



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200410044643.2

[43] 公开日 2004年12月1日

[11] 公开号 CN 1550555A

[22] 申请日 2004.5.19

[21] 申请号 200410044643.2

[30] 优先权

[32] 2003.5.19 [33] JP [31] 140836/2003

[32] 2003.5.19 [33] JP [31] 140838/2003

[32] 2004.3.4 [33] JP [31] 061117/2004

[71] 申请人 佳能株式会社

地址 日本东京

[72] 发明人 铃木智博 川口正浩 石井美绘

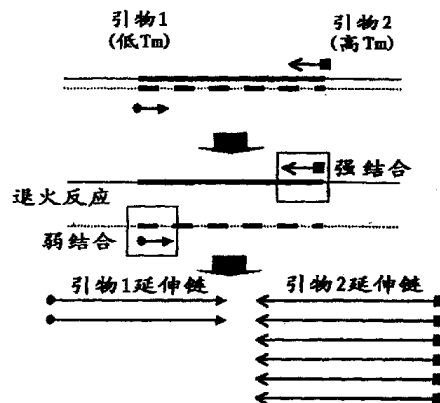
[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利
商标事务所
代理人 陈 昕

权利要求书5页 说明书42页 附图2页

[54] 发明名称 核酸的 PCR 扩增方法、PCR 引物组、PCR 扩增产物、以及利用该扩增方法的核酸检测方法

[57] 摘要

本发明提供利用 PCR 扩增法从作为模板的核酸分子可以优先扩增含有所期望核酸序列的核酸链，可以更简便、而且具有重复性更高的核酸扩增法。即提供分别设计在 PCR 扩增反应使用的两个引物的碱基序列，要使得夹住应当扩增的碱基序列区域的两个引物的溶解温度 T_m 值在 PCR 反应条件下各不相同，使用 T_m 值不同的这两个引物，由作为模板的核酸分子进行 PCR 扩增反应的方法。



1. 核酸扩增方法,是使用由至少 2 个引物构成的引物组通过 PCR 扩增法从样品中含有的核酸分子制造该核酸分子中含有至少一个以上的特定碱基序列的扩增产物的方法,其特征是:作为构成上述引物组的多种引物中的至少一种引物,在上述 PCR 扩增反应条件下,使用具有溶解温度 T_m 值与其他引物不同的引物。

2. 权利要求 1 记述的方法,其特征是:PCR 扩增反应中被扩增的由上述多种引物延伸的多种引物延伸链中,作为构成希望优先扩增的引物延伸链的引物,使用具有构成上述引物组的至少一个 T_m 值比其他引物更高的引物。

3. 权利要求 2 记述的方法,其特征是:上述样品是其中混有多种核酸分子的检体,方法包括

从混在上述检体中的多种核酸分子中选择希望扩增的一个以上的核酸分子的工序,

从被选择的希望扩增的核酸分子的全碱基序列中选择一个以上希望扩增的碱基序列区域的工序,相对于被选择的各碱基序列区域,对 PCR 扩增用的正向引物以及反向引物进行设计,做成由上述的至少两个引物构成的引物组的工序,

选择一个以上希望扩增的引物延伸链的工序,以及使用引物组的引物与检体中的核酸进行 PCR 扩增反应的工序。

4. 权利要求 2 记述的方法,其特征是:在 PCR 扩增反应中从样品中含有的核酸分子中对该核酸分子中含有特定的碱基序列的扩增产物进行扩增时,使用两个引物,作为在由上述两个引物延伸的两种引物延伸链中构成希望优先扩增的引物延伸链的引物,使用具有 T_m 值比另一个引物更高的引物。

5. 权利要求 1 记述的方法,其特征是:在 PCR 扩增反应中,于在上述 PCR 扩增反应条件下,在构成上述引物组的多种引物表现出的各个引物的 T_m 值中,在将最高 T_m 值和最低 T_m 值作为上限、下限

的温度范围内，设定使引物结合模板的退火工序中的退火温度。

6. 权利要求 1 记述的方法，其特征是：在 PCR 扩增反应中，于上述 PCR 扩增反应条件下，至少包含两个阶段温度不同的退火工序，包括在构成上述引物组的多种引物表现出的各个引物的 T_m 值中，设定在最低 T_m 值以下的温度的第 1 阶段退火工序，和

在构成上述引物组的多种引物表现出的各个引物的 T_m 值中，在将最高 T_m 值和最低 T_m 值作为上限、下限的温度范围内设定的第 2 阶段退火工序。

7. 权利要求 6 记述的方法，其特征是：在 PCR 扩增反应中从样品中含有的核酸分子中对该核酸分子中含有特定的碱基序列的扩增产物进行扩增时，使用两个引物，于上述 PCR 扩增反应条件下，在将上述两个引物分别表现出的 T_m 值作为上限、下限的温度范围内设定使引物结合模板的退火工序中的退火温度。

8. 权利要求 4 记述的方法，其特征是：将上述两个引物表现出的 T_m 值之间的温度差选择在 $10^{\circ}\text{C} \sim 20^{\circ}\text{C}$ 范围。

9. 权利要求 4 记述的方法，其特征是：将上述两个引物表现出的 T_m 值之间的温度差选择在 $5^{\circ}\text{C} \sim 10^{\circ}\text{C}$ 范围。

10. 权利要求 4 记述的方法，其特征是：将上述两个引物表现出的 T_m 值之间的温度差选择在 $1^{\circ}\text{C} \sim 5^{\circ}\text{C}$ 范围。

11. 权利要求 1 记述的方法，其特征是：作为将构成上述引物组的多种引物中的至少一种引物做成在上述 PCR 扩增反应条件下具有溶解温度 T_m 值与其他引物不同的引物的手段，通过对引物含有的碱基序列中的 GC% 进行调整，利用对该碱基序列的引物表现出的 T_m 值进行调整的手段，通过该引物含有的碱基序列的选择，设定与其他引物 T_m 值的差。

12. 权利要求 1 记述的方法，其特征是：作为将构成上述引物组的多种引物中的至少一种引物做成在上述 PCR 扩增反应条件下具有溶解温度 T_m 值与其他引物不同的引物的手段，通过对引物含有的碱基序列的碱基链长进行调整，利用对该碱基序列的引物表现出的 T_m

值进行调整的手段，通过该引物含有的碱基序列的选择，设定与其他引物 T_m 值的差。

13. 权利要求 1 记述的方法，其特征是：作为将构成上述引物组的多种引物中的至少一种引物做成在上述 PCR 扩增反应条件下具有溶解温度 T_m 值与其他引物不同的引物的手段，对引物实施化学修饰。

14. 权利要求 13 记述的方法，其特征是：该化学修饰是具有使核酸双链稳定性提高的性质的化学物质。

15. 权利要求 13 记述的方法，其特征是：该化学修饰是具有使核酸双链稳定性降低的性质的化学物质。

16. 权利要求 14 记述的方法，其特征是：该化学物质具有作为核酸嵌入剂的性质。

17. 权利要求 14 记述的方法，其特征是：该化学物质具有作为核酸沟结合剂的性质。

18. 权利要求 1 记述的方法，其特征是：就构成上述引物组的多种引物中的至少两个引物，在上述 PCR 扩增反应条件下再设置对该引物的 T_m 值进行相互比较的工序，作为进行比较的该引物的 T_m 值，使用根据该引物具有的碱基序列计算的值，作为该引物的 T_m 值的计算方法，使用最近邻位碱基对法。

19. 权利要求 1 记述的方法，其特征是：就构成上述引物组的多种引物中的至少两个引物，在上述 PCR 扩增反应条件下再设置对该引物的 T_m 值进行相互比较的工序，作为进行比较的该引物的 T_m 值，使用根据该引物具有的碱基序列计算的值，作为该引物的 T_m 值的计算方法，使用 Wallace 法。

20. 权利要求 1 记述的方法，其特征是：就构成上述引物组的多种引物中的至少两个引物，在上述 PCR 扩增反应条件下再设置对该引物的 T_m 值进行相互比较的工序，作为进行比较的该引物的 T_m 值，使用根据该引物具有的碱基序列计算的值，作为该引物的 T_m 值的计算方法，使用 GC% 法。

21. 权利要求 1 记述的方法，其特征是：通过 PCR 扩增得到的扩

增产物含有利用标记物质标记的扩增产物。

22. 权利要求 21 记述的方法，其特征是：经上述标记物质标记的扩增产物是使 PCR 扩增反应中用作底物的脱氧核苷酸中含有标记的脱氧核苷酸，由 PCR 扩增反应得到的延伸链中含有来自上述标记脱氧核苷酸标记的扩增产物。

23. 权利要求 21 记述的方法，其特征是：经上述标记物质标记的扩增产物是通过使构成上述引物组的多种引物中含有预先标记的引物，经 PCR 扩增反应形成上述被标记的引物的延伸链的扩增产物。

24. 权利要求 23 记述的方法，其特征是：在含有预先标记的引物中，对该引物预先实施的标记是 5' 末端标记。

25. 权利要求 21 记述的方法，其特征是：在经上述标记物质标记的扩增产物中，该标记物质是荧光物质。

26. 权利要求 21 记述的方法，其特征是：在经上述标记物质标记的扩增产物中，该标记物质是放射性同位素。

27. 权利要求 1 记述的方法，其特征是：上述样品是作为利用杂交反应的核酸分子的检测对象的样品，

在利用杂交反应的核酸分子的检测中，被检测的至少一种核酸分子是使用由上述至少两种引物构成的引物组，经 PCR 扩增法制造的具有至少一个以上的特定碱基序列的扩增产物，

含有通过扩增制造的该扩增产物的样品用作利用上述杂交反应的核酸分子检测中的检体。

28. 权利要求 27 记述的方法，其特征是：在利用上述杂交反应的核酸分子的检测中，将固定或吸附于固相表面的 DNA 分子用作该杂交反应应用探针。

29. 权利要求 28 记述的方法，其特征是：在固定或吸附于上述固相表面的 DNA 分子中，上述固相是 DNA 芯片、或 DNA 微阵列的方式。

30. 权利要求 28 记述的方法，其特征是：在固定或吸附于上述固相表面的 DNA 分子中，上述固相是微球。

31. 引物组, 是用于通过 PCR 扩增法从样品中含有的核酸分子制造该核酸分子中的含有至少一个以上特定碱基序列的扩增产物的由至少 2 个引物构成的引物组,

是利用权利要求 1~30 中任一项记述的核酸扩增方法, 由适合通过 PCR 扩增法制造上述扩增产物的工序的由多种引物构成的引物组。

32. PCR 扩增产物, 是使用由至少 2 个引物构成的引物组通过 PCR 扩增法从样品中含有的核酸分子制造该核酸分子中的含有至少一个以上的特定碱基序列的扩增产物,

上述扩增产物是利用权利要求 1~30 中任一项记述的核酸扩增方法制造的。

33. 核酸的检测方法, 是利用杂交反应检测核酸分子的方法, 其特征是: 使用由至少 2 个引物构成的引物组通过 PCR 扩增法从含有作为检测对象的核酸分子的样品中制造该核酸分子中的含有至少一个以上特定碱基序列的扩增产物, 将含有经扩增得到的该扩增产物的样品用作利用上述杂交反应的核酸分子检测中的检体, 在通过 PCR 扩增法制造上述扩增产物时使用权利要求 1 记述的核酸扩增方法。

34. 核酸序列的扩增方法, 是使用由至少 2 个引物构成, 而且在 PCR 中退火条件下, 用于使该特定核酸序列延伸的引物和另一个引物具有不同 T_m 值的引物组, 通过 PCR 扩增法对样品中含有的核酸的至少一个以上的特定碱基序列进行扩增的方法, 其特征是: 包括下述工序, 对含有上述样品和上述引物组的反应液进行包含在构成该引物组的引物的 T_m 值以下温度的退火工序的 PCR, 得到含有上述特定核酸序列的片段被扩增的反应液的工序, 和

对含有上述特定核酸序列的片段被扩增的反应液, 进行 PCR, 使含有该特定核酸序列的片段进一步扩增的工序, 其中所述 PCR 包含在构成该反应液中的引物组的引物中用于使含有该特定核酸序列的片段延伸的引物 T_m 值以下, 比其他引物的 T_m 值更高的温度下进行退火的工序。

核酸的 PCR 扩增方法、PCR 引物组、PCR 扩增产物、 以及利用该扩增方法的核酸检测方法

技术领域

本发明涉及到利用 PCR 扩增法从作为模板的核酸分子对含有所期望的核酸序列的核酸链优先进行扩增的方法。另外，本发明也涉及到在这样的核酸的 PCR 扩增方法中利用的 PCR 引物组、利用该方法得到的 PCR 扩增产物以及利用该扩增方法的核酸的检测方法。

背景技术

近年来，随着基因序列解析技术的飞跃发展，进行着以人基因组为中心的许多基因碱基序列的破译，而且破译的基因编码的蛋白质、核酸分子在生物体内的功能正在被阐明。另外，在阐明基因编码的蛋白质、核酸分子表现的功能的过程中，这些基因表达状态或碱基序列的变异、编码的蛋白质的氨基酸序列的变异与各种各样的疾病或体质的关系也正在被阐明。以这样的基因信息的积累为背景，高精度地检测检体样品中含有的具有特定碱基序列的核酸分子的技术的需要急剧高涨。按照这些要求，到目前为止，可应用于上述检测技术的各种各样的关连技术也正在开发。

在众多核酸检测技术中，使用非常多的是利用杂交法的核酸分子检测技术。在利用杂交法的检测方法中，预先准备相对于希望检测的核酸分子的碱基序列的互补链的核酸探针，通过将核酸探针固定在固相上，或直接在液相中使检体中含有的检测对象核酸分子和核酸探针之间进行杂交反应。得到的杂交体通过合适的手法进行检测，验证有无含有检测对象的该碱基序列的核酸分子，以及进行该序列的定量检测。

对具有检体中所含有的特定碱基序列的核酸分子进行检测不止应用于利用标志基因等的各种遗传病的诊断,而且在癌、传染病等中,检体所含有的特异的核酸分子和这些病例的关系也不断地被判明,人们期待着在各种各样疾病的诊断中的广泛应用。

在基于该杂交法的核酸分子检测方法中,近年来正被特别扩大利用的手法是利用将核酸探针固定在固相上的 DNA 芯片、或 DNA 微阵列的检测技术。利用该 DNA 芯片、或 DNA 微阵列的方法是预先将与希望检测的核酸分子的碱基序列的合成互补链(DNA 探针)固定在玻璃基板等固相表面上,使预先用荧光物质等标记的检体中的核酸分子在固相上进行杂交反应,对来自在基板上形成杂交体并被固定的,例如预先进行荧光标记的核酸分子的荧光强度进行测定,研究检体中有无作为对象的含有碱基序列的核酸分子,以及检体中含有的量的技术。作为 DNA 芯片的制作技术,已经开发了各种各样的技术,结果可以高密度配置多种核酸探针(DNA 探针),人们急切期待高灵敏度而且可同时适用于多项目的检测的划时代的技术。

DNA 芯片可进行高灵敏度检测,但一般检体中含有的检测对象核酸的绝对量很少,另外由于需要通过适当的方法用荧光物质进行标记,在利用 DNA 芯片的核酸序列的检测中,与 DNA 芯片的制作技术同样,检体处理技术也很重要。

在各种各样的核酸扩增技术中应用最广泛的是称为聚合酶链式反应(PCR)的方法。该 PCR 法是以极高扩增率对样品中含有的特定序列进行扩增的方法。有关 PCR 法在美国专利第 4683195 号、4683202 号、4965188 号等有报道。

在进行用于 DNA 芯片等固相上杂交的检体的制备时,设定扩增

区域以便含有固定在固相上的探针区域，在扩增区域的两个末端设计引物。然后使用设计的两个引物进行 PCR 反应，大量合成含有所期望的探针区域的双链核酸。另外希望用任一个标记物质对检体进行标记时，向 PCR 反应的底物（即核酸的单体）中以一定的比例添加结合了标记物质的单体后进行 PCR 反应，或通过引物任一个标记物质进行标记后进行 PCR 反应，得到标记的双链核酸。

利用杂交反应进行含有特定碱基序列的核酸分子的检测时，与探针形成杂交体的单链核酸分子的存在量越多，越可以高精度地进行检测。通常，往往一次样品中含有的检测对象核酸分子的含量不充分，可以以一次样品中含有的检测对象核酸分子为模板，预先通过扩增反应按照检测对象核酸分子的含量，在制备含有定量扩增的扩增产物的检体样品基础上，利用对核酸分子进行检测的手法。在该检体样品的制备工序中，希望更多地合成探针的互补链 DNA 链。即，在检体样品含有的双链中，与含有和探针相同碱基序列的 DNA 链相比，含有与探针进行杂交的互补碱基序列的 DNA 链（靶链）存在越多，在其后的杂交反应越能有效进行。这不单是与探针进行杂交反应的靶链的浓度高的一方灵敏度好这一理由，而且是共存的含有与探针相同碱基序列的 DNA 链与探针的杂交反应进行竞争，通过相对降低含有与这样的探针相同碱基序列的 DNA 链的浓度，可获得使通过探针进行的杂交反应的效率进一步提高的效果，由于这两个理由，与含有与探针相同碱基序列的 DNA 链相比，希望使含有互补的碱基序列的 DNA 链（靶链）的含有比率进一步提高。

为了更有效地扩增一方的 DNA 链，尝试了各种各样的方法。作为代表性的方法，有在 PCR 扩增反应中，将用于希望优先更多合成的 DNA 链的延伸合成用的引物的浓度提高进行 PCR 扩增反应的方法（非对称 PCR），或一旦通过通常的 PCR 扩增反应合成含有靶链的双链 DNA 后，只加用于靶链延伸合成用的引物，再次进行扩增反应的方法

(两阶段 PCR) 等。

然而, 这些以往的手法由于各种各样的原因, 不能达到优先扩增目的靶链的情况也不少。具体来说, 关于非对称 PCR 法, 有时获得不到充分的 PCR 扩增产物的产量, 即使在充分获得产量时, PCR 扩增产物的收率也不是非对称的, 结果 PCR 扩增产物几乎都变成双链 DNA。而在两阶段 PCR 法中, 除了分成两个阶段进行 PCR 反应带来的麻烦外, 在整个工序的扩增收率中容易产生上下波动, 存在着重复性方面的问题。另外在第二阶段的 PCR 反应中, 只加一条链的引物, 有时会出现第二阶段的 PCR 反应完全不能进行等问题。因此, 期待更简便、而且重复性高的、优先扩增合成目的单链 DNA (靶链) 的核酸扩增方法的开发。

发明内容

本发明提供可利用 PCR 扩增法从作为模板的核酸分子优先扩增含有所期望的核酸序列的核酸链, 具有更简便、而且重复性高的核酸扩增方法。

本发明人为了开发利用杂交反应, 在含有特定碱基序列的核酸分子的检测中, 利用可应用于该检体样品的制备的、具有更简便、而且重复性高的手段, 利用 PCR 扩增法对从作为模板的核酸分子优先扩增含有所期望的核酸序列的核酸链的方法, 进行了深入研究。这时, 分别设计 PCR 扩增反应中使用的两个引物碱基序列, 要使夹住应当扩增的碱基序列区域的这两个引物的融解温度 (T_m) 值在 PCR 反应条件下为不同的值, 通过使用这样的 T_m 值不同的两个引物, 进行 PCR 扩增反应, 发现由各个引物延伸的单链 DNA 收率不同, 而且重复性高。就是说, 通过运用上述手法, 发现可以优先扩增合成由一方引物延伸的单链 DNA。这里的引物的 T_m 值是指双链的引物、即引物与模板的对应互补部分的杂交融解温度。特别是如果将 PCR 扩增反应中的退火

温度设定在设计成相互不同的两个引物的 T_m 值之间，本发明人确认通过在这样的温度条件下进行 PCR 扩增反应，由 T_m 值高的引物延伸的延伸链与由 T_m 值低的引物延伸的延伸链相比，可以非常显著的高效率扩增，而完成本发明。

即本发明的核酸扩增方法是使用由至少 2 个引物构成的引物组通过 PCR 扩增法从样品中含有的核酸分子制造至少含有该核酸分子中的一个以上的特定碱基序列的扩增产物的方法，其特征是作为构成上述引物组的多种引物中的至少一种引物，使用在上述 PCR 扩增反应条件下，溶解温度 (T_m) 值与其他引物不同的引物。

另外本发明的核酸扩增方法是使用由至少 2 个引物构成，而且在 PCR 中退火条件下，用于使该特定核酸序列延伸的引物和另一个引物具有不同 T_m 值的引物组通过 PCR 扩增法对样品中含有的核酸分子制造至少含有该核酸分子中的一个以上的特定碱基序列进行扩增的方法，包括以下工序：在含有上述样品和上述引物组的反应液中进行具有退火工序在构成该引物组的引物的 T_m 值以下温度的 PCR，得到含有上述特定核酸序列片段被扩增的反应液的工序，对含有上述特定核酸序列片段被扩增的反应液进行 PCR 的工序（在构成该反应液中的引物组的引物中用于使含有该特定核酸序列的片段延伸的引物的 T_m 值以下，比另一个引物的 T_m 值高的温度进行退火工序），使含有该特定核酸序列的片段更扩增的工序。

利用本发明的核酸扩增方法，通过适当设定 PCR 扩增反应中使用的多种引物的 T_m 值、以及扩增反应中的退火温度，在 PCR 扩增产物中作为各个引物的延伸链可合成的具有互补的碱基序列的两条延伸链 DNA 中，与互补链的引物延伸链相比，可以优先合成所期望的引物延伸链。另外，通过本发明的核酸扩增方法达到的所期望的引物延伸链的优先扩增在利用 DNA 芯片等的核酸分子的检测中，可应用于期望

有效合成含有与探针 DNA 进行杂交的互补的碱基序列的单链 DNA 的检体样品的制备。

附图的简单说明

图 1 是表现与本发明相关的核酸扩增方法中的基本的发明技术原理的模式图。

图 2 是表示在实施例 1 PCR 扩增反应中得到的精制后 PCR 扩增产物溶液的电泳图。

图 3 是表示在实施例 5 PCR 扩增反应中得到的精制后 PCR 扩增产物溶液的电泳结果图。

具体实施方式

以下就实施本发明相关的核酸扩增方法时的方式以及与本发明相关的核酸扩增方法中专用的引物组，以及通过本发明相关的核酸扩增方法的应用得到的 PCR 扩增产物、核酸检测方法的发明进行说明。

首先在上述本发明相关的核酸扩增方法中，在 PCR 扩增反应中被扩增的、由上述多种引物延伸的多种引物延伸链中，作为构成希望优先扩增的引物延伸链的引物可以使用具有 T_m 值至少比构成上述引物组的另一个引物高的引物。此外上述样品作为其中混有多种核酸分子的检体时，优选包括以下工序的方法：

从混在上述检体中的多种核酸分子中选择一个以上希望扩增的核酸分子的工序，

从被选择的一个以上希望扩增的核酸分子的全碱基序列中选择一个以上希望扩增的碱基序列区域的工序，

对选择的碱基序列区域设计 PCR 扩增用的正向引物以及反向引物，做成由至少上述两个引物构成的引物组的工序，以及

从由使用构成上述引物组的至少两个引物的 PCR 扩增反应中扩增的上述多种引物延伸的多种引物延伸链中选择一个以上希望扩增的引物延伸链的工序。

例如，可以是特征如下所述的方法。即在 PCR 扩增反应中，从样品中含有的核酸分子中对该核酸分子中含有特定碱基序列的扩增产物进行扩增时，使用两个引物，

由上述两个引物延伸的两种引物延伸链中，

作为构成希望优先扩增的引物延伸链的引物，使用具有 T_m 值比另一个引物更高的引物。

或者是特征如下所述的方法。即在 PCR 扩增反应中，在上述 PCR 扩增反应的条件下，在构成上述引物组的多种引物表现出的各个引物的 T_m 值中，在将最高 T_m 值和最低 T_m 值作为上限、下限的温度范围内，设定使引物结合模板的退火工序中的退火温度。此时，在 PCR 扩增反应中从样品中含有的核酸分子中对含有该核酸分子中特定碱基序列的扩增产物进行扩增时，使用两个引物，于上述 PCR 扩增反应条件下，优选是在将上述两个引物分别表现出的 T_m 值作为上限、下限的温度范围内，设定使引物结合模板的退火工序中的退火温度。

还有，为了更有效地实施本发明的核酸扩增方法，通过退火温度的转换进行将 PCR 反应中的退火温度设定在两个引物的 T_m 值以下实施 PCR 反应的扩增工序（第 1 退火工序），和设定在两个引物的 T_m 之间实施 PCR 反应的靶链合成工序（第 2 退火工序）。这两个工序也可以一个一个地实施，可以通过 PCR 反应的温度控制转换进入工序。

即，是对样品中核酸含有的至少一个以上的特定的碱基序列，使用由至少两个引物构成的，而且在 PCR 的退火条件下，使用具有用于使该特定核酸序列延伸的引物和另一个引物的 T_m 值不同的引物组，通过 PCR 进行扩增的方法，优选包括以下工序，即对含有上述样品和上述引物组的反应液进行 PCR（包括在构成该引物组的引物的 T_m 值以下的温度下的退火工序），得到含有上述特定核酸序列的片段被扩增的反应液的工序，以及对含有上述特定核酸序列的片段被扩增的反应液进行 PCR（包括在构成该反应液中的引物组的引物中用于延伸含有

该特定核酸序列的片段的引物的 T_m 值以下, 比另一个引物 T_m 值高的温度下的退火工序), 对含有该特定核酸序列的片段进一步扩增的工序。

在上述实施方式中, 将退火温度设定在上述两个引物的 T_m 值以下通过 PCR 反应进行扩增工序, 结果不用进行任何精制等, 通过将引物对模板 DNA 的退火温度设定在该引物组的两个引物的 T_m 值之间, 进行 PCR 反应, 由 T_m 值高的引物延伸的延伸链与由 T_m 值低的引物延伸的延伸链相比可以更多地扩增(靶链合成工序)。

通过将经两个阶段 PCR 扩增和标记在另外工序(另一个反应容器)进行, 可以更高效率地进行扩增和靶链的标记, 但在本实施例方式下, 在同一容器内可以生成同样的靶链。即, 将退火温度设定在使靶链互补链延伸的引物(低 T_m 引物) T_m 值以下的温度, 进行 PCR 反应, 对双链核酸进行扩增, 然后如果不进行任何精制等操作, 将退火温度设定在使靶链延伸的引物的 T_m 值和使靶链的互补链延伸的引物的 T_m 值之间进行 PCR 反应时, 靶链就可以被优先扩增。

通过适当设定构成 PCR 反应的各个引物的 T_m 值和 PCR 反应的退火温度, 可以更有效地更多地扩增希望扩增的单链(靶链) DNA 链。在许多情况下, 如果将构成希望更多扩增的 DNA 链的引物的 T_m 值设计得比退火温度更高, 将构成不希望扩增的互补链一方的 DNA 的引物的 T_m 值设计得比退火温度还低, 可以有效地只扩增所期望的 DNA 链。这也可以在同时使用多个引物组的多重 PCR 中利用。

本实施方式的核酸扩增方法可以用于随核酸检测用制作的 DNA 芯片等中杂交的检体的核酸扩增的检体制备。

即, 作为可以有效地扩增对 DNA 芯片上探针 DNA 进行杂交的单链 DNA 链, 而在该扩增过程中可以整合荧光物质等标记物质的使标记物质整合的方法, 有使用标记的引物的方法, 以及作为底物使用标记的核苷酸进行 PCR 反应的方法等。

因此，就象上述那样，按照本实施方式，通过依照本发明适当设定 PCR 反应中引物的 T_m 值以及反应中的退火温度，含有靶序列的核酸的核酸量即使少量，在有效 PCR 产物中可合成的双链 DNA 之中所期望的引物延伸链与互补链的引物延伸链相比，也可以优先合成。

本发明中使用的引物只要至少两个引物在 PCR 反应条件下的 T_m 值存在适当的差值，就可以进行本发明的核酸扩增。

更具体地讲，将上述两个引物表现出的 T_m 值之间的温度差优选选择在 $10^{\circ}\text{C} \sim 20^{\circ}\text{C}$ 的范围，而将上述两个引物表现出的 T_m 值之间的温度差选择在 $5^{\circ}\text{C} \sim 10^{\circ}\text{C}$ 范围也很好。另外，也可以将上述两个引物表现出的 T_m 值之间的温度差选择在 $1^{\circ}\text{C} \sim 5^{\circ}\text{C}$ 范围。

另外，作为将构成上述引物组的多种引物中的至少一个引物在上述 PCR 扩增反应条件下作成具有与另一个引物不同的 T_m 值的引物的手段，

使用通过调整引物含有的碱基序列中的 GC% 来调整该碱基序列的引物表现出的 T_m 值的手段，

通过对该引物含有的碱基序列的选择，可以设置与另一个引物的 T_m 值的差值。或者作为将构成上述引物组的多种引物中的至少一个引物作成在上述 PCR 扩增反应条件下，具有与另一个引物不同 T_m 值的引物的手段，

使用通过调整引物含有的碱基序列的碱基链长来调整该碱基序列的引物表现出的 T_m 值的手段，

通过对该引物含有的碱基序列的选择，也可以设置与另一个引物的 T_m 值的差值。

另外，通过对引物实施任一种化学修饰，也可以调整引物的 T_m 值。这是基于被修饰的化学修饰基团等对引物和其互补链的两条链稳

定性有影响，结果使引物的 T_m 值变化的现象等。就是说，在导入的化学修饰基团使双链的稳定性增加时，可以使 T_m 值上升，反之，在使稳定性降低时，使 T_m 值下降。

通过化学修饰基团对 T_m 值的调整特别是在该化学修饰具有嵌入剂的性质时，或具有沟结合剂性质时，可以对双链稳定性有很大影响。因此，通过导入以嵌入剂或沟结合剂起作用的化学修饰基团，可以调整引物的 T_m 值。

另一方面，就构成上述引物组的多种引物中的至少两个引物，在上述 PCR 扩增反应条件下再设置对该引物的 T_m 值进行相互比较的工序，

作为进行比较的该引物的 T_m 值，可以使用根据该引物具有的碱基序列计算的值。

作为该引物的 T_m 值的计算方法，可以使用最近邻位碱基对法。

作为该引物的 T_m 值的计算方法，可以使用 Wallace 法。

作为该引物的 T_m 值的计算方法，可以使用 GC % 法。

在本发明的相关核酸扩增方法中，通过 PCR 扩增得到的扩增产物可以含有利用标记物质标记的扩增产物。

此时，经上述标记物质标记的扩增产物也可以是使在 PCR 扩增反应中用作底物的脱氧核苷酸中含有标记的脱氧核苷酸，在由 PCR 扩增反应得到的延伸链中含有来自上述标记脱氧核苷酸标记的扩增产物。另外，与使用上述化学修饰的引物的 PCR 同样使在构成上述引物组的多种引物中含有预先标记的引物，经 PCR 扩增反应形成被上述标记的引物的延伸链的扩增产物。此时，在含有的预先标记的引物中，对该引物预先实施的标记优选是 5' 末端标记。另外此时，与使用化学修饰基团同样，考虑到标记物质对 T_m 值的影响，希望对引物的序列或碱

基长度进行调整。

另外，在经上述标记物质标记的扩增产物中，该标记物质优选是荧光物质。或在经上述标记物质标记的扩增产物中，该标记物质也可以是放射性同位素。

作为本发明相关的核酸扩增方法的应用，

上述样品是利用杂交反应核酸分子被作为检测对象的样品，

在利用上述杂交反应的核酸分子的检测中，至少一种被检测的核酸分子是使用由上述至少两种引物构成的引物组，经 PCR 扩增法制造的至少一种以上的具有特定碱基序列的扩增产物，

以含有通过扩增制造的该扩增产物的样品可以用作利用上述杂交反应的核酸分子检测中的检体作为特征的方法的方式。另外，在利用上述杂交反应的核酸分子的检测中，优选是将固定或吸附于固相表面的 DNA 分子用作该杂交反应用探针。例如在固定或吸附于固相表面的 DNA 分子中，上述固相优选是 DNA 芯片或 DNA 微阵列的方式。另外，在固定或吸附于固相表面的 DNA 分子中，上述固相也可以是微球。

本发明还提供在上述本发明相关的核酸扩增方法中专门利用的 PCR 用引物组的发明，即本发明相关的引物组

是通过 PCR 扩增法从样品中含有的核酸分子制造至少含有该核酸分子中的一个以上的特定碱基序列的扩增产物时使用的由至少 2 个引物构成的引物组，

是以利用包括上述任一方式的本发明相关的核酸扩增方法，由适合通过 PCR 扩增法制造上述扩增产物的工序的多种引物构成的引物组为特征的引物组。

同时本发明提供通过使用上述本发明相关的核酸扩增方法得到的 PCR 扩增产物的发明，即本发明相关的 PCR 扩增产物

是使用由至少2个引物构成的引物组通过PCR扩增法从样品中含有的核酸分子制造至少含有该核酸分子中的一个以上的特定碱基序列的扩增产物，

上述扩增产物是以使用包括上述任一方式的本发明的相关核酸扩增方法制备的为特征的PCR扩增产物。

另外本发明也提供利用本发明相关的核酸扩增方法的核酸检测方法的发明，即本发明的相关核酸检测方法

是利用杂交反应检测核酸分子的方法，

是以使用由至少2个引物构成的引物组，通过PCR扩增法从样品中含有的核酸分子制造该核酸分子中一个以上含有特定碱基序列的扩增产物，

将通过扩增制备的含有该扩增产物的样品用作利用上述杂交反应的核酸分子检测中的检体，

在通过PCR扩增法制造上述扩增产物时，使用包括上述任一方式的本发明相关核酸扩增方法为特征的核酸检测方法。

以下对本发明相关的核酸扩增方法进行更具体地说明。

在本发明相关的核酸扩增方法中，通过PCR扩增反应对从作为模板的核酸分子的全碱基序列中选择的相当于所期望的碱基序列区域的核酸链进行扩增合成时，适当设定PCR扩增反应中使用的反应液组成中的各个引物的溶解温度(T_m)值和PCR扩增反应中模板和引物进行结合的退火过程的退火温度。通过该设定，由于由 T_m 值不同的引物延伸的单链DNA分子的收率上设置差异，可以有效地扩增特定的引物的延伸链。因此，对各个引物的碱基序列进行选择以便使希望优先扩增的单链DNA分子的延伸的引物的 T_m 值比另一个引物的 T_m 值更高。在许多情况下，如果将用于希望多扩增的DNA链的引物的 T_m 值设计得比退火温度更高，而将用于希望相对抑制扩增产量的互补链一方的DNA分子延伸中的引物的 T_m 值设计得比退火温度更低

那样设定该碱基序列，可以同时有效地只扩增所期望的单链 DNA 链。

图 1 给出了在以上的本发明相关的核酸扩增方法中利用的技术原理模式图。在退火过程中，由于比 T_m 值高的引物 2 相对于模板形成更强的结合，所以比 T_m 值高的这样的引物 2 延伸的引物 2 延伸链的产量更高。另外，在退火过程中，由于比 T_m 值低的引物 1 相对于模板形成更弱的结合，所以比 T_m 值低的这样的引物 1 延伸的引物 1 延伸链的产量更低。在 PCR 扩增反应中，通过反复进行温度循环，以到前一阶段为止合成的单链 DNA 作为模板，由于从引物延伸 DNA 链，反复地进行扩增，就象本发明的方法给出的那样，多个引物的添加量做成相等，结果由比 T_m 值低的引物 1 延伸的引物 1 延伸链的产量也维持在一定范围内。结果在各个阶段中，可以在由比 T_m 值高的引物 2 延伸的 DNA 链中，由作为模板的 T_m 值低的引物 1 开始 DNA 链的延伸链的含量变得非常少，一方面实质上避免了扩增停止，一方面又使得作为目的由比 T_m 值高的引物 2 延伸的引物 2 延伸链的产量更高。

通过本发明的核酸扩增方法扩增合成的 PCR 扩增产物在由相关引物延伸 DNA 链的过程中，整合荧光物质等标记物质是有可能的。作为整合该标记物质的方法，可以利用对使用的引物预先附加标记的手法，或在通过聚合酶使 DNA 链延伸过程中，作为底物使用标记的核苷酸，在延伸的 DNA 链部导入标记的手法。

如果将这些附加了标记的单链 DNA 分子作为利用与 DNA 探针的杂交反应的核酸分子的检测中的检体样品的话，通过利用该标记，有可能很容易地对得到的杂交体进行定量检测。例如，在可与核酸检测用制作的 DNA 芯片等杂交的检体样品的制备中，随着优先、而且定量地扩增目的单链 DNA 分子，在伴随整合所定的荧光物质等的标记物质的核酸扩增的检体制备工序中，使用本发明的相关核酸扩增方法非常合适。

在本发明的核酸扩增方法中，首先设计夹住希望扩增的对象核酸分子碱基序列区域的引物。在引物设计中，将夹住希望扩增的碱基序列区域的正向引物用和反向引物用的两个引物（一个引物组），设计成在 PCR 反应条件下 T_m 值不同。此时，作为在 PCR 反应条件下的引物的 T_m 值，通过对 2 个引物的设计，使得希望优先更多扩增的 DNA 链的延伸中用的引物的 T_m 值比另外一方 DNA 链延伸用的引物的 T_m 值更高，可以使由具有更高 T_m 值的引物延伸的所期望的 DNA 链更多地扩增。

作为将在 PCR 反应条件下引物的 T_m 值为所期望的温度那样设计引物的方法，在不显著损害引物的序列特异性的范围内，一般都是改变引物碱基序列的长度、或改变引物碱基序列中的 GC%（核酸序列中的鸟嘌呤和胞嘧啶的构成比率）那样选择引物碱基序列。而设计的引物的 T_m 值的计算方法，例如通过测定来自附加在引物的荧光标记的吸收强度求出在实际的 PCR 反应条件下改变温度，与模板结合的引物比率，可以由该温度的依赖性算出。作为根据引物的碱基序列，通过计算对引物的 T_m 值高精度地进行推定的手法，也可以通过一般都了解的最近邻位碱基对法、Wallace 法、GC% 等方法求出计算值。

另外，有关最近邻位碱基对法，

参照 Breslauer K. J., Frank R., Blocker H., Markey L. A. (1986) Predicting DNA duplex stability from the base sequence - Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 3746-3750、Freier S. M., Kierzek R., Jaeger J. A., Sugimoto N., Caruthers M. H., Nielson T., Turner D. H. (1986) Improved free-energy parameters for predictions of RNA duplex stabilit. - Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 9373-9377、Schildkraut C., Lifson S. (1965) Dependence of the melting temperature of DNA on salt concentration - Biopolymers 3, 195-208

等,

有关 Wallace 法,

参照 Wallace, R. B.; Shaffer, J.; Murphy R. F.; Bonner, J.; Hirose, T.; Itakura, K.; (1979) *Nucleic Acid Res.* 6, 3543 等,

有关 GC % 法,

参照 Dependence of the Melting Temperature of DNA on Salt Concentration、Schildkraut C., Lifson S. (1965) *BIOPOLYMERS* 3. 195-208、Optimization of the annealing temperature for DNA amplification in vitro、W. Rychlik、*Nucl. Acids Res.* (1990) 18(21) 6409-6412 等。

另外,作为将 PCR 反应条件下的引物的 T_m 值定在所期望的温度那样设计引物的方法,可以对引物实施化学修饰,通过该化学修饰基团的作用对引物的 T_m 值进行调整。与引物结合的化学修饰基团对引物的双链的稳定性有影响,例如具有使双链的稳定性增强的化学修饰基团可以使 T_m 值升高,反之,具有使双链的稳定性降低的化学修饰基团可以使 T_m 值降低。

作为化学修饰基团,无论是种类、结合样式都可没有特别限制地利用。其中具有与核酸双链构造有强烈相互作用的嵌入剂、或沟结合剂的那性质物质对 T_m 值的调整特别有效。作为嵌合剂一般常用的有溴乙锭、9-氨基吡啶、吡啶橙、二氨基吡啶、其他的葱等多环芳香族分子。或作为沟结合剂如市售的ヘキスト 33258、ヘキスト 33342、Pentamidine、NetroPsin、DAPI 等。一般常用溴乙锭、葱等芳香族化合物。此外特开平 7-233065 号公报公开的吡喃鎓 (pyrrilium) 色素等作为与双链核酸具有强烈相互作用的物质也经常使用。在一部分沟结合剂中,例如象 DAPI 那样通过存在很多 AT 的区域以高频率进行相互作用的例子也有报道。另外,许多嵌入剂、或沟结合剂对碱基序列非特异地与核酸双链构造进行强烈的相互作用。此时由于相互作用

的对象核酸的双链结构部分的碱基序列以及嵌入剂或沟结合剂的种类不同，得到的复合体的构造、热稳定性都会有种种变化。

嵌入剂整合到双链核酸堆积的碱基对之间，而沟结合剂整合到双螺旋结构的沟中，两者都对双链结构的稳定性具有强烈的影响，由于种类不同有的使双链结构的稳定性增强，有的使双链结构的稳定性下降。

作为将这些化学修饰基团导入引物的方法，例如有预先对引物的5'末端修饰氨基或生物素，利用对这些官能团的特异性反应，使所期望的化学修饰基团结合的方法等，可以无特别限制地利用各种结合模式。

在基本的 PCR 扩增反应中，使用的引物组是由夹住希望扩增的碱基序列区域的 1 组的正向引物和反向引物构成的，本发明的核酸扩增方法并不限于此。通过 1 组以上的引物对 1 个碱基序列区域进行扩增时，或通过 1 组引物组对多个扩增区域进行扩增时，或将他们组合后进行的复合 PCR 扩增中也可以使用本发明的核酸扩增方法。使用多个引物组的 PCR 扩增反应可以从一个以上的核酸分子中选择一个以上的希望扩增的核酸分子，从选择的核酸分子的碱基序列中选择一个以上的希望扩增的区域，对选择的各个区域设计引物，再通过 PCR 反应选择一个以上的希望优先扩增的 DNA 链，在进行一系列选择工序后，按照本发明核酸扩增方法，通过对使用的引物进行设计以及 PCR 扩增反应条件的设定，可以运用本发明的核酸扩增方法。

使用设计的引物进行扩增反应，无论什么样的反应条件都可以，为了更有效地实施本发明的核酸扩增。可以将扩增反应中的退火温度设定在一组有正向引物和反向引物的 2 个引物的不同 T_m 值之间，进行 PCR 扩增反应。通过 PCR 扩增反应，退火温度和通过聚合酶进行 DNA 链延伸反应温度变为同一温度，有时也未必需要另外实施退火反应，在该情况下，同时进行退火处理，通过将酶反应温度设定在上述

两个引物的 T_m 值之间那样设定各个引物的 T_m 值，通过本发明的方法优先进行核酸扩增是可能的。

两个引物的 T_m 值与 PCR 扩增反应中的退火温度的关系希望为上述的关系；例如即使退火温度比两个引物的 T_m 值低时，也可以进行 PCR 扩增反应。然而相对于退火温度，两个引物的 T_m 值实质上的差异相对变小，本发明的效果也变得低了。而与此相反，退火温度比两个引物的 T_m 值高时，担心 PCR 扩增反应本身的效率下降。因此，在本发明的扩增方法中，希望将 PCR 扩增反应的退火温度设定在两个引物的 T_m 值之间，当不能设定时，希望将退火温度设定在离一方引物 T_m 值的 5°C 以内的范围内。

在 PCR 扩增反应条件下的两个引物的 T_m 值如果存在适当的差值，虽然可以实施本发明核酸扩增方法，但希望该 T_m 值间的温度差在 $1\sim 5^\circ\text{C}$ 的范围。另外 T_m 值间的温度差如果在 $5\sim 10^\circ\text{C}$ 的范围内更好。更优选 T_m 值间的温度差如果在 $10\sim 20^\circ\text{C}$ 的范围。

如果再详细地进行说明，当两个引物的 T_m 值存在大的差异时，就本发明的目的“希望优先扩增的引物延伸链比互补链更多地被扩增”这一观点来说是所希望的。然而就 PCR 扩增反应的效率这一观点来说，过大的差异并不好。因此，与扩增率相比更追求扩增产物的非对称化时，在两个引物之间设定 $10\sim 20^\circ\text{C}$ 、或 $5\sim 10^\circ\text{C}$ 的 T_m 值差，反之，与扩增产物的非对称化相比更追求扩增产率时，将 T_m 值的差设定得比较小更好。

本发明的核酸扩增方法可以无限制地应用于需要 PCR 扩增的各种各样的检体制备，特别是作为期待该效果的实施方式，可应用于利用杂交反应的具有特定核酸配列的核酸分子的检测。其中，作为核酸检测方法，近年广泛利用的应用方式，有利用对固定于固相上的 DNA

探针进行杂交反应的检测方法。作为固相常用玻璃、塑料、金属等，本发明的核酸扩增方法可以无特别限制地利用这些种类的固相。其中，利用平板上固定很多 DNA 探针的 DNA 芯片或 DNA 微阵列等的核酸分子的检测手法在该检体样品的制备工序中本发明的核酸扩增方法是最合用的核酸检测方法之一。而除了平板状 DNA 芯片以外，利用固定了 DNA 探针的微球的核酸检测方法近年来也常用，本发明的核酸扩增方法也可用于在使用该微球表面固定了 DNA 探针的核酸检测方法中的检体样品的制备。

固相上固定的 DNA 探针是单链 DNA 片段，一条 DNA 片段的链长为 60mer 左右比较长时，单链 DNA 探针的 T_m 值高，可进行比较强的杂交反应。因此成为检测对象的 PCR 扩增产物即使与其互补链形成双链，也可以通过加热处理，使双链解开，与检测对象的 DNA 链有效地形成杂交体。然而固相上单链 DNA 探针的链长为 20mer 左右比较短时，单链 DNA 探针的 T_m 值低，将 PCR 扩增产物的双链解开后，与再构成双链的过程进行竞争之后，不可能有效地形成杂交体。当利用与该 20mer 左右比较短的 DNA 探针时，本发明的核酸扩增方法由于可以优先地扩增目的靶链，所以特别有效，通过使用含有优先扩增合成的靶链的检体样品，可以进行高灵敏度的检测。

在含有与 DNA 芯片等固定的 DNA 探针形成杂交体的靶链的检体样品的制备工序中，实施本核酸扩增方法时，往往对作为靶链的希望更多扩增的引物延伸链以任一种形式进行标记。本发明的核酸扩增方法也可应用于伴随标记的核酸扩增方法，这种情况，可不受标记方法限制地实施。作为标记的方法，与实施上述的化学修饰的引物同样，对引物的一部分预先进行任意标记，通过被标记的引物进行 PCR 扩增反应的方法是最常用的方法之一。特别是在引物的 5' 末端等预先进行荧光物质标记，使用该标记引物，进行 PCR 扩增反应的方法是其中有代表性的反应。但此时，与使用化学修饰基团的引物同样，考虑到结

合标记物质对 T_m 值的影响，需要设计引物的碱基序列等。而除了该方法以外，还有作为 PCR 扩增反应底物，通过荧光物质等对可整合到延伸的 DNA 链的脱氧核苷酸进行标记，通过将该底物添加到 PCR 反应液，对 PCR 扩增产物进行标记的方法也被广泛利用。本发明的核酸扩增方法可不受任何标记方法限制地应用。

作为可利用的标记物质，从灵敏度高和操作简便来说一般都是通过荧光物质进行标记，也可以通过放射性同位素等标记，或对于标记了生物素的 PCR 扩增产物通过使标记的抗生物素蛋白与生物素结合间接地进行标记。

实施例

以下通过实施例对本发明进行更具体地说明。但是以下叙述的实施例只是与本发明相关的优选实施方式的一例，本发明的技术范围并不限于这些实施例。

<实施例 1>pUC118 EcoRI/BAP 的 PCR

(1) 引物的设计

由市售的 Takara 公司生产的载体 pUC118 EcoRI/BAP (全长 3162bp) 的碱基序列中设计具有下列序列的 4 种引物。而有关 pUC118 EcoRI/BAP 的全碱基序列信息由 Takara 公司提供，另外从公开的数据库等也可以获得。

关于这 4 种引物，表 1 示出了根据他们的碱基序列通过计算求出的溶解温度 T_m 值。利用的 T_m 值计算方法是上述的手法，计算时，PCR 反应中的各个条件为：反应液中的 Na^+ 浓度为 50mM、 Mg^{2+} 浓度为 1.5mM、各个引物浓度为 0.5 μM 。

表 1

名称	引物的碱基序列	T _m 值
F1	5' ccttaacgtgagtttctg 3'	54.24 °C
F2	5' cccttaacgtgagtttctgt 3'	59.12 °C
F3	5' atcccttaacgtgagtttctgttc 3'	62.08 °C
R1	5' gcggttaatacggttatccac 3'	59.10 °C

由这 4 种引物构成的引物组中，通过下述的正向引物和反向引物的组合得到的双链的 PCR 扩增产物的碱基序列链长如表 2 所示。

表 2

	引物组合		PCR 扩增产物的链长
	正向引物	反向引物	
[1]	F1	R1	758bp
[2]	F2	R1	758bp
[3]	F3	R1	761bp

(2) 引物合成

对实施例 1 (1) 设计的 4 种引物进行合成。各个引物的合成按照常规方法用 DNA 合成仪合成具有各个碱基序列的 DNA 链，对 DNA 链的 5' 末端一侧通过环己烷接头进行氨基修饰。得到的 5' 末端氨基修饰 DNA (引物) 经萃取柱精制后，对 F1、F2、F3 用在氨基结合了 NHS 型 Cy3 标记试剂 (Amersham Pharmacia) 进行处理，R1 经 NHS 型 Cy5 标记试剂 (Amersham Pharmacia) 处理，在 5' 末端导入了荧光色素标记。对得到的标记引物分别进行 HPLC 精制，得到 Cy3 标记 F1、Cy3 标记 F2、Cy3 标记 F3、Cy5 标记 R1 的 4 种引物。得到的各个标记引物用 TE 缓冲液稀释到 10 μ M 的浓度。

(3) PCR 扩增反应

使用实施例 1 (2) 合成的 4 种标记引物、作为模板基因 DNA 的

Takara 公司生产的载体 pUC118 EcoRI/BAP 以及 QIAGEN 公司生产的 PCR 试剂盒 HotStarTaq Master Mix, 进行 PCR 扩增反应。

作为正向引物和反向引物的组合, 就(1)中表 2 记载的 3 组组合, 进行如下表 3 所示组成的反应液的制备。

表 3
反应液组成

成分	组成
Master Mix (QIAGEN 公司 Master Mix)	25 μ l
模板 DNA (Takara 公司 pUc118 稀释物)	1 μ l(10ng)
Cy3 标记正向引物 (F1、F2 或 F3)	2.5 μ l(25pmol/tube)
Cy5 标记反向引物 (R1)	2.5 μ l(25pmol/tube)
H ₂ O	19 μ l
合计	50 μ l

就制备的反应液, 使用市售的热循环仪, 按照下面表 4 的温度循环程序进行 PCR 扩增反应。

表 4
PCR 扩增反应的温度条件

步骤	温度		保持时间	反复次数
1	95 $^{\circ}$ C		15 min.	
2	92 $^{\circ}$ C	(变性)	45 s	25 循环
3	57 $^{\circ}$ C	(退火)	45 s	
4	72 $^{\circ}$ C	(延伸)	1 min	
5	72 $^{\circ}$ C		10 min	

扩增反应结束后, PCR 扩增产物用精制用柱(QIAGEN QIAquick PCR Purification Kit)进行精制。精制后, PCR 扩增产物溶液量调整

到 50 μ L。取得到的精制后的 PCR 扩增产物溶液一部分，按照常规方法进行电泳，确认有相当于目的 760bp 的带出现。图 2 给出了对使用正向引物和反向引物的组合 [1]、[2]、[3] 得到的 PCR 扩增产物进行电泳的照片。

(4) 吸收测定

对实施例 1(2) 合成的 4 种标记引物溶液以及 (3) 中制备的 PCR 扩增产物溶液的吸收进行测定。各个标记引物溶液调整到 0.5 μ M 浓度，根据各个标记引物的标记荧光物质 (Cy3 或 Cy5)，于下述波长下对来自标记荧光物质的吸收强度进行测定。

另外，对于 PCR 扩增产物溶液于来自标记的正向引物和反向引物的标记荧光物质的两个吸收波长下测定吸收强度。

表 5

引物名称	吸收波长	吸收强度
Cy3 标记 F1	564nm	0.0872
Cy3 标记 F2	564nm	0.0859
Cy3 标记 F3	564nm	0.0880
Cy5 标记 R1	663nm	0.1214

表 6

PCR 扩增产物	吸收波长	吸收强度
PCR 扩增产物 [1]	564nm (来自 Cy3 标记 F1)	0.0135
	663nm (来自 Cy5 标记 R1)	0.0366
PCR 扩增产物 [2]	564nm (来自 Cy3 标记 F2)	0.0361
	663nm (来自 Cy5 标记 R1)	0.0494
PCR 扩增产物 [3]	564nm (来自 Cy3 标记 F3)	0.0605
	663nm (来自 Cy5 标记 R1)	0.0752

然后，根据于 PCR 扩增产物溶液中测定的吸收强度，算出由于 PCR 扩增反应引起的各个标记引物的整合收率。该整合收率给出了在 PCR 扩增反应中向反应液中添加的引物中，百分比为多少引起延伸反应，可变成 PCR 扩增反应产物的引物延伸链。

表 7

PCR 扩增产物	标记引物的延伸链	整合率
PCR 扩增产物[1]	来自 Cy3 标记 F1 的正向延伸	15.5%
	来自 Cy5 标记 R1 的反向延伸	30.1%
PCR 扩增产物[2]	来自 Cy3 标记 F2 的正向延伸	42.0%
	来自 Cy5 标记 R1 的反向延伸	40.7%
PCR 扩增产物[3]	来自 Cy3 标记 F3 的正向延伸	68.8%
	来自 Cy5 标记 R1 的反向延伸	61.9%

在 PCR 扩增产物[2]中，Cy3 标记 F2 和 Cy5 标记 R1 的 T_m 值几乎相等，还由于退火温度比两 T_m 值低，所以其结果两者的整合收率没有大的差别，可以判定对应的两条链可均等地合成。另外，在 PCR 扩增产物[1]中，由于 Cy3 标记 F1 的 T_m 值比 Cy5 标记 R1 的 T_m 值更低，还由于退火温度位于两者之间，所以优先合成 Cy5 标记 R1 的延伸链，随着它的合成，在各个延伸链中与 Cy3 标记 F1 的整合收率比较，Cy5 标记 R1 的整合收率升高很多。而在 PCR 扩增产物[3]中，由于退火温度比其中的一个 T_m 值低，但 Cy3 标记 F3 的 T_m 值比 Cy5 标记 R1 的 T_m 值更高，所以优先合成 Cy3 标记 F3 的延伸链，随着它的合成，在各个延伸链中与 Cy5 标记 R1 的整合收率比较，Cy3 标记 F3 的整合收率还要高。

<实施例 2> 在 DNA 芯片中的杂交反应

(1) DNA 微芯片的制作

(1) - 1 玻璃基板的清洗

将合成石英的玻璃基板(大小(WLT): 25mm×75mm×1mm 饭山特殊玻璃公司生产): 放入到耐热、耐碱性的架中, 浸入到调整到所定浓度的超声波清洗用的清洗液中。于清洗液中浸泡过夜后, 进行 20 分钟的超声波清洗。然后取出玻璃基板, 用纯水轻轻地冲洗后, 于超纯水中进行 20 分钟的超声波清洗。然后将玻璃基板浸入到加热到 80℃ 的 1N 氢氧化钠水溶液中, 浸泡 10 分钟。再进行纯水清洗和超纯水清洗, 准备 DNA 芯片用的清洗干净的石英玻璃基板。

(1) - 2 表面处理

使偶联剂 KBM-603 (信越硅公司生产) 溶解于纯水中, 使终浓度为 1%, 于室温下搅拌 2 小时。然后, 将洗净后的石英玻璃基板浸入到该偶联剂水溶液中, 在室温下放置 20 分钟。提起玻璃基板, 用纯水轻轻清洗表面后, 向玻璃基板的两面吹氮气, 使其干燥。然后将氮气干燥的玻璃基板于加热到 120℃ 的烘箱中烘 1 个小时, 使偶联剂处理完结。通过该偶联剂处理, 在玻璃基板表面导入了来自硅烷偶联剂的氨基。

另外, 制备将同仁化学研究所公司生产的 N-马来酰亚胺己酰氧琥珀酰亚胺 (N-(6-Maleimidocaproyloxy) succinimido, 以下缩写为 EMCS) 溶解于二甲基亚砷和乙醇的 1:1 混合溶剂中使终浓度为 0.3mg/ml 的 EMCS 溶液。烘后, 将偶联剂处理过的玻璃基板放置冷却, 于室温下在制备的 EMCS 溶液中浸泡 2 小时。在该浸渍处理期间, 导入到偶联剂处理过的玻璃基板的表面的氨基和 EMCS 的琥珀酰亚胺基反应, 将来自 EMCS 的马来酰亚胺导入到玻璃基板表面。将从 EMCS 溶液中提出的玻璃基板用先前叙述的二甲基亚砷和乙醇的混合溶剂清洗, 再用乙醇清洗后, 于氮气气氛中使其干燥。

(1) - 3 探针用 DNA 合成

合成具有下列碱基序列的探针 P1。而该碱基序列相对于实施例 1 的 PCR 扩增产物[1]、[2]、[3]的反向一侧的延伸链的部分碱基序列是 100% 的互补碱基序列。

探针 P1: 5' ccttaacgtgagttttcg 3'

为探针 DNA 与在上述表面导入了马来酰亚胺的玻璃基板共价结合, 按照常规方法对 5' 末端实施巯基化处理。然后为了避免 DNA 合成时的副反应, 对实施了保护的保护基进行去保护, 再实施 HPLC 精制和脱盐处理。

得到的探针 DNA 溶解于纯水中, 使最终浓度(墨水溶解时)为 10M, 进行分注后, 进行冷冻干燥, 除去水分。

(1) - 4 通过 BJ 点印机喷出探针 DNA, 以及与基板表面的结合

准备含有甘油 7.5wt%、硫撑二乙醇 7.5wt%、尿素 7.5wt%、アセチレノール EH (川研ファインケミカル公司生产) 1.0wt% 的水溶液。然后将分注的探针 DNA 按照规定浓度(10 μ M) 溶解于上述的混合溶剂中。将得到的探针 DNA 溶液充填到バルブ喷墨打印机(商品名: BJF-850 佳能公司生产)用墨水池中, 装到印字头上。

而上述バルブ喷墨打印机是实施改造成可向平板喷墨印刷的印刷机。另外该改造的バルブ喷墨打印机通过按照所定的文件作成方法输入印字图形, 在约 120 μ m 间距上可以点印上约 5pl 的 DNA 溶液液滴。

然后使用改造的バルブ喷墨打印机, 向玻璃基板表面进行探针 DNA 溶液的点印操作。每一枚 DNA 芯片预先作成可进行 16 点的喷出的点那样进行喷墨印字。通过放大镜确认确实对目的图样进行了 DNA 溶液的点印后, 于加湿槽内静置 30 分钟, 使玻璃基板表面的马来酰亚

胺基与探针 DNA 5'端的巯基 (-SH) 反应。

(1) - 5 清洗

于加湿槽内反应 30 分钟后, 用含有 100mM 的 NaCl 的 10mM 的磷酸缓冲液 (pH7.0) 冲洗残留在玻璃基板表面的未反应的探针 DNA。得到了在玻璃基板表面每个 DNA 芯片 16 个点分别固定了所定的单链探针 DNA 的 DNA 微阵列型 DNA 芯片。

(2) 杂交反应

使用实施例 2 (1) 制作的 DNA 芯片和作为检体在实施例 1 中制作的 PCR 扩增产物, 对目的核酸分子进行检测反应。

(2) - 1 DNA 微阵列的封闭

将 BSA (牛血清白蛋白级分 5: Sigma 公司生产) 溶解于 100mM 的 NaCl/10mM 的磷酸缓冲液, 使终浓度为 1wt%, 将实施例 2 (1) 制作的 DNA 微阵列 (DNA 芯片) 在室温下于该溶液中浸泡 2 小时, 进行玻璃基板的封闭。封闭结束后, 用含有 0.1wt% SDS (十二烷基硫酸钠) 的 2SSC 溶液 (NaCl 300mM、柠檬酸钠 (二水合柠檬酸三钠盐 ($C_6H_5Na_3 \cdot 2H_2O$) 30mM、pH7.0) 进行清洗后, 用纯水冲洗。然后用旋转干燥 (Spin dry) 装置除去 DNA 微阵列的水。

(2) - 2 杂交溶液的制备

为了将各个 PCR 扩增产物溶液中的靶核酸量 (摩尔数) 作成一样, 将由对反向链标记的 Cy5 引起的吸收强度做成一样, 调整 3 种 PCR 扩增产物的浓度。然后使用等量的 PCR 扩增产物溶液, 制备终浓度为下述组成的 3 种杂交溶液。

<杂交溶液>

6SSPE /10 % Formamide/PCR 扩增产物溶液

(6×SSPE: NaCl 900mM、NaH₂PO₄·H₂O 60mM、EDTA 6mM、pH7.4)

(2) - 3 杂交

将除去水的 DNA 芯片装置在杂交装置 (Genomic Solutions Inc. Hybridization Station) 中, 用上述组成的杂交溶液, 按照下述的顺序和条件进行杂交反应。

<杂交条件和顺序>

表 8

操作	操作顺序和条件
反应	65℃ 3min → 92℃ 2min → 45℃ 3h
清洗	2×SSC/0.1% SDS at 25℃
	2×SSC at 20℃
(冲洗)	H ₂ O (手动冲洗)
干燥	旋转干燥

(3) 荧光测定

杂交反应结束后, 就旋转干燥的 DNA 芯片通过使用 DNA 微阵列用荧光检测装置 (Axon 公司生产、genepix 4000B) 对来自杂交体的荧光进行测定。来自该杂交体的荧光是来自与探针 DNA 形成杂交体的实施例 1 中 PCR 扩增产物 [1]、[2]、[3] 的反向一侧延伸链上的荧光标记的荧光。

将在 DNA 芯片上没有探针 DNA 的点的部分观测的荧光强度作为背景值, 将由各个点的表面的荧光强度减去背景值作为荧光强度的实测值。在下面表 9 中给出了进行 2 次测定后的实测值的平均值。

表 9

检体的 PCR 扩增产物	荧光强度
PCR 扩增产物[1]	7400
PCR 扩增产物[2]	3250
PCR 扩增产物[3]	2670

由该结果可以判明与来自正向链和反向链均等合成的 PCR 扩增产物[2]的检体样品相比, 与正向链比较, 在来自反向链优先合成的 PCR 扩增产物[1]的检体样品中, 在 DNA 芯片上可效率更高地发生反向链的杂交。因此, 通过运用与本发明有关的核酸扩增方法, 可以更优先地进行所期望的 PCR 扩增延伸链的合成, 在供给使用 DNA 探针的核酸分子的检测的检体样品的制备工序中, 适合运用本发明有关的核酸扩增方法。

<实施例 3>使用蒽修饰引物的 PCR 和杂交

(1) 蒽修饰引物的合成

进行在实施例 1 设计的 pUC118 的引物 R1 的合成。引物的合成按照常规方法用 DNA 自动合成仪合成具有相同碱基序列的 DNA 链, 再通过由甲叉链构成的接头对 DNA 链的 5'端修饰巯基。得到的 5'末端巯基修饰 DNA 在除去结合于各个官能团的保护基后, 通过凝胶过滤和乙醇沉淀进行精制。

然后将得到的巯基修饰 DNA 30nmol 溶解于 100 μ l 的混合溶剂(水 50%、乙醇 25%、二甲基亚砷 25%)中, 再加入 1mg 的 EMCS, 于室温下反应 3 小时。得到的混合物通过凝胶过滤和乙醇沉淀进行精制。通过该反应, DNA 的 5'末端结合 EMCS, 合成了末端结合了琥珀酰亚胺的修饰 DNA。

然后, 将上述修饰 DNA 溶解于 100 μ l 的水和二甲基甲酰胺的混合

溶剂 (1:1), 添加 10mg 的 2-氨基蒽, 搅拌, 尽可能地使其溶解。再于 45°C 下边继续搅拌, 边反应约 5 小时。通过该反应, 使 DNA 末端的琥珀酰亚胺基与结合于蒽的氨基反应, 得到 5' 末端结合了蒽的蒽修饰引物 (以下略为 F2AN)。

对析出的成分等进行过滤除去后, 按照常规方法进行精制。精制后, 对核酸成分的浓度进行测定, 用 TE 缓冲液稀释到 10M。

(2) PCR 扩增反应

按照常规方法合成具有在实施例 1 设计的 F2 和 R1 序列的各个引物。在合成时对末端没有进行特意修饰。合成的引物用 TE 缓冲液稀释到 10M。

然后, 使用 F2、R1AN 和 R1 的 3 种引物进行 PCR。引物的组合为表 10 记载的组合。

表 10

	引物组合		PCR 扩增产物的链长
	正向引物	反向引物	
[4]	F2	R1AN	759bp
[5]	F2	R1	759bp

PCR 的详细反应组成就象下面表 11 所表示的那样。作为标记底物混有 Cy3dUTP, 通过进行 PCR, 对得到的 PCR 产物进行标记。

表 11
反应液组成

成分	组成
Master Mix (QIAGEN 公司 Master Mix)	25 μ l (10ng)
模板 DNA (Takara 公司 pUC118 稀释物)	1 μ l (25pmol/tube)
正向引物 (F2)	2.5 μ l (25pmol/tube)
反向引物 (RIAN 或 R1)	2.5 μ l (25nmol/tube)
Cy3dUTP (Amersham Pharmacia 公司生产) 1mM	2.5 μ l (25nmol/tube)
H ₂ O	16.5 μ l
合计	50 μ l

就制备的反应液使用市售的热循环仪,按照下面表 12 的温度循环程序进行 PCR 扩增反应。

表 12
PCR 扩增反应的温度条件

步骤	温度		保持时间	反复次数
1	95°C		15 min.	
2	92°C	(变性)	45 s	25 循环
3	57°C	(退火)	45 s	
4	72°C	(延伸)	1 min.	
5	72°C		10 min.	

扩增反应结束后,PCR 扩增产物用精制用柱(QIAGEN QIAquick PCR Purification Kit)进行精制。精制后,PCR 扩增产物溶液量调整到 50 μ L。取得到的精制后 PCR 扩增产物溶液一部分,按照常规方法进行电泳,确认有相当于目的 760bp 的带出现。

(3) 杂交反应

将得到的 2 种 PCR 产物各自回收的总量对实施例 2 (1) 制作的 DNA 芯片进行杂交。杂交溶液组成、杂交的顺序以及芯片的扫描同实施例 2 那样进行。表 13 示出了计算与实施例 2 同样进行 2 次扫描的平均值的结果。

表 13

检体的 PCR 扩增产物	荧光强度
PCR 扩增产物[4]	10100
PCR 扩增产物[5]	7150

由该结果可知，引物结合了嵌入剂葱的引物 R1AN 由于葱的效果使 T_m 值升高，比 F1 优先地进行 PCR 的延伸反应。结果，与没有修饰的 R1 ([5]) 相比，使用 R1AN ([4]) 的一方荧光辉度变高了。

<实施例 4> 使用金刚烷修饰引物的 PCR 和杂交

(1) 金刚烷修饰引物的合成

进行实施例 1 设计的 pUC118 的引物 R1 的合成。引物的合成按照常规方法用 DNA 自动合成仪合成具有相同碱基序列的 DNA 链，再通过由甲叉链构成的接头对 DNA 链的 5'端修饰巯基。得到的 5'末端巯基修饰 DNA 在除去结合于各个官能团的保护基后，通过凝胶过滤和乙醇沉淀进行精制。

然后将得到的巯基修饰 DNA 30nmol 溶解于 100 μ l 的混合溶剂(水 50%、乙醇 25%、二甲基亚砷 25%) 中，再加入 1mg 的 ENCS，于室温下反应 3 小时。得到的混合物通过凝胶过滤和乙醇沉淀进行精制。通过该反应，DNA 的 5'末端结合 EMCS，合成了末端结合了琥珀酰亚胺的修饰 DNA。

然后，将上述修饰 DNA 溶解于 100 μ l 水后，添加 10mg 的盐酸金刚烷胺，搅拌，尽可能地使其溶解。再于 45 $^{\circ}$ C 下边继续搅拌，边反应约 5 小时。通过该反应，使 DNA 末端的琥珀酰亚胺基与结合于金刚烷的氨基反应，得到 5' 末端结合了金刚烷的金刚烷修饰引物（以下略为 R1AD）。

对析出的成分等进行过滤除去后，按照常规方法进行精制。精制后，进行核酸成分的浓度测定，用 TE 缓冲液稀释到 10 μ M。

(2) PCR 扩增反应

按照常规方法合成具有在实施例 1 设计的 F2 和 R1 序列的各个引物。在合成时没有对末端进行特别修饰。合成的引物用 TE 缓冲液稀释到 10 μ M。

然后，使用 F2、R1、R1AD 的 3 种引物进行 PCR。引物的组合为表 14 记载的组合。

表 14

	引物组合		PCR 扩增产物的链长
	正向引物	反向引物	
[6]	F2	R1AD	759bp
[7]	F2	R1	759bp

PCR 反应的详细反应组成就象下面表 15 所表示的那样。作为标记底物混有 Cy3dUTP，通过进行 PCR，对得到的 PCR 产物进行标记。

表 15
反应液组成

成分	组成
Master Mix (QIAGEN 公司 Master Mix)	25 μ l
模板 DNA (Takara 公司 pUC118 稀释物)	1 μ l (10ng)
正向引物 (F2)	2.5 μ l (25pmol/tube)
反向引物 (R1AD 或 R1)	2.5 μ l (25pmol/tube)
Cy3dUTP (Amersham Pharmacia 公司生产) 1mM	2.5 μ l (25 n mol/tube)
H ₂ O	16.5 μ l
合计	50 μ l

就制备的反应液使用市售的热循环仪,按照下面表 16 的温度循环程序进行 PCR 扩增反应。

表 16 PCR 扩增反应的温度条件

步骤	温度		保持时间	反复次数
1	95 $^{\circ}$ C		15 min.	
2	92 $^{\circ}$ C	(变性)	45 s	25 循环
3	57 $^{\circ}$ C	(退火)	45 s	
4	72 $^{\circ}$ C	(延伸)	1 min.	
4	72 $^{\circ}$ C		10 min.	

扩增反应结束后,PCR 扩增产物用精制用柱(QIAGEN QIAquick PCR Purification Kit)进行精制。精制后,PCR 扩增产物溶液量调整到 50 μ L。取得到的精制后 PCR 扩增产物溶液一部分,按照常规方法进行电泳,确认有相当于目的 760bp 的带出现。

(3) 杂交反应

使得到的 2 种 PCR 产物各自回收的总量对实施例 2 (1) 制作的

DNA 芯片进行杂交。杂交溶液组成、杂交的顺序以及芯片的扫描同实施例 2 那样进行。表 17 示出了计算与实施例 2 同样进行 2 次扫描的平均值的结果。

表 17

检体的 PCR 扩增产物	荧光强度
PCR 扩增产物[6]	5300
PCR 扩增产物[7]	9900

由该结果可知，对引物进行了金刚烷化学修饰的引物 F1AD 由于金刚烷的效果，引物双链稳定性降低， T_m 值下降，相对来说，来自 F2 的延伸链可优先地进行 PCR 的延伸反应。结果，与没有修饰的 R1 ([7]) 相比，使用 R1AD ([6]) 的一方荧光辉度变低了。

<实施例 5> (具有 2 阶段退火工序的 PCR 扩增法)

(1) 引物的合成

与实施例 1 (2) 同样，进行 4 种 (R1、F1、F2、F3) 引物的合成，标记，得到 Cy3 标记 F1、Cy3 标记 F2、Cy3 标记 F3、Cy5 标记 R1 的 4 种引物。

(2) 靶单链核酸扩增

使用上述 4 种引物、Takara 公司生产的载体 pUC118 EcoRI/BAP 以及 Takara 公司生产的 PCR 试剂盒 Premix Taq (Takara EX Taq Version)，进行 PCR 扩增反应。

作为引物的组合，使用上述 (1) 中记载的 3 组的引物组合，PCR 的反应条件按照下述程序进行：

Premix Taq (Takara EX Taq Version)	25 μ l
模板 DNA (Takara 公司的 pUC118 稀释物)	1 μ l (2ng)
Cy3 标记正向引物 (F1、F2 或 F3)	3 μ l

Cy5 标记反向引物 (R1)	3 μ l
<u>H₂O</u>	<u>18μl</u>
合计	50 μ l

上述组成的反应液按照以下的温度循环程序, 使用市售的热循环仪, 进行扩增反应。

于 92°C/保持 2 分钟后, 按照一个循环: 92°C (变性)/45 秒、52°C (退火)/45 秒以及 72°C (延伸)/1 分钟那样进行 15 个循环, 然后按照一个循环: 92°C (变性)/45 秒、58°C (退火)/45 秒以及 72°C (延伸)/1 分钟那样进行 25 个循环, 最后于 72°C 下保持 10 分钟。

反应结束后, PCR 扩增产物用精制用柱(QIAGEN QIAquick PCR Purification Kit)进行精制。精制后溶液量调整到 50 μ L。取得到的精制后的 PCR 扩增产物溶液一部分, 按照常规方法进行电泳, 确认有相当于目的 760bp 的带出现。图 3 示出了电泳图。将由上述引物组合①~③得到的 PCR 产物分别作为 PCR 产物①~③。

(3) 吸收测定

对实施例 5 (1) 合成的引物以及 (2) 中合成的 PCR 扩增产物的吸收进行测定。标记引物浓度调整到 0.6 μ M, 根据标记的荧光物质 (Cy3 或 Cy5), 于下述波长下对吸收强度进行测定。另外, 对 PCR 产物进行两个波长吸收强度的测定。

表 19

引物名称	吸收波长	吸收强度
Cy3 标记 F1	564nm	0.108
Cy3 标记 F2	564nm	0.103
Cy3 标记 F3	564nm	0.110
Cy5 标记 R1	663nm	0.147

表 20

PCR 扩增产物	波长	吸收强度
PCR 扩增产物①	564nm (来自 Cy3 标记 F1)	0.0112
	663nm (来自 Cy5 标记 R1)	0.0343
PCR 扩增产物②	564nm (来自 Cy3 标记 F2)	0.0342
	663nm (来自 Cy5 标记 R1)	0.0515
PCR 扩增产物③	564nm (来自 Cy3 标记 F3)	0.0609
	663nm (来自 Cy5 标记 R1)	0.0763

然后，由测定的吸收强度算出由于 PCR 扩增反应产生的整合收率。通过算出整合收率可知供给 PCR 反应的引物中，百分比为多少引起延伸反应，产生 PCR 产物。

表 21

PCR 扩增产物	波长	整合率
PCR 扩增产物①	564nm (来自 Cy3 标记 F1)	10.4%
	663nm (来自 Cy5 标记 R1)	23.3%
PCR 扩增产物②	564nm (来自 Cy3 标记 F2)	33.2%
	663nm (来自 Cy5 标记 R1)	35.0%
PCR 扩增产物③	564nm (来自 Cy3 标记 F3)	55.4%
	663nm (来自 Cy5 标记 R1)	51.9%

就 Cy3 标记 F2 和 Cy5 标记 R1 的 T_m 值几乎相等的 PCR 产物②来说，整合收率没有大的差别，可知对应的两条链可均等地合成。另外，就①来说，由于 Cy3 标记 F1 的 T_m 值低，所以优先合成 Cy5 标记 R1 的延伸链，与 Cy3 标记 F1 的整合收率比较，Cy5 标记 R1 的整合收率升高很多。而就③来说，由于 Cy3 标记 F3 的 T_m 值比 Cy5 标记 R1 的 T_m 值更高，所以优先合成 Cy3 标记 F3 的延伸链，整合收率也变高。

<实施例 6>有无扩增工序的比较

(1) 靶单链核酸的制作

使用实施例 5 (1) 合成的 4 种引物以及 Takara 公司生产的载体 pUC118 EcoRI/BAP、Takara 公司生产的 PCR 试剂盒 Premix Taq (Takara EX Taq Version), 进行 PCR 反应。引物的组合与实施例 5 的一样。

Premix Taq (Takara EX Taq Version)	25 μ l
模板 DNA (Takara 公司的 pUC118 稀释物)	1 μ l (2ng)
Cy3 标记正向引物 (F1、F2 或 F3)	3 μ l
Cy5 标记反向引物 (R1)	3 μ l
<u>H₂O</u>	<u>18μl</u>
合计	50 μ l

上述组成的反应液按照以下的程序, 使用市售的热循环仪, 进行扩增反应。

于 92 $^{\circ}$ C/保持 15 分钟后, 按照一个循环: 92 $^{\circ}$ C (变性)/45 秒、57 $^{\circ}$ C (退火)/45 秒以及 72 $^{\circ}$ C (延伸)/1 分钟那样进行 40 个循环, 最后于 72 $^{\circ}$ C 下保持 10 分钟。

反应结束后, 用精制用柱 (QIAGEN QIAquick PCR Purification Kit) 进行精制。精制后溶液量调整到 50 μ L。取得到的精制后的 PCR 扩增产物溶液一部分, 与实施例 5 同样按照常规方法进行电泳, 确认有相当于目的 760bp 的带出现 (没有图示)。

(3) 吸收测定

对 (1) 合成的 PCR 产物的吸收进行测定。标记引物使用实施例 5 (1) 制作的引物。PCR 产物如实施例 5 那样测定对应于各个标记试剂的 2 个波长的吸收强度。

表 22

引物名称	波长	吸收强度
Cy3 标记 F1	564nm	0.108
Cy3 标记 F2	564nm	0.103
Cy3 标记 F3	564nm	0.110
Cy5 标记 R1	663nm	0.147

表 23

PCR 产物名称	波长	整合率
PCR 扩增产物①	564nm (来自 Cy3 标记 F1)	0.0066
	663nm (来自 Cy5 标记 R1)	0.0144
PCR 扩增产物②	564nm (来自 Cy3 标记 F2)	0.015
	663nm (来自 Cy5 标记 R1)	0.0219
PCR 扩增产物③	564nm (来自 Cy3 标记 F3)	0.0246
	663nm (来自 Cy5 标记 R1)	0.0304

然后,由测定的吸收强度算出由于 PCR 反应产生的整合收率。通过算出整合收率可知供给 PCR 反应的引物中,百分比为多少引起延伸反应,生产 PCR 产物。

表 24

PCR 产物名称	波长	整合率
PCR 扩增产物①	564nm (来自 Cy3 标记 F1)	6.1%
	663nm (来自 Cy5 标记 R1)	9.8%
PCR 扩增产物②	564nm (来自 Cy3 标记 F2)	14.6%
	663nm (来自 Cy5 标记 R1)	14.9%
PCR 扩增产物③	564nm (来自 Cy3 标记 F3)	22.4%
	663nm (来自 Cy5 标记 R1)	20.7%

来自各个引物的产量比 (F1/R1、F2/R2、F3/R1) 虽然与实施例 5 没有大的差别, 但实施例 5 各产物合成量都增加。通过与实施例 5 比较, 确认在模板 DNA 量少时, 在低 T_m 引物的 T_m 以下实施扩增工序的有效性。

<实施例 7>于 DNA 芯片的杂交

使用实施例 2(1)制作的 DNA 芯片和实施例 5 制作的 PCR 产物, 如实施例 2(2)那样进行检测反应。

另外, 杂交溶液的调整, 杂交条件按照实施例 2-(2)进行。

(3) 荧光测定

对杂交反应结束后的 DNA 芯片用 DNA 微阵列用荧光检测装置 (Axon 公司生产、GenePix 4000B) 进行荧光测定 (光电倍增电压: 400V、波长 532nm)。测定结果如下所示。另外, 将来自相当于背景上没有点的部分的荧光强度减去的值, 进行 2 次测定后其平均值作为测定结果。

表 25

PCR 产物	荧光强度
PCR 产物①	5120
PCR 产物②	2770
PCR 产物③	2580

由该结果可以判明与来自正向链和反向链均等合成的 PCR 扩增产物②相比, 可知由反向链优先合成的 PCR 扩增产物①在 DNA 芯片上更有效地进行杂交。因此可知本发明的核酸扩增方法可以更有效地进行所期望的 PCR 延伸链的合成, 适合应用于供给 DNA 芯片的检体

制备等。

产业上利用的可能性

本发明利用 PCR 扩增法,可应用于提高所期望的单链核酸的含有比率的检体制备,特别是通过利用提高所期望的单链核酸的含有比率的效果,通过杂交反应,最适用于对具有特定核酸序列的核酸分子的检测。

序列表

<110> 佳能株式会社

<120> 核酸的 PCR 扩增方法、PCR 引物组、PCR 扩增产物、以及利用该扩增方法的检测方法

<130>

<140>

<141>

<160> 5

<170> MS-WORD

<210> 1

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的名为 P1 的 DNA 探针

<400> 1

ccttaacgtg agttttcg 18

<210> 2

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的 DNA 用作名为 F1 的正向引物

<400> 2

ccttaacgtg agttttcg 18

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的 DNA 用作名为 F2 的正向引物

<400> 3

cccttaacgt gagtttcgt 20

<210> 4

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的 DNA 用作名为 F3 的正向引物

<400> 4

atccctaac gtgagtttc gttc 24

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的 DNA 用作名为 R1 的反向引物

<400> 5

gcggaatac gggtatccac 20

图1

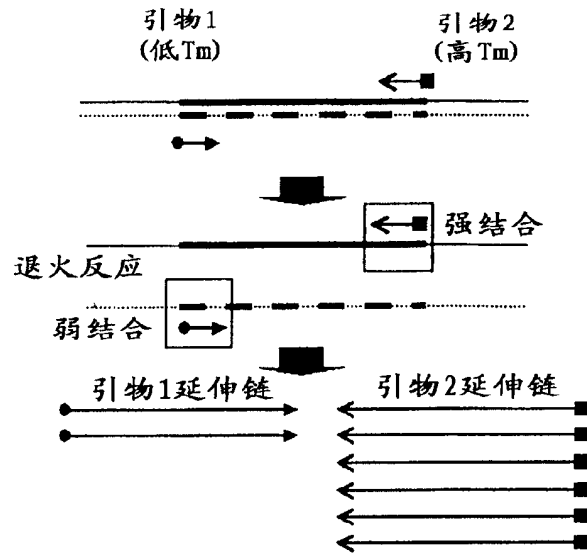


图2

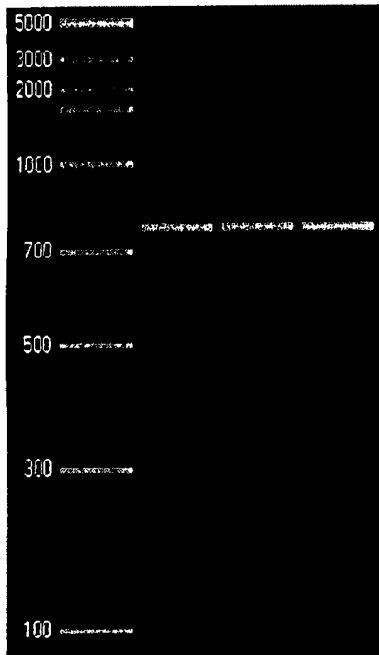


图 3

