

發明專利說明書

200413527

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：97/30165

※申請日期：92-10-29

※IPC 分類：C12N 15/10

壹、發明名稱：(中文/英文)

核酸之擴增法

AMPLIFICATION OF NUCLEIC ACID

貳、申請人：(共 1 人)

姓名或名稱：(中文/英文)

1. 獨立行政法人理化學研究所/RIKEN
2. 達納福股份有限公司/K. K. DNAFORM
3. 湧永製藥股份有限公司/WAKUNAGA PHARMACEUTICAL CO., LTD.

代表人：(中文/英文)

1. 野依良治/NOYORI, RYOJI
2. 林利藏/HAYASHI, TOSHIZO
3. 草井由博/KUSAI, YOSHIHIRO

住居所或營業所地址：(中文/英文)

1. 日本國埼玉縣和光市廣澤 2 番 1 號
2-1, HIROSAWA, WAKO-SHI, SAITAMA-KEN, JAPAN
2. 日本國東京都港區三田 1 丁目 3 番 35 號
3-35, MITA 1-CHOME, MINATO-KU, TOKYO-TO, JAPAN
3. 日本國大阪府大阪市淀川區宮原四丁目 5 番 36 號
5-36, MIYAHARA 4-CHOME, YODOGAWA-KU, OSAKA-SHI, OSAKA-FU, JAPAN

國籍：(中文/英文)

日本/JAPAN

參、發明人：(共 4 人)

姓名：(中文/英文)

1. 三谷康正/MITANI, YASUMASA
2. 山根明男/YAMANE, AKIO
3. 柴田裕子/SHIBATA, YUKO
4. 林崎良英/HAYASHIZAKI, YOSHIHIDE

住居所地址：(中文/英文)

1. ~2. 日本國廣島縣高田郡甲田町下甲立1624
1624, SHIMO-KOUTACHI, KOU DA-CHO, TAKATA-GUN, HIROSHIMA-KEN, JAPAN
3. 日本國茨城縣稻敷郡阿見町中央8-3-1
8-3-1, AMIMACHI-CHUO, INASHIKI-GUN, IBARAKI-KEN, JAPAN
4. 日本國茨城縣筑波市稻荷前22-8
22-8, INARIMAE, TSUKUBA-SHI, IBARAKI-KEN, JAPAN

國籍：(中文/英文)

日本/JAPAN

肆、聲明事項：

☐ 本案係符合專利法第二十條第一項☐第一款但書或☐第二款但書規定之期間，其日期為： 年 月 日。

◎本案申請前已向下列國家（地區）申請專利 ☒ 主張國際優先權：

【格式請依：受理國家（地區）；申請日；申請案號數 順序註記】

1. 日本； 2002.10.29； 特願 2002-314776

☐ 主張國內優先權（專利法第二十五條之一）：

【格式請依：申請日；申請案號數 順序註記】

1.

2.

☐ 主張專利法第二十六條微生物：

☐ 國內微生物 【格式請依：寄存機構；日期；號碼 順序註記】

☐ 國外微生物 【格式請依：寄存國名；機構；日期；號碼 順序註記】

☐ 熟習該項技術者易於獲得，不須寄存。

玖、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

發明領域

本發明係有關於一種於基因工程領域中甚為有用之核
5 酸序列的合成法及擴增法；若更詳而言之，則係有關於一
種利用鏈置換反應之核酸序列之合成法及擴增法。

【先前技術】

背景技術

於基因工程領域中，作為可直接分析遺傳性特徵之方
10 法，基於核酸序列互補性之分析已為人知。就此種分析而
言，若試料中存在之目標基因量甚少時，一般而言不易進
行檢測，故需預先使目標基因本身擴增。

目標基因之擴增(核酸擴增)主要係以利用DNA聚合酶
之酶性方法進行。此種酶性方法之主要者可列舉如聚合酶
15 連鎖反應法(PCR法；美國專利第4683195號說明書、美國專
利第4683202號說明書)，且更有將PCR法與逆轉錄酶反應組
合而成之逆轉錄PCR法(RT-PCR法；Trends in Biotechnology
10, pp146-152, 1992)。該等方法係使由三階段構成之反應
反覆進行，藉此可使來自DNA或RNA之目標基因擴增；該
20 三階段分別為：使模板之雙股核酸解離為單股核酸、使引
子煉合至單股核酸、以及來自引子之互補鏈合成(延伸)。該
等方法中，需使合計共三程序(用以將反應溶液調節為各適
於前述三階段之溫度)反覆實施。

使前述核酸擴增法中之程序數減為二之改良方法已知

有往返(Shuttle)PCR法(「PCR法最前線」, 蛋白質核酸酵素別冊, 共立出版, 第41卷第5號, 425頁~428頁(1996))。Shuttle PCR法係使PCR法之三階段反應中之引子煉合及延伸等二階段於相同溫度下進行, 故可藉2程序之反應使目標基因擴
5 增。而歐洲專利公開案第0320308號說明書中已揭示連接酶連鎖反應法(LCR法), 該方法係使用耐熱性之DNA連接酶以進行二程序之溫度循環反應(反覆進行加熱及冷卻之反應), 藉此使已知之基因序列擴增。

以上所載方法均需使用高價之加熱循環器, 以便能經
10 時性地進行廣泛溫度範圍下之嚴密溫度控制。此外, 該反應係以2至3種之溫度條件進行, 因此需要調整至各反應溫度之時間, 且循環數越是增加, 所須之時間越長。

為解決前述問題, 可於等溫狀態下實施之核酸擴增法正進行開發。該種方法可列舉如: 記載於特公平7-114718
15 號公報之鏈置換型擴增(SDA; strand displacement amplification)法; 自立複製(3SR; self-sustained sequence replication)法; 載於日本專利第2650159號公報之核酸序列擴增(NASBA; nucleic acid sequence based amplification)法; TMA(transcription-mediated amplification)法; 載於日
20 本專利第2710159號公報之Q β 複製酶法; 載於美國專利第5824517號說明書、國際公開第99/09211號手冊或國際公開第95/25180號手冊之各種改良SDA法; 載於國際公開第00/28082號手冊之LAMP法(Loop-Mediated Isothermal Amplification); 以及載於國際公開第02/16639號手冊之

ICAN 法 (Isothermal and Chimeric primer-initiated Amplification of Nucleic acid)等。該等等溫核酸擴增法中相關之全階段反應係同時於保持在一定溫度之反應混合物中進行。

- 5 SDA法係於DNA最後擴增之系統中，藉著透過DNA聚合酶與限制核酸內切酶之雙股置換，使試料中之目標核酸(及其互補鏈)得以擴增。該方法需要4種引子，其中2種必須設計成含有限制核酸內切酶之識別部分。此外，該方法需以經修飾之去氧核苷三磷酸(如三磷酸部分中 α 位磷酸基
- 10 之氧原子被取代為硫原子(S)之去氧核苷三磷酸)作為用以合成核酸之基質。因此，該方法需要甚高之實施成本。另，該方法因經擴增之核酸片段中含有修飾核苷酸(如 α S取代去氧核苷酸)，舉例言之，於將該核酸片段供予限制酶片段長多型 (RFLP ; restriction enzyme fragment length
- 15 polymorphism)解析時，將有無法以限制酶切斷該擴增片段而無法實施此種解析之情形。

- 美國專利第5824517號說明書中所載之改良SDA法必須使用由RNA與DNA構成且3'端側為DNA之嵌合引子。此種由RNA與DNA構成之嵌合引子之合成所需費用甚高，且
- 20 處理含RNA之引子必須具高度專業知識。另，載於國際公開第99/09211號手冊之改良SDA法需有用以產生5'突出端之限制酶，而載於國際公開第95/25180號手冊之改良SDA法則需至少2組之引子對，因此該等方法均需甚高之實施成本。

ICAN法必須使用由DNA與RNA構成且3'端側為RNA之嵌合引子，更需要用以將該引子3'端側之RNA部分切斷之RnaseH，故所須之試劑費用不貲。因此，該方法於對大量樣本進行基因檢測時亦需高昂之實施成本。

- 5 LAMP法需要4種引子，以藉該等引子識別6個領域而可使目標基因擴增。意即，該方法係先使第一引子煉合至模板鏈而引起延伸反應，且因該第一引子之結構，迴圈結構形成在延長鏈之5'端部分。其次，藉著被設計於較第一引子更上游側之第二引子所引起之鏈置換反應，第一引子之
- 10 延長鏈自模板鏈分離。亦對雙股核酸之另一股進行與其相同之反應，再反覆進行該等反應，以使目標核酸擴增。因此，LAMP法中擴增反應之作用機制複雜，且必須選出6個領域，而使引子之設計更為困難。再者，4種引子中需有2種為相對長鏈之引子，而使引子之合成及純化需耗費時間
- 15 與費用。

因此，現今正迫切需要一種低實施成本且可使所得核酸片段更能用於基因工程處理上之核酸擴增法。尤其更需要一種可藉一對引子便可快速擴增之等溫核酸擴增法。

【發明內容】

20 發明概要

本案發明人發現，於利用鏈置換反應之核酸擴增法中，可將該方法採用之引子(可藉引子之延伸而形成迴圈者)設計成符合特定條件，藉此可使用一種引子合成出目標核酸序列與互補核酸序列，進而可使用2種引子並有效率地使

目標核酸擴增。本案發明即係基於此種真知灼見而完成者。

因此，本發明之目的在於提供一種可使含目標核酸序列之核酸高效率地合成或擴增之方法，以及用於此方法之引子或引子組。

5 本發明之核酸合成法係一種用以合成出與模板核酸中之目標核酸序列互補之核酸；該方法含有以下各程序：

(a)準備引子，該引子係於3'端部分含有一序列(Ac')，其可與目標核酸序列之3'端部分之序列(A)雜交，且該序列(Ac')之5'側含有一序列(B')，其可與目標核酸序列中存在於
10 較前述序列(A)更偏5'側之序列(B)的互補序列(Bc)雜交；且

若引子中前述序列(Ac')與前述序列(B')間不存有插入序列，且令前述序列(Ac')之鹼基數為X而目標核酸序列中前述序列(A)與前述序列(B)間所挾領域之鹼基數為Y時， $\{X-(Y)\}/X$ 係於-1.00~1.00之範圍內；

15 而若引子中前述序列(Ac')與前述序列(B')間存有插入序列，且令X、Y之定義與前述者相同而該插入序列之鹼基數為Y'時， $\{X-(Y-Y')\}/X$ 係於-1.00~1.00之範圍內；

(b)準備模板核酸；

(c)使前述引子煉合至前述模板，再進行引子延伸反應，以合成出含有前述目標核酸序列之互補序列的互補核
20 酸；

(d)使存在於藉程序(c)合成出之互補核酸之5'側的序列(B')與存在於同互補核酸上之序列(Bc)雜交，藉此使模板核酸上之部分前述序列(A)成為單股；

(e)使具有與前述引子相同序列之其他引子煉合至藉程序(d)成為單股之模板核酸上前述序列(A)之部分而進行鏈置換反應，以便可用藉前述其他引子新合成出之互補核酸來置換程序(c)合成出之互補核酸。

5 再者，本發明之核酸擴增法係一種使由雙股構成之模板核酸中之目標核酸序列擴增之方法，含有以下各程序：

(a)準備第一引子，該第一引子係於3'端部分含有一序列(Ac')，其可與雙股模板核酸第一股中之目標核酸序列之3'端部分的序列(A)雜交，且該序列(Ac')之5'側含有一序列
10 (B')，其可與目標核酸序列中存在於較前述序列(A)更偏5'側之序列(B)的互補序列(Bc)雜交；且

若引子中前述序列(Ac')與前述序列(B')間不存有插入序列，且令前述序列(Ac')之鹼基數為X而目標核酸序列中前述序列(A)與前述序列(B)間所挾領域之鹼基數為Y時，
15 $\{X-(Y)\}/X$ 係於-1.00~1.00之範圍內；

而若引子中前述序列(Ac')與前述序列(B')間存有插入序列，且令X、Y之定義與前述者相同而該插入序列之鹼基數為Y'時， $\{X-(Y-Y')\}/X$ 係於-1.00~1.00之範圍內；

(b)準備第二引子，該第二引子係於3'端部分含有一序
20 列(Cc')，其可與雙股模板核酸第二股中之目標核酸序列之3'端部分的序列(C)雜交，且該序列(Cc')之5'側含有一序列(D')，其可與目標核酸序列中存在於較前述序列(C)更偏5'側之序列(D)的互補序列(Dc)雜交；且

若引子中前述序列(Cc')與前述序列(D')間不存有插入

序列，且令前述序列(Cc')之鹼基數為X而目標核酸序列中
前述序列(C)與前述序列(D)間所挾領域之鹼基數為Y時，
 $\{X-(Y)\}/X$ 係於-1.00~1.00之範圍內；

而若引子中前述序列(Cc')與前述序列(D')間存有插入
5 序列，且令X、Y之定義與前述者相同而該插入序列之鹼基
數為Y'時， $\{X-(Y-Y')\}/X$ 係於-1.00~1.00之範圍內；

(c)準備由第一模板核酸與第二模板核酸構成之雙股模
板核酸；

(d)使前述第一、第二引子各煉合至前述第一、第二模
10 板，再各自進行引子延伸反應，以合成出含有前述目標核
酸序列之互補序列的第一、第二互補核酸；

(e)使存在於藉程序(d)合成出之互補核酸之5'側的序列
(B')及序列(D')與存在於同互補核酸上之序列(Bc)及序列
(Dc)雜交，藉此使第一及第二模板核酸上之部分前述序列
15 (A)及序列(C)成為單股；

(f)使具有與前述引子相同序列之其他引子煉合至藉程
序(e)成為單股之第一及第二模板核酸上的前述序列(A)及
序列(C)之部分而進行鏈置換反應，以便可用藉前述其他引
子新合成出之互補核酸來置換程序(d)所合成出之互補核
20 酸。

而本發明之引子係用以合成與模板核酸中之目標核酸
序列互補之核酸者；且該引子係於3'端部分含有一序列
(Ac')，其可與目標核酸序列之3'端部分之序列(A)雜交，且
該序列(Ac')之5'側含有一序列(B')，其可與目標核酸序列中

存在於較前述序列(A)更偏5'側之序列(B)的互補序列(Bc)雜交；且

若引子中前述序列(Ac')與前述序列(B')間不存有插入序列，且令前述序列(Ac')之鹼基數為X而目標核酸序列中
5 前述序列(A)與前述序列(B)間所挾領域之鹼基數為Y時， $\{X-(Y)\}/X$ 係於-1.00~1.00之範圍內；

而若引子中前述序列(Ac')與前述序列(B')間存有插入序列，且令X、Y之定義與前述者相同而該插入序列之鹼基數為Y'時， $\{X-(Y-Y')\}/X$ 係於-1.00~1.00之範圍內。

10 本發明之引子組係用以使由雙股構成之模板核酸中之目標核酸序列擴增者，含有：

(a)第一引子，係於3'端部分含有一序列(Ac')，其可與雙股模板核酸第一股中之目標核酸序列之3'端部分的序列(A)雜交，且該序列(Ac')之5'側含有一序列(B')，其可與目
15 標核酸序列中存在於較前述序列(A)更偏5'側之序列(B)的互補序列(Bc)雜交；且

若引子中前述序列(Ac')與前述序列(B')間不存有插入序列，且令前述序列(Ac')之鹼基數為X而目標核酸序列中
前述序列(A)與前述序列(B)間所挾領域之鹼基數為Y時，
20 $\{X-(Y)\}/X$ 係於-1.00~1.00之範圍內；

而若引子中前述序列(Ac')與前述序列(B')間存有插入序列，且令X、Y之定義與前述者相同而該插入序列之鹼基數為Y'時， $\{X-(Y-Y')\}/X$ 係於-1.00~1.00之範圍內；

(b)第二引子，係於3'端部分含有一序列(Cc')，其可與

雙股模板核酸第二股中之目標核酸序列之3'端部分的序列(C)雜交，且該序列(Cc')之5'側含有一序列(D')，其可與目標核酸序列中存在於較前述序列(C)更偏5'側之序列(D)的互補序列(Dc)雜交；且

- 5 若引子中前述序列(Cc')與前述序列(D')間不存有插入序列，且令前述序列(Cc')之鹼基數為X而目標核酸序列中前述序列(C)與前述序列(D)間所挾領域之鹼基數為Y時， $\{X-(Y)\}/X$ 係於-1.00~1.00之範圍內；

而若引子中前述序列(Cc')與前述序列(D')間存有插入
10 序列，且令X、Y之定義與前述者相同而該插入序列之鹼基數為Y'時， $\{X-(Y-Y')\}/X$ 係於-1.00~1.00之範圍內。

若依本發明，則可以DNA或RNA為模板並使用一個寡核苷酸引子，而於等溫條件下連續合成出目標DNA。此外，若據本發明，則可以DNA或RNA為模板並使用一對寡核苷酸引子，而於等溫條件下連續使目標DNA擴增。因此，本
15 發明之方法不需加熱循環器等特殊裝置，亦無須溫度設定所花費之時間，而可達到短時間內獲得擴增產物之優異效果。此外，依本發明而擴增之DNA片段可施予限制酶處理，故可用於限制酶片段長多型及變異檢測等基因檢查領域
20 上。

圖式簡單說明

第1圖係用以模式性地顯示本發明之核酸擴增法者。

第2圖係用以顯示使人類STS DYS237基因擴增時所採用之引子之5'側序列與3'側序列在該基因上之位置者。

第3圖係用以顯示使sY160基因擴增時所採用之引子之5'側序列與3'側序列在該基因上之位置者。

第4圖係用以顯示使M13mp18RT DNA擴增時所採用之引子之5'側序列與3'側序列在該基因上之位置者。

5 第5圖係用以顯示各種條件下人類STS DY237基因之擴增結果者。

第6圖係用以顯示各種條件下人類STS DY237基因之擴增結果者。

第7圖係用以顯示各種條件下人類STS DY237基因之
10 擴增結果者。

第8圖係用以顯示各種條件下sY160基因之擴增結果者。

第9圖係用以顯示各種條件下M13mp18RT DNA之擴增結果者。

第11圖係用以顯示將人類STS DY237基因之擴增產物
15 施以限制酶處理後所得之電泳圖案者。

第12圖係用以顯示將sY160基因之擴增產物施以限制酶處理後所得之電泳圖案者。

第13圖係用以顯示將M13mp18RT DNA之擴增產物施以限制酶處理後所得之電泳圖案者。

20 第14圖係用以顯示於各種熔解溫度調整劑存在下人類STS DY237基因之擴增結果者。

【實施方式】

發明之具體說明

茲模式性地將本發明之核酸合成之作用機制示於第1

圖。首先，決定將成為模板之核酸中之目標核酸序列，再決定出該目標核酸序列之3'端部分之序列(A)以及存在於較序列(A)更偏5'側之序列(B)。本發明之引子含有序列(Ac')，更於其5'側含有序列(B')。序列(Ac')係用以與序列(A)雜交者。而序列(B')則係用以與序列(B)之互補序列(Bc)雜交者。於此，本發明之引子於前述序列(Ac')與序列(B')間可含有不對反應造成影響之插入序列。一旦使此種引子煉合至模板核酸，引子中之序列(Ac')將呈與目標核酸序列之序列(A)雜交之狀態(第1(a)圖)。若於此狀態下發生引子延伸反應，便可合成出含有目標核酸序列之互補序列的核酸。接著，使存在於所合成出之核酸之5'端側的序列(B')與存在於同核酸中之序列(Bc)雜交，藉此，合成出之核酸之5'端部分形成有迴圈結構。結果，模板核酸上之序列(A)成為單股，此部份將與具有與前述引子相同序列之其他引子雜交(第1(b)圖)。之後，藉鏈置換反應，於發生來自新雜交之引子的延伸反應時，先合成之核酸將同時自模板核酸分離(第1(c)圖)。

於前述作用機制中，序列(B')雜交至序列(Bc)之現象係因於同一鏈上存有互補領域而發生者。一般而言，雙股核酸解離為單股時，將從其末端或其他較不安定之部分開始解離。藉前述引子之延伸反應而產生之雙股核酸於相對高溫下，末端之鹼基對係處於解離與結合呈平衡之狀態，整體維持雙股狀。於此狀態下，末端解離之部分中若互補序列存在於同一鏈上，則可形成迴圈結構而呈準安定狀態。

該迴圈結構雖並未安定地存在，但因形成該結構而露出之互補鏈部分(模板核酸上之序列(A))將與同一引子結合而使聚合酶即刻進行延伸反應，藉此，可於先前合成出之鏈被置換而游離之同時，產生新的雙股核酸。

- 5 重複操作如上反應，可大量合成出與模板核酸中之目標核酸序列互補之核酸。此外，亦可以前述模板核酸之互補鏈為模板進行相同之核酸反應。因此，若依本發明，亦可使雙股之模板核酸中之目標核酸序列擴增。

本發明之核酸合成法包含以下程序：

- 10 (a)準備引子，該引子係於3'端部分含有一序列(Ac')，其可與目標核酸序列之3'端部分之序列(A)雜交，且該序列(Ac')之5'側含有一序列(B')，其可與目標核酸序列中存在於較前述序列(A)更偏5'側之序列(B)的互補序列(Bc)雜交；且

- 15 若引子中前述序列(Ac')與前述序列(B')間不存有插入序列，且令前述序列(Ac')之鹼基數為X而目標核酸序列中前述序列(A)與前述序列(B)間所挾領域之鹼基數為Y時， $\{X-(Y)\}/X$ 係於-1.00~1.00之範圍內；

- 20 而若引子中前述序列(Ac')與前述序列(B')間存有插入序列，且令X、Y之定義與前述者相同而該插入序列之鹼基數為Y'時， $\{X-(Y-Y')\}/X$ 係於-1.00~1.00之範圍內；

(b)準備模板核酸；

(c)使前述引子煉合至前述模板，再進行引子延伸反

應，以合成出含有前述目標核酸序列之互補序列的互補核酸；

(d)使存在於藉程序(c)合成出之互補核酸之5'側的序列(B')與存在於同互補核酸上之序列(Bc)雜交，藉此
5 使模板核酸上之部分前述序列(A)成為單股；

(e)使具有與前述引子相同序列之其他引子煉合至藉程序(d)成為單股之模板核酸上前述序列(A)之部分而進行鏈置換反應，以便可用藉前述其他引子新合成出之互補核酸來置換程序(c)合成出之互補核酸。

10 本發明中，所謂之『雜交』係指：使本發明之引子之一部份於嚴苛條件下雜交至目標核酸，而不雜交至目標核酸以外之核酸分子。而嚴苛條件係可依本發明之引子與其互補鏈之雙鏈融解溫度 $T_m(^{\circ}\text{C})$ 及雜交溶液之鹽濃度加以決定，舉例言之，可參考J. Sambrook, E. F. Frisch, T. Maniatis;
15 Molecular Cloning 2nd edition, Cold Spring Harbor Laboratory(1989)等。例如，若於較所用引子之融解溫度略低之溫度下進行雜交，可使引子專一性地結合至目標核酸上。此種引子可使用市售之引子建立軟體如Primer3(Whitehead Institute for Biomedical Research社製)
20 等加以設計。若依本發明之較佳實施型態，則用以與某一目標核酸雜交之引子係包含全部或部分之與該核酸互補之核酸分子序列。

前述程序(a)中準備之本發明引子係構成為一種可提供單股序列(A)者，該單股序列(A)可於程序(c)中煉合至模板

核酸，可於程序(d)中供序列(B')與序列(Bc)雜交，且具有相同序列之其他引子可進行煉合。茲針對可良好進行該等程序之引子結構更詳細地加以說明。於前述程序(e)中，為使新引子能有效地進行煉合，需藉程序(c)所合成出之互補核酸在程序(d)中形成迴圈結構，以使部分之模板核酸之前述序列(A)成為單股。因此，序列(Ac')之鹼基數X與目標核酸序列中前述序列(A)與序列(B)所挾領域之鹼基數Y之差(X-Y)相對於X之比例(X-Y)/X甚為重要。但，存在於較模板核酸上之序列(A)更偏5'側且與引子之雜交無關的部分則無須一併化為單股。此外，於前述程序(e)中為使新引子有效率地煉合，必須使程序(c)所合成出之互補核酸在程序(d)中有效率地形成迴圈結構。而，就有效形成迴圈結構(即，效率良好地進行序列(B')與序列(Bc)之雜交)而言，該序列(B')與(Bc)間之距離(X+Y)甚為重要。一般而言，引子延伸反應之最適溫度最高亦僅止於72°C左右，而此種低溫下難以使延伸鏈之長領域全部解離。因此，為使序列(B')有效地雜交至序列(Bc)上，兩序列間之鹼基數宜少。另一方面，為使序列(B')與序列(Bc)雜交而使模板核酸上之前述序列(A)之部分成為單股，序列(B')與序列(Bc)間之鹼基數宜多。

從以上觀點看來，構成引子之序列(Ac')與序列(B')之間不存有插入序列時，就本發明之引子而言，係設計成(X-Y)/X為-1.00以上且宜為0.00以上，更宜為0.05以上而尤宜為0.10以上；於1.00以下且宜於0.75以下，更宜於0.50以下而尤宜於0.25以下。更進一步地說，(X+Y)係宜於15以上

且更宜於20以上，尤宜為20以上而最宜為30以上；並宜於50以下，更宜於48以下，而最宜於42以下。

再者，構成引子之序列(Ac')與序列(B')之間存有插入序列(鹼基數為Y')時，就本發明之引子而言，係設計成
 5 {X-(Y-Y')}/X為-1.00以上且宜為0.00以上，更宜為0.05以上而尤宜為0.10以上；於1.00以下且宜於0.75以下，更宜於0.50以下而尤宜於0.25以下。更進一步地說，(X+Y+Y')係宜於15以上且更宜於20以上，尤宜為20以上而最宜為30以上；並宜於100以下，更宜於75以下，而最宜於50以下。

10 本發明之引子係由去氧核糖核苷酸及/或核糖核苷酸所構成，其所具有之鏈長程度恰為可在被賦予之條件下維持所必須專一性並可進行與目標核酸間之鹼基對結合者。本發明之引子鏈長宜為15~100個核苷酸，且更宜為30~60個核苷酸。其次，用以構成本發明引子之序列(Ac')與序列
 15 (B')的長度各宜為5~50個核苷酸，且更宜為10~30個核苷酸。此外，亦可依需要而於序列(Ac')與序列(B')間插入不致影響反應之插入序列。

本發明中，「核糖核苷酸」(亦僅稱為「N」)係指核糖核苷三磷酸，如ATP、UTP、CTP、GTP等。核糖核苷酸亦
 20 包含該等之衍生物，如 α 位磷酸基之氧原子被硫原子取代而成之核糖核苷酸(α -硫代-核糖核苷酸)等。

再者，本發明之引子亦包含：未修飾去氧核苷酸及/或修飾去氧核苷酸所構成之寡核苷酸引子；未修飾核糖核苷酸及/或修飾核糖核苷酸所構成之寡核苷酸引子；以及含有

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/或修飾核糖核苷酸之嵌合寡核苷酸引子等。

本發明之引子可藉由係運用於合成寡核苷酸之任意方法而加以合成，如磷酸三酯法、H-磷酸鹽法及硫代磷酸鹽法等。舉例言之，本發明之引子若藉一使用ABI社(Applied Biosystem Inc.)之DNA合成儀394型的phosphoramidite法進行合成，則可輕易取得之。

本發明之核酸合成法所用之DNA聚合酶僅需為具有鏈置換(strand displacement)活性(鏈取代能)者即可，可使用具長溫性、中溫性或耐熱性者。此外，該DNA聚合酶可為天然體或施加人造變異之變異體。更詳言之，該DNA聚合酶宜為實質上不具5'→3'外切酶活性者。此種DNA聚合酶可列舉如來自嗜熱脂肪芽孢桿菌(Bacillus stearothermophilus，以下稱為「B. st」)、Bacillus caldotenax(以下稱為「B. ca」)等嗜熱性桿菌屬菌株之DNA聚合酶的欠缺5'→3'外切酶活性之變異體，以及來自大腸桿菌(E. coli)之DNA聚合酶I之克萊諾片段(Klenow fragment)等。本發明之核酸合成法所用之DNA聚合酶更可列舉如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-Tag DNA聚合酶、Pfu DNA聚合酶、Pfu turbo DNA聚合酶、KOD DNA聚合酶、9° Nm DNA聚合酶及Therminater DNA聚合酶等。

本發明之核酸合成方法中所採用之其他試劑，舉例言

之，可使用如氯化鎂、乙酸鎂及硫酸鎂等催化劑；dNTP混合物等基質；以及三鹽酸緩衝液、酪胺酸緩衝液、磷酸鈉緩衝液及磷酸鎂緩衝液等緩衝液。更可使用二甲亞砜(dimethyl sulfoxide)及甜菜鹼(N, N, N-trimethylglycine)等
5 添加物及載於國際公開第99/54455號手冊之酸性物質及陽離子錯體。

本發明之核酸合成方法中，作為模板之核酸可為DNA或RNA。舉例言之，該等核酸可由下述試料離析取得，即：取自血液、組織、細胞或動植物等活體之試料；或，從食
10 品、土壤及排水等分離出之取自微生物之試料。

模板核酸之離析可藉任意方法進行，舉例言之，可採用界面活性劑之溶劑處理、音波處理、使用玻璃珠之振盪攪拌及高壓破碎(Franch press)等。此外，存有內在性核酸酶時，宜將已離析之核酸純化。舉例言之，核酸之純化可
15 藉苯酚抽提、柱色層分析法、離子交換、凝膠電泳及按照密度之離心分離等方法實施。更具體言之，本發明之核酸合成方法中之模板核酸可使用藉前述方法離析出之基因DNA及PCR片段等之雙股核酸，或使用藉逆轉錄反應而由全RNA或mRNA調製出之cDNA等單股核酸。於使用前述雙
20 股核酸時，可藉變性程序(denaturing)令其為單股，而可更適於利用。

用於前述逆轉錄反應之酶僅需為以RNA為模板且具有cDNA合成活性者即可，可列舉如來自鳥類骨髓母細胞症病毒之逆轉錄酶(ATV RTase)、Raus關連病毒2逆轉錄病毒

(RAV-2 RTase)、來自 Moloney 鼠白血病病毒之逆轉錄酶 (MMLV RTase) 等各種來源之逆轉錄酶。此外，亦可使用一併具有逆轉錄活性之 DNA 聚合酶。另，為達成本發明之目的，於高溫下具有逆轉錄活性之酶最為適合，可使用如來自嗜熱屬菌株之 DNA 聚合酶 (TthDNA 聚合酶等) 以及來自桿菌屬菌株之 DNA 聚合酶等。若例示較理想之酶，舉例言之，來自嗜熱性桿菌屬菌株之 DNA 聚合酶可列舉如取自 B. st 之 DNA 聚合酶 (Bst DNA 聚合酶)，及取自 B. ca 之 DNA 聚合酶 (Bca DNA 聚合酶) (如 BcaBEST DNA 聚合酶與 Bca(exo-)DNA 聚合酶) 等。如，Bca DNA 聚合酶於反應時不需錳離子而可於高溫條件下抑制模板 DNA 之二次結構形成並合成出 cDNA。

本發明之核酸合成方法更可使用同時具有逆轉錄活性之 DNA 聚合酶 (如 BcaBEST DNA 聚合酶、Bca(exo-)DNA 聚合酶等)，而可藉單種聚合酶進行全 RNA 或 mRNA 之逆轉錄反應以及以 cDNA 為模板之 DNA 聚合酶反應。此外，可將 DNA 聚合酶與 MMLV 逆轉錄酶等之逆轉錄酶組合使用。

即使於模板核酸為雙股核酸時，本發明之核酸合成方法亦可將其直接用於反應中，但亦可依需要使其等變性成單股，藉此使引子有效率地煉合至模板核酸。使溫度上升至約 95 度為理想之核酸變性法。其他方法中，亦可使 pH 上升以進行變性，但此時為使引子雜交至目標核酸而需使 pH 值降低。

若依本發明之較佳實施樣態，則程序 (e) 所得雙股核酸

可於程序(d)中反覆使用。藉此，可使與模板核酸中之目標核酸互補的核酸量產。

本發明中核酸合成方法之特徵之一為可於等溫下進行實施。因此，若據本發明，可提供一種用以合成互補核酸
5 之方法，該核酸係與模板核酸中之目標核酸互補，且該方法包含一準備核酸合成用溶液之程序及一培養該核酸合成用溶液之程序，而前述核酸合成溶液含有模板核酸與本發明之引子。於此，所謂『等溫』係指保持在一種可使酶與引子於實質上可運作之大致固定的溫度條件下。

10 可保持在一可維持所用酶之活性的溫度而實施本發明之核酸合成方法。此外，本發明之核酸合成方法中，為使引子煉合至目標核酸上，舉例言之，宜將反應溫度設定在該引子之熔解溫度(T_m)左右，或設定為較其更低之溫度，更可考量引子之熔解溫度來設定嚴苛條件之程度。因此，
15 該溫度宜為約 20°C ~約 75°C ，更宜為約 35°C 至約 65°C 。

本發明之核酸合成方法中，可令雙股核酸為模板，再使用係針對各股加以設計之由2種本發明之引子所構成之引子組，而使前述核酸中之目標核酸序列擴增。因此，若據本發明，可提供一種用以使雙股模板核酸中之目標核酸
20 序列擴增之方法，而該核酸擴增方法包含下列程序：

(a)準備第一引子，該第一引子係於3'端部分含有一序列(Ac')，其可與雙股模板核酸第一股中之目標核酸序列之3'端部分的序列(A)雜交，且該序列(Ac')之5'側含有一序列(B')，其可與目標核酸序列中存在於較前述序列(A)更偏5'

側之序列(B)的互補序列(Bc)雜交；且

若引子中前述序列(Ac')與前述序列(B')間不存有插入序列，且令前述序列(Ac')之鹼基數為X而目標核酸序列中前述序列(A)與前述序列(B)間所挾領域之鹼基數為Y時，

5 {X-(Y)}/X係於-1.00~1.00之範圍內；

而若引子中前述序列(Ac')與前述序列(B')間存有插入序列，且令X、Y之定義與前述者相同而該插入序列之鹼基數為Y'時，{X-(Y-Y')}/X係於-1.00~1.00之範圍內；

(b)準備第二引子，該第二引子係於3'端部分含有一序列(Cc')，其可與雙股模板核酸第二股中之目標核酸序列之
10 3'端部分的序列(C)雜交，且該序列(Cc')之5'側含有一序列(D')，其可與目標核酸序列中存在於較前述序列(C)更偏5'側之序列(D)的互補序列(Dc)雜交；且

若引子中前述序列(Cc')與前述序列(D')間不存有插入
15 序列，且令前述序列(Cc')之鹼基數為X而目標核酸序列中前述序列(C)與前述序列(D)間所挾領域之鹼基數為Y時，{X-(Y)}/X係於-1.00~1.00之範圍內；

而若引子中前述序列(Cc')與前述序列(D')間存有插入
20 序列，且令X、Y之定義與前述者相同而該插入序列之鹼基數為Y'時，{X-(Y-Y')}/X係於-1.00~1.00之範圍內。

(c)準備由第一模板核酸與第二模板核酸構成之雙股模板核酸；

(d)使前述第一、第二引子各煉合至前述第一、第二模板，再各自進行引子延伸反應，以合成出含有前述目標核

酸序列之互補序列的第一、第二互補核酸；

(e)使存在於藉程序(d)合成出之互補核酸之5'側的序列(B')及序列(D')與存在於同互補核酸上之序列(Bc)及序列(Dc)雜交，藉此使第一及第二模板核酸上之部分前述序列(A)及序列(C)成為單股；

(f)使具有與前述引子相同序列之其他引子煉合至藉程序(e)成為單股之第一及第二模板核酸上的前述序列(A)及序列(C)之部分而進行鏈置換反應，以便可用藉前述其他引子新合成出之互補核酸來置換程序(d)所合成出之互補核酸。

此外，引子之設計及反應條件等詳細內容，則如前述本發明之核酸合成方法中所載者。

若依本發明之較佳實施樣態，則本發明之核酸擴增方法中，程序(f)所製得且係單股核酸之第一及第二互補核酸可於程序(e)中反覆使用。即，程序(f)製得之第一互補核酸可作為程序(d)之第二模板核酸而加以利用，而程序(f)所得之第二互補核酸則可作為程序(d)之第一模板核酸而加以利用。

本發明之核酸擴增方法與本發明之核酸合成方法同樣可於等溫下實施。因此，若依本發明，可供一種可使雙股模板核酸中之目標核酸序列擴增之方法，其含有一準備核酸擴增用溶液之程序及一以等溫培養該核酸擴增用溶液之程序，且該核酸擴增用溶液含有雙股模板核酸及本發明之引子對。於此，所謂『等溫』係指保持在一種可使酶與引

子於實質上可運作之大致固定的溫度條件。而其溫度條件之詳情則如前述本發明之核酸合成方法中所載者。

本發明之核酸擴增方法更可使用具有逆轉錄活性之DNA聚合酶，舉例言之，若使用BcaBEST DNA聚合酶，則
5 即使於係以RNA作為模板時，亦可含有自該RNA調製cDNA之程序，而為最適宜實施之核酸擴增方法。此外，亦可使自RNA調製cDNA之程序獨立實行，再將其生成物用於本發明之核酸擴增方法。

本發明之核酸合成法及核酸擴增法中，為使核酸之合
10 成效率或擴增效率提高，亦可將熔解溫度調整劑添加至反應溶液中。一般而言，核酸之熔解溫度(T_m)係以核酸中形成雙鏈部分之具體核苷酸序列來決定。可於反應溶液中添加熔解溫度調整劑而使熔解溫度變化，因此而可於一定溫度下調整核酸中雙鏈形成之強度。通常之熔解溫度調整劑
15 具有使熔解溫度下降之效果。可添加此種熔解溫度調整劑藉此使二個核酸間之雙鏈形成部分的熔解溫度下降，換言之，即可使該雙鏈之形成強度下降。因此，若於本發明之核酸合成方法及核酸擴增方法中添加此種熔解溫度調整劑，則可於形成堅固雙鏈之GC豐富之核酸領域及形成複雜
20 二次結構的領域中有效地使雙鏈部分化為單鏈，藉此可於引子延伸反應結束後使後續之引子容易地雜交至目標領域，進而提高核酸之合成效率及擴增效率。熟習相關技術者自可考量影響雜交條件之其他反應條件而選擇本發明中採用之熔解溫度調整劑及其於反應溶液中之濃度。因此，

熔解溫度調整劑雖無特別限制，但宜為二甲亞砜(DMSO)、甜菜鹼、甲醯胺或甘油，或者該等之任意組合，且更宜為二甲亞砜(DMSO)。

5 本發明之核酸合成方法及核酸擴增方法中，亦可將酶安定化劑添加至反應溶液中。藉此，可使反應中之酶更為安定，而提高核酸之合成效率及擴增效率。本發明中採用之酶安定化劑可為甘油等之於相關領域中已為人知者，並未特別受到限制。

10 本發明之核酸合成方法及核酸擴增方法中，亦可於反應溶液中添加用以增強DNA聚合酶及逆轉錄酶等酶之耐熱性之試劑，藉此可反應液中之酶安定化而提高核酸之合成效率及擴增效率。此種試劑可為海藻糖(trehalose)等之相關領域中已為人所知者，並未特別受到限制。

15 本發明之核酸合成方法及核酸擴增方法中，合成反應或擴增反應係反覆進行至用以使酶失去活性或用以啟動引子之試劑中之任一者用盡為止。

20 本發明之核酸合成方法及核酸擴增方法中，亦可以含有非天然核糖核苷酸之核酸作為模板核酸。本發明說明書中，『非天然核糖核苷酸』係指：含有天然核苷酸所含鹼基(腺嘌呤、鳥嘌呤、胞嘧啶、胸腺嘌呤或尿嘧啶)外之鹼基的核糖核苷酸，並將其置於核酸序列中者；舉例言之，如黃嘌呤類、二胺基嘧啶類、isoG、isoC(Proc, Natl. Acad. Sci. USA 92, 6329-6333, 1995)等。一般而言，含非天然核苷酸之目標核酸之擴增係使用不具耐熱性之核酸擴增酵素。另

一方面，舉例言之，本發明之核酸合成方法及核酸擴增方法可於50°C左右之等溫下進行，因此，與習知之PCR法相較下，核酸擴增酶(如DNA聚合酶等)失去活性之可能性較低。因此，本發明之核酸合成方法及核酸擴增方法對於係
5 使用不具耐熱性之核酸擴增酶且含非天然核糖核苷酸之目標核酸之擴增而言亦有效果。用於使含非天然核糖核苷酸擴增之酶僅需為可使此種目標核酸擴增者即可，並未受到特別限制，若特別從置入效率之觀點看來，則Y188L/E478Q變異型HIV I 逆轉錄酶、AMV逆轉錄酶、DNA聚合酶之克
10 萊諾片段、9°C DNA聚合酶及HotTub DNA聚合酶等甚為理想(參照Michael Sismour 1 et al., Biochemistry 42, No.28, 8598, 2003/美國專利第6617106號說明書、Michael J. Lutz et al., Bioorganic & Medical Chemistry letters 8, 1149-1152, 1998等)。更可於反應溶液中添加用以提高核酸擴增酶之耐
15 熱性之物質(如海藻糖等)，藉此可更有效率地進行含非天然核糖核苷酸之目標核酸之擴增。

使用本發明之核酸合成方法或核酸擴增方法可簡便且迅速地製出用以固定於DNA晶片之單股核酸、用以決定鹼基序列之單股核酸探針或用於長鏈PCR法之巨引子。舉例
20 言之，可使用本發明之核酸合成方法或核酸擴增方法並依所欲目的而僅選擇出表現序列或反表現序列後使其擴增。因此，本發明之核酸合成方法或核酸擴增方法亦可作為某一目標核酸之表現序列或反表現序列之擴增方法而甚為有用。

以本發明之核酸合成方法或核酸擴增方法獲得之擴增產物可藉各種方法檢測出其存在。其中一種方法為藉通常之凝膠電泳法測出特定尺寸之擴增產物。舉例言之，該方法可藉溴化乙錠(ethidium bromide)及Cybergreen等螢光物質進行檢測。至於其他方法則亦有使用具生物素等標幟之標幟探針，使其與擴增產物雜交以進行檢測者。可藉生物素與已螢光標幟之抗生物素蛋白以及已結合至過氧化酶等酶之抗生物素蛋白的結合而檢測出結果。

此外，本發明之核酸合成方法或核酸擴增方法所得之擴增產物亦可使用免疫色層分析法檢測。該方法係使用柱色譜媒介(利用可藉肉眼檢測之標幟)者(免疫色層分析法)。若使前述擴增片段與標幟探針雜交，再使該擴增片段之可與不同序列雜交之捕捉用探針固定在柱媒介上，則可以該固定之部分進行捕捉，而可於柱媒介進行檢測。結果，便可以肉眼進行簡易之檢測。

本發明之核酸合成方法或核酸擴增方法中，可使用已固定化於小珠上之引子，而可藉著確認因核酸合成或核酸擴增引起之小珠凝集檢測出合成產物或擴增產物。此外，以多數目標核酸為合成或擴增之對象時，可將針對各目標核酸設計之引子固定化於可互相識別之小珠(如顏色形狀等相異之小珠)，再使用含有該等之單種反應溶液來進行核酸合成反應或核酸擴增反應。此時，可藉確認各珠有無凝集而得知是否存有各目標核酸。

此外，本發明之核酸合成方法或核酸擴增方法更可使

用固定化於陣列(如DNA晶片)之引子，藉此確認因核酸合成或核酸擴增而產生於陣列上之核酸凝集物，進而測出合成產物或擴增產物。再者，以多數目標核酸作為合成或擴增之對象時，可將針對各目標核酸設計之引子固定化於陣列上可識別之位置，再使用含有該陣列之反應溶液進行核酸合成反應或核酸擴增反應。此時，可確認陣列上之對應位置有無核酸凝集物，以得知是否存有各目標核酸。亦可利用內校正劑(inter-corrector)來取代核酸凝集物之確認。

本發明之核酸擴增方法所得之擴增片段係由一般之鹼基所構成，因此，擴增後可使用擴增片段內部之限制酶部分而於適當之載體內選殖。甚至可使用RFLP等限制酶進行處理，而亦可廣泛利用於基因檢測領域中。此外，因本發明之核酸擴增方法所得之擴增片段係由一般之鹼基構成，若預先於擴增片段中編入RNA聚合酶之啟動序列，則可由擴增片段直接合成RNA，且該RNA亦可作為RNA探針。

此外，本發明之核酸合成方法或核酸擴增方法中，亦可使用已藉生物素或螢光物質標幟之鹼基來取代一般之dNTP，藉此可製得業經生物素及螢光物質標幟之DNA探針。

本發明之核酸合成方法或核酸擴增方法所製得之單股核酸可作為用以固定於DNA晶片上之DNA片段加以使用。即，本發明之核酸合成方法或核酸擴增方法亦可應用在製成DNA鏈之方法上，該DNA鏈係於製作DNA晶片時固定化者。再者，亦可預先將引子之5'端固定於DNA晶片上，再

於該晶片上進行核酸合成或核酸擴增，以製作DNA晶片。

另，若於進行該核酸合成或核酸擴增前預先添加螢光標幟探針，則可於DNA晶片上進行核酸合成或核酸擴增之同時，進行實時(real-time)之檢測。

- 5 為實施本發明之核酸合成方法或核酸擴增方法，可整理必須之試劑而令其成套組。因此，本發明之套組含有本發明之引子或本發明之引子組。此外，本發明之核酸合成方法或核酸擴增方法具有無須本發明之引子或引子對以外之其他引子的優點。因此，若據本發明之較佳實施型態，
- 10 則本發明之套組未含本發明之引子或引子組以外的引子成分。而本發明之套組更可含有前述試劑、反應容器及說明書等。

[實施例]

- 以下，以實施例將本發明作更具體之說明，但該等內容非為用以限定本發明者。
- 15

例1

本例中，使用Human DNA(Clontech社)為模板，嘗試人類STS DYS237基因之擴增。所用引子係如下所示。該等引子之合成係委託ESPEC-OLIGO SERVICE株式會社。

- 20 實驗所用之引子特徵係記載如下。此外，相對於模板之各引子領域之位置關係則如第2圖所示。再者，下述序列中，劃線部分表示各表現引子及反表現引子中共通之3'端領域。

引子組1：僅由煉合至模板之序列(20mer)構成之引子

組合；

SY153L：GCATCCTCATTTTATGTCCA(序列編號1)；

SY153R：CAACCCAAAAGCACTGAGTA(序列編號2)。

引子組2：如下所述般之引子組合，即，位於各引子3'端側之序列(20mer：與引子組1相同之序列)煉合至模板上，延伸反應後，位於5'端側之序列(13mer)係雜交至該引子延伸鏈上從各引子3'端殘基之下游1個鹼基處開始的領域；

SY153LP13-0：AAGTCTCTGATGTGCATCCTCATTTTATGTCCA(序列編號3)；

SY153RP13-0：AGAACTCGCTTTACAACCCAAAAGCACTGAGTA(序列編號4)。

引子組3：如下所述般之引子組合，即，位於各引子3'端側之序列(20mer：與引子組1相同之序列)煉合至模板上，延伸反應後，位於5'端側之序列(13mer)係雜交至該引子延伸鏈上從各引子3'端殘基之下游6個鹼基處開始的領域；

SY153LP13-5：GTATTAAGTCTCTGCATCCTCATTTTATGTCCA(序列編號5)；

SY153RP13-5：CACTAAGAACTCGCAACCCAAAAGCACTGAGTA(序列編號6)。

引子組4：如下所述般之引子組合，即，位於各引子3'端側之序列(20mer：與引子組1相同之序列)煉合至模板上，延伸反應後，位於5'端側之序列(13mer)係雜交至該引子延伸鏈上從各引子3'端殘基之下游11個鹼基處開始的領域；

SY153LP13-10：GTTCAGTATTAAGGCATCCTCATTTTATGTCCA(序列編號7)；

SY153RP13-10：AGCATCACTAAGACAACCCAAAAGCACTGAGTA(序列編號8)。

引子組5：如下所述般之引子組合，即，位於各引子3'端側之序列(20mer：與引子組1相同之序列)煉合至模板上，延伸反應後，位於5'端側之序列(13mer)係雜交至該引子延

伸鏈上從各引子3'端殘基之下游16個鹼基處開始的領域；

SY153LP13-15: CATTGTTCAGTAGCATCCTCATT^{TTT}TATGTCCA(序列編號9)；

SY153RP13-15: CTTGCAGCATCACCAACCCAAAAGCACTGAGTA(序列編號10)。

引子組6：如下所述般之引子組合，即，位於各引子3'端側之序列(20mer：與引子組1相同之序列)煉合至模板上，延伸反應後，位於5'端側之序列(10mer)係雜交至該引子伸鏈上從各引子3'端殘基之下游21個鹼基處開始的領域；

SY153LP10: GGCATT^{TTT}TGTTGCATCCTCATT^{TTT}TATGTCCA(序列編號11)；

SY153RP10: ATCTTGCAGCCAACCCAAAAGCACTGAGTA(序列編號12)。

引子組7：如下所述般之引子組合，即，位於各引子3'端側之序列(20mer：與引子組1相同之序列)煉合至模板上，延伸反應後，位於5'端側之序列(13mer)係雜交至該引子伸鏈上從各引子3'端殘基之下游21個鹼基處開始的領域；

SY153LP13: TGTGGCATT^{TTT}TGTTGCATCCTCATT^{TTT}TATGTCCA(序列編號13)；

SY153RP13: AACATCTTGCAGCCAACCCAAAAGCACTGAGTA(序列編號14)。

引子組8：如下所述般之引子組合，即，位於各引子3'端側之序列(20mer：與引子組1相同之序列)煉合至模板上，延伸反應後，位於5'端側之序列(16mer)係雜交至該引子伸鏈上從各引子3'端殘基之下游21個鹼基處開始的領域；

SY153LP16: TTATGTGGCATT^{TTT}TGTTGCATCCTCATT^{TTT}TATGTCCA(序列編號15)；

SY153RP16: CTTAACATCTTGCAGCCAACCCAAAAGCACTGAGTA(序列編號16)。

引子組9：如下所述般之引子組合，即，位於各引子3'端側之序列(20mer：與引子組1相同之序列)煉合至模板上，延伸反應後，位於5'端側之序列(22mer)係雜交至該引子延

伸鏈上從各引子3'端殘基之下游21個鹼基處開始的領域；

SY153LP22：TTATCTTTATGTGGCATTGTTGTCATCCTCATTTTATGTCCA(序列編號17)；

SY153RP22：ATTTAACTTAACATCTTGCAGCCAACCCAAAAGCACTGAGTA(序列編號18)。

引子組10：如下所述般之引子組合，即，位於各引子3'端側之序列(20mer：與引子組1相同之序列)煉合至模板上，延伸反應後，位於5'端側之序列(25mer)係雜交至該引子伸鏈上從各引子3'端殘基之下游21個鹼基處開始的領域；

SY153LP25：TCATTACCTTTATGTGGCATTGTTGTCATCCTCATTTTATGTCCA(序列編號19)；

SY153RP25：AAGATTTAACTTAACATCTTGCAGCCAACCCAAAAGCACTGAGTA(序列編號20)。

引子組11：如下所述般之引子組合，即，位於各引子3'端側之序列(20mer：與引子組1相同之序列)煉合至模板上，延伸反應後，位於5'端側之序列(28mer)係雜交至該引子伸鏈上從各引子3'端殘基之下游21個鹼基處開始的領域；

SY153LP28：CAGTCATTACCTTTATGTGGCATTGTTGTCATCCTCATTTTATGTCCA(序列編號

21)；

SY153RP28：AAGAAGATTTAACTTAACATCTTGCAGCCAACCCAAAAGCACTGAGTA(序列編號22)。

調製含有如下組成之反應液(25 μ l)：

Tris-HCL(20mM,pH8.8)、KCL(10mM)、(NH₄)₂SO₄(10mM)、MgSO₄(2mM)、Triton X-100(0.1%)、dNTP(0.4mM)，其等各含有100pmol之前述引子對及100ng之模板DNA以及8U之Bst DNA聚合酶(NEW ENGLAND BioLabs)，再使反應液以60°C培養20、40或60分鐘。

以3% NuSieve GTG Agarose(BioWhittaker Molecular

Applications(BMA)社製；自TakaraBio社購入；「NuSieve」為BMA社之登錄商標)對各反應液5 μ l進行電泳。結果如第5、6及7圖所示。該等圖中各行(lane)之樣本則如以下表1~3所示。

5

表1：第5圖之電泳照片中各泳動行之說明

行	引子	模板	反應時間(分)
1	DNA size marker (20bp ladder)		
2	引子組1	有	20
3	引子組1	有	40
4	引子組1	有	60
5	引子組1	無	60
6	引子組2	有	20
7	引子組2	有	40
8	引子組2	有	60
9	引子組2	無	60
10	引子組3	有	20
11	引子組3	有	40
12	引子組3	有	60
13	引子組3	無	60
14	引子組4	有	20
15	引子組4	有	40
16	引子組4	有	60
17	引子組4	無	60
18	引子組5	有	20
19	引子組5	有	40
20	引子組5	有	60
21	引子組5	無	60

表2：第6圖之電泳照片中各泳動行之說明

行	引子	模板	反應時間(分)
1	DNA size marker (20bp ladder)		
2	引子組6	有	20
3	引子組6	有	40
4	引子組6	有	60
5	引子組6	無	60
6	引子組7	有	20
7	引子組7	有	40
8	引子組7	有	60
9	引子組7	無	60
10	引子組8	有	20
11	引子組8	有	40
12	引子組8	有	60
13	引子組8	無	60
14	引子組9	有	20
15	引子組9	有	40
16	引子組9	有	60
17	引子組9	無	60
18	引子組10	有	20
19	引子組10	有	40
20	引子組10	有	60
21	引子組10	無	60

表3：第7圖之電泳照片中各泳動行之說明

行	引子	模板	反應時間(分)
1	DNA size marker (20bp ladder)		
2	引子組11	有	20
3	引子組11	有	40
4	引子組11	有	60
5	引子組11	無	60

5 各圖中之行5、9、13、17及21未添加模板，因此，並未發現未反應之引子有被染色者以外之帶(band)。

第5圖之行2及3添加有模板，因此可發現未反應之引子與高分子規模之模板的帶。但因反應時間不足，並未發現

擴增產物。由第5圖之行4可知，添加模板且反應時間為60分鐘之樣本可獲得擴增產物，但其等為低規模領域呈舵狀且高規模領域呈抹片狀之擴增產物。第5圖之行2~5係使用僅由與模板鏈合之寡核醣核苷酸(20mer)所構成之引子組1，並未發生本發明之合成反應，故而未獲得所欲之擴增產物。

第5圖之行6以後則為使用以下引子組進行擴增之結果；該引子組為：位於各引子3'端側之序列(20mer：與引子組1相同之序列)煉合至模板上，延伸反應後，位於5'端側之序列係雜交至該引子延伸鏈上從各引子3'端殘基之下游開始的領域。

由第5圖之行8及行12可知，使用引子組2或3時，可以60分鐘之反應時間製得目的擴增產物。低規模之帶中，約160bp附近之帶為可從本發明之合成反應預先思及的產物。亦可由第5圖之行15及16、第6圖之行3、4、7、8、11、12、15、16、19及20以及第7圖之行3及行4得知，使用引子對4、6、7、8、9、10及11時，可以40分鐘以上之反應時間製得目標擴增產物。低規模之帶中，約160bp附近之帶為可從本發明之合成反應預先思及的產物。

更可由第5圖之行18~20得知，使用引子組5時，可以約20分鐘以上之反應時間製得目標擴增產物。低規模之帶中，約160bp附近之帶為可從本發明之合成反應預先思及的產物。

如引子組2及3般，其引子延伸鏈上相當於引子3'端側

序列之領域以及5'端側序列將進行雜交之領域間之間隔較小時，具有相同序列之下一引子所應鏈合之模板上之序列大部分將呈雙鏈，而使得次一引子難以進行鏈合，因此需要較長之反應時間。

- 5 此外，如引子組6~11般，其引子延伸鏈上相當於引子3'端側序列之領域以及5'端側序列將進行雜交之領域間之間隔較大時，各引子5'端側之序列反覆效率降低，而需要較長之反應時間。

10 另一方面，若如引子組5般，其引子延伸鏈上相當於引子3'端側序列之領域以及5'端側序列將進行雜交之領域間之間隔恰於既非過大亦不過小之距離時，則可完成本發明中效率最佳之擴增。

例2

15 本例中，使用Human DNA(Clontech社)為模板，嘗試人類sY160基因之擴增。所用引子係如下所示。該等引子之合成係委託ESPEC-OLIGO SERVICE株式會社。

20 實驗所用之引子特徵係記載如下。此外，相對於模板之各引子領域之位置關係則如第3圖所示。再者，下述序列中，劃線部分表示各表現引子及反表現引子中共通之3'端領域。

引子組12：如下所述之表現引子與反表現引子的組合；其中，表現引子為：位於引子3'端側之序列(20mer)煉合至模板上，延伸反應後，位於5'端側之序列(13mer)係雜交至該引子延伸鏈上從各引子3'端殘基之下游27個鹼基處

開始的領域；反表現引子則為：位於引子3'端側之序列(20mer)煉合至模板上，延伸反應後，位於5'端側之序列(13mer)係雜交至該引子延伸鏈上從各引子3'端殘基之下游21個鹼基處開始的領域；

5 SY160LP13: ATTCGATTCCGTTTACGGGTCTCGAATGGAATA(序列編號23)；

SY160RP13: CTAAATCGAATGGTCATTGCATTCTTTCCATT(序列編號24)。

引子組13：如下所述之表現引子與反表現引子的組合；其中，表現引子為：位於引子3'端側之序列(20mer；與引子12相同之序列)煉合至模板上，延伸反應後，位於5'端側之序列(16mer)係雜交至該引子延伸鏈上從各引子3'端殘基之下游27個鹼基處開始的領域；反表現引子則為：位於引子3'端側之序列(20mer；與引子12相同之序列)煉合至模板上，延伸反應後，位於5'端側之序列(16mer)係雜交至該引子延伸鏈上從各引子3'端殘基之下游21個鹼基處開始的領域；

SY160LP16: GACATTCGATTCCGTTTACGGGTCTCGAATGGAATA(序列編號25)；

SY160RP16: GAACTAAATCGAATGGTCATTGCATTCTTTCCATT(序列編號26)。

調製含有如下組成之反應液(25μl)：
Tris-HCL(20mM,pH8.8)、KCL(10mM)、(NH₄)₂SO₄(10mM)、
20 MgSO₄(2mM)、Triton X-100(0.1%)、dNTP(0.4mM)，其等各含有100pmol之前述引子對及100ng之模板DNA以及8U之Bst DNA聚合酶(NEW ENGLAND BioLabs)，再使反應液以60°C培養60或90分鐘。

以3% NuSieve GTG Agarose(BMA社製；自TakaraBio

社購入；「NuSieve」為BMA社之登錄商標)對各反應液5μl進行電泳。結果如第8圖所示。該等圖中各行之樣本則如下表4所示。

表4：第8圖之電泳照片中各泳動行之說明

行	引子	模板	反應時間(分)
1	DNA size marker (20bp ladder)		
2	引子組12	有	60
3	引子組12	有	90
4	引子組12	無	90
5	引子組13	有	60
6	引子組13	有	90
7	引子組13	無	90

5 行4及行7並未添加模板，因此未反應之引子並未發現除染色者以外之帶。

行2及行5添加有模板，因此可發現未反應之引子與高分子規模之模板的帶。但因反應時間不足，並未發現擴增產物。由行3及行6可知，添加模板且反應時間為90分鐘之樣本可充分獲得目的之擴增產物。低規模之帶中，約260bp左右之帶為可從本發明合成反應預先思及的產物。

例3

本例中，使用M13mp18RF DNA(噬菌體載體：TakaraBio社)為模板，嘗試其擴增。所用引子係如下所示。該等引子之合成係委託ESPEC-OLIGO SERVICE株式會社。

實驗所用之引子特徵係記載如下。此外，相對於模板之各引子領域之位置關係則如第2圖所示。再者，下述序列中，劃線部分表示各表現引子及反表現引子中共通之3'端領域。

20 引子組14：如下所述之表現引子與反表現引子的組

合；其中，表現引子為：位於引子3'端側之序列(24mer)煉合至模板上，延伸反應後，位於5'端側之序列(24mer)係雜交至該引子延伸鏈上從各引子3'端殘基之下游51個鹼基處開始的領域；反表現引子則為：位於引子3'端側之序列(22mer)煉合至模板上，延伸反應後，位於5'端側之序列(15mer)係雜交至該引子延伸鏈上從各引子3'端殘基之下游54個鹼基處開始的領域；

M13BIP:CGACTCTAGAGGATCCCCGGGTACTGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGAT(序列編號27)；

M13FIP:ACAACGTCGTGACTGGGAAAACCCTGTGCGGGCCTCTTCGCTATTAC(序列編號28)。

10 引子組15：如下所述之表現引子與反表現引子的組合；其中，表現引子為：位於引子3'端側之序列(24mer；與引子組14相同之序列)煉合至模板上，延伸反應後，位於5'端側之序列(13mer)係雜交至該引子延伸鏈上從各引子3'端殘基之下游1個鹼基處開始的領域；反表現引子則為：位於引子3'端側之序列(22mer；與引子組14相同之序列)煉合至模板上，延伸反應後，位於5'端側之序列(13mer)係雜交至該引子延伸鏈上從各引子3'端殘基之下游1個鹼基處開始的領域；

M13F2L13-0:GTGTGAAATTGTTTGTGTGTGGAATTGTGAGCGGAT(序列編號29)；

20 M13R2L13-0:TTCGCCAGCTGGCGTGGGGCCTCTTCGCTATTAC(序列編號30)。

引子組16：如下所述之表現引子與反表現引子的組合；其中，表現引子為：位於引子3'端側之序列(24mer；與引子組14相同之序列)煉合至模板上，延伸反應後，位於5'端側之序列(13mer)係雜交至該引子延伸鏈上從各引子3'端

殘基之下游7個鹼基處開始的領域；反表現引子則為：位於引子3'端側之序列(22mer；與引子組14相同之序列)煉合至模板上，延伸反應後，位於5'端側之序列(13mer)係雜交至該引子延伸鏈上從各引子3'端殘基之下游7個鹼基處開始的領域；

M13F2L13-6：TTTCCTGTGTGAATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGAT(序列編號31)；

M13R2L13-6：CCCCCTTTCGCCAGTGCGGGCCTCTTCGCTATTAC(序列編號32)。

引子組17：如下所述之表現引子與反表現引子的組合；其中，表現引子為：位於引子3'端側之序列(24mer；與引子組14相同之序列)煉合至模板上，延伸反應後，位於5'端側之序列(13mer)係雜交至該引子延伸鏈上從各引子3'端殘基之下游13個鹼基處開始的領域；反表現引子則為：位於引子3'端側之序列(22mer；與引子組14相同之序列)煉合至模板上，延伸反應後，位於5'端側之序列(13mer)係雜交至該引子延伸鏈上從各引子3'端殘基之下游13個鹼基處開始的領域；

M13F2L13-12：TAGDTGTTTCCTGTGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGAT(序列編號33)；

M13R2L13-12：AGCACATCCCCCTGTGCGGGCCTCTTCGCTATTAC(序列編號34)。

引子組18：如下所述之表現引子與反表現引子的組合；其中，表現引子為：位於引子3'端側之序列(24mer；與引子組14相同之序列)煉合至模板上，延伸反應後，位於5'端側之序列(13mer)係雜交至該引子延伸鏈上從各引子3'端殘基之下游19個鹼基處開始的領域；反表現引子則為：位於引子3'端側之序列(22mer；與引子組14相同之序列)煉合

至模板上，延伸反應後，位於5'端側之序列(13mer)係雜交至該引子延伸鏈上從各引子3'端殘基之下游19個鹼基處開始的領域；

M13F2L13-18：TGGTCATAGCTGTTGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGAT(序列編號35)；

5 M13R2L13-18：CCTTGCAGCACATGTGCGGGCCTCTTCGCTATTAC(序列編號36)。

引子組19：如下所述之表現引子與反表現引子的組合；其中，表現引子為：位於引子3'端側之序列(24mer；與引子組14相同之序列)煉合至模板上，延伸反應後，位於5'端側之序列(13mer)係雜交至該引子延伸鏈上從各引子3'端殘基之下游25個鹼基處開始的領域；反表現引子則為：位於引子3'端側之序列(22mer；與引子組14相同之序列)煉合至模板上，延伸反應後，位於5'端側之序列(13mer)係雜交至該引子延伸鏈上從各引子3'端殘基之下游23個鹼基處開始的領域；

15 M13F2L13：TAATCATGGTCATTGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGAT(序列編號37)；

M13R3L13：TCGCCTTGCAGCAGTGCGGGCCTCTTCGCTATTAC(序列編號38)。

引子組20：如下所述之表現引子與反表現引子的組合；其中，表現引子為：位於引子3'端側之序列(24mer；與引子組14相同之序列)煉合至模板上，延伸反應後，位於5'端側之序列(23mer)係雜交至該引子延伸鏈上從各引子3'端殘基之下游25個鹼基處開始的領域；反表現引子則為：位於引子3'端側之序列(22mer；與引子組14相同之序列)煉合至模板上，延伸反應後，位於5'端側之序列(23mer)係雜交至該引子延伸鏈上從各引子3'端殘基之下游23個鹼基處開

始的領域；

M13F2L23 : CTCGAATTCGTAATCATGGTCATTGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGAT(序列編號39)；

M13R3L23 : CCCAACTTAATCGCCTTGCAGCAGTGCGGGCCTCTTCGCTATTAC(序列編號40)。

- 5 調 製 含 有 如 下 組 成 之 反 應 液 (25 μ l)：
- Tris-HCL(20mM,pH8.8)、KCL(10mM)、(NH₄)₂SO₄(10mM)、
- MgSO₄(2mM)、Triton X-100(0.1%)、dNTP(0.4mM)，其等
- 各含有100pmol之前述引子對及0.05 μ g之模板DNA以及8U
- 之Bst DNA聚合酶(NEW ENGLAND BioLabs)，再使反應液
- 10 以65 $^{\circ}$ C培養20至120分鐘。

以3% NuSieve GTG Agarose(BMA社製；自TakaraBio社購入；「NuSieve」為BMA社之登錄商標)對各反應液5 μ l進行電泳。結果如第9及10圖所示。該等圖中各行之樣本則如以下表5及表6所示。

15

表5：第9圖之電泳照片中各泳動行之說明

行	引子	模板	反應時間(分)
1	DNA size marker (20bp ladder)		
2	引子組14	有	60
3	引子組14	有	90
4	引子組14	有	120
5	引子組14	無	120
6	引子組15	有	60
7	引子組15	有	90
8	引子組15	有	120
9	引子組15	無	120
10	引子組16	有	60
11	引子組16	有	90
12	引子組16	有	120
13	引子組16	無	120
14	引子組17	有	60
15	引子組17	有	90
16	引子組17	有	120
17	引子組17	無	120
18	引子組18	有	60
19	引子組18	有	90
20	引子組18	有	120
21	引子組18	無	120

表6：第10圖之電泳照片中各泳動行之說明

行	引子	模板	反應時間(分)
1	DNA size marker (20bp ladder)		
2	引子組19	有	20
3	引子組19	有	40
4	引子組19	有	60
5	引子組19	無	60
6	引子組20	有	20
7	引子組20	有	40
8	引子組20	有	60
9	引子組20	無	60

各圖中行5、9、13、17及21並未添加模板，因此未反應之引子並未發現除染色者以外之帶。

第9圖之行3及4添加有模板，反應時間90分以上可獲得擴增產物。但此為與目的規模不同之低規模舵狀之擴增產物。該等行於擴增反應時係使用引子組14。其引子延伸鏈上，相當於引子3'端側序列之領域與5'端側序列進行雜交之領域間之間隔如下：若為表現引子則為50個核糖核苷酸；但若為反表現引子則為53個核糖核苷酸。由此可知，若引子延伸鏈上相當於引子3'端側序列之領域與5'端側序列進行雜交之領域之間隔過大，則各引子5'端側之序列反覆效率明顯降低，難以發生本發明之合成反應，而無法獲得目的之擴增產物。

由第9圖之行7可知，使用引子組15時，可藉90分鐘以上之時間獲得目標擴增產物。低規模之帶中，約240bp左右之帶為可從本發明合成反應預先思及的產物。

更可從第9圖之行12及行6以及第10圖之行4及行8得知，使用引子組16、17、19及20時，可以60分鐘之反應時間獲得目標擴增產物。低規模之帶中，約240bp左右之帶為可從本發明合成反應預先思及的產物。

可從第9圖之行19得知，使用引子組18時可獲得40分以上之反應時間獲得目標擴增產物。低規模之帶中，約240bp左右之帶為可從本發明合成反應預先思及的產物。

若如引子組15般，其引子延伸鏈上相當於引子3端側序列之領域與5'端側序列進行雜交之領域間之間隔較小時，

具有相同序列之下一引子所應鏈合之模板上之序列大部分將呈雙鏈，而使得次一引子難以進行鏈合，因此需要較長之反應時間。

此外，如引子組19及20般，其引子延伸鏈上相當於引子3'端側序列之領域以及5'端側序列將進行雜交之領域間之問隔較大時，各引子5'端側之序列反覆效率降低，而需要較長之反應時間。

另一方面，若如引子組18般，其引子延伸鏈上相當於引子3'端側序列之領域以及5'端側序列將進行雜交之領域間之問隔恰於既非過大亦不過小之距離時，則可完成本發明中效率最佳之擴增。

例4

例1至例3所得擴增產物中，對各標的採用被認為最具有擴增效果之擴增產物，再以限制酶消化之。藉限制酶Mbo II將使用例1所載之引子對5而獲得之擴增產物之反應液1μL消化，並以限制酶BstXI將使用例1所載之引子對12而獲得之擴增產物之反應液1μL消化，再以限制酶PstI將使用例3所載之引子對18而獲得之擴增產物之反應液1μL消化。限制酶消化之條件為以37°C進行3小時。

使用3% NuSieve GTG Agarose(BMA社製；自TakaraBio社購入；「NuSieve」為BMA社之登錄商標)對各消化物5μl進行電泳。結果如第11、12及13圖所示。從各個鹼基序列推測得知之各限制酶消化片段之規模係如電泳照片旁所載示者。因幾乎所有處於未消化狀態之帶均轉變為所推定之

消化後之規模，而可確認已製得目標擴增產物。

例5

對擴增反應溶液添加各種熔解溫度調整劑以進行擴增反應，並檢討熔解溫度調整劑對於擴增效率之效果。與例1
5 相同地使用 Human DNA(Clontech社製)，嘗試人類 STS
DYS237基因之擴增。所用引子為例1中顯示最佳擴增效率
之引子對5(序列編號9及序列編號10)。

調製含有如下組成之反應液 (25 μ l)：
Tris-HCL(20mM,pH8.8)、KCL(10mM)、(NH₄)₂SO₄(10mM)、
10 MgSO₄(8mM)、Triton X-100(0.1%)、dNTP(1.4mM)，其等
各含有1600nM之前述引子對、模板DNA以及16U之Bst
DNA聚合酶(NEW ENGLAND BioLabs)。模板DNA之濃度為
100ng、10ng、1ng或0ng。再對反應液進行添加，使其最終
濃度呈6%之DMSO、0.5M甜菜鹼、4%甲醯胺或10%甘油。
15 最後以60℃將其培養90分鐘。

擴增反應後，與實施例1相同地進行電泳。結果如第14
圖所示。第14圖中各行之樣本如以下表7所示。

表7：第14圖之電泳照片中各泳動行之說明

行	熔解溫度調整劑	模板量
1	DNA size marker (20 bp ladder)	
2	6%DMSO	100ng
3	0.5M甜菜鹼	100ng
4	4%甲醯胺	100ng
5	10%甘油	100ng
6	無	100ng
7	6%DMSO	10ng
8	0.5M甜菜鹼	10ng
9	4%甲醯胺	10ng
10	10%甘油	10ng
11	無	10ng
12	6%DMSO	1ng
13	0.5M甜菜鹼	1ng
14	4%甲醯胺	1ng
15	10%甘油	1ng
16	無	1ng
17	6%DMSO	無
18	0.5M甜菜鹼	無
19	4%甲醯胺	無
20	10%甘油	無
21	無	無
22	DNA size marker (20 bp ladder)	

於第14圖中，約160bp左右之帶為可從本發明之合成反應預先思及之擴增產物。由第14圖可清楚得知，使用100ng之模板DNA時，無論有無熔解溫度調整劑，均可獲得擴增產物。另一方面，使用10ng之模板DNA時，則僅於添加熔解溫度調整劑時可獲得擴增產物。且於使用1ng之模板DNA時，亦僅有添加熔解溫度調整劑之時可確認擴增產物之帶，特別係於添加DMSO(6%)作為熔解溫度調整劑時，確認到最明確之擴增產物之帶。

由以上結果可知，本發明之核酸擴增方法中，可於反應液中添加DMSO、甜菜鹼、甲醯胺及甘油等熔解溫度調

整劑而提高效率，特別係於添加DMSO時可獲得良好之擴增效率。

【圖式簡單說明】

第1圖係用以模式性地顯示本發明之核酸擴增法者。

5 第2圖係用以顯示使人類STS DYS237基因擴增時所採用之引子之5'側序列與3'側序列在該基因上之位置者。

第3圖係用以顯示使sY160基因擴增時所採用之引子之5'側序列與3'側序列在該基因上之位置者。

10 第4圖係用以顯示使M13mp18RT DNA擴增時所採用之引子之5'側序列與3'側序列在該基因上之位置者。

第5圖係用以顯示各種條件下人類STS DY237基因之擴增結果者。

第6圖係用以顯示各種條件下人類STS DY237基因之擴增結果者。

15 第7圖係用以顯示各種條件下人類STS DY237基因之擴增結果者。

第8圖係用以顯示各種條件下sY160基因之擴增結果者。

第9圖係用以顯示各種條件下M13mp18RT DNA之擴增結果者。

20 第11圖係用以顯示將人類STS DY237基因之擴增產物施以限制酶處理後所得之電泳圖案者。

第12圖係用以顯示將sY160基因之擴增產物施以限制酶處理後所得之電泳圖案者。

第13圖係用以顯示將M13mp18RT DNA之擴增產物施

以限制酶處理後所得之電泳圖案者。

第14圖係用以顯示於各種熔解溫度調整劑存在下人類 STS DY237 基因之擴增結果者。

【圖式之主要元件代表符號表】

(無)

1/18
SEQUENCE LISTING

<110> RIKEN

K.K. Dnaform

Wakunaga Pharmaceutical Co., Ltd.

<120> Method for Amplification of Nucleic Acids

<130> 145062

<150> JP 2002-314776

<151> 2002-10-29

<160> 43

<170> Patent In Ver. 2.0

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 1

gcatacctcat tttatgtcca

20

<210> 2

2/18

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 2

caacc caaaa gcactgagta

20

<210> 3

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 3

aagtctctga tgtgcatcct cattttatgt cca

33

<210> 4

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

3/18

<400> 4

agaactcgct ttacaacca aaagcactga gta 33

<210> 5

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 5

gtattaagtc tctgcatcct cattttatgt cca 33

<210> 6

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 6

cactaagaac tcgcaacca aaagcactga gta 33

<210> 7

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

4/18

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 7

gttcagtatt aaggcatcct cattttatgt cca 33

<210> 8

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 8

agcatcacta agacaaccga aaagcactga gta 33

<210> 9

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 9

catttggtca gtagcatcct cattttatgt cca 33

<210> 10
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 10
cttgcagcat caccaacc ca aaagcactga gta 33

<210> 11
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 11
ggcatttggt gcatacctcat tttatgtcca 30

<210> 12
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 12	
atcttgcagc caacccaaaa gcactgagta	30
<210> 13	
<211> 33	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Description of Artificial Sequence:Primer	
<400> 13	
tgtggcattt gttgcatcct cattttatgt cca	33
<210> 14	
<211> 33	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Description of Artificial Sequence:Primer	
<400> 14	
aacatcttgc agccaacca aaagcactga gta	33
<210> 15	
<211> 36	
<212> DNA	

7/18

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 15

ttatgtggca ttgttgcat cctcatttta tgtcca 36

<210> 16

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 16

cttaacatct tgcagccaac ccaaaagcac tgagta 36

<210> 17

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 17

ttacctttat gtggcatttg ttgcatcctc attttatgtc ca 42

8/18

<210> 18

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 18

atttaactta acatcttgca gccaacccaa aagcactgag ta 42

<210> 19

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 19

tcattacctt tatgtggcat ttgttgcac ctc:atattat gtcca 45

<210> 20

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

9/18

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 20

aagatttaac ttaacatctt gcagccaacc caaaagcact gagta 45

<210> 21

<211> 48

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 21

cagtcattac ctttatgtgg catttggtgc atcctcattt tatgtcca 48

<210> 22

<211> 48

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 22

aagaagattt aacttaacat cttgcagcca ac~:caaaagc actgagta 48

<210> 23

<211> 33

10/18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 23

attcgattcc gtttacgggt ctcgaatgga ata

33

<210> 24

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 24

ctaaatcgaa tggtcattgc attcctttcc att

33

<210> 25

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 25

11/18

gacattcgat tccgtttacg ggtctcgaat ggaata 36

<210> 26

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 26

gaactaaatc gaatggatcat tgcattcctt tccatt 36

<210> 27

<211> 48

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 27

cgactctaga ggatccccgg gtactgttgt gtggaattgt gagcggat 48

<210> 28

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

12/18

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 28

acaacgtcgt gactgggaaa accctgtgcg ggcctcttcg ctattac 47

<210> 29

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 29

gtgtgaaatt gtttgttg tggaattgtg agcggat 37

<210> 30

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 30

ttcgccagct ggcgtgcggg cctcttcgct attac 35

<210> 31

13/18

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 31

tttcctgtgt gaatgttg tggaattgtg agcggt

37

<210> 32

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 32

cccccttcg ccagtgcggg cctcttcgct attac

35

<210> 33

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 33
tagctgtttc ctgtgttg tggaattgtg agcggat 37

<210> 34
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 34
agcacatccc cctgtgcggg cctcttcgct attac 35

<210> 35
<211> 37
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 35
tggtcatagc tgttgttg tggaattgtg agcggat 37

<210> 36
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 36
ccttgcagca catgtgcggg cctcttcgct attac 35

<210> 37
<211> 37
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 37
taatcatggt cattgttgtg tggaattgtg agcggat 37

<210> 38
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 38
tcgccttgca gcagtgcggg cctcttcgct attac 35

16/18

<210> 39

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 39

ctcgaattcg taatcatggt cattgttgtg tggaattgtg agcggat 47

<210> 40

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 40

cccaacttaa tcgccttgca gcagtgcggg cctcttcgct attac 45

<210> 41

<211> 140

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 41

agcatcctca ttttatgtcc aacatcagag acttaatact gaacaaatgc cacataaagg 60

17/18

taatgactgt tgaagaagat ttaacttaac atcttgcagc atcactaaga actcgcttta 120
tactcagtgc ttttgggttg 140

<210> 42

<211> 240

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> unsure

<222> (48)

<223> n is unknown

<400> 42

gctacgggtc tcgaatggaa taaaaatata tggaatggaa tgcaatgnaa cggaatcgaa 60
tgtcatagaa tgtaatgcaa tgcaaaaaca tggaatccaa aatcattgac tggaaaggct 120
gggtgtcgaa aggaattgac tccaatggaa tggaatcgaa tggaatggaa gtgaatagaa 180
tcgaactaaa tcgaatggaa tggaattgat aggaacggaa tggaaaggaa tgcaatgatt 240

<210> 43

<211> 300

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Phage vector

<400> 43

cactcattag gcaccccagg ctttacactt tatgcttccg gctcgtatgt tgtgtggaat 60

18/18

tgtgagcgga taacaatttc acacaggaaa cagctatgac catgattacg aatcgagct 120
cggtagccgg ggatcctcta gagtcgacct gcaggcatgc aagcttggca ctggccgtcg 180
ttttacaacg tcgtgactgg gaaaaccctg gcl~ttacca acttaatcgc cttgcagcac 240
atcccccttt cgccagctgg cgtaatagcg aagaggcccg caccgatcgc ccttcccaac 300

伍、中文發明摘要：

本發明係關於一種可使含有目標核酸序列之核酸有效地合成或擴增之方法。本發明之方法中，所採用之引子係於3'端部分含有一序列(Ac')，其可與目標核酸序列之3'端部分之序列(A)雜交，且該序列(Ac')之5'側含有一序列(B')，其可與目標核酸序列中存在於較前述序列(A)更偏5'側之序列(B)的互補序列(Bc)雜交；其中，若令前述序列(Ac')之鹼基數為X、目標核酸序列中挾於前述序列(A)與前述序列(B)間之領域的鹼基數為Y且前述序列(Ac')與前述序列(B')間之插入序列的鹼基數為Y'(Y'可為0)時， $\{X-(Y-Y')\}/X$ 係於-1.00~1.00之範圍內。

陸、英文發明摘要：

The present invention relates to a method for effectively synthesizing or amplifying a nucleic acid having target nucleic acid sequence. The method of this invention uses a primer having a sequence (Ac') in 3' terminal portion which is able to hybridize a sequence (A) in the 3' terminal portion of the target nucleic acid sequence, and which has a sequence (B') in 5' terminal end of the sequence (Ac'). The sequence (B') is able to hybridize to the complementary sequence (Bc) of a sequence (B) which presents in the target nucleic acid sequence that is nearer to the 5' terminal than the sequence (A). In this invention, when the number of bases of the sequence (Ac') is X, the number of bases in the region between the sequence (Ac') and the sequence (B) in the target nucleic acid sequence is Y, and the number of the bases of insert sequence between the sequence (Ac') and the sequence (B') is Y' (Y' can be zero), the result of $\{X-(Y-Y')\}/X$ is in the range of -1.00 ~ 1.00.

拾、申請專利範圍：

1. 一種合成核酸之方法，該核酸係與模板核酸中之目標核酸序列互補；該方法含有以下各程序：

(a)準備引子，該引子係於3'端部分含有一序列
 5 (Ac')，其可與目標核酸序列之3'端部分之序列(A)雜交，且該序列(Ac')之5'側含有一序列(B')，其可與目標核酸序列中存在於較前述序列(A)更偏5'側之序列(B)的互補序列(Bc)雜交；且

若引子中前述序列(Ac')與前述序列(B')間不存有
 10 插入序列，且令前述序列(Ac')之鹼基數為X而目標核酸序列中前述序列(A)與前述序列(B)間所挾領域之鹼基數為Y時， $\{X-(Y)\}/X$ 係於-1.00~1.00之範圍內；

而若引子中前述序列(Ac')與前述序列(B')間存有
 15 插入序列，且令X、Y之定義與前述者相同而該插入序列之鹼基數為Y'時， $\{X-(Y-Y')\}/X$ 係於-1.00~1.00之範圍內；

(b)準備模板核酸；

(c)使前述引子煉合至前述模板，再進行引子延伸反應，以合成出含有前述目標核酸序列之互補序列的互補
 20 核酸；

(d)使存在於藉程序(c)合成出之互補核酸之5'側的序列(B')與存在於同互補核酸上之序列(Bc)雜交，藉此使模板核酸上之部分前述序列(A)成為單股；

(e)使具有與前述引子相同序列之其他引子煉合至

藉程序(d)成為單股之模板核酸上前述序列(A)之部分而進行鏈置換反應，以便可用藉前述其他引子新合成出之互補核酸來置換程序(c)合成出之互補核酸。

2. 如申請專利範圍第1項之方法，其係使程序(e)所得之雙股核酸反覆使用於程序(d)中。
3. 如申請專利範圍第1項之方法，其中程序(c)、程序(d)及程序(e)係於等溫下進行者。
4. 如申請專利範圍第1項之方法，其係使用具有鏈置換能之DNA聚合酶。
5. 如申請專利範圍第1項之方法，其於模板核酸為RNA時，更含有一使用逆轉錄酶以合成cDNA之程序。
6. 如申請專利範圍第1項之方法，其中程序(c)、程序(d)及程序(e)係於熔解溫度調整劑存在下進行者。
7. 如申請專利範圍第6項之方法，其中該熔解溫度調整劑為二甲亞砷、甜菜鹼、甲醯胺或甘油，或者為該等之混合物。
8. 如申請專利範圍第1項之方法，其中前述模板核酸中之目標核酸序列含有非天然核苷酸。
9. 一種使由雙股構成之模板核酸中之目標核酸序列擴增之方法，含有以下各程序：

(a)準備第一引子，該第一引子係於3'端部分含有一序列(Ac')，其可與雙股模板核酸第一股中之目標核酸序列之3'端部分的序列(A)雜交，且該序列(Ac')之5'側含有一序列(B')，其可與目標核酸序列中存在於較前述序

列(A)更偏5'側之序列(B)的互補序列(Bc)雜交；且

5 若引子中前述序列(Ac')與前述序列(B')間不存有插入序列，且令前述序列(Ac')之鹼基數為X而目標核酸序列中前述序列(A)與前述序列(B)間所挾領域之鹼基數為Y時， $\{X-(Y)\}/X$ 係於-1.00~1.00之範圍內；

而若引子中前述序列(Ac')與前述序列(B')間存有插入序列，且令X、Y之定義與前述者相同而該插入序列之鹼基數為Y'時， $\{X-(Y-Y')\}/X$ 係於-1.00~1.00之範圍內；

10 (b)準備第二引子，該第二引子係於3'端部分含有一序列(Cc')，其可與雙股模板核酸第二股中之目標核酸序列之3'端部分的序列(C)雜交，且該序列(Cc')之5'側含有一序列(D')，其可與目標核酸序列中存在於較前述序列(C)更偏5'側之序列(D)的互補序列(Dc)雜交；且

15 若引子中前述序列(Cc')與前述序列(D')間不存有插入序列，且令前述序列(Cc')之鹼基數為X而目標核酸序列中前述序列(C)與前述序列(D)間所挾領域之鹼基數為Y時， $\{X-(Y)\}/X$ 係於-1.00~1.00之範圍內；

20 而若引子中前述序列(Cc')與前述序列(D')間存有插入序列，且令X、Y之定義與前述者相同而該插入序列之鹼基數為Y'時， $\{X-(Y-Y')\}/X$ 係於-1.00~1.00之範圍內；

(c)準備由第一模板核酸與第二模板核酸構成之雙股模板核酸；

(d)使前述第一、第二引子各煉合至前述第一、第二模板，再各自進行引子延伸反應，以合成出含有前述目標核酸序列之互補序列的第一、第二互補核酸；

5 (e)使存在於藉程序(d)合成出之互補核酸之5'側的序列(B')及序列(D')與存在於同互補核酸上之序列(Bc)及序列(Dc)雜交，藉此使第一及第二模板核酸上之部分前述序列(A)及序列(C)成為單股；

10 (f)使具有與前述引子相同序列之其他引子煉合至藉程序(e)成為單股之第一及第二模板核酸上的前述序列(A)及序列(C)之部分而進行鏈置換反應，以便可用藉前述其他引子新合成出之互補核酸來置換程序(d)所合成出之互補核酸。

10. 如申請專利範圍第9項之方法，其係使程序(f)所得之雙股核酸反覆使用於程序(e)中。

15 11. 如申請專利範圍第9項之方法，其係使程序(f)所得之呈單股核酸的第一及第二互補核酸於程序(e)中各作為第二及第一之模板核酸而反覆使用。

12. 如申請專利範圍第9項之方法，其中程序(d)、程序(e)及程序(f)係於等溫下進行者。

20 13. 如申請專利範圍第9項之方法，其係使用具有鏈置換能之DNA聚合酶。

14. 如申請專利範圍第9項之方法，其於模板核酸為RNA時，更含有一使用逆轉錄酶以合成cDNA之程序。

15. 如申請專利範圍第9項之方法，其中程序(d)、程序(e)及

程序(f)係於熔解溫度調整劑存在下進行者。

16. 如申請專利範圍第15項之方法，其中該熔解溫度調整劑為二甲亞砷、甜菜鹼、甲醯胺或甘油，或者為該等之混合物。
- 5 17. 如申請專利範圍第9項之方法，其中前述模板核酸中之目標核酸序列含有非天然核苷酸。
18. 一種引子，係用以合成與模板核酸中之目標核酸序列互補之核酸者；且該引子係於3'端部分含有一序列(Ac')，其可與目標核酸序列之3'端部分之序列(A)雜交，且該
 - 10 序列(Ac')之5'側含有一序列(B')，其可與目標核酸序列中存在於較前述序列(A)更偏5'側之序列(B)的互補序列(Bc)雜交；且

若引子中前述序列(Ac')與前述序列(B')間不存有插入序列，且令前述序列(Ac')之鹼基數為X而目標核酸序列中前述序列(A)與前述序列(B)間所挾領域之鹼基數為Y時， $\{X-(Y)\}/X$ 係於-1.00~1.00之範圍內；

而若引子中前述序列(Ac')與前述序列(B')間存有插入序列，且令X、Y之定義與前述者相同而該插入序列之鹼基數為Y'時， $\{X-(Y-Y')\}/X$ 係於-1.00~1.00之範圍內。
 - 20
19. 一種套組，用以合成與模板核酸中之目標核酸序列互補之核酸，且含有申請專利範圍第18項之引子者。
20. 一種引子組，係用以使由雙股構成之模板核酸中之目標核酸序列擴增者，含有：

(a)第一引子，係於3'端部分含有一序列(Ac')，其可與雙股模板核酸第一股中之目標核酸序列之3'端部分的序列(A)雜交，且該序列(Ac')之5'側含有一序列(B')，其可與目標核酸序列中存在於較前述序列(A)更偏5'側之序列(B)的互補序列(Bc)雜交；且

若引子中前述序列(Ac')與前述序列(B')間不存有插入序列，且令前述序列(Ac')之鹼基數為X而目標核酸序列中前述序列(A)與前述序列(B)間所挾領域之鹼基數為Y時， $\{X-(Y)\}/X$ 係於-1.00~1.00之範圍內；

而若引子中前述序列(Ac')與前述序列(B')間存有插入序列，且令X、Y之定義與前述者相同而該插入序列之鹼基數為Y'時， $\{X-(Y-Y')\}/X$ 係於-1.00~1.00之範圍內；

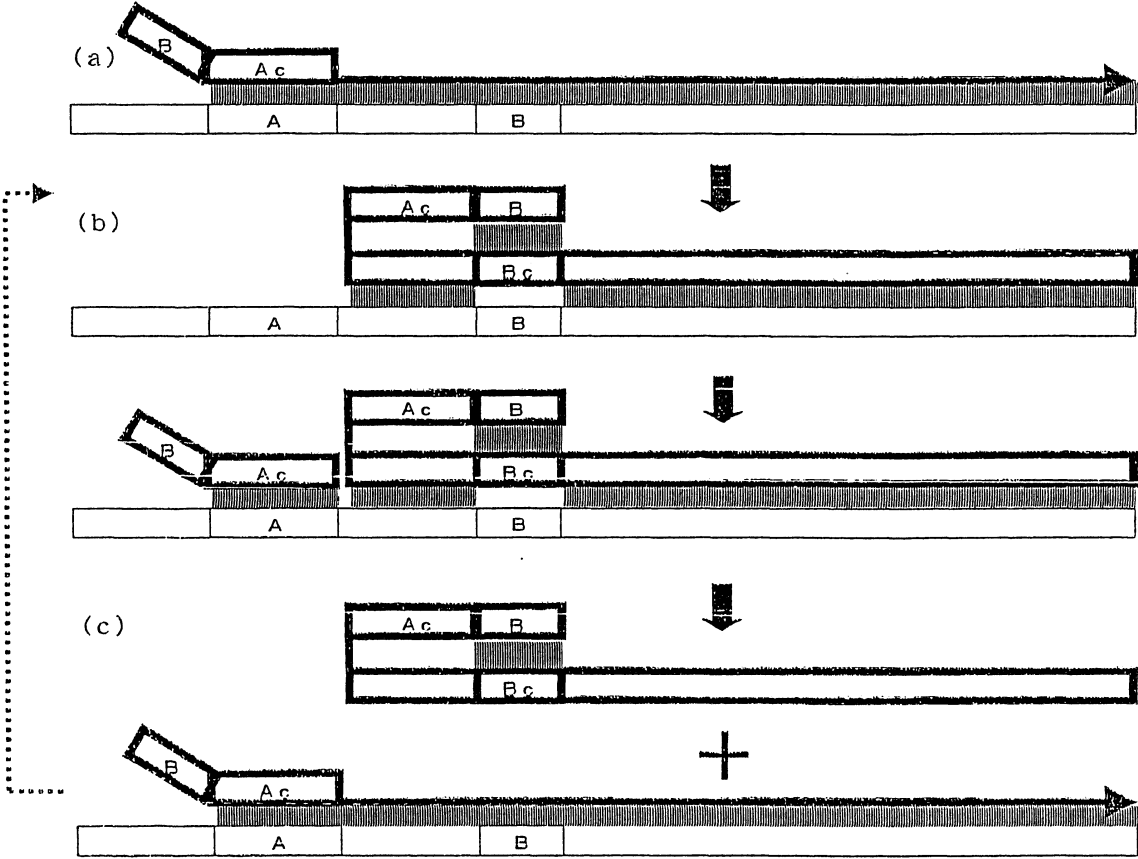
(b)第二引子，係於3'端部分含有一序列(Cc')，其可與雙股模板核酸第二股中之目標核酸序列之3'端部分的序列(C)雜交，且該序列(Cc')之5'側含有一序列(D')，其可與目標核酸序列中存在於較前述序列(C)更偏5'側之序列(D)的互補序列(Dc)雜交；且

若引子中前述序列(Cc')與前述序列(D')間不存有插入序列，且令前述序列(Cc')之鹼基數為X而目標核酸序列中前述序列(C)與前述序列(D)間所挾領域之鹼基數為Y時， $\{X-(Y)\}/X$ 係於-1.00~1.00之範圍內；

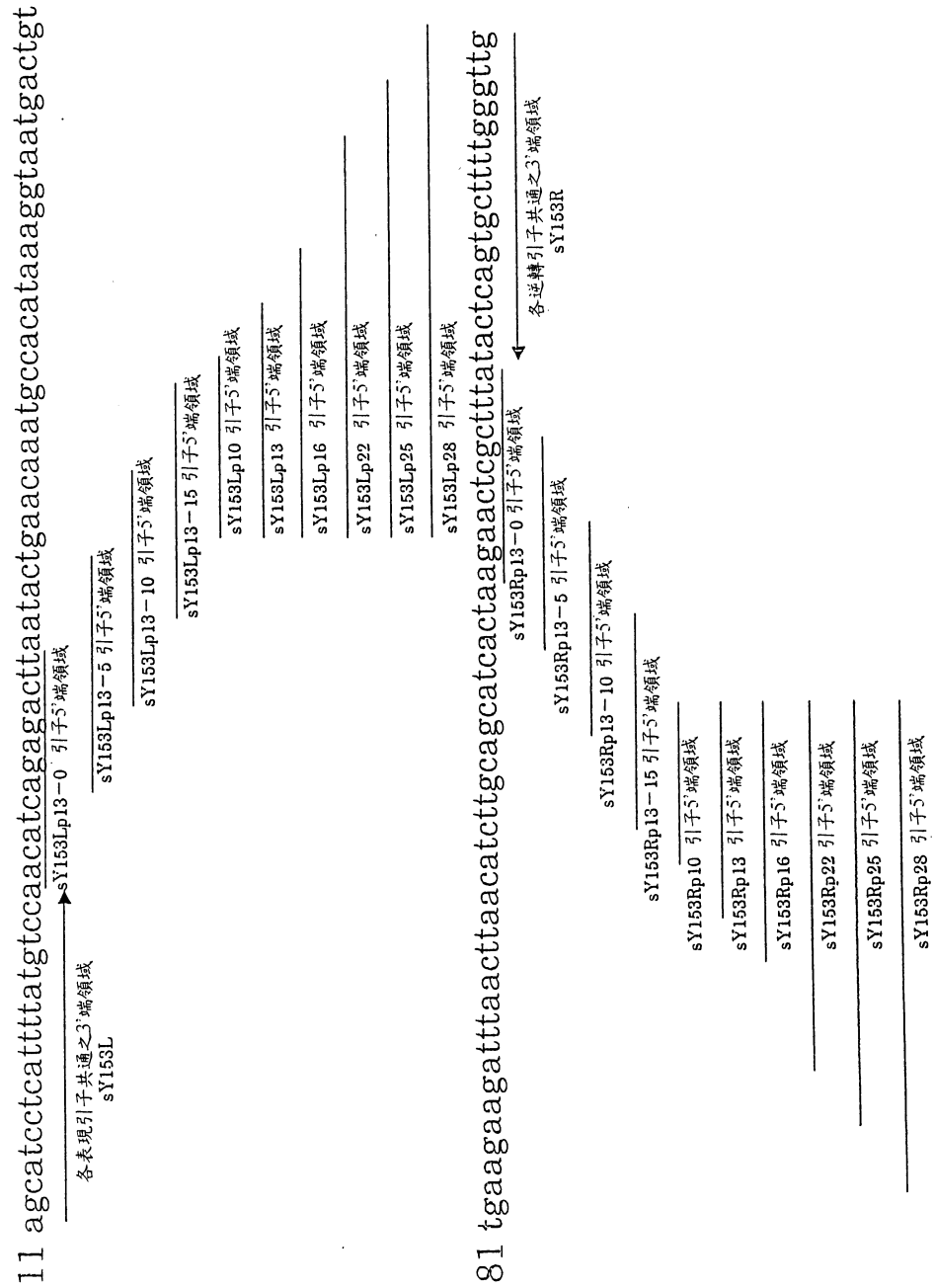
而若引子中前述序列(Cc')與前述序列(D')間存有插入序列，且令X、Y之定義與前述者相同而該插入序

列之鹼基數為Y'時， $\{X-(Y-Y')\}/X$ 係於-1.00~1.00之範圍內。

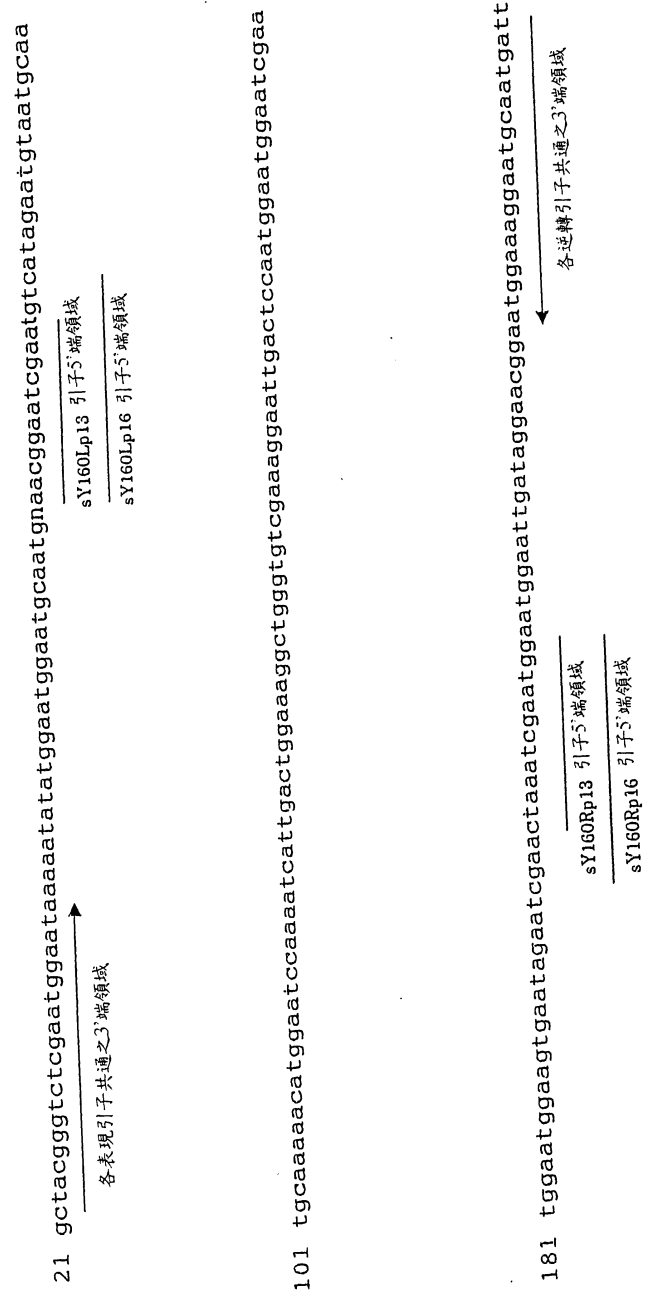
21. 一種套組，用以使由雙股構成之模板核酸中之目標核酸序列擴增，且含有申請專利範圍第20項之引子組。



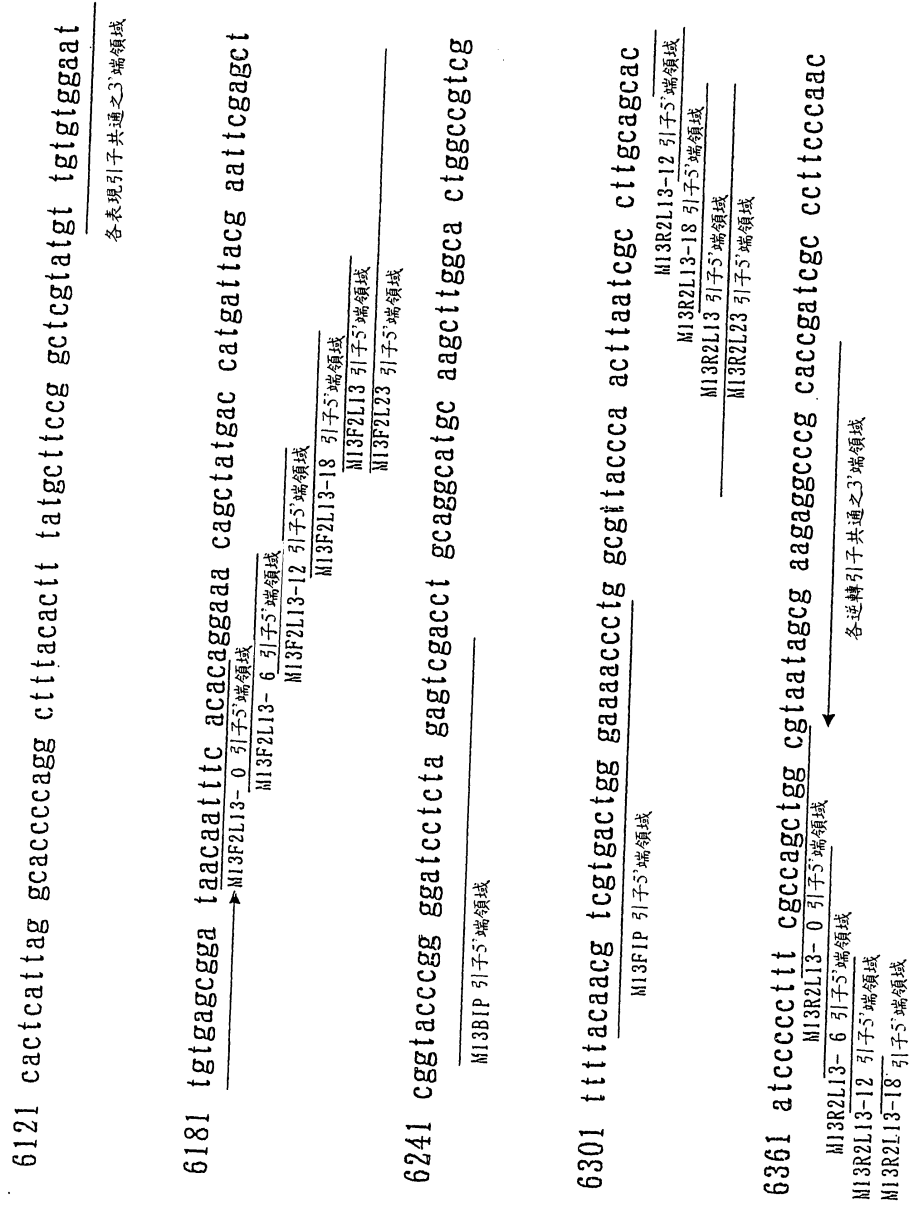
第 1 圖



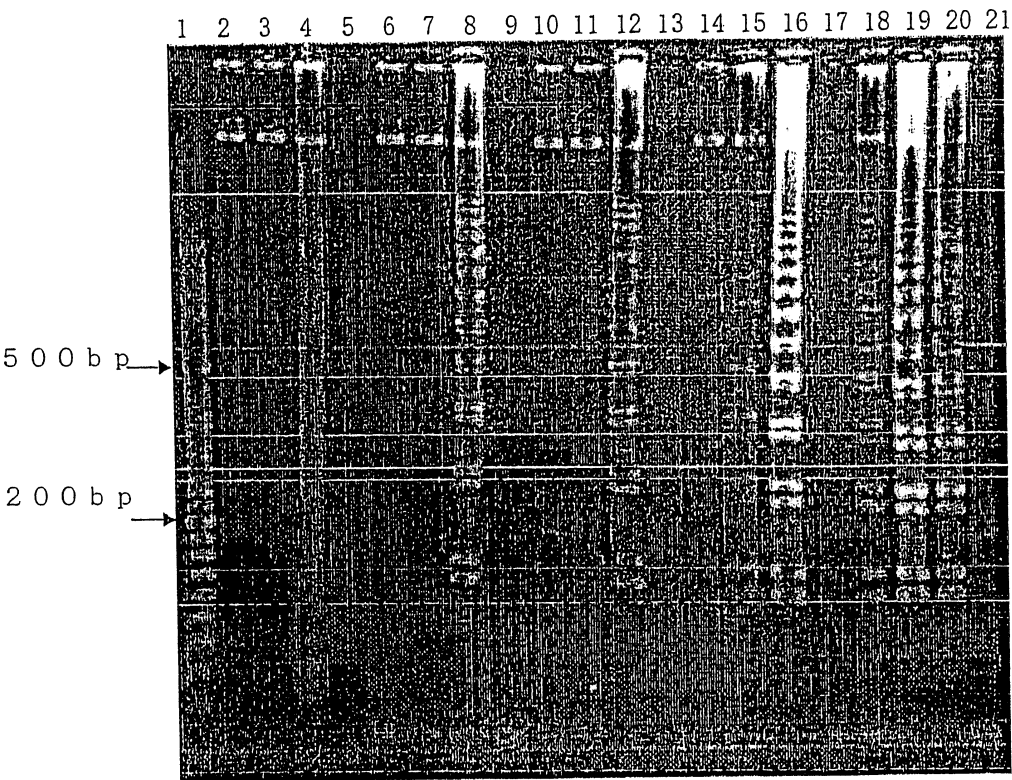
第 2 圖



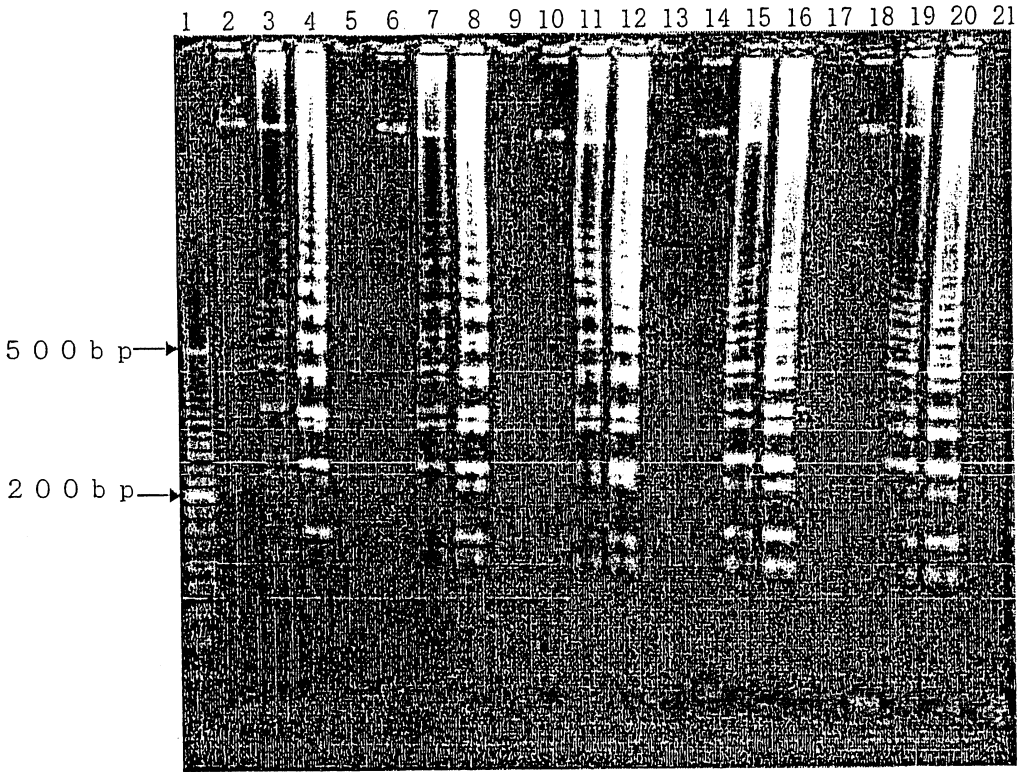
第 3 圖



第 4 圖

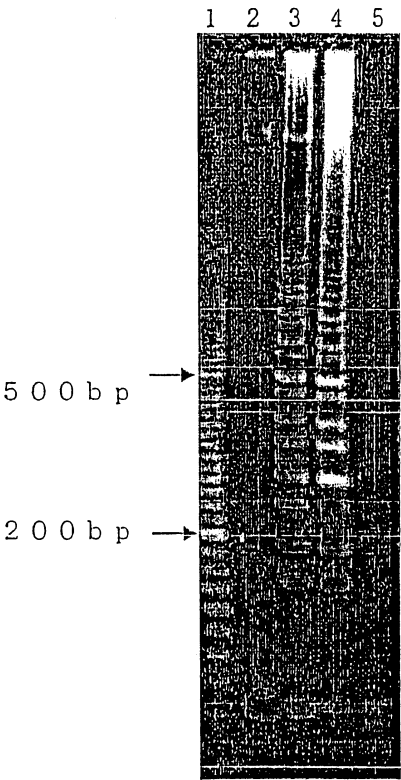


第 5 圖



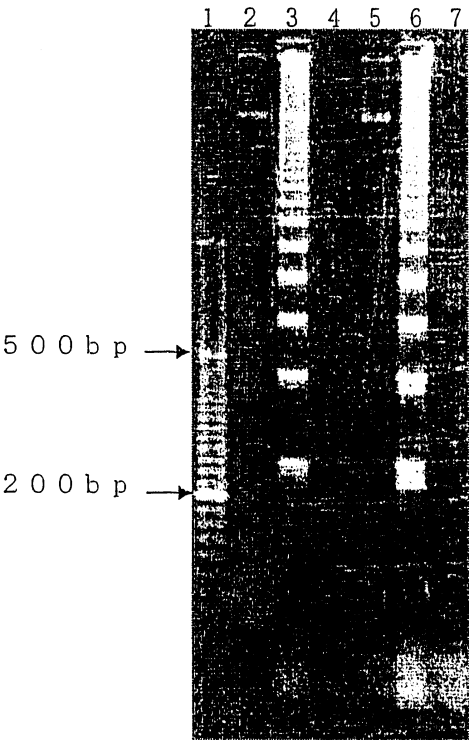
第 6 圖

7/14



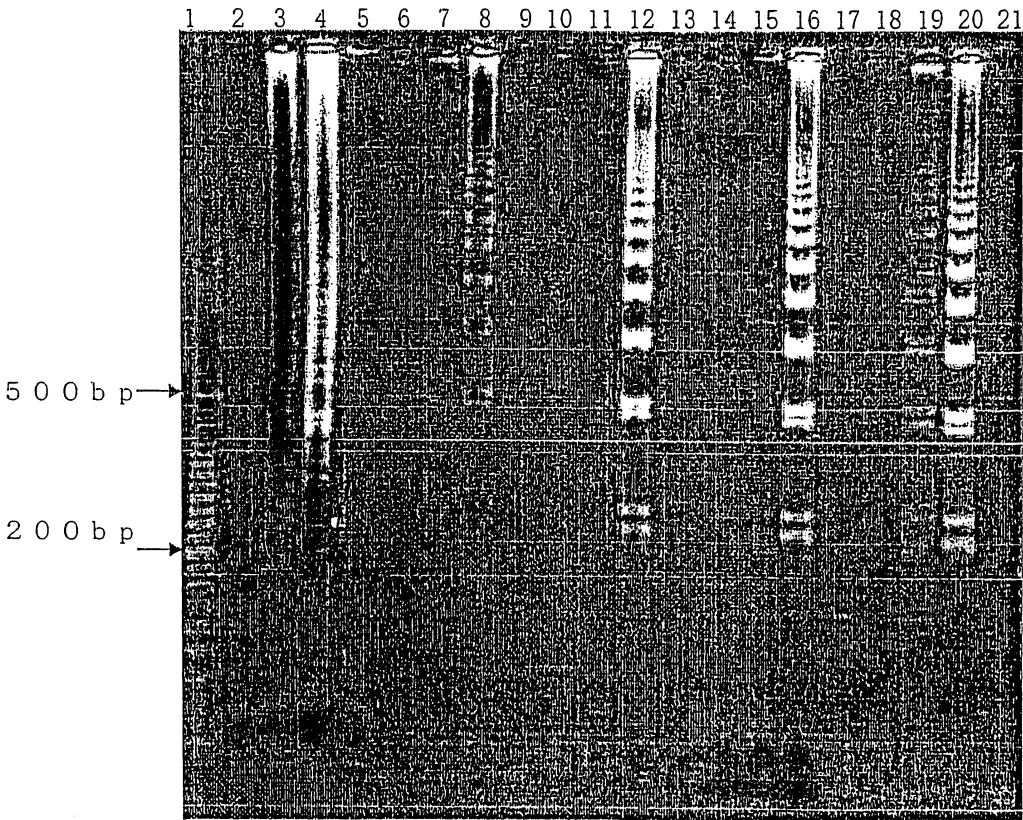
第 7 圖

8/14



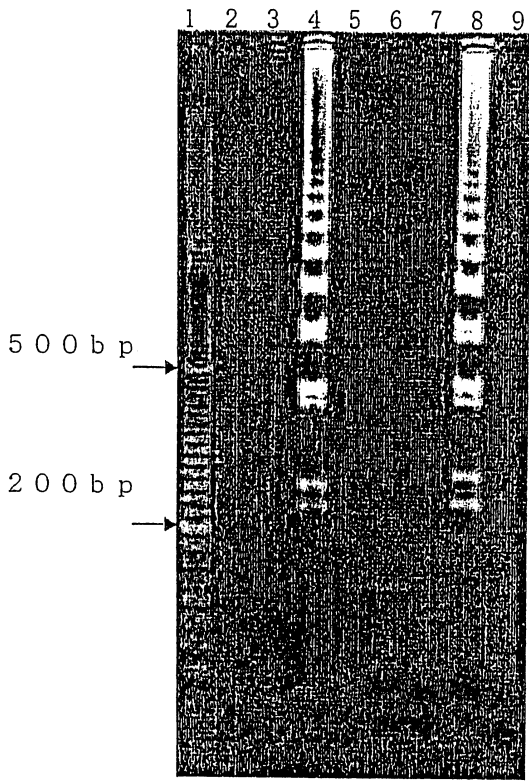
第 8 圖

9/14



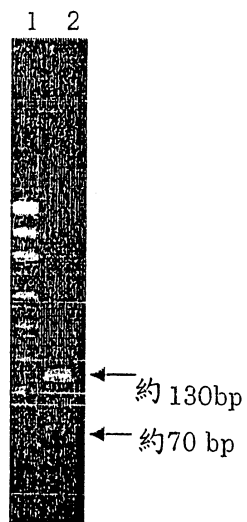
第 9 圖

10/14



第 10 圖

11/14

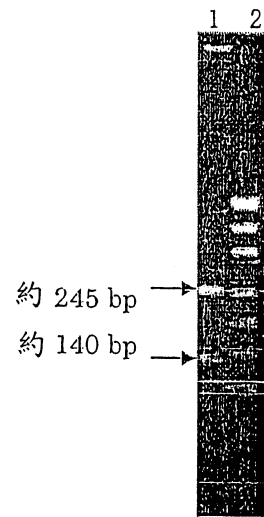


行 1 : DNA size marker (pUC19-HpaII)

行 2 : 受到限制酶處理之人類 STS DYS237之擴增產物

第 11 圖

12/14

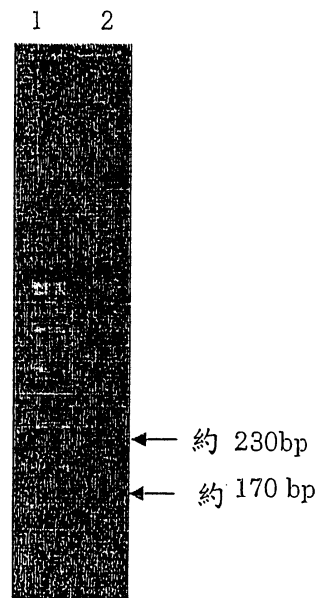


行 1 : 受到限制酶處理之Sy160 擴增產物

行 2 : DNA size marker (pUC19-HpaII)

第 12 圖

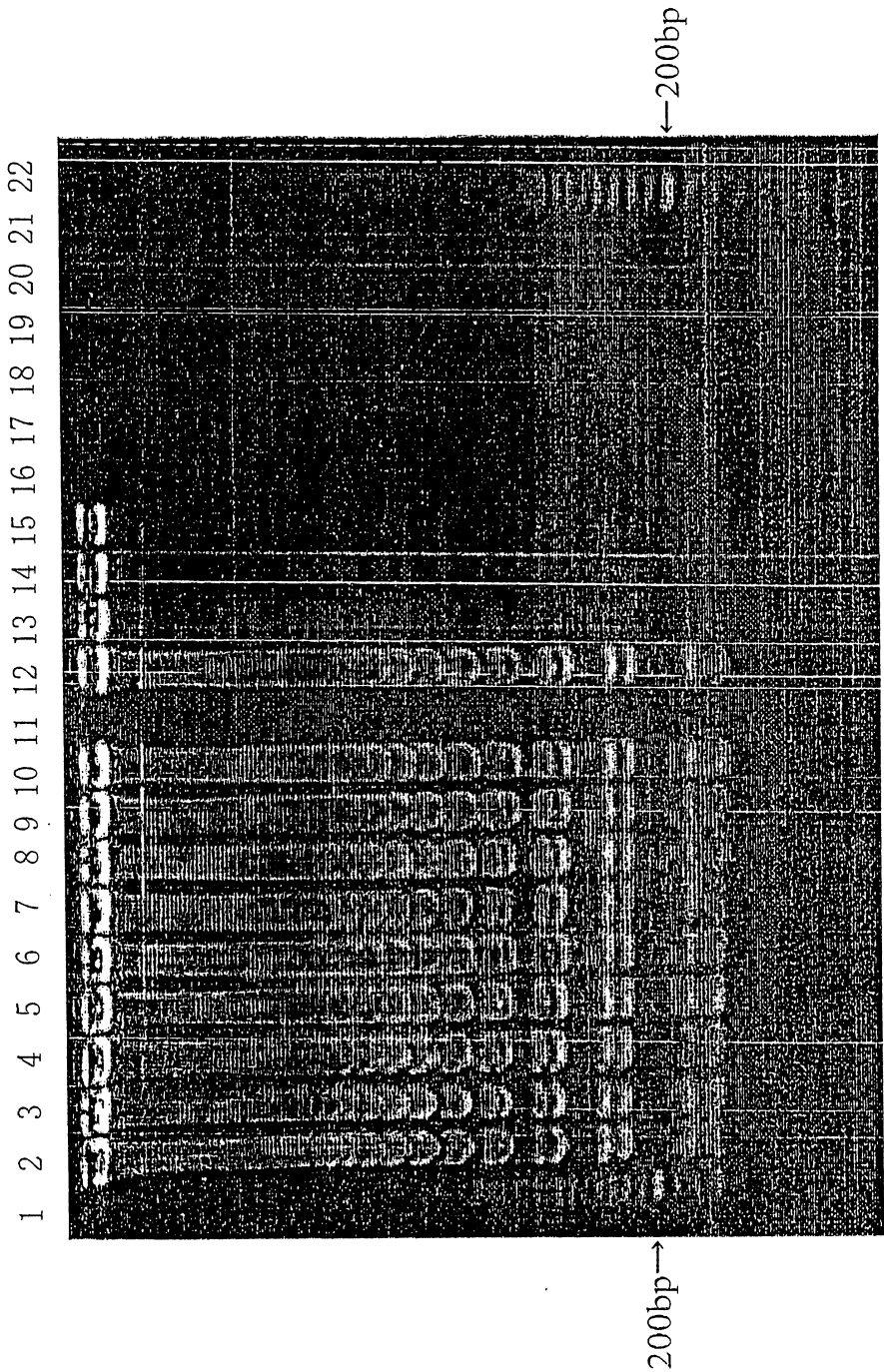
13 / 14



行 1 : DNA size marker (pUC19-HpaII)

行 2 : 受到限制酶處理之 M13mp18之擴增產物

第 13 圖



第 14 圖

柒、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第 (1) 圖。

(二)本代表圖之元件代表符號簡單說明：

(無)

捌、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

(無)