



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02803415.5

[43] 公开日 2004 年 3 月 24 日

[11] 公开号 CN 1484697A

[22] 申请日 2002.10.30 [21] 申请号 02803415.5

[30] 优先权

[32] 2001.11.8 [33] JP [31] 342709/2001

[32] 2002.5.8 [33] JP [31] 132402/2002

[86] 国际申请 PCT/JP02/11321 2002.10.30

[87] 国际公布 WO03/040367 日 2003.5.15

[85] 进入国家阶段日期 2003.7.2

[71] 申请人 三光纯药株式会社

地址 日本东京都

[72] 发明人 薄井贡 三塚真理 波木井千雅子

[74] 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任公司

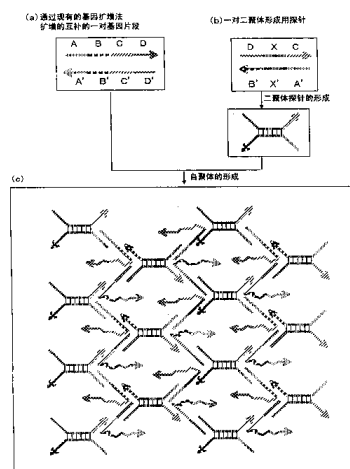
代理人 李香兰

权利要求书 6 页 说明书 32 页 序列表 8 页
附图 52 页

[54] 发明名称 通过基因扩增反应合成的寡核苷酸的自聚体形成方法、自聚体和基因的检出方法

[57] 摘要

本发明提供不用特殊的仪器或烦杂的操作而形成寡核苷酸的自聚体的方法、通过该自聚体的形成方法形成的自聚体、以及利用该自聚体的形成方法而低成本并且简便地检出被扩增的特定基因的方法。在通过寡核苷酸的自聚反应而形成自聚体的方法中，作为该寡核苷酸，含有通过基因扩增反应合成的寡核苷酸。利用所述的寡核苷酸的自聚体形成方法形成自聚体，通过检出形成的自聚体，而检出通过所述基因扩增反应合成的寡核苷酸。



ISSN 1008-4274

1.一种寡核苷酸的自聚体形成方法，是通过寡核苷酸的自聚反应而形成自聚体的方法，其特征在于，作为该寡核苷酸，含有通过基因扩增反应而合成的寡核苷酸。

2.根据权利要求1所述的寡核苷酸的自聚体形成方法，其特征在于，所述自聚体的形成方法，是利用多对由 n 处（ $n \geq 3$ ）的互补的碱基序列区构成的一对寡核苷酸探针，通过相互不同交叉地杂交，寡核苷酸自聚形成自聚体。

3.根据权利要求2所述的寡核苷酸的自聚体形成方法，其特征在于，所述一对寡核苷酸探针的至少一方，是通过含有所述 n 处（ $n \geq 3$ ）区的基因扩增反应而合成的寡核苷酸。

4. 根据权利要求2或3所述的一对寡核苷酸的自聚体形成方法，其特征在于，所述一对寡核苷酸探针的构成为，以1对1进行杂交时，在 n 处（ $n \geq 3$ ）互补的部分中必须每1处都能够特异地杂交。

5.根据权利要求2~4中任一项所述的寡核苷酸的自聚体形成方法，其特征在于，所述一对寡核苷酸探针的多对，是由该碱基序列区至少1处不同的 m （ $m \geq 2$ ）种的一对探针构成。

6. 根据权利要求2~5中任一项所述的寡核苷酸的自聚体形成方法，其特征在于，所述寡核苷酸探针是由选自DNA、RNA、PNA或LNA中任何一种的碱基构成。

7. 根据权利要求2~6中任一项所述的寡核苷酸的自聚体形成方法，其特征在于，在所述寡核苷酸探针的互补碱基序列区的端部上，至少配置1个G（鸟嘌呤）或C（胞嘧啶），所述探针在杂交时，在互补碱基序列区的端部至少形成一个G—C键。

8.根据权利要求1所述的寡核苷酸的自聚体形成方法，其特征在于，所述自聚体的形成方法，是具有：从含有把1号和2号的一对寡核苷酸的各寡核苷酸分成3'侧区、中央区和5'侧区3个区、使各寡核苷酸的中央区为互补碱基序列、使3'侧区和5'侧区为不互补碱基序列的多对二聚体形成

用探针的第1系统至第 $(2n-1)$ ($n \geq 1$) 系统依次形成的含有 n 个二聚体形成用探针系统;

从分别含有把1号和2号的一对寡核苷酸的各寡核苷酸分成3'侧区和5'侧区2个区、使各寡核苷酸的3'侧区和5'侧区为不互补碱基序列的多对交
5 联探针的第2系统至第 $2n$ 系统依次形成的含有 n 个交联探针系统;

且将此交联探针作为能够交联由该二聚体形成用探针形成的二聚体的碱基序列,

从而能够通过使该探针杂交,使寡核苷酸自聚而形成自聚体。

9.根据权利要求8所述的寡核苷酸的自聚体形成方法,其特征在于,
10 所述探针中的至少一个是通过基因扩增反应而合成的寡核苷酸。

10.根据权利要求8所述的寡核苷酸的自聚体形成方法,其特征在于,
所述 $n=1$,所述探针的碱基序列为分别使下列区:

第1系统的1号寡核苷酸的3'侧区与第2系统的1号寡核苷酸的3'侧区、
第1系统的2号寡核苷酸的5'侧区与第2系统的2号寡核苷酸的5'侧区、
15 第2系统的2号寡核苷酸的3'侧区与第1系统的2号寡核苷酸的3'侧区、
第2系统的1号寡核苷酸的5'侧区与第1系统的1号寡核苷酸的5'侧区,
成为互补的碱基序列。

11.根据权利要求8所述的寡核苷酸的自聚体形成方法,其特征在于,
所述 $n=1$,所述探针的碱基序列为分别使下列区:

20 第1系统的1号寡核苷酸的3'侧区与第2系统的1号寡核苷酸的3'侧区、
第1系统的2号寡核苷酸的5'侧区与第2系统的1号寡核苷酸的5'侧区、
第1系统的2号寡核苷酸的3'侧区与第2系统的2号寡核苷酸的3'侧区、
第1系统的1号寡核苷酸的5'侧区与第2系统的2号寡核苷酸的5'侧区,
成为互补的碱基序列。

25 12.根据权利要求8所述的寡核苷酸的自聚体形成方法,其特征在于,
所述 $n \geq 2$,所述探针的碱基序列是分别使下列区:

第 $(2n-3)$ 系统的1号寡核苷酸的3'侧区与第 $(2n-2)$ 系统的1号寡核苷酸的3'侧区、

30 第 $(2n-3)$ 系统的2号寡核苷酸的5'侧区与第 $(2n-2)$ 系统的2号寡核苷酸的5'侧区、

第 $(2n-2)$ 系统的2号寡核苷酸的3'侧区与第 $(2n-1)$ 系统的2号寡核苷酸的3'侧区、

第 $(2n-2)$ 系统的1号寡核苷酸的5'侧区与第 $(2n-1)$ 系统的1号寡核苷酸的5'侧区、

5 二聚体形成用探针的最后系统的1号寡核苷酸的3'侧区与交联探针的最后系统的1号寡核苷酸的3'侧区、

二聚体形成用探针的最后系统的2号寡核苷酸的5'侧区与交联探针的最后系统的2号寡核苷酸的5'侧区、

10 交联探针的最后系统的2号寡核苷酸的3'侧区与第1系统的2号寡核苷酸的3'侧区、

交联探针的最后系统的1号寡核苷酸的5'侧区与第1系统的1号寡核苷酸的5'侧区，成为互补的碱基序列。

13. 根据权利要求8所述的寡核苷酸的自聚体形成方法，其特征在于，所述 $n \geq 2$ 所述探针的碱基序列为分别使下列区：

15 第 $(2n-3)$ 系统的1号寡核苷酸的3'侧区与第 $(2n-2)$ 系统的1号寡核苷酸的3'侧区、

第 $(2n-3)$ 系统的2号寡核苷酸的5'侧区与第 $(2n-2)$ 系统的2号寡核苷酸的5'侧区、

20 第 $(2n-2)$ 系统的2号寡核苷酸的3'侧区与第 $(2n-1)$ 系统的2号寡核苷酸的3'侧区、

第 $(2n-2)$ 系统的1号寡核苷酸的5'侧区与第 $(2n-1)$ 系统的1号寡核苷酸的5'侧区、

二聚体形成用探针的最后系统的1号寡核苷酸的3'侧区与交联探针的最后系统的1号寡核苷酸的3'侧区、

25 二聚体形成用探针的最后系统的2号寡核苷酸的5'侧区与交联探针的最后系统的1号寡核苷酸的5'侧区、

交联探针的最后系统的2号寡核苷酸的3'侧区与第1系统的2号寡核苷酸的3'侧区、

30 交联探针的最后系统的2号寡核苷酸的5'侧区与第1系统的1号寡核苷酸的5'侧区，成为互补的碱基序列。

14.根据权利要求8~13中的任一项所述的寡核苷酸的自聚体形成方法,其特征在于,所述探针的杂交,是预先由所述二聚体形成用探针形成二聚体后,再使所述交联探针和该二聚体杂交。

5 15.根据权利要求8~14中的任一项所述的寡核苷酸的自聚体形成方法,其特征在于,所述多对二聚体形成用探针,是由所述中央区不同的m ($m \geq 2$) 种的二聚体形成用探针构成。

16.根据权利要求8~15中的任一项所述的寡核苷酸的自聚体形成方法,其特征在于,使所述一对二聚体形成用探针的3'侧区和/或5'侧区为彼此相同的碱基序列。

10 17.根据权利要求8~16中的任一项所述的寡核苷酸的自聚体形成方法,其特征在于,所述交联探针的至少一个,是通过含有所述交联探针的2个区的基因扩增反应而合成的寡核苷酸。

15 18.根据权利要求17所述的寡核苷酸的自聚体形成方法,其特征在于,通过所述基因扩增反应合成的寡核苷酸,是分别具有与第(2n-1)系统的寡核苷酸的5'侧区和3'侧区互补的区各2处的、至少由4处区构成的互补基因片段。

19.根据权利要求8~18中的任一项所述的寡核苷酸的自聚体形成方法,其特征在于,所述二聚体形成用探针和交联探针,是由选自DNA、RNA、PNA或LNA中任何一种的碱基构成。

20 20.根据权利要求8~19中的任一项所述的寡核苷酸的自聚体形成方法,其特征在于,在所述二聚体形成用探针和交联探针的互补碱基序列区的端部上,至少配置1个G(鸟嘌呤)或C(胞嘧啶),所述探针在杂交时,在互补碱基序列区的端部上至少形成一个G-C键。

25 21.根据权利要求1~20中的任一项所述的寡核苷酸的自聚体形成方法,其特征在于,在所述基因扩增反应中使用耐热性核酸合成酶。

22.根据权利要求1~20中的任一项所述的寡核苷酸的自聚体形成方法,其特征在于,在所述基因扩增反应中使用耐热性核酸连接酶。

23.根据权利要求1~20中的任一项所述的寡核苷酸的自聚体形成方法,其特征在于,在所述基因扩增反应中使用链置换型核酸合成酶。

30 24.根据权利要求1~23中的任一项所述的寡核苷酸的自聚体形成方

法,其特征在于,通过所述基因扩增反应合成的寡核苷酸,是由双链的DNA和/或RNA构成的寡核苷酸片段。

25.根据权利要求1~23中的任一项所述的寡核苷酸的自聚体形成方法,其特征在于,通过所述基因扩增反应合成的寡核苷酸,是由单链的DNA
5 和/或RNA构成的寡核苷酸片段。

26.根据权利要求1~25中的任一项所述的寡核苷酸的自聚体形成方法,其特征在于,在所述基因扩增反应中所用的扩增用探针为DNA。

27.根据权利要求1~25中的任一项所述的寡核苷酸的自聚体形成方法,其特征在于,在所述基因扩增反应中所用的扩增用探针为RNA。

10 28.根据权利要求1~25中的任一项所述的寡核苷酸的自聚体形成方法,其特征在于,在所述基因扩增反应中所用的扩增用探针为由DNA和RNA构成的嵌合型。

29.根据权利要求26~28中的任一项所述的寡核苷酸的自聚体形成方法,其特征在于,将在所述基因扩增反应中所用的一对扩增用探针的至少一方的5'末端侧和/或3'末端侧的碱基进行甲基化。
15

30.根据权利要求1~29中的任一项所述的寡核苷酸的自聚体形成方法,其特征在于,通过所述基因扩增反应合成的寡核苷酸,是预先在该互补的区上剪切具有与靶基因互补区的寡核苷酸,通过连接反应而连接的寡核苷酸。

20 31.根据权利要求1~30中的任一项所述的寡核苷酸的自聚体形成方法,其特征在于,利用核酸分解酶分解通过所述基因扩增反应合成的寡核苷酸。

32.根据权利要求31所述的寡核苷酸的自聚体形成方法,其特征在于,在所述核酸分解酶中使用核酸外切酶。

25 33.根据权利要求31所述的寡核苷酸的自聚体形成方法,其特征在于,在所述核酸分解酶中使用RNase H。

34.根据权利要求31所述的寡核苷酸的自聚体形成方法,其特征在于,在所述核酸分解酶中使用限制酶。

30 35.根据权利要求1~34中的任一项所述的寡核苷酸的自聚体形成方法,其特征在于,在所述基因扩增反应中,被扩增的靶基因使用双链的DNA

和/或RNA。

36.根据权利要求1~34中的任一项所述的寡核苷酸的自聚体形成方法,其特征在于,在所述基因扩增反应中,被扩增的靶基因使用单链的DNA和/或RNA。

5 37.根据权利要求1~34中的任一项所述的寡核苷酸的自聚体形成方法,其特征在于,在所述基因扩增反应中,被扩增的靶基因为单碱基多态。

38.一种自聚体,其特征在于,利用权利要求1~37中的任一项所述的寡核苷酸的自聚体形成方法而形成。

10 39.一种基因的检出方法,其特征在于,利用权利要求1~37中的任一项所述的寡核苷酸的自聚体形成方法,形成自聚体,通过检出形成的所述自聚体,来检出通过所述基因扩增反应合成的寡核苷酸。

5 通过基因扩增反应合成的寡核苷酸的自聚体形成方法、自聚体和基因的检出方法

技术领域

本发明涉及利用基因扩增反应合成的寡核苷酸来形成自聚体的方法、形成的自聚体、以及利用该自聚体的基因检出方法。

10

背景技术

近年来，为了检出微量靶基因，开发出了各种扩增基因的基因扩增方法。其中，使用耐热性核酸合成酶的Polymerase chain reaction法（United States Patent No.4,683,195、USP 4,683,202、以下称为PCR法）、利用耐热性核酸连接酶的Ligase chain reaction法（USP 5,792,607、以下称为LCR法）、利用链置换型核酸合成酶的Strand Displacement Amplification法（日本特许第2076096号、以下称为SDA法）、以及Isothermal and Chimeric primer-initiated Amplification of Nucleic acid法（WO 00/56877，以下称为ICAN法），均是利用合成核酸的酶的特征而开发的基因扩增方法。

20 这些基因扩增方法，是仅重复复制基因的特定部位的反应，是使由该特定部位构成的基因片段扩增的方法。由此，由于通过基因扩增法产生的扩增产物，是直链状的基因片段，所以，难于简便地检出，目前在市售的基因诊断试剂盒中基因的检出法中，主要是通过EIA（enzyme immuno assay）的组合而检出，或者预先将荧光物质标记在基因上，然后检出靶基因。

但是，在EIA或将荧光物质标记在基因上的测定中，须要特殊的仪器和试剂，操作也烦杂，并且需要1小时以上的时间才能判定结果，所以人们期望能够开发出一种能够简便并廉价地检出通过目前的基因扩增法扩增的基因的方法。

30

另一方面，本申请人已提出不使用酶的新型等温核酸扩增法（探针自聚体的制作方法）（USP 6,261,846、日本特许第3267576号和EP1,002,877A）。该方法是利用由3个区构成的一对探针（HoneyComb Probe、以下称为HCP法）的方法，其中，第1探针和第2探针的各个3个区，具有互补的碱基序列，在使两者反应时，要设置各区的碱基序列，使仅与1个区进行杂交。通过这种设置，在使多对探针进行反应时，相互杂交并可以形成探针的自聚体（Probe alternation link self-assembly reaction，以下称为PALSAR法）。

10 发明内容

本发明是鉴于上述情况而完成的，目的在于提供不用使用特殊仪器或试剂而能够通过EIA法测定的形成寡核苷酸自聚体的方法、以及通过该自聚体形成方法而形成的自聚体、和利用该自聚体的形成方法简便廉价地检出扩增的特定基因的方法。

15 为解决上述课题，本发明人等，对于各种寡核苷酸的自聚体的形成方法进行了锐意的研究。其结果发现，作为用于形成自聚体的寡核苷酸可以利用通过基因扩增反应而扩增的寡核苷酸。扩增后的寡核苷酸，由于通过自聚反应容易形成聚合体，所以不需要使用特殊仪器就能够检出基因。

20 本发明的寡核苷酸的自聚体的形成方法；是通过寡核苷酸的自聚反应而形成自聚体的方法，其特征在于，作为该寡核苷酸，含有通过基因扩增反应而合成的寡核苷酸。

作为所述自聚体的形成方法的一个例子，是利用多对由 n 个（ $n \geq 3$ ）通过互补的碱基序列区构成的寡核苷酸探针（以下有时称为HCP），通过使相互不同交叉地杂交，可以使寡核苷酸自聚并形成自聚体。

25 所述一对寡核苷酸探针中的至少一方，可以使用通过含有所述 n 处（ $n \geq 3$ ）区的基因扩增反应合成的寡核苷酸。

所述一对寡核苷酸探针的构成为，在以1对1进行杂交时，在 n 处（ $n \geq 3$ ）互补部分中，必须每1处都能够进行特异性地杂交。

30 此外，所述一对寡核苷酸探针的多对，可以使用该碱基序列区至少1

处不同的 m ($m \geq 2$) 种的一对探针。

作为所述自聚体的形成方法的另外例子，具有：从含有把1号和2号的一对寡核苷酸的各寡核苷酸分成3'侧区、中央区和5'侧区3个区、使各寡核苷酸的中央区为互补碱基序列、使3'侧区和5'侧区为不互补碱基序列的多对二聚体形成用探针的第1系统至第 $(2n-1)$ ($n \geq 1$) 系统依次形成的含有 n 个二聚体形成用探针系统；从分别含有把1号和2号的一对寡核苷酸的各寡核苷酸分成3'侧区和5'侧区2个区、使各寡核苷酸3'侧区和5'侧区为不互补碱基序列的多对交联探针的第2系统至第 $2n$ 系统依次形成的含有 n 个交联探针系统；且将此交联探针作为能够交联由该二聚体形成用探针形成的二聚体的碱基序列，从而能够通过使该探针杂交使寡核苷酸自聚而形成自聚体。

作为上述多对二聚体形成用探针以及多对交联探针中的至少一对，可以使用通过基因扩增反应而合成的寡核苷酸。

在所述自聚体的形成方法的另外例子中，在 $n=1$ 时，第1系统的二聚体探针和第2系统的交联探针的互补碱基序列的组合，存在两套。作为 $n=1$ 时例子，可以使用所述探针的碱基序列为分别使下列区：

第1系统的1号寡核苷酸的3'侧区与第2系统的1号寡核苷酸的3'侧区、
第1系统的2号寡核苷酸的5'侧区与第2系统的2号寡核苷酸的5'侧区、
第2系统的2号寡核苷酸的3'侧区与第1系统的2号寡核苷酸的3'侧区、
第2系统的1号寡核苷酸的5'侧区与第1系统的1号寡核苷酸的5'侧区，成为互补的碱基序列。

作为 $n=1$ 时的另外的例子，可以使用所述探针的碱基序列为分别使下列区，

第1系统的1号寡核苷酸的3'侧区与第2系统的1号寡核苷酸的3'侧区、
第1系统的2号寡核苷酸的5'侧区与第2系统的2号寡核苷酸的5'侧区、
第1系统的2号寡核苷酸的3'侧区与第2系统的2号寡核苷酸的3'侧区、
第1系统的1号寡核苷酸的5'侧区与第2系统的2号寡核苷酸的5'侧区互，成为互补的碱基序列。

在所述自聚体的形成方法的另外的例子中，在 $n \geq 2$ 时，第1、第3、……、第 $(2n-1)$ 系统的二聚体形成用探针和第2、第4、……、

第 $2n$ 系统的交联探针的互补碱基序列的组合，存在两套。作为 $n \geq 2$ 时例子，可以使用所述探针的碱基序列为分别使下列区，

第 $(2n-3)$ 系统的1号寡核苷酸的3'侧区与第 $(2n-2)$ 系统的1号寡核苷酸的3'侧区、

5 第 $(2n-3)$ 系统的2号寡核苷酸的5'侧区与第 $(2n-2)$ 系统的2号寡核苷酸的5'侧区、

第 $(2n-2)$ 系统的2号寡核苷酸的3'侧区与第 $(2n-3)$ 系统的2号寡核苷酸的3'侧区、

10 第 $(2n-2)$ 系统的1号寡核苷酸的5'侧区与第 $(2n-3)$ 系统的1号寡核苷酸的5'侧区、

二聚体形成用探针的最后系统的1号寡核苷酸的3'侧区与交联探针的最后系统的1号寡核苷酸的3'侧区、

二聚体形成用探针的最后系统的2号寡核苷酸的5'侧区与交联探针的最后系统的2号寡核苷酸的5'侧区、

15 交联探针的最后系统的2号寡核苷酸的3'侧区与第1系统的2号寡核苷酸的3'侧区、

交联探针的最后系统的1号寡核苷酸的5'侧区与第1系统的1号寡核苷酸的5'侧区，成为分别互补的碱基序列。

20 作为 $n \geq 2$ 时的另外的例子，可以使用所述探针的碱基序列为分别使下列区：

第 $(2n-3)$ 系统的1号寡核苷酸的3'侧区与第 $(2n-2)$ 系统的1号寡核苷酸的3'侧区、

第 $(2n-3)$ 系统的2号寡核苷酸的5'侧区与第 $(2n-2)$ 系统的2号寡核苷酸的5'侧区、

25 第 $(2n-2)$ 系统的2号寡核苷酸的3'侧区与第 $(2n-1)$ 系统的2号寡核苷酸的3'侧区、

第 $(2n-2)$ 系统的1号寡核苷酸的5'侧区与第 $(2n-1)$ 系统的1号寡核苷酸的5'侧区、

30 二聚体形成用探针的最后系统的1号寡核苷酸的3'侧区与交联探针的最后系统的1号寡核苷酸的3'侧区、

二聚体形成用探针的最后系统的2号寡核苷酸的5'侧区与交联探针的最后系统的1号寡核苷酸的5'侧区、

交联探针的最后系统的2号寡核苷酸的3'侧区与第1系统的2号寡核苷酸的3'侧区、

- 5 交联探针的最后系统的2号寡核苷酸的5'侧区与第1系统的1号寡核苷酸的5'侧区，成为互补的碱基序列。

所述探针的杂交，优选在预先从所述二聚体形成用探针形成二聚体后，使所述交联探针和该二聚体进行杂交。

- 10 所述多对二聚体形成用探针，可以使用所述中央区不同的 m ($m \geq 2$) 种的二聚体形成用探针。

所述一对二聚体形成用探针的3'侧区和/或5'侧区，可以为相同的碱基序列。

所述交联探针的至少一个，可以使用通过含有所述交联探针的2个区的基因扩增反应而合成的寡核苷酸。

- 15 作为通过所述基因扩增反应而合成的寡核苷酸，可以使用分别具有与第 $(2n-1)$ 系统的寡核苷酸的5'侧区和3'侧区互补的区各2处的、至少由4处区构成的互补的基因片段。

- 20 在所述HCP、二聚体形成用探针和交联探针的自聚体形成中所用的寡核苷酸探针（以下有的只称为探针），由选自DNA、RNA、PNA或LNA中的任何一个的碱基构成。

在所述探针的互补碱基序列区的端部上，至少配置1个G（鸟嘌呤）或C（胞嘧啶），所述探针在杂交时，通过在互补的碱基序列区的端部至少形成一个G-C键，通过碱基的叠重（stacking of base）使产生碱基的 π 电子的特殊相互作用，可以形成更稳定的寡核苷酸的自聚体。

- 25 作为通过所述基因扩增反应而扩增的寡核苷酸，第1，可以使用通过利用耐热性核酸合成酶的基因扩增反应而扩增的寡核苷酸。

作为通过所述基因扩增反应而扩增的寡核苷酸，第2，可以使用通过利用耐热性核酸连接酶的基因扩增反应而扩增的寡核苷酸。

- 30 作为通过所述基因扩增反应而扩增的寡核苷酸，第3，可以使用通过利用链置换型核酸合成酶的基因扩增反应而扩增的寡核苷酸。

作为通过所述基因扩增反应而合成的寡核苷酸，可以使用由双链DNA和/或RNA构成的寡核苷酸片段。

作为通过所述基因扩增反应而合成的寡核苷酸，可以使用由单链DNA和/或RNA构成的寡核苷酸片段。

5 作为用于所述基因扩增反应的扩增用探针（以下也有只称为扩增用探针），可以举出由DNA、RNA、或DNA和RNA构成的嵌合体型探针。

用于所述基因扩增反应的扩增用探针，优选使用在一对扩增用探针的至少一方上具有被甲基化的碱基的扩增用探针。被甲基化的碱基的位置，优选为扩增用探针的5'末端~5'末端周边或3'末端~3'末端周边，更
10 优选从各末端起5个碱基以内。在本发明中，将5'末端和5'末端周边称为5'末端侧，将3'末端和3'末端周边称为3'末端侧。一对扩增用探针，可以使用仅一方的探针被甲基化的一对扩增用探针；也可以使用两方的探针均被甲基化的一对扩增用探针。此外，可以使5'末端侧和3'末端侧均甲基化，也可以使仅是任何一个的末端侧甲基化。另外，作为扩增用探针在使用
15 由DNA和RNA构成的嵌合体型探针时，也能够使用使DNA区和/或RNA区的末端侧甲基化的探针，这也包括在本发明中。

在通过所述基因扩增反应合成的寡核苷酸中，优选使用预先在该互补的区内切断具有与靶基因互补的区的寡核苷酸，并通过连接反应而连接的寡核苷酸。

20 通过所述基因扩增反应合成的寡核苷酸，优选利用核酸分解酶分解。

作为所述核酸分解酶，优选使用核酸外切酶、RNase H、限制酶等。

本发明的自聚体，是利用所述寡核苷酸自聚体的形成方法而形成的自聚体。

25 本发明的基因检出方法，其特征在于，利用所述寡核苷酸的自聚体的形成方法形成自聚体，通过检出形成的所述自聚体，从而检出通过所述基因扩增反应合成的寡核苷酸。

在所述基因扩增反应中，在被扩增的靶基因中可以使用双链DNA和/或RNA。

30 在所述基因扩增反应中，在被扩增的靶基因中可以使用单链DNA和/或RNA。

在所述基因扩增反应中，在被扩增的靶基因中可以使用单碱基多态。

附图说明

图1是表示利用本发明中所用的PALSA法的一对HCP的自聚体形成方法的一例的示意图，（a）表示一对HCP，（b）表示HCP结合状态的一例，（c）表示自聚体的形成。

图2表示利用本发明中所用的PALSA法的一对HCP的自聚体形成方法的另一例的示意图，（a）、（b）分别表示互补区的1处不同的一对HCP，（c）表示由上述HCP形成的二聚体，（d）表示自聚体的形成。

图3是表示利用本发明中所用的PALSA法的 $n=1$ 时二聚体形成用探针和交联探针的自聚体的形成方法的一例示意图，（a）表示一对二聚体形成用探针，（b）表示一对交联探针，（c）表示自聚体的形成。

图4是表示利用本发明中所用的PALSA法的 $n=1$ 时二聚体形成用探针和交联探针的自聚体的形成方法的另一例示意图，（a）表示一对二聚体形成用探针，（b）表示一对交联探针，（c）表示自聚体的形成。

图5是表示利用本发明中所用的PALSA法的 $n \geq 2$ 时二聚体形成用探针和交联探针的自聚体的形成方法的一例示意图，（a）表示由一对二聚体形成用探针形成的4组二聚体探针、以及4组的一对交联探针，（b）表示自聚体的形成。

图6是表示利用本发明中所用的PALSA法的 $n \geq 2$ 时二聚体形成用探针和交联探针的自聚体的形成方法的另一例示意图，（a）表示由一对二聚体形成用探针形成的4组二聚体探针、以及4组的一对交联探针，（b）表示自聚体的形成。

图7是表示本发明的寡核苷酸的自聚体形成方法的第1例的第1实施方式的原理的示意图，（a）表示一对基因片段，（b）表示一对二聚体形成用探针，（c）表示自聚体形成。

图8是表示本发明的寡核苷酸的自聚体形成方法的第1例的第2实施方式的原理的示意图，（a）表示一对基因片段，（b）表示一对二聚体形成用探针，（c）表示自聚体形成。

图9是表示本发明的寡核苷酸的自聚体形成方法的第1例的第3实施方

式的原理的示意图，(a)表示一对基因片段，(b)表示一对二聚体形成用探针，(c)表示自聚体形成。

图10是表示本发明的寡核苷酸的自聚体形成方法的第1例的第4实施方式的原理的示意图，(a)表示一对基因片段，(b)表示一对二聚体形成用探针，(c)表示自聚体形成。

图11是表示利用被酶剪切的一对基因片段的自聚体形成方法的第1例的示意图，(a)表示一对基因片段，(b)表示一对二聚体形成用探针，(c)表示自聚体形成。

图12是表示利用被酶剪切的一对基因片段的自聚体形成方法的第2例的示意图，(a)表示一对基因片段，(b)表示一对二聚体形成用探针，(c)表示自聚体形成。

图13是表示利用被酶剪切的一对基因片段的自聚体形成方法的第3例的示意图，(a)表示一对基因片段，(b)表示一对二聚体形成用探针，(c)表示自聚体形成。

图14是表示预先制作为基因片段的交联探针的自聚体形成方法的示意图，(a)表示单链基因片段，(b)表示一对二聚体形成用探针，(c)表示预先制作的交联探针，(d)表示自聚体的形成。

图15是表示利用通过使用扩增用RNA探针的基因扩增而被扩增的基因片段和RNase H的自聚体形成方法的一例示意图，(a)表示利用扩增用RNA探针的DNA扩增。

图16是表示利用通过使用扩增用RNA探针的基因扩增而被扩增的基因片段和RNase H的自聚体形成方法的一例示意图，(b)表示利用扩增用RNA探针被扩增的一对基因片段，(c)表示RNase H处理后的一对基因片段，(d)表示一对二聚体形成用探针，(e)表示自聚体的形成。

图17是表示本发明中所用的寡核苷酸中被甲基化的碱基。

图18是表示本发明的寡核苷酸的自聚体形成方法的第2例的实施方式的原理的示意图，(a)表示靶基因，(b)表示被剪切的甲基化后的二聚体形成用探针。

图19是表示本发明的寡核苷酸的自聚体形成方法的第2例的实施方式的原理的示意图，(c)表示靶基因和被剪切的二聚体形成用探针的杂交，

(d) 表示被剪切的二聚体形成用探针的连接反应。

图20是表示本发明的寡核苷酸的自聚体形成方法的第2例的实施方式的原理的示意图，(e) 表示对被连接的二聚体形成用探针进行的核酸分解酶的分解处理，(f) 表示对未反应的二聚体形成用探针进行的核酸分解酶的分解处理。

图21是表示本发明的寡核苷酸的自聚体形成方法的第2例的实施方式的原理的示意图，(g) 表示对被连接的二聚体形成用探针中自聚体的形成，(h) 分解后的二聚体形成用探针中自聚体的形成。

图22是表示本发明的寡核苷酸的自聚体形成方法的第3例的第1实施方式 10 方式的原理的示意图，(a)表示靶基因，(b) 表示甲基化的扩增用探针。

图23是表示本发明的寡核苷酸的自聚体形成方法的第3例的第1实施方式 10 方式的原理的示意图，(c) 表示靶基因和甲基化的扩增用探针的杂交，(d) 表示DNA合成。

图24是表示本发明的寡核苷酸的自聚体形成方法的第3例的第1实施方式 15 方式的原理的示意图，(e) 表示合成的DNA和扩增用探针的杂交，(f) 表示DNA的合成。

图25是表示本发明的寡核苷酸的自聚体形成方法的第3例的第1实施方式 15 方式的原理的示意图，(g) 表示合成探针，(h) 表示核酸分解酶的分解。

图26是表示本发明的寡核苷酸的自聚体形成方法的第3例的第1实施方式 20 方式的原理的示意图，(i) 表示通过核酸分解酶分解后的合成探针，(j) 表示合成探针作为交联探针的使用，(k) 表示合成探针作为HCP的使用。

图27是表示本发明的寡核苷酸的自聚体形成方法的第3例的第1实施方式 25 方式的原理的示意图，(l) 及 (m) 表示分解的合成探针和未反应探针的杂交，(n) 表示核酸分解酶的处理。

图28是表示本发明的寡核苷酸的自聚体形成方法的第3例的第2实施方式 25 方式的原理的示意图，(a) 表示靶基因，(b) 表示仅一方甲基化的扩增用探针。

图29是表示本发明的寡核苷酸的自聚体形成方法的第3例的第2实施方式 30 方式的原理的示意图，(c) 表示靶基因和扩增用探针的杂交，(d) 表

示DNA合成。

图30是表示本发明的寡核苷酸的自聚体形成方法的第3例的第2实施方式的原理的示意图，(e)表示合成的DNA和扩增用探针的杂交，(f)表示DNA的合成。

5 图31是表示本发明的寡核苷酸的自聚体形成方法的第3例的第2实施方式的原理的示意图，(g)表示合成探针，(h)表示通过核酸分解酶的分解。

图32是表示本发明的寡核苷酸的自聚体形成方法的第3例的第2实施方式的原理的示意图，(i)表示通过核酸分解酶分解后的合成探针，(j)表示合成探针作为交联探针的使用，(k)表示合成探针作为HCP的使用。

图33是表示本发明的寡核苷酸的自聚体形成方法的第3例的第2实施方式的原理的示意图，(l)表示分解的合成探针和未反应探针的杂交，(m)表示通过核酸分解酶的处理。

图34是表示本发明的寡核苷酸的自聚体形成方法的第4例的实施方式的原理的示意图，(a)表示靶基因，(b)表示甲基化的嵌合型扩增用探针。

图35是表示本发明的寡核苷酸的自聚体形成方法的第4例的实施方式的原理的示意图，(c)表示靶基因和甲基化的嵌合型扩增用探针的杂交，(d)表示通过RNase H的处理。

20 图36是表示本发明的寡核苷酸的自聚体形成方法的第4例的实施方式的原理的示意图，(e)表示利用链置换型酶的DNA合成，(f)表示合成DNA，(g)表示未反应的探针。

图37是表示本发明的寡核苷酸的自聚体形成方法的第4例的实施方式的原理的示意图，(h)表示合成探针，(i)表示通过核酸分解酶的分解。

25 图38是表示本发明的寡核苷酸的自聚体形成方法的第4例的实施方式的原理的示意图，(j)表示通过核酸分解酶分解后的合成探针，(k)表示合成探针作为交联探针的使用，(l)表示合成探针作为HCP的使用。

图39是表示本发明的寡核苷酸的自聚体形成方法的第4例的实施方式的原理的示意图，(m)和(n)表示分解的合成探针和未反应探针的杂交，(o)表示通过核酸分解酶的处理。

30

图40是表示本发明的寡核苷酸的自聚体形成方法的第5例的实施方式的原理的示意图，(a)表示靶基因，(b)表示嵌合型扩增用探针。

图41是表示本发明的寡核苷酸的自聚体形成方法的第5例的实施方式的原理的示意图，(c)表示靶基因和嵌合型扩增用探针的杂交，(d)
5 表示通过RNase H的处理。

图42是表示本发明的寡核苷酸的自聚体形成方法的第5例的实施方式的原理的示意图，(e)表示利用链置换型酶的DNA合成，(f)表示合成探针，(g)表示未反应的探针。

图43是表示本发明的寡核苷酸的自聚体形成方法的第5例的实施方式的原理的示意图，(h)表示合成探针，(i)表示通过核酸分解酶的分解。
10

图44是表示本发明的寡核苷酸的自聚体形成方法的第5例的实施方式的原理的示意图，(j)表示通过核酸分解酶分解后的合成探针，(k)表示合成探针作为交联探针的使用，(l)表示合成探针作为HCP的使用。

图45是表示本发明的寡核苷酸的自聚体形成方法的第5例的实施方式的原理的示意图，(m)和(n)表示分解的合成探针和未反应探针的杂交，(o)表示通过核酸分解酶的处理。
15

图46是表示实施例1~16结果的照片。

图47是表示实施例17和比较例1的变性PAGE电泳法的结果的照片。

图48是表示实施例17和比较例1的琼脂糖凝胶电泳法的结果的照片。

图49是表示实施例18和比较例2的PAGE电泳法的结果的照片。
20

图50是表示实施例18的琼脂糖凝胶电泳法的结果的照片。

图51是表示实施例19和比较例3的PAGE电泳法的结果的照片。

图52是表示实施例19的利用荧光显微镜的结果的照片。

图53是表示比较例4的利用荧光显微镜的结果的照片。

图54是表示比较例5的利用荧光显微镜的结果的照片。
25

具体实施方式

以下根据附图对本发明的实施方式进行说明，但是这些实施方式只是举出的例子，只要不脱离本发明的技术构思，可以进行各种变形。

30 本发明是利用以基因扩增方法合成的寡核苷酸，在等温并且不存在

酶的条件下，通过自聚反应而形成双链自聚体的发明。

使用的探针的数目，没有特殊限制，可以使用 $10^2 \sim 10^{15}$ 个范围。反应缓冲液的组成、浓度没有特殊限制，可以适宜地使用核酸扩增重常用的普通的缓冲液。pH也可以为常用的范围，可以优选使用pH7.0~pH9.0的范围。反应温度为40~90℃，优选为55~70℃。这些条件没有特殊限制。

构成探针的核酸，通常由DNA或RNA构成，但是也可以是核酸类似体。作为核酸类似体，例如可以举出肽核酸(PNA, WO 92/20702)或Locked Nucleic Acid (LNA, Koshkin AA et al. Tetrahedron 1998.54, 3607-3630., Koshkin AA et al., J.Am.Chem.Soc. 1998.120, 13252-13253., Wahlestedt C et al., PNAS.2000.97, 5633-5638)。此外，探针通常由同类核酸构成，但是，例如DNA探针和RNA探针也可以成为一对。即，探针的核酸种类，可以选自DNA、RNA或和核酸类似体（例如PNA或LNA等）。此外，在一个探针内的核酸组成，没有必要由一种、例如仅由DNA构成，根据需要，例如也可以使用由DNA和RNA构成的探针（嵌合型探针），本发明就包括这样探针。

另外，探针的各区的长度，以碱基数计，至少为5个碱基，优选至少为8个碱基，更优选为10个碱基~100个碱基，特别优选为10~40个碱基。

所述基因扩增方法，没有特殊限制，例如作为自聚反应的寡核苷酸可以使用通过PCR法、SDA法、ICAN法、NASBA法、TMA法、3SR法、LCR法等现有的基因扩增方法扩增的双链或单链DNA和/或RNA。

图1是表示利用PALSAR法的一对HCP（1号探针和2号探针）的自聚体形成方法的一例示意图。在该图中，1号探针具有 X_1 区、 X_2 区和 X_3 区，2号探针具有 X'_1 区、 X'_2 区和 X'_3 区[图1(a)]。该1号探针和2号探针的构成为，在使两者进行杂交时，仅是 X_1 区和 X'_1 区结合、 X_2 区和 X'_2 区结合、 X_3 区和 X'_3 区结合，以3个结合模式，一对探针进行相互不同地杂交。[图1(b)]。

以3个结合模式进行相互不同地杂交的多对HCP，如图1(c)中示意的一个例子那样，根据PALSAR法的原理，通过寡核苷酸的自聚，可以形成双链的自聚体。

图1对由3处互补碱基序列区构成的HCP进行了说明，即使对于使用

具有4处以上的互补碱基序列区的HCP时，也可以同样地形成自聚体。

在利用所述HCP的自聚体的形成方法中，可以使用具有不同的互补区的2种以上的HCP。图2表示由通过3处互补区构成的2种的一对HCP（3号和4号探针、5号和6号探针）形成的自聚体的一例检出方法。在该图中，3号探针具有X区、 α 区和Z区，4号探针具有X'区、 α' 区和Z'区[图2(a)]。另外，5号探针具有X区、 β 区和Z区，6号探针具有X'区、 β' 区和Z'区[图2(b)]。如图2所示，2组HCP为1个互补区不同的HCP。各探针的构成为，在使两者进行杂交时，能够使X区仅和X'区结合、Z区仅和X'区结合、 α 区仅和 α' 区结合、 β 区仅和 β' 区结合。2组的HCP，各自 α 区和 α' 区或 β 区和 β' 区杂交，能够形成二聚体，根据PALSAR法的原理，由这些二聚体[图2(c)]通过寡核苷酸的自聚，可以形成双链的自聚体[图2(d)]。

图3是表示利用PALSAR法的二聚体形成用探针和交联用探针的自聚体形成方法的一例示意图。如图3所示，第1系统的一对二聚体形成用探针，是将一对寡核苷酸分为3个区，在使中央区为互补区的同时，3'侧区和5'侧区为不互补的碱基序列，从而形成二聚体探针[图3(a)]。第2系统的一对交联探针，是将一对寡核苷酸分为3'侧区和5'侧区的2个区，使各区为不互补的碱基序列，3'侧区和二聚体形成用探针的3'侧区、5'侧区二聚体形成用探针的5'侧区分别为互补的碱基序列 [图3(b)]。相对于第1系统的二聚体探针，通过使第2系统的交联探针交联地杂交，寡核苷酸自聚形成双链自聚体[图3(c)]。

图4是表示利用PALSAR法的二聚体形成用探针和交联用探针的自聚体形成方法的另一例示意图。作为二聚体形成用探针和交联探针的5'侧区以及3'侧区的互补区的组合，也可以如图4那样变更图3的组合。

在图3和图4中，对利用由第1系统构成的二聚体形成用探针和第2系统构成的交联探针的自聚体的形成方法进行了说明，如图5和图6所示，利用由第1、3、 \dots 、 $(2n-1)$ 的系统构成的二聚体形成用探针和由第2、4、 \dots 、 $2n$ 的系统构成的交联探针，可以形成自聚体。图5是表示 $n \geq 2$ 时的自聚体的形成方法的一例的图，图6是表示 $n \geq 2$ 时的自聚体的形成方法的另一例的图。

在利用所述二聚体形成用探针和交联探针的自聚体的形成方法中，

所谓不互补的碱基序列，只要是不相互杂交的碱基序列，都可以，包括相同的碱基序列也包括不互补的碱基序列。

所述二聚体形成用探针的构成，各系统的二聚体形成用探针，可以是一种，在一个系统中可以包括中央区不同的多种二聚体形成用探针，
5 没有特殊限制。另外，也可以同时组合2组以上的不完全互补的二聚体形成用探针和交联探针。

在利用所述二聚体形成用探针和交联探针的自聚体的形成方法中，由二聚体形成用探针形成二聚体的时期，可以同时使二聚体形成前的二聚体形成用探针和交联探针同时反应，也可以预先通过二聚体形成用探针形成二聚体后，再与交联探针反应，没有特殊限制，但是更优选预先
10 形成二聚体后再与交联探针反应而形成自聚体。

通过本发明的寡核苷酸形成自聚体的方法，为在所述自聚体的形成方法中，作为探针至少使用一个通过基因扩增反应而合成的寡核苷酸的方法。

通过本发明的基因扩增方法合成的寡核苷酸的自聚体形成方法的第1例，是在所述PALSAR法中，作为探针使用耐热性核酸合成酶或链置换型合成酶等现有基因扩增法扩增的基因的例子。以下对作为交联探针使用扩增后的基因的情况进行阐述。

图7是表示通过所述寡核苷酸形成自聚体的方法的第1例的第1实施方式
20 的原理示意图。如图7所示，利用通过现有的基因扩增法扩增的互补的一对基因片段，可以形成自聚体。首先，如图7(a)所示，将互补的基因片段分为四个区（A~D区和A'~D'区）。进而，选择一对寡核苷酸的5'侧区的2区（A区和B区、C'区和D'区），将选择的2区中的位于5'侧区的区（A区、D'区）作为交联探针的5'侧区，将位于3'侧区的区（B区、C'区）
25 作为交联探针的3'侧区，如图7(b)所示制作与其对应的一对二聚体形成用探针。在基因片段中，分别存在在3'侧区与二聚体形成用探针的各区不杂交的多余序列（C区和D区、A'区和B'区），一对基因片段，在由一对二聚体形成用探针构成的二聚体探针上交联地杂交，根据PALSAR法的原理，寡核苷酸自聚形成双链的自聚体[图7(c)]。

30 图8是表示通过所述寡核苷酸形成自聚体的方法的第1例的第2实施方

式的原理示意图。如图8(a)和(b)所示,对于一对基因片段,作为一对交联探针的5'侧区和3'侧区可以使用各3'侧的2区(C区和D区、A'区和B'区)。此时,在基因片段中,分别存在在5'侧区与二聚体形成用探针的各区不杂交的多余序列(A区和B区、C'区和D'区)。该一对基因片段,在由一对二聚体形成用探针构成的二聚体探针上交联地杂交,根据PALSAR法的原理,寡核苷酸自聚形成双链的自聚体[图8(c)]。

图9是表示通过所述寡核苷酸形成自聚体的方法的第1例的第3实施方式的原理示意图。如图9(a)和(b)所示,对于一对基因片段,作为一对交联探针的5'侧区和3'侧区可以使用不相邻的2区(A区和B区、C'区和D'区)。此时,如图9(c)所示,一对基因片段,在由一对二聚体形成用探针构成的二聚体探针上交联地杂交,根据PALSAR法的原理,寡核苷酸自聚形成双链的自聚体。

此外,将通过现有的基因扩增法扩增的一对基因片段分为5个区以上,其中的每2区也可以作为与二聚体探针交联的2区使用。

图10是表示通过所述寡核苷酸形成自聚体的方法的第1例的第4实施方式的原理示意图。如图10(a)和(b)所示,将互补的基因片段分为5个区(A~E区和A'~E'区)。进而,选择一对寡核苷酸的5'侧的2区(A区和B区、C'区和D'区),将选择的2区中的位于5'侧的区(A区、D'区)作为交联探针的5'侧区,将位于3'侧的区(B区、C'区)作为交联探针的3'侧区,如图10(b)所示制作与其对应的一对二聚体形成用探针。在基因片段中,分别存在在3'侧区与二聚体形成用探针的各区不杂交的多余序列(E、C区和D区、A'、B'和E'区),一对基因片段,在由一对二聚体形成用探针构成的二聚体探针上交联地杂交,根据PALSAR法的原理,寡核苷酸自聚形成双链的自聚体[图10(c)]。

如上所述,作为PALSAR法的交联探针可以使用互补的一对基因片段。在基因片段的各区中,将哪2区作为与二聚体探针杂交的区,没有特殊限制,2区可以相邻也可以不相邻。另外,也未必都存在于基因片段的末端。

在本发明的寡核苷酸的自聚体形成方法中,优选预先利用酶等将与二聚体形成用探针不互补的区剪切,将该剪切的一对基因片段用作交联

探针，再根据PALSAR法的原理使通过现有的基因扩增反应扩增的基因片段形成自聚体。

在图11~图13中示例了剪切的基因片段的自聚体形成方法。图11和图12分别表示剪切图7和图10的一对基因片段时的自聚体形成方法。图13是表示将二聚体形成用探针和交联探针的互补区进行如图4所示的组合时，剪切一对基因片段时的自聚体形成方法。通过剪切在二聚体探针上没有交联的多余区，可以提高自聚体的形成效率。

基因片段的剪切方法，没有特殊限制，优选使用限制酶或RNase H等的酶。

在本发明的寡核苷酸的自聚体形成方法中，由二聚体形成用探针形成二聚体的时期，可以同时使二聚体形成前的二聚体形成用探针和交联探针同时反应，也可以预先通过二聚体形成用探针形成二聚体探针后，再与基因片段反应，没有特殊限制，但更优选预先形成二聚体探针后再形成自聚体。

本发明的寡核苷酸的自聚体形成方法，包括与由所述的二聚体形成用探针构成的二聚体探针相同的二聚体探针，能够与交联探针交联地杂交而形成自聚体的自聚体的形成方法。

本发明的寡核苷酸的自聚体形成方法中所用的一对基因片段，没有必要两条链都是通过基因扩增反应扩增的基因片段，例如，如图14所示，在作为交联探针使用的一对基因片段中，使用了通过现有的基因扩增法扩增一方的基因片段[图14(a)]，也可以使用另一方是预先制作的基因片段[图14(c)]。通过使这些一对基因片段和与之对应的一对二聚体形成用探针[图14(b)]杂交，形成自聚体[图14(d)]。所用的基因片段，如上所述，只要是含有分别与二聚体探针交联的2区，就没有特殊限制。在图14(a)中，作为优选的例子，示例出了由分别与二聚体探针交联的A区和B区、以及与其都不杂交的Y区构成的单链基因片段，Y区可以是任何序列，没有特殊限制。如上所述，在含有多余标记的基因片段时，可以直接使用，但更优选将该区剪切后形成自聚体。

在现有的基因扩增法中，由于利用过量的引物等的扩增用探针进行基因扩增，所以在扩增后的溶液中既存在扩增的基因片段也存在过剩的

扩增用探针。在该过剩的扩增用探针存在下，容易产生自聚体形成的效率降低等问题。作为除去该扩增用探针提高自聚体形成效率的方法，优选使用核酸外切酶（例如Exonuclease I或Exonuclease VII等）或由RNA构成的扩增用探针和RNase H。在利用扩增用RNA探针和RNase H时，作为
5 用作自聚体形成反应的探针的靶基因，可优选使用通过耐热性DNA合成酶扩增的基因片段、通过链置换型DNA合成酶扩增的基因片段。作为耐热性DNA合成酶，优选使用KOD Dash（TOYOBO社制）等。在图15和图16中，示例了利用耐热性DNA合成酶、扩增用RNA探针和RNase H的自聚体形成方法的示意图。

10 如图15（a）所示，若利用一对扩增用RNA探针进行DNA扩增时，由DNA（A'、B'区、C、D区）和RNA（X区、Y区）构成的一对基因片段被扩增[图15(a)和图16(b)]。通过在该扩增后的溶液中添加RNase H使反应，基因片段地RNA区部分和扩增用RNA探针被水解。如图16(c)所示，通过将RNase H处理后的一对基因片段分为2区，形成由不互补的2区构成
15 的一对交联探针。在RNase H处理后的一对基因片段上优选构成扩增用RNA探针，使不残存互补的区，但是没有特殊限制，含有互补的区也包括在本发明中。所述的一对交联探针，在预先制作的与交联探针对应的二聚体探针[图16(D)]上交联地杂交，并形成自聚体[图16(e)]。通过所述方法，除去扩增用探针，并且消除在二聚体探针上不交联的多余序列，
20 可以提高自聚体的形成效率。

通过本发明的基因扩增反应合成的寡核苷酸的自聚体形成方法的第2例，是在所述PALSAR法中，作为探针使用通过耐热性核酸连接酶连接的并且末端侧碱基被甲基化的寡核苷酸（以下有的称为甲基化探针）的例子。利用具有与靶基因互补的区的甲基化探针，预先剪切与靶基因互
25 补的区，在靶基因存在下通过耐热性连接酶使剪切的基因片段进行连接反应。其特征在于，在连接反应后，利用核酸外切酶分解作为自聚反应的竞争物质的未反应的甲基化探针。在基因扩增反应中所用的寡核苷酸的甲基化碱基如图17所示。以下对将扩增后的基因用作二聚体形成用探针的一例进行阐述。

30 图18～图21是表示所述寡核苷酸的自聚体形成方法的第2例的实施方

式的原理示意图。如图18所示，在利用第1系统的二聚体形成用探针和第2系统的交联探针的自聚体形成方法中，如图18(a)(b)所示，由靶基因[图18(a)]制作在中央区具有与靶基因互补的区(α' 区和 β' 区、 α 区和 β 区)的二聚体形成用探针，将5'侧末端和3'侧末端的碱基进行甲基化，进而预先剪切与靶基因互补的中央区[图18(b)]。如图19(c)所示，剪切后的二聚体形成用探针，在于靶基因进行杂交后，如图19(d)所示，通过耐热性连接酶，连接二聚体形成用探针。通过热循环控制器反复该系列反应，从而增加被连接的二聚体形成用探针。之后，若加入核酸分解酶、例如Exonuclease VII等的核酸外切酶，若靶基因存在并且二聚体形成用探针被连接时，如图20(e)所示，被连接的二聚体形成用探针的两端碱基，由于被甲基化，所以不被分解，但是，若靶基因不存在并且二聚体形成用探针在以被剪切的状态存在时，没有连接的二聚体形成用探针[图20(f)]，由于被剪切的部分没有被甲基化，所以被完全分解，也不能形成自聚体[图21(h)]。被连接的二聚体形成用探针，通过加入另外准备的交联探针，能够形成自聚体[图21(g)]。所以，通过确认自聚体的形成，可以确认自聚体的存在。

通过本发明的基因扩增反应合成的寡核苷酸的自聚体形成方法的第3例，是在所述PALSAR法中，作为探针使用末端侧碱基被甲基化的扩增用探针和利用耐热性核酸合成酶扩增的寡核苷酸的例子。将至少一方的扩增用探针的3'末端侧碱基进行甲基化，5'末端侧碱基进行磷酸化，作为耐热性DNA合成酶的基因扩增用探针使用。其特征在于，在基因扩增后，利用核酸外切酶分解作为自聚反应的竞争物质的过剩存在的扩增用探针。以下对将扩增的基因(以下也有的称为合成探针)用作交联探针或HCP的情况进行说明。

图22~图27是表示所述寡核苷酸的自聚体形成方法的第3例的第1实施方式的原理示意图。准备与图22(a)所示的靶基因的实线部分互补并且3'末端侧碱基被甲基化的探针[图22(b)]。然后，在靶基因上使甲基化的扩增用探针进行退火[图23(c)]，通过耐热性DNA合成酶合成DNA[图23(d)]。通过热循环控制器反复该系列反应[图24(e)，(f)]，增加被扩增的探针[图25(g)]，通过添加核酸分解酶例如T7 Gene 6 Exonuclease等

核酸外切酶，如图25(h)所示，扩增的合成探针，从5'侧到被甲基化的碱基之前被分解。分解后的合成探针[图26(i)]，可以用作一对交联探针[图26(j)]或者两种一对HCP的一方[图26(k)]，通过添加另外准备的二聚体形成用探针或另一方的HCP可以形成自聚体。

5 另外，如图27(l)、(m)所示，分解后的合成探针，进而与未反应的探针杂交后，通过酶处理，可以使从5'侧到被甲基化的碱基之前更加完全地分解[图27(n)]。

图28~图33是表示所述寡核苷酸的自聚体形成方法的第3例的第2实施方式 10 的原理示意图。图28是表示利用被甲基化的扩增用探针的通过耐热性DNA合成酶进行基因扩增和自聚体形成的图。准备与图28(a)所示的靶基因的实线部分互补并且只是3'末端侧碱基被甲基化的探针[图28(b)]。然后，在靶基因上使甲基化的扩增用探针进行退火[图29(c)]，通过耐热性DNA合成酶合成DNA[图29(d)]。通过热循环控制器反复该系列反应[图30(e)，(f)]，增加被扩增的探针[图31(g)]，通过添加核酸分 15 解酶例如T7 Gene 6 Exonuclease等核酸外切酶，如图31(h)所示，扩增的合成探针，从5'侧到被甲基化的碱基之前被分解。分解后的合成探针[图32(i)]，可以用作一对交联探针的一方[图32(j)]或者一对HCP的一方[图32(k)]，通过添加另外准备的另一方交联探针和一对二聚体形成用探针或另一方的HCP可以形成自聚体。

20 另外，如图33(l)所示，分解后的合成探针，进而与未反应的探针杂交后，通过酶处理，可以使从未反应的探针更加完全地分解[图33(m)]。

通过本发明的基因扩增反应合成的寡核苷酸的自聚体形成方法的第4 25 例，是在所述PALSAR法中，作为扩增用探针使用由DNA和RNA构成的嵌合型探针并且该探针的与RNA相邻的DNA的3'末端侧碱基被甲基化的探针，作为探针使用通过链置换型DNA合成酶扩增的基因（合成探针）的例子。将至少一方的扩增用探针的3'侧碱基设为RNA、5'侧碱基设为DNA并且将3'末端侧的碱基进行甲基化，作为链置换型DNA合成酶的基因扩增用的探针使用，其特征在于，基因扩增后，利用核酸外切酶分解作为自聚反应的竞争物质而过剩存在的扩增用探针。以下对将扩增后的 30 基因用作交联探针或HCP的情况进行说明。

图34~图39是表示所述寡核苷酸的自聚体形成方法的第4例的实施方式的一例原理示意图。准备与靶基因[图34(a)]的实线部分互补、由DNA和RNA构成的并且仅有与RNA相邻的3'末端侧碱基被甲基化的扩增用探针[图34(b)]。然后,在靶基因上使甲基化的扩增用探针进行退火[图35(c)],通过RNase H剪切RNA部分 [图35(d)],通过链置换型DNA合成酶合成DNA[图36(e)]。通过等温反复该系列反应,增加被扩增的探针[图36(f),图36(h)],通过添加核酸分解酶例如T7 Gene 6 Exonuclease等核酸外切酶,如图37(i)所示,扩增的合成探针,从5'侧到被甲基化的碱基之前被分解。分解后的合成探针[图38(j)],可以用作一对交联探针[图38(k)]或者两种一对HCP的一方[图38(l)],通过添加另外准备的一对二聚体形成用探针或另一方的HCP可以形成自聚体。

另外,如图39(m)、(n)所示,分解后的合成探针,进而与未反应的探针杂交后,通过酶处理,可以使未反应探针更加完全地分解[图39(o)]。

通过本发明的基因扩增反应合成的寡核苷酸的自聚体形成方法的第5例,是在所述PALSAR法中,作为扩增用探针使用由DNA和RNA构成的嵌合型探针,作为探针使用通过链置换型DNA合成酶扩增的基因的例子。将至少一方的扩增用探针的3'侧碱基设为RNA、5'侧碱基设为DNA,作为链置换型DNA合成酶的基因扩增用的探针使用。其特征在于,基因扩增后,利用核酸外切酶分解作为自聚反应的竞争物质而过剩存在的扩增用探针。以下对将扩增后的基因(合成探针)用作交联探针或HCP的情况进行说明。

图40~图45是表示所述寡核苷酸的自聚体形成方法的第5例的实施方式的一例原理示意图。准备与图40(a)所示的靶基因的实线部分互补、由DNA和RNA构成的扩增用探针[图40(b)]。然后,在靶基因上使甲基化的扩增用探针进行退火[图41(c)],通过RNase H剪切RNA部分 [图41(d)],通过链置换型DNA合成酶合成DNA[图42(e)]。通过等温反复该系列反应,增加被扩增的合成探针[图42(f),图43(h)],通过添加核酸分解酶,例如T7 Gene 6 Exonuclease等核酸外切酶,如图43(i)所示,扩增的合成探针,从5'侧到RNA部分被分解。分解后的合成探针[图44(j)],

可以用作一对交联探针[图44(k)]或者两种一对HCP的一方[图44(l)], 通过添加另外准备的一对二聚体形成用探针或另一方的HCP可以形成自聚体。

另外, 如图45(m)、(n)所示, 分解后的合成探针, 进而与未反应的探针杂交后, 通过酶处理, 可以使未反应探针更加完全地分解[图45(o)]。

通过所述方法形成的自聚体, 通过一般的琼脂糖凝胶电泳法等能够简单地确认。

此外, 根据在本发明中形成的自聚体的碱基的叠重构成的有规则的高级结构, 发现260nm处紫外部的所谓吸收带强度减弱“减色性”的淡色效果, 也可以确认自聚体的状态。

进而, 添加具有与核酸结合性质的荧光物质, 从该荧光物质的变化也可以确认自聚体的状态。例如, 在寡核苷酸的两条链上插入并添加发出荧光的色素, 利用SPHAIDE社的I-CORE™ (Smart Cycler™) 等, 通过观察荧光的发光状态, 也可以检出自聚体。

如上所述, 本发明的寡核苷酸的自聚体的形成方法, 由于仅在靶基因存在时才形成自聚体, 所以通过检出形成的自聚体, 也可以检出靶基因。

实施例

以下根据实施例对本发明进行说明, 但本发明不受这些实施例限制。

(实施例1~16)

以下表示在实施例1~16中所用的寡核苷酸探针。

[1]交联探针-1[下划线, 多余的序列(标记)]

5'-TTGGATCAACCCGCTCAATG CCTGGAGATTTGGGCGTGCC-
25 CCCGCAAGACTGCTAGCCGA GTAGTGTTGGGTCGCGAAAG-3'

[2]交联探针-2[下划线, 多余的序列(标记)]

3'-AACCTAGTTGGGCGATTAC GGACCTCTAAACCCGCACGG-
GGGCGTTCTGACGATCGGCT CATCACAACCCAGCGCTTTC-5'

[3]交联探针-3

30 5'-TTGGATCAACCCGCTCAATG CCTGGAGATTTGGGCGTGCC-3'

[4]交联探针-4

3'-GGGCGTTCTGACGATCGGCT CATCACAAACCCAGCGCTTTC-5'

[5]二聚体形成用探针-1

5'-GTAGTGTTGGGTCGCGAAAG-GCTCACAGTTAAGCCGTGAG-
5 CCCGCAAGACTGCTAGCCGA-3'

[6]二聚体形成用探针-2

5'-CATTGAGCGGGTTGATCCAA-CTCACGGCTTAACTGTGAGC-
GGCACGCCCAAATCTCCAGG-3'

(实施例1~14)

10 (1) 目的

作为交联探针在使用具有与通过现有的基因扩增法扩增为预想的二聚体探针不杂交的多余序列(标记)的基因片段时,探讨能否与二聚体探针形成自聚体。

(2) 材料

15 (a) 作为交联探针,制作假设通过现有的基因扩增法扩增的具有互补序列的80碱基的合成寡核苷酸2条链(交联探针-1和交联探针-2)、以及与他们对应的二聚体形成用探针(二聚体形成用探针-1和二聚体形成用探针-2)。各探针分别调配为100pmol/ μ L。

(b) 实施例1~7,作为缓冲液使用2M-CaCl₂溶液。实施例8~14,
20 作为缓冲液使用20×SSC溶液(3M-NaCl、0.3M-C₆H₅Na₃·2H₂O,在实施8~14中,20×SSC溶液,作为3M-NaCl处理)。

(3) 方法

(a) 反应液的调配

25 加入交联探针-1、交联探针-2、二聚体形成用探针-1和二聚体形成探针各0.5 μ L,添加缓冲液(2M-CaCl₂溶液或3M-NaCl溶液)和灭菌再蒸馏水,调配成共计20 μ L的反应液。添加缓冲液和灭菌再蒸馏水,使反应液中的缓冲液的浓度分别为1.2M(实施例1、8)、1.0M(实施例2、9)、0.8M(实施例3、10)、0.6M(实施例4、11)、0.4M(实施例5、12)、0.2M(实施例6、13)、0.5M(实施例7、14)。

30 (b) 自聚体的形成反应

利用热循环控制器（Parkinerm社制），首先使上述各反应液反应94°C/30秒，之后通过70°C/1小时反应，进行自聚体的形成反应。

(c) 通过琼脂糖凝胶电泳法进行自聚体的确认

5 在自聚体形成反应后的反应液8μL中添加2μL的loading buffer，通过2% Nusieve 3:1 agarose gel（Bio Whittaker Molecular Applications 社制）进行100V、30分钟的电泳。作为分子大小标记，使用DNA Molwuxle Weight Marker XV（BERINGA • MANNHEIM社制）。

（实施例15和实施例16）

(1) 目的

10 作为交联探针在使用通过现有的基因扩增法扩增并且通过酶等消除与二聚体探针不杂交的多余序列（标记）的基因片段时，根据PALSAR法，探讨能否形成自聚体。

(2) 材料

15 (a) 作为交联探针，合成从实施例1~14中所用的合成寡核苷酸上除去标记的并且不互补的一对寡核苷酸（交联探针-3和交联探针-4），并且作为交联探针使用。作为二聚体形成用探针，利用实施例1~14中所用的二聚体形成用探针1和二聚体形成用探针2。各探针分别调配为100pmol/μL。

20 (b) 缓冲液，在实施例15中使用2M-CaCl₂溶液，在实施例16中使用3M-NaCl溶液。

(3) 方法

(a) 反应液的调配

25 加入交联探针-3、交联探针-4、二聚体形成用探针-1和二聚体形成探针各0.5μL，添加缓冲液和灭菌再蒸馏水，调配成共计20μL的反应液。添加缓冲液和灭菌再蒸馏水，使反应液中的缓冲液的浓度为1.2M。

(b) 自聚体形成反应

通过与实施例1~14相同的操作和条件，进行自聚体形成反应。

(c) 通过琼脂糖凝胶电泳法进行自聚体的确认

通过与实施例1~14相同的操作和条件，进行自聚体形成的确认。

30 (4) 结果

实施例1~16的结果表示在图46中。在具有多余序列（标记）的交联探针时，若比较观察实施例1~7的CaCl₂溶液中的反应（泳道1~7）和实施例8~14的20×SSC溶液中的反应（泳道9~15），发现仅在CaCl₂溶液中形成自聚体。自聚体形成尤其显著的CaCl₂溶液浓度，可知为0.8M（泳道3）附近。在消除多余序列（标记）的实施例15（泳道8）和实施例16（泳道16）中，均观察到了自聚体的形成，不依赖于缓冲液。由这些结果可以确认，消除多余序列（标记）的交联探针，自聚体形成的效率良好，为互补的序列，即使在具有多余序列（标记）的交联探针中，也能够与二聚体探针形成自聚体。由此，显示可以应用于将现有的基因扩增法和自聚体形成反应组合的系统中。

（实施例17和比较例1）

以下，表示在实施例17和比较例1中所用的寡核苷酸探针。其中□表示被甲基化的碱基。

[7]靶基因—A（下划线部分为互补区）

15 5'-AACATGAAAA AT GATTATGGCT CAGGTA CTGC
TATCCACCCT CAAACAGGTG AATTATTA GCACTTGTA
GCACACCTTC-3'

[8]靶基因—B（下划线部分为互补区）

20 5'-GAAGGTGTGC TTACAAGTGC TAATAATT CACCTGTTTG
AGGGTGGATA GCAGTACCTG AGCCATAATC AT TTTTCATGTT-3'

[9]甲基化探针—1（下划线部分为中央区）

5'-□GTGCTGACTT AACCGGATAC-GATTATGGCT CAGGTA CTGC
T-3'

[10]甲基化探针—2（下划线部分为中央区）

25 5'（磷酸化）-ATCCACCCT CAAACAGGTG-GATTGGTACT
GCGAGATAG[□]-3'

[11]甲基化探针—3（下划线部分为中央区）

5'-□GACGCTTTCT GCGTGTATAG-CACCTGTTTG AGGGTGGATA-
3'

30 [12]甲基化探针—4（下划线部分为中央区）

5' (磷酸化) -GCAGTACCTG AGCCATAATC-CTAGAACGGA
TCGTA \square CTTCG-3'

[13]交联探针-5

5'-CTATACACGCAGAAAGCGTC-CGAAGTACGA TCCGTTCTAG-
5 3'

[14]交联探针-6

5'-GTATCCGGTT AAGTCAGCAC-CCTATCTCGC AGTACCATTC-
3'

(1) 目的

10 通过对依赖于与靶基因的杂交并被连接的二聚体形成用探针、和利用该连接的二聚体形成用探针和交联探针的自聚体的形成确认靶基因。

(2) 材料

(a) 作为靶基因，利用源于MRSA的PBPgene的合成寡核苷酸的靶基因-A和靶基因-B。靶基因分别调配为1pmol/ μ L。

15 (b) 制作中央区具有与靶基因-A和B互补的区的一对二聚体形成用探针和对应的一对交联探针(交联探针-5,6)，分别将上述一对二聚体形成用探针的5'末端和3'末端进行甲基化，并剪切各个中央区，制作将剪切部位的5'末端磷酸化的探针(甲基化探针1~4)。探针分别调配至50pmol/ μ L。

20 (c) 作为缓冲液，使用20×SSC(3M-NaCl, 0.3M-C₆H₅O₇Na₃·2H₂O, pH7.0)。

(3) 方法

(a) 反应液的调配

25 在0.2mL试管中分别加入靶基因A和B各1 μ L、甲基化探针1~4各1 μ L、耐热性连接酶(Tsc-Ligase、日本ROSHU社制)1 μ L、添加连接酶的10×incubation buffer2 μ L，用灭菌蒸馏水调制为20 μ L的反应液(实施例37)。另外，作为对照，相对于上述反应液，也制作不加靶基因的反应液(比较例1)。

(b) 甲基化探针通过耐热性连接酶的基因扩增方法

30 利用热循环控制器(Parkinelmer社制)，使上述各反应液反应95°C3

分钟后, 进行40个循环“94℃15秒钟→63℃4分钟”, 通过连接反应进行二聚体形成用探针的扩增。然后, 在99℃反应10分钟使连接酶失活后, 进行冰冷, 制作单链的二聚体形成用探针。

(c) 在所述反应后的反应液中, 添加1μL的核酸外切酶(Exonuclease VII、usb社制), 在37℃使反应60分钟。作为对照, 不添加核酸外切酶, 对于添加灭菌蒸馏水的情况都相同。利用6%改性聚丙烯酰胺97M Urea)对反应后的反应液进行变性PAGE电泳。

(d) 自聚体的形成方法

利用热循环控制器(Parkinelmer社制), 在所述反应后的各反应液中加入20×SSC(最终浓度: 10×SSC), 在94℃使反应30秒后, 通过70℃/1小时的反应, 进行自聚体形成反应。

(e) 通过琼脂糖凝胶电泳法确认自聚体

在自聚体形成反应后的反应液8μL中添加2μL的loading buffer, 通过2%Nusieve 3:1 agarose gel (Bio Whittaker Molecular Applications 社制)进行100V、30分钟的电泳。作为分子大小标记, 使用DNA标记(λ Hind III digest)。

(4) 结果

实施例17和比较例1的变性PAGE电泳法的结果如图47所示。如图47的泳道1(实施例17, 未用酶处理)所示, 在靶基因存在时, 剪切的二聚体形成用探针被连接, 箭头(a)的位置的泳带被检出。如图47的泳道3(实施例17, 酶处理)所示, 由于连接的二聚体形成用探针即使进行核酸外切酶处理, 也不分解, 所以在与泳道1相同的(a)的位置上泳带被检出。另一方面, 如图47的泳道2(比较例1, 未用酶处理)和泳道4(比较例1, 酶处理)所示, 在靶基因不存在时, 剪切的二聚体形成用探针不被连接, 在(a)的位置上没有检出泳带。此外, 在泳道1和泳道2中在箭头(b)的位置上检出的没有连接的甲基化探针, 由于通过核酸外切酶处理而分解, 所以在泳道3和泳道4上没有检出该泳带。

实施例17和比较例1的琼脂糖凝胶电泳法的结果如图48所示。连接的二聚体探针通过和交联探针反应, 形成自聚体(图48, 泳道1, 实施例17)。另外, 在未连接的未反应探针的二聚体探针中, 即使与交联探针反应,

也不形成自聚体（图48，泳道2，比较例1）。

（实施例18和比较例2）

以下，表示在实施例18和比较例2中所用的寡核苷酸探针。其中，□表示碱基的甲基化。

- 5 [15]扩增用探针—1（甲基化探针）
5'（磷酸化）-CGGAAGCTCC TATGACAAT□G-3'
- [16]扩增用探针—2（甲基化探针）
5'（磷酸化）-GTTGATCGTC TCGGCTAGT□G-3'
- [17]扩增用探针—3（非甲基化探针）
10 5'（磷酸化）-CGGAAGCTCC TATGACAATG-3'
- [18]扩增用探针—4（非甲基化探针）
5'（磷酸化）-GTTGATCGTC TCGGCTAGTG-3'
- [19]二聚体形成用探针—3
5'-TATGACAATG • GATCCTAGAC • CGGAAGCTCC-3'
- 15 [20]二聚体形成用探针—4
5'-TCGGCTAGTG • GTCTAGGATC • GTTGATCGTC-3'

（1）目的

利用甲基化的扩增用探针通过耐热性DNA合成酶进行基因扩增和通过自聚体的形成确认扩增的基因。

20 （2）材料

（a）作为靶基因使用用作 Temperate DNA 的 *Mycobacterium tuberculosis* 的IS6110区的部分碱基序列。

（b）将作为扩增靶基因的扩增用探针，分别制作3'末端甲基化的一对扩增用探针—1和2(实施例18)以及没有甲基化的一对扩增用探针—3和4(比较例2)。作为二聚体形成用探针，制作能够将扩增的合成探针用作交
25 联探针而构成的一对二聚体形成探针—3和4。探针分别调制为50pmol/μL。

（c）作为缓冲液，使用 20 × SSC（3M — NaCl， 0.3M — C₆H₅O₇Na₃ • 2H₂O， pH7.0）。

30 （3）方法

(a) 反应液的调配

在0.2mL试管中分别加入Temperate DNA 1 μ L、扩增用探针-1和2各0.5 μ L、10 \times PCR缓冲液（10 \times Ex Taq Buffer：宝酒造社制）5 μ L、dNTP混合物（dNTP Mixture（2.5mM each）：宝酒造社制）4 μ L、Taq聚合酶（TaKaRa Ex Taq（5units/ μ ）：宝酒造社制）0.1 μ L，用灭菌蒸馏水调制为50 μ L的PCR反应液（实施例18）。另外，作为对照，在所述反应液中，不加扩增用探针-1和2，制作添加扩增用探针3和4的PCR反应液（比较例2）。

(b) PCR反应

利用热循环控制器（Parkinmer社制），使上述各PCR反应液反应94 $^{\circ}$ C 1分钟后，进行35个循环“94 $^{\circ}$ C 1分钟 \rightarrow 60 $^{\circ}$ C 2分钟”。

(c-1) 核酸外切酶的处理（1）

将所述PCR反应后的反应液10 μ L移入另外的0.2mL试管中，分别加入核酸外切酶（T7 Gene 6 Exonuclease，AMASHAMU FARUMASHIA BIOTECH社制）0.1 μ L，5 \times T7 Gene 6 Exonuclease buffer（AMASHAMU FARUMASHIA BIOTECH社制）2 μ L，用灭菌蒸馏水调制13 μ L的反应液。使该反应液在37 $^{\circ}$ C反应30分钟后，在85 $^{\circ}$ C下加热15分钟，使核酸外切酶失活。作为对照，不加核酸外切酶，同样添加灭菌蒸馏水。通过核酸外切酶处理后，用16%聚丙烯酰胺凝胶（29:1 BIOLID社制）对10 μ L的反应液进行电泳。电泳后用溴一锭对凝胶进行染色。

(c-2) 核酸外切酶的处理（2）

对于上述PCR反应后的实施例18的反应液，除使所述核酸外切酶处理(1)的反应条件从37 $^{\circ}$ C/30分钟 \rightarrow 85 $^{\circ}$ C/15分钟的反应变到37 $^{\circ}$ C/30分钟 \rightarrow 57 $^{\circ}$ C/30分钟 \rightarrow 37 $^{\circ}$ C/30分钟 \rightarrow 85 $^{\circ}$ C/15分钟的反应之外，其余的以同样的条件和操作进行核酸外切酶的处理。

(d) 自聚体的形成

在进行所述核酸外切酶处理（1）和（2）后的实施例18的各反应液中，添加二聚体形成用探针-3和4各1 μ L，添加20 \times SSC使最终浓度为10 \times SSC，在94 $^{\circ}$ C下处理30分钟后，进行60 $^{\circ}$ C 1小时的自聚体形成反应。

(e) 通过琼脂糖凝胶电泳法进行自聚体的确认

通过与实施例17相同的操作和条件进行自聚体的确认。

(4) 结果

实施例18和比较例2的PAGE的电泳法的结果如图49所示。在图49中，泳道1表示10bp DNA Ladder marker，泳道2表示对照用的40mer的单链寡核苷酸，泳道3表示对照用的60mer的单链寡核苷酸，泳道4表示比较例2(未用酶处理)，泳道5表示实施例18(未用酶处理)，泳道6表示比较例2(酶处理)，泳道7表示实施例18(酶处理)。

如图49的泳道5和泳道7所示，在利用甲基化的扩增用探针的实施例18中，在40bp的位置上检出了通过PCR反应而扩增的作为目的扩增产物的合成探针的泳带，进而，在20bp的位置上检出了通过核酸外切酶处理而使40bp的泳带分解的新泳带。该20bp泳带，是通过核酸外切酶处理分解为20mer的合成探针和20mer的未反应的扩增用探针之间的杂交体。由此，通过核酸外切酶对利用甲基化的扩增用探针的扩增产物进行处理，互补链分解，可以得到目的的20mer的一对交联探针。

另一方面，如图49的泳道4和泳道6所示，在将作为对照的非甲基化探针用作扩增用探针的比较例2中，在40bp的位置上检出了通过PCR反应而产生的目的扩增产物的泳带，但是，一旦进行核酸外切酶的处理，仅40bp的泳带被分解，没有新检出别的大的泳带。

实施例18的琼脂糖凝胶电泳的结果如图50所示。在泳道1[核酸外切酶处理(1)]中，由于成为合成探针的互补链的未反应的扩增用探针被除去，所以，通过合成探针和二聚体形成用探针形成的自聚体被确认。

另一方面，合成探针和未反应的扩增用探针以形成杂交体的状态，在添加二聚体形成用探针的泳道2[核酸外切酶处理(1)]中，没有确认自聚体的形成。

(实施例19和比较例3~5)

以下表示在实施例19中所用的由DNA和RNA构成的寡核苷酸探针。其中，□表示RNA。

[21]扩增用嵌合探针-1(3'侧3碱基为RNA)

5' (磷酸化) -CGGAAGCTCC TATGACA AUG -3'

[22]扩增用嵌合探针-2(3'侧3碱基为RNA)

5' (磷酸化) -GTTGATCGTC TCGGCTA GUG -3'

(1) 目的

利用嵌合化的扩增用探针 (由DNA和RNA构成的探针) 通过链置换型核酸合成酶进行基因扩增和通过自聚体的形成确认扩增的基因。

5 (2) 材料

(a) 作为靶基因使用用作 Temperate DNA 的 *Mycobacterium tuberculosis* 的IS6110区的部分碱基序列。

(b) 将靶基因作为扩增的扩增用探针, 分别制作3'侧的3甲基作为RNA的一对扩增用嵌合探针-1和2(实施例19)。作为二聚体形成用探针, 10 与实施例18相同, 利用二聚体形成用探针-3和4。探针分别调制为50pmol/ μ L。

(c) 作为缓冲液, 使用 $20 \times$ SSC (3M - NaCl, 0.3M - $C_6H_5O_7Na_3 \cdot 2H_2O$, pH7.0)。

(3) 方法

15 (a) 反应液的调配

在0.2mL试管中分别加入Temperate DNA 1 μ L、扩增用嵌合探针-1和2各0.25 μ L、tris系缓冲液 (0.1M tris盐酸Buffer: pH7.5) 7.5 μ L、dNTP混合物[dNTP Mixture (2.5mM each): 宝酒造社制]1 μ L、Bcapolymerase (22U/ μ L: 宝酒造社制) 0.15、BSA (20mg/ml: 宝酒造社制) 0.2 μ L、20 10%甘油6.5 μ L、DMSO1 μ L、 $MgCl_2$ (50omM)5 μ L、RNase H (60U/ μ L: 宝酒造社制) 0.5 μ L, 用灭菌蒸馏水调制为25 μ L的反应液。

作为对照, 不加Temperate DNA, 制作添加灭菌蒸馏水的反应液 (比较例3)。

(b) 扩增反应

25 利用热循环控制器 (Parkinelder社制), 使上述反应液在60 $^{\circ}$ C反应60分钟后, 在95 $^{\circ}$ C进行5分钟加热, 使酶失活。将该反应液作为“合成探针”溶液。

(c) 利用丙烯酰胺凝胶电泳法进行扩增产物的检出

30 利用16%聚丙烯酰胺凝胶 (29:1、BIOLAD社制) 对8 μ l的所述合成探针溶液进行电泳。在电泳后用溴一锭对凝胶进行染色。

(d) 自聚体的形成反应

在0.2mL试管中分别加入二聚体形成用探针-3和4各1 μ L、20 \times SSC 12 μ L，用灭菌蒸馏水调制为20 μ L的反应液。

在94 $^{\circ}$ C对反应液处理30秒钟后，在60 $^{\circ}$ C反应18小时，将此反应液作为“二聚体探针”溶液。

然后，作为自聚体的形成反应，在另外0.2mL试管中分别加入合成探针溶液5 μ L、二聚体探针溶液10 μ L、20 \times SSC 5 μ L，在60 $^{\circ}$ C下使反应18小时。

作为对照，也进行仅加合成探针溶液（比较例4）、以及仅加二聚体探针溶液（比较例5）的反应。

(e) 利用荧光显微镜的确认

在所述(d)的自聚体的形成反应溶液5 μ L中，加入溴一锭（10mg/mL）5 μ L稀释为1/1000，放置30分钟。在载玻片上滴下上述溶液3 μ L，用荧光显微镜进行观察。

(4) 结果

1: 通过丙烯酰胺凝胶电泳法进行扩增产物的检出

在图51中表示了实施例19和比较例3的丙烯酰胺凝胶电泳法的结果。泳道M表示10bp DNA Ladder marker、泳道1表示比较例3、泳道2和3表示实施例19。该结果表明，实施例19的仅在添加靶DNA时，才能够检出40bp和20bp的扩增产物的泳带。该20bp的泳带，是扩增的40bp的合成探针，通过共存的RNase H RNA部分被分解，剪切20mer的合成探针和20mer的未反应探针之间的杂交体。

2: 通过荧光显微镜的确认

在图52~54中分别表示了实施例19和比较例4、5荧光显微镜的观察结果。仅在使二聚体形成用探针和合成探针的混合溶液进行反应时（实施例19），能够在载玻片上确认粒子状的自聚体。

在工业上的利用可能性

如上所述，根据本发明的通过基因扩增反应得到的合成探针的自聚体形成方法，不须要EIA的特殊仪器或试剂而能够形成寡核苷酸的自聚体，根据本发明的基因的检出方法，不用特殊的仪器或烦杂的操作而能

够低成本并且简便地检出特定的基因。本发明的自聚体，是根据本发明的寡核苷酸的自聚体形成方法而有效合成的自聚体。

<110> 三光纯药株式会社

<120> 通过基因扩增反应合成的寡核苷酸的自聚体形成方法

<130> 76206-PCT-CN

<140> PCT/JP02/11321

<141> 2002-10-30

<150> JP 2001-342709

<151> 2001-11-08

<150> JP 2002-132402

<151> 2002-05-08

<160> 22

<110> 三光纯药株式会社

<210> 1

<211> 80

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<213> 人工序列的描述: 合成的交联探针-1

<400> 1

```
ttgatcaac cgcctcaatg cctggagatt tgggcgtgcc cccgcaagac tgctagccga 60
gtagtgttg gtcgcgaaag                                     80
```

<210> 2

<211> 80

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<213> 人工序列的描述: 合成的交联探针-2

<400> 2

```
cttcgcgac ccaacactac tcggctagca gtcttcggg ggcacgccca aatctccagg 60
```

cattgagcgg gttgatcaa 80

<210> 3
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <213> 人工序列的描述: 合成的交联探针-3

<400> 3
 ttgatcaac ccgctcaatg cctggagatt tgggcgtgcc 40

<210> 4
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <213> 人工序列的描述: 合成的交联探针-4

<400> 4
 ctttcgcgac ccaacactac tcggctagca gtcttcgagg 40

<210> 5
 <211> 60
 <212> DNA

<213> 人工序列

<220>
 <213> 人工序列的描述: 合成的二聚体形成用探针-1

<400> 5
 gtagtgttg gtcgcgaaag gtcacagtt aagccgtgag cccgcaagac tgctagccga 60

<210> 6
 <211> 60
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <213> 人工序列的描述: 合成的二聚体形成用探针-2

<400> 6

cattgagcgg gttgatccaa ctcacggctt aactgtgagc ggcacgccca aatctccagg 60

<210> 7

<211> 80

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<213> 人工序列的描述: 合成的靶基因-A

<400> 7

aacatgaaaa atgattatgg ctcaggtact gctatccacc ctcaaacagg tgaattatta 60
gcacttgtaa gcacaccttc 80

<210> 8

<211> 80

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<213> 人工序列的描述: 合成的靶基因-B

<400> 8

gaaggtgtgc ttacaagtgc taataattca cctgtttgag ggtggatagc agtacctgag 60
ccataatcat ttttcatgtt 80

<210> 9

<211> 41

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> misc_feature

<223> 连接在 5'端的甲基

<220>

<213> 人工序列的描述: 合成的甲基化探针-1

<400> 9

gtgctgactt aaccggatac gattatggct caggtactgc t 41

<210> 10

<211> 39

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> misc_feature

<223> 连接在 5'端的磷酸

<220>

<221> misc_feature

<223> 连接在 3'端的甲基

<220>

<213> 人工序列的描述: 合成的甲基化探针-2

<400> 10

atccaccctc aaacaggtgg attgtactg cgagatagg

39

<210> 11

<211> 40

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> misc_feature

<223> 连接在 5'端的甲基

<220>

<213> 人工序列的描述: 合成的甲基化探针-3

<400> 11

gacgcttct gcgtgatag cacctgttg aggtggata

40

<210> 12

<211> 40

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> misc_feature

<223> 连接在 5'端的磷酸

<220>

<221> misc_feature

<223> 连接在 3'端的甲基

<220>

<213> 人工序列的描述: 合成的甲基化探针-4

<400> 12

gcagtacctg agccataatc ctagaacgga tcgtacttcg 40

<210> 13

<211> 40

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<213> 人工序列的描述: 合成的交联探针-5

<400> 13

ctatacacgc agaaagcgtc cgaagtagca tccgttctag 40

<210> 14

<211> 40

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<213> 人工序列的描述: 合成的交联探针-6

<400> 14

gtatccggtt aagtcagcac-cctatctcgc agtaccattc 40

<210> 15

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> misc_feature

<223> 连接在 5'端的磷酸

<220>

<221> misc_feature

<223> 连接在 3'端的甲基

<220>

<213> 人工序列的描述: 合成的扩增用探针-1

<400> 15

cggaagctcc tatgacaatg

20

<210> 16

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> misc_feature

<223> 连接在 5'端的磷酸

<220>

<221> misc_feature

<223> 连接在 3'端的甲基

<220>

<213> 人工序列的描述: 合成的扩增用探针-2

<400> 16

gttgatgctc tcggctagtg

20

<210> 17

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> misc_feature

<223> 连接在 5'端的磷酸

<220>

<213> 人工序列的描述: 合成的扩增用探针-3

<400> 17

cggaagctcc tatgacaatg

20

<210> 18

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>
 <221> misc_feature
 <223> 连接在 5'端的磷酸

<220>
 <213> 人工序列的描述: 合成的扩增用探针-4

<400> 18
 gttgacgctc tcggctagtg 20

<210> 19
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <213> 人工序列的描述: 合成的二聚体形成用探针-3

<400> 19
 tatgacaatg gatcctagac cggaagctcc 30

<210> 20
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <213> 人工序列的描述: 合成的二聚体形成用探针-4

<400> 20
 tcggctagtg gtctaggatc gttgacgctc 30

<210> 21
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> misc_feature
 <223> 连接在 5'端的磷酸

<220>
 <221> misc_RNA
 <222>(18)...(20)

<223> 嵌合的 DNA/RNA

<220>

<213> 人工序列的描述: 合成的扩增用嵌合探针-1

<400> 21

cggaagctcc tatgacaug

20

<210> 22

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> misc_feature

<223> 连接在 5'端的磷酸

<220>

<221> misc_RNA

<222>(18)...(20)

<223> 嵌合的 DNA/RNA

<220>

<213> 人工序列的描述: 合成的扩增用嵌合探针-2

<400> 22

gttgatcgtc tcggctagug

20

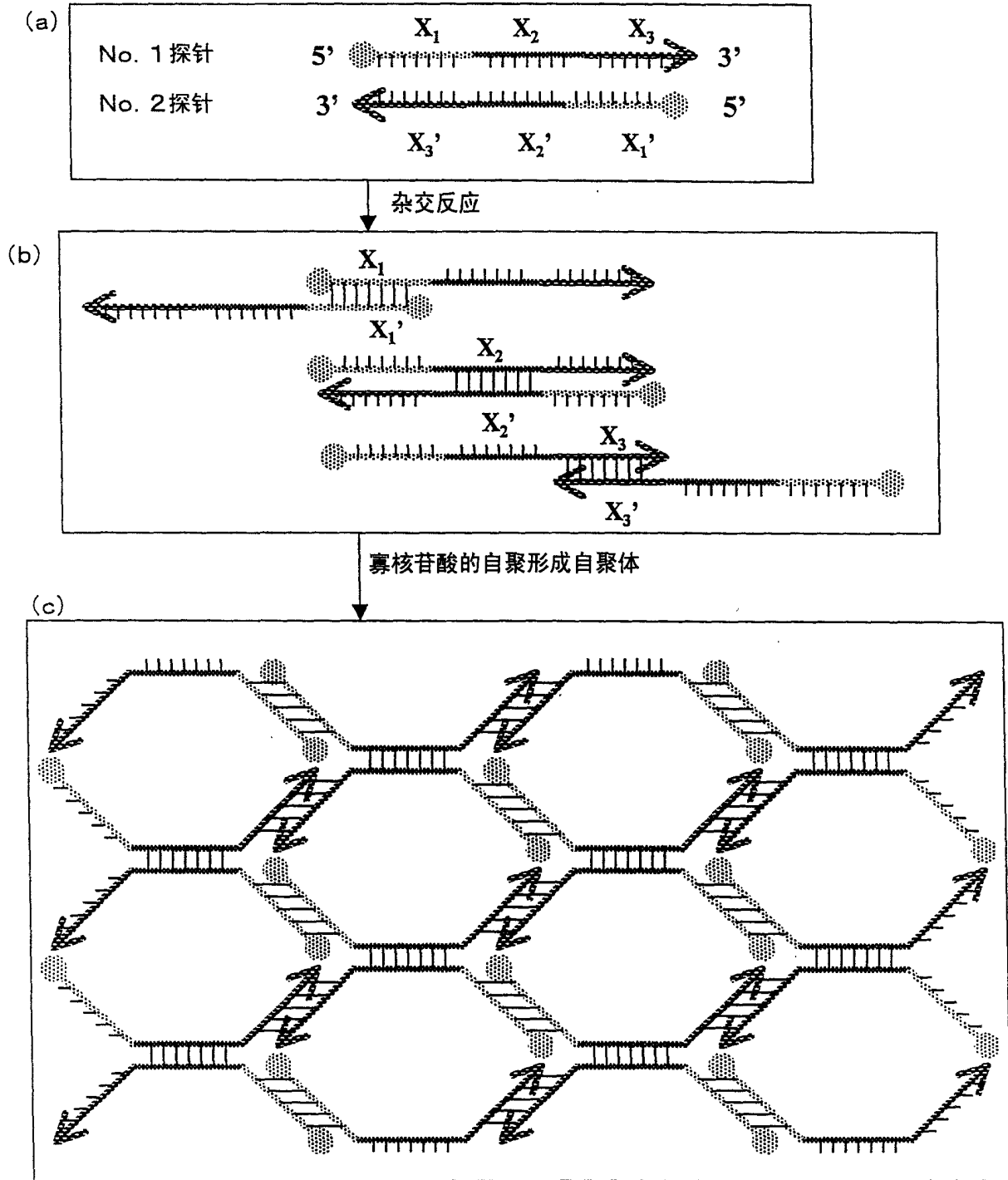


图 1

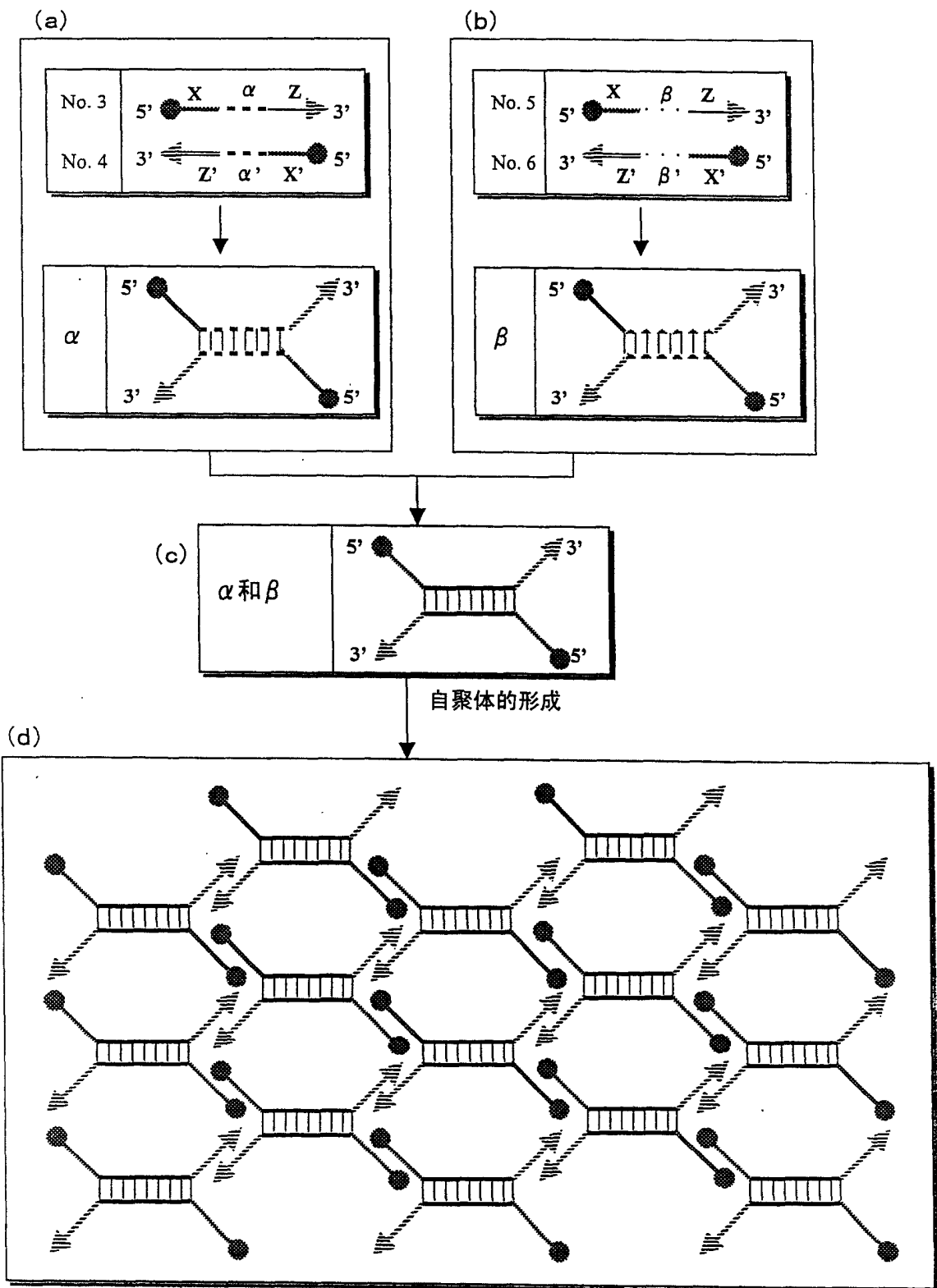


图 2

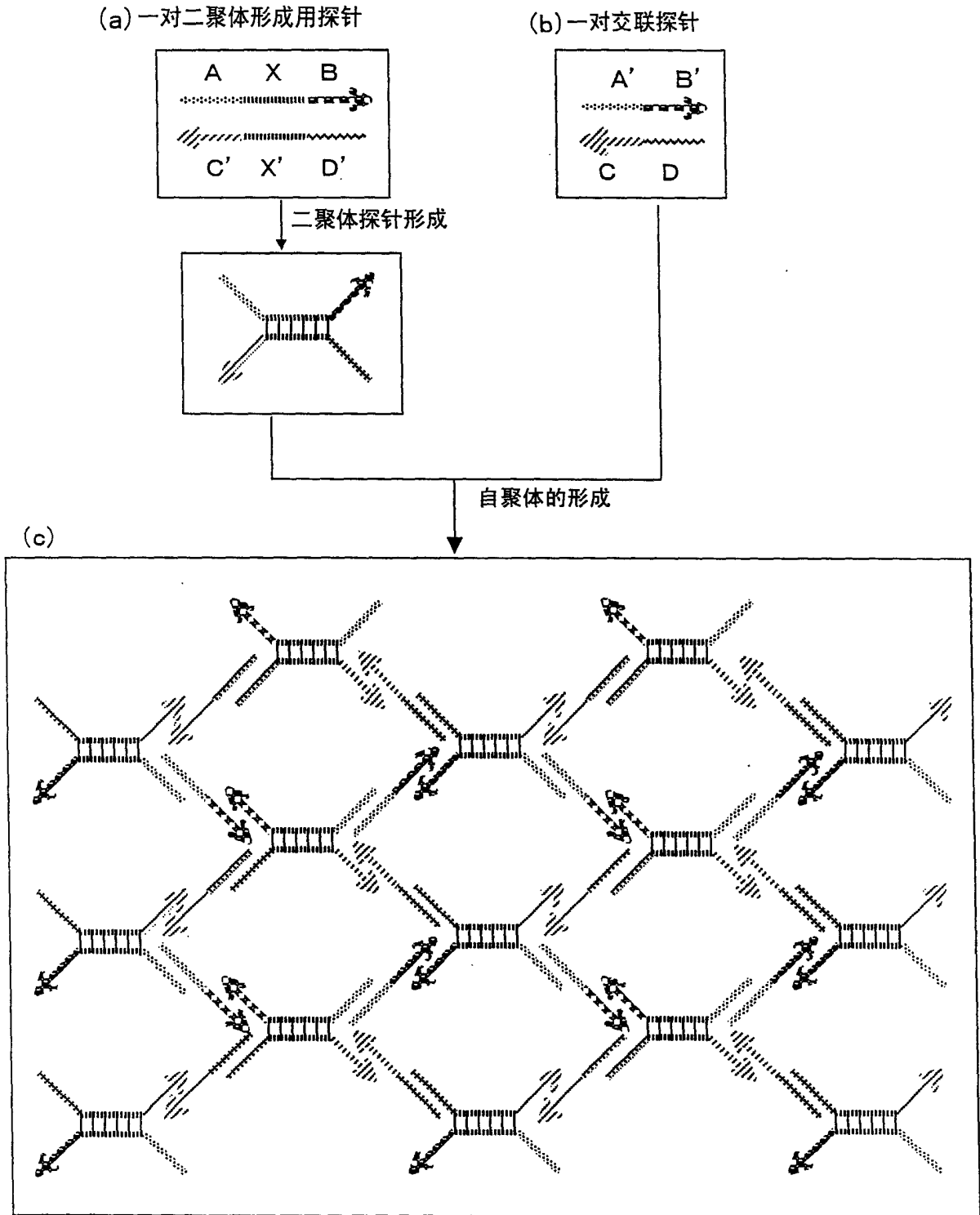


图 3

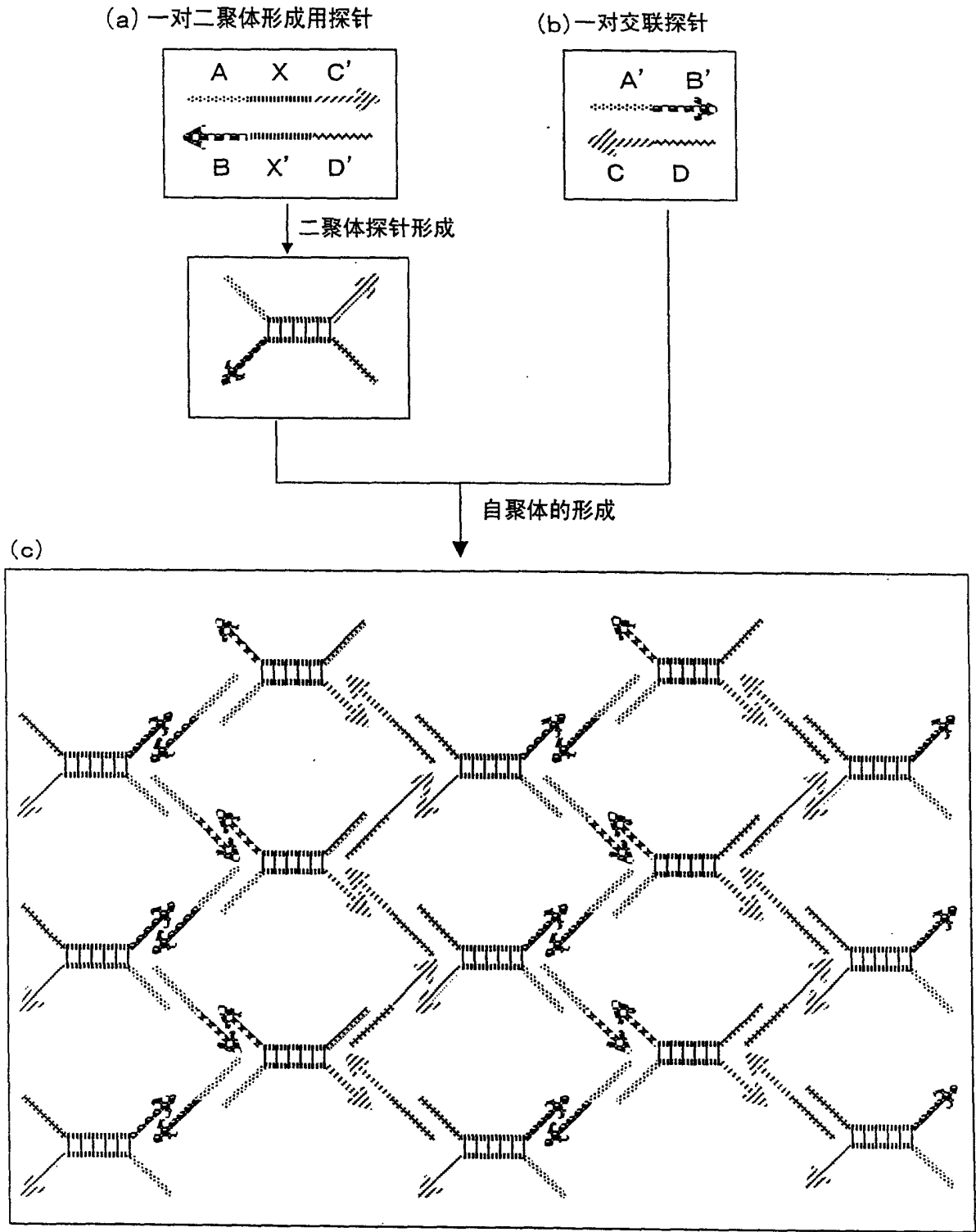
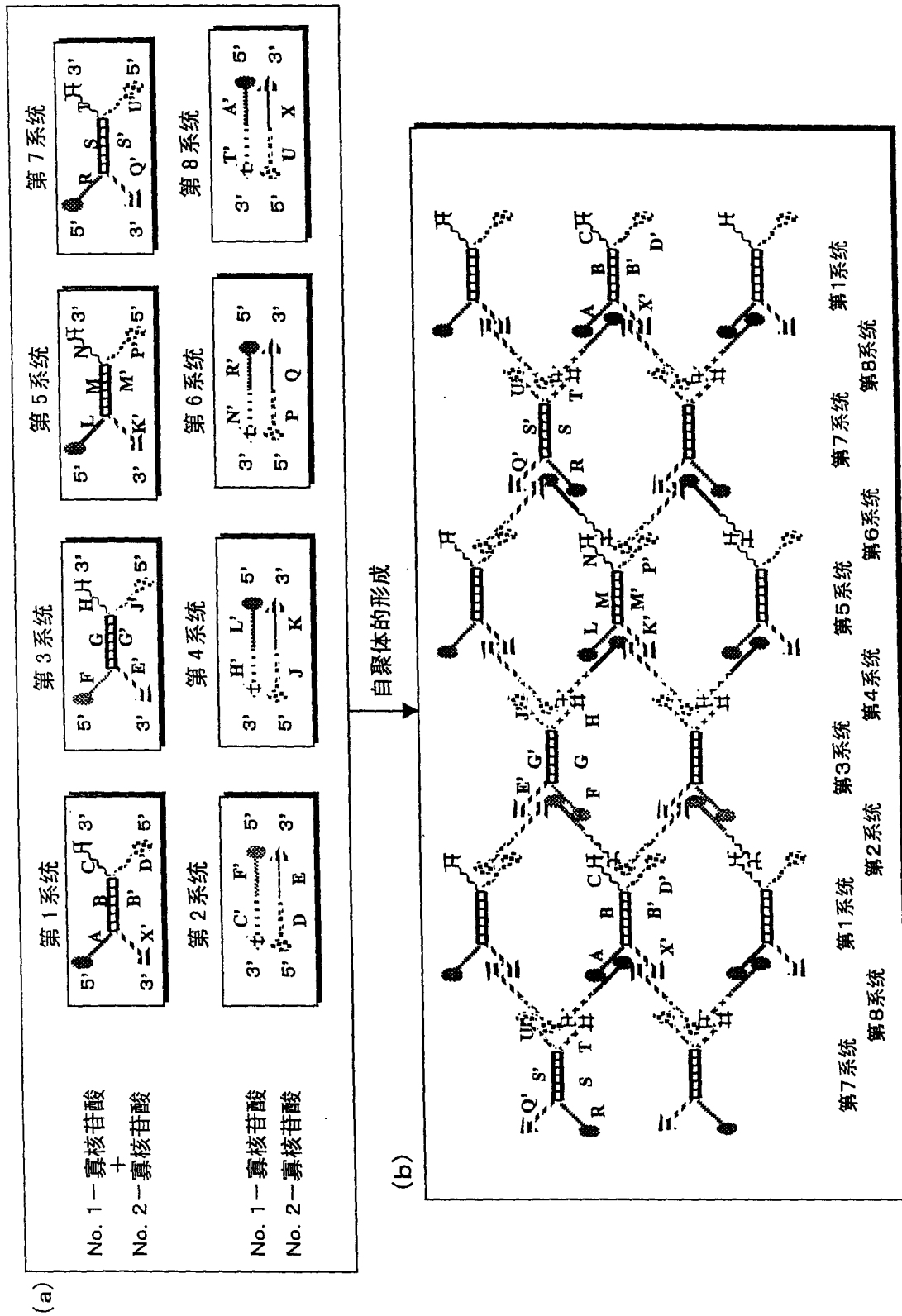


图 4



在形成的自聚体中的系统的排列,在 $n = 4$ 之前为 $(\dots(7) \cdot (8) \cdot (1) \cdot (2) \cdot \dots(6) \cdot (7) \cdot (8) \cdot (1) \cdot (2) \cdot \dots)$ 。
 在 $n = k$ 时的系统中,为 $(\dots(2k-2) \cdot (2k-1) \cdot 2k \cdot 1 \cdot 2 \cdot 3 \cdot 4 \cdot \dots(2k-3) \cdot (2k-2) \cdot (2k-1) \cdot 2k \cdot 1 \cdot 2 \cdot \dots)$ 。

图 5

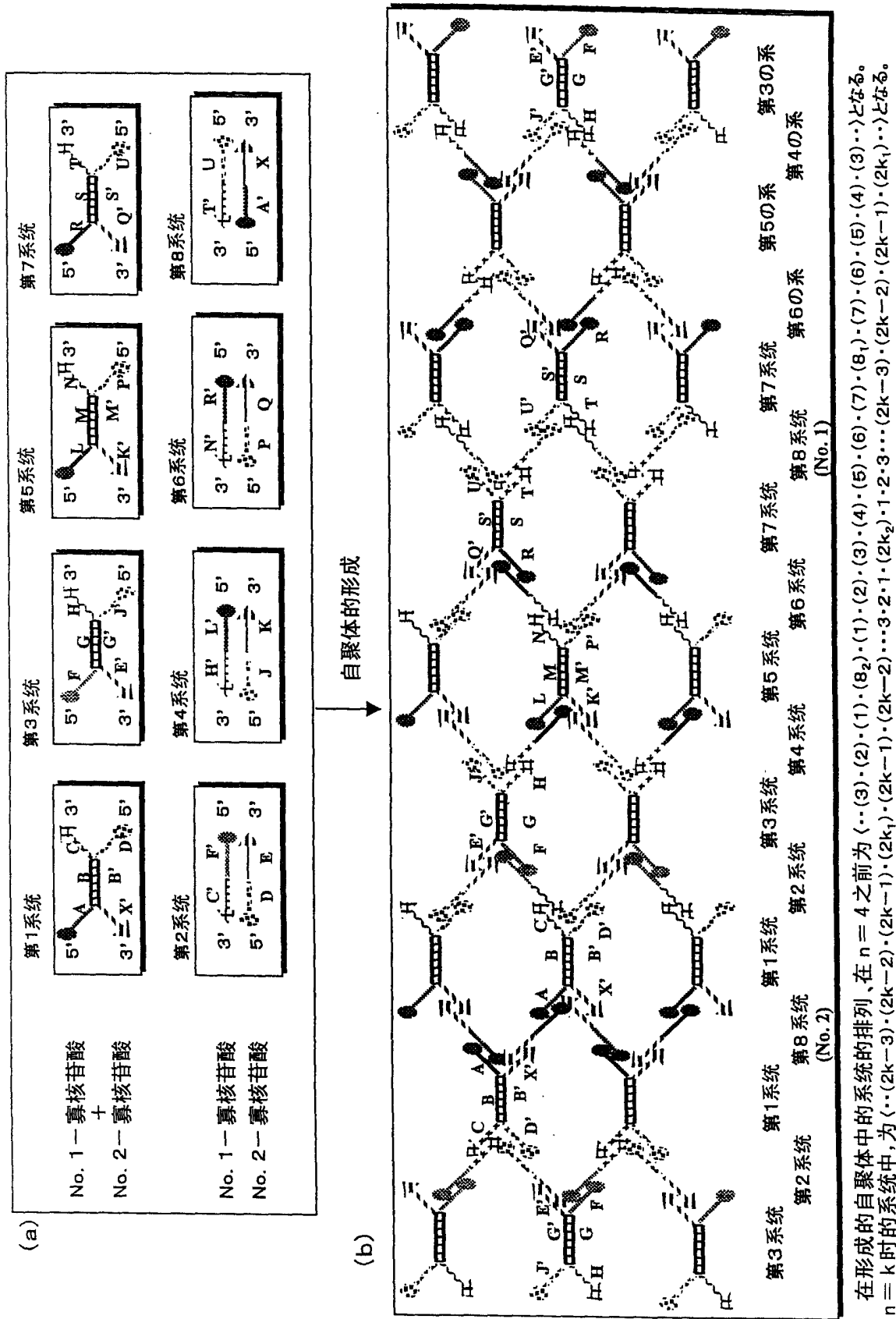


图6

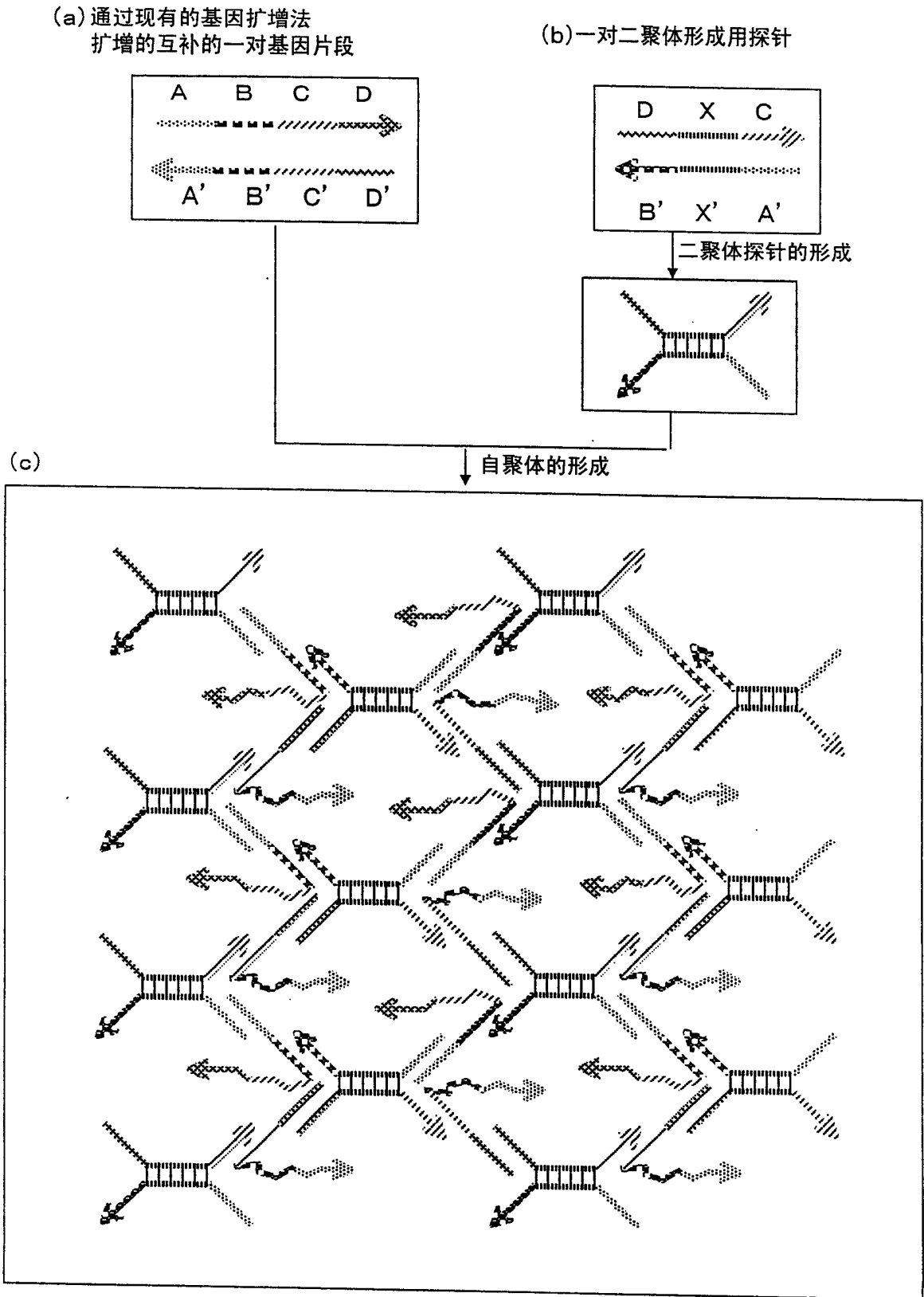
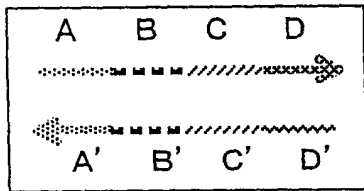
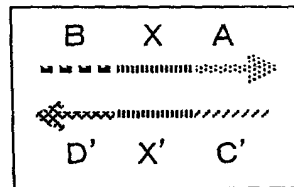


图 7

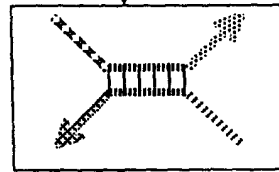
(a) 通过现有的基因扩增法
扩增的互补的一对基因片段



(b) 一对二聚体形成用探针



二聚体探针的形成



自聚体的形成

(c)

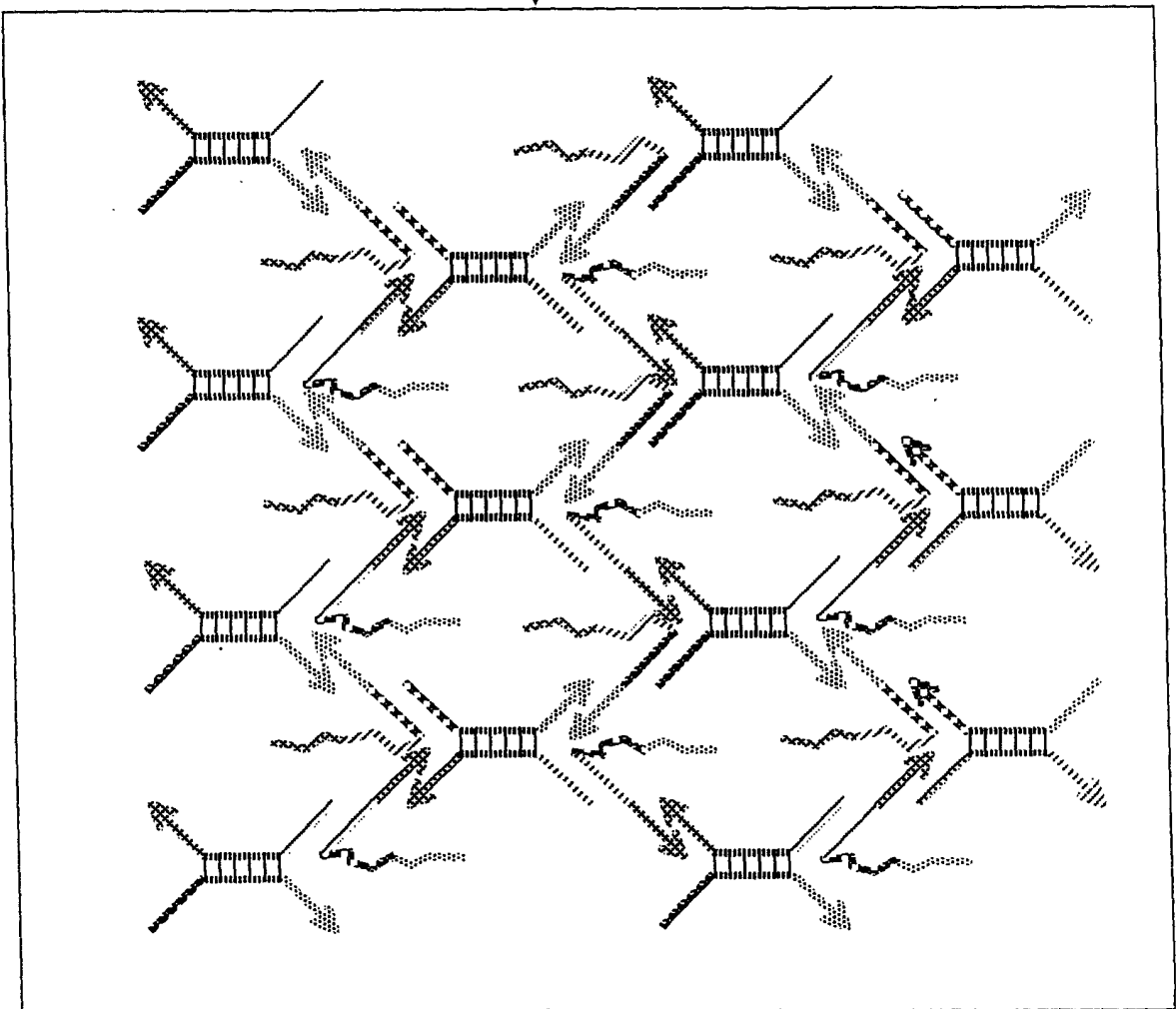


图 8

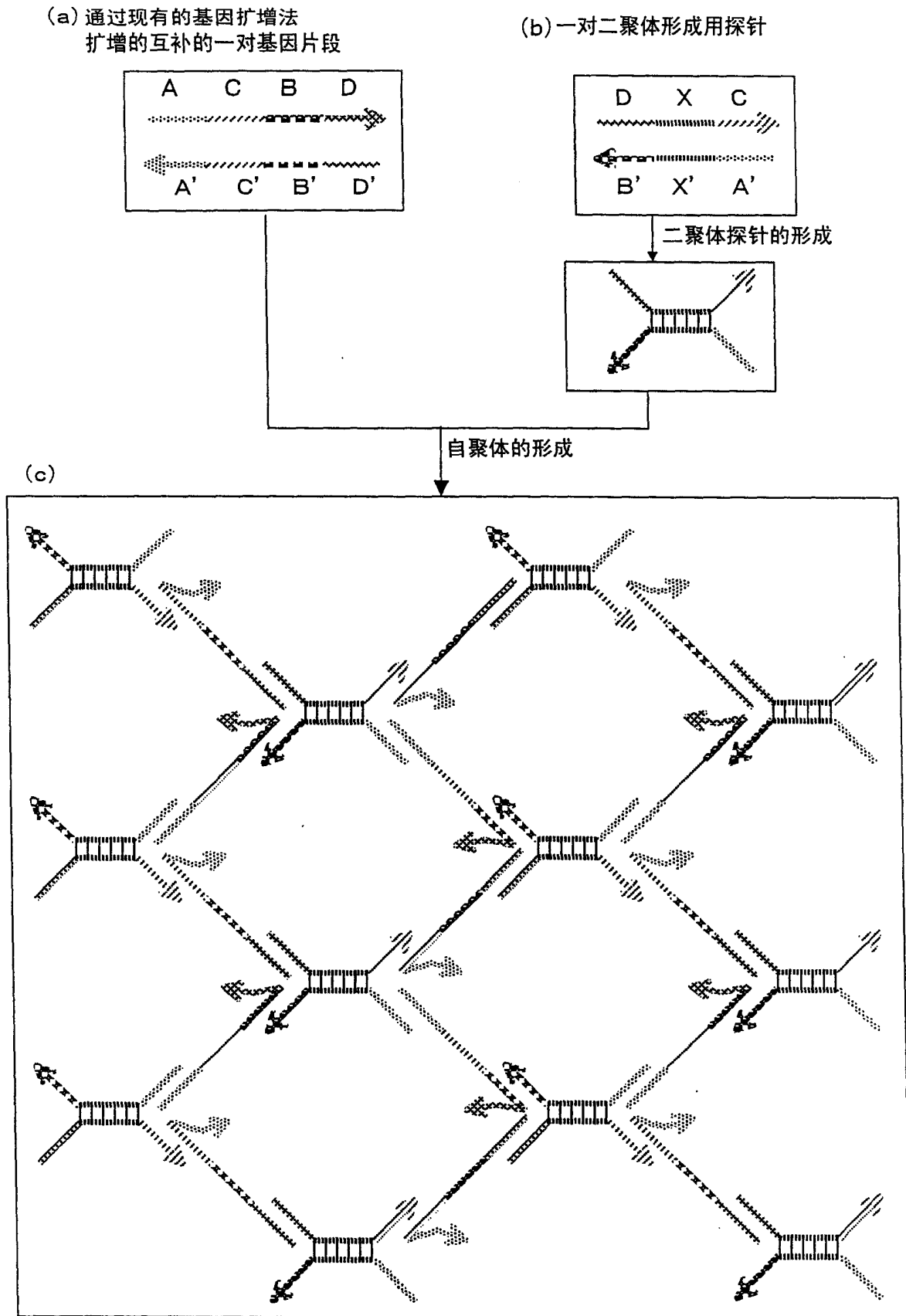


图 9

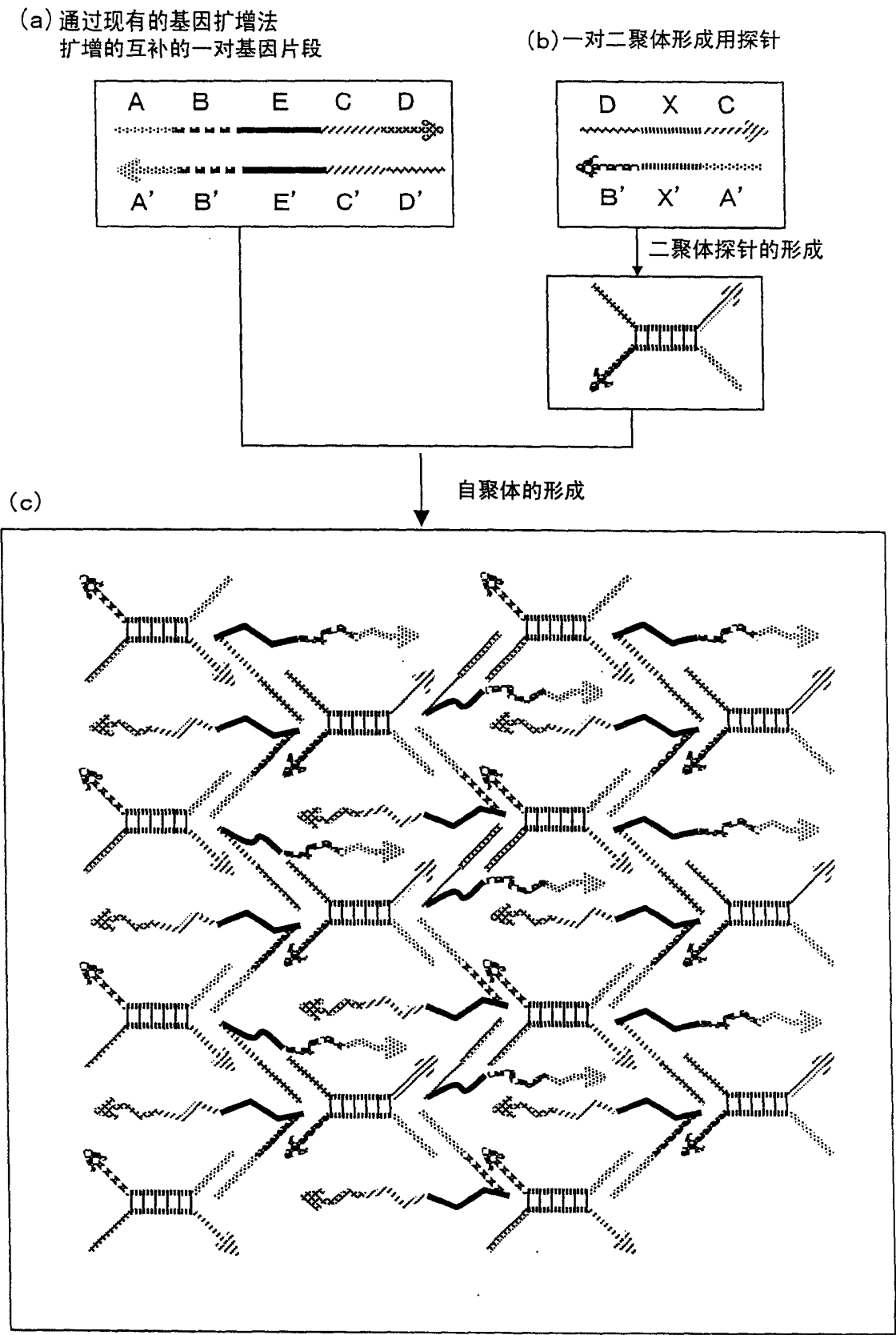


图 10

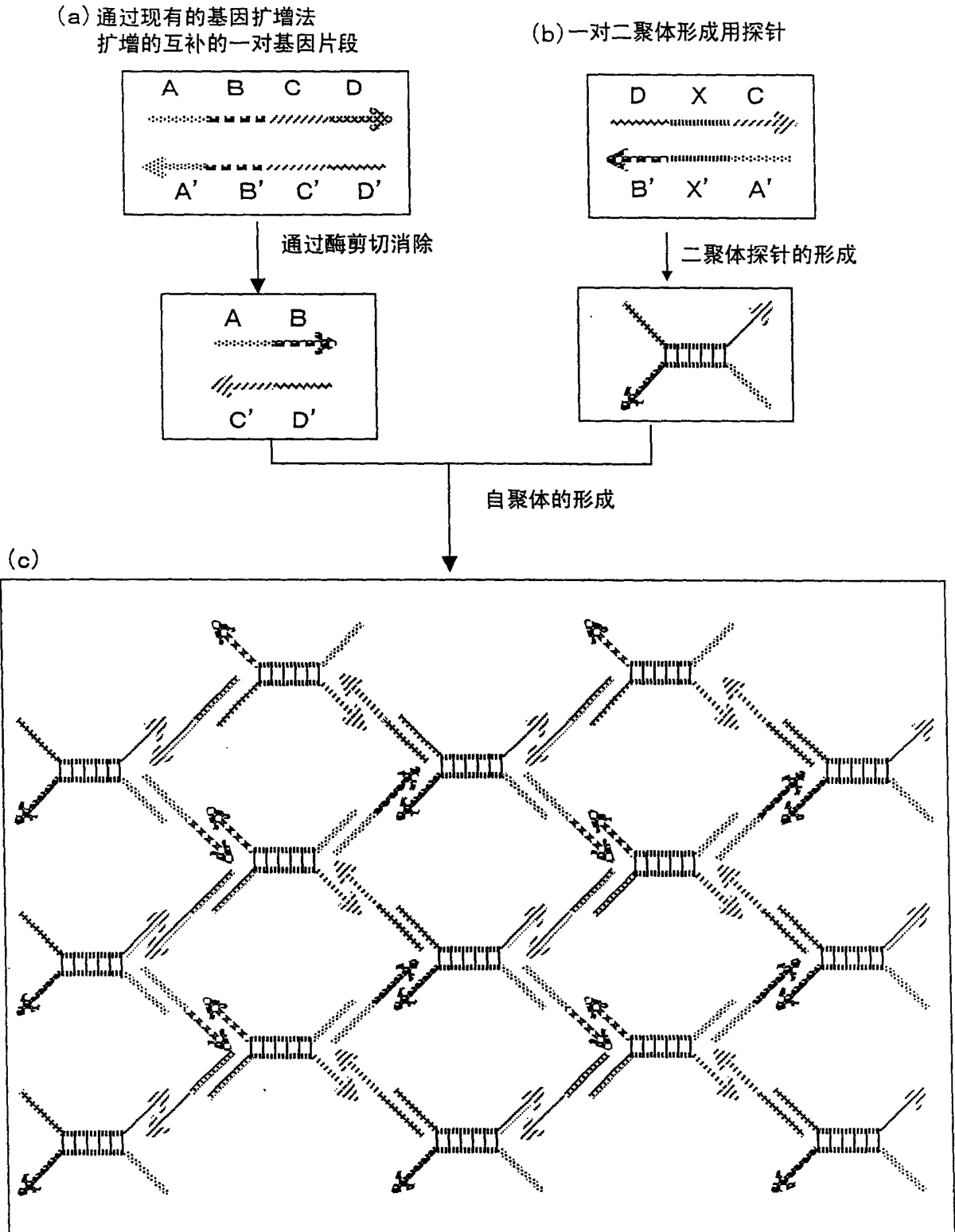


图 11

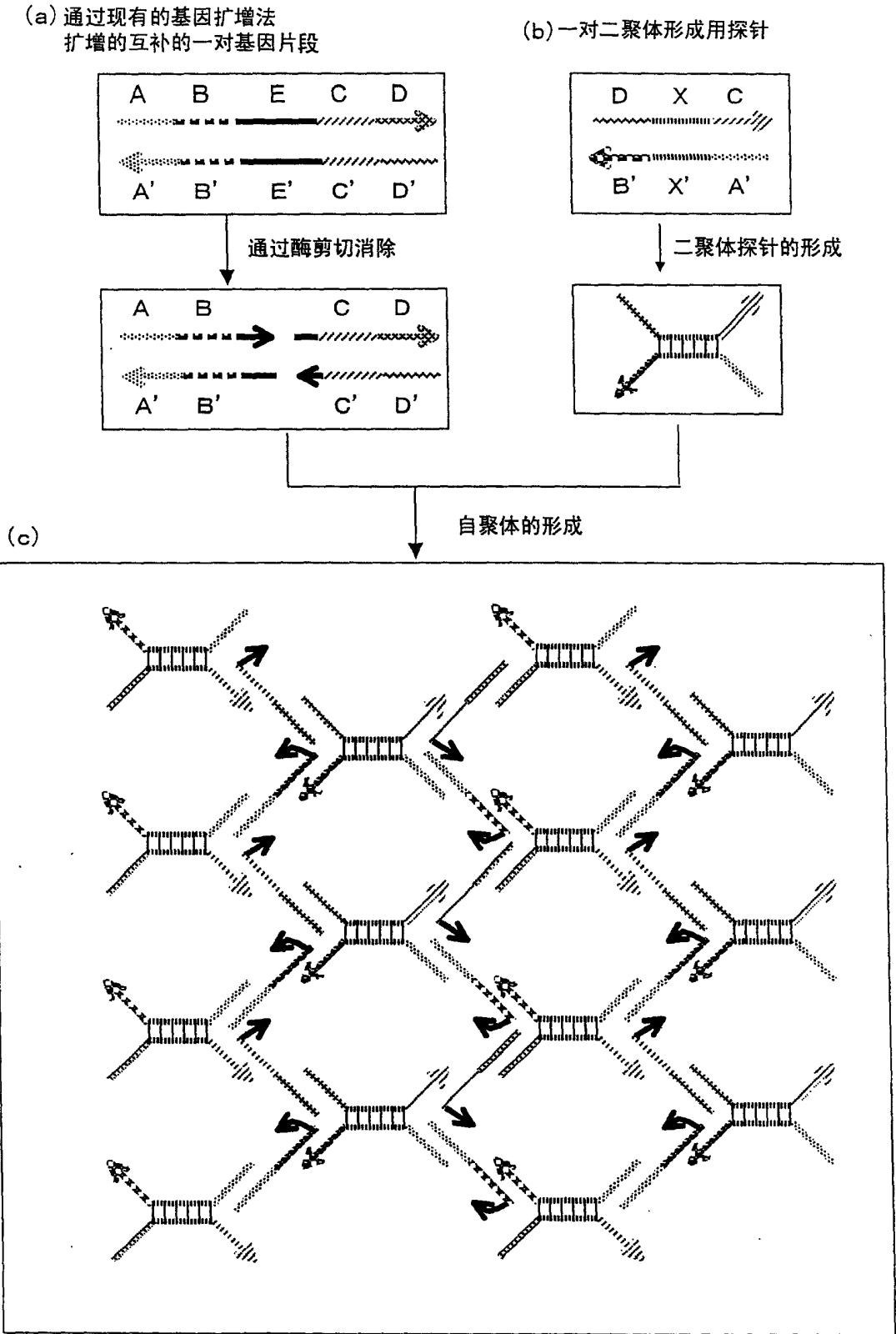


图 12

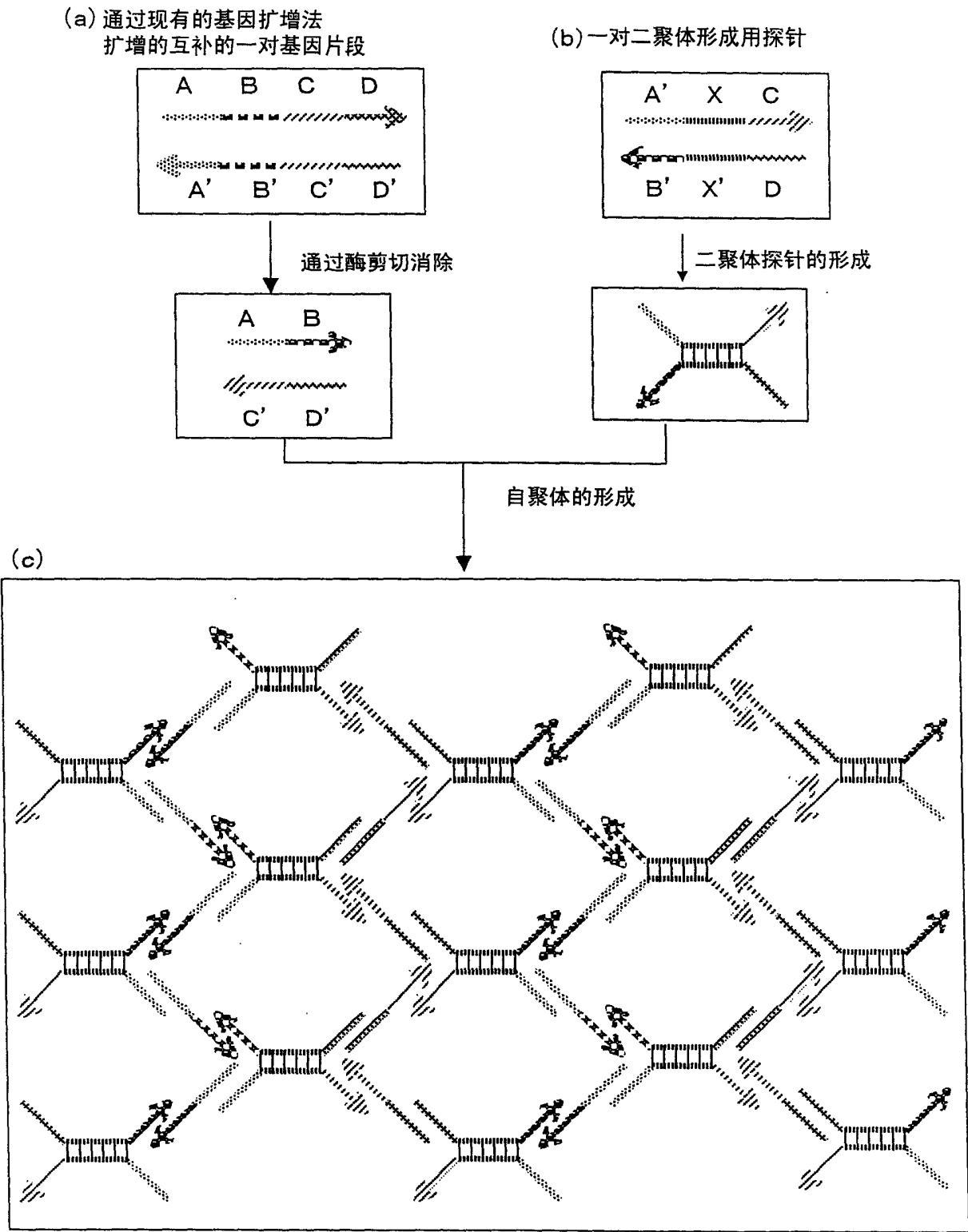


图 13

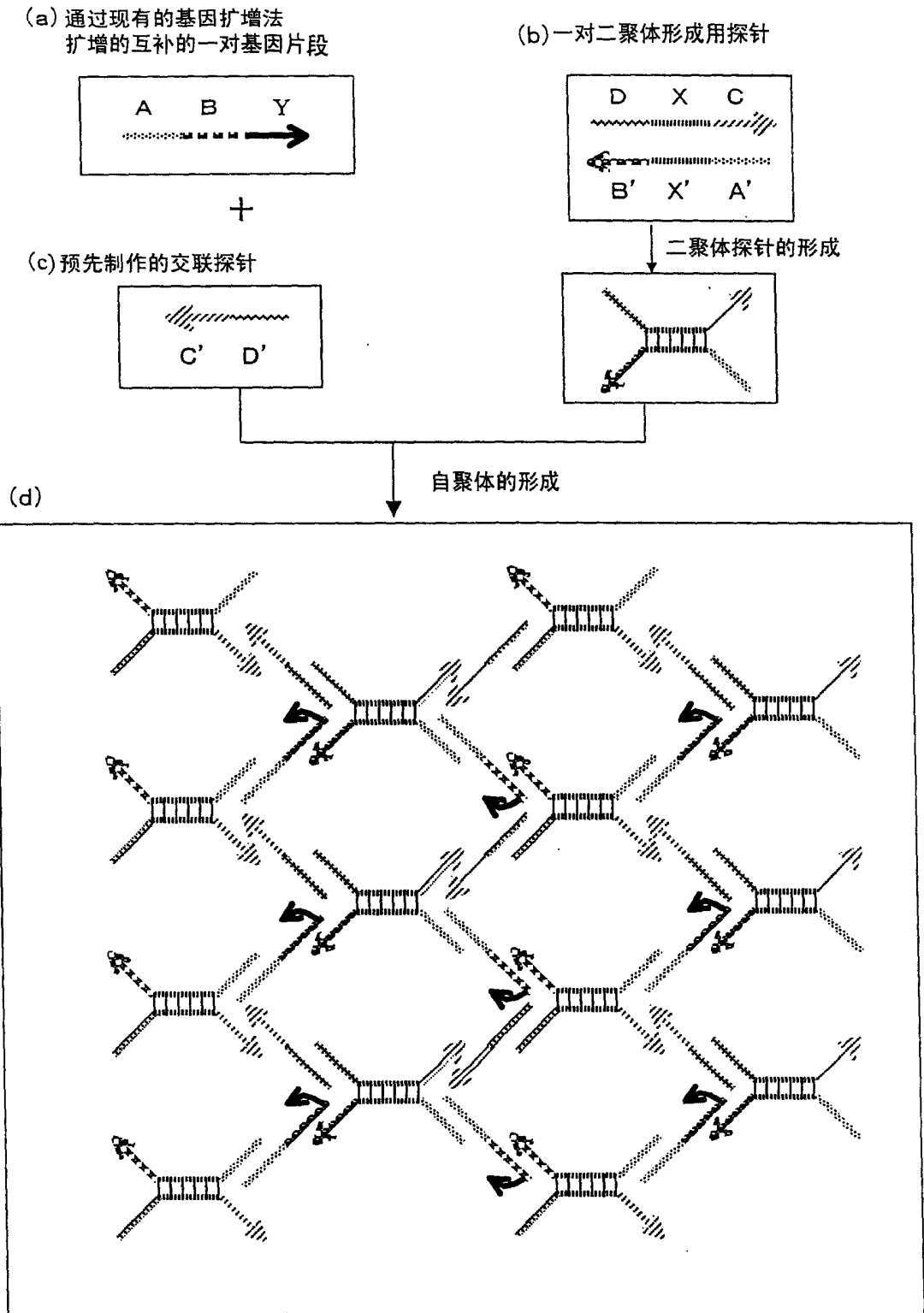


图 14

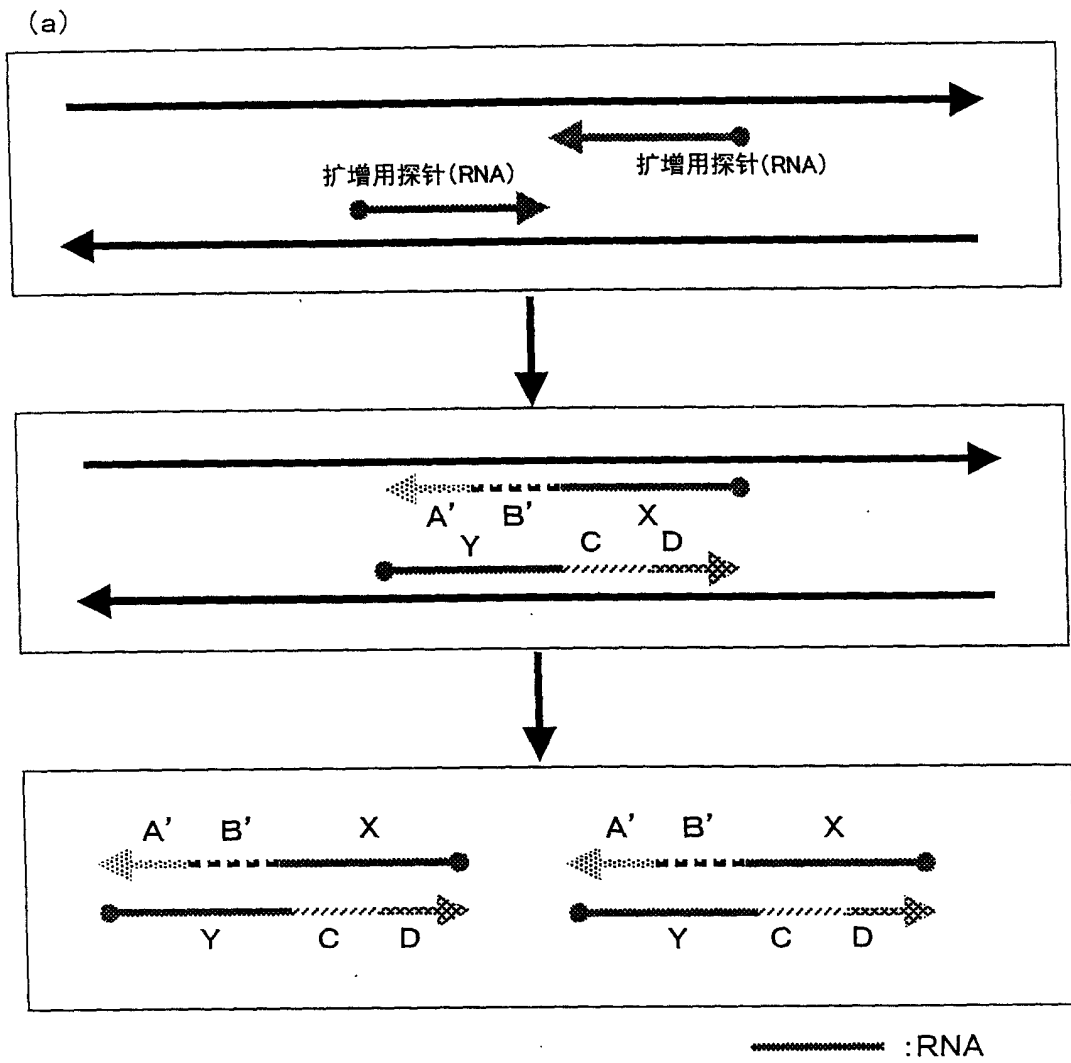
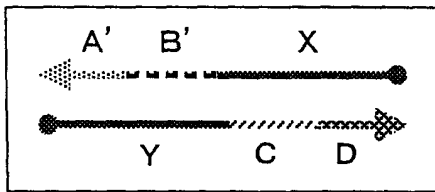
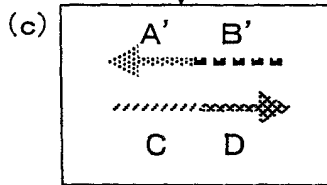


图 15

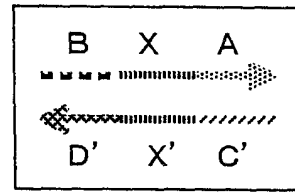
(b) 通过利用扩增用 RNA 探针的基因扩增法扩增的一对基因片段



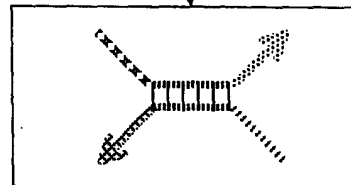
通过 RNase H 剪切



(d) 一对二聚体形成用探针



二聚体探针的形成



自聚体的形成

(e)

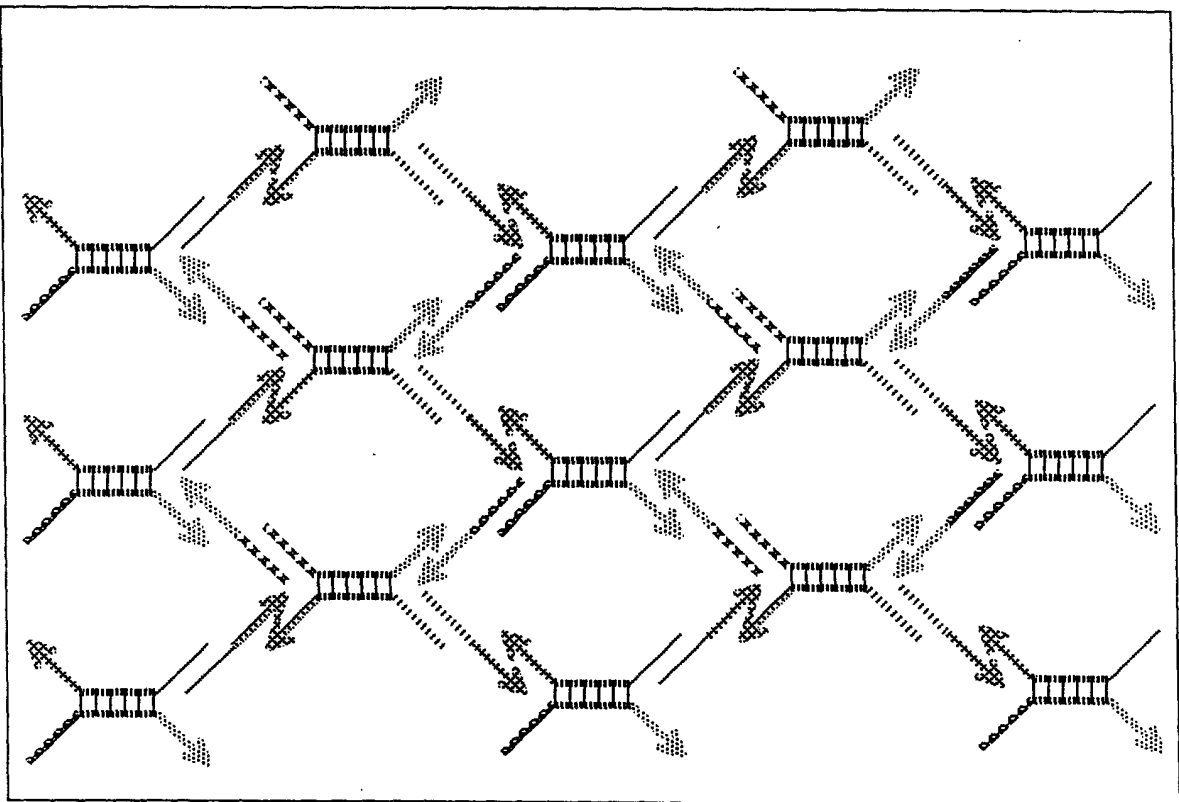


图 16

碱基的甲基化

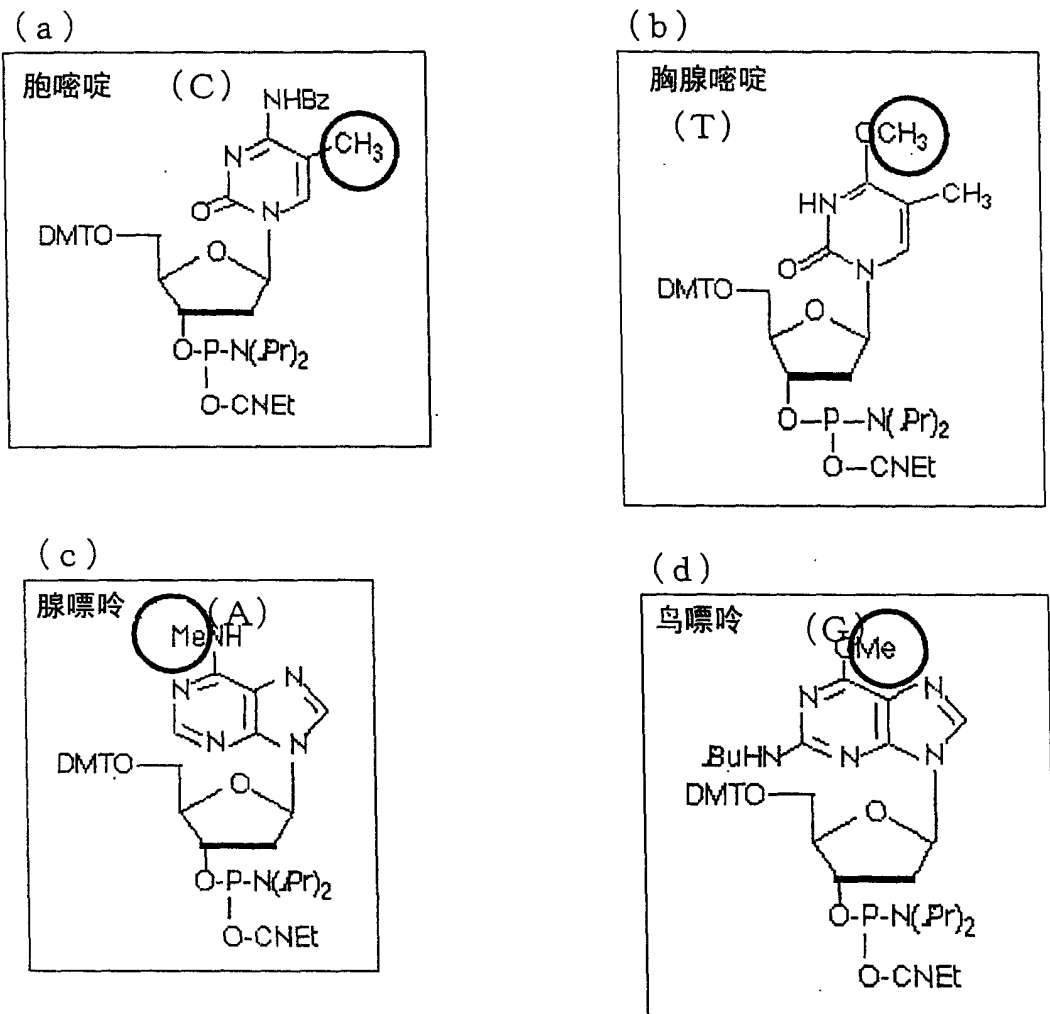


图 17

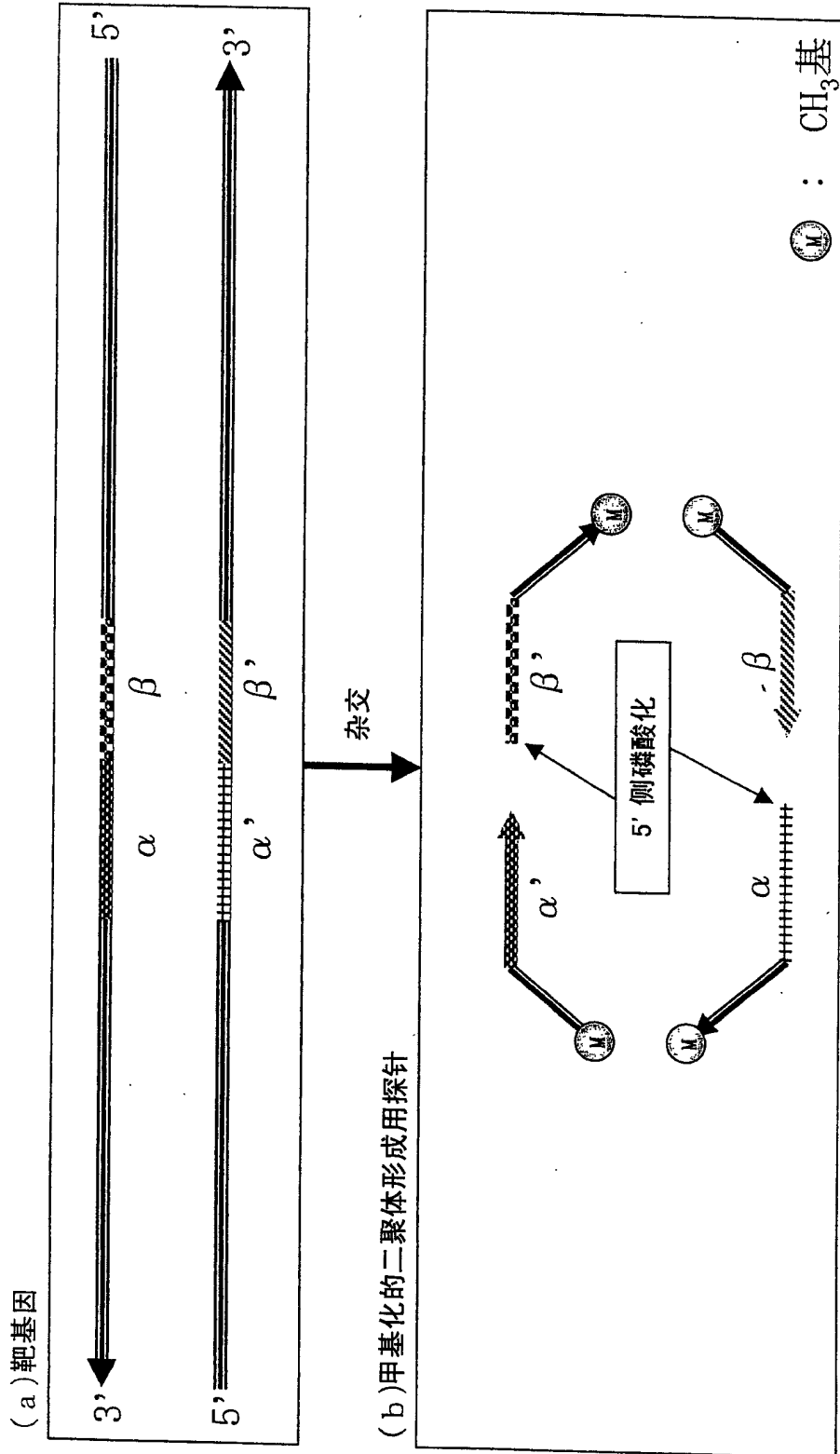


图 18

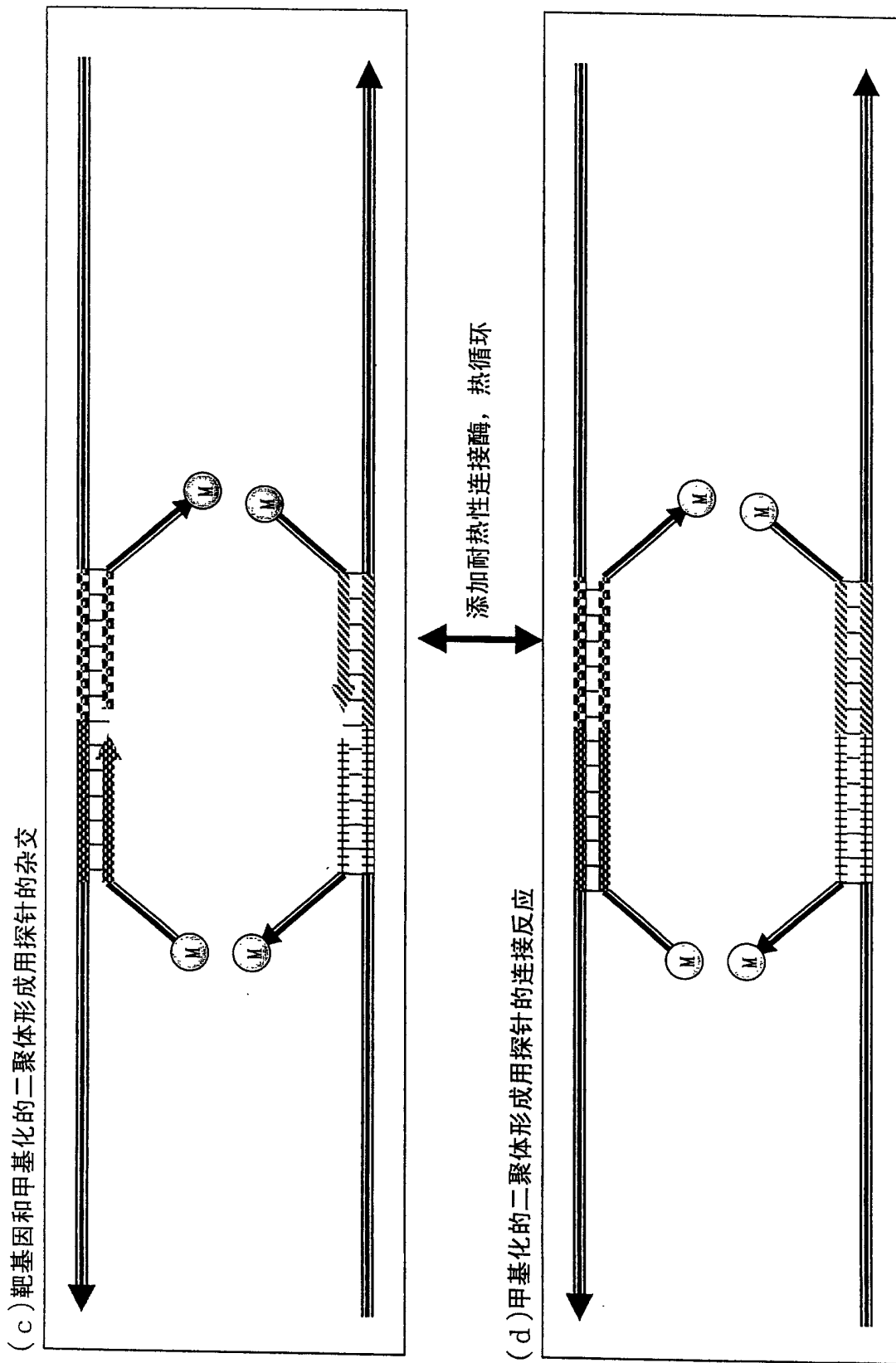


图 19

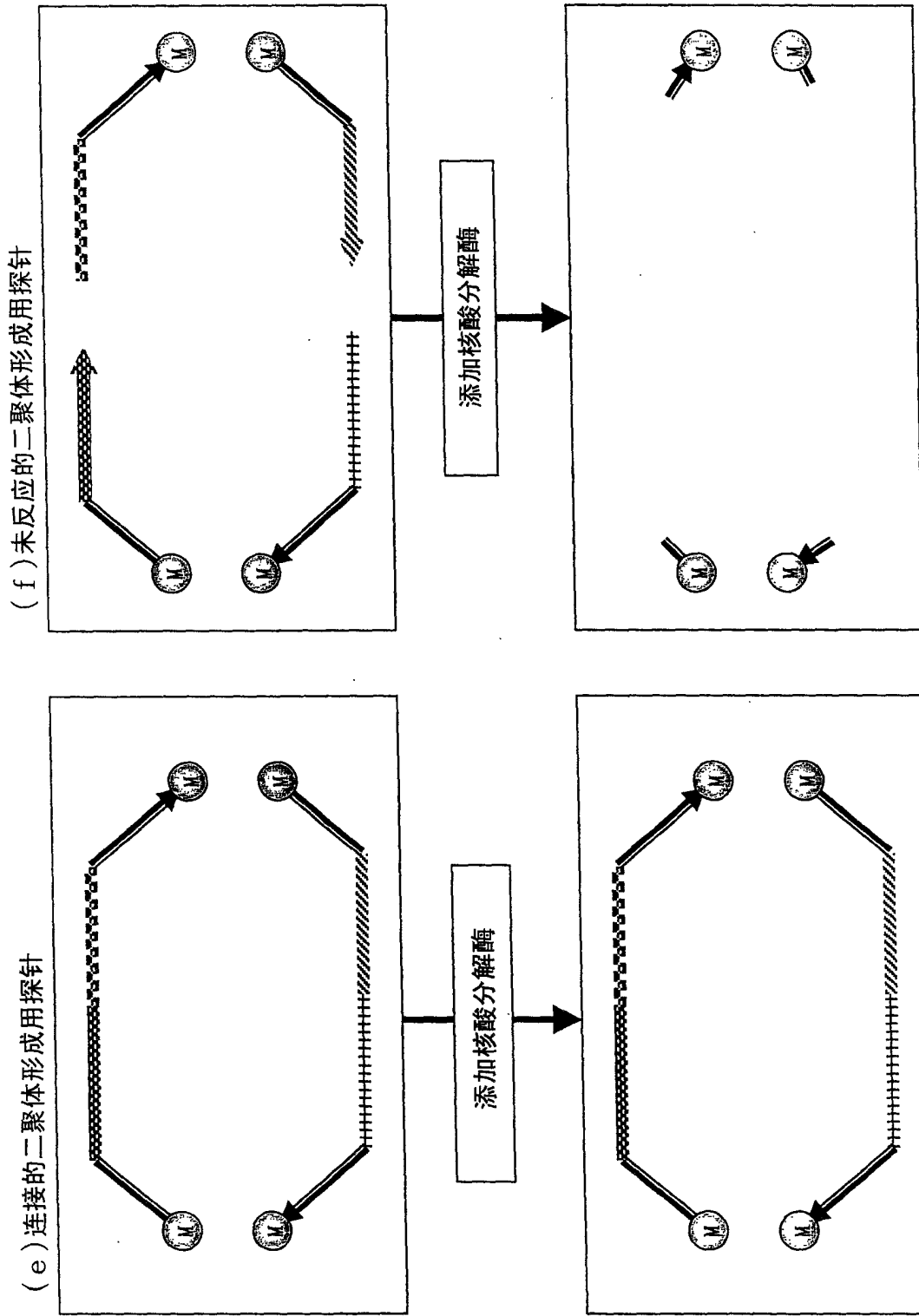


图 20

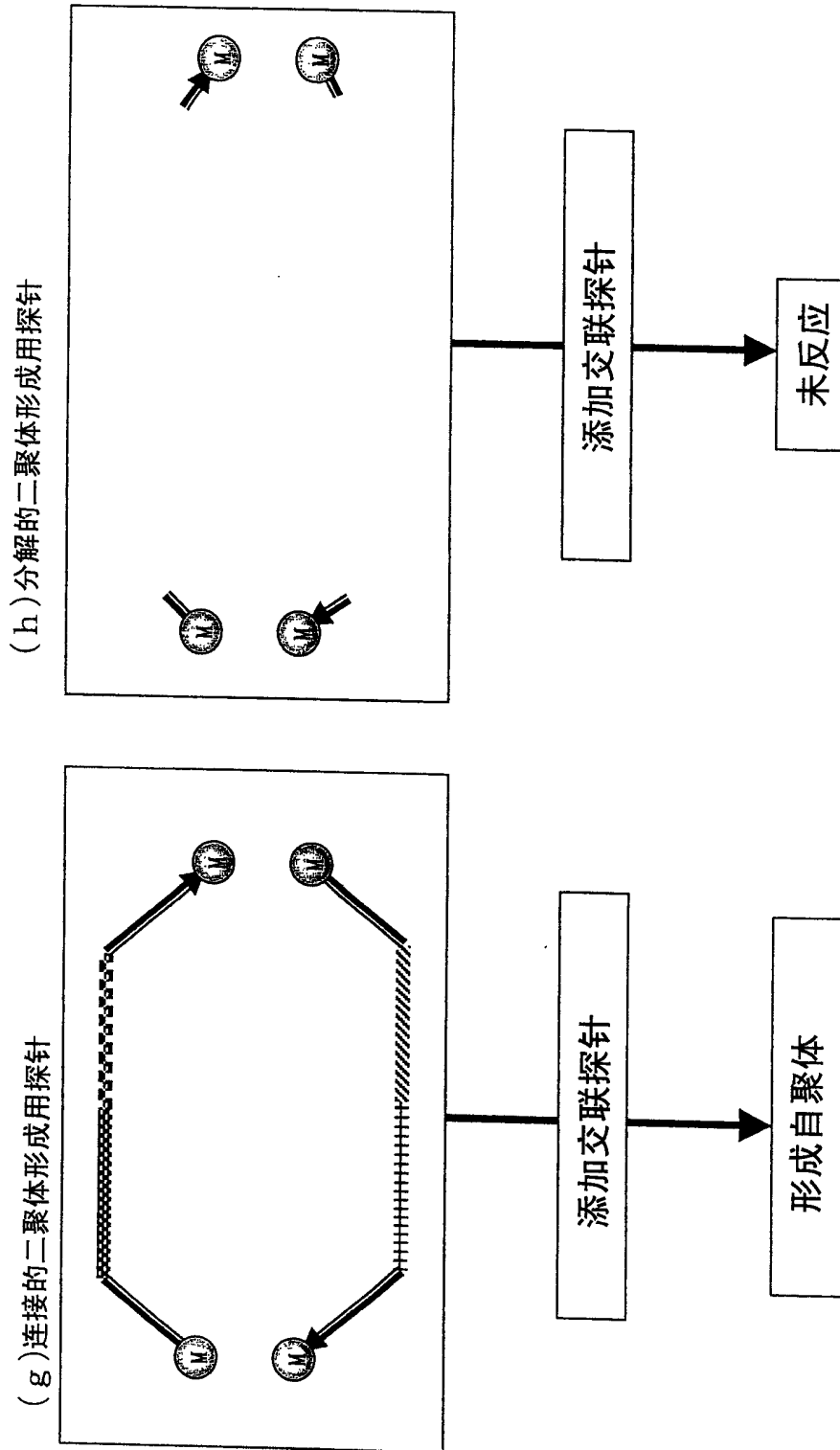


图 21

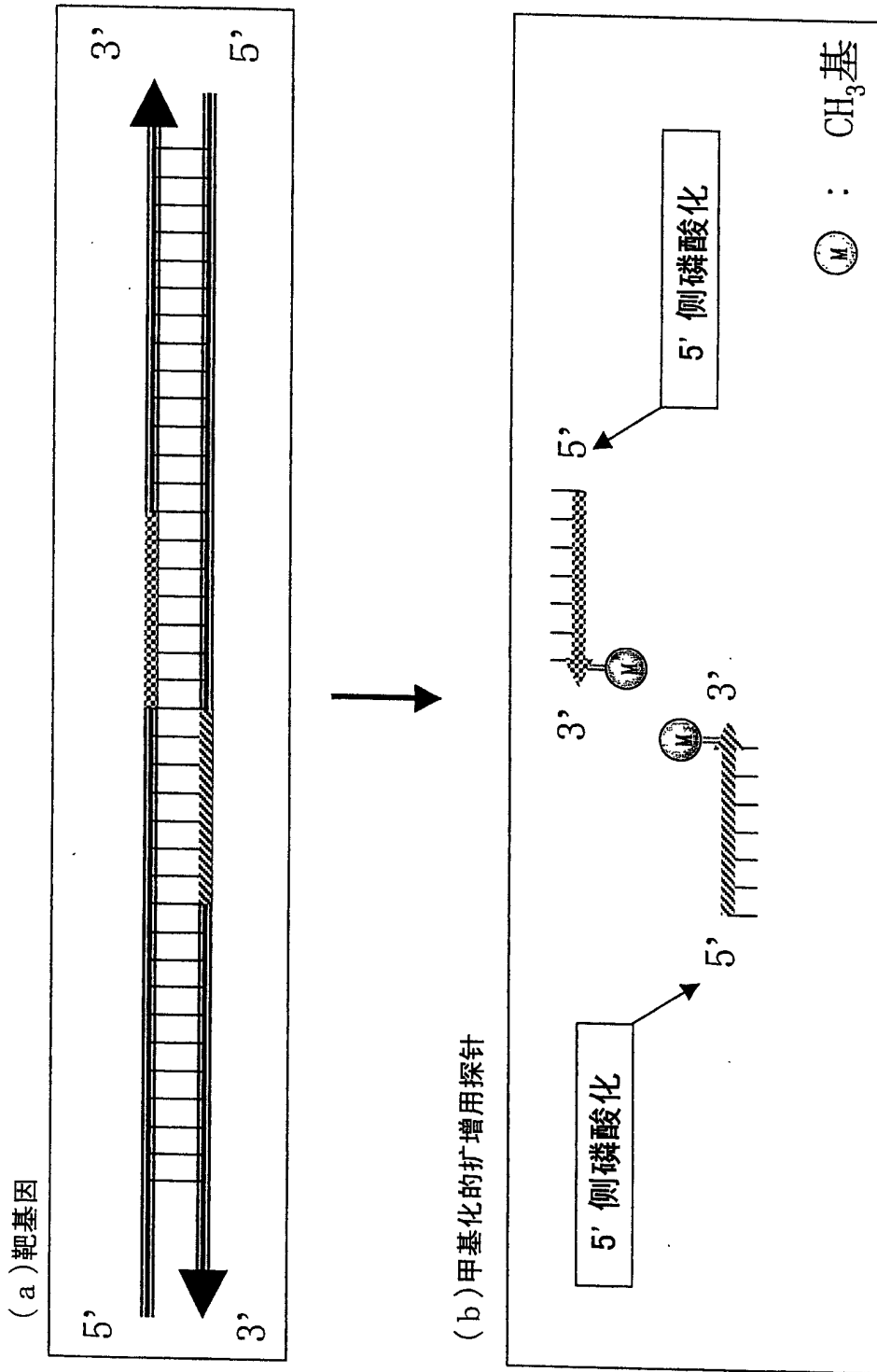
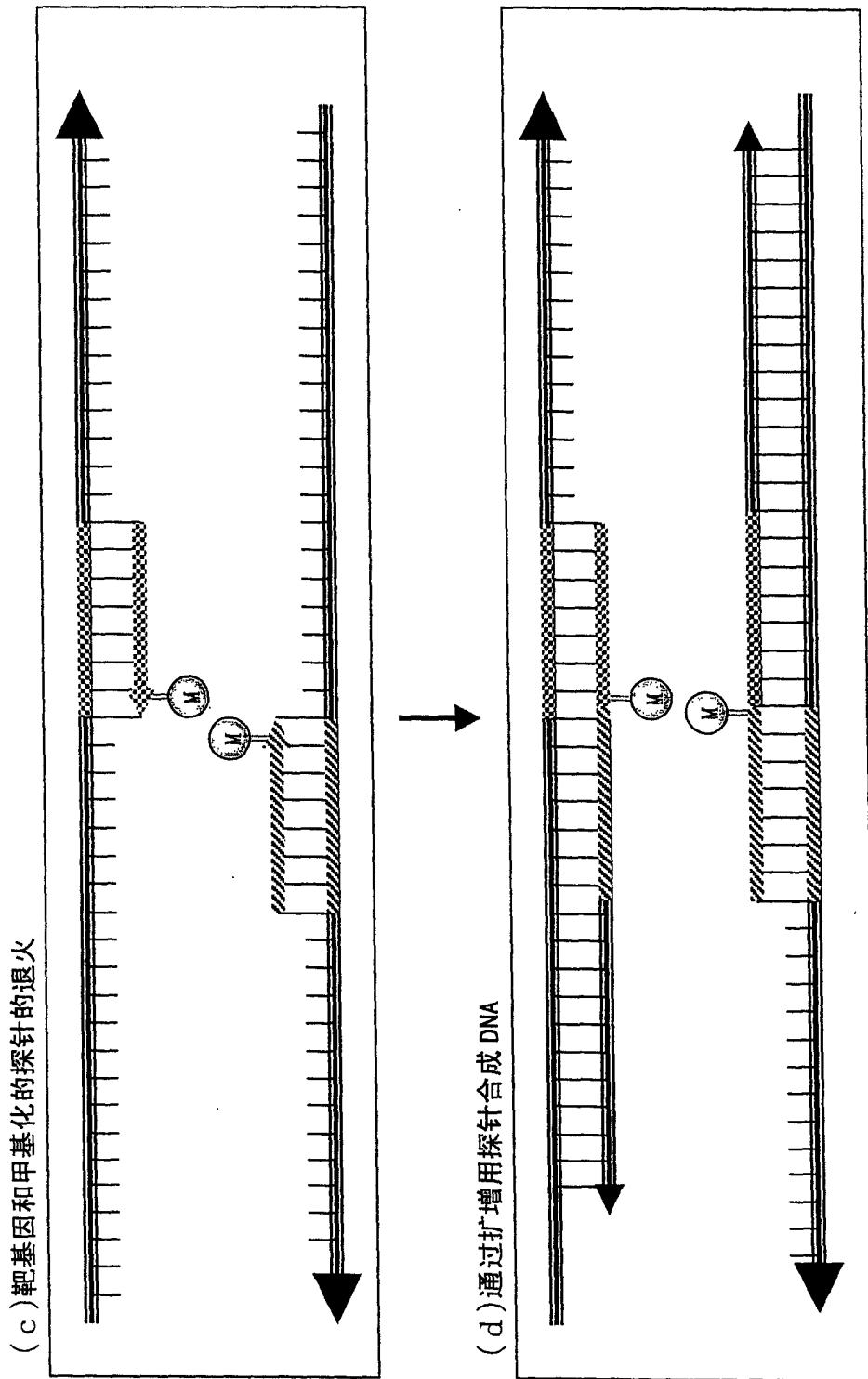


图 22



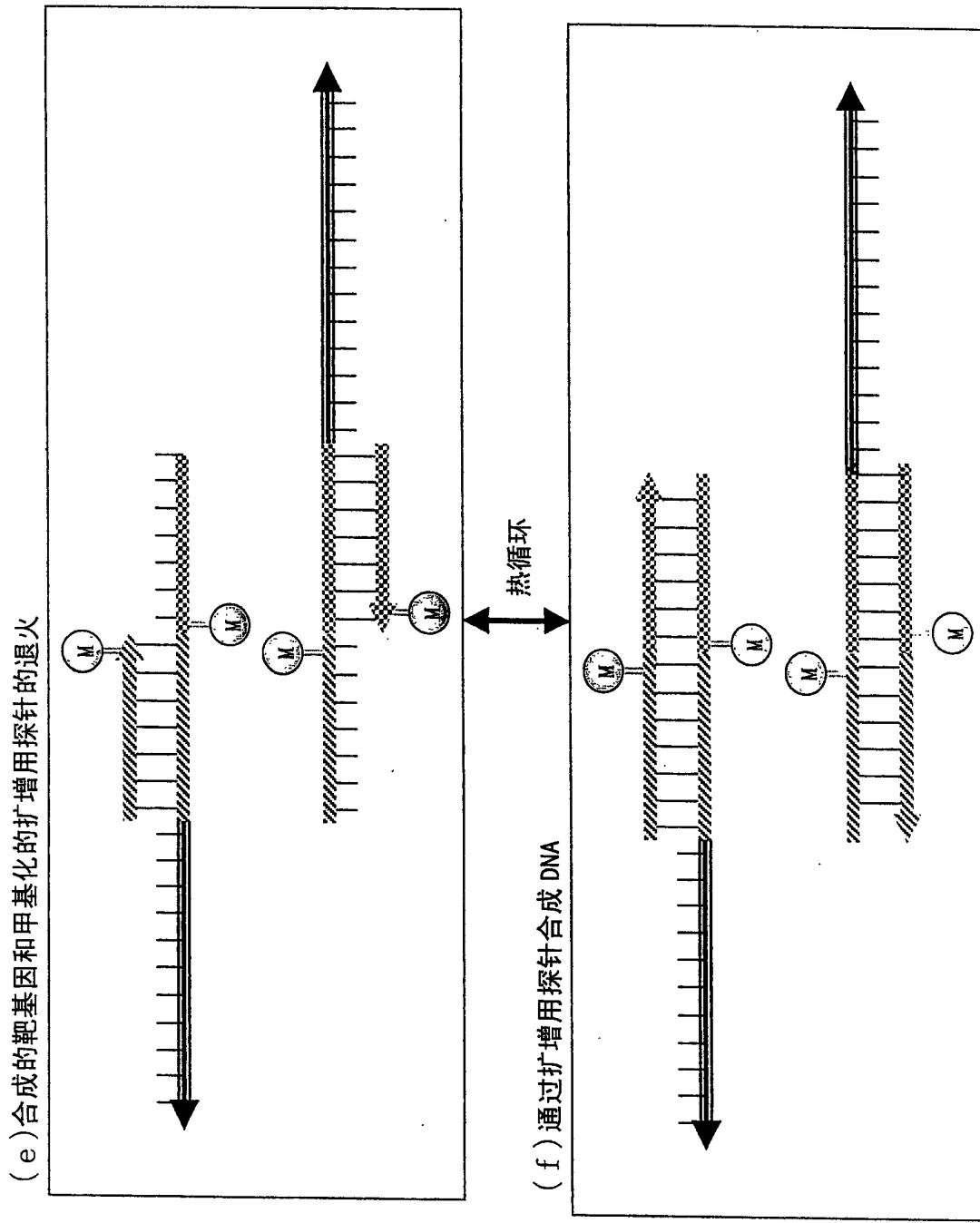
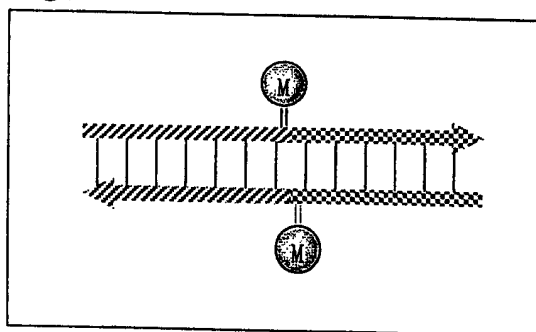


图 24

(g) 合成探针



(h) 通过核酸分解酶除去互补链的5'侧

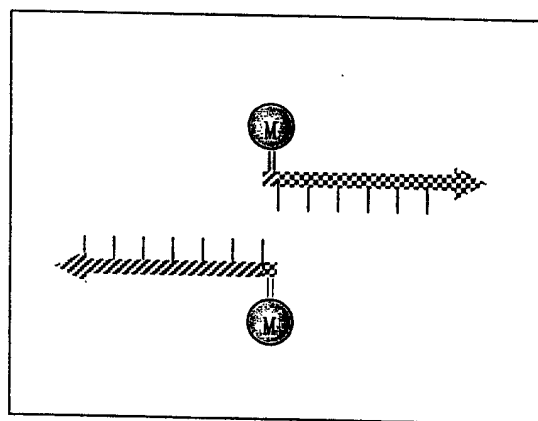
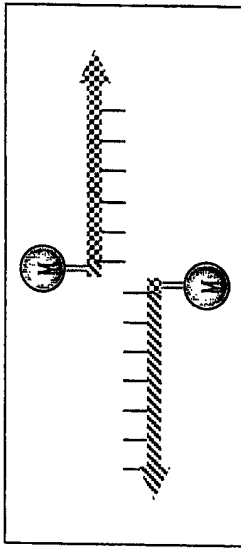
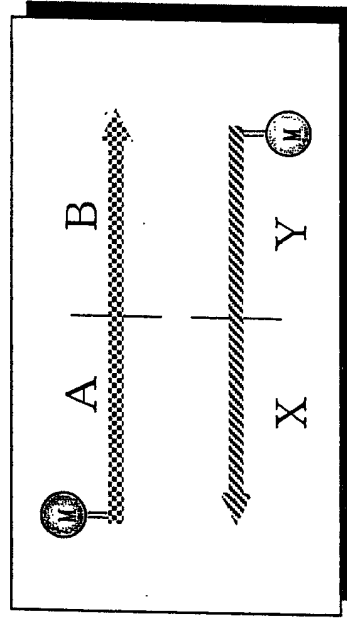


图 25

(i) 通过核酸分解酶除去互补链后的合成探针



(j) 作为用于形成自聚合体的交联探针使用



(k) 作为用于形成自聚合体的HCP使用

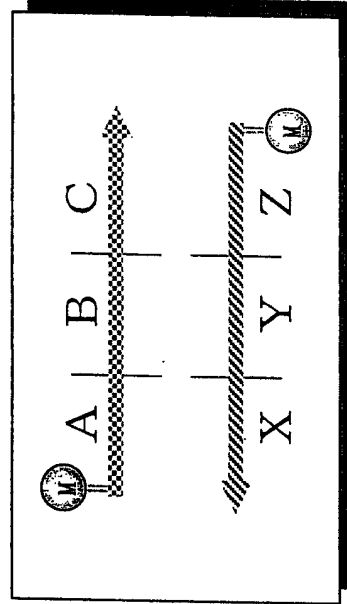


图 26

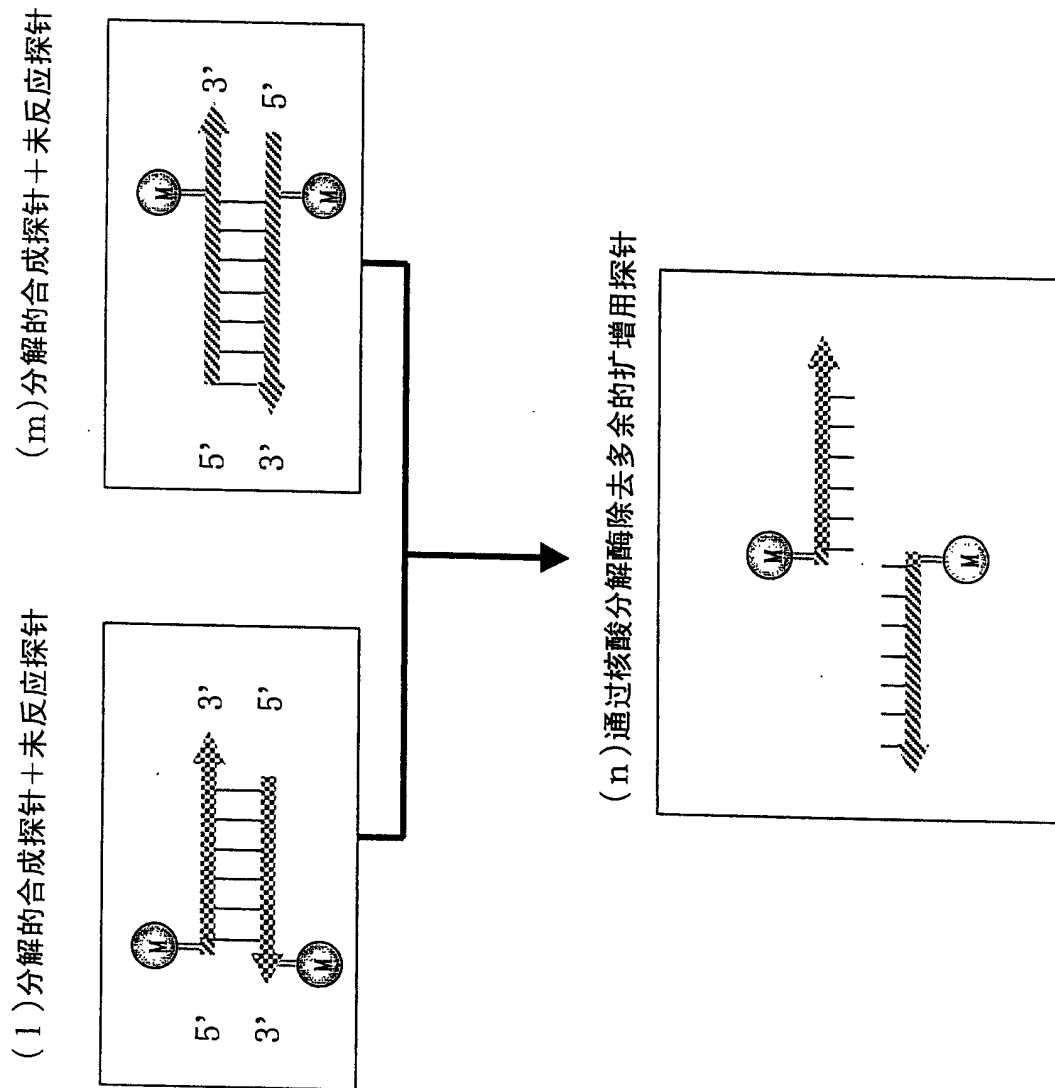


图 27

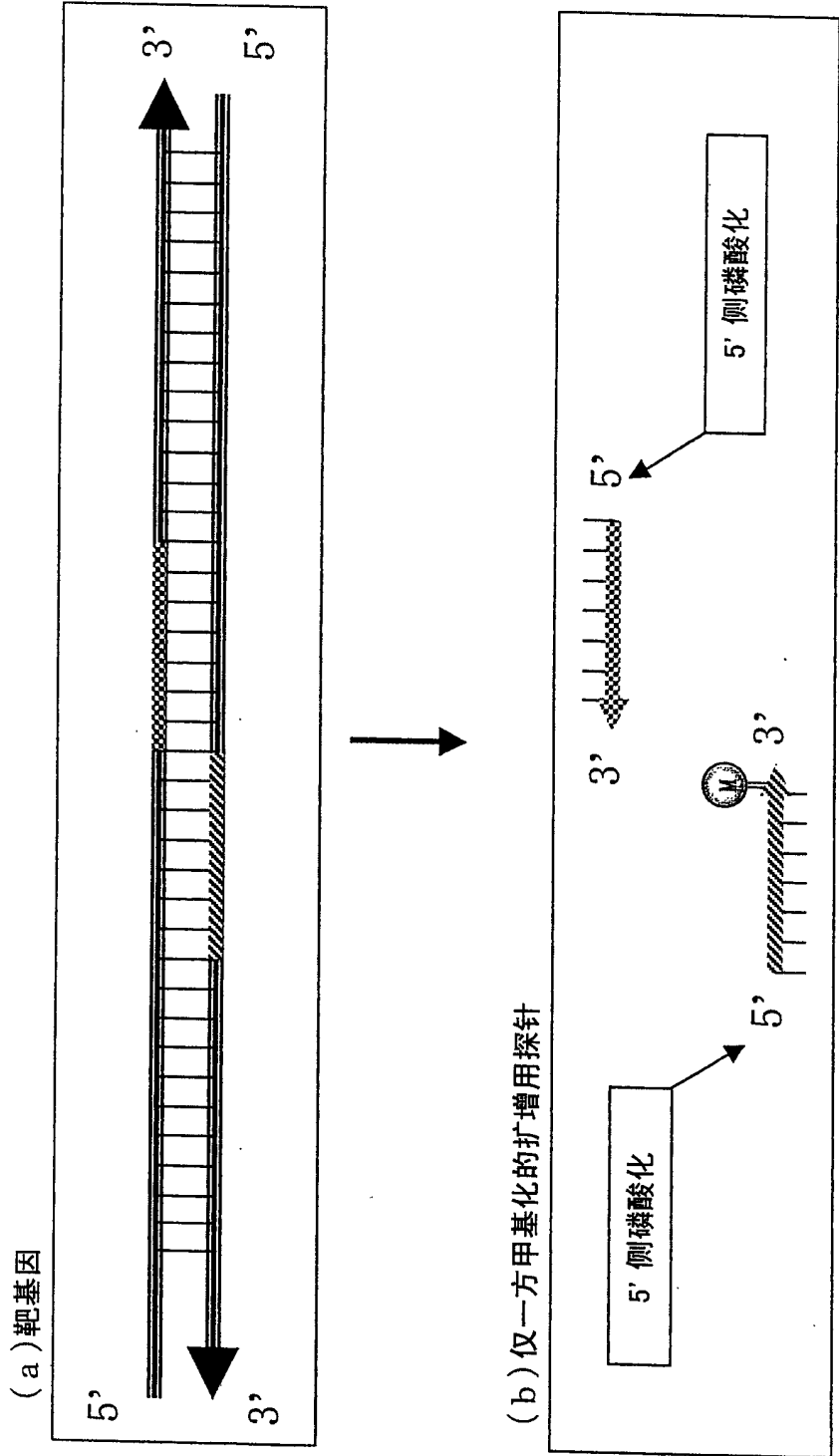
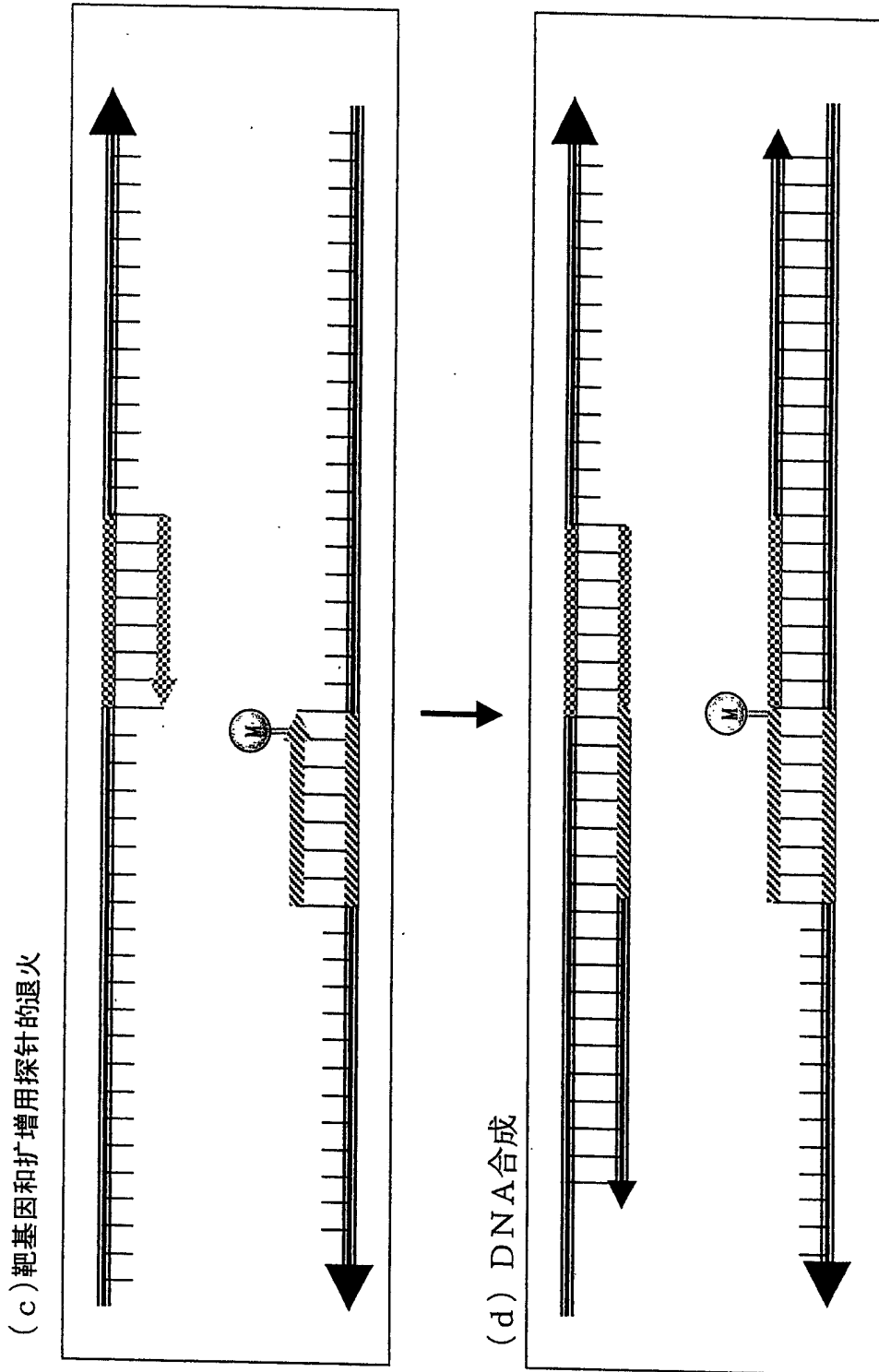
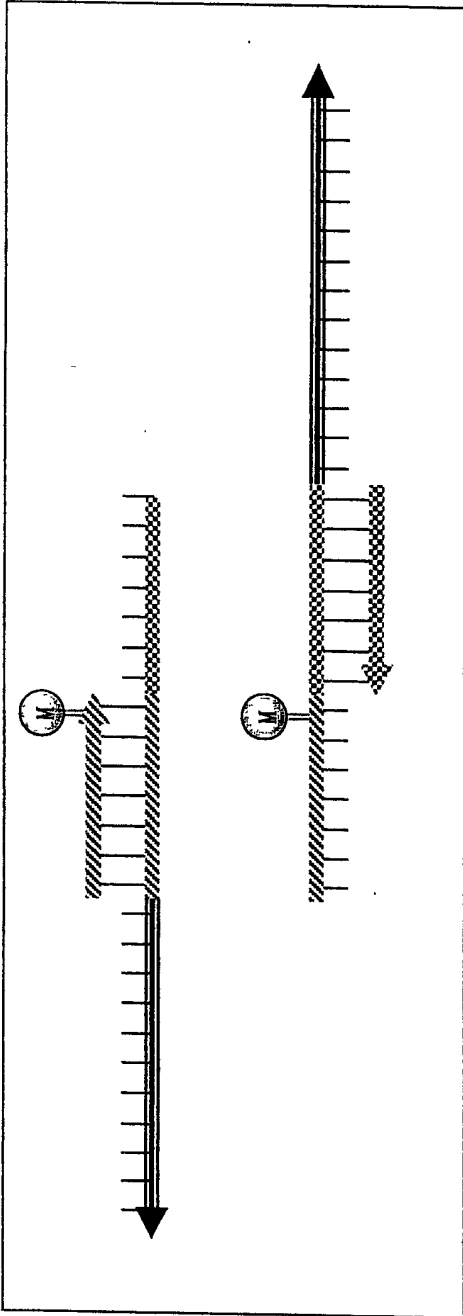


图 28



(e) 合成的靶基因和扩增用探针的退火



热循环

(f) 通过扩增用探针合成 DNA

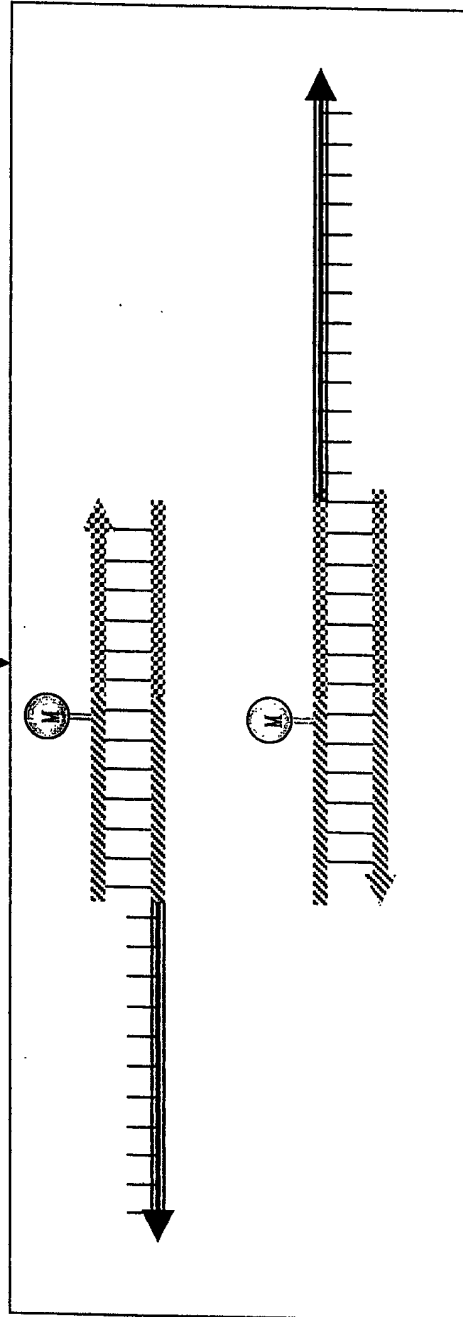
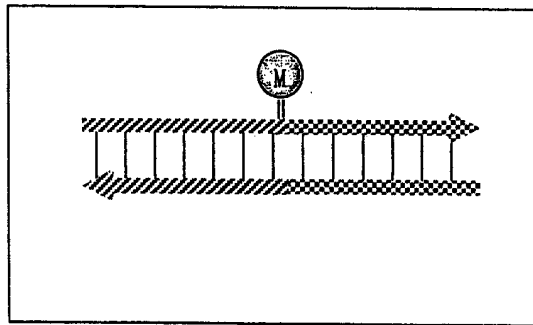


图 30

(g) 合成探针



(h) 通过核酸分解酶除去互补链的5'侧

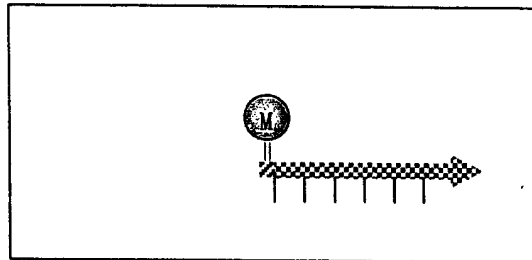


图 31

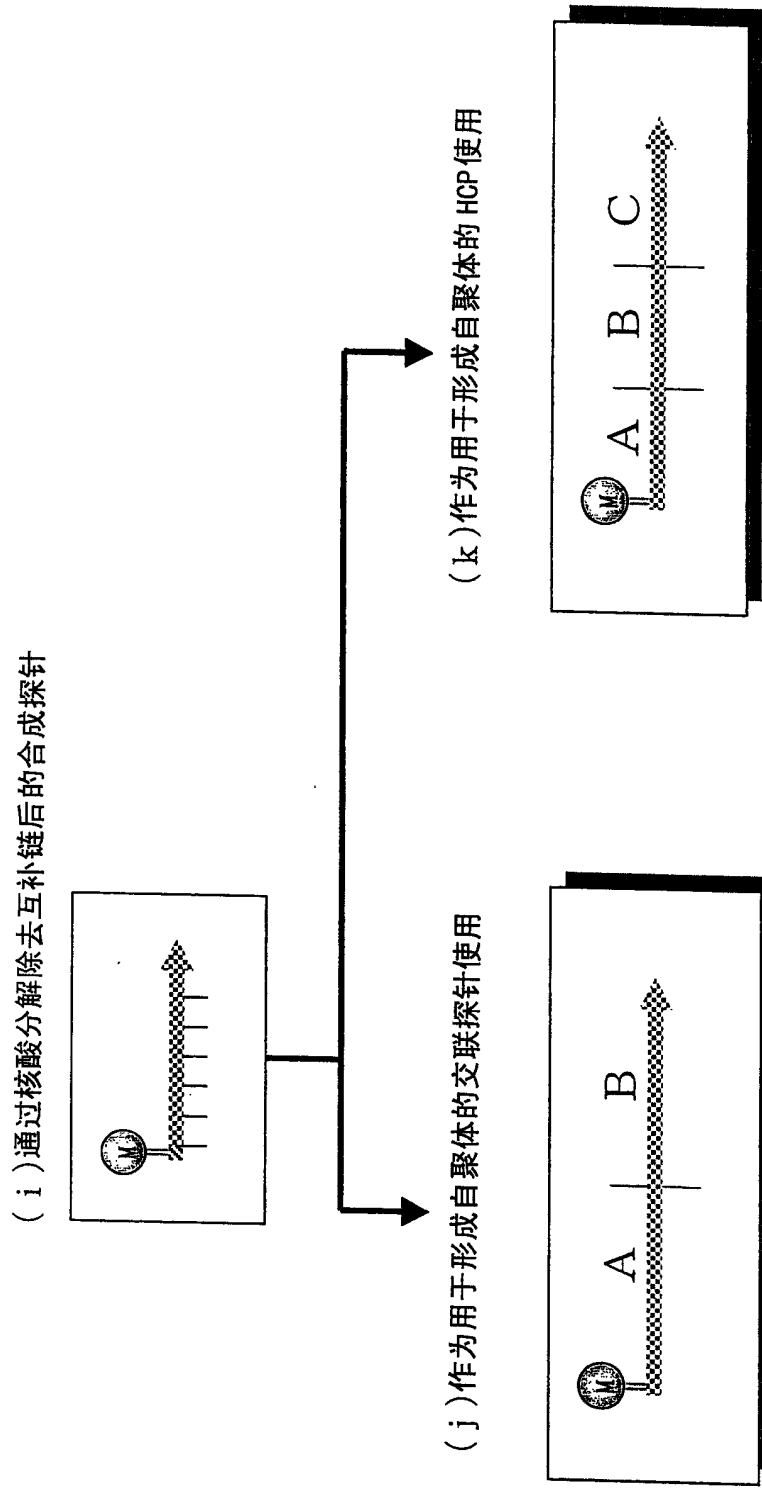
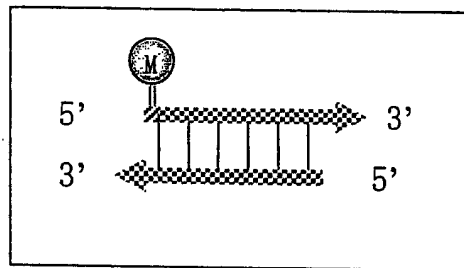


图 32

(1) 分解的合成探针
+ 未反应探针



(m) 通过核酸分解酶除去多余的扩增用探针

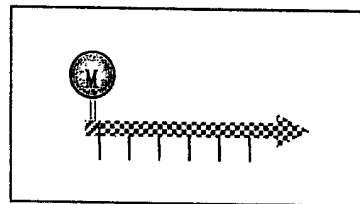


图 33

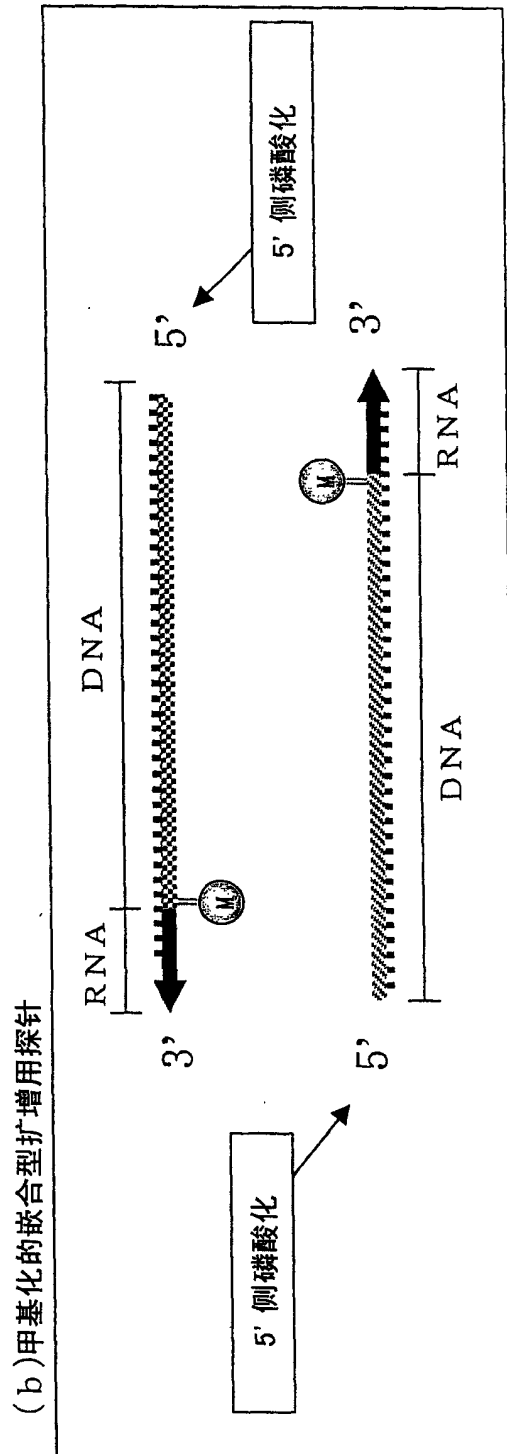
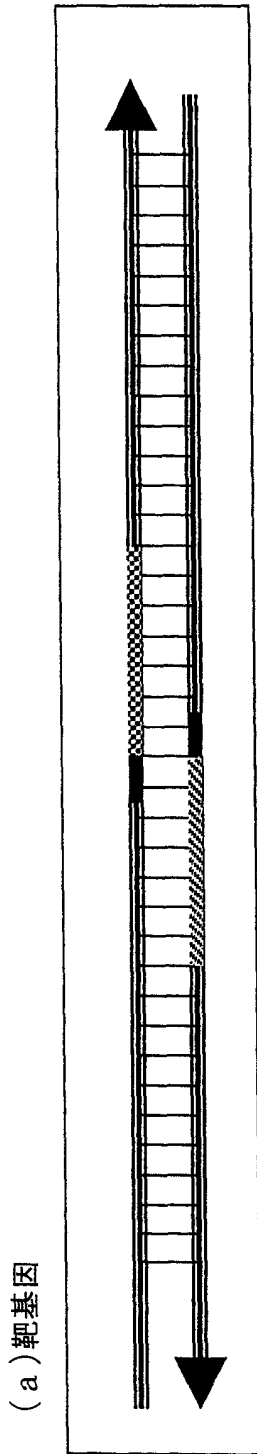


图 34

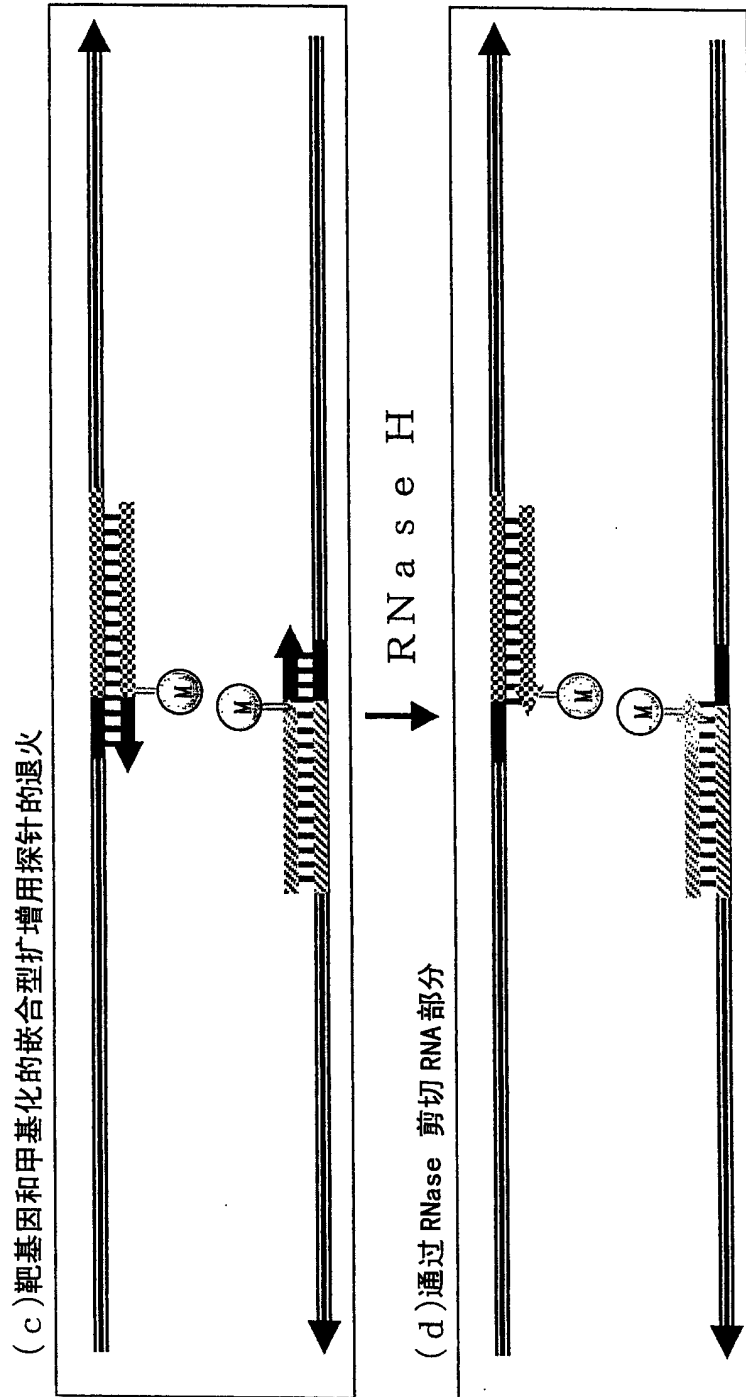


图 35

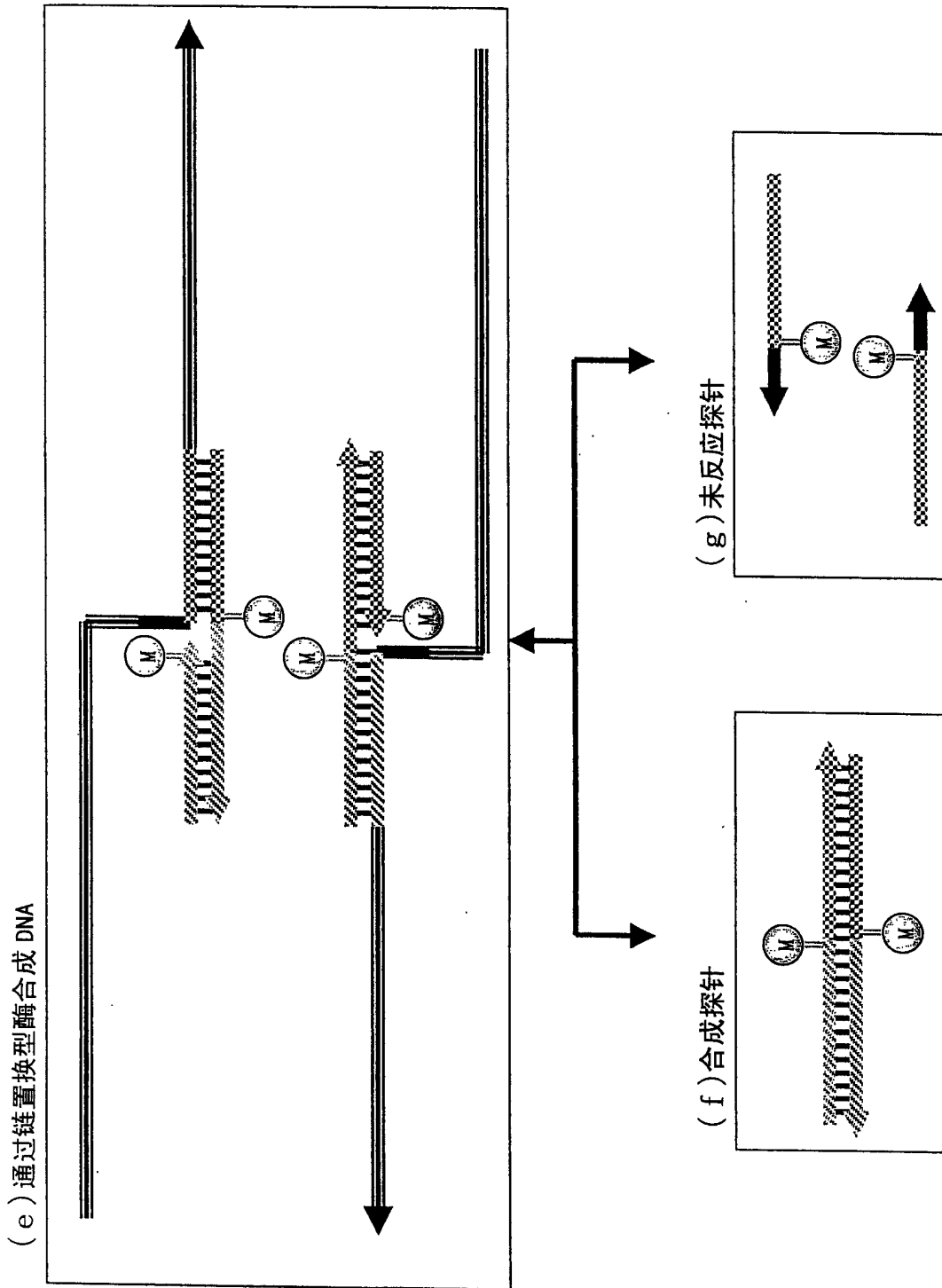
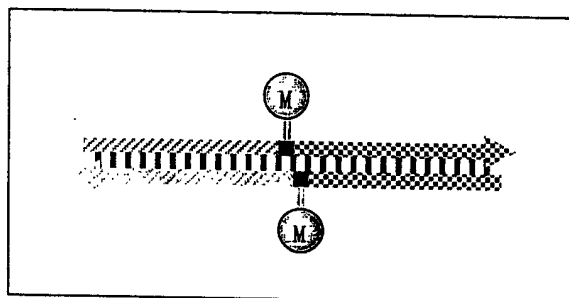


图 36

(h) 合成探针



(i) 通过核酸分解酶除去互补链的5'侧

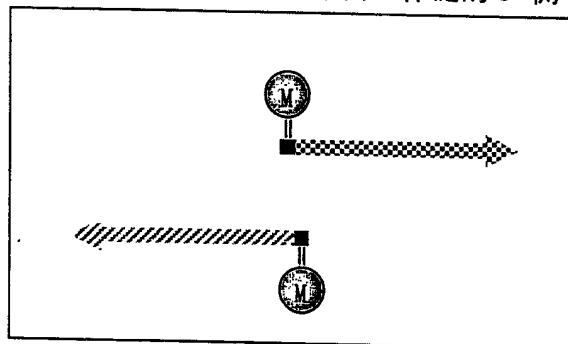
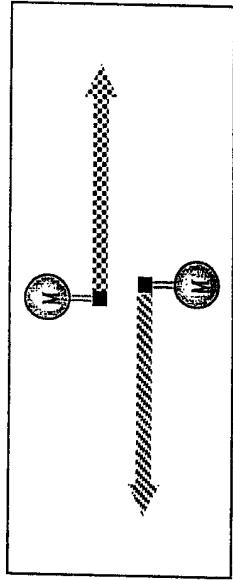
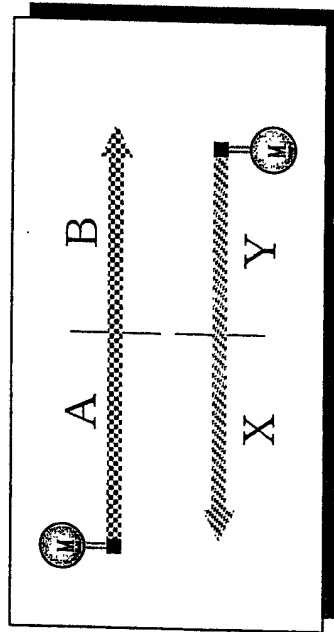


图 37

(j) 通过核酸分解酶除去互补链后的合成探针



(k) 作为用于形成自聚体的交联探针使用



(l) 作用于形成自聚体的HCP使用

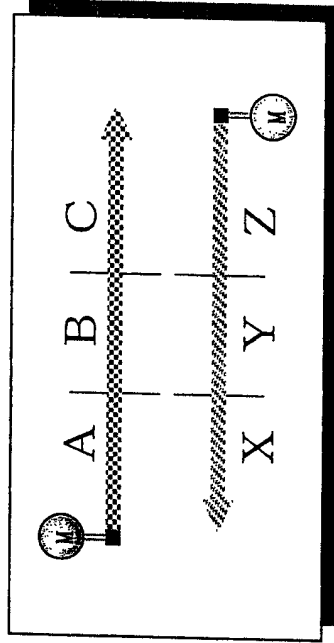


图 38

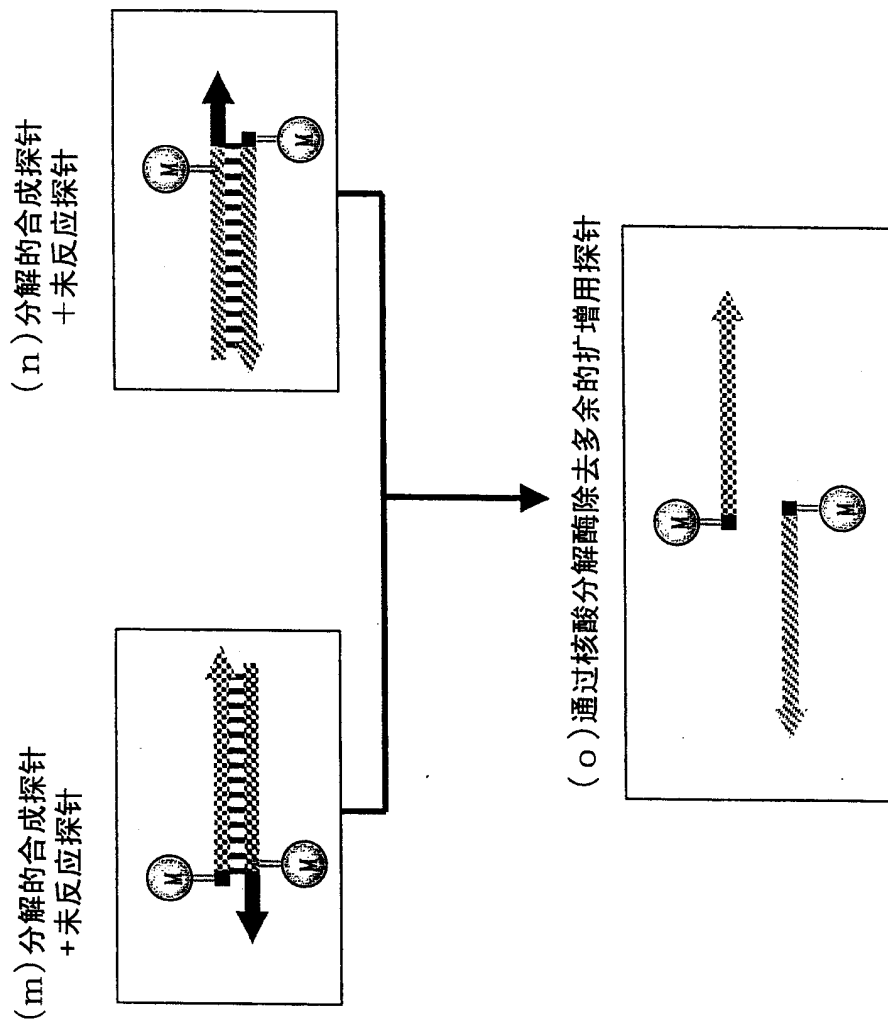


图 39

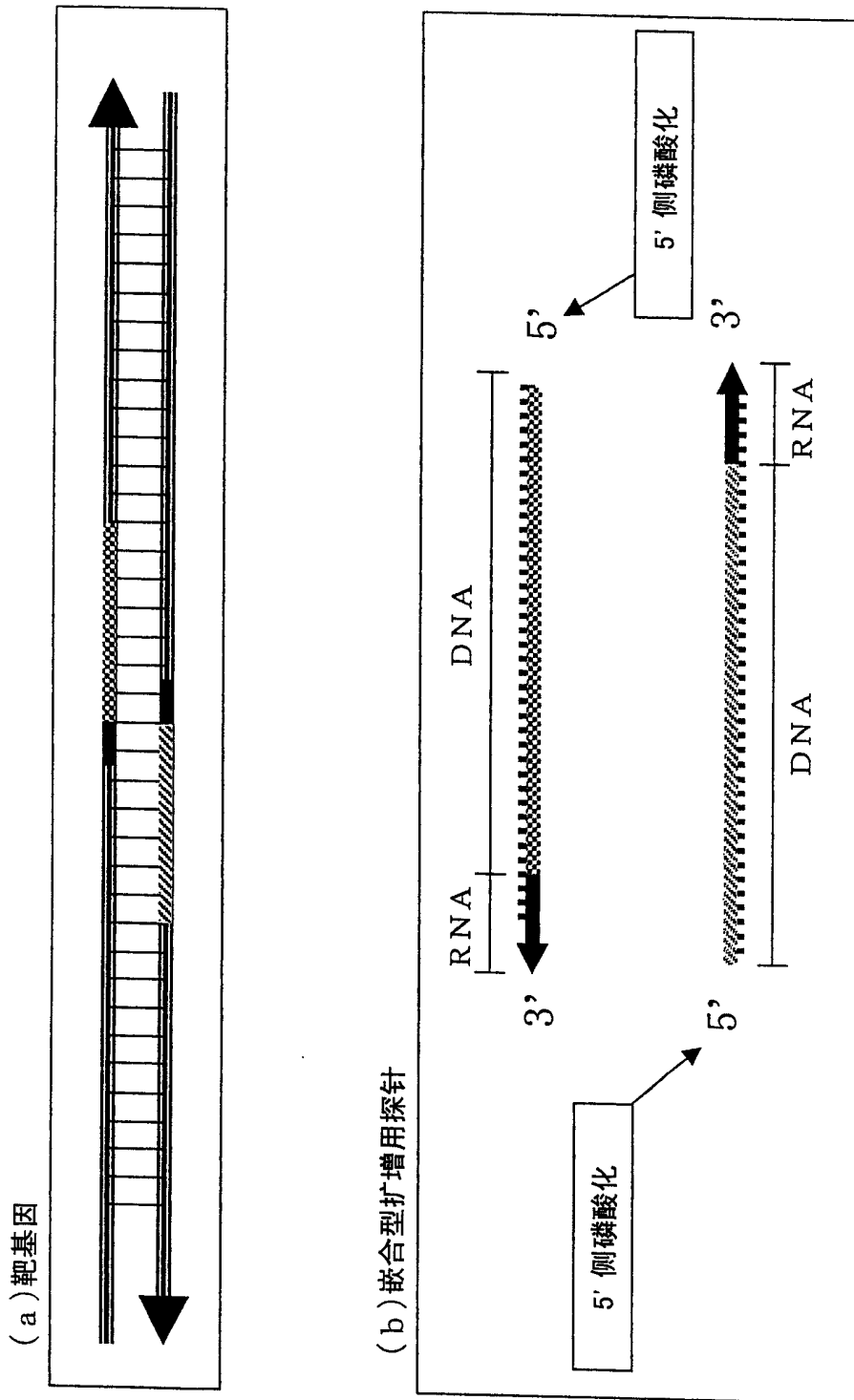
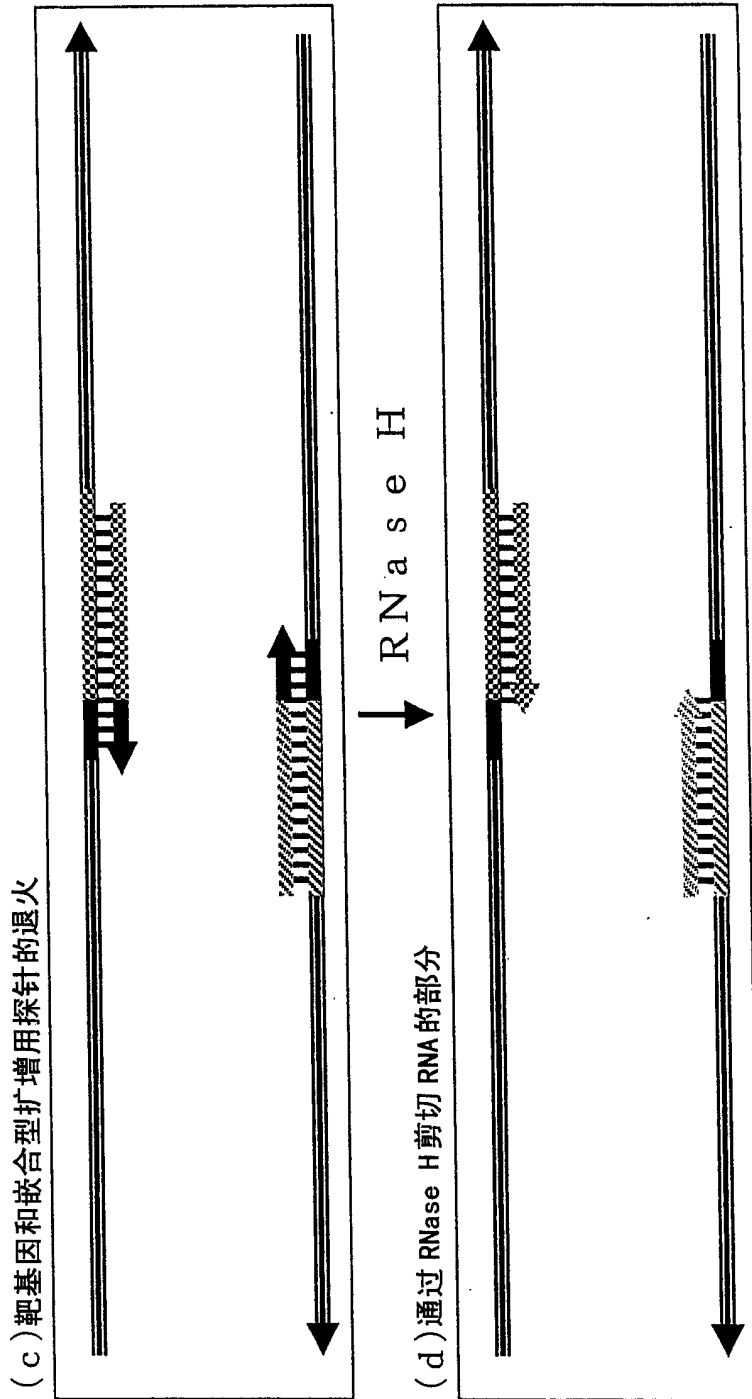
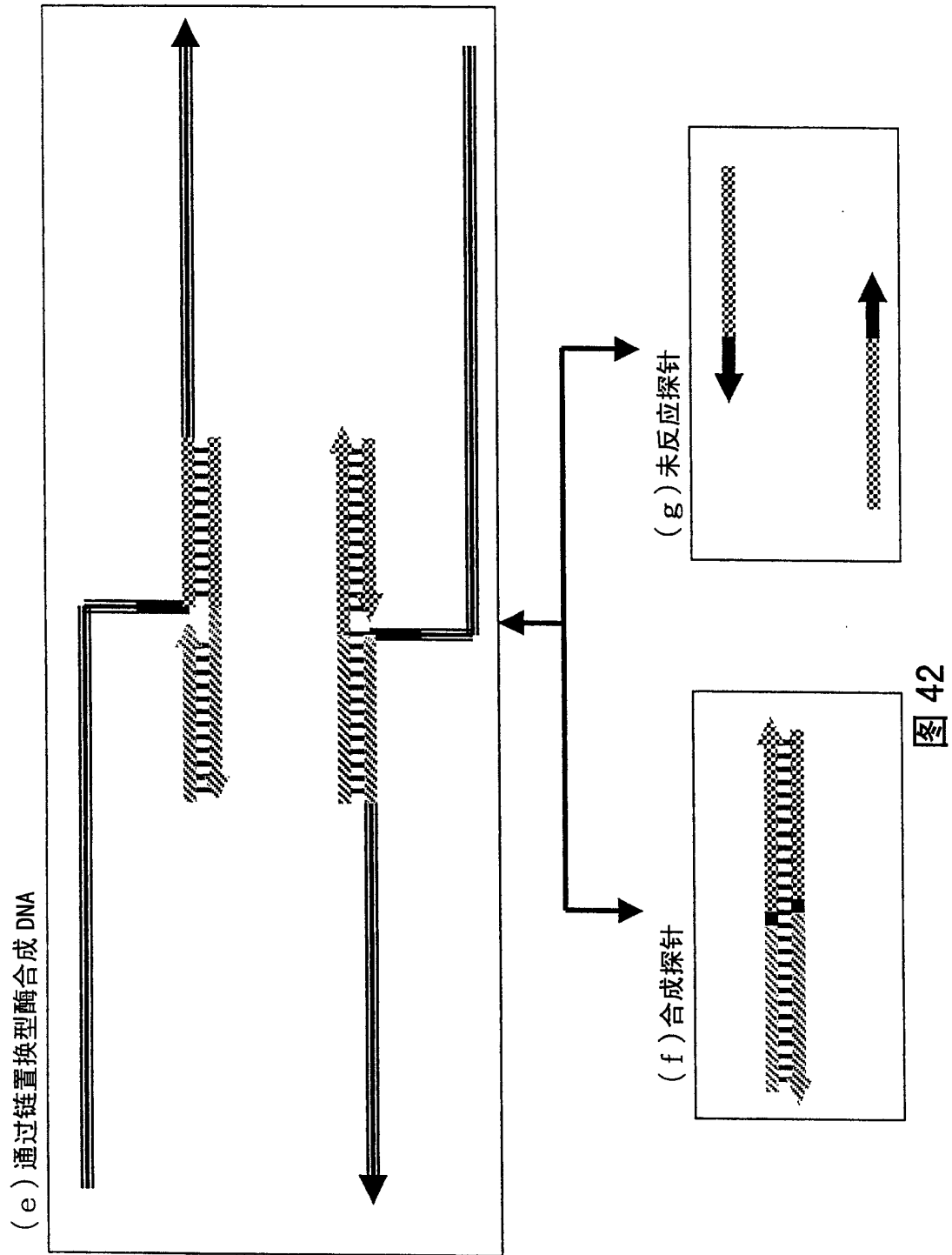
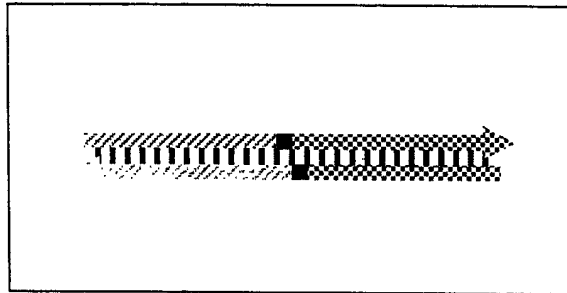


图 40





(h) 合成探针



(i) 通过核酸分解酶除去互补链的5'侧的RNA部分之前的DNA

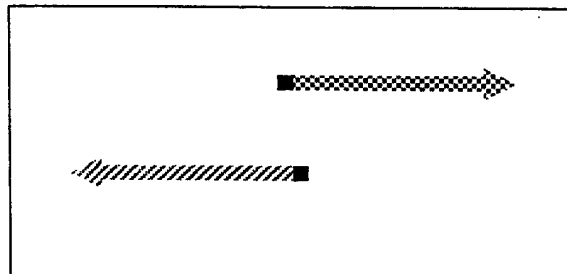
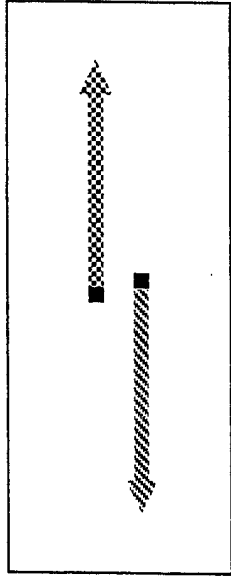
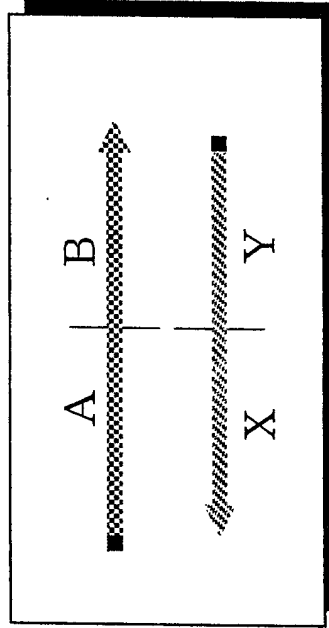


图 43

(j)通过核酸分解酶除去互补链的5'侧的RNA部分之前的DNA后的合成探针



(k)作为用于形成自聚体的交联探针使用



(l)作为用于形成自聚体的HCP使用

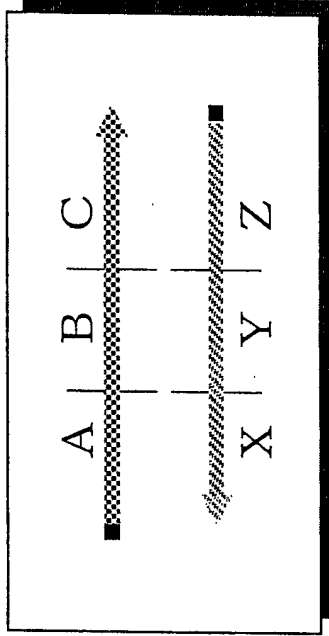


图 44

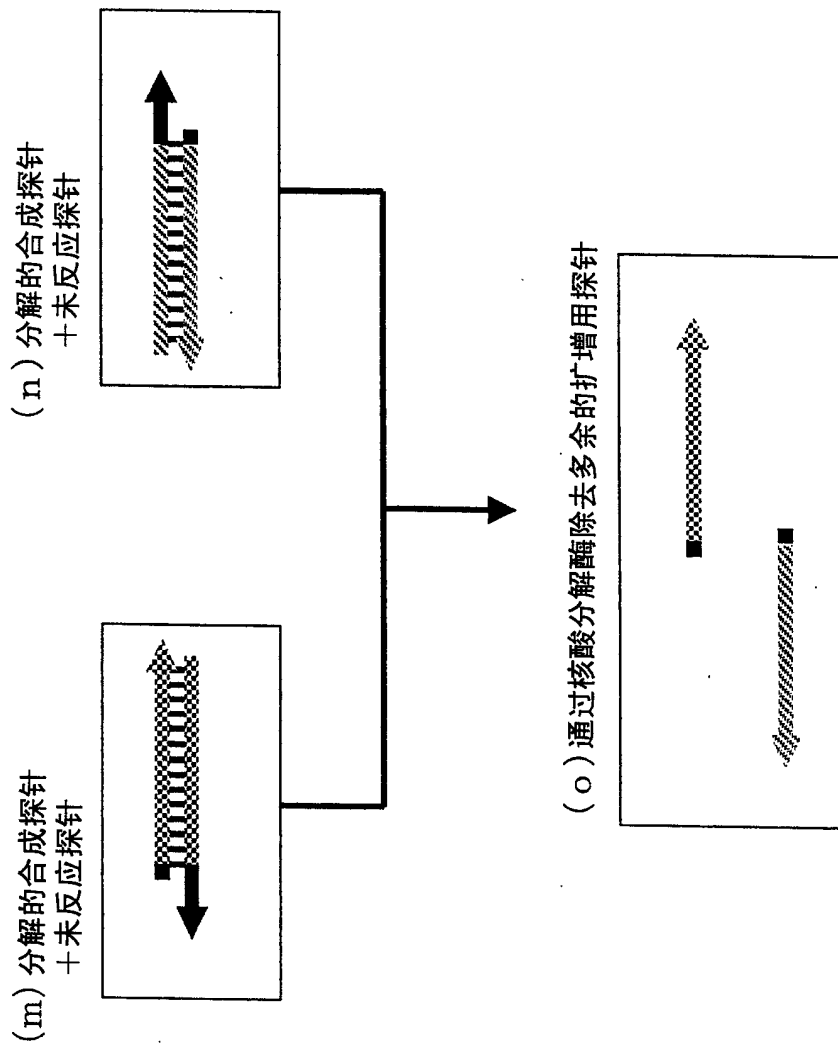
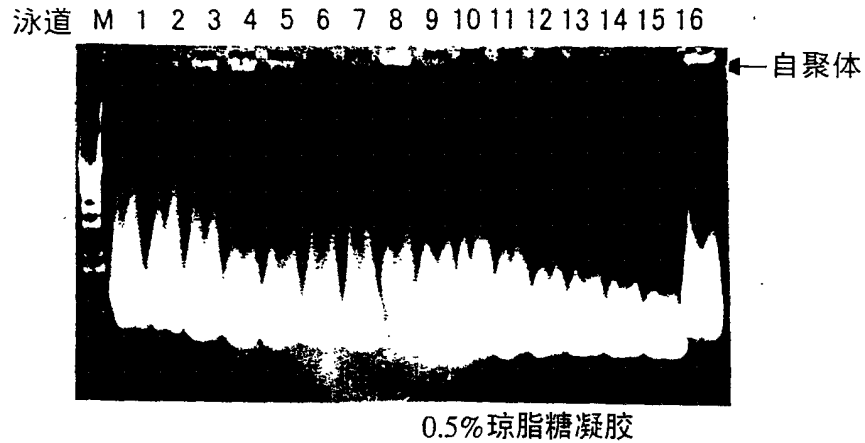


图 45



M	: 分子大小标记
泳道 1	: 实施例 1 (CaCl ₂ 溶液 1.2M)
泳道 2	: 实施例 2 (CaCl ₂ 溶液 1.0M)
泳道 3	: 实施例 3 (CaCl ₂ 溶液 0.8M)
泳道 4	: 实施例 4 (CaCl ₂ 溶液 0.6M)
泳道 5	: 实施例 5 (CaCl ₂ 溶液 0.4M)
泳道 6	: 实施例 6 (CaCl ₂ 溶液 0.2M)
泳道 7	: 实施例 7 (CaCl ₂ 溶液 0.05M)
泳道 8	: 实施例 15
泳道 9	: 实施例 8 (20×SSC溶液 1.2M)
泳道 10	: 实施例 9 (20×SSC溶液 1.0M)
泳道 11	: 实施例 10 (20×SSC溶液 0.8M)
泳道 12	: 实施例 11 (20×SSC溶液 0.6M)
泳道 13	: 实施例 12 (20×SSC溶液 0.4M)
泳道 14	: 实施例 13 (20×SSC溶液 0.2M)
泳道 15	: 实施例 14 (20×SSC溶液 0.05M)
泳道 16	: 实施例 16

图 46

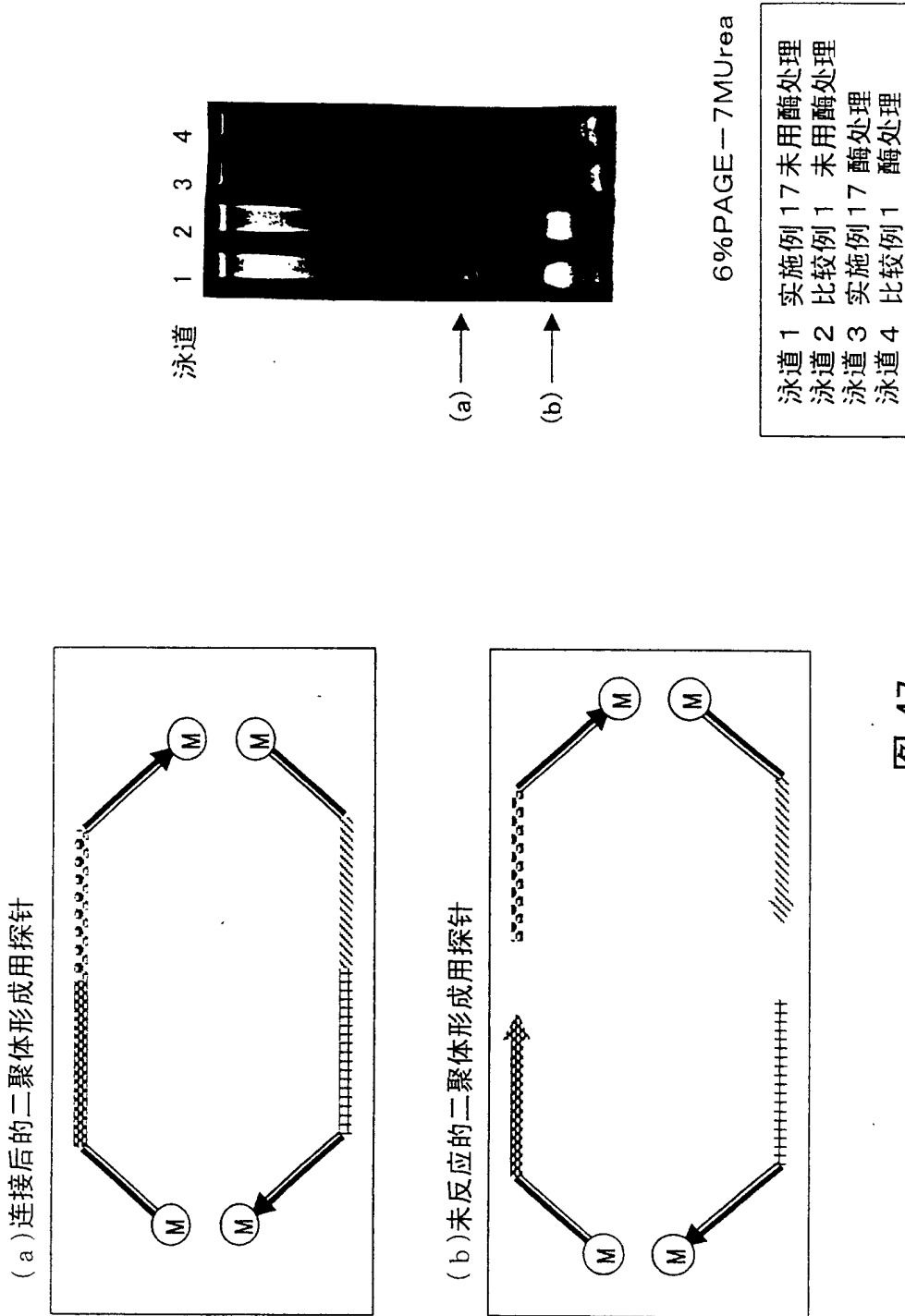


图 47

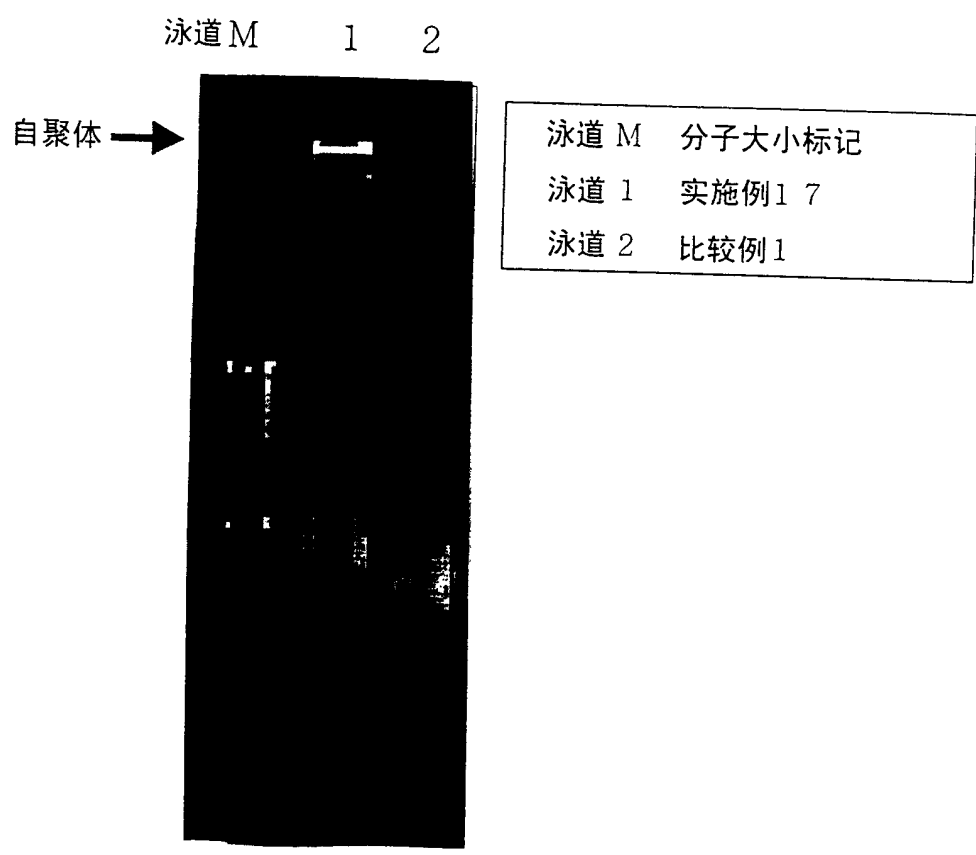
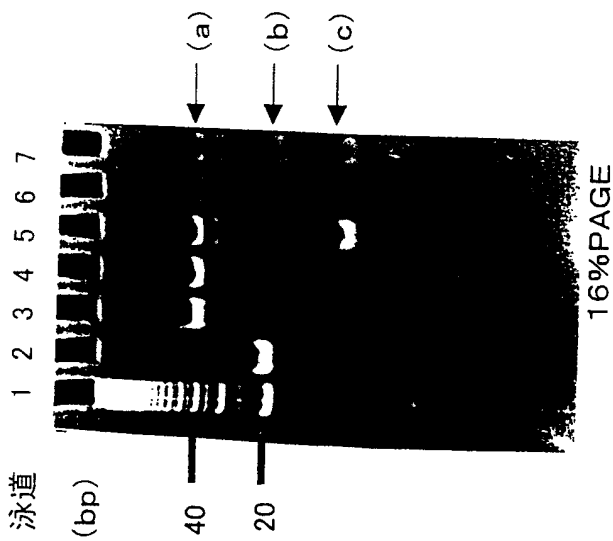
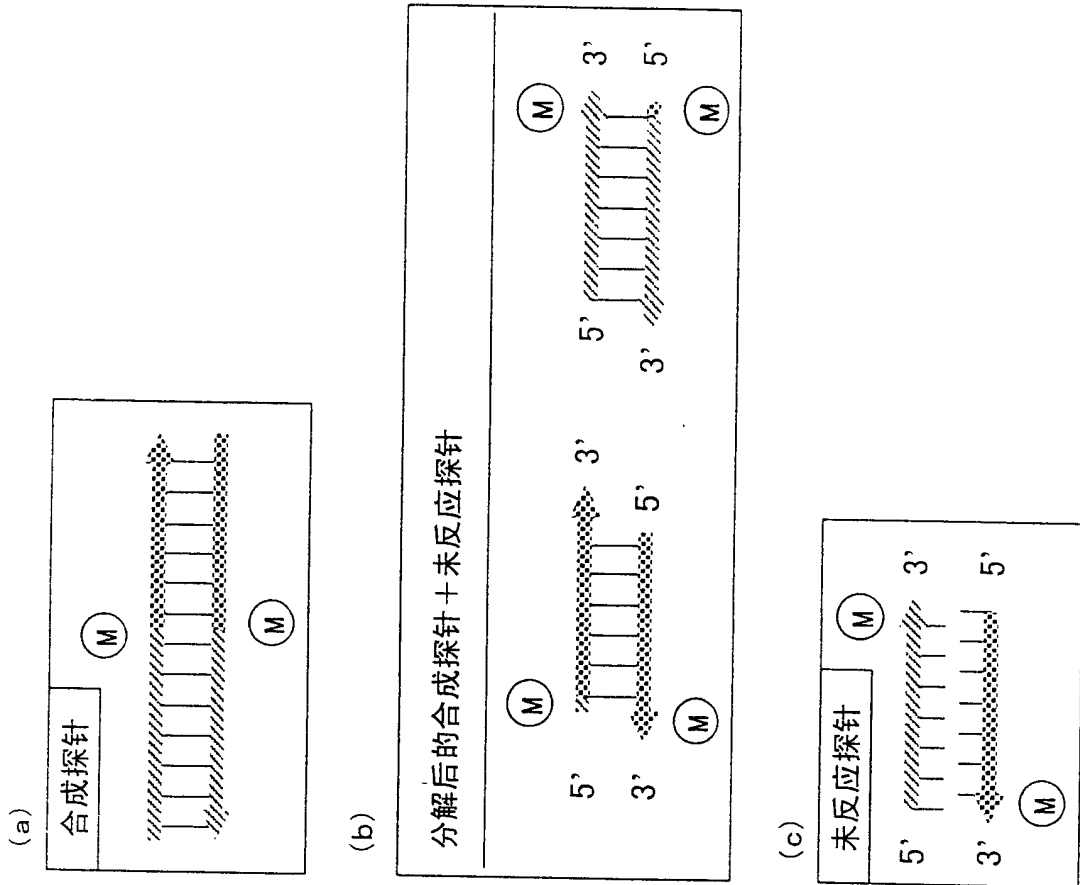


图 48



泳道 1 分子大小标记
 泳道 2 ssDNA 40mer
 泳道 3 ssDNA 60mer
 泳道 4 比较例2
 泳道 5 实施例18
 泳道 6 比较例2
 泳道 7 实施例18

图 49

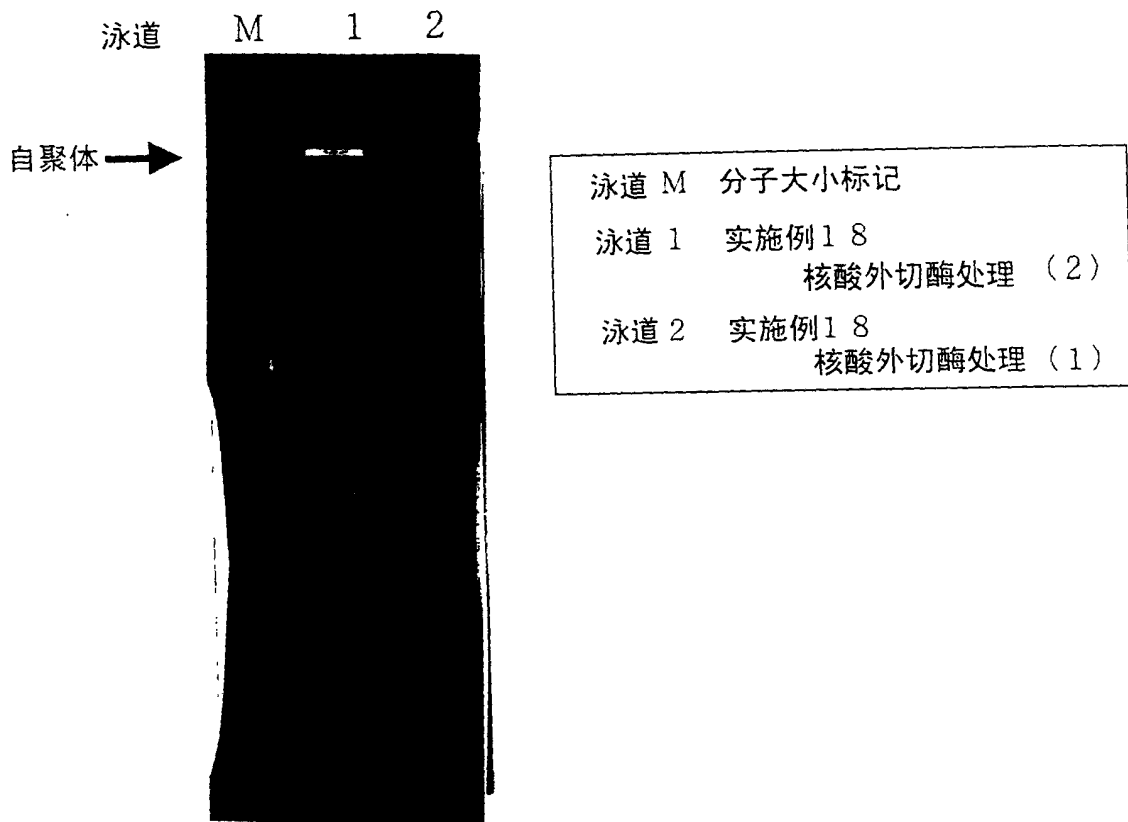
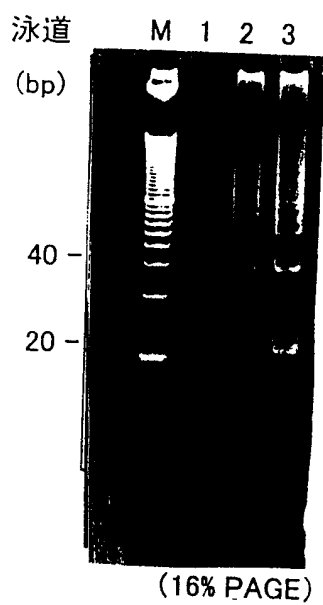


图 50



M : 10bp DNA Ladder Marker
1 : 比较例3
2 : 实施例19
3 : 实施例19

图 51

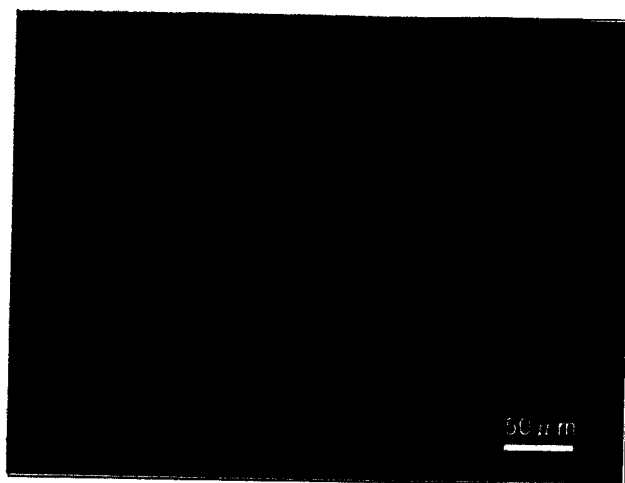


图 52

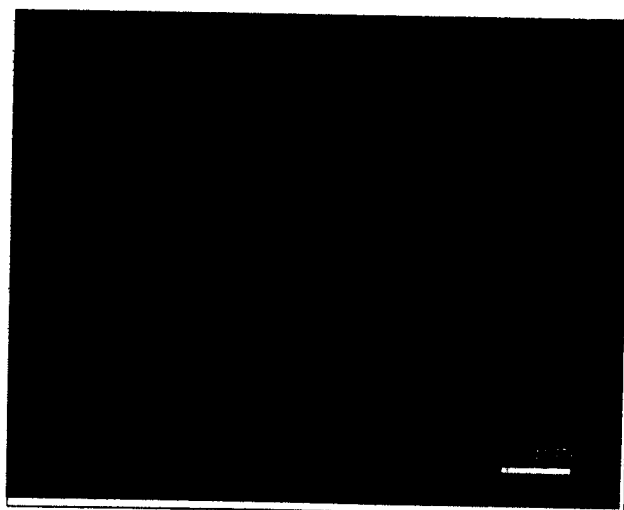


图 53

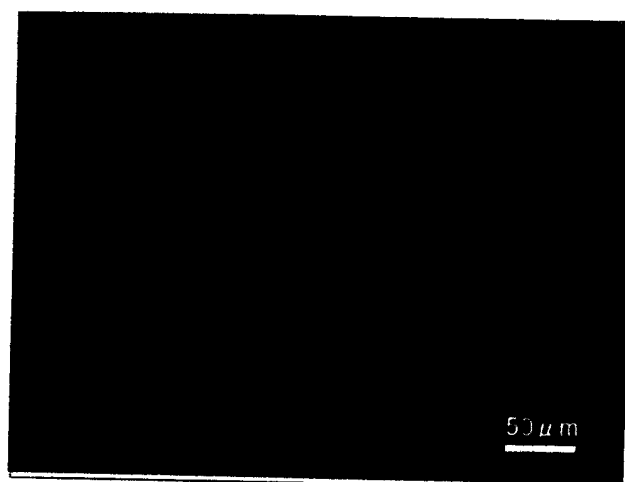


图 54