



# (12)发明专利



(10)授权公告号 CN 106244695 B

(45)授权公告日 2019.12.13

(21)申请号 201610669073.9

(22)申请日 2011.11.24

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 106244695 A

(43)申请公布日 2016.12.21

(30)优先权数据

2010-261728 2010.11.24 JP

2011-143424 2011.06.28 JP

(62)分案原申请数据

201180056583.4 2011.11.24

(73)专利权人 株式会社钟化

地址 日本大阪府

(72)发明人 高桥孝治 宫本重彦 直原启明

友野润

(74)专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

代理人 沈雪

(51)Int.Cl.

C12Q 1/6834(2018.01)

(56)对比文件

EP 2436777 B1,2015.08.19,

EP 1496359 B1,2010.06.30,

CN 1780909 A,2006.05.31,

WO 2006095550 A1,2006.09.14,

JP 2009050217 A,2009.03.12,

审查员 李恩

权利要求书1页 说明书28页

序列表23页 附图5页

(54)发明名称

扩增核酸的检测方法和检测装置

(57)摘要

本发明的目的是提供核酸检测方法,和核酸检测装置或试剂盒,所述核酸检测方法有效利用杂交法的高特异性,并且减少PCR产物的检测步骤所需的时间和步骤,在不需要特殊装置的情况下,简便且高精度地进行目测检测。提供了检测样品中的目标核酸的方法以及检测装置,所述方法包括:在扩增目标核酸序列时,合成在两个末端添加了单链区域的、具有部分双链结构的扩增产物的步骤;和采用结合了所述扩增产物的单链区域和展开介质的核酸序列、以及结合了目标化复合物的核酸序列来形成夹心杂交复合物的步骤。

1. 核酸检测方法,其包括下述步骤(1)–(4):

(1) 使用具有在核酸扩增反应中不被双链化的标签区域的引物,通过PCR法扩增目标核酸,得到具有包含天然核苷酸的单链区域的双链DNA扩增片段的步骤;

(2) 在色谱装置上的不同于固定有第1寡核苷酸探针的区域的区域中,配置所述DNA扩增片段而不进行单链化处理的步骤;

(3) 使用溶剂,使所述DNA扩增片段在朝向固定有所述第1寡核苷酸探针的区域的方向上在所述装置上扩散的步骤;以及

(4) 在固定有所述第1寡核苷酸探针的区域中,使所述第1寡核苷酸探针与所述DNA扩增片段在室温下杂交的步骤,

该方法不用于疾病的诊断。

2. 根据权利要求1所述的核酸检测方法,其还包含使所述双链DNA扩增片段与标志物结合,并肉眼检测所述标志物的步骤。

3. 根据权利要求1或2所述的核酸检测方法,其中,所述包含天然核苷酸的单链区域是与双链DNA区域相同方向的序列。

4. 根据权利要求3所述的核酸检测方法,其中,引物在能够与目标核酸的模板杂交的序列和标签区域之间具有包括聚合酶反应抑制区域的间隔区结构。

5. 根据权利要求1或2所述的核酸检测方法,其中,所述步骤(1)是使用第1引物组和第2引物组且通过PCR法扩增目标核酸的步骤,

所述第1引物组包括下述引物,该引物具有能够与目标核酸的模板杂交的序列、和不能够与该模板杂交的共同序列,以及

所述第2引物组包括下述引物,该引物具有能够与所述共同序列的互补序列杂交的序列、和在核酸扩增反应中不被双链化的标签区域。

6. 根据权利要求3所述的核酸检测方法,其中,所述步骤(1)是使用第1引物组和第2引物组且通过PCR法扩增目标核酸的步骤,

所述第1引物组包括下述引物,该引物具有能够与目标核酸的模板杂交的序列、和不能够与该模板杂交的共同序列,以及

所述第2引物组包括下述引物,该引物具有能够与所述共同序列的互补序列杂交的序列、和在核酸扩增反应中不被双链化的标签区域。

7. 根据权利要求5所述的核酸检测方法,其中,所述在核酸扩增反应中不被双链化的标签区域包含天然核苷酸、且是与能够和共同序列的互补序列杂交的序列相同方向的序列。

8. 根据权利要求6所述的核酸检测方法,其中,所述在核酸扩增反应中不被双链化的标签区域包含天然核苷酸、且是与能够和共同序列的互补序列杂交的序列相同方向的序列。

9. 根据权利要求5所述的核酸检测方法,其中,第2引物组中包含的引物在能够与共同序列的互补序列杂交的序列、和在核酸扩增反应中不被双链化的标签区域之间具有包括聚合酶反应抑制区域的间隔区结构。

10. 根据权利要求7所述的核酸检测方法,其中,第2引物组中包含的引物在能够与共同序列的互补序列杂交的序列、和在核酸扩增反应中不被双链化的标签区域之间具有包括聚合酶反应抑制区域的间隔区结构。

## 扩增核酸的检测方法和检测装置

[0001] 本申请是申请日为2011年11月24日、申请号为201180056583.4的中国发明申请“扩增核酸的检测方法和检测装置”的分案申请。

### 技术领域

[0002] 本发明涉及扩增核酸的简便的检测方法及其装置。

### 背景技术

[0003] 特异性扩增目标核酸序列的方法已经成为了分子生物学研究领域、基因检查等临床应用领域中非常重要的技术。作为特异性检测通过核酸扩增方法获得的扩增产物的方法之一有如下方法：将包含目标序列的核酸片段固定在固相上并进行检测的方法。在该方法中，目标核酸被特异地捕获在固相上，通过清洗等可以容易地去除非特异性核酸序列，从而提高检测特异性。

[0004] 目前，使目标核酸捕获于固相的方法可列举利用能够形成特异性结合的抗原-抗体的组合、或配体-受体的组合的方法。例如，非专利文献1公开了使用引物扩增的PCR产物的检测方法，所述引物中的一条引物末端用生物素修饰，另一条引物用荧光物质修饰。在该方法中，使PCR产物与由链霉亲和素-琼脂糖形成的固相接触，通过形成链霉亲和素-生物素复合物与固相结合，并可以通过测量其荧光而检测目标扩增产物。

[0005] 但是，由于受到能够作为标记使用的抗原/抗体或配体/受体的组合的限制，实际上难以同时检测多个目标核酸。此外，荧光标记核酸较为昂贵也存在成本方面的问题。

[0006] 在固相上捕获目标核酸的其他方法还有将由具有与目标核酸互补的序列的寡核苷酸形成的探针固定在固相上，通过目标核酸与探针的杂交，将目标核酸间接固定在固相上的方法。在该方法中，检测由杂交体的形成所带来的信号强度。这类核酸解析方法可以通过改变探针序列而一次性分析多个目标序列。

[0007] 但是，对于在固相上使固定化了的探针与目标核酸杂交，一般地，通过热处理使PCR方法扩增了的双链核酸变性成为单链的步骤是必需的，加热处理不仅复杂，而且存在由于再退火导致杂交效率低下的问题。此外，单链DNA易于球形化，还具有检测灵敏度差的问题。专利文献1中公开了不进行加热处理、通过核酸酶处理来扩增单链核酸的方法，但是，其操作仍然复杂，仍然存在单链的球形化的问题。

[0008] 在核酸的检测方法中，作为操作性优异、迅速、简便的检测目标核酸的方法，有基于专利文献2记载的色谱的方法。该方法是如下基因检测方法，所述方法是在单个基因检测装置上，通过毛细管作用，使包含任意被提取的基因或其片段的液体样品移动，从而连续进行从细胞、病毒或细菌中提取基因的步骤、将任意被提取的基因片段化的步骤和检测步骤。可以判断是否存在目的基因，进一步鉴别它的种类。

[0009] 但是，专利文献2也是通过NASBA法扩增单链核酸。在使用单链核酸上的问题如前所述。

[0010] 为了解决上述问题，在专利文献3和专利文献4中，通过使引物区域的5'端具有抑

制DNA聚合酶催化的核酸合成的非天然核酸标签、发夹结构或假结(シェードノット)结构,从而即使在PCR反应后也在双链核酸的一端保留了单链区域。由于仅使用特殊的引物进行PCR反应,就能够制备下述扩增产物,因此是有利的。所述扩增产物具在双链DNA的一个末端具有能够杂交的单链区域。但是,由于必须通过荧光标记、表面等离子体共振差异成像进行检测,因此高价的专用装置是必需的,在快捷性、简便性等方面存在问题。

[0011] 现有技术文献

[0012] 专利文献

[0013] 专利文献1日本特开平5-252998号公报

[0014] 专利文献2日本特开2006-201062号公报

[0015] 专利文献3国际公开第2006/095550号小册子

[0016] 专利文献4日本特开2009-296948号公报

[0017] 非专利文献

[0018] 非专利文献1Analytical biochemistry,193,231-235,(1991)

## 发明内容

[0019] 发明要解决的问题

[0020] 由于在临床现场进行基因诊断或检查需要大型且高价的检查装置,需要检查时间,患者的检查费用、多次去医院就医的时间或负担较重。因此,出于确保检查的准确性,同时减轻患者和检查者负担的原因,需要简便、快速且特异性高的方法、以及低成本且不需要特殊装置的方法。本发明是针对上述问题进行的发明,其目的在于提供如下核酸检测方法和核酸检测装置或试剂盒,该方法为有效利用杂交法的高特异性,同时减少PCR产物的检测步骤所需的时间和步骤,在不需要特殊装置的情况下,简便且高精度地目测检测的核酸检测方法。进一步的,迄今为止需要针对每个目标核酸制备高价的标记标签,在劳动力和成本方法还有改良的余地。

[0021] 解决问题的方法

[0022] 本发明人等为了解决上述问题进行深入研究,结果独创性地发现:将目标核酸作为在两个末端分别具有单链区域的双链核酸进行扩增,使该扩增片段与具有能够与上述单链区域之一进行杂交的寡核苷酸探针的固相结合,从而检测核酸,就可以在不需要特殊装置的情况下,简便且高精度的检测上述DNA扩增片段,从而完成了本发明。

[0023] 即,本发明涉及核酸检测方法,其包括:使双链DNA扩增片段的一个末端的单链区域与固定在固相上的第1寡核苷酸探针杂交的步骤,所述双链DNA扩增片段是在两个末端具有包含天然核苷酸的单链区域的双链DNA扩增片段。

[0024] 优选还包括使上述DNA扩增片段的另一个末端的单链区域与结合有标志物的第2寡核苷酸探针杂交的步骤。

[0025] 标志物优选包括着色担载体,并可以目测检测上述DNA扩增片段。

[0026] 优选包括在核酸检测装置上检测上述DNA扩增片段的步骤。

[0027] 优选用电谱检测上述DNA扩增片段。

[0028] 优选包括下述步骤(a)-(c):

[0029] (a)在上述核酸检测装置上的不同于固定有上述第1寡核苷酸探针的区域的区域

中,配置上述DNA扩增片段的步骤,

[0030] (b) 使用溶剂,使上述DNA扩增片段在朝向固定有上述第1寡核苷酸探针的区域的方向上在上述装置上扩散的步骤,以及

[0031] (c) 在固定有上述第1寡核苷酸探针的区域中,使上述第1寡核苷酸探针与上述DNA扩增片段杂交的步骤。

[0032] 优选还包括在上述步骤(c)之前,使上述DNA扩增片段与结合有上述标志物的第2寡核苷酸探针杂交的步骤。

[0033] 优选:

[0034] (d) 在上述核酸检测装置上的不同于固定有上述第1寡核苷酸探针的区域的各个区域中,分别配置上述DNA扩增片段、以及结合有所述标志物的第2寡核苷酸探针,

[0035] (e) 使用溶剂,使上述DNA扩增片段在朝向配置有第2寡核苷酸探针的区域的方向上扩散,所述第2寡核苷酸探针结合有上述标志物,

[0036] (f) 在配置了结合有上述标志物的第2寡核苷酸探针的区域中,使上述DNA扩增片段与结合有标志物的第2寡核苷酸探针杂交,

[0037] (g) 使在步骤(f)中杂交而得到的复合物在朝向配置有上述第1寡核苷酸探针的方向上在展开介质上扩散,以及

[0038] (h) 在固定有上述第1寡核苷酸探针的区域中,使上述第1寡核苷酸探针与上述复合物杂交。

[0039] 上述包含天然核苷酸的单链区域优选是与双链DNA区域相同方向的序列。

[0040] 上述DNA扩增片段优选是使用2种下述引物且通过核酸扩增方法获得的产物,所述引物具有在核酸扩增反应中不被双链化的标签区域。

[0041] 上述DNA扩增片段优选是使用第1引物组和第2引物组且通过核酸扩增方法获得的产物,所述第1引物组包括下述引物,该引物具有能够与目标核酸的模板杂交的序列、和不能够与该模板杂交的共同序列,以及所述第2引物组包括下述引物,该引物具有能够与上述共同序列的互补序列杂交的序列、和在核酸扩增反应中不被双链化的标签区域。

[0042] 优选上述在核酸扩增反应中不被双链化的标签区域包括天然核苷酸,且第2引物组的引物全长为相同方向的序列。

[0043] 此外,本发明涉及在上述核酸检测方法中使用的核酸检测装置,其具有:配置上述DNA扩增片段的区域,保持有上述第1寡核苷酸探针的色谱担载体,所述第1寡核苷酸探针待与上述DNA扩增片段结合,以及结合有标志物的上述第2寡核苷酸探针。

[0044] 此外,本发明涉及双链DNA扩增片段,其为使用具有在核酸扩增反应中不被双链化的标签区域的2种引物且通过核酸扩增方法而获得的、并在两个末端具有包含天然核苷酸的单链区域的双链DNA扩增片段。

[0045] 优选引物的在核酸扩增反应中不被双链化的标签区域包括天然核苷酸,且引物全长为相同方向的序列。

[0046] 发明的效果

[0047] 通过本发明,可以利用DNA扩增产物的单链区域、特异地与固相结合,进一步的,可以利用另一个末端的单链区域与目标化合物形成复合物,能够在不使用特殊装置的情况下,简便、快速的目测判断DNA扩增产物。此外,通过检测结构上稳定的双链DNA,使得检测灵

敏度比检测全长单链更高。此外,通过准备用于结合固相的扩增产物的单链区域和与其互补的固相上的寡核苷酸探针的多种组合,还可以同时鉴别存在于样品中的2种以上的目标核酸。此外,使用本发明的其他实施方式,可以通过廉价的联合引物(jointprimer),在所有目标核酸上添加相同的单链区域。利用该相同的单链区域,可以使用相同的标记标签和装置进行检测。在此情况下,不必针对每个目标核酸来制备高价的标记标签,可以极大的改善时间和成本。

## 附图说明

- [0048] 图1为本发明的PCR用引物的示意图。
- [0049] 图2为本发明的PCR用第1引物的示意图。
- [0050] 图3为本发明PCR用第2引物的示意图。
- [0051] 图4为本发明的部分双链核酸的合成方法示意图。
- [0052] 图5为本发明的部分双链核酸的合成方法的其他实施方式的示意图。
- [0053] 图6为显示本发明的核酸色谱装置的一个例子的示意图。
- [0054] 图7为本发明的PCR产物检测原理的示意图。
- [0055] 图8为显示本发明的微阵列(DNA芯片)的一个例子的示意图。
- [0056] 图9为显示本发明的珠状担载体一个例子的示意图。

## 具体实施方式

[0057] 本发明涉及核酸检测方法,包括使双链DNA扩增片段的一个末端的单链区域与固定在固相上的第1寡核苷酸探针杂交的步骤,所述双链DNA扩增片段是在两个末端具有包含天然核苷酸的单链区域的双链DNA扩增片段。

[0058] 双链DNA扩增片段是针对作为模板的样品DNA,使用特定的引物组进行核酸扩增反应而获得的。

[0059] 样品DNA没有特殊的限制,只要可以作为核酸扩增反应的模板使用即可。具体而言,可以使用血液、体液、组织、口腔黏膜、毛发、爪、培养细胞、动物、植物、微生物等所有源自生物样品的DNA。此外,上述样品DNA可以是基因组DNA、cDNA、线粒体DNA和叶绿体DNA等。此外,也可以使用以RNA为模板逆转录后获得的cDNA。这些DNA可以根据扩增的DNA片段来恰当的选择。此外,样品DNA不必是纯化的DNA,可以是包含样品DNA的细胞或组织,在不进行纯化处理的条件下,直接适用于核酸扩增反应。

[0060] 在两个末端具有单链区域的双链DNA扩增片段优选是使用2种下述引物且通过核酸扩增方法获得的产物,所述引物具有在核酸扩增反应中不被双链化的标签区域。在此情况下,双链DNA扩增片段的两个末端的单链区域是源自核酸扩增反应中使用的引物中的、通过核酸扩增反应不被双链化的标签区域的区域。

[0061] 图1显示了用于核酸扩增的引物。该引物包括引物本体区域1和位于上述引物本体部分的5'末端的通过核酸扩增反应不被双链化的标签区域2。此外,引物本体区域和标签区域之间可以具有包括聚合酶反应抑制区域3的间隔区结构。

[0062] 此外,双链DNA扩增片段优选是使用第1引物组和第2引物组且通过核酸扩增方法获得的产物,所述第1引物组包括具有能够与目标核酸的模板杂交的序列、和不能够与该模

板杂交的共同序列的引物,并且所述第2引物组包括具有能够与上述共同序列的互补序列杂交的序列,和在核酸扩增反应中不被双链化的标签区域的引物。图2显示了构成PCR用第1引物组的引物。PCR用第1引物(联合引物)的特征是包括能够与目标核酸的模板杂交的引物本体区域4和位于上述引物本体区域的5'端的共同区域5,所述共同区域5包括与第2引物共同的序列。图3显示了构成PCR用第2引物组的引物。第2引物的特征是包括具有与上述第1引物共同的序列的引物本体区域6,和位于本体区域6的5'末端的通过核酸扩增反应不被双链化的标签区域7。第2引物本体区域和标签区域之间,可以具有包括聚合酶反应抑制区域8的间隔区结构。

[0063] 引物本体区域是指具有在核酸扩增反应中能够作为引物发挥作用的碱基序列的寡核苷酸区域。具体而言,是能够与目标核酸的目标碱基序列的5'末端或3'末端杂交的序列;一般而言,是与目标碱基序列的5'末端或3'末端的碱基序列互补的碱基序列。这些引物本体区域只要可以与目标核酸特异性结合即可,可以具有碱基缺失、插入和错配位点。引物本体区域的长度优选是8个碱基以上,更优选是12个碱基以上,更优选是15个碱基以上。此外,引物的链长没有特殊的上限,从它的合成成本等观点来看,通常50个碱基以下,或者40个碱基以下是合适的。

[0064] 引物的标签区域只要是包含天然核苷酸即可,没有特殊的限制。天然核苷酸是指由天然的腺嘌呤、胸腺嘧啶、鸟嘌呤、胞嘧啶、尿嘧啶碱基,以及脱氧核糖、核糖糖基,以及磷酸基形成的核苷酸,各部分都是未经人工修饰的核苷酸。天然核苷酸可以是D型核苷酸,也可以是L型核苷酸。D型核苷酸表示包含D型脱氧核糖或核糖的核苷酸。此外,L型核苷酸表示包含L型脱氧核糖或核糖的核苷酸。标签区域由于包含天然核苷酸,因此可以发挥合成廉价且容易实现的效果。此外,引物的标签区域中的天然核苷酸的比例优选在5%以上,更优选在20%以上,更优选在50%以上,更优选在70%以上,最优选在90%以上。标签区域的长度没有特殊的限制,只要是具有对于与互补链核酸杂交而言为足够的长度即可。通常是5个碱基-60个碱基,优选是6个碱基-40个碱基。

[0065] 引物的标签区域的核酸方向优选朝向与引物本体区域相同的方向排列。通过朝向与引物本体区域相同的方向来排列引物的标签区域的核酸方向,实现了廉价且方便合成的效果。标签区域和引物本体区域即使没有直接连接,例如,在标签区域和引物本体区域之间插入偶氮苯这样的非天然化合物时,也优选朝向相同的方向排列。在本文中,核酸为相同方向是指相邻的核苷酸是通过核苷酸糖基的5'位和3'位之间的磷酸二酯键而结合,并不是通过3'位和3'位之间或者是5'位与5'位之间的磷酸二酯键而结合。例如,标签区域中的核苷酸彼此之间通过磷酸二酯键在糖基的5'位和3'位之间结合时,本体区域中的核苷酸彼此之间也在糖基的5'位和3'位之间形成连接。

[0066] 聚合酶反应抑制区域,其只要是能够抑制聚合酶催化的核酸延伸反应,保持该区域的单链结构即可,没有特殊的限制。这类结构包括:具有稳固的发夹结构或假结结构这一类抑制聚合酶行进的立体结构的核酸序列、或L型核酸或人工核酸等非天然核酸、或RNA、和脂肪链这类非核酸结构。

[0067] “发夹结构”或“假结结构”是指与同一分子中的另一单链区域配对所形成的稳定的环状结构。L型DNA是包含L型脱氧核糖的DNA,由于不能被一般使用的DNA聚合酶识别,因此不具有作为DNA延伸反应的模板的功能。进一步的,L型DNA由于形成左旋的双螺旋结构,

不能与天然存在的D型核酸形成杂交体,而仅可以在L型核酸之间形成杂交体。人工核酸是指人为插入在天然核酸序列中不存在的化合物而得的核酸。可列举例如肽核酸(PNA)、交联核酸(BNA或LNA)或偶氮苯、荧光素、Cy3、Cy5等,但不限于此。

[0068] PNA是指在主链中保留了肽结构,并具有与DNA或RNA类似结构的分子,N-(2-氨基乙基)甘氨酸以酰胺键相结合而得到的物质作为主链。因此,与核酸碱基相对应的嘌呤环或嘧啶环通过亚甲基和羰基与主链结合。BNA(LNA)表示通过交联修饰DNA或RNA的糖基结构而人工合成的核酸。

[0069] 在标签区域仅由天然核苷酸组成,且标签区域的核酸方向与引物本体区域的方向相同的情况下,通常与引物区域之间需要聚合酶反应抑制区域。另一方面,在当标签区域是L型核酸或人工核酸等这类不能作为DNA聚合酶催化的反应的模板、且在核酸扩增反应后也不被双链化的情况下,也可以省略聚合酶反应抑制区域。此外,本发明的引物可以单独具有发夹结构、假结结构等稳定的环状结构、L型核酸、人工核酸等非天然核酸、以及脂肪链等非核酸结构等,也可以具有多个的组合。

[0070] 可以通过寡核苷酸标记中常用的各种分子来标记引物。这类分子可列举酶、磁性颗粒、荧光色素、放射性同位素等。这些分子可以单独使用,也可以组合多个来使用。

[0071] 制备所设计的引物的方法没有特殊的限制,可以通过公知的方法来制备。具体而言,使用DNA合成装置,利用委托合成服务,可以容易的获得设计的引物。

[0072] 核酸扩增方法只要是使用上述引物,获得在两个末端具有包含天然核苷酸的单链区域的双链DNA扩增片段的方法即可,没有特殊的限制。可列举例如PCR。此外,也可以使用LAMP法、ICAN法等等温扩增方法。

[0073] 在使用PCR作为核酸扩增方法时,作为用于PCR反应中的反向引物和正向引物的组合,可以使用与两条引物不同的聚合酶反应抑制区域,也可以在一条中使用聚合酶反应抑制区域,在另一条中不导入聚合酶反应抑制区域而是进行生物素等修饰。

[0074] PCR条件没有特殊的限制,在以上述样品DNA作为模板,使用上述引物组进行PCR时,只要是可以扩增样品DNA的预期区域的条件即可。具体而言,用于PCR的聚合酶没有特殊的限制,更优选是耐热性DNA聚合酶,更优选是实质上没有3'→5'外切核酸酶活性的耐热性DNA聚合酶。此类耐热性DNA聚合酶可列举Ex-Taq(TAKARA BIO公司生产)等,但不限于此。此外,对温度、时间、缓冲液组成等PCR反应条件也没有特殊的限制,可以根据所选择的DNA聚合酶、引物序列、目的序列部分的长度等,恰当地设置。通过核酸扩增反应扩增的DNA长度优选是20个碱基以上,更优选是40个碱基以上。如果少于20个碱基,则非特异性扩增的倾向增加。

[0075] 使用上述引物组,通过常规方法进行PCR,可以获得在目标核酸序列的两末端添加了单链区域的扩增产物。图4显示了扩增反应的一个例子,是在使用了包含引物本体区域和标签区域的引物时的扩增反应的模式图。正向引物10具有引物本体区域11和位于其5'末端的标签区域12,所述引物本体区域11包括与目标核酸序列9的5'末端的一部分相同的序列。反向引物13具有引物本体区域14和位于其5'末端的标签区域15,所述引物本体区域14包括与目标核酸序列的3'末端的一部分互补的序列。两条引物结合的标签区域的序列通常分别具有不同的序列。使用上述引物组进行PCR时,由于添加在两条引物上的标签区域实际上不参与PCR反应,因此,获得了在两个末端具有单链区域的DNA扩增产物16。在两个末端具有单



链区域的DNA扩增片段是指下述DNA扩增产物,如图4所示的,所述DNA扩增产物具有与目标DNA区域相同的双链DNA部分,以及在其两侧各自的5'末端具有作为标签部分的单链区域。换言之,如果对上述DNA扩增片段更详细的说明,其表示在两个末端具有包含没有修饰的核酸的单链区域的双链DNA扩增片段,并且,两个末端的单链区域分别具有与其所连接的DNA链方向相同的序列。

[0076] 图5显示了扩增反应的一个例子,是在使用了包含引物本体区域和共同序列区域的引物作为联合引物组、以及包含共同序列和标签区域的引物的情况下的扩增反应的模式图。使用第1和第2引物组,通过常规方法进行PCR,可以获得在目标核酸序列的两末端添加了单链区域的扩增产物。

[0077] 正向第1引物18具有引物本体区域19及位于其5'末端的共同序列区域20,所述引物本体区域19包括与目标核酸序列17的5'末端的一部分相同的序列。反向第1引物21具有引物本体区域22及位于其5'末端的共同序列区域23,所述引物本体区域22包括与目标核酸序列的3'末端的一部分互补的序列。在两条引物中添加的共同区域的序列通常分别具有不同的序列。使用上述第1引物组进行PCR,获得具有共同区域的双链DNA扩增产物24。

[0078] 此外,DNA扩增产物24的两端的共同序列区域的正向第2引物25,具有引物本体区域26及位于其5'末端的标签区域27,所述引物本体区域26包括与具有上述共同区域的双链DNA扩增产物24的5'末端的一部分相同的序列。反向第2引物28具有引物本体区域29及位于其5'末端的标签区域30,所述引物本体区域29包括与具有上述共同区域的双链DNA扩增产物24的3'末端的一部分共同的互补的序列。两条引物中结合的标签区域的序列通常分别具有不同的序列。使用上述引物组进行PCR时,由于添加在两条引物上的标签区域实际上不参与PCR反应,因此,获得了在两个末端具有单链区域的DNA扩增产物31。在该实施方式中,使用第1引物的PCR反应和使用第2引物的PCR反应,如图5所示连续进行,其顺序可以是同时添加第1引物和第2引物。或者也可以是后添加第2引物。

[0079] 在两个末端具有单链区域的DNA扩增片段是指如图5的31所示,具有与目标DNA区域相同的双链DNA部分,及在其两侧的5'末端分别具有作为标签部分的单链区域的DNA扩增产物。

[0080] 通过使用第1和第2引物组,即使改变目标核酸,通过将共同序列设计为相同的序列,第2引物可以使用相同的引物,可以制备出相同的单链标签序列。如果对上述DNA扩增片段更详细的说明,其表示在两个末端具有包含没有修饰的核酸的单链区域的双链DNA扩增片段,并且,两个末端的单链区域分别具有与其所连接的DNA链方向相同的序列。

[0081] 利用使用上述引物获得的上述扩增产物的单链区域,形成杂交复合物。杂交是指包含核酸的分子互补地形成复合物,除DNA/DNA外,还包括DNA/RNA、DNA/PNA、L-DNA/L-DNA等。在本发明的核酸检测方法中,由于DNA扩增片段具有单链区域,因此,在核酸扩增步骤中获得的DNA扩增产物可以不进行热处理等单链化处理等,就用于杂交反应中。

[0082] 可以使在两个末端具有包含天然核苷酸的单链区域标签的双链DNA扩增片段的一个单链区域,与固定在用于捕获的担载体(固相)上的第1寡核苷酸探针杂交。优选还包括使双链DNA扩增片段的另一个单链区域,与直接或间接结合了标志物的第2寡核苷酸探针杂交的步骤。双链DNA扩增片段、第1寡核苷酸探针和第2寡核苷酸探针这3者的复合物的形成被称为夹心杂交。此外,对三者的杂交顺序没有特殊的限制。

[0083] 对第1寡核苷酸探针的长度没有特殊的限制,只要能够与双链DNA扩增片段的单链区域杂交即可,优选5-60个碱基长,更优选10-40个碱基长。

[0084] 对第2寡核苷酸探针的长度没有特殊的限制,只要能够与双链DNA扩增片段的单链区域杂交即可,优选5-60个碱基长,更优选10-40个碱基长。

[0085] 与第2寡核苷酸探针结合的标志物没有特殊的限制,只要能够实现双链DNA扩增片段的检测即可,优选能够实现目测检测双链DNA扩增片段的着色担载体。这类着色担载体可列举着色颗粒、酶或色素结合担载体等。其中,优选使用着色颗粒。

[0086] 着色颗粒可列举包括金、银、铜、铂等金属的胶体粒子、用色素或染料等使胶乳着色而形成的着色胶乳、将色素分子固定在硅石(二氧化硅)颗粒内部的硅石纳米颗粒等。其中,优选使用金胶体颗粒、由蓝色、红色等着色的水分散型高分子聚合物所形成的着色胶乳颗粒。通过使用这类着色颗粒,可以方便的目测判断DNA扩增片段。特别是当同时检测多个对象时,通过每个对象使用不同颜色的着色颗粒,可以方便地同时目测判断多个对象。

[0087] 在使用着色颗粒的情况下,对颗粒的粒径没有特殊的限制,优选是对夹心杂交复合物的形成和在固相上捕获包含目标序列的扩增产物的不利影响小,且在检测时显色好的粒径。着色颗粒的粒径选自比下述用于色谱的介质的孔径更小的粒径。具体而言,通常使用500nm以下的,其中优选0.1nm-100nm,更优选1nm-50nm的。作为着色担载体使用的酶是指催化显色或发光的底物的反应的蛋白质。可列举例如过氧化物酶、碱性磷酸酶、荧光素酶等,只要能够用肉眼检测即可,没有特殊的限制。

[0088] 对双链DNA扩增片段末端的单链区域与第1或第2寡核苷酸探针的杂交条件没有特殊的限制,只要是发生杂交的条件即可,优选是在室温下,10mM磷酸缓冲液中反应。此时,通过加入氯化钠等盐,可以提高杂交效率。

[0089] 通过检测在捕获担载体(固相)上的能够识别的位置所形成的夹心杂交复合物中所包含的标志物,可以判断有无目标核酸。检测优选通过目测判断。通过本发明的检测方法,核酸扩增反应的扩增产物可以在不进行热变性等单链化处理的条件下,直接用于杂交反应。此外,也不需要特殊的装置,就可以简单、迅速的目测判断有无目标核酸。

[0090] 上述通过形成夹心杂交复合物而检测核酸的方法,优选在核酸检测装置上实施。此外,优选用色谱检测DNA扩增核酸。

[0091] 图6的核酸色谱装置是在作为基体材料的构件36上,使用粘合剂等贴合样品垫32(用于添加DNA扩增产物的担载体)、联结垫33(配置有结合了着色担载体的寡核苷酸的担载体)、保持有捕获用寡核苷酸的担载体34(色谱用介质)和吸收垫35。在担载体34上,设计了涂抹了捕获用寡核苷酸的测试线37和控制线38。当将结合着色担载体的寡核苷酸混合在展开溶液中时,也可以没有联结垫33。

[0092] 色谱优选通过包括下述步骤(a)-(c)的方法,检测双链DNA扩增片段:(a)在核酸检测装置上的不同于固定有第1寡核苷酸探针的区域的区域中,配置DNA扩增片段的步骤;(b)使用溶剂,使DNA扩增片段在朝向固定有第1寡核苷酸探针区域的方向上在装置上扩散的步骤;以及(c)在固定有第1寡核苷酸探针的区域中,使第1寡核苷酸探针和DNA扩增片段杂交的步骤。

[0093] 例如,在图6的核酸色谱装置的情况下,在步骤(a)中,DNA扩增片段配置在样品垫32上。在步骤(b)中,按箭头方向使DNA扩增片段扩散。在步骤(c)中,在测试线37中,通过与

固定的第1寡核苷酸探针杂交,捕获DNA扩增片段。

[0094] 在步骤(c)之前,优选还包括使DNA扩增片段与结合有标志物的第2寡核苷酸探针杂交的步骤。例如,在图6的核酸色谱装置的情况下,DNA扩增片段和第2寡核苷酸探针在联结垫33中杂交。

[0095] 此外,色谱优选是(d)在核酸检测装置上的不同于固定有第1寡核苷酸探针的区域的各个区域中,分别配置DNA扩增片段、以及结合有标志物的第2寡核苷酸探针;(e)使用溶剂,使DNA扩增片段在朝向配置有第2寡核苷酸探针的区域的方向上扩散,该第2寡核苷酸结合有标志物;(f)在配置了结合有标志物的第2寡核苷酸探针的区域中,使DNA扩增片段与结合有标志物的第2寡核苷酸探针杂交;(g)使在步骤(f)中杂交而得的复合物在朝向配置有第1寡核苷酸探针的方向上在展开介质上扩散;以及(h)在固定有上述第1寡核苷酸探针的区域中,使上述第1寡核苷酸探针与上述复合物杂交。

[0096] 例如,在图6的核酸色谱装置的情况下,在步骤(d)中,DNA扩增片段配置在样品垫32上,第2寡核苷酸探针配置在联结垫33上。在步骤(e)中,DNA扩增片段从样品垫32按箭头方向扩散。在步骤(f)中,DNA扩增片段和第2寡核苷酸探针在联结垫33中杂交。在步骤(g)中,DNA扩增片段和结合了标志物的第2寡核苷酸探针的复合物按箭头方向扩散。在步骤(h)中,第1寡核苷酸探针和复合物在测试线37中杂交。

[0097] 将具有与上述DNA扩增片段的一个标签区域互补的序列的寡核苷酸探针,作为用于捕获的第1寡核苷酸探针,固定在膜上的测试线中。用于捕获的第1寡核苷酸探针可以直接与膜结合,也可以通过官能团结合,也可以通过任何物质与膜结合。作为中介的物质可列举肽、蛋白质、核酸等,没有限制。当作为中介的物质是抗生物素蛋白时,用于捕获的寡核苷酸需要进行生物素修饰。

[0098] 在膜上的控制线中,固定有用于捕获着色担载体的寡核苷酸探针。用于控制线的寡核苷酸探针具有与结合有标志物的第2寡核苷酸探针互补的序列,使得当溶液展开时,必然捕获标志物。用于控制线的寡核苷酸探针也如前所述,同样可以直接与膜结合,也可以通过官能团结合,也可以通过任何物质与膜结合。作为中介的物质可列举肽、蛋白质、核酸等,没有限制。当作为中介的物质是抗生物素蛋白时,用于捕获的寡核苷酸需要进行生物素修饰。

[0099] 通过在测试线中显色,可以目测判断样品中存在目标核酸。另一方面,通过控制线中的显色,可以目测判断正常进行了展开与着色反应。在本文中,目测是指用肉眼观察判断颜色。

[0100] 色谱用介质可列举包括定性滤纸、定量滤纸、分液滤纸、玻璃纤维滤纸、二氧化硅纤维滤纸、复合纤维滤纸在内的滤纸等。此外,也可以使用硝化纤维素等包含纤维素的滤纸、聚醚砜膜等合成树脂的膜、硅胶、琼脂糖、葡聚糖、明胶等多孔凝胶。此外,也可以恰当的使用尼龙膜。在实际使用时,对该色谱介质的形态和大小没有特殊的限制,只要适合操作和观察反应结果即可。

[0101] 为了提高亲水性或与化合物的结合性,可以对这些担载体实施各种修饰。为了使操作更简单,优选在表面形成反应部位的色谱介质的内部,设计包括塑料等在内的支持物。

[0102] 装置内的展开方向可以是如图6所示的水平方向,也可以是垂直方向,没有特殊的限制。对于展开溶剂,由于可以在核酸扩增反应中使用溶剂,因此可以直接将核酸扩增反应

后的反应液滴至图6中的样品垫32上。或者,也可以在扩增反应后的反应液中另外添加展开溶液并加至样品垫中。展开溶剂只要是液体即可,没有特殊的限制,可以使用磷酸缓冲液、Tris缓冲液等优秀的缓冲液。此外,也可以在溶剂中溶解盐、表面活性剂、蛋白质或核酸。

[0103] 在图7中,作为本发明的实施方案的一个例子,以在层析担载体上形成的夹心杂交复合物为例进行说明。在不进行热处理等单链化处理的条件下,将核酸扩增步骤中获得的DNA扩增片段16用于之后的复合物形成步骤中。通过寡核苷酸探针与DNA扩增片段16之间的杂交,形成第1复合物41,所述寡核苷酸探针包括能够与上述DNA片段一个末端的标签区域12特异性结合的核酸序列39和着色担载体40。复合物41可以在上样至展开介质之前在PCR反应容器中形成,也可以将DNA扩增片段上样至担载体上,并使其利用毛细管现象,在移动中,使其通过涂布了与上述标记分子结合的寡核苷酸并干燥了的担载体而形成。

[0104] 复合物41与用于捕获的寡核苷酸探针43在展开介质上接触,所述寡核苷酸探针43预先结合在了包括多孔膜等的色谱用介质42上的能够识别的位置上。上述用于捕获的寡核苷酸43具有与上述DNA扩增片段的另一个末端的标签序列15互补的序列,通过复合物41与用于捕获的寡核苷酸杂交,形成夹心杂交复合物。

[0105] 形成夹心杂交复合物的顺序没有特殊的限制。优选在形成DNA扩增片段与结合有标志物的第2寡核苷酸探针的复合物41之后,形成与用于捕获的第1寡核苷酸探针的复合物,但也可以在展开介质上通过用于捕获DNA扩增片段的第1寡核苷酸探针来浓缩DNA扩增片段之后,展开结合了标志物的第2寡核苷酸,形成夹心杂交复合物。

[0106] 其他的核酸检测装置的实施方式可列举图8所示的微阵列(DNA芯片)。在微阵列44上的固定有用于捕获的寡核苷酸的孔内,可以通过夹心杂交形成3者的复合物。

[0107] 此外,可列举图9所示的珠状方式。在保持有用于捕获的寡核苷酸的珠状载体45上,可以通过夹心杂交成3者的复合物。

[0108] 本发明的核酸检测方法和核酸检测装置可用于包括核酸扩增步骤的所有技术。换言之,可用于包括检测通过核酸扩增法得到的DNA扩增片段(例如,PCR产物)的所有技术领域。具体而言,可用于例如分子生物学的研究领域、病原体检测、过敏原等食品中的掺入物检测、食品质量管理(仿冒食品、基因重组食品等的检查)、家畜管理、碱基多态性(下文也称为“SNP”)检测、癌症等疾病检查等。因此,本发明还包括了病原体感染症的检测方法、食品中的混合物(例如,过敏原)的检测方法、食品质量管理、家畜的管理方法和碱基多态性的检测方法等,上述方法包括本发明所涉及的核酸检测方法作为一个步骤。

[0109] 在本文中,作为本发明应用的一个实施方案,详细的说明本发明所涉及的病原体检测方法和过敏原的检测方法。

[0110] 本发明所涉及的病原体检测方法使用了本发明所涉及的核酸检测方法,只要包括检测病原体特有基因的步骤即可。上述病原体没有特殊的限制,具体而言,可列举例如病原性细菌、病原性病毒、食物中毒细菌、医院内感染病原菌和病毒等。更具体而言,可列举例如丙型肝炎病毒(HCV)、巨细胞病毒(CMV)、EB病毒(EBV)、疱疹病毒、人免疫缺陷病毒(HIV)等病毒、0157等大肠杆菌、结核菌、伤寒杆菌、沙门氏菌或肠炎弧菌等细菌、或支原体等微生物。

[0111] 对本发明所涉及的病原体检测方法更具体的说明是:例如,使用上述核酸检测方法,判断由作为检查有无病原体的对象的样品制备的DNA样品中,是否包含上述病原体特有

的基因。此外,在不制备DNA样品的条件下,可以将作为检查有无病原体的对象的样品直接作为核酸扩增法的模板使用。例如,在检测作为病原体的大肠杆菌等细菌的情况下,可以使用细菌菌落的悬浮液作为模板。其结果是,当检测到病原体特有的基因时,判断所述样品中包含病原体。因此,可以不需要特殊的装置,简单且高精度地判断样品中是否包含病原体。即,本发明所涉及的病原体检测方法可用于诊断微生物感染症。

[0112] 本发明所涉及的过敏原的检测方法只要包括使用本发明所涉及的核酸检测方法,检测编码过敏原的基因的步骤即可。上述过敏原没有特殊的限制,具体而言,可列举例如包含在食品中的过敏原。更具体而言,可列举蛋清过敏原、乳过敏原、小麦过敏原、荞麦过敏原和花生过敏原等。对本发明所涉及的过敏原的检测方法更具体的说明是:例如,使用上述核酸检测方法,判断从食品制备的DNA样品中,是否存在编码蛋、乳、小麦、荞麦、花生等过敏原的基因。其结果是在检测到这类基因的情况下,判断所述食品中包括含有过敏原的原材料。

[0113] 因此,不需要特殊的装置,就可以简单且高精度地判断食品等样品中是否包含具有过敏原的原材料。此外,过敏原的来源不限于上文示例的对象,例如以谷类为例,包括稻、玉米、小米、黍、稗子、荞麦和豆类的全部。此外,DNA是热稳定的,也可以在加工食品中进行微量检测。因此,通过本发明所涉及的过敏原的检测方法获得的数据,除了用于食品标示、食品的过敏原信息外,还可用于检测极微量残存的加工助剂或残留物等食品添加剂,或者生产线之间有无相互污染等生产者预料以外的物质的掺入。

[0114] 此外,本发明可用于包括人在内的哺乳动物的亲子鉴定、家畜的血统鉴定、农产品品种鉴定、SNP检测、由于基因突变造成的疾病(癌等)检测等。具体而言,例如,以家畜为例,可用于血统登记、个体识别、亲子鉴定、去除病原基因携带个体等目的。但本发明并不限于上文说明的各种构成,可以在权利要求保护的范围所表示的范围内进行各种改变,对于恰当的组合不同实施方案中启示的技术手段所获得的实施方案,也包括在本发明的技术范围内。

#### [0115] 实施例

[0116] 下面通过实施例更详细地说明本发明。但本发明的技术范围不限于这些实施例。

#### [0117] <实施例1>

##### [0118] (1) 连接有L-DNA标签的引物的合成

[0119] 在本实施例中,使用pUC19(Takara Bio公司生产)作为模板,设计了用于通过PCR扩增扩增约330个碱基对的正向引物(F)和反向引物(R)。进一步地,设计了分别在上述引物的5'末端导入了由非天然型(L型)DNA链形成的标签序列T1和T2的连有L-DNA标签的引物,即T1-F和T2-R。连接有L-DNA标签的引物的合成使用0.2μM尺寸的柱子,基于一般的亚磷酸胺法,使用DNA自动合成仪(H-8-SE:Gene World)合成。

[0120] 示出在本研究中制备的引物组。

[0121] 引物F:5' -<sup>D</sup>d (GGAAACAGCTATGACCATGA) -3' (序列号1)

[0122] 引物R:5' -<sup>D</sup>d (CTATGCGGCATCAGAGCAG) -3' (序列号2)

[0123] 标签序列T1:5' -<sup>L</sup>d (GACAACGGAGACAGAGCCAA) -3' (序列号3)

[0124] 标签序列T2:5' -<sup>L</sup>d (ATGCTACCGTATGCCCAGTG) -3' (序列号4)

[0125] 引物T1-F:

[0126] 5' -<sup>L</sup>d (GACAACGGAGACAGAGCCAA) -<sup>D</sup>d (GGAAACAGCTATGACCATGA) -3' (序列号5)

[0127] 引物T2-R:

[0128] 5' -<sup>L</sup>d (ATGCTACCGTATGCCCAGTG) -<sup>D</sup>d (CTATGCGGCATCAGAGCAG) -3' (序列号6)。

[0129] (2) 使用连接有L-DNA标签的引物组的PCR反应

[0130] 使用在上述步骤(1)中实施制备的引物组进行PCR反应。将各15pmol引物F和引物R、10ng pUC19添加到0.2Ml PCR管中,根据ExTaq PCR装置(Takara Bio公司生产)的说明书,配制100μl的PCR反应液。然后,将PCR管放入热循环仪(GeneAmp PCR System、Applied Biosystems公司生产)中,在95℃热处理5分钟后,进行35个95℃下30秒、55℃下30秒、72℃下30秒的循环,扩增约330bp的目标。此外,进行不添加pUC19的相同反应,作为阴性对照。

[0131] (3) 制备与胶乳结合的L型寡核苷酸探针

[0132] 在添加了必需量的水溶性碳化二亚胺的MES缓冲液中,混合含有羧基的聚苯乙烯胶乳(固体成分10% (w/w)、Bangs公司生产)和含有氨基的L型寡核苷酸探针(序列号7、序列号3的互补链),在结合后,用单乙醇胺进行嵌段。在离心分离上述反应液后,去除上清液,用水洗涤获得的沉淀。洗净后,重新悬浮在含有表面活性剂的HEPES缓冲液中,将其均匀的添加在用玻璃纤维生产的垫片上,然后通过真空干燥器干燥,作为联结垫。

[0133] 核苷酸探针1:5' -<sup>L</sup>d (TTGGCTCTGTCTCCGTTGTC) -NH<sub>2</sub>-3' (序列号7)。

[0134] (4) 将L型寡核苷酸探针固定在固相上

[0135] 用水溶性碳化二亚胺处理羧基修饰的尼龙膜(日本Pall公司生产、6mm×60mm),用去离子水洗涤。在距活化的膜的一个末端30mm处,用分配器将具有与序列号4互补的序列(序列号8)的含有氨基的L型寡核苷酸探针涂抹在线上,风干15分钟。然后,用Tris缓冲液处理膜,在嵌段后,水洗膜并干燥。

[0136] 核苷酸探针2:5' -<sup>L</sup>d (CACTGGGCATACGGTAGCAT) -NH<sub>2</sub>-3' (序列号8)。

[0137] (5) 制备核酸色谱型测试条(test strip)

[0138] 如图6所示,将如上所述制备的由尼龙膜构成的色谱介质、联结垫、作为样品添加部的通用样品垫、用于吸收所展开的样品或标志物的吸收垫,贴合在由底板(backing sheet)制成的基体材料上,制备了用于检测使用了连接有L型DNA标签的引物组的PCR扩增产物的测试条。

[0139] (6) 用测试条检测PCR产物

[0140] 在不变性通过步骤(2)制备的PCR产物的条件下,将所述产物直接上样于通过步骤(5)制备的测试条上的样品添加部位,通过色谱进行检测。当步骤(2)中添加pUC19作为检查材料时,在测试线上检测到目标核酸特异性的着色线。另一方面,当添加水作为阴性对照时,没有发现检测到线。此外,用色谱检测所需要的时间是10-15分钟的短时间。

[0141] <实施例2>

[0142] (1) 合成连接有发夹标签的引物

[0143] 与实施例1的步骤(1)相同,使用pUC19(Takara Bio公司生产)作为模板,设计用于通过PCR扩增扩增约330个碱基对的正向引物(F)和反向引物(R)。还分别在上述引物的5'末端导入具有发夹结构的聚合酶反应抑制区域(H)和标签序列T3和T4,合成连接有标签的引物T3-H-F和T4-H-R。

[0144] 示出在本研究中制备的引物组。

[0145] 聚合酶反应抑制序列H:

- [0146] 5' -<sup>D</sup>d (AGGCGAGGTCGCGAGCGCACATGTGCGCTCGCGACCTCGCCT) -3' (序列号9)
- [0147] 标签序列T3: 5' -<sup>D</sup>d (TATGATATGCTTCTCCACGCATAAT) -3' (序列号10)
- [0148] 标签序列T4: 5' -<sup>D</sup>d (TGCTCTGTACACTTGCTCAAT) -3' (序列号11)
- [0149] 引物T3-H-F:
- [0150] 5' -<sup>D</sup>d (TATGATATGCTTCTCCACGCATAATAGGCGAGGTCGCGAGCGCACATG
- [0151] TGCGCTCGCGACCTCGCCTGGAAACAGCTATGACCATGA) -3' (序列号12)
- [0152] 引物T4-H-R:
- [0153] 5' -<sup>D</sup>d (TGCTCTGTACACTTGCTCAATAGGCGAGGTCGCGAGCGCACATGTGC GCTCGCGACCTCGCCTCTATGCGGCATCAGAGCAG) -3' (序列号13)。

[0154] (2) 使用了连接有发夹标签的引物组的PCR反应

[0155] 使用了在上述步骤(1)中实施制备的引物组进行PCR反应。将各15pmol引物F和引物R、10ng pUC19添加到0.2ml PCR管中,根据ExTaq PCR装置(Takara Bio公司生产)的说明书,配制100μl PCR反应液。然后,将PCR管放入热循环仪(GeneAmp PCR System、Applied Biosystems公司生产)中,在95℃热处理5分钟后,进行35个95℃下30秒、55℃下30秒、72℃下30秒的循环,扩增约330bp的目标。此外,进行不添加pUC19的相同反应,作为阴性对照。

[0156] (3) 制备与胶乳结合的寡核苷酸探针

[0157] 在添加了必需量的水溶性碳化二亚胺的MES缓冲液中,混合含有羧基的聚苯乙烯胶乳(固体成分10% (w/w)、Bangs公司生产)和含有氨基的寡核苷酸探针(序列号14、序列号10的互补链),在结合后,用单乙醇胺进行嵌段。在离心分离上述反应液后,去除上清液,用水洗涤获得的沉淀。洗净后,重新悬浮在含有表面活性剂的HEPES缓冲液中,将其均匀的添加在用玻璃纤维生产的垫片上,然后通过真空干燥器干燥,作为联结垫。

[0158] 寡核苷酸探针3:

[0159] 5' -<sup>D</sup>d (ATTATGCGTGGAGAAGCATATCATA) -NH<sub>2</sub>-3' (序列号14)。

[0160] (4) 将寡核苷酸探针固定在固相上

[0161] 用水溶性碳化二亚胺处理羧基修饰的尼龙膜(日本Pall公司生产、6mm×60mm),用去离子水洗涤。在距活化的膜的一个末端30mm处,用分配器将具有与序列号11互补的序列(序列号15)的含有氨基的L型寡核苷酸探针涂抹在线上,风干15分钟。然后,用Tris缓冲液处理膜,在嵌段后,水洗膜并干燥。

[0162] 寡核苷酸探针4: 5' -<sup>D</sup>d (ATTGAGCAAGTGACAGAGCA) -NH<sub>2</sub>-3' (序列号15)。

[0163] (5) 制备核酸色谱型测试条

[0164] 如图6所示,将如上所述制备的由尼龙膜构成的色谱介质、联结垫、作为样品添加部的通用样品垫、用于吸收所展开的样品或标志物的吸收垫,贴合在由底板制成的基体材料上,制备了用于检测使用了连接有发夹标签的引物组的PCR扩增产物的测试条。

[0165] (6) 用测试条检测PCR产物

[0166] 在不变性通过步骤(2)制备的PCR产物的条件下,将所述产物直接上样至由步骤(5)制备的测试条上的样品添加部位,通过色谱进行检测。当步骤(2)中添加pUC19作为检查材料时,在测试线上检测到目标核酸特异性的着色线。另一方面,当添加水作为阴性对照时,没有发现检测到线。此外,用色谱检测所需要的时间是10-15分钟的短时间。

[0167] <实施例3>

## [0168] (1) 合成插入人工核酸(偶氮苯)的引物

[0169] 与实施例1的步骤(1)相同,使用pUC19(Takara Bio公司生产)作为模板,设计用于通过PCR扩增扩增约330个碱基对的正向引物(F)和反向引物(R)。还分别在上述引物的5'末端导入含有人工核酸即偶氮苯的聚合酶反应抑制区域(X)和标签序列T5和T6,合成了连接有标签的引物T5-X-F和T6-X-R。这2种插入偶氮苯的引物是委托筑波OLIGO SERVICE株式会社合成并购入的。示出本研究中制备的引物组。

[0170] 标签序列T5:5' -<sup>D</sup>d (TGGCAACATTTTTCCTGGGTTTATAG) -3' (序列号16)

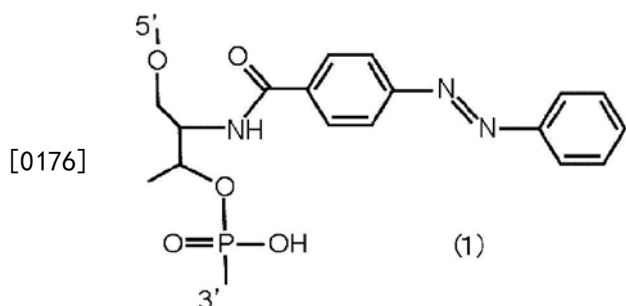
[0171] 标签序列T6:5' -<sup>D</sup>d (GGTTAGCTTCCAACCACGTGTAGATCA) -3' (序列号17)

[0172] 引物T5-X-F:5' -<sup>D</sup>d (TGGCAACATTTTTCCTGGGTTTATAG XGGAAACAGCTATGACCATGA) -3' (序列号18)

[0173] 引物T6-X-R:5' -<sup>D</sup>d (GGTTAGCTTCCAACCACGTGTAGATCA XTCTATGCGGCATCAGAGCAG) -3' (序列号19)

[0174] 此外,插入到引物中的偶氮苯如下式(1)所示。

[0175] [化学式1]



## [0177] (2) 使用了插入偶氮苯的引物组的PCR反应

[0178] 使用了在上述步骤(1)中实施制备的引物组进行PCR反应。将各15pmol引物T5-X-F和引物T6-X-R、10ng pUC19添加到0.2ml PCR管中,根据ExTaqPCR装置(Takara Bio公司生产)的说明书,配制100μl PCR反应液。然后,将PCR管放入热循环仪(GeneAmp PCR System、Applied Biosystems公司生产)中,在95℃热处理5分钟后,进行35个95℃下30秒、55℃下30秒、72℃下30秒的循环,扩增约330bp的目标。此外,进行不添加pUC19的相同反应,作为阴性对照。

## [0179] (3) 制备与胶乳结合的寡核苷酸探针

[0180] 在添加了必需量的水溶性碳化二亚胺的MES缓冲液中,混合含有羧基的聚苯乙烯胶乳(固体成分10% (w/w)、Bangs公司生产)和含有氨基的寡核苷酸探针(序列号20、序列号16的互补链),在结合后,用单乙醇胺进行嵌段。在离心分离上述反应液后,去除上清液,用水洗涤获得的沉淀。洗净后,重新悬浮在含有表面活性剂的HEPES缓冲液中,将其均匀的添加在用玻璃纤维生产的垫片上,然后通过真空干燥器干燥,作为联结垫。

[0181] 寡核苷酸探针5:

[0182] 5' -<sup>D</sup>d (CTATAAACCCAGTGAAAAATGTTGCCA) -NH<sub>2</sub>-3' (序列号20)。

## [0183] (4) 将寡核苷酸探针固定在固相上

[0184] 用水溶性碳化二亚胺处理羧基修饰的尼龙膜(日本Pall公司生产、6mm×60mm),用去离子水洗涤。在距活化的膜的一个末端30mm处,用分配器将具有与序列号17互补的序列



(序列号21)的含有氨基的D型寡核苷酸探针涂抹在线上,风干15分钟。然后,用Tris缓冲液处理膜,在嵌段后,水洗膜并干燥。

[0185] 寡核苷酸探针6:

[0186] 5' -<sup>D</sup>d (GATCATACACGTGGTTGGAAGCTAACC) -NH<sub>2</sub>-3' (序列号21)。

[0187] (5) 制备核酸色谱型测试条

[0188] 如图6所示,将如上所述制备的由尼龙膜构成的色谱介质、联结垫、作为样品添加部的通用样品垫、用于吸收所展开的样品或标志物的吸收垫,贴合在由底板制成的基体材料上,制备了用于检测使用了插入偶氮苯的引物组的PCR扩增产物的测试条。

[0189] (6) 用测试条检测PCR产物

[0190] 在不变性通过步骤(2)制备的PCR产物的条件下,将所述产物直接上样至由步骤(5)制备的测试条上的样品添加部位,通过色谱进行检测。当步骤(2)中添加pUC19作为检查材料时,在测试线上检测到目标核酸特异性的着色线。另一方面,当添加水作为阴性对照时,没有发现检测到线。此外,用色谱检测所需要的时间是10-15分钟的短时间。

[0191] <实施例4>

[0192] (1) 制备结合有金胶体的寡核苷酸探针

[0193] 混合Gold Colloid (40nm、 $9.0 \times 10^{10}$  (颗粒数/ml)、British BioCell International公司生产)和含有巯基的寡核苷酸探针(序列号22、序列号16的互补链),在50℃下温育16小时。在6000rpm下离心分离15分钟,去除上清液,加入0.05M氯化钠、5mM磷酸缓冲液pH7,混和后,再在50℃下温育40小时。

[0194] 温育后,进行离心(6000rpm、15分钟),去除上清液,加入5mM磷酸缓冲液(pH7)。再次进行该缓冲液置换。

[0195] 将配制的金胶体溶液均匀的添加到用玻璃纤维生产的垫片上之后,在真空干燥器中干燥,作为联结垫。

[0196] 寡核苷酸探针7:

[0197] 5' -<sup>D</sup>d (CTATAAACCCAGTGAAAAATGTTGCCA) -SH-3' (序列号22)。

[0198] (2) 将寡核苷酸探针固定在固相上

[0199] 将具有与序列号17互补的序列(序列号23)的3'末端生物素修饰的寡核苷酸探针,与链霉亲和素混合。用分配器将该混合液涂抹在硝化纤维素膜(商品名:Hi-Flow 180、Millipore公司生产)上,在40℃风干30分钟。

[0200] 寡核苷酸探针8:

[0201] 5' -<sup>D</sup>d (GATCATACACGTGGTTGGAAGCTAACC) -生物素-3' (序列号23)。

[0202] (3) 制备核酸色谱型测试条

[0203] 如图6所示,将如上所述制备的由硝化纤维素膜构成的色谱介质、联结垫、作为样品添加部的通用样品垫、用于吸收所展开的样品或标志物的吸收垫,贴合在由底板制成的基体材料上,制备了用于检测使用了插入偶氮苯的引物组的PCR扩增产物的测试条。

[0204] (4) 用测试条检测PCR产物

[0205] 在不变性通过实施例3的步骤(2)制备的PCR产物的条件下,将所述产物直接上样至由步骤(3)制备的测试条上的样品添加部位,通过色谱进行检测。当实施例3的步骤(2)中添加pUC19作为检查材料时,在测试线上检测到目标核酸特异性的着色线。另一方面,当添

加水作为阴性对照时,没有发现检测到线。此外,用色谱检测所需要的时间是10-15分钟的短时间。

[0206] <实施例5>

[0207] (1) 将寡核苷酸探针固定在固相上

[0208] 用分配器将具有与序列号17互补的序列(序列号24)的寡核苷酸探针涂抹在UltraBind亲和膜(日本Pall公司生产)上,在80℃风干1小时。

[0209] 寡核苷酸探针9:

[0210] 5' -<sup>32</sup>P (GATCATACACGTGGTTGGAAGCTAACC) -3' (序列号24)。

[0211] (2) 制备核酸色谱型测试条

[0212] 如图6所示,将如上所述制备的由UltraBind亲和膜构成的色谱介质、联结垫、作为样品添加部的通用样品垫、用于吸收所展开的样品或标志物的吸收垫,贴合在由底板制成的基体材料上,制备了用于检测使用了插入偶氮苯的引物组的PCR扩增产物的测试条。

[0213] (3) 用测试条检测PCR产物

[0214] 在不变性通过实施例3的步骤(2)制备的PCR产物的条件下,将所述产物直接上样至由步骤(2)制备的测试条上的样品添加部位,通过色谱进行检测。当实施例3的步骤(2)中添加pUC19作为检查材料时,在测试线上检测到目标核酸特异性的着色线。另一方面,当加水作为阴性对照时,没有发现检测到线。此外,用色谱检测所需要的时间是10-15分钟的短时间。

[0215] <实施例6>

[0216] (1) 合成插入人工核酸(偶氮苯)的引物

[0217] 在本实施例中,目标核酸的模板使用pUC19(Takara Bio公司生产)、EcoRI甲基化酶基因和BamHI甲基化酶基因这3种作为模板,分别设计用于通过PCR扩增扩增约330个碱基对、约200个碱基对和约100个碱基对的正向引物(F1)和反向引物(R1)、正向引物(F2)和反向引物(R2),以及正向引物(F3)和反向引物(R3)这3组引物。还分别在上述引物的5'末端导入含有人工核酸即偶氮苯的聚合酶反应抑制区域(X)和标签序列T10和T11、标签序列T12和T13,以及标签序列T14和T15,合成了连接有标签的引物T10-X-F1和T11-X-R1、T12-X-F2和T13-X-R2、T14-X-F3和T15-X-R3。这6种插入偶氮苯的引物是委托筑波OLIGO SERVICE株式会社合成并购入的。下文示出本研究中制备的3组引物组。

[0218] 标签序列T10:

[0219] 5' -<sup>32</sup>P (TGGCAACATTTTTCACGTGGGTTTATAG) -3' (序列号25)

[0220] 标签序列T11:

[0221] 5' -<sup>32</sup>P (GGTTAGCTTCCAACCACGTGTAGATCA) -3' (序列号26)

[0222] 引物T10-X-F1:

[0223] 5' -<sup>32</sup>P (TGGCAACATTTTTCACGTGGGTTTATAG XGGAAACAGCTATGACCATGA) -3' (序列号27)

[0224] 引物T11-X-R1:

[0225] 5' -<sup>32</sup>P (GGTTAGCTTCCAACCACGTGTAGATCA XTCTATGCGGCATCAGAGCAG) -3' (序列号28)

[0226] 标签序列T12:

[0227] 5' -<sup>32</sup>P (CGCATTGAGCAAGTGACAGAGCAT) -3' (序列号29)

[0228] 标签序列T13:

[0229] 5' -<sup>D</sup>d (ATTATGCGTGGAGAAGCATATCATA) -3' (序列号30)

[0230] 引物T12-X-F2:

[0231] 5' -<sup>D</sup>d (CGCATTGAGCAAGTGTACAGAGCAT XAGCATTATGAATTATATGGT) -3' (序列号31)

[0232] 引物T13-X-R2:

[0233] 5' -<sup>D</sup>d (ATTATGCGTGGAGAAGCATATCATA XTTGTTTACATTTATAGCATC) -3' (序列号32)

[0234] 标签序列T14:

[0235] 5' -<sup>D</sup>d (AATTGCGCATGTCCATGTGTAA) -3' (序列号33)

[0236] 标签序列T15:

[0237] 5' -<sup>D</sup>d (TACTTTAGAGGAAACTGCTGAG) -3' (序列号34)

[0238] 引物T14-X-F3:

[0239] 5' -<sup>D</sup>d (AATTGCGCATGTCCATGTGTAA XTGGTTTTAAACTCTGATAC) -3' (序列号35)

[0240] 引物T15-X-R3:

[0241] 5' -<sup>D</sup>d (TACTTTAGAGGAAACTGCTGAG XAGTATGATGAGGGTGTAACA) -3' (序列号36)

[0242] (2) 使用了3组插入偶氮苯的引物组的PCR反应

[0243] 使用了在上述步骤(1)中实施制备的3组引物组进行PCR反应。将各15pmol引物T10-X-F1、引物T11-X-R1、引物T12-X-F2、引物T13-X-R2、引物T14-X-F3和引物T15-X-R3、各模板10ng添加到0.2ml PCR管中,根据ExTaq PCR装置(Takara Bio公司生产)的说明书,配制100μl PCR反应液。制备以下5种反应液。

[0244] (i) 添加pUC19(Takara Bio公司生产)作为模板

[0245] (ii) 添加EcoRI甲基化酶基因作为模板

[0246] (iii) 添加BamHI甲基化酶基因作为模板

[0247] (iv) 添加所有3种pUC19(Takara Bio公司生产)、EcoRI甲基化酶基因和BamHI甲基化酶基因作为模板,和

[0248] (v) 无模板。

[0249] 在配制了这些反应液后,将PCR管放入热循环仪(GeneAmp PCRSystem、Applied Biosystems公司生产)中,在95℃热处理5分钟后,进行30个95℃下30秒、55℃下30秒、72℃下30秒的循环,如下获得具有相应的目标序列的DNA片段。扩增了(i) 约330bp; (ii) 约200bp; (iii) 约100bp; 和(iv) 约330bp、约200bp、约100bp这3种; (v) 无扩增DNA片段(作为阴性对照)。

[0250] (3) 制备与胶乳结合的寡核苷酸探针

[0251] 在添加了必需量的水溶性碳化二亚胺的MES缓冲液中,分别混合含有羧基的聚苯乙烯胶乳(蓝色)(固体成分10% (w/w)、Bangs公司生产)和含有氨基的寡核苷酸探针16(序列号37、序列号25的互补链)、含有羧基的聚苯乙烯胶乳(桔色)(固体成分10% (w/w)、Bangs公司生产)和含有氨基的寡核苷酸探针17(序列号38、序列号29的互补链)、以及含有羧基的聚苯乙烯胶乳(绿色)(固体成分10% (w/w)、Bangs公司生产)和含有氨基的寡核苷酸探针18(序列号39、序列号33的互补链),在结合后,用单乙醇胺进行嵌段。在离心分离上述反应液后,去除上清液,用水洗涤获得的沉淀。洗净后,重新悬浮在含有表面活性剂的HEPES缓冲液中,制备结合了寡核苷酸探针16的胶乳(蓝色)、结合了寡核苷酸探针17的胶乳(桔色)、结合了寡核苷酸探针18的胶乳(绿色)。

[0252] 将这3种胶乳均匀的添加在用玻璃纤维生产的垫片上,然后通过真空干燥器干燥,作为联结垫。

[0253] 寡核苷酸探针16:

[0254] 5' -<sup>D</sup>d (CTATAAACCCAGTGAAAAATGTTGCCA) -NH<sub>2</sub>-3' (序列号37)。

[0255] 寡核苷酸探针17:

[0256] 5' -<sup>D</sup>d (TTGCTCTGTACACTTGCTCAATGCG) -NH<sub>2</sub>-3' (序列号38)。

[0257] 寡核苷酸探针18:

[0258] 5' -<sup>D</sup>d (TTACACATGGACATGCGCAATT) -NH<sub>2</sub>-3' (序列号39)。

[0259] (4) 将3种寡核苷酸探针固定在固相上

[0260] 将具有与序列号26互补的序列(序列号40)的3'末端生物素修饰的寡核苷酸探针、具有与序列号30互补的序列(序列号41)的3'末端生物素修饰的寡核苷酸探针,和具有与序列号34互补的序列(序列号42)的3'末端生物素修饰的寡核苷酸探针,分别与链霉亲和素混合。使用分配器,将这些混合液涂抹在硝化纤维素膜(商品名:Hi-Flow 135、Millipore公司生产)3个位点处,为自上游开始依次相互分离的位置上,在40℃风干30分钟。制备3条测试线。

[0261] 寡核苷酸探针19:

[0262] 5' -<sup>D</sup>d (GATCATACACGTGGTTGGAAGCTAACC) -生物素-3' (序列号40)。

[0263] 寡核苷酸探针20:

[0264] 5' -<sup>D</sup>d (TATGATATGCTTCTCCACGCATAAT) -生物素-3' (序列号41)。

[0265] 寡核苷酸探针21:

[0266] 5' -<sup>D</sup>d (CTCAGCAGTTTCTCTAAAGTA) -生物素-3' (序列号42)。

[0267] (5) 制备核酸色谱型测试条

[0268] 如图6所示,将如上所述制备的由硝化纤维素膜构成的色谱介质、步骤(3)制备的联结垫、作为样品添加部的通用样品垫、用于吸收所展开的样品或标志物的吸收垫,贴合在由底板制成的基体材料上,制备了用于检测使用了插入偶氮苯引物组的PCR扩增产物的测试条。

[0269] (6) 用测试条检测PCR产物

[0270] 在分别不变性通过步骤(2)中制备的(i)-(v) PCR产物的条件下,将所述产物分别直接上样至步骤(5)中制备的测试条上的样品添加部位,通过色谱进行检测。结果如下所示。

[0271] (i): 仅第1条测试线着色为蓝色。

[0272] (ii): 仅第2条测试线着色为桔色。

[0273] (iii): 仅第3条测试线着色为绿色。

[0274] (iv): 第1条测试线着色为蓝色,第2条测试线着色为桔色,第3条测试线着色为绿色。

[0275] (v): 没有发现任何一条测试线着色。

[0276] 根据上述结果,可以分别特异性地检测目标基因,确定可以同时检测3种。

[0277] 此外,用色谱检测所需要的时间是10-15分钟的短时间。

[0278] <实施例7>

[0279] (1) 合成联合引物

[0280] 在本实施例中,目标核酸的模板使用pUC19(Takara Bio公司生产)、EcoRI甲基化酶基因和BamHI甲基化酶基因这3种作为模板,分别设计用于通过PCR扩增扩增约330个碱基对、约200个碱基对和约100个碱基对的正向引物(Fj1)和反向引物(Rj1)、正向引物(Fj2)和反向引物(Rj2),以及正向引物(Fj3)和反向引物(Rj3)这3组引物。还分别在上述引物的5'末端导入共同序列KF1和KR1、共同序列KF2和KR2,以及共同序列KF3和KR3,合成了连接有共同序列的引物KF1-Fj1和KR1-Rj1、KF2-Fj2和KR2-Rj2、KF3-Fj3和KR3-Rj3。这6种连接共同序列的引物是委托筑波OLIGO SERVICE株式会社合成并购入的。下文显示本研究中制备的3组引物组。

[0281] 共同序列KF1:5' -<sup>D</sup>d (TGGGCTGACCTAGAGGTCTT) -3' (序列号43)

[0282] 共同序列KR1:5' -<sup>D</sup>d (ATGAAATGCAGGCCATTCGG) -3' (序列号44)

[0283] 引物KF1-Fj1:

[0284] 5' -<sup>D</sup>d (TGGGCTGACCTAGAGGTCTT

[0285] GGAAACAGCTATGACCATGA) -3' (序列号45)

[0286] 引物KR1-Rj1:

[0287] 5' -<sup>D</sup>d (ATGAAATGCAGGCCATTCGG

[0288] TCTATGCGGCATCAGAGCAG) -3' (序列号46)

[0289] 共同序列KF2:5' -<sup>D</sup>d (CCGGAACAGACACCAGGTTT) -3' (序列号47)

[0290] 共同序列KR2:5' -<sup>D</sup>d (GAAGCTGTACCGTCACATGA) -3' (序列号48)

[0291] 引物KF2-Fj2:

[0292] 5' -<sup>D</sup>d (CCGGAACAGACACCAGGTTT

[0293] AGCATTATGAATTATATGGT) -3' (序列号49)

[0294] 引物KR2-Rj2:

[0295] 5' -<sup>D</sup>d (GAAGCTGTACCGTCACATGA

[0296] TTGTTTACATTTATAGCATC) -3' (序列号50)

[0297] 共同序列KF3:5' -<sup>D</sup>d (ATACCGATGAGTGTGCTACC) -3' (序列号51)

[0298] 共同序列KR3:5' -<sup>D</sup>d (TGGCCTGTGTGACACTATGC) -3' (序列号52)

[0299] 引物KF3-Fj3:

[0300] 5' -<sup>D</sup>d (ATACCGATGAGTGTGCTACC

[0301] TGGTTTTAAACTCTGATAC) -3' (序列号53)

[0302] 引物KR3-Rj3:

[0303] 5' -<sup>D</sup>d (TGGCCTGTGTGACACTATGC

[0304] AGTATGATGAGGTGTAACA) -3' (序列号54)

[0305] (2) 合成插入人工核酸(偶氮苯)的引物

[0306] 在本实施例中,为了能够与步骤1中制备的联合引物组分别扩增的3种PCR扩增片段结合,分别设计与联合引物具有相同的共同序列的3组引物。分别在上述引物的5'末端导入含有人工核酸即偶氮苯的聚合酶反应抑制区域(X)和标签序列T22和T23、标签序列T24和T25、标签序列T26和T27,合成了连接有标签的引物T22-X-KF1和T23-X-KR1、T24-X-KF2和T25-X-KR2、T26-X-KF3和T27-X-KR3。这6种插入偶氮苯的引物是委托筑波OLIGO SERVICE株

式会社合成并购入的。下文示出研究中制备的3组引物组。

[0307] 标签序列T22:

[0308] 5' -<sup>D</sup>d (TGGCAACATTTTTCACCTGGGTTTATAG) -3' (序列号55)

[0309] 标签序列T23:

[0310] 5' -<sup>D</sup>d (GGTTAGCTTCCAACCACGTGTAGATCA) -3' (序列号56)

[0311] 引物T22-X-KF1:

[0312] 5' -<sup>D</sup>d (TGGCAACATTTTTCACCTGGGTTTATAG XTGGGCTGACCTAGAGGTCTT) -3' (序列号57)

[0313] 引物T23-X-KR1:

[0314] 5' -<sup>D</sup>d (GGTTAGCTTCCAACCACGTGTAGATCA XATGAAATGCAGGCCATTTCGG) -3' (序列号58)

[0315] 标签序列T24:

[0316] 5' -<sup>D</sup>d (CGCATTGAGCAAGTGTACAGAGCAT) -3' (序列号59)

[0317] 标签序列T25:

[0318] 5' -<sup>D</sup>d (ATTATGCGTGGAGAAGCATATCATA) -3' (序列号60)

[0319] 引物T24-X-KF2:

[0320] 5' -<sup>D</sup>d (CGCATTGAGCAAGTGTACAGAGCAT XCCGGAACAGACACCAGGTTT) -3' (序列号61)

[0321] 引物T25-X-KR2:

[0322] 5' -<sup>D</sup>d (ATTATGCGTGGAGAAGCATATCATA XGAAGCTGTACCGTCACATGA) -3' (序列号62)

[0323] 标签序列T26: 5' -<sup>D</sup>d (AATTGCGCATGTCCATGTGTAA) -3' (序列号63)

[0324] 标签序列T27: 5' -<sup>D</sup>d (TACTTTAGAGGAACTGCTGAG) -3' (序列号64)

[0325] 引物T26-X-KF3:

[0326] 5' -<sup>D</sup>d (AATTGCGCATGTCCATGTGTAA XATACCGATGAGTGTGCTACC) -3' (序列号65)

[0327] 引物T27-X-KR3:

[0328] 5' -<sup>D</sup>d (TACTTTAGAGGAACTGCTGAG XTGGCCTGTGTGACACTATGC) -3' (序列号66)

[0329] (3) 使用联合引物和插入偶氮苯的引物的PCR反应

[0330] 使用了在上述步骤(1)和(2)中实施制备的6组引物组进行PCR反应。将各8pmol引物KF1-Fj1、引物KR1-Rj1、引物KF2-Fj2、引物KR2-Rj2、引物KF3-Fj3、引物KR3-Rj3、引物T22-X-KF1、引物T23-X-KR1、引物T24-X-KF2、引物T25-X-KR2、引物T26-X-KF3、引物T27-X-KR3、各模板10ng添加到0.2ml PCR管中,根据ExTaq PCR装置(Takara Bio公司生产)的说明书,配制100μl PCR反应液。制备以下5种反应液。

[0331] (i) 添加pUC19(Takara Bio公司生产)作为模板

[0332] (ii) 添加EcoRI甲基化酶基因作为模板

[0333] (iii) 添加BamHI甲基化酶基因作为模板

[0334] (iv) 添加所有3种pUC19(Takara Bio公司生产)、EcoRI甲基化酶基因和BamHI甲基化酶基因作为模板,和

[0335] (v) 无模板。

[0336] 在配制了这些反应液后,将PCR管放入热循环仪(GeneAmp PCRSystem、Applied Biosystems公司生产)中,在95℃热处理5分钟后,进行30个95℃下30秒、55℃下30秒、72℃下30秒的循环,如下获得具有相应的目标序列的DNA片段。扩增(i)约360bp;(ii)约230bp;(iii)约130bp;和(iv)约360bp、约230bp、约130bp这3种;(v)无扩增DNA片段(作为阴性对

照)。

[0337] (4) 制备与胶乳结合的寡核苷酸探针

[0338] 在添加了必需量的水溶性碳化二亚胺的MES缓冲液中,分别混合含有羧基的聚苯乙烯胶乳(蓝色)(固体成分10%(w/w)、Bangs公司生产)和含有氨基的寡核苷酸探针28(序列号67、序列号55的互补链)、含有羧基的聚苯乙烯胶乳(桔色)(固体成分10%(w/w)、Bangs公司生产)和含有氨基的寡核苷酸探针29(序列号68、序列号59的互补链)、以及含有羧基的聚苯乙烯胶乳(绿色)(固体成分10%(w/w)、Bangs公司生产)和含有氨基的寡核苷酸探针30(序列号69、序列号63的互补链),在结合后,用单乙醇胺进行嵌段。在离心分离上述反应液后,去除上清液,用水洗涤获得的沉淀。洗净后,重新悬浮在含有表面活性剂的HEPES缓冲液中,制备结合了寡核苷酸探针28的胶乳(蓝色)、结合了寡核苷酸探针29的胶乳(桔色)、结合了寡核苷酸探针30的胶乳(绿色)。

[0339] 将这3种胶乳均匀的添加在用玻璃纤维生产的垫片上,然后通过真空干燥器干燥,作为联结垫。

[0340] 寡核苷酸探针28:

[0341] 5' -<sup>D</sup>d (CTATAAACCCAGTGAAAAATGTTGCCA) -NH<sub>2</sub>-3' (序列号67)。

[0342] 寡核苷酸探针29:

[0343] 5' -<sup>D</sup>d (TTGCTCTGTACACTTGCTCAATGCG) -NH<sub>2</sub>-3' (序列号68)

[0344] 寡核苷酸探针30:5' -<sup>D</sup>d (TTACACATGGACATGCGCAATT) -NH<sub>2</sub>-3' (序列号69)

[0345] (5) 将3种寡核苷酸探针固定在固相上

[0346] 将具有与序列号56互补的序列(序列号70)的3'末端生物素修饰的寡核苷酸探针、具有与序列号60互补的序列(序列号71)的3'末端生物素修饰的寡核苷酸探针,和具有与序列号64互补的序列(序列号72)的3'末端生物素修饰的寡核苷酸探针,分别与链霉亲和素混合。用分配器将这些混合液涂抹在硝化纤维素膜(商品名:Hi-Flow 135、Millipore公司生产)的三个位点处,自上游开始依次相互分离的位置上,在40℃风干30分钟。制备3条测试线。

[0347] 寡核苷酸探针31:5' -<sup>D</sup>d (GATCATACACGTGGTTGGAAGCTAACC) -生物素-3' (序列号70)。

[0348] 寡核苷酸探针32:5' -<sup>D</sup>d (TATGATATGCTTCTCCACGCATAAT) -生物素-3' (序列号71)。

[0349] 寡核苷酸探针33:5' -<sup>D</sup>d (CTCAGCAGTTTCCTCTAAAGTA) -生物素-3' (序列号72)。

[0350] (6) 制备核酸色谱型测试条

[0351] 如图6所示,将如上所述制备的由硝化纤维素膜构成的色谱介质、步骤(4)制备的联结垫、作为样品添加部的通用样品垫、用于吸收所展开的样品或标志物的吸收垫,贴合在由底板制成的基体材料上,制备了用于检测使用了插入偶氮苯的引物组的PCR扩增产物的测试条。

[0352] (7) 用测试条检测PCR产物

[0353] 在分别不变性通过步骤(3)制备的(i)-(v)PCR产物的条件下,将所述产物分别直接上样至步骤(6)中制备的测试条上的样品添加部位,通过色谱进行检测。结果如下所示。

[0354] (i):仅第1条测试线着色为蓝色。

[0355] (ii):仅第2条测试线着色为桔色。

[0356] (iii):仅第3条测试线着色为绿色。

[0357] (iv):第1条测试线着色为蓝色,第2条测试线着色为桔色,第3条测试线着色为绿色。

[0358] (v):没有发现任何一条测试线着色。

[0359] 根据上述结果,可以分别特异性地检测目标基因,确定可以同时检测3种。此外,用色谱检测所需要的时间是10-15分钟的短时间。

[0360] <实施例8>

[0361] (1) 合成联合引物

[0362] 在本实施例中,目标核酸的模板使用pUC19(Takara Bio公司生产)作为模板,设计用于通过PCR扩增扩增约330个碱基对的正向引物(F)和反向引物(R)。分别在上述引物的5'末端导入共同序列KF和KR,合成了连接有共同序列的引物KF-F和KR-R。这2种连接共同序列的引物是委托筑波OLIGOSERVICE株式会社合成并购入的。下文示出本研究中制备的引物组。

[0363] 共同序列KF:5' -<sup>D</sup>d (TGGGCTGACCTAGAGGTCTT) -3' (序列号73)

[0364] 共同序列KR:5' -<sup>D</sup>d (ATGAAATGCAGGCCATTCGG) -3' (序列号74)

[0365] 引物KF-F:

[0366] 5' -<sup>D</sup>d (TGGGCTGACCTAGAGGTCTT

[0367] GGAAACAGCTATGACCATGA) -3' (序列号75)

[0368] 引物KR-R:

[0369] 5' -<sup>D</sup>d (ATGAAATGCAGGCCATTCGG

[0370] TCTATGCGGCATCAGAGCAG) -3' (序列号76)

[0371] (2) 合成生物素修饰的引物和FITC修饰的引物

[0372] 在本实施例中,为了能够与步骤(1)中制备的联合引物组扩增的PCR扩增片段结合,分别设计与联合引物具有相同的共同序列的引物。合成了一条引物的5'末端进行了生物素修饰的引物,合成了另一条引物的5'末端进行了FITC修饰的引物。这2种修饰引物是委托筑波OLIGO SERVICE株式会社合成并购入的。下文示出本研究中制备的引物组。

[0373] 引物KF2:5' -生物素-<sup>D</sup>d (TGGGCTGACCTAGAGGTCTT) -3' (序列号77)

[0374] 引物KR2:5' -FITC-<sup>D</sup>d (ATGAAATGCAGGCCATTCGG) -3' (序列号78)

[0375] (3) 使用了联合引物和修饰引物的PCR反应

[0376] 使用在上述步骤(1)和(2)中实施制备的引物组进行PCR反应。将各8pmol引物KF-F、引物KR-R、引物KF2、引物KR2、10ng作为模板的pUC19添加到0.2ml PCR管中,根据ExTaq PCR装置(Takara Bio公司生产)的说明书,配制100μl PCR反应液。在配制了反应液后,将PCR管放入热循环仪(GeneAmp PCR System,Applied Biosystems公司生产)中,在95℃热处理5分钟后,进行30个95℃下30秒、55℃下30秒、72℃下30秒的循环,扩增具有约360bp的目标序列的DNA片段。

[0377] (4) 制备与胶乳结合的链霉亲和素

[0378] 在添加了必需量的水溶性碳化二亚胺的MES缓冲液中,混合含有羧基的聚苯乙烯胶乳(蓝色)(固体成分10%(w/w)、Bangs公司生产)和链霉亲和素(和光纯药工业公司生产),在结合后,用单乙醇胺进行嵌段。在离心分离上述反应液后,去除上清液,用水洗涤获



得的沉淀。洗净后,重新悬浮在含有表面活性剂的HEPES缓冲液中,制备结合了链霉亲和素的胶乳(蓝色)。将该胶乳溶液均匀的添加在用玻璃纤维生产的垫片上,然后通过真空干燥器干燥,作为联结垫。

[0379] (5) 将抗FITC(异硫氰酸荧光素)抗体固定在固相上

[0380] 将抗FITC抗体(Invitrogen公司生产)溶解在5mM Tris缓冲液(pH7.5)中,使用分配器涂抹在硝化纤维素膜(商品名:Hi-Flow 135、Millipore公司生产)的线上,在40℃风干30分钟。制备测试线。

[0381] (6) 制备核酸色谱型测试条

[0382] 如图6所示,将如上所述制备的由硝化纤维素膜构成的色谱介质、步骤(4)制备的联结垫、作为样品添加部的通用样品垫、用于吸收所展开的样品或标志物的吸收垫,贴合在由底板制成的基体材料上,制备了用于检测使用了生物素修饰引物和FITC修饰引物组的PCR扩增产物的测试条。

[0383] (7) 用测试条检测PCR产物

[0384] 在不变性通过步骤(3)制备的PCR产物的条件下,将所述产物直接上样至由步骤(6)制备的测试条上的样品添加部位,通过色谱进行检测。当在步骤(3)中添加pUC19作为检查材料时,结果在测试线上检测到目标核酸特异性着色线。另一方面,当添加水作为阴性对照时,没有检测到线。此外,用色谱检测所需要的时间是10-15分钟的短时间。

[0385] <实施例9>

[0386] (1) 合成联合引物

[0387] 在本实施例中,目标核酸的模板使用pUC19(Takara Bio公司生产)、EcoRI甲基化酶基因和BamHI甲基化酶基因这3种作为模板,分别设计用于通过PCR扩增扩增的约330个碱基对、约200个碱基对和约100个碱基对的正向引物(Fj1)和反向引物(Rj1)、正向引物(Fj2)和反向引物(Rj2),以及正向引物(Fj3)和反向引物(Rj3)这3组引物。还分别在上述引物的5'末端导入共同序列KF1和KR1、共同序列KF2和KR2,以及共同序列KF3和KR3,合成了连接有共同序列的引物KF1-Fj1和KR1-Rj1、KF2-Fj2和KR2-Rj2、KF3-Fj3和KR3-Rj3。这6种连接共同序列的引物是委托筑波OLIGOSERVICE株式会社合成并购入的。下文示出本研究中制备的3组引物组。

[0388] 共同序列KF1:5' -<sup>D</sup>d (TGGGCTGACCTAGAGGTCTT) -3' (序列号79)

[0389] 共同序列KR1:5' -<sup>D</sup>d (ATGAAATGCAGGCCATTCGG) -3' (序列号80)

[0390] 引物KF1-Fj1:

[0391] 5' -<sup>D</sup>d (TGGGCTGACCTAGAGGTCTT

[0392] GGAAACAGCTATGACCATGA) -3' (序列号81)

[0393] 引物KR1-Rj1:

[0394] 5' -<sup>D</sup>d (ATGAAATGCAGGCCATTCGG

[0395] TCTATGCGGCATCAGAGCAG) -3' (序列号82)

[0396] 共同序列KF2:5' -<sup>D</sup>d (CCGGAACAGACACCAGGTTT) -3' (序列号83)

[0397] 共同序列KR2:5' -<sup>D</sup>d (GAAGCTGTACCGTCACATGA) -3' (序列号84)

[0398] 引物KF2-Fj2:

[0399] 5' -<sup>D</sup>d (CCGGAACAGACACCAGGTTT

[0400] AGCATTATGAATTATATGGT)-3' (序列号85)

[0401] 引物KR2-Rj2:

[0402] 5' -<sup>D</sup>d (GAAGCTGTACCGTCACATGA

[0403] TTGTTTACATTTATAGCATC)-3' (序列号86)

[0404] 共同序列KF3:5' -<sup>D</sup>d (ATACCGATGAGTGTGCTACC)-3' (序列号87)

[0405] 共同序列KR3:5' -Dd (TGGCCTGTGTGACACTATGC)-3' (序列号88)

[0406] 引物KF3-Fj3:

[0407] 5' -<sup>D</sup>d (ATACCGATGAGTGTGCTACC

[0408] TGGTTTTAAACTCTGATAC)-3' (序列号89)

[0409] 引物KR3-Rj3:

[0410] 5' -<sup>D</sup>d (TGGCCTGTGTGACACTATGC

[0411] AGTATGATGAGGGTGTAACA)-3' (序列号90)

[0412] (2) 合成插入人工核酸(偶氮苯)的引物和生物素修饰的引物

[0413] 在本实施例中,为了能够与步骤1中制备的联合引物组分别扩增的3种PCR扩增片段结合,分别设计与联合引物具有相同的共同序列的3组引物。合成了3组引物中各自的一条引物为在5'末端进行了生物素化修饰的引物KF1、KF2、和KF3。此外,合成了3组引物中各自的另一条引物为在5'末端导入含有人工核酸即偶氮苯的聚合酶反应抑制区域(X)和标签序列T34、标签序列T35和标签序列T36的具有标签的引物,即T34-X-KR1、T35-X-KR2和T36-X-KR3。这6种修饰的引物是委托筑波OLIGO SERVICE株式会社合成并购入的。下文示出本研究中制备的3组引物组。

[0414] 标签序列T34:5' -<sup>D</sup>d (GGTTAGCTTCCAACCACGTGTAGATCA)-3' (序列号91)

[0415] 引物KF1:5' -生物素-<sup>D</sup>d (TGGGCTGACCTAGAGGTCTT)-3' (序列号92)

[0416] 引物T34-X-KR1:

[0417] 5' -<sup>D</sup>d (GGTTAGCTTCCAACCACGTGTAGATCA XATGAAATGCAGGCCATTTCGG)-3' (序列号93)

[0418] 标签序列T35:

[0419] 5' -<sup>D</sup>d (ATTATGCGTGGAGAAGCATATCATA)-3' (序列号94)

[0420] 引物KF2:5' -生物素-<sup>D</sup>d (CCGGAACAGACACCAGGTTT)-3' (序列号95)

[0421] 引物T35-X-KR2:

[0422] 5' -<sup>D</sup>d (ATTATGCGTGGAGAAGCATATCATA XGAAGCTGTACCGTCACATGA)-3' (序列号96)

[0423] 标签序列T36:5' -<sup>D</sup>d (TACTTTAGAGGAACTGCTGAG)-3' (序列号97)

[0424] 引物KF3:5' -生物素-<sup>D</sup>d (ATACCGATGAGTGTGCTACC)-3' (序列号98)

[0425] 引物T36-X-KR3:

[0426] 5' -<sup>D</sup>d (TACTTTAGAGGAACTGCTGAG XTGGCCTGTGTGACACTATGC)-3' (序列号99)

[0427] (3) 使用联合引物和偶氮苯插入引物的PCR反应

[0428] 使用在上述步骤(1)和(2)中实施制备的6组引物组进行PCR反应。将各8pmol引物KF1-Fj1、引物KR1-Rj1、引物KF2-Fj2、引物KR2-Rj2、引物KF3-Fj3、引物KR3-Rj3、引物KF1、引物T34-X-KR1、引物KF2、引物T35-X-KR2、引物KF3、引物T36-X-KR3、各模板10ng添加到0.2ml PCR管中,根据ExTaq PCR装置(Takara Bio公司生产)的说明书,配制100μl PCR反应液。制备以下5种反应液。

[0429] (i) 添加pUC19 (Takara Bio公司生产) 作为模板

[0430] (ii) 添加EcoRI甲基化酶基因作为模板、

[0431] (iii) 添加BamHI甲基化酶基因作为模板

[0432] (iv) 添加所有3种pUC19 (Takara Bio公司生产)、EcoRI甲基化酶基因和BamHI甲基化酶基因作为模板, 和

[0433] (v) 无模板。

[0434] 在配制了这些反应液后, 将PCR管放入热循环仪 (GeneAmp PCRSystem, Applied Biosystems公司生产) 中, 在95℃热处理5分钟后, 进行30个95℃下30秒、55℃下30秒、72℃下30秒的循环, 如下获得具有相应的目标序列的DNA片段。扩增 (i) 约360bp; (ii) 约230bp; (iii) 约130bp; 和 (iv) 约360bp、约230bp、约130bp这3种; (v) 无扩增DNA片段 (作为阴性对照)。

[0435] (4) 制备与金胶体结合的链霉亲和素

[0436] 混合Gold Colloid (粒径40nm, British BioCell International公司生产) 和链霉亲和素, 在50℃下温育16小时。在6000rpm下离心分离15分钟, 去除上清液, 加入0.05M氯化钠、5mM磷酸缓冲液pH7, 混和后, 再在50℃下温育40小时。

[0437] 温育后, 进行离心 (6000rpm、15分钟), 去除上清液, 加入5mM磷酸缓冲液 (pH7)。再次进行该缓冲液置换。

[0438] 将配制的金胶体溶液均匀的添加到用玻璃纤维生产的垫片上之后, 在真空干燥器中干燥, 作为联结垫。

[0439] (5) 将3种寡核苷酸探针固定在固相上

[0440] 合成具有与序列号91互补的序列 (序列号100) 的寡核苷酸探针、与序列号94互补的序列 (序列号101) 的寡核苷酸探针和与序列号97互补的序列 (序列号102) 的寡核苷酸探针。在硝化纤维素膜 (商品名: Hi-Flow 135, Millipore公司生产) 上的3个位点, 使用分配器将这些混合液涂抹在自上游开始依次相互分离的位置上的线上, 在40℃风干30分钟。制备3条测试线。

[0441] 寡核苷酸探针37:

[0442] 5' -<sup>32</sup>P (GATCATACACGTGGTTGGAAGCTAACC) -3' (序列号100)。

[0443] 寡核苷酸探针38:

[0444] 5' -<sup>32</sup>P (TATGATATGCTTCTCCACGCATAAT) -3' (序列号101)。

[0445] 寡核苷酸探针39:

[0446] 5' -<sup>32</sup>P (CTCAGCAGTTTCCTCTAAAGTA) -3' (序列号102)。

[0447] (6) 制备核酸色谱型测试条

[0448] 如图6所示, 将如上所述制备的由硝化纤维素膜构成的色谱介质、步骤(4)制备的联结垫、作为样品添加部的通用样品垫、用于吸收所展开的样品或标志物的吸收垫, 贴合在由底板制成的基体材料上, 制备了用于检测使用了生物素修饰的引物和插入偶氮苯的引物组的PCR扩增产物的测试条。

[0449] (7) 用测试条检测PCR产物

[0450] 在分别不变性通过步骤(3)制备的 (i) - (v) PCR产物的条件下, 将所述产物分别直接上样至步骤(6)中制备的测试条上的样品添加部位, 通过色谱进行检测。结果如下所示。

[0451] (i):仅第1条测试线着色。

[0452] (ii):仅第2条测试线着色。

[0453] (iii):仅第3条测试线着色。

[0454] (iv):第1、第2、第3条测试线分别着色。

[0455] (v):没有发现任何一条测试线着色。

[0456] 根据上述结果,可以分别特异性的检测目标基因,确定可以同时检测3种。此外,用色谱检测所需要的时间是10-15分钟的短时间。

[0457] <实施例10>

[0458] (1) 合成插入人工核酸(偶氮苯)的引物

[0459] 在本实施例中,使用导入了质粒pUC19的大肠杆菌(E.coli DH5α)作为目标。当以pUC19作为模板时,设计了用于通过PCR扩增扩增约330碱基对的正向引物(F)和反向引物(R)。分别在上述引物的5'末端导入含有人工核酸即偶氮苯的聚合酶反应抑制区域(X)和标签序列T37和T38,合成连接标签的引物T37-X-F和T38-X-R。这2种偶氮苯插入引物是委托筑波OLIGOSERVICE株式会社合成并购入的。下文示出本研究中制备的引物组。

[0460] 标签序列T37:

[0461] 5' -<sup>D</sup>d (TGGCAACATTTTTCCTGGGTTTATAG) -3' (序列号103)

[0462] 标签序列T38:

[0463] 5' -<sup>D</sup>d (GGTTAGCTTCCAACCACGTGTAGATCA) -3' (序列号104)

[0464] 引物F:5' -<sup>D</sup>d (GGAAACAGCTATGACCATGA) -3' (序列号105)

[0465] 引物R:5' -<sup>D</sup>d (TCTATGCGGCATCAGAGCAG) -3' (序列号106)

[0466] 引物T37-X-F:5' -<sup>D</sup>d (TGGCAACATTTTTCCTGGGTTTATAG XGAAACAGCTATGACCATGA) -3' (序列号107)

[0467] 引物T38-X-R:5' -<sup>D</sup>d (GGTTAGCTTCCAACCACGTGTAGATCA XTCTATGCGGCATCAGAGCAG) -3' (序列号108)

[0468] (2) 使用插入偶氮苯的引物的PCR反应

[0469] 选取导入了质粒pUC19的大肠杆菌(E.coli DH5α)的菌落,与1ml水混和。使用在上述步骤(1)制备的引物组进行PCR反应。将各5pmol引物F和引物R、上述大肠杆菌的悬浮液1μl分别添加到0.2ml PCR管中,根据ExTaq PCR装置(Takara Bio公司生产)的说明书,配制25μl PCR反应液。然后,将PCR管放入热循环仪(GeneAmp PCR System、Applied Biosystems公司生产)中,在95℃热处理5分钟后,进行30个的95℃下30秒、55℃下30秒、72℃下30秒的循环,扩增约330bp的目标。此外,进行不添加悬浮液的相同反应,作为阴性对照。

[0470] (3) 制备与金胶体结合的寡核苷酸探针

[0471] 混合Gold Colloid(10nm、 $5.7 \times 10^{12}$ (颗粒数/ml)、British BioCellInternational公司生产)和抗FITC抗体溶液(5mM磷酸缓冲液、pH7),在室温下静置20分钟。添加1/2量的1%BSA、0.1%PEG溶液,在10000rpm下离心分离25分钟,去除上清液,加入1%BSA、0.1%PEG溶液,混和后,10000rpm下离心分离25分钟。在离心后,添去除上清液,添加5mM磷酸缓冲液(pH7)。再次进行该缓冲液置换。

[0472] 将3'末端FITC修饰的寡核苷酸探针40(序列号109、序列号103的互补链)混合到配制的金胶体溶液中,均匀的添加到用玻璃纤维生产的垫片上之后,在真空干燥器中干燥,作

为联结垫。

[0473] 寡核苷酸探针40:

[0474] 5' -<sup>D</sup>d (CTATAAACCCAGTGAAAAATGTTGCCA) -FITC-3' (序列号109)。

[0475] (4) 将寡核苷酸探针固定在固相上

[0476] 合成具有与序列号104互补的序列(序列号110)的3'末端生物素修饰的寡核苷酸探针41,与链霉亲和素混合。使用分配器将该混合液涂抹在硝化纤维素膜(商品名:Hi-Flow 180、Millipore公司生产)的线上,在40℃风干30分钟。

[0477] 寡核苷酸探针41:5' -<sup>D</sup>d (GATCATACACGTGGTTGGAAGCTAACC) -生物素-3' (序列号110)。

[0478] (5) 制备核酸色谱型测试条

[0479] 如图6所示,将如上所述制备的由硝化纤维素膜构成的色谱介质、联结垫、作为样品添加部的通用样品垫、用于吸收所展开的样品或标志物的吸收垫,贴合在由底板制成的基体材料上,制备了用于检测使用了插入偶氮苯的引物组的PCR扩增产物的测试条。

[0480] (6) 用测试条检测PCR产物

[0481] 在不变性通过步骤(2)制备的PCR产物的条件下,将所述产物直接上样至由步骤(5)制备的测试条上的样品添加部位中,通过色谱进行检测。当在步骤(2)中添加大肠杆菌作为检查材料时,结果是在测试线上检测到目标核酸特异性着色线。另一方面,当不添加大肠杆菌作为阴性对照时,没有检测到线。此外,用色谱检测所需要的时间是10-15分钟的短时间。

[0482] 符号说明

[0483] 1. 引物区域

[0484] 2. 标签区域

[0485] 3. 聚合酶反应抑制区域(间隔区区域)

[0486] 4. 第1引物(联合引物)的引物区域

[0487] 5. 第1引物(联合引物)的共同区域

[0488] 6. 第2引物的共同区域

[0489] 7. 第2引物的标签区域

[0490] 8. 第2引物的聚合酶反应抑制区域(间隔区区域)

[0491] 9. 目标核酸序列

[0492] 10. 正向引物

[0493] 11. 正向引物的引物区域

[0494] 12. 正向引物的标签区域

[0495] 13. 反向引物

[0496] 14. 反向引物的引物区域

[0497] 15. 反向引物的标签区域

[0498] 16. 具有部分双链核酸结构的PCR产物

[0499] 17. 目标核酸序列

[0500] 18. 正向第1引物

[0501] 19. 正向第1引物的引物区域

- [0502] 20.正向第1引物的标签区域
- [0503] 21.反向第1引物
- [0504] 22.反向第1引物的引物区域
- [0505] 23.反向第1引物的标签区域
- [0506] 24.根据第1引物的双链PCR产物
- [0507] 25.正向第2引物
- [0508] 26.正向第2引物的引物区域
- [0509] 27.正向第2引物的标签区域
- [0510] 28.反向第2引物
- [0511] 29.反向第2引物的引物区域
- [0512] 30.反向第2引物的标签区域
- [0513] 31.具有部分双链核酸结构的PCR产物
- [0514] 32.样品垫
- [0515] 33.联结垫
- [0516] 34.保持有用于捕捉的寡核苷酸的担载体
- [0517] 35.吸收垫
- [0518] 36.基体材料
- [0519] 37.测试线
- [0520] 38.控制线
- [0521] 39.用于结合标记分子的寡核苷酸
- [0522] 40.标记分子
- [0523] 41.PCR产物-标记分子复合物
- [0524] 42.多孔膜
- [0525] 43.用于捕获的寡核苷酸
- [0526] 44.在各孔中保持有用于捕获的寡核苷酸的担载体(微阵列)
- [0527] 45.保持有用于捕获的寡核苷酸的珠状载体

## 序列表

[0001]	<110>	株式会社钟化 (KANEKA CORPORATION)	
	<120>	扩增核酸的检测方法和检测装置	
	<130>	B100423W001	
	<150>	JP2010-261728	
	<151>	2010-11-24	
	<150>	JP2011-143424	
	<151>	2011-06-28	
	<160>	110	
	<170>	PatentIn version 3.1	
	<210>	1	
	<211>	20	
	<212>	DNA	
	<213>	人工的	
	<220>		
	<223>	引物 F	
	<400>	1	
		ggaaacagct atgaccaiga	20
	<210>	2	
	<211>	19	
	<212>	DNA	
	<213>	人工的	
	<220>		
	<223>	引物 R	
	<400>	2	
		ctatgcggca tcagagcag	19
	<210>	3	
	<211>	20	
	<212>	DNA	
	<213>	人工的	
	<220>		
	<223>	标签序列 T1	
	<220>		
	<221>	misc.feature	
	<222>	(1)..(20)	
	<223>	L-型 DNA	
	<400>	3	
		gacaacggag acagagccaa	20
	<210>	4	
	<211>	20	
	<212>	DNA	
	<213>	人工的	
	<220>		
	<223>	标签序列 T2	
	<220>		
	<221>	misc.feature	
	<222>	(1)..(20)	

[0002]

<223>	L-型 DNA	
<400>	4	
	atgctaccgt atgcccagtg	20
<210>	5	
<211>	40	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	引物 T1-F	
<220>		
<221>	misc_feature	
<222>	(1).. (20)	
<223>	L-型 DNA	
<400>	5	
	gacaacggag acagagccaa ggaaacagct atgaccatga	40
<210>	6	
<211>	39	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	引物 T2-R	
<220>		
<221>	misc_feature	
<222>	(1).. (20)	
<223>	L-型 DNA	
<400>	6	
	atgctaccgt atgcccagtg ctatgcggca tcagagcag	39
<210>	7	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	探针 1	
<220>		
<221>	misc_feature	
<222>	(1).. (20)	
<223>	L-型 DNA	
<220>		
<221>	修饰的碱基	
<222>	(20).. (20)	
<223>	用氨基修饰.	
<400>	7	
	ttagctctgt ctccgttgtc	20
<210>	8	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	探针 2	
<220>		



	<221> misc_feature	
	<222> (1)..(20)	
	<223> L-型 DNA	
	<220>	
	<221> 修饰的碱基	
	<222> (20)..(20)	
	<223> 用氨基修饰.	
	<400> 8	
	cactgggcat acggtagcat	20
	<210> 9	
	<211> 42	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> PCR 抑制序列 H	
	<400> 9	
	aggcgaggct gcgagcgcac atg'gcgctc gcgacctcgc ct	42
	<210> 10	
	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> 标签序列 T3	
[0003]	<400> 10	
	tatgatatgc ttctccacgc ataata	25
	<210> 11	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> 标签序列 T4	
	<400> 11	
	tgctctgtac acttgctcaa t	21
	<210> 12	
	<211> 87	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> 引物 T3-H-F	
	<400> 12	
	tatgatatgc ttctccacgc ataataggcg aggtcgcgag cgcacatgtg cgctcgcgac	60
	ctgcctgga aacagctatg accatga	87
	<210> 13	
	<211> 82	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> 引物 T4-H-R	

[0004]	<400> 13 tgctctgtac acttgcctcaa taggcgaggt cgcgagcgca catgtgcgct cgcgacctcg  cctctatgcg gcatcagagc ag	60  82
	<210> 14 <211> 25 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> 探针 3	
	<220> <221> 修饰的碱基 <222> (25).. (25) <223> 用氨基修饰.	
	<400> 14 attatgcgtg gagaagcata tcata	25
	<210> 15 <211> 21 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> 探针 4	
	<220> <221> 修饰的碱基 <222> (21).. (21) <223> 用氨基修饰.	
	<400> 15 attgagcaag tgtacagagc a	21
	<210> 16 <211> 27 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> 标签序列 T5	
	<400> 16 tggcaacatt tticaciggg ttatag	27
	<210> 17 <211> 27 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> 标签序列 T6	
	<400> 17 ggttagcttc caaccacgtg tagatca	27
	<210> 18 <211> 48 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> 引物 T5-X-F	

[0005]	<220>		
	<221>	misc.feature	
	<222>	(28).. (28)	
	<223>	n 为说明书公式(1)表示的偶氮苯.	
	<400>	18	
		tggcaacatt tticaciggg ttatagngg aaacagctat gaccaiga	48
	<210>	19	
	<211>	48	
	<212>	DNA	
	<213>	人工的	
	<220>		
	<223>	引物 T6-X-R	
	<220>		
	<221>	misc.feature	
	<222>	(28).. (28)	
	<223>	n 为说明书公式(1)表示的偶氮苯.	
	<400>	19	
		ggttagcttc caaccacgtg tagatcantic tatgcggcat cagagcag	48
	<210>	20	
	<211>	27	
	<212>	DNA	
	<213>	人工的	
	<220>		
	<223>	探针 5	
	<220>		
	<221>	修饰的碱基	
	<222>	(27).. (27)	
	<223>	用氨基修饰.	
	<400>	20	
		ctataaacc agtgaaaaat gtigcca	27
	<210>	21	
	<211>	27	
	<212>	DNA	
	<213>	人工的	
	<220>		
	<223>	探针 6	
	<220>		
	<221>	修饰的碱基	
	<222>	(27).. (27)	
	<223>	用氨基修饰.	
	<400>	21	
		gatcatacac ggggttgaa gctaac	27
	<210>	22	
	<211>	27	
	<212>	DNA	
	<213>	人工的	
	<220>		
	<223>	探针 7	
	<220>		
	<221>	修饰的碱基	
	<222>	(27).. (27)	
	<223>	用巯基修饰.	

[0006]	<400> 22		
	ctataaaccc agtgaaaaat gtgcca		27
	<210> 23		
	<211> 27		
	<212> DNA		
	<213> 人工的		
	<220>		
	<223> 探针 8		
	<220>		
	<221> 修饰的碱基		
	<222> (20)..(20)		
	<223> 用生物素修饰.		
	<400> 23		
	gatcatcac ggtgttgaa gctaacc		27
	<210> 24		
	<211> 27		
	<212> DNA		
	<213> 人工的		
	<220>		
	<223> 探针 9		
	<400> 24		
	gatcatcac ggtgttgaa gctaacc		27
[0006]	<210> 25		
	<211> 27		
	<212> DNA		
	<213> 人工的		
	<220>		
	<223> 标签序列 T10		
	<400> 25		
	tggcaacatt tticactggg ttatag		27
	<210> 26		
	<211> 27		
	<212> DNA		
	<213> 人工的		
	<220>		
	<223> 标签序列 T11		
	<400> 26		
	ggttagcttc caaccacgtg tagatca		27
	<210> 27		
	<211> 48		
	<212> DNA		
	<213> 人工的		
	<220>		
	<223> 引物 T10-X-F1		
	<220>		
	<221> misc_feature		
	<222> (28)..(28)		
	<223> n 为说明书公式(1)表示的偶氮苯.		

[0007]	<400> 27 tggcaacatt tticactggg ttatagngg aaacagctat gaccaiga	48
	<210> 28	
	<211> 48	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> 引物 T11-X-R1	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (28).. (28)	
	<223> n 为说明书公式(1)表示的偶氮苯.	
	<400> 28 ggttagcttc caaccacgtg tagatcantic taigcggcat cagagcag	48
	<210> 29	
	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> 标签序列 T12	
	<400> 29 cgcatigagc aaggttacag agcat	25
	<210> 30	
	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> 标签序列 T13	
	<400> 30 attatgcgtg gagaagcata tcata	25
	<210> 31	
	<211> 46	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> 引物 T12-X-F2	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (26).. (26)	
	<223> n 为说明书公式(1)表示的偶氮苯	
	<400> 31 cgcatigagc aaggttacag agcatnagca ttatgaatta taiggt	46
	<210> 32	
	<211> 46	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> 引物 T13-X-R2	
	<220>	
	<221> misc_feature	

[0008]	<222> (26).. (26)	
	<223> n 为说明书公式(1)表示的偶氮苯.	
	<400> 32	
	attatgcgtg gagaagcata tcatantigi ttacatttat agcatc	46
	<210> 33	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> 标签序列 T14	
	<400> 33	
	aattgcgcat gtccatgigt aa	22
	<210> 34	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> 标签序列 T15	
	<400> 34	
	tacttttagag gaaactgctg ag	22
	<210> 35	
	<211> 43	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> 引物 T14-X-F3	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (23).. (23)	
	<223> n 为说明书公式(1)表示的偶氮苯.	
	<400> 35	
	aattgcgcat gtccatgigt aantggtttt aaaactctga tac	43
	<210> 36	
	<211> 43	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> 引物 T15-X-R3	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (23).. (23)	
	<223> n 为说明书公式(1)表示的偶氮苯.	
	<400> 36	
	tacttttagag gaaactgctg agnagtaiga tgagggtgta aca	43
	<210> 37	
	<211> 27	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> 探针 16	

	<220>		
	<221>	修饰的碱基	
	<222>	(27).. (27)	
	<223>	用氨基修饰.	
	<400>	37	
		ctataaaccc agtgaaaaat gttgcc	27
	<210>	38	
	<211>	25	
	<212>	DNA	
	<213>	人工的	
	<220>		
	<223>	探针 17	
	<220>		
	<221>	修饰的碱基	
	<222>	(25).. (25)	
	<223>	用氨基修饰.	
	<400>	38	
		ttgctctgta cacttgctca atgcg	25
	<210>	39	
	<211>	22	
	<212>	DNA	
	<213>	人工的	
	<220>		
	<223>	探针 18	
[0009]	<220>		
	<221>	修饰的碱基	
	<222>	(22).. (22)	
	<223>	用氨基修饰.	
	<400>	39	
		ttacacatgg acatgcgcaa tt	22
	<210>	40	
	<211>	27	
	<212>	DNA	
	<213>	人工的	
	<220>		
	<223>	探针 19	
	<220>		
	<221>	修饰的碱基	
	<222>	(27).. (27)	
	<223>	用生物素修饰.	
	<400>	40	
		gatcatacac gtggttgaa gctaacc	27
	<210>	41	
	<211>	25	
	<212>	DNA	
	<213>	人工的	
	<220>		
	<223>	探针 20	
	<220>		
	<221>	修饰的碱基	
	<222>	(25).. (25)	

	<223> 用生物素修饰.	
	<400> 41 tatgataatgc ttctccacgc ataata	25
	<210> 42 <211> 22 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> 探针 21	
	<220> <221> 修饰的碱基 <222> (22).. (22) <223> 用生物素修饰.	
	<400> 42 ctcagcagtt tcctctaaag ta	22
	<210> 43 <211> 20 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> 共同序列 KF1	
	<400> 43 tgggctgacc tagaggtctt	20
[0010]	<210> 44 <211> 20 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> 共同序列 KR1 <222> (1).. (20) <223>	
	<400> 44 atgaaatgca ggccattcgg	20
	<210> 45 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> 引物 KF1-Fj1	
	<400> 45 tgggctgacc tagaggtctt ggaacacagct atgacatga	40
	<210> 46 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> 引物 KR1-Rj1	
	<400> 46 atgaaatgca ggccattcgg tctatgcggc atcagagcag	40



[0011]	<210> 47		
	<211> 20		
	<212> DNA		
	<213> 人工的		
	<220>		
	<223> 共同序列 KF2		
	<400> 47		
	ccggaacaga caccaggttt	20	
	<210> 48		
	<211> 20		
	<212> DNA		
	<213> 人工的		
	<220>		
	<223> 共同序列 KR2		
	<400> 48		
	gaagctgtac cgtcacatga	20	
[0011]	<210> 49		
	<211> 40		
	<212> DNA		
	<213> 人工的		
	<220>		
	<223> 引物 KF2-Fj2		
	<400> 49		
	ccggaacaga caccaggttt agcattatga attatatggt	40	
	<210> 50		
	<211> 40		
	<212> DNA		
	<213> 人工的		
	<220>		
	<223> 引物 KR2-Rj2		
	<400> 50		
	gaagctgtac cgtcacatga tigtattacat ttatagcatc	40	
[0011]	<210> 51		
	<211> 20		
	<212> DNA		
	<213> 人工的		
	<220>		
	<223> 共同序列 KF3		
	<400> 51		
	ataccgatga gttgtgctacc	20	
	<210> 52		
	<211> 20		
	<212> DNA		
	<213> 人工的		
	<220>		
	<223> 共同序列 KR3		
	<400> 52		
	tggccigtgt gacactatgc	20	

<210> 53  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> 人工的  
  
<220>  
<223> 引物 KF3-Fj3  
  
<400> 53  
ataccga tga ggtgctacc tggttttaaa acctgatac 40

<210> 54  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> 人工的  
  
<220>  
<223> 引物 KR3-Rj3  
  
<400> 54  
tggcctgtgt gacactatgc agtatgatga ggggtgaaca 40

<210> 55  
<211> 27  
<212> DNA  
<213> 人工的  
  
<220>  
<223> 标签序列 T22  
  
<400> 55  
tggcaacatt tticactggg ttatag 27

[0012]

<210> 56  
<211> 27  
<212> DNA  
<213> 人工的  
  
<220>  
<223> 标签序列 T23  
  
<400> 56  
ggttagcttc caaccacgig tagatca 27

<210> 57  
<211> 48  
<212> DNA  
<213> 人工的  
  
<220>  
<223> 引物 T22-X-KF1  
  
<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (28).. (28)  
<223> n 为说明书公式(1)表示的偶氮苯。  
  
<400> 57  
tggcaacatt tticactggg ttatagnig ggcigaccia gaggcttt 48

<210> 58  
<211> 48  
<212> DNA  
<213> 人工的  
  
<220>

	<223> 引物 T23-X-KR1	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (28).. (28)	
	<223> n 为说明书公式(1)表示的偶氮苯.	
	<400> 58	
	ggtagcttc caaccacgtg tagatcanat gaaatgcagg ccattcgg	48
	<210> 59	
	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> 标签序列 T24	
	<400> 59	
	cgcattgagc aagtgtacag agcat	25
	<210> 60	
	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> 标签序列 T25	
	<400> 60	
	attatgcgtg gagaagcata tcata	25
[0013]	<210> 61	
	<211> 46	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> 引物 T24-X-KF2	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (26).. (26)	
	<223> n 为说明书公式(1)表示的偶氮苯.	
	<400> 61	
	cgcattgagc aagtgtacag agcatnccgg aacagacacc aggittt	46
	<210> 62	
	<211> 46	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> 引物 T25-X-KR2	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (26).. (26)	
	<223> n 为说明书公式(1)表示的偶氮苯.	
	<400> 62	
	attatgcgtg gagaagcata tcatangaag ctgtaccgtc acatga	46
	<210> 63	
	<211> 22	
	<212> DNA	

	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> 标签序列 T26	
	<400> 63	
	aattgcgcat gtccatgtgt aa	22
	<210> 64	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> 标签序列 T27	
	<400> 64	
	tacttttagag gaaactgctg ag	22
	<210> 65	
	<211> 43	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> 引物 T26-X-KF3	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (23).. (23)	
	<223> n 为说明书公式(1)表示的偶氮苯.	
[0014]	<400> 65	
	aattgcgcat gtccatgtgt aanataccga tgagtgtgct acc	43
	<210> 66	
	<211> 43	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> 引物 T27-X-KR3	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (23).. (23)	
	<223> n 为说明书公式(1)表示的偶氮苯.	
	<400> 66	
	tacttttagag gaaactgctg agntggcctg tgtgacacta tgc	43
	<210> 67	
	<211> 27	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> 探针 28	
	<220>	
	<221> 修饰的碱基	
	<222> (27).. (27)	
	<223> 用氨基修饰.	
	<400> 67	
	ctataaacc agigaaaaat gtigcca	27

[0015]	<210>	68	
	<211>	25	
	<212>	DNA	
	<213>	人工的	
	<220>		
	<223>	探针 29	
	<220>		
	<221>	修饰的碱基	
	<222>	(25)..(25)	
	<223>	用氨基修饰.	
	<400>	68	
		tigctctgtgta cacttgctca atgcg	25
	<210>	69	
	<211>	22	
	<212>	DNA	
	<213>	人工的	
	<220>		
	<223>	探针 30	
	<220>		
	<221>	修饰的碱基	
	<222>	(22)..(22)	
	<223>	用氨基修饰.	
	<400>	69	
		ttacacatgg acatgcgcaa tt	22
	<210>	70	
	<211>	27	
	<212>	DNA	
	<213>	人工的	
	<220>		
	<223>	探针 31	
	<220>		
	<221>	修饰的碱基	
	<222>	(27)..(27)	
	<223>	用生物素修饰.	
	<400>	70	
		gatacatacac ggggttgga gctaacc	27
	<210>	71	
	<211>	25	
	<212>	DNA	
	<213>	人工的	
	<220>		
	<223>	探针 32	
	<220>		
	<221>	修饰的碱基	
	<222>	(25)..(25)	
	<223>	用生物素修饰.	
	<400>	71	
		taigatatgc ttctccacgc ataata	25
	<210>	72	
	<211>	22	
	<212>	DNA	
	<213>	人工的	

[0016]	<220>		
	<223>	探针 33	
	<220>		
	<221>	修饰的碱基	
	<222>	(22).. (22)	
	<223>	用生物素修饰.	
	<400>	72	
		ctcagcagtt tcctctaaag ta	22
	<210>	73	
	<211>	20	
	<212>	DNA	
	<213>	人工的	
	<220>		
	<223>	共同序列 KF	
	<400>	73	
		tgggctgacc tagaggtctt	20
[0016]	<210>	74	
	<211>	20	
	<212>	DNA	
	<213>	人工的	
	<220>		
	<223>	共同序列 KR	
	<400>	74	
		atgaaatgca ggccattcgg	20
	<210>	75	
	<211>	40	
	<212>	DNA	
	<213>	人工的	
	<220>		
	<223>	引物 KF-F	
	<400>	75	
		tgggctgacc tagaggtctt ggaaacagct atgacatga	40
[0016]	<210>	76	
	<211>	40	
	<212>	DNA	
	<213>	人工的	
	<220>		
	<223>	引物 KR-R	
	<400>	76	
		atgaaatgca ggccattcgg tctatgcggc atcagagcag	40
	<210>	77	
	<211>	20	
	<212>	DNA	
	<213>	人工的	
	<220>		
	<223>	引物 KF2	
	<220>		
	<221>	修饰的碱基	
	<222>	(1).. (1)	

	<223> 用生物素修饰.	
	<400> 77 tgggctgacc tagaggtctt	20
	<210> 78 <211> 20 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> 引物 KR2	
	<220> <221> 修饰的碱基 <222> (1)..(1) <223> 用 FITC 修饰.	
	<400> 78 atgaaatgca ggccattcgg	20
	<210> 79 <211> 20 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> 共同序列 KF1	
	<400> 79 tgggctgacc tagaggtctt	20
[0017]	<210> 80 <211> 20 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> 共同序列 KR1 <222> (1)..(20) <223>	
	<400> 80 atgaaatgca ggccattcgg	20
	<210> 81 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> 引物 KF1-Fj1	
	<400> 81 tgggctgacc tagaggtctt ggaacagct atgacatga	40
	<210> 82 <211> 40 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> 引物 KR1-Rj1	
	<400> 82 atgaaatgca ggccattcgg tctatgcggc atcagagcag	40

[0018]	<210> 83		
	<211> 20		
	<212> DNA		
	<213> 人工的		
	<220>		
	<223> 共同序列 KF2		
	<400> 83		
	ccggaacaga caccaggttt	20	
	<210> 84		
	<211> 20		
	<212> DNA		
	<213> 人工的		
	<220>		
	<223> 共同序列 KR2		
	<400> 84		
	gaagctgtac cgtcacatga	20	
	<210> 85		
	<211> 40		
	<212> DNA		
	<213> 人工的		
	<220>		
	<223> 引物 KF2-Fj2		
	<400> 85		
	ccggaacaga caccaggttt agcattatga attatatggt	40	
	<210> 86		
	<211> 40		
	<212> DNA		
	<213> 人工的		
	<220>		
	<223> 引物 KR2-Rj2		
	<400> 86		
	gaagctgtac cgtcacatga tigtttacat ttatagcatc	40	
	<210> 87		
	<211> 20		
	<212> DNA		
	<213> 人工的		
	<220>		
	<223> 共同序列 KF3		
	<400> 87		
	ataccgatga gttgtgctacc	20	
	<210> 88		
	<211> 20		
	<212> DNA		
	<213> 人工的		
	<220>		
	<223> 共同序列 KR3		
	<400> 88		
	tggccigtgt gacactatgc	20	



	<210> 89	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> 引物 KF3-Fj3	
	<400> 89	
	ataccgaiga ggtgctacc tggttttaaa acctgatac	40
	<210> 90	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> 引物 KR3-Rj3	
	<400> 90	
	tggccigtgt gacactatgc agtatgatga ggggtgaaca	40
	<210> 91	
	<211> 27	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> 标签序列 T34	
	<400> 91	
	ggtagcttc caaccacgtg tagatca	27
[0019]	<210> 92	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> 引物 KF1	
	<220>	
	<221> 修饰的碱基	
	<222> (1)..(1)	
	<223> 用生物素修饰.	
	<400> 92	
	tgggctgacc tagaggtctt	20
	<210> 93	
	<211> 48	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> 引物 T34-X-KR1	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (28)..(28)	
	<223> n 为说明书公式(1)表示的偶氮苯.	
	<400> 93	
	ggtagcttc caaccacgtg tagatcanat gaaatgcagg ccattcgg	48
	<210> 94	

	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> 标签序列 T35	
	<400> 94	
	attatgcgtg gagaagcata tcata	25
	<210> 95	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> 引物 KF2	
	<220>	
	<221> 修饰的碱基	
	<222> (1)..(1)	
	<223> 用生物素修饰.	
	<400> 95	
	ccggaacaga caccaggttt	20
	<210> 96	
	<211> 46	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> 引物 T35-X-KR2	
[0020]	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (26)..(26)	
	<223> n 为说明书公式(1)表示的偶氮苯.	
	<400> 96	
	attatgcgtg gagaagcata tcatangaag ctgtaccgtc acatga	46
	<210> 97	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> 标签序列 T36	
	<400> 97	
	tacttttagag gaaacigctg ag	22
	<210> 98	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> 引物 KF3	
	<220>	
	<221> 修饰的碱基	
	<222> (1)..(1)	
	<223> 用生物素修饰.	
	<400> 98	
	ataccgatga gtgtgctacc	20

	<p>&lt;210&gt; 99 &lt;211&gt; 43 &lt;212&gt; DNA &lt;213&gt; 人工的</p> <p>&lt;220&gt; &lt;223&gt; 引物 T36-X-KR3</p> <p>&lt;220&gt; &lt;221&gt; misc_feature &lt;222&gt; (23)..(23) &lt;223&gt; n 为说明书公式(1)表示的偶氮苯.</p> <p>&lt;400&gt; 99 tacttttagag gaaactgctg agniggcctg tggacacta tgc</p>	43
	<p>&lt;210&gt; 100 &lt;211&gt; 27 &lt;212&gt; DNA &lt;213&gt; 人工的</p> <p>&lt;220&gt; &lt;223&gt; 探针 37</p> <p>&lt;400&gt; 100 gatcatacac ggggttgga gctaacc</p>	27
[0021]	<p>&lt;210&gt; 101 &lt;211&gt; 25 &lt;212&gt; DNA &lt;213&gt; 人工的</p> <p>&lt;220&gt; &lt;223&gt; 探针 38</p> <p>&lt;400&gt; 101 tatgatatgc ttctccacgc ataata</p>	25
	<p>&lt;210&gt; 102 &lt;211&gt; 22 &lt;212&gt; DNA &lt;213&gt; 人工的</p> <p>&lt;220&gt; &lt;223&gt; 探针 39</p> <p>&lt;400&gt; 102 ctcagcagtt tctctaaag ta</p>	22
	<p>&lt;210&gt; 103 &lt;211&gt; 27 &lt;212&gt; DNA &lt;213&gt; 人工的</p> <p>&lt;220&gt; &lt;223&gt; 标签序列 T37</p> <p>&lt;400&gt; 103 tggaacatt ttccactggg ttatag</p>	27
	<p>&lt;210&gt; 104 &lt;211&gt; 27 &lt;212&gt; DNA &lt;213&gt; 人工的</p> <p>&lt;220&gt;</p>	

	<223> 标签序列 T38	
	<400> 104 ggttagcttc caaccacgtg tagatca	27
	<210> 105 <211> 20 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> 引物 F	
	<400> 105 gg aaacagctat gaccatga	20
	<210> 106 <211> 20 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> 引物 R	
	<400> 106 tc tatgcggcat cagagcag	20
	<210> 107 <211> 48 <212> DNA <213> 人工的	
[0022]	<220> <223> 引物 T37-X-F	
	<220> <221> misc_feature <222> (28)..(28) <223> n 为说明书公式(1)表示的偶氮苯.	
	<400> 107 tggcaacatt tticactggg ttatagngg aaacagctat gaccatga	48
	<210> 108 <211> 48 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> 引物 T38-X-R	
	<220> <221> misc_feature <222> (28)..(28) <223> n 为说明书公式(1)表示的偶氮苯.	
	<400> 108 ggttagcttc caaccacgtg tagatcantc tatgcggcat cagagcag	48
	<210> 109 <211> 27 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> 探针 40	

	<220>		
	<221>	修饰的碱基	
	<222>	(27).. (27)	
	<223>	用 FITC 修饰.	
	<400>	109	
		ctataaacc agtgaaaaat gtigcca	27
[0023]	<210>	110	
	<211>	27	
	<212>	DNA	
	<213>	人工的	
	<220>		
	<223>	探针 41	
	<220>		
	<221>	修饰的碱基	
	<222>	(27).. (27)	
	<223>	用生物素修饰.	
	<400>	110	
		gatcatacac gtggttgaa gctaacc	27

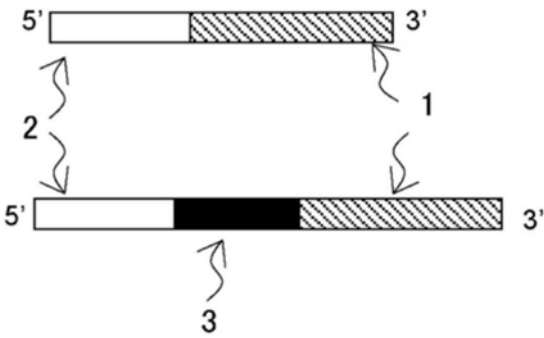


图1

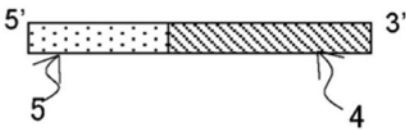


图2

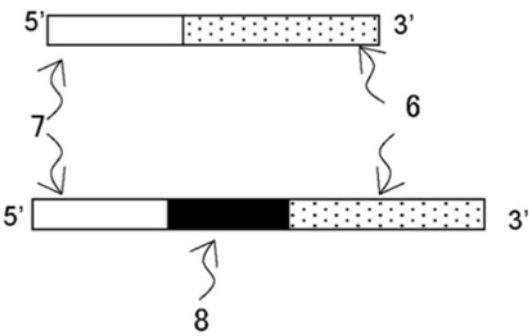


图3

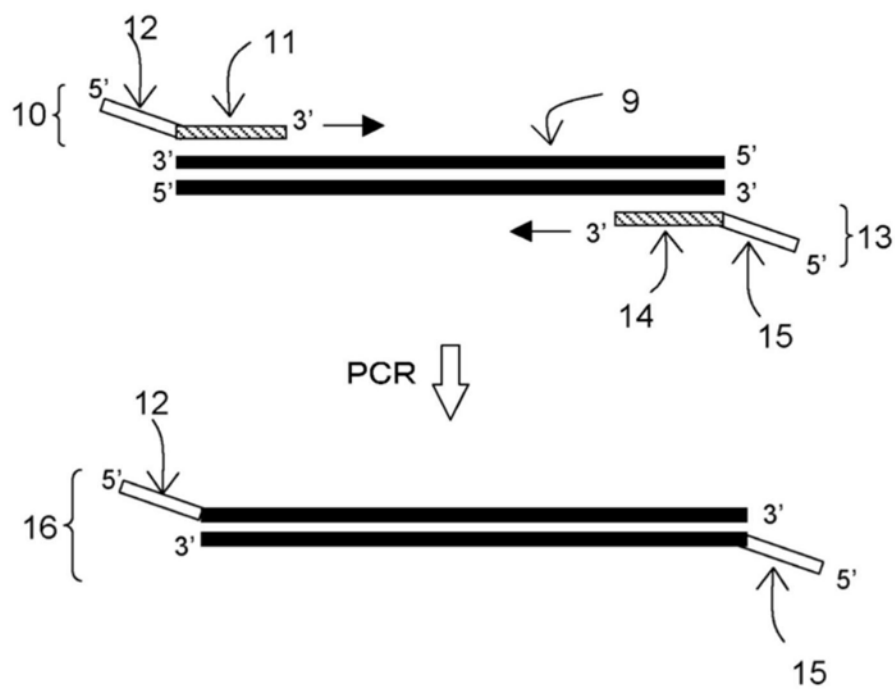


图4

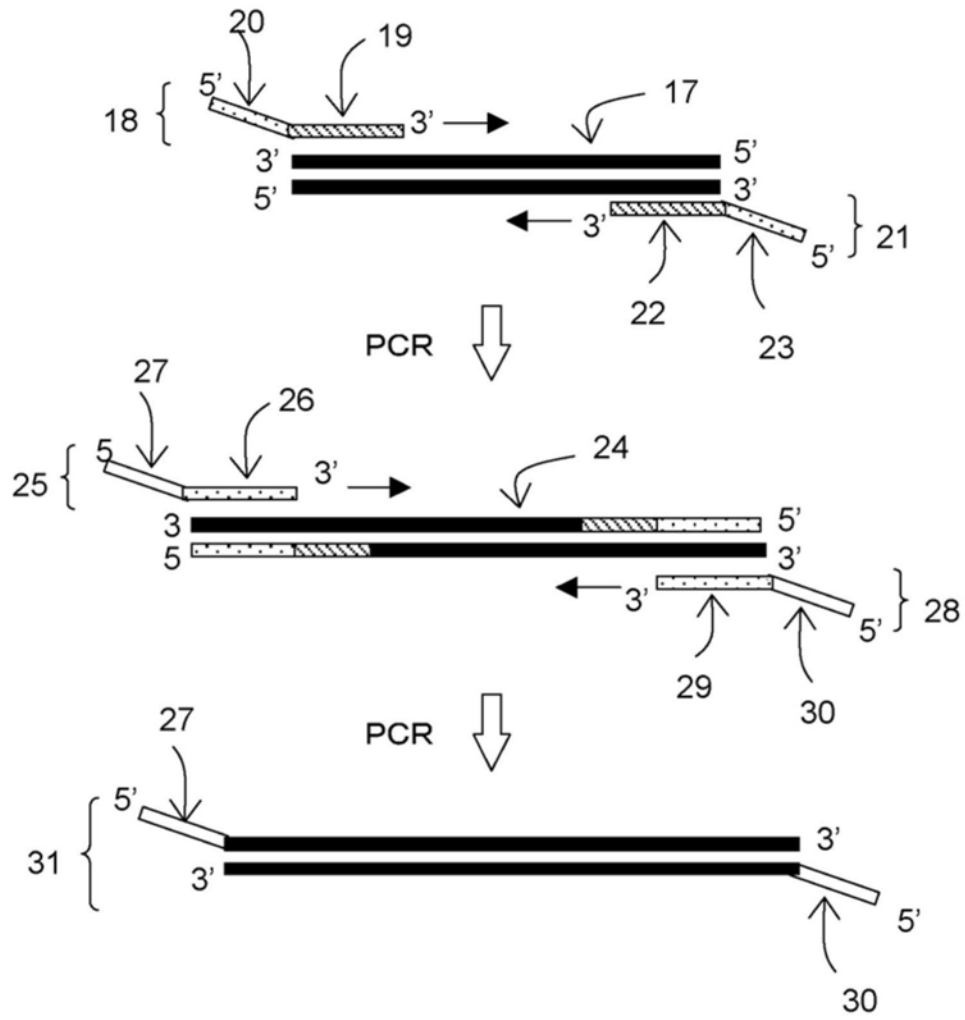


图5



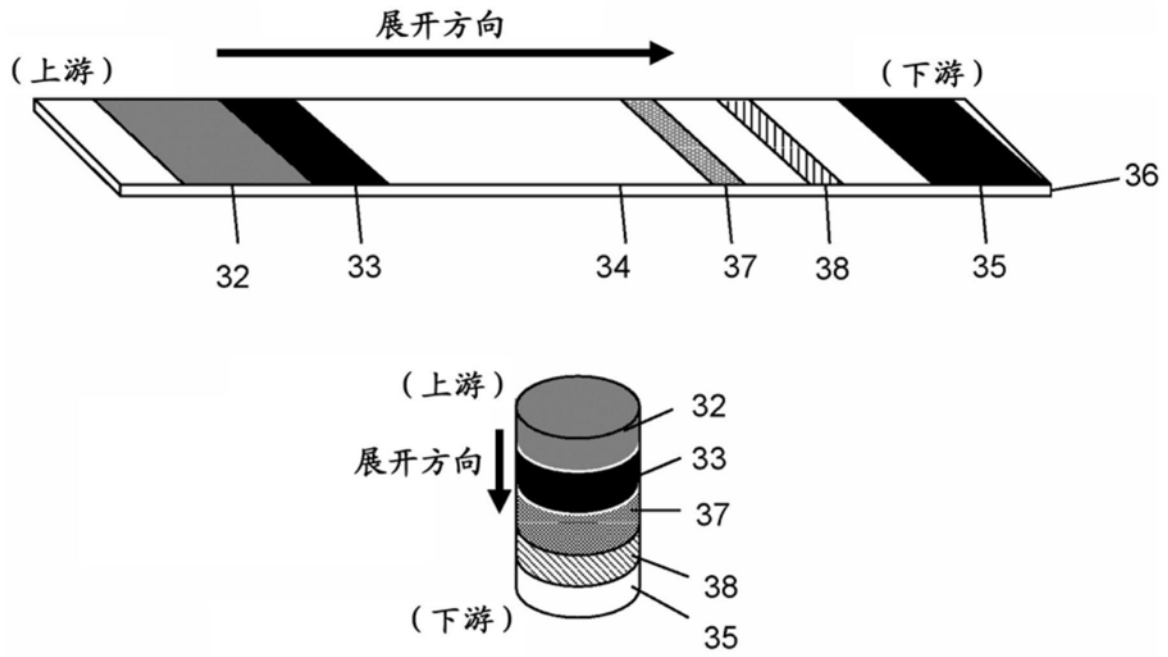


图6

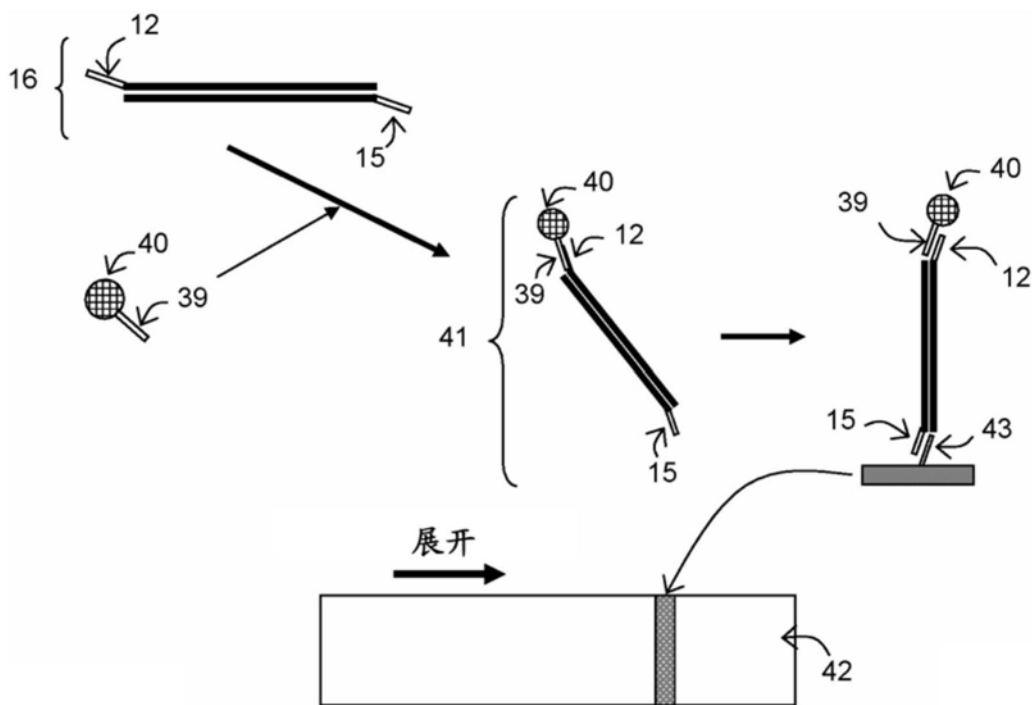


图7

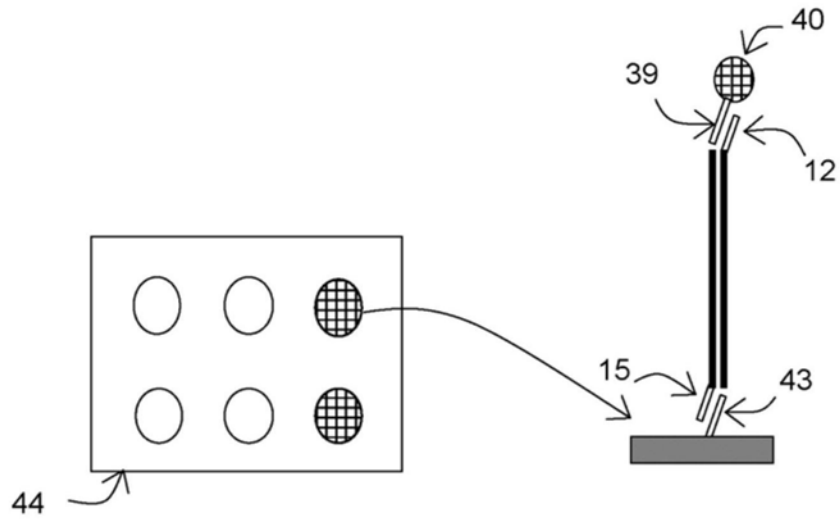


图8

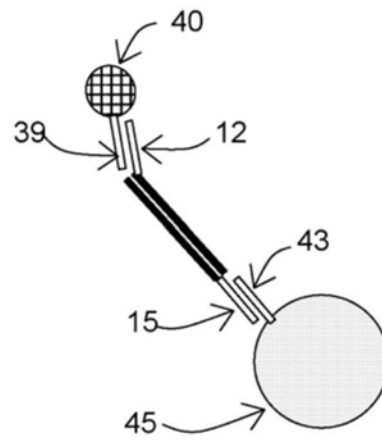


图9