

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局



(43) 国际公布日:
2003年2月20日(20.02.2003)

PCT

(10) 国际公布号:
WO 03/014384 A1

- (51) 国际分类号⁷: C12Q 1/68 (75) 发明人/申请人(仅对美国): 关新元(GUAN, Xinyuan) [CN/CN]; 中国香港沙湾径25号二座14A室, Hong Kong (CN)。
- (21) 国际申请号: PCT/CN01/01208 (74) 代理人: 上海专利商标事务所(SHANGHAI PATENT & TRADEMARK LAW OFFICE); 中国上海市桂平路435号徐迅, Shanghai 200233 (CN)。
- (22) 国际申请日: 2001年7月27日(27.07.2001) (81) 指定国(国家): CN, JP, US
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (71) 申请人(对除美国以外的所有指定国): 香港大学(THE UNIVERSITY OF HONG KONG) [CN/CN]; 中国香港薄扶林道, Hong Kong (CN)。
- (72) 发明人;及 本国际公布:
— 包括国际检索报告。
- 所引用双字母代码和其它缩写符号, 请参考刊登在每期 PCT公报期刊起始的“代码及缩写符号简要说明”。

(54) Title: A NOVEL METHOD FOR ELIMINATING REPEAT SEQUENCE IN GENOME AND ITS USE IN GENOME CHIPS

(54) 发明名称: 一种消除基因组重复序列的新方法及其在基因组芯片中的应用

(57) Abstract: The present invention discloses a method for amplification by polymerase chain reaction, in which an artificial chromosome or a large DNA fragment of 50-5000kb in length is used as a template, and an Alu-specific primer is used as primer. Said Alu-specific primer binds specifically to 5'-terminus of an Alu sequence, and extends from 3' to 5' of the A sequence, alternatively, said primer binds specifically to 3'-terminus of an Alu sequence, and extends from 5' to 3' of the A sequence. The present invention also includes the use of said method in preparing of genome chips. The amplification product obtained by the present method can eliminate the Alu repeat sequence, so non-specific background signal of a genome chip prepared by said method can be decreased dramatically.

(57) 摘要

本发明公开了一种聚合酶链反应扩增方法, 其中以人工染色体或长度为 50-5000kb 的大片段 DNA 分子为模板, 并且以 Alu 特异性引物为引物, 所述的 Alu 特异性引物都特异性地结合于 Alu 序列的 5'端且延伸方向为 Alu 序列的 3'→ 5'方向, 或者都结合于 Alu 序列的 3'端且延伸方向为 Alu 序列的 5'→ 3'方向。本发明还包括了该方法在制备基因组芯片上的应用。用本发明方法获得扩增产物可消除 Alu 重复序列, 因此用其制备的基因芯片的非特异性背景信号可显著降低。



WO 03/014384 A1

一种消除基因组重复序列的新方法及其在基因组芯片中的应用

技术领域

本发明涉及在利用人工染色体制备基因组芯片过程中消除基因组重复序列的新方法。利用该新方法得到的基因组 DNA 序列中不含有基因组重复序列，因此有效地消除了因重复序列引起的非特异性杂交信号，提高了基因组芯片的准确性。

背景技术

2000 年 6 月，人类基因组计划公布了人类基因组的“工作草图”。2000 年 1 月 15 日，“正式版”人类基因组图谱也已面世。随着人类基因组逐渐被破译，一张生命之图将被绘就，人们的生活也将发生巨大变化。人类基因组计划的飞速发展为生物技术的开发提供了新的机会。

含有大片段 DNA 分子的各类人工染色体是发展人类基因组计划的副产品之一。人工染色体包括酵母人工染色体(Yeast Artificial Chromosome, YAC。其插入片段约为 1,000 千碱基对)，噬菌体人工染色体(Phage Artificial Chromosome, PAC。其插入片段约为 100 千碱基对)，细菌人工染色体(Bacterial Artificial Chromosome, BAC。其插入片段约为 100 千碱基对)。

这类人工染色体可以被用于作为染色体荧光原位杂交(Fluorescence In Situ Hybridization, FISH)探针，用于多种用途，其中包括遗传病诊断(主要是各种染色体异常)，产前诊断(孕妇遗传病筛查)，肿瘤分型、诊断和预后检验，观测放射线和其他环境因素对人体的损害。另外，由于这些人工染色体大多数已被定位，所以它们可以被用来制作基因组芯片。

在人类基因组中存在许多重复的 DNA 序列。这些序列非常相似，在整个基因组中不断出现。其中，以 Alu 序列出现频率最高，大约每隔 4 千碱基对就会出现一次。Alu 序列占人类基因组总 DNA 量 5%左右，高达 900,000 拷贝，其中 60%序列成员含有限制性内切酶 Alu 的切口，故叫做 Alu 家族，主要集中在细胞分裂晚期的 R 带，大部分属于非编码 DNA，但也有一部分位于 mRNA 的非翻译区，甚至位于编码区内。Alu 序列最长的约 150 碱基对。人类 Alu

序列长度约 300bp, 本身又由 120bp 和 150bp 的重复序列组成, 两者之间由富含 A 的区域分开, 两端又有一段 7-10bp 的正向重复序列。Alu 序列之间并不完全一样, 存在一些差异。由于这些重复序列可以相互杂交而产生非特异背景信号, 因而会干扰特异性杂交信号。这是目前用人工染色体制作探针或制作基因组芯片所面临的重大难题。

因此, 本领域迫切需要开发消除 Alu 重复序列的技术, 以便获得降低非特异性背景信号的基因芯片。

发明内容

10 本发明的目的在于提供一种新的扩增人基因组 DNA 的方法, 该方法用于扩增人工染色体中的人基因组 DNA 序列时可以有效地去除重复序列, 从而消除因重复序列导致的非特异性杂交信号的干扰, 提高杂交结果的准确性和可靠性。

15 在本发明的第一方面, 提供了一种聚合酶链反应扩增方法, 其中, 以人工染色体或长度为 50-5000kb 的大片段 DNA 分子为模板, 并且以 Alu 特异性引物为引物, 所述的 Alu 特异性引物都特异性地结合于 Alu 序列的 5' 端且延伸方向为 Alu 序列的 3' → 5' 方向, 或者都结合于 Alu 序列的 3' 端且延伸方向为 Alu 序列的 5' → 3' 方向。

20 在本发明的一优选例中, 所述的 Alu 特异性引物长度为 15-25bp。在另一优选中, 所述的 Alu 特异性引物选自下组:

Alu-N1: 5'-TTA CAG GYR TCA GCC ACY AC-3' (SEQ ID NO:1)

Alu-N2: 5'-RCC AYT GCA CTY CAG CCT G-3' (SEQ ID NO:2)

其中: Y=C 或 T; R=A 或 G。

在本发明的第二方面, 提供了一种产生基因芯片的方法, 它包括步骤:

25 (a) 通过聚合酶链反应扩增出多核苷酸产物, 在所述聚合酶链反应中以人工染色体或长度为 50-5000kb 的大片段 DNA 分子为模板, 并且以 Alu 特异性引物为引物, 所述的 Alu 特异性引物都特异性地结合于 Alu 序列的 5' 端且延伸方向为 Alu 序列的 3' → 5' 方向, 或者都结合于 Alu 序列的 3' 端且延伸方向为 Alu 序列的 5' → 3' 方向;

(b)将步骤(a)中的多核苷酸产物点样在基因芯片基板上,形成基因芯片。

在本发明的第三方面,还提供了用上述方法制得的基因(组)芯片。

5 附图说明

图 1 是用 Alu 引物扩增的 PCR 产物的电泳图,其中模板是 BAC 克隆的 DNA。图中,分子量标记物(M)是 1kb 的 DNA 梯(DNA ladder)。RPII-497 I 24 等为 BAC 克隆的编号,其中 RPII 是 BAC 克隆文库(由许多盘子组成)的名称,“RP11-”后的一组数字(如 497)是该文库中其中一个盘子的名称,再后面的英文字(如 I)和另一组数字(如 24)分别指该 BAC 克隆在这个盘中所处位置的横坐标和纵坐标。

图中的 5' 表示 5' 引物,即 Alu-N1:5'-TTA CAG GYR TCA GCC ACY AC-3 (SEQ ID NO:1); 3' 表示 3' 引物,即 Alu-N2:5'-RCC AYT GCA CTY CAG CCT G-3' (SEQ ID NO:2),其中:Y=C 或 T; R=A 或 G。

图 2 是用 Alu 引物扩增的 PCR 产物的 Southern 印迹图。其中分子量标记物(M)是 1kb 的 DNA 梯(DNA ladder)。阳性对照 1 和 2(CTRL1 和 CTRL2)是 BAC DNA。图中,作为探针的是整个 BAC 克隆 DNA。该 BAC 克隆的编号为 RPII-110-0-7,大小为 120kb。

20 具体实施方式

如本文所用,术语“人工染色体”指人工构建的具有染色体特性(如含有着丝粒、端粒及 DNA 复制起始点,同时还带有转化筛选标记)的,可自我复制的载体。代表性的人工染色体包括但不限于:酵母人工染色体(Yeast Artificial Chromosome, YAC),噬菌体人工染色体(Phage Artificial Chromosome, PAC),细菌人工染色体(Bacterial Artificial Chromosome, BAC),哺乳动物人工染色体(Mammalian Artificial Chromosome, MAC)。例如, YAC 使用酵母染色体着丝粒、端粒,依此类推。

如本文所用,术语“Alu 特异性引物”指特异性结合于 Alu 序列的末端,从而使聚合酶链反应扩增产物不含有或基本上不含有 Alu 重复序列的引物。

Alu 特异性引物分为二类：第一类 Alu 特异性引物是特异性地结合于 Alu 序列的 5' 端且延伸方向为 Alu 序列的 3' → 5' 方向；第二类 Alu 特异性引物是结合于 Alu 序列的 3' 端且延伸方向为 Alu 序列的 5' → 3' 方向。

5 本发明人经过广泛而深入的研究，建立了一种用于在人工染色体中高效扩增人 DNA 序列的新方法。该方法采用了设计独特的扩增引物和扩增条件，其中扩增引物在位于人基因组 DNA 中高频率出现的 Alu 重复序列的 5' 端和 3' 端。该方法的特点是，利用这种引物通过 PCR 方法扩增例如细菌人工染色体 (BAC) 中的人基因组 DNA 序列，可以有效地去除人基因组 DNA 中高频率出现的
10 Alu 重复序列。

 本技术方法的原理是利用 Alu 序列出现频率的特点，以 Alu 一端的序列为模板，设计相应的引物。当两个 Alu 序列相隔不远，即在一个正常 PCR 反应扩增范围内（一般在 2 千碱基对内）并且这两个 Alu 序列的方向相对（如 5' 端对 5' 端）时，就可以扩增出在此两个 Alu 序列之间的基因组 DNA 序列。由于用本方法扩增出的 DNA 序列位于两个 Alu 重复序列之间，所以它不再含有
15 重复序列。

 以细菌人工染色体 (BAC) 为例，其大小一般在 100 千碱基对左右。以平均每 4 千碱基对出现一次 Alu 序列计算，通常在一个 BAC 中可以有 25 个左右的 Alu 序列，其中相当一部分相隔距离在 PCR 反应扩增范围内。因此，当使用
20 本发明的 Alu 特异引物扩增 BAC 中的人基因组 DNA 时，就可以大大增加得到单一序列的机会。

 在本发明中，对 PCR 反应条件没有特别限制，常规的特异性扩增的 PCR 条件都可用于本发明。一种常用的条件是 90 — 95 °C 变性 45 — 75 秒，50-65 °C 退火 30 — 90 秒，70-74 °C 延伸 30 — 90 秒，共 25 — 35 个循环。

25 实验结果证明了此新技术方法的可行性和高效率。本发明人选取了 100 个来自人 3 号染色体及 16 号染色体是的 BAC 克隆，分别用本发明设计的 Alu 序列 5' 端和 3' 端特异引物扩增。所有的 BAC 都得到至少一种 PCR 产物，最多的可以得到十几种 PCR 产物。

 此外，还选用一个含有多种重复序列的 BAC 作探针 (RP-11-110-0-7)，经

放射性同位素 ^{32}P 标记后与这些 PCR 产物进行分子杂交反应。反应结果表明：所有的 PCR 产物均不含重复序列。

进一步对一些 PCR 产物做了 DNA 序列测定分析。测序结果也证明这些 PCR 产物的大小在 400 — 2000 碱基对之间，平均约 800 碱基对，并且都不含重复序列。

因此，利用本发明的新技术方法可以快速从诸如 BAC 克隆等人工染色体或大片段 DNA 中扩增出不含重复序列的单一人基因组 DNA 序列。

本发明的技术有多种用途，其中包括但不限于：

10 (1). 这些被扩增得到的单一序列可以作为基因探针，进行 Southern 印迹分子杂交；

(2). 这些被扩增得到的单一序列可以结合在固相载体表面制成基因组 DNA 芯片，进行基因检测和诊断。

15 另一方面，用本发明方法获得的寡核苷酸或其片段可作微阵列的对象。微阵列列可用于同时检测大量基因的表达水平，并可检测出基因变异、突变及多态现象。这些信息可用于推断基因功能，理解疾病产生的基因基础，诊断疾病等用途。

20 术语“微阵列(Microarray)”，又称 DNA 芯片。是指将不同的多聚核苷酸排列在基片上，如纸、尼龙或其它任何膜、滤膜、芯片、玻片或任何其它合适的固体支持物。术语“元件”或“微阵列元件”，指的是排列在基质表面的可杂交的多聚核苷酸。

25 DNA 芯片可通过使用一系列化学方法及喷墨技术把样品固定在基片上得到。常用的方法有射线、化学、热力学、机械方法、干燥等，形成的元件有点状、条形等等。一块典型的芯片通常含有一定数量的元件，可通过手工或用适当的仪器设备制备。杂交反应后，洗去未结合的探针，然后用扫描仪来检测发生杂交反应的元件及反应的程度。探针与每一个芯片元件的互补性和结合量都可通过对扫描出的图像的分析来判断。一种常用的方法就是将 Alu 特异性引物扩增出的 PCR 产物，直接地有序排列于玻璃等载体上，然后通过

紫外线交联、干燥等方式加以固定。

由于用本发明方法获得扩增产物消除了 Alu 重复序列，因此用其制备的基因芯片的非特异性背景信号可显著降低。

- 5 下面结合具体实施例，进一步阐述本发明。应理解，这些实施例仅用于说明本发明而不适用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法，通常按照常规条件如 Sambrook 等人，分子克隆：实验室手册 (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) 中所述的条件，或按照制造厂商所建议的条件。

10

实施例 1

引物合成

用人工合成的方法分别合成如下引物：

Alu-N1: 5'-TTA CAG GYR TCA GCC ACY AC-3' (SEQ ID NO:1)

15 Alu-N2: 5'-RCC AYT GCA CTY CAG CCT G-3' (SEQ ID NO:2)

其中：Y=C 或 T；R=A 或 G。

实施例 2

用 Alu 特异性引物扩增细菌人工染色体 (BAC)

- 20 ①. 培养细菌人工染色体 (BAC) 克隆，涂布培养基平板，培养，挑选单个克隆，摇瓶培养该克隆菌，从该菌中抽提 BAC DNA。

②. 用 PCR 反应扩增不含重复序列的 BAC DNA 片段的方法如下：

- 取 50 ng BAC DNA (作为 PCR 反应的模板)，在 50 μ l (微升) 反应总体积中进行反应。该反应体系中的成分为：10 mM Tris-HCl, pH 8.4, 2 mM
25 MgCl₂, 50 mM KCl, 0.1 mM gelatin, 200 mM Dntp, 0.5 mM 引物 Alu-N1 或 Alu-N2，
2 单位 Taq polymerase)。PCR 反应的条件为：94 $^{\circ}$ C 1 分钟，60 $^{\circ}$ C 1 分钟，
72 $^{\circ}$ C 2 分钟，30 循环。

以不同的 BAC 克隆为模板进行 PCR 反应的电泳结果如图 1 所示。PCR 产物平均为 2-5 个。

实施例 3

对 PCR 产物的 Southern 印迹分析

将实施例 2 中获得的 PCR 产物经凝胶电泳后，转移至尼龙膜上。用 ^{32}P 标记过的完整的 BAC 克隆 (RP11-110-0-7) DNA 作为探针，与所述 Southern 印迹膜杂交。

Southern 印迹分析结果如图 2 所示。因为所用的探针 (完整的 BAC) 中含有大量的 DNA 重复序列，而用 Alu 引物扩增出的 PCR 产物没有杂交，因此这说明 PCR 产物中不含 DNA 重复序列。

10

实施例 4

对 PCR 产物的保存、筛选和鉴定

将上述获得的 PCR 扩增产物克隆到 TA-Vector 载体中，以便于保存及今后大量复制。

15 然后，用 Alu 序列筛选阴性克隆。即用细菌人工染色体克隆 RPII-110-0-7 (大小为 120kb) 筛选出不含 Alu 重复序列的阴性克隆。

接着，用 PCR 反应扩增出插入片段，并通过凝胶电泳法测定插入片段的大小。此外，还进一步对一些 PCR 产物做了 DNA 序列测定分析。

20 测序结果也证明这些 PCR 产物的大小在 400 — 2000 碱基对之间，平均约 800 碱基对，并且都不含重复序列。

实施例 5

基因组芯片的制备

25 将实施例 2 中获得的 PCR 产物，经分离和处理后，分别点样在玻璃基板上，干燥后获得基因组芯片。

权 利 要 求 书

1.一种聚合酶链反应扩增方法，其特征在于，以人工染色体或长度为 50-5000kb 的大片段 DNA 分子为模板，并且以 Alu 特异性引物为引物，所述的 Alu 特异性引物都特异性地结合于 Alu 序列的 5'端且延伸方向为 Alu 序列的 3'→ 5'方向，或者都结合于 Alu 序列的 3'端且延伸方向为 Alu 序列的 5'→ 3'方向。

2.如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述人工染色体选自下组：酵母人工染色体，噬菌体人工染色体，细菌人工染色体和哺乳动物人工染色体。

3.如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述的 PCR 反应条件是：90 — 95 °C 变性 45 — 75 秒，50-65 °C 退火 30 — 90 秒，70-74 °C 延伸 30 — 90 秒，共 25 — 35 个循环。

4.如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述的 Alu 特异性引物长度为 15-25bp。

5.如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述的 Alu 特异性引物选自下组：

Alu-N1: 5'-TTA CAG GYR TCA GCC ACY AC-3'(SEQ ID NO:1)

Alu-N2: 5'-RCC AYT GCA CTY CAG CCT G-3' (SEQ ID NO:2)

其中：Y=C 或 T；R=A 或 G。

6.一种产生基因芯片的方法，其特征在于，它包括步骤：

(a)通过聚合酶链反应扩增出多核苷酸产物，在所述聚合酶链反应中以人工染色体或长度为 50-5000kb 的大片段 DNA 分子为模板，并且以 Alu 特异性引物为引物，所述的 Alu 特异性引物都特异性地结合于 Alu 序列的 5'端且延伸方向为 Alu 序列的 3'→ 5'方向，或者都结合于 Alu 序列的 3'端且延伸方向为 Alu 序列的 5'→ 3'方向；

(b)将步骤(a)中的多核苷酸产物点样在基因芯片基板上，形成基因芯片。

7.如权利要求 6 所述的方法，其特征在于，所述人工染色体选自下组：酵母人工染色体，噬菌体人工染色体，细菌人工染色体和哺乳动物人工染色体

体。

8.如权利要求 6 所述的方法，其特征在于，所述的 Alu 特异性引物长度为 15-25bp。

9.如权利要求 6 所述的方法，其特征在于，所述的 Alu 特异性引物选自

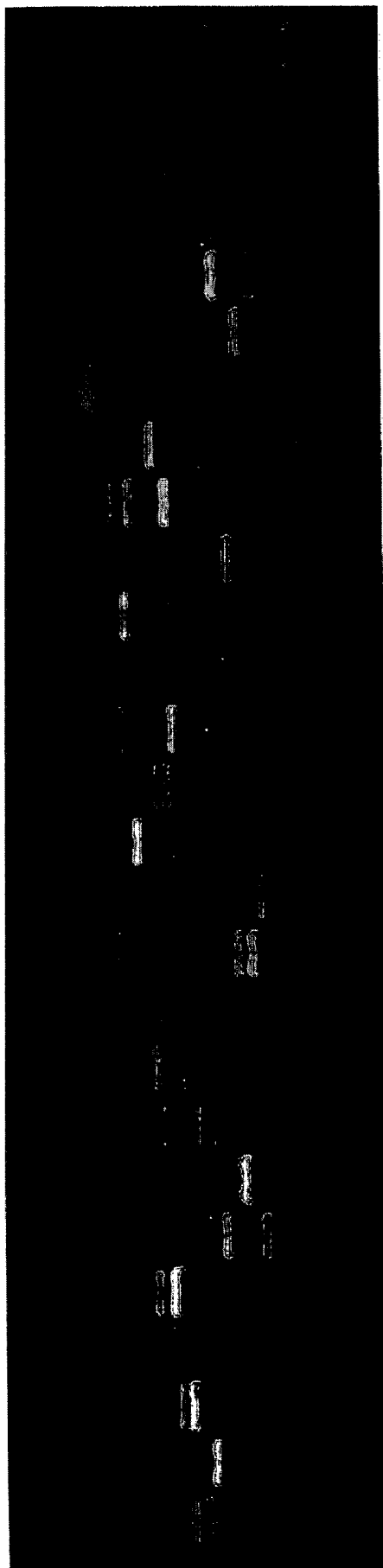
5 下组：

Alu-N1: 5'-TTA CAG GYR TCA GCC ACY AC-3'(SEQ ID NO:1)

Alu-N2: 5'-RCC AYT GCA CTY CAG CCT G-3' (SEQ ID NO:2)

其中：Y=C 或 T；R=A 或 G。

10.一种用权利要求 6 所述方法制得的基因芯片。



M

5' RP11- 497I24

3' RP11- 497I24

5' RP11- 605M1

3' RP11- 605M1

5' RP11- 392M7

3' RP11- 392M7

5' RP11- 416N8

3' RP11- 416N8

5' RP11- 204C23

3' RP11- 204C23

5' RP11- 93A1

3' RP11- 93A1

5' RP11- 344L9

3' RP11- 344L9

5' RP11- 327M20

3' RP11- 327M20

5' RP11- 622P3

3' RP11- 622P3

5' RP11- 508A20

3' RP11- 508A20

5' RP11- 453F3

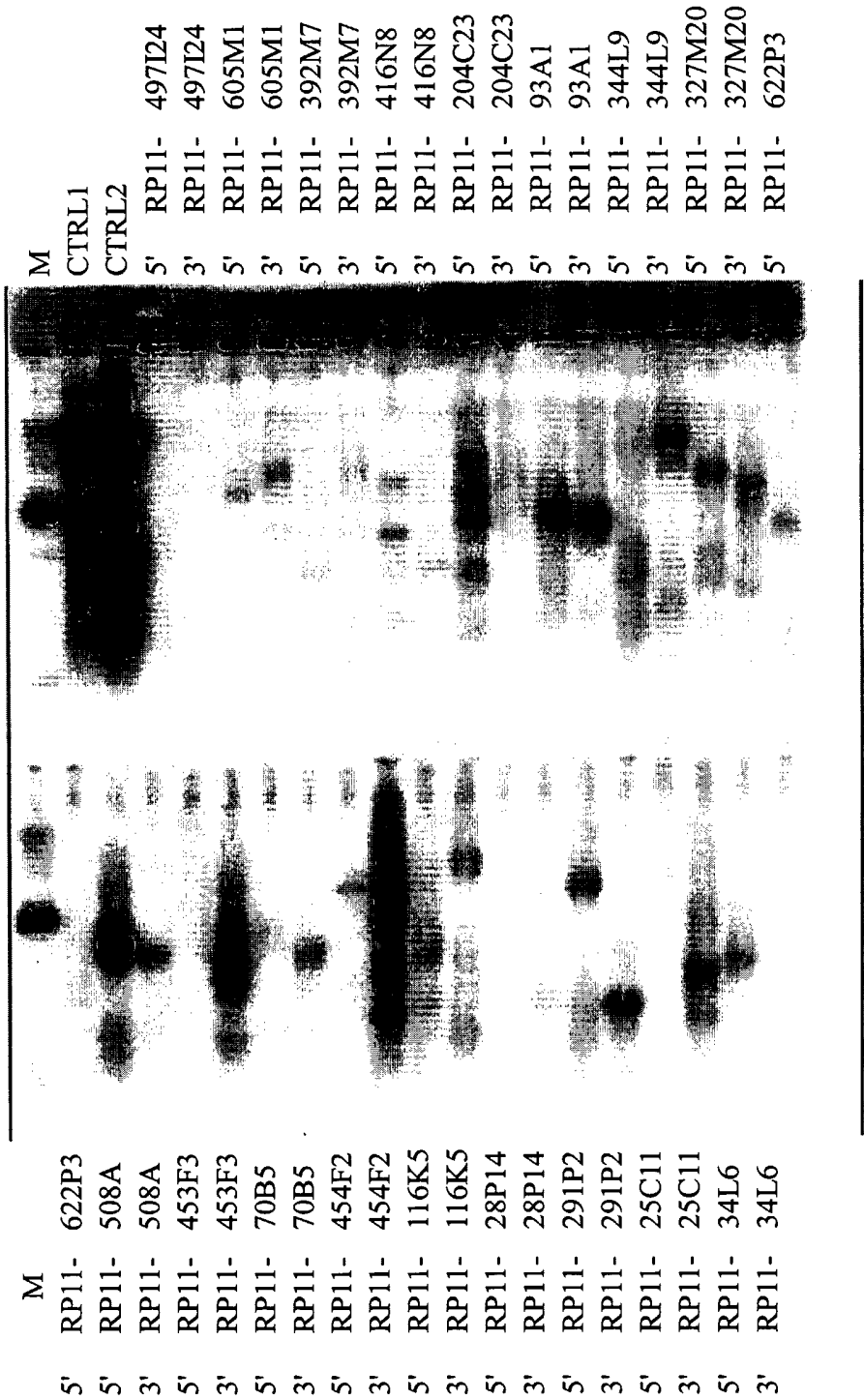
3' RP11- 453F3

5' RP11- 70B5

3' RP11- 70B5

5' RP11- 454F24

3' RP11- 454F24



序列表

	<110> 香港大学	
	关, 新元	
5		
	<120> 一种消除基因组重复序列的新方法及其在基因组芯片中的应用	
	<130> 014159 PCW0	
10		
	<160> 2	
	<170> PatentIn version 3.0	
	<210> 1	
15	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 合成的引物	
	<220>	
20	<221> misc_feature	
	<223> Y=C, T; R=A, G	
	<400> 1	
	ttacaggyrt cagccacyac	20
25		
	<210> 2	
	<211> 19	
	<212> DNA	

<213> 合成的引物

<220>

<221> misc_feature

5 <223> Y=C, T; R=A, G

<400> 2

rccaytgcac tycagcctg

19

10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN01/01208

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC⁷ C12Q1/68

According to International Patent Classification(IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched(classification system followed by classification symbols)

IPC⁷ C12Q1/68

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the field searched

Chinese Patnets, Chinese Scientific and Technical Journals

Electronic data base consulted during the international search(name of data base and, where practicable, search terms used)

GenBank, EPOQUE, BA, MEDLINE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant claim No.
A	US5773649(Centre de recherche de l'Hôpital Sainte-Justine), 1998 see the abstract	1 — 10
A	WO00/22164(GENSET et al), 2000 see the abstract	1 — 10
A	Proc Natl Acad Sci USA 1996; 93(9):4474-9 see the abstract	1 — 10

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason(as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
27 December 2001 (27. 12. 01)

Date of mailing of the international search report

17 JAN 2002 (17. 01. 02)

Name and mailing address of the ISA/

The Chinese Patent Office
6, Xitucheng Road, Haidian District,
Beijing, 100088, China

Authorized officer

SUN, guangxiu

Facsimile No. 86-010-62019451

Telephone No. 86-010-62093884

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/CN01/01208

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family members	Publication date
US5773649	1998-6-30	CA2207845	1997-12-10
WO0022164	2000-4-20	FR2784683	2000-4-21
		AU6098199	2000-5-01

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN01/01208

A. 主题的分类

IPC⁷ C12Q1/68

按照国际专利分类表(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类体系和分类号)

IPC⁷ C12Q1/68

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

中国专利文献数据库, 中文科技期刊数据库

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称和, 如果实际可行的, 使用的检索词)

GenBank, EPOQUE, BA, MEDLINE

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 包括相关段落的说明	相关的权利要求编号
A	US5773649(Centre de recherche de l'Hôpital Sainte-Justine), 1998 见摘要	1 — 10
A	WO00/22164(GENSET 等), 2000 见摘要	1 — 10
A	Proc Natl Acad Sci USA 1996; 93(9):4474-9 见摘要	1 — 10

☐ 其余文件在 C 栏的续页中列出。☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的专用类型:

“A” 明确表示了一般现有技术, 不认为是特别相关的文件

“E” 在先文件, 但是在国际申请日的同一日或之后公布的

“L” 对优先权要求可能产生怀疑或者用来确定另一篇引用文件的公布日期或其它特殊理由而引用的文件(如详细说明)

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他手段的文件

“P” 在国际申请日之前但迟于所要求的优先权日公布的文件

“T” 在国际申请日或优先权日之后公布的在后文件, 它与申请不相抵触, 但是引用它是为了理解构成发明基础的理论或原理

“X” 特别相关的文件: 当该文件被单独使用时, 要求保护的发明不能认为是新颖的或不能认为具有创造性

“Y” 特别相关的文件: 当该文件与其他一篇或多篇这类文件结合在一起, 这种结合对本领域技术人员是显而易见的, 要求保护的发明不能认为具有创造性

“&” 同族专利成员的文件

国际检索实际完成的日期

27. 12 月 2001(27.12.01)

国际检索报告邮寄日期

17. 1月 2002(17.01.02)

国际检索单位名称和邮寄地址

中国专利局

中国北京市海淀区西土城路 6 号(100088)

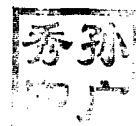
传真号:

86-010-62019451

授权官员

孙广秀

电话号码: 86-010-62093884



国际检索报告
同族专利成员的情报

国际申请号

PCT/CN01/01208

检索报告中引用的 专利文件	公布日期	同族专利成员	公布日期
US5773649	1998-6-30	CA2207845	1997-12-10
WO0022164	2000-4-20	FR2784683	2000-4-21
		AU6098199	2000-5-01