第 139-161 位 (23 bp)

R3: SEQ ID NO: 6 所示核苷酸序列中的第 162-178 位 (17 bp)

具有下列序列的引物放入反应溶液中并允许在 65℃ 反应 1 小时。

引物:

1600 nM 内引物 FA

5'-TGTTCTGATGCAGTGGGCAGCTTTAGTCTGCGGCGGTGTTCTG-3' (SEQ ID NO: 7)

1600 nM 内引物 RA

5'-TGCTGGTTCGGCACAGCCTGAAGCTGACCTGAAATACCTGGCCTG-3' (SEQ ID NO: 8)

400 nM 外引物 F3

5'-TGCTTGTGGCCTCTCGTG-3' (SEQ ID NO: 9)

400 nM 外引物 R3

5'-GGGTGTGTGAAGCTGTG-3' (SEQ ID NO: 10)

结果, 阴性对照吸光度不显示任何改变, 然而, 阳性对照在大约 30 分钟达到平台 (图 8)。

这个结果证明随时间观察到焦磷酸镁白色沉淀能够监测 LAMP 方法随时间的核酸扩增。

[实施例 5] 浊度和 DNA 合成量之间的关系

以与实施例 4 相同方式, 用 PSA DNA 作为模板进行 LAMP 反应。随时间测定浊度 (A400 nm) 并定量 DNA。用 PicoGreen dsDNA 定量试剂盒 (Molecular Probe 制造) 定量 DNA。浊度和 DNA 量之间的关系在图 9 显示。从图 9 明显看出, 浊度和 DNA 量之间可观察到线性相关, 它显示浊度增加与合成 DNA 的量成比例。

[实施例 6] LAMP 反应模板 DNA 的定量

10^4 , 10^6 和 10^8 分子 PSA DNA 用作模板, 随时测定浊度 (A 400 nm), 测定浊度达到 1.0 的时间 (阈时间)。DNA 量与阈时间之间的关系在图 10 中显示。从图 10 明显看出, DNA 量与阈时间之间观察到线性相关。因此, 证明随时测定浊度和确定阈时间可定量模板 DNA 量。

[实施例 7] 使用凝结剂进行沉淀

400 μ M 聚丙烯酸 (MW100, 000) 或 10 mM 羧甲基葡聚糖 (MW10, 000)

加入 LAMP 反应溶液中作为凝结剂，进行 LAMP 反应。结果，沉淀量随凝结剂的添加而增加。

[实施例 8] 染色不溶物质

检测染色焦磷酸镁沉淀是否会利于检测。0.1g 焦磷酸镁中加入 750 μ l 酸性橙(终浓度 65 μ M)。作为对照，仅制备酸性橙溶液。室温搅拌 4 小时后，测定酸性橙上清的吸光度，基于与对照溶液吸光度之间的差异计算焦磷酸镁上染色的量。

结果，52.8 nmol 酸性橙染色到 0.1 g 焦磷酸镁上。这表明添加到溶液中的酸性橙中有大约一半被焦磷酸镁白色沉淀吸收。这个结果提示焦磷酸镁白色沉淀吸收染料可利于检测。而且，可能使用上清颜色的改变作为指示剂进行检测。

不含文本的序列表

SEQ ID NO: 1; 合成 DNA

SEQ ID NO: 2; 合成 DNA

SEQ ID NO: 3; 合成 DNA

SEQ ID NO: 4; 合成 DNA

SEQ ID NO: 5; 合成 DNA

SEQ ID NO: 6; 合成 DNA

SEQ ID NO: 7; 合成 DNA

SEQ ID NO: 8; 合成 DNA

SEQ ID NO: 9; 合成 DNA

SEQ ID NO: 10; 合成 DNA

工业实用性

本发明提供了检测核酸发生扩增的新方法。根据本发明的方法，可通过出现浑浊或沉淀来检测扩增产生的不溶物质。因此，可以以很简单方式检测发生了扩增。

序列表

<110> EIKEN CHEMICAL CO., LTD.

<120> 检测基因扩增产物的方法

<130> PH-1166-PCT

<150> JP 2000-132667

<151> 2000-05-01

<160> 10

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 172

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成 DNA

<400> 1

```
gcttatcttt ccctttatctt ttgctgcggt aagtcgcata aaaaccattc ttcataattc 60
aatccattta ctatggtatg ttctgagggg agtgaaaatt cccctaattc gatgaagatt 120
cttgctcaat tgttatcagc tatgcccga ccagaacacc ttgccgatca gc          172
```

<210> 2

<211> 50

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成 DNA

<400> 2

```
tcccctcaga acataacata gtaatgcggt aagtcgcata aaaaccattc          50
```

<210> 3

<211> 47

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成 DNA

<400> 3

tgaaaattcc cctaattcga tgaggctggc gcatagctga taacaat

47

<210> 4

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成 DNA

<400> 4

gcttatcttt ccctttattt ttgc

24

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成 DNA

<400> 5

gctgatcggc aaggtgttct

20

<210> 6

<211> 178

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成 DNA

<400> 6

tgcttgtggc ctctcgtggc agggcagtct gggcggtgt tctggtgcac cccagtgagg 60 tcctcacagc

tgccccactgc atcaggaaca aaagcgtgat cttgctgggt eggcacagcc 120 tgtttcatcc tgaagacaca
ggccaggtat ttcaggtcag ccacagcttc acacaccc 178

<210> 7

<211> 44

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成 DNA

<400> 7

tgttcctgat gcagtgggca gctttagtct gcgggcgtgt totg 44

<210> 8

<211> 45

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成 DNA

<400> 8

tgctgggtcg gcacagcctg aagctgacct gaaatacctg gcctg 45

<210> 9

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成 DNA

<400> 9

tgcttggtgc ctctcgtg 18

<210> 10

<211> 17

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成 DNA

<400> 10

gggtgtgtga agctgtg

17

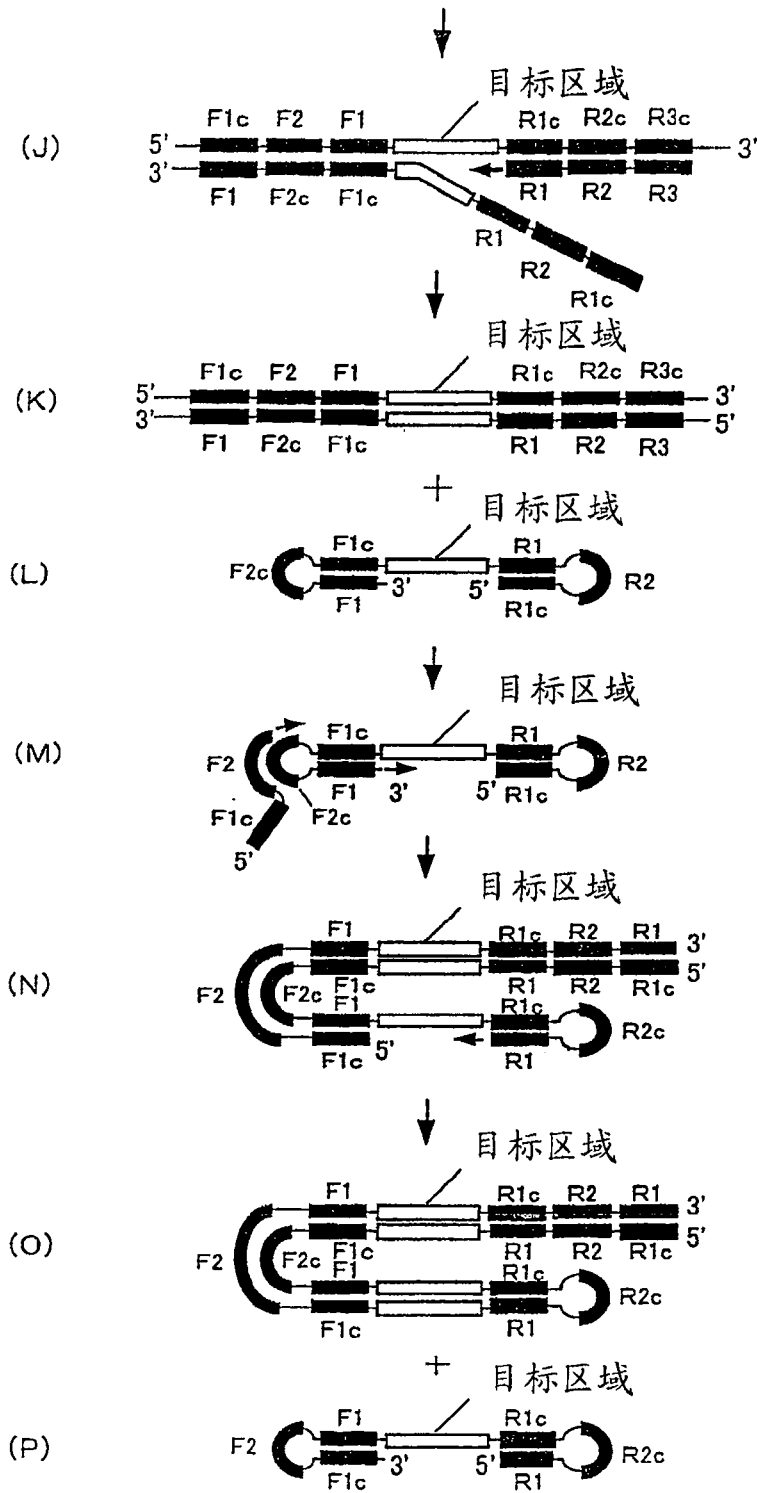


图 2

LAMP反应溶液的白色沉淀

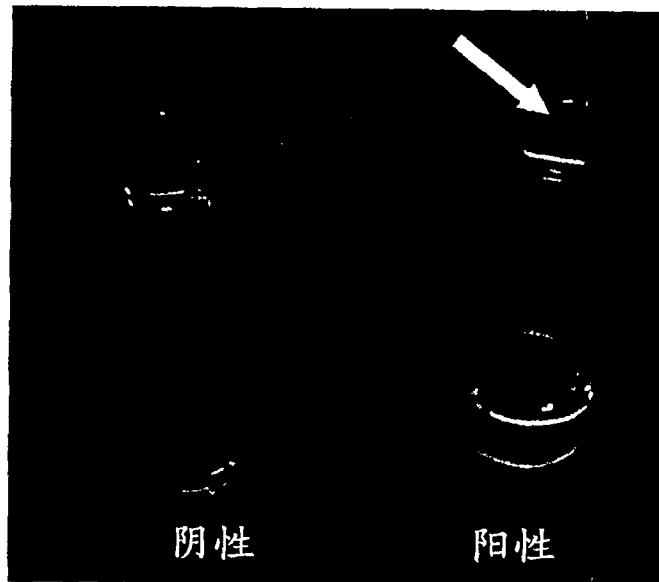


图 3

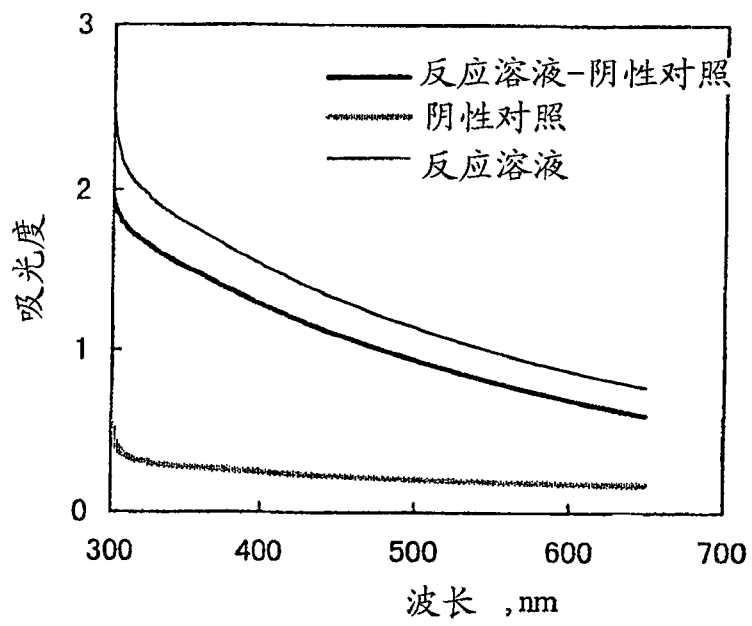


图 4

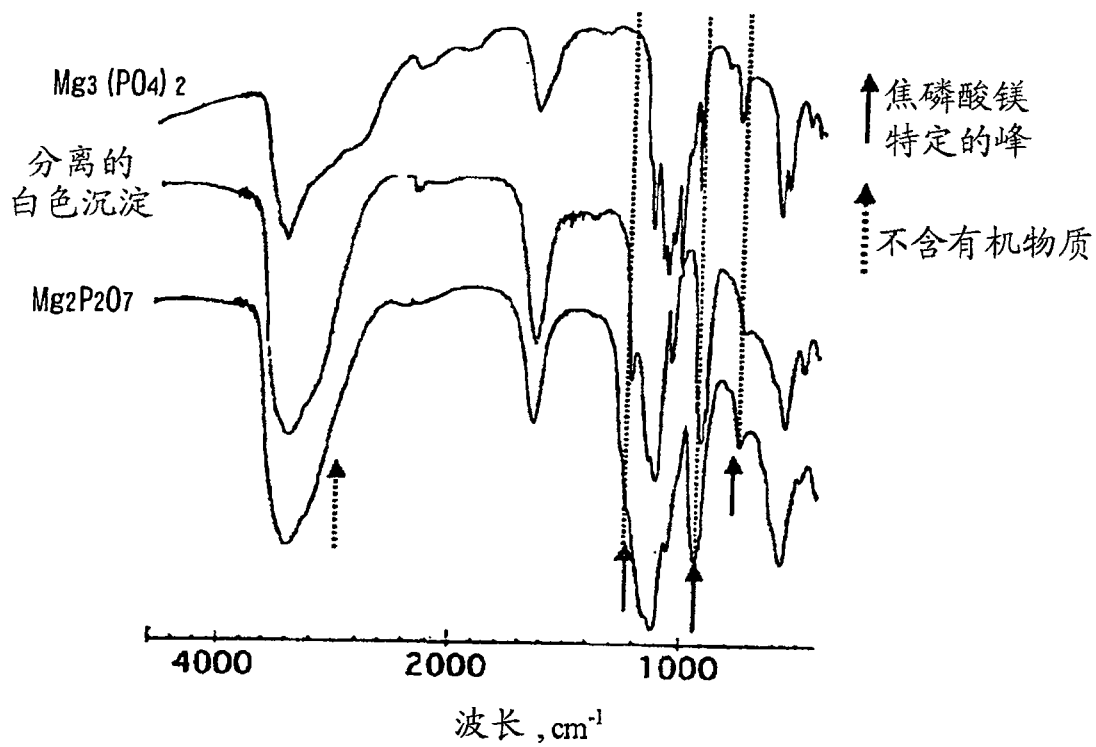


图 5

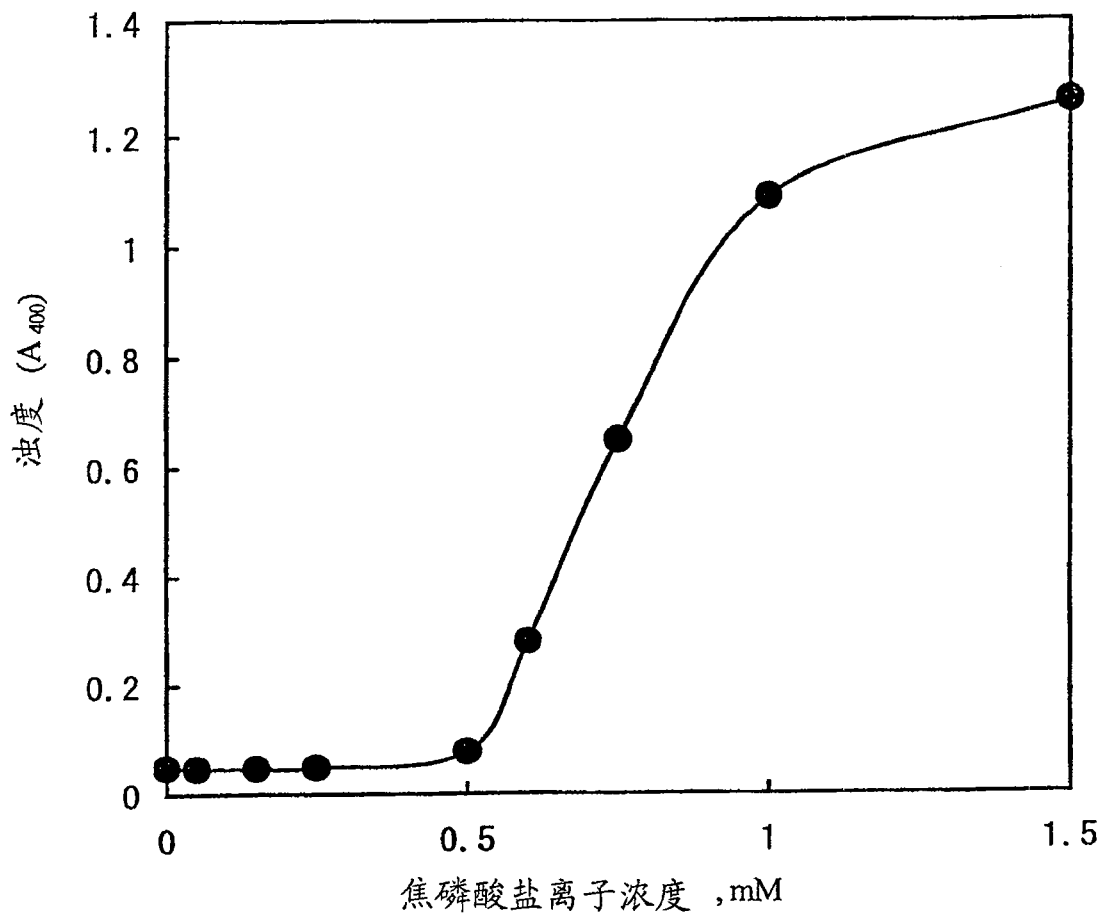


图 6

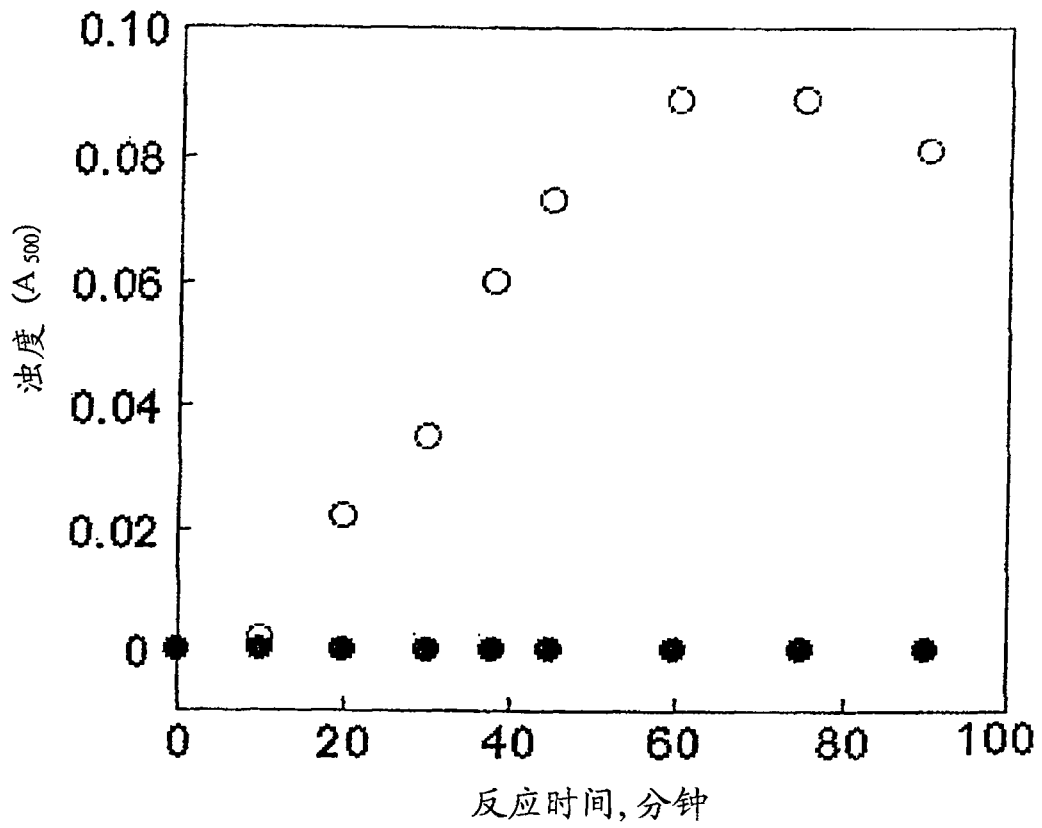


图 7

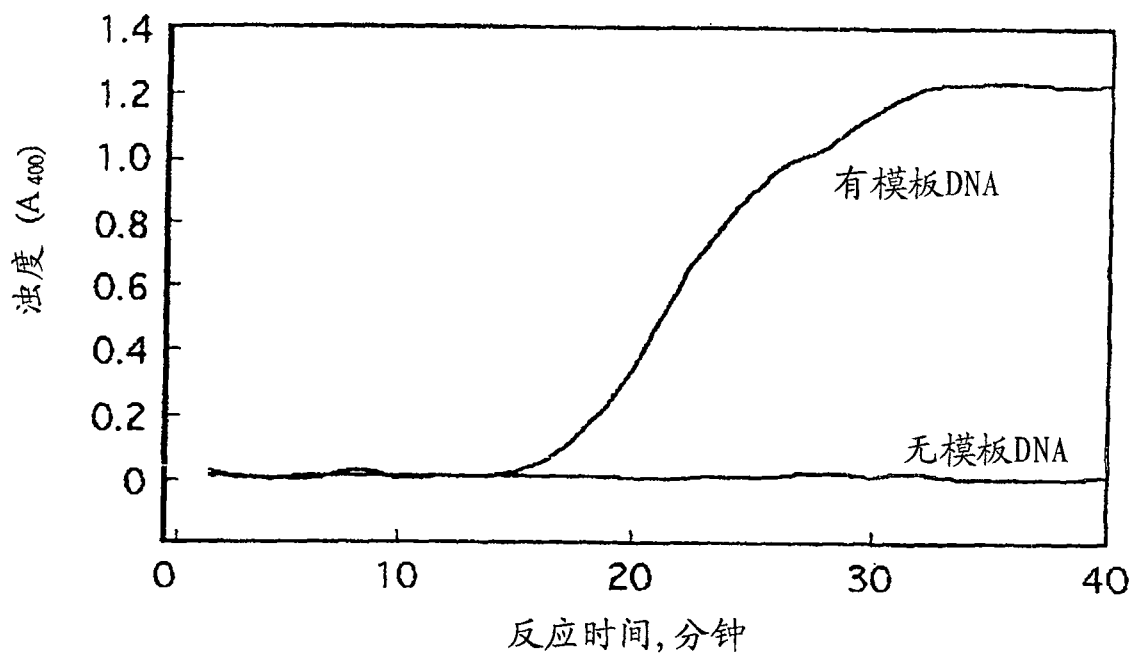


图 8

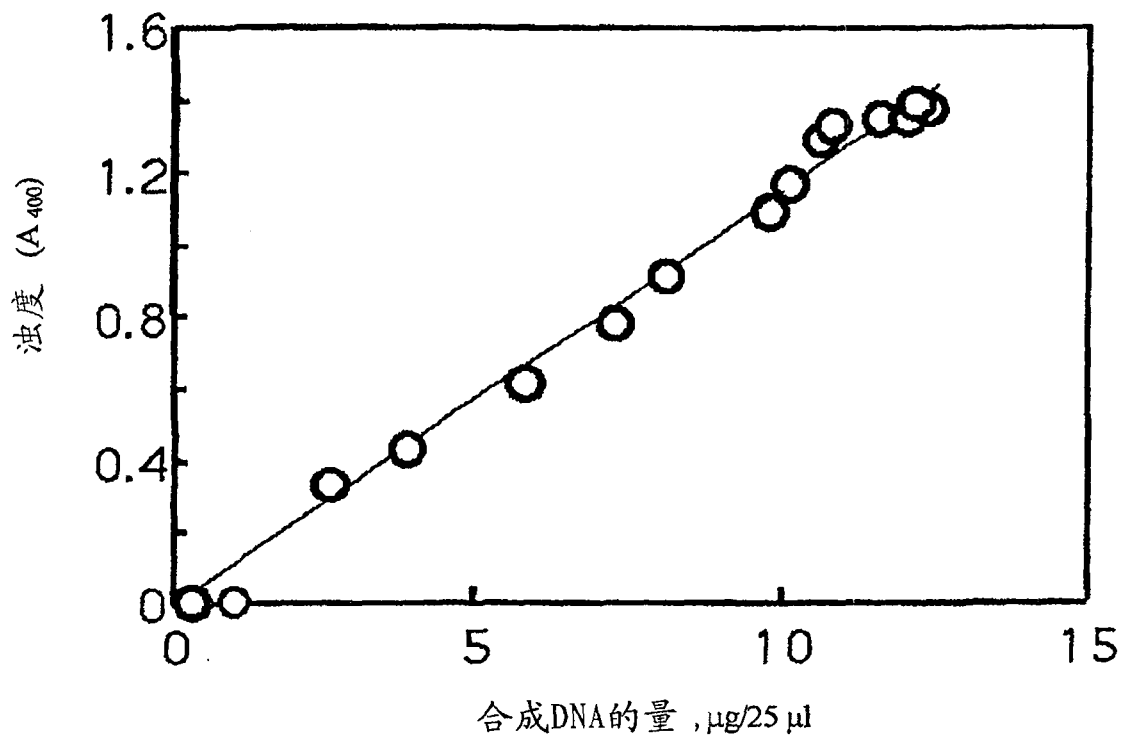


图 9

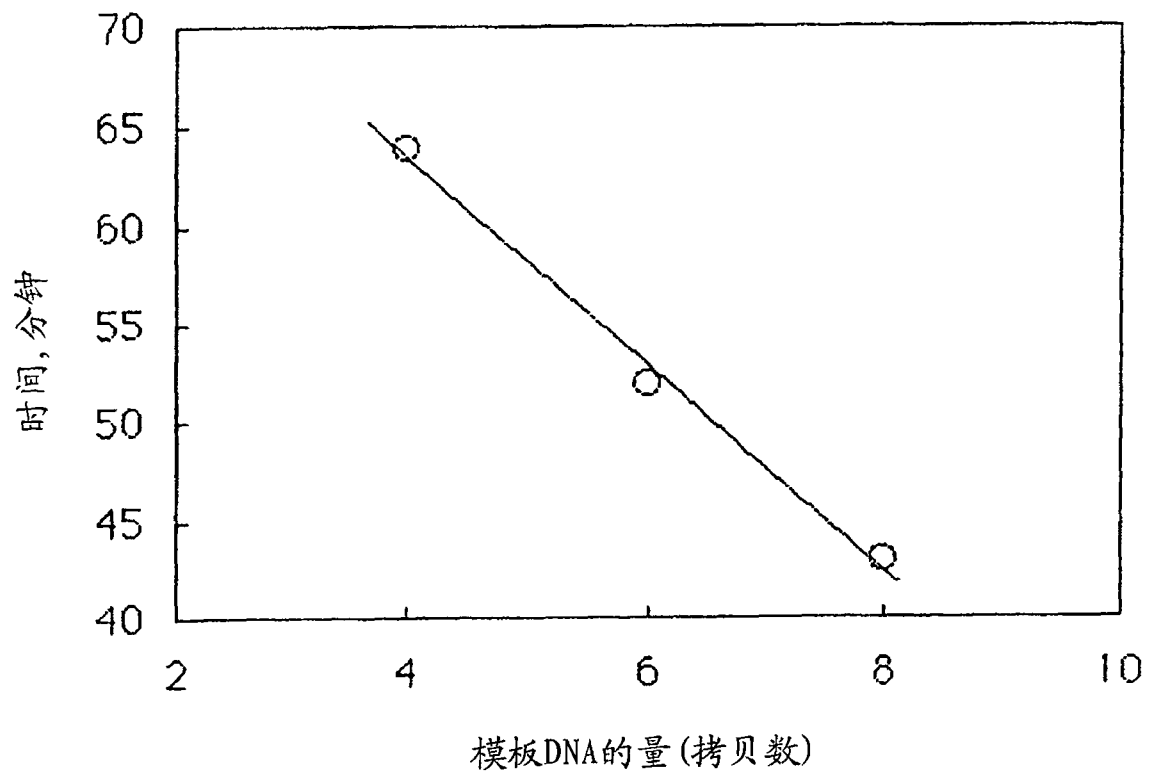


图 10