[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
C12N 15/00 (2006.01)
C12N 9/99 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)
G01N 33/566 (2006.01)

[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 03802063.7

[45] 授权公告日 2008 年 10 月 29 日

[11] 授权公告号 CN 100429307C

[22] 申请日 2003.1.8 [21] 申请号 03802063.7

[30] 优先权

[32] 2002. 1. 9 [33] JP [31] 2046/2002

[32] 2002.11.13 [33] JP [31] 329958/2002

[86] 国际申请 PCT/JP2003/000060 2003.1.8

[87] 国际公布 WO2003/060116 日 2003.7.24

[85] 进入国家阶段日期 2004.7.9

[73] 专利权人 希森美康株式会社

地址 日本兵库县

[72] 发明人 多田幸代 吉田智一 正见圭一郎
西田昌弘 中林一树 山形浩一

[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

[56] 参考文献

WO9932654A 1999.7.1

CN1151437A 1997.6.11

审查员 王亦然

权利要求书 2 页 说明书 32 页 附图 4 页

[54] 发明名称

核酸检测方法及其系统

[57] 摘要

为了在利用核酸扩增方法进行核酸的检测时，使用直接核酸扩增方法，使测定花费的时间缩短，使基因等的检查系统综合有效，在对采集的生物样品的处理中，经过对采集的生物样品均一化工序或在该工序中导入抑制核酸分解活性的手段，不从生物样品中进行核酸成分的分离纯化。 抑制该核酸的分解活性的手段的导入是在酸性 pH 下、具体来说是在 pH2.5 ~ pH5 下进行的，通过使用与核酸扩增反应的反应阻碍物和/或核酸成分进行相互作用的盐进行处理，不进行核酸成分的分离纯化直接进行核酸扩增。

1. 直接核酸扩增法，包括将可以含有核酸成分的生物样品和酸性 pH 的缓冲液混合的工序、将得到的混合液均一化的工序、和实施不从所得混合液分离核酸成分而对核酸成分中的靶核酸进行扩增的核酸扩增法的工序。

2. 权利要求 1 所述的直接核酸扩增法，其中在将可以含有核酸成分的生物样品和酸性 pH 的缓冲液混合的工序中，还混合核酸成分的分解酶抑制剂。

3. 权利要求 1 所述的直接核酸扩增法，在将可以含有核酸成分的生物样品和酸性 pH 的缓冲液混合的工序中，还混合与核酸扩增反应的反应阻碍物发生相互作用的盐。

4. 权利要求 1 所述的直接核酸扩增法，其中酸性 pH 为 pH2.5～5.0。

5. 权利要求 2 所述的直接核酸扩增法，其中核酸成分的分解酶抑制剂是 RNase 抑制剂。

6. 权利要求 3 所述的直接核酸扩增法，其中与核酸扩增反应的反应阻碍物进行相互作用的盐是离液盐。

7. 权利要求 3 所述的直接核酸扩增法，其中与核酸扩增反应的反应阻碍物进行相互作用的盐是三卤醋酸的碱金属盐。

8. 权利要求 1 所述的直接核酸扩增法，其中可以含有核酸成分的生物样品是淋巴节。

9. 权利要求 1 所述的直接核酸扩增法，其中可以含有核酸成分的生物样品是癌或肿瘤标志。

10. 权利要求 9 所述的直接核酸扩增法，其中癌或肿瘤标志是细胞角蛋白 18、细胞角蛋白 19、细胞角蛋白 20 或 CEA。

11. 权利要求 1 所述的直接核酸扩增法，其中靶核酸的序列是来自病毒或微生物的核酸序列。

12. 权利要求 1 所述的直接核酸扩增法，其中对核酸成分中的靶

核酸进行扩增的核酸扩增法中，核酸扩增反应液中含有 RNase 抑制剂。

13. 权利要求 1 所述的直接核酸扩增法，是 LAMP 法、RT-LAMP 法、PCR 法或 RT-PCR 法中的任一种。

14. 靶核酸序列检测方法，包括实施权利要求 1 所述的直接核酸扩增法的工序和检测所得扩增产物的工序。

核酸检测方法及其系统

技术领域

本发明涉及在利用核酸扩增手段，进行肿瘤或癌的诊断、病毒、细菌等感染、以及各种基因疾病的检测领域中，含有核酸的生物样品的处理方法，不用从生物样品中提取核酸成分，可直接简便而且迅速地对基因进行检测的核酸扩增方法。

背景技术

随着近年来基因工程以及分子生物学等领域的进步，对于传染病和基因疾病等疾病可以在 DNA 或 RNA 水平进行诊断了。特别是利用聚合酶链式反应法（PCR 法，Science, 230:1350-1354,1985）或 NASBA 法（Nucleic Acid Sequence Based Amplification 法，Nature, 350,91-92,1991、日本专利第 2648802 号公报以及日本专利第 2650159 号公报记载）以及 LAMP 法（Loop mediated isothermal amplification of DNA 扩增法、特开 2001-242169 号公报）等核酸扩增方法，作为检测非常困难的生物检体中极微量的核酸的检测成为可能，基因解析也一下子变得容易了。

PCR 法是通过使 DNA 链解离成单链，并使夹住 DNA 链中特定区域的引物结合单链，利用 DNA 聚合酶反复进行 DNA 合成反应，将目的 DNA 片段扩增数十万倍的方法。PCR 法是 Mullis 等人的发明，在特开昭 61-274697 号公报中报道了。PCR 法可用作各种样品中核酸的高灵敏度分析法，特别是可用作来自动物体液的样品中核酸的分析法。因此、PCR 法可用于传染病和遗传病以及癌的诊断等。另外，PCR 法也是适用于移植或亲子鉴定时的 DNA 类型的检查方法。这些场合下，往往选择末梢血液作为检查对象。

PCR 法一个缺点在于色素、蛋白质、糖类或未知杂质阻碍反应。

就是说，人们都知道以代表性的耐热性 DNA 聚合酶－来自水生栖热菌（Thermus aquaticus）的 TaqDNA 聚合酶为首的很多 DNA 聚合酶，即使是微量的来自体液的杂质混在 PCR 反应液中也会强烈地阻碍 PCR。

RT-PCR 法是提取诸如肿瘤的 RNA，以寡(dT)或随机六聚体作为引物，通过逆转录酶 (RT)合成 cDNA，通过 PCR 法扩增其一部分进行检测的方法。利用该方法对成纤维细胞瘤进行诊断的例子已有报道（北海道医学杂志、p.135- 141, Vol. 66(2), 1991）。RT-PCR 法由于使用易分解的 mRNA 作为对象，所以需要在检体采集后进行迅速处理。另外，由于是极其灵敏的检测方法，特别要注意防止与其它检体的污染。

LAMP 法是当进行链置换反应时，利用含有可在扩增产物的末端形成发卡结构的特殊引物 2 组以上引物的基因扩增法。扩增产物是由许多反复结构构成的，反复结构的单元是由构成夹在引物之间的被扩增领域的 2 条核酸的碱基序列成反向的同一链内的互补区域构成。LAMP 法的扩增产物可以通过众所周知的双链 DNA 检测法进行检测，利用其独特构造的检测方法等也有报道（特开 2001-242169 号公报、WO00/28082 号国际公开公报）。

另外，作为同样的基因扩增法的 TMA 法、NASBA 法、3SR 法，其特征是在两条引物中一条使用含有 T7 启动子序列的引物。这样一来，使这些引物与靶 DNA 或 RNA 杂交，进行逆转录酶反应(以 RNA 或 DNA 作为模板，合成 DNA)，合成含有 T7 启动子的双链 DNA。当向该反应系添加 T7 聚合酶时，T7 启动子被活化，其下游的基因进行表达，合成大量的扩增产物 RNA。在 TMA 法、NASBA 法、3SR 法中，以上那样的扩增循环在一定温度下进行。

利用核酸扩增手段的核酸检测系统一般由对采集的生物样品进行处理的工序、提取核酸的工序、分注测定试剂的工序、核酸扩增工序以及扩增产物的判定工序构成的。在利用 PCR 法等进行核酸扩增之前，需要提取核酸的前处理工序。作为该提取方法，一直使用通过酶、

表面活性剂、离液（chaotropic）剂等分解基因包涵体，然后利用酚法（Biochimica et Biophysica Acta, 72:619-629,1963）、碱法（Nucleic Acid Research, 7: 1513 - 1523, 1979）、或酚-氯仿等从基因包涵体的分解物中提取核酸的方法。

最近，在提取核酸的过程中使用离子交换树脂、玻璃滤器、玻璃珠或具有蛋白质凝集作用的试剂等。

另外，作为在核酸的提取中使用的结合核酸用载体的体系，报道了使用玻璃粒子和碘化钠的方法（Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76-2: 615 -619, 1979）、使用羟磷灰石的方法（特开昭 63-263093 号公报）等。这些方法虽然不使用那么多有害的有机溶剂等，但由于在相关的工序中包括很多离心分离操作，存在着一次处理许多样品困难，分离核酸花费时间长等问题。

因此，以往的核酸分离方法要使用有机溶剂或碱等危险试剂，需要离心分离操作，存在着处理多个检体困难等难点，在要对多个检体进行再现性好的处理，使人力减少的自动机械化中还存在很大的问题。

作为以提取核酸的自动机械化为目标的方法有使用核酸结合性硅粒子和离液离子的方法（非专利文献 1、专利文献 1）。该方法是将核酸结合性硅粒子和具有使样品中核酸游离的能力的离液离子与样品混合，使样品中核酸结合于核酸结合性硅粒子，将固相与液相分离开，除去样品中杂质后，将结合于核酸结合性硅粒子的核酸洗脱下来的方法。

作为核酸扩增阻碍物质的除去方法，报道了对含有核酸的生物材料进行酸处理的方法（专利文献 2）。然而，虽然有报道在从生物材料检体提取核酸的任意阶段可以对该检体进行酸处理，但由于对于样品中核酸成分不进行分离纯化的记载还没有，所以迅速地实施核酸扩增方法依然困难。

作为减少核酸扩增反应的阻碍的方法，报道了为了使核酸扩增阻碍物与阴离子性固相结合，使样品与阴离子性固相接触的方法（专利文献 3）。但也是由于对于样品中核酸成分不进行分离纯化的记载还没

有，所以迅速地实施核酸扩增方法依然困难。

肿瘤或癌的诊断、病毒、细菌等的感染、以及各种基因疾病的检测领域中，像以上说明的那样的核酸扩增方法已经逐渐实用化（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）。

然而，在利用核酸扩增手段的核酸检测中，测定中花费的时间、灵敏度等方面还遗留许多应当改进的地方。

（非专利文献 1）J. Clinical Microbiology, 28-3:p.495-503,1990 年

（专利文献 1）专利第 2680462 号公报

（专利文献 2）国际公开 WO01/00813 号公报

（专利文献 3）特开平 09-173065 号公报

发明的内容

本发明的课题在于在利用核酸扩增方法进行核酸的检测时，要使测定需要的时间缩短，使基因等的检查系统综合的有效率。

本发明人等为了解决上述课题反复潜心研究，结果发现如果改善生物样品的前处理工序，可以缩短检查系统整体时间，提高测定灵敏度，从而完成本发明。

即本发明由以下内容组成。

1. 以导入抑制核酸分解活性的手段，不从生物样品分离纯化核酸成分而对核酸进行扩增为特征的直接核酸扩增法，

2. 上述 1 所述核酸扩增方法，其中抑制核酸分解活性的手段是抑制 RNA 分解活性的手段，

3. 上述 1 或 2 所述核酸扩增方法，其中抑制核酸分解活性的手段的导入是在酸性 pH 下进行的，

4. 上述 3 所述核酸扩增方法，其中酸性 pH 为 pH2.5～pH5，

5. 上述 1～4 中任一项所述核酸扩增方法，是在对采集的生物样品经过均一化工序后，不进行核酸成分的分离纯化而进行核酸扩增的，

6. 以使用与核酸扩增反应的反应阻碍物和/或核酸成分相互作用的盐，对生物样品进行处理，不进行核酸成分分离纯化而对核酸进行

扩增为特征的直接核酸扩增法，

7. 上述 6 所述核酸扩增方法，其中反应阻碍物和/或核酸成分与盐的相互作用是通过离子键和/或疏水作用进行的，

8. 上述 6 或 7 所述核酸扩增方法，其中盐是离液盐，

9. 上述 6 或 7 所述核酸扩增方法，其中盐是三卤醋酸的碱金属盐，

10. 上述 8 所述核酸扩增方法，其中盐的种类至少包括 NaCl、KCl、NaI、KI、TMACl（氯化四甲基铵）、TEACl（氯化四乙基铵）、KSCN、CsSCN、CsCl 中的一种，

11. 上述 9 所述的核酸扩增方法，其中盐的种类包括 CF_3COOCs（三氟醋酸铯），

12. 上述 6～11 中任一项所述核酸扩增方法，其中盐浓度为 1mM～2000mM，

13. 上述 6～12 中任一项所述核酸扩增方法，是导入抑制核酸分解活性的手段，然后使用与核酸扩增反应的反应阻碍物进行相互作用的盐对生物样品进行处理的，

14. 上述 13 所述核酸扩增方法，其中抑制核酸分解活性的手段是抑制 RNA 分解活性的手段，

15. 上述 12～14 中任一项所述核酸扩增方法，其中抑制核酸分解活性的手段的导入是在酸性 pH 下进行的，

16. 上述 15 所述核酸扩增方法，其中酸性 pH 为 pH2.5～pH5，

17. 上述 6～16 中任一项所述核酸扩增方法，是在对采集的生物样品经过均一化后工序后，不进行核酸成分的分离纯化而进行核酸扩增的，

18. 上述 6～17 中任一项所述核酸扩增方法，是将使用与核酸扩增反应的反应阻碍物和/或核酸成分相互作用的盐进行处理后的生物样品再用阴离子性固体进行处理的，

19. 上述 6～18 中任一项所述核酸扩增方法，是使使用与核酸扩增反应的反应阻碍物和/或核酸成分相互作用的盐进行处理后的生物样品在有核酸成分的分解酶抑制剂共存下扩增的，

20. 上述 19 所述核酸扩增方法，其中核酸成分的分解酶抑制剂是 RNase 抑制剂，

21. 上述 1～20 中任一项所述核酸扩增方法是 LAMP 法、RT-LAMP 法、PCR 法或 RT-PCR 法中的任一种，

22. 上述 1～20 中任一项所述核酸扩增方法中使用的生物样品的处理方法，

23. 上述 1～20 中任一项所述核酸扩增方法中使用的核酸检测用试剂，

24. 使用上述 1～20 中任一项所述核酸扩增方法的核酸检测系统，

25. 使用上述 24 所述核酸检测系统的核酸检查装置，

26. 使用上述 24 所述核酸检测系统的癌转移的检查方法，

27. 上述 24 所述核酸检测系统中使用的核酸检查试剂盒，

28. 具有使核酸成分保持在稳定状态的 pH 的生物样品处理溶液，

29. 上述 28 所述生物样品处理溶液，其中 pH 为 2.5-5，

30. 上述 28 或 29 所述生物样品处理溶液，还包含与核酸扩增反应的反应阻碍物和/或核酸成分相互作用的盐。

附图的简单说明

图 1 是表示提取的 RNA 的稳定性的说明图（实施例 1）。

图 2 是表示对于用氯化钾-HCl(pH3.0) + 0.1%Nonidet P-40 缓冲液制备的检体利用 RT-LAMP 法进行 CK19mRNA 的基因产物扩增时间过程的说明图（实施例 3）。

图 3 是表示对于用甘氨酸-HCl(pH2.2)缓冲液制备的检体利用 RT-LAMP 法进行的 CK19mRNA 的基因产物扩增时间过程的说明图（实施例 3）。

图 4 是表示对有无三氟醋酸铯添加引起的 CK19mRNA 的基因产物扩增开始时间变化进行比较的图（实施例 4）。

图 5 和图 6 是对有无 RNase 抑制剂添加引起的 β-肌动蛋白 mRNA 的基因产物扩增进行比较的图（实施例 5）。

图 7 是对由于缓冲液 pH 不同引起的 CK19mRNA 的基因产物的扩增开始循环数变化进行比较的图（实施例 7）。

实施发明的最佳方式

以下就本发明的核酸扩增方法、生物样品的处理方法、核酸检测用试剂等进行说明。

本发明中所谓的直接核酸扩增方法指的是用匀浆机等将从作为被检测样品的由生物体采集的生物样品均一化后，可使该生物样品中含有的核酸扩增的核酸扩增方法，不从均一生物样品提取目的核酸成分，而是可以直接使核酸扩增的核酸扩增方法。

本发明中所谓的生物样品指的是用于目的核酸扩增的由生物体得到的样品，具体来说包括从生物体采集的组织、全血、血清、血浆、尿、唾液、体液、分泌物等来自人或动物的生物材料，以及来自植物、微生物等动物以外的生物材料。

（生物样品的处理）

所谓导入抑制核酸分解活性的手段指的是在对生物样品进行处理时导入抑制生物样品中所含的使核酸分解的原因物质，例如抑制分解酶活性的物质或条件等。这里所说的核酸指的是 DNA 或 RNA，例如用于确认蛋白质表达的 RNA、特别是 mRNA 特别适合。RNA 容易被生物成分中所含的 RNA 分解酶分解，特别不稳定。本发明中所谓抑制核酸分解活性的手段具体来说指的是，例如抑制 DNA 分解酶或 RNA 分解酶活性的手段。在这种场合下，一般来说可以考虑添加核酸分解酶抑制剂等方法，在本发明中只要是能够抑制核酸分解活性的手段，可以使用任意手段。例如、作为抑制核酸分解酶活性的手段可以使用通过酶蛋白质变性抑制酶活性的手段。作为可使酶蛋白质变性的手段，如添加蛋白质变性剂、加热处理、随着 pH 变化的变性处理等。本发明中，需要使酶蛋白质变性，而且要确保目的核酸成分处于稳定的状态下。

在此，当对目的核酸成分保持在稳定状态下的条件进行研究时，可知由于生物样品处理液的 pH 不同，生物样品中所含的核酸的稳定性也不同。所以处理溶液最好不要处于样品中所含的核酸分解酶等酶活性最高的中性附近，另外酸性过强（pH 过低），核酸成分、特别是 RNA 由于磷酸二酯键因化学分解等会被切成短的片段，所以也不希望在 pH2 以下。本发明的一个特征是发现在中性或低于中性的 pH 条件下进行生物样品的处理，目的核酸稳定的条件。具体来说、通过用在 pH2.5～5、最好是在 pH3～4、最理想是在 pH3 附近的溶液对生物样品进行处理，可以确保目的核酸成分处于稳定的状态下。

所谓酸性 pH 溶液具体来说如含有甘氨酸-HCl、氯化钾-HCl 的溶液。

上述生物样品处理也可以通过添加与核酸扩增反应的反应阻碍物相互作用的盐来进行。所谓核酸扩增反应的反应阻碍，例如在以 mRNA 为模板扩增 DNA 时，由 mRNA 的逆转录活性的抑制、DNA 复制的抑制等。可以认为这样的扩增反应抑制是由例如应为目的的 DNA 或 RNA 等核酸与样品中含有的蛋白质结合等引起的。

如果在酸性 pH 下处理生物样品，由于 RNA 等核酸成分依然带（－）电荷，而蛋白质倾向带（＋）电荷，核酸成分和蛋白质通过离子键或疏水作用进行结合。为了防止这样的核酸成分和蛋白质的结合，在核酸成分结合蛋白质之前，可以向处理液中添加与蛋白质通过离子键或疏水作用结合的物质。可以将这样的物质称之为与反应阻碍物和/或核酸成分相互作用的盐。

作为与反应阻碍物和/或核酸成分相互作用的盐的具体例子，如可以产生离液离子的盐，所谓离液盐以及三卤醋酸的碱金属盐等。所谓离液离子是离子半径大的 1 价阴离子的总称，如果将该离子加到水中，具有使疏水性分子的水溶性增加，疏水作用减弱的作用。就是说，通过这些离子使目的核酸成分与反应阻碍物的离子键或疏水作用减弱，防止目的核酸成分吸附于反应阻碍物，由此可以有效地进行核酸扩增反应。作为离液离子的具体离子，可举出 SCN^-、I^-、ClO_4^-、NO_3^-、Br^-、

Cl^-、$CH_3CO_2^-$、F^-等。作为可产生这样离子的盐，如 NaCl、KCl、LiCl、RbCl、NaI、KI、TMACl、TEACl、KSCN、CsSCN、CsCl 等，其中 NaCl、KCl、NaI、KI、TMACl、TEACl、KSCN、CsSCN、CsCl 最好。上述盐的添加可以在导入上述的抑制核酸分解活性的手段的前后进行，也可以同时进行，同时添加效率好，最优选。

另外，三卤醋酸的碱金属盐也具有与离液盐同样的效果，所以也可以有效地进行核酸扩增反应。作为三卤醋酸的碱金属盐的具体例子，如三氟醋酸钠、三氟醋酸钾、三氟醋酸铯、三氟醋酸锂、三氯醋酸钠、三氯醋酸钾、三氯醋酸铯、三氯醋酸锂、三氯醋酸铷、三氯醋酸钫等，三氟醋酸铯最好。上述盐的添加可以在导入上述的抑制核酸分解活性的手段的前后进行，也可以同时进行，同时添加效率好，最优选。

添加的盐的浓度为 1mM～2000mM、优选是 50mM～500mM，更优选的是 100mM～300mM。

通过用与核酸扩增反应的反应阻碍物相互作用的盐处理的上述生物样品可以用阴离子性固体、即带负电荷的固体进行处理。作为阴离子性固体可以使用阳离子交换树脂、例如羧甲基、磷酸或磺丙基衍生化离子交换基质或其它的任何含有带负电荷表面的固体、例如带负电荷的硅物质。用阳离子交换树脂等阴离子性固体处理生物样品的方法可以通过众所周知的方法进行，具体来说、可以使用柱层析法以及批次法。例如将样品与阴离子性粒子混合、离心、静置、磁分离或通过同样手段将阴离子性粒子与上述反应阻碍物一起从目的核酸成分中分离。

为了进一步提高稳定性效果，可以并用本身是公知的表面活性剂。作为表面活性剂如非离子表面活性剂、阳离子表面活性剂、阴离子表面活性剂、两性表面活性剂等，最好使用非离子表面活性剂。作为非离子表面活性剂如高级醇、烷基酚、乙二醇、多价醇的脂肪酸等的部分酯、高级脂肪酸甘油酯、山梨糖醇的脂肪酸酯、以聚丙二醇作为疏水性基团，两端加成作为亲水性基团的乙二醇的聚合产物等。这些表面活性剂可以单独或 2 种以上并用。

生物样品用匀浆器和/或捣碎机等粉碎，使其均一化后、通过上述的抑制核酸分解活性的手段和/或用与核酸扩增反应的反应阻碍物相互作用的盐进行处理、和/或用阴离子性固体处理、可以制备测定样品。这样得到的测定样品可以直接用于本发明的测定方法，这一点是表示本发明直接核酸扩增方法的主要特征点。均一化的生物样品为了除去细胞破碎物，根据需要，也可以实施过滤、离心分离等处理。

（核酸的扩增步骤）

本发明的核酸扩增法可以适用众所周知的的方法，没有特别限定。例如、可适用 PCR 法、RT-PCR 法、LAMP 法、RT-LAMP 法、TMA(Transcription Mediated Amplification)法(特表平 4-500759 号公报)、NASBA 法、3SR 法、SDA(Strand Displacement Amplification)法、ICAN(Isothermal and Chimeric primer - initiated Amplification of Nucleic acids)法等核酸扩增法以及作为 RCA(Rolling Circle Amplification)法、INVADER 法、CPT (Cycling Probe Technology)法、PALSAR 法等核酸扩增法的一种的信号放大法。优选 PCR 法、RT-PCR 法、LAMP 法、RT-LAMP 法、更优选是在扩增 RNA 的 RT-PCR 法、RT-LAMP 法中特别有效。

（扩增产物的检测）

通常，反应结束后的扩增产物可以利用本身公知的方法进行检测，没有特别限定。例如、通过琼脂糖凝胶电泳法、通过使用荧光标记的探针进行检测的实时检测法、通过 DNA 合成时副产物的浊度进行检测等，根据需要，可通过限制酶的酶切图形进行确认，以及通过直接测序解析确定碱基序列的方法、也可以选择其它的很多方法。另外，当非特异性的扩增带多，特异带的判别困难时，可以通过使用目的扩增域内的探针的 Southern 印迹法等对特异带进行确认。本发明也适用于这些众所周知的方法。

（对象核酸）

可适用于上述手段的目的核酸没有特别限定，可广泛适用于通过使微量核酸成分扩增，在对疾病有无进行判断的临床检查。例如、可适用于癌或肿瘤相关标志的表达的确认、与基因有关的疾病、有无病毒或微生物感染的判断等。

作为癌或肿瘤相关标志、例如在癌患者癌组织以及发生了癌的脏器的正常部位同等出现，只要在诊断对象组织没有癌转移，就不能认定其表达的标志、或在癌组织中确认强烈表达的标志等。作为在癌患者癌组织以及癌发生的脏器的正常部位同等出现的标志的例子，如细胞角蛋白类、具体来说，如细胞角蛋白 18、细胞角蛋白 19、细胞角蛋白 20 等。而作为在癌组织中确认强烈表达的标志的例子，如 CEA 等肿瘤标志。通过确认来自诊断对象组织中的各蛋白质的 mRNA 可以确认癌细胞的转移。

为了确认来自上述特定患者的确认癌组织的 mRNA，有时将癌组织、癌发生的脏器的正常部位或诊断对象组织的任一个中都同等表达的蛋白质的 mRNA 量作为指标。作为这样的例子，具体来说可举出 β－肌动蛋白、GAPDH 的 mRNA 等。

通过运用本发明方法，可以迅速地对癌的淋巴节转移或腹腔内转移等进行诊断。例如、乳癌等，为了提高 QOL(生活质量：Quality of life)，希望手术中的淋巴节清扫范围尽可能小。而对于食道癌，由于淋巴节转移部位不同，需要选择开腹、开胸、颈部切开手术。对于前列腺癌，如果发生淋巴节转移，则应决定是否中止切除手术、进行激素疗法等决定手术继续进行或者中止的意向。而对于胃癌，由于有无向淋巴节癌转移，清扫范围不同，手术方式有很大变动，术后治疗方针的指针，例如抗癌剂的给药或放射线疗法成为选择的指针。这样场合下，如果可以利用术中采集的生物体组织对癌转移进行迅速诊断，在短时间手术中也可以决定淋巴节清扫范围、进行手术方式的变更、辅助疗法的选择等，可以使患者受到最适的治疗。本发明的检查系统适合用作癌转移的术中快速诊断方法。

可适用于作为与基因有关的疾病，遗传性疾病的检查、例如年龄老化发病的遗传性疾病的发病危险性的予测，具体来说，可以适用于对青光眼、家族性大肠癌、高血压、糖尿病等发病危险性进行判断的场合。另外，有无病毒或微生物感染的判断可以对生物体组织、例如血液等有无含有感染原因物质的核酸序列进行迅速检查。

（试剂、检查试剂盒以及检查系统）

本发明可以提供用于进行直接核酸扩增方法需要的各种试剂类、具体来说可以提供生物样品处理液、逆转录酶、互补链合成的底物dNTP、进行链置换型的互补链合成的DNA聚合酶、作为本发明使用的引物需要的各种寡核苷酸、赋予酶反应最适条件的缓冲液、以及根据需要用于反应产物的检测所必需的试剂类。另外，将这些试剂中的生物样品处理液以及其它的至少一种试剂组合后可作为试剂盒提供。

本发明除了涉及到直接核酸扩增方法之外，还涉及到生物样品处理方法、包括处理方法在内的核酸检测用试剂、试剂盒以及核酸检测系统整体。另外还涉及到适用于本系统的装置、癌转移的检查方法。具体来说、例如在癌患者的手术中从生物体采集的组织也可运用本系统，在手术期间可以对向其它组织的癌转移进行确认。

（实施例）

以下、通过实施例对本发明进行更具体说明，但本发明并不限定于这些实施例。

（实施例1）

就稳定保存RNA的条件进行研究。

1）材料和方法

(1)样品的制备

取出小鼠的淋巴节，用匀浆器和捣碎机，将组织粉碎，将均一化的组织于4℃下进行离心分离（12000rpm×5分），取上清。使用市售

的抽提用试剂（TRIZOL: Gibco BRL 公司）从上清中提取 RNA。

就提取的 RNA 513μg/ml 水溶液通过注入以下各种缓冲液研究保存稳定性。向各种缓冲液 7μl 中加入上述小鼠 RNA 溶液 2μl，于室温下静置 10 分钟。然后加电泳用缓冲液 1μl，通过琼脂糖凝胶电泳研究 RNA 的稳定性。

(2)缓冲液

①200mM 氯化钾-HCl(pH1.0) + 0.1％Nonidet P-40（非离子性表面活性剂:Calbiochem 公司）

②200mM 氯化钾-HCl(pH2.2) + 0.1％Nonidet P-40

③200mM 氯化钾-HCl(pH3.0) + 0.1％Nonidet P-40

④200mM 甘氨酸-HCl(pH3.0) + 0.1％Nonidet P-40

⑤醋酸缓冲液（pH5.2）+ 0.1％Nonidet P-40

⑥50mMTris-HCl（pH7.4）+ 0.1％Nonidet P-40

⑦不加缓冲液时(H_2O)

(3) RNA 的检测（琼脂糖电泳）

琼脂糖凝胶电泳使用 1％琼脂糖、TEA 缓冲液，每一个槽加 RNA 至 1μg、按照通常的手法进行。

2）结果

结果如图 1 所示。在比 pH3.0 高的中性侧缓冲液中，RNA 没有分解，稳定。在比 pH2.2 高的酸性缓冲液中，RNA 分解、但没有看到 RNA 的带。

可知 pH3.0 缓冲液使 RNA 稳定，作为 RNA 样品制备用缓冲液最有效。

（实施例 2）

采集乳癌患者的淋巴节，对人的粗提 RNA 样品和纯化 RNA 样品通过 RT-PCR 法确认细胞角蛋白（CK18 和 CK19）的 mRNA 的有无。

1）材料和方法

(1)样品的制备

将人淋巴节悬浮于 50mM 氯化钾-HCl(pH3.0) + 0.1 % Nonidet P-40 的缓冲液中，用匀浆器和搅拌器将该人淋巴节的组织粉碎，将匀浆的组织于4℃离心分离（12000rpm×5分），取上清，作为粗提RNA样品。另外与实施例1同样，使用市售抽提用试剂（TRIZOL: Gibco BRL公司）从粗提RNA样品中提取RNA，作为精制RNA样品。

(2)使用的引物向或探针的序列

①CK18 反向引物:

5'-GATGGTTTGCATGGAGTTGCT-3'（序列1）

（源于 Genbank 访问码 No.4557887 的 CK18 序列的碱基位置 1215-1195 位）

②CK18 正向引物:

5'-GCCGCCTGCTGGAAGAT-3' （序列2）

（源于 Genbank 访问码 No.4557887 的 CK18 序列的碱基位置 1142-1158 位）

③CK19 反向引物:

5'-TCCAGGGCGCGCAC-3' （序列3）

（源于 Genbank 访问码 No.4504916 的 CK19 序列的碱基位置 305-292 位）

④CK19 正向引物:

5'-AAGCTAACCATGCAGAACCTCAAC-3'（序列4）

（源于 Genbank 访问码 No.4504916 的 CK19 序列的碱基位置 241-264 位）

⑤CK18 的 TaqMan 探针:

5'-CAAGGCATCACCAAGATTAAAGTCCTCGC-3'（序列5）

（源于 Genbank 访问码 No.4557887 的 CK18 序列的碱基位置 1188-1160 位）

⑥CK19 的 TaqMan 探针:

5'-CGCCTGGCCTCCTACCTGGACA-3'（序列6）

（源于 Genbank 访问码 No.4504916 的 CK19 序列的碱基位置

268-289 位）

(3)RT-PCR 法

RT-PCR 使用 Applied Biosystem 公司的 RT-PCR Master 试剂进行。

测定试剂盒: TaqMan One-step RT-PCR Master Mix Reagents (Applied Biosystem 公司生产)

cDNA 合成: 使用 MultiScribe 逆转录酶合成。

①CK18 的扩增

逆转录用引物: 使用序列 1 记载的引物。

PCR 用引物: 使用终浓度为 300nM 的序列 1 和 2 记载的引物。

DNA 聚合酶: 使用 Ampli Taq Gold DNA 聚合酶。

②CK19 的扩增

逆转录用引物: 使用序列 3 记载的引物。

PCR 用引物: 使用终浓度为 300nM 的序列 3 记载的引物以及终浓度为 900nM 的序列 4 记载的引物。

DNA 聚合酶: 使用 Ampli Taq Gold DNA 聚合酶。

③PCR 处理

于 48℃下进行 30 分钟逆转录反应后、于 95℃保持 10 分钟。

然后、进行 95℃: 15 秒、60℃: 1 分钟的 PCR 操作 40 循环。

(4)核酸的检测

通过与目的双链 DNA 特异性杂交的 TaqMan 探针，利用荧光法检测人 CK18 和 CK19mRNA 的扩增产物。TaqMan 探针对于 CK18 是序列 5、对于 CK19 是序列 6 的寡核苷酸、在各个 5'末端使用标记了 FAM、3'末端标记了 TAMRA 的探针。使用 Applied Biosystem 公司生产的 PRISM7700，对反应液中荧光强度的增加进行实时测定。

（表 1）

表 1 RT－PCR 的测定

（精制 RNA 样品和粗提 RNA 样品的测定值）

样品	精制 RNA 样品 拷贝数/ng 总 RNA	粗提 RNA 样品 拷贝数/ng 总 RNA
CK18	2000	300
CK19	9000	1900

2）结果

以上结果表明临床结果（HE 染色组织诊断）与通过 RT-PCR 测定的结果一致，CK18 以及 CK19 的 mRNA 都扩增了。另外即使对于粗制 RNA 样品也确认了来自 mRNA 的 300 和 1900 拷贝的核酸的扩增（表 1）。

由此表明如果作为样品制备用液，使用含有 Nonidet P-40 的 pH3.0 缓冲液，不用提取 RNA 也可通过 RT-PCR 法进行扩增，结果可以缩短 RNA 检测所需要的时间。

（实施例 3）

采集乳癌患者的人淋巴节，就通过 HE 染色临床确认癌转移的检体利用 RT-LAMP 法对作为乳癌标志的 CK19 mRNA 进行了检测。

1）材料和方法

(1)样品的制备

将人淋巴节悬浮于缓冲液中，用匀浆器和搅拌器将组织可溶化。均一化的组织于 4℃下离心分离（12000rpm×5 分），取上清（ライセート）作为粗制 RNA 样品。对于组织悬浮液使用 50mM 氯化钾-HCl (pH3.0) + 0.1 % Nonidet P-40 的缓冲液或 50mM 甘氨酸-HCl (pH2.2)缓冲液。另外与实施例 1 和 2 同样，使用市售抽提用试剂（TRIZOL: Gibco BRL 公司），从粗制 RNA 样品提取 RNA 作为精制 RNA 样品。

(2)利用 RT-LAMP 法进行扩增

CK19 的扩增是通过向含有以下序列: 7～12 所示 6 种引物的以下组成中添加粗制 RNA 溶液或精制 RNA 溶液 2μl，于 65℃下加温 1 小时进行的。

(3)引物

①19-FA-1101:

5'-ttggcccctcagcgtacaagagctggcctacctg-3'（序列 7）

②19-RA-1101:

5'-aggtcagtgtggaggtggcgcatgtcactcaggatc-3'（序列 8）

③19-F3-1101:

5'-acctggagatgcagatcg-3'（序列 9）

④19-R3-1101:

5'-caggcttcagcatccttc-3'（序列 10）

⑤19-LPF-1101:

5'-tgatttcctcctcatggttc-3'（序列 11）

⑥19-LPR-1101:

5'-tccgggcaccgatctc-3'（序列 12）

(4)反应液组成

dNTPs (GIBCO 公司)	0.4 mM
$MgSO_4$	2 mM
二硫苏糖醇	5 mM
甜菜碱 (Sigma 公司)	640 mM
Thermopol 缓冲液(New England BioLabs 公司)	
AMV 逆转录酶 (Promega 公司)	1.25U
Bst DNA 聚合酶 (New England BioLabs)	16U
溴乙锭	0.125 mg/mL
正向内引物（19-FA-1101：序列 7）	40 pmol
反向内引物（19-RA-1101：序列 8）	40 pmol
正向外引物（19-F3-1101：序列 9）	5 pmol
反向外引物（19-R3-1101：序列 10）	5 pmol
正向回环引物(loop primer)（19-LPF-1101：序列 11）	20 pmol
反向回环引物（19-LPR-1101：序列 12）	20 pmol

(5)核酸的检测

通过与双链 DNA 特异结合的溴乙锭，利用荧光法对人 CK19mRNA 的扩增产物进行检测。反应液中荧光强度变化用 Applied Biosystem 公司生产 PRISM7700 进行实时测定。

2）结果

图 2 和图 3 给出了作为制备用缓冲液使用氯化钾-HCl（pH3.0）+ Nonidet P-40 时以及使用甘氨酸-HCl（pH2.2）缓冲液时通过各 RT-LAMP 法进行核酸扩增处理的结果。

使用甘氨酸-HCl(pH2.2)缓冲液时，确认在精制的 RNA 样品中有扩增，而对于粗制 RNA 样品没有看到扩增。另外使用氯化钾-HCl(pH3.0) + Nonidet P-40 缓冲液时确认无论精制 RNA 样品还是粗制 RNA 样品都看到了扩增。

所以作为制备用缓冲液如果使用含有 Nonidet P-40 的 pH3.0 缓冲液，不纯化 RNA 通过 RT-LAMP 法也可确认扩增，结果可以缩短 RNA 检测需要的时间。

（实施例 4）

将淋巴节检体破碎后可溶化时添加盐类，就减少使用粗制 RNA 样品进行扩增反应时杂质对扩增的阻碍的条件进行研究。

1）材料和方法

(1)样品的制备

用捣碎机将小鼠淋巴节于缓冲液中破碎、均一化。另外将培养细胞(KATOIII)于缓冲液中进行可溶化、均一化。将均一化的这些溶液混合、用作粗制 RNA 样品。对于这些样品的均一化使用含有或不含有 100mM 的三氟醋酸铯的含有 1%Nonidet P-40 200mM 甘氨酸-HCl(pH3.0)缓冲液。

(2)通过 RT-LAMP 扩增

CK19mRNA 的扩增利用含有如下序列: 7～10 所示 4 种引物的以下组成于 65℃下加温 1 小时进行。对于各反应液以适当的比率将上述

KATOIII 细胞培养细胞可溶化样品和小鼠淋巴节可溶化样品进行混合，向一种反应液中加入相当于 20 个 KATOIII 细胞的样品，另外，作为杂质量的参数，共存蛋白质量调整到设定的量。

(3)引物

①19-FA-1101:（序列 7）

②19-RA-1101:（序列 8）

③19-F3-1101:（序列 9）

④19-R3-1101:（序列 10）

⑤19-LPF-1101:（序列 11）

⑥19-LPR-1101:（序列 12）

(4)反应液组成

dNTPs (GIBCO 公司)	0.4 mM
$MgSO_4$	2 mM
二硫苏糖醇	5 mM
甜菜碱 (Sigma 公司)	640 mM
Thermopol 缓冲液(New England BioLabs 公司)	
AMV 逆转录酶 (Promega 公司)	1.25U
Bst DNA 聚合酶 (New England BioLabs)	16U
溴乙锭	0.125 mg/mL
正向内引物（19-FA-1101: 序列 7）	40 pmol
反向内引物（19-RA-1101: 序列 8）	40 pmol
正向外引物（19-F3-1101: 序列 9）	5 pmol
反向外引物（19-R3-1101: 序列 10）	5 pmol
正向回环引物（19-LPF-1101: 序列 11）	20 pmol
反向回环引物（19-LPR-1101: 序列 12）	20 pmol

(5)核酸的检测

通过共存于反应体系的溴乙锭的荧光进行检测。用 Applied Biosystem 公司生产 PRISM7700 对反应液中的荧光强度变化进行实时

测定。

2）结果

图 4 给出了作为用于制备粗制 RNA 样品的缓冲液使用含有 100mM 三氟醋酸铯和 1%Nonidet P-40 的 200mM 甘氨酸-HCl(pH3.0)缓冲液时的结果以及使用不含三氟醋酸铯的含有 1%Nonidet P-40 的 200mM 甘氨酸-HCl(pH3.0)缓冲液时的结果。横轴表示一种反应液中含有的杂质蛋白质量，纵轴表示 DNA 扩增开始时间。对于用于制备粗制 RNA 样品的缓冲液中存在 100mM 的三氟醋酸铯时，一种反应液中的杂质蛋白质量即使增加到 8μg 附近，DNA 扩增开始时间也几乎没有变化。与此相反，当没有三氟醋酸铯时，随着杂质蛋白质量增加，DNA 扩增开始时间明显推迟了。这表明核酸扩增反应受到了杂质蛋白质的阻碍。由此表明通过使粗制 RNA 样品制备用缓冲液中含有 100mM 三氟醋酸铯，可以减少杂质蛋白质造成的扩增反应的阻碍，作为结果，可以向一种反应液增加可添加的粗制 RNA 样品溶液，可以提高灵敏度。

（实施例 5）

使用由淋巴节检体制备的粗制 RNA 样品进行扩增反应时，对通过添加 RNase 抑制剂防止 RNase 对目标 mRNA 的分解，意图提高检测灵敏度进行研究。

1）材料和方法

(1)样品的制备

将乳癌患者淋巴节于含有或不含有 100mM 的三氟醋酸铯的含有 1%Nonidet P-40 的 200mM 甘氨酸-HCl(pH3.0)缓冲液中用捣碎机破碎、均一化。将均一化该溶液直接或用均一化使用的缓冲液稀释 5 倍、或 50 倍后用作粗制 RNA 样品。

(2)通过 RT-LAMP 法进行扩增

β-肌动蛋白的扩增通过向含有如下序列 13～18 所示 6 种引物的以下组成中添加上述粗制 RNA 样品 2μl，于 65℃下加温 1 小时进行。

(3)引物

①AFA-4:

5'-tgaaggtagtttcgtggatgcctgaggcactcttccagc-3'（序列：13）

②ARA-4:

5'-tgaagtgtgacgtggacatccagggtacatggtggtgc-3'（序列：14）

③AF3-4:

5'-tggcaatgagcggttcc-3'（序列：15）

④AR3-4:

5'-tccttctgcatcctgtcg-3'（序列：16）

⑤AD-LPF1:

5'-acaggactccatgccc-3'（序列：17）

⑥AD-LPR1:

5'-tgtacgccaacacagtgc-3'（序列：18）

(4)反应液组成

dNTPs (GIBCO 公司)	0.4 mM
$MgSO_4$	2 mM
二硫苏糖醇	5 mM
甜菜碱 (Sigma 公司)	640 mM
Thermopol 缓冲液(New England BioLabs 公司)	
AMV 逆转录酶 (Promega 公司)	1.25U
Bst DNA 聚合酶 (New England BioLabs)	16U
溴乙锭	0.125 mg/mL
正向内引物（AFA-4：序列 13）	40 pmol
反向内引物（ARA-4：序列 14）	40 pmol
正向外引物（AF3-4：序列 15）	5 pmol
反向外引物（AR3-4：序列 16）	5 pmol
正向回环引物（AD-LPF1：序列 17）	20 pmol
反向回环引物（AD-LPR1：序列 18）	20 pmol
RNase 抑制剂	

（STRATAGENE公司、RNase Block Ribonuclease Inhibitor）25U

(5)核酸的检测

通过共存于反应体系的溴乙锭的荧光进行检测。用 Applied Biosystem公司生产 PRISM7700 对反应液中的荧光强度变化进行实时测定。

2）结果

图 5 和 6 给出了扩增反应液中添加和不添加 RNase 抑制剂时的结果。横轴表示反应时间，纵轴表示荧光强度。反应液中含有 RNase 抑制剂时，人淋巴节均一化后制备的粗制 RNA 样品、5 倍稀释的样品、50 倍稀释的样品都没有阻碍，发生了扩增反应。与此相反，反应液中不含有 RNase 抑制剂时，扩增反应受到阻碍，特别是使用没有稀释的粗制 RNA 样品时，几乎没有扩增。由此表明通过向反应液中添加 25U 的 RNase 抑制剂，可以减少粗制 RNA 样品中含有的杂质对扩增反应的阻碍，作为结果，可以向一种反应液增加可添加的粗制 RNA 样品溶液，能够提高灵敏度。

（实施例 6）

在将淋巴节检体破碎、均一化的缓冲液中含有 100mM 三氟醋酸铯，扩增反应液中含有 25U 的 RNase 抑制剂的条件下，实际上使用乳癌患者淋巴节，确认添加上述成分的效果。

1）材料和方法

(1)样品的制备

将乳癌患者淋巴节于含有或不含有 100mM 的三氟醋酸铯的含有 1%Nonidet P-40 的 200mM 甘氨酸-HCl(pH3.0)缓冲液中用捣碎机破碎、均一化。用均一化用的缓冲液将均一化的该溶液稀释 5 倍，用作粗制 RNA 样品，通过 RT-LAMP 进行扩增反应。另外为了测定粗制 RNA 样品中含有的 CK19mRNA 拷贝数，与实施例 1 一样从粗制 RNA 样品用市售抽提用试剂（TRIZOL: Gibco BRL 公司）提取 RNA，作为精制 RNA 样品，进行 RT-PCR。RT-PCR 在与实施例 1 同样的条件

下进行。

(2)通过 RT-LAMP 的扩增

CK19mRNA 的扩增通过含有如下序列：7～12 所示的 6 种引物的以下组成于 65℃下加温 1 小时进行。在三氟醋酸铯共存下使用均一化的粗制 RNA 样品时，向反应液中添加 RNase 抑制剂后进行扩增反应。

(3)引物

①19-FA-1101:（序列 7）

②19-RA-1101:（序列 8）

③19-F3-1101:（序列 9）

④19-R3-1101:（序列 10）

⑤19-LPF-1101:（序列 11）

⑥19-LPR-1101:（序列 12）

(4)反应液组成

dNTPs (GIBCO 公司)	0.4 mM
$MgSO_4$	2 mM
二硫苏糖醇	5 mM
甜菜碱 (Sigma 公司)	640 mM
Thermopol 缓冲液(New England BioLabs 公司)	
AMV 逆转录酶 (Promega 公司)	1.25U
Bst DNA 聚合酶 (New England BioLabs)	16U
溴乙锭	0.125 mg/mL
正向内引物（19-FA-1101：序列 7）	40 pmol
反向内引物（19-RA-1101：序列 8）	40 pmol
正向外引物（19-F3-1101：序列 9）	5 pmol
反向外引物（19-R3-1101：序列 10）	5 pmol
正向回环引物（19-LPF-1101：序列 11）	20 pmol
反向回环引物（19-LPR-1101：序列 12）	20 pmol
RNase 抑制剂	
（STRATAGENE 公司、RNase Block Ribonuclease Inhibitor）25U	

(5)核酸的检测

通过共存于反应体系的溴乙锭的荧光进行检测。用 Applied Biosystem公司生产PRISM7700对反应液中的荧光强度变化进行实时测定。

2）结果

表2给出了扩增反应液中添加和不添加三氟醋酸铯和RNase抑制剂时的结果。表的左半边表示不含有三氟醋酸铯和RNase时的结果。右半边表示使用三氟醋酸铯和 RNase 两者时的结果。没有两者时，4个检体不能通过RT-LAMP检测CK19mRNA，使用两者时，4个检体中的3个检体可以进行CK19mRNA扩增后进行检测。由此可以确认对于实际的人淋巴节检体在破碎可溶化时使三氟醋酸共存，反应液中添加RNase抑制剂可以有效提高检测灵敏度。

(表2)利用 RT－PCR 和 RT－LAMP 进行 CK19mRNA 的测定

样品号	蛋白质 (mg/ml)	CK19mRNA（拷贝数/μg）		样品号	蛋白质 (mg/ml)	CK19mRNA（拷贝数/μg）	
		PCR	LAMP			PCR	LAMP
33 (HE+)	0.76	70	ND	102 (HE+)	0.44	60	ND
41 (HE+)	3.0	380	ND	118 (HE+)	8.2	<400	300
94 (HE+)	6.8	1,880	ND	149 (HE+)	7.9	90	650
126 (HE-/IHC+)	3.8	620	ND	150 (HE-)	5.5	70	<500

（实施例7）

直接用血清检体通过RT-PCR确认三氟醋酸铯的效果。

1）材料及方法

(1)样品的制备

向人血清中加入含有pH8.0的200mM Tris-HCl缓冲液或含100mM 三氟醋酸铯的200mM 甘氨酸-HCl缓冲液(pH3.0)，再添加来自KATOIII细胞的精制RNA样品，用作RNA样品。样品中的蛋白质量调整到0至33μg/μl。另外、CK19 mRNA调整到为总RNA样品中5000拷贝/μl。

(2)使用的引物和探针序列

①CK19 反向引物:

5'-cttggcccctcagcgtact-3' （序列 19）

（源于 Genbank 访问码 No.4504916 的 CK19 序列的碱基位置 685-667 位）

②CK19 正向引物:

5'-cagatcgaaggcctgaagga-3' （序列 20）

（源于 Genbank 访问码 No.4504916 的 CK19 序列的碱基位置 607-626 位）

③CK19 的 TaqMan 探针:

5'-gcctacctgaagaagaaccatgaggaggaa-3' （序列 21）

（源于 Genbank 访问码 No.4504916 的 CK19 序列的碱基位置 634-663 位）

(3)RT-PCR法

RT-PCR 使用 Applied Biosystem 公司的 RT-PCR Master 试剂进行。

测定试剂盒 : TaqMan One-step RT-PCR Master Mix Reagents (Applied Biosystem 公司生产)

cDNA 合成: 使用 MultiScribe 逆转录酶合成。

①CK19 的扩增

逆转录用引物: 使用序列 19 记载的引物。

PCR 用引物: 使用终浓度为 300nM 的序列 19 记载的引物以及终浓度为 900nM 的配列编号 20 记载的引物。

DNA 聚合酶：使用 Ampli Taq Gold DNA 聚合酶。

③PCR 处理

于 48℃下进行 30 分钟逆转录反应后，于 95℃下保持 10 分钟。

然后进行 40 循环的 95℃：15 秒、60℃：1 分钟的 PCR 操作。

(4)核酸的检测

通过与目的双链 DNA 特异性杂交的 TaqMan 探针，利用荧光法检测人 CK19mRNA 的扩增产物。TaqMan 探针对于 CK19 是序列 21 的寡核苷酸、在各个 5'末端使用标记了 FAM、3'末端标记了 TAMRA 的探针。使用 Applied Biosystem 公司生产的 PRISM7700，对反应液中荧光强度的增加进行实时测定。

2）结果

图 7 给出了用含有三氟醋酸铯的缓冲液(pH3)制备含有血清成分的 RNA 样品时的结果、以及用中性缓冲液(pH8)制备时的 RT-PCR 的结果。图中四角曲线表示使用含有三氟醋酸铯的酸性缓冲液(pH3) 时的结果，而菱形曲线表示使用中性缓冲液(pH8)时的结果。纵轴表示 RT-PCR 反应中扩增开始循环数，横轴表示反应液中存在的血清蛋白质量。含有血清蛋白质时，在用中性缓冲液制备的 RNA 样品中发生扩增反应的阻碍，扩增开始循环数增加，但在用含有三氟醋酸铯的酸性缓冲液制备的 RNA 样品中阻碍的程度小，循环数没有怎么增加。由此可以确认用含有三氟醋酸铯的酸性缓冲液(pH3)制备 RNA 样品不仅可以有效地防止利用 RT-LAMP 的扩增中的反应阻碍，而且对于 RT-PCR 反应也是有效的。

工业实用性

就象以上说明的那样，在对核酸进行扩增之后检测 RNA 的方法中，利用本发明的检体制备条件，确认在 RT-PCR 法以及 RT-LAMP 法中，即使是粗制 RNA 样品也可进行测定，使用核酸扩增手段能够缩短测定时间。

序列表

<110> 希森美康株式会社

<120> 核酸检测方法及其系统

<130> GP02-1020/PCT

<160> 21

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 根据 CK18 基因设计的 DNA

<400> 1
gatggtttgc atggagttgc t 21

<210> 2
<211> 17
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 根据 CK18 基因设计的 DNA

<400> 2
gccgcctgct ggaagat 17

<210> 3
<211> 14
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 根据 CK19 基因设计的 DNA

<400> 3
tccagggcgc gcac 14

<210> 4
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 根据 CK19 基因设计的 DNA

<400> 4
aagctaacca tgcagaacct caac 24

<210> 5
<211> 29
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 根据 CK18 基因设计的 DNA

<400> 5
caaggcatca ccaagattaa agtcctcgc 29

<210> 6
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 根据 CK19 基因设计的 DNA

<400> 6
cgcctggcct cctacctgga ca 22

<210> 7
<211> 34
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 根据 CK19 基因设计的 DNA

<400> 7
ttggcccctc agcgtacaag agctggccta cctg 34

<210> 8
<211> 36
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 根据 CK19 基因设计的 DNA

<400> 8
aggtcagtgt ggaggtggcg catgtcactc aggatc 36

<210> 9
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 根据 CK19 基因设计的 DNA

<400> 9
acctggagat gcagatcg 18

<210> 10
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 根据 CK19 基因设计的 DNA

<400> 10
caggcttcag catccttc 18

<210> 11
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 根据 CK19 基因设计的 DNA

<400> 11
tgatttcctc ctcatggttc 20

<210> 12
<211> 16
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 根据 CK19 基因设计的 DNA

<400> 12
tccgggcacc gatctc 16

<210> 13
<211> 39
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 根据 β-肌动蛋白基因设计的 DNA

<400> 13
tgaaggtagt ttcgtggatg cctgaggcac tcttccagc 39

<210> 14
<211> 38
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 根据 β-肌动蛋白基因设计的 DNA

<400> 14
tgaagtgtga cgtggacatc cagggtacat ggtggtgc 38

<210> 15
<211> 17
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 根据β-肌动蛋白基因设计的DNA

<400> 15
tggcaatgag cggttcc 17

<210> 16
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 根据β-肌动蛋白基因设计的DNA

<400> 16
tccttctgca tcctgtcg 18

<210> 17
<211> 16
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 根据β-肌动蛋白基因设计的DNA

<400> 17
acaggactcc atgccc 16

<210> 18
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 根据β-肌动蛋白基因设计的DNA

<400> 18
tgtacgccaa cacagtgc 18

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

<220>
<223> 根据CK19基因设计的DNA

<400> 19
cttggcccct cagcgtact 19

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

<220>
<223> 根据CK19基因设计的DNA

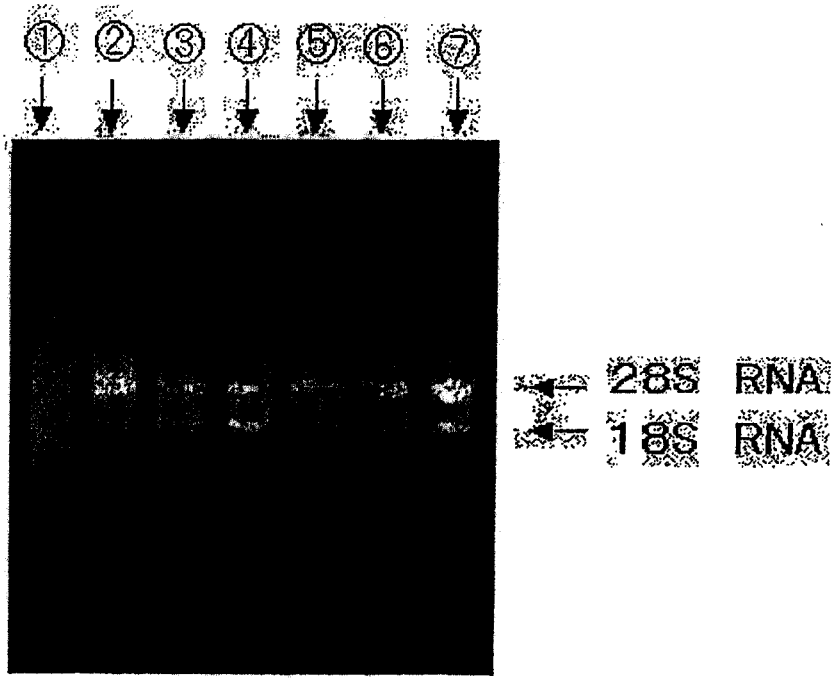
<400> 20
cagatcgaag gcctgaagga 20

<210> 21
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 根据CK19基因设计的DNA

<400> 21
gcctacctga agaagaacca tgaggaggaa 30

图1



①200mM氯化钾-HCl(pH1.0)+0.1%Nonidet P-40
②200mM氯化钾-HCl(pH2.2)+0.1%Nonidet P-40
③200mM氯化钾-HCl(pH3.0)+0.1%Nonidet P-40
④200mM甘氨酸-HCl(pH3.0)+0.1%Nonidet P-40
⑤醋酸缓冲液(pH5.2)+0.1%Nonidet P-40
⑥50mMTris-HCl(pH7.4)+0.1%Nonidet P-40
⑦不加缓冲液时(H_2O)

图2

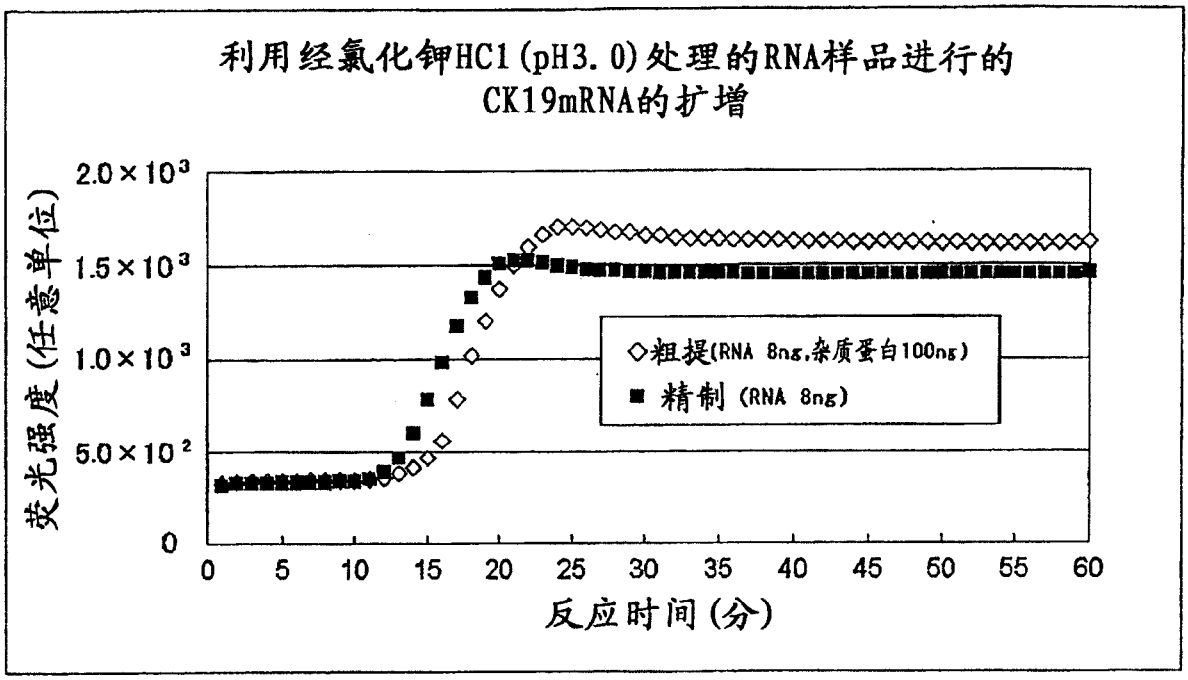

利用经氯化钾HC1(pH3.0)处理的RNA样品进行的
CK19mRNA的扩增
荧光强度(任意单位)
2.0×10³
1.5×10³
1.0×10³
5.0×10²
0
0 5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60
反应时间(分)
◇粗提(RNA 8ng,杂质蛋白100ng)
■ 精制 (RNA 8ng)

图3

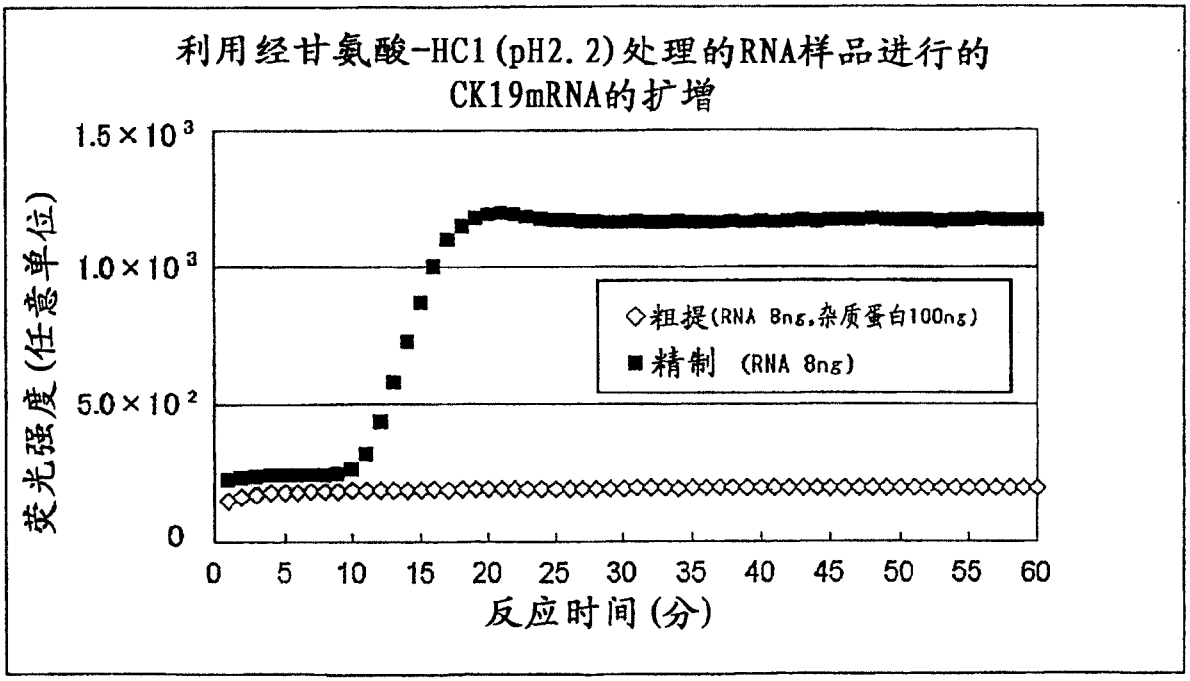

利用经甘氨酸-HC1(pH2.2)处理的RNA样品进行的
CK19mRNA的扩增
荧光强度(任意单位)
1.5×10³
1.0×10³
5.0×10²
0
0 5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60
反应时间(分)
◇粗提(RNA 8ng,杂质蛋白100ng)
■精制 (RNA 8ng)

图4

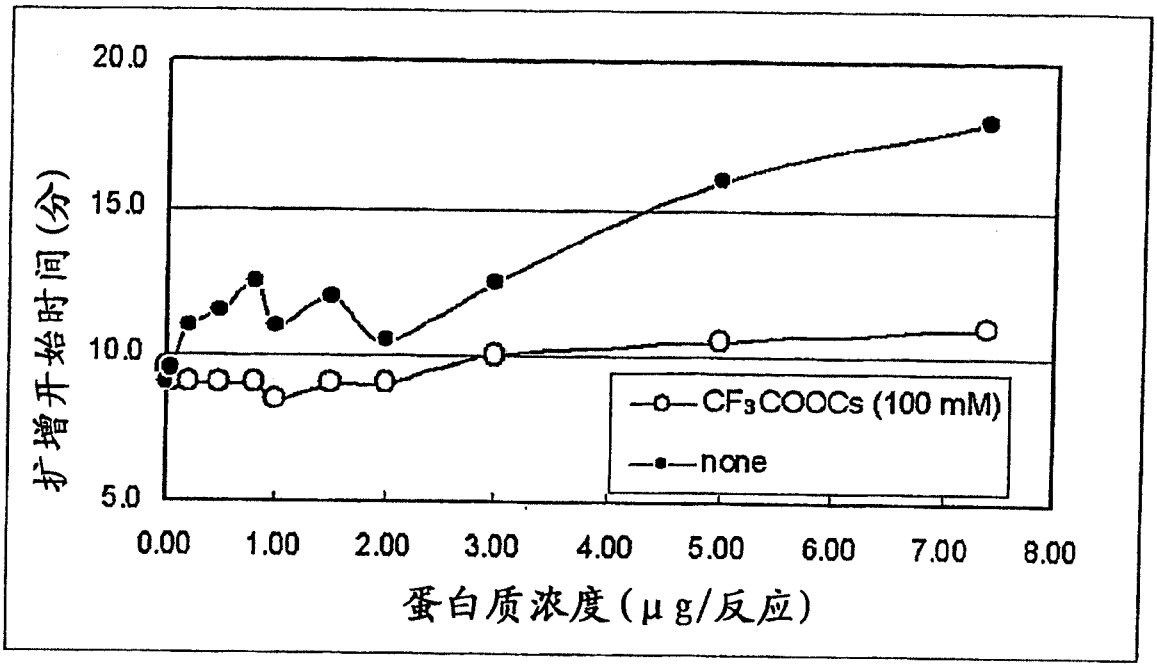

20.0
15.0
10.0
5.0
扩增开始时间(分)
0.00
1.00
2.00
3.00
4.00
5.00
6.00
7.00
8.00
蛋白质浓度(μg/反应)
CF3COOCs (100 mM)
none

图5

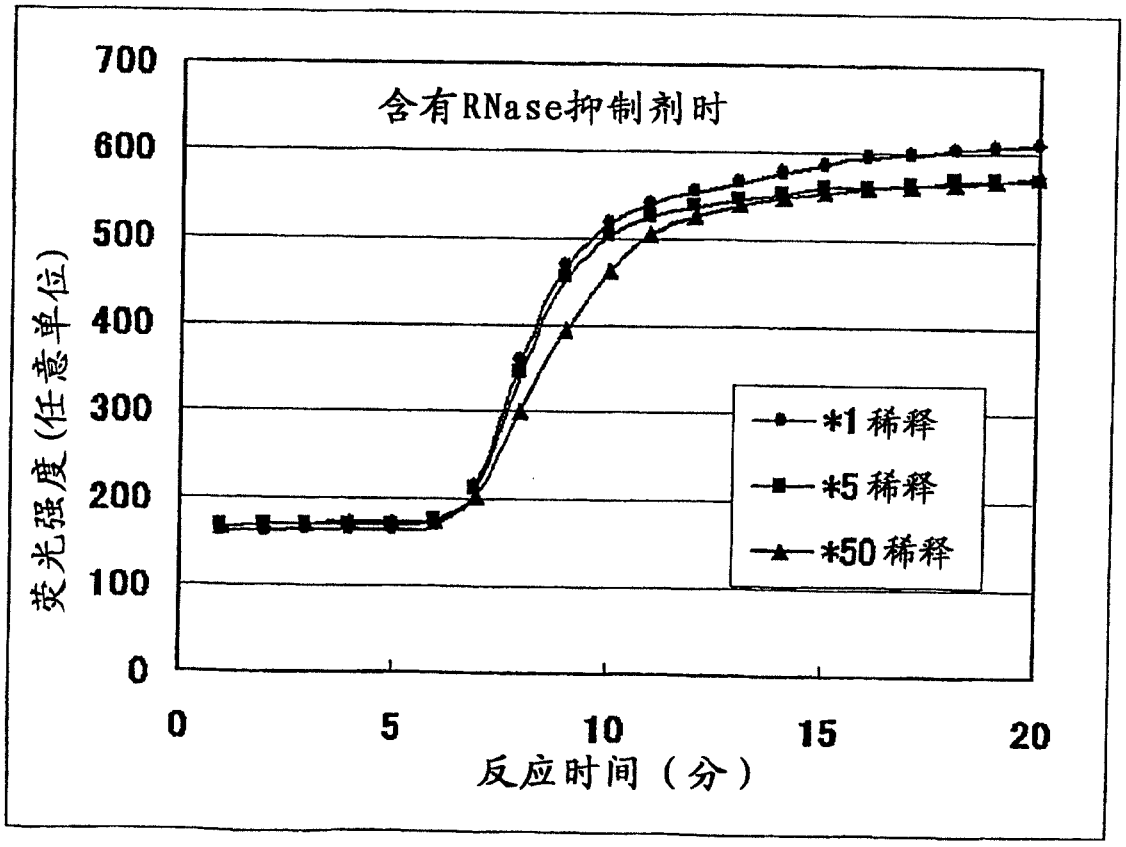

含有RNase抑制剂时
700
600
500
400
300
200
100
0
荧光强度(任意单位)
0
5
10
15
20
反应时间（分）
*1 稀释
*5 稀释
*50 稀释

图6

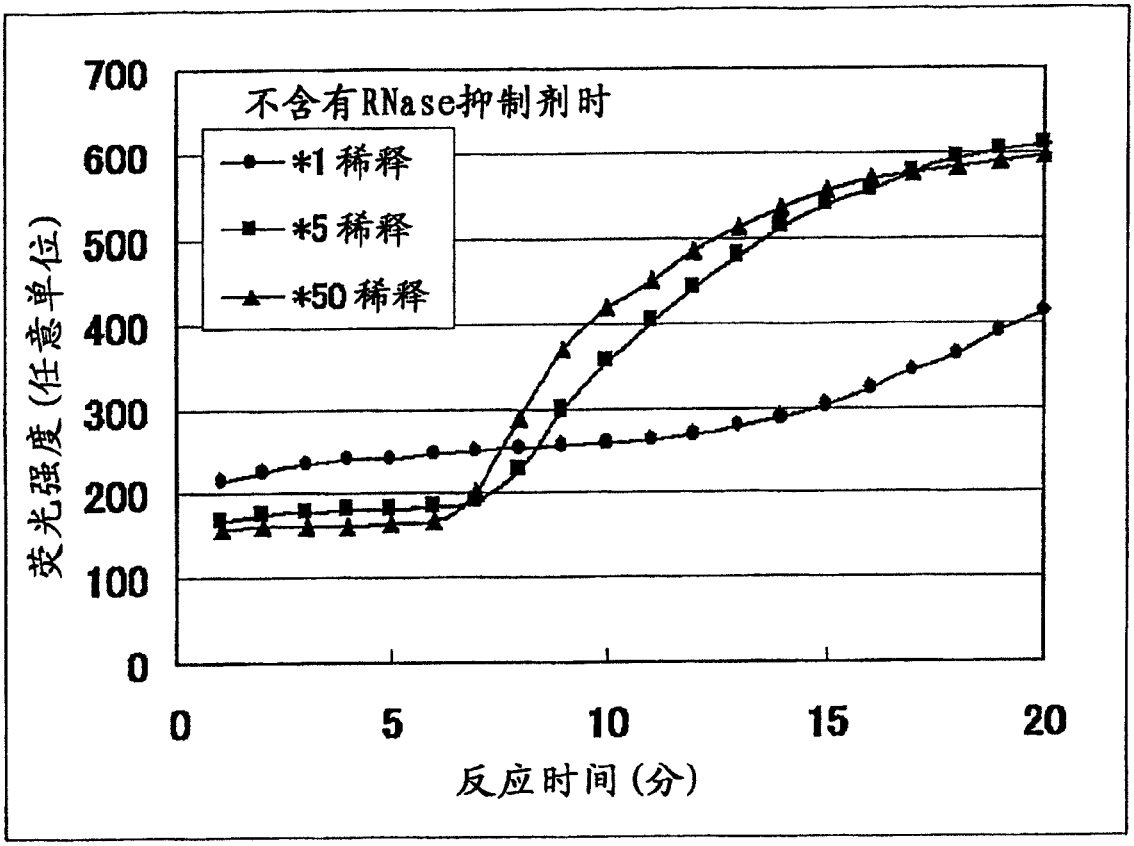
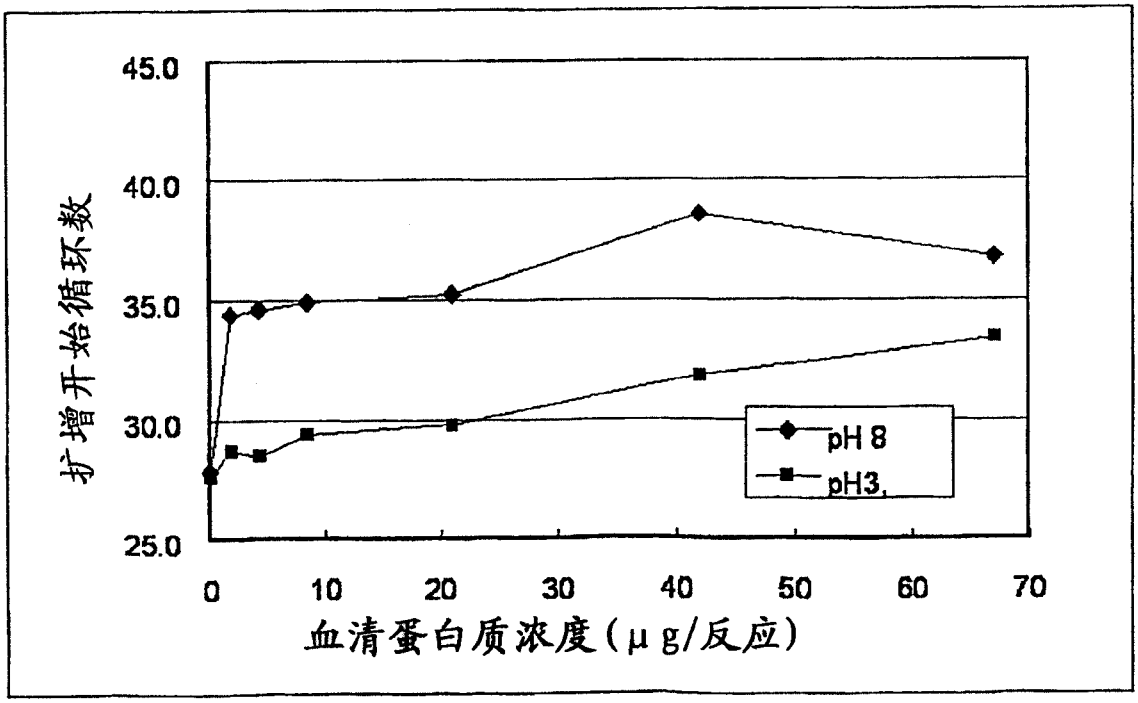

不含有RNase抑制剂时
*1 稀释
*5 稀释
*50 稀释
荧光强度(任意单位)
700
600
500
400
300
200
100
0
0
5
10
15
20
反应时间(分)

图7


扩增开始循环数
45.0
40.0
35.0
30.0
25.0
0
10
20
30
40
50
60
70
血清蛋白质浓度(μg/反应)
pH 8
pH3.