



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201317250 A1

(43)公開日：中華民國 102 (2013) 年 05 月 01 日

(21)申請案號：101132990

(22)申請日：中華民國 101 (2012) 年 09 月 10 日

(51)Int. Cl. : C07H21/00 (2006.01)

C12Q1/68 (2006.01)

(30)優先權：2011/09/08 日本

2011-196597

(71)申請人：達納福股份有限公司 (日本) KABUSHIKI KAISHA DNAFORM (JP)

日本

(72)發明人：林崎良英 HAYASHIZAKI, YOSHIHIDE (JP)；木村恭將 KIMURA, YASUMASA (JP)；白井健悟 USUI, KENGO (JP)；田中有希 TANAKA, YUKI (JP)；川井雄輝 KAWAI, YUUKI (JP)

(74)代理人：憚軼群；陳文郎

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：16 項 圖式數：36 共 114 頁

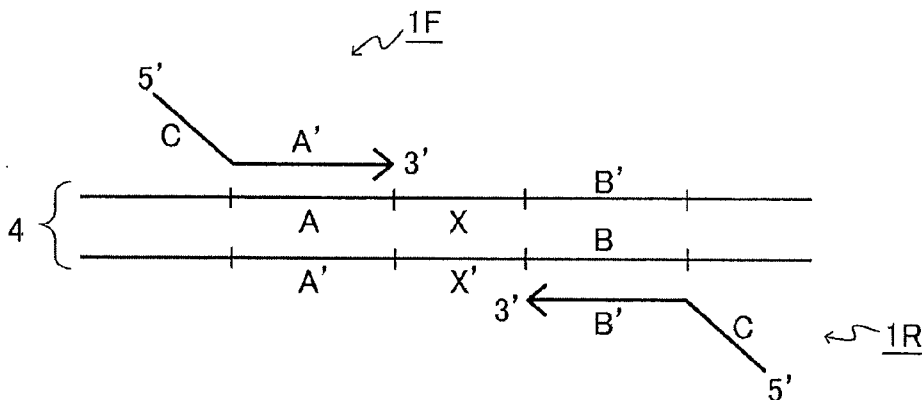
(54)名稱

引子組與使用該引子組之標的核酸序列擴增方法及突變核酸檢測方法

PRIMER SET, METHOD FOR AMPLIFYING TARGET NUCLEIC ACID USING THEREOF AND METHOD FOR DETECTING MUTATED NUCLEIC ACID USING THEREOF

(57)摘要

本發明提供一種引子組，為容易設計引子，且擴增距離可能縮短之引子組。使用於標的核酸序列 4 的等溫擴增方法的引子組的特徵為：上述的引子組包含第一引子 1F 及第二引子 1R。上述第一引子 1F 之 3' 端含有可與上述的標的核酸序列 3' 端序列(A)雜交的序列(A')；上述第二引子 1R 之 3' 端含有可與上述的第一引子的延長鏈或上述標的核酸序列 4 之互補鏈的 3' 端序列(B)雜交的序列(B')；而且，上述的第一引子 1F 及第二引子 1R，個別在 5' 端含有相互而言，實質上一致的序列(C)。





(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201317250 A1

(43)公開日：中華民國 102 (2013) 年 05 月 01 日

(21)申請案號：101132990

(22)申請日：中華民國 101 (2012) 年 09 月 10 日

(51)Int. Cl. : C07H21/00 (2006.01)

C12Q1/68 (2006.01)

(30)優先權：2011/09/08 日本

2011-196597

(71)申請人：達納福股份有限公司 (日本) KABUSHIKI KAISHA DNAFORM (JP)

日本

(72)發明人：林崎良英 HAYASHIZAKI, YOSHIHIDE (JP)；木村恭將 KIMURA, YASUMASA (JP)；白井健悟 USUI, KENGO (JP)；田中有希 TANAKA, YUKI (JP)；川井雄輝 KAWAI, YUUKI (JP)

(74)代理人：憚軼群；陳文郎

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：16 項 圖式數：36 共 114 頁

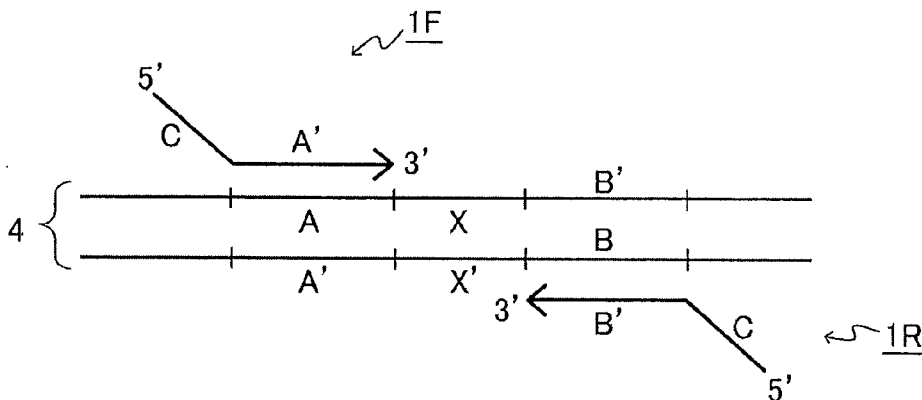
(54)名稱

引子組與使用該引子組之標的核酸序列擴增方法及突變核酸檢測方法

PRIMER SET, METHOD FOR AMPLIFYING TARGET NUCLEIC ACID USING THEREOF AND METHOD FOR DETECTING MUTATED NUCLEIC ACID USING THEREOF

(57)摘要

本發明提供一種引子組，為容易設計引子，且擴增距離可能縮短之引子組。使用於標的核酸序列 4 的等溫擴增方法的引子組的特徵為：上述的引子組包含第一引子 1F 及第二引子 1R。上述第一引子 1F 之 3' 端含有可與上述的標的核酸序列 3' 端序列(A)雜交的序列(A')；上述第二引子 1R 之 3' 端含有可與上述的第一引子的延長鏈或上述標的核酸序列 4 之互補鏈的 3' 端序列(B)雜交的序列(B')；而且，上述的第一引子 1F 及第二引子 1R，個別在 5' 端含有相互而言，實質上一致的序列(C)。



發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：101132990

07H 21/00 (2006.01)

※申請日：101.9.10

※IPC 分類：C12Q 1/68 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

引子組與使用該引子組之標的核酸序列擴增方法及突變核酸檢測方法
PRIMER SET, METHOD FOR AMPLIFYING TARGET NUCLEIC ACID
USING THEREOF AND METHOD FOR DETECTING MUTATED
NUCLEIC ACID USING THEREOF

二、中文發明摘要：

本發明提供一種引子組，為容易設計引子，且擴增距離可能縮短之引子組。

使用於標的核酸序列4的等溫擴增方法的引子組的特徵為：上述的引子組包含第一引子1F及第二引子1R。上述第一引子1F之3'端含有可與上述的標的核酸序列3'端序列(A)雜交的序列(A')；上述第二引子1R之3'端含有可與上述的第一引子的延長鏈或上述標的核酸序列4之互補鏈的3'端序列(B)雜交的序列(B')；而且，上述的第一引子1F及第二引子1R，個別在5'端含有相互而言，實質上一致的序列(C)。

三、英文發明摘要：

四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第 (1) 圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

(無)

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：



六、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

發明領域

[0001]本發明係關於引子組與使用該引子組之標的核酸序列擴增方法及突變核酸檢測方法。

【先前技術】

發明背景

[0002]基因工程學領域中，眾所周知的以核酸序列之互補性為基礎，作為直接分析遺傳特徵的替代方法。這樣的分析，當試料中標的基因的存在為少量的情況下，一般而言，其檢出並不容易，將標的基因預先擴增是必要的。

[0003]標的基因的擴增(核酸擴增)主要藉由利用DNA聚合酶的酵素方法來進行。這樣的酵素方法主要有，例如，聚合酶連鎖反應法(PCR法；美國專利第4683195號說明書(專利文獻1)、美國專利第4683202號說明書(專利文獻2)及美國專利第4800159號說明書(專利文獻3))，還有組合PCR法與反轉錄酶反應的反轉錄酶-聚合酶連鎖反應法(RT-PCT法；Trends in Biotechnology 10, p146~152, 1992 (非專利文獻1))。這些方法是將作為模板的雙股核酸解離為單股核酸(變性)、形成單股核酸的引子的緩冷配對、及由引子而得的互補鏈合成(延長)的3個階段形成的反應，經反覆操作而使DNA或RNA的標的基因的擴增成為可能之事。這些方法的反應溶液必須依據個別適合於上述3個階段的溫度做調節，反覆操作此3個步驟。

[0004]此外，在歐洲專利公開第0320308號說明書(專利文獻4)中公開了接合酶連鎖反應(LCR法)。上述方法使用耐熱性的DNA接合酶，藉由進行2個步驟的溫度循環反應(加熱及冷卻之反覆操作反應)，使已知的基因序列擴增。但是，以上記載的方法，由於廣泛的溫度範圍，必須使用能夠定時地進行嚴格的溫度控制之高價的溫度循環儀。又，這些反應必須在2~3種溫度條件下進行，調整至各反應溫度的時間是必須的，隨著循環數的增加，調節溫度所需的時間也會增加。

[0005]為了解決上述的問題點，開發了可以在等溫狀態下進行的核酸擴增法。這樣的方法可列舉，例如，在日本專利特公平第7-114718號公報(專利文獻5)中記載的鏈替代擴增法(SDA, strand displacement amplification)、自主序列複製法(3SR, self-sustained sequence replication)，日本專利第2650159號公報(專利文獻6)中記載之依賴核酸序列擴增法(NASBA; nucleic acid sequence based amplification)、TMA法(transcription-mediated amplification)，日本專利第2710159號公報(專利文獻7)中記載的Q β 複製酶法，美國專利第5824517號說明書(專利文獻8)、國際公開第99/09211號小冊子(專利文獻9)及國際公開第95/25180號小冊子(專利文獻10)中記載的各種改良的SDA法、國際公開第00/28082號小冊子(專利文獻11)中記載的恆溫環形核酸擴增法(LAMP, Loop-mediated Isothermal Amplification)、國際公開第02/16639號小冊子(專利文獻12)中記載的ICAN法

(Isothermal and Chimeric primer- initiated Amplification of Nucleic acids)、日本專利第3897805號公報(專利文獻13)中記載的SmartAmp2法等。這些等溫核酸擴增法相關的全階段的反應都在保持定溫的反應混合物中同時進行。

[0006]上述的等溫擴增法之中，LAMP法及SmartAmp2法是高實用性的方法。首先，LAMP法為需要2個迴轉引子(turn-back primer, TP)及2個外側引子(outer primer, OP)的等溫擴增法。因此，由於需要4種引子，合計需要6個基因體辨識點。圖11表示LAMP法的例子。此圖省略了2個OP，只顯示2個TP。如此圖所示，TP的3'端持有可與標的核酸序列雜交的序列，且在5'端持有與引子延長鏈互補的序列。例如，此圖中的一個TP(此圖中的左側)的3'端有與標的核酸序列(A)互補的序列(A')，5'端有與引子延長鏈序列(M')互補的序列(M)。另一個TP(此圖中的右側)也一樣。因為這樣的結構，TP與模板序列雜交生成延長鏈，上述TP的5'端迴轉與上述延長鏈雜交，其結果是引子延長鏈的5'端形成主幹迴圈結構。LAMP法因使用2個TP，其問題為將標的核酸序列的擴增區域縮短是困難的。又，如前所述，由於LAMP法需要4種引子，所以基因體辨識點合計也要6個，引子設計的困難也是問題之一。另一方面，SmartAmp2法由於使用TP及摺疊引子(folding primer, FP)，所以沒有如LAMP法上述的問題。圖12表示SmartAmp2法的例子。如此圖所示，SmartAmp2法其一引子使用TP，另一引子使用FP。如此圖所示，FP的3'端有與標的核酸序列(B)互補的序列(B')，5'

端有彼此互補的序列(F-F')被包含於單股上之摺疊序列。
SmartAmp2法由於使用TP及FP，基因體辨識點有3處，且FP
不迴轉。因此，擴增速度快，再加上專一性高的優點，並
且，具有容易設計引子、擴增區域可以縮短的優點。

先行技術文獻

專利文獻

[0007]專利文獻1：美國專利第4683195號說明書

專利文獻2：美國專利第4683202號說明書

專利文獻3：美國專利第4800159號說明書

專利文獻4：歐洲專利公開第0320308號說明書

專利文獻5：日本專利特公平第7-114718號公報

專利文獻6：日本專利第2650159號公報

專利文獻7：日本專利第2710159號公報

專利文獻8：美國專利第5824517號說明書

專利文獻9：國際公開第99/09211號小冊子

專利文獻10：國際公開第95/25180號小冊子

專利文獻11：國際公開第00/28082號小冊子

專利文獻12：國際公開第02/16639號小冊子

專利文獻13：日本專利第3897805號公報

非專利文獻

[0008]非專利文獻1：Trends in Biotechnology 10,
p146~152, 1992

【發明內容】

發明概要

發明欲解決之課題

[0009]如前所述，SmartAmp2法具有種種優點，為實用性方面十分優良的方法。但是，SmartAmp2法因使用TP，對於基因體辨識點之更加少數化及縮短擴增距離是有其限制的。

[0010]在此，本發明的目的為提供一使用等溫擴增方法、基因體辨識點少、且可縮短擴增距離之引子組，以及使用此引子組之等溫擴增方法和核酸序列突變的檢測方法。用以解決課題之手段

[0011]為達到上述的目的，本發明之引子組為使用於標的核酸的等溫擴增方法之引子組。上述的引子組的特徵為：包含第一引子1F及第二引子1R。上述第一引子1F之3'端含有可與上述的標的核酸序列3'端序列(A)雜交的序列(A')；上述第二引子1R之3'端含有可與上述第一引子的延長鏈或上述標的核酸序列4之互補鏈的3'端序列(B)雜交的序列(B')；而且，上述的第一引子1F及第二引子1R，個別在5'端含有相互而言，實質上一致的序列(C)。

[0012]本發明之等溫擴增方法為使用引子組在等溫下擴增標的核酸序列的等溫擴增方法。上述之引子組，其特徵為使用上述本發明之引子組。

[0013]本發明之核酸序列的突變之檢測方法為使用引子組，藉由等溫擴增方法，將核酸試料中的核酸序列之突變檢出的方法。上述之引子組，為使用上述本發明之引子組。上述之引子組，為含有上述突變的核酸序列或不含有

上述突變的核酸序列，與上述突變相關的核苷酸殘基，被包含於設計的引子組之第一引子之互補序列(A)或第二引子之互補序列(B)，在上述核酸試料存在下，藉由上述引子組進行等溫擴增反應為其特徵。

發明效果

[0014]本發明之引子組的基因體辨識點有二個，此外，因未使用TP，所以容易設計引子，且可以縮短擴增區域序列。因此，只要使用本發明的引子組，用過去的方法無法擴增的，如小分子核糖核酸(microRNA)等一般的短序列，也可以擴增。如此，本發明提供了與本發明者已開發的SmartAmp2完全迥異的引子組及等溫擴增方法。

圖式簡單說明

[0015]圖1為本發明之引子組的一例之圖示。

圖2為本發明之引子組的其他例子之圖示。

圖3為本發明之引子組的其他更多例子之圖示。

圖4表示本發明之引子組的擴增反應的一例之模式圖。

圖5A表示關於本發明之核酸的合成方法的反應機轉的一例之模式圖。

圖5B表示關於圖5B之接續的反應步驟之反應機轉的一例之模式圖。

圖6表示以超越核酸鏈裂型延長為基礎的延長鏈交換反應之反應機轉的一例之模式圖。

圖7A表示關於本發明之核酸的合成方法的反應機轉的其他例子之模式圖。

圖7B表示關於圖7A之接續的反應工程之反應機轉的一例之模式圖。

圖8A表示關於本發明之核酸的合成方法的反應機轉的其他更多例子之模式圖。

圖8B表示關於圖8A之接續的反應步驟之反應機轉的一例之模式圖。

圖9A表示關於本發明之核酸的合成方法的反應機轉的其他更多例子之模式圖。

圖9B表示關於圖9A之接續的反應步驟之反應機轉的一例之模式圖。

圖9C表示關於圖9A之接續的反應步驟之反應機轉的其他例子之模式圖。

圖10為關於本發明之引子組的第一引子的一例之圖示。

圖11為LAMP法的例子之圖示。

圖12為SmartAmp2法的例子之圖示。

圖13為使用實施例1的引子組(順向引子(forward primer)1及反向引子(reverse primer)1)時的螢光擴增曲線之圖示。

圖14表示確認圖13之螢光訊號增加的反應溶液之洋菜凝膠電泳結果的照片。

圖15為使用實施例1的引子組(順向引子2及反向引子2)時的螢光擴增曲線之圖示。

圖16表示確認圖15之螢光訊號增加的反應溶液之洋菜

凝膠電泳結果的照片。

圖17為使用實施例2的引子組(順向引子3及反向引子3)時的螢光擴增曲線之圖示。

圖18表示確認圖17之螢光訊號增加的反應溶液之洋菜凝膠電泳結果的照片。

圖19為使用實施例3的引子組(順向引子4及反向引子4)時的螢光擴增曲線之圖示。

圖20為使用實施例3的增強引子(boost primer)1時的螢光擴增曲線之圖示。

圖21為使用實施例3的增強引子2時的螢光擴增曲線之圖示。

圖22為使用實施例3的增強引子1及2時的螢光擴增曲線之圖示。

圖23表示確認圖19~22之螢光訊號增加的反應溶液之洋菜凝膠電泳結果的照片。

圖24為使用實施例4的引子組(順向引子5及反向引子5)時的螢光擴增曲線之圖示。

圖25表示確認圖24之螢光訊號增加的反應溶液之洋菜凝膠電泳結果的照片。

圖26表示實施例4的引子組的擴增反應的之模式圖。

圖27為使用實施例5的引子組(順向引子6及反向引子6)時的螢光擴增曲線之圖示。

圖28表示確認圖27之螢光訊號增加的反應溶液之洋菜凝膠電泳結果的照片。

圖29表示實施例5的引子組的擴增反應的之模式圖。

圖30為使用實施例6的引子組(順向引子7及反向引子7)時的螢光擴增曲線之圖示。

圖31表示確認圖30之螢光訊號增加的反應溶液之洋菜凝膠電泳結果的照片。

圖32為使用實施例7的引子組(順向引子8及反向引子6)時的螢光擴增曲線之圖示。

圖33表示確認圖32之螢光訊號增加的反應溶液之洋菜凝膠電泳結果的照片。

圖34為使用實施例8的引子組(順向引子5及反向引子8)時的螢光擴增曲線之圖示。

圖35表示確認圖34之螢光訊號增加的反應溶液之洋菜凝膠電泳結果的照片。

圖36表示實施例8的引子組的擴增反應的之模式圖。

【實施方式】

用以實施發明之形態

[0016]上述的第一引子及第二引子，如上所述，個別在5'端含有相互而言，實質上一致的序列(C)。上述的二個序列(C)的所謂「實質上一致的」是指上述的二個序列(C)個別可與另一方的引子之互補序列雜交。具體而言，例如上述的二個序列(C)為相互地完全一致的序列(完全吻合，full match)亦可，一部分鹼基不同的序列(偏合，mismatch)亦可。上述偏合的情況，例如，二個序列(C)之中的一方針對另一方的序列(C)之鹼基，藉由置換、插入或刪除至少一個

而產生序列亦可。上述的二個序列(C)中，置換、插入或刪除而產生的鹼基數，相對於上述的二個序列(C)之鹼基數的總合，以十分之二以下為佳，十分之一以下為較佳。又，上述的二個序列(C)完全一致時(亦即，置換、插入或刪除而產生的鹼基數為零)為特佳。

[0017]本發明之引子組，上述第一引子及第二引子的至少其中一方，在上述序列(C)的5'端，還包含在同一鏈上具有可互相雜交的二個序列形成的摺疊序列(D-D')亦可。

[0018]本發明之引子組，在上述第一引子之序列(C)的5'端，還包含在同一鏈上具有可互相雜交的二個序列形成的摺疊序列(D-D')；在上述第二引子之序列(C)的5'端，還包含在同一鏈上具有可互相雜交的二個序列形成的摺疊序列(E-E')。上述序列(D-D')及上述序列(E-E')為相互迥異的序列的型態亦可。

[0019]本發明之引子組，還包含第三引子。上述第三引子為上述標的核酸序列、上述標的核酸序列的互補序列，又，與上述第一引子的延長鏈或上述第二引子的延長鏈雜交。且上述第三引子之雜交，以不與上述第一引子及第二引子競爭的狀態為宜。

[0020]本發明的另一方面為第一核酸合成方法：由至少二個迥異的序列順序，至少二次反覆操作，在等溫下合成由單股核酸與上述單股核酸互補的核酸構成之雙股核酸。第一核酸合成方法的特徵包含以下的(A1)~(A6)的步驟為宜。

(A1)此步驟提供了單股模板核酸：包含3'末端的3'端主

幹序列及包含5'末端的5'端主幹序列，透過迴圈序列連結成主幹迴圈結構的單股模板核酸。上述3'端主幹序列的3'末端連結了同一鏈上含有可互相雜交的二個序列之摺疊序列。

(A2)上述單股模板核酸的上述迴圈上使其與引子雜交，使上述引子朝向上述5'端主幹序列的5'末端延長的步驟。

(A3)至上述5'端主幹序列的5'末端為止進行的上述引子的延長反應，自上述5'端主幹序列的5'末端開始到上述摺疊序列的3'末端為止，連續的進行步驟。

(A4)上述(A3)的上述朝著摺疊序列的3'末端進行的引子延長反應，再一次，朝向上述5'端主幹序列的5'末端連續的進行步驟，而且，藉由進行中的上述引子延長反應，與上述(A2)行程的單股模板核酸雜交之引子延長鏈進行鏈替代反應而成為單股核酸的步驟。

(A5)上述(A4)的引子延長反應，到上述5'端主幹序列的5'末端為止停止的步驟。

(A6)以上述(A4)形成的單股核酸的引子延長鏈為模板，延長上述單股模板核酸的上述摺疊序列3'末端的步驟。

[0021]本發明第一核酸合成方法中，(A3)步驟及(A4)步驟，至少要反覆操作2次為宜。

[0022]本發明之第一核酸合成方法中，上述(A1)步驟所提供的上述單股模板核酸，以本發明之引子組，使用上述的第一引子，只在其上述序列(C)的5'端含有摺疊序列(D-D')的引子組進行等溫擴增反應，藉以形成單股模板核酸，上

述(A2)步驟之上述迴圈狀序列雜交之上述引子為上述含有摺疊序列(D-D')的第一引子亦可。

[0023]本發明之第一核酸合成方法，上述(A1)步驟提供的上述單股模板核酸，上述5'端主幹迴圈序列的5'末端上，還連結了同一鏈上含有可互相雜交的二個序列之摺疊序列之單股模板核酸。代替上述(A3)步驟，包含以下(A3-2)步驟亦可。

(A3-2)至上述5'端主幹序列的5'末端為止進行的上述引子的延長反應，不藉由上述5'端主幹序列的5'末端連結的上述摺疊序列，直接自上述5'端主幹序列的5'末端開始到上述摺疊序列的3'末端為止，連續的進行步驟。

[0024]本發明之第一核酸合成方法中，(A3-2)步驟及(A4)步驟至少反覆進行2次為宜。

[0025]本發明之第一核酸合成方法，取代上述(A3)步驟，包含(A3-2)步驟的情況下，上述(A1)步驟所提供的單股模板核酸，使用上述含有摺疊序列(D-D')的第一引子及上述含有摺疊序列(E-E')的第二引子之引子組進行等溫擴增法以形成單股模板核酸。上述(A2)步驟之上述迴圈序列雜交之上述引子為上述本發明之引子組的第一引子或的二引子皆可。

[0026]又，本發明之另一方面為核酸的擴增方法，包含：至少二個迴異的序列順序、至少二次反覆操作、由單股核酸與上述單股核酸互補的核酸構成雙股核酸，在等溫合成的核酸合成步驟。上述核酸合成步驟為藉由本發明的

第一核酸合成方法實施為特徵的第一核酸擴增方法為宜。

[0027]又，本發明之另一方面為：至少二個迴異的序列順序、至少二次反覆操作、由單股核酸與上述單股核酸互補的核酸構成雙股核酸，在等溫合成的第二核酸合成方法。至少含有下列至少一方為特徵的第二核酸合成方法：包含(B1)~(B3)各步驟的第一反應步驟或包含(C1)~(C3)各步驟的第二反應步驟。

(B1)提供2個核酸方向互為逆向狀態的雙股：由包括在3'末端的區域，含有在同一鏈上具有可互相雜交的二個序列之摺疊序列的單股核酸，與上述單股核酸互補的單股核酸所形成。

(B2)上述(B1)的2個雙股的其中之一，自雙股的上述單股核酸之摺疊序列的3'末端開始，以另一個雙股的上述互補的單股核酸為模板，進行鏈替代延長反應。上述其中之一的雙股的上述單股核酸的延長鏈的一部份，與上述另一個雙股的互補的單股核酸雜交形成雙股的步驟。

(B3)上述步驟(B2)的部分雙股中，自上述互補的單股核酸的3'末端開始，經由上述單股核酸為模板的延長反應，形成完整雙股的步驟。

(C1)提供1個雙股：由包括在3'末端的區域，含有在同一鏈上具有可互相雜交的二個序列之摺疊序列的單股核酸，與上述單股核酸互補的單股核酸所形成。

(C2)自上述(C1)的雙股的上述單股核酸之摺疊序列的3'末端開始，以上述互補的單股核酸為模板，自上述互補

的單股核酸的3'末端開始至5'末端為止，進行鏈替代延長反應。上述單股核酸的延長鏈的一部份，與上述互補的單股核酸雜交形成部分雙股的步驟。

(C3)上述步驟(C2)的部分雙股中，自上述互補的單股核酸的3'末端開始，經由上述單股核酸為模板的延長反應，形成完整雙股的步驟。

[0028]上述(B1)步驟及上述(C1)步驟的雙股，以本發明之引子組的上述第一引子及第二引子的至少其中一方，使用在上述序列(C)的5'端，還包含在同一鏈上具有可互相雜交的二個序列形成的摺疊序列(D-D')的引子組，經由等溫擴增反應形成雙股亦可。又，上述(B1)步驟及上述(C1)步驟的雙股，以本發明之引子組：上述第一引子，在上述序列(C)的5'端，還包含在同一鏈上具有可互相雜交的二個序列形成的摺疊序列(D-D')；上述第二引子，在上述序列(C)的5'端，還包含在同一鏈上具有可互相雜交的二個序列形成的摺疊序列(E-E')。使用上述序列(D-D')及上述序列(E-E')為相互迴異的序列的引子組，經由等溫擴增反應形成雙股亦可。

[0029]又，本發明之另一方面為核酸的擴增方法，包含：至少二個迴異的序列順序、至少二次反覆操作、由單股核酸與上述單股核酸互補的核酸構成雙股核酸，在等溫合成的核酸合成步驟。上述核酸合成步驟為藉由本發明的第二核酸合成方法實施為特徵的第二核酸擴增方法為宜。

[0030]其次，關於本發明，舉例以詳細說明。

[0031]本發明之「標的核酸」或「標的核酸序列」意指

想擴增的核酸或不只是這個序列，與其互補的序列、或有上述序列的核酸。

[0032]本發明之「雜交」意指本發明之引子的一部份在嚴格的條件下與標的核酸雜交，不與標的核酸以外的核酸分子雜交。嚴格的條件，例如可依本發明之引子與其互補鏈之雙股的熔點 $T_m(^{\circ}C)$ 及雜交溶液之鹼基濃度之相依性來決定。例如，可參照J. Sambrook, E. F. Frisch, T. Maniatis; Molecular Cloning 2nd edition, Cold Spring Harbor Laboratory (1989)等。例如，使用比熔點為低的溫度下進行雜交，引子可與標的核酸專一性的雜交。這樣的引子，可以使用市售的引子建構軟體來設計，例如 Primer 3 (Whitehead Institute for Biochemical Research公司製)等。本發明適宜的實施狀態為：與某標的核酸雜交的引子，為含有該標的核酸之互補的核酸分子之全部或部分序列所形成。

[0033]圖1表示本發明之引子組的一個例子。如此圖所示，本例的引子組，為標的核酸序列4之等溫擴增方法使用的引子組。上述的引子組，包含第一引子1F及第二引子1R。上述第一引子1F之3'端含有可與上述的標的核酸序列3'端序列(A)雜交的序列(A')；上述第二引子1R之3'端含有可與上述的第一引子的延長鏈或上述標的核酸序列4之互補鏈的3'端序列(B)雜交的序列(B')；而且，上述的第一引子1F及第二引子1R，個別在5'端含有相互而言，一致的序列(C)。

[0034]圖4表示本例的引子組的擴增反應的一例之模式圖。此圖中，與圖1相同的部分，附有相同的符號。

[0035]如圖4(a)所示，第一引子1F及第二引子1R與標的核酸序列4雜交而產生延長反應。因此，如圖(b)所示，第一引子的延長鏈上，藉由與第二引子雜交而延長；或第二引子的延長鏈上，藉由與第一引子雜交而延長，以形成雙股的中間體。如圖(c)及(c')所示，雙股的中間體在動態平衡反應下成為單股時，經由分子內的雜交而取得主幹迴圈結構。然後，如圖(d)及(d')所示，主幹迴圈結構的單股中間體的迴圈，藉由與第一引子或第二引子雜交形成之延長鏈，以形成雙股的中間體。因為此圖(d)及(d')之雙股中間體，與圖(b)之雙股中間體為同一物質，所以再次經由動態平衡反應，成為主幹迴圈結構的單股中間體。經由這些一連串的循環，擴增了標的核酸序列。

[0036]本發明之引子組的第一引子及第二引子中，與標的核酸序列雜交的序列(A')及(B')的鹼基數並無特別限制，例如：3~100個鹼基，10~60個鹼基為佳，15~50個鹼基為較佳。又，本發明之引子組的第一引子及第二引子的同一序列(C)的鹼基數並無特別限制，例如：3~100個鹼基，10~60個鹼基為佳，15~50個鹼基為較佳。

[0037]圖2表示本發明之引子組的上述第一引子2F中，上述序列(C)的5'端，還包含在同一鏈上具有可互相雜交的二個序列形成的摺疊序列(D-D')的例子。

[0038]本發明中摺疊序列(D-D')的全長並無特別限制，例如：3~100個鹼基，4~60個鹼基為佳，5~50個鹼基為較佳。摺疊序列(D-D')的彼此互補的序列中的任一個的鹼

基數並無特別限制，例如：1~50個鹼基，1~30個鹼基為佳，1~20個鹼基為較佳。摺疊序列(D-D')的彼此互補的序列之間，也可存在介入序列。上述介入序列的鹼基數為，例如：1~50個鹼基，1~20個鹼基為佳，1~10個鹼基為較佳。又，本發明中摺疊序列的一部份，由第一引子及第二引子的同一序列(C)的一部分來形成亦可。這些摺疊序列(D-D')的條件，也適用於與摺疊序列(D-D')迥異的摺疊序列(E-E')。

[0039]圖3表示本發明之引子組的上述第一引子3F中，上述序列(C)的5'端，還包含在同一鏈上具有可互相雜交的二個序列形成的摺疊序列(D-D')；第二引子3R中，上述序列(C)的5'端，還包含在同一鏈上具有可互相雜交的二個序列形成的摺疊序列(E-E')，上述序列(D-D')及上述序列(E-E')為相互迥異的序列的型態。

[0040]其次，關於本發明的核酸合成方法，舉例以詳細說明。

[0041]如後述的實施例所示，本發明的核酸合成方法為：至少二個迥異的序列順序、至少二次反覆操作、由單股核酸與上述單股核酸互補的核酸構成雙股核酸，在等溫合成。在此，本發明的核酸合成方法的反應機轉，例如，如後述的圖5A~圖7B所示之第一合成反應及如後述的圖8A~圖9C所示之第二合成反應。上述第一合成反應可包含上述步驟(A1)~(A6)，以及一如上述可取代上述(A3)步驟的上述(A3-2)步驟。上述第二合成反應包含下列至少其中一方：包含上述(B1)~(B3)各步驟的第1反應步驟，及包含上述

(C1)~(C3)各步驟的第2反應步驟。但是，使用本發明的引子組之擴增反應，亦可包含這些第一合成反應及第二合成反應以外的合成反應。又，雖然使用本發明的引子組之擴增反應，以包含上述第一合成反應及第二合成反應的至少一方為宜，但亦可不包含上述第一合成反應及第二合成反應。

[0042]首先，上述第一合成反應是以超越核酸鏈裂型延長為基礎的延長鏈交換反應。以下，以圖5A~圖7B來說明上述第一合成反應的例子。

[0043]圖5A及5B表示上述第一合成反應的一個例子。這個反應，只有一邊的引子含有摺疊序列，使用與圖2相同的引子組的反應。意即，上述引子組為：序列(C)的5'端，包含摺疊序列(D-D')的第一引子2F，及不包含摺疊序列的第二引子2R。尚且，圖5A及5B中，與圖2同樣的構成要素，以同樣的符號表示。

[0044]首先，如圖5A(a)~(g)所示，提供 Ω 中間體((A1)步驟)。如圖5A(g)所示，此 Ω 中間體是一單股模板核酸：包含3'末端的3'端主幹序列(C')與包含5'末端的5'端主幹序列(C)，透過迴圈序列(A-B')連結成主幹迴圈結構的單股模板核酸；其上述3'端主幹序列(C')的3'末端，連結了一個包含在同一鏈上具有可互相雜交的二個序列(D)及(D')形成的摺疊序列(D-D')。

[0045]關於上述(A1)步驟(圖5A(a)~(g))，在此具體說明。意即，首先，如圖5A(a)所示，第一引子2F與標的序列(A)雜交。然後，如圖5A(b)所示，藉由第一引子2F的延長，

第1鏈的延長開始。其次，如圖5A(c)所示：第一引子2F的延長鏈，其序列(A')，藉由波動自標的核酸序列的序列(A)游離；第一引子2F與含有同一序列的引子，和上述標的核酸序列的序列(A)進行鏈替代雜交(SDH, strand displacement hybridization)；並且，藉由延長反應，使上述第一引子2F的延長鏈(第1鏈)游離。

[0046]其次，如圖(d)及(e)所示，藉由上述已游離的第1鏈與第二引子2R的雜交及延長反應的開始，形成第二引子2R的延長鏈(第2鏈)。上述第2鏈，如圖(e)所示，含有與第一引子的序列(A'-C-D-D')互補的序列(D-D'-C'-A)。然後，如圖(f)所示：第二引子2R的延長鏈，其序列(B')，藉由波動自標的核酸序列的序列(B)游離；第二引子2R與含有同一序列的引子，和上述第1鏈的序列(B)進行鏈替代雜交(SDH, strand displacement hybridization)；並且，藉由延長反應，使上述第2鏈游離。然後，如圖(g)所示，上述已游離的第2鏈的序列(C)及序列(C')自己雜交，形成 Ω 狀構造的單股模板核酸。這就是上述的 Ω 中間體。而且，圖5A(c)及(f)的引子延長鏈的游離，也可以使用外側引子(OP)來實施。

[0047]其次，如圖5A(h)及圖5B(i)所示，上述 Ω 中間體(單股模板核酸)的上述迴圈上的序列(A)，和第一引子2F與含有同一序列的引子雜交。上述引子，朝向上述 Ω 中間體之5'端主幹序列(C)的5'末端延長((A2)步驟)。此延長反應到達上述5'端主幹序列(C)為止，就會如圖5B(i)所示，上述以5'端主幹序列(C)為模板的延長反應，將開始伴隨鏈替代反

應。而且，在此，由於上述5'端主幹序列(C)(Tail序列)的5'末端部分與上述摺疊序列(D-D')(hook序列)的3'末端形成的核酸鏈裂而使延長停止的情況下，則形成單倍體(上述單股模板核酸)的擴增子。以下，將說明未因上述核酸鏈裂而使延長停止，以超越核酸鏈裂型延長為基礎開始的延長鏈交換反應之情況。

[0048]意即，首先，如圖5B(i)的虛線箭號所示，至上述5'端主幹序列(C)的5'末端為止進行的上述引子的延長反應，自上述5'端主幹序列(C)的5'末端開始到上述摺疊序列(D-D')的3'末端為止，連續的進行步驟((A3)步驟)。然後，如圖(j)~(l)所示，同圖(i) (上述(A3)步驟)的上述朝向摺疊序列(D-D')的3'末端進行的上述引子的延長反應，再次朝向上述5'端主幹序列(C)的5'末端連續的進行。且，藉由進行的上述引子的延長反應，如圖5A(h)~5B(i)所示(上述(A2)步驟)，與形成的單股模板核酸(Ω 中間體)雜交的引子延長鏈，進行鏈替代以成為單股((A4)步驟)。然後，上述(A4)步驟的引子延長反應，如圖5B(l)所示，停止於上述5'端主幹序列(C)的5'末端((A5)步驟)。藉此，上述引子延長鏈，2個擴增子序列(上述單股模板核酸序列)以順方向連結(串聯)成二倍體1a。並且，如圖5B(m)所示，以上述(A4)步驟中成為單股的引子延長鏈(串聯的二倍體1a)為模板，將上述單股模板核酸(Ω 中間體)的上述摺疊序列(D-D')的3'末端延長((A6)步驟)。藉由此延長反應，以形成上述引子延長鏈(串聯的二倍體1a)互補鏈，由上述引子延長鏈及其互補鏈形成



完整的雙股 m_a 。

[0049]尚且，如圖5A及5B所示，上述(A3)步驟及(A4)步驟只進行一次，以形成串聯的二倍體的例子。相對於此，藉由重複操作至少二次上述(A3)步驟及上述(A4)步驟以外，其餘都一樣時，可形成三倍體以上的串聯鏈。意即，上述(A4)步驟後，回到上述(A3)步驟，重複操作至少二次上述(A3)步驟及上述(A4)步驟後，再進行上述(A5)步驟及上述(A6)步驟，形成三倍體以上的串聯鏈亦可。

[0050]圖6表示有超越核酸鏈裂反應及無此反應的情況。首先，如圖(a)所示， Ω 中間體中，5'端主幹序列的5'末端與摺疊序列的3'末端因接近而形成核酸鏈裂的情況下，啟動超越核酸鏈裂的引子延長反應。相對於此，如圖(b)所示， Ω 中間體中，5'端主幹序列的5'末端與摺疊序列的3'末端因遠離而未形成核酸鏈裂的情況下，引子延長反應將停止於5'端主幹序列的5'末端。

[0051]其次，圖7A及7B表示上述第一合成反應的其他例子。此反應的2個引子都含有摺疊序列，使用與圖3樣的引子組。意即，上述引子組為：序列(C)的5'端包含摺疊序列(D-D')的第一引子3F，及序列(C)的5'端包含摺疊序列(E-E')的第二引子3R。尚且，圖7A及7B中，與圖3同樣的構成要素，以同樣的符號表示。

[0052]首先，如圖7A(a)~(g)所示，提供 Ω 中間體((A1)步驟)。如圖7A(g)所示，此 Ω 中間體是一單股模板核酸：包含3'末端的3'端主幹序列(C')與包含5'末端的5'端主幹序列

(C)，透過迴圈序列(A-B')連結成主幹迴圈結構的單股模板核酸；其上述3'端主幹序列(C')的3'末端，連結了一個包含在同一鏈上具有可互相雜交的二個序列(D)及(D')形成的摺疊序列(D-D')。但是，圖7A(g)所示的 Ω 中間體，還在上述5'端主幹序列(C)的5'末端，連結了一個包含在同一鏈上具有可互相雜交的二個序列(E)及(E')形成的摺疊序列(E-E')。此點與圖5A(g)的 Ω 中間體迥異。除了包含上述摺疊序列(E-E')以外，與圖5A(g)的 Ω 中間體是相同的。

[0053]上述(A1)步驟(圖7A(a)~(g))中，圖7A(a)~(c)與圖5A(a)~(c)相同，包括：第一引子與模板核酸雜交、延長反應、及上述第一引子的延長鏈(第1鏈)游離。圖7A的第一引子3F的序列與圖5A的第一引子2F相同。

[0054]其次，如圖7A(d)~(g)所示，除了以包含摺疊序列(E-E')的第二引子3R取代不含摺疊序列的第二引子2R以外，都與圖5A(d)~(g)相同，如圖7A(g)所示，形成單股模板核酸(Ω 中間體)。

[0055]其次，如圖7A(h)及圖7B(i)所示，上述 Ω 中間體(單股模板核酸)的上述迴圈上的序列(A)，和第一引子3F與含有同一序列的引子雜交。上述引子，朝向上述 Ω 中間體之5'端主幹序列(C)的5'末端延長((A2)步驟)。此延長反應到達上述5'端主幹序列(C)為止，就會如圖7B(i)所示，上述以5'端主幹序列(C)為模板的延長反應，將開始伴隨鏈替代反應。之後，如圖(j')所示，至上述 Ω 中間體的摺疊序列(E-E')的5'末端持續進行延長反應的情況下，可生成完全互補的

雙股DNA(如圖(k'))。

[0056]另一方面，形成串聯的擴增子序列的情況，如圖7B(i)的虛線箭號所示，至上述5'端主幹序列(C)的5'末端為止進行的上述引子的延長反應，不藉由上述5'端主幹序列(C)的5'末端連結的上述摺疊序列(E-E')，直接自上述5'端主幹序列(C)的5'末端開始到上述摺疊序列(D-D')的3'末端為止，連續的進行((A3-2)步驟)。然後，如圖(j)~(l)所示，同圖(i) (上述(A3-2)步驟)的上述朝向摺疊序列(D-D')的3'末端進行的上述引子的延長反應，再次朝向上述5'端主幹序列(C)的5'末端連續的進行。且，藉由進行的上述引子的延長反應，如圖7A(h)~7B(i)所示(上述(A2)步驟)，與形成的單股模板核酸(Ω 中間體)雜交的引子延長鏈，進行鏈替代以成為單股((A4)步驟)。然後，上述(A4)步驟的引子延長反應，如圖7B(l)所示，停止於上述5'端主幹序列(C)的5'末端((A5)步驟)。但是，上述引子延長鏈進行鏈替代反應以成為單股的反應，至5'端主幹序列(C)的5'末端停止，但延長反應本身，會超過5'端主幹序列(C)的5'末端，前進到上述 Ω 中間體的折疊序列(E-E')的5'末端為止。藉此，上述引子延長鏈，2個擴增子序列(上述單股模板核酸序列)以順方向連結(串聯)成二倍體(圖7B(m)或(n)之上側的鏈)。並且，如圖7B(m)或(n)所示，以上述(A4)步驟中成為單股的引子延長鏈為模板，將上述單股模板核酸(Ω 中間體)的上述摺疊序列(D-D')的3'末端延長((A6)步驟)。如圖7B(n)所示，藉由此延長反應，以形成上述引子延長鏈互補鏈(此圖下側的鏈)，由

上述引子延長鏈及其互補鏈形成完整的雙股。且，自5'端主幹序列(C)的5'末端開始，向摺疊序列(D-D')的3'末端連續的引子延長反應，將啟動與上述超越核酸鏈裂反應一樣的機轉。

[0057]尚且，如圖7A及7B所示，上述(A3-2)步驟及(A4)步驟只進行一次，以形成串聯的二倍體的例子。相對於此，藉由重複操作至少二次上述(A3-2)步驟及上述(A4)步驟以外，其餘都一樣時，可形成三倍體以上的串聯鏈。意即，上述(A4)步驟後，回到上述(A3-2)步驟，重複操作至少二次上述(A3-2)步驟及上述(A4)步驟後，再進行上述(A5)步驟及上述(A6)步驟，形成三倍體以上的串聯鏈亦可。

[0058]其次，使用圖8A~9C說明上述第二合成反應。

[0059]圖8A及8B表示上述第二合成反應的一個例子。這個反應，只有一邊的引子含有摺疊序列，使用與圖2相同的引子組的反應。意即，上述引子組為：序列(C)的5'端，包含摺疊序列(D-D')的第一引子2F，及不包含摺疊序列的第二引子2R。尚且，圖8A及8B中，與圖2同樣的構成要素，以同樣的符號表示。

[0060]首先，由圖8A(a)~(i)形成互補的雙股(單倍體擴增子)，如圖8B(j)所示提供1個雙股((C1)步驟)或如圖8B(j')所示提供2個序列方向互為逆向的雙股((B1)步驟)。圖8A(a)~(g)(Ω 中間體的形成)為止，與圖5A(a)~(g)(上述第一合成反應)完全相同。其次，如圖8A(h)所示，上述 Ω 中間體(單股模板核酸)的上述迴圈上的序列(A)，和第一引子2F與

含有同一序列的引子雜交。上述引子，朝向上述 Ω 中間體之5'端主幹序列(C)的5'末端延長。此延長反應在上述5'端主幹序列(C)的5'末端停止，如圖(i)所示，由上述 Ω 中間體與上述引子延長鏈形成互補的雙股(單倍體擴增子)。此擴增子，如圖所示，包含3'末端的區域上，由含有在同一鏈上具有可互相雜交的二個序列(D)及(D')形成的摺疊序列(D-D')的單股核酸(圖8A(i)下側的鏈)，與上述單股核酸互補的單股核酸(同圖上側的鏈)形成的雙股。且，以第二引子2R為反應起點的情況下，也以同樣的反應過程形成擴增子。

[0061]由圖8A(i)的擴增子(與圖8B(i)一樣)開始，如圖8B所示，經由二條反應路徑，形成與上述 Ω 中間體或其互補鏈以順方向連結的(串聯的)擴增產物。一條反應路徑，如圖8B(j)~(l)所示，為上述雙股擴增子(圖8B(i))的分子內，鏈替代雜交啟動的路徑。另一條路徑，如圖8B(j')~(l')所示，二分子的上述雙股擴增子之間，鏈替代雜交啟動的路徑。意即，首先，上述擴增子，如圖8B(j)所示提供1個擴增子((C1)步驟)或如圖8B(j')所示提供2個序列方向互為逆向的擴增子((B1)步驟)。其次，上述雙股擴增子(如圖(j)~(k)所示，上述雙股擴增子的分子內；或如圖(j')~(k')所示，二分子的上述雙股擴增子之間)，5'末端序列(C)與其他鏈的序列(C')雜交(Tail替代)。此Tail替代開始時，如圖(l)及圖(l')所示，在個別的末端的摺疊序列(D-D')的摺疊處啟動。藉此，自3'末端的摺疊序列(D-D')的序列D的3'末端開始，以逆側鏈為模板的重組型延長啟動。藉此延長反應生成新合成的延長

鏈(同圖(m))。圖8B(l)開始至同圖(m)的反應，相當於自上述(C1)的雙股(圖8B(j))的上述單股核酸的摺疊序列(D-D')的3'末端開始，以上述互補的單股核酸為模版，自上述互補的單股核酸的3'末端開始至5'末端為止，進行鏈替代延長反應。上述單股核酸的延長鏈的一部份，與上述互補的單股核酸雜交形成部分雙股(同圖(m))的步驟((C2)步驟)。圖8B(l')開始至同圖(m)的反應，相當於自上述(B1)的2個雙股(圖8B(j'))的一個雙股之上述單股核酸的摺疊序列(D-D')的3'末端開始，以另一個雙股之上述互補的單股核酸為模版，自上述互補的單股核酸的3'末端開始至5'末端為止，進行鏈替代延長反應。上述一個雙股之單股核酸的延長鏈的一部份，與上述另一個雙股之互補的單股核酸雜交形成部分雙股(同圖(m))的步驟((B2)步驟)。且，這些延長反應，並非自上述3'末端的摺疊序列(D-D')開始，以自己的序列為模版的之字形延長。

[0062]而且，如圖(n)所示，自新合成的延長鏈的互補鏈之3'末端部位開始，以逆側鏈為模板的延長反應啟動。其結果為，上述擴增子以順方向連結(串聯的)形成雙股(同圖(o))。此圖8B(n)開始至圖(o)的反應，相當於上述步驟(B2)或(C2)的部分雙股(同圖(m))中，自上述互補的單股核酸(同圖(m)上側的鏈)的3'末端開始，藉由以上述單股核酸為模版(同圖(n))之延長反應，形成完整的雙股(同圖(o))的步驟((B3)步驟或(C3)步驟)。

[0063]其次，圖9A~9C表示上述第二合成反應的其他例

子。此反應的2個引子都含有摺疊序列，使用與圖3樣的引子組。意即，上述引子組為：序列(C)的5'端包含摺疊序列(D-D')的第一引子3F，及序列(C)的5'端包含摺疊序列(E-E')的第二引子3R。尚且，圖9A~9C中，與圖3同樣的構成要素，以同樣的符號表示。

[0064]首先，由圖9A(a)~(i)形成互補的雙股(單倍體擴增子)，如圖9C(j)所示提供1個雙股((C1)步驟)或如圖9C(j')所示提供2個序列方向互為逆向的雙股((B1)步驟)。圖9A(a)~(g)(Ω 中間體的形成)為止，與圖7A(a)~(g)(上述第一合成反應)完全相同。其次，如圖(h)所示，上述 Ω 中間體(單股模板核酸)的上述迴圈上的序列(A)，和第一引子3F與含有同一序列的引子雜交。上述引子，朝向上述 Ω 中間體之5'端主幹序列(C)的5'末端延長。此延長反應在上述5'端主幹序列(C)的5'末端連結的摺疊序列(E-E')的5'末端停止，如圖9A(i)所示，由上述 Ω 中間體與上述引子延長鏈形成互補的雙股(單倍體擴增子)。此擴增子，如圖所示，包含3'末端的區域上，由含有在同一鏈上具有可互相雜交的二個序列(D)及(D')形成的摺疊序列(D-D')的單股核酸(圖9A(i)下側的鏈)，與上述單股核酸互補的單股核酸(同圖上側的鏈)形成的雙股。且，以第二引子3R為反應起點的情況下，也以同樣的反應過程形成擴增子。

[0065]圖9A(i)以下，如圖9B或圖9C的任一所示，有二條反應路徑。一條反應路徑為，如圖9B所示，使用具有類似迴文序列的折疊序列路徑。具體而言，圖9A(i)的雙股擴

增子的摺疊序列(D-D')及(E-E')為類似迴文序列的情況之路徑。首先，如追加圖9B(p)所示，二分子的上述雙股擴增子之間，具有上述類似迴文序列、異質的摺疊序列(D-D')及(E-E')，互相雜交。只有像這樣具有3'末端摺疊序列的同伴互相雜交的情況下，才能進入下個階段(同圖(q))。其次，如圖(q)~(r)所示，以互相雜交的摺疊序列的3'末端為起點，鏈替代延長反應啟動。藉此，如圖(r)所示，藉由鏈替代延長反應，生成上述擴增子順向地連結(串聯)的雙股核酸。此時，藉由上述鏈替代延長反應，游離出的單股DNA成為 Ω 中間體。

[0066]另一條反應路徑為，如圖9C所示，上述雙股擴增子的序列(C)即與其互補的序列(C')(Tail序列)之間，產生重組雜交的路徑。此反應路徑，如同圖所示，又區分為二條反應路徑。意即，一條反應路徑，如圖9C(j)~(l)所示，圖9C(i)表示的上述雙股擴增子(同圖9A(i))的分子內，鏈替代雜交啟動的路徑。另一條路徑，如圖9C(j')~(l')所示，二分子的上述雙股擴增子之間，鏈替代雜交啟動的路徑。意即，首先，上述擴增子，如圖9C(j)所示提供1個擴增子((C1)步驟)或如圖9C(j')所示提供2個序列方向互為逆向的擴增子((B1)步驟)。其次，上述雙股擴增子(如圖(j)~(k)所示，上述雙股擴增子的分子內；或如圖(j')~(k')所示，二分子的上述擴增子之間)，序列(C)與其他鏈的序列(C')雜交(Tail替代)。此Tail替代開始時，如圖(l)及圖(l')所示，在個別的末端的摺疊序列(D-D')或(E-E')的摺疊處啟動。藉此，自3'末端的



摺疊序列(D-D')的序列D或(E-E')的序列E的3'末端開始，以逆側鏈為模板的重組型延長啟動。藉此延長反應生成新合成的延長鏈(同圖(m))。圖9C(l)開始至同圖(m)的反應，相當於自上述(C1)的雙股(圖9C(j))的上述單股核酸的摺疊序列(D-D')的3'末端開始，以上述互補的單股核酸為模版，自上述互補的單股核酸的3'末端開始至5'末端為止，進行鏈替代延長反應。上述單股核酸的延長鏈的一部份，與上述互補的單股核酸雜交形成部分雙股(同圖(m))的步驟((C2)步驟)。圖9C(l')開始至同圖(m)的反應，相當於自上述(B1)的2個雙股(圖9C(j'))的一個雙股之上述單股核酸的摺疊序列(D-D')的3'末端開始，以另一個雙股之上述互補的單股核酸為模版，進行鏈替代延長反應。上述一個雙股之單股核酸的延長鏈的一部份，與上述另一個雙股之互補的單股核酸雜交形成部分雙股(同圖(m))的步驟((B2)步驟)。且，這些延長反應，並非自上述3'末端的摺疊序列(D-D')或(E-E')開始，以自己的序列為模板的之字形延長。

[0067]而且，如圖(n)所示，自游離的摺疊序列(E-E')的3'摺疊部位開始，以逆側鏈為模板的重組型延長反應啟動。其結果為，上述擴增子的連結部分，異質的摺疊同伴成為錘頭狀構造的擴增產物形成了(同圖(o))。此圖9B(n)開始至圖(o)的反應，相當於上述步驟(B2)或(C2)的部分雙股(同圖(m))中，自上述互補的單股核酸(同圖(m)上側的鏈)的3'末端開始，藉由以上述單股核酸為模版(同圖(n))之延長反應，形成完整的雙股(同圖(o))的步驟((B3)步驟或(C3)步

驟)。

[0068]以上，說明了本發明的核酸合成方法之第一及第二合成反應。但是，使用本發明的引子組之等溫擴增方法，包含這些本發明的合成反應亦可，不包含亦可。

[0069]本發明的引子組，如圖10所示，第一引子的序列(A)及序列(C)中間也可持有介入序列(G)。介入序列(G)的長度，例如：1~30個鹼基，1~20個鹼基為佳，1~10個鹼基為較佳。又，本發明的引子組，如圖10所示，第一引子的序列(C)及摺疊序列(D-D')中間也可持有介入序列(H)。介入序列(H)的長度，例如：1~30個鹼基，1~20個鹼基為佳，1~10個鹼基為較佳。

[0070]本發明的引子組，除了第一引子及第二引子以外，也可以包含第三引子。第三引子可與上述標的核酸序列或與其互補序列雜交，不與其他引子競爭對於標的核酸序列或其互補序列的雜交。

[0071]本發明中的「不競爭」意指此引子與標的核酸的雜交，不會妨礙其他引子與互補鏈合成起點之賦與。

[0072]藉由第一引子及第二引子使標的核酸擴增的情況下，例如，第三引子可以在上述標的核酸擴增而有擴增產物部分成為單股狀態時，與存在其單股部分的標的序列緩冷配對。藉此，可提供擴增產物中標的核酸序列內新的互補鏈合成的起點，由於從那開始的延長反應啟動了，核酸擴增反應更加迅速地進行。

[0073]第三引子不必限定只有1種，為了提昇核酸擴增

反應的迅速性及專一性，同時使用2種以上的第三引子亦可。這些第三引子，典型為與第一引子及第二引子迥異的序列來構成，但由於這些引子之不競爭的限制，在部分重疊區域上雜交亦可。第三引子的鏈長，以2~100個鹼基為佳，5~50個鹼基為較佳，7~30個鹼基為更佳。

[0074]第三引子是為了使第一引子及第二引子之核酸擴增反應更快速地進行，其輔助工作為主要目的。因此，第三引子的熔點比第一引子及第二引子的個別3'末端之熔點較低為宜。又，第三引子對擴增反應液的添加量比第一引子及第二引子的個別添加料較少為宜。

[0075]第三引子可列舉，如國際公開第02/24902號小冊子之記載所示，以具有可形成迴圈之物為模板，在此迴圈部分給予互補鏈合成的起點，但不限定於此。意即，只要在標的核酸序列內，任何部位都可提供互補鏈合成的起點。

[0076]本發明之引子組所包含的引子是由去氧核苷酸(deoxynucleotide)及/或核糖核苷酸(ribonucleotide)構成。本發明中「核糖核苷酸」(也單以「N」稱之)是指核糖核苷三磷酸(ribonucleotide triphosphate)，例如ATP、UTP、CTP、GTP等。而且，核糖核苷酸還包含其衍生物，例如， α 位的磷酸基之氧原子以硫原子取代後的核糖核苷酸(α -硫代-核糖核苷酸, α -thio-ribonucleotide)等。

[0077]又，上述引子包含：由未修飾去氧核苷酸及/或修飾去氧核苷酸構成寡核苷酸引子(oligonucleotide primer)，及未修飾核糖核苷酸及/或修飾核糖核苷酸構成寡

核苷酸引子，還有含有未修飾去氧核苷酸及/或修飾去氧核苷酸及未修飾核糖核苷酸及/或修飾核糖核苷酸的嵌合體寡核苷酸引子(chimera oligonucleotide primer)等。

[0078]本發明之引子組所包含的引子可以使於寡核苷酸合成的任一方法來合成之，例如，磷酸三酯法、H-磷酸酯法、硫代磷酸酯法等。例如，上述引子若用ABI公司(Applied Biosystem Inc.)的DNA合成儀394型，藉由亞磷醯胺法合成，即可容易取得。

[0079]核酸擴增反應中使用的包含標的核酸序列之模板核酸或核酸試料，可以是DNA或RNA，可以是雙股或單股。DNA包含互補DNA(cDNA)、基因體DNA(genome DNA)、及合成DNA的任何一個。RNA包含全RNA、mRNA、rRNA、siRNA、hnRNA、微型(microRNA)、及合成RNA的任何一個。這些核酸可由下列試料調製之，例如：血液、組織、細胞、更或如動物、植物而來的活體來源試料；或由活體來源試料、食品、土壤、排水等分離而得的微生物來源試料或病毒來源試料。

[0080]模板核酸或核酸試料的分離可以任意方法進行，可列舉例如，藉由界面活性劑溶解處理、音波處理、使用玻璃珠振動攪拌、及法式濾壓等。又，內生性核酸酶存在的情況下，將分離的核酸純化為宜。核酸的純化可以藉由下列方法實施，例如：酚萃取、層析法、離子交換、凝膠電泳、密度相依性離心分離等。

[0081]更具體來說，作為上述模板核酸或上述核酸試

料，以下任一個都可使用：如以上述方法分離的基因體DNA或PCR片段的雙股核酸、或如全RNA或由mRNA經反轉錄反應調製而成之互補DNA的單股核酸。上述的雙股核酸的情況下，藉由進行變性步驟成為單股，更適合利用之。

[0082]上述反轉錄反應使用的酵素，只要具有以RNA為模板合成互補DNA的活性，並無特別限制。可列舉各種來源的反轉錄酶，例如：鳥類骨髓胚細胞過多症病毒來源反轉錄酶(AMV RTase)、勞斯聯合病毒2反轉錄酶(RAV-2 RTase)、莫洛尼(氏)鼠白血病毒來源反轉錄酶(MMLV RTase)等。此外，也可使用併有反轉錄活性的DNA聚合酶。又，為達本發明的目的，在高溫仍具反轉錄活性的酵素最佳，例如可以使用嗜熱屬細菌來源DNA聚合酶(TthDNA polymerase等)、桿菌屬細菌來源DNA聚合酶等。特佳的酵素的示例可列舉如：以嗜熱性桿菌屬細菌來源DNA聚合酶而言，有B. st來源DNA聚合酶(Bst DNA聚合酶)及B. ca來源DNA聚合酶(Bca DNA聚合酶)，例如BcaBEST DNA聚合酶、Bca(exo-)DNA聚合酶等。例如，Bca DNA聚合酶，反應中不必有錳離子，在高溫條件下，可邊抑制模板RNA的二級結構形成，邊合成互補DNA。

[0083]核酸擴增反應中，模版核酸為雙股的情況下，就這樣使用以進行反應亦可，因應需求，藉由將其變性成單股，使引子向模板核酸緩冷配對能更有效率地進行。將溫度升高至約95℃是適宜的核酸變性法。其他方法，藉由將pH值升高使其變性亦可，在此情況下，為使引子與標的核

酸雜交，必須將pH值下降。

[0084]核酸擴增反應中使用的DNA聚合酶，若有鏈替代活性(鏈替代能力)為宜，可使用常溫性、中溫性或耐熱性的任一個適宜者。又，此聚合酶可天然的或人工的添加突變成突變體。這樣的聚合酶，可列舉如DNA聚合酶。而且，此DNA聚合酶，實質上不具有5'→3'外核酸酶活性為宜。這樣的DNA聚合酶可列舉：脂肪嗜熱芽孢桿菌(*Bacillus stearothermophilus*，本說明書中稱為「B. st」)、熱堅芽孢桿菌(*Bacillus caldotenax*，本說明書中稱為「B. ca」)等好熱性桿菌屬來源DNA聚合酶之5'→3'外核酸酶活性已刪除的突變體、大腸桿菌(*E. coli*)來源DNA聚合酶I之克列諾片段等。作為核酸擴增反應中使用的DNA聚合酶，還可列舉：Vent DNA聚合酶、Vent (Exo-)DNA聚合酶、DeepVent DNA聚合酶、DeepVent (Exo-)DNA聚合酶、Φ29噬菌體DNA聚合酶、MS-2噬菌體DNA聚合酶、Z Taq DNA聚合酶、Pfu DNA聚合酶、Pfu turbo DNA聚合酶、KOD DNA聚合酶、9° Nm DNA聚合酶、Therminater DNA聚合酶等。

[0085]而且，上述核酸擴增反應，藉由使用併有反轉錄活性的DNA聚合酶，例如BcaBEST DNA聚合酶、Bca(exo-)DNA聚合酶等，可以只使用一種聚合酶就能進行全RNA或mRNA起始的反轉錄反應及以cDNA為模板的DNA聚合酶反應。又，也可將DNA聚合酶與MMLV反轉錄酶組合使用之。

[0086]核酸擴增反應中使用的其他試藥，可使用例如：



氯化鎂、醋酸鎂、硫酸鎂等觸媒；dNTP混合等受質；托立斯鹽酸緩衝液、酪胺酸緩衝溶液、磷酸鈉緩衝液、磷酸鉀緩衝液等緩衝液。還有使用下列亦可：二甲亞砷(dimethyl sulfoxide)、三甲甘胺酸(N,N,N-trimethylglycine)等添加物；國際公開第99/54455號小冊子中記載的酸性物質、陽離子複合物等。

[0087]核酸擴增反應中，為提高核酸的擴增效率，可以在反應溶液中添加熔點溫度調整劑。核酸的熔點(T_m)，一般而言，依據核酸中的雙股形成部分的核苷酸序列而定。藉由在反應溶液中添加熔點溫度調整劑，可改變此熔點，因此，在一定的溫度下，可調整雙股形成的強度。一般的熔點溫度調整劑具有降低熔點溫度的效果。像這樣，藉由在反應溶液中添加熔點溫度調整劑，可以降低雙股核酸間雙股形成部分的熔點溫度，換言之，可以降低此雙股形成的強度。因此，上述核酸擴增反應中，像這樣，在反應溶液中添加熔點溫度調整劑後，對於形成堅固雙股的GC豐富的核酸區域或形成二級結構的區域，可有效率的將雙股部分變單股。藉此，引子之延長反應結束後，下一個引子可輕易的與標的區域雜交，故可提高核酸擴增的效率。本發明中使用的熔點溫度調整劑及其反應溶液中的濃度，由該業者考量影響雜交的其他反應條件，例如鹽濃度、反應溫度等，再適當的選擇。因此，雖然熔點溫度調整劑並無特別限制，以二甲亞砷(DMSO)、甜菜鹼、甲醯胺或甘油、或這些地任意組合為佳，以二甲亞砷(DMSO)為較佳。

[0088]還有，核酸擴增反應中，可以在反應溶液中添加酵素穩定劑。藉此，反應液中的酵素穩定化，可以提高核酸的擴增效率。本發明中使用的酵素穩定劑為甘油、牛血清白蛋白、醣類等該技術分野熟知之物即可，並無特別限制。

[0089]還有，核酸擴增反應，可以添加增強DNA聚合酶、反轉錄酶等酵素的耐熱性的試藥於反應溶液中，以作為酵素穩定劑。藉此，反應液中的酵素穩定化，可以提高核酸的合成效率及擴增效率。這樣的試藥以該技術分野熟知之物即可，並無特別限制。以醣類為佳，以單醣或寡糖為較佳，以海藻糖、山梨醇、甘露糖醇、或這些2種以上的混合物為更佳。

[0090]使用本發明之引子組的核酸擴增反應，在等溫下可以實施。在此，「等溫」是指酵素及引子之實質的可行使機能下，維持大約一定的溫度條件。並且，「大約一定的溫度條件」意指並非只有正確地保持設定的溫度，在不損失酵素及引子之實質機能的程度之溫度變化是被容許的。

[0091]一定的溫度條件下的核酸擴增反應，可藉由保持可維持使用酵素的活性之溫度，得以實施之。又，此核酸擴增反應中，為了引子與標的核酸之緩冷配對，例如，反應溫度設定在此引子的熔點(T_m)附近或在這以下為宜。並且，考量引子的熔點(T_m)，設定在嚴格的程度為宜。因此，此溫度以約 20°C ~約 75°C 為佳，以約 35°C ~約 65°C 為更佳。

[0092]上述核酸擴增反應一直反覆操作，直到酵素失去活性，或引子起始試藥的其中一個用盡為止。

[0093]上述核酸擴增反應，可以含有非天然核苷酸之核酸為模板核酸(標的核酸序列)。本說明書之「非天然核苷酸」意指含有包含於天然核苷酸的鹼基(腺嘌呤、鳥糞嘌呤、胞嘧啶、及胸腺嘧啶或尿嘧啶)以外的鹼基之核苷酸，被併入核酸序列中。可列舉例如，黃苷類、二氨基嘧啶類(diaminopyrimidine)、isoG、isoC (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, p6329-6333, 1995)等。含有非天然核苷酸的標的核酸之擴增，一般使用不具耐熱性的核酸擴增酵素。一方面，為使上述核酸擴增反應可在例如50°C前後的等溫下進行，與過去的PCR方法比較，核酸擴增酵素(DNA聚合酶等)失去活性的可能性低。因此，使用本發明之引子的核酸擴增反應，對於使用不具耐熱性的核酸擴增酵素之含有非天然核苷酸的標的核酸之擴增亦有效。含有非天然核苷酸的標的核酸之擴增所使用的酵素，若有能將這樣的標的核酸擴增之物即可，並無特別限定。特別自併入效率的觀點來看，適合者為：Y188L/E478Q突變型HIV I反轉錄酶、AMV反轉錄酶、DNA聚合酶之克列諾片段、9° N DNA聚合酶、HotTub DNA聚合酶等(Michael Sismour 1 et al., Biochemistry 42, No.28, p8598, 2003/美國專利第6617106號說明書、Michael J. Lutz et al., Bioorganic & Medical Chemistry letters 8, p1149-1152, 1998等)。並且，使核酸擴增酵素的耐熱性升高的物質，例如海藻糖等，可添加於反應溶液，藉此，能更有效率地進行含有非天然核苷酸的標的核酸之擴增。

[0094]藉由本發明之核酸擴增反應得到擴增產物的存

在，有許多方法可以檢測。其中一個方法，藉由一般的凝膠電泳檢測特定大小的擴增產物。此方法，例如，可藉溴化乙啶或SYBR green等螢光物質來檢測。其他方法，使用像生物素一樣有標記的標記探針，藉其與擴增產物雜交而檢測之。生物素是藉由與螢光標記的抗生物素蛋白、與像過氧化酶一樣的酵素結合的抗生物素蛋白等結合，而可以檢測。還有別的方法，可使用免疫層析法。此方法，旨在使用利用肉眼可以檢出的標記之層析法介質(免疫層析法)。上述擴增斷片與標記探針雜交，一旦該擴增斷片之其他不同序列與可雜交的捕獲探針(capture probe)固定於層析法介質，可捉住其固定部分，可在層析法介質檢出。其結果，可以肉眼簡單的檢出。另外，本發明之核酸擴增反應，因核酸擴增反應之擴增效率非常高，利用擴增的副產物焦磷酸的生成，可間接地檢出擴增產物。這樣的方法，例如，利用焦磷酸與反應溶液中的鎂結合而生成焦磷酸鎂的白色沉澱，目測反應溶液的白濁度的觀察方法。又，其他方法，藉焦磷酸與鎂等金屬離子強力結合而形成不溶性鹽類，利用反應溶液中鎂離子濃度顯著減少的方法。此方法，在反應溶液中預先加入隨鎂離子濃度變化的金屬指示劑(例如，染毛色媒黑T (Eriochrome Black T)、羥基萘酚藍 (Hydroxy Naphthol Blue)等)，以目視觀察反應溶液顏色的變化，可以檢測擴增之有無。並且，利用鈣黃綠素 (Calcein)，因可以目視觀察伴隨擴增反應螢光的增大，同步的擴增產物之檢測成為可能。



[0095]本發明適宜的實施狀態下，檢測本發明之核酸擴增反應得到擴增產物的存在，可藉由觀察因擴增產物的生成所致之固相攜帶體(carrier)凝集。進行此檢測的情況，包含於本發明的引子組之至少其中1種引子，含有固相攜帶體或與固相攜帶體可以結合的部位。固相攜帶體或與固相攜帶體可以結合的部位，在引子的3'末端部位、5'末端部位、中央區域等，任一部位導入皆可，以在5'末端部位導入為宜。或者，在核酸擴增反應使用的受質，包含固相攜帶體或與固相攜帶體可以結合的部位亦可。

[0096]本發明使用的固相攜帶體可以使用下列任何一個：不溶於核酸擴增反應使用的反應溶液之攜帶體；或者在擴增前後，由液相到固相(膠狀)、或固相(膠狀)到液相，型態變化的相變化攜帶體。適宜的固相攜帶體可列舉：不溶於水的有機高分子攜帶體、不溶於水的無機高分子攜帶體、合成高分子攜帶體、相變化攜帶體、金屬脈絡膜、磁性粒子等，還有不溶於溶媒的有機高分子攜帶體、不溶於溶媒的無機高分子攜帶體、溶於溶媒的有機高分子攜帶體、凝膠高分子攜帶體等。又，不溶於水的有機高分子可列舉如：多孔矽石、多孔玻璃、矽藻土、矽鈣石等矽含有物；硝化纖維素、羥磷灰石、洋菜糖、聚葡萄糖、纖維素、羧甲基纖維素等多醣類的架橋體；甲基化白蛋白、明膠、膠原蛋白、酪蛋白等蛋白質的架橋體；膠狀粒子、染料溶膠等。不溶於水的無機高分子可列舉如：氧化鋁、氧化鈦、陶瓷粒子等。合成高分子可列舉如：聚苯乙烯、聚甲基丙

烯酸鹽、聚乙烯醇、聚丙烯腈、或以上這些物質之共聚物；
苯乙烯-苯乙烯磺酸共聚物、乙酸乙烯酯-丙烯酸酯共聚物。
金屬脈絡膜可列舉如：金脈絡膜等。磁性粒子可列舉如：
磁性酸化鐵的珠子、表面有磁性酸化鐵的微粉碎粒子之單
分散性超能磁性粒子(特表平4-501959號公報)、具有以聚合
性矽烷膜包覆之超能磁性酸化鐵的磁氣回應粒子(特公平
7-6986號公報)、在有機引子中封入微粉末狀的可以磁化的
粒子等。磁性化固相攜帶體，利用磁力即可簡單地進行固
體與液體的分離。固相攜帶體的形狀可列舉粒子、膜、纖
維狀、濾紙等。固相攜帶體的形狀以粒子為特佳，其表面
為多孔或非多孔皆宜。特佳的固相攜帶體可列舉：合成高
分子攜帶體被水等平均地散佈之乳膠、金脈絡膜等之金屬
脈絡膜粒子、磁珠等的磁性粒子。

[0097]引子或受質朝向固相攜帶體的固定化，可以該業
者眾所周知的方法進行，物理的結合或化學的結合的任一
方法皆可。引子或受質朝向固相攜帶體的固定化，一般而
言，可將下列二者組合後進行之：將引子或探針等寡核苷
酸標記化之物質、及將可與之結合的物質結合在固相攜帶
體。以這樣的目的使用的物質組合，可使用該技術領域眾
所周知之物，可列舉如：生物素與抗生物素蛋白或鏈抗生
物素蛋白之組合、抗原及與之結合的抗體之組合、配位子
(ligand)及與之結合的接受體(receptor)之組合、可互相雜交
的2個核酸之組合等。具體而言，例如，藉由以生物素標記
的引子或受質，與表面塗佈抗生物素蛋白或鏈抗生物素蛋



白的固相攜帶體結合，而可將引子或受質固定於固相攜帶體。上述抗原可列舉如FITC、DIG、DNP等半抗原(hapten)，與之結合的抗體為抗FITC抗體、抗DIG抗體、抗DNP抗體等之抗體。又，這些抗體為單株抗體或多株抗體之任一皆可。特別的是，由於生物素與鏈抗生物素蛋白的結合專一性高、結合效率良好，這樣的組合為特佳。生物素、半抗原、配位子等標記物質的任一個，單獨或依需求成複數的組合，以眾所周知的方法(請參照特開昭59-93099號公報、特開昭59-148798號公報、及特開昭59-204200號公報)，可導入於引子的5'末端部位。

[0098]本發明使用的固相攜帶體與可能結合的部位(或基)，可藉由為了使引子或受質朝向固相攜帶體的固定化而使用的上述方法來選擇。因此，與固相攜帶體可能以物理的結合之物、或可能以化學的結合之物的任一皆可，以能專一性結合者為宜。與這樣的固相攜帶體可能結合的部位，如上所述，可列舉：生物素、抗生物素蛋白、鏈抗生物素蛋白、抗原、抗體、配位子、接受體、核酸、蛋白質等。以生物素或鏈抗生物素蛋白為佳，以生物素為較佳。藉由使用包含這樣的部位之引子或受質，進行核酸擴增反應之後，擴增產物可結合在固相攜帶體。這種情況使用的固相攜帶體，因應需要，可含有包含於引子或受質的上述部位之結合對象。這樣的結合對象，與包含於引子或受質的上述部位之結合以可能的形式存在，以在固相攜帶體表面上存在之物為佳，以在固相攜帶體表面上塗佈之物為較佳。

[0099]本發明的一個實施型態，針對複數的標的核酸，個別安排本發明的引子組，這些複數的引子組以可互相分辨的形式，固定於固相攜帶體，使用這些固定化引子組進行核酸擴增反應。藉此，複數的標的核酸同時擴增，以能分辨的形式，可以檢測個別的擴增產物。擴增產物的檢測，可使用嵌插劑(intercalater)以進行之。例如，在平面狀的固相攜帶體上，藉由複數的引子在個別的位置固定化，核酸擴增反應及擴增產物檢測後，依據擴增產物檢出的位置，可指出擴增的標的核酸。又，為了這樣的目的可能使用的固相攜帶體，並非只有上述的平面狀固相攜帶體，可使用該技術領域眾所周知之物：互相可以分辨的珠子表面(美國專利第6046807號說明書及美國專利第6057107號說明書)；將個別的引子組已固定化於纖維狀攜帶體之物綁成束後，切成薄片以製成準平板攜帶體(特開2000-245460號公報)等。

[0100]因為本發明的核酸擴增法得到的擴增斷片由通常的鹼基構成，擴增後，使用擴增斷片內部的限制酵素部位，在適當的載體(vector)上做次選殖(subcloning)。此外，上述擴增斷片，可像RFLP一樣處理限制酵素，也可廣泛應用於基因檢查領域。又，上述擴增斷片，可以生成含有RNA聚合酶的啟動子(promoter)序列之物，藉此，可以自擴增斷片直接合成RNA。這樣合成的RNA，可做為RNA探針、siRNA來使用。

[0101]本發明的核酸擴增法，可以使用經生物素或螢光物質標記的鹼基，取代通常的dNTP為受質。藉此，可調製

以生物素或螢光物質標記的DNA探針。而且，透過此生物素或標記物質等的某構造，可確認擴增產物的有無。

[0102]包含於本發明的引子組的引子，可以包含限制酵素辨識部位，藉此，可以提高核酸擴增的效率。意即，藉由對應於引子內限制酵素辨識部位的限制酵素，使擴增產物中生成核酸鏈裂，以此核酸鏈裂為合成起點，可生成鏈替代型的互補鏈合成反應。此方法，基本上是以在發明背景中記載的SDA法的原理為基礎。

[0103]又，包含於本發明引子組的引子，可以含有RNA聚合酶的啟動子序列，藉此，可以提高核酸擴增效率。此方法，基本上是以在發明背景中記載的NASBA法的原理為基礎。

[0104]並且，本發明引子組可以含有LAMP法或SDA法中利用的外側引子(outer primer)，藉此，可以提高核酸擴增效率。外側引子在模板核酸之標的序列外側的位置部分，可作為提供互補鏈合成起點的引子。

[0105]藉由本發明的核酸擴增法，可以簡便且迅速的製作為了固定於DNA尖端(tip)的單股核酸、為了決定鹼基序列的單股DNA探針、為了長鏈PCR法的大引子(megaprimer)等。又，藉由本發明的核酸擴增法，因應目的，可以選擇只有標的核酸的正意(sense)序列或只有反意(antisense)序列進行擴增。

[0106]藉本發明的核酸擴增法調製的單股核酸，可做為為了固定於DNA尖端的DNA斷片來使用。意即，本發明的

核酸擴增法，可應用於在DNA尖端製作中，調製為了固定化的DNA鏈的方法。又，將引子的5'末端預先固定於DNA尖端上，在此尖端上進行核酸擴增，也可以製作DNA尖端。又，此核酸擴增進行前，藉由預先在反應溶液中添加與擴增產物雜交的螢光標記探針，在DNA尖端上進行核酸擴增的同時，可同步地檢出擴增產物。

[0107]利用使用本發明的引子組的核酸擴增法，可以檢測(判定)核酸試料中核酸序列的突變之有無。為此目的，可設計將突變部位包含於上述序列(A)或上述序列(B)的引子組，藉此，透過確認擴增產物的有無，可以檢測(判定)上述突變的有無。

[0108]本發明的突變檢測法，使用以具有目標突變的核酸序列為標的核酸序列而設計的引子組之情況下，核酸擴增反應後，擴增產物的存在表示突變的存在，擴增產物不存在或減少表示突變不存在。另外，使用以不具目標突變的核酸序列為標的核酸序列而設計的引子組之情況下，核酸擴增反應後，擴增產物的存在表示突變的不存在，擴增產物不存在或減少表示突變存在。在此，「擴增產物的減少」意指：得到的擴增產物的量，相較於核酸試料中存在標的核酸序列時得到的量，減少了。

[0109]本發明的「突變」意指核酸序列中存在與對照核酸序列相異的鹼基(雙股核酸的情況下為鹼基對)。本發明中「突變」包含鹼基的缺失、插入、附加、置換。又，本發明的「對照核酸」是指關於某特定的鹼基序列，有其標準

的鹼基序列，例如以標準的基因型存在之野生型(wild type，也稱為正常型(normal type))的序列。相對於此，「被檢核酸」意指本發明的突變檢測法中，為是否具有與對照核酸相異的鹼基(突變)的對象的核酸。換言之，為存在核酸試料中的核酸，去除與突變相關的鹼基後，具有與對照核酸一樣的序列。並且，本發明的「突變相關的鹼基」或「突變相關的核苷酸殘基」意指在核酸中突變的部位上存在的鹼基或核苷酸殘基。因此，亦指包含於對照核酸的突變部位的鹼基或核苷酸殘基，及包含於突變核酸的突變部位的鹼基或核苷酸殘基的任一者。例如，檢測疑有基因疾病的患者之基因突變的情況下，被疑有突變的患者之基因為被檢核酸，對應於此基因的正常人的基因為對照核酸。

[0110]上述被檢核酸及對照核酸，可為天然物來源的核酸或人工合成的核酸皆可。本發明使用的所謂「核酸」的用詞意指含有任意的未修飾的核苷酸及/或修飾的核苷酸之聚核苷酸(polynucleotide)。被檢核酸及對照核酸，典型為互補DNA(cDNA)、基因體DNA(genome DNA)、合成DNA等DNA或mRNA、全RNA、hnRNA、siRNA、合成RNA等RNA。又，本發明使用的所謂「聚核苷酸」的用詞，簡便而言，包含聚核苷酸及寡核苷酸，同時也包含胍肽核酸、嗎啉基(morpholino)核酸、甲基磷酸酯(methylphosphonate)核酸、S-寡核酸等人工合成核酸。被檢核酸及對照核酸，可由試驗實施者自由選擇。並且，執行檢測時，這些核酸混在一起也可以。

[0111]包含被檢核酸的核酸試料，被檢體，例如可以自人類或非人類動物取得。這種情況，自該被檢體的預期之組織、臟器及細胞等的樣本，可以該技術領域眾所周知的方法，萃取出核酸。因應需求，可在萃取後依據核酸斷片的大小及精製純度等條件，調整到適當的狀態。之後，更藉由一般的聚合酶連鎖反應(PCR)等進行擴增反應，將核酸試料中的被檢核酸擴增。

[0112]被檢核酸及對照核酸，是單股或雙股皆可。本發明使用的所謂「雙股核酸」的用詞意指雙股DNA、雙股RNA及DNA/RNA的任何一個。雙股核酸就這樣用作核酸試料亦可，使用以噬菌體或質體等載體擴增之物亦可。

實施例

[0113]其次，說明本發明的實施例。但是，本發明並不限制及限定於下述實施例。

[0114](實施例1)

本實施例，第一引子及第二引子的其中一方附有摺疊序列(D-D')的情況下，及第一引子附有摺疊序列(D-D')、第二引子附有摺疊序列(E-E')的情況下，使用此2種引子組在等溫下進行擴增。

[0115]容積25 μ L的液體中，在最終濃度為1.4mM dNTP、5% DMSO、20mM Tris-HCl (pH 8.0)、30mM 醋酸鉀、10mM 硫酸鈉、8mM 硫酸鎂、0.1% Tween20、1/100000稀釋SYBR Green (寶酒造公司製作)及12 unit Aac DNA聚合酶的溶液中，以個別2 μ M濃度，加入如下所示序列的順

向引子(順向引子1：序列編號1、及順向引子2：序列編號2)及反向引子(反向引子1：序列編號3、及反向引子2：序列編號4)，以成為反應溶液。而且，下述引子中，以底線標示處為摺疊序列，以方框包圍處為順向及反向引子的共通序列。

[0116]

Forward 引子1(序列編號1)

5' -AGGACGCTGAGATGCGTCCTAGCGATGCGTAGACAACTGGAAAG-3'

Forward 引子2(序列編號2)

5' -AATATATATATATATTCGGAGGAGGTGGAGGAGACAACTGGAAAG-3'

Reverse 引子1(序列編號3)

5' -AGCGATGCGTATGGGCCTATTGGA-3'

Reverse 引子2(序列編號4)

5' -ACCTTCTGTTACCCCTCAGAAGGTCGGAGGAGGTGGAGGATGGGCCTATTGGA-3'

[0117]做為模板DNA，將具有流行性感冒A(H3N2) RNA 基因體N2分段(Influenza A(H3N2) RNA genome N2 segment)的互補DNA的部分序列(序列編號5)之質體DNA，以 2×10^4 拷貝(copies)加入反應溶液，使用RealtimePCR裝置MX3000p (Agilent製)，60°C、60分鐘，在一定的溫度下進行反應，藉由透過FAM Filter所得的螢光擴增曲線，調查核酸擴增活性。又，為了調查核酸擴增產物，提供反應後的溶液5 μ L，於使用3%(w/v) NuSieve洋菜糖之洋菜凝膠電泳，藉由溴化乙啶(ethidium bromide)染色，以觀察帶圖樣(band pattern)。

[0118]流行性感冒A(H3N2) N2片段，部分的互補DNA (序列編號5)

401鹼基對

5'-CCAGGAGTCAGAATGCGTTTGTATCAATGGAAC TTGTACAGTAGTAATGACTG
 ATGGGAGTGCTTCAGGAAAAGCTGATACTAAAATACTATTTCATTGAGGAGGGGA
 AAATCGTTCATACTAGCACATTGTCAGGAAGTGCTCAGCATGTCGAGGAGTGCT
 CCTGCTATCCTCGATATCCTGGTGTCAGATGTGTCTGCAGAGACAACTGGAAAGG
 CTCCAATAGGCCCATCGTAGATATAAACATAAAGGATCATAGCATTGTTTCCAGTT
 ATGTGTGTTTCAGGACTTGTGGAGACACACCCAGAAAAACGACAGCTCCAGC
 AGTAGCCATTGTTTGGATCCTAACAATGAAGAAGGTGGTCATGGAGTGAAAGGC
 TGGGCCTTTGATGATGGAAATG-3'

[0119](結果1:使用只有順向引子有摺疊序列的引子之情況下的等溫反應結果)

圖13表示在使用順向引子1(序列編號1)及反向引子1(序列編號3)的情況下，加入模板DNA(○)及無模板DNA(●)之個別的螢光擴增曲線(○及●的意義與以下的實施例相同)。如圖所示，加入模板DNA者之螢光訊號的增加確認為顯著。又，圖14的照片顯示，圖13之螢光訊號增加確認的反應溶液之洋菜凝膠電泳結果。如圖14所示，觀察由短鏈變長鏈之週期的帶樣圖，等溫核酸擴增的進行是明確的。

[0120](結果2:使用順向引子及反向引子的雙方有迴異的摺疊序列之引子的情況下之等溫反應結果)

圖15表示在使用順向引子2(序列編號2)及反向引子2(序列編號4)的情況下之螢光擴增曲線。如圖15所示，和上述結果1一樣，加入模板DNA者之螢光訊號的增加確認為顯著。又，圖16的照片顯示，圖15之螢光訊號增加確認的反應溶液之洋菜凝膠電泳結果。如圖16所示，觀察由短鏈變長鏈之週期的帶樣圖。但是，與圖14的帶樣圖比較，帶樣



週期的模式不同，具有與上述結果1的情況不同之帶樣圖的等溫核酸擴增之進行是明確的。

[0121](實施例2)

本實施例使用的第一引子及第二引子雙方，其摺疊序列(D-D')或摺疊序列(E-E')共同序列(C)之間，已插入介入序列(H)的情況下，標的核酸序列在等溫下進行擴增反應。又，在第一引子及第二引子中，介入序列(H)是相異的。

[0122]引子以外的反應組成液，與上述實施例1一樣。意即，容積25 μ L的液體中，在最終濃度為1.4mM dNTP、5% DMSO、20mM Tris-HCl (pH 8.0)、30mM 醋酸鉀、10mM 硫酸鈉、8mM 硫酸鎂、0.1% Tween20、1/100000稀釋SYBR Green (寶酒造公司製作)及12 unit Aac DNA聚合酶的溶液中，以個別2 μ M濃度加入，引子為如下所示序列的順向引子(順向引子3：序列編號6)及反向引子(反向引子3：序列編號7)，以成為反應溶液。而且，下述引子中，以底線(一條底線)標示處為摺疊序列，以方框包圍處為順向及反向引子的共通序列，還有以二條底線標示處為介入序列。

[0123]

Forward 引子3(序列編號6)

5' -GCATTCACCCCCCCGATTAGATATCTATAGACAACCTGGAAAG-3'

Reverse 引子3(序列編號7)

5' -AGGACGCTGAGATGCGTCCTTTTTTTGATTAGATATCTATATGGGCCTATTGGA-3'

[0124]又，與上述實施例1一樣，做為模板DNA，將具有流行性感冒A(H3N2) RNA基因體N2分段(Influenza A(H3N2) RNA genome N2 segment)的互補DNA的部分序列

(序列編號5)之質體DNA，以 2×10^4 拷貝(copies)加入反應溶液，使用RealtimePCR裝置MX3000p(Agilent製)， 60°C 、90分鐘，在一定的溫度下進行反應，藉由透過FAM Filter所得的螢光擴增曲線，調查核酸擴增活性。又，為了調查核酸擴增產物，提供反應後的溶液 $5\mu\text{L}$ ，於使用3%(w/v) NuSieve 洋菜糖之洋菜凝膠電泳，藉由溴化乙啶(ethidium bromide)染色，以觀察帶圖樣(band pattern)。

[0125](結果3：使用持有介入序列(H)的引子的情況下之等溫反應結果)

圖17表示在使用順向引子3(序列編號6)及反向引子3(序列編號7)的情況下之螢光擴增曲線。如圖17所示，加入模板DNA者之螢光訊號的增加確認為顯著。又，圖18的照片顯示，圖17之螢光訊號增加確認的反應溶液之洋菜凝膠電泳結果。如圖18所示，觀察由短鏈變長鏈之週期的、每2條一組的帶樣圖，等溫核酸擴增的進行是明確的。

[0126](實施例3：第三引子的效果)

本實施例中，針對標的核酸與第一引子及第二引子之緩冷配對區域，以互補設計了第三引子，顯示其提高了本發明的等溫擴增反應的效果。

[0127]首先，本實施例使用的第一引子及第二引子雙方，其摺疊序列(D-D')或摺疊序列(E-E')共同序列(C)之間，使用已插入介入序列(H)之物。引子以外的反應組成液，與上述實施例1一樣。意即，容積 $25\mu\text{L}$ 的液體中，在最終濃度為 1.4mM dNTP、 5% DMSO、 20mM Tris-HCl (pH 8.0)、 30mM

醋酸鉀、10mM 硫酸鈉、8mM 硫酸鎂、0.1% Tween20、1/100000稀釋SYBR Green (寶酒造公司製作)及12 unit Aac DNA聚合酶的溶液。引子如以下所示序列的順向引子(順向引子4：序列編號8)為第一引子，及反向引子(反向引子4：序列編號9)為第二引子，各以2 μ M濃度加入；還有第三引子，下述引子(增強引子1或2：序列編號10或11)以0.6 μ M濃度加入，以形成反應溶液。而且，下述引子中，以底線(一條底線)標示處為摺疊序列，以方框包圍處為順向及反向引子的共通序列，還有以二條底線標示處為介入序列。

[0128]

Forward 引子4(序列編號8)

5'-AGGACGCTGAGATGCGTCCTTTTAGCGATGCGTTGAATATAAACTTGTGGTAGT-3'

Reverse 引子4(序列編號9)

5'-GCGACTCGCCAGCGATGCGTCTGAATTAGCTGTATCGTCAAG-3'

Boost 引子1(序列編號10)

5'-CAAGAGTGCC-3'

Boost 引子2(序列編號11)

5'-CCACCAGCTCC-3'

[0129]本實施例，以含有k-ras基因部分序列(序列編號12)為標的序列，使用人類基因體DNA為模板DNA(Promega公司製Human Genomic DNA, Male; Cat# G1471)。反應溶液中加入上述人類基因體DNA 10ng，使用RealtimePCR裝置MX3000p(Agilent製)，60 $^{\circ}$ C、100分鐘，在一定的溫度下進行反應，藉由透過FAM Filter所得的螢光擴增曲線，調查核酸擴增活性。又，為了調查核酸擴增產物，提供反應後的

溶液5 μ L，於使用3%(w/v) NuSieve洋菜糖之洋菜凝膠電泳，藉由溴化乙啶(ethidium bromide)染色，以觀察帶圖樣(band pattern)。

[0130]人類基因體，部分DNA(序列編號12)

401鹼基對

5'-TTTCATGATTGAATTTTGTAAGGTATTTTGAAATAATTTTTCATATAAAGGTGAG
TTTGTATTAAGGTACTGGTGGAGTATTTGATAGTGTATTAACCTTATGTGTGAC
ATGTTCTAATATAGTCACATTTTCATTATTTTATTATAAAGGCCTGCTGAAAATGAC
TGAATATAAACTTGTGGTAGTTGGAGCTGGTGGCGTAGGCAAGAGTGCCTTGAC
GATACAGCTAATTCAGAATCATTTTGTGGACGAATATGATCCAACAATAGAGGTA
AATCTTGTTTTAATATGCATATTACTGGTGCAGGACCATTCTTTGATACAGATAAA
GGTTTCTCTGACCATTTTCATGAGTACTTATTACAAGATAATTATGCTGAAAGTTA
AGTTATCTGAAA-3'

[0131](結果4：使用第三引子的情況下之等溫反應結果)

圖19表示使用順向引子4(序列編號8)及反向引子4(序列編號9)做為第一引子及第二引子的情況下之螢光擴增曲線。圖20~22為除了第一引子及第二引子，再加入第三引子的情況下之螢光擴增曲線：圖20的反應為只有增強引子1、圖21的反應為只有增強引子2、圖22的反應為加入兩者增強引子1及2的結果。

[0132]首先，圖19的結果，加入模板DNA的情況下，確認螢光訊號的增加為80分以下。其次，加入增強引子1的圖20的結果，不認為與圖19的螢光擴增曲線有所差異。加入增強引子2的圖21的結果，加入模板DNA的情況下，確認螢光訊號的增加為50分以下。並且，加入兩者增強引子1及2的圖22，和圖21的結果一樣的時間內，訊號升高的螢光擴增曲線是確認的。圖23顯示，圖19~22之螢光訊號增加確認

的反應溶液之洋菜凝膠電泳結果。由此結果，螢光訊號被確認的、加入模板DNA的情況下之反應溶液，以由短鏈變長鏈之週期的帶樣圖為擴增產物觀察之，等溫核酸擴增在反應溶液中的進行是明確的。又，加入增強引子2或加入兩者增強引子1及2的情況下，較長鏈的核酸擴增產物增加的事是確認的。由此電泳結果及圖19~22之結果，本實施例中藉第一引子及第二引子進行的等溫核酸擴增，藉由以增強引子2為第三引子之作用，此核酸擴增效率顯著上升的事是明確的。

[0133](實施例4)

本實施例之等溫核酸擴增法，在25 μ L的液體中，在最終濃度為1.4mM dNTP、5% DMSO、20mM Tris-HCl (pH 8.0)、10mM 氯化鉀、10mM 硫酸銨、8mM 硫酸鎂、0.1% Tween20、1/100000稀釋SYBR Green (寶酒造公司製作)及6 unit Aac DNA聚合酶(DNAFORM公司製)的溶液中，以個別2.5 μ M濃度，加入如下所示序列的順向引子5 (序列編號13)、及反向引子5 (序列編號14)，以成為反應溶液。而且，下述各引子中，以底線標示處為摺疊序列，以方框包圍處為順向及反向引子的共通序列。

[0134]順向引子5(序列編號13)

44-單元

5'-GCGCGCGCTAAATCGCGACTATCGTCTCAGCTATGAACACAGCA-3'

反向引子5(序列編號14)

49-單元

5'-GAAGGATTCTTCTAAATCGCGACTATCGTCTTCTCCTTTTCCCATTCC-3'

[0135]並且，做為模板DNA，將具有B型流行性感
冒RNA基因體MP分段(Influenza B RNA genome MP segment)
的互補DNA的部分序列(序列編號15)之質體DNA，以 6×10^3
拷貝(copies)加入反應溶液。又，短鏈模板DNA之擴增，以
順向引子5及反向引子5之緩冷配對序列、及被這兩者挾著
的相當於B型流行性感
冒RNA基因體MP分段的互補DNA的
部分序列(序列編號15之底線標示處)52-單元的寡核苷酸為
模板DNA。在反應溶液中加入 6×10^3 拷貝(copies)上述模板
DNA。

[0136]B型流行性感
冒MP片段，部分的互補DNA(序列編號15)

740鹼基對

5'-AGCAGAAGCACGCACTTTCTTAAAATGTCGCTGTTTGGAGACACAATTGCCTA
CCTGCTTTCATTGACAGAAGATGGAGAAGGCAAAGCAGAACTAGCAGAAAAAT
TACACTGTTGGTGGTGGGAAAGAATTTGACCTAGACTCTGCCTTGAATGGAT
AAAAACAAAAGATGCTTAACTGATATACAAAAAGCACTAATTGGTGCCTCTATA
TGCTTTTTAAAACCCAAAGACCAGGAAAGAAAAAGAAGATTCATCACAGAGCC
CTTATCAGGAATGGGAACAACAGCAACAAAAAAGAAAGGCCTGATTCTGGCTG
AGAGAAAAATGAGAAGATGTGTGAGCTTTCATGAAGCATTGAAATAGCAGAAG
GCCATGAAAGCTCAGCGCTACTATACTGTCTCATGGTCATGTACCTGAATCCTGG
AAATTATTCAATGCAAGTAAACTAGGAACGCTCTGTGCTTTATGCGAGAAACA
AGCATCACATTCACACAGGGCTCATAGCAGAGCAGCGAGATCTTCAGTGCCTGG
AGTGAGACGAGAAATGCAGATGGTCTCAGCTATGAACACAGCAAAAAACAATGA
ATGGAATGGGAAAAGGAGAAGACGTCCAAAAGCTGGCAGAAGAGCTGCAAAG
CAACATTGGAGTGCTGAGATCTCTTGGGGCAAGTCAAAGAATGGGGAAGGGA
TTGCAAAGGATGTAATGGAAGTGCTAAAGCAGAGCTCCATGGG-3'

[0137]等溫核酸擴增反應，使用 RealtimePCR 裝置
MX3000p(Agilent製)，60°C、90分鐘，在一定的溫度下培
育(incubation)進行反應，藉由透過FAM Filter所得的螢光擴
增曲線，調查核酸擴增之有無。

[0138]擴增反應結束後，為了調查核酸擴增產物，提供反應後的溶液5 μ L，於使用4.5%(w/v) NuSieve洋菜糖之洋菜凝膠電泳，藉由溴化乙啶(ethidium bromide)染色，以觀察帶圖樣(band pattern)。又，關於以B型流行性感冒互補DNA質體(FluB cDNA plasmid)為模板之擴增產物，將以洋菜凝膠電泳確認的DNA帶切下，使用Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega公司製)萃取DNA。此純化的DNA斷片之3'末端上，使用TAKARA ExTaq DNA聚合酶(寶酒造公司製作)，60 $^{\circ}$ C、10分鐘的培育(incubation)以進行A附加。使用TOPO TA Cloning Kit (Life Technologies公司製)，於此3' A附加DNA斷片做TA選殖(cloning)。以BigDye Terminator Cycle sequencing kit ver.1.1及ABI3100-Avant (Life Technologies公司製)來定出得到的選殖產物之插入序列，由序列資料分析擴增產物的一級結構。

[0139](結果：使用順向引子及反向引子之兩者具有相異的摺疊序列的情況下之等溫擴增反應結果)

圖24表示使用順向引子5(序列編號13)及反向引子5(序列編號14)的情況下之螢光擴增曲線。此結果，含有做為模板之B型流行性感冒互補DNA之質體(白色圓)，及兩個引子之緩冷配對序列和被這兩者挾著的只有B型流行性感冒的目標區域構成的52-單元之單股寡DNA(灰色四角)的情況下的一方，相較於作為對照實驗未加入模板DNA的情況(黑色三角)，螢光訊號的增加確認為顯著。圖25顯示，提供圖24之擴增反應的反應溶液進行洋菜凝膠電泳的結果。由此

圖可了解，觀察含有模板DNA之反應配製品由短鏈變長鏈之週期的帶樣圖，等溫核酸擴增的進行是明確的。又，提供長鏈雙股之質體為模板DNA的情況，與提供短鏈單股之寡DNA為模板DNA的情況下之帶樣圖的不同並未被確認，同樣的核酸擴增的進行是明確的。

[0140]關於圖25A中箭號1及箭號2所指的帶(band)，定出各DNA的鹼基序列的結果如圖26所示。相當於圖25A中箭號1所指的DNA得到為105鹼基對的鹼基序列，相當於箭號2所指的DNA得到為202鹼基對的鹼基序列。此與洋菜凝膠電泳確認的DNA斷片長度幾乎一致。分析各DNA斷片的一級結構的結果，相當於圖25A中箭號1所指的DNA是來自模板DNA，得到被順向引子及反向引子挾著的擴增子序列一事是明確的(圖26A)。並且，相當於圖25A中箭號2所指的DNA，2個擴增子序列以順方向(串聯)連接的序列是確認的，生成只有一邊的引子摺疊序列包含於在此擴增子的連接部位的形狀是明確的(圖26B)。

[0141](實施例5)

本實施例，探討本發明的等溫核酸擴增法之引子對標的核酸之專一性。在25 μ L的液體中，在最終濃度為1.4mM dNTP、5% DMSO、20mM Tris-HCl (pH 8.0)、10mM 氯化鉀、10mM 硫酸銨、8mM 硫酸鎂、0.1% Tween20、1/100000稀釋SYBR Green I (寶酒造公司製作)及6 unit Aac DNA聚合酶(DNAFORM公司製)的溶液中，以個別2.5 μ M濃度，加入如下所示的順向引子6 (序列編號16)、及反向引子6 (序列

編號17)，以成為反應溶液。而且，下述各引子中，以底線標示處為摺疊序列，以方框包圍處為順向及反向引子的共通序列。

[0142]順向引子6(序列編號16)

49-單元

5'-GAGACTCCGGAGTCTCTCTGGCAGCGCGCATGTACCTGAATCCTGGAAA-3'

反向引子6(序列編號17)

49-單元

5'-TCCGCGCGCGCGCGGATCTGGCAGCGCGCGCGTTCCTAGTTTTACTTGC-3'

[0143]並且，做為模板DNA，將具有B型流行性感
冒RNA基因體MP分段(Influenza B RNA genome MP segment)
的互補DNA的部分序列(序列編號15)之質體DNA，以 6×10^3
拷貝(copies)加入反應溶液。又，與上述模板DNA一起，相
當於1份反應液中加入20ng人類基因體DNA (Human
Genomic DNA, Male, Promega公司製，相當於 10^3 拷貝
(copies))以調製反應溶液。

[0144]使用上述反應溶液的等溫核酸擴增反應、擴增反
應產物的確認，以與實施例4同樣的方法執行。

[0145](結果：使用順向引子及反向引子之兩者具有相異的
摺疊序列的情況下，對等溫核酸擴增之模板DNA上標的部
位的專一性)

圖27表示將順向引子6(序列編號16)及反向引子6(序列
編號17)作為引子，加入以包含此標的序列的B型流行性感
冒互補DNA之質體為模板DNA，同時，加入人類基因體

DNA的情況下之螢光擴增曲線。此結果，添加模板DNA者(白色圓)，及還加入人類基因體DNA(灰色四角)的情況下的任一方，相較於作為對照實驗未加入模板DNA的情況(灰色菱形)，螢光訊號的增加確認為顯著。又，只加入人類基因體DNA為模板的情況下(黑色三角)，螢光訊號的增加未被確認。又，圖28A顯示，提供圖27之擴增反應的反應溶液進行洋菜凝膠電泳的結果。由此圖可了解，觀察含有B型流行性感感冒互補DNA質體為模板DNA之反應配製品，由短鏈變長鏈之週期的帶樣圖，不含模板DNA或只含人類基因體DNA的反應溶液，顯著的擴增帶樣圖無法被確認。因此，本實施例中使用的引子完成等溫核酸擴增，專一地辨認以B型流行性感感冒互補DNA之質體為模板DNA一事是明確的。

[0146]又，關於圖28B中箭號所指的帶(band)，訂出各DNA的鹼基序列的結果如圖29所示。相當於圖28B中箭號所指的DNA得到為105鹼基對的鹼基序列，此與洋菜凝膠電泳確認的DNA斷片長度幾乎一致。分析各DNA斷片的一級結構的結果，確認了：相當於圖28B中箭號所指的DNA，來自模板DNA，含有被順向引子及反向引子挾著的擴增子序列，被相當於兩個引子的3'末端之序列挾著的區間，自緩冷配對區域開始含有連續的對B型流行性感感冒基因具專一性序列之一事。因此，由分析擴增產物的一級結構的結果，也證明了本實施例使用的引子之標的序列辨識之專一性。

[0147](實施例6)

本實施例，探討藉由本發明的等溫核酸擴增法，以RNA

為模板的反轉錄反應溶液，是否能實施直接的等溫核酸擴增。來自實施例4使用的含有B型流行性感冒互補DNA的部分序列之質體DNA，作為如下所示B型流行性感冒互補DNA擴增用引子(序列編號18及19)，藉PCR法製作附加T7啟動子序列之B型流行性感冒互補DNA的直鏈狀雙股DNA。使用此PCR產物與CUGA T7 RNA聚合酶 (Nippon Genetech公司製)，執行生體外反轉錄反應，以酸性苯酚萃取法自反應溶液的到的RNA，作為本實施例反轉錄反應的RNA模板。

[0148]T7/FluB互補DNA擴增用順向引子7(序列編號18)

39-m單元

5'-TAATACGACTCACTATAGGGAGCAGAAGCACGCACTTTC-3'

T7/FluB互補DNA擴增用反向引子7(序列編號19)

20-單元

5'-CCCATGGAGCTCTGCTTTAG-3'

[0149]將上述調製的RNA 200ng，在反轉錄反應液25 μ L (50mM Tris-HCl [pH 8.3]、75mM 氯化鉀、3mM 氯化鎂、10mM DTT、及200 unit M-MLV反轉錄酶 [缺失突變，RNaseH(-)，Promega公司製]、反轉錄引子[序列編號20])中，以42 $^{\circ}$ C反應1小時。之後，為了使M-MLV反轉錄酶失去活性，保持在95 $^{\circ}$ C 5分鐘。

[0150]反轉錄引子(序列編號20)

18-單元

5'-TGGACGTCTTCTCCTTTT-3'

[0151]上述反轉錄反應液的1/4000稀釋的溶液1 μ L，加入等溫擴增反應溶液(試藥組成及引子，與實施例1之記載相同)，使用RealtimePCR裝置MX3000p(Agilent製)，60 $^{\circ}$ C、90分鐘，在一定的溫度下進行反應，藉由透過FAM Filter所得的螢光擴增曲線，調查核酸擴增之有無。為了調查核酸擴增產物，提供反應後的溶液5 μ L，於使用4.5%(w/v) NuSieve GTG 洋菜糖之洋菜凝膠電泳，藉由溴化乙啶(ethidium bromide)染色，以觀察帶圖樣(band pattern)。

[0152](結果：以RNA為模板的反轉錄反應溶液之直接的等溫核酸擴增)

圖30表示使用順向引子5(序列編號13)及反向引子6(序列編號14)的等溫擴增反應中，添加了本實施例做成的反轉錄反應液的1/4000稀釋液之反應配製品(白色圓)，與添加與實施例4相同、以B型流行性感冒互補DNA質體為模板的情況下(灰色四角)比較的結果。結果，相較於以質體為模板者，螢光訊息的初次升高的時間延遲了。添加反轉錄反應液的反應配製品，相較於作為對照實驗未加入模板DNA的情況(黑色三角)，螢光訊號的增加確認為顯著。圖31顯示，提供圖30之擴增反應的反應溶液進行洋菜凝膠電泳的結果。結果，由短鏈變長鏈之週期的帶樣圖，在添加反轉錄反應液之反應配製品中，觀察到與使用模板核酸一樣的帶樣圖，同樣的等溫核酸擴增的進行是明確的。

[0153](實施例7)

本實施例，探討提供給本發明等溫核酸擴增法之引子

的構造，只在其中一方引子，將其位於5'末端之摺疊序列去除的情況下的行為。在25 μ L的液體中，在最終濃度為1.4mM dNTP、5% DMSO、20mM Tris-HCl (pH 8.0)、10mM 氯化鉀、10mM 硫酸銨、8mM 硫酸鎂、0.1% Tween20、1/100000稀釋SYBR Green I(寶酒造公司製作)及6 unit Aac DNA聚合酶(DNAFORM公司製)的溶液中，以個別2.5 μ M濃度，加入如下所示序列的順向引子8 (序列編號21)、及實施例5使用的反向引子6 (序列編號17)。而且，下述各引子中，以方框包圍處為順向及反向引子的共通序列。順向引子8，與去除5'末端的摺疊序列(16鹼基)後的順向引子6(序列編號16)序列是相同的。

[0154]順向引子8 (序列編號22)

33-單元

5'-TCTGGCAGCGCGCATGTACCTGAATCCTGGAAA-3'

[0155]並且，做為模板DNA，將具有B型流行性感冒RNA基因體MP分段(Influenza B RNA genome MP segment)的互補DNA的部分序列(序列編號15)之質體DNA，以 6×10^3 拷貝(copies)加入反應溶液。又，與上述模板DNA一起，相當於1份反應液中加入20ng人類基因體DNA (Human Genomic DNA, Male, Promega公司製，相當於 10^3 拷貝(copies))以調製反應溶液。

[0156]使用上述反應溶液的等溫核酸擴增反應、擴增反應產物的確認，以與實施例4同樣的方法執行。

[0157](結果：除去一邊的引子之5'末端的摺疊序列的情況

下之等溫核酸擴增反應)

圖32表示使用不含5'末端的摺疊序列的順向引子8(序列編號21)及含5'末端的摺疊序列的反向引子6(序列編號17)作為引子，加入以包含此標的序列的B型流行性感冒互補DNA質體為模板DNA，同時，加入人類基因體DNA的情況下之螢光擴增曲線。此結果，添加模板DNA者(白色圓)，及還加入人類基因體DNA(灰色四角)的情況下的任一方，相較於作為對照實驗未加入模板DNA的情況(灰色菱形)，螢光訊號的增加確認為顯著。又，只加入人類基因體DNA為模板的情況下(黑色三角)，螢光訊號的增加未被確認。又，圖33顯示，提供圖32之擴增反應的反應溶液進行洋菜凝膠電泳的結果。結果，觀察含有B型流行性感冒互補DNA質體為模板DNA之反應配製品，由短鏈變長鏈之週期的帶樣圖，不含模板DNA或只含人類基因體DNA的反應溶液，顯著的擴增帶樣圖無法被確認。因此，一邊的引子不含5'末端的摺疊序列的情況下，完成標的模版核酸的等溫核酸擴增一事是明確的。但是，擴增產物的到的帶樣圖相較於實施例5的結果(圖28)，得到相異的帶樣圖。藉由去除一邊引子的5'末端的摺疊序列，得到不同的擴增產物一事是明確的。

[0158](實施例8)

本實施例的等溫核酸擴增法，在25 μ L的液體中，在最終濃度為1.4mM dNTP、5% DMSO、20mM Tris-HCl (pH 8.0)、10mM 氯化鉀、10mM 硫酸銨、8mM 硫酸鎂、0.1%

Tween20、1/100000稀釋SYBR Green I(寶酒造公司製作)及6 unit Aac DNA聚合酶(DNAFORM公司製)的溶液中，以個別2.5 μ M濃度，加入實施例4使用的順向引子5(序列編號13)、及反向引子8(序列編號22)，以形成反應溶液。而且，下述各引子中，以方框包圍處為順向及反向引子的共通序列。反向引子8，與去除5'末端的摺疊序列(13鹼基)後的反向引子5(序列編號14)序列是相同的。

[0159]反向引子8(序列編號22)

36-單元

5'-TAAATCGCGACTATCGTCTTCTCCTTTTCCCATTCC-3'

[0160]並且，做為模板DNA，將具有B型流行性感冒RNA基因體MP分段(Influenza B RNA genome MP segment)的互補DNA的部分序列(序列編號15)之質體DNA，以 6×10^3 拷貝(copies)加入反應溶液。

[0161]使用上述反應溶液的等溫核酸擴增反應、擴增反應產物的電泳、及擴增產物的序列分析，以與實施例4同樣的方法執行。

[0162](結果：除去一邊的引子之5'末端的摺疊序列的情況下之等溫核酸擴增反應及擴增產物的序列分析)

圖34表示使用含5'末端的摺疊序列的順向引子5(序列編號13)及不含5'末端的摺疊序列的反向引子8(序列編號22)作為引子，加入以包含此標的序列的B型流行性感冒互補DNA質體為模板DNA，的情況下之螢光擴增曲線。此結果，使用以包含B型流行性感冒互補DNA之質體為模板DNA的

情況下(白色圓)，相較於作為對照實驗未加入模板DNA的情況(黑色三角)，螢光訊號的增加確認為顯著。又，圖35顯示，提供圖34之擴增反應的反應溶液進行洋菜凝膠電泳的結果。結果，觀察含有模板DNA之反應配製品，由短鏈變長鏈之週期的帶樣圖，等溫核酸擴增的進行是明確的。

[0163]關於圖35中箭號1及箭號2所指的帶(band)，定出各DNA的鹼基序列的結果如圖36所示。相當於圖35中箭號1所指的DNA得到為92鹼基對的鹼基序列，相當於箭號2所指的DNA得到為186鹼基對的鹼基序列。此與洋菜凝膠電泳確認的DNA斷片長度幾乎一致。分析各DNA斷片的一級結構的結果，相當於圖35中箭號1所指的DNA是來自模板DNA，含有被順向引子及反向引子挾著的擴增子序列被複製的序列是明確的(圖36A)。並且，相當於圖35中箭號2所指的DNA，2個擴增子序列以順方向(串聯)，透過GT(鳥糞嘌呤、胸腺嘧啶)的2鹼基連接的序列是確認的。

[0164]以上，參照實施型態以說明此申請發明，此申請發明並不限定於上述實施型態。此申請發明的構成或詳細內容，在此申請發明的範圍內，可做為使該業者能理解各種變更。又，此申請發明說明書中顯示的文獻名稱之全部文獻記載內容，藉由參照這些文獻，使其融入於此申請發明說明書。

【圖式簡單說明】

圖1為本發明之引子組的一例之圖示。

圖2為本發明之引子組的其他例子之圖示。

圖3為本發明之引子組的其他更多例子之圖示。

圖4表示本發明之引子組的擴增反應的一例之模式圖。

圖5A表示關於本發明之核酸的合成方法的反應機轉的一例之模式圖。

圖5B表示關於圖5B之接續的反應步驟之反應機轉的一例之模式圖。

圖6表示以超越核酸鏈裂型延長為基礎的延長鏈交換反應之反應機轉的一例之模式圖。

圖7A表示關於本發明之核酸的合成方法的反應機轉的其他例子之模式圖。

圖7B表示關於圖7A之接續的反應工程之反應機轉的一例之模式圖。

圖8A表示關於本發明之核酸的合成方法的反應機轉的其他更多例子之模式圖。

圖8B表示關於圖8A之接續的反應步驟之反應機轉的一例之模式圖。

圖9A表示關於本發明之核酸的合成方法的反應機轉的其他更多例子之模式圖。

圖9B表示關於圖9A之接續的反應步驟之反應機轉的一例之模式圖。

圖9C表示關於圖9A之接續的反應步驟之反應機轉的其他例子之模式圖。

圖10為關於本發明之引子組的第一引子的一例之圖示。

圖11為LAMP法的例子之圖示。

圖12為SmartAmp2法的例子之圖示。

圖13為使用實施例1的引子組(順向引子1及反向引子1)時的螢光擴增曲線之圖示。

圖14表示確認圖13之螢光訊號增加的反應溶液之洋菜凝膠電泳結果的照片。

圖15為使用實施例1的引子組(順向引子2及反向引子2)時的螢光擴增曲線之圖示。

圖16表示確認圖15之螢光訊號增加的反應溶液之洋菜凝膠電泳結果的照片。

圖17為使用實施例2的引子組(順向引子3及反向引子3)時的螢光擴增曲線之圖示。

圖18表示確認圖17之螢光訊號增加的反應溶液之洋菜凝膠電泳結果的照片。

圖19為使用實施例3的引子組(順向引子4及反向引子4)時的螢光擴增曲線之圖示。

圖20為使用實施例3的增強引子1時的螢光擴增曲線之圖示。

圖21為使用實施例3的增強引子2時的螢光擴增曲線之圖示。

圖22為使用實施例3的增強引子1及2時的螢光擴增曲線之圖示。

圖23表示確認圖19~22之螢光訊號增加的反應溶液之洋菜凝膠電泳結果的照片。

圖24為使用實施例4的引子組(順向引子5及反向引子5)

時的螢光擴增曲線之圖示。

圖25表示確認圖24之螢光訊號增加的反應溶液之洋菜凝膠電泳結果的照片。

圖26表示實施例4的引子組的擴增反應的之模式圖。

圖27為使用實施例5的引子組(順向引子6及反向引子6)時的螢光擴增曲線之圖示。

圖28表示確認圖27之螢光訊號增加的反應溶液之洋菜凝膠電泳結果的照片。

圖29表示實施例5的引子組的擴增反應的之模式圖。

圖30為使用實施例6的引子組(順向引子7及反向引子7)時的螢光擴增曲線之圖示。

圖31表示確認圖30之螢光訊號增加的反應溶液之洋菜凝膠電泳結果的照片。

圖32為使用實施例7的引子組(順向引子8及反向引子6)時的螢光擴增曲線之圖示。

圖33表示確認圖32之螢光訊號增加的反應溶液之洋菜凝膠電泳結果的照片。

圖34為使用實施例8的引子組(順向引子5及反向引子8)時的螢光擴增曲線之圖示。

圖35表示確認圖34之螢光訊號增加的反應溶液之洋菜凝膠電泳結果的照片。

圖36表示實施例8的引子組的擴增反應的之模式圖。

【主要元件符號說明】

(無)

序列表

- <110> 獨立行政法人理化學研究所
達納福股份有限公司
- <120> 引子組與使用該引子組之標的核酸序列擴增方法及突變核酸檢測方法
- <130> TF12023TW
- <150> JP2011-196597
<151> 2011-09-08
- <160> 22
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
<211> 44
<212> DNA
<213> 人工的
- <220>
<223> 順向引子
- <400> 1
aggacgctga gatgcgtct agcgatgct agacaactgg aaag 44
- <210> 2
<211> 45
<212> DNA
<213> 人工的
- <220>
<223> 順向引子
- <400> 2
aatatatata tatattcgga ggaggtggag gagacaactg gaaag 45
- <210> 3
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工的
- <220>
<223> 反向引子
- <400> 3
agcgatgct atgggctat tgga 24
- <210> 4
<211> 53
<212> DNA
<213> 人工的
- <220>
<223> 反向引子
- <400> 4
acctctgtt caccctcaga aggtcggagg aggtggagga tgggcctatt gga 53
- <210> 5
<211> 401
<212> DNA
<213> 人工的
- <220>
<223> 質體DNA
- <400> 5
ccaggagtca gaatcgttt gtatcaatgg aactgtaca gtagtaatga ctgatgggag 60

tgcttcagga aaagctgata ctaaataact attcattgag gaggggaaaa tcgttcatac 120
 tagcacattg tcaggaagtg ctacagcatgt cgaggagtgct tctgctatc ctogatatcc 180
 tgggtgcaga tgtgtctgca gagacaactg gaaaggctcc aataggccca tcgtagatat 240
 aaacataaag gatcatagca ttgttccag ttatgtgtgt tcaggacttg ttggagacac 300
 acccagaaaa aacgacagct ccagcagtag ccattgtttg gatcctaaca atgaagaagg 360
 tggatcatgga gtgaaaggct gggccttga tgatggaaat g 401

<210> 6
 <211> 43
 <212> DNA
 <213> 人工的

<220>
 <223> 順向引子

<400> 6
 gcattcaccc ccccgattag atattctata gacaactgga aag 43

<210> 7
 <211> 55
 <212> DNA
 <213> 人工的

<220>
 <223> 反向引子

<400> 7
 aggacgctga gatgcgtcct tttttgatt agatattcta tatgggccta ttgga 55

<210> 8
 <211> 54
 <212> DNA
 <213> 人工的

<220>
 <223> 順向引子

<400> 8
 aggacgctga gatgcgtcct ttagcgatg cgttgaatat aaactgtgg tagt 54

<210> 9
 <211> 44
 <212> DNA
 <213> 人工的

<220>
 <223> 反向引子

<400> 9
 ggcactcgcc ccagcgatgc gtctgaatta gctgtatcgt caag 44

<210> 10
 <211> 10
 <212> DNA
 <213> 人工的

<220>
 <223> boost primer

<400> 10
 caagagtgcc 10

<210> 11
 <211> 11

<212> DNA
 <213> 人工的
 <220>
 <223> 增強引子(boost primer)
 <400> 11
 ccaccagctc c 11

 <210> 12
 <211> 401
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 12
 ttcatgatt gaattttgta aggtatttg aaataattt tcatataaag gtgagttgt 60
 attaaaagg actggtggag tattgatag tgtattaacc ttatgtgga catgttctaa 120
 tatagtcaca ttttcattat ttttattata aggcctgctg aaaatgactg aatataaact 180
 tgtggtagt ggagctggg gogtaggcaa gagtgcctg acgatacagc taattcagaa 240
 tcattttgtg gacgaatatg atccaacaat agaggtaa atctgtttaa tatgcatatt 300
 actggtgcag gaccattctt tgatacagat aaaggtttct ctgaccattt tcatgagtac 360
 ttattacaag ataattatgc tgaaggtaa gttatctgaa a 401

 <210> 13
 <211> 44
 <212> DNA
 <213> 人工的
 <220>
 <223> 順向引子
 <400> 13
 ggcgcgccta aatcgcgact atcgtctcag ctatgaacac agca 44

 <210> 14
 <211> 49
 <212> DNA
 <213> 人工的
 <220>
 <223> 反向引子
 <400> 14
 gaaggattcc ttctaaatcg cgactatogt ctctccttt toccattcc 49

 <210> 15
 <211> 740
 <212> DNA
 <213> 流行性感 冒B病毒
 <400> 15
 agcagaagca cgcacttct taaaatgctg ctgttggag acacaattgc ctacctgctt 60
 tcattgacag aagatggaga aggcaaagca gaactagcag aaaaattaca ctgttggtt 120
 ggtgggaaag aattgacct agactctgcc ttggaatgga taaaaaaca aagatgctta 180
 actgatatac aaaaagcact aattggtgcc tctatatgct ttttaaaacc caaagaccag 240
 gaaagaaaaa gaagattcat cacagagccc ttatcaggaa tgggaacaac agcaacaaaa 300
 aagaaaggcc tgattctggc tgagagaaaa atgagaagat gtgtgagctt tcatgaagca 360
 ttgaaatag cagaaggcca tgaagctca ggcctactat actgtctcat ggcatgtac 420



ctgaatcctg gaaattattc aatgcaagta aaactaggaa cgctctgtgc ttatgogag 480
 aaacaagcat cacattcaca cagggctcat agcagagcag cgagatcttc agtgcoctgga 540
 gtgagacgag aatgcagat ggtctcagct atgaacacag caaaaacaat gaatggaatg 600
 ggaaaaggag aagacgtcca aaagctggca gaagagctgc aaagcaacat tggagtgtctg 660
 agatctcttg gggcaagtca aaagaatggg gaagggattg caaaggatgt aatggaagtg 720
 ctaaagcaga gctccatggg 740

<210> 16
 <211> 49
 <212> DNA
 <213> 人工的

<220>
 <223> 順向引子

<400> 16
 gagactcogg agtctctctg gcagcgcgca tgtacctgaa tctctgaaa 49

<210> 17
 <211> 49
 <212> DNA
 <213> 人工的

<220>
 <223> 反向引子

<400> 17
 tcgcgcgcgc gcggatctg gcagcgcgcg cgttcttagt ttacttgc 49

<210> 18
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> 人工的

<220>
 <223> 順向引子

<400> 18
 taatacgact cactataggg agcagaagca cgcacttcc 39

<210> 19
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 人工的

<220>
 <223> 反向引子

<400> 19
 cccatggagc tctgctttag 20

<210> 20
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> 人工的

<220>
 <223> RT引子

<400> 20
 tggacgtctt ctctttt 18

<210> 21
 <211> 33

<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 順向引子

<400> 21
tctggcagcg cgcagtacc tgaatcctgg aaa

33

<210> 22
<211> 36
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 反向引子

<400> 22
taaatgcga ctatgtctt ctcttttcc cattcc

36



七、申請專利範圍：

1. 一種引子組，係用於標的核酸序列之等溫擴增方法者，其特徵在於：

該引子組包含第一引子及第二引子，前述第一引子在3'端側含有可與前述標的核酸序列3'端側之序列(A)雜交的序列(A')，前述第二引子在3'端側含有可與前述第一引子之延長鏈或前述標的核酸序列之互補鏈的3'端側序列(B)雜交的序列(B')；而且，前述第一引子及第二引子係分別在其5'端側上含有實質上互為相同之序列(C)。

2. 如申請專利範圍第1項之引子組，其中前述第一引子及第二引子中之至少一者係在前述序列(C)之5'端側上進一步包含摺疊序列(D-D')，且該摺疊序列(D-D')係在同一鏈上含有可互相雜交的二個序列。

3. 如申請專利範圍第1項之引子組，其中前述第一引子係在前述序列(C)之5'端側進一步包含摺疊序列(D-D')，該摺疊序列(D-D')係在同一鏈上具有可互相雜交的二個序列；

前述第二引子係在上述序列(C)之5'端側進一步包含摺疊序列(E-E')，該摺疊序列(E-E')係在同一鏈上具有可互相雜交的二個序列；

並且，前述序列(D-D')及前述序列(E-E')為互異之序列。

4. 如申請專利範圍第1至3項中任一項之引子組，其進一步

- 包含第三引子，該第三引子會與前述標的核酸序列、前述標的核酸序列之互補序列或者前述第一引子之延長鏈或前述第二引子的延長鏈雜交，且上述第三引子之雜交不與前述第一引子及第二引子競爭。
5. 一種等溫擴增方法，係在等溫下使用引子組來擴增標的核酸序列者，其特徵在於：使用如申請專利範圍第1至4項中任一項之引子組作為前述引子組。
6. 一種藉由使用引子組之等溫擴增方法來檢測核酸試料中之核酸序列突變的方法，其特徵在於：

前述引子組係使用如申請專利範圍第1至4項中任一項之引子組，前述引子組係設計如下：以含有前述突變之核酸序列或不合前述突變之核酸序列作為標的核酸序列，且與上述突變相關的核苷酸殘基被包含於第一引子之互補序列(A)或第二引子之互補序列(B)中；

並且，在前述核酸試料存在下，以前述引子組進行等溫擴增反應。

7. 一種核酸合成方法，係於等溫下合成雙股核酸者，該雙股核酸係由一單股核酸及與該單股核酸互補之核酸所構成，而前述單股核酸中至少有二個不同序列之順序會重複至少二次；該核酸合成方法的特徵在於包含下述(A1)~(A6)之各步驟：

(A1)步驟：提供單股模板核酸，該單股模板核酸具主幹迴圈(stem-loop)結構，該結構係包含3'末端的3'端側主幹序列與包含5'末端的5'端側主幹序列透過迴圈序

列連結而成者，且前述3'端側主幹序列之3'末端連結有在同一鏈上含有相互雜交的二個序列之摺疊序列；

(A2)步驟：使引子與前述單股模板核酸之前述迴圈雜交，而使前述引子朝向上述5'端側主幹序列之5'末端延長；

(A3)步驟：使已進行至前述5'端側主幹序列之5'末端的前述引子延長反應從前述5'端側主幹序列之5'末端起連續地持續進行到上述摺疊序列之3'末端序列；

(A4)步驟：使前述(A3)中已進行至前述摺疊序列之3'末端的引子延長反應再次朝向前述5'端側主幹序列之5'末端而連續地持續進行，並且藉由持續進行之前述引子延長反應，使前述(A2)所形成之與單股模板核酸雜交的引子延長鏈藉由鏈替代反應而成為單股；

(A5)步驟：使前述(A4)之引子延長反應在前述5'端側主幹序列的5'末端停止；

(A6)步驟：以前述(A4)中已成為單股之引子延長鏈作為模板，使前述單股模板核酸之前述摺疊序列的3'末端延伸。

8. 如申請專利範圍第7項之核酸合成方法，其將(A3)步驟及(A4)步驟重複至少2次。
9. 如申請專利範圍第7項或第8項之核酸合成方法，其中前述(A1)步驟所提供之前述單股模板核酸係如申請專利範圍第2項之引子組，且該單股模板核酸係藉由使用僅在第一引子含有摺疊序列(D-D')之引子組的等溫擴增

反應而形成者；

並且，在前述(A2)步驟中與前述迴圈雜交之前述引子係含有前述摺疊序列(D-D')的第一引子。

10. 如申請專利範圍第7項之核酸合成方法，其中前述(A1)步驟所提供之前述單股模板核酸係在前述5'端側主幹迴圈序列之5'末端上進一步連結有摺疊序列者，該摺疊序列係在同一鏈上含有可相互雜交的二個序列；

並且，該核酸合成方法包含下述(A3-2)步驟來取代前述(A3)步驟；

(A3-2)步驟：不透過連結至前述5'端側主幹序列之5'末端的前述摺疊序列，使已進行至前述5'端側主幹序列之5'末端的上述引子延長反應直接從前述5'端側主幹序列之5'末端起連續地持續進行到前述摺疊序列的3'末端。

11. 如申請專利範圍第10項之核酸合成方法，其將(A3-2)步驟及(A4)步驟重複至少2次。

12. 如申請專利範圍第10項或第11項之核酸合成方法，其中前述(A1)步驟所提供之前述單股模板核酸係以使用如申請專利範圍第3項之引子組的等溫擴增反應而形成者；

並且，前述(A2)步驟中與上述迴圈雜交之前述引子係如申請專利範圍第3項之引子組的第一引子或第二引子。

13. 一種核酸擴增方法，其特徵在於：包含核酸合成步驟，



該核酸合成步驟係於等溫下合成雙股核酸者，且該雙股核酸係由一單股核酸及與該單股核酸互補之核酸所構成，而前述單股核酸中至少有二個不同序列之順序會重複至少二次；並且，該核酸合成步驟係利用如申請專利範圍第7至12項中任一項之核酸合成方法來實施。

14. 一種核酸合成方法，係於等溫下合成雙股核酸者，且該雙股核酸係由一單股核酸及與該單股核酸互補之核酸所構成，而前述單股核酸中至少有二個不同序列之順序會重複至少二次；該核酸合成方法之特徵在於包含第1反應步驟及第2反應步驟中之至少一者，且該第1反應步驟包含下述(B1)~(B3)之各步驟，第2反應步驟則包含下述(C1)~(C3)之各步驟：

(B1)步驟：在序列方向互呈逆向之狀態下提供2個雙股，該雙股係由一單股核酸及與該單股核酸互補之單股核酸所構成，而該單股核酸係在包含3'末端的區域中含有摺疊序列，該摺疊序列係在同一鏈上具有可相互雜交的二個序列；

(B2)步驟：自前述(B1)之2個雙股中的一個雙股之摺疊序列的3'末端起，以另一個雙股之前述互補單股核酸為模板來引發鏈替代延長反應，而在前述一個雙股之前述單股核酸之延長鏈的一部份上與前述另一個雙股的互補單股核酸雜交，形成雙股；

(B3)步驟：在前述步驟(B2)之部分雙股中，自前述互補單股核酸之3'末端起，藉由以前述單股核酸作為模

板的延長反應，形成完整雙股；

(C1)步驟：提供1個由單股核酸及與該單股核酸互補之單股核酸所構成的雙股，該單股核酸係在包含3'末端之區域中含有摺疊序列，且該摺疊序列係在同一鏈上含有相互雜交的二個序列；

(C2)步驟：自前述(C1)之雙股的前述單股核酸之摺疊序列的3'末端起，以前述互補的單股核酸作為模板，從前述互補的單股核酸的3'末端到5'末端引發鏈替代延長反應而形成部分雙股，該部分雙股係在前述單股核酸之延長鏈的一部份上與前述互補的單股核酸雜交；

(C3)步驟：在前述步驟(C2)的部分雙股中，從上述互補的單股核酸的3'末端起，藉由以前述單股核酸作為模板的延長反應，形成完整雙股。

15. 如申請專利範圍第14項之核酸合成方法，其中前述(B1)步驟及前述(C1)步驟之雙股係藉由使用如申請專利範圍第2或3項之引子組的等溫擴增反應而形成者。
16. 一種核酸擴增方法，其特徵在於：包含核酸合成步驟，該核酸合成步驟係於等溫下合成雙股核酸者，且該雙股核酸係由一單股核酸及與該單股核酸互補之核酸所構成，而前述單股核酸中至少有二個不同序列之順序會重複至少二次；並且，該核酸合成步驟係利用如申請專利範圍第14或15項之核酸合成方法來實施。

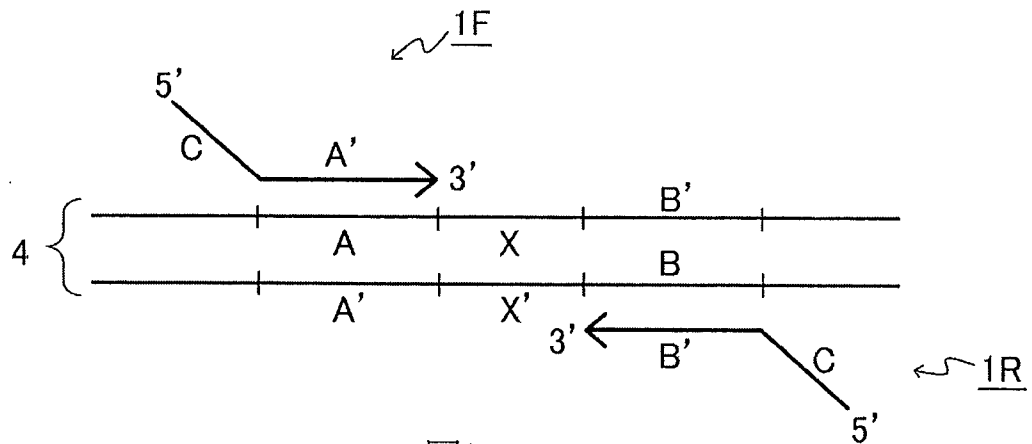


圖1

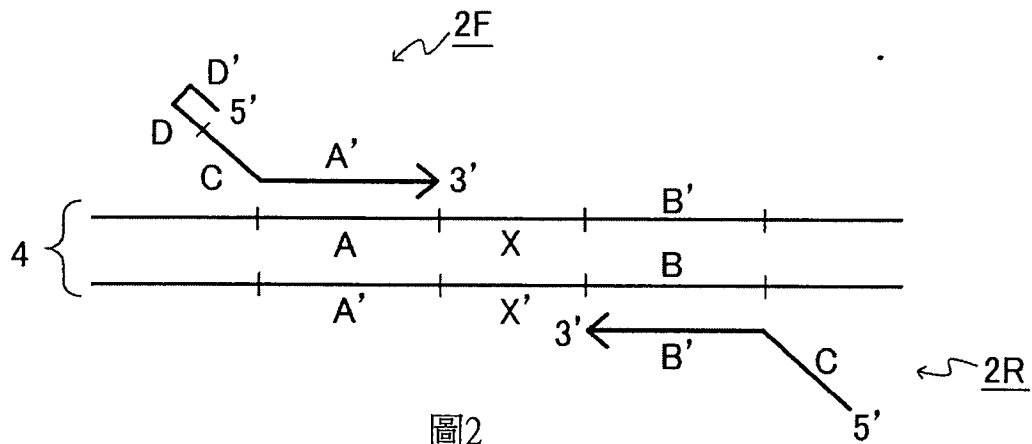


圖2

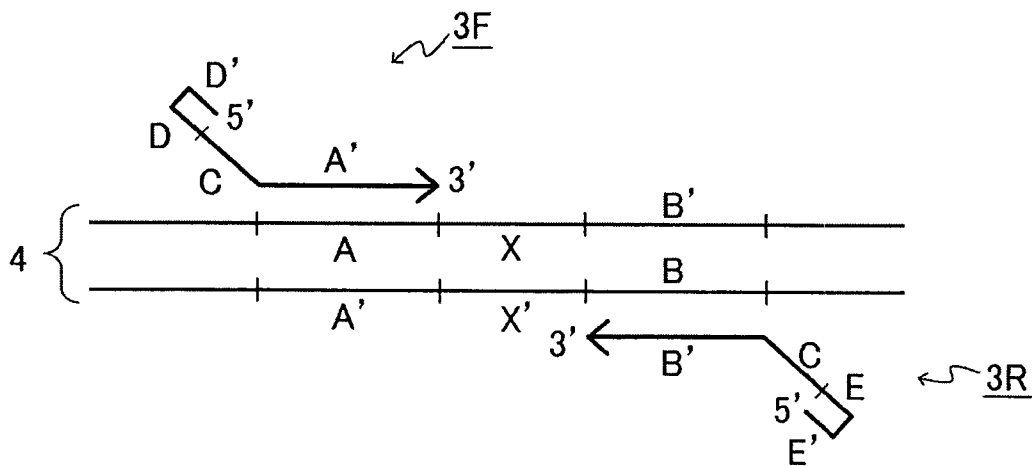


圖3

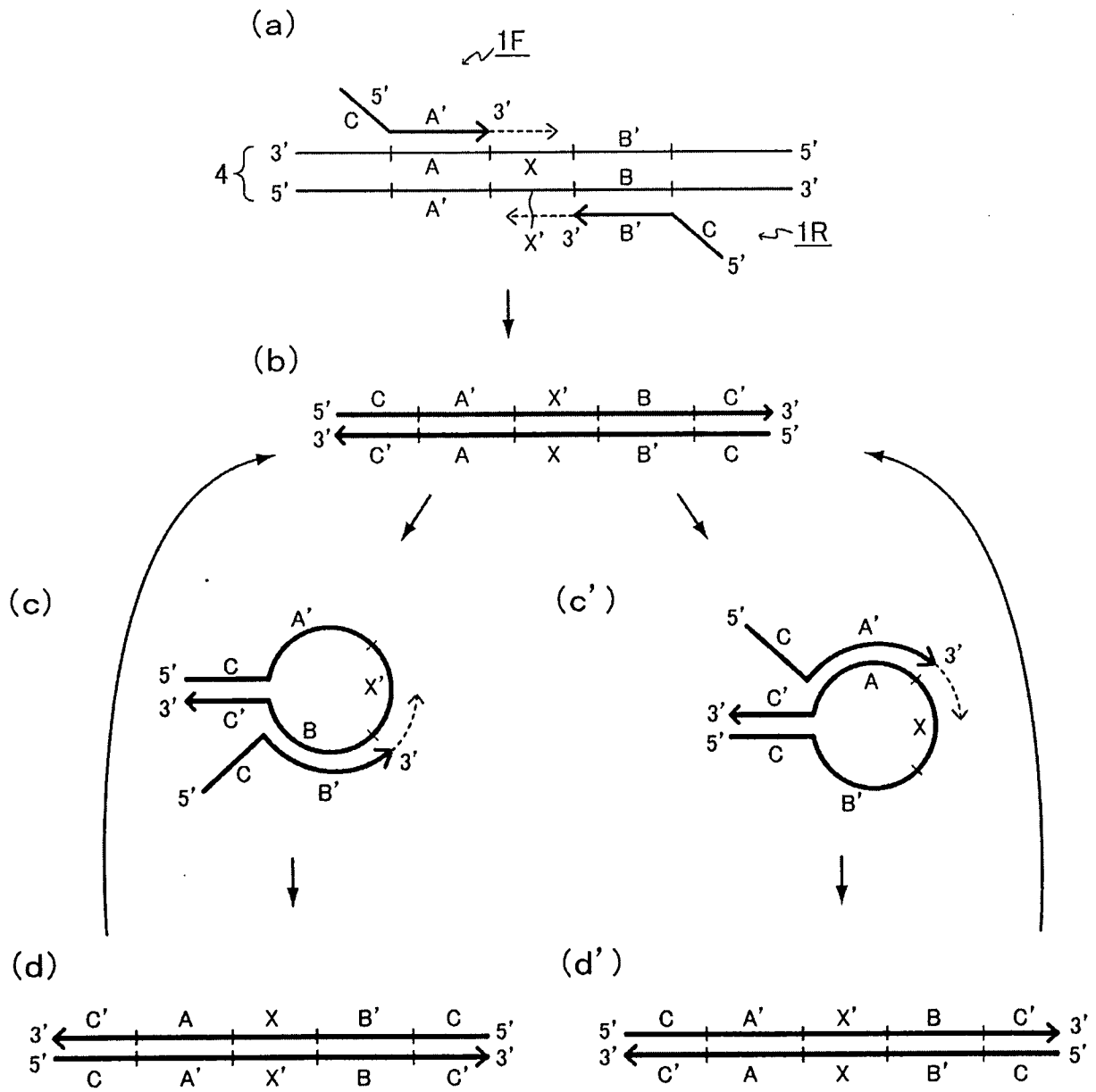


圖4

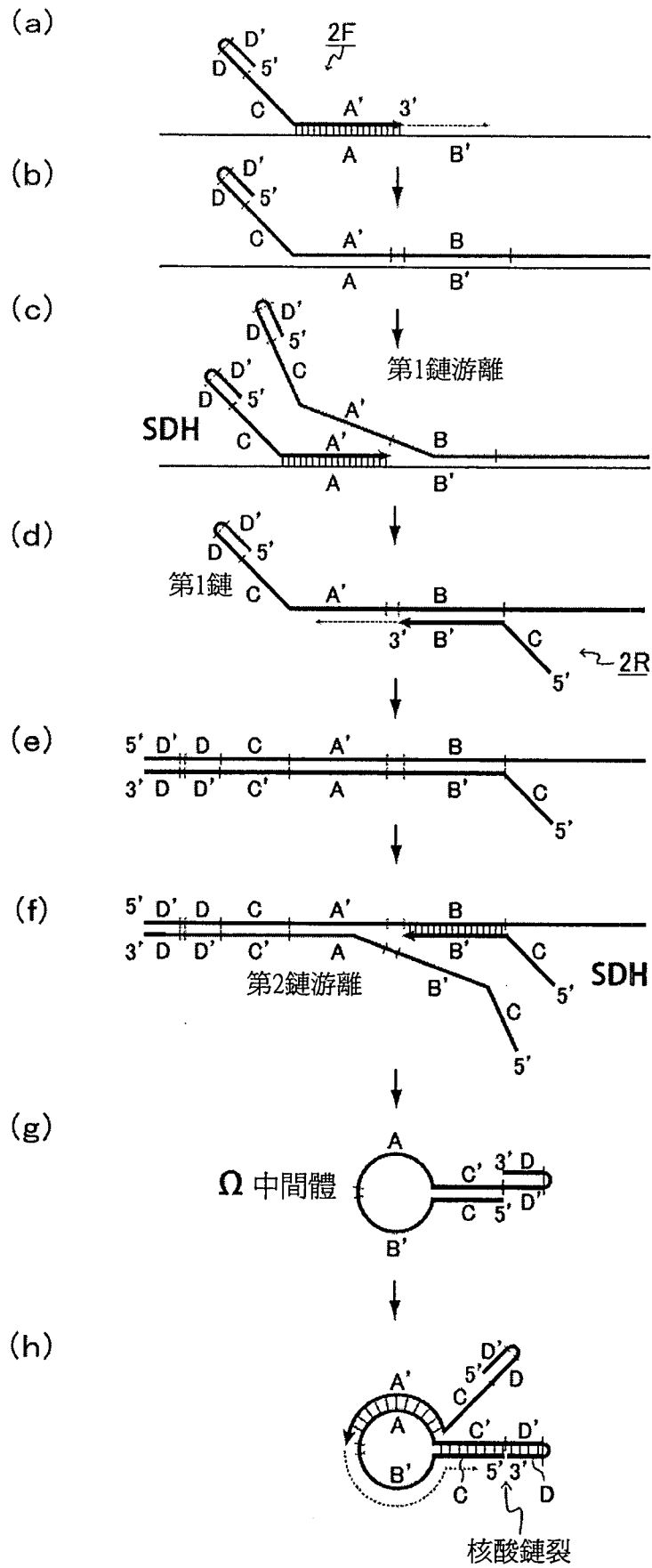


圖5A

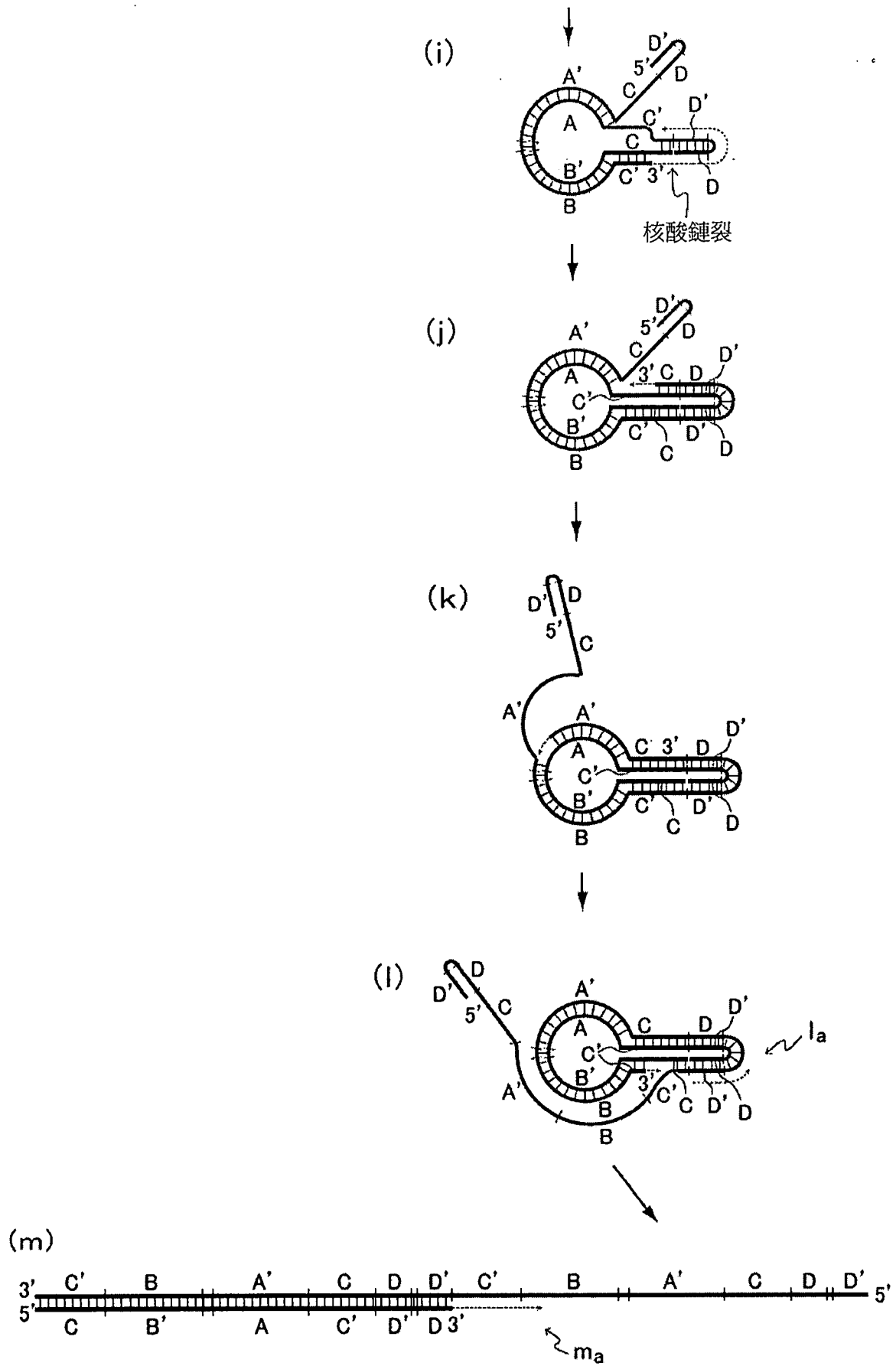


圖5B



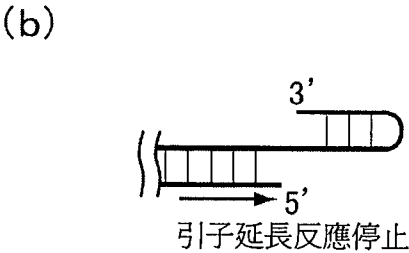
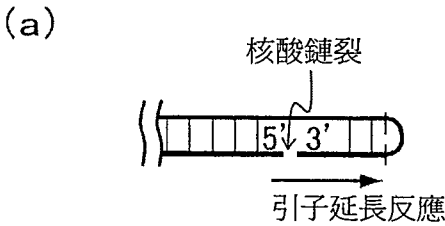


圖6

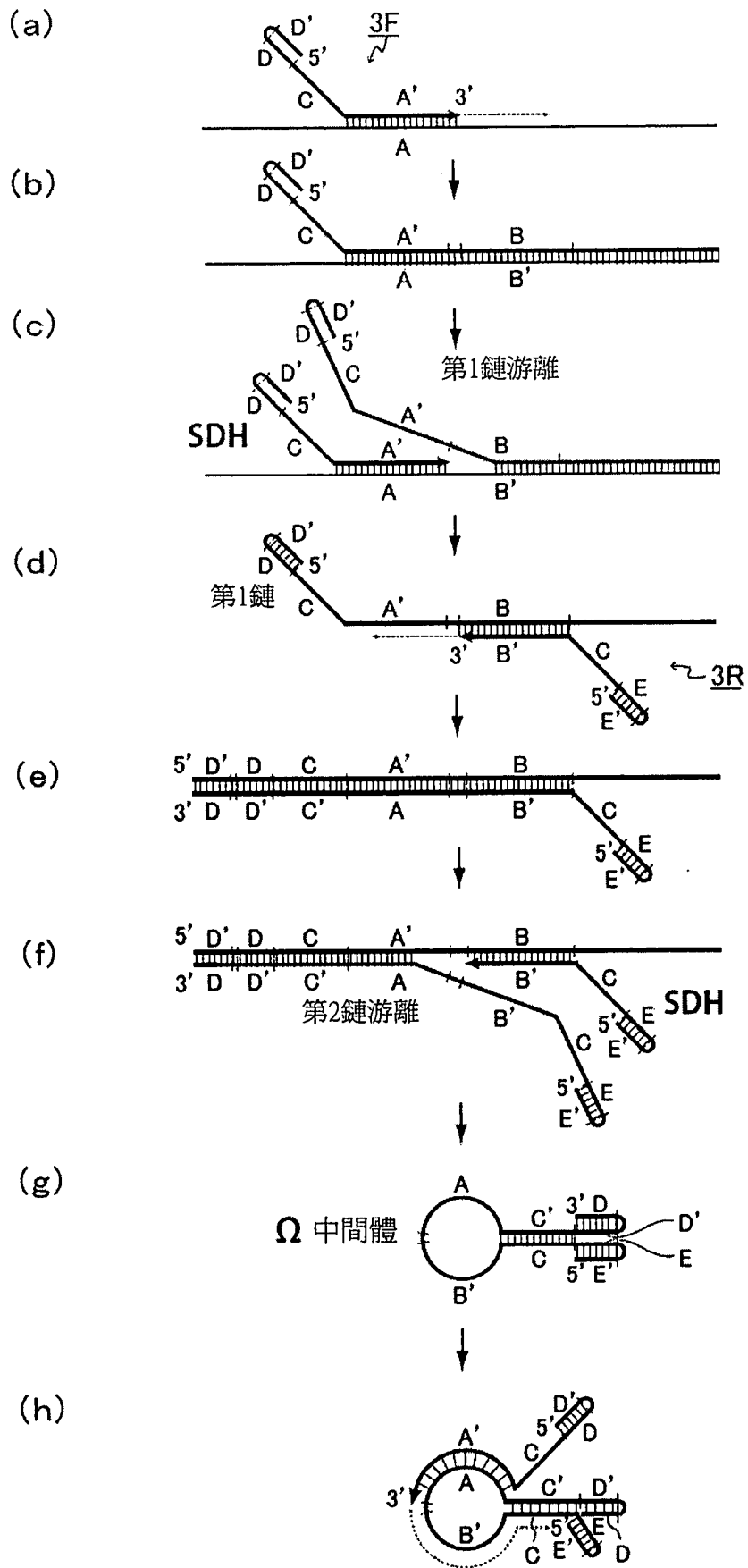


圖7A



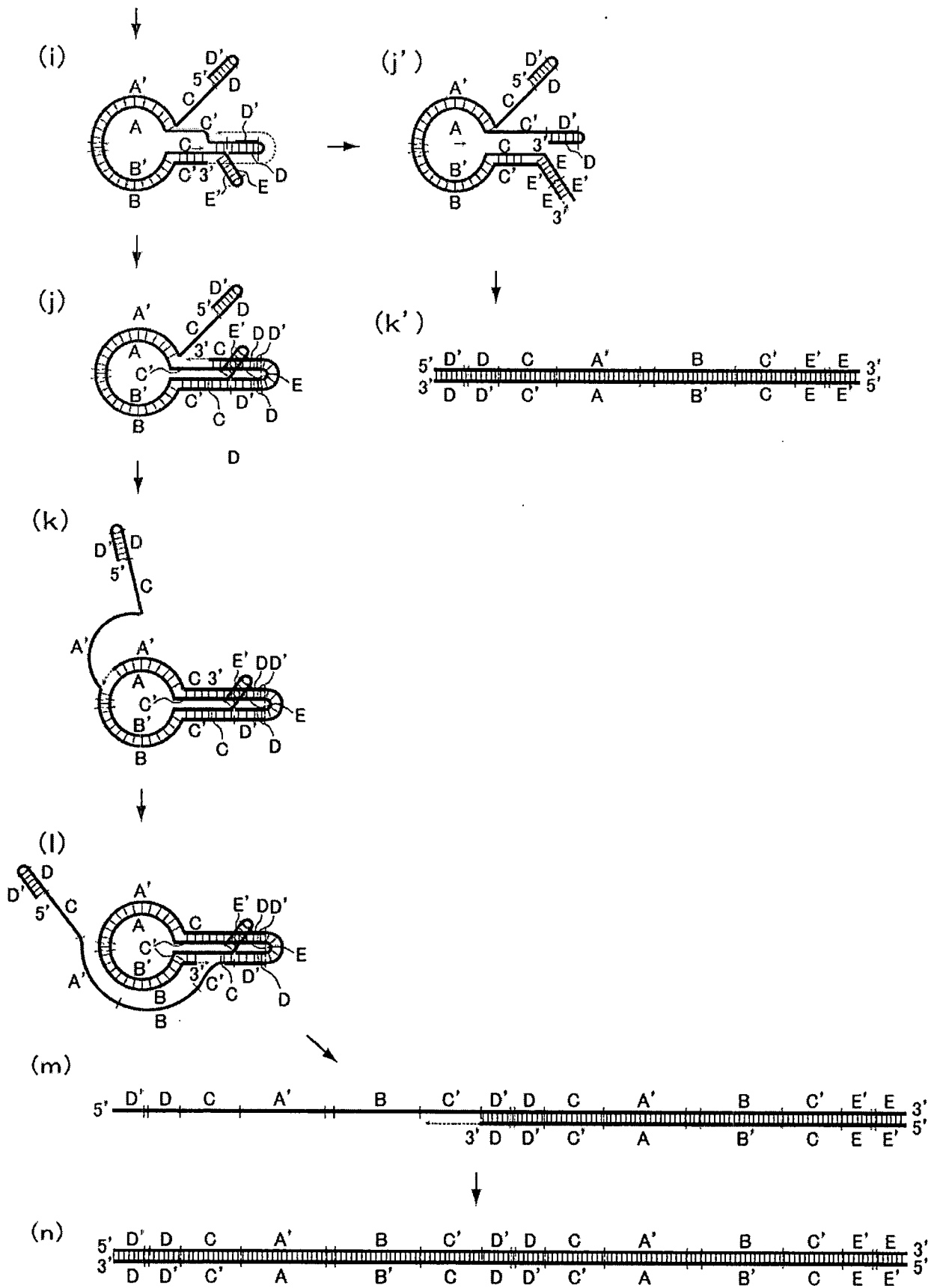


圖7B

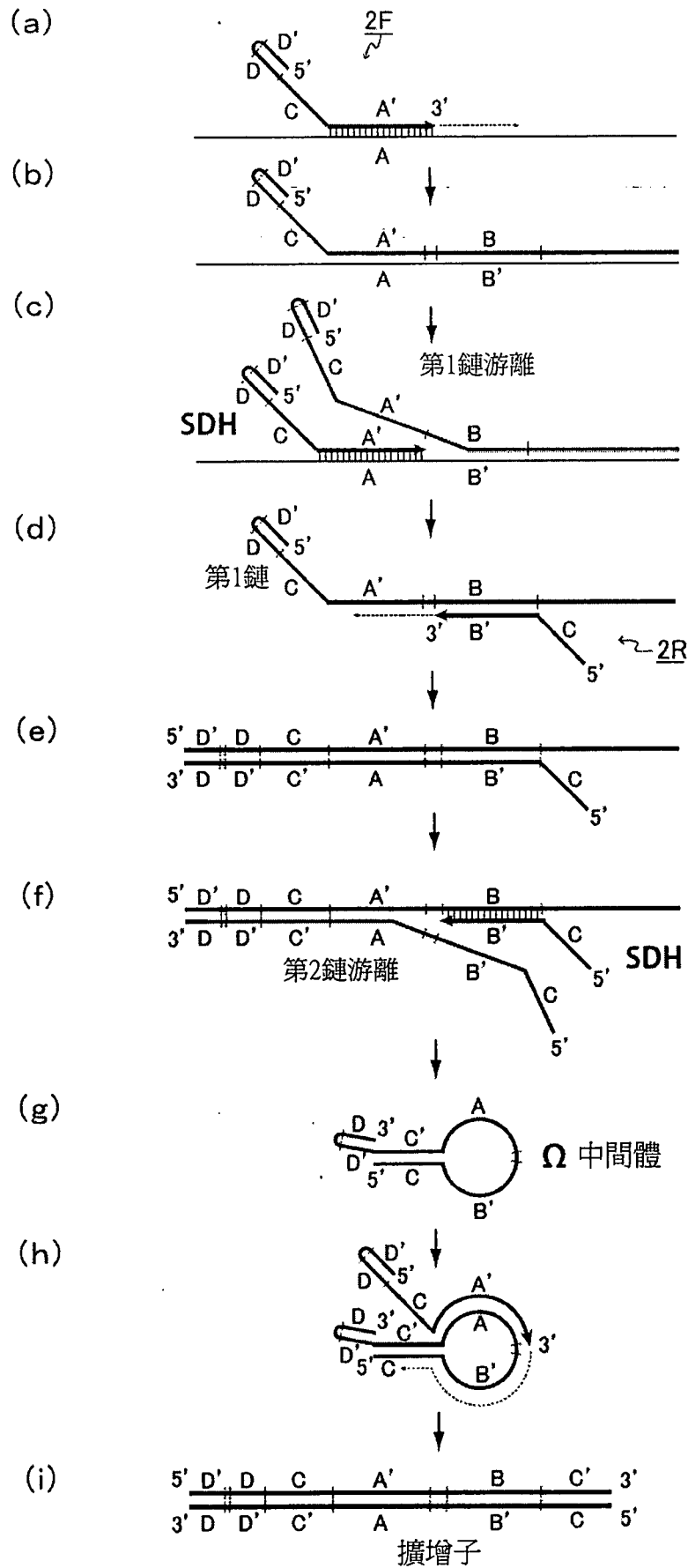


圖8A

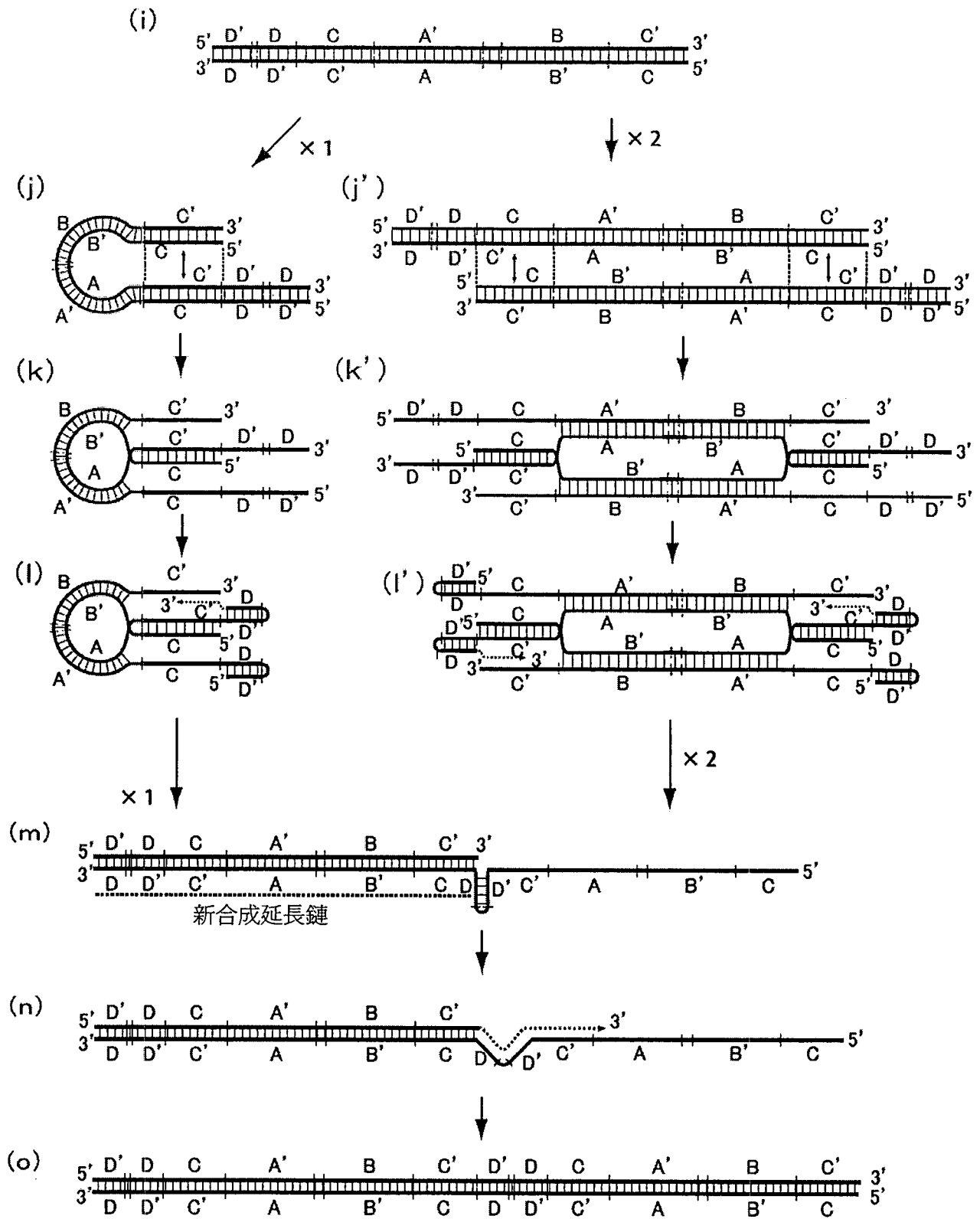


圖8B

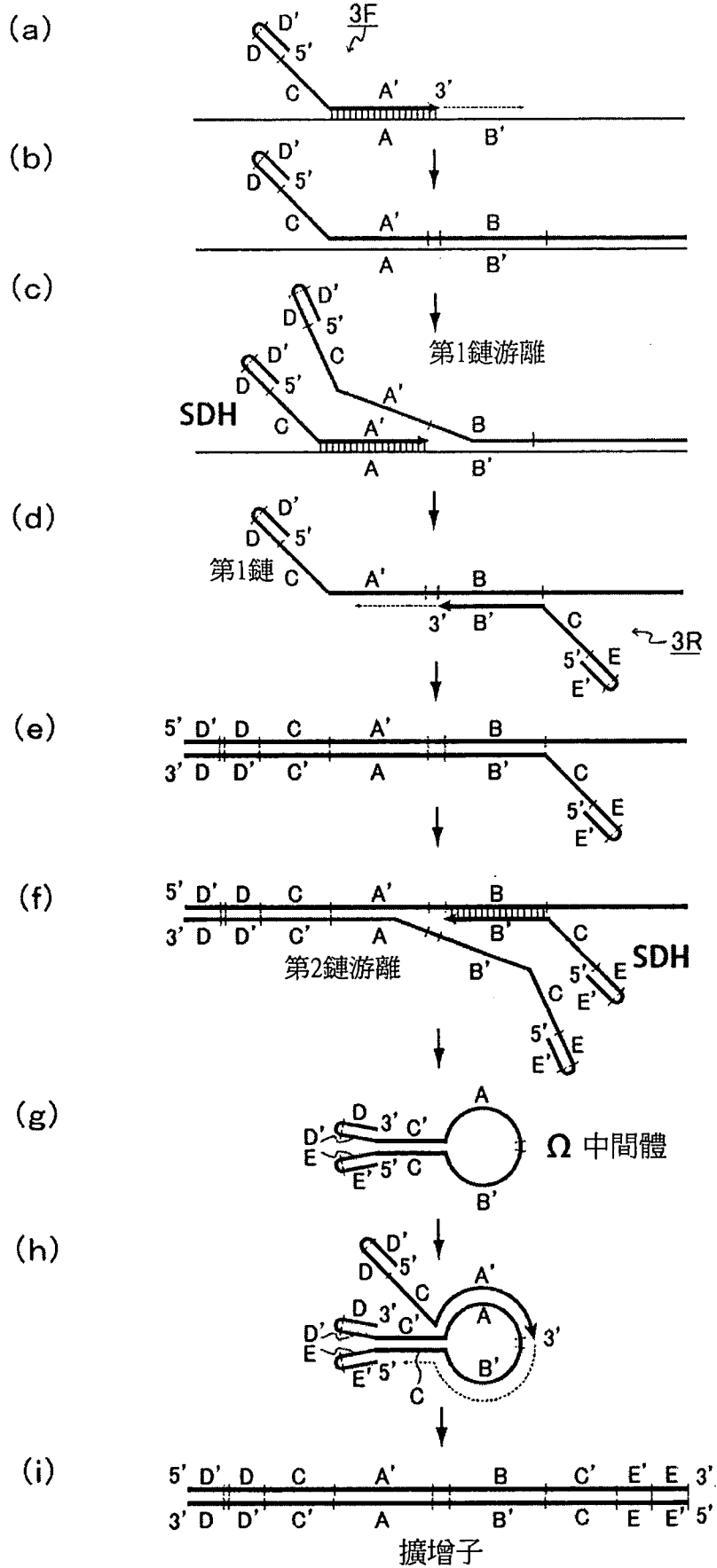


圖9A

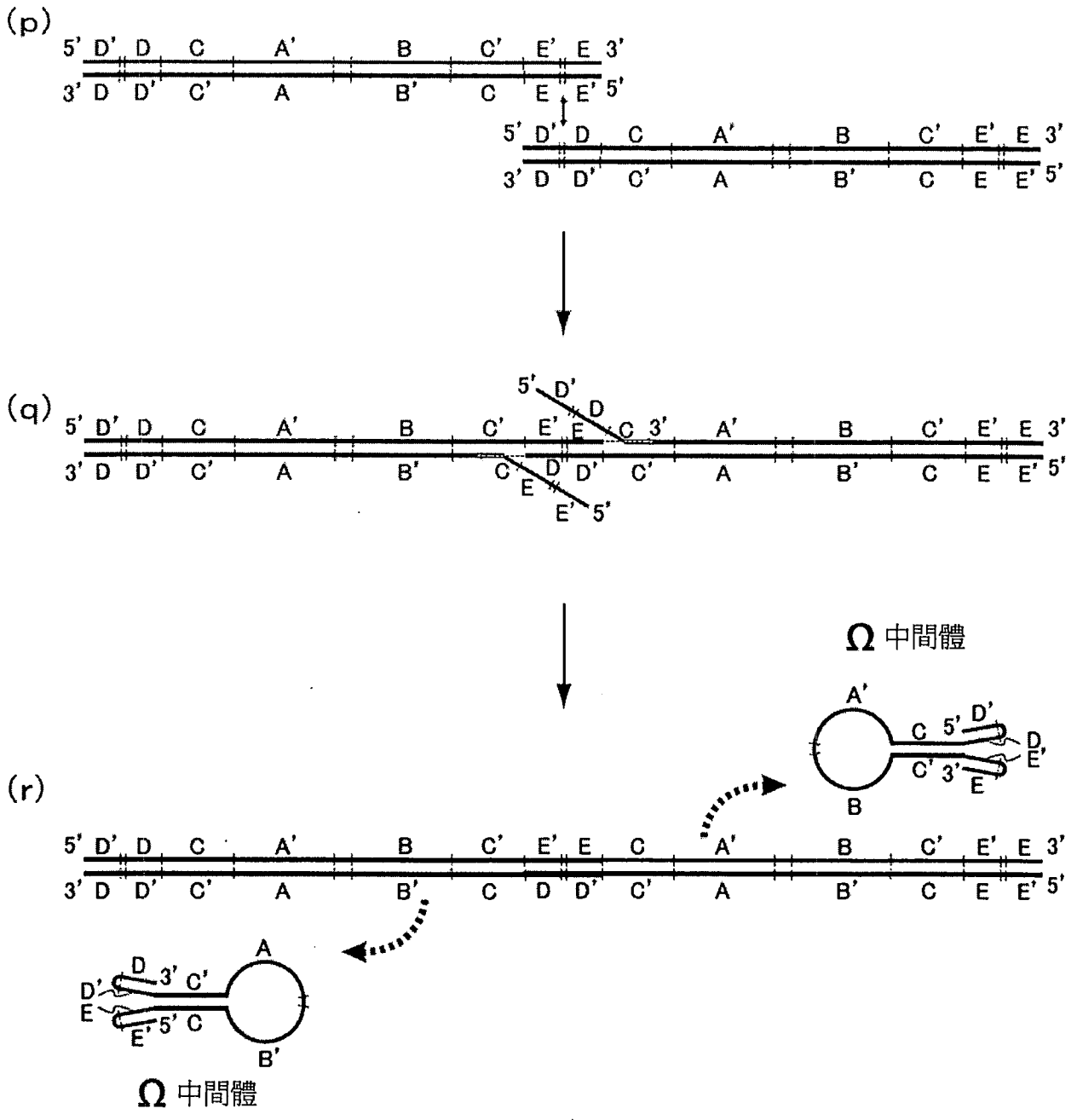


圖9B

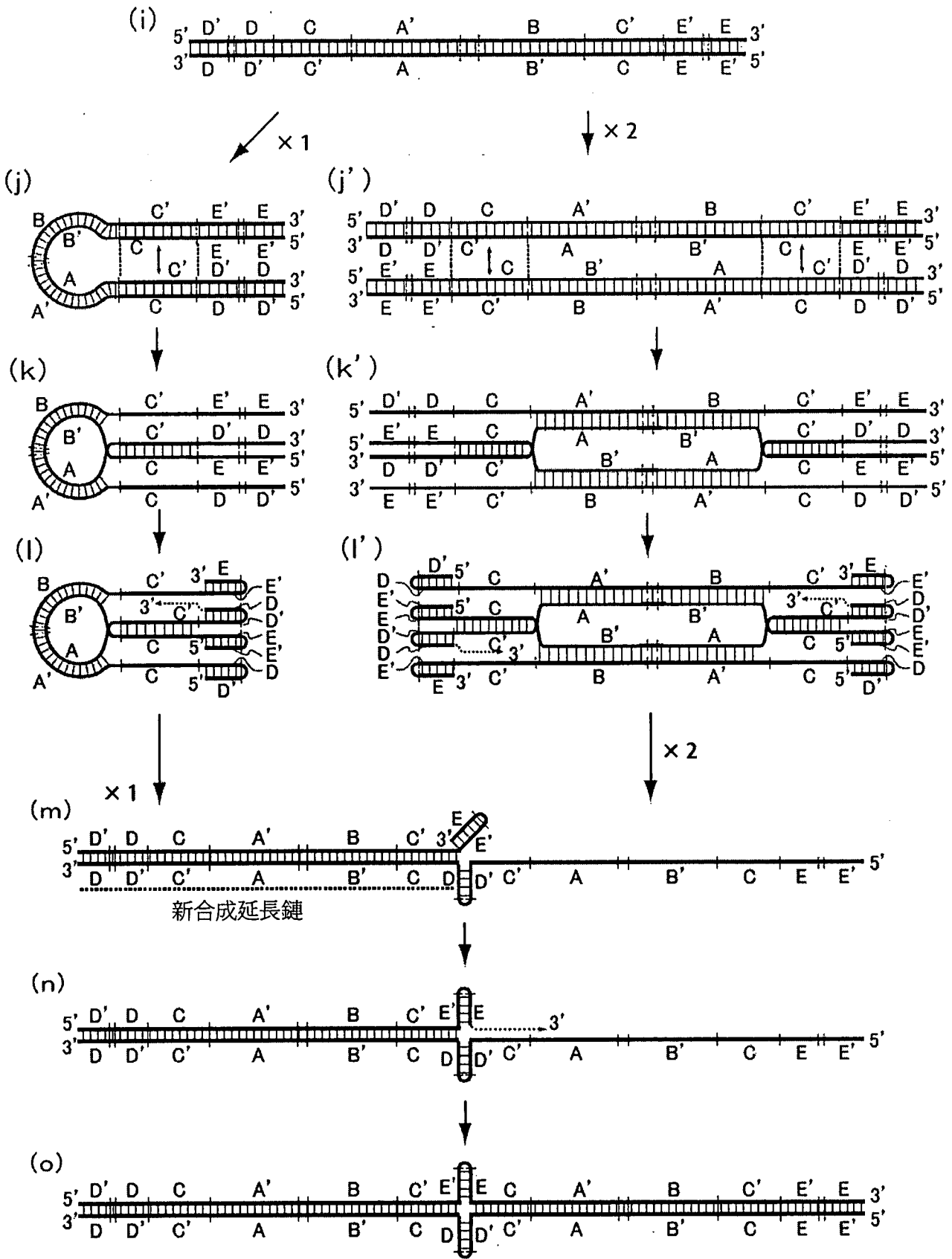


圖9C

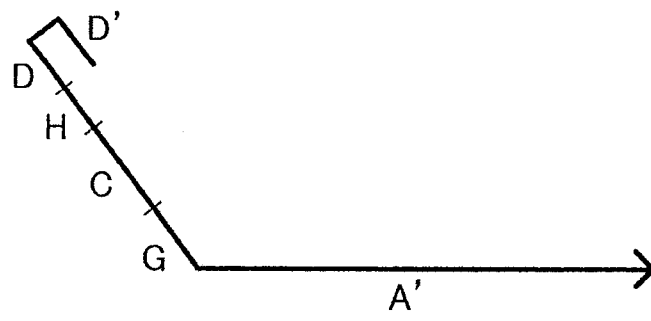


圖10

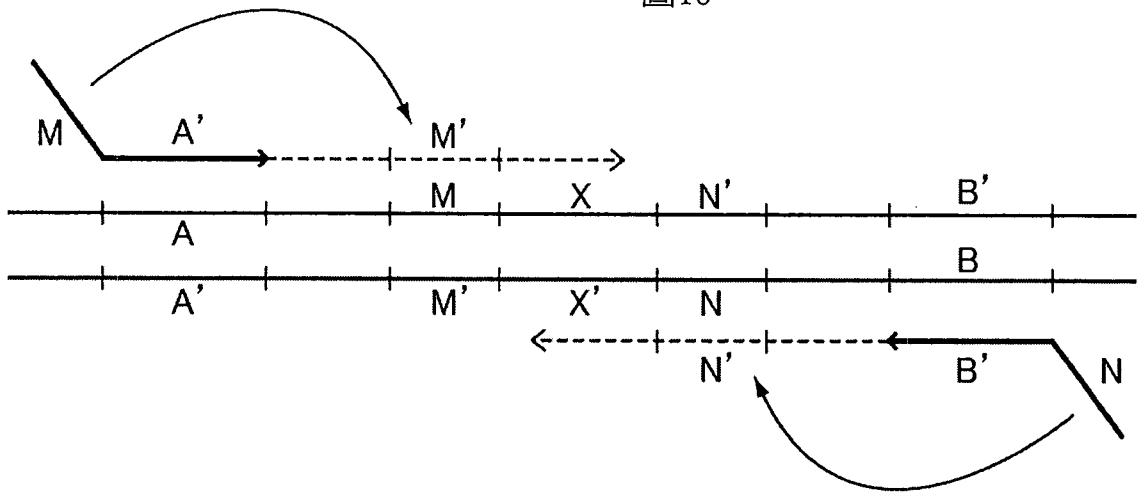


圖11

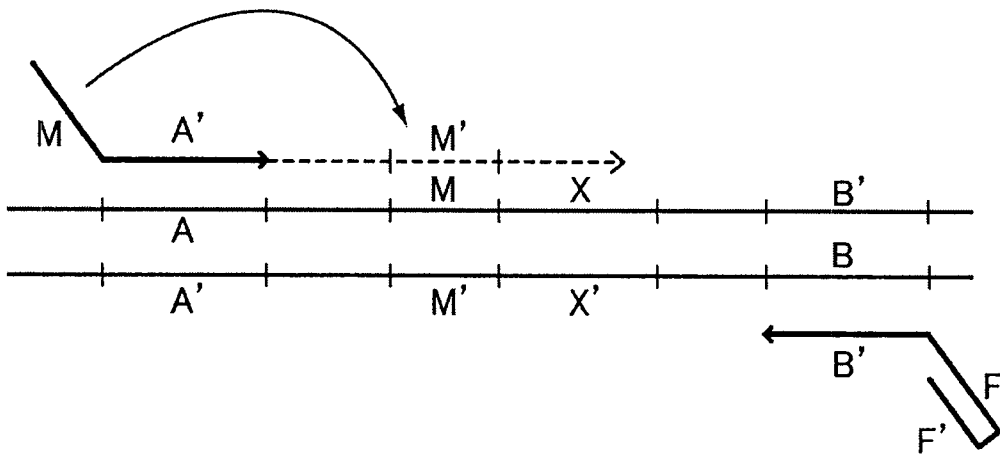


圖12

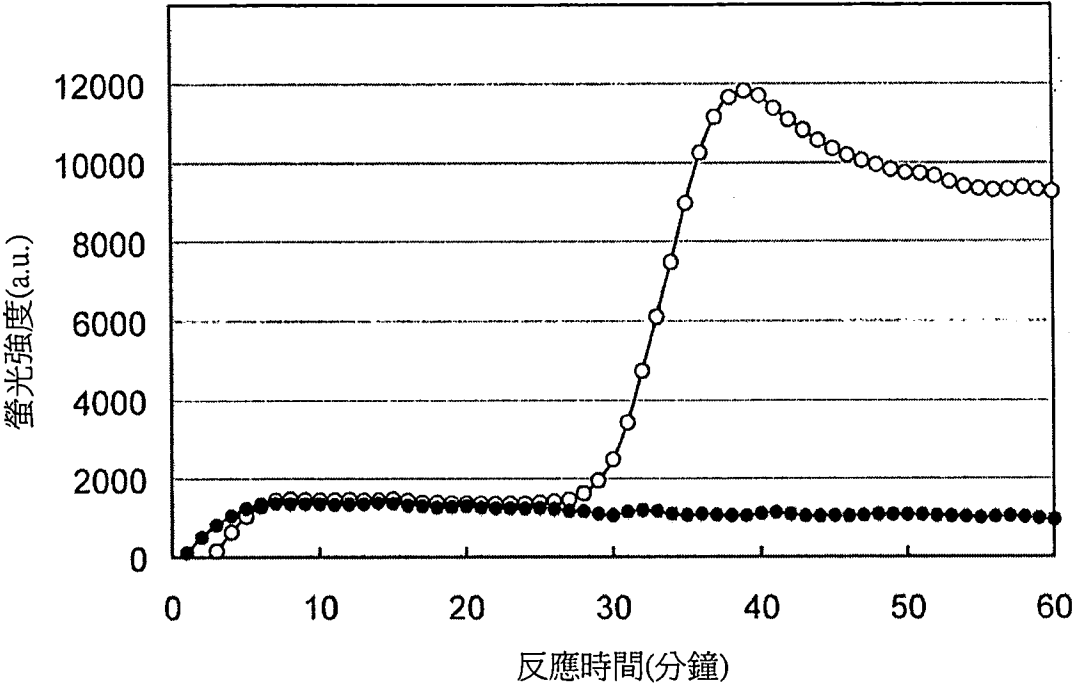


圖13

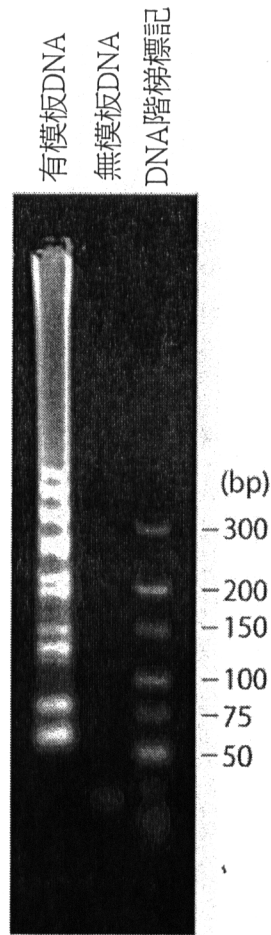


圖14

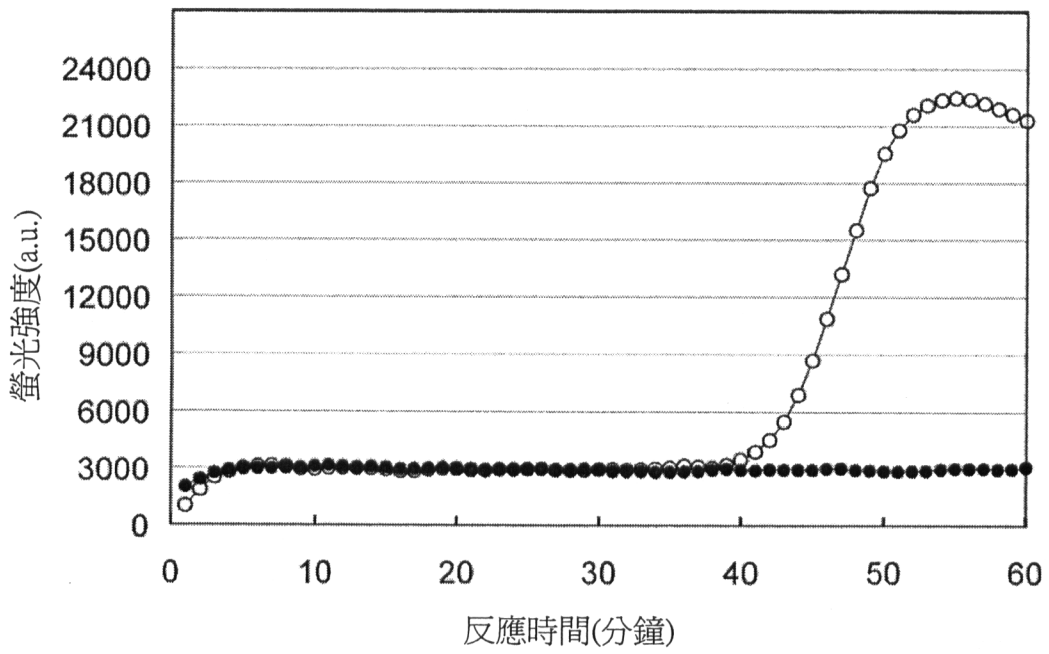


圖15

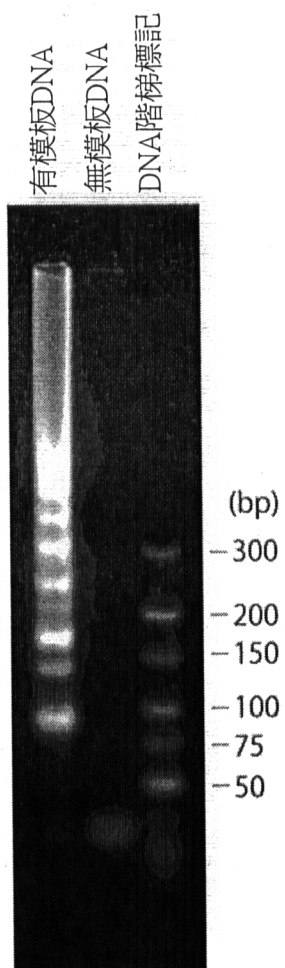


圖16

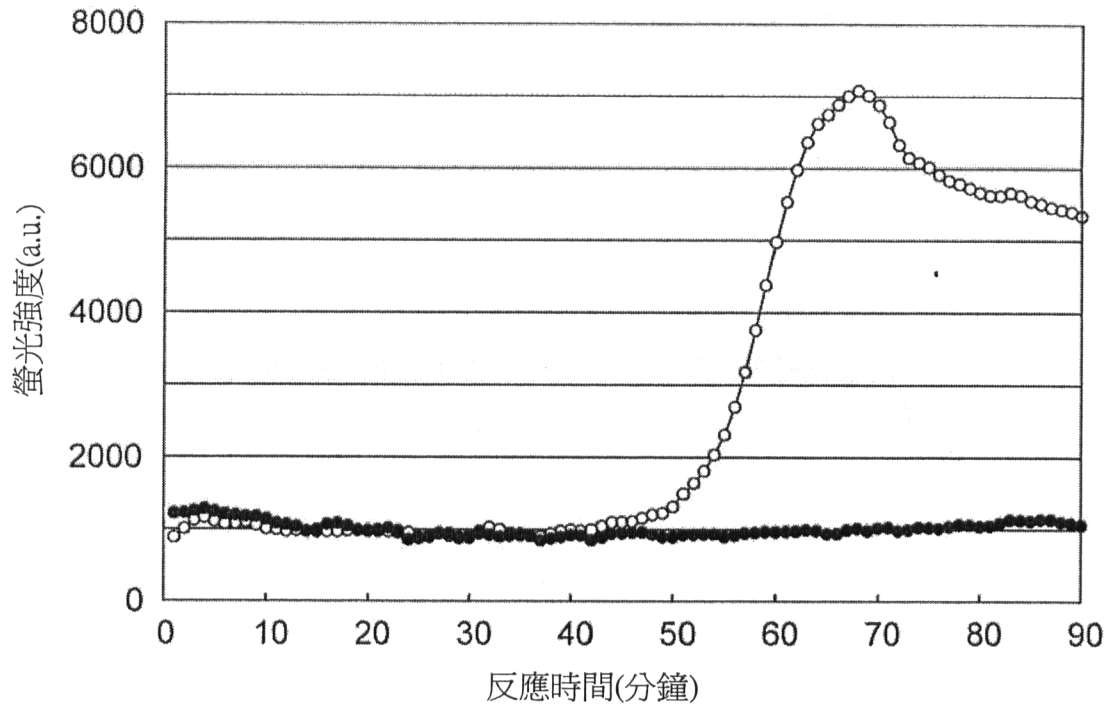


圖17

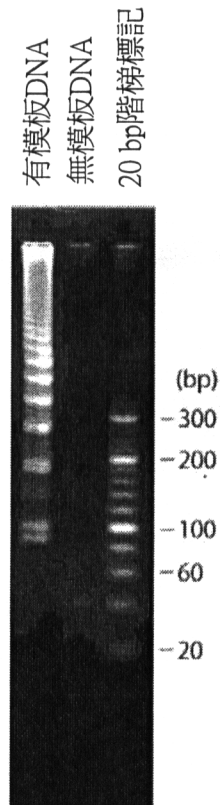


圖18

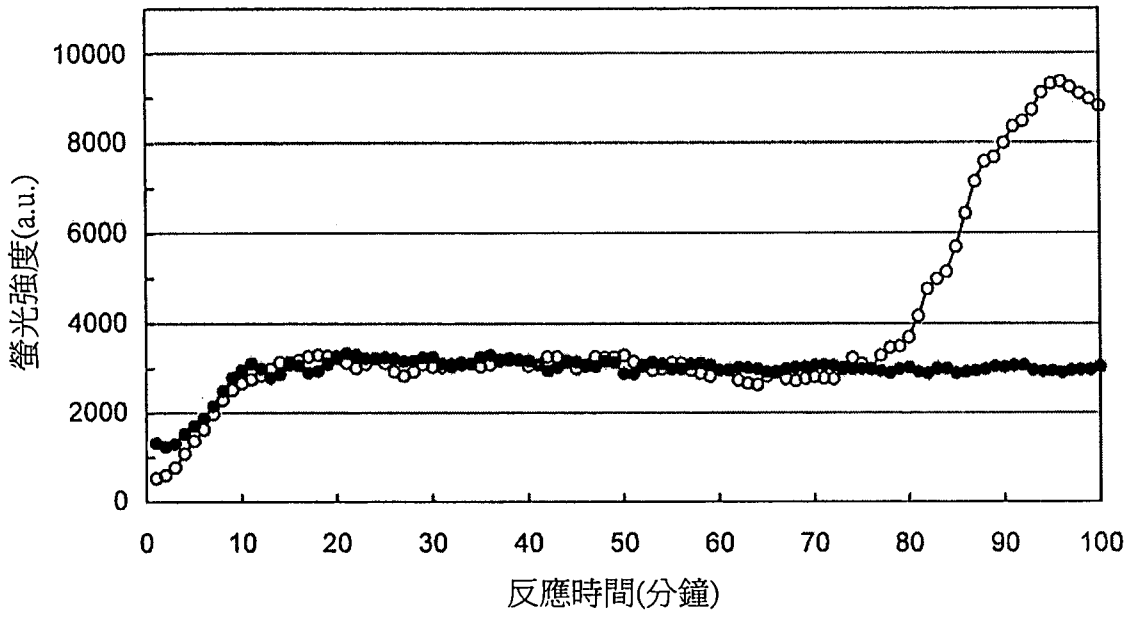


圖19

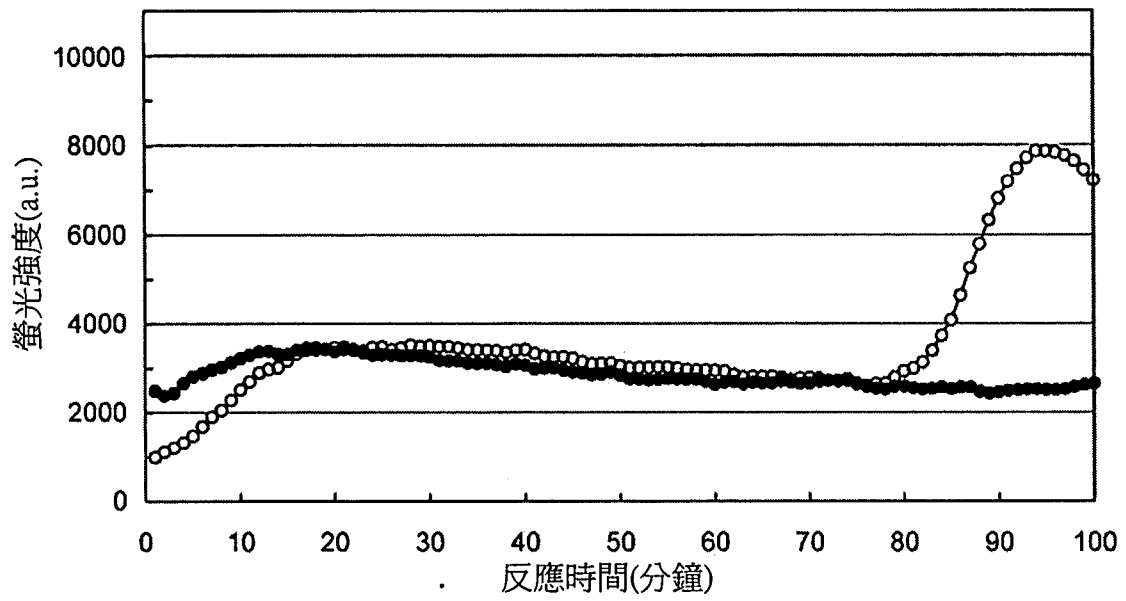


圖20

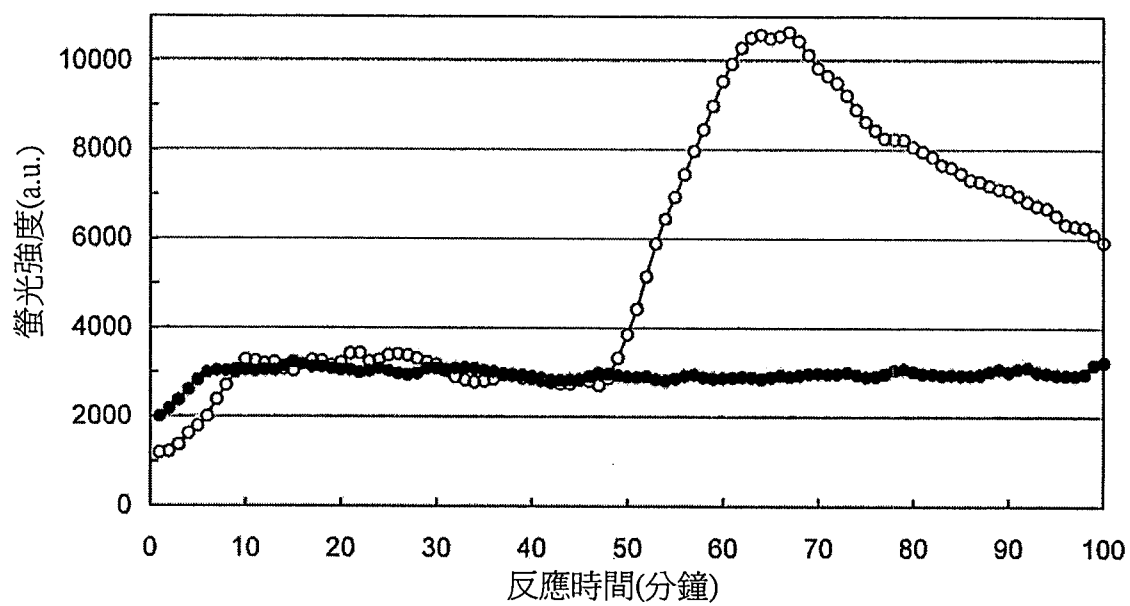


圖21

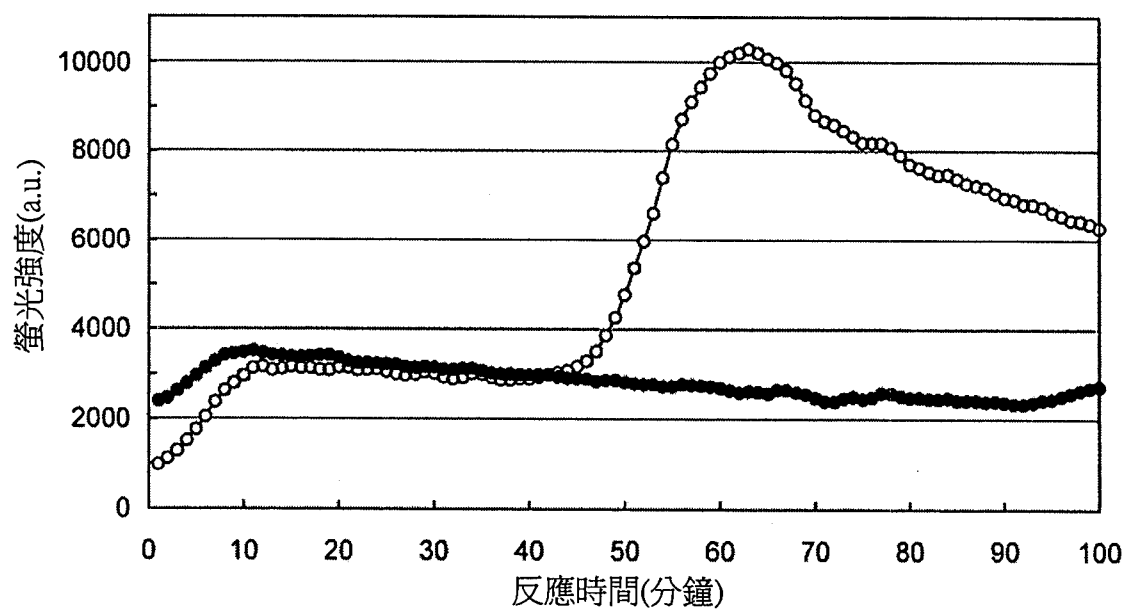


圖22

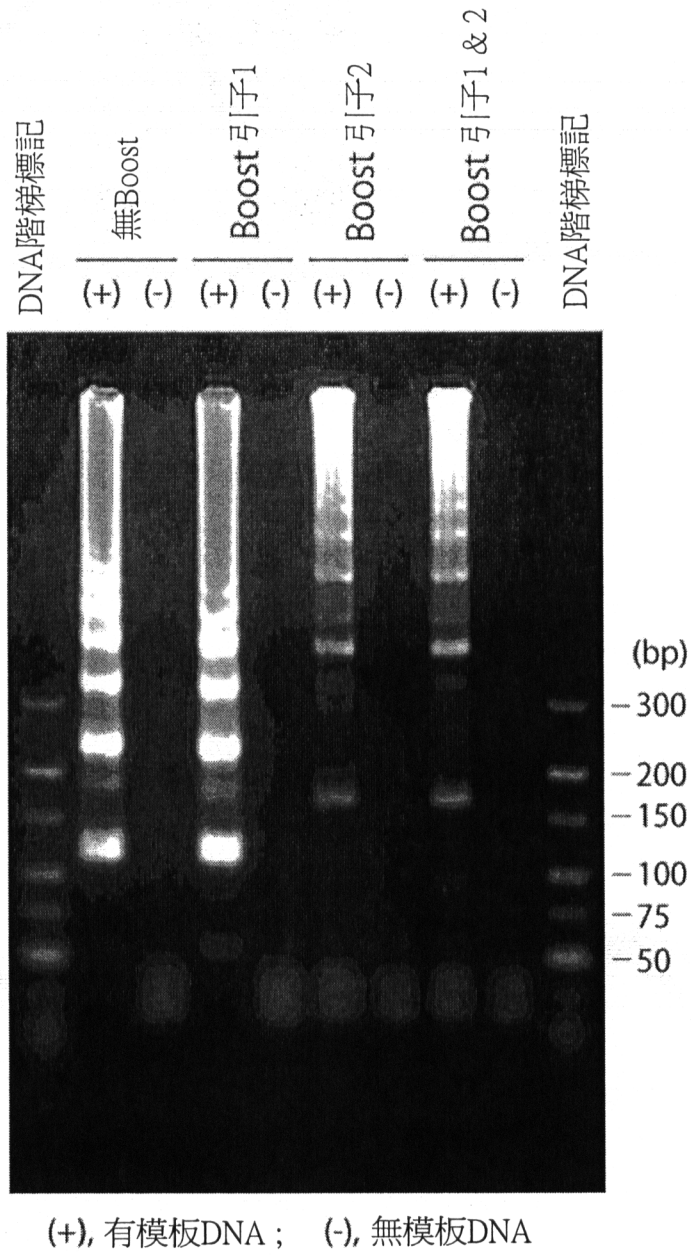


圖23

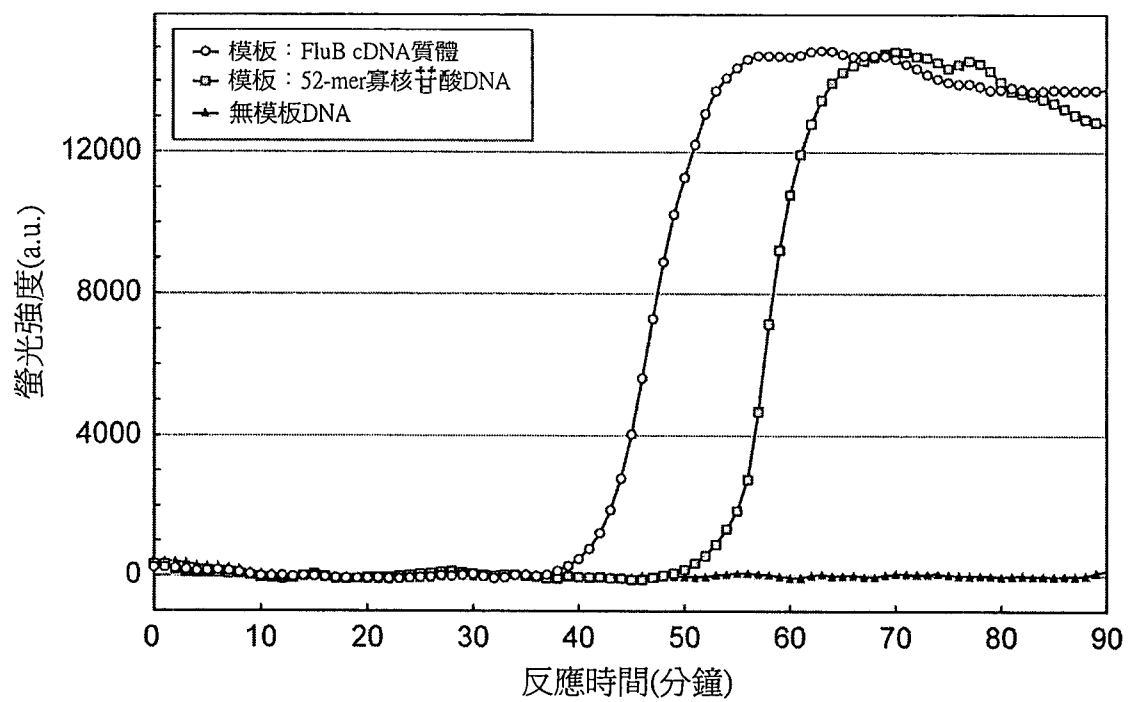


圖24

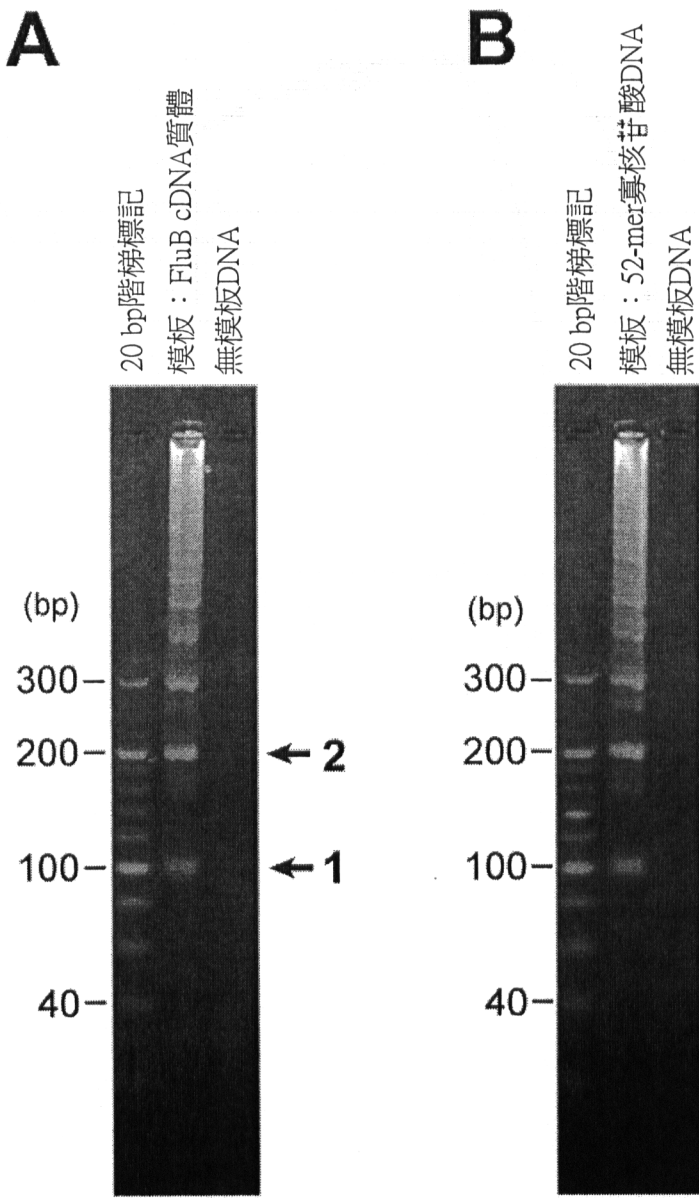
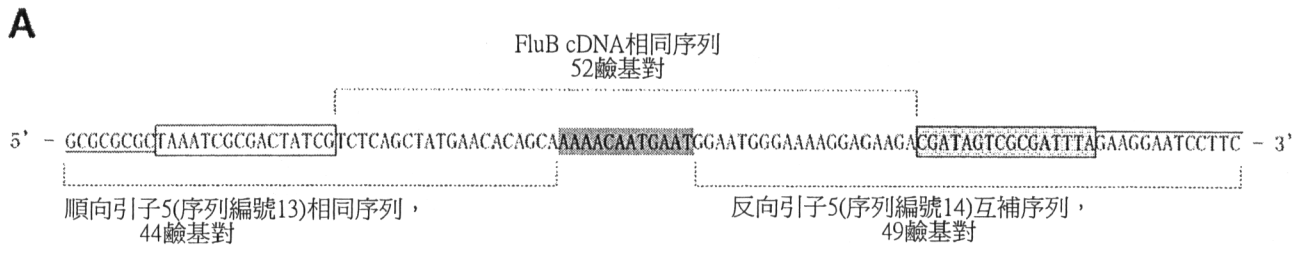


圖25



DNA斷片1：全長105 bp



DNA斷片2：全長202 bp

圖26

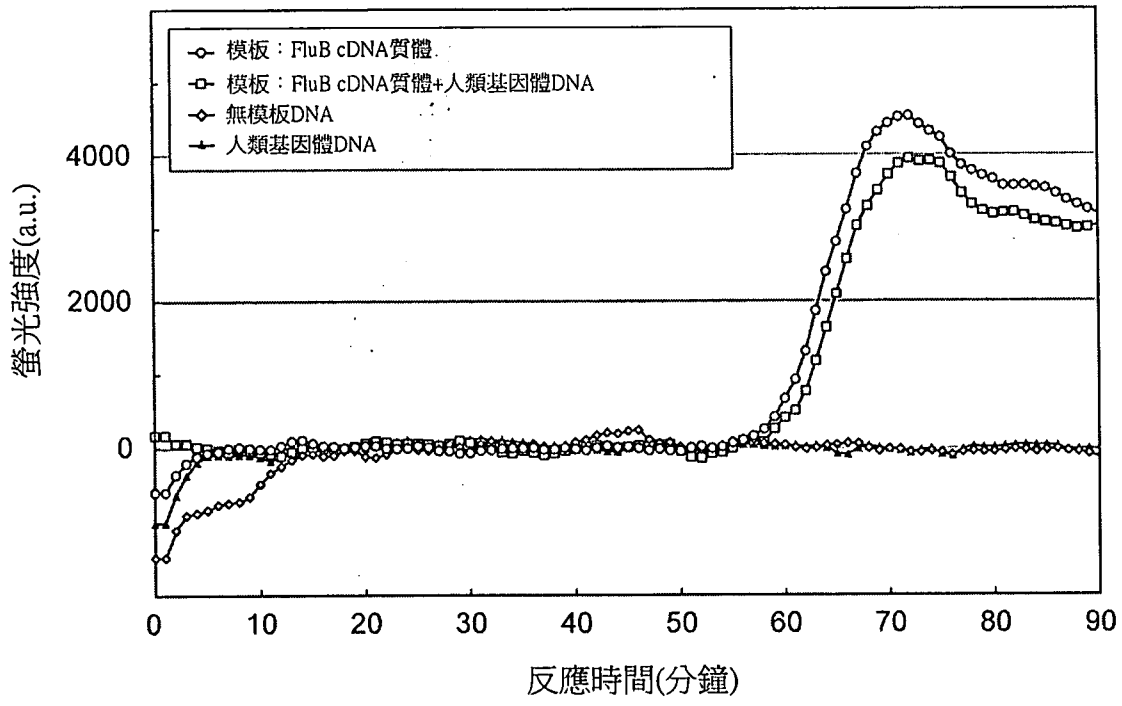
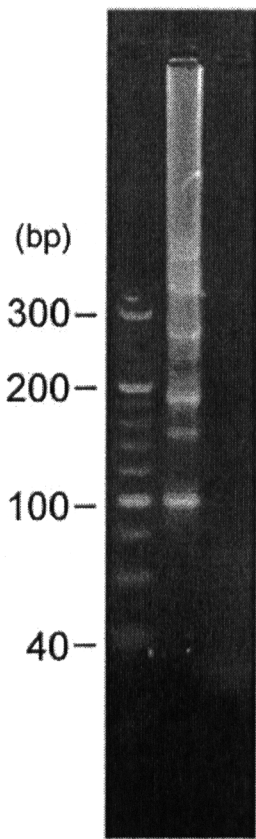


圖27



A

20 bp 階梯標記
模板：FluB cDNA 質體
無模板DNA



B

20 bp 階梯標記
模板：FluB cDNA 質體+人類基因體DNA
人類基因體DNA

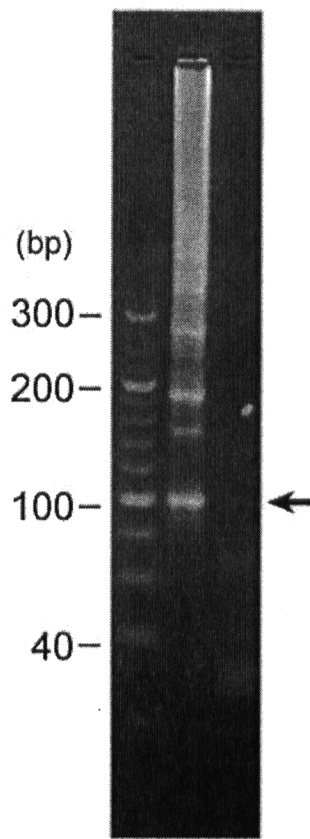
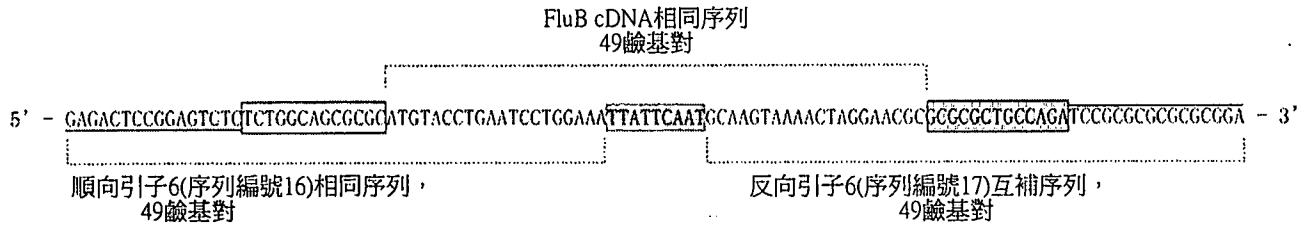


圖28



DNA斷片：全長107 bp

圖29

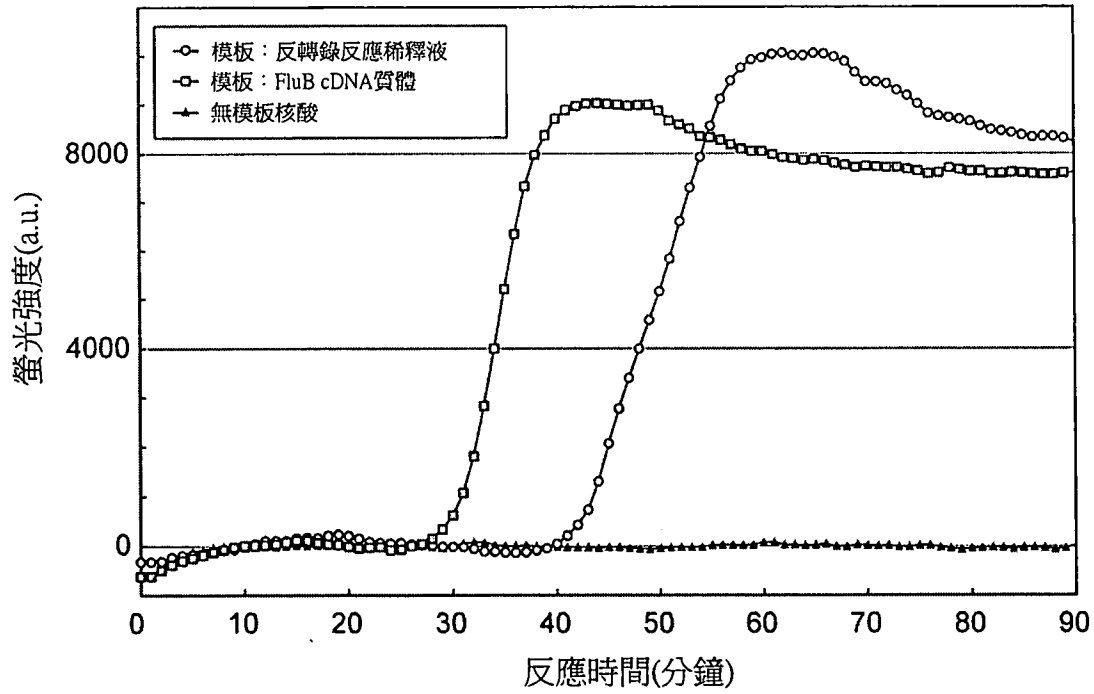


圖30



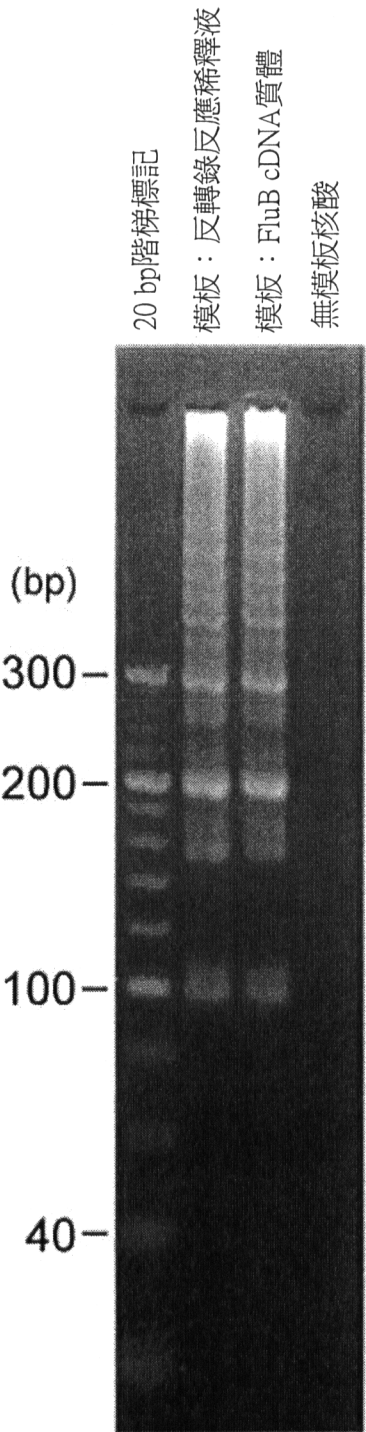


圖31

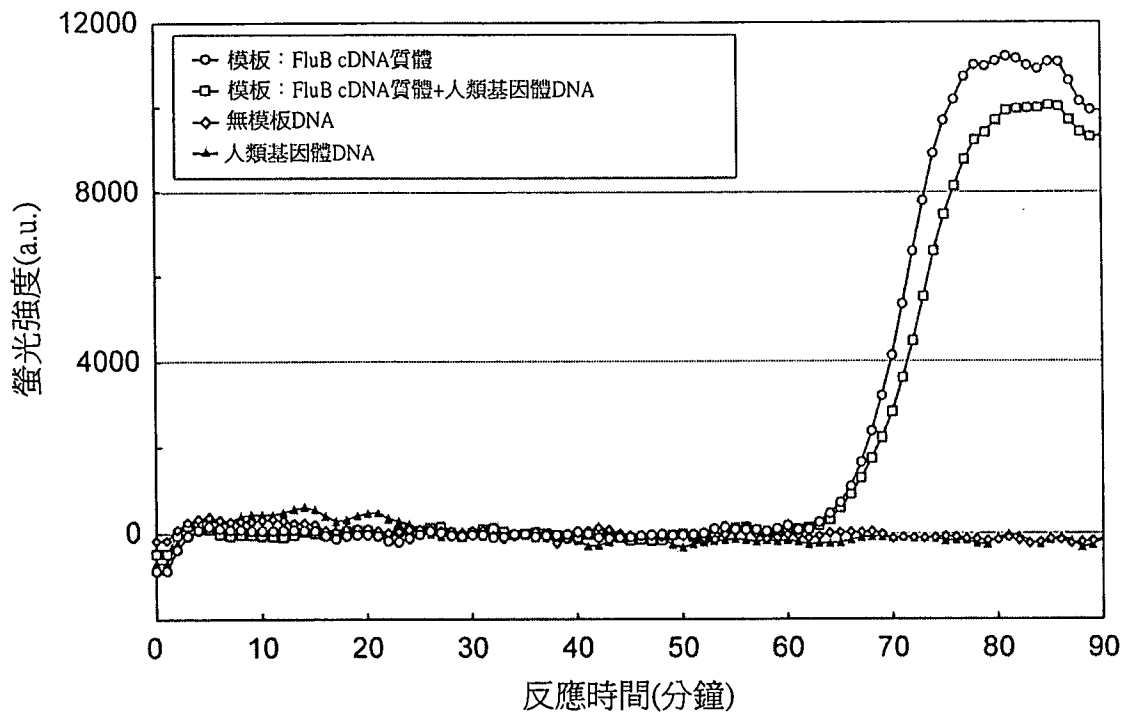


圖32



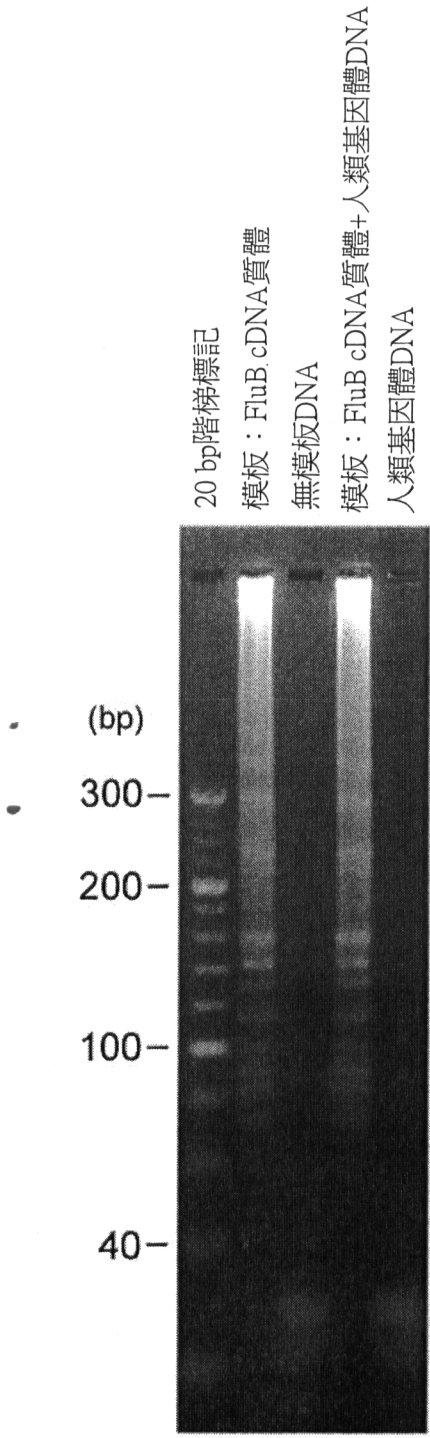


圖33

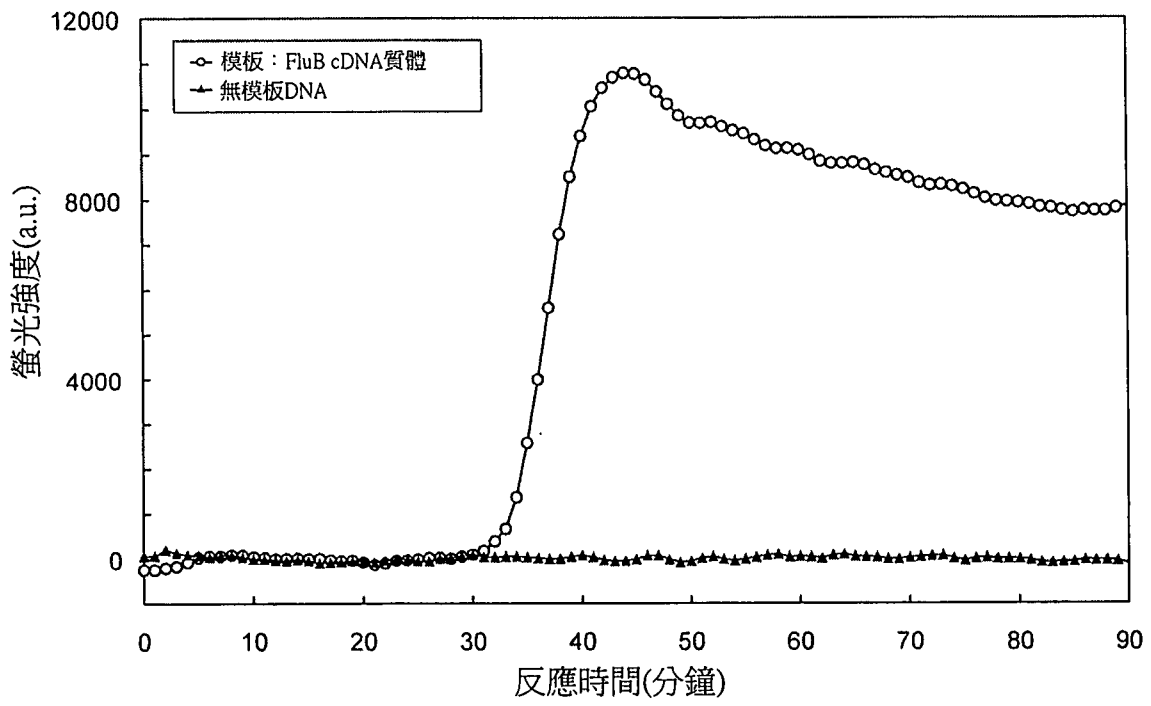


圖34



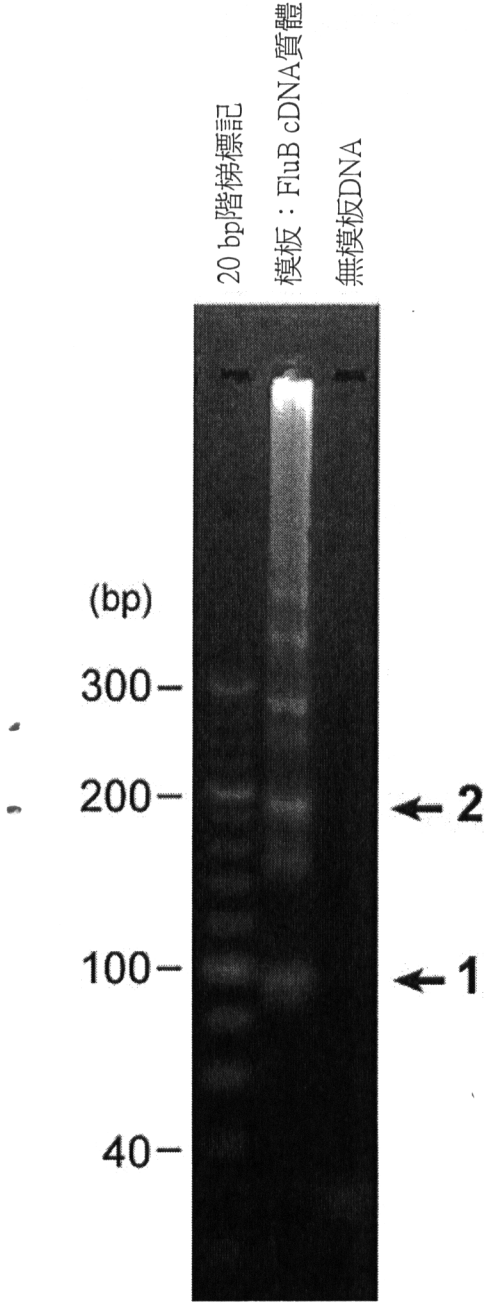
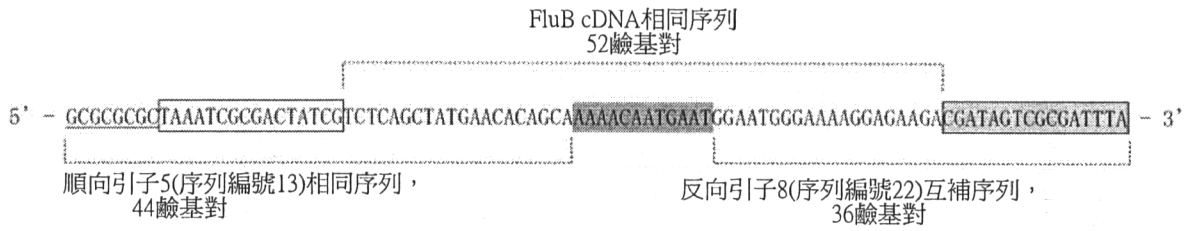


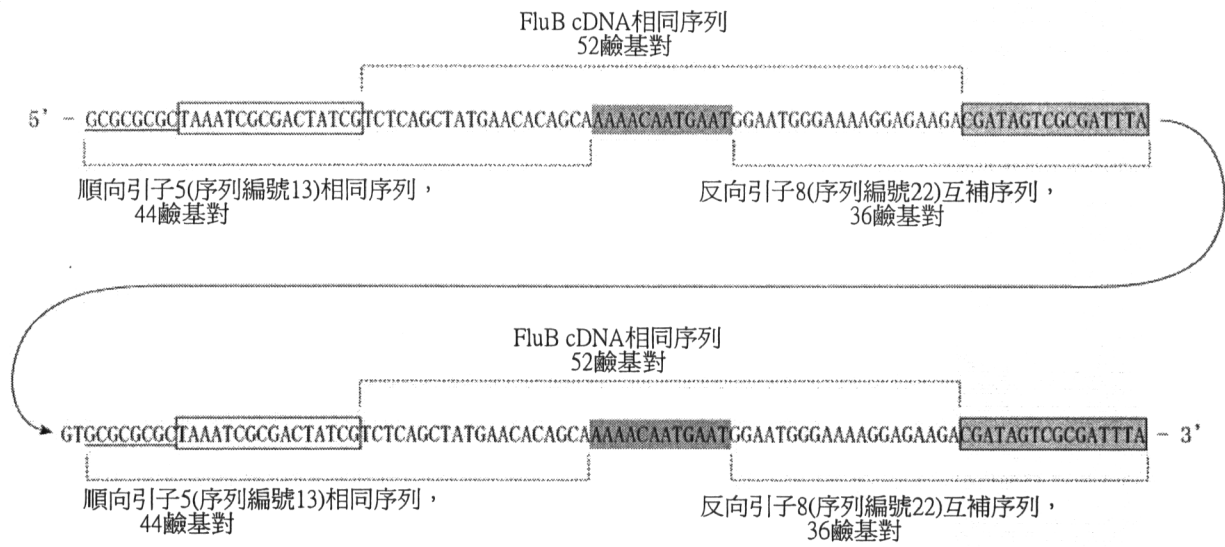
圖35

A



DNA斷片1：全長92 bp

B



DNA斷片2：全長186 bp

圖36