

# [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 01802491.2

[43] 公开日 2003 年 1 月 1 日

[11] 公开号 CN 1388831A

[22] 申请日 2001.8.14 [21] 申请号 01802491.2

[30] 优先权

[32]2000.8.30 [33]JP [31]261687/00

[86] 国际申请 PCT/JP01/07020 2001.8.14

[87] 国际公布 WO02/18642 日 2002.3.7

[85] 进入国家阶段日期 2002.4.22

[71] 申请人 三光纯药株式会社

地址 日本东京都

[72] 发明人 薄井贡 三塚真理

波木井千雅子

[74] 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任公司

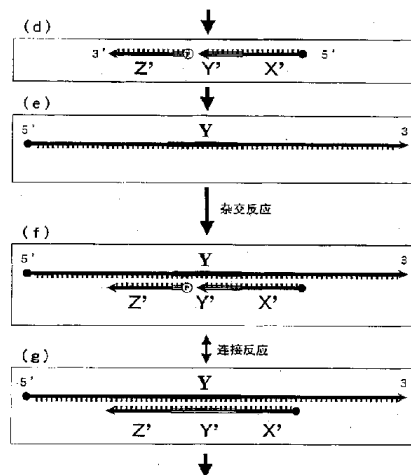
代理人 汪惠民

权利要求书 1 页 说明书 18 页 序列表 4 页  
附图 26 页

[54] 发明名称 基因的检测方法

[57] 摘要

本发明提供一种基因的检测方法,通过利用 PALSAR 法,不需要捕获连接的低聚核苷酸和洗涤多余的低聚核苷酸的操作,能够通过聚合物的形成检测基因。使用复数对由  $n(n \geq 3)$  个互补碱基序列区域构成的成对探针,预先切断上述成对探针与目标基因互补区域的单侧或两侧的一个部位或数个部位,通过控制温度,使之进行杂交反应、连接反应和解离反应,使上述切断的探针连接,形成完全探针,使用探针聚合物的制备方法形成双链聚合物,检测出上述目标基因。



1、一种基因检测方法，它是采用通过使用复数对由  $n$  ( $n \geq 3$ ) 个互  
5 补碱基序列区域构成的成对探针，使之杂交达到相互交错的状态，从而  
形成双链聚合物的探针聚合物制备方法的基因检测方法，其特征在于，  
使上述成对的探针中任意一个探针的一个以上的互补区域成为具有与目  
标基因的一部分互补的碱基序列的区域，预先切断上述成对探针与目标  
10 基因互补区域的单侧或两侧的一个部位或数个部位，通过控制温度，使  
之进行杂交反应、连接反应和解离反应，使上述切断的探针连接，形成  
完全探针，通过上述探针聚合物的制备方法形成双链聚合物，检测出上  
述目标基因。

2、如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，采用 DNA 连接酶、耐  
热性 DNA 连接酶或不使用酶的自动连接法进行上述连接反应。

15 3、如权利要求 1 或 2 所述的方法，其特征在于，上述目标基因使用  
单链 DNA 或 RNA。

4、如权利要求 1 或 2 所述的方法，其特征在于，上述目标基因使用  
双链 DNA 或 RNA。

20 5、如权利要求 1~4 中任意一项所述的方法，其特征在于，设计成  
上述预选切断的探针部分与 SNPs 互补。

6、如权利要求 1~5 中任意一项所述的方法，其特征在于，使用控  
制反应温度的仪器。

7、如权利要求 1~6 中任意一项所述的方法，其特征在于，使猝灭  
剂 and 荧光物质结合在上述使用的成对探针的单侧或两侧的末端，通过荧  
25 光的消失确认形成的双链聚合物。

## 基因的检测方法

5

## 技术领域

本发明涉及采用探针聚合物制备方法检测基因的方法，所述探针聚合物的制备方法是使用复数对由  $n$  ( $n \geq 3$ ) 个互补碱基序列区域构成的成对探针（以下，有时称为 HoneyComb Probe: HCP），使之杂交达到相互交错的状态，从而形成双链聚合物的方法（USP6261846、特开 2000—201687 号以及特愿 2000—98797 号，以下，称为 PALSAR(Probe alternation link self-assembly reaction) 法）。

## 背景技术

15 已开发出通过进行杂交使之与目标基因或单核苷酸多态性互补的二个低聚核苷酸邻接从而连接二个低聚核苷酸的连接反应，检测目标基因或单核苷酸多态性的方法。

上述连接反应大致分为使用连接酶（Ligase）的方法和不使用酶而使用特殊低聚核苷酸的方法。

20 使用连接酶（Ligase）的方法中包括一般基因操作中使用的 T4DNA 连接酶或 LCR（Ligase chain reaction）法中使用的耐热性 DNA 连接酶（*Thermus thermophilus* DNA ligase）（USP5792607 和 USP5494810）。另外，不使用酶的自动连接反应（Autoligation reaction）法（Yanzheng Xu and Eric T. Kool. (1999) *Nucleic Acids Res.*, 27. 875-881），是预先使硫代磷酸（phosphorothioate）结合在相邻的二个低聚核苷酸的 3' 末端，并使碘代胸腺嘧啶核甙（iodo thymidine）结合在 5' 末端，进行 5'—桥连硫代磷酸连接（5'—bridging phosphorothioate linkage），从而连接二个低聚核苷酸的方法。

30 如上所述，连接二个低聚核苷酸的方法有各种各样的方法，但用于检测连接后的低聚核苷酸的方法如 LCR<sup>TM</sup> 所代表的那样，通过特殊的装

置仅仅捕获连接的低聚核苷酸，如果不通过采用洗涤的 B/F 分离操作除去多余的低聚核苷酸，则不能进行基因检测。

另外，通过分离猝灭剂使能够通过猝灭剂抑制荧光的荧光物质发出荧光的方法中，包括 TaqMan PCR 法和转化法，Taqman PCR 法是通过利用 Taq DNA 聚合酶的 5'核酸酶活性，切断结合有荧光物质的探针，分离猝灭剂使之发出荧光的方法，另外，转化法是通过使用具有识别 DNA 的结构进行切割的特殊内切核酸酶活性的酶（cleavase），切断结合有荧光物质的探针，分离猝灭剂使之发出荧光的方法，两种方法均为需要特殊酶的方法。

另一方面，本发明人发明了不使用酶或分支 DNA 但能够有效进行探针聚合的划时代的方法，即 PALSAR 法，并已经提出申请（参见 USP6261846、特开 2000-201687 号以及特愿 2000-98797 号）。

#### 发明内容

鉴于上述已有技术的现状，本发明人为了创造出采用上述 PALSAR 法的新型基因检测方法，反复悉心研究后发现如下述试验例 1 所示，不切断图 25 所示 PALSAR 法中使用的成对探针与目标基因互补的区域时，如图 27 中箭头所示，依赖于杂交反应温度形成聚合物，但是另一方面，切断图 26 所示 PALSAR 法中使用的成对探针与目标基因互补的区域时，如图 28 所示在任意的杂交反应温度下均不会形成聚合物。

发现通过利用这种 PALSAR 法中使用的成对探针的性质，不用分离与目标基因连接的低聚核苷酸和未反应的多余的低聚核苷酸，仅在目标基因存在的场合就可以获得形成聚合物的探针，能够简单地检测出基因，从而完成了本发明。

本发明的目的在于提供一种基因的检测方法，通过利用 PALSAR 法，不需要捕获连接的低聚核苷酸和洗涤多余的低聚核苷酸的操作，能够通过聚合物的形成检测基因，另外通过在 PALSAR 法中使用的成对探针的 5'末端标记荧光物质，并使猝灭剂结合在 3'末端，不需要特殊的酶，采用 PALSAR 法形成双链聚合物时，能够根据荧光由于猝灭剂消失来检测基因。

为了解决上述课题，本发明的基因检测方法的第 1 种方式是一种采用通过使用复数对由  $n$  ( $n \geq 3$ ) 个互补碱基序列区域构成的成对探针，使之杂交达到相互交错的状态，从而形成双链聚合物的探针聚合物制备方法的基因检测方法，其特征在于，使上述成对的探针中任意一个探针的一个以上互补区域成为具有与目标基因的一部分互补的碱基序列的区域，预先切断上述成对探针与目标基因互补区域的单侧或两侧的一个部位或数个部位，通过控制温度，使之进行杂交反应、连接反应和解离反应，使上述切断的探针连接，形成完全探针，通过上述探针聚合物的制备方法形成双链聚合物，检测出上述目标基因。

而且，具体而言，具有与目标基因互补的区域并切断了这一部位的探针，在存在目标基因时，与目标基因杂交后，通过连接反应连接，之后通过热使双链解离。其次，尚未切断的探针与目标基因或连接的探针进行杂交后，通过连接反应进行连接，通过热使双链解离。通过控制温度，反复进行上述杂交反应→连接反应→解离反应，使探针连接，形成完全探针。连接的探针通过 PALSAR 法形成双链聚合物。不存在目标基因时，切断的探针不连接，切断的探针不形成聚合物。因此，根据聚合物的形成，能够检测出目标基因。

优选采用 DNA 连接酶、耐热性 DNA 连接酶或不使用酶的自动连接法进行上述连接反应。

上述目标基因可以使用单链 DNA 或 RNA。

上述目标基因可以使用双链 DNA 或 RNA。

优选设计成上述预选切断的探针部分与单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphisms: 以下称为 SNPs) 互补。

上述方法中，最好使用控制反应温度的仪器。

优选使猝灭剂 (Quencher: 使荧光消失的物质) 和荧光物质 (Fluorophore) 结合在上述使用的成对探针的单侧或两侧的末端，通过荧光的消失确认形成的双链聚合物。

#### 附图说明

图 1 是表示通过 1 个部位被切断的 PALSAR 法中使用的成对探针的

连接反应检测单链目标基因的一个实例的示意图，(a) 表示单链目标基因，(b) 表示具有与目标基因的 Y 区域互补的区域的一对探针，而且 (c) 表示将与目标基因互补的区域切断 1 处后的一对探针。

图 2 是表示通过 1 个部位被切断的 PALSAR 法中使用的成对探针的连接反应检测单链目标基因的一个实例的示意图，(d) 表示与目标基因互补的 Y 区域被切断 1 处后的探针，(e) 表示单链目标基因，(f) 表示切断的探针与目标基因的杂交反应，而且 (g) 表示切断的探针的连接反应。

图 3 是表示通过 1 个部位被切断的 PALSAR 法中使用的成对探针的连接反应检测单链目标基因的一个实例的示意图，(h) 表示连接的探针，(i) 表示成对的 HCP 的另一个探针，(j) 表示复数对连接的成对探针，而且 (k) 表示根据 PALSAR 法的原理形成聚合物。

图 4 是表示通过 1 个部位被切断的 PALSAR 法中使用的成对探针的连接反应检测双链目标基因的一个实例的示意图，(a) 表示双链目标基因，(b) 表示具有与双链目标基因的 Y 区域和 Y'区域互补的区域的一对探针，而且 (c) 表示将与双链目标基因互补的区域切断 1 处后的一对探针。

图 5 是表示通过 1 个部位被切断的 PALSAR 法中使用的成对探针的连接反应检测双链目标基因的一个实例的示意图，(d) 表示与目标基因互补的 Y 区域和 Y'区域被切断 1 处后的探针，(e) 表示双链解离的目标基因，(f) 表示切断的探针与解离的目标基因的杂交反应，而且 (g) 表示切断的探针的连接反应。

图 6 是表示通过 1 个部位被切断的 PALSAR 法中使用的成对探针的连接反应检测双链目标基因的一个实例的示意图，(h) 表示连接的探针，(i) 表示切断的探针，而且 (j) 表示连接的探针与切断的探针的杂交反应。

图 7 是表示通过 1 个部位被切断的 PALSAR 法中使用的成对探针的连接反应检测双链目标基因的一个实例的示意图，(k) 表示复数对连接的成对探针，而且 (l) 表示根据 PALSAR 法的原理形成聚合物。

图 8 是表示通过 3 个部位被切断的 PALSAR 法中使用的成对探针的

连接反应检测双链目标基因的一个实例的示意图，(a) 表示双链目标基因，(b) 表示具有与双链目标基因上的 X 区域和 X'区域、Y 区域和 Y'区域、Z 区域和 Z'区域互补的区域的一对探针，而且 (c) 表示将与目标基因互补的 3 个区域分别切断 1 处 (共计 3 处) 后的一对探针。

5 图 9 是表示通过 3 个部位被切断的 PALSAR 法中使用的成对探针的连接反应检测双链目标基因的一个实例的示意图，(d) 表示目标基因的 Y 区域与切断的探针的 Y'区域的杂交反应，(e) 表示目标基因的 X 区域与切断的探针的 X'区域的杂交反应，而且 (f) 表示目标基因的 Z 区域与切断的探针的 Z'区域的杂交反应。

10 图 10 是表示通过 3 个部位被切断的 PALSAR 法中使用的成对探针的连接反应检测双链目标基因的一个实例的示意图，(g) 表示连接的一对探针，(h) 表示切断的探针，(i) 表示连接的探针的 Z 区域与切断的探针的 Z'区域以及连接的探针的 X'区域与切断的探针的 X 区域的杂交反应，(j) 表示连接的探针的 Y 区域与切断的探针的 Y'区域的杂交反应，  
15 以及连接的探针的 Y'区域与切断的探针的 Y 区域的杂交反应，(k) 表示连接的探针的 X 区域与切断的探针的 X'区域的杂交反应，以及连接的探针的 Z'区域与切断的探针的 Z 区域的杂交反应。

图 11 是表示通过 3 个部位被切断的 PALSAR 法中使用的成对探针的连接反应检测双链目标基因的一个实例的示意图，(l) 表示复数对连接的成对探针，而且 (m) 表示根据 PALSAR 法的原理形成聚合物。  
20

图 12 是表示通过 1 个部位被切断的 PALSAR 法中使用的成对探针的连接反应检测 SNPs 的一个实例的示意图，(a) 表示具有与包含 SNPs 的目标基因互补的区域 (Y 区域)，并将这一区域切断 1 处后的一对探针，  
(b1) 表示使包含 SNPs 的目标基因的 SNPs 与切断了 1 处的探针的连接  
25 部分完全一致 (Complete match) 进行杂交时的杂交反应和连接反应，而且 (b2) 表示包含 SNPs 的目标基因的 SNPs 与切断了 1 处的探针的连接部分不匹配 (Mismatch) 时的杂交反应和连接反应。

图 13 是表示通过 1 个部位被切断的 PALSAR 法中使用的成对探针的连接反应检测 SNPs 的一个实例的示意图，(c) 表示与连接反应无关的探针通过碱性磷酸酶脱磷酸化，(d) 表示连接的探针，(e) 表示一对  
30

HCP 中未切断的另一个探针，而且 (f) 表示根据 PALSAR 法的原理形成聚合物。

图 14 是表示 Sephide 公司的 I-CORE™ (Smart Cyclor™) 的原理的说明图，(a) 表示反复通过侧面大致呈五角形状的容器以及侧壁冷却和加热，另外 (b) 表示确认有无荧光物质存在的方法。

图 15 是表示使用 Sephide 公司的 I-CORE™ (Smart Cyclor™) 通过 1 个部位被切断的 PALSAR 法中使用的成对探针的连接反应检测双链目标基因时的示意图，(a) 表示双链目标基因，(b) 表示将具有与双链目标基因的 Y 区域和 Y'区域互补的区域的一对探针的互补区域切断 1 处后的探针，而且 (c) 表示使用 Sephide 公司的 I-CORE™ (Smart Cyclor™) 的连接反应。

图 16 是表示使用 Sephide 公司的 I-CORE™ (Smart Cyclor™) 通过 1 个部位被切断的 PALSAR 法中使用的成对探针的连接反应检测双链目标基因时的示意图，(d) 表示双链目标基因，(e) 表示双链解离后的目标基因，(f) 表示目标基因与切断的探针的杂交反应，而且 (g) 表示切断的探针的连接反应。

图 17 是表示使用 Sephide 公司的 I-CORE™ (Smart Cyclor™) 通过 1 个部位被切断的 PALSAR 法中使用的成对探针的连接反应检测双链目标基因时的示意图，(h) 表示连接的一对探针，(i) 表示切断的一对探针，而且 (j) 表示连接的探针与切断的探针的杂交反应。

图 18 是表示使用 Sephide 公司的 I-CORE™ (Smart Cyclor™) 通过 1 个部位被切断的 PALSAR 法中使用的成对探针的连接反应检测双链目标基因时的示意图，(k) 表示复数对连接的成对探针，而且 (l) 表示根据 PALSAR 法的原理形成聚合物。

图 19 是表示使用 Sephide 公司的 I-CORE™ (Smart Cyclor™) 通过 1 个部位被切断的 PALSAR 法中使用的成对探针的连接反应检测双链目标基因时的示意图，(m) 表示根据 PALSAR 法的原理形成的聚合物，而且 (n) 表示使用 Sephide 公司的 I-CORE™ (Smart Cyclor™) 通过荧光检测聚合物的方法。

图 20 是通过分子标记 (Molecular Beacons) 检测按 PALSAR 法形成

的聚合物时（不一致）的示意图，（a）表示将 PALSAR 法中使用的探针与目标基因互补的区域（Y 区域）切断后的一对 HCP，而且（b）表示在 HCP 的 5'末端标记荧光物质，并使猝灭剂结合在 3'末端的一对切断的探针。

5 图 21 是通过分子标记检测按 PALSAR 法形成的聚合物时（完全一致）的示意图，（a）表示将 PALSAR 法中使用的探针与目标基因互补的区域（Y 区域）切断后的一对 HCP，而且（b）表示在 HCP 的 5'末端标记荧光物质，并使猝灭剂结合在 3'末端的一对切断的探针。

图 22 是通过分子标记检测按 PALSAR 法形成的聚合物时（完全一  
10 致）的示意图，（c）表示通过连接反应连接的一对探针，而且（d）表示根据 PALSAR 法的原理形成的聚合物引起的荧光消失。

图 23 是表示实施例 1、比较例 1、比较例 2、比较例 4 和比较例 5 的结果的照片，（a）表示 PAGE 的结果，而且（b）表示琼脂糖凝胶电泳法的结果。

15 图 24 是表示实施例 2~实施例 4 以及比较例 3~比较例 5 的结果的照片，（a）表示 PAGE 的结果，而且（b）表示琼脂糖凝胶电泳法的结果。

图 25 是表示试验例 1 中所使用的未将 PALSAR 法中使用的成对探针与目标基因互补的区域切断时的 DNA 探针的示意图。

图 26 是表示试验例 1 中所使用的将 PALSAR 法中使用的成对探针  
20 与目标基因互补的区域切断时的 DNA 探针的示意图。

图 27 是表示未将 PALSAR 法中使用的成对探针与目标基因互补的区域切断时的试验例 1 的结果的琼脂糖凝胶电泳法照片。

图 28 是表示将 PALSAR 法中使用的成对探针与目标基因互补的区域切断时的试验例 1 的结果的琼脂糖凝胶电泳法照片。

25

### 具体实施方式

以下结合附图说明本发明的实施方式，但是这些实施方式是示例性的，当然只要不脱离本发明的技术思想，能够进行各种变形。

另外，以下所示的实施方式中使用的连接反应并不限于使用连接  
30 酶（Ligase）的方法和不使用酶而使用特殊低聚核苷酸的方法中的任意

一种。

图 1~图 3 是表示通过 1 个部位被切断的 PALSAR 法中使用的成对探针的连接反应检测单链目标基因的一个实例的示意图。

如图 1 (a) (b) 所示, 由单链目标基因制作具有与目标基因互补的区域 (Y'区域) 的 HCP 及其对的 HCP (图 1 (b)), 如图 1 (c) 所示, 5 预先将具有与目标基因的 Y 区域互补的区域的探针 (图 1 (b)) 的 Y'区域的一处切断。切断的探针 (图 2 (d)) 如图 2 (f) 所示, 与目标基因杂交后, 如图 2 (g) 所示, 通过连接反应连接。

其次, 该连接的探针 (图 3 (h)) 和切断的探针 (图 2 (d)) 通过将 10 温度控制在  $94^{\circ}\text{C}\sim 25^{\circ}\text{C}$  的范围内反复进行解离、杂交和连接反应后 (图 2 (f)、图 2 (g)、图 3 (h)), 连接的探针 (图 3 (h)) 与另外加入的另一个 HCP (图 3 (i) (j)) 反应, 如图 3 (k) 所示, 根据 PALSAR 法的原理形成聚合物。

这里形成的聚合物能够通过一般的琼脂糖凝胶电泳法或下述检测方法 15 法 (图 20~图 22) 简单地确认。

另外, 也可以使用同时在互补区域将成对探针切断的探针。

图 4~图 7 是表示通过 1 个部位被切断的 PALSAR 法中使用的成对探针的连接反应检测双链目标基因的一个实例的示意图。

如图 4 (a) (b) 所示, 由双链目标基因制作具有与目标基因互补的区域的一对 HCP, 如图 4 (c) 所示, 预先将具有与图 4 (a) 所示双链目标基因上的 Y 区域和 Y'区域互补的区域的探针 (图 4 (b)) 的 Y'区域和 Y 区域的一处切断。切断的探针 (图 5 (d)) 如图 5 (f) 所示与双链解离的目标基因 (图 5 (e)) 杂交后, 如图 5 (g) 所示, 通过连接反应连接。其次, 该连接的探针 (图 6 (h)) 和图 6 (i) 的切断的探针杂交后, 25 如图 6 (j) 所示, 通过连接反应连接。

连接的探针 (图 6 (h)) 和切断的探针 (图 5 (d)) 通过将温度控制在  $94^{\circ}\text{C}\sim 25^{\circ}\text{C}$  的范围内反复进行解离、杂交和连接反应后 (图 6 (j)、图 7 (k)), 如图 7 (l) 所示, 根据 PALSAR 法的原理形成聚合物。

这里形成的聚合物能够通过一般的琼脂糖凝胶电泳法或下述检测方法 30 法 (图 20~图 22) 简单地确认。

图 8~图 11 是表示通过 3 个部位被切断的 PALSAR 法中使用的成对探针的连接反应检测双链目标基因的一个实例的示意图。

如图 8 (a) (b) 所示, 由双链目标基因制作具有与目标基因 3 处互补的区域的一对 HCP, 如图 8 (c) 所示, 预先分别将具有与图 8 (a) 所示双链目标基因上的 X 区域和 X'区域、Y 区域和 Y'区域、Z 区域和 Z'区域互补的区域的探针 (图 8 (b)) 的各区域的一处 (共计 3 处) 切断。切断的探针 (图 8 (c)) 如图 9 (d) (e) (f) 所示, 与解离的目标基因杂交后, 通过连接反应连接。

其次, 该连接的探针 (图 10 (g)) 和预先将 3 处切断的探针 (图 10 (h)) 通过将温度控制在  $94^{\circ}\text{C}\sim 25^{\circ}\text{C}$  的范围内反复进行解离、杂交和连接反应后 (图 10 (i) (j) (k)、图 11 (l)), 如图 11 (m) 所示, 根据 PALSAR 法的原理形成聚合物。

这里形成的聚合物能够通过一般的琼脂糖凝胶电泳法或下述检测方法 (图 20~图 22) 简单地确认。

图 12~图 13 是表示通过 1 个部位被切断的 PALSAR 法中使用的成对探针的连接反应检测 SNPs 的一个实例的示意图。

图 12 (a) 表示将 PALSAR 法中使用的一对探针中与包含 SNPs 的目标基因互补的区域 (Y) 切断 1 处后的探针。

如图 12 (b1) 所示, 使包含 SNPs 的目标基因的 SNPs 与切断了 1 处的探针的连接部分完全一致 (Complete match) 进行杂交时, 切断的探针通过连接反应连接, 而包含 SNPs 的目标基因的 SNPs 与切断了 1 处的探针的连接部分不匹配 (Mismatch) 时, 即使进行杂交反应, 也不能进行连接反应, 因此探针仍然断开 (图 12 (b2))。

之后, 与连接反应无关的探针如图 13 (c) 所示通过碱性磷酸酶进行脱磷酸化, 能够形成对连接反应不能应答的形态。

连接的探针 (图 13 (d)) 与另外加入的另一个 HCP (图 13 (e)) 反应, 如图 13 (f) 所示, 根据 PALSAR 法的原理形成聚合物。

这里形成的聚合物能够通过一般的琼脂糖凝胶电泳法或下述检测方法 (图 20~图 22) 简单地确认。

图 14 是表示本发明方法中优选使用的控制反应温度的仪器的说明

图。该图表示 Sephide 公司的 I-CORE™ (Smart Cyclor™)，该反应温度控制仪器具有侧面大致呈五角形状的容器主体，该容器主体具备具有高热传导性的一对侧壁以及互相倾斜接合的倾斜底板。因此，如图 14 (a) 所示，能够通过侧壁反复进行冷却和加热。另外，如图 14 (b) 所示，为了确认有无荧光物质的存在，能够通过由一侧的倾斜底板投射激发光，由另一侧的倾斜底板观察发光状态进行。

图 15~图 19 是表示使用 Sephide 公司的 I-CORE™ (Smart Cyclor™) 通过上述 1 个部位被切断的 PALSAR 法中使用的成对探针的连接反应检测双链目标基因时的示意图。

10 向图 15 (c) 的反应池中加入目标基因 (图 15 (a)) 和 1 处被切断的 PALSAR 法中使用的成对探针 (图 15 (b))。

只有在能够控制温度的反应池中存在检测的目标基因 (图 16 (d)) 时，解离的目标基因 (图 16 (e)) 和切断的聚合物发生杂交反应 (图 16 (f))，探针通过连接反应连接 (图 16 (g))。连接的探针 (图 17 (h)) 和切断的探针 (图 17 (i)) 通过将温度控制在 94℃~25℃的范围内反复进行解离、杂交和连接反应后 (图 17 (j)、图 18 (k))，如图 18 (l) 所示，根据 PALSAR 法的原理形成聚合物。

形成的聚合物 (图 19 (m)) 可以通过添加插入到低聚核苷酸的双链中发出荧光的色素，使用 Sephide 公司的 I-CORE™ (Smart Cyclor™)，观察荧光的发光状态进行检测 (图 19 (n))。

这里形成的聚合物能够通过一般的琼脂糖凝胶电泳法或下述检测方法 (图 20~图 22) 简单地确认。

图 20~图 22 是通过分子标记 (Molecular Beacons) 检测按 PALSAR 法形成的聚合物时的示意图。

25 它是将图 20 (a) 和图 21 (a) 所示的 PALSAR 法中使用的探针与目标基因互补的区域 (Y 区域和 Y'区域) 切断，在其 HCP 的 5'末端标记荧光物质，并使猝灭剂结合在 3'末端 (图 20 (b)、图 21 (b))，从而与目标基因互补的区域 (Y 区域和 Y'区域) 不匹配时 (图 20 (b))，不能通过 PALSAR 法形成聚合物，保持发出荧光的状态，而与目标基因互补的区域 (Y 区域和 Y'区域) 完全一致时 (图 21 (b))，能够通过连接反

30

应获得 HCP (图 22 (c)), 如图 22 (d) 所示, 通过 PALSAR 法形成聚合物, 而且 5'末端和 3'末端邻接, 从而根据荧光由于猝灭剂消失能够检测基因的方法。另外, 也可以采用用增强子代替猝灭剂的方法。

另外, 图中, 前端锐角部分表示 3'末端, 起始端黑圆圈表示 5'末端。

5

### 实施例

以下结合本发明的实施例进行说明, 但是本发明当然并不限于这些实施例。

实施例 1~4 和比较例 1~5 中使用的 DNA 探针和目标基因

10 a) 探针 1 (INT-1): (5'-X'-Y'-Z'-3')

5' - ACGCAGAAAGCGTCTAGC - CGCTCACAGTTAAG  
CCGTGAGATTCAC-GTACTGCCTGATAGGGTG-3'

b) 探针 2 (INT-2): (5'-X-Y-Z-3')

15 5'-GCTAGACGCTTTCTGCGT-GTGAAATCTCACGG  
CTTAACTGTGAGCG-CACCCCTATCAGGCAGTAC-3'

c) 探针 3 (INT-1-A): (5'-X'-Y' (切断) -3')

5'-ACGCAGAAAGCGTCTAGC-CGCTCACAGTTAAG-3'

d) 探针 4 (INT-1-B): (5'-Y' (切断) -Z'-3')

5' (磷酸化) -CCGTGAGATTCAC-GTACTGCCTGATAGGGTG-3'

20 e) 探针 5 (INT-2-C): (5'-X-Y (切断) -3')

5'-GCTAGACGCTTTCTGCGT-GTGAAATCTCACGG-3'

f) 探针 6 (INT-2-D): (5'-Y (切断) -Z-3')

5' (磷酸化) -CTTAACTGTGAGCG-CACCCCTATCAGGCAGTAC-3'

g) 目标基因 (INT-①): (5'--Y--3')

25 5' - GGTTTGTCGCGTTGTTT - GTGAAATCTCACG G C TTAACT  
GTGAGCG-TGCGGGCGATACGGG-3'

h) 目标基因 (INT-①S1): (5'--Y--3')

5'-GGTTTGTCGCGTTGTTT-GTGAAATCTCACG T C TTAACT  
GTGAGCG-TGCGGGCGATACGGG-3'

30 i) 目标基因 (INT-①S2): (5'--Y--3')

5'—GGTTTGTCTCGCGTTGTTC—GTGAAATCTCACG G G—  
TTAACTGTGAGCG—TGC GGGCGATACGGG—3'

j) 目标基因 (INT-①R) : (5'—Y'—3')

5'—CCCGTATCGCCCGCA—CGCTCACAGTTAAG—

5 CCGTGAGATTTAC—GAACAACGCGACAAACC—3'

(实施例 1、比较例 1 和比较例 2) HCP 中的连接反应 (目标基因: 双链)

### 1、目的

尝试通过 1 处被切断的 HCP 的连接反应检测双链目标基因。

### 10 2、材料

1) 关于目标基因, 制作源于 *Mycobacterium intracellulare* 16s rRNA 基因的 60 个碱基的合成低聚核苷酸 (以下称为 INT-①) 以及与目标基因 INT-①互补序列的合成低聚核苷酸 (以下称为 INT-①R), 使两者形成双链, 进行以下的实验。

15 2) 制作由具有与目标基因 INT-①的 Y 区域互补的区域的探针 1 (以下称为 INT-1) 以及各区域与该探针 1 互补的探针 2 (以下称为 INT-2) 构成的成对 HCP。并且准备分别将其 1 处切断后得到的探针 (以下分别称为 INT-1-A、INT-1-B、INT-2-C、INT-2-D)。

20 3) 作为耐热性 DNA 连接酶, 使用将 Tsc DNA ligase, thermostable (Roche Molecular Biochemicals) 添加到培养缓冲液 (Incubation buffer) 中的物质。

4) 作为缓冲液使用 20×SSC (3M-NaCl, 0.3M-C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>Na<sub>3</sub>·2H<sub>2</sub>O, pH7.0)。

### 3、方法

#### 25 a) 反应液的配制

将分别配制成 100pmol/μL 的 INT-1-A、INT-1-B、INT-2-C 以及 INT-2-D 0.5μL 分别加入 0.2mL 的灭菌后的微管中, 加入连接酶 1μL、培养缓冲液 2μL, 加入配制成 100pmol/μL 的由 INT-①和 INT-①R 构成双链的目标基因 1μL, 通过 DW<sup>2</sup> 制成 20μL 的反应液 (实施例 1)。

30 另外, 作为对照, 制作相对于上述反应液未添加目标基因的反应液 (比

较例 1), 以及连接酶和目标基因均未添加的反应液 (比较例 2)。

#### b) 连接反应

之后, 使用热循环装置 (Parkinermar 公司制), 使上述各种反应液在 94°C 下反应 2 分钟, 然后循环进行 (94°C/30 秒→50°C/2 分钟→55°C/5 分钟) 的反应 30 次, 使之分别进行连接反应。之后, 通过 99°C/10 分钟, 进行用于使连接酶惰化的反应。

#### c) 通过聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE) 确认连接

在连接反应之后, 对各反应液进行 PAGE。使用反应液 5 $\mu$ L, 用 16% PAGE (30% Acrylamide/Bis Solution 29:1, 10% Ammonium Persulfate, TEMED, Bio-Rad Laboratories, 10% TBE, H<sub>2</sub>O) 在 90 分钟、130V 的条件下进行电泳。作为对照使用 INT-①、INT-①R、以及 INT-①和 INT-①R 构成的双链目标基因。作为分子尺寸标记使用 10bpDNA 梯 (DNA Ladder, GIBCO BRL 公司制)。电泳 90 分钟后, 用溴化乙锭 (EtBr Solution, 株式会社 NIPPON GEN 制) 将凝胶染色。

#### d) 聚合物形成反应

分别向 0.2mL 微管中的上述连接反应后的反应液 10 $\mu$ L 中加入 20 $\times$  SSC 10 $\mu$ L, 使用热循环装置 (Parkinermar 公司制), 使之在 66°C 反应 16 小时。

#### e) 通过琼脂糖凝胶电泳法确认聚合物

对于聚合物形成反应后的反应液 8 $\mu$ L, 用 2% Nusieve 3:1 琼脂糖凝胶 (Bio Whittaker Molecular Applications 公司制) 在 100V 电泳 30 分钟。作为分子尺寸标记使用 1kbDNA 延伸梯 (DNA Extension Ladder, GIBCO BRL 公司制)。琼脂糖凝胶电泳后, 用溴化乙锭将凝胶染色。

### 4、结果

结果如图 23 (a) 和 (b) 所示。根据图 23 (a) 的用于确认连接的 PAGE 的结果, 添加目标基因时 (实施例 1、泳道 1) 检测出对照 (比较例 2、泳道 2) 中未见到的用箭头表示的较高位置的条带。认为该条带是连接反应的结果得到的已连接探针的条带。另外, 在图中没有显示, 比较例 1 也得到了与比较例 2 同样的结果。

如图 23 (b) 所示, 通过琼脂糖凝胶电泳法确认聚合物形成时, 仅

在添加了目标基因的场所（实施例 1、泳道 1）中能够观察到聚合物的形成，比较例 1（泳道 2）和比较例 2（泳道 3）中观察不到聚合物。上述内容表明，切断的 HCP 通过双链目标基因连接，连接的 HCP 形成聚合物，从而能够检测出双链目标基因。

5

（实施例 2~4 以及比较例 3）通过 HCP 的连接反应检测 SNPs

### 1、目的

讨论通过 1 处被切断的 HCP 的连接反应是否能够检测单链目标基因和 SNPs。

10

### 2、材料

除实施例 1 中使用的探针、连接酶、连接缓冲液、缓冲液以及目标基因 INT-①之外，重新制作 INT-①的 Y 区域仅 1 个碱基不同的目标基因 INT-①S1（与切断 HCP 的 Y 区域 5'末端互补的部分的 1 个碱基不同）和 INT-①S2（与切断 HCP 的 Y 区域 3'末端互补的部分的 1 个碱基不同）。

15

### 3、方法

#### a) 反应液的配制

将分别配制成 100pmol/μL 的 INT-1-A、INT-1-B、INT-2-C 以及 INT-2-D 0.5μL 分别加入 0.2mL 的灭菌后的微管中，加入连接酶 1μL、培养缓冲液 2μL，加入配制成 100pmol/μL 的目标基因 0.5μL，通过 DW<sup>2</sup> 分别制成 20μL 的反应液。作为目标基因，在实施例 2 中选择 INT-①，在实施例 3 中选择 INT-①S1，在实施例 4 中选择 INT-①S2。另外，作为对照，制作相对于上述反应液未添加目标基因（INT-①、INT-①S1 和 INT-①S2）的反应液（比较例 3）。

20

#### b) 连接反应

之后，使用热循环装置（Parkinermar 公司制），对于上述各种反应液，循环进行（94°C/30 秒→50°C/90 秒→55°C/3 分钟）的反应 30 次，使之分别进行连接反应。之后，通过 99°C/10 分钟，进行用于使连接酶惰化的反应。

25

#### c) 通过聚丙烯酰胺凝胶电泳（PAGE）的确认

30

采用与实施例 1 同样的步骤和条件，对于各反应液通过 PAGE 进行确认。作为对照，使用 INT-①、INT-①S1 和 INT-①S2。作为分子尺寸标记，除 10bpDNA 梯以外，还使用 50bpDNA 梯 (DNA Ladder, GIBCO BRL 公司制)。

5        d) 聚合物形成反应

采用与实施例 1 同样的步骤和条件，对上述连接反应后的反应液进行聚合物形成反应。

      e) 通过琼脂糖凝胶电泳法确认聚合物

10        采用与实施例 1 同样的步骤和条件，对于聚合物形成反应后的反应液进行琼脂糖凝胶电泳。

      4、结果

结果如图 24 (a) 和 (b) 所示。根据图 24 (a) 的用于确认连接的 PAGE 的结果，添加了 INT-①的实例 (实施例 2、泳道 1) 中，由于目标基因和切断探针的 Y 区域的序列完全匹配，因此进行连接反应，在高  
15        于约 350bp 的位置可见用箭头表示的浓条带。与此相对，添加了 SNPs 即 INT-①S1 (实施例 3、泳道 2) 和 INT-①S2 (实施例 4、泳道 3) 的实例中，由于目标基因和切断探针的 Y 区域的序列有 1 个碱基不同 (不匹配)，因此不发生连接反应，确认没有泳道 1 中看见的条带。另一方面，仅有连接酶而未添加目标基因的泳道 3 (比较例 3) 中，仅可以确认切断  
20        的 4 根探针连结成环状得到的浓条带。

如图 24 (b) 所示，通过琼脂糖凝胶电泳法确认聚合物形成时，也只有添加了目标基因和切断探针的 Y 区域的序列完全匹配的 INT-①的实例 (实施例 2、泳道 1) 形成了聚合物，实施例 3 (泳道 2) 和实施例 4 (泳道 3) 没有观察到聚合物。另外，图中没有显示，比较例 3 也与  
25        实施例 3 和 4 同样没有观察到聚合物。以上内容表明，切断的 HCP 通过序列完全匹配的单链目标基因连接，连接的 HCP 形成聚合物，从而能够检测出单链目标基因。而且，SNPs 的场合，切断的 HCP 不能连接，也不能形成聚合物，因此能够通过 1 处被切断的 HCP 的连接反应检测出 SNPs。

30

(比较例 4 和比较例 5)

### 1、目的

比较切断 HCP 的场合和不切断 HCP 的场合下通过 PALSAR 法形成聚合物的反应。

### 5 2、材料

1) 作为比较例 4 的探针, 使用 INT-1 和 INT-2, 作为比较例 5 的探针, 使用 INT-1-A、INT-1-B、INT-2-C 和 INT-2-D。

2) 作为缓冲液使用 20×SSC (3M-NaCl, 0.3M-C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>Na<sub>3</sub> · 2H<sub>2</sub>O, pH7.0)。

### 10 3、方法

#### a) 反应液的配制

分别在 0.2mL 的灭菌后的微管中加入 20×SSC 20μL、分别配制成 100pmol/μL 的探针 0.5μL, 通过 DW<sup>2</sup> 分别制成 20μL 的反应液。作为探针, 在比较例 4 中选择 INT-1 和 INT-2, 在比较例 5 中选择 INT-1-A、INT-1-B、INT-2-C 和 INT-2-D。

15

#### b) 聚合物形成反应

使用热循环装置 (Parkinermar 公司制), 使各反应液在 94℃ 下反应 30 秒后, 在 66 反应 16 小时。

#### c) 通过琼脂糖凝胶电泳法确认聚合物

采用与实施例 1 同样的步骤和条件, 对反应后的反应液进行琼脂糖凝胶电泳。

20

### 4、结果

如图 23 (b) 和图 24 (b) 所示, 使用未切断的探针的比较例 4 中, 观察到聚合物的形成, 使用切断的探针的比较例 5 中, 没有观察到聚合物的形成。

25

(试验例 1) 通过 PALSAR 法使用 HCP 的形成聚合物的反应

### 1、目的

比较在将 PALSAR 法中使用的成对探针切断 1 处的场合以及未切断的场合温度变化时的聚合物的形成反应。

30

### 工业实用性

如上所述，按照本发明的基因检测方法，通过利用 PALSAR 法，不需要捕获连接的低聚核苷酸和洗涤多余的低聚核苷酸的操作，能够通过聚合物的形成检测基因，另外通过在 PALSAR 法中使用的成对探针的 5' 末端标记荧光物质，并使猝灭剂结合在 3' 末端，从而不需要特殊的酶，采用 PALSAR 法形成双链聚合物时，能够根据荧光由于猝灭剂消失来检测基因，产生了显著的效果。

## 2、材料

1) 聚合时使用以下的成对 HCP (探针 7、探针 8) 以及将探针 7 切断 1 处得到的探针, 即探针 9、探针 10。

a) 探针 7 (HCP-1)

5 5' - GAATAAGTCATAGCTCATA - AAGGACTGG TCGCTCGAC -  
ATCGTCCTAGGGAGATTCG-3'

b) 探针 8 (HCP-2)

5' - TATGAGCTATGACTTATTC - GTCGAGCGACCAGTCCTT -  
CGAATCTCCCTAGGACGAT-3'

10 c) 探针 9 (HCP-1-1)

5'-GAATAAGTCATAGCTCATA-AAGGACTGG-3'

d) 探针 10 (HCP-1-2)

5' (磷酸化) -TCGCTCGAC-ATCGTCCTAGGGAGATTCG-3'

2) 作为缓冲液使用 20×SSC (3M-NaCl, 0.3M-C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>Na<sub>3</sub> · 2H<sub>2</sub>O,  
15 pH7.0)。

## 3、方法

分别向 0.2mL 的灭菌后的微管中加入配制成 10<sup>13</sup> 拷贝/μL 的探针 7 和探针 8, 或者探针 9、探针 10 和探针 8 5μL, 加入 40μL 的 20×SSC, 加盖后, 在 94℃ 下煮沸 30 秒, 在 52℃、54℃、56℃、58℃、60℃、62  
20 ℃、64℃、66℃、68℃、70℃ 下分别加热 30 分钟。

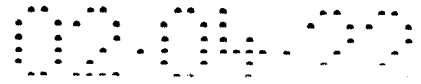
加热后, 使用 0.5% 的琼脂糖凝胶进行电泳, 通过溴化乙锭染色, 确认聚合的效果。

## 4、结果

图 27 和图 28 用照片表示使用 0.5% 的琼脂糖凝胶进行 100V、30 分  
25 钟的电泳得到的试验例 1 的结果。

图 27 是表示未将 PALSAR 法中使用的成对探针切断时的结果的照片。如图 27 中箭头所示, 未切断的 HCP 依赖于杂交温度形成双链聚合物。

图 28 是表示将 PALSAR 法中使用的成对探针切断 1 处时的结果的照片。如图 28 所示, 在任何杂交温度下均不形成聚合物。  
30



序列表

<110> Sanko Junyaku Co., Ltd.

<120> Gene detecting method

<130> 76014-PCT-CN

<140> PCT/JP01/07020

<141> 2001-08-14

<150> JP 2000-261687

<151> 2000-08-30

<160> 14

<210> 1

<211> 66

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 探针1

<400> 1

acgcagaaag cgtctagccg ctcacagtta agccgtgaga tttcacgtac tgcctgatag 60

ggtg

64

<210> 2

<211> 64

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 探针2

<400> 2

gctagacgct ttctgcgtgt gaaatctcac ggcttaactg tgagcgcacc ctatcaggca 60

gtac

64

<210> 3

<211> 32

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 探针 3



<400> 3  
 acgcagaaag cgtctagccg ctcacagtta ag 32

<210> 4  
 <211> 32  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <221> misc feature  
 <222> (1)  
 <223> 连接在5'末端的磷酸

<220>  
 <223> 人工序列的描述: 探针 4

<400> 4  
 ccgtgagatt tcacgtactg cctgataggg tg 32

<210> 5  
 <211> 32

<212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工序列的描述: 探针 5

<400> 5  
 gctagacgct ttctgcgtgt gaaatctcac gg 32

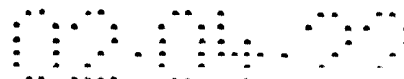
<210> 6  
 <211> 32  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <221> misc feature  
 <222> (1)  
 <223> 连接在5'末端的磷酸

<220>  
 <223> 人工序列的描述: 探针 6

<400> 6  
 cttaactgtg agcgcaccct atcaggcagt ac 32

<210> 7



<211> 60  
<212> DNA  
<213>人工序列

<220>  
<223> 人工序列的描述: 目标基因-1

<400> 7

ggtttgctgc gttgttcgtg aaatctcacg gcttaactgt gagcgtgcgg gcgatacggg 60

<210> 8  
<211> 60  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列的描述: 目标基因-S1

<400> 8  
ggtttgctgc gttgttcgtg aaatctcacg tcttaactgt gagcgtgcgg gcgatacggg 60

<210> 9  
<211> 60  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列的描述: 目标基因-S2

<400> 9  
ggtttgctgc gttgttcgtg aaatctcacg ggtaactgt gagcgtgcgg gcgatacggg 60

<210> 10  
<211> 54  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列的描述: 目标基因-1R

<400> 10  
cccgtatcgc cgcacgctc acagttaag cctgagattt cacgaacaac gcgacaaacc 60

<210> 11  
<211> 54  
<212> DNA  
<213> 人工序列



<220>

<223> 人工序列的描述: 探针7

<400> 11

gaataagtca tagctcataa aggactggtc gctcgacatc gtcctaggga gattcg 56

<210> 12

<211> 56

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 探针8

<400> 12

tatgagctat gacttattcg tcgagcgacc agtccttcca atctccctag gacgat 56

<210> 13

<211> 28

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 探针9

<400> 13

gaataagtca tagctcataa aggactgg 28

<210> 14

<211> 28

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> misc feature

<222> (1)

<223> 连接在5'末端的磷酸

<220>

<223> 人工序列的描述: 探针 10

<400> 14

tcgctcgaca tcgtcctagg gagattcg 28

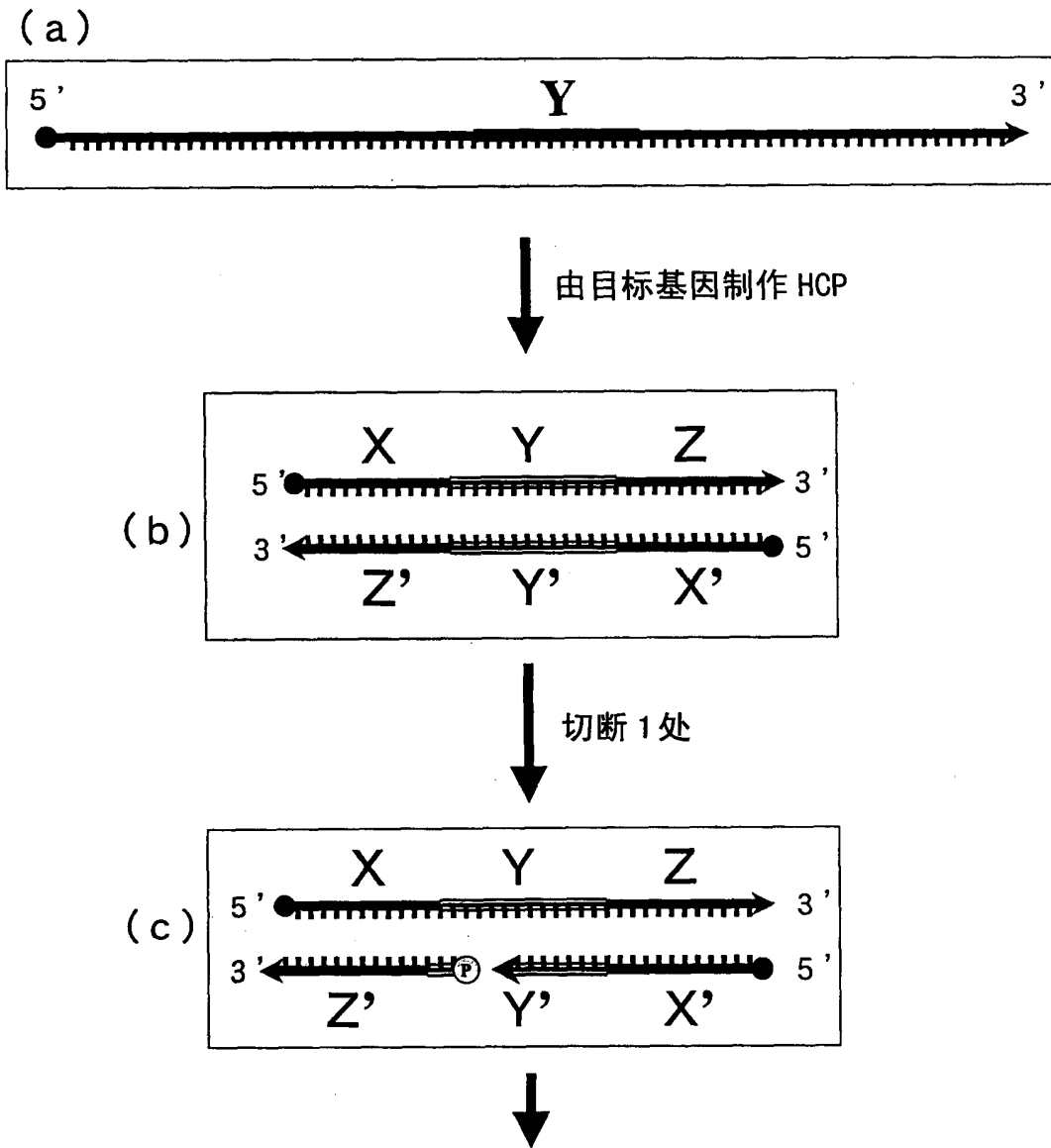


图 1

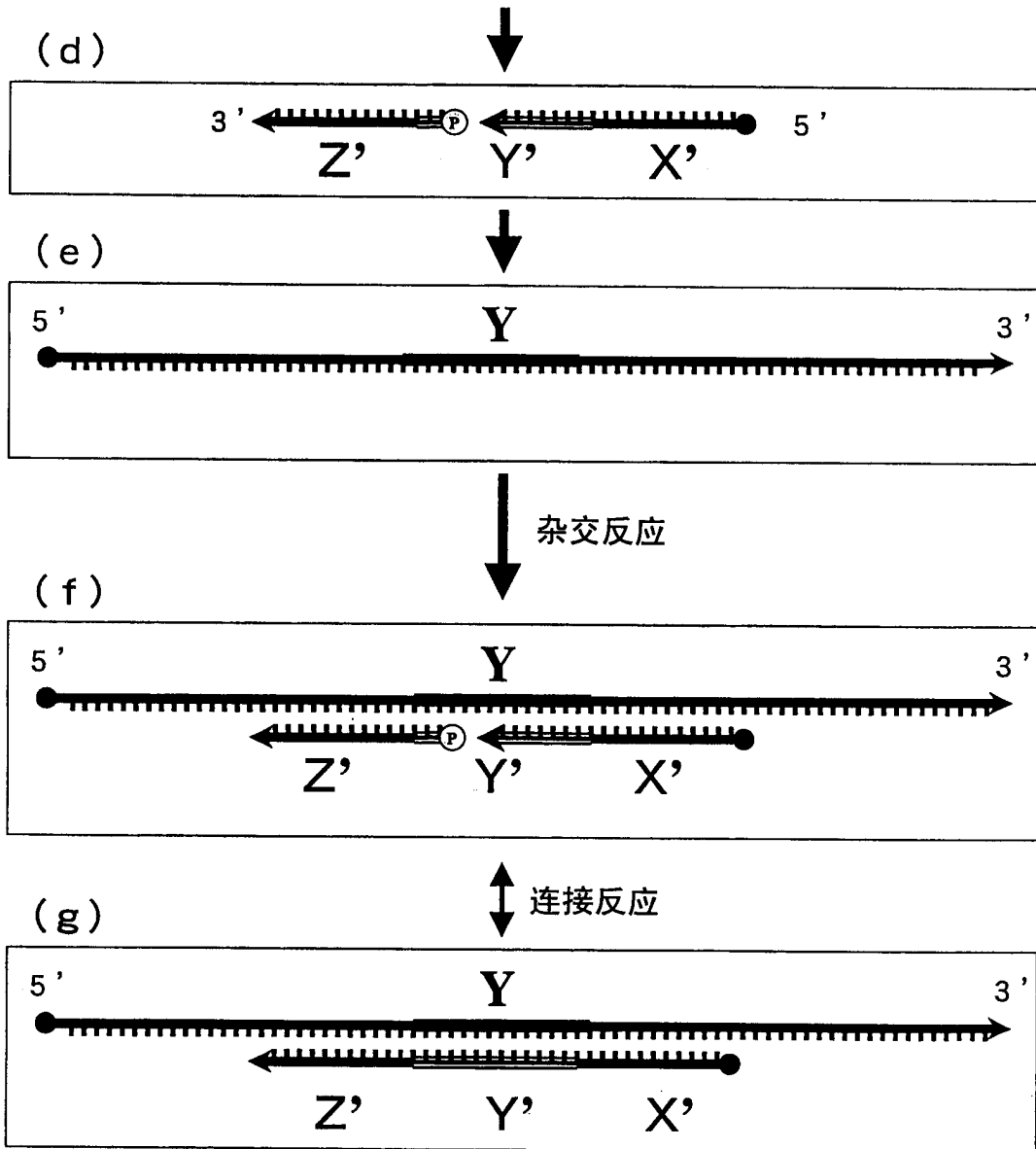


图 2

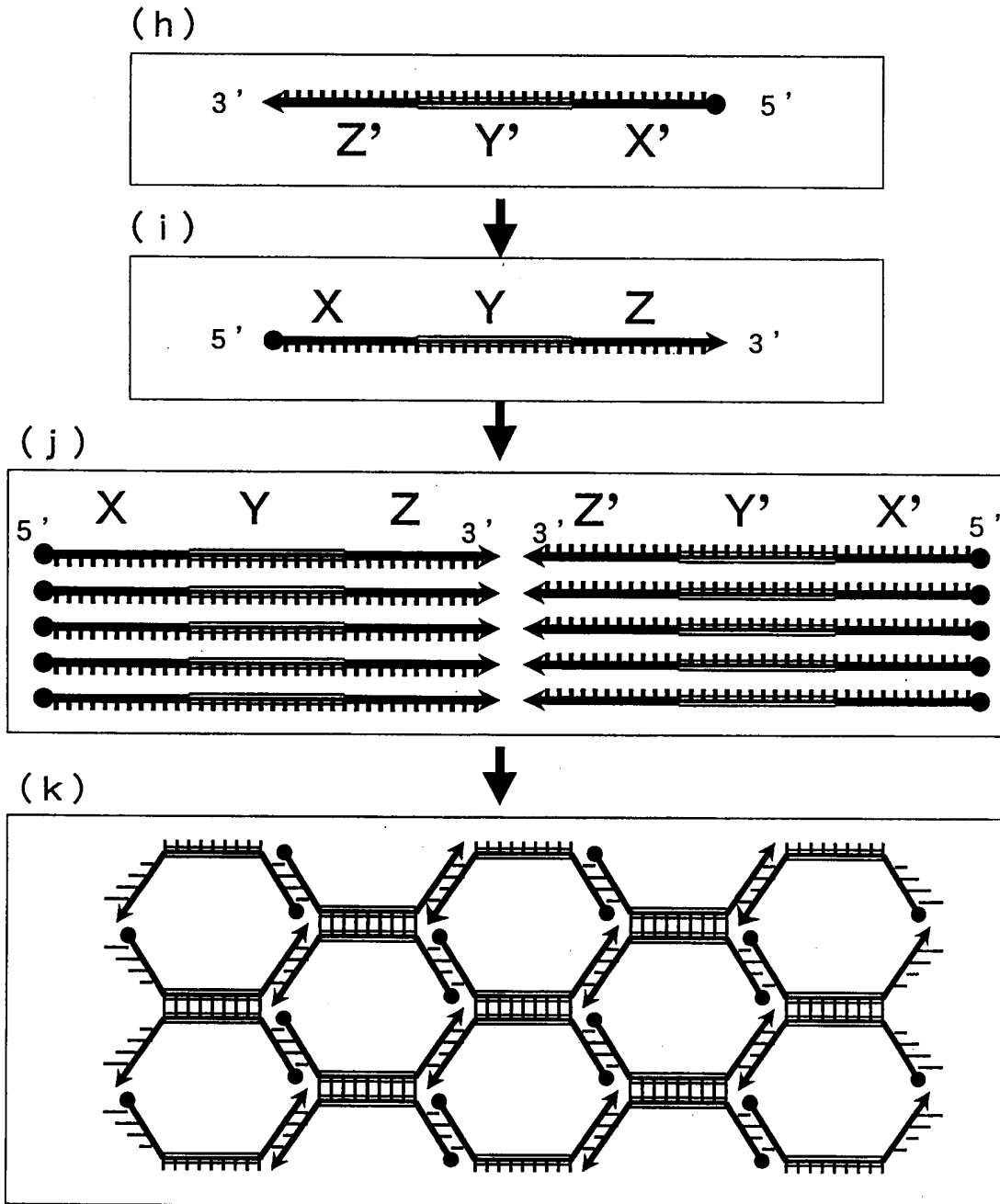


图 3

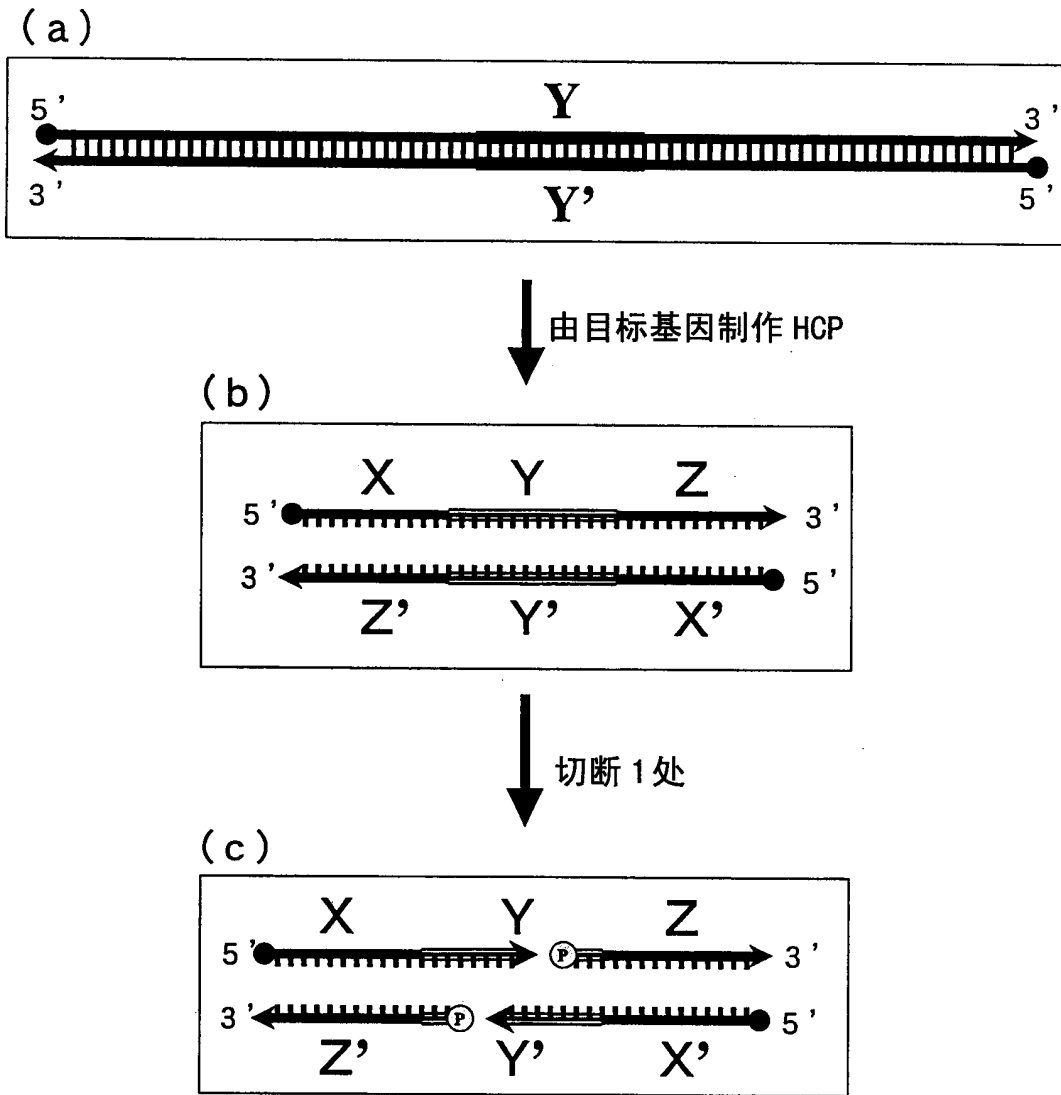
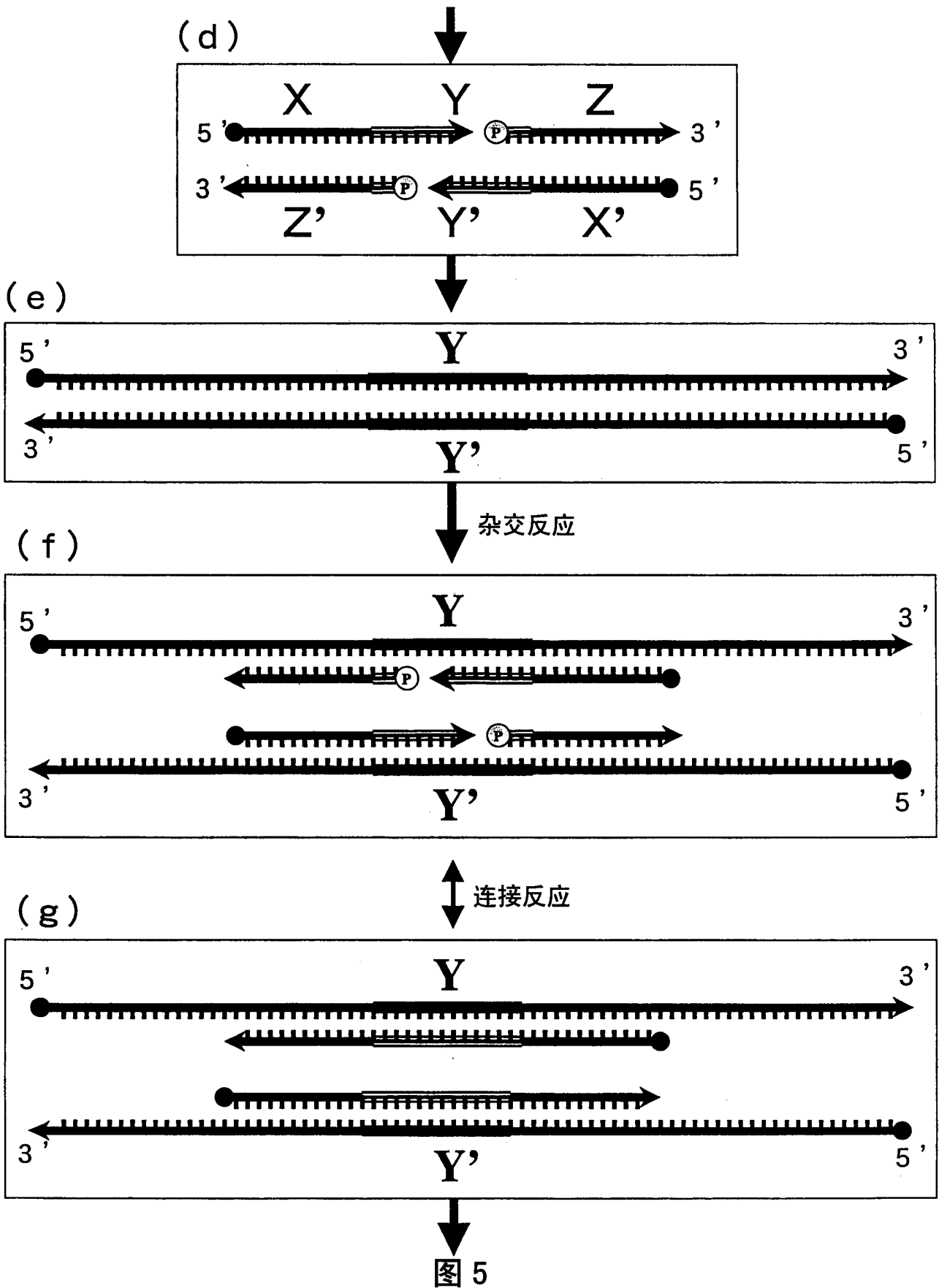


图 4



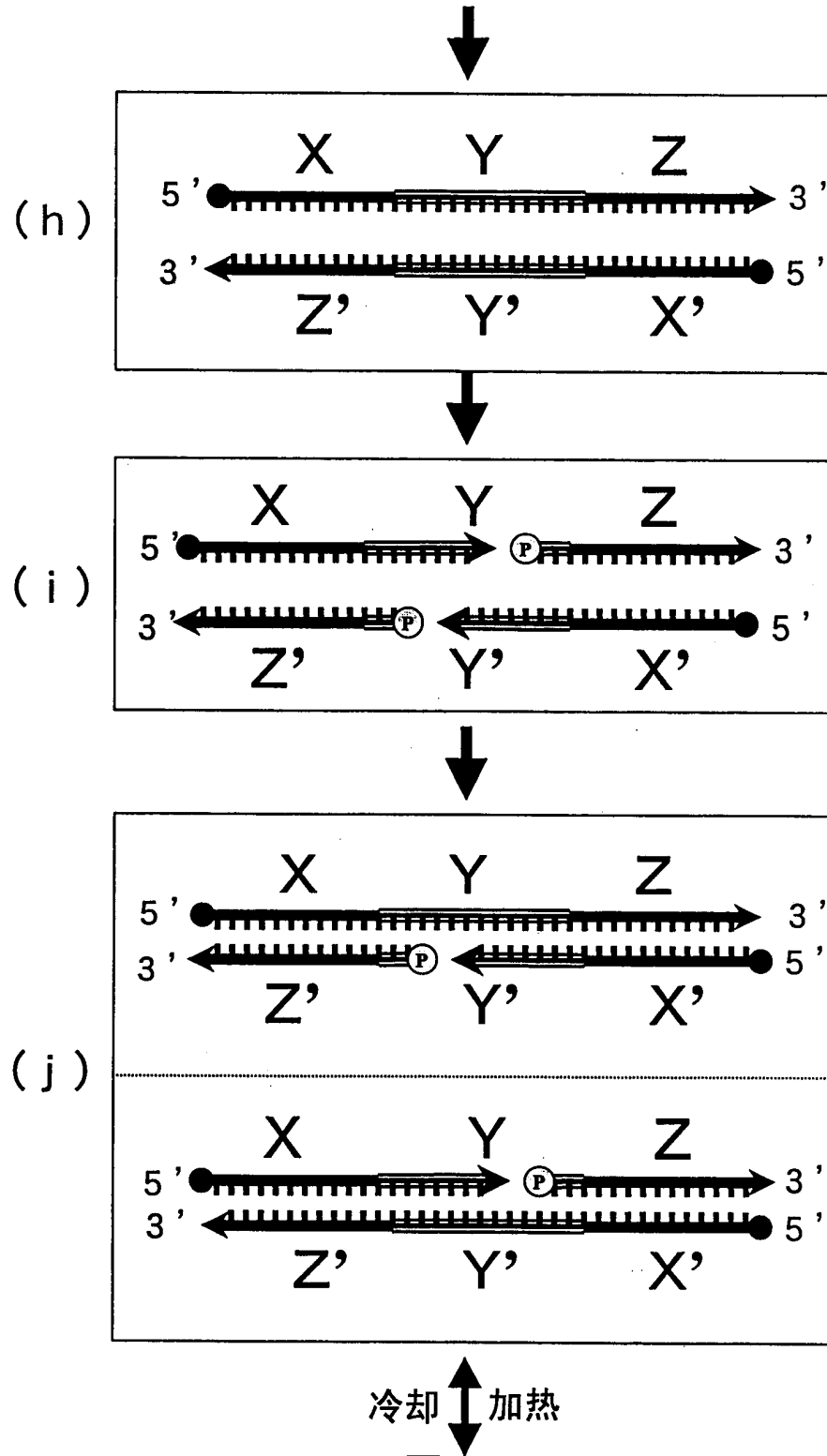


图 6

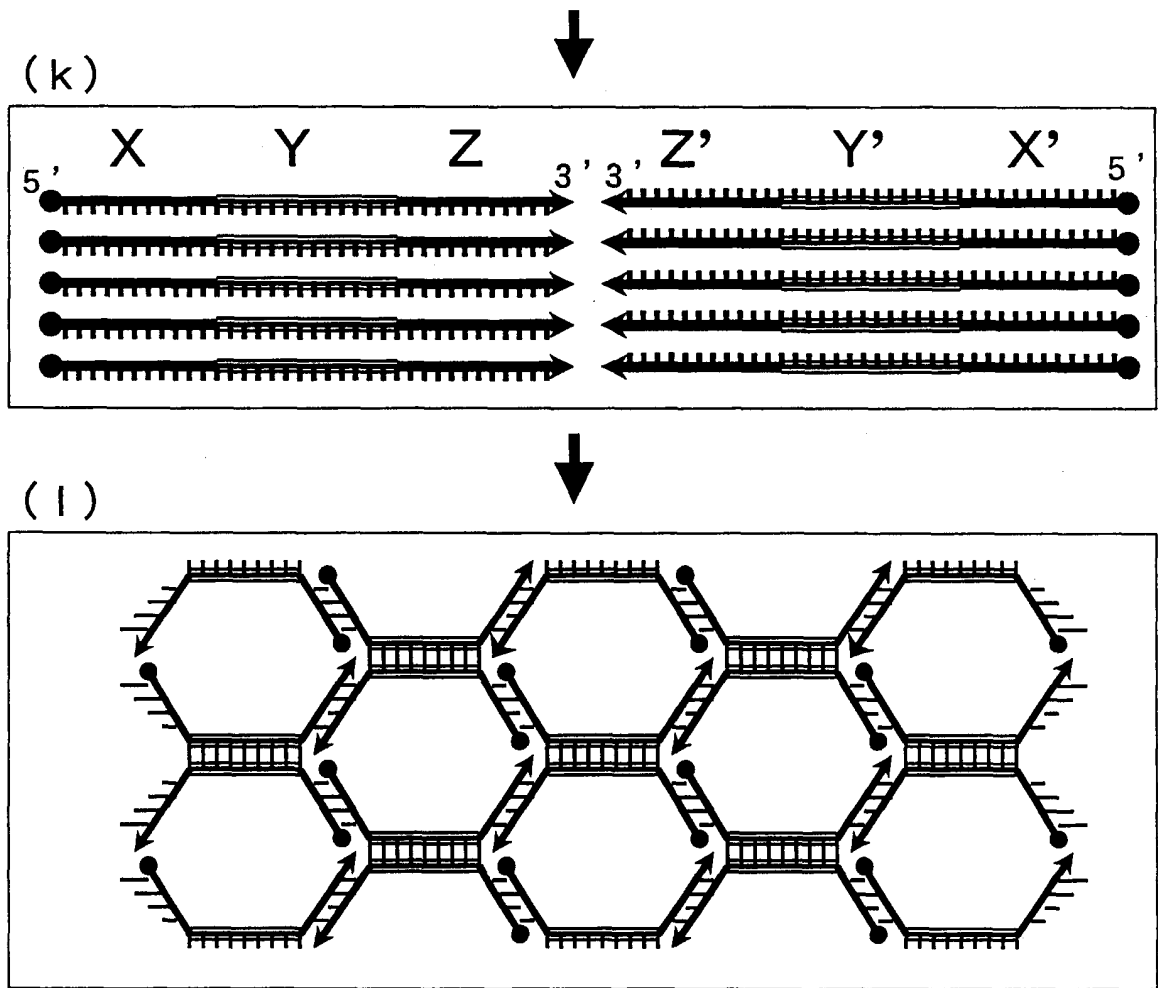


图 7

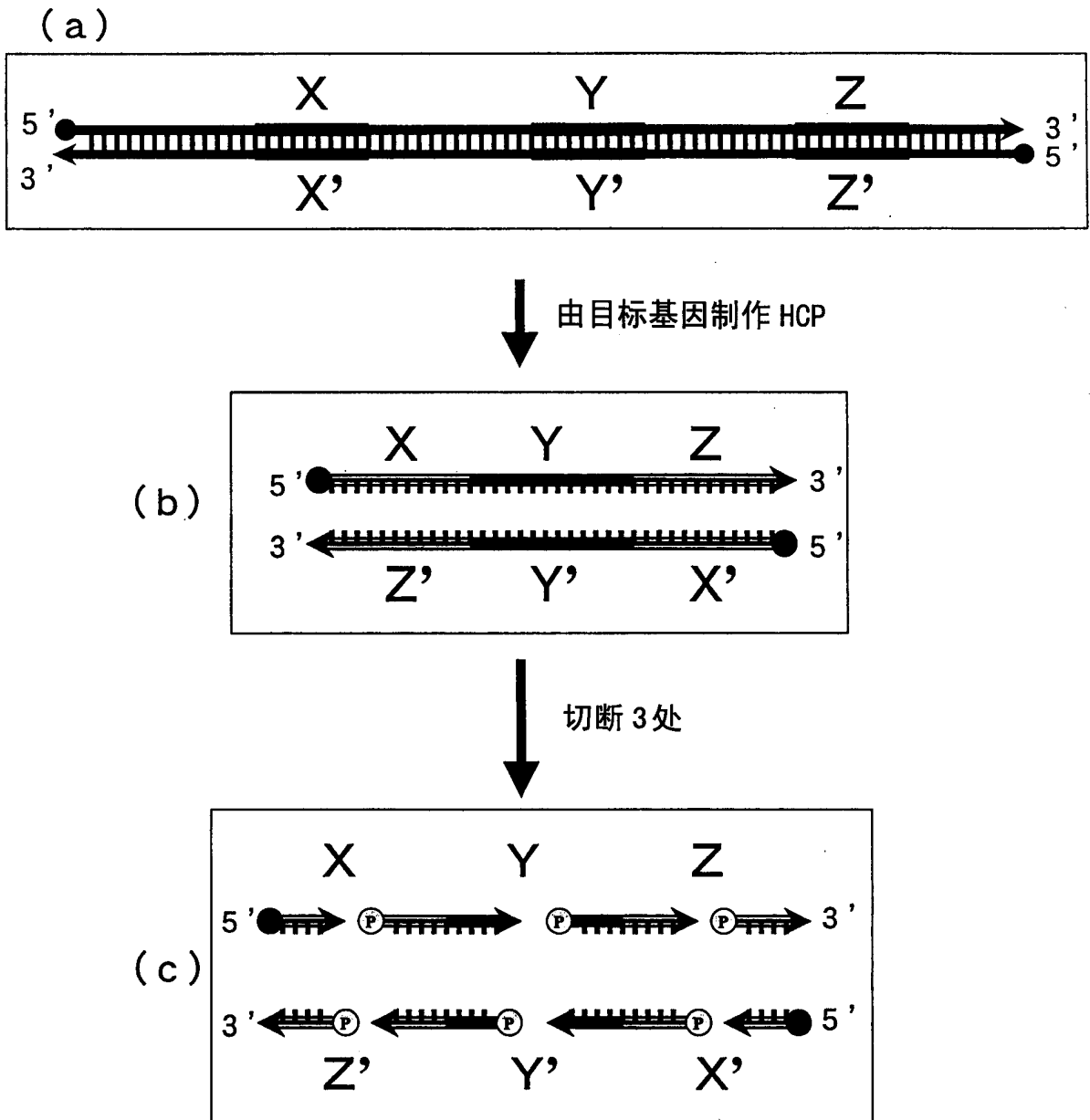
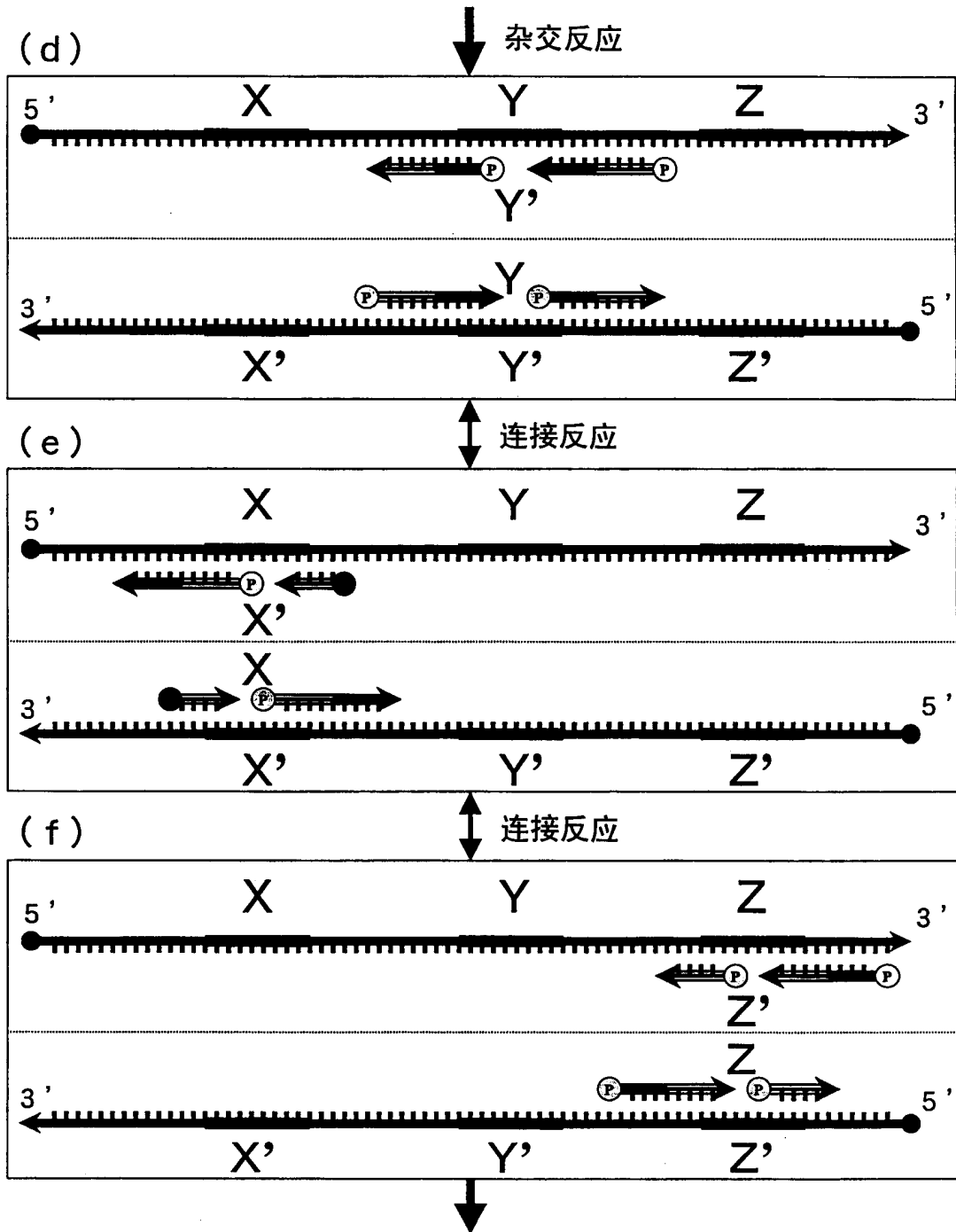


图 8



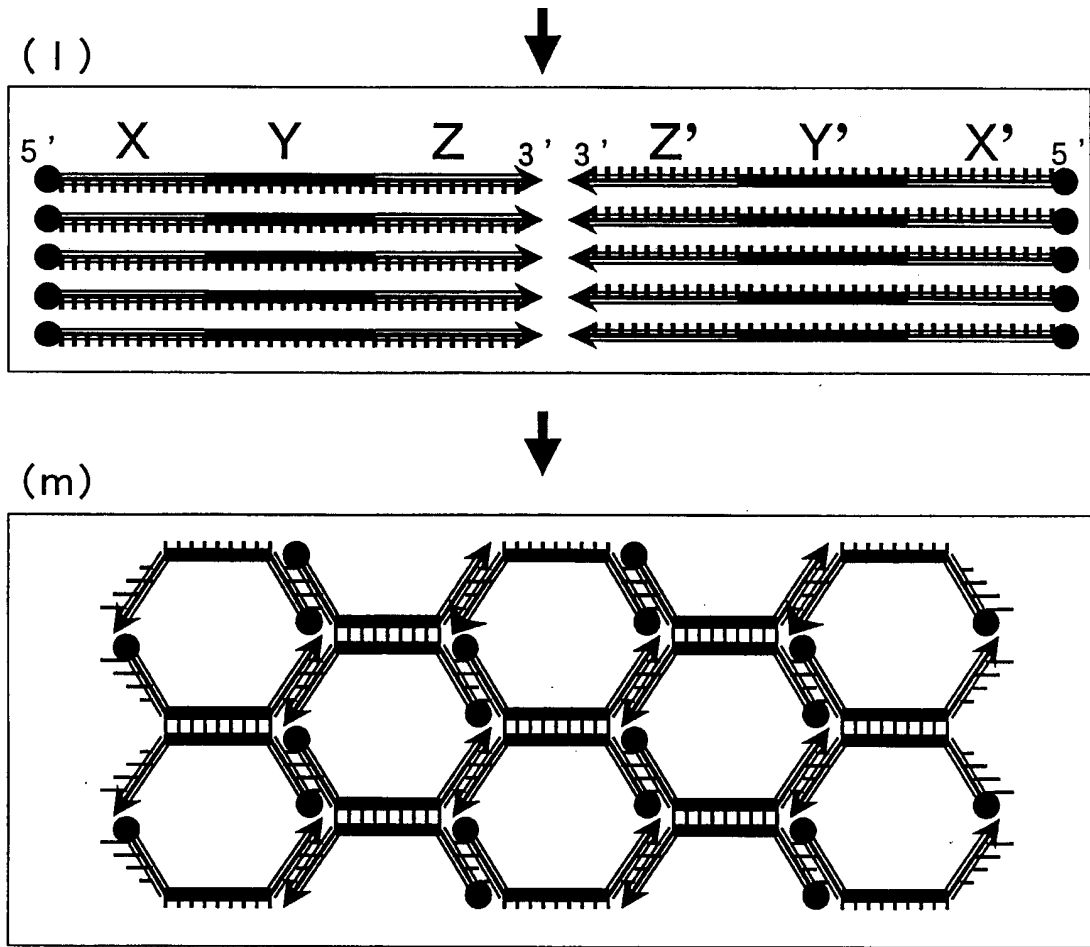


图 11

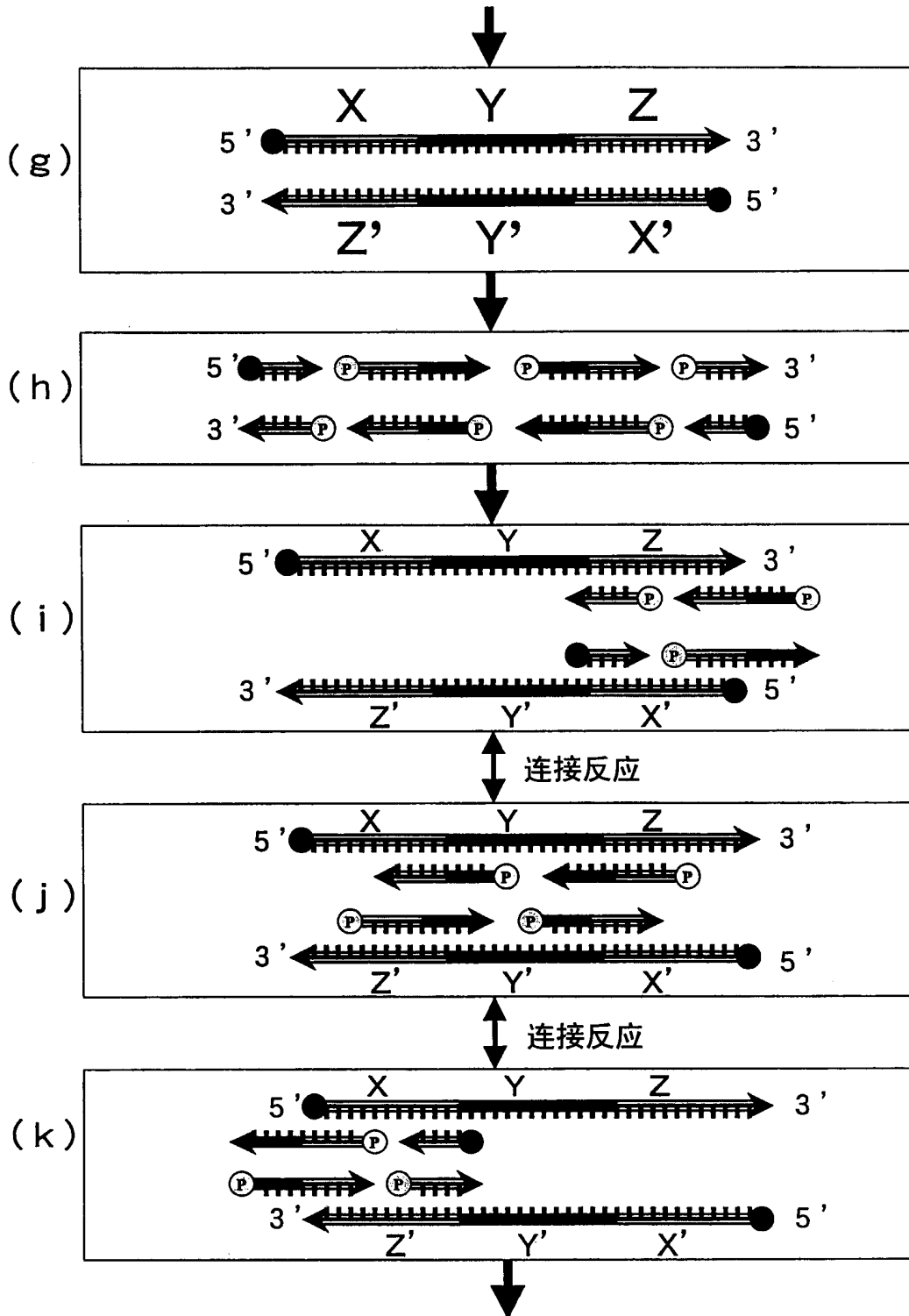


图 10

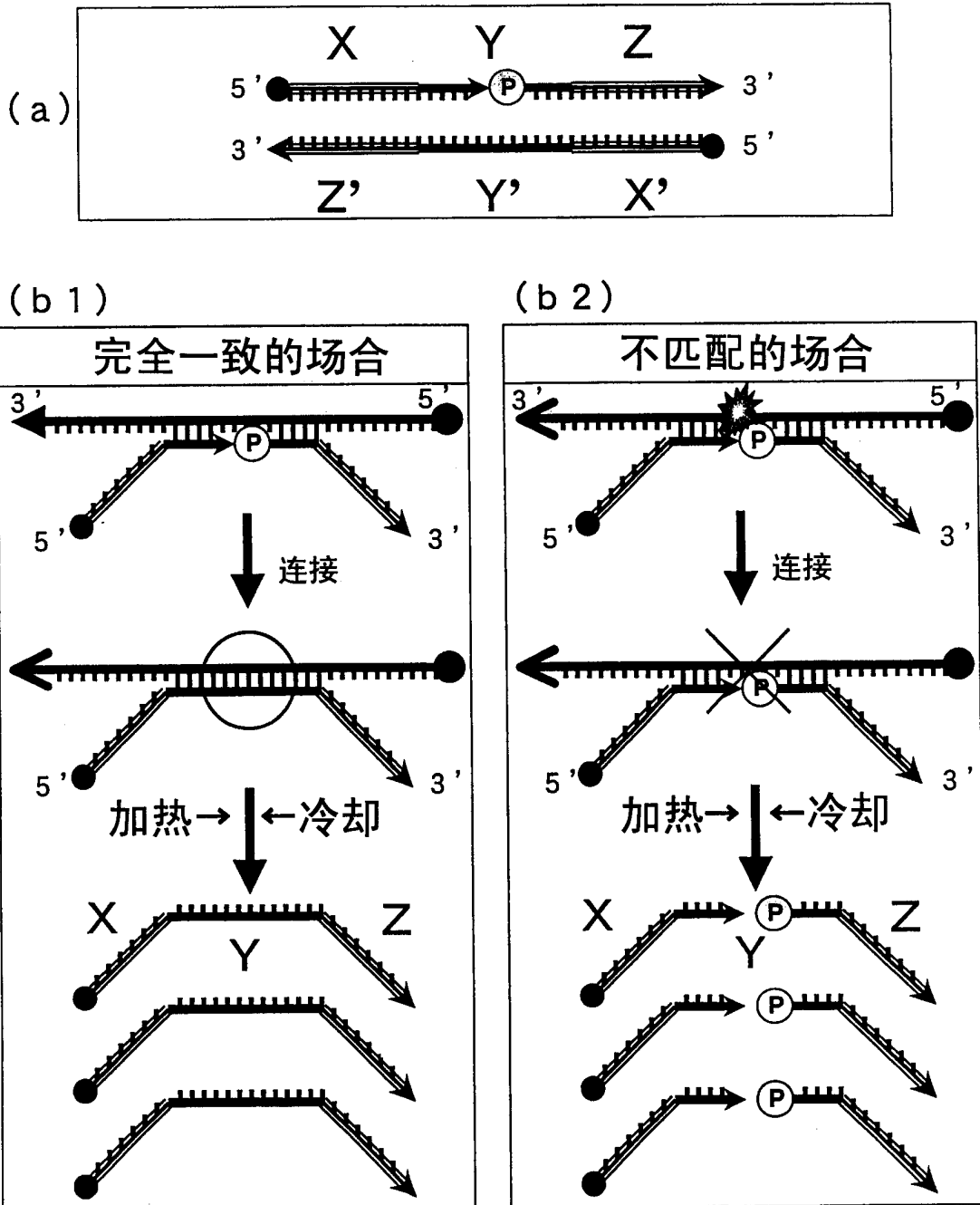


图 12

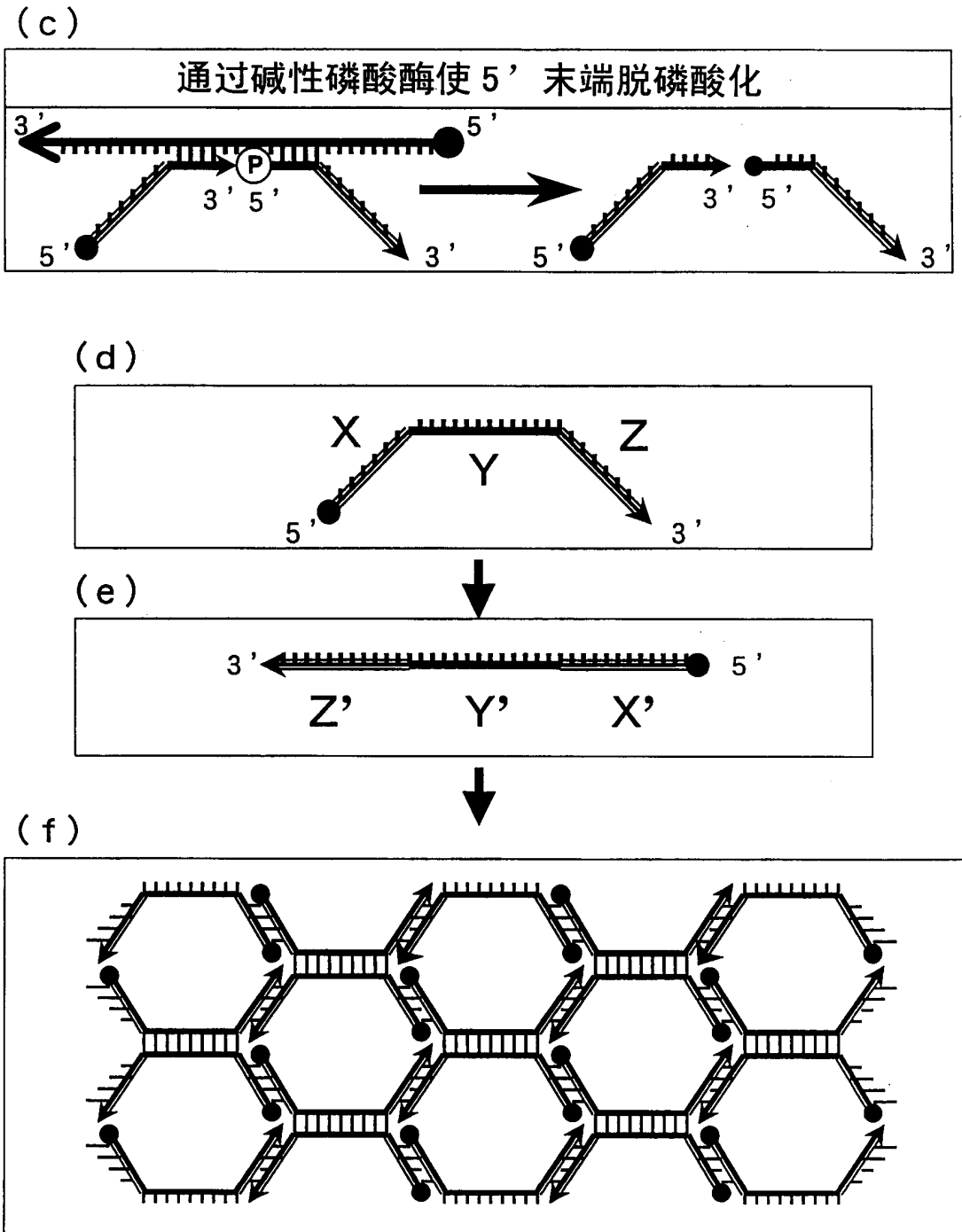


图 13

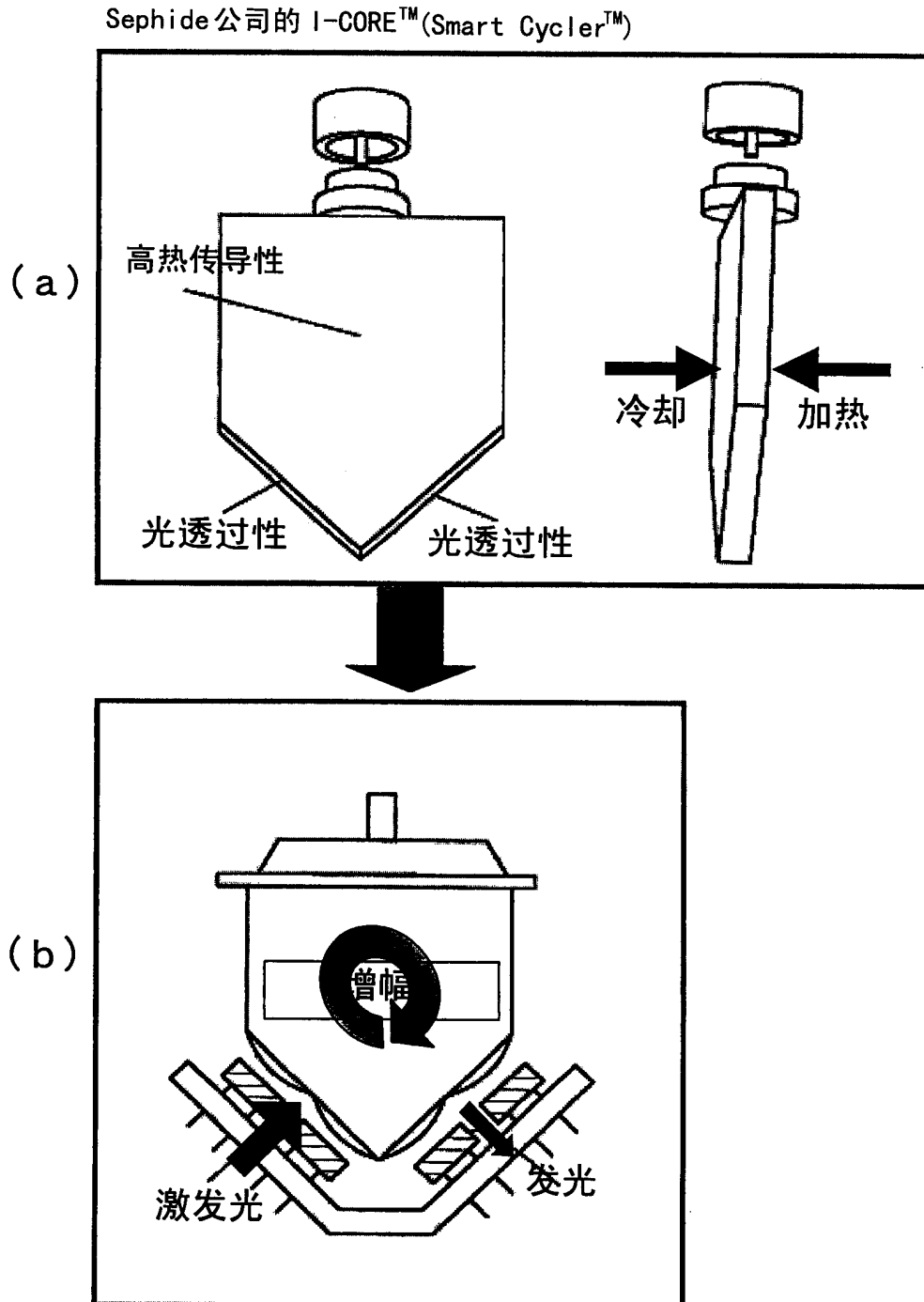


图 14

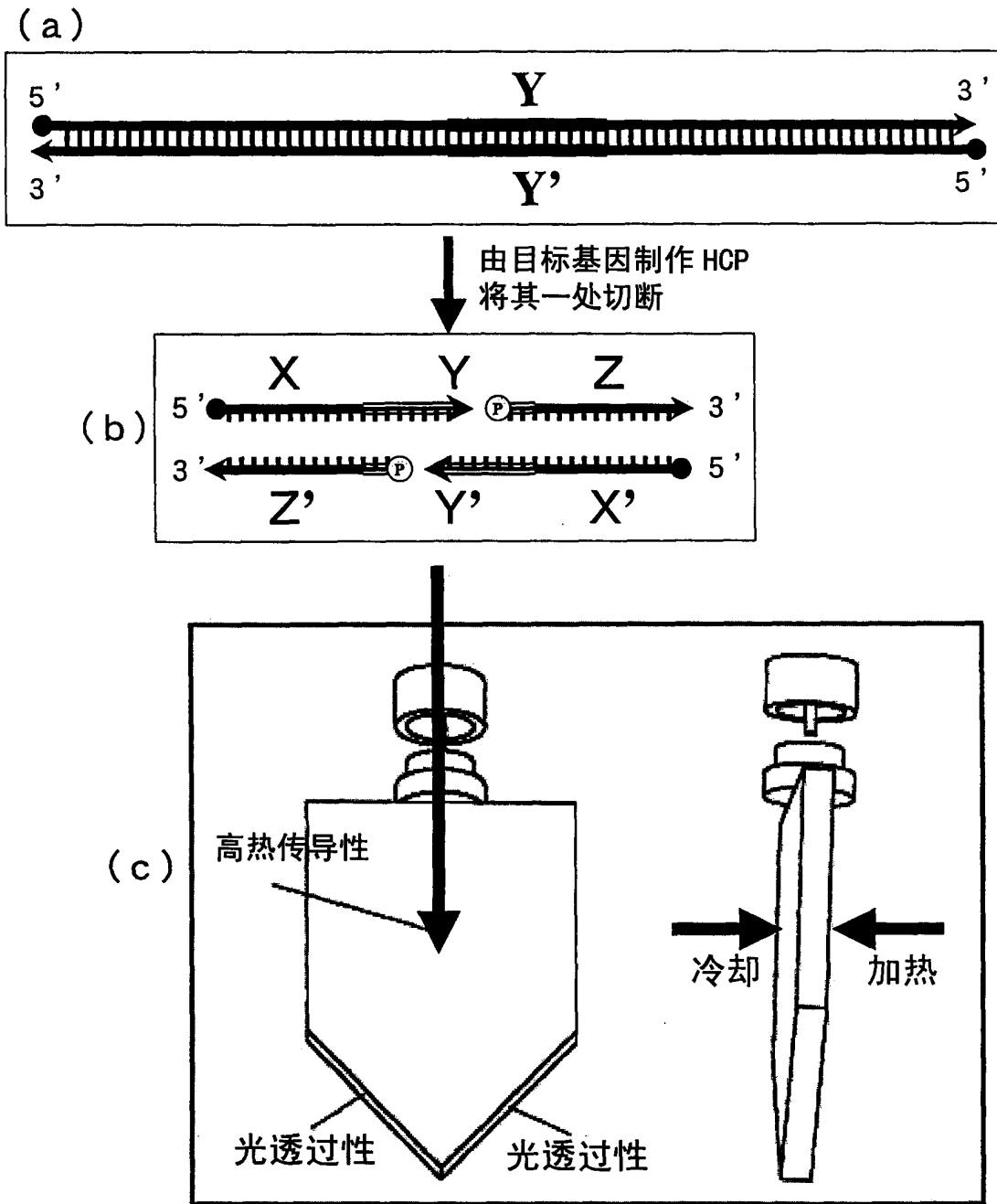


图 15

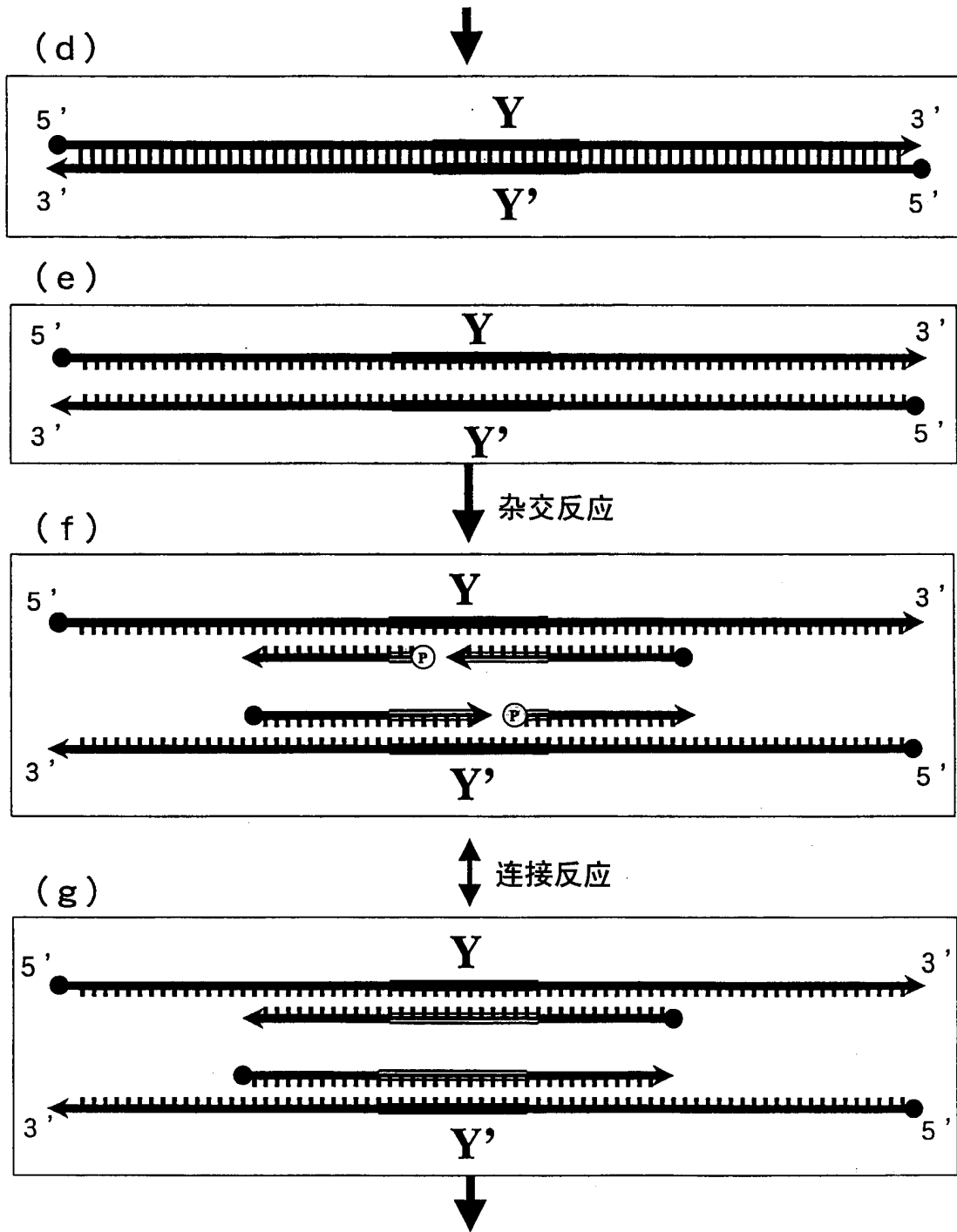


图 16

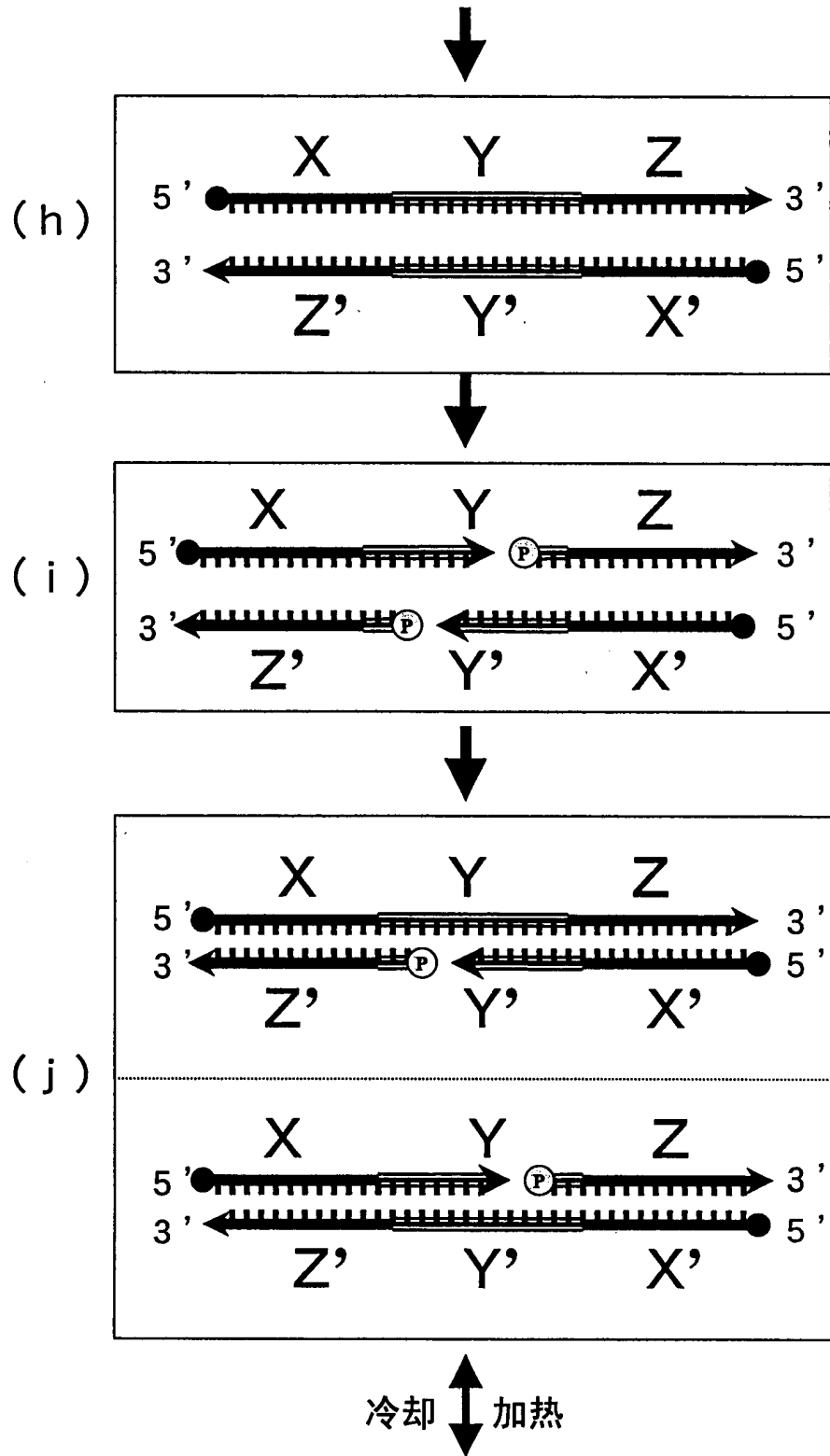


图 17

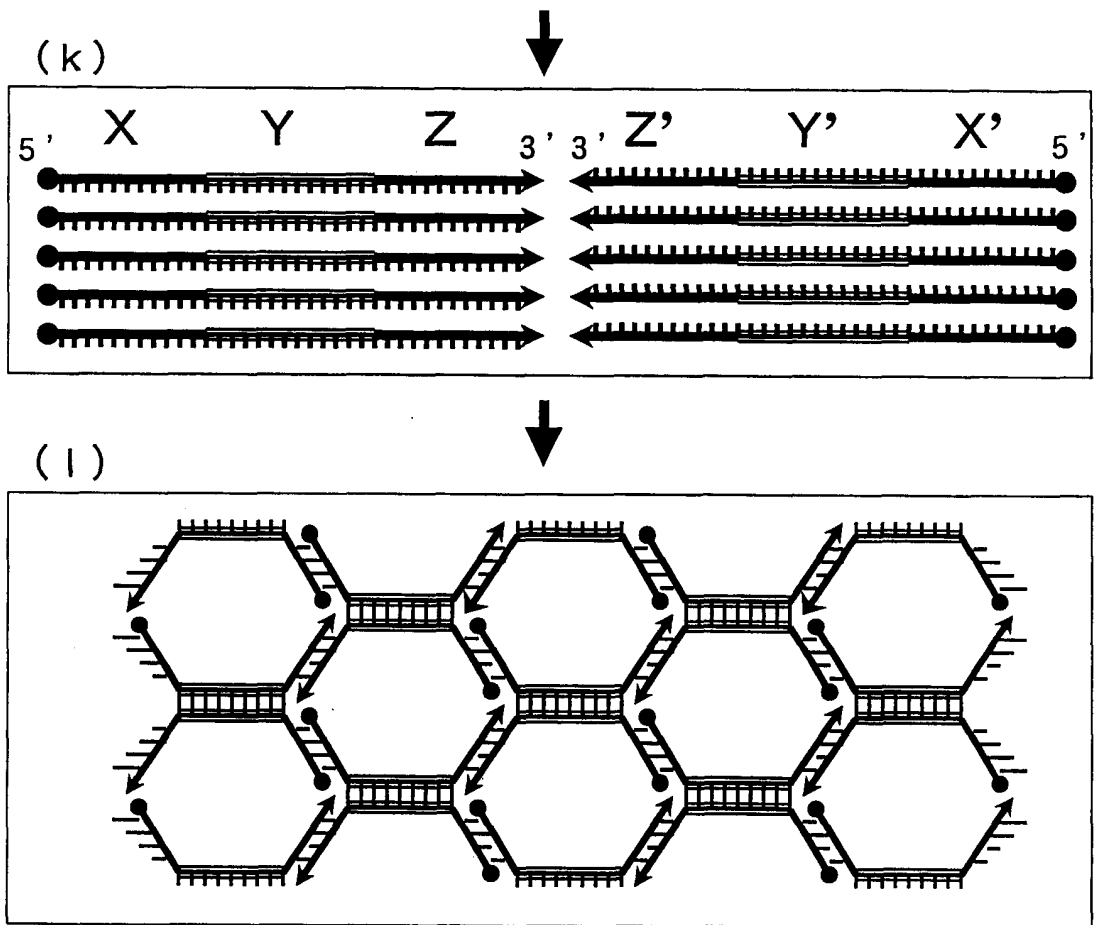


图 18

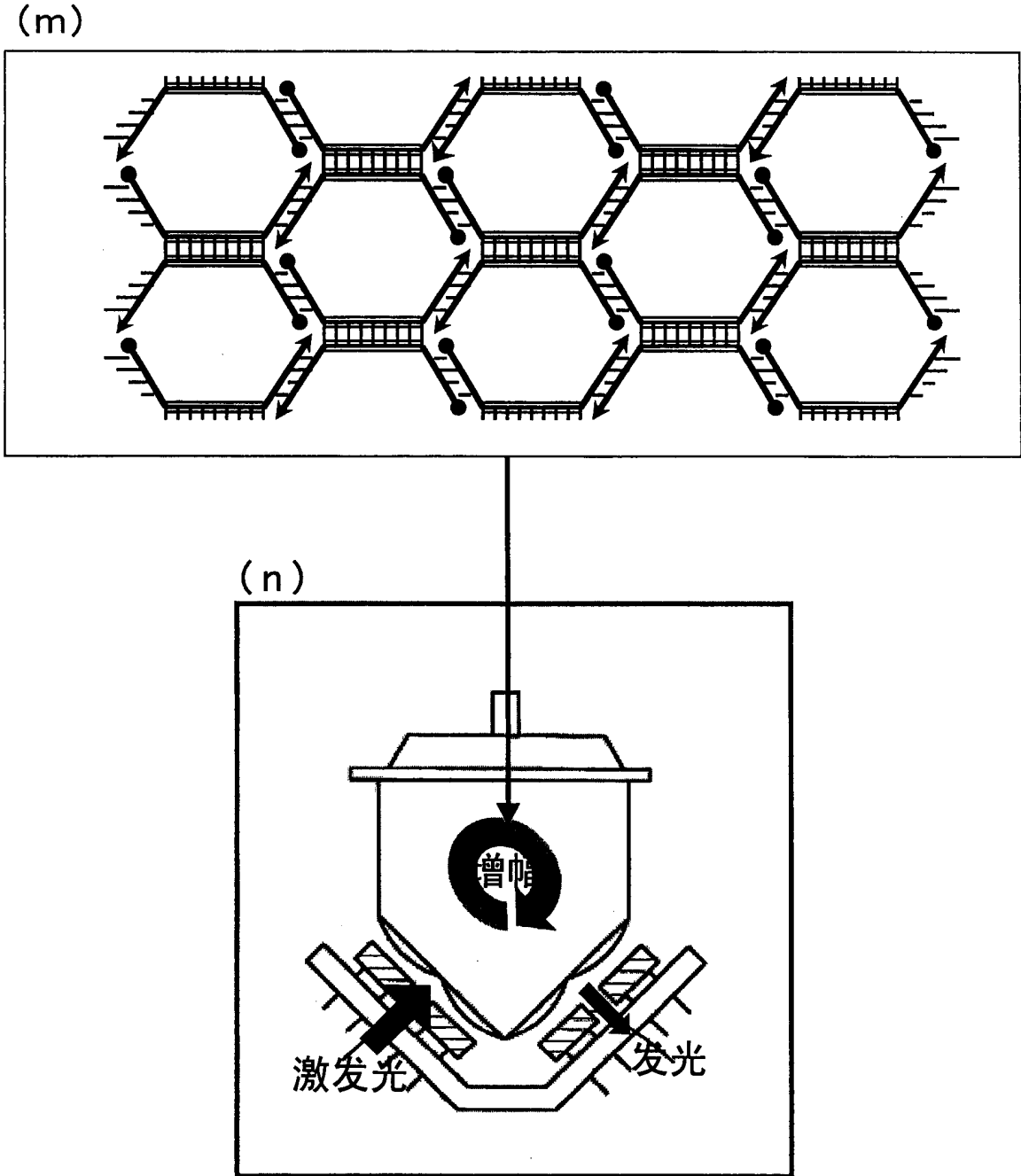


图 19

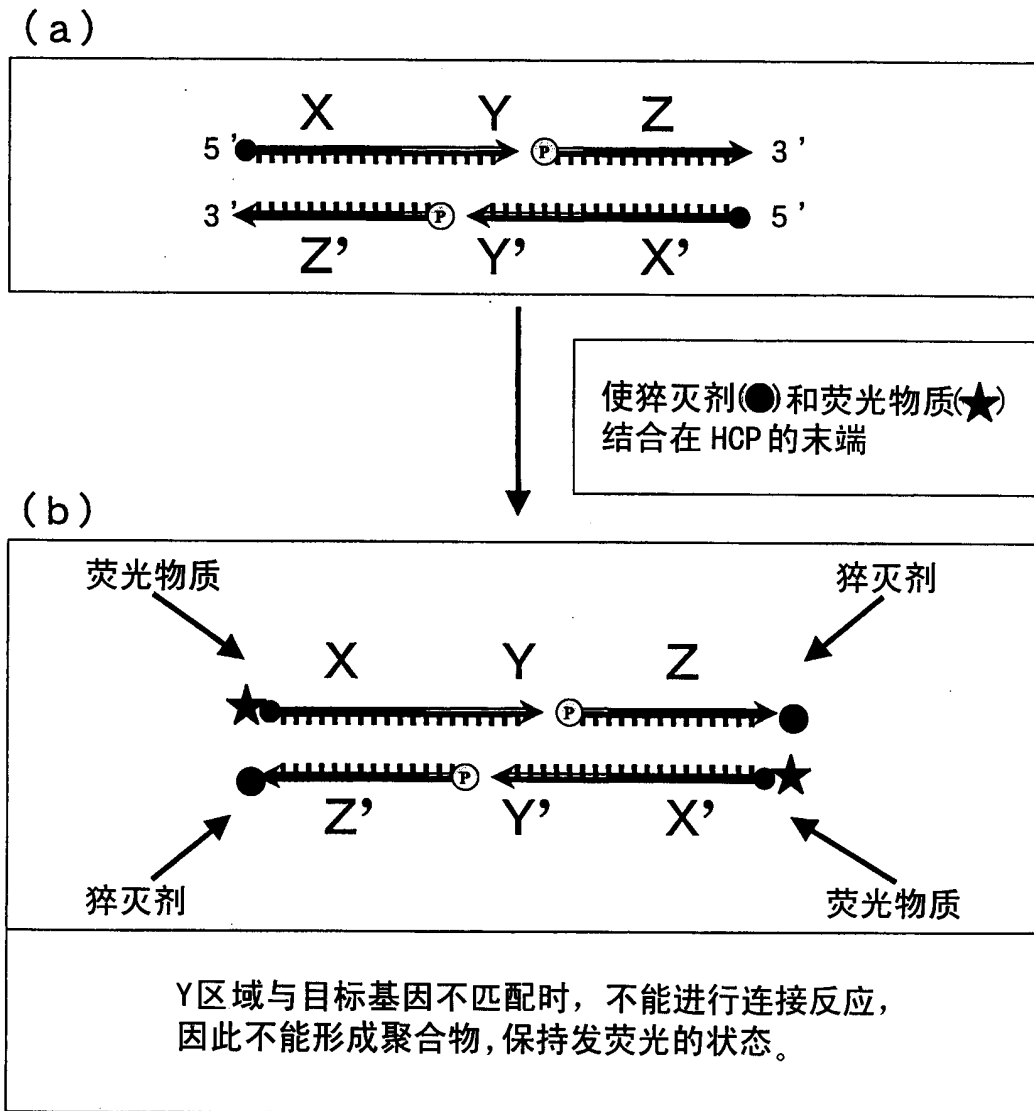


图 20

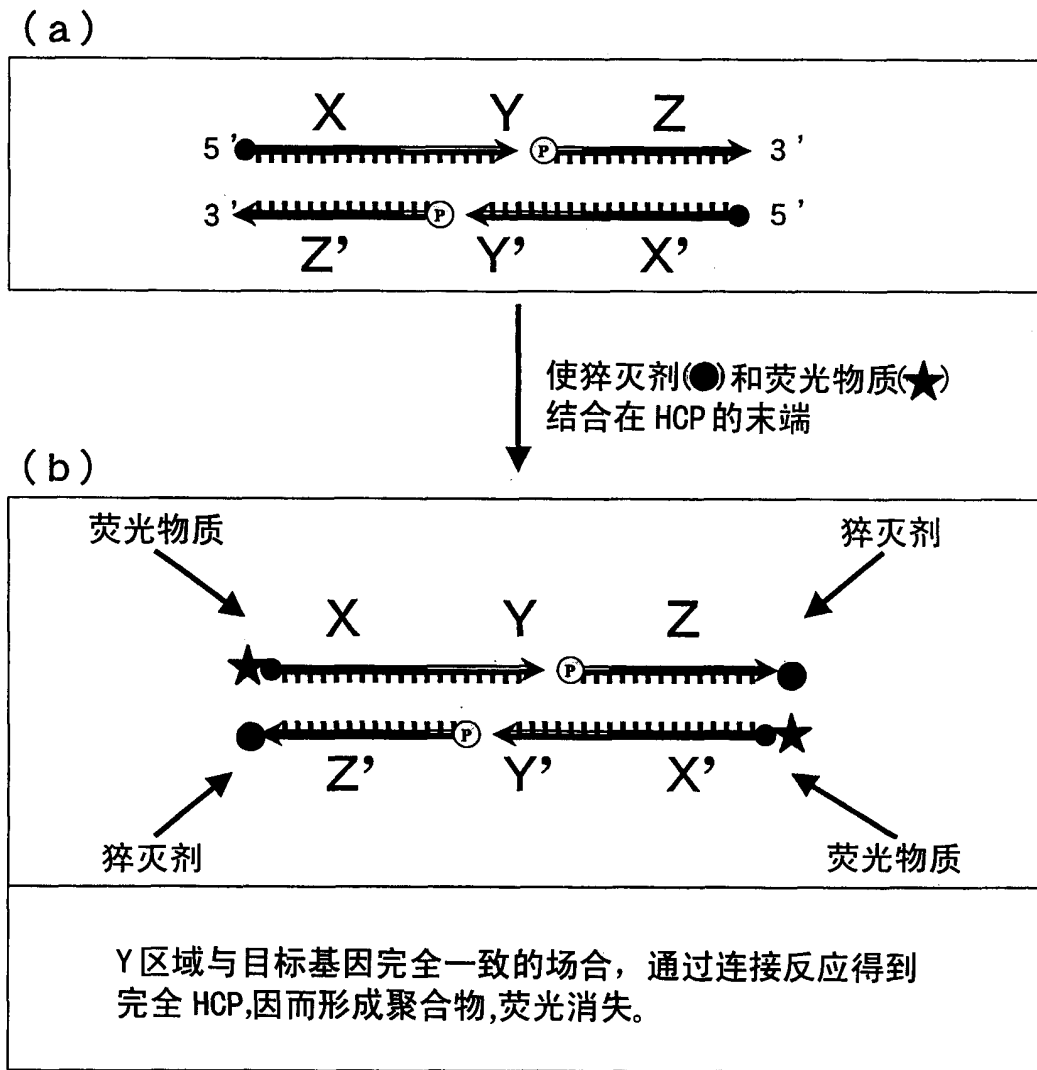


图 21

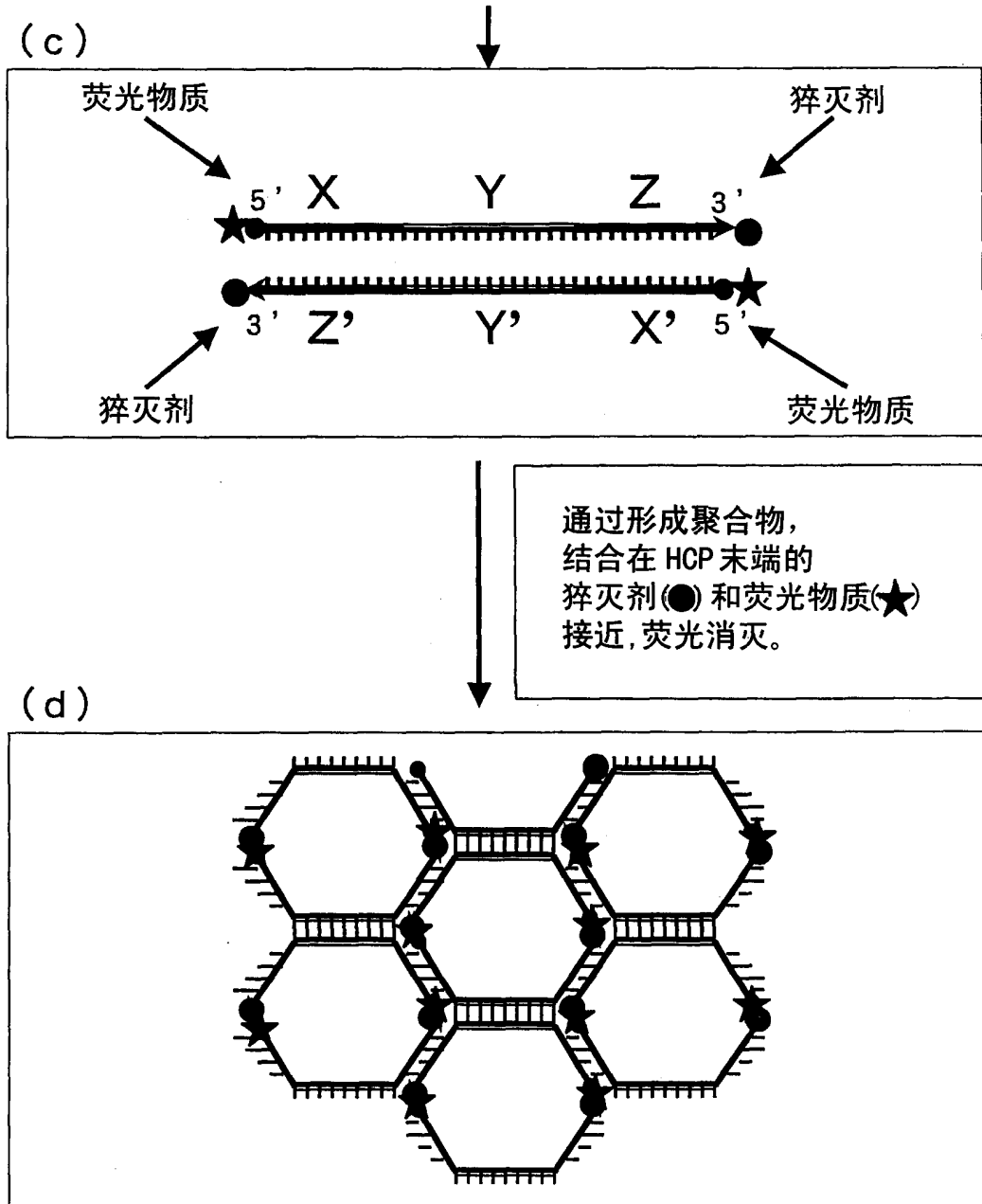


图 22

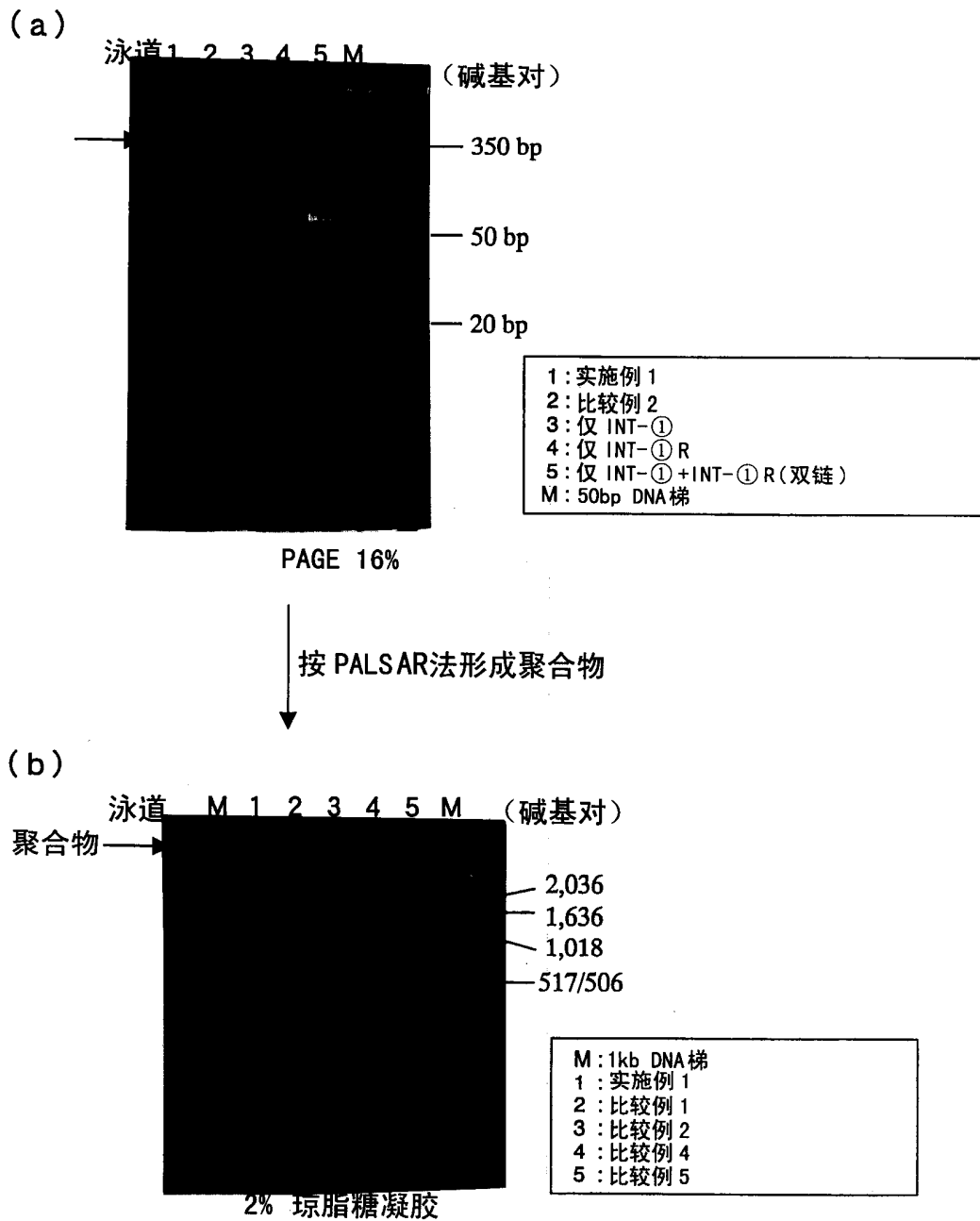
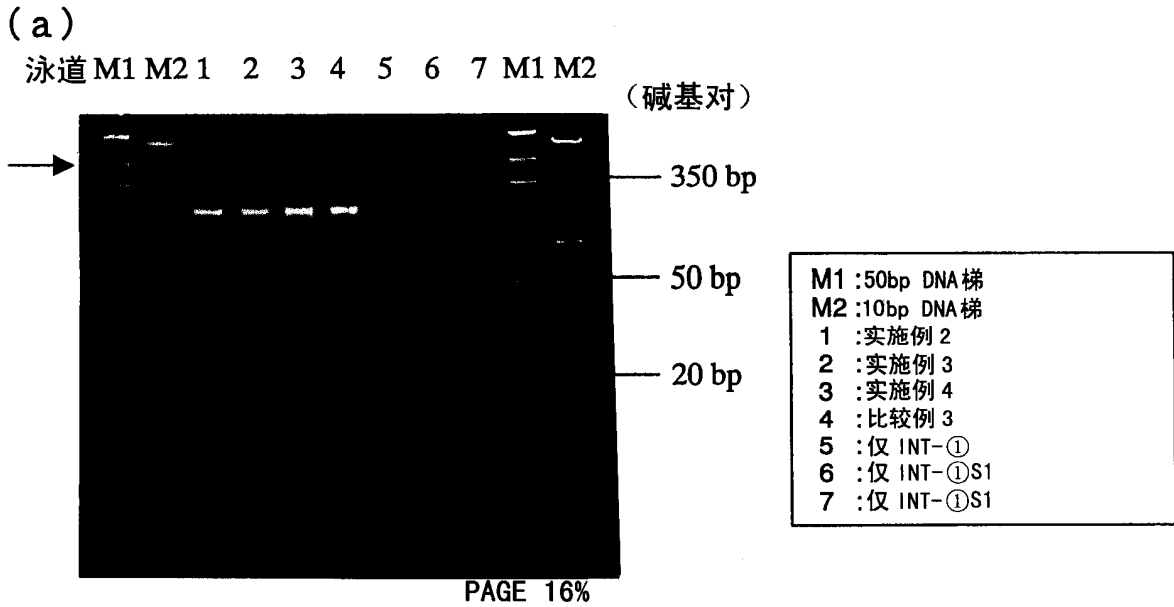


图 23



按 PALSAR法形成聚合物

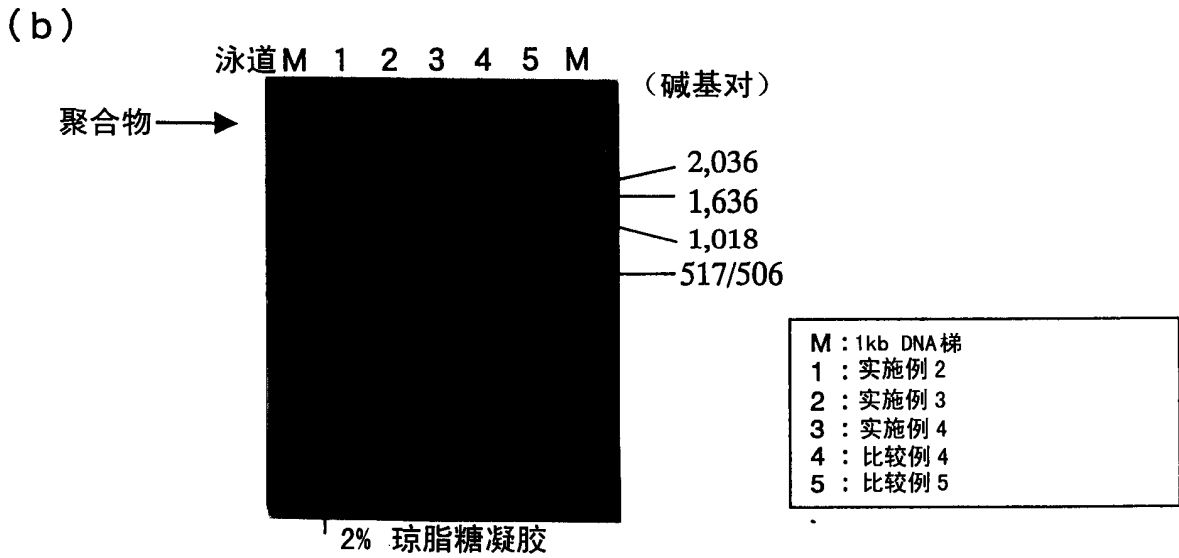


图 24

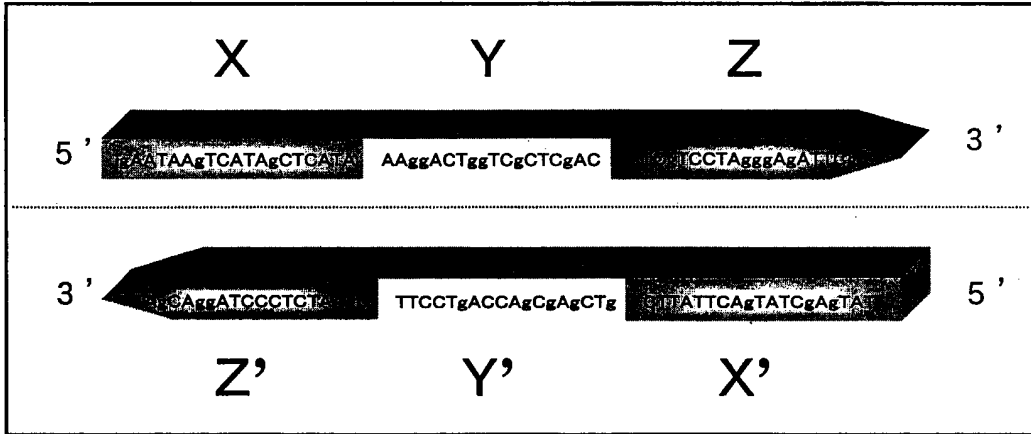


图 25

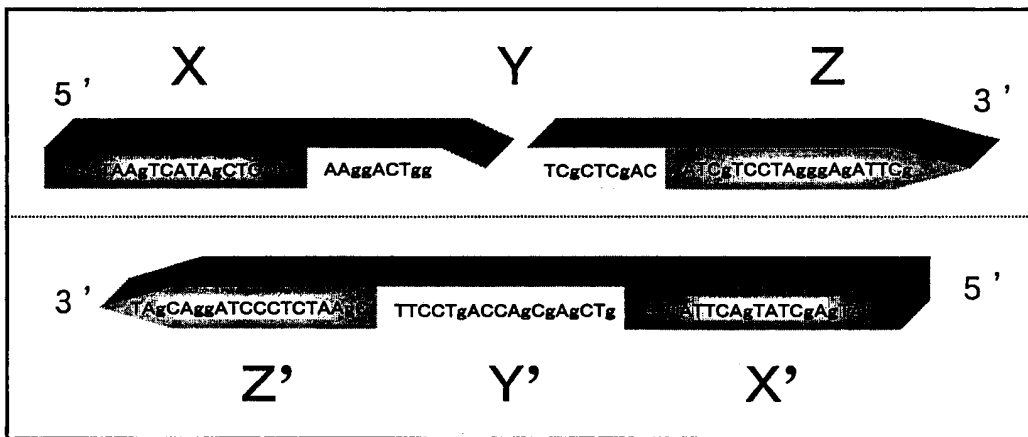


图 26

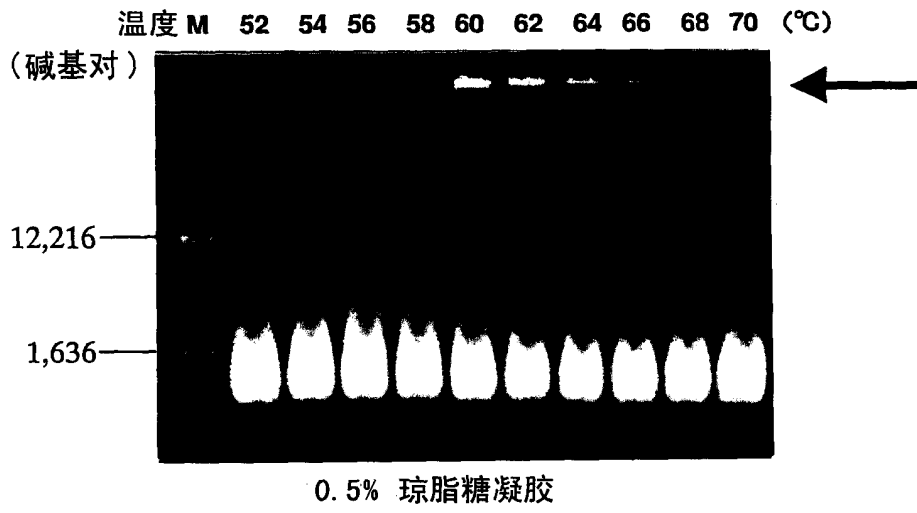


图 27

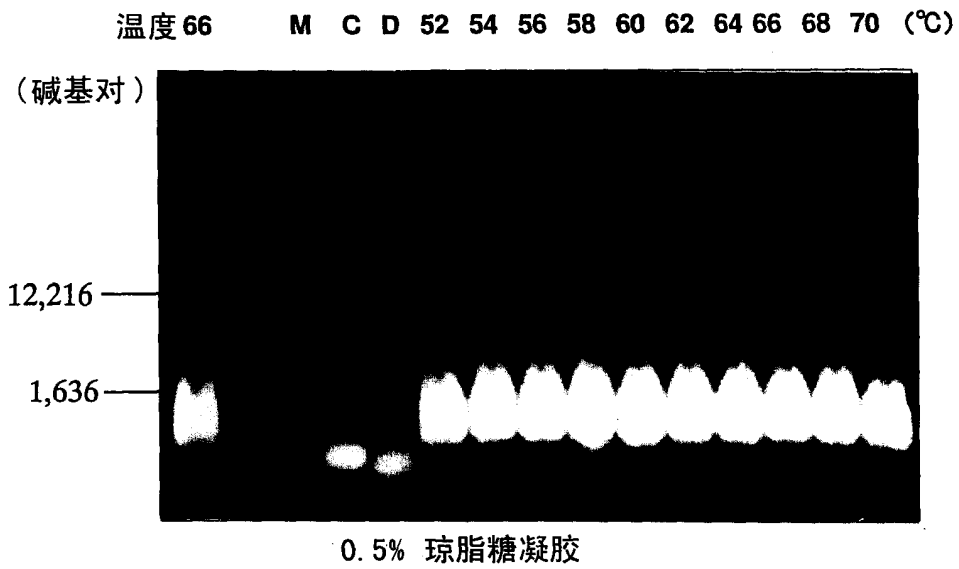


图 28