

408224

申請日期	84. 3. 14
案 號	04102392
類 別	G01N ³³ /68 C12Q ^{1/68}

A4
C4

408224

(以上各欄由本局填註)

發 明 專 利 說 明 書
新 型

一、發明 名稱	中 文	使用嗜熱性酶之股置換放大作用 (89年8月修正)
	英 文	STRAND DISPLACEMENT AMPLIFICATION USING THERMOPHILIC ENZYMES
二、發明 創作人	姓 名	1. 梅琳達 S·佛萊什 (Melinda S. Fraiser) 2. 凱薩琳 A·史巴爾高 (Catherine A. Spargo) 3. 喬治 T·華爾克 (George T. Walker) 4. 馬克貝恩克利貝 (Mark Van Cleve) 5. 大衛 J·懷特 (David J. Wright)
	國 籍	1-5 皆屬美國
三、申請人	住、居所	1. 美國北卡羅萊那州 27704 杜哈姆東梅納德街 104 號 2. 美國北卡羅萊那州 27511 卡里當達爾克路 503 號 3. 美國北卡羅萊那州 27514 查布爾山玻拉斯山路 209 號 4. 美國北卡羅萊那州 27707 杜哈姆卡里布雷公園 #202 路 7301 號 5. 美國北卡羅萊那州 27514 查布爾山卡梅爾山教堂路 1013 號
	姓 名 (名稱)	貝登狄金森公司 Becton, Dickinson and Company
三、申請人	國 籍	美國
	住、居所 (事務所)	美國新澤西州 07417-1880 法蘭克林湖萬貝登道
三、申請人	代 表 人 姓 名	理查 J. 羅瑞克 (Richard J. Rodrick)

裝

訂

線

(由本局填寫)

承辦人代碼：
大類：
I P C分類：

A6
B6

本案已向：

美 國 (地區) 申請專利，申請日期： 1994年 4月 18日 案號： 08/229,279 ， ☐有 ☐無主張優先權

有關微生物已寄存於： ，寄存日期： ，寄存號碼：

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄)

裝

訂

線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明 (1)

發明領域

本發明係關於核酸目標序列之放大方法，特別係關於核酸目標序列之恆溫放大方法。

發明背景

活體外核酸放大技術提供檢測與分析少量核酸的有力工具。此種方法靈敏度極高，導致試圖開發其用於診斷傳染病及遺傳病；分離分析用基因；及檢測特定核酸，如用於法醫學之用途。核酸放大技術可根據過程的溫度需求分類。聚合酶連鎖反應 (PCR; R. K. Saiki, et al. 1985. Science 230, 1350-1354)，接合酶連鎖反應 (LCR; D. Y. Wu, et al. 1989. Genomics 4, 560-569; K. Barringer, et al. 1990. Gene 89, 117-122; F. Barany. 1991. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 189-193)，基於轉錄的放大作用 (D. Y. Kwoh, et al. 1989. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 1173-1177)，及限制放大作用 (U. S. Patent No. 5, 102, 784) 需要溫度周期。相反地，如股置換放大 (SDA; G. T. Walker, et al. 1992. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 392-396及 G. t. Walker, et al. 1992. Nuc. Acids. Res. 20, 1691-1696，及 EP 0 497 272，三種揭示皆併述於此以供參考)，自行維持序列複製 (3SR; J. C. Guatelli, et al. 1990. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 1874-1878)，及 Q β 複製酶系統 (P. M. Lizardi, et al. 1988. BioTechnology 6, 1197-1202) 等方法皆為恆溫

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

原

五、發明說明(2)

反應。此外，WO 90/10064及WO 91/03573說明嗜菌體 phi29 複製源用於核酸恆溫複製的用途。WO 92/05287 說明序列特異性寡核苷酸之恆溫生產方法，其中一股上之修飾可使切割劑選擇性切割相對股。釋出單股互補寡核苷酸，可再度聚合另一互補寡核苷酸。恆溫放大反應係於恆溫下進行，與如PCR之高溫與低溫間循環特性之放大反應相反。

習知SDA反應係於約37℃至42℃間之恆溫下進行。此乃由於exo⁻克諾(Klenow)DNA聚合酶，特別是限制核酸內切酶(例如HincII)對溫度易感(對溫度敏感)。因此驅動放大反應之酶於反應溫度升高時被失活化。然而，於較先前可行之更高溫下進行恆溫放大反應(如SDA)有若干優點。於高溫放大可獲得放大引物與模板DNA間更為嚴謹地配對，因此改良放大過程的特異性。背景反應也可因放大特異性改良而減少。於SDA，背景反應的顯著來源為短的“引物二聚物”，其係於放大引物彼此反應所產生。引物二聚物的生成會嚴重損害目標序列的期望特異性放大效率。由於反應的嚴謹度降低，使具有有限同源性的序列間暫時性雜交增加，故此種引物二聚物更可能於低溫生成。高溫下進行SDA的能力可能降低引物二聚物的交互作用，減少背景與改良特異目標物放大效率。此外，高溫放大有助於藉聚合酶進行股置換反應。改良之股置換活性，可提高目標物放大效率，導致放大產物產量增高。使用充分熱安定性酶，也可於最初熱變

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

原

五、發明說明 (3)

性步驟之前加入全部 SDA 反應所需之試劑物。習知 SDA 要求酶於雙股目標序列經加熱變性之後加至反應混合物。

dUTP 可藉 SDA 併入已放大的目標 DNA。如此可使來自先前放大而可能污染後續放大反應的放大區，藉著使用尿嘧啶 DNA 糖基酶 (UDG) 處理而變成無法放大。去除污染方法本身無論放大區於 SDA 反應產生時溫度如何皆可使用。然而，於低溫 (亦即 37℃ 至 42℃) 產生的 SDA 放大產物可能含高濃度非特異性背景產物。去除大量背景放大區污染可能嚴重妨礙或抑制污染目標特異性放大區的去除，如此降低去除污染過程效率。藉著抑制非特異性背景放大區的產生，較高溫進行 SDA 的能力，可因此提高 UDG 去除污染過程效率。

SDA 反應需要數種極為特異性酶活性俾成功地放大目標序列。嗜熱性聚合酶於參考文獻已有徹底報導。然而因其它核酸放大系統無需 SDA 酶活性組合，故於本發明之前，有關嗜熱性酶活性與反應需求的所知極少，歸因於其與 SDA 所需生物活性有關。又，因 SDA 需要兩種不同酶 (限制核酸內切酶及聚合酶) 之同時活性，故於本發明之前，未知是否存在有此種嗜熱性酶之相容對偶。換言之，需要嗜熱性聚合酶和嗜熱性限制核酸內切酶二者。此二酶必須具有可彼此相容且與 SDA 相容的溫度與反應條件 (例如鹽) 需求，俾於相同 SDA 反應混合物中有效發揮功能。此外，聚合酶必須 1) 或天然或藉失活化而缺

五、發明說明(4)

乏 5'-3' 核酸外切酶；2) 併入 SDA (α 硫-dNTPs 或其它改質 dNTPs) 所需之改質核苷酸中；3) 始於單股切口由雙股分子置換下游單股；及較佳 4) 入併 dUTP 俾去除放大區污染。聚合酶必須藉添加 dNTP 至自由 3'-OH 以延長模板上的互補股。聚合酶具高加工性也較佳。換言之，聚合酶必須可在分離及終止延長產物前儘可能多加入核苷酸。限制核酸內切酶必須 1) 在識別／切割部位被半改質時，切割其雙股識別／切割部位之單股；2) 自識別／切割部位分離夠快速，因此聚合酶可有效結合與放大目標物；及較佳 3) 不受併入其識別／切割部位之 dUTP 影響。此外，限制核酸內切酶於與聚合酶相容之溫度及反應條件下必須具有此等活性。

發明概述

本發明提供可於較習知 SDA 更廣的溫度範圍 (37℃ 至 70℃, "嗜熱性 SDA") 進行恆溫股置換放大之方法。嗜熱性 SDA 之較佳溫度範圍為 50℃ 至 70℃。經發現某些嗜熱性限制核酸內切酶可如 SDA 所需，切割半改質限制核酸內切酶識別／切割部位，然後由該部位分離。又發現某些嗜熱性聚合酶可從切口延長同時置換下游股。此等發現可開發一種 SDA 方法，其在較先前可能之高溫下進行的特性可改良特異性及效率，減少非特異性背景放大，且極可能改良放大產物產率。此外，當使用於變性溫度安定的酶時，可免除最初熱變性雙股目標物後於另一步驟中加入酶的需要。當非特異性背景放大區數量減少時

五、發明說明(5)

， SDA 反應中，目標特異性放大區的UDG去除污染也更有效。

圖式之說明

第1圖舉例說明Walker等(1992. Nuc. Acids Res., 參見上文)之SDA目標物產生反應圖。

第2圖舉例說明使用兩種放大引物(指數放大)之雙股目標物之SDA反應周期。顯示使用一種放大引物之反應周期之第2圖部分則舉例說明線性SDA。

發明之詳細說明

如此處所用，下列術語及片語定義如下：

放大引物為藉引物延長作用放大目標序列之引物。用於SDA，放大引物(目標結合序列)3'端雜交於目標序列3'端。SDA放大引物又包括靠近5'端之限制核酸內切酶之識別/切割部位。在識別/切割部位5'端之額外核苷酸可存在以供有效結合限制核酸內切酶。識別/切割部位係供限制核酸內切酶用，當識別/切割部位被半改質時，如Walker等(1992. PNAS, 參見上文)所述，將切割DNA雙倍體之一股。半改質識別/切割部位為限制核酸內切酶之雙股識別/切割部位，其中一股含有至少一段衍生的核苷酸，可防止藉限制核酸內切酶切割兩股中之一股。大半例中，最初不含衍生核苷酸之半改質識別/切割部位的該股被限制核酸內切酶切割。然而，第一SDA周期後，切割股之半量識別/切割部位將含衍生核苷酸，但無法防止後續的切割。習知SDA之較佳半改質識別/切

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

錄

五、發明說明(6)

割部位為限制核酸內切酶 Hinc II, Hind II, Ava I, Nci I 及 Fnu4HI 之半硫代磷酸化識別 / 切割部位。放大引物也包括 3'-OH 基, 當放大引物之目標結合序列雜交至目標序列時, 3'-OH 基可藉由 DNA 聚合酶延長。至於大半 SDA 反應, 放大引物負責目標序列的放大。

延長產物為核酸, 包括一個引物(或引物之一部分)和新合成的一股, 其為引物結合部位下游目標序列之互補股。延長產物自於引物與目標序列雜交及使用目標序列作模板藉由聚合酶引物之延長。

保險槓引物(或外引物)為與放大引物上游目標序列配對的引物, 故保險槓引物之延長可置換下游放大引物及其延長產物。保險槓引物之延長為置換放大引物延長產物之方法, 但加熱也適用。

相同序列將與相同互補核苷酸序列雜交。大致相同序列之核苷酸序列充分類似, 故也可與相同部分互補核苷酸序列雜交。

目標或目標序列二詞表示有待放大的核酸序列。包含有待放大的原始核酸序列, 其互補第二股及於放大反應產生的原始序列複本任一股。目標序列也稱為雜交放大引物之延長用模板。

放大產物, 已放大產物, 或放大區包括目標序列複本且由放大引物之雜交及延長產生。本詞表示單股及雙股放大引物延長產物, 其含有原始目標序列部分, 包含放大反應中間產物。

五、發明說明(7)

股置換放大作用(SDA)為核酸放大之恆溫方法，其中引物延長，半改質限制核酸內切酶識別／切割部位切割，單股延長產物置換，引物與延長產物(或原始目標序列)的配對及後續引物之延長，同時發生於反應混合物。此乃與PCR相反，其中因反應溫度周期特性故各反應步驟在各別階段或周期發生。SDA係基於1)限制核酸內切酶可切割其雙股識別／切割部位之半硫代磷酸化形式之未改質股；及2)某些聚合酶可於切口引發複製作用並置換下游非模板股。於升溫(約95℃)初步培育而變性雙股目標序列供引物配對後，聚合反應及新合成股的置換係於恆溫進行。各目標序列新複本之產生有五步驟：1)放大引物結合原始目標序列或預先聚合的已置換單股延長產物；2)藉由5'-3'核酸外切酶缺失之聚合酶併入 α -硫去氧核苷三磷酸(α 硫-dNTP)延長引物；3)切割半改質雙股限制部位；4)由切割部位分離限制酶；及5)藉由5'-3'核酸外切酶缺失之聚合酶由切口3'端延長伴以置換下游新合成股。因從切口延長再生另一個可切割限制部位，故切割、聚合與置換於恆溫下同時連續進行。當使用一對放大引物時，其各別雜交雙股目標序列兩股之一股，放大作用為指數反應。此乃由於意義股及反意義股作為隨後放大回合之相對引物的模板。當使用單一放大引物時，由於僅有一股作為引物延長模板，故放大為線性反應。當合併有 α -硫dNTP時，切割其雙股識別／切割部位之限制核酸內切酶之例有HincII，HindII，AvaI，NciI

五、發明說明(8)

及 Fnu4HI。全部此等限制核酸內切酶及其它具有所需切割活性酶皆適用於習知 SDA。但其對溫度相當易感且在高於約 40℃ 時喪失活性。

藉 SDA 放大之目標物可使用不會切割目標序列的核酸內切酶限制將較大核酸切成片段製備。但一般具有 SDA 反應中供切割之經選擇的限制核酸內切酶識別/切割部位的目標核酸係如 Walker 等 (1992, Nuc. Acids. Res., 參見上文) 及美國專利案第 5,270,184 號 (併述於此以供參考) 敘述生產。簡言之, 若目標序列為雙股, 則 4 個引物與目標序列雜交。其中二引物 (S_1 及 S_2) 為 SDA 放大引物, 和二引物 (B_1 及 B_2) 為外引物或保險槓引物。 S_1 及 S_2 結合目標序列旁出雙股核酸之相對股。 B_1 及 B_2 分別結合 S_1 及 S_2 之目標序列 5' (亦即上游)。然後, 核酸外切酶缺失之聚合酶於三種去氧核苷三磷酸和至少一種改質去氧核苷三磷酸 (例如 2'-去氧腺核苷 5'-O-(1-硫三磷酸) "dATP α S") 存在下用以同時延長全部 4 個引物。因此 S_1 及 S_2 延長產物藉 B_1 及 B_2 延長由原始目標模板置換。放大引物經置換的單股延長產物作為結合相對放大引物和保險槓引物 (例如 S_1 的延長產物結合 S_2 及 B_2) 之目標物。下一延長與置換周期獲得兩段雙股核酸片段, 於各端有半改質限制核酸內切酶識別/切割部位。此等片段為藉 SDA 放大的適當基質。如同 SDA, 目標物生成反應之各別步驟同時連續進行, 於末端產生具有 SDA 中限制酶切割所需識別/切割序列之目標序列。因 SDA

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明(9)

反應全部成分業已存在於目標物生成反應，目標序列自動產生並連續進入SDA周期且被放大。

欲防止一種SDA反應受另一種SDA反應放大產物的交叉污染，dUTP可替代dTTP併入SDA放大DNA，而未抑制放大反應。然後，尿嘧啶改質核酸經特異識別及使用UDG處理失活化。因此若dUTP於先前反應併入經SDA放大之DNA，則於雙股目標物放大前，任何後續SDA反應可使用UDG處理，來自先前放大反應之任何含dU之DNA將變成無法放大。後續反應中有待放大的目標DNA不含dU且不受UDG處理影響。則UDG可於目標放大前，使用Ugi處理被抑制。另外UDG可藉熱失活化。嗜熱性SDA中，反應本身之高溫($\geq 50^{\circ}\text{C}$)可用來同時將UDG失活化並放大目標物。

SDA需要缺乏5'-3'外切核酸酶活性之聚合酶，其於雙股核酸之單股切口引發聚合反應，及置換切口下游股，同時使用未切割股作模板產生新的互補股。聚合酶必須藉由將核苷酸加至自由態3'-OH延長。欲獲得最佳SDA反應，也希望聚合酶具高度加工性而可獲得可被放大的最長目標序列長度。高度加工性聚合酶可在延長產物分離並終止合成前聚合有意義長度的新股。置換活性乃放大反應所必要，因置換活性使目標物可供合成另外複本並生成單股延長產物，其於指數放大反應中，第二放大引物可與之雜交。切割活性也重要，因切割使得反應永續，並引發後續目標放大回合開始。

五、發明說明 (10)

因對嗜熱性聚合酶於SDA適當溫度的活性所知極少，故開發聚合酶篩檢系統來鑑別候選嗜熱性聚合酶（若存在的話）。篩檢系統為一種延長檢定分析，其試驗聚合酶起始於雙股模板之單股切口的置換下游股能力。聚合酶置換活性存在乃SDA必要者。然而，若5'-3'核酸外切酶活性存在於其它方面皆屬適合的嗜熱性聚合酶，則可藉業界已知例行方法失活化(WO 92/06200)。於聚合酶內選擇性將核酸外切酶失活化之最常見方法之一，為：選殖聚合酶基因，鑑別編碼負責核酸外切酶之蛋白領域的基因序列部分，及藉活體外致突變作用使聚合酶失活化。另外，核酸外切酶活性可使蛋白酶處理聚合酶失活化以分離出僅具有所需聚合與置換活性的片段。因此，延長檢定分析鑑別的嗜熱性聚合酶於適當溫度下具活性，於切口引發延長作用並併入改質或非習知dNTP，但具有5'-3'核酸外切酶活性者並未自嗜熱性SDA考慮中刪除。

於聚合酶延長檢定分析中，單股由雙股核酸置換及於切口之起始，係藉由在二引物互補完整序列上配對兩個彼此恰毗鄰的引物而顯現。引物5'端經標記。若聚合酶具有股置換活性，其能在由毗鄰引物生成的"切口"上引發聚合反應且缺乏5'-3'核酸外切酶活性，兩個引物則皆被延長且兩種延長產物可經檢測。若聚合酶缺乏5'-3'核酸外切酶活性但無法在切口引發延長（例如需要間隙）或也缺乏置換活性，則僅下游引物延長產物經檢測。在

五、發明說明 (11)

切口引發但有 5'-3' 核酸外切酶活性之聚合酶，將僅產生上游引物之延長產物。

業已鑑別下列具有用於本發明所需全部特徵之聚合酶：exo- Vent(New England Biolabs)，exo- Deep Vent(New England Biolabs)，Bst(BioRad)，exo- Pfu(Stratagene)，Bca(Panvera)，及序列決定等級之Taq(Promega)。其它可使用延長檢定分析例行鑑別而無需運用本發明技巧，全部此等聚合酶皆適用於嗜熱性SDA。聚合酶Tth(Boehringer)，Tfl(Epicentre)，REPLINASE(DuPont)及REPLITHERM(Epicentre)股可由切口置換但也有5'-3'核酸外切酶活性。此等聚合酶在去除核酸外切酶活性後，例如藉由基因工程，有用於本發明之方法。至目前為止，鑑別的嗜熱性聚合酶大半於65℃-75℃具有最佳活性，而於50℃-60℃具有顯著較低之活性。但因嗜熱性限制核酸內切酶之熱安定性通常限於低於65℃，故於較低溫具最佳活性的嗜熱性聚合酶(例如Bst及Bca)於反應中與嗜熱性限制核酸內切酶更相容故較佳。

限制核酸內切酶必須夠快速從識別／切割部位分離而可有效放大目標序列，使聚合酶立刻於切口結合並引發延長作用。適用於SDA之限制核酸內切酶也需僅切割限制核酸內切酶之雙股半改質識別／切割部位之引物("切開")。因限制酶一般產生雙股裂痕，故需選擇性抑制在切割部位雙倍體中兩股之一的切割。此通常係藉合成過程中將核苷酸類似物(例如去氧核苷硫代磷酸)引進DNA

五、發明說明 (12)

一股達成，因此改質股不再對切割敏感。某些例中引進核苷酸類似物，可能導致未改質股不再對切割敏感。若未改質股保護不受切割，則核苷酸類似物可於引物合成過程中合併引起切割，如此免除添加核苷酸類似物至放大反應之需要，及可合併此種核苷酸類似物之聚合酶之需求。

但核苷酸類似物取代無法保護引物股不受到全部限制核酸內切酶作用。因此需要評估限制核酸內切酶切割特性之方法俾鑑別多種有用嗜熱性限制核酸內切酶（若存在的話）中之適當酶。因此基於併入雙股限制核酸內切酶識別／切割部位之一股來保護兩股之一股不受核酸內切酶切割之改質去氧核苷酸能力，設計鑑別具所需性質之嗜熱性限制核酸內切酶篩檢系統。稱為類似物誘發切割檢定分析或股保護檢定分析。

檢定分析中，合成單股模板和互補引物。然後較佳使用放射性標記來標記模板和引物。模板和引物雜交，藉延長引物將改質 dNTP 併入，生產含半改質限制核酸內切酶識別／切割部位之完整雙股分子。此種產物於適當切割條件下使用限制核酸內切酶處理。反應產物於變性條件下作電泳分析，藉生成的片段大小決定識別／切割部位是否經切開，切割或未切割。電泳時片段大小也用來決定識別／切割部位之兩股中之何股（亦即改質或未改質）經保護不受切割。

嗜熱性 SDA 主要如 Walker 等 (1992, PNAS 及 Nuc. Acids

五、發明說明(13)

Res., 參見上文)所述如同習知 SDA 進行, 以所需熱安定聚合酶及熱安定性限制核酸內切酶取代。當然, 反應溫度將調整至適合取代酶的較高溫, 以及 Hinc II 限制核酸內切酶識別/切割部位將由選用的熱安定性核酸內切酶的適當限制核酸內切酶識別/切割部位替代。同時與 Walker 等相反, 若酶於變性溫度夠安定, 則操作員可於最初變性步驟前將酶包含於反應混合物。用於嗜熱性 SDA 之較佳限制核酸內切酶為 Bsr I, BstNI, BsmAI, Bsl I 及 Bso BI (New England BioLabs), 及 BstOI (Promega)。較佳嗜熱性聚合酶為 Bca 及 Bst。

欲開發可得高放大因數(例如 $10^8 - 10^9$)之 SDA 系統, 推薦評估並最適化緩衝系統。評估用於嗜熱性 SDA 之新穎限制酶/聚合酶配對也屬此種情況。製造商提供限制核酸內切酶之推薦緩衝液, 其通常為含 10 mM $MgCl_2$ 之 Tris 緩衝液。也可含 50-150 mM NaCl 及/或 KCl。此等條件對嗜熱性 SDA 無需最適化, 反而期望於推薦溫度下提供 100% 核酸的雙股切割。於 SDA, 限制核酸內切酶辨認其雙股部位, 但衍生 dNTP 之取代誘使核酸內切酶切割引物股而非切割雙股。因此製造商推薦緩衝液並非表現此種改質限制核酸內切酶行為的最佳緩衝液。此外, 限制核酸內切酶必須於 SDA 與聚合酶和諧發揮功能。因此緩衝系統必須支持藉限制酶切割及藉聚合酶延長/置換二者俾使 SDA 反應進行。

評估用於新穎 SDA 限制核酸內切酶之緩衝系統時, 通

五、發明說明(14)

常可藉評估限制酶之推薦緩衝液開始緩衝液最適化。使用扣除方法，可決定何種成分為核酸內切酶切割作用必要者。結合此訊息與已知可促進SDA聚合酶活性的緩衝條件，可開發離型緩衝系統。如前討論，緩衝液最適化之一重要方向為各成分的交互作用性質。因此，需要測試各種不同成分濃度而非一次維持一種成分恆定而改變其它成分。例如若檢查多種 $MgCl_2$ 濃度同時維持 KPO_4 恆定，則結果為於該特殊 KPO_4 濃度之最佳 $MgCl_2$ 濃度。但若檢視 $MgCl_2$ 與 KPO_4 濃度之多種組合，則結果為可獲得最佳結果的 $MgCl_2$ 與 KPO_4 組合濃度。因此各緩衝液成分必須同時檢查俾確保各成分的和諧作用可得最佳放大效果。此種方法由Perry Haaland博士(Marcell Dekker, NY, 1989)在Experimental Design in Biotechnology中詳細說明。

習知SDA之緩衝液最適化方法可用於嗜熱性SDA。習知SDA之緩衝液(使用HincII/exo⁻克諾)經開發如下：使用市售限制核酸內切酶緩衝液各別進行SDA。此等緩衝液含有20-50mM Tris pH7.4-8, 50-150mM NaCl及/或KCl(或乙酸鹽)及5-12mM $MgCl_2$ 。最佳支持SDA之HincII緩衝液為得自GIBCO-BRL之REACT6，雖然製造商推薦REACT4用於HincII進行雙股切割(20mM Tris, pH7.4, 5mM $MgCl_2$ 及50mM KCl)。REACT6緩衝液含50mM Tris pH7.4, 6mM $MgCl_2$, 50mM NaCl及50mM KCl。進行進一步試驗，其中認定 $MgCl_2$ 及 K^+ 為最重要的緩衝液成分。因此 KPO_4

五、發明說明(15)

緩衝液取代 Tris 作為 K^+ 來源。此種緩衝液可支持限制核酸內切酶活性及聚合酶活性二者，導致習知 SDA 反應之高度放大。使用 KPO_4 緩衝液與限制核酸內切酶非典型，但證實當分析緩衝液成分時，適合 SDA 中之限制核酸內切酶／聚合酶組合。較常見之緩衝液（亦即 Tris）曾以類似方式檢查，但並未進一步促進放大作用。

類似的最適化方法可用於決定嗜熱性 SDA 之任何限制核酸內切酶／聚合酶組合之適當緩衝液，僅需例行試驗而無需運用本發明技巧。許多情況下，典型用於習知 SDA 之 KPO_4 ／ $MgCl_2$ 緩衝液適用於嗜熱性 SDA，或如所述或對此等成分濃度作若干例行修改（參見實例 5）。

實例 1

篩檢聚合酶之延長檢定分析

使用質體 pBR322 作目標物，合成兩個引物基於質體上恰彼此毗鄰配對。引物 PBR1 為上游引物且對應於 pBR322 之氮鹼基 3661-3690。引物 PBR2 雜交 PBR1 下游且對應於氮鹼基 3691-3720。此等 30 聚物寡核苷酸係使用應用生物系統 (Applied Biosystems) DNA 型號 380 合成儀合成，並藉由變性丙烯醯胺凝膠電泳純化。引物分別於激酶反應中使用 $10\mu M$ 引物， $50mM$ Tris, pH7.5, $10mM$ $MgCl_2$ ， $70\mu Ci^{32}P$ -ATP 及 10 單位聚核苷酸激酶以 $10\mu L$ 反應體積於 $37^\circ C$ 分別標記 30 分鐘。經標記之引物與 200 ng 經 Pst I／Hinc II 水解的 pBR322 於終濃度 $0.2\mu M$ （各引物）合併。目標 pBR322 DNA 於含 $25mM$ KPO_4 pH7.4，

五、發明說明 (16)

2-8 mM $MgCl_2$ 及 0.2-1mM dNTP之緩衝液於 98℃ 變性 3 分鐘。然後混合物冷卻至選定的反應溫度 (50-70℃) 2 分鐘。加入一單位聚合酶並任反應進行 10分鐘。藉加入等體積 95% 甲醯胺 / 50mM EDTA / 溴酚藍染料終止反應。25 μ L 反應液於 6% 變性凝膠上電泳及將凝膠曝露於自動放射線攝影底片 (柯達, XAR5)。

前述反應條件用於檢定分析試驗聚合酶於 50℃, 60℃ 及 70℃ 之活性。各情況下, 聚合酶於全部習知去氧核苷酸 (dNTP) 存在下, 或於習知 dNTP 與一種硫取代去氧核苷酸 (α 硫 dCTP, "dCTP α S 混合物") 存在下試驗。試驗聚合酶及反應條件示於下表:

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

原

五、發明說明 (17)

反應編號	溫度(℃)	dNTP 或 dCTP 混合物	MgCl ₂	聚合酶(1 單位)
1	50	1 mM dNTP	8 mM	Bst
2	50	1 mM dCTPαS mix	8 mM	Bst
3	50	0.2 mM dNTP	4 mM	Bca
4	50	0.2 mM dCTPαS mix	4 mM	Bca
5	50	1 mM dNTP	5.2 mM	exo-Deep Vent
6	50	1 mM dCTPαS mix	5.2 mM	exo-Deep Vent
7	50	0.2 mM dNTP	2 mM	exo- Vent
8	50	0.2 mM dCTPαS mix	2 mM	exo-Vent
9	50	0.2 mM dNTP	2 mM	exo-Pfu
10	50	0.2 mM dCTPαS mix	2 mM	exo-Pfu
11	60	1 mM dNTP	8 mM	Bst
12	60	1 mM dCTPαS mix	8 mM	Bst
13	60	0.2 mM dNTP	4 mM	Bca
14	60	0.2 mM dCTPαS mix	4 mM	Bca
15	60	1 mM dNTP	5.2 mM	exo-Deep Vent
16	60	1 mM dCTPαS mix	5.2 mM	exo-Deep Vent
17	60	0.2 mM dNTP	2 mM	exo-Vent
18	60	0.2 mM dCTPαS mix	2 mM	exo-Vent
19	60	0.2 mM dNTP	2 mM	exo-Pfu
20	60	0.2 mM dCTPαS mix	2 mM	exo-Pfu
21	70	1 mM dNTP	8 mM	Bst
22	70	1 mM dCTPαS mix	8 mM	Bst
23	70	0.2 mM dNTP	4 mM	Bca
24	70	0.2 mM dCTPαS mix	4 mM	Bca
25	70	1 mM dNTP	5.2 mM	exo-Deep Vent
26	70	1 mM dCTPαS mix	5.2 mM	exo-Deep Vent
27	70	0.2 mM dNTP	2 mM	exo-Vent
28	70	0.2 mM dCTPαS mix	2 mM	exo-Vent
29	70	0.2 mM dNTP	2 mM	exo-Pfu
30	70	0.2 mM dCTPαS mix	2 mM	exo-Pfu

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

原

五、發明說明 (18)

可延長兩種引物伴以置換下游新合成股之聚合酶，在自動放射線照片上產生二帶。大帶表示 PBR1 延長至經水解的目標質體之 Hinc II 部位，長度為 244 核苷酸。小帶為延長至 Hinc II 部位的 PBR2 延長產物，長度為 214 核苷酸。僅產生一種延長產物時，自動放射性照片上僅檢得一帶。唯一一帶是二帶中之小帶時，唯有下游引物 (PBR2) 被延長。此種聚合酶或因無法藉由在切口引發延長而延長上游引物；或因無法置換切口下游股；故不適合 SDA。僅檢得大帶時，聚合反應在切口引發，但聚合酶也具有 5'-3' 核酸外切酶活性。

可用於嗜熱性 SDA 之延長檢定分析中，鑑別的聚合酶活性圖摘述於下表：

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

象

五、發明說明(19)

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

聚合酶	股置換	5'-3'-外	最適溫度	來源
Bst (<i>B. stearothermophilus</i>)	是	否	65°C	BioRad & MBR
Bca (<i>B. caldotenax</i>)	是	否	65°C	Panvera (Takara)
exo-Vent (<i>Thermococcus litoralis</i>)	是	否	72°C	NEB
exo-Deep Vent (<i>Pyrococcus</i> sp. GB-D)	是	否	72°C	NEB
exo-Pfu	是	否	72°C	Stratagene
Tth (<i>Thermus</i> <i>thermophilus</i> HB-8)	是	是	72°C	Boehringer Mannheim & Epicentre
Tfl (<i>Thermus flavus</i>)	是	是	72°C	Epicentre
Replinase	是	是	72°C	DuPont
Replitherm	是	是	72°C	Epicentre
Taq (<i>Thermus aquaticus</i>)	是	是	72°C	Perkin-Elmer Cetus, USB & Boehringer-Mannheim
Sequencing Grade Taq (<i>Thermus aquaticus</i>)	是	否	72°C	Promega

檢定分析中，Bst聚合酶(BioRad)及Bca聚合酶(Panvera, Takara, 亦知Ladderman聚合酶)產生兩種延長產物。本例試驗的聚合酶中，唯有此二者符合全部要求(於切口引發股置換及併入硫取代去核苷酸)出現於50°C至70°C之全部溫度範圍。因此，Bca及Bst聚合酶在正常緩衝條件下，50°C至70°C整個範圍內可用於嗜熱性SDA反應。第二組聚合酶(Exo-Vent, exo-Deep Vent及exo-

五、發明說明(20)

Pfu)於該溫度範圍產生PBR2延長產物，但低於70℃即無法產生意義量的PBR1延長產物。使用此三種聚合酶於50℃未檢知任何2/44核苷酸PBR1延長產物，而於60℃僅少量經檢知。但於70℃皆產生有意義量的兩種延長產物。此等結果指示置換活性及／或於切口引發乃Exo⁻Vent, exo⁻Deep Vent及exo⁻Pfu的溫度相關活性。然而，該等聚合酶能併入硫取代去氧核苷酸且具SDA所需全部其它活性。第二組聚合酶可連同於約70℃或更高溫有作用的限制核酸內切酶，較佳連同最適溫度於70℃左右的限制核酸內切酶合併用於嗜熱性SDA中。另外，其置換活性可藉於較低溫下加入溶劑如約15%甘油或約15% DMSO增強。

於檢定分析試驗序列決定等級Taq, Tth, Tfl, REPLINASE及REPLITHERM聚合酶時僅見PBR1延長產物。此等結果指示此等聚合酶可於切口引發，但具有5'-3'核酸外切酶活性。使用業界已知方法選擇性去除5'-3'核酸外切酶活性，此種聚合酶也可用於嗜熱性SDA。

實例2

限制核酸內切酶篩檢用股保護檢定分析

構築含限制核酸內切酶之半改質識別／切割部位之雙股寡核苷酸。雙股寡核苷酸係藉由首先合成長16核苷酸之共用引物(序列識別編號1或序列識別編號2)及長44-57核苷酸之各模板股而構築。各模板股含串列的多個識別／切割部位，各部位間通常有填充子序列。切割部

五、發明說明 (21)

位在寡核甘酸上，故各部位的切開或切割將生成可於凝膠上依大小區別的片段。某些例中，核酸內切酶具有簡併性識別／切割部位，試驗其中之若干者。合成模板如下：

CDa1S1 (序列識別編號：3)

5'-TACAATAGTCCCAATCTACCCGAGCTTACACGGAGGCATCAAGTG-3'

CDa2S1 (序列識別編號：4)

5'-TACAATAGTCCCAATCTACTCGGGCTTACACGGAGGCATCAAGTG-3'

TP-1 (序列識別編號：5)

5'-CCGGAATTCTGAATGCCAAAAGACTGGGTCTCCAGGAACCAACTCGGCCGGATCCGC-3'

TP-1C (序列識別編號：6)

5'-CCGGAATTCTGGTTCCTGGAGACCCAGTCTTTTGGCATTCACTCGGCCGGATCCGC-3'

TP-3 (序列識別編號：7)

5'-GGAATTCGGTCCCGAGTGATGAAGATCGCAGCGCCCGAGACTCGGCCGGATCCGC-3'

TP-3C (序列識別編號：8)

5'-GGAATTCCTCGGGCGCTGATCTTCATCACTGTCCCACTCGGCCGGATCCGC-3'

TP-4 (序列識別編號：9)

5'-GGAATTCCTCGAGGAAGGTAGACGCAATGGCGGCACTCGGCCGGATCCGG-3'

TP-4C (序列識別編號：10)

5'-GGAATTCGCAGCCATTGCGTCTACCAACCTCGGGACTCGGCCGGATCCGG-3'

SSP-BSMA (序列識別編號：19)

5'-GAGAATTCGTGGACTGCAGATGTCTCCAATCCCCCTCACAACGTTCCAGTAACC-3'

序列識別編號：1引導序列識別編號：5-10及序列識別編號：2引導序列識別編號：2-4。此等模板含有下列限制

五、發明說明(22)

核酸內切酶之識別／切割部位：Acc I，Asp I，Bsa I，BsaBI，BsiYI，Bsl I，Bsm I（兩個簡併性部位），BsmAI，BsmFI，BsmHI，BspWI，BsoBI（四個簡併部位），BsoFI，Bsr I（兩個簡併性部位），BsrBRI，BsrDI（兩個簡併性部位），Bst71I，BstNI（兩個簡併部位），BstOI，BstXI，Dpn I，Hae II，Mam I，Mbo II，Mva I，Mwo I，Sfi I 及 Tth111I。

引物和模板於合成後，藉凝膠電泳純化及使用標準方法從凝膠片電溶離。然後，使用T4聚核苷酸激酶和 γ -[32 P]-腺核苷三磷酸於5'端標記供後續自動放射性攝影檢測。典型激酶反應含有2 μ L 10X激酶緩衝液(New England Biolabs)，10 μ L γ -[32 P]-ATP(3000curies/mmol, NEN-DuPont)引物或模板獲得終濃度1 μ M，20單位T4聚核苷酸激酶(New England Biolabs)，及水調整為總反應體積20 μ L。激酶反應於37℃進行30分鐘，然後於沸水加熱5分鐘終止反應。然後，引物與各模板雜交並使用聚合酶及多種硫代磷酸取代之核苷酸延長，產生雙股寡核苷酸，其中識別／切割部位經半改質。經衍生的dNTP於試驗切割活性影響之不同實驗中併入識別／切割部位兩股之一股或另一股。然後，經放射性標記的引物及模板於封閉的0.5mL聚丙烯微離心管內經由混合各2 μ L之引物及模板，1 μ L REACT-1緩衝液(Life Technologies)，及11.5 μ L去離子蒸餾水而配對。混合物於沸水浴加熱3分鐘，然後藉由熱源移開水浴，緩慢

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(23)

冷卻至 37℃。然後將管移至 37℃ 培育器，雜交之引物藉加入下列各者於模板上延長：1 μL 適當去氧核甘三磷酸(dNTP)混合物，其中含至少一種硫-dNTP，2 μL 10 mM 二硫赤絲醇(DTT)及 0.5 μL 10 U/μL 核酸外切酶缺乏克諾聚合酶溶液(U.S. Biochemicals)。延長反應中各 dNTP 終濃度為 250 μM。任引物延長反應進行 20 分鐘，然後藉於 75℃ 加熱 10 分鐘終止反應。

延長後整分如限制核酸內切酶供應商推薦 10 倍稀釋於限制核酸內切酶活性之適當緩衝液內。檢定分析中 DNA 分子終濃度為 10 nM。藉添加 5 至 10 單位適當限制核酸內切酶至各反應混合物引發股保護檢定分析。反應於限制核酸內切酶供應商推薦之溫度下培育。於固定間隔移出樣品，並加入等體積甲醯胺讀序反應終止溶液(U.S. Biochemicals)而淬熄反應。淬熄樣品於冰上儲存至全部樣品皆收集為止。然後，樣品於沸水浴加熱 3 分鐘並於 Tris-硼酸鹽緩衝液(Gibco-BRL)中載至 8% 聚丙烯醯胺，7M 尿素 DNA 序列決定凝膠。於 57W 恆定電力進行電泳 1 小時。經放射性標記之 DNA 帶使用富士 RX 級 X 光底片做自動放射性攝影觀察。

試驗的嗜熱性限制核酸內切酶中，鑑定出有 11 種完全或幾乎完全切割半改質識別／切割部位：列舉於下表。某些例中當於股保護檢定分析半改質時僅簡併性部位之一部位為限制核酸內切酶所切割。模板中識別／切割部位由核甘酸部位連同多種硫代磷酸取代結果指示。

五、發明說明 (24)

若併入 dNTP α S 獲得衍生股之完全或幾乎完全保護 (亦即未改質股經切割), 則列舉核苷酸取代。"無"表示未見任何疏核苷酸取代導致切割。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (25)

酶	模 板	識 別 部 位 +	以 dNTP α S 保 護
Acc I	序 列 識 別 編 號 : 9	17-22	C
Bsl I	序 列 識 別 編 號 : 9	7-17	C
Bsm I	序 列 識 別 編 號 : 5	10-15	C-未改質股經保護
	序 列 識 別 編 號 : 6	35-40	A-改質股經保護
BsmA I	序 列 識 別 編 號 : 5	27-31	G+T
	序 列 識 別 編 號 : 19	22-31	G
BsoB I	序 列 識 別 編 號 : 7	33-38	無
	序 列 識 別 編 號 : 10	29-34	C
	序 列 識 別 編 號 : 3	19-24	T
	序 列 識 別 編 號 : 4	19-24	C
Bsr I	序 列 識 別 編 號 : 5	22-26	無
	序 列 識 別 編 號 : 7	12-16	A
BsrD I	序 列 識 別 編 號 : 9	23-28	無
	序 列 識 別 編 號 : 10	13-18	T
BstN I	序 列 識 別 編 號 : 5	31-35	無
	序 列 識 別 編 號 : 6	15-19	A+C
BstO I	序 列 識 別 編 號 : 5	31-35	無
	序 列 識 別 編 號 : 6	15-19	A+C
BstX I	序 列 識 別 編 號 : 5	15-27	T
Mwo I	序 列 識 別 編 號 : 9	23-33	G+T

+ 識 別 部 位 係 以 自 模 板 股 5'端 之 核 苷 酸 表 示 。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明 (26)

令人感興趣注意的是：於序列識別編號：5於 Bsm I 10-15 部位的識別部位具有未改質股之保護作用，亦即改質股被切割。提示於嗜熱性 SDA，使用此種識別部位併用硫衍生引物替代習知未改質引物的可能性。此種系統中，可於無衍生 dNTP 存在下進行切割及置換。免除聚合酶必須能併入衍生 dNTP 之需求。

此等候選的限制核酸內切酶進一步試驗其於 50℃ 至 65℃ 範圍之熱安定性。唯有 Acc I 於此溫度範圍具未臻滿意之安定性且無法藉由添加常用安定劑如雙股 DNA 及 BSA 安定化。其餘九種限制核酸內切酶如實例 3 於線性 SDA 反應中試驗。除 Mwo I 外，全部獲得放大產物。可能此種酶從切割識別／切割部位分離太緩慢；或於第一延長步驟將硫化核苷酸併入識別／切割部位兩股後無法再度切割該部位（亦即引發後續放大周期）。另外，Mwo I 切割活性與緩衝系統不相容，因此可如前述最適化，使 Mwo I 也可用於嗜熱性 SDA。

如實例 3 之線性 SDA 可使用 BsoBI，Bsr I，BstNI，BsmAI 及 Bsl I，以 dUTP 取代 TTP 進行。確認此等限制核酸內切酶與 UDG 污染去除方法之相容性。BsoBI，BstNI 及 BsmAI 不受 dU 於識別／切割部位之負面影響，但於此等條件下，Bsr I 及 Bsl I 之線性 SDA 效率降低。因 Bst 和 Bca 聚合酶顯然不受 dUTP 取代影響，故 Bsr I 及 Bsl I 切割活性降低，可能係因 dU 併入酶之識別／切割部位。因 Bsl I 切割部位出現於簡併性序列，故相信該

五、發明說明 (27)

部位可改變俾克服 du 對此種酶切割活性的影響。

鑑別若干嗜熱性限制核酸內切酶其於股保護檢定分析之初步篩檢條件下具有部分或低切割活性(例如 Tth111I, BsiYI 及 BsoFI)。此等核酸內切酶之切割活性可藉由使反應條件最適化(例如藉最適化緩衝液或調整反應溫度)獲得最佳活性,使其更可用於嗜熱性 SDA。此外,已知限制核酸內切酶識別/切割部位旁出序列會影響核酸內切酶活性,故改變模板旁出序列也可改善核酸內切酶切割活性,該酶於本例條件下僅能部分切割或促進於本例條件下無法切割之核酸內切酶切割活性。

實例 3

線性嗜熱性 SDA

聚合酶 Bst 及限制核酸內切酶 BsrI 於 60℃ 進行的線性 SDA 反應試驗。成功地放大目標序列,不僅表示聚合酶和限制核酸內切酶於嗜熱性 SDA 反應條件下能起作用,同時也表示產生 SDA "同轉",亦即於切割半改質識別/切割部位後限制核酸內切酶分離,因而引發聚合反應伴以重複聚合反應周期。

合成具兩種如下核苷酸序列之 DNA 寡聚體:

CCACCTCTGACTTGAGCGTCCCAGTGTCAATACGGCGGAGCCTATGGAGTAACGCC

(序列識別編號:11)

GCAAAAGGCCAGGAACCGATAAAAGGATGCGTTGCTGGCGTTACTCCATAGGCTCCG

(序列識別編號:12)

此等寡核苷酸彼此雜交,有 21 氮鹼基對重疊並突出單股

五、發明說明(28)

5'端。Brs I 識別 / 切割部位於序列識別編號 11 以畫底線斜體字表示。

寡聚體經由 100℃ 下培育 3 分鐘，接著緩慢冷卻至 60℃ 配對。然後使用 Bst 聚合酶，三種習知去氧寡核苷酸 (dCTP, dTTP 及 dGTP 其中一者帶有 α - 32 P 標記) 及 2'-去氧腺核苷 5'-O-(1-硫三磷酸) (dATP α S) 延長生成完全雙股片段。此雙倍體長 92 核苷酸。然後加入 Bsr I 核酸內切酶開始放大反應 (時間 = 0)。當互補股含有改質腺核苷時，Bsr I 切割兩 C 間識別 / 切割部位之未改質股。然後聚合酶於切口上引發並以 5'-3' 方向聚合置換長 70 核苷酸之單股寡聚體。第一聚合周期後，核酸內切酶識別 / 切割部位再生，但先前未改質的識別 / 切割部位之該股在切口 3' 以 dA α S 部分取代。但不干擾 SDA。重複切割及聚合周期從最初存在於反應之各雙倍體產生 70 核苷酸延長產物多複本。

SDA 反應後於 60℃ 於 20 μ L 緩衝液進行，緩衝液包括 25mM K_2HPO_4 pH 7.6; 6mM MgCl_2 ; 50mM KCl, 0.5mM dCTP, dTTP, dGTP 及 dATP α S; 100 μ Ci [α - 32 P]dCTP (3000 Ci/mmol); 各 50nM 寡聚體; 50 單位 Bsr I 核酸內切酶及 2 單位 Bst 聚合酶。5, 10 及 20 分鐘後由反應液取出整數分 (5 μ L)。於變性聚丙烯醯胺凝膠上電泳分離標記產物並以自動放射性攝影觀察。第一系列 SDA 反應含前述全部試劑。第二系列 SDA 反應刪除 Bsr I。第三 SDA 反應於生成雙倍體後而添加限制核酸內切酶前，將 Bst

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

原

五、發明說明 (29)

聚合酶藉加熱 (100℃, 5min) 失活化。

於第一時間點 (5 分鐘) 及隨後於第一反應系列, 檢得預期 70 核苷酸延長產物。也可見完整互補股長 92 核苷酸帶。第二系列反應僅顯示 92 核苷酸反應產物, 因不具 Bsr I 切割活性, 故無法產生 70 核苷酸延長產物。第三系列反應僅顯示切割雙倍體, 由長 70 核苷酸之微弱帶及長 92 核苷酸之微弱帶可證, 二帶皆因最初存在於反應之未放大雙倍體所致。本實驗中, SDA 周期的周轉速率由底片密度估計約為 1 min^{-1} 。

實例 4

指數嗜熱性 SDA

BsoBI (由 New England Biolabs 由桿菌菌屬分離) 及 Bca 聚合酶 (PanVera Corporation 由 Bacillus caldotenax 選殖) 藉嗜熱性 SDA 用以驗證目標序列的指數放大。合成互補寡聚體作為雙股目標序列 (序列識別編號: 13) 之兩個單股。5 μL 含不等濃度之目標序列加至各反應混合物。若干反應未接受目標序列。也合成放大引物。引物 XBsoB1-1 (序列識別編號: 14) 如同引物 XBsoB1-2 (序列識別編號: 15) 含有單股型 BsoBI 限制核酸內切酶識別 / 切割部位。

引物 XBsoB1-1 雜交至目標序列之一股, 生成具突起單股 5' 端之 17 氮鹼基對重疊。內縮雙股 3' 端藉聚合酶延長, 獲得含雙股半改質 BsoBI 識別 / 切割部位之長 103 核苷酸之完全雙股片段。類似地, 引物 XBsoB1-2 雜交至目

五、發明說明(30)

標序列相對股生成具突出單股5'端之17氮鹼基對雙股重疊。此種構造也藉聚合酶填入產生含雙股半改質BsoBI識別/切割部位之雙股103元體。

反應混合物扣除Bca及BsoBI，加熱3分鐘使目標DNA變性，然後冷卻至反應溫度60℃。平衡3分鐘後，以總體積5μL加入4單位Bca聚合酶及16單位BsoBI。反應混合物(終體積50μL)內試劑終濃度為25mM K₂PO₄ pH 7.6；各1.375mM dCTPαS, dATP, dGTP及dTTP；100μg/ml乙醯化牛血清白蛋白；6.5mM MgCl₂；0.05μM XBsoBI-1；0.05μM XBsoBI-2；16單位BsoBI，4單位Bca，+/- 目標序列。放大反應進行1小時，然後藉由將試管放置於沸水浴中5分鐘終止反應。

放大產物如下檢測。取出各10μL整分反應液及加入³²P標記引物(序列識別編號:16)。引物雜交至任何存在的放大產物後，如Walker等1992. Nuc. Acids Res., (參見上文)所述，藉加入聚合酶延長至診斷長度。10μM變性負載溶液加入整分，然後加熱。10μL於變性聚丙烯醯胺凝膠上電泳分析。

本實驗可檢測寡核苷酸之預測長度為1)58核苷酸，由引物於經切割經置換的放大產物之延長產生，及2)81核苷酸，由引物於完整全長目標之延長產生。當少至150分子目標序列加至放大反應時，雖然反應條件並非最適當，但該方法夠靈敏可檢測放大反應。

實例5

五、發明說明(31)

習知 SDA 與嗜熱性 SDA 之比較

使用 BsoBI 作限制核酸內切酶之嗜熱性線性 SDA 與使用 HincII 之習知線性 SDA 比較。放大反應係於下示條件下進行：

HincI (反應條件 A)

45mM K_2PO_4 , pH7.6

10% DMSO

各 0.25mM dATP α S, dCTP, dGTP, dTTP

100 μ g/mL 乙醯化牛血清白蛋白

6mM $MgCl_2$

50nM 引物 / 目標複合物 (序列識別編號:17 及序列識別編號:18)

150 單位 HincII

10USB 單位 exo⁻ 克諾聚合酶

0.01mCi α -³²P-dCTP

BsoBI (反應條件 B)

25mM K_2PO_4 , pH8.3

各 0.25mM dCTP α S, dATP, dGTP, dTTP

100 μ g/mL 乙醯化牛血清白蛋白

15mM $MgCl_2$

50nM 引物 / 目標複合物 (序列識別編號:15 及序列識別編號:13 互補股)

16 單位 BsoBI

4 單位 Bca 聚合酶

0.01mCi α -³²P-dATP

五、發明說明 (32)

BsoBI (反應條件 C)

25mM K_2PO_4 , pH8.3

各 0.25mM dCTP α S, dATP, dGTP, dTTP

100 μ g / mL 乙醯化牛血清白蛋白

6mM $MgCl_2$

50nM 引物 / 目標複合物 (序列識別編號 : 15

及序列識別編號 : 13 互補股)

16 單位 BsoBI

4 單位 Bca 聚合酶

0.01mCi α - 32 P-dATP

反應混合物 (扣除酵素) 加熱 3 分鐘使反應 DNA 變性及冷卻至所需放大溫度以配對引物 (HincII 40℃ 及 BsoBI 60℃)。平衡 3 分鐘後加入 2 μ L 聚合酶及延長反應進行 20 分鐘產生完全雙股目標, HincII 系統為長 85 核苷酸及 BsoBI 系統為長 103 核苷酸。然後 3.5 μ L 整分移至 5 μ L 終止溶液作延長反應對照。然後加入適當限制核酸內切酶 (2 μ L)。HincII 之時間點取在 5, 20 及 60 分鐘。BsoBI 之時間點取在 1, 3 及 6 分鐘。直接加入 5 μ L 終止溶液於各時間點之整分。然後樣品藉沸騰 2 分鐘加熱, 5 μ L 載至變性聚丙烯醯胺凝膠上電泳。凝膠藉由自動放射性攝影分析。

HincII 習知 SDA 反應之預期反應產物為全長完整目標分子 (長 85 核苷酸) 及經切割經置換的放大產物 (長 60 核苷酸)。BsoBI 預期反應產物為全長目標物 (長 103 核苷酸)。

五、發明說明 (33)

酸)及一 81 聚體放大產物。此等產物皆檢得。但習知 Hinc II / exo⁻ 克諾系統與 BsoBI / Bca系統間之反應速率有顯著差異。Hinc II 反應約需 60 分鐘來產生可檢測濃度的經切割經置換放大產物。相反地, BsoBI 系統僅約需 6 分鐘來產生可檢測濃度之目標序列放大。對 BsoBI 系統試驗兩種反應條件, 使用較低濃度 MgCl₂ 之反應條件 C 獲得較反應條件 B 改良之放大速率。

序列表

(i) 一般資訊:

(i) 申請人: Fraiser, Melinda S.

Spargo, Catherine A.

Walker, George T.

Van Cleve, Mark

Wright, David J.

(ii) 發明名稱: 使用嗜熱性酶之股置換放大作用

(iii) 序列數: 19

(iv) 通訊地址:

(A) 受信人: Richard J. Rodrick, Becton

Dickinson and Company

(B) 街名: 1 Bacton Drive

(C) 市名: Franklin Lakes

(D) 州名: NJ

(E) 國名: US

(F) 郵遞區號: 07417

五、發明說明 (34)

(v) 電腦可讀格式：

- (A) 媒體類型：軟性磁碟
- (B) 電腦：IBM PC相容
- (C) 作業系統：PC-DOS / MS-DOS
- (D) 軟體：PatentIn Release #1.0, Version #1.25

(IV) 目前申請資料：

- (A) 申請案號：
- (B) 申請日期：
- (C) 分類：

(viii) 代理人資訊：

- (A) 名稱：Fugit Donna R.
- (B) 登錄編號：32,135
- (C) 參考編號：P-2961

(2) 序列識別編號 1 之資訊：

(i) 序列特徵：

- (A) 長度：16 氮鹼基對
- (B) 類別：核酸
- (C) 股性：單
- (D) 型態：線性

(ii) 分子類別：DNA (基因組)

(xi) 序列說明：序列識別編號 1：

GCGGATCCGG CCGAGT

16

五、發明說明 (35)

(2) 序列識別編號 2 之資訊：

(i) 序列特徵：

(A) 長度：21 氮鹼基對

(B) 類別：核酸

(C) 股性：單

(D) 型態：線性

(ii) 分子類別：DNA (基因組)

(xi) 序列說明：序列識別編號 2：

CACTTGATGC CTCCTGTAA G

21

(2) 序列識別編號 3 之資訊：

(i) 序列特徵：

(A) 長度：45 氮鹼基對

(B) 類別：核酸

(C) 股性：單

(D) 型態：線性

(ii) 分子類別：DNA (基因組)

(xi) 序列說明：序列識別編號 3：

TACAATAGTC CCAATCTACC CGAGCTTACA CGGAGGCATC AAGTG

45

(2) 序列識別編號 4 之資訊：

(i) 序列特徵：

(A) 長度：45 氮鹼基對

(B) 類別：核酸

(C) 股性：單

(D) 型態：線性

五、發明說明 (36)

(ii) 分子類別：DNA (基因組)

(xi) 序列說明：序列識別編號 4：

TACAATAGTC CCAATCTACT CGGGCTTACA CGGAGGCATC AAGTG

45

(2) 序列識別編號 5 之資訊：

(i) 序列特徵：

(A) 長度：56 氮鹼基對

(B) 類別：核酸

(C) 股性：單

(D) 型態：線性

(ii) 分子類別：DNA (基因組)

(xi) 序列說明：序列識別編號 5：

CCGGAATTCTG AATGCCAAAA GACTGGGTCT CCAGGAACCA ACTCGGCCGG ATCCGC

56

(2) 序列識別編號 6 之資訊：

(i) 序列特徵：

(A) 長度：56 氮鹼基對

(B) 類別：核酸

(C) 股性：單

(D) 型態：線性

(ii) 分子類別：DNA (基因組)

(xi) 序列說明：序列識別編號 6：

CCGGAATTCTT GGTTCCTGGA GACCCAGTCT TTTGGCATTCT ACTCGGCCGG ATCCGC

56

(2) 序列識別編號 7 之資訊：

(i) 序列特徵：

(A) 長度：54 氮鹼基對

五、發明說明 (37)

(B) 類別：核 酸

(C) 股 性：單

(D) 型態：線 性

(ii) 分子類別：DNA (基因組)

(xi) 序列說明：序列識別編號 7：

GGAATTCCGT CCCAGTGATG AAGATCGCAG CGCCCGAGAC TCGGCCGGAT CCGC

54

(2) 序列識別編號 8 之資訊：

(i) 序列特徵：

(A) 長度：52 氮 鹼 基 對

(B) 類別：核 酸

(C) 股 性：單

(D) 型態：線 性

(ii) 分子類別：DNA (基因組)

(xi) 序列說明：序列識別編號 8：

GGAATTCCCT CGGGCGCTGA TCTTCATCAC TGTCCCACTC GGCCGGATCC GC

52

(2) 序列識別編號 9 之資訊：

(i) 序列特徵：

(A) 長度：49 氮 鹼 基 對

(B) 類別：核 酸

(C) 股 性：單

(D) 型態：線 性

(ii) 分子類別：DNA (基因組)

(xi) 序列說明：序列識別編號 9：

GGAATTCCCG AGGAAGGTAG ACGCAATGGC GGCACCTCGGC CGGATCCGG

49

五、發明說明 (38)

(2) 序列識別編號 10 之資訊：

(i) 序列特徵：

(A) 長度：50 氮鹼基對

(B) 類別：核酸

(C) 股性：單

(D) 型態：線性

(ii) 分子類別：DNA (基因組)

(xi) 序列說明：序列識別編號 10：

GGAATTCGCA GCCATTGCGT CTACCAACCT CGGGACTCGG CCGGATCCGG

50

(2) 序列識別編號 11 之資訊：

(i) 序列特徵：

(A) 長度：56 氮鹼基對

(B) 類別：核酸

(C) 股性：單

(D) 型態：線性

(ii) 分子類別：DNA (基因組)

(xi) 序列說明：序列識別編號 11：

CCACCTCTGA CTTGAGCGTC CCAGTGTC AA TACGGCGGAG CCTATGGAGT AACGCC

56

(2) 序列識別編號 12 之資訊：

(i) 序列特徵：

(A) 長度：57 氮鹼基對

(B) 類別：核酸

(C) 股性：單

(D) 型態：線性

五、發明說明 (39)

(ii) 分子類別：DNA (基因組)

(xi) 序列說明：序列識別編號 12：

GCAAAAGGCC AGGAACCGAT AAAAGGATGC GTTGCTGGCG TTA CTCCATA GGCTCCG

57

(2) 序列識別編號 13 之資訊：

(i) 序列特徵：

(A) 長度：70 氮鹼基對

(B) 類別：核酸

(C) 股性：雙

(D) 型態：線性

(ii) 分子類別：DNA (基因組)

(xi) 序列說明：序列識別編號 13：

CCGGAGCTGA ATGAAGCCAT ACCAAACGAC GAGCGTGACA CCACGATGCC TGCAGCAATG

60

GCAACAACGT

70

(2) 序列識別編號 14 之資訊：

(i) 序列特徵：

(A) 長度：50 氮鹼基對

(B) 類別：核酸

(C) 股性：單

(D) 型態：線性

(ii) 分子類別：DNA (基因組)

(xi) 序列說明：序列識別編號 14：

GTATTC TGCT GCTCTGTTCC GCCTCGGTA GACACGTTGT TGCCATTGCT

50

(2) 序列識別編號 15 之資訊：

(i) 序列特徵：

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

頁

五、發明說明(40)

(A) 長度：50 氮鹼基對

(B) 類別：核酸

(C) 股性：單

(D) 型態：線性

(ii) 分子類別：DNA (基因組)

(xi) 序列說明：序列識別編號 15：

GGATTGCGCT CCAGATCTGG TCCTCGGGTA GACCCGGAGC TGAATGAAGC

50

(2) 序列識別編號 16 之資訊：

(i) 序列特徵：

(A) 長度：23 氮鹼基對

(B) 類別：核酸

(C) 股性：單

(D) 型態：線性

(ii) 分子類別：DNA (基因組)

(xi) 序列說明：序列識別編號 16：

CATCGTGGTG TCACGCTCGT CGT

23

(2) 序列識別編號 17 之資訊：

(i) 序列特徵：

(A) 長度：49 氮鹼基對

(B) 類別：核酸

(C) 股性：單

(D) 型態：線性

(ii) 分子類別：DNA (基因組)

(xi) 序列說明：序列識別編號 17：

ATACGGGTTA CTGATGATGA ACATGCCCGG TTACTGGAAC GTTGTGAGG

49

五、發明說明(41)

(2) 序列識別編號18之資訊：

(i) 序列特徵：

(A) 長度：57氮鹼基對

(B) 類別：核酸

(C) 股性：單

(D) 型態：線性

(ii) 分子類別：DNA (基因組)

(xi) 序列說明：序列識別編號18：

GAGAATTCGT GGACTGCAGA TCGTTGACGT GATTACCCTC ACAACGTTCC AGTAACC

57

(2) 序列識別編號19之資訊：

(i) 序列特徵：

(A) 長度：55氮鹼基對

(B) 類別：核酸

(C) 股性：單

(D) 型態：線性

(ii) 分子類別：DNA (基因組)

(xi) 序列說明：序列識別編號19：

GAGAATTCGT GGACTGCAGA TGTCTCCAAT CCCCCCTCAC AACGTTCCAG TAACC

55

四、中文發明摘要(發明之名稱： 使用嗜熱性酶之股置換放大作用)

股置換放大方法(嗜熱性 SDA)可於廣泛溫度範圍(37℃至70℃)進行。嗜熱性 SDA 之較佳溫度範圍為50℃至70℃。經發現某些嗜熱性限制核酸內切酶可如 SDA 所需，切割半改質限制核酸內切酶識別／切割部位並由該部位分離。又發現某些嗜熱性聚合酶可由切口延伸同時置換下游股。嗜熱性 SDA 由於反應溫度較過去使用習知 SDA 酶系統的反應溫度高，故具有改良之特異性及效率，減少非特異性背景放大，及可能改進放大產物產率。此外，當使用可忍受變性溫度之酶時可免除雙股目標物最初熱變性後於各別步驟中添加酶的需要。

英文發明摘要(發明之名稱： Strand displacement amplification using thermophilic enzymes)

Strand Displacement Amplification methods (thermophilic SDA) which can be performed over a broad temperature range (37°C to 70°C). The preferred temperature range for thermophilic SDA is 50°C to 70°C. It has been found that certain thermophilic restriction endonucleases are capable of nicking the hemimodified restriction endonuclease recognition/cleavage site as required by SDA and dissociating from the site. It has further been found that certain thermophilic polymerases are capable of extending from the nick while displacing the downstream strand. Thermophilic SDA, because of reaction temperatures higher than previously possible with conventional SDA enzyme systems, has improved specificity and efficiency, reduced nonspecific background amplification, and potentially improved yields of amplification products. In addition, the need to add the enzymes in a separate step after the initial heat denaturation of double stranded targets is eliminated when enzymes capable of tolerating the denaturation temperature are used.

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄)

裝

訂

線

六、申請專利範圍

第 84102392 號「使用嗜熱性酶之股置換放大作用」專利

(89 年 5 月修正)

六 申請專利範圍

1. 一種放大目標序列之方法，包括：

- a) 提供含目標序列之單股核酸片段，該片段具有一個 5' 端和一個 3' 端；
- b) 結合 SDA 放大引子至該片段 3' 端而形成 5' 單股突出端，而此放大引子含有嗜熱性限制核酸內切酶的識別／切割部位，然而該內切酶不會切割目標核酸序列；
- c) 在下列情況下於片段上進行放大引子的延長：
 - i) 一嗜熱性 DNA 聚合酶，該聚合酶於 50℃ 至 70℃ 具有活性，且具有股置換活性而缺乏 5'-3' 核酸外切酶活性，
 - ii) 去氧核苷三磷酸，
 - iii) 至少一種衍生的去氧核苷三磷酸，及
 - iv) 一嗜熱性限制核酸內切酶，當該核酸內切酶在核酸序列之識別／切割部位藉由併入衍生的去氧核苷三磷酸而進行半修飾時，會對識別／切割部位切出開口，該核酸內切酶於 50℃ 至 70℃ 具有活性，藉此產生放大引物之第一延長產物，其包括與目標序列互補的第一新合成股及雙股半修飾之限制核酸內切酶識別／切割部位；
- d) 使用限制核酸內切酶切割雙股半修飾之限制核酸內切

六、申請專利範圍

酶識別／切割部位；

e)使用 DNA 聚合酶從該開口處延長序列，藉此從該片段上置換出第一新合成股及產生包括第二新合成股之第二延長產物；及

f)重複切割、延長及置換步驟，如此來放大目標序列。

2.如申請專利範圍第 1 項之方法，其中該 DNA 聚合酶係選自 Bca 聚合酶及 Bst 聚合酶所組成之群類。

3.如申請專利範圍第 2 項之方法，其中該限制核酸內切酶係選自 Bsr I, BstN I, BsmA I, Bsl I, BsoB I 及 BstO I 所組成之群類。

4.一種放大目標序列之方法，包括：

a)提供包括目標序列之第一及第二單股片段，該第一及第二單股片段各自有一個 5'端和一個 3'端；

b)結合 SDA 第一放大引子至第一單股片段之 3'端及結合 SDA 第二放大引子至第二單股片段之 3'端，因此該第一及第二放大引子分別於第一及第二單股片段上生成 5'單股突出端，第一及第二放大引子各自包括一個 5'端，該 5'端包括嗜熱性限制核酸內切酶之識別／切割部位，然而該內切酶不會切割目標核酸序列；

c)在下列情況下分別於第一及第二單股片段上進行第一及第二放大引子的延長：

i)一嗜熱性 DNA 聚合酶，該聚合酶於 50℃至 70℃具有活性，有股置換活性而缺乏 5'-3' 核酸外切酶活性，

六、申請專利範圍

- ii) 去氧核苷三磷酸,
 - iii) 至少一種衍生的去氧核苷三磷酸, 及
 - iv) 一嗜熱性限制核酸內切酶, 當該核酸內切酶在核酸序列之識別/切割部位藉由併入衍生的去氧核苷三磷酸而半進行半修飾時, 會對識別/切割部位切出開口, 該核酸內切酶於 50℃至 70℃具有活性, 藉此生成 i) 第一放大引子之第一延長產物, 其包括與第一單股片段互補的第一新合成股及第一雙股半修飾之限制核酸內切酶識別序列, 及 ii) 第二延長產物, 其包括與第二單股片段互補的第二新合成股及第二雙股半修飾之限制核酸內切酶識別/切割部位;
 - d) 使用嗜熱性限制核酸內切酶切割第一及第二半修飾之限制核酸內切酶識別/切割部位;
 - e) 使用 DNA 聚合酶從開口處延長序列, 因此從第一單股片段置換出第一新合成股及從第二單股片段置換出第二新合成股, 藉此分別產生第三及第四新合成股;
 - f) 重複切割、延長及置換步驟, 如此來放大目標序列。
5. 如申請專利範圍第 4 項之方法, 其中一含有目標序列之雙股片段係由如下方法生成, 該方法包括:
- a) 結合第一及第二放大引子至含有目標序列之核酸片段, 第一及第二放大引子是結合至核酸片段相對股的目標序列 3' 上;
 - b) 於片段上延長第一及第二放大引子藉此生產第一放大

六、申請專利範圍

- 引物之第一延長產物及第二放大引物之第二延長產物；
- c)藉延長第一及第二保險槓引子來置換第一及第二延長產物；
- d)於衍生的去氧核糖三磷酸存在下合成經置換的第一及第二延長產物互補股，因此生產包括可由 SDA 放大的目標序列之雙股片段。
- 6.如申請專利範圍第 5 項之方法，其中該 DNA 聚合酶係選自 Bca 聚合酶及 Bst 聚合酶所組成之群類。
- 7.如申請專利範圍第 6 項之方法，其中該限制核酸內切酶係選自 Bsr I, BstN I, BsmA I, Bsl I, BsoB I 及 BstO I 所組成之群類。
- 8.一種放大目標序列之方法，包括：
- a)結合 SDA 放大引子至含有目標序列之單股核酸片段，該片段有一個 5'端和一個 3'端，而放大引子含有嗜熱性限制核酸內切酶識別／切割部位，然而該內切酶不會切目標序列，此放大引子是結合至片段 3'的目標序列；
- b)在下列情況下於片段上進行放大引子的延長：
- i)一嗜熱性 DNA 聚合酶，聚合酶於 50℃至 70℃具有活性，有股置換活性而缺乏 5'-3'核酸外切酶活性，
- ii)去氧核糖三磷酸，
- iii)至少一種衍生的去氧核糖三磷酸，及
- iv)一嗜熱性限制核酸內切酶，當該核酸內切酶在核酸序列之識別／切割部位藉由併入衍生的去氧核糖三

六、申請專利範圍

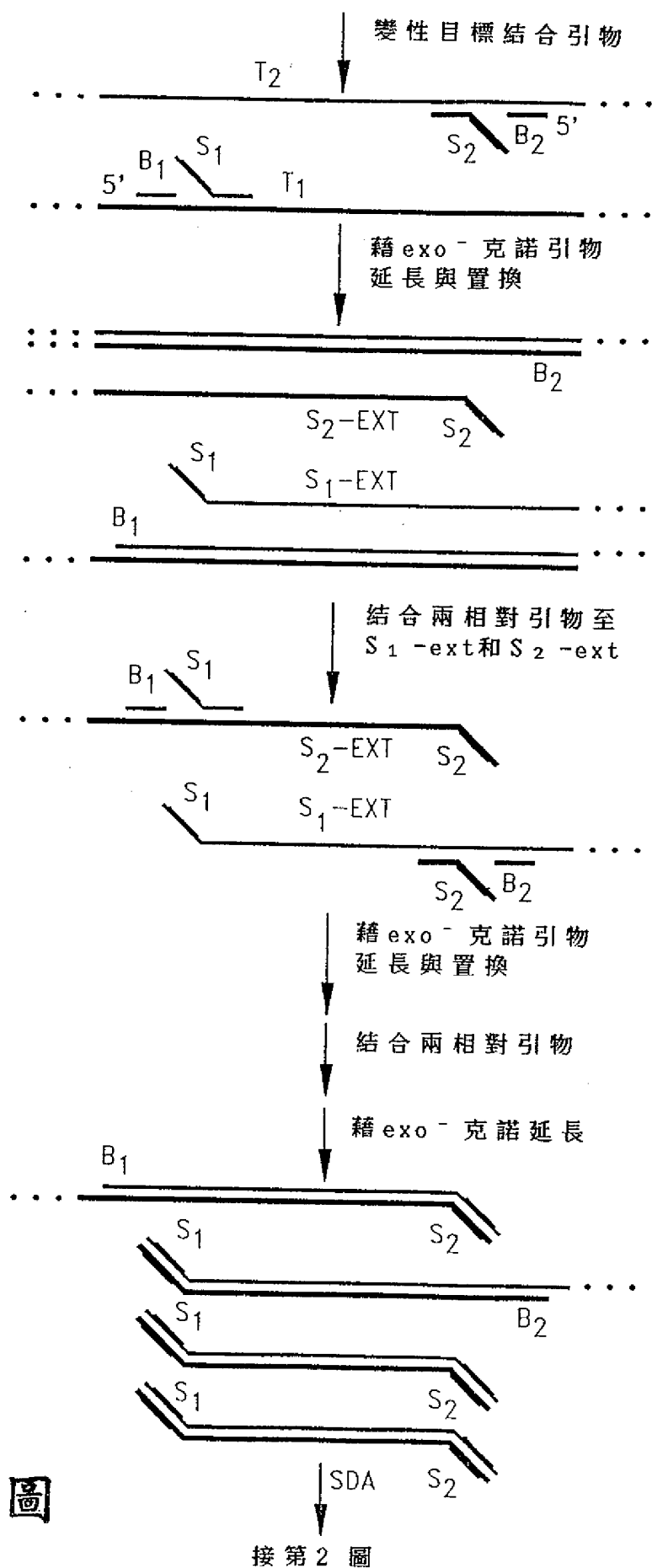
- 磷酸而進行半修飾時會對識別／切割部位之切出開口，該核酸內切酶於 50℃至 70℃具有活性，藉此產生包括第一新合成股之放大引子之第一延長產物；
- c)由該片段置換出第一延長產物；
- d)於至少一種取代的去氧核苷三磷酸存在下合成第一延長產物之互補股，因此生成雙股半修飾之限制核酸內切酶識別／切割部位；
- e)使用嗜熱性限制核酸內切酶切割雙股半改質限制核酸內切酶識別／切割部位；
- f)使用聚合酶從開口處延長序列，藉此從片段置換第一新合成股及生成包含第二新合成股之第二延長產物；
- 及
- g)重複切割、延長及置換步驟，如此來放大目標序列。
- 9.如申請專利範圍第 8 項之方法，其中該 DNA 聚合酶係選自 Bca 聚合酶及 Bst 聚合酶所組成之群類。
- 10.如申請專利範圍第 9 項之方法，其中該限制核酸內切酶係選自 Bsr I, BstN I, BsmA I, Bsl I, BsoB I 及 BstO I 所組成之群類。。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

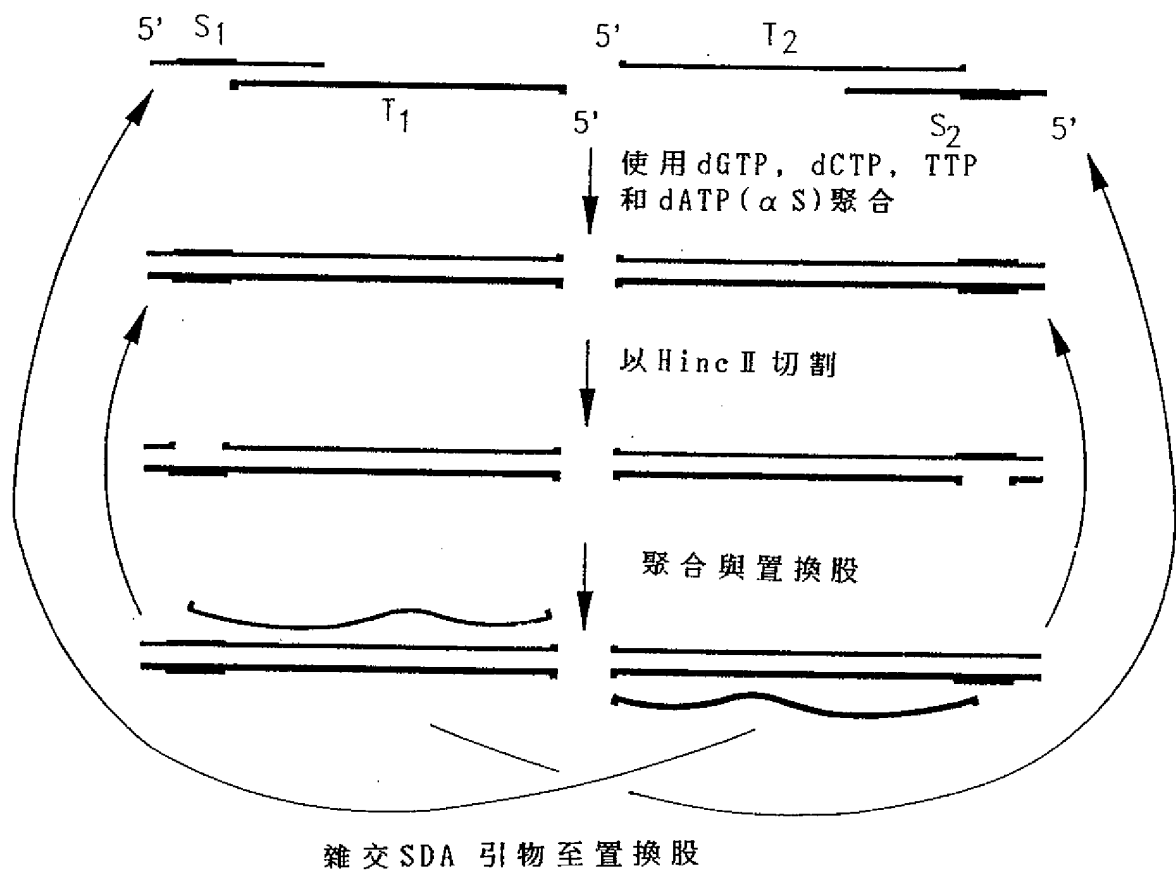
訂

408224

8410239



第1圖



第2圖