

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C12N 15/09

C12Q 1/68



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 03804069.7

[43] 公开日 2005 年 6 月 29 日

[11] 公开号 CN 1633500A

[22] 申请日 2003.2.13 [21] 申请号 03804069.7

[30] 优先权

[32] 2002. 2. 20 [33] JP [31] 43866/2002

[32] 2002. 2. 20 [33] JP [31] 43867/2002

[86] 国际申请 PCT/JP2003/001474 2003.2.13

[87] 国际公布 WO2003/070935 日 2003.8.28

[85] 进入国家阶段日期 2004.8.17

[71] 申请人 希森美康株式会社

地址 日本兵库县

[72] 发明人 多田幸代

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商
标事务所

代理人 陈 昕

权利要求书 6 页 说明书 27 页 序列表 34 页
附图 2 页

[54] 发明名称 用于持家基因 mRNA 检测的核酸扩
增用引物和使用该引物的检查方法

[57] 摘要

本发明的目的在于提供用于持家基因 mRNA 检测的核酸扩增用引物, 具体来说, 是提供用于确认 β -肌动蛋白或 GAPDH 扩增的新的引物。具体来说、对于 β -肌动蛋白选择含有序列 2 或 4~49 中任一个所示碱基序列的寡核苷酸、对于 GAPDH 选择含有序列 52~96 任一个所示碱基序列的寡核苷酸的引物, 组合后使用。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 一种用于通过 LAMP 法对与持家基因和/或持家基因相关的 mRNA 进行检测的核酸扩增用引物。

2. 根据权利要求 1 所述的核酸扩增用引物, 其中持家基因是 β -肌动蛋白基因或 GAPDH 基因。

3. 用于 β -肌动蛋白检测的核酸扩增用引物, 含有由以下组中选出的序列构成的寡核苷酸:

1) 由序列 1 所示碱基序列的第 240~380 位、或第 401~1060 位的区域和/或其互补链的区域选择的含有序列 1 或其互补链的至少 5 个以上连续碱基的寡核苷酸;

2) 由序列 2 或 4~34 中任一个所示碱基序列构成的寡核苷酸;

3) 上述 1) 或 2) 记载的寡核苷酸的互补链;

4) 在严格条件下可与上述 1)~3) 中任一个记载的寡核苷酸杂交的寡核苷酸;

5) 含有前记 1)~4) 所述寡核苷酸中 1 个至数个碱基被置换、缺失、插入或付加变异的碱基序列的具有引物功能的寡核苷酸。

4. 用于 β -肌动蛋白检测的核酸扩增用引物, 是由选自序列 10 和序列 14~17、29~50 表示的碱基序列中的任一种寡核苷酸构成的。

5. 用于 GAPDH 检测的核酸扩增用引物, 含有由以下组中选出的序列构成的寡核苷酸:

1) 含有由序列 51 所示碱基序列的第 110~450 位的区域和/或其互补链区域选择的序列 51 或其互补链的至少 5 个以上连续碱基的寡核苷酸;

2) 由序列 52~79 任一个所示碱基序列构成的寡核苷酸;

- 3) 上述 1) 或 2) 所述寡核苷酸的互补链;
- 4) 在严格条件下可与上述 1) ~ 3) 中任一个所述寡核苷酸杂交的寡核苷酸;
- 5) 含有上述 1) ~ 4) 所述寡核苷酸中 1 个至数个碱基被置换、缺失、插入或付加变异的碱基序列的具有引物功能的寡核苷酸。

6. 用于 GAPDH 检测的核酸扩增用引物, 是由从序列 58 和序列 62 ~ 64、73 ~ 96 表示的碱基序列中任一个中选出的寡核苷酸构成的。

7. 根据权利要求 3 ~ 6 项任一项所述核酸扩增用引物, 其中核酸扩增手段是 LAMP 法。

8. 一种用于 β -肌动蛋白检测的核酸扩增用引物组, 其特征是由含有从以下组中选出的序列构成的寡核苷酸的核酸扩增用引物中至少选择 2 种:

- 1) 含有从序列 1 所示碱基序列的第 240 ~ 1060 位的区域和/或其互补链中选出的序列 1 或其互补链的至少 5 个以上连续碱基的寡核苷酸;
- 2) 由序列 2 ~ 34 所示碱基序列构成的寡核苷酸;
- 3) 上述 1) 或 2) 所述寡核苷酸的互补链;
- 4) 在严格条件下可与上述 1) ~ 3) 中任一个所述寡核苷酸杂交的寡核苷酸;
- 5) 含有上述 1) ~ 4) 所述寡核苷酸中 1 个至数个碱基被置换、缺失、插入或付加变异的碱基序列的具有引物功能的寡核苷酸。

9. 一种用于 β -肌动蛋白检测的核酸扩增用引物组, 其特征是从含有权利要求 8 所述寡核苷酸的核酸扩增用引物中至少选择 4 种。

10. 根据权利要求 8 或 9 所述的核酸扩增用引物组, 其特征是上

述引物组所含有的引物中至少 2 种识别序列 1 所示碱基序列和/或其互补链的各 2 处基因区域。

11. 根据权利要求 9 或 10 所述的核酸扩增用引物组,其特征是上述引物组中所含有的引物识别序列 1 所示碱基序列和/或其互补链中的至少 6 处基因区域。

12. 引物组,是在由序列 10 和序列 14~17、29~32、35~42 和 43~50 所示碱基序列的寡核苷酸构成的用于 β -肌动蛋白检测的核酸扩增用引物中,从(a)FIP: 序列 35~42、(b)RIP: 序列 43~50、(c)F3: 序列 10 和 14~17、和(d)R3: 序列 29~32 各个分类中选择 1 个引物组合后而成的。

13. 引物组,在权利要求 12 记载的的引物组中,作为引物还含有序列 33 和 34 所示碱基序列的寡核苷酸。

14. 用于 GAPDH 检测的核酸扩增用引物组,其特征是从包含权利要求 5 所述寡核苷酸的核酸扩增用引物中至少选择 2 种。

15. 用于 GAPDH 检测的核酸扩增用引物组,其特征是从包含权利要求 5 所述寡核苷酸的核酸扩增用引物中至少选择 4 种。

16. 权利要求 14 或 15 记载的核酸扩增用引物组,其特征是上述引物组中含有的引物中至少有 2 种识别序列 51 所示碱基序列和/或其互补链的各 2 处的基因区域。

17. 权利要求 14~16 中任一项记载的核酸扩增用引物组,其特征是上述引物组所含有的引物识别序列 51 所示碱基序列和/或其互补链的至少 6 处基因区域。

18. 引物组, 是由序列 80~96 所示碱基序列的寡核苷酸构成的用于 GAPDH 检测的核酸扩增用引物, 其特征是含有由 (a)FIP: 序列 80~87、(b)RIP: 序列 88~96 各个分类选择的 1 个引物的组合区域的。

19. 引物组, 在权利要求 18 所述的被选择的各引物组合中, 作为引物还含有序列 58 或序列 62~64 所示碱基序列的寡核苷酸中的任一个和序列 73~77 所示碱基序列的寡核苷酸中的任一个的。

20. 引物组, 在权利要求 18 或 19 所述的引物组中, 作为引物还含有序列 78 和 79 所示碱基序列的寡核苷酸。

21. 权利要求 8~20 任一项所述的核酸扩增用引物组, 核酸扩增手段为 LAMP 法。

22. 用于 β -肌动蛋白检测的核酸扩增用引物组, 由以下 1)~12) 所示任一个构成:

1) 作为引物含有序列 35、43、14 和 29 所示碱基序列的寡核苷酸的引物组;

2) 作为引物含有序列 36、44、15 和 30 所示碱基序列的寡核苷酸的引物组;

3) 作为引物含有序列 37、45、10 和 31 所示碱基序列的寡核苷酸的引物组;

4) 作为引物含有序列 41、50、17 和 32 所示碱基序列的寡核苷酸的引物组;

5) 作为引物含有序列 38、45、10 和 31 所示碱基序列的寡核苷酸的引物组;

6) 作为引物含有序列 39、45、10 和 31 所示碱基序列的寡核苷酸的引物组;

7) 作为引物含有序列 40、45、16 和 31 所示碱基序列的寡核苷酸的引物组;

8) 作为引物含有序列 41、45、16 和 31 所示碱基序列的寡核苷酸的引物组;

9) 作为引物含有序列 37、46、16 和 31 所示碱基序列的寡核苷酸的引物组;

10) 作为引物含有序列 37、47、16 和 31 所示碱基序列的寡核苷酸的引物组;

11) 作为引物含有序列 37、48、16 和 31 所示碱基序列的寡核苷酸的引物组;

12) 作为引物含有序列 37、49、16 和 31 所示碱基序列的寡核苷酸的引物组;

23. 用于 GAPDH 检测的核酸扩增用引物组, 由以下所示 1) ~ 16) 中任一个构成:

1) 作为引物含有序列 80、88、62 和 73 所示碱基序列的寡核苷酸的引物组;

2) 作为引物含有序列 81、89、63 和 75 所示碱基序列的寡核苷酸的引物组;

3) 作为引物含有序列 86、95、58 和 76 所示碱基序列的寡核苷酸的引物组;

4) 作为引物含有序列 87、96、64 和 77 所示碱基序列的寡核苷酸的引物组;

5) 作为引物含有序列 81、89、62 和 75 所示碱基序列的寡核苷酸的引物组;

6) 作为引物含有序列 82、89、62 和 75 所示碱基序列的寡核苷酸的引物组;

7) 作为引物含有序列 83、89、63 和 75 所示碱基序列的寡核苷酸的引物组;

8) 作为引物含有序列 83、89、62 和 75 所示碱基序列的寡核苷酸的引物组;

9) 作为引物含有序列 84、89、62 和 75 所示碱基序列的寡核苷酸的引物组;

10) 作为引物含有序列 85、89、62 和 75 所示碱基序列的寡核苷酸的引物组;

12) 作为引物含有序列 81、90、63 和 75 所示碱基序列的寡核苷酸的引物组;

13) 作为引物含有序列 81、91、63 和 75 所示碱基序列的寡核苷酸的引物组;

14) 作为引物含有序列 81、92、63 和 75 所示碱基序列的寡核苷酸的引物组;

15) 作为引物含有序列 81、93、63 和 75 所示碱基序列的寡核苷酸的引物组;

16) 作为引物含有序列 81、94、63 和 75 所示碱基序列的寡核苷酸的引物组;

24. 核酸检测方法, 至少使用一个权利要求 1~7 中任一项记载的引物进行。

25. 核酸检测方法, 至少使用一个权利要求 8~23 中任一项记载的引物组进行。

26. 权利要求 24 或 25 所述核酸检测方法中使用的试剂和/或试剂盒。

27. 使用权利要求 24 或 25 所述核酸检测方法的核酸检测系统。

用于持家基因 mRNA 检测的核酸扩增 用引物和使用该引物的检查方法

技术领域

本发明涉及到用于持家基因(housekeeping gene)检测的核酸扩增用引物。

背景技术

随着近年来基因工程和分子生物学等领域的进步，可以在 DNA 或 RNA 水平对传染病和基因疾病等进行诊断了。特别是通过聚合酶链式反应法（PCR 法、Science, 230:1350-1354,1985）和 NASBA 法（Nucleic Acid Sequence Based Amplification 法、Nature, 350, 91-92, 1991、日本专利第 2648802 号公报和日本专利第 2650159 号公报记载）等核酸扩增方法，以往比较困难的生物检体中极微量核酸量的检测也可以进行了，基因解析迅速变成了容易的事情。

例如在癌症领域，向淋巴节的癌转移诊断就具有极其重要的意义。作为向淋巴节的癌转移诊断的一个手法，有检测作为癌标志的例如细胞角蛋白(CK)那样的蛋白质方法。由于近年来基因解析技术的发展，通过检测与癌标志蛋白质有关的 mRNA 的表达，已经可以有效地进行癌诊断了（北海道医学杂志、p. 135 - 141, Vol. 66 (2), 1991）。通过 RT-PCR 可以通过切除的组织进行 CK 的 mRNA 表达的检测，漏掉癌转移（诊断）的问题已经可以避免到一定程度。在肿瘤或癌的诊断领域中，这样的核酸扩增方法已经实用化了（临床检查法提要、第 31 版、金原出版株式会社、1998 年 9 月 20 日发行）。

作为上述以外的 DNA 扩增方法，报道了 LAMP 法（专利文献 1）。LAMP 法是通过利用含有当进行链置换反应时在扩增产物末端形成发卡构造的引物的多个引物进行的基因扩增方法。首先，在初期反应，

通过2种内引物(FIP, RIP)以及2种外引物(F3引物、R3引物)和链置换型DNA聚合酶由模板DNA合成两端具有一条链环部分的哑铃状的结构。该结构成为扩增循环的起点结构,由该结构的3'末端侧以自身作为模板进行DNA的延伸合成反应。扩增产物由许多重复结构构成,重复结构单位由夹在引物之间构成被扩增区域的双链核酸的碱基序列成反向的同一链内的互补区构成。LAMP法的特征是不需要通过热变性将模板DNA的双链变为一条链的操作,扩增反应都是在等温下连续进行的(非专利文献1和2)。模板是RNA时,通过在模板为DNA的反应液组成中再添加逆转录酶,同样可以合成起点结构,进行扩增(RT-LAMP法)。通过LAMP法在30分钟左右时间就可检测到充分的扩增产物。因此,由于核酸检测需要的时间被缩短,可以运用于以例如迅速确定治疗方针为目的的向淋巴节的癌转移的诊断。另外由于可以迅速得到结果,也有望可运用于术中诊断。

在对mRNA进行定量时,作为样品中的内部对照,即可以使用认为虽然组织不同但表达量没有差异的持家基因的mRNA。存在着通过使用该持家基因的mRNA作为内部对照,即使不考虑靶基因mRNA的提取效率或cDNA的合成效率也可以检测相对的靶基因mRNA的优点。

作为持家基因例子,如作为细胞骨架构成成分的 β -肌动蛋白的基因和作为糖酵解主要酶的甘油醛-3-磷酸脱氢酶(以下称为「GAPDH」)基因。

关于作为内部对照目的使用的持家基因,期望开发出更有效的核酸扩增用引物。

(关于 β -肌动蛋白基因)

肌动蛋白是大量出现在所有真核细胞的蛋白质。该蛋白质在高等生物细胞中提供包括有丝分裂中的作用、运动性以及结构完全性在内的很多结构和调节的功能。在脊椎动物中已鉴定有6个肌动蛋白的同工型,其中4个为肌肉型(骨骼肌、心肌、大动脉型平滑肌和胃型平

滑肌的肌动蛋白)和2个非肌肉型(细胞质的 β -肌动蛋白和 γ -肌动蛋白)。肌肉肌动蛋白存在组织特异性,参与肌肉的收缩。与之相反,细胞质肌动蛋白基本上出现在所有细胞中,与许多细胞功能有关。细胞内存在的肌动蛋白尽管存在多样性,但氨基酸序列在肌动蛋白的类型和真核生物的种间高度保守。

人的细胞质 β -肌动蛋白基因的序列已经确定,并已与其它种类的 β -肌动蛋白基因进行了比较(Nakajima-Iijima, et. al. PNAS 82, p.6133-6137(1985)、欧洲专利申请第0174608号、Ponte et. al. 1984. Nucleic Acids Res. 12, p.1687-1696 (1984)。用于扩增人 β -肌动蛋白基因整体的引物来自Clontech Laboratories(Clontech Laboratories, Inc. (Palo Alto, CA)的以MAPPING Amplimershito β -肌动蛋白用的商品名在市场销售。而关于与人 β -肌动蛋白的核苷酸序列进行种特异性杂交的寡核苷酸,有报道将这些寡核苷酸作为核酸扩增反应中的内部对照,以及用作决定核酸扩增反应中使用的样品的完全性的手段(特开平7-99981)。

(关于GAPDH基因)

人甘油醛-3-磷酸是生物体内糖酵解、戊糖磷酸循环等糖代谢以及脂质合成中的重要中间体之一,广泛分布于人体内。另外为了由该物质合成脂质,需要人甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH),所以该酶也广泛分布于人体内。

关于作为内部对照目的使用的 β -肌动蛋白和GAPDH,期望开发更有效的核酸扩增用引物。

(专利文献1)国际公开第WO 00/28082号公报

(非专利文献1)Bioventure、2001年、Vol.1, No.1, p.109-115

(非专利文献2)BIO INDUSTRY、2001年、Vol.18, No.2, p.15-29

发明的内容

本发明的目的在于提供用于持家基因 mRNA 检测的核酸扩增用引物，具体来说提供用于扩增 β -肌动蛋白基因或 GAPDH 基因的 mRNA 的新的引物。

(用于解决课题的手段)

本发明人等为了解决上述课题进行了深入地研究，结果可以构建持家基因用核酸扩增用引物。

即本发明包括以下内容：

1. 一种用于通过 LAMP 法对与持家基因和/或持家基因相关的 mRNA 进行检测的核酸扩增用引物。

2. 上述 1 所述的核酸扩增用引物，其中持家基因是 β -肌动蛋白基因或 GAPDH 基因。

3. 含有选自以下组的序列构成的寡核苷酸的用于 β -肌动蛋白检测的核酸扩增用引物；

1) 由序列 1 所示碱基序列的第 240~380 位、或第 401~1060 位的区域和/或其互补链的区域选择的，至少含有 5 个以上的序列 1 或其互补链的连续碱基的寡核苷酸。

2) 由序列 2 或 4~34 中任一个所示碱基序列构成的寡核苷酸。

3) 上述 1) 或 2) 所述的寡核苷酸的互补链。

4) 在严格条件下可与上述 1)~3) 中任一个所述的寡核苷酸杂交的寡核苷酸。

5) 含有在上述 1)~4) 所述寡核苷酸中 1 个至数个碱基被变异(置换、缺失、插入或付加)的碱基序列在内的具有引物功能的寡核苷酸。

4. 由从序列 10 和 14~17、29~50 的序列表示的碱基序列中选择的任一个寡核苷酸构成的用于 β -肌动蛋白检测的核酸扩增用引物。

5. 含有由以下组中选择的序列构成的寡核苷酸的用于 GAPDH 检测的核酸扩增用引物；

1) 含有由序列 51 所示碱基序列的第 110~450 位的区域和/或其

互补链区域选择的序列 51 或其互补链的至少 5 个以上连续碱基的寡核苷酸。

2) 由序列 52 ~ 79 任一个所示碱基序列构成的寡核苷酸。

3) 上述 1) 或 2) 所述的寡核苷酸的互补链。

4) 在严格条件下可与上述 1) ~ 3) 中任一个所述寡核苷酸杂交的寡核苷酸。

5) 含有在上述 1) ~ 4) 所述寡核苷酸中 1 个至数个碱基被变异(置换、缺失、插入或付加)的碱基序列的具有引物功能的寡核苷酸。

6. 由从序列 58 和 62 ~ 64、73 ~ 96 的序列表示的碱基序列中选择的任一个寡核苷酸构成的用于 GAPDH 检测的核酸扩增用引物。

7. 上述 3 ~ 6 项任一项所述的核酸扩增用引物, 其中核酸扩增手段是 LAMP 法。

8. 一种用于 β -肌动蛋白检测的核酸扩增用引物组, 其特征是从含有由以下各组选择的序列构成的寡核苷酸的核酸扩增用引物中至少选择 2 种。

1) 含有从序列 1 所示碱基序列的第 240 ~ 1060 位的区域和/或其互补链选择的序列 1 或其互补链的至少 5 个以上连续碱基的寡核苷酸。

2) 由序列 2 ~ 34 所示碱基序列构成的寡核苷酸。

3) 上述 1) 或 2) 所述的寡核苷酸的互补链。

4) 在严格条件下可与上述 1) ~ 3) 中任一个所述寡核苷酸杂交的寡核苷酸。

5) 包含在上述 1) ~ 4) 所述寡核苷酸中 1 个至数个碱基被变异(置换、缺失、插入或付加)的碱基序列的具有引物功能的寡核苷酸。

9. 一种用于 β -肌动蛋白检测的核酸扩增用引物组, 其特征是从含有上述 8 所述寡核苷酸的核酸扩增用引物中至少选择 4 种。

10. 上述 8 或 9 所述的核酸扩增用引物组, 其特征是上述引物组中含有的引物中至少 2 种识别序列 1 所示碱基序列和/或其互补链的各 2 处的基因区域。

11. 上述 9 或 10 所述的核酸扩增用引物组, 其特征是上述引物组

中含有的引物识别序列 1 所示碱基序列和/或其互补链中的至少 6 个基因区域。

12. 由序列 10 和 14~17、29~32、35~42 和 43~50 所示的碱基序列的寡核苷酸构成的用于 β -肌动蛋白检测的核酸扩增用引物, 该引物是从(a)FIP: 序列 35~42、(b)RIP: 序列 43~50、(c)F3: 序列 10 和 14~17、和(d)R3: 序列 29~32 各个分类中各选择 1 个引物组合后的引物组。

13. 在上述 12 所述的引物组中, 作为引物还含有序列 33 和 34 所示碱基序列的寡核苷酸的引物组。

14. 用于 GAPDH 检测的核酸扩增用引物组, 其特征是从含有上述 5 所述寡核苷酸的核酸扩增用引物中至少选择 2 种。

15. 用于 GAPDH 检测的核酸扩增用引物组, 其特征是从含有上述 5 所述寡核苷酸的核酸扩增用引物中至少选择 4 种。

16. 上述 14 或 15 所述核酸扩增用引物组, 其特征是上述引物组中含有的引物中至少有 2 种识别序列 51 所示碱基序列和/或其互补链的各 2 处的基因区域。

17. 上述 14~16 中任一项所述的核酸扩增用引物组, 其特征是上述引物组中含有的引物识别序列 51 所示碱基序列和/或其互补链的至少 6 个基因区域。

18. 由序列 80~96 所示碱基序列的寡核苷酸构成的用于 GAPDH 检测的核酸扩增用引物, 其特征是含有由 (a)FIP: 序列 80~87、(b)RIP: 序列 88~96 各个分类选择的 1 个引物的组合的引物组。

19. 在上述 18 所述的被选择的各引物组合中作为引物还含有序列 58 或序列 62~64 所示碱基序列的寡核苷酸中的任一个和序列 73~77 所示碱基序列的寡核苷酸中的任一个的引物组。

20. 在上述 18 或 19 所述的引物组中作为引物还含有序列 78 和 79 所示碱基序列的寡核苷酸的引物组。

21. 上述 8~20 任一项所述核酸扩增用引物组, 核酸扩增手段为 LAMP 法。

22. 由以下 1) ~ 12) 中所示任一个构成的 β -肌动蛋白检测用的核酸扩增用引物组;

1) 作为引物, 含有序列 35、43、14 和 29 所示碱基序列的寡核苷酸的引物组。

2) 作为引物, 含有序列 36、44、15 和 30 所示碱基序列的寡核苷酸的引物组。

3) 作为引物, 含有序列 37、45、10 和 31 所示碱基序列的寡核苷酸的引物组。

4) 作为引物, 含有序列 41、50、17 和 32 所示碱基序列的寡核苷酸引物组。

5) 作为引物, 含有序列 38、45、10 和 31 所示碱基序列的寡核苷酸引物组。

6) 作为引物, 含有序列 39、45、10 和 31 所示碱基序列的寡核苷酸引物组。

7) 作为引物, 含有序列 40、45、16 和 31 所示碱基序列的寡核苷酸引物组。

8) 作为引物, 含有序列 41、45、16 和 31 所示碱基序列的寡核苷酸引物组。

9) 作为引物, 含有序列 37、46、16 和 31 所示碱基序列的寡核苷酸引物组。

10) 作为引物, 含有序列 37、47、16 和 31 所示碱基序列的寡核苷酸引物组。

11) 作为引物, 含有序列 37、48、16 和 31 所示碱基序列的寡核苷酸引物组。

12) 作为引物, 含有序列 37、49、16 和 31 所示碱基序列の寡核苷酸引物组、

23. 由以下 1) ~ 16) 中所示的任一个构成的用于 GAPDH 检测的核酸扩增用引物组;

1) 作为引物含有序列 80、88、62 和 73 所示碱基序列的寡核苷酸

引物组。

2) 作为引物, 含有序列 81、89、63 和 75 所示碱基序列的寡核苷酸引物组。

3) 作为引物, 含有序列 86、95、58 和 76 所示碱基序列的寡核苷酸引物组。

4) 作为引物, 含有序列 87、96、64 和 77 所示碱基序列的寡核苷酸引物组。

5) 作为引物, 含有序列 81、89、62 和 75 所示碱基序列的寡核苷酸引物组。

6) 作为引物, 含有序列 82、89、62 和 75 所示碱基序列的寡核苷酸引物组。

7) 作为引物, 含有序列 83、89、63 和 75 所示碱基序列的寡核苷酸引物组。

8) 作为引物, 含有序列 83、89、62 和 75 所示碱基序列的寡核苷酸引物组。

9) 作为引物, 含有序列 84、89、62 和 75 所示碱基序列的寡核苷酸引物组。

10) 作为引物, 含有序列 85、89、62 和 75 所示碱基序列的寡核苷酸引物组。

12) 作为引物, 含有序列 81、90、63 和 75 所示碱基序列的寡核苷酸引物组。

13) 作为引物, 含有序列 81、91、63 和 75 所示碱基序列的寡核苷酸引物组。

14) 作为引物, 含有序列 81、92、63 和 75 所示碱基序列的寡核苷酸引物组。

15) 作为引物, 含有序列 81、93、63 和 75 所示碱基序列的寡核苷酸引物组。

16) 作为引物, 含有序列 81、94、63 和 75 所示碱基序列的寡核苷酸引物组。

24. 至少使用一个上述 1~7 中任一项所述的引物进行的核酸检测方法、

25. 使用上述 8~23 中任一项所述的引物组进行的核酸检测方法、

26. 上述 24 或 25 所述的核酸检测方法中使用的试剂和/或试剂盒、

27. 利用上述 24 或 25 所述的核酸检测方法的核酸检测系统。

附图的简单说明

图 1 是表示使用本发明 β -肌动蛋白用引物时的灵敏度的图 (实验例 2), 图 2 是表示在 LS180 细胞和 Raji 细胞培养液中使用本发明 β -肌动蛋白用引物进行测定时的结果 (实验例 3) 图。

图 3 是表示使用本发明 GAPDH 用引物时的灵敏度的图 (实验例 5)、图 4 是表示在 LS180 细胞和 Raji 细胞培养液中使用本发明 GAPDH 用引物进行测定时的结果 (实验例 6) 图。

发明的具体实施方式

(引物的设计)

本发明目的在于提供持家基因的核酸扩增法、更具体地说是提供可适用于 β -肌动蛋白基因或 GAPDH 基因的 mRNA 的核酸扩增法的核酸扩增用引物。

在 LAMP 法中使用的引物的基本思路就象专利文献 1 所述那样。

具体来说,由要扩增的靶 DNA 的 3' 末端侧开始依次规定称为 F3c、F2c、F1c 的区域,由 5' 末端侧开始依次规定称为 R3、R2、R1 的区域,至少对于这 6 个区域,选择实质上含有同一碱基序列、或实质上含有互补碱基序列的寡核苷酸链,至少设计 4 种引物。

所谓实质上同一碱基序列定义如下。即,以某一碱基序列为模板合成的互补链与目的碱基序列杂交,给出互补链合成的起点时,该序列相对于目的碱基序列实质上是同一序列。例如,所谓对于 F2 实质上同一的碱基序列,除了与 F2 完全同一的碱基序列外,还包括与 F2

杂交，具有作为给出可成为互补链合成起点的碱基序列的模板功能的碱基序列。

根据本发明，用于赋予构成寡核苷酸的碱基序列的特征中使用的同一、或互补的用语无论哪一个都不需要完全同一、或完全互补。即，所谓与某一序列同一也包括对可与某一序列杂交的碱基序列互补的序列。而，所谓互补的序列指的是在严格条件下可进行杂交，可提供成为互补链合成起点的3'末端的序列。

本发明的引物具有在以下所述的各种核酸合成反应中在所给予的环境下，一方面维持必要的特异性，一方面可与互补链进行碱基对结合的程度的链长。具体来说，做成5~200碱基、最好是10~50碱基对。由于催化依赖于序列的核酸合成反应的众所周知的聚合酶识别的引物链长最低为5个碱基左右，进行杂交的部分的链长必需为5个碱基以上。此外，为了维持作为碱基序列的特异性，希望维持在10个碱基以上的长度。另一方面，由于过长碱基序列通过化学合成制备困难，所以举出上述那样的希望的范围。

本发明中使用的所谓模板的用语指的是成为互补链合成的模板的一侧的核酸。具有与模板互补的碱基序列的互补链具有作为可与模板杂交的链的意思，两者的关系只不过始终是相对的关系。就是说，作为互补链合成的链可以起到再作为模板的功能。即，互补链可以变成模板。

在本发明中，由靶DNA碱基序列选择的引物构成各个FIP(正向内引物, forward inner primer)、F3引物(正向外引物, forward outer primer)、RIP(反向内引物, reverse inner primer)和R3引物(反向外引物, reverse outer primer)中的任一个。

FIP设计成在3'末端具有与靶DNA的F2c区域实质上互补的F2区域的碱基序列，在5'末端具有与靶DNA的F1c区域实质上相同的碱基序列。在这种情形下，在F2和F1c的序列间也可以含有不依赖于靶DNA的序列。不依赖于该靶DNA的序列的长度可容许为0~50碱基、优选是0~40碱基。

F3 引物可以设计为具有与 F3 区域实质上相同的碱基序列，而 F3 区域实质上与靶 DNA 的 F3c 区域互补。

RIP 可以设计为在 3' 末端具有与靶 DNA 的 R2c 区域实质上互补的 R2 区域的碱基序列，在 5' 末端具有与靶 DNA 的 R1c 区域实质上相同的碱基序列。RIP 也与 FIP 同样，在 R2 和 R1c 的序列间可以含有不依赖于靶 DNA 的序列。

R3 引物可以设计为具有与 R3 区域实质上相同的碱基序列，而 R3 区域实质上与靶 DNA 的 R3c 区域互补。

另外在 LAMP 法中，通过并用至少 1 种以上的回环引物，可以缩短扩增时间（国际公开 WO 02/24902 号公报）。所谓回环引物指的是哑铃构造的 5' 末端侧的回环的单链部分，具体来说，例如在 R1 区域和 R2 区域间、或 F1 区域和 F2 区域间具有互补的序列的引物。通过使用回环引物，可以增加 DNA 合成的起点。该回环引物设计成在 DNA 合成过程中可与生成的 FIP 或 RIP 不杂交的回环区域进行杂交。

为了构建上述引物，选择的基因区域要注意碱基组成、GC 含量、二级结构、T_m 值等，识别 DNA 区域的碱基序列长度可以选择碱基数至少在 5 个碱基以上、最好是 10~30 个碱基、更理想的是 17~25 个碱基的碱基序列。T_m 值一般可以通过 Nearest Neighbor 法求出。DNA 区域可以选择 T_m 值为 55~65℃、最好是 58~64℃、GC 含量为 40~70%、最好是 50~65% 的区域。

本发明的引物也根据上述原理选择区域、进行设计。

在本发明中可选择的 β-肌动蛋白基因的区域包括在序列 1 所示碱基序列的第 240~1060 位和/或其互补链的区域、最好是第 240~380 位或第 401~1060 位、更理想的是第 740~990 位的区域和/或该互补链的区域。

本发明中 β-肌动蛋白检测用引物是 1) 序列 1 所示碱基序列的第 240~1060 位、最好是第 240~380 位或第 401~1060 位、更理想的是

第 740 ~ 990 位的区域和/或该互补链的区域, 碱基数至少在 5 个以上的寡核苷酸, 2) 由序列 2 ~ 50 所示碱基序列构成的寡核苷酸、3) 上述 1) 或 2) 所述的寡核苷酸的互补链、4) 在严格条件下可与上述 1) ~ 3) 中任一个所述寡核苷酸杂交的寡核苷酸、或、5) 含有上述 1) ~ 4) 中所述寡核苷酸中 1 个至数个碱基被变异(置换、缺失、插入或付加)的碱基序列的寡核苷酸, 可从中选择、设计用作引物。

而本发明中可选择的 GAPDH 基因的区域包括在序列 51 所示碱基序列的第 110 ~ 450 位的区域和/或该互补链的区域。

本发明中的 GAPDH 的引物是 1) 序列 51 所示碱基序列的第 110 ~ 450 位的区域和/或该互补链的区域, 碱基数至少在 5 以上的寡核苷酸, 2) 由序列 52 ~ 96 所示碱基序列构成的寡核苷酸、3) 上述 1) 或 2) 所述的寡核苷酸的互补链、4) 在严格条件下可与上述 1) ~ 3) 中任一个所述的寡核苷酸杂交的寡核苷酸、或、5) 含有上述 1) ~ 4) 中所述寡核苷酸中 1 个至数个碱基被变异(置换、缺失、插入或付加)的碱基序列的寡核苷酸, 可从中选择、设计用作引物。

寡核苷酸可以通过众所周知的方法制造, 例如可以通过化学合成制造。或者通过限制性内切酶等切天然核酸, 可以使之变成或连接成上述那样的碱基序列的构成。具体来说, 可以通过寡核苷酸合成装置 (Applied Biosystems 公司生产 Expedite Model 8909 DNA 合成仪) 等进行合成。另外, 变异(置换、缺失、插入或付加) 1 至数个碱基的寡核苷酸的合成法也可以使用众所周知的制造方法。另外, 可以单独或适当组合使用部位特异的变异导入法、基因同源重组法、引物延伸法或 PCR 法, 例如根据 *Molecular Cloning; A Laboratory Manual*, 2 版、Sambrook 等人编、Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989 年; [*Laboratory Manual 基因工程*], 村松正实编、丸善株式会社、1988 年; [*PCR Technology、DNA 扩增的原理和应用*], Ehrlich, HE. 编、Stockton Press、1989 年等记载的方

法，或改变的这些方法实施，例如可以利用 Ulmer 的技术 (Science (1983) 219:666)。

严格杂交条件可以选择一般都知道的条件。举一个例子，在含有 50% 甲酰胺、5×SSC (150mM NaCl、15mM 柠檬酸三钠)、50mM 磷酸钠、pH7.6、5×Denhardt 溶液、10% 葡聚糖硫酸酯、和 20μg/ml 的 DNA 的溶液中，于 42℃ 下杂交过夜后，于室温下在 2×SSC 的 0.1% SDS 中洗一次，然后在约 65℃ 下用 0.1×SSC 的 0.1% SDS 洗二次的条件。

在本发明应当被扩增的核酸的模板由于是持家基因的 mRNA，使用的引物需要设计成不扩增检体中含有的基因组 DNA。具体来说，希望本发明引物组中含有的至少一个引物是包含横跨例如 β-肌动蛋白或 GAPDH 的基因中多个外显子区域的引物。可以通过想办法将来自基因组 DNA 序列的扩增排除，有选择地扩增来自 β-肌动蛋白或 GAPDH 的 mRNA 的序列。

(引物组)

使用本发明引物进行核酸扩增时，将至少 2 种引物组合作为引物组使用。在 LAMP 法中、将至少 4 种引物 (FIP、F3 引物、RIP、R3 引物) 组合后作为引物组使用。另外也可以组合 1 种以上回环引物作为引物组使用。

(RT-LAMP 法)

RT-LAMP 法是以 RNA 为模板的 LAMP 法，LAMP 法的基本思路就象专利文献 1 所述那样。在 RT-LAMP 法中，在一个溶液中一方面由模板 RNA 合成 cDNA，一方面合成了 LAMP 法的起点结构。具体来说，以下的 1) 步骤后、通过反复进行 2) ~ 5) 步骤、反复进行 DNA 延伸，进行靶 DNA 的扩增。

1) FIP 结合模板 RNA 链，与模板 RNA 链互补的 DNA 链延伸。该反应使用逆转录酶、例如来自 AMV 的逆转录酶等。

2) F3 引物将上述 1) 中合成的从 FIP 开始的 DNA 链从模板 RNA 剥下, 与模板 RNA 链互补的 DNA 链延伸。以后 DNA 链的延伸由 DNA 聚合酶催化进行。

3) RIP 与上述 2) 中剥下的 DNA 链结合后 DNA 链延伸。

4) R3 引物将上述 3) 中延伸的由 RIP 开始的 DNA 链剥下, 与来自 FIP 的 DNA 链互补的 DNA 链延伸, 合成 LAMP 法的起点结构。

5) 在上述 4) 中被剥下的 DNA 链两端序列由于在同样 DNA 链序列中含有互补的序列, 各自进行杂交, 两端具有回环结构。

另外, 存在着例如象 BcaDNA 聚合酶那样具有逆转录酶活性和 DNA 聚合酶活性两者活性的酶, 使用这样的酶时, 上述反应可以通过一个酶实施。

(测定方法)

在 LAMP 法中, 由于合成的 DNA 链具有与自身序列互补的序列, 所以其大部分可形成碱基对结合。利用该特征, 可以进行扩增产物的检测。在溴化乙锭、SYBER GREEN I、或 Pico Green 那样的双链嵌入剂 (インターカーレーター) 荧光色素的存在下, 使用本发明引物实施核酸扩增, 可以观察到随着产物增加, 荧光强度增大的现象。对该现象进行监测, 可同时追踪在闭链系中 DNA 的扩增和荧光的增加 (临床检查法提要、31 版 1318 页; 特开 2001-242169 号公报参照。以下简称称为「实时 (real time) 法」)。

(试剂、试剂盒等)

使用本发明引物进行核酸检测时需要的各种试剂类可以预先进行包装, 做成试剂盒。具体来说, 可以将作为本发明的互补链合成引物, 或作为置换用的引物所必需的各种寡核苷酸、具有逆转录活性的酶、成为互补链合成的底物的 dNTP、进行链置换型的互补链合成的 DNA 聚合酶、赋予酶反应合适条件的缓冲液、以及根据需要用于反应生成物检测所必需的试剂类做成试剂盒提供。

本发明涉及到核酸扩增用引物和引物组、以及使用这些引物的核酸检测方法、核酸检测方法中使用的检测试剂、核酸检测试剂盒和核酸检测系统整体。

(实施例)

以下、通过实施例对本发明进行具体说明，但本发明并不限于这些实施例。

(实施例1) β -肌动蛋白基因区域的选择

由序列1记载的碱基序列，使用探针设计软件研究适合LAMP法的 β -肌动蛋白基因区域的位置。基因区域的选择，F1c和R1c通过Tm值为58.5~63.5℃、F2和R2通过Tm值为61.5~62.5℃、F3和R3通过Tm值为58.5~62.5℃选择基因区域，结果选择了如下所示序列1记载的碱基序列上第240~1060位区域和其互补链的区域中含有的序列。

F1c: 位于序列1记载序列的互补链中的基因区域

343-327 5'-tggccttgggttcagg-3' (序列2)

400-381 5'-cgtacatggctggggtgttg-3' (序列3)

822-803 5'-gatgccacaggactccatgc-3' (序列4)

838-817 5'-tgaaggtagtttcgtggatgcc-3' (序列5)

922-904 5'-cagggtacatggtggtgcc-3' (序列6)

F2 : 序列1记载的序列上的基因区域

265-284 5'-accttctacaatgagctgcg-3' (序列7)

341-357 5'-ccaaccgcgagaagatg-3' (序列8)

748-766 5'-attggcaatgagcggttcc-3' (序列9)

750-766 5'-tggcaatgagcggttcc-3' (序列10)

774-790 5'-tgaggcactcttccagc-3' (序列11)

782-799 5'-tcttccagccttccctcc-3' (序列12)

851-868 5'-agtgtgacgtggacatcc-3' (序列13)

F3 : 序列 1 记载的序列上的基因区域**240-259 5'-cgacatggagaaaatctggc-3' (序列 14)****274-290 5'-aatgagctgcgtgtggc-3' (序列 15)****718-734 5'-tacgagctgcctgacgg-3' (序列 16)****750-766 5'-tggcaatgagcggttcc-3' (序列 10)****818-837 5'-gcatccacgaaactaccttc-3' (序列 17)****R1c: 序列 1 记载的序列上的基因区域****346-366 5'-cgcgagaagatgaccagatc-3' (序列 18)****402-423 5'-tgctatccaggctgtgctatcc-3' (序列 19)****848-868 5'-tgaagtgtgacgtggacatcc-3' (序列 20)****857-876 5'-acgtggacatccgcaaagac-3' (序列 21)****925-945 5'-attgccgacaggatgcagaag-3' (序列 22)****R2 : 处于序列 1 记载的序列的互补链中的基因区域****414-396 5'-agcctggatagcaacgtac-3' (序列 23)****461-444 5'-tccatcacgatgccagtg-3' (序列 24)****921-905 5'-agggtacatggtggtgc-3' (序列 25)****925-909 5'-tgccagggtacatggtg-3' (序列 26)****929-911 5'-gcaatgccagggtacatgg-3' (序列 27)****1011-994 5'-gtacttgcgctcaggagg-3' (序列 28)****R3 : 处于序列 1 记载的序列的互补链中的基因区域****454-438 5'-cgatgccagtggtagcg-3' (序列 29)****497-480 5'-tagatgggcacagtgtgg-3' (序列 30)****947-930 5'-tccttctgcatcctgtcg-3' (序列 31)****1059-1043 5'-ctggaaggtggacagcg-3' (序列 32)****loop F: 处于序列 1 记载的序列的互补链中的基因区域****816-801 5'-acaggactccatgccc-3' (序列 33)****loop R: 序列 1 记载的序列上的基因区域****878-895 5'-tgtacgccaacacagtgc-3' (序列 34)**

(实施例2) β -肌动蛋白用引物的设计

从选择区域的序列得到适用于 LAMP 法的 β -肌动蛋白用的如下核酸扩增用引物。

FIP: (连接区域 F1c 的碱基序列和 F2 的碱基序列的引物)

AFA-1 (序列 35) 连接 序列 2 和 7 的序列

AFA-2 (序列 36) 连接 序列 3 和 8 的序列

AFA-4 (序列 37) 连接 序列 5 和 11 的序列

AFA-4a (序列 38) 连接 序列 5 和 12 的序列

AFA-4c (序列 39) 连接 序列 5 和 10 的序列

AFA-4d (序列 40) 连接 序列 4 和 9 的序列

AFA-4e (序列 41) 连接 序列 4 和 10 的序列

AFA-6 (序列 42) 连接 序列 6 和 13 的序列

RIP: (连接区域 R1c 的碱基序列和 R2 的碱基序列的引物)

ARA-1 (序列 43) 连接序列 18 和 23 的序列

ARA-2 (序列 44) 连接 序列 19 和 24 的序列

ARA-4 (序列 45) 连接 序列 20 和 25 的序列

ARA-4a (序列 46) 连接 序列 20 和 27 的序列

ARA-4b (序列 47) 连接 序列 20 和 26 的序列

ARA-4d (序列 48) 连接 序列 21 和 27 的序列

ARA-4e (序列 49) 连接 序列 21 和 26 的序列

ARA-6 (序列 50) 连接 序列 22 和 28 的序列

F3 引物 : (与 F3 区域的碱基序列同一的序列)

AF3-1 (序列 14)

AF3-2 (序列 15)

AF3-4 (序列 10)

AF3-6 (序列 17)

AF3-9 (序列 16)

R3 引物: (与 R3 区域的碱基序列同一的序列)

AR3-1 (序列 29)

AR3-2 (序列 30)

AR3-4 (序列 31)

AR3-6 (序列 32)

回环引物:

(与 loop F 或 loop R 区域的碱基序列同一的序列)

AD-LPF1 (序列 33)

AD-LPR1 (序列 34)

(实施例 3) GAPDH 基因区域的选择

由序列 51 记载碱基序列, 利用探针设计软件研究适合于 LAMP 法的 GAPDH 基因区域的位置。基因区域的选择, F1c 和 R1C 通过 Tm 值为 58.5~63.5°C、F2 和 R2 通过 Tm 值为 61.5~62.5°C、F3 和 R3 通过 Tm 值为 58.5~62.5°C 选择基因区域, 结果选择了如下所示的序列 51 记载的碱基序列上第 110~450 位的区域含有的序列。

F1c: 位于序列 51 记载的序列的互补链中的基因区域

213-192 5'-tccattgatgacaagcttcccg-3' (序列 52)

236-217 5'-tcttgggaagatgggtgatggg-3' (序列 53)

246-228 5'-gggatctcgctcctggaag-3' (序列 54)

284-265 5'-acgtactcagcgcagcagc-3' (序列 55)

335-316 5'-aatgagccccagccttctc-3' (序列 56)

F2 : 序列 51 记载的序列上的基因区域

152-169 5'-ccacccatggcaaatcc-3' (序列 57)

163-180 5'-aaattccatggcaccgtc-3' (序列 58)

179-195 5'-tcaaggctgagaacggg-3' (序列 59)

217-235 5'-cccataccatcttcagg-3' (序列 60)

276-293 5'-tgagtacgtcgtggagtc-3' (序列 61)

F3 : 序列 51 记载的序列上的基因区域

103-120 5'-gacccttcattgacctc-3' (序列 62)

- 159-176 5'-tggcaaattccatggcac-3' (序列 63)
- 163-180 5'-aaattccatggcaccgtc-3' (序列 58)
- 227-244 5'-tcttcaggagcgagatc-3' (序列 64)
- R1c : 序列 51 记载的序列上的基因区域**
- 216-235 5'-tcccatcaccatcttcagg-3' (序列 65)
- 248-268 5'-ccaaaatcaagtggggcgatg-3' (序列 66)
- 254-271 5'-tcaagtggggcgatgctg-3' (序列 67)
- 305-323 5'-tcaccaccatggagaaggc-3' (序列 68)
- 338-354 5'-aggggggagccaaaagg-3' (序列 69)
- R2 : 处于序列 51 记载的序列的互补链上的基因区域**
- 295-279 5'-tggactccacgacgtac-3' (序列 70)
- 305-289 5'-aagacgccagtgactc-3' (序列 71)
- 310-294 5'-tggtgaagacgccagt-3' (序列 72)
- 324-308 5'-agccttctccatggtg-3' (序列 73)
- 327-311 5'-cccagccttctccatg-3' (序列 74)
- 365-346 5'-gagatgatgacccttttggc-3' (序列 75)
- 399-383 5'-catgacgaacatggggg-3' (序列 76)
- R3 : 处于序列 51 记载的序列的互补链上的基因区域**
- 324-308 5'-agccttctccatggtg-3' (序列 73)
- 365-346 5'-gagatgatgacccttttggc-3' (序列 75)
- 399-383 5'-catgacgaacatggggg-3' (序列 76)
- 445-426 5'-tgctgatgatcttgaggctg-3' (序列 77)
- loop F: 处于序列 51 记载的序列的互补链上的基因区域**
- 227-212 5'-atggtgatgggatttc-3' (序列 78)
- loop R: 序列 51 记载的序列上的基因领域**
- 275-293 5'-ctgagtacgtcgtggagtc-3' (序列 79)

(实施例 4) GAPDH 引物的设计

从选择的区域的序列得到适用于 LAMP 法的 GAPDH 用的以下核

酸扩增用引物。

FIP: (连接区域 F1c 的碱基序列和 F2 的碱基序列的引物)

FA-2 (序列 80) 连接序列 52 和 57 的序列

FA-3 (序列 81) 连接序列 54 和 59 的序列

FA-3b (序列 82) 连接序列 54 和 58 的序列

FA-3d (序列 83) 连接序列 53 和 59 的序列

FA-3e (序列 84) 连接序列 53 和 58 的序列

FA-3g (序列 85) 连接序列 53 和 57 的序列

FA-5 (序列 86) 连接序列 55 和 60 的序列

FA-7 (序列 87) 连接序列 56 和 61 的序列

RIP: (连接区域 R1c 的碱基序列和 R2 的碱基序列的引物)

RA-2 (序列 88) 连接序列 65 和 80 的序列

RA-3 (序列 89) 连接序列 67 和 83 的序列

RA-3a (序列 90) 连接序列 67 和 84 的序列

RA-3b (序列 91) 连接序列 67 和 82 的序列

RA-3c (序列 92) 连接序列 67 和 81 的序列

RA-3d (序列 93) 连接序列 66 和 83 的序列

RA-3e (序列 94) 连接序列 66 和 84 的序列

RA-5 (序列 95) 连接序列 68 和 75 的序列

RA-7 (序列 96) 连接序列 69 和 76 的序列

F3 : (与 F3 领域的碱基序列同一的序列)

F3-3 (序列 63)

F3-4 (序列 68)

F3-6 (序列 64)

F3-8 (序列 62)

R3 : (与 R3 区域的碱基序列同一的序列)

R3-2 (序列 73)

R3-3 (序列 75)

R3-5 (序列 76)

R3-7 (序列 77)

回环引物:

(与 loop F 或 loop R 区域的碱基序列同一的序列)

GC-LPF1 (序列 78)**GC-LPR1 (序列 79)****(实验例 1)**

对使用以表 1 各组合的实施例 2 记载的 β -肌动蛋白用引物利用 RT-LAMP 法从开始反应后直至确认扩增为止所需要的时间进行研究。

1) 人 β -肌动蛋白的 mRNA 样品

作为人 β -肌动蛋白的模板使用市售的人总 RNA (来自 Raji 细胞、ABI 公司生产)。

2) β -肌动蛋白用引物

各引物使用 (表 1) 的组合。

(表 1) 引物组和扩增确认时间

FIP	RIP	F3 引物	R3 引物	扩增确认时间 (分)
AFA-1	ARA-1	AF3-1	AR3-1	35
AFA-2	ARA-2	AF3-2	AR3-2	34
AFA-4	ARA-4	AF3-4	AR3-4	25
AFA-6	ARA-6	AF3-6	AR3-6	45
AFA-4a	ARA-4	AF3-4	AR3-4	37
AFA-4c	ARA-4	AF3-9	AR3-4	33
AFA-4d	ARA-4	AF3-9	AR3-4	28
AFA-4e	ARA-4	AF3-9	AR3-4	28
AFA-4	ARA-4a	AF3-4	AR3-4	40
AFA-4	ARA-4b	AF3-4	AR3-4	26
AFA-4	ARA-4d	AF3-4	AR3-4	40
AFA-4	ARA-4e	AF3-4	AR3-4	31

3) 反应液组成

dNTPs (GIBCO 公司生产)				0.4 mM
MgSO ₄				2 mM
二硫苏糖醇 (dithiothreitol)				5 mM
甜菜碱 (betaine) (Sigma 公司生产)				640 mM
Thermopol buffer (New England BioLabs 公司生产)				
AMV 逆转录酶(Promega 公司生产)				1.25U
Bst DNA 聚合酶 (New England BioLabs 公司生产)				16U
溴化乙锭(ethidium bromide)				0.125mg/ml
各引物				
FIP	40pmol、	RIP		40pmol
F3 引物	5pmol、	R3 引物		5pmol

4) RT-LAMP 法

向含有上述 4 种引物的反应液 23 μ l 中添加 RNA 样品 2 μ l (含有 20ng 的人总 RNA), 于 65 $^{\circ}$ C 加温 1 小时。

5) 扩增的确认

扩增产物由于具有双链结构, 溴化乙锭嵌入后发荧光。该荧光强度的增加用 ABI 公司生产 PRISM7700 通过实时 (real time) 法进行测定。

6) 结果

表 1 给出了使用各引物组反应时直至确认 β -肌动蛋白扩增为止的时间。该结果表明, 确认扩增在各引物组中最大为 45 分, 大多数情形是在 30 分以内。

(实验例 2)

在实验例 1 中研究的 β -肌动蛋白用引物组中选择确认在最短时间扩增的引物组, 再使用组合有回环引物的引物组, 研究利用 RT-LAMP 法测定时的灵敏度。

1) 人 β -肌动蛋白的 mRNA 样品

与实验例 1 同样进行。

2) 引物组

(表 2) 引物组

FIP	RIP	F3 引物	R3 引物	回环引物 F	回环引物 R
AFA-4	ARA-4	AF3-4	AR3-4	AD-LPF1	AD-LPR1

3) 反应液组成

向与实验例 1 同样的组成中再加入终浓度各为 5pmol 的 F3 回环引物和 R3 回环引物。

4) RT-LAMP 法

与实验例 1 同样进行。向含有上述 6 种引物的反应液 23 μ l 中添加 RNA 样品 2 μ l (含有 20ng 的人总 RNA), 于 65 $^{\circ}$ C 加温 1 小时。

5) 扩增的确认

与实验例 1 同样进行。

6) 结果

图 1 给出了研究结果。该结果表明, β -肌动蛋白基因的 mRNA 模板量越多, 越可确认在短时间扩增。即使在模板量为 0.02ng 时 30 分以内也确认扩增, 模板量为 20ng 时 15 分左右可确认扩增。

(实验例 3)

研究在 LS180 细胞 (大肠癌细胞株) 和 Raji 细胞 (Burkitt 淋巴瘤细胞株) 的培养细胞中进行 β -肌动蛋白的扩增。

即、对于细胞角蛋白为阳性的 LS180 细胞溶液以及细胞角蛋白在用阴性的 Raji 细胞溶液稀释情形的各浓度 LS180 细胞溶液样品中进行 β -肌动蛋白的扩增进行研究, 研究在测定细胞角蛋白的肿瘤标志时作为数据修正对照能否使用 β -肌动蛋白。

1) 样品

制备 LS180 细胞和 Raji 细胞的总细胞数为 8000 的样品。使总细胞数 8000 中的 LS180 细胞数为 8000、800、80、8 和 0。

2) β -肌动蛋白用引物

选择与实验例 2 同样的引物。

3) 反应液组成

使用与实验例 2 同样组成的反应液。

4) RT-LAMP 法

与实验例 2 同样进行。

5) 核酸的检测

与实验例 2 同样向含有 6 种引物的反应液 23 μ l 中添加 2 μ l 细胞的悬浮液, 于 65 $^{\circ}$ C 加温 1 小时。

6) 结果

结果如图 2 所示。其结果即使当 LS180 细胞和 Raji 细胞的比率不同时, β -肌动蛋白在 15 分左右也可确认扩增。该结果表明, 不管有无肿瘤标志, 也可确认在人细胞中 β -肌动蛋白进行了组成表达, β -肌动蛋白可以作为 LAMP 法中数据修正的对照使用。

(实验例 4)

对以表 3 记载的各组合使用实施例 4 记载的 GAPDH 用引物, 利用 RT-LAMP 法从反应开始后直至确认扩增为止需要的时间进行研究。

1) GAPDH 的 mRNA 样品

作为 GAPDH 的模板使用市售的人总 RNA(来自 Raji 细胞、ABI 公司生产)。

2) GAPDH 用引物

各引物使用(表 3)的组合引物。

(表3) 引物组和扩增确认时间

FIP	RIP	F3 引物	R3 引物	扩增确认时间(分)
FA-2	RA-2	F3-8	R3-2	40
FA-3	RA-3	F3-3	R3-3	20
FA-5	RA-5	F3-4	R3-5	50
FA-7	RA-7	F3-6	R3-7	45
FA-3	RA-3	F3-8	R3-3	18
FA-3b	RA-3	F3-8	R3-3	21
FA-3d	RA-3	F3-3	R3-3	10
FA-3d	RA-3	F3-8	R3-3	10
FA-3e	RA-3	F3-8	R3-3	42
FA-3g	RA-3	F3-8	R3-3	32
FA-3	RA-3a	F3-3	R3-3	27
FA-3	RA-3b	F3-3	R3-3	21
FA-3	RA-3c	F3-3	R3-3	28
FA-3	RA-3d	F3-3	R3-3	22
FA-3	RA-3e	F3-3	R3-3	33

3) 反应液组成

使用与实验例 1 同样组成的反应液。

4) RT-LAMP 法

与实验例 1 同样进行。向含有上述 4 种引物的反应液 23 μ l 中添加 RNA 样品 2 μ l (含有 20ng 的人总 RNA)、于 65 $^{\circ}$ C 下加温 1 小时。

5) 扩增的确认

与实验例 1 同样进行。

6) 结果

表 3 给出了使用各引物组反应时直至确认 GAPDH 扩增为止的时间。其结果表明, 扩增在各引物组中最大为 45 分, 大部分情形在 30 分以内。

(实验例 5)

实验例 4 中研究的 GAPDH 用引物组中, 选择在最短时间内确认扩增的引物组, 再使用组合有回环引物的引物组, 研究通过 RT-LAMP 法进行测定时的灵敏度。

1) 人 GAPDH 的 mRNA 样品

作为 GAPDH 模板、使用市售人总 RNA (来自 Raji 细胞、ABI 公司生产)。

2) 引物组

(表 4) 引物组

FIP	RIP	F3 引物	R3 引物	回环引物 F	回环引物 R
FA-3d	RA-3	F3-3	R3-3	GC-LPF1	GC-LPR1

3) 反应液组成

使用与实验例 2 同样组成的反应液。

4) RT-LAMP 法

与实验例 2 同样进行。

5) 核酸的检测

与实验例 2 同样进行。

6) 结果

图 3 给出了研究结果。该结果表明, GAPDH 的 mRNA 模板量越多, 确认越可在短时间扩增。而且即使模板量为 0.02ng 时也可确认在 30 分以内进行了扩增, 模板量为 20ng 时可确认 10 分左右就扩增了。

(实验例 6)

在 LS180 细胞 (大肠癌细胞株) 和 Raji 细胞 (Burkitt 淋巴瘤细胞株) 的培养细胞中进行 GAPDH 扩增研究。

即, 对于细胞角蛋白在用阳性的 LS180 细胞溶液以及细胞角蛋白用阴性的 Raji 细胞溶液稀释的情形的各浓度 LS180 细胞溶液样品中进行 GAPDH 扩增的研究, 研究作为数据修正的对照在测定细胞角蛋白的肿瘤标志时能否使用 GAPDH。

1) 样品

制备 LS180 细胞和 Raji 细胞的总细胞数为 8000 的样品。使总细胞数 8000 中的 LS180 细胞数为 8000、800、80、8 和 0。

2) GAPDH 用引物组

选择与实验例 5 同样的引物组。

3) 反应液组成

使用与实验例 2 同样组成的反应液。

4) RT-LAMP 法

与实验例 2 同样进行。向与实验例 5 同样的含有 6 种引物反应液 23 μ l 中添加细胞悬浮液 2 μ l, 于 65 $^{\circ}$ C 加温 1 小时。

5) 核酸的检测

与实验例 2 同样进行。

6) 结果

图 4 给出了实验结果。该结果表明, 即使 LS180 细胞和 Raji 细胞的比率不同时, 也可确认 GAPDH 10 分左右扩增。这表明, 不管有无肿瘤标志, 都可确认人细胞中 GAPDH 进行了组成表达, 作为 LAMP 法中的数据修正对照可以使用 GAPDH。

产业上利用的可能性

就象以上说明的那样, 如果使用本发明的引物或引物组, 实施 LAMP 法, 最快时, 15 分以内就可确认 β -肌动蛋白或 GAPDH 的扩增。

另外不管有无细胞角蛋白那样的肿瘤标志, 可知通过确认来自人细胞的 β -肌动蛋白或 GAPDH 的存在, 可以使用他们作为 LAMP 法中数据修正的对照。

所以, 使用本发明的引物、或引物组, 在用核酸扩增手段进行癌转移诊断时, 可以缩短诊断需要的时间, 是具有可靠性的诊断。

<110> 希森美康株式会社

<120> 用于持家基因 mRNA 检测的核酸扩增用引物和使用该引物的检查方法

<130> GP02-1019

<150> JP P2002-043866

<151> 2002-02-20

<150> JP P2002-043867

<151> 2002-02-20

<160> 96

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 1128

<212> DNA

<213> 人 (Homo sapiens)

<400> 1

atggatgatg atatcgccgc gctcgtcgtc gacaacggct ccggcatgtg caaggccggc 60

ttcgcgggcg acgatgcccc ccgggccgtc ttcccctcca tcgtggggcg ccccaggcac 120

cagggcgtga tggtagggcat gggtcagaag gattcctatg tgggacgacga ggcccagagc 180

aagagaggca tcctcacctt gaagtacccc atcgagcacg gcacgtcac caactgggac 240

gacatggaga aaatctggca ccacacctt tacaatgagc tgcgtgtggt tcccaggagg 300

caccccgtgc tgctgaccga ggccccctg aacccaagg ccaaccgca gaagatgacc 360

cagatcatgt ttgagacctt caacacccca gccatgtacg ttgctatcca ggctgtgcta 420

tccctgtacg cctctggccg taccactggc atcgtgatgg actccgggta cggggtcacc	480
cacactgtgc ccatctacga ggggtatgcc ctccccatg ccatcctgcg tctggacctg	540
gttgccggg acctgactga ctacctcatg aagatcctca ccgagcggg ctacagcttc	600
accaccacgg ccgagcggga aatcgtgcgt gacattaagg agaagctgtg ctacgtcgcc	660
ctggacttcg agcaagagat ggccacggct gttccagct cctccctgga gaagagctac	720
gagctgcctg acggccaggt catcaccatt ggcaatgagc gttccgctg ccctgaggca	780
ctttccagc cttccttctt gggcatggag tcctgtggca tccacgaaac tacctcaac	840
tccatcatga agtgtgacgt ggacatccgc aaagacctgt acgccaacac agtgcgtctt	900
ggcggcacca ccatgtaccc tggcattgcc gacaggatgc agaaggagat cactgccctg	960
gcaccacgca caatgaagat caagatcatt gctcctctg agcgcaagta ctccgtgtgg	1020
atcggcgget ccatcctggc ctgcgtgtcc acctccagc agatgtggat cagcaagcag	1080
gagtatgacg agtccggccc ctccatcgtc caccgcaaat gcttctag	1128

<210> 2

<211> 16

<212> DNA

<213> 人工合成序列

<220>

<223> 基于 β 肌动蛋白设计的 DNA

<400> 2

tggccttggg ttcagg

16

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工合成序列

<220>

<223> 基于 β 肌动蛋白设计的 DNA

<400> 3

cgtacatggc tggggtgttg

20

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工合成序列

<220>

<223> 基于 β 肌动蛋白设计的 DNA

<400> 4

gatgccacag gactccatgc

20

<210> 5

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工合成序列

<220>

<223> 基于 β 肌动蛋白设计的 DNA

<400> 5

tgaaggtagt ttcgtggatg cc

22

<210> 6	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工合成序列	
<220>	
<223> 基于 β 肌动蛋白设计的 DNA	
<400> 6	
cagggtacat ggtggtgcc	19
<210> 7	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工合成序列	
<220>	
<223> 基于 β 肌动蛋白设计的 DNA	
<400> 7	
accttctaca atgagctgcg	20
<210> 8	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> 人工合成序列	
<220>	
<223> 基于 β 肌动蛋白设计的 DNA	
<400> 8	
ccaaccgcga gaagatg	17
<210> 9	

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工合成序列

<220>

<223> 基于 β 肌动蛋白设计的 DNA

<400> 9

attggcaatg agcggttcc

19

<210> 10

<211> 17

<212> DNA

<213> 人工合成序列

<220>

<223> 基于 β 肌动蛋白设计的 DNA

<400> 10

tggcaatgag cggttcc

17

<210> 11

<211> 17

<212> DNA

<213> 人工合成序列

<220>

<223> 基于 β 肌动蛋白设计的 DNA

<400> 11

tgaggcactc ttccagc

17

<210> 12

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工合成序列

<220>

<223> 基于 β 肌动蛋白设计的 DNA

<400> 12

tcttcagcc ttccttcc

18

<210> 13

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工合成序列

<220>

<223> 基于 β 肌动蛋白设计的 DNA

<400> 13

agtgtgacgt ggacatcc

18

<210> 14

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工合成序列

<220>

<223> 基于 β 肌动蛋白设计的 DNA

<400> 14

cgacatggag aaaatctggc

20

<210> 15

<211> 17

<212> DNA

<213> 人工合成序列

<220>

<223> 基于 β 肌动蛋白设计的 DNA

<400> 15

aatgagctgc gtgtggc

17

<210> 16

<211> 17

<212> DNA

<213> 人工合成序列

<220>

<223> Designed DNA based on beta-actin

<400> 16

tacgagctgc ctgacgg

17

<210> 17

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工合成序列

<220>

<223> 基于 β 肌动蛋白设计的 DNA

<400> 17

gcatccacga aactaccttc

20

<210> 18

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工合成序列

<220>

<223> 基于 β 肌动蛋白设计的 DNA

<400> 18

cgcgagaaga tgaccagat c

21

<210> 19

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工合成序列

<220>

<223> 基于 β 肌动蛋白设计的 DNA

<400> 19

tgctatccag gctgtgctat cc

22

<210> 20

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工合成序列

<220>

<223> 基于 β 肌动蛋白设计的 DNA

<400> 20

tgaagtgtga cgtggacatc c

21

<210> 21

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工合成序列

<220>

<223> 基于 β 肌动蛋白设计的 DNA

<400> 21

acgtggacat ccgcaaagac

20

<210> 22

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工合成序列

<220>

<223> 基于 β 肌动蛋白设计的 DNA

<400> 22

attgccgaca ggatgcagaa g

21

<210> 23

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工合成序列

<220>

<223> 基于 β 肌动蛋白设计的 DNA

<400> 23

agcctggata gcaacgtac

19

<210> 24

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工合成序列

<220>

<223> 基于 β 肌动蛋白设计的 DNA

<400> 24

tccatcacga tgccagtg

18

<210> 25

<211> 17

<212> DNA

<213> 人工合成序列

<220>

<223> 基于 β 肌动蛋白设计的 DNA

<400> 25

agggtacatg gtggtgc

17

<210> 26

<211> 17

<212> DNA

<213> 人工合成序列

<220>

<223> Designed DNA based on beta-actin

<400> 26

tgccagggta catggtg

17

<210> 27

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工合成序列

<220>

<223> 基于 β 肌动蛋白设计的 DNA

<400> 27

gcaatgccag ggtacatgg

19

<210> 28

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工合成序列

<220>

<223> 基于 β 肌动蛋白设计的 DNA

<400> 28

gtacttgccg tcaggagg

18

<210> 29

<211> 17

<212> DNA

<213> 人工合成序列

<220>

<223> 基于 β 肌动蛋白设计的 DNA

<400> 29

cgatgccagt ggtacgg

17

<210> 30

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工合成序列

<220>

<223> 基于 β 肌动蛋白设计的 DNA

<400> 30
tagatgggca cagtgtgg 18

<210> 31
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工合成序列

<220>
<223> 基于 β 肌动蛋白设计的 DNA

<400> 31
tccttctgca tcctgtcg 18

<210> 32
<211> 17
<212> DNA
<213> 人工合成序列

<220>
<223> 基于 β 肌动蛋白设计的 DNA

<400> 32
ctggaaggtg gacagcg 17

<210> 33
<211> 16
<212> DNA
<213> 人工合成序列

<220>
<223> 基于 β 肌动蛋白设计的 DNA

<400> 33

acaggactcc atgccc 16

<210> 34
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> 人工合成序列

<220>
 <223> 基于 β 肌动蛋白设计的 DNA

<400> 34
 tgtacgcca cacagtgc 18

<210> 35
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> 人工合成序列

<220>
 <223> 基于 β 肌动蛋白设计的 DNA

<400> 35
 tggccttggg ttcaggacct tctacaatga gctgcg 36

<210> 36
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> 人工合成序列

<220>
 <223> 基于 β 肌动蛋白设计的 DNA

<400> 36
 cgtacatggc tggggtgtg ccaaccgcga gaagatg 37

<210> 37

<211> 39

<212> DNA

<213> 人工合成序列

<220>

<223> 基于 β 肌动蛋白设计的 DNA

<400> 37

tgaaggtagt ttcgtggatg cctgaggcac tcttccagc

39

<210> 38

<211> 40

<212> DNA

<213> 人工合成序列

<220>

<223> 基于 β 肌动蛋白设计的 DNA

<400> 38

tgaaggtagt ttcgtggatg cctcttccag ccttccttcc

40

<210> 39

<211> 39

<212> DNA

<213> 人工合成序列

<220>

<223> 基于 β 肌动蛋白设计的 DNA

<400> 39

tgaaggtagt ttcgtggatg cctggcaatg agcggttcc

39

-
- <210> 40
<211> 37
<212> DNA
<213> 人工合成序列
- <220>
<223> 基于 β 肌动蛋白设计的 DNA
- <400> 40
gatgccacag gactccatgc tggcaatgag cggttcc 37
- <210> 41
<211> 39
<212> DNA
<213> 人工合成序列
- <220>
<223> 基于 β 肌动蛋白设计的 DNA
- <400> 41
gatgccacag gactccatgc attggcaatg agcggttcc 39
- <210> 42
<211> 38
<212> DNA
<213> 人工合成序列
- <220>
<223> 基于 β 肌动蛋白设计的 DNA
- <400> 42
gatgccacag gactccatgc agtgtgacgt ggacatcc 38

<210> 43

<211> 40

<212> DNA

<213> 人工合成序列

<220>

<223> 基于β肌动蛋白设计的DNA

<400> 43

cgcgagaaga tgaccagat cagcctggat agcaacgtac

40

<210> 44

<211> 40

<212> DNA

<213> 人工合成序列

<220>

<223> 基于β肌动蛋白设计的DNA

<400> 44

tgctatccag gctgtgctat cctccatcac gatgccagtg

40

<210> 45

<211> 38

<212> DNA

<213> 人工合成序列

<220>

<223> 基于β肌动蛋白设计的DNA

<400> 45

tgaagtgtga cgtggacatc cagggtacat ggtggtgc

38

<210> 46

<211> 40

<212> DNA

<213> 人工合成序列

<220>

<223> 基于 β 肌动蛋白设计的 DNA

<400> 46

tgaagtgtga cgtggacatc cgcaatgccca ggtacatgg

40

<210> 47

<211> 38

<212> DNA

<213> 人工合成序列

<220>

<223> 基于 β 肌动蛋白设计的 DNA

<400> 47

tgaagtgtga cgtggacatc ctgccagggt acatggtg

38

<210> 48

<211> 39

<212> DNA

<213> 人工合成序列

<220>

<223> 基于 β 肌动蛋白设计的 DNA

<400> 48

acgtggacat ccgcaaagac gcaatgccag ggtacatgg

39

<210> 49

<211> 37

<212> DNA	
<213> 人工合成序列	
<220>	
<223> 基于 β 肌动蛋白设计的 DNA	
<400> 49	
acgtggacat ccgcaaagac tgccagggta catggtg	37
<210> 50	
<211> 39	
<212> DNA	
<213> 人工合成序列	
<220>	
<223> 基于 β 肌动蛋白设计的 DNA	
<400> 50	
attgccgaca ggatgcagaa ggtacttgcg ctcaggagg	39
<210> 51	
<211> 1008	
<212> DNA	
<213> 人	
<400> 51	
atggggaagg tgaaggtcgg agtcaacgga tttggtcgta ttgggcgcct ggtcaccagg	60
gctgctttta actctggtaa agtggatatt gttgcatca atgaccctt cattgacctc	120
aactacatgg tttacatggt ccaatatgat tccacccatg gcaaattcca tggcacctc	180
aaggctgaga acgggaagct tgcacatcaat ggaaatccca tcaccatctt ccaggagcga	240
gatccctcca aatcaagtg gggcgatgct ggcgctgagt acgtcgtgga gtccactggc	300

gtcttcacca ccatggagaa ggctggggct catttgcagg ggggagccaa aagggtcatc 360
 atctctgccc cctctgctga tgccccatg ttctcatgg gtgtgaacca tgagaagtat 420
 gacaacagcc tcaagatcat cagcaatgcc tctgcacca ccaactgctt agcaccctg 480
 gccaaagtca tccatgacaa ctttggatc gtggaaggac tcatgaccac agtccatgcc 540
 atcaactgcca ccagaagac tgtggatggc cctccggga aactgtggcg tgatggccgc 600
 ggggctctcc agaacatcat cctgcctct actggcgctg ccaaggctgt gggcaagtc 660
 atccctgagc tgaacgggaa gctcactggc atggccttc gtgtccccac tgccaacgtg 720
 tcagtggagg acctgacctg ccgtctagaa aaacctgcca aatatgatga catcaagaag 780
 gtggtgaagc aggcgtcgga gggccccctc aaggcatcc tgggctacac tgagcaccag 840
 gtggtctcct ctgacttcaa cagegacacc cactcctcca cctttgacgc tggggctggc 900
 attgccctca acgaccactt tgtcaagctc atttctggt atgacaacga atttgctac 960
 agcaacaggg tggtagacct catgcccac atggcctcca aggagtaa 1008

<210> 52

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工合成序列

<220>

<223> 基于 GAPDH 设计的 DNA

<400> 52

tccattgatg acaagcttcc cg 22

<210> 53	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工合成序列	
<220>	
<223> 基于 GAPDH 设计的 DNA	
<400> 53	
tcctggaaga tggatgatggg	20
<210> 54	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工合成序列	
<220>	
<223> 基于 GAPDH 设计的 DNA	
<400> 54	
gggatctcgc tcctggaag	19
<210> 55	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工合成序列	
<220>	
<223> 基于 GAPDH 设计的 DNA	
<400> 55	
acgtactcag cgccagcatc	20

<210> 56

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工合成序列

<220>

<223> 基于 GAPDH 设计的 DNA

<400> 56

aaatgagccc cagccttctc

20

<210> 57

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工合成序列

<220>

<223> 基于 GAPDH 设计的 DNA

<400> 57

ccacccatgg caaattcc

18

<210> 58

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工合成序列

<220>

<223> 基于 GAPDH 设计的 DNA

<400> 58

aaattccatg gcaccgtc

18

<210> 59

<211> 17

<212> DNA

<213> 人工合成序列

<220>

<223> 基于 GAPDH 设计的 DNA

<400> 59

tcaaggctga gaacggg

17

<210> 60

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工合成序列

<220>

<223> 基于 GAPDH 设计的 DNA

<400> 60

cccatcacca tcttccagg

19

<210> 61

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工合成序列

<220>

<223> 基于 GAPDH 设计的 DNA

<400> 61

tgagtacgtc gtggagtc

18

<210> 62

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工合成序列

<220>

<223> 基于 GAPDH 设计的 DNA

<400> 62

gacccttca ttgacctc

18

<210> 63

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工合成序列

<220>

<223> 基于 GAPDH 设计的 DNA

<400> 63

tggcaaattc catggcac

18

<210> 64

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工合成序列

<220>

<223> 基于 GAPDH 设计的 DNA

<400> 64

tcttccagga gcgagatc

18

<210> 65

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工合成序列

<220>

<223> 基于 GAPDH 设计的 DNA

<400> 65

tcccatcacc atcttccagg

20

<210> 66

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工合成序列

<220>

<223> 基于 GAPDH 设计的 DNA

<400> 66

cctaaatcaa gtggggcgat g

21

<210> 67

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工合成序列

<220>

<223> 基于 GAPDH 设计的 DNA

<400> 67

tcaagtgggg cgatgctg

18

<210> 68

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工合成序列

<220>

<223> 基于 GAPDH 设计的 DNA

<400> 68

tcaccacat ggagaaggc

19

<210> 69

<211> 17

<212> DNA

<213> 人工合成序列

<220>

<223> 基于 GAPDH 设计的 DNA

<400> 69

aggggggagc caaaagg

17

<210> 70

<211> 17

<212> DNA

<213> 人工合成序列

<220>

<223> 基于 GAPDH 设计的 DNA

<400> 70

tggactccac gacgtac

17

<210> 71

<211> 17

<212> DNA

<213> 人工合成序列

<220>

<223> 基于 GAPDH 设计的 DNA

<400> 71

aagacgccag tggactc

17

<210> 72

<211> 17

<212> DNA

<213> 人工合成序列

<220>

<223> 基于 GAPDH 设计的 DNA

<400> 72

tggatgaagac gccagtg

17

<210> 73

<211> 17

<212> DNA

<213> 人工合成序列

<220>

<223> 基于 GAPDH 设计的 DNA

<400> 73

agccttctcc atggtgg

17

<210> 74

<211> 17

<212> DNA

<213> 人工合成序列

<220>

<223> 基于 GAPDH 设计的 DNA

<400> 74

cccagccttc tccatgg

17

<210> 75

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工合成序列

<220>

<223> 基于 GAPDH 设计的 DNA

<400> 75

gagatgatga cccttttggc

20

<210> 76

<211> 17

<212> DNA

<213> 人工合成序列

<220>

<223> 基于 GAPDH 设计的 DNA

<400> 76

catgacgaac atggggg

17

<210> 77

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工合成序列

<220>

<223> 基于 GAPDH 设计的 DNA

<400> 77	
tgctgatgat cttgaggctg	20
<210> 78	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> 人工合成序列	
<220>	
<223> 基于 GAPDH 设计的 DNA	
<400> 78	
atggtgatgg gatttc	16
<210> 79	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工合成序列	
<220>	
<223> 基于 GAPDH 设计的 DNA	
<400> 79	
ctgagtacgt cgtggagtc	19
<210> 80	
<211> 40	
<212> DNA	
<213> 人工合成序列	
<220>	
<223> 基于 GAPDH 设计的 DNA	

-
- <400> 80
tccattgatg acaagcttcc cgccacccat ggcaaattcc 40
- <210> 81
<211> 36
<212> DNA
<213> 人工合成序列
- <220>
<223> 基于 GAPDH 设计的 DNA
- <400> 81
gggatctcgc tcttgaagt caaggctgag aacggg 36
- <210> 82
<211> 37
<212> DNA
<213> 人工合成序列
- <220>
<223> 基于 GAPDH 设计的 DNA
- <400> 82
gggatctcgc tcttgaaga aattccatgg caccgtc 37
- <210> 83
<211> 37
<212> DNA
<213> 人工合成序列
- <220>
<223> 基于 GAPDH 设计的 DNA
- <400> 83

tcctggaaga tggatgatggg tcaaggctga gaacggg 37

<210> 84

<211> 38

<212> DNA

<213> 人工合成序列

<220>

<223> 基于 GAPDH 设计的 DNA

<400> 84

tcctggaaga tggatgatggg aaattccatg gcaccgtc 38

<210> 85

<211> 38

<212> DNA

<213> 人工合成序列

<220>

<223> 基于 GAPDH 设计的 DNA

<400> 85

tcctggaaga tggatgatggg ccacccatgg caaattcc 38

<210> 86

<211> 39

<212> DNA

<213> 人工合成序列

<220>

<223> 基于 GAPDH 设计的 DNA

<400> 86

acgtactcag cgccagcacc cccatcacca tcttccagg 39

<210>	87	
<211>	38	
<212>	DNA	
<213>	人工合成序列	
<220>		
<223>	基于 GAPDH 设计的 DNA	
<400>	87	
	aaatgagccc cagccttctc tgagtacgtc gtggagtc	38
<210>	88	
<211>	37	
<212>	DNA	
<213>	人工合成序列	
<220>		
<223>	Desigend DNA based on GAPDH	
<400>	88	
	tcccatcacc atcttccagg tggactccac gacgtac	37
<210>	89	
<211>	35	
<212>	DNA	
<213>	人工合成序列	
<220>		
<223>	基于 GAPDH 设计的 DNA	
<400>	89	
	tcaagtgggg cgatgctgag ccttctccat ggtgg	35

<210> 90

<211> 35

<212> DNA

<213> 人工合成序列

<220>

<223> 基于 GAPDH 设计的 DNA

<400> 90

tcaagtgggg cgatgctgcc cagccttctc catgg

35

<210> 91

<211> 35

<212> DNA

<213> 人工合成序列

<220>

<223> 基于 GAPDH 设计的 DNA

<400> 91

tcaagtgggg cgatgctgtg gtgaagacgc cagtg

35

<210> 92

<211> 35

<212> DNA

<213> 人工合成序列

<220>

<223> 基于 GAPDH 设计的 DNA

<400> 92

tcaagtgggg cgatgctgaa gacgccagtg gactc

35

<210> 93

<211> 38

<212> DNA

<213> 人工合成序列

<220>

<223> 基于 GAPDH 设计的 DNA

<400> 93

ccaaaatcaa gtggggcgat gaggccttctc catggtgg

38

<210> 94

<211> 38

<212> DNA

<213> 人工合成序列

<220>

<223> 基于 GAPDH 设计的 DNA

<400> 94

ccaaaatcaa gtggggcgat gccagcctt ctccatgg

38

<210> 95

<211> 39

<212> DNA

<213> 人工合成序列

<220>

<223> 基于 GAPDH 设计的 DNA

<400> 95

tcaccacat ggagaaggcg agatgatgac ccttttggc

39

<210> 96

<211> 34

<212> DNA

<213> 人工合成序列

<220>

<223> 基于 GAPDH 设计的 DNA

<400> 96

aggggggagc caaaaggcat gacgaacatg gggg

34

图1

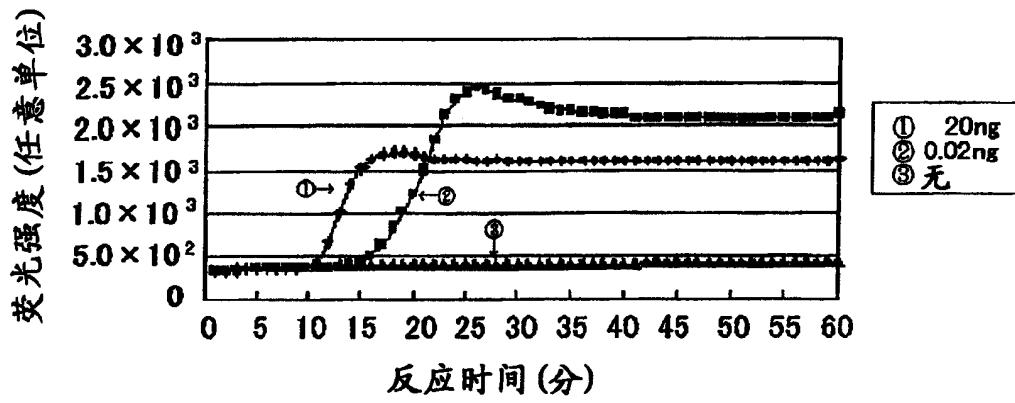


图2

