

[51] Int. Cl⁷

C12Q 1/68

C12N 15/00



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 00818133.0

[43] 公开日 2003 年 4 月 30 日

[11] 公开号 CN 1415020A

[22] 申请日 2000.11.7 [21] 申请号 00818133.0

[30] 优先权

[32] 1999. 11. 8 [33] WO [31] PCT/JP99/06213

[32] 2000. 4.28 [33] JP [31] 134334/2000

[86] 国际申请 PCT/JP00/07816 2000.11.7

[87] 国际公布 WO01/34838 日 2001.5.17

〔85〕 进入国家阶段日期 2002.7.2

[71] 申请人 荣研化学株式会社

地址 日本东京都

[72] 发明人 神田秀俊 纳富继宣 长岭宪太郎

米川俊广

[74] 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

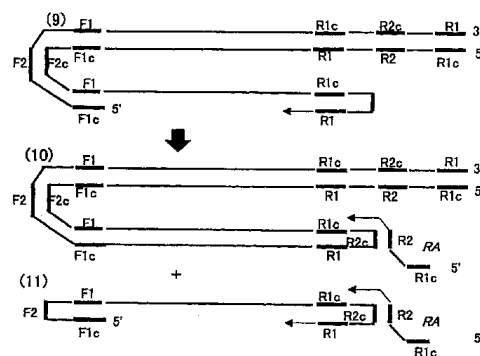
代理人 巫肖南 封新琴

权利要求书 6 页 说明书 44 页 序列表 5 页
附图 17 页

[54] 发明名称 检测突变和/或多态性的方法

[57] 摘要

本发明的方法基于这样一种方法，其中利用作为相同链的核苷酸序列存在的靶核苷酸序列的特定区域上的，通过互补链合成而合成的杂交的3'末端作为下一轮互补链合成的起点来合成核酸。根据本发明，重复进行与需检测突变和多态性的特定区域的杂交。因此，靶核苷酸序列中的突变和多态性被精确地拷贝到反应产物上。



LSN 1008-4274

1. 检测靶核苷酸序列特定区域内的突变和/或多态性的方法，它包括以下步骤：(1)在允许互补链合成的条件下保温下列组分(a)至(e)，其中将第二
5 和第一引物用作起点；
- (a) 含有靶核苷酸序列的核酸样品；
- (b) 催化包括链置换的互补链合成的 DNA 聚合酶；
- (c) 第二引物，其中第二引物的 3'末端与一条所述靶核苷酸序列链 3'方向的区域退火，第二引物的 5'方向包括与推测核苷酸序列互补的核苷酸序列，它构成利用引物作为起点的互补链合成反应的产物上的区域；
10
- (d) 第一引物，其中第一引物的 3'末端与另一条所述靶核苷酸序列链 3'方向的区域退火，第一引物的 5'方向包括与推测核苷酸序列互补的核苷酸序列，它构成利用引物作为起点的互补链合成反应的产物上的区域；和
- (e) 核苷酸底物；和
- 15 (2)将利用靶核苷酸序列为模板的互补链合成反应所合成的产物的量与特定区域内突变和/或多态性的存在相联系，其中第二和第一引物的 5'末端中的至少一个上所排列的核苷酸序列含有与所述特定区域的推测核苷酸序列或其互补链互补的核苷酸序列，其中当含有特定区域的核苷酸序列不是预想的核苷酸序列时，利用 5'末端上排列的核苷酸序列为模板而合成的，并通
20 过与特定区域或其互补链退火而用作互补链合成之起点的互补链会抑制互补链合成。
2. 权利要求 1 的方法，其中第二引物或第一引物的 5'末端上排列的核苷酸序列都含有与所述特定区域的推测核苷酸序列或其互补链互补的核苷酸序列，其中当含有特定区域的核苷酸序列不是预想的核苷酸序列时，利用
25 5'末端排列的核苷酸序列为模板而合成的，并通过与特定区域或其互补链退火而用作互补链合成之起点的互补链会抑制互补链合成。
3. 权利要求 1 的方法，另外还包括下列组分：
- (f) 第三引物，其中第三引物用作互补链合成反应的起点，另外将模板上第一引物退火区域的 3'方向用作起点；和
- 30 (g) 第四引物，其中第四引物用作互补链合成反应的起点，另外将模板上第二引物退火区域的 3'方向用作起点。

4. 权利要求 1 的方法，其中相同样品中存在一种基因，该基因含有的核苷酸序列类似于靶核苷酸序列的核苷酸序列。
5. 权利要求 4 的方法，其中基因是家族基因和/或假基因。
6. 权利要求 5 的方法，其中家族基因和/或假基因是选自下列的任何基因：
- 5 因：细胞色素 P450 家族，人白细胞组织相容性抗原和血小板同种抗原。
7. 权利要求 1 的方法，其中多态性是单核苷酸多态性。
8. 权利要求 1 的方法，其中靶核苷酸序列选自以下任何致病性病毒或致病性微生物基因的核苷酸序列：丙型肝炎病毒，流感病毒，疟疾和幽门螺杆菌。
- 10 9. 权利要求 1 的方法，其中在解链温度调节剂的存在下进行步骤(1)的保温。
10. 权利要求 9 的方法，其中解链温度调节剂是至少一种选自下列的化合物：甜菜碱，脯氨酸和二甲基亚砷。
11. 权利要求 1 的方法，其中核酸样品为双链。
- 15 12. 权利要求 1 的方法，其中所述方法在核酸检测器的存在下进行，以根据检测器信号的变化检测突变和/或多态性的存在。
13. 权利要求 1 的方法，其中将源自与需检测突变和/或多态性的生物体相同的生物体，且其序列经证实不包括突变和/或多态性的核苷酸序列用作内部标准，通过与使用该核苷酸序列为模板所得合成产物的量相比较，检测突变和/或多态性的存在。
- 20 14. 权利要求 1 的方法，另外还包括：
- (h) 第一种具环引物，其中第一种具环引物在第一引物延伸产物中的源自第一引物的区域和所述第一引物的任意区域之间提供互补链合成起点；和/或
- 25 (i) 第二种具环引物，其中第二种具环引物在第二引物延伸产物中的源自第二引物的区域和所述第二引物的任意区域之间提供互补链合成起点。
15. 权利要求 1 的方法，当含有所述特定区域的核苷酸序列不是预想的核苷酸序列时，在与特定区域或其互补链退火的过程中，自互补链 3'末端起的第二至第四个核苷酸中出现错配，所述互补链是使用排列在第一引物和/或第二引物 5'末端的核苷酸序列为模板而合成的。
- 30

16. 含有下列组分 i)-iv), 用于检测靶核苷酸序列中特定区域的突变和/或多态性的试剂盒, 其中第二和第一引物的 5'末端中的至少一个上所排列的核苷酸序列含有与所述特定区域的推测核苷酸序列或其互补链互补的核苷酸序列, 其中当含有特定区域的核苷酸序列不是预想的核苷酸序列时, 利用该 5'末端上排列的核苷酸序列为模板而合成的, 并通过与特定区域或其互补链退火而用作互补链合成之起点的互补链会抑制互补链合成:

i) 第二引物, 其中第二引物的 3'末端与一条所述靶核苷酸序列链 3'方向的区域退火, 第二引物的 5'方向包括与推测核苷酸序列互补的核苷酸序列, 它构成利用引物作为起点的互补链合成反应的产物上的区域;

10 ii) 第一引物, 其中第一引物的 3'末端与另一条所述靶核苷酸序列链 3'方向的区域退火, 第一引物的 5'方向包括与推测核苷酸序列互补的核苷酸序列, 它含有利用引物作为起点的互补链合成反应的产物上的区域;

iii) 催化包括链置换的互补链合成的 DNA 聚合酶; 和

iv) 核苷酸底物。

15 17. 权利要求 16 的试剂盒, 另外还包括下列组分:

v) 第三引物, 其通过与模板上第一引物退火区域的 3'方向退火而用作互补链合成的起点; 和

vi) 第四引物, 其通过与模板上第二引物退火区域的 3'方向退火而用作互补链合成的起点。

20 18. 权利要求 16 的试剂盒, 另外还包括下列组分:

vii) 扩增内部标准的第五引物, 其中第五引物的 3'末端与内部标准的一个靶核苷酸序列链的 3'方向区域退火, 第五引物的 5'方向包括与含有互补链合成反应之产物的任意区域的核苷酸序列互补的核苷酸序列, 其中所述反应利用该引物为起点; 和

25 iix) 扩增内部标准的第六引物, 其中第六引物的 3'末端与内部标准的一个靶核苷酸序列链的 3'方向区域退火, 第六引物的 5'方向包括与含有互补链合成反应之产物的区域的核苷酸序列互补的核苷酸序列, 其中所述反应利用该引物为起点。

19. 权利要求 18 的试剂盒, 另外还包括下列组分:

30 ix) 第七引物, 其通过与模板上第六引物退火区域的 3'方向退火而用作互补链合成的起点; 和

x)第八引物,其通过与模板上第六引物退火区域的3'方向退火而用作互补链合成的起点。

20. 检测靶核苷酸序列特定区域内的突变和/或多态性的方法,其中第二和第一引物的5'末端中的至少一个上所排列的核苷酸序列含有与所述特定区域的推测核苷酸序列或其互补链互补的核苷酸序列,其中当含有特定区域的核苷酸序列不是预想的核苷酸序列时,利用5'末端上排列的核苷酸序列为模板而合成的,并通过与特定区域或其互补链退火而用作互补链合成之起点的互补链会抑制互补链合成,所述方法包括下列步骤:

a) 将第一引物与靶核苷酸序列退火,以使用引物为起点,进行互补链合成反应,其中第一引物的3'末端与一条所述靶核苷酸序列链3'方向的区域退火,第一引物的5'方向包括与推测核苷酸序列互补的核苷酸序列,它含有互补链合成反应产物上的区域,所述合成反应利用该引物作为起点;

b) 使步骤 a)中合成的第一引物延伸产物中与第二引物退火的区域处于能让该区域与第二引物进行碱基配对的状态,将它们退火以便使用第一引物延伸产物为模板合成互补链;其中第二引物的3'末端与另一条所述靶核苷酸序列链3'方向的区域退火,第二引物的5'方向包括与推测核苷酸序列互补的核苷酸序列,它含有互补链合成反应产物上的区域,所述合成反应利用该引物作为起点;

c) 使用第二引物的延伸产物自身为模板,通过使具有所述推测核苷酸序列的产物的3'末端与所述延伸产物中的第一引物退火,进行互补链合成;

d) 使用步骤 c)中合成的互补链自身为模板,通过使步骤 c)中合成的,具有所述推测核苷酸序列的互补链的3'末端与所述延伸产物中的第二引物退火,进行互补链合成;和

e) 将利用第二引物作起点所得的合成产物的量与特定区域内突变和/或多态性的存在相联系。

21. 权利要求 20 的方法,其中步骤 b)包括通过置换将第一引物延伸产物转变为单链的步骤,其中置换是使用第三引物为起点通过互补链合成反应而进行的,所述第三引物利用了与模板上的第一引物退火的区域的3'方向。

22. 权利要求 20 的方法,其中步骤 c)包括通过置换将第二引物延伸产物转变为单链的步骤,其中置换是使用第四引物为起点通过互补链合成反应而进行的,所述第四引物利用了与模板上的第二引物退火的区域的3'方向。

23. 权利要求 20 的方法, 其中第二和第一引物的 5'末端中的至少一个上所排列的核苷酸序列含有与所述特定区域的推测核苷酸序列或其互补链互补的核苷酸序列, 其中当含有特定区域的核苷酸序列不是预想的核苷酸序列时, 利用 5'末端上排列的核苷酸序列为模板而合成的, 并通过与特定区域或其互补链退火而用作互补链合成之起点的互补链会抑制互补链合成, 所述方法还包括下列步骤:

1) 在权利要求 20 的方法中, 通过使第一引物的 3'末端与第二引物延伸产物内的推测核苷酸序列退火, 形成能与所述 3'末端的互补核苷酸序列形成碱基对的成环区域, 并使用其自身 3'末端作为互补链合成的起点来进行步骤 c) 的互补链合成反应;

2) 使第一引物与成环区域退火, 利用催化互补链合成的 DNA 聚合酶, 使用第一引物为起点进行互补链合成, 所述互补链合成包括链置换;

3) 使用与成环区域退火的引物为起点, 通过互补链合成反应置换自其自身 3'末端开始延伸的产物, 以使 3'末端和所述推测的核苷酸序列之间能再次发生碱基配对;

4) 通过置换互补链以形成单链核酸, 所述互补链是使用成环区域为起点, 通过使 3'末端与所述推测的核苷酸序列退火作为互补链合成之起点, 进行使用其自身为模板的互补链合成反应而合成的, 其中 3'末端处于步骤 3) 中所述的形成碱基对的状态;

5) 通过使 3'末端与所述第二引物的推测核苷酸序列退火, 并通过互补链合成形成成环区域, 该区域与第二引物 3'末端的互补核苷酸序列形成碱基对;

6) 使第二引物与成环区域退火, 通过催化互补链合成的 DNA 聚合酶, 使用第二引物为起点进行互补链合成, 所述互补链合成包括链置换;

7) 重复步骤 3) 至 6); 和

8) 在步骤 7) 之后和/或与步骤 7) 平行, 检测单链核酸的形成, 其中重复连接靶核苷酸序列及其互补链, 并使所形成核酸的量与突变和/或多态性相联系。

24. 权利要求 23 的方法, 另外还包括下列步骤:

9) 使用步骤 4) 中形成的单链核酸为模板, 通过使其 3'末端与所述第二引物的推测核苷酸序列退火, 形成能与第二引物 3'末端的互补核苷酸序列形成

碱基对的成环区域,并使用其自身的3'末端作为互补链合成的起点,以进行互补链合成反应;

- 10)使第二引物与成环区域退火,所述区域是通过使3'末端与其自身的所述特定区域退火而形成的,使用第二引物为起点,通过催化互补链合成的DNA聚合酶进行互补链合成,所述互补链合成包括链置换;

11)使用与成环区域退火的引物为起点,通过互补链合成反应置换自其自身3'末端开始延伸的产物,以使3'末端和所述推测的核苷酸序列之间能再次发生碱基配对;

- 12)通过置换互补链以形成单链核酸,所述互补链是使用成环区域为起点,通过使3'末端与所述推测的核苷酸序列退火作为互补链合成之起点,进行使用其自身为模板的互补链合成反应而合成的,其中3'末端处于步骤11)中所述的能与所述推测的核苷酸序列形成碱基对的状态;

13)通过使3'末端与所述的推测核苷酸序列退火,并进行互补链合成形成成环区域,该区域与第一引物3'末端的互补核苷酸序列形成碱基对;

- 14)使第一引物与成环区域退火,通过催化互补链合成的DNA聚合酶,使用第一引物为起点进行互补链合成,所述互补链合成包括链置换;

15)重复步骤11)至14);和

- 16)在步骤15)之后和/或与步骤15)平行,检测单链核酸的形成,其中重复连接靶核苷酸序列及其互补链,并使所形成核酸的量与突变和/或多态性相联系。

25. 权利要求24的方法,另外还包括下列步骤:

- 17)通过使步骤12)中形成的单链核酸的3'末端与其自身的所述推测核苷酸序列退火,形成能与第一引物3'末端的互补核苷酸序列形成碱基对的成环区域,并使用其自身的3'末端作为起点,使用其自身作为模板以进行互补链合成反应。

26. 权利要求20的方法,其中第二引物和第一引物的5'末端上排列的核苷酸序列都含有与所述特定区域的推测核苷酸序列或其互补链互补的核苷酸序列,其中当含有特定区域的核苷酸序列不是预想的核苷酸序列时,利用5'末端排列的核苷酸序列为模板而合成的,并通过与特定区域或其互补链退火而用作互补链合成之起点的互补链会抑制互补链合成。

检测突变和/或多态性的方法

5

技术领域

本发明涉及检测核苷酸序列中的突变和多态性的方法。

背景技术

10 基因区域的突变可导致伴随着翻译氨基酸改变的错义突变，氨基酸无
任何改变的沉默突变，以及因缺失或插入核苷酸而使翻译框移动的移码突
变。错义突变还包括无义突变，其中在不正确的位置处产生了终止密码子。
另外，基因区域的突变也具有通过剪接异常等导致基因翻译异常的潜能。除
了沉默突变外，很多这种突变都伴随着翻译出的蛋白质的结构或功能改变。

另外，表达调节区域的异常也很可能会影响蛋白质的表达调节机制。

15 在核酸的核苷酸序列差异中，某一种群内以 1%或更高频率出现的突变
被特别地称为多态性。种群指的是可通过地理分离来区分的群体或亚种。例
如，当某一突变在日本人中以低于 1%的频率出现，而在其他人种中以 1%
或更高的频率出现时，该突变就不是突变，而是多态性。

20 在这些多态性中，因插入，缺失或置换单个核苷酸而产生的多态性被
特别地称为单核苷酸多态性(下文简称为 SNP)。SNP 分布很广，因为它们
是人类基因组中最常出现的突变。

由于多态性以固定的频率广泛分布于种群中，人们认为它不伴随着任
何表型变化，或者仅伴随着这样的表型变化，该变化只影响到被称为结构的
表型，而不会对存活(繁殖)特别不利。例如，有人提出当典型的成人疾病，
25 如糖尿病，风湿症，变态反应，自身免疫病，肥胖和癌症受遗传特征影响时，
可以通过多态性来测定这些疾病的诱因。另外，药物代谢，人白细胞组织相
容性抗原(下文简称为 HLA)等也受多态性的影响。此外，已揭示出大多数的
多态性为 SNP。

30 由于多态性具有诸如微卫星多态性之类的特征，可通过染色体作图，
连锁分析等，用多态性来测定疾病相关基因。每 300 至 600 个核苷酸中存在

一个 SNP。因此,使用 SNP 能绘制出详细的图谱,该图谱有望促进基因测定。

此外,通过汇集与多态性位置和波动性相关的信息,并分析它们与某些表型的关联性,即有望获得更多的信息。例如,通过发现与药物副作用相关的 SNP,即可防止这种药物副作用。通过克服这些副作用,多种在实际应用中已被放弃的药物可被重新评价为安全的药物。

就细菌和病毒而言,丙型肝炎病毒(下文简称为 HCV)亚型等是基于核苷酸序列特征的分类,所述核苷酸序列常以固定的频率出现,因此,也可将这些亚型看成是多态性。研究这种多态性的基因型的突变分析被称为分型。

10 α -干扰素对 HCV 的治疗效力根据特定亚型的不同而有所区别。因此,定型为选择治疗方法提供了有用的重要信息。另外,还证实了除 HCV 以外的病原体,如流感病毒,疟疾病原体和幽门螺杆菌也是根据亚型的不同而具有不同治疗效力的病原体。因此,定型也为确定这些病原体的治疗模式提供了重要信息。

15 与多态性形成对照的是,对人而言,以低于 1%的频率出现的突变是不会在人群中广泛传播的突变,几乎所有的突变都可能被提及与某些类型的疾病相关。具体地说,这些突变对应于在遗传病中发现的突变。此外,一些在个体中发现的突变也与疾病相关,例如已发现的与癌症相关的突变等。对这些突变的检测可为诊断相应疾病提供决定性的信息。

20 通过与互补的核苷酸序列杂交,可以证实某个基因的核苷酸序列是否与推测的核苷酸序列有所不同。更具体地,可以利用与引物或探针的杂交。

例如,当靶核苷酸序列具有与 PCR 引物互补的核苷酸序列时,该引物只能用作引物。基于这一原理,可使用 PCR 扩增产物作为指示剂,检查靶核苷酸序列以确定该序列是否与引物互补。然而,基于 PCR 进一步证实核苷酸序列的方法存在几个问题。首先,通过引物检验核苷酸序列的机制是不完全的。曾有人考虑过通过 PCR 法的扩增反应来检测单核苷酸差异的方法(等位基因-特异性 PCR, Nucleic Acids Res. 17: p.2503, 1989; Genomics 5: p.535, 1989; J. Lab. Clin. Med. 114: p.105, 1989)。然而,据 S. Kwok 等报道(Nucleic Acids Res. 18: p.999, 1990),当使用具有单核苷酸差异的引物时,与完全互补的引物相比,反应以每轮扩增循环约 0.1%至 85%(根据序列差异而有所不同)进行。换句话说,即使核苷酸序列与引物不完全互补,也常会发

生互补链合成。结果证实：为了使用等位基因-特异性 PCR 区分单核苷酸差异，有必要在另一个位置人工插入另一个错配。然而，在这种情况下，也应根据序列差异精确地设置条件，而这并不是一项普通的技术。因此，难以在普通条件下通过 PCR 鉴定单核苷酸差异，如 SNP。

5 换句话说，根据与互补核苷酸序列的杂交来检测稍有不同的核苷酸序列的方法可能无法准确地进行检测。根据 PCR 方法，通过不准确检测而形成的产物也可以用作完全的模板，因此，这些产物引起指数扩增。使用常规的 PCR 方法检测少量核苷酸序列的问题在于：尽管存在不准确检测的可能性，基于不准确的检测，仍会发生高水平的扩增。

10 PCR 法的第二个问题是：原则上，仅能形成针对两个区域的引物。因此，当同一样品中存在多个由类似核苷酸序列组成的基因时，如果将 PCR 扩增产物的存在或缺乏用作指示剂，很难测定基因的突变和多态性。这是因为即使样品中存在一种具有突变的基因，但是当引物与其中一个基因杂交时，就会进行 PCR 反应。

15 例如，将用于检测家族基因，如人 CYP2C19 中某个基因的突变的引物也用作其它基因的引物。图 6 显示了在人 CYP2C19 家族中发现的彼此类似的核苷酸序列。从图中可以看出，用于检测某个基因突变的引物也可用作其它野生型基因的引物。在这种条件下，难以同时鉴定类似的基因并检测仅有的两个区域的突变。

20 为了解决上述两个问题，有人提出所谓的依赖于 PCR 的突变检测技术，其中通过 PCR 特异性扩增靶基因，然后使用探针或引物检测突变。在这些技术中，DNA 芯片法是格外引人注目的检测技术。在 DNA 芯片上微小的区室内，可以放置很多相似的核苷酸序列。通过控制 DNA 芯片上精细空间的反应环境，可以检测出是否存在基于核苷酸序列细微差别的杂交。然而，使用 DNA 芯片所获得的分析数据的再现性是个主要问题。由于精细反应空间的存在，必须精确设置 DNA 芯片上的杂交条件。为了维持固定水平的再现性，需要复杂精细的技术和最大程度的小心谨慎。另外，由于这是依赖于 PCR 的技术，需要两个步骤；DNA 芯片的价格昂贵是需要解决的另一个问题。

30 另一方面，据报道 Invader 法(Mol. Diagn. 4: p.135, 1999)和 RCA 法(Nat. Genet. 19: p.225, 1998)是不依赖于 PCR 的突变检测技术的例子。然而，这两

种方法的反应特异性都取决于两个邻近区域的探针套。正如在提到 PCR 时所指出的，难以同时鉴定类似的基因并检测仅有的两个区域的突变。

如上所述，已知的进一步证实核苷酸序列的方法都存在问题。例如，在一个步骤中无法精确鉴定微量的核苷酸序列。这些方法也难以同时鉴定相似的基因并检测突变。另外，即使在技术上可以鉴定相似的基因并检测突变(例如依赖于 PCR 的技术)，但是由于需要多个步骤，仍难以维持准确性，或者需要复杂的方法。最后，还需在经济方面进行改善。

发明内容

10 本发明的目的是提供一种新的反应原理，它能同时鉴定相似的基因，并准确检测核苷酸序列中的微小差异。更具体地，本发明的目的是提供通过核酸合成法检测靶核苷酸序列中的突变和多态性的方法，其中可以重复地检验靶核苷酸序列的核苷酸序列。

15 本发明人注意到以下事实：大多数引物不与靶核苷酸序列杂交，这正是基于已知核酸扩增反应进一步证实核苷酸序列的方法的问题所在。具体地说，在 PCR 方法中，源自引物的核苷酸序列被直接用作互补链合成的模板。因此，通过引物杂交检验靶核苷酸序列的机制实际上仅对整个反应中的极小部分起作用。大多数反应通过引物与互补链杂交来进行，所述互补链只是简单地拷贝了引物的核苷酸序列。这种系统与检验靶核苷酸序列的宗旨相去甚远。

20 因此，本发明人希望通过利用核酸合成反应准确地检测靶核苷酸序列中的细微差异，所述反应含有多个与靶核苷酸序列的核苷酸序列杂交的步骤。然后，本发明人发现：利用已完成互补链合成的 3'末端作为接下去的互补链合成的起点，可获得更精确的靶核苷酸序列检验机制，从而完成了本发明。

更具体地说，发明人首次通过互补链合成提供了核苷酸序列鉴定所用的引物，并且发现基于核酸合成法可以实现复杂精细的检验机制，其中引物被用作利用其自身作为模板的互补链合成的起点。本发明的发明人已经报道了这种类型的核酸合成反应(Nucleic Acid Res. 2000, Vol.28, No. 12, e63, WO00/28082)。本发明基于这种核酸合成方法解决了上述问题。更具体地，本发明涉及下列检测突变和/或多态性的方法，以及所用的试剂盒：

30 [1]检测靶核苷酸序列特定区域内的突变和/或多态性的方法，它包括以下步骤：(1)在允许互补链合成的条件下保温下列组分(a)至(e)，其中将第二

和第一引物用作合成的起点;和(2)将利用靶核苷酸序列为模板的互补链合成反应所合成的产物的量与特定区域内突变和/或多态性的存在相联系,其中第二和第一引物的 5'末端中的至少一个上所排列的核苷酸序列含有与所述特定区域的推测核苷酸序列或其互补链互补的核苷酸序列,其中当含有特定区域的核苷酸序列不是预想的核苷酸序列时,利用 5'末端上排列的核苷酸序列为模板而合成的,并通过与特定区域或其互补链退火而用作互补链合成之起点的互补链会抑制互补链合成:

- (a)含有靶核苷酸序列的核酸样品;
- (b)催化包括链置换的互补链合成的 DNA 聚合酶;
- 10 (c)第二引物,其中第二引物的 3'末端与一条所述靶核苷酸序列链 3'方向的区域退火,第二引物的 5'方向包括与推测核苷酸序列互补的核苷酸序列,它构成利用引物作为起点的互补链合成反应的产物上的区域;
- (d)第一引物,其中第一引物的 3'末端与另一条所述靶核苷酸序列链 3'方向的区域退火,第一引物的 5'方向包括与推测核苷酸序列互补的核苷酸序列,它构成利用引物作为起点的互补链合成反应的产物上的区域;和
- 15 (e)核苷酸底物;

[2][1]的方法,其中第二引物或第一引物的 5'末端上排列的核苷酸序列都含有与所述特定区域的推测核苷酸序列或其互补链互补的核苷酸序列,其中当含有特定区域的核苷酸序列不是预想的核苷酸序列时,利用 5'末端排列的核苷酸序列为模板而合成的,并通过与特定区域或其互补链退火而用作互补链合成之起点的互补链会抑制互补链合成:

[3][1]的方法,另外还包括下列组分:

- (1)第三引物,其中第三引物用作互补链合成反应的起点,其中将模板上第一引物退火区域的 3'方向用作起点;和
- 25 (2)第四引物,其中第四引物用作互补链合成反应的起点,其中将模板上第二引物退火区域的 3'方向用作起点;

[4][1]的方法,其中相同样品中存在一种基因,该基因含有的核苷酸序列类似于靶核苷酸序列的核苷酸序列;

- [5][4]的方法,其中所含核苷酸序列类似于靶核苷酸序列的核苷酸序列
- 30 的基因是家族基因和/或假基因;

[6][5]的方法, 其中家族基因和/或假基因是选自下列的任何基因: 细胞色素 P450 家族, 人白细胞组织相容性抗原和血小板同种抗原;

[7][1]的方法, 其中多态性是单核苷酸多态性;

5 [8][1]的方法, 其中靶核苷酸序列选自以下任何致病性病毒或致病性微生物基因的核苷酸序列: 丙型肝炎病毒, 流感病毒, 疟疾和幽门螺杆菌;

[9][1]的方法, 其中在解链温度调节剂的存在下进行保温;

[10][9]的方法, 其中解链温度调节剂是至少一种选自下列的化合物: 甜菜碱, 脯氨酸和二甲基亚砷;

[11][1]的方法, 其中核酸样品为双链;

10 [12][1]的方法, 其中所述方法在核酸检测器的存在下进行, 以根据检测器信号的变化检测突变和/或多态性的存在;

[13][1]的方法, 其中将源自与需检测突变和/或多态性的生物体相同的生物体, 且其序列经证实不包括突变和/或多态性的核苷酸序列用作内部标准, 通过与使用该核苷酸序列为模板所得合成产物的量相比较, 检测突变和
15 /或多态性的存在;

[14][1]的方法, 另外还包括:

(f)第一种具环引物(loop primer), 其中第一种具环引物在第一引物延伸产物中的源自第一引物的区域和所述第一引物的任意区域之间提供互补链合成起点; 和/或

20 (g)第二种具环引物, 其中第二种具环引物在第二引物延伸产物中的源自第二引物的区域和所述第二引物的任意区域之间提供互补链合成起点;

[15][1]的方法, 当含有所述特定区域的核苷酸序列不是预想的核苷酸序列时, 在与特定区域或其互补链退火的过程中, 自互补链 3'末端起的第二至
25 第四个核苷酸中出现错配, 所述互补链是使用排列在第一引物和/或第二引物 5'末端的核苷酸序列为模板而合成的;

[16]含有下列组分, 用于检测靶核苷酸序列中特定区域的突变和/或多态性的试剂盒, 其中第二和第一引物的 5'末端中的至少一个上所排列的核苷酸序列含有与所述特定区域的推测核苷酸序列或其互补链互补的核苷酸序列, 其中当含有特定区域的核苷酸序列不是预想的核苷酸序列时, 利用 5'末端上
30 排列的核苷酸序列为模板而合成的, 并通过与特定区域或其互补链退火而用作互补链合成之起点的互补链会抑制互补链合成;

i)第二引物,其中第二引物的3'末端与一条所述靶核苷酸序列链3'方向的区域退火,第二引物的5'方向包括与推测核苷酸序列互补的核苷酸序列,它构成利用引物作为起点的互补链合成反应的产物上的区域;

5 ii)第一引物,其中第一引物的3'末端与另一条所述靶核苷酸序列链3'方向的区域退火,第一引物的5'方向包括与推测核苷酸序列互补的核苷酸序列,它含有利用引物作为起点的互补链合成反应的产物上的区域;

iii)催化包括链置换的互补链合成的DNA聚合酶;和

iv)核苷酸底物;

[17][16]的试剂盒,另外还包括下列组分:

10 v)第三引物,其中第三引物通过与模板上第一引物退火区域的3'方向退火而用作互补链合成的起点;和

vi)第四引物,其中第四引物通过与模板上第二引物退火区域的3'方向退火而用作互补链合成的起点;

[18][16]的试剂盒,另外还包括下列组分:

15 vii)扩增内部标准的第五引物,其中第五引物的3'末端与内部标准的一个靶核苷酸序列链的3'方向区域退火,第五引物的5'方向包括与含有互补链合成反应之产物的任意区域的核苷酸序列互补的核苷酸序列,其中所述反应利用引物为起点;和

20 iix)扩增内部标准的第六引物,其中第六引物的3'末端与内部标准的一个靶核苷酸序列链的3'方向区域退火,第六引物的5'方向包括与含有互补链合成反应之产物的区域的核苷酸序列互补的核苷酸序列,其中所述反应利用引物为起点;

[19][18]的试剂盒,另外还包括下列组分:

25 ix)第七引物,其中第七引物通过与模板上第六引物退火区域的3'方向退火而用作互补链合成的起点;和

x)第八引物,其中第八引物通过与模板上第六引物退火区域的3'方向退火而用作互补链合成的起点;

30 [20]检测靶核苷酸序列特定区域内的突变和/或多态性的方法,其中第二和第一引物的5'末端中的至少一个上所排列的核苷酸序列含有与所述特定区域的推测核苷酸序列或其互补链互补的核苷酸序列,其中当含有特定区域的核苷酸序列不是预想的核苷酸序列时,利用5'末端上排列的核苷酸序列为

模板而合成的,并通过与特定区域或其互补链退火而用作互补链合成之起点的互补链会抑制互补链合成,所述方法包括下列步骤:

- 5 a)将第一引物与靶核苷酸序列退火,以使用引物为起点,进行互补链合成反应,其中第一引物的3'末端与一条所述靶核苷酸序列链3'方向的区域退火,第一引物的5'方向包括与推测核苷酸序列互补的核苷酸序列,它含有互补链合成反应产物上的区域,所述合成反应利用该引物作为起点;
- 10 b)使步骤 a)中合成的第一引物延伸产物中与第二引物退火的区域处于能让该区域与第二引物进行碱基配对的状态,使用第一引物延伸产物为模板,将它们退火以合成互补链;其中第二引物的3'末端与另一条所述靶核苷酸序列链3'方向的区域退火,第二引物的5'方向包括与推测核苷酸序列互补的核苷酸序列,它含有互补链合成反应产物上的区域,所述合成反应利用该引物作为起点;
- 15 c)使用第二引物的延伸产物自身为模板,通过使具有所述推测核苷酸序列的产物的3'末端与所述延伸产物中的第一引物退火,进行互补链合成;
- d)使用步骤 c)中合成的互补链自身为模板,通过使步骤 c)中合成的,具有所述推测核苷酸序列的互补链的3'末端与所述延伸产物中的第二引物退火,进行互补链合成;和
- e)将利用第二引物作起点所得的合成产物的量与特定区域内突变和/或多态性的存在相联系;
- 20 [21][20]的方法,其中步骤 b)包括通过置换将第一引物延伸产物转变为单链的步骤,其中置换是使用第三引物为起点通过互补链合成反应而进行的,所述第三引物利用了与模板上的第一引物退火的区域的3'方向;
- [22][20]的方法,其中步骤 c)包括通过置换将第二引物延伸产物转变为单链的步骤,其中置换是使用第四引物为起点通过互补链合成反应而进行的,所述第四引物利用了与模板上的第二引物退火的区域的3'方向;
- 25 [23][20]的方法,其中第二和第一引物的5'末端中的至少一个上所排列的核苷酸序列含有与所述特定区域的推测核苷酸序列或其互补链互补的核苷酸序列,其中当含有特定区域的核苷酸序列不是预想的核苷酸序列时,利用5'末端上排列的核苷酸序列为模板而合成的,并通过与特定区域或其互补链退火而用作互补链合成之起点的互补链会抑制互补链合成,所述方法还包括下列步骤:
- 30

- 1)在[20]的方法中, 通过使第一引物的 3'末端与第二引物延伸产物内的推测核苷酸序列退火, 形成能与所述 3'末端的互补核苷酸序列形成碱基对的成环区域, 并使用其自身 3'末端作为互补链合成的起点来进行步骤 c)的互补链合成反应;
- 5 2)使第一引物与成环区域退火, 利用催化互补链合成的 DNA 聚合酶, 使用第一引物为起点进行互补链合成, 所述互补链合成包括链置换;
- 3)使用与成环区域退火的引物为起点, 通过互补链合成反应置换自其自身 3'末端开始延伸的产物, 以使 3'末端和所述推测的核苷酸序列之间能再次发生碱基配对;
- 10 4)通过置换互补链以形成单链核酸, 所述互补链是使用成环区域为起点, 通过使 3'末端与所述推测的核苷酸序列退火作为互补链合成之起点, 进行使用其自身为模板的互补链合成反应而合成的, 其中 3'末端处于步骤 3)中所述的形成碱基对的状态;
- 5)通过使 3'末端与所述第二引物的推测核苷酸序列退火, 并通过互补链合成形成成环区域, 该区域与第二引物 3'末端的互补核苷酸序列形成碱基对;
- 15 6)使第二引物与成环区域退火, 通过催化互补链合成的 DNA 聚合酶, 使用第二引物为起点进行互补链合成, 所述互补链合成包括链置换;
- 7)重复步骤 3)至 6); 和
- 20 8)在步骤 7)之后和/或与步骤 7)平行, 检测单链核酸的形成, 其中重复连接靶核苷酸序列及其互补链, 并使所形成核酸的量与突变和/或多态性相联系;
- [24][23]的方法, 另外还包括下列步骤:
- 9)使用步骤 4)中形成的单链核酸为模板, 通过使其 3'末端与所述第二引物的推测核苷酸序列退火, 形成能与第二引物 3'末端的互补核苷酸序列形成碱基对的成环区域, 并使用其自身的 3'末端作为互补链合成的起点, 以进行互补链合成反应;
- 25 10)使第二引物与成环区域退火, 所述区域是通过使 3'末端与其自身的所述特定区域退火而形成的, 使用第二引物为起点, 通过催化互补链合成的 DNA 聚合酶进行互补链合成, 所述互补链合成包括链置换;
- 30

11)使用与成环区域退火的引物为起点,通过互补链合成反应置换自其自身3'末端开始延伸的产物,以使3'末端和所述推测的核苷酸序列之间能再次发生碱基配对;

5 12)通过置换互补链以形成单链核酸,所述互补链是使用成环区域为起点,通过使3'末端与所述推测的核苷酸序列退火作为互补链合成之起点,进行使用其自身为模板的互补链合成反应而合成的,其中3'末端处于步骤11)中所述的能与所述推测的核苷酸序列形成碱基对的状态;

13)通过使3'末端与所述的推测核苷酸序列退火,并进行互补链合成形成成环区域,该区域与第一引物3'末端的互补核苷酸序列形成碱基对;

10 14)使第一引物与成环区域退火,通过催化互补链合成的DNA聚合酶,使用第一引物为起点进行互补链合成,所述互补链合成包括链置换;

15)重复步骤11)至14);和

16)在步骤15)之后和/或与步骤15)平行,检测单链核酸的形成,其中重复连接靶核苷酸序列及其互补链,并使所形成核酸的量与突变和/或多态性
15 相联系;

[25][24]的方法,另外还包括下列步骤:

17)通过使步骤12)中形成的单链核酸的3'末端与其自身的所述推测核苷酸序列退火,形成能与第一引物3'末端的互补核苷酸序列形成碱基对的成环区域,并使用其自身的3'末端作为起点,使用其自身作为模板以进行互补链
20 合成反应;

[26][20]的方法,其中第二引物和第一引物的5'末端上排列的核苷酸序列都含有与所述特定区域的推测核苷酸序列或其互补链互补的核苷酸序列,其中当含有特定区域的核苷酸序列不是预想的核苷酸序列时,利用5'末端排列的核苷酸序列为模板而合成的,并通过与特定区域或其互补链退火而用作
25 互补链合成之起点的互补链会抑制互补链合成。

[术语的定义]

本发明所用的下列术语分别具有下文所述的含义。

30 突变:本文中的“突变”指的是在相同来源的各个生物(包括病毒)中观察到的核酸的核苷酸序列差异。关于多细胞生物,在个体的器官,细胞等中观察到的差异也被称为突变。突变是由点突变,缺失,插入,重复,倒位和

易位造成的。另外，突变也可出现在基因区域(蛋白质编码区域和内含子序列)或表达调控区域，如启动子和增强子内。突变还包括在其它基因组序列中发现的核苷酸序列差异。

多态性：在上述突变中，以 1%或更高频率出现在某个种群中的突变被特别地称为“多态性”。在多态性中，由置换，插入或缺失单个核苷酸而组成的多态性被特别地称为单核苷酸多态性(或“SNP”)。

靶核苷酸序列：“靶核苷酸序列”是含有一个或多个待测突变或多态性的核苷酸序列，它含有一个区域，其中该区域的 3'方向是通过引物测定的。在下文中，术语“5'方向”和“3'方向”皆指用作模板的链的方向。更具体地，与本发明的引物退火的区域所包围的核苷酸序列含有本发明的靶核苷酸序列。一般说来，从有义链的 5'方向至 3'方向来描述核酸的核苷酸序列。另外，本发明的靶核苷酸序列不仅包括有义链，还包括其互补链，即反义链的核苷酸序列。更具体地，术语“靶核苷酸序列”至少指的是被合成的核苷酸序列或其互补链。靶核苷酸序列含有下文所述的特定区域。

特定区域：“特定区域”是上述靶核苷酸序列中包含的区域，其包括一个或多个待测突变或多态性。根据本发明的检测方法，合成互补链，特定区域的推测核苷酸序列的互补链能与其 5'末端结合。另外，必须加入与特定区域互补的核苷酸序列以包含所合成的互补链的 5'末端。

推测的核苷酸序列：“推测的核苷酸序列”可以是野生型核苷酸序列或含有特定突变的核苷酸序列。当将野生型核苷酸序列用作推测的核苷酸序列时，检测靶核苷酸序列中是否存在野生型的核苷酸序列，并通过特定突变或多态性的核苷酸序列检测靶核苷酸序列中是否存在含有特定突变或多态性的核苷酸序列。

3'末端或 5'末端：术语“3'末端”和“5'末端”不是指任一末端的核苷酸，而是指位于末端的，包括单个末端核苷酸的区域。更具体地，术语“3'末端”和“5'末端”包括自任一末端起的 500 个核苷酸，优选为 100 个核苷酸，或至少为 20 个核苷酸。与之形成对照的是，为了表示单个末端核苷酸或末端附近存在的特定位置处的核苷酸，具体标出了其位置的数值。

模板和互补链：本发明中所用的术语“模板”指的是在互补链合成中被用作模板的核酸。尽管具有与模板互补的核苷酸序列的互补链是对应于模板

的链，但这两者的关系仅仅是相关。具体地说，被合成为互补链的链能用作模板。换句话说，互补链也可用作模板。

核酸合成和扩增：本文所述的核酸合成指的是从用作合成起点的寡核苷酸起延伸核酸。除了合成以外，包括形成其它核酸和延伸所形成的核酸的连续反应的一系列反应被统称为“扩增”。

退火：术语“退火”和“杂交”指的是通过基于 Watson-Crick 模型的碱基配对形成核酸的双螺旋结构。因此，即使核酸链的碱基配对由单链组成，通过分子内的互补核苷酸序列形成碱基对也被认为是退火或杂交。根据本发明，就核酸因碱基配对而形成双螺旋结构这一点而言，退火和杂交是同义词。当形成碱基对的核酸的 3'末端用作互补链合成的起点时，被特别地称为退火。然而，这不意味着通过杂交形成的碱基对不能用作互补链合成的起点。

基本相同的核苷酸序列：当使用某序列为模板合成的互补链与靶序列退火并用作互补链合成的起点时，可以认为该序列与靶序列“基本上相同”。本文所用术语“相同”和“互补”包含不完全相同和不完全互补的情况。更具体地，与某一序列相同的序列也包括能与该序列退火的核苷酸序列的互补序列。另一方面，互补序列指的是能在严紧条件下退火，并提供 3'末端作为互补链合成之起点的序列。更具体地，与某个核苷酸序列具有一般为 50%至 100%，通常为 70%至 100%，优选为 80%至 100%的同一性的核苷酸序列被认为是基本上相同的序列。可根据已知的算法，如 BLAST 来测定同一性。

20

[原理的描述]

在本发明检测突变和多态性的方法中，根据下文所述的原理检验靶核苷酸序列特定区域中的核苷酸序列。首先，在本发明中使用下列第二引物和第一引物。本发明中使用的第二引物和第一引物中的每一个在其 3'末端含有能与靶核苷酸序列 3'方向退火的核苷酸序列，在其 5'末端含有与使用引物的 3'末端为起点延伸的产物中的任意区域互补的核苷酸序列。引物 5'末端上排列的至少一个核苷酸序列被设计成包括与所述特定区域的推测核苷酸序列或其互补链互补的核苷酸序列。当特定区域的核苷酸序列不是预想的核苷酸序列时，利用互补链合成的抑制作用检验互补链的核苷酸序列，所述互补链是使用引物 5'末端上排列的核苷酸序列为模板而合成的。当 3'末端与特定区域(或其互补链)退火并用作互补链合成的起点时，检验机制总能发挥作用。因

30

此,能将特定区域核苷酸序列中出现的任何差异清楚地检测为反应产物的量的差异。

为了根据上述反应原理实际检测突变和/或多态性,例如,可以使用以下反应。具体地说,本发明涉及检测靶核苷酸序列特定区域内的突变和/或多态性的方法,其中第二和第一引物的 5'末端中的至少一个上所排列的核苷酸序列含有与上述特定区域的推测核苷酸序列或其互补链互补的核苷酸序列,其中当含有特定区域的核苷酸序列不是预想的核苷酸序列时,利用 5'末端上排列的核苷酸序列为模板而合成的,并通过与特定区域或其互补链退火而用作互补链合成之起点的互补链会抑制互补链合成,所述方法包括下列步骤:

a)将第一引物与靶核苷酸序列退火,使用引物为起点,进行互补链合成反应,其中第一引物的 3'末端与两条所述靶核苷酸序列链之一的 3'方向的区域退火,第一引物的 5'方向包括的核苷酸序列含有互补链合成产物上的区域,所述合成利用该引物作为起点;

b)使步骤 a)中合成的第一引物延伸产物中与第二引物退火的区域处于能让该区域与第二引物进行碱基配对的状态,使用第一引物延伸产物为模板,将它们退火以合成互补链,其中第二引物的 3'末端与另一条所述靶核苷酸序列链 3'方向的区域退火,第二引物的 5'方向包括与推测核苷酸序列互补的核苷酸序列,它含有互补链合成产物上的区域,所述合成利用该引物作为起点;

c)使用第二引物的延伸产物自身为模板,通过使具有所述推测核苷酸序列的产物的 3'末端与所述延伸产物中的第一引物退火,进行互补链合成;

d)使用步骤 c)中合成的互补链自身为模板,通过使步骤 c)中合成的,具有所述推测核苷酸序列的互补链的 3'末端与所述延伸产物中的第二引物退火,进行互补链合成;和

e)将利用第二引物作起点所得的合成产物的量与特定区域内突变和/或多态性的存在相联系。

在本发明中,第二引物和/或第一引物延伸产物的 3'末端与其自身的特定区域退火,并用作使用延伸产物自身为模板的互补链合成的起点。在此反应中,当特定区域的核苷酸序列是预想的核苷酸序列时,使用 3'末端为起点进行互补链合成。与之形成对照的是,当核苷酸序列不是预想的核苷酸序列

时, 3'末端不能用作互补链合成的起点, 结果, 互补链合成受到抑制。因此, 使用互补链合成的产物为指标, 可以测定特定区域是否具有推测的核苷酸序列, 在所述合成中, 将 3'末端用作引物, 将产物自身用作模板。

此步骤合成的互补链延伸至其自身的 5'末端以完成延伸。根据本发明, 5 模板的 5'末端总含有对应于引物 5'末端上所排列核苷酸序列的核苷酸序列。即, 与延伸产物中的任意区域互补的核苷酸序列被添加到模板的 5'末端。因此, 在使用延伸产物为模板而合成的互补链的 3'末端再次产生与任意区域退火的核苷酸序列。随后, 当 3'末端和与 3'末端退火的任意区域通过某种方式形成碱基对时, 又重新开始互补链的合成。

10 根据本发明, 与延伸产物上的特定区域(或其互补链)互补的核苷酸序列排列于它的 5'末端, 所述产物是使用第二和第一引物中的至少一个的 3'末端为起点合成的。在下文中, 在某些场合下, 将 5'末端含有与特定区域(或其互补链)互补的核苷酸序列的第二或第一引物特别地称为检验引物。

因此, 每当使用检验引物的 5'末端为模板而合成的延伸产物的 3'末端 15 与特定区域(或其互补链)退火时, 所述 3'末端即可检验特定区域(或其互补链)的核苷酸序列。因此, 互补链合成的恢复取决于特定区域是否含有推测的核苷酸序列。从上述描述中可以清楚地看出, 本发明的重要特征是: 当不断重复地检验特定区域的核苷酸序列时, 可进行使用其自身为模板而进行的互补链合成反应。因此, 即使在互补链合成中产生错误的产物, 在下一轮将产物 20 用作模板的互补链合成中, 检验核苷酸序列错误的机制会发挥作用。结果, 在随后一轮互补链合成中, 使用错误产物的互补链合成受到抑制, 因此, 根据本发明, 可以显著降低由错误的互补链合成导致的“噪声”。

仅通过在适当条件下保温下列组分即可进行上述反应, 所述反应实际上 25 是为了根据本发明的原理检测突变和/或多态性。更具体地, 本发明提供了使用检验引物作为第二引物或第一引物中的至少一个, 以检测突变和/或多态性的方法, 所述方法包括下列步骤: 在允许使用第二和第一引物为起点进行互补链合成的条件下, 保温下列组分(a)至(e); 和将利用靶核苷酸序列作为模板的互补链合成反应产物的量与特定区域内突变和/或多态性的存在相联系:

- 30 (a)含有靶核苷酸序列的核酸样品;
(b)催化包括链置换的互补链合成的 DNA 聚合酶;

(c)第二引物: 第二引物的 3'末端与一条所述靶核苷酸序列链 3'方向的区域退火, 第二引物的 5'方向含有与推测核苷酸序列互补的核苷酸序列, 它构成利用引物作为起点的互补链合成的产物上的区域;

5 (d)第一引物: 第一引物的 3'末端与另一条所述靶核苷酸序列链 3'方向的区域退火, 第一引物的 5'方向含有与推测核苷酸序列互补的核苷酸序列, 它构成利用引物作为起点的互补链合成反应的产物上的区域; 和

(e)核苷酸底物。

使用第二和第一引物的核酸-扩增方法是本发明人以前报道过的“LAMP 法”(Nucleic Acid Res. 2000 Vol.28, No.12 e63; WO00/28082)。然而, 10 本发明提供的新发现实际上是: 在检测突变和多态性的方法中, 使用 LAMP 法中所用的至少一个引物作为检验引物, 可以提供高度准确的核苷酸序列检验机制。

上述反应中所用的第一引物含有下列区域:

15 X2: 含有与 X2c 互补的核苷酸序列的区域, 该区域能测定靶核苷酸序列的 3'方向; 和

X1c: 位于上述 X2c 5'方向的区域, 该区域含有与区域 X1 的推测核苷酸序列互补的核苷酸序列, 所述 X1 区域存在于第一引物的延伸产物上。X1 是第一引物延伸产物上的任意区域的序列, 所述任意区域位于第一引物的 3'末端和特定的核苷酸序列之间。X1c 还包括具有与任意区域 X1c 的推测核苷酸序列基本上相同的核苷酸序列的区域。 20

下文将参照图 1 至 4 描述 LAMP 法的反应原理和该方法在本发明中的应用。在下文的描述中, FA 指的是第一引物, RA 指的是第二引物。FA 由 F2 和 F1c 组成, 它们分别对应于上述的 X2 和 X1c。FA 中包含的 F1c 还含有与 F1c 具有基本上相同的核苷酸序列的那些 F1c。根据本发明, 例如, 任 25 选的区域(如上述 F1)可与含有与该区域互补的核苷酸序列的多核苷酸退火, 只要使用多核苷酸为合成起点而合成的互补链具有本发明所需的功能, 即可从任何任意区域选择出该区域。

另一方面, 由分别对应于上述 X2 和 X1c 的 R2 和 R1c 组成的引物可用作本发明的第二引物 RA。在此情况下, 例如, 当将 RA 用作检验引物时, 30 R1c 含有 FA 延伸产物中的特定区域 R1c 的推测核苷酸序列, 所述特定区域

含有待测的突变和/或多态性, R2 含有与核苷酸序列 R2c 互补的核苷酸序列, 它构成 FA 延伸产物中的任意区域。

当在本发明的检测方法中使用检验引物 RA 时, FA 可被用作另一个检验引物。在如下所述使用检验引物 RA 进行互补链合成反应的过程中, FA 延伸产物的 3' 末端时刻准备进行碱基配对, 因此, 可以使用产物自身为模板重复进行互补链合成反应。另一方面, 还连续产生单链形式的 RA 延伸产物。另外, 与 FA 一样, RA 的延伸产物也因其 3' 末端而将它们自身作为模板来进行互补链合成。在此反应循环中, 通过使用 FA 的检验引物可提供检验 FA 延伸产物的核苷酸序列的机制。根据与上文所述的, 通过 RA 检验核苷酸序列的机制相同的原理, 进行本发明使用 FA 的检验机制, 所述机制可用于检验互补链合成中特定区域的核苷酸序列。即将相同的原理应用于特定区域的互补链。

下文将更详细地描述将检验引物用作 FA 和 RA 的反应。当检验引物用作 RA 时, 使用 R1 作为起点的互补链合成[图 4-(9)]受到抑制。类似地, 当检验引物用作 FA 时, 使用 F1 作为起点的互补链合成[图 3-(8)]受到抑制。然而, 与 PCR 中一样, 在实践中不可能利用多核苷酸退火的特异性检测核苷酸序列中的微小差异。对于本发明的反应而言同样如此。即使当特定区域不含有推测的核苷酸序列, 本发明中的互补链合成受到抑制, 较为现实的做法是设想反应不能完全被抑制。

下文将讨论尽管特定区域不是推测的核苷酸序列, 但互补链合成不受抑制的情况。在图 1 至 4 中, 分开图示了 F1 和 R1c(或 R1 和 F1c)。这些图中阐明的反应代表使用检验引物作为 FA 或 RA 的反应。

另一方面, 当检验引物被用作 FA 和 RA 时, 与特定区域互补的核苷酸序列从两个方向上与链退火。因此, 与 R1 退火的 R1c 的至少一部分与 F1 重叠。同时, 身为 F1 互补链的 F1c 的至少一部分与 R1 重叠。

首先, 将在下文中讨论使用 F1 为起点的互补链合成反应[图 3-(8)], 即具有错误的互补链合成的反应。第一步, R1 与错误合成的延伸产物的特定区域退火, 然后, 合成互补链。检验引物为 RA, 使用 RA 为模板合成的 3' 末端 R1 与含有原先为 FA 3' 末端的区域的区域退火。即, 该区域含有推测的核苷酸序列以进行不具检验功能的互补链合成。然而, 当互补链合成至 5'

末端时，其 3'末端是检验引物 FA 5'末端的互补链。因此，通过使合成的互补链的 3'末端与特定区域退火即可发挥检验机制的作用。

如上所述，还存在下列情况，即当 FA 检验机制在检验引物采用 FA 和 RA 的反应中起作用时，RA 检验机制不起作用。然而，当靶核苷酸序列是双链核酸时，RA 和 FA 按照图 1 至 4 中所示的顺序反应的实际的可能性理论上是 1/2。剩下的一半反应按照与图 1 至 4 所示相反的顺序进行。更具体地，在图 1 至 4 中，“R”必须读作“F”才能解释剩下的一半反应，因为 RA 和 FA 各自与构成靶核苷酸序列的两条链退火，并按照相同的方式进行随后的反应。

或者，在基于图 1 至 4 解释本发明的反应时，还需提到 RA(或 FA)不代表与靶核苷酸序列的任一条链退火的特定引物。即，为了便于说明，图仅仅将首先退火的引物解释为 RA。

因此，人们可以容易地认识到检验引物作为 FA 以及 RA 的重要性。具体地说，由于与上述 FA 互补链相似的检验机制对 RA 的互补链也起作用，在整个反应系统中，总共有更多的检验机制在起作用。因此，本发明的优选实施方案是将检验引物用作 FA 和 RA。

下文将更详细地讨论基于本发明的检验机制。尽管本发明将检验引物用作 FA 和 RA，但在有些反应中本发明的检验机制不起作用，这在理论上是确实存在的。具体地说，引物延伸产物的 3'末端不与特定区域退火，而与源自任一引物的核苷酸序列退火，所述引物与环部分退火，该环部分邻近于含有源自检验引物 5'末端的核苷酸序列的区域。当 3'末端不与特定区域退火，而与源自引物的核苷酸序列退火时，检验机制不起作用。然而，根据本发明，重要的是检验机制能多次起作用，直至产生检验机制对其不起作用的产物。

将产生检验机制对其不起作用的产物的可能性 X 表示为 A^n 。在本文中，A 是尽管特定区域不包括推测的核苷酸序列，反应进行的可能性；n 是产生检验机制对其不起作用的产物之前起作用的检验机制的数目。例如，甚至在以 5%的比例产生检验机制对其不起作用的反应产物的情况下，如果检验机制工作 3 次，可能性 X 仅为 $0.05^3 = 0.000125$ (0.01%)。即，与检验机制仅工作 1 次的情况相比，风险降低约 1/500。因此，显而易见的是，相对于检验机制仅工作 1 次的反应而言，本发明中产生检验机制对其不起作用的产物的可能性显著降低。

上述靶核苷酸序列是检测靶或得自检测靶的核酸的一部分或全部。靶核苷酸序列可以是单链或双链序列。当它是双链核酸时，测定靶核苷酸序列和靶核苷酸序列内的特定区域的每条链的 3'末端的至少一部分核苷酸序列是已知的，或者是可预测的。或者，当靶核苷酸序列是单链核酸时，测定靶核苷酸序列 3'方向，互补链 3'方向的核苷酸序列和靶核苷酸序列内的特定区域的至少一部分核苷酸序列是已知的，或者是可预测的。上述 3'末端 X2c 和位于其 5'方向的特定区域 X1c 的核苷酸序列是核苷酸序列应被测定的区域。本发明的特定区域含有潜在被突变的核苷酸，和/或含有一个或多个多态性。应设计本发明的检验引物，使得当特定区域内潜在被突变和/或具有多态性的核苷酸与推测的核苷酸不同时，互补链合成受到抑制。

例如，可按下述设计本发明的检验引物。具体地说，当使用检验引物为模板合成互补链时，设计引物，使得与所合成的互补链的 3'末端邻近的区域对应于与潜在被突变和/或具有多态性的核苷酸残基互补的位点。当用作互补链合成之起点的 3'末端或其相邻区域存在错配时，核酸的互补链合成反应明显地受到抑制。更具体地，当距离用作互补链合成之起点的 3'末端 10 个碱基，特别优选距离 3'末端 2 至 4 个碱基的区域内存在错配，更优选第 2 或第 3 个核苷酸为错配时，互补链合成反应明显地受到抑制。因此，优选设计检验引物 5'方向的核苷酸序列，以在此部分诱导错配，所述错配是由于存在(或缺乏)本发明的待测突变和多态性引起的。

根据本发明，如果起始于反应早期产生的产物的末端结构的反应不能被重复多次，就无法获得广泛的扩增。因此，即使发生错误的合成，由于错配仍无法获得广泛的扩增，因为在某些阶段，扩增中的互补链合成受到抑制。结果，错配有效地抑制了扩增，给出正确的结果。即根据本发明的核酸扩增具有较完美的核苷酸序列检验机制。这些特征提供了优于诸如 PCR 的方法的优点，在这些方法中仅扩增了两个区域之间的序列。

另外，当合成互补序列时，身为本发明所用引物之特征的区域 X1c 仅用作起点，互补序列与相同序列内新合成的 X1 退火以进行合成反应，所述反应使用链自身为模板。因此，即使产生所谓的引物二聚体，本发明的引物仍不会形成环，而这在现有技术中常常是个严重的问题。因此，本发明中不会发生由引物二聚体所致的非特异性扩增，从而改善了反应的特异性。

两个区域 X2c 和 X1c(或用作靶核苷酸序列的核酸的 X2 和 X1)可以彼此连接,或者独立存在。通过产物核酸的自身退火形成的环部分的状态取决于两个区域的相对位置。另外,优选这两个区域必须分开,使得相对于退火两个分子而言,更优先进行产物核酸的自身退火。因此,这两个区域之间间隔核苷酸序列的优选长度一般为 0 至 500 个核苷酸。然而,在一些情况下,两个区域彼此靠得太近不利于通过自身退火形成合乎需要的环。更具体地,能退火新引物并平稳地开始包括链置换的互补链合成反应的结构是环所需要的。因此,更优选将引物设计成使区域 X2c 和位于 X2c 5'方向的区域 X1c 之间的距离为 1 至 100 个核苷酸,进一步优选该距离为 10 至 70 个核苷酸。距离值不含有 X1c 和 X2 的长度。环部分的核苷酸长度进一步包括对应于 X2 的长度。

一般将构成本发明所用引物的区域 X2 和 X1c 彼此不重叠地连续排列于含有上述特定核苷酸序列的核酸内。或者,如果 X2 和 X1c 享有共同的核苷酸序列,可放置它们,使得它们彼此部分重叠。应将 X2 置于 3'末端,一律用作引物。另一方面,如下所述将 X1c 置于 5'末端,为使用 X1c 为模板而合成的互补链的 3'末端提供引物功能。在下一步骤中,将使用引物为合成起点所得的互补链用作反向互补链合成的模板,最终,引物部分也被当成是互补链的模板而被拷贝。被拷贝的 3'末端含有核苷酸序列 X1,并与位于相同链内的 X1c 退火以形成环。在本文中,当模板 5'末端的引物是检验引物时, X1c 与特定区域退火。

本发明中所用的引物是符合两个要求的寡核苷酸:(1)能形成互补的碱基对,和(2)能在碱基对的 3'末端提供-OH 基团以用作互补链合成的起点。引物的骨架不局限于由磷酸二酯键组成的那些骨架。例如,引物可以是硫代磷酸酯,其含有 S 替代 O 作为骨架。另外,核苷酸可以是任何核苷酸,只要它能形成互补的碱基对即可。通常,有五种类型的天然核苷酸,即 A, C, T, G 和 U;然而,还包括类似物,例如溴脱氧尿苷。本发明所用的寡核苷酸不仅用作合成的起点,还优选用作互补链合成的模板。

本发明所用的引物由核苷酸组成,所述核苷酸具有适当的长度,能在下述多种类型的核酸合成反应中的给定条件下,通过维持所需的特异性与互补链进行碱基配对。具体地说,引物含有 5 至 200 个核苷酸,更优选为 7 至 50 个核苷酸。催化依赖于序列的核酸合成的已知聚合酶所识别的最小引物

长度为5个核苷酸左右。因此，优选退火部分的长度大于5个核苷酸。另外，为了确保核苷酸-序列特异性，引物一般含有6个或更多个核苷酸，优选含有7个或更多个核苷酸。另一方面，难以化学合成过长的核苷酸序列。因此，举例说明的上述引物长度为优选范围。例举的引物长度仅对应于与互补链退火的部分。如下所述，本发明的寡核苷酸可独立地与至少两个区域退火。因此，应将上文例举的引物长度理解为：所述长度对应于构成引物的每个区域的长度。

另外，可用已知的标记物标记本发明所用的引物。所述标记物包括具有结合能力的配体，如地高辛和生物素；酶；荧光物质和发光物质；和放射性同位素。另外，将寡核苷酸中的核苷酸转变为荧光类似物的技术是已知的(WO95/05391; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91, 6644-6648, 1994)。

另外，可将本发明所用的引物固定于固相上。或者，用具有结合能力的配体，如生物素标记引物的任意部分，然后经由结合配对物，如固定化的亲和素间接固定该部分。当将固定化的引物用作合成起点时，合成的核酸产物被固定于固相上，因此易于分离该产物。通过核酸-特异性指示剂或通过标记探针进一步杂交，即可检测分离的产物。或者，通过用任意限制性酶消化核酸以回收所需的核酸片断。

除了上述两个区域以外，本发明所用的引物还可含有其它区域。X2和X1c分别位于3'末端和5'末端，任意序列可位于这两个区域之间。所述任意序列包括例如限制性酶识别序列，由RNA聚合酶识别的启动子，编码核酶的DNA等。通过插入限制性酶识别序列，可将本发明的合成产物单链核酸消化成两个长度相同的双链核酸，在所述单链核酸中，互补的核苷酸序列交替相连。通过插入由RNA聚合酶识别的启动子序列，使用本发明的合成产物为模板，可将该产物转录成RNA。另外，通过额外安排编码核酶的DNA，可以建立转录物的自身-裂解系统。上述所有额外的核苷酸序列仅当序列形成双链核酸时才起作用。因此，在形成环的本发明单链核酸中，这些序列不起作用。这些额外的序列首次仅在核酸延伸得以进行，序列与互补的核苷酸序列退火而未形成任何环之后才起作用。

下文将要更具体地描述本发明的上述反应步骤(a)至(f)。

首先，使用第一引物进行将靶核苷酸序列用作模板的互补链合成，其中引物具有与靶核苷酸序列5'方向任意区域相同的序列。然后，使用延伸产物

为模板，用第二引物进行互补链合成。使与引物退火的区域处于准备进行碱基配对的状态，使得能用第二引物进行互补链合成。具体地说，通过伴随着互补链合成的置换即可达到此目的，所述互补链合成使用第三引物为起点，该引物与位于与第一引物退火之区域的3'方向的靶核苷酸序列区域退火。根据本发明，第三引物与位于与第一引物退火的3'方向的区域退火，并用作互补链合成的起点，所述合成针对与第一引物退火的区域进行。该步骤由DNA聚合酶催化，所述酶催化包括链置换的互补链合成。另外，通过诸如热-变性的方法，可将第一引物的延伸产物转变为单链。

10 然后，第二引物的延伸产物使用其3'末端为引物，产物自身为模板，启动互补链合成。将核苷酸序列添加于在使用第二引物的互补链合成中用作模板的第一引物的5'末端，所述序列与第一引物延伸产物的任意区域中的推测核苷酸序列互补。因此，使用第一引物为模板而产生的第二引物延伸产物的3'末端含有与上述任意区域基本上相同的核苷酸序列。

15 在此步骤中，第二引物延伸产物的3'末端和与3'末端退火的区域应制备成准备进行碱基配对的状态。通常，通过将延伸产物转变为单链即可完成该步骤。具体地说，通过例如使用第四引物为起点，进行与互补链合成相关联的置换，可将延伸产物转变为单链，其中所述引物与同第二引物退火的区域的3'方向退火。在本文中，将置换所用的引物，例如上述第三引物和此步骤所用的第四引物称为外部引物。

20 第二引物在其5'末端含有与特定区域内的推测核苷酸序列互补的核苷酸序列。即，第二引物是检验引物。通过引物导入互补的核苷酸序列。因此，使用第二引物为模板合成的序列在其3'末端含有与其自身的特定区域互补的核苷酸序列。因此，系统处于准备检验特定区域中的核苷酸序列的状态。接着，在随后的反应步骤中，实际“检验”核苷酸序列。

25 按下述进行核苷酸序列的检验反应。首先，将上文合成的单链多核苷酸的3'末端和特定区域制备成准备进行碱基配对的状态。优选按下述完成此步骤。具体地说，经由互补链合成置换3'末端，所述合成使用具有发夹结构的成环区域为起点。

30 根据本发明优选的实施方案，将形成环所需的核苷酸序列置于单链多核苷酸的互补核苷酸序列之间。形成环所需的序列在本文中被称为成环序列。上述单链多核苷酸基本上由经由成环序列相连的互补核苷酸序列组成。一般

说来,在碱基对解离之后不会解离成两个或多个分子的核苷酸序列被称为单链,而不用管它是否仍含有部分碱基配对。即使互补的核苷酸序列存在于相同的链上,它们也能形成碱基对。通过允许上述单链多核苷酸在相同的链内形成碱基对而获得的,具有分子内碱基配对的产物含有双链区域和不含碱基配对的环部分。

即,单链多核苷酸也可被定义为单链核酸,它含有在相同链内彼此退火的互补核苷酸序列,其退火产物在弯曲的绞链部分含有不具有碱基配对的环。具有互补核苷酸序列的核苷酸可与不含碱基配对的环退火。成环序列可以是任意核苷酸序列。成环序列可形成碱基对以启动互补链合成,用于进行链置换,优选成环序列含有与其它核苷酸序列有所不同的序列,从而进行特异性退火。例如,在优选实施方案中,成环序列含有与第一引物互补的核苷酸序列。图5显示了示意图,其中FA与成环区域退火。

通过第一引物与成环区域退火而进行的互补链合成置换单链多核苷酸的杂交部分,以制备准备进行碱基配对的特定区域和单链多核苷酸的3'末端。特定区域和单链多核苷酸的3'末端一起退火,3'末端提供3'-OH用作互补链合成的起点。在此阶段,其核苷酸序列应被检验的特定区域与3'末端退火。因此,当此区域的核苷酸序列与推测的核苷酸序列相同时,使用3'末端为起点进行互补链合成。或者,当序列不是推测的核苷酸序列时,互补链合成受到抑制。

本发明最重要的特征是:通过利用LAMP法,核苷酸序列检验机制在随后的反应中一次又一次地发挥作用。例如,即使不论核苷酸序列与推测的核苷酸序列的差异,仍进行互补链合成,使用本发明的单链多核苷酸为模板的互补链合成反应产物的3'末端含有与特定区域互补的链。甚至在重复几次互补链合成之后,由于产物自身在5'末端的特定区域内具有推测的核苷酸序列,产物的结构不会改变。另一方面,使用靶核苷酸序列为模板拷贝与3'末端退火的特定区域,因此,这两者的退火仍含有错配。因此,在包括第二轮反应的随后几轮反应中,还会发生抑制作用。可以认为根据本发明的核苷酸序列检验机制是使错误互补链合成的影响最小化的机制。

如上所述,当在靶核苷酸序列的存在下,使用具有特定结构的引物,和催化包括链置换的互补链合成的DNA聚合酶进行合成时,具有核苷酸序列检验机制的互补链合成反应得以进行。结果,如果特定区域的核苷酸序列是

推测的核苷酸序列，即开始连续产生互补链合成产物。另一方面，当序列不是推测的核苷酸序列时，本发明的核苷酸序列检验机制显著抑制互补链合成。因此，当在固定的一段时间之后检测扩增产物时，可以得出以下结论：即样品中的特定区域具有推测的核苷酸序列。

- 5 通过本发明的互补链合成获得的核酸是在单链上含有交替相连的互补核苷酸序列的核酸。根据本发明，将所产生核酸的量与特定区域内推测核苷酸序列的存在相联系。即，相对于当特定区域的序列是推测的核苷酸序列时，所产生的具有该构象的核酸的量而言，当序列不是推测的核苷酸序列时，所产生的相应的量有所减少。本文所用的，含有以单链形式交替相连的互补核苷酸序列，被用作指标的核酸指的是含有两个彼此互补，交替相连于单链上的核苷酸序列的核酸。

- 15 通过本领域已知的方法可以检测互补链合成的产物。例如，通过用凝胶电泳分析反应溶液，可将本发明的特定扩增产物测定为不同的带。本发明的扩增产物由重复的靶核苷酸序列构象及其互补链为单位组成。产物的电泳结果给出以固定间隔排列的梯形带。或者，也可通过已知方法监测反应过程中互补链合成的进程。例如，可使用特异于双链核酸的荧光染料，如溴化乙锭和 SYBR Green，将互补链合成产物的积累监测为荧光强度变化。可以使用下述内部标准：当内部标准发出的信号增强或到达平台期，而样品发出的信号基本上未增强时，表示样品中的特定区域不具有推测的核苷酸序列。

- 20 根据本发明的检测方法，可将互补链合成所合成的产物的量与内部标准的相应量进行比较。例如，可将源自相同的核酸样品，但不含突变或多态性改变的核酸用作内部标准。为了分析基因组核苷酸序列，将已知不存在突变或多态性的基因组核苷酸序列用作内部标准。或者，当使用 mRNA 为模板进行本发明的检测方法时，例如可将在多种细胞中以几乎相同的水平表达的基因用作内部标准。将上述任何内部标准的核苷酸序列用作靶核苷酸序列，
- 25 在与本发明相同的条件下进行互补链合成反应。将产物的量用作对照，与需检测突变的样品的核苷酸序列的相应量进行比较。当产物的检测量与内部标准的差不多时，证明特定区域的核苷酸序列具有推测的核苷酸序列。反之，当特定区域的核苷酸序列不是推测的核苷酸序列时，互补链合成产物的量小
- 30 于内部标准的相应量。

另外,当出乎意料地未检测到内部标准的互补链合成产物时,或者当检测到的产物的量小于期望值时,怀疑反应自身出了问题。在大多数情况下,在与试验引物相同的反应溶液中进行内部标准的反应。然而,在本发明中可以分开检测内部标准,只要在同一条件下,使用相同样品进行反应即可。例如,甚至当在第一反应系统和第二反应系统中,分别使用相同样品检测标准

5 和样品核酸时,标准也被称为内部标准。

根据本发明,当特定区域含有推测的核苷酸序列时,合成的核酸中的互补核苷酸序列数目至少为一对。根据本发明优选的实施方案,该数目有时是整倍数。在这种情况下,理论上对本发明的上述核酸中互补核苷酸序列对的数目没有上限。当作为本发明的产物被合成的核酸由多对互补核苷酸序列组成时,核酸由相同核苷酸序列重复组成。无需多说,反应产物可包括那些在沿着模板进行互补链合成反应的过程中,预-成熟终止而未到达 5'末端的产物。

10

根据本发明合成的,含有以单链形式交替相连的互补核苷酸序列的核酸不总是必须具有与天然核酸相同的结构。已知在具有 DNA 聚合酶的核酸合成中,可通过使用核苷酸衍生物为底物合成核酸衍生物。所述核苷酸衍生物包括由放射性同位素标记的核苷酸,以及由具有结合能力的配体,如生物素和地高辛标记的核苷酸衍生物。使用这种核苷酸衍生物可标记作为产物的核酸衍生物。或者,使用荧光核苷酸为底物,可获得作为荧光核酸衍生物的产物。另外,产物可以是 DNA 或 RNA。产生的是 DNA 还是 RNA,取决于核酸聚合化中所用的引物结构,聚合化底物的类型和聚合化试剂的类型组合。

15

20

本发明中所用的核酸可以是 DNA, RNA 或其嵌合分子。核酸可以是天然核酸,以及人工合成的核酸。另外,本发明的核酸还包括具有部分或完全人工结构的核苷酸衍生物,只要它可形成碱基对或能在互补链合成中用作模板即可。对本发明核酸中的核苷酸数目没有限制。术语核酸等同于术语多核苷酸。另一方面,本文所用术语寡核苷酸特别地指在多核苷酸中具有较少数目的核苷酸的多核苷酸。一般说来,术语寡核苷酸指的是含有 2 至 100 个核苷酸残基,更优选约 2 至 50 个核苷酸残基的多核苷酸,但并不局限于此。

25

本发明的检测方法可用于所有类型的核酸。具体地说,例如,所述核酸包括原核和真核细胞的基因组 DNA; 病毒基因组 DNA 和 RNA; 细胞内寄生虫,如支原体和立克次氏体的基因组; 由这些物种的 mRNA 转变而来的

30

cDNA; 由这些基因来源构建的文库; 分离自文库的克隆等。当需检测突变和多态性改变的基因是 RNA 时, 可使用具有逆转录酶活性的 DNA 聚合酶将其转变为 cDNA。用作本发明样品的核酸一般包含于生物样品中。所述生物样品包括动物和植物组织, 微生物细胞, 细胞, 培养物, 排泄物及其提取物。根据本发明, 得自生物体的生物样品和源自宿主生物体中生活的传染性寄生虫, 微生物和病毒的生物样品中所含的核酸可用作检测的靶。本发明的核酸也可得自上述生物样品的核酸。例如, 在本发明的检测方法中, 可将由 mRNA 合成的 cDNA 和由得自生物样品的核酸扩增的核酸用作样品。这些基因在按下文所述变性成单链, 或保持为双链之后, 可用作本发明检测方法中的样品。

当在适于引物退火和使用引物为起点进行互补链合成的条件下保温时, 含有本发明的靶核苷酸序列的双链形式的核酸可用作样品。一般说来, 通过变性转变为单链的步骤是通过与探针或引物杂交以分析核酸样品所必需的。然而, 本发明人已发现: 在使双链核酸去稳定化的条件下, 由引物进行互补链合成的过程中则可省去转变为完全单链的步骤(2000 年 4 月 7 日提交的日本专利申请 2000-111939)。

具体地说, 在仅使双链核酸去稳定化的条件下, 难以进行有效的互补链合成, 但是, 通过联合使用合成与起初在等温条件下进行的核酸扩增反应, 即可进行效率类似于使用单链核酸模板所获得的效率的扩增。当使用的模板核酸为单链时, 本发明所用的核酸扩增方法在等温下进行。该方法基于等温条件下互补链合成反应循环的原理, 所述反应循环由以下步骤组成: 自身退火, 随后进行互补链合成, 更新的引物与环退火, 随后再使用 DNA 聚合酶进行互补链合成, 所述聚合酶催化包括链置换的互补链合成。因此, 根据本发明, 双链核酸可用作靶核苷酸序列。

本文描述了将双链核酸直接用作本发明的模板以检测突变和多态性的方法。下列描述解释了当特定区域的核苷酸序列就是推测的核苷酸序列时启动的互补链合成过程。当特定区域的核苷酸序列与推测的核苷酸序列有所不同时, 在链自身的 3' 末端与特定区域退火之后, 使用链自身为模板进行的互补链合成反应的抑制步骤被掺入下文所述的一些类型的互补链合成反应中。

本发明的双链核酸包括例如 cDNA 和基因组 DNA。另外, 其中已插入这些 DNA 的多种载体也可用作本发明的双链核酸。本发明的双链核酸可以

是纯化的或粗的核酸。另外，本发明的方法也适用于细胞中的核酸(原位)。使用细胞中的双链核酸为模板，即可进行原位基因组分析。

当本发明中将 cDNA 用作模板时，可在相同条件下进行本发明的 cDNA 合成步骤和核酸合成方法。当使用 RNA 为模板进行 cDNA 的第一链合成时，形成 DNA-RNA 杂合体的双链核酸。可使用双链核酸作为本发明的模板进行合成核酸的方法。当本发明合成核酸的方法中所用的 DNA 聚合酶具有逆转录酶活性时，在相同条件下使用单个酶即可完成核酸合成。例如，Bca DNA 聚合酶是具有链-置换活性以及逆转录酶活性的 DNA 聚合酶。显然，在通过第二链合成形成完全双链 cDNA 之后，也可使用本发明的合成核酸的方法。

10 使用聚合酶检测本发明的突变和多态性，所述聚合酶催化包括链置换的互补链合成。与 SDA 等所用的聚合酶类型相同的聚合酶可用作本发明的 DNA 聚合酶。在使用引物作为合成起点的互补链合成过程中，通过置换模板 5'方向上的双链区域(如果模板上存在任何双链区域的话)来合成互补链的特定聚合酶是本领域已知的，其中所述引物与某个核苷酸序列 3'方向的区域互补。模板的 5'方向代表位于引物 3'方向的区域。因此，模板的 5'方向是进行互补链合成反应的方向。根据本发明，还需添加互补链合成所需的底物。

在本发明中，将任意引物与双链核酸混合，在确保使用引物为起点进行互补链合成的条件下保温混合物。使用本发明的任意引物，使与 FA 退火的区域作好碱基配对的准备。因此，任意引物需要具有与模板双链核酸的核苷酸链的互补链退火的能力，其中所述核苷酸链与 FA 退火。另外，使用本发明的任意引物作为复制起点的互补链合成中的链延伸应该针对与 FA 退火的区域进行。换句话说，引物可与区域的任意部分退火，所述区域用作使用 FA 为起点的互补链合成的模板。可从任意区域中选择符合标准的任意引物。例如，在 RA 或模板内与 RA 退火之区域的 3'方向上退火的外部引物(将在下文描述)也可用作任意引物。使用外部引物是本发明的一个优选实施方案，因为必需的反应组分的数目有所减少。

25 通过在使用任意引物为起点的互补链合成中置换两条双链核酸链中的一条，即可确保与 FA 进行碱基配对。通过选择这种条件，甚至在将双链核酸用作样品时，也可在不改变温度的情况下进行本发明的方法。能确保任意引物和双链核酸退火，并使用该引物为起点进行互补链合成的条件实际上是在不改变反应条件的情况下完成下列多个步骤的条件：

- i)使引物与双链核酸模板退火；和
- ii)使用退火引物为复制起点进行互补链合成。

通常，人们相信仅当与引物退火的区域为单链时，引物才能与核酸链退火。因此，当将双链核酸用作模板时，以前核酸还需要经过以下步骤，即在
5 引物退火之前，先通过变性将核酸转变为单链。然而，在通过某种方式使双链去稳定化，而不是将双链完全转变为单链的条件下，通过保温模板与引物也可达到与引物退火的目的。将双链核酸加热至接近解链温度(下文简称为 T_m)的条件可被举例为双链去稳定化条件。或者，加入 T_m 调节剂也有效。

在以下组分的存在下进行包括一系列步骤的反应，所述组分是：提供适
10 于酶反应的 pH 的缓冲液，引物退火和维持酶催化活性所需的盐，酶的防腐剂，另外必要时还包括解链温度(T_m)调节剂等。本发明中使用了具有缓冲作用的缓冲液，其 pH 范围为中性至弱碱性，如 Tris-HCl。根据所用 DNA 聚合酶的类型来调节 pH。为了维持酶活性和改动核酸解链温度(T_m)而加入的盐的例子包括：KCl, NaCl, $(NH_4)_2SO_4$ 等。酶的防腐剂包括牛血清白蛋白
15 和糖。

另外，常用的解链温度(T_m)调节剂包括甜菜碱，脯氨酸，二甲基亚砷(下文简称为 DMSO)和甲酰胺。当使用解链温度(T_m)调节剂时，可在有限的温度范围内调节上述寡核苷酸的退火。另外，甜菜碱(N,N,N,-三甲基甘氨酸)和四烷基铵盐因其等稳定化作用而能有效改善链置换的效率。在反应溶液
20 中加入浓度约为 0.2 至 3.0M，优选约为 0.5 至 1.5M 的甜菜碱有望能增强本发明的核酸扩增。由于这些解链温度调节剂降低了解链温度，通过考虑反应条件，如盐浓度和反应温度，凭经验选择能提供所需严谨度和反应性的条件。

通过利用 T_m 调节剂，可以容易地选择酶反应所需的适当温度条件。根据引物与靶核苷酸序列的关系改变 T_m 。因此，优选调节 T_m 调节剂的量，
25 使得维持酶活性的条件与符合本发明标准的保温条件一致。根据本发明的内容，本领域技术人员可以根据引物核苷酸序列容易地选择待加入的适当量的 T_m 调节剂。例如，可根据退火核苷酸序列的长度和 GC 含量，盐浓度和 T_m 调节剂的浓度来确定 T_m 。

引物与双链核酸在这种条件下退火被认为是不稳定的。然而，当 DNA
30 与催化包括链置换的互补链合成的 DNA 聚合酶一起保温时，使用不稳定退火的引物作为复制起点以进行互补链合成。一旦合成互补链，随着时间的流

逝，引物退火变得更加稳定。下文列出的 DNA 聚合酶在确保引物与双链核酸退火的条件下催化互补链合成。

催化包括链置换的互补链合成的 DNA 聚合酶在本发明检测突变和多态性的方法中起着至关重要的作用。所述 DNA 聚合酶包括下文所列的那些。

- 5 另外，本发明还可以使用这些酶的多种突变体，只要它们具有依赖于序列的互补链合成活性和链置换活性即可。所述突变体包括截短的酶或突变的酶，前者仅具有具催化活性的结构，后者的催化活性，稳定性或热稳定性已通过氨基酸突变得以修饰。

Bst DNA 聚合酶

- 10 Bca(exo-) DNA 聚合酶

DNA 聚合酶 I 的 Klenow 片断

Vent DNA 聚合酶

Vent(Exo-) DNA 聚合酶(无外切核酸酶活性的 Vent DNA 聚合酶)

DeepVent DNA 聚合酶

- 15 DeepVent(Exo-) DNA 聚合酶(无外切核酸酶活性的 DeepVent DNA 聚合酶)

Φ29 噬菌体 DNA 聚合酶

MS-2 噬菌体 DNA 聚合酶

Z-Taq DNA 聚合酶(Takara Shuzo)

- 20 KOD DNA 聚合酶(TOYOBO)

在这些酶中，特别优选 Bst DNA 聚合酶和 Bca(exo-) DNA 聚合酶，因为它们是具有一定程度的热稳定性和高催化活性的酶。根据本发明，在相同条件下进行引物与双链核酸的退火和互补链合成。由于所述反应经常需要一些加热，因此优选使用热稳定性的酶。通过热稳定性的酶，可在多种条件下
25 完成反应。

- 例如，Vent(Exo-) DNA 聚合酶是具有链置换活性的高度热稳定的酶。据报道，加入单链-结合蛋白可促进使用 DNA 聚合酶进行的，包括链置换的互补链合成反应(Paul M. Lizardi 等, Nature Genetics 19, 225-232, 1998 年 7 月)。通过将此方法应用于本发明，有望通过加入单链-结合蛋白来促进互补
30 链合成。当使用 Vent(Exo-) DNA 聚合酶时，T4 基因 32 可有效地用作单链-结合蛋白。

由于使用了缺乏 3'-5'外切核酸酶活性的 DNA 聚合酶,本领域已知这样一种现象:即甚至当反应到达模板的 5'末端,已合成的链中添加了多余的核苷酸时,互补链合成仍未终止。本发明不优选此现象,因为接下来的互补链合成从合成的 3'末端互补链序列开始。然而,由 DNA 聚合酶添加至 3'末端的核苷酸很有可能是核苷酸“A”。因此,应选择互补链合成的序列,以从 3'末端的 A 开始合成,从而避免因错误添加单个-dATP 核苷酸所致的问题。或者,甚至当 3'末端在互补链合成的过程中为突出端时,可通过 3'→5'外切核酸酶活性将其消化成平端。例如,可以联合使用具有这种活性的天然 Vent DNA 聚合酶与 Vent(Exo-) DNA 聚合酶以克服上述问题。

与上述 DNA 聚合酶不同,诸如常用于 PCR 的 Taq 聚合酶 PCR 之类的 DNA 聚合酶在一般的条件下几乎不表现出链置换活性。然而,当在确保能进行链置换的条件下使用这种 DNA 聚合酶时,所述酶也可用于本发明。

根据本发明,可在 LAMP 法中使用具环引物来改善扩增效率。具环引物是在上述 FA 延伸产物中的源自 FA 的区域和对应于 FA 的任意区域(即含有与 FA 5'末端互补的核苷酸序列的区域)之间提供互补链合成起点的引物。对 RA 而言情况类似,可以使用具环引物,在上述 RA 延伸产物中的源自 RA 的区域和对应于 RA 的任意区域(即含有与 RA 5'末端互补的核苷酸序列的区域)之间提供互补链合成起点。本文为了方便起见,将对应于 FA 的具环引物称为具环引物 F;将对应于 RA 的具环引物称为具环引物 R。根据 LAMP 法的产物经常包括不能与 RA 或 FA 退火的环这一事实来设计具环引物。本发明人提交了有关使用具环引物的 LAMP 法的专利申请(2000 年 9 月 19 日提交;日本专利申请号为 2000-283862)。通过联合使用具环引物和 LAMP 法,反应效率显著改善。在使用具环引物时,在加入具环引物 F 和/或具环引物 R 以及 RA, FA, 必要时还加入外部引物之后,开始反应。甚至通过在反应进行之后仅加入具环引物,具环引物也有望能发挥作用,然而,为了改善反应效率,更为理性的做法是在开始反应之前加入它们。

根据本发明,试剂盒可作为本发明上述反应的一套预先组合好的组分被提供。更具体地,本发明涉及用于检测突变和/或多态性的试剂盒,其含有由两种内部引物组成的引物套,催化包括链置换的互补链合成的 DNA 聚合酶,以及核苷酸底物,其中上述引物套中至少任一种内部引物是检验引物。本发明的试剂盒中还可掺入对应于上述内部引物的外部引物和另一个内部

标准引物套。另外，试剂盒也可含有具环引物以改善反应效率。另外，试剂盒中还附有标准样品作为阳性或阴性对照，操作说明书等。此外，试剂盒可含有指示剂组分用于检测扩增产物。所述指示剂包括例如荧光染料，如 EtBr；识别扩增产物的核苷酸序列时可产生信号的探针等。

5 另外，通过联合使用两套针对野生型和突变型的引物作为上述内部引物套，可以提供用于测定杂合子/纯合子的基因定型试剂盒。当用基因定型试剂盒检测不同类型的突变时，通过使用数目相当于突变类型数目的多个引物套进行基因定型，可以辨别所有突变型的纯合子和杂合子。在家谱分析和基于基因型的表型预测中，测定纯合子和杂合子是至关重要的。

10 下文将参照图 1 至 4 描述通过联合使用上述内部引物 RA 和 FA，和具有链-置换活性的 DNA 聚合酶进行双链核酸扩增反应的基本原理。根据实施例，扩增引物套由内部引物 RA 和 FA 组成，另外，RA 还用作任意引物，可以使与 FA 退火的双链靶核苷酸序列区域作好碱基配对的准备。当特定区域，即 R1 含有推测的核苷酸序列时，如下所述的扩增反应将在本发明中进行。

15 另一方面，如果特定区域不具有推测的核苷酸序列，每当 3'末端 R1c 与 R1 退火时，互补链合成反应即受抑制，因此，理论上，扩增反应不会进行。或者，甚至在有可能使用 R1c 为起点，错误地进行互补链合成时，最终的影响也可以忽略不计，原因是产物的量非常少。

20 上述任意引物(图 1-(1)中的 RA)首先与模板双链核酸上的 X2c 退火(对应于 R2c)以用作互补链合成的起点。在这种条件下，双链核酸是不稳定的，引物直接用作双链核酸上的互补链合成的起点。在图 1-(2)中，使用 RA 为起点合成的互补链置换了模板双链核酸的一条链，与内部引物 FA 退火的区域 F2c 已作好碱基配对的准备(图 1-(2))。

25 通过使 FA 与已作好碱基配对准备的区域 F2c 退火，进行互补链合成。在本文中，由 FA 3'方向启动互补链合成的外部引物 F3 也与该区域退火(图 2-(4))。设计外部引物，以在每个内部引物的 3'方向上启动互补链合成，相对于内部引物而言，外部引物的使用浓度较低。因此，与内部引物相比，外部引物更有希望启动可能性较低的互补链合成。

30 联合使用具环引物和内部引物 RA 和 FA 的本发明突变检测方法中的检验机制的严紧度主要取决于 F1/F1c 的 T_m 。通过在可允许的范围内使 F1/F1c 的 T_m 最小化，即可获得严紧的核苷酸序列-检验机制。然而，在 F1/F1c 的

T_m 低于可接受的限度的情况下，甚至当特定区域的核苷酸序列是推测的核苷酸序列时，也不能进行有效的扩增。例如，在下述实施例中，当 F1/F1c 的 T_m 为 45°C 时，在反应温度为 60°C 时会发生有效的合成。通常，当反应温度比 T_m 高 15°C 时，不同多核苷酸分子的杂交不能进行。换句话说，在这种情况下，无法进行有效的互补链合成。然而，由于在本发明中 F1/F1c 的退火发生在单个分子上，因此，甚至当 T_m 比反应温度低很多时，也可在不牺牲反应效率的情况下获得严紧度足够高的核苷酸序列检验。因此，对本发明而言较为有利的条件是：设计 F1/F1c 的 T_m，使得不同类型的多核苷酸不能彼此杂交，但可以进行分子内杂交。例如，下文所述实施例 5 中所用的各个引物的 T_m 值如下：

外部引物 F3(R3): 60°C

具环引物 FL: 56°C

具环引物 RL: 58°C

内部引物 FA 3'方向上的 F2(或 RA 3'方向上的 R2): 55°C

内部引物 FA 5'方向上的 F1c(或 RA 5'方向上的 R1c): 45°C

当根据本发明联合使用具环引物时，整体反应效率有所增加。因此，甚至在将 F1c(R1c)的 T_m 设置得较低时，也有望在短时间内进行广泛扩增。因此，根据本发明可缩短引物的长度。

使用外部引物 F3 作为起点进行的互补链合成的结果是：使用内部引物 FA 为起点合成的延伸产物被置换和释放成单链(图 2-(5))。使用所述单链为模板，RA 和对应于 RA 的外部引物 R3 彼此退火，并启动互补链合成(图 3-(6))。结果，RA 延伸产物具有能使 3'末端 F1 与其自身进行分子内退火的结构(图 3-(8))。

在图 3-(6)中，链的 5'末端在分子内与其自身退火。然而，此结构不能启动扩增反应，因为 5'末端不能用作互补链合成的起点。仅当合成了图 3-(6)所示链的互补链，随后提供在其 3'末端与其自身退火的结构(图 3-(8))时，才能启动扩增反应。可将这些反应步骤称为本发明扩增反应的准备步骤。

下文将参照附图中所示的示意图，具体描述本发明的核酸扩增和特定区域 R1c 的核苷酸序列检验机制。将自身-退火的 3'末端 F1(图 3-(8))用作互补链合成的起点。与 3'末端的退火发生在 F1 和 F1c 之间，因此，也可能发生下述情况，即所述退火与也含有 F1c 的 FA 竞争。然而，实际上，存在于相

同链上的相邻区域的互补核苷酸序列 F1/F1c 优先互相退火。因此, 优先启动使用其自身链为模板的互补链合成反应。通过此反应合成核酸, 其中靶核苷酸序列在单链上交替相连。另外, 在通过 3' 末端 F1 自身退火而形成的成环区域中存在能与内部引物 FA 退火的 F2c。FA 与此部分退火之后, 启动互补链合成(图 3-(8))。图 5 显示了与内部引物 FA 退火的环部分的位置关系。自与环退火的 FA 起的互补链合成置换了使用其自身为模板, 自 3' 末端起始的互补链合成的产物, 3' 末端 R1 再次作好自身退火的准备(图 4-(9))。随后的反应包括使用其自身 3' 末端为起点, 其自身链为模板的互补链合成, 以及使用环部分为起点和内部引物 RA 为起点的互补链合成的交替步骤。如上所述, 核酸扩增反应包括使用其自身链为模板的重复 3' 末端延伸, 以及新启动的由与环部分退火的引物开始的延伸的交替步骤。

另一方面, 关于所合成的, 使用其自身链为模板, 使用与其环部分退火的寡核苷酸为起点而延伸的, 与单链核酸互补的核酸链, 也在合成的核酸链上进行具有交替相连于单链上的互补核苷酸序列的核酸的合成。具体地说, 例如, 如图 4-(9)所示, 自环部分起的互补链合成当到达 R1 时即告完成。然后, 使用被核酸合成置换的 3' 末端作为起点, 新启动另一轮互补链合成(图 4-(9))。逐渐地, 反应再次到达在先前的步骤中被用作合成起点以启动置换的环部分。因此, 自环部分启动合成的核酸也被置换, 结果, 产生在链自身上退火的 3' 末端 R1(图 4-(11))。该 3' 末端 R1 在与相同链上存在的 R1c 退火之后, 启动互补链合成。当该反应中的 F 为 R, 而 R 为 F 时, 反应与图 3-(8)中所示的相同。因此, 将图 4-(11)中所示的结构用作新核酸, 继续自我-延伸和另一轮核酸合成。

如上所述, 根据本发明的方法, 可连续提供能启动另一轮延伸的核酸的反应与核酸的延长一起进行。由于链被进一步延伸, 在链的末端和相同的链内都产生了多个成环序列。当这些成环序列通过包括链置换的合成反应作好碱基配对的准备时, 内部引物与成环序列退火, 并用作合成起点以产生新的核酸。通过联合使用由链的内部区域起始的合成与自链末端起始的链合成, 即可获得更有效的扩增。

另外, 通过在本发明中同时采用 RA 和 FA 作为检验引物, 可以增加检验机制的检验频率。或者, 甚至当仅用使用 RA 为模板产生的 3' 末端来检验特定区域内的核苷酸序列时, 也可通过检验特定区域内的核苷酸序列来进行

互补链合成反应。结果,相对于特定区域具有推测的核苷酸序列的情况而言,特定区域不具有推测的核苷酸序列的互补链合成所产生物的量大大减少。因此,本发明提供了检测突变和/或多态性的方法,根据该原理,所述方法具有极好的 S/N 比率。

- 5 如上所述,通过使用具有特定结构的引物,即可完成伴随新核酸合成的链延伸。另外,根据本发明,新产生的核酸自身延伸,导致新产生其它核酸。理论上,这一系列反应永无休止地持续,因此,可获得极为有效的核酸扩增。另外,可在等温的反应条件下进行本发明的方法。

- 10 当在本发明中将 RA 和 FA 用作内部引物时,重要的特征是仅当多个区域的相互位置保持不变时,才能进行这一系列的反应步骤。另外,在联合使用外部引物的实施方案中,反应至少涉及到 6 个区域。由于这一特征,即可有效防止伴随着非-特异性互补链合成的非-特异性合成。具体地说,该特征使甚至当发生了一些非-特异性反应时,产物用作随后的扩增步骤的起始物质的可能性降低。

- 15 另外,可通过多个不同的区域控制反应过程这一事实给人们构建检测系统提供了灵活性,所述系统能精确地分辨相似的核苷酸序列。检测诸如人 CYP2C19 的基因的相似核苷酸序列之间的 SNP 是一项重要的任务。然而,通过根据常规的基因扩增技术,如 PCR 和其它已知的信号扩增技术,如 Invader 法进行单轮扩增反应,难以检测到相似核苷酸序列中的细小突变。
- 20 根据本发明,当多个区域含有推测的核苷酸序列并维持特定的位置关系时,可设计引物以确保进行广泛地扩增。

- 25 因此,本发明可在例如定型 HLA 和血小板同种抗原或致病性微生物的过程中,用于检测含有类似核苷酸序列的多个基因之间核苷酸序列的微小差异。测定基因型的基因的大多数部分是基因所共有的,基于一些区域内的突变模式进行定型。在这种分析中适于使用本发明的方法,在所述方法中,仅当多个区域的核苷酸序列与推测的相同时,才会产生一定量的扩增产物。

- 30 另外,基于本发明,通过联合使用一种引物与另一种引物分析同一样品的基因组 DNA,可以清楚地分辨杂合子和纯合子,其中前一种引物在特定区域的核苷酸序列与野生型的相同时可确保扩增所述核苷酸序列,而后一种引物能确保扩增与突变型相同的序列。具体地说,当仅通过任一种引物扩增

样品时,样品是野生型或突变型的纯合子。另一方面,当通过两种引物进行扩增时,样品是由突变型和野生型序列组成的杂合子。

另外,本发明也可用作一项分析参与药物代谢的基因的技术,它可能对特制的药物有用。在测定个体的药物-敏感性时,参与药物代谢的基因是至关重要的。据推测药物对个体的活性差异是由基因核苷酸序列中的微小差异引起的,所述基因编码参与药物代谢的酶。人类基因组计划揭示出标准的人类基因。该计划成果的一项实际应用是分析参与药物代谢的基因,这已成为人们主要的兴趣。因此,本发明提供了一项在后基因组时代非常有用的技术。本文所提及的描述现有技术的所有出版物都列入本文作为参考。

10

附图简述

图 1 描述了阐明本发明优选实施方案的反应原理(1)至(2)部分的示意图。

图 2 描述了阐明本发明优选实施方案的反应原理(3)至(5)部分的示意图。

图 3 描述了阐明本发明优选实施方案的反应原理(6)至(8)部分的示意图。

图 4 描述了阐明本发明优选实施方案的反应原理(9)至(11)部分的示意图。

图 5 描述了本发明的单链核酸中形成的环结构的示意图。

图 6 描述了属于人 CYP2C19 家族的基因的核苷酸序列,所述序列彼此类似。

图 7 描述了阐明在实施例中用于检测 SNP 的靶核苷酸序列,和引物与靶核苷酸序列的位置关系的示意图。

图 8 描述了阐明本发明的突变检测方法之结果的照片。每个泳道表示:靶模板(特定区域具有推测的核苷酸序列);具有单核苷酸错配的模板(特定区域具有的核苷酸序列与推测的核苷酸序列有单核苷酸差异);无模板(仅用作对照的引物)。

图 9 描述了阐明本发明的突变检测方法所得结果的图。此处,纵坐标表示荧光强度,横坐标表示反应时间(小时)。-■-: 无靶; -O-: ml; 和 -●-: WT。

图 10 描述了阐明在实施例 3 中用于检测 SNP 的靶核苷酸序列, 和引物与靶核苷酸序列的位置关系的示意图。

图 11 描述了阐明本发明的突变检测方法所得结果的图。实验组 a) 和 b) 分别阐明了通过使野生型(WT)的引物套和突变型(MUT)的引物套与各自的模板 DNA 反应所得的结果。此处, 纵坐标表示荧光强度, 横坐标表示反应时间(分钟)。-●-: 野生型(WT); -O-: 突变型(MUT); 和 -▲-: 无 DNA。

图 12 描述了阐明本发明的突变检测方法之结果的照片。每个泳道表示: 通过使各自的模板 DNA 与野生型(WT)的引物套和突变型(MUT)的引物套反应所得的产物。无 DNA(不含模板 DNA); MUT DNA(以突变型的 CYP2C19 基因为模板); 和 WT DNA(以野生型的 CYP2C19 基因为模板)。

图 13 描述了阐明本发明的突变检测方法之特异性的图。实验组 a) 和 b) 分别阐明了通过使野生型(WT)的引物套和突变型(MUT)的引物套与各自的模板 DNA 反应所得的结果。此处, 纵坐标表示荧光强度, 横坐标表示反应时间(分钟)。-◆-: 无 DNA; -▲-: CYP2C9 基因; -X-: CYP2C18 基因; -●-: 野生型(WT) CYP2C19; 和 -O-: 突变型(MUT) CYP2C19。

图 14 描述了阐明在实施例 5 中用于检测 SNP 的靶核苷酸序列, 和引物与靶核苷酸序列的位置关系的示意图。

图 15 描述了阐明使用具环引物的本发明的突变检测方法之结果的图。实验组 a) 和 b) 分别阐明了通过使野生型(WT)的引物套和突变型(MUT)的引物套与各自的模板 DNA 反应所得的结果。此处, 纵坐标表示荧光强度, 横坐标表示反应时间(分钟)。-●-: 野生型(WT); -O-: 突变型(MUT); 和 -▲-: 无 DNA。

图 16 描述了阐明使用具环引物的本发明的突变检测方法之特异性的图。实验组 a) 和 b) 分别阐明了通过使野生型(WT)的引物套和突变型(MUT)的引物套与各自的模板 DNA 反应所得的结果。此处, 纵坐标表示荧光强度, 横坐标表示反应时间(分钟)。-◆-: 无 DNA; -▲-: CYP2C9 基因; -X-: CYP2C18 基因; -●-: 野生型(WT) CYP2C19; 和 -O-: 突变型(MUT) CYP2C19。

图 17 描述了阐明通过使用具环引物的本发明突变检测方法检测血液样品中的突变的结果图。10 号样品: 野生型纯合子(WT/WT); 11 号样品: 野

生型/突变型杂合子(WT/MUT)和 8 号样品: 突变型纯合子(MUT/MUT)。此处, 纵坐标表示荧光强度, 横坐标表示反应时间(分钟)。-●-: 野生型(WT)引物; 和 -○-: 突变型(MUT)引物。

5 实施本发明的最佳模式

下文将参照实施例详细描述本发明。

实施例 1. 检测人 CYP2C19 基因中的突变(1)

通过 PCR 扩增人 CYP2C19 基因, 并用识别 SNP 位点的限制性酶 SmaI 消化该基因, 以将基因定型为野生型(WT)或具有单核苷酸突变的突变型(m1)。另外, 将基于上述结果被测定为 WT 或 m1 的 PCR 产物克隆至 pBluescript II 的 EcoRV 位点。测定核苷酸序列以进一步证实 SNP 位点的核苷酸序列。野生型的核苷酸序列示于 SEQ ID NO:5。在 m1 中, SEQ ID NO:5 的核苷酸 111 处的残基不是 G 而是 A(图 7)。

然后, 被设计用于根据本发明分辨人 CYP2C19 的 WT 和 m1 的引物含有下列核苷酸序列。靶核苷酸序列中各个引物的位置示于图 7。FA 的 5'末端含有待测的突变位点。因此, 当靶核苷酸序列的区域中不含推测的核苷酸序列时, 互补链合成反应受到抑制。

RA(R1+R2)/SEQ ID NO:1

5'-GGGAACCCATAACAAATTACTTAAAAACCTGTGTTCTTTTACTT
20 TCTCCAAAATATC-3'

外部引物 R3/SEQ ID NO:2

5'-AGGGTTGTTGATGTCCATC-3'

FA(F1+F2)/SEQ ID NO:3

5'-CGGGAAATAATCAATGATAGTGGGAAAATATGCTTTTAATTTAAT
25 AAATTATTGTTTTCTCTTAG-3'

外部引物 F3/SEQ ID NO:4

5'-CCAGAGCTTGGCATATTGTATC-3'

使用含有上述核苷酸序列的引物, 并使用 10^{-19} mol/管(约 60000 个分子)已插入 WT 或 m1 的 pBluescript II(已用 EcoRI 线性化)作为模板, 60℃保温 2
30 小时。使模板保持为双链以进行反应。反应溶液的组成如下:

反应溶液的组成(25μL)

- 20mM Tris-HCl pH8.8
10mM KCl
10mM (NH₄)₂SO₄
4mM MgSO₄
5 1M 甜菜碱
0.1% Triton X-100
0.4mM dNTP
8 U Bst DNA 聚合酶(NEW ENGLAND BioLabs)
引物:
10 1600nM FA
1600nM RA
200nM F3
200nM R3

在 5 μ L 上述反应溶液中加入 5 μ L 上样缓冲液, 然后, 上样于 2% 琼脂糖凝胶(0.5% TBE)。在 100V 下电泳 0.5 小时。电泳后, 用溴化乙锭(EtBr)染色凝胶以通过肉眼观察核酸。结果示于图 8。当反应不含模板或含有含单核苷酸错配的模板 m1 时, 观察不到扩增。然而, 当将 WT 用作模板时, 能检测到扩增产物。由此证实本发明能清楚地分辨单核苷酸差异。

实施例 2. 检测人 CYP2C19 基因中的突变(2)

- 20 使用与实施例 1 中所用引物相同的引物进行本发明的突变检测方法。反应溶液的组成与实施例 1 中的相同, 不同的是将 10^{-21} mol/管(约 600 个分子)已插入 WT 或 m1 的 pBluescript II(已用 EcoRI 线性化)用作靶核苷酸序列。在 64 $^{\circ}$ C 进行保温。在反应溶液中以终浓度为 0.25 μ g/ml 加入 EtBr。用 ABI Prism 7700(Perkin Elmer)监测反应 6 小时。
- 25 结果示于图 9。当反应中不使用模板, 或使用含单核苷酸错配的模板 m1 时, 在 6 小时的反应过程中检测不到扩增。当将 WT 用作模板时, 随着扩增反应的进行, 荧光强度有所增强。由此证实本发明能清楚地分辨特定区域中的单核苷酸差异。另外, 还阐明可以在等温下进行基于本发明的突变检测方法, 此外, 可用常规的荧光分析仪器监测反应。
- 30 实施例中使用的 ABI Prism 7700 原先是监测 PCR 的仪器。然而, 本发明的检测方法中不需要象 PCR 中那样的热循环; 仅通过在等温下保温(64 $^{\circ}$ C)

即可完成反应。因此,可在具有温箱的荧光分析仪器中进行根据此实施例的突变检测方法。

实施例 3. 检测人 CYP2C19 基因中的突变(3)

进行下列实验以评价本发明检测核苷酸序列突变的方法的特异性。更具
5 体地,分别设计对应于特定区域中的突变型和野生型推测核苷酸序列的引物,并使用引物进行本发明的突变检测方法。下文列出了所制备的引物的核苷酸序列。使用人 CYP2C19 基因为模板,并使用扩增具有所需突变(MUT)之序列(突变型推测核苷酸序列)的引物套和扩增野生型(WT)序列(野生型推测核苷酸序列)的引物套,通过与实施例 1 和 2 相同的方法进行实验。各个
10 引物在靶核苷酸序列中的位置示于图 10。自 FA 和 RA 的 5'末端起的第二个核苷酸对应于 SNP 位点。

检测野生型的一套引物

FA(F1+F2)/SEQ ID NO:6:

5'-CCGGGAAATAATCAATGTAATTTAATAAATTATTGTTTTCTCTTAG
15 -3'

RA(R1+R2)/SEQ ID NO:7:

5'-CGGGAACCCATAACTGTTCTTTTACTTTCTCC-3'

检测突变型的一套引物

FA(F1+F2)/SEQ ID NO:8:

20 5'-CAGGAACCCATAACAAATTACTTAGTGTTCTTTTACTTTCTC-3'

RA(R1+R2)/SEQ ID NO:9:

5'-CAGGAACCCATAACAAATGTGTTCTTTTACTTTCTCC-3'

此实施例中使用的外部引物 R3 和 F3 分别由 SEQ ID NO:2 和 SEQ ID NO:4 的核苷酸序列组成(与实施例 1 中的相同)。

25 制备溶液,其中含有含上述核苷酸序列的引物,和用作模板的 6000 个分子/管已插入 WT 或 ml 的 pBluescript II(已用 EcoRI 线性化)。95℃加热溶液 3 分钟,并与下列反应溶液混合。总体积为 25μL。60℃保温混合物 3 小时。反应溶液的组成如下:

反应溶液的组成(25μL)

30 20mM Tris-HCl pH8.8

10mM (NH₄)₂SO₄

- 10mM KCl
3.5mM MgSO₄
1M 甜菜碱
0.1% Triton X-100
5 0.4mM dNTP
8 U Bst DNA 聚合酶
1600nM FA
1600nM RA
200nM F3
10 200nM R3

在反应溶液中以终浓度为 0.25 μ g/ml 加入 EtBr。用 ABI Prism 7700(Perkin Elmer)监测反应 3 小时。

结果示于图 11。另外，在反应完成之后，使用与实施例 1 中所用的相同的方法，对 5 μ L 上述反应溶液进行电泳；结果示于图 12。经证实仅当模板具有推测的核苷酸序列时，在 3 小时的反应过程中，野生型引物套或突变型引物套才能进行扩增。甚至当仅用 6000 个模板分子进行实验时，约 100 分钟后，扩增反应就到达平台期。由此阐明本发明的检测方法是高度敏感的。6000 个 DNA 分子刚好对应于得自 1 μ L 血液的白血细胞基因组 DNA 的拷贝数。据估计，正常情况下成人的白血细胞数目为 4000 至 8000 个细胞。因此，白血细胞的平均数目为 6000。由于大部分的血液 DNA 得自白血细胞，白血细胞的数目相当于血液中的 DNA 拷贝数。因此，如果用 6000 个 DNA 分子可以获得分析结果，那么用 1 μ L 血液样品即可完成基因分析。

另一方面，当模板的核苷酸序列与推测的核苷酸序列都不相同时，在 3 小时的反应过程中，用野生型或突变型引物套都检测不到扩增。由此阐明本发明的突变检测方法甚至用少量样品也能获得可信度较高的核苷酸序列检验机制。

实施例 4. 针对人 p450CYP2C19 基因的特异性

通过实验评价本发明检测突变之方法的特异性，所述实验使用了量大 100 倍的模板，该模板由与待检测突变的模板相类似的核苷酸序列组成。使用与实施例 3 中相同的模板，人 p450CYP2C19 基因检测突变。将人 p450CYP2C9 基因和人 p450CYP2C18 基因用作模板，所述模板由类似于基

因核苷酸序列的核苷酸序列组成。还将这些基因克隆至 pBluescript II, 通过与实施例 1 中相同的方法证实核苷酸序列。然后将基因用于此实验。

在此实验中, 使用 600,000 个分子/管人 p450CYP2C9 基因或人 p450CYP2C18 基因替代 6,000 个分子/管人 p450CYP2C19 作为模板。其它实验条件与实施例 3 中的相同。

结果示于图 13。当模板是 6000 个分子的 CYP2C19WT DNA 时, 用野生型的引物套可以检测到扩增。然而, 当模板是 600,000 个分子的 CYP2C9 或 CYP2C18 基因时, 用相同的引物套检测不到扩增。类似地, 当模板是 6000 个分子的 CYP2C19MUT DNA 时, 用突变型的引物套可以检测到扩增。但是, 当模板是 600,000 个分子的 CYP2C9 或 CYP2C18 基因时, 用相同的引物套检测不到扩增。上文所述的结果表明: 根据本发明的突变检测方法, 可将一组含有彼此相似的核苷酸序列的基因中的感兴趣的核苷酸序列与其它类似的核苷酸序列区分开, 还可以清楚地检测到突变。

从图 6 中可以看出, p450CYP2C19, p450CYP2C9 和 p450CYP2C18 的核苷酸序列彼此非常类似。根据常规的核苷酸序列检测方法, 几乎不可能区分具有如此高的相似性的核苷酸序列并检测所述核苷酸序列上的突变。

实施例 5. 用具环引物进行分析(1)

- 检测人 p450CYP2C19 基因中的 SNP -

进行下列实验以证实申请人发明的具环引物(2000 年 9 月 19 日提交; 日本专利申请 2000-283862)对 LAMP 法的改良作用也适用于本发明的突变检测方法。

首先, 设计含有下述核苷酸序列的引物和具环引物。具环引物指的是存在于 FA 延伸产物上的 F2 和 F1 之间, 用作互补链合成之起点的引物。对于 RA 而言情况类似, 将存在于上述 RA 延伸产物上的 R2 和 R1 之间, 用作互补链合成之起点的引物用作具环引物。具体地说, 所用的具环引物含有下文所示的核苷酸序列。具环引物可与野生型(WT)引物套联合使用, 或与突变型(MUT)引物套联合使用。各个引物在反应所用靶核苷酸序列中的位置示于图 14。与实施例 3 相同, 自 FA 和 RA 的 5'末端起的第二个核苷酸对应于 SNP 位点。

检测野生型的一套引物

FA(F1+F2)/SEQ ID NO:10:

5'-CCGGGAAATAATCTAATTTAATAAATTATTGTTTTCTCTTAG-3'

RA(R1+R2)/SEQ ID NO:11:

5'-CGGGAACCCTGTTCTTTTACTTTCTCC-3'

检测突变型的一套引物

5 FA(F1+F2)/SEQ ID NO:12:

5'-CTGGGAAATAATCATAATTTAATAAATTATTGTTTTCTCTTAG-3'

RA(R1+R2)/SEQ ID NO:13:

5'-CAGGAACCCATATGTTCTTTTACTTTCTCC-3'

具环引物 FL/SEQ ID NO:14:

10 5'-GATAGTGGGAAAATTATTGC-3'

具环引物 RL/SEQ ID NO:15:

5'-CAAATTACTTAAAAACCTTGCTT-3'

外部引物 R3 由 SEQ ID NO:2 的核苷酸序列组成, 外部引物 F3 由 SEQ ID NO:4 的核苷酸序列组成(与实施例 1 中的相同)。

15 95℃加热溶液 3 分钟, 所述溶液含有上述引物套和具环引物中的任一种, 以及用作模板的 6000 个分子/管已插入 WT 或 ml 的 pBluescript II(已用 EcoRI 线性化), 将所述溶液与下列反应溶液混合至总体积为 25μL。60℃保温混合物 3 小时。反应溶液的组成如下:

反应溶液的组成(25μL)

20 20mM Tris-HCl pH8.8

10mM (NH₄)₂SO₄

10mM KCl

4.0mM MgSO₄

1M 甜菜碱

25 0.1% Triton X-100

0.5mM dNTP

8 U Bst DNA 聚合酶

1600nM FA

1600nM RA

30 200nM F3

200nM R3

800nM FL

800nM RL, 和

6000 个分子/管模板 DNA

在反应溶液中以终浓度为 0.25 μ g/ml 加入 EtBr。用 ABI Prism 7700(Perkin

5 Elmer)监测反应 1 小时。结果示于图 15。

在不合具环引物的反应中, 分别在用 WT-型引物套和 MUT-型引物套开始反应之后约 70 分钟和约 80 分钟, 观察到由扩增产物所致的有所增强的荧光信号(图 11)。而在含有具环引物的反应中, 在用野生型或突变型引物套开始反应之后约 20 分钟, 检测到由扩增产物所致的有所增强的荧光信号(图

10 15)。通过使用具环引物, 反应速率有所提高。

另一方面, 在检测 SNP 时, 证实不管使用具环引物与否, 都通过区分单核苷酸差异来进行扩增反应。由此阐明使用具环引物能大大改善反应速率而不会牺牲特异性。

实施例 6. 用具环引物进行分析(2)

15 - 评价针对人 p450CYP2C19 基因的特异性 -

通过实验来评价本发明的突变检测方法的特异性, 所述实验使用具环引物和模板, 所述模板含有的核苷酸序列类似于需检测突变的模板的核苷酸序列, 而量比用于检测突变的模板要高 100 倍。在此实验中, 使用 600,000 个分子/管人 p450CYP2C9 基因和人 p450CYP2C18 基因的每一种替代 6,000 个分子/管人 p450CYP2C19 作为模板。其它反应条件与实施例 5 中的相同。

20 结果示于图 16。当将 6000 个分子的 CYP2C19WT DNA 用作模板时, 用野生型的引物套可以检测到扩增。然而, 当将 600,000 个分子的 CYP2C9 或 CYP2C18 基因用作模板时, 用相同的引物套检测不到扩增。类似地, 当将 6000 个分子的 CYP2C19MUT DNA 用作模板时, 用突变型的引物套可以检测到扩增。但是, 当将 600,000 个分子的 CYP2C9 或 CYP2C18 基因用作模板时, 用相同的引物套检测不到扩增。因此, 甚至在根据本发明的突变检测方法中使用具环引物时, 该方法仍可将一组含有彼此相似的核苷酸序列的基因中存在的目标核苷酸序列与类似的核苷酸序列区分开, 还可以清楚地检测到目标突变。

30 实施例 7. 用血液样品进行分析

用 QIAamp DNA Blood 试剂盒(Qiagen)从收集自志愿者的血液样品(35个样品)中提取 DNA。通过 PCR 从提取的 DNA 中扩增人 p450CYP2C19 基因的 m1 区域，所述 PCR 使用未审公开的日本专利申请(JP-A) No. Hei 10-14585 中所述的引物序列。根据 Z-Taq 所用的方法，使用 Z-Taq 聚合酶 5 (Takara Shuzo)进行扩增。

通过 PCR-RFLP 分析所得的 PCR 产物。方法如下。首先，于 37℃用限制性酶 MspI 消化 3μL PCR 产物 3 小时，并在 4%琼脂糖凝胶(Amplisize Agarose, BIO-RAD)上电泳。电泳之后，用 SYBR Green I(FMC)染色凝胶，观察 DNA 带的模式以定型 m1 区域。

10 通过本发明的突变检测方法，分析所有样品中野生型纯合子(WT/ WT)，野生型/突变型杂合子(WT/MUT)和突变型纯合子(MUT/MUT)的各 3 个样品，总共 9 个样品的 m1 区域。测定所用 9 个样品的 PCR 产物的核苷酸序列以证实使用 PCR-RFLP 进行定型所得的结果。根据实施例 5 中所述的方法进行本发明的突变检测方法。所用样品 DNA 的量理论上等于提取自 1μL 血液的 15 DNA 量。具体地说，将提取自 7ml 血液的 DNA 的 1/7000 等分试样用作样品 DNA。

关于所有 9 个样品，通过本发明的突变检测方法获得的结果与通过 PCR-RFLP 法所获得的一致。图 17 中显示了 9 个样品中的 10 号样品(PCR-RFLP 的检测结果是 WT/WT)，11 号样品(PCR-RFLP 的检测结果是 20 WT/MUT)和 8 号样品(PCR- RFLP 的检测结果是 MUT/MUT)的反应结果。

仅当使用野生型(WT)引物套时，才会对野生型纯合子(WT/WT)样品发生扩增反应，用突变型(MUT)的引物检测不到扩增。另一方面，当样品是杂合子(WT/MUT)时，用两个引物套，即野生型(WT)引物套和突变型(MUT)引物套都可以扩增基因。另外，只能用突变型(MUT)引物，不能用野生型(WT) 25 引物扩增突变型(MUT)纯合子(MUT/MUT)的样品。这表明根据下文所述的由联合使用野生型和突变型引物套所得反应结果得出的矩阵，可以方便地评价纯合子/杂合子。

	野生型	突变型
野生型纯合子	+	-
突变型纯合子	-	+
杂合子	+	-

另外，通过测序进一步证实扩增的核酸具有 CYP2C19 基因的核苷酸序列。除 CYP2C19 基因外，得自血液的 DNA 样品含有很多类似的序列，如 CYP2C9 和 CYP2C18。只有身为靶基因的 CYP2C19 基因甚至在存在类似序列的情况下，都能被特异性扩增，在单轮扩增反应中即可检测到单核苷酸差异。由此证实仅通过在单轮扩增反应中检测扩增产物的存在或缺乏，即可进行很多具有类似序列的基因的的 SNP 定型。

工业实用性

根据本发明，无论靶核苷酸序列是否与推测的核苷酸序列有所不同，都可以精确地评估靶核苷酸序列。本发明的方法可用于分析核酸内的突变和多态性。该方法基于简单的酶反应。因此，实施该方法无需任何特别的仪器或反应组分，这使得该方法能在低成本下容易地进行。

另外，由于检测本发明突变和多态性的方法包括含有扩增靶核苷酸序列的反应，使用所扩增的核酸产物的量为指标即可区分核苷酸序列的差异。因此，可以进行高度敏感和可再现的核苷酸序列分析。另外，在每一轮开始时检验靶核苷酸序列，然后再进行基于本发明所用反应原理的互补链合成。因此，甚至当错误的互补链被错误地合成时，这种错误的反应也不会影响到最终的分析结果。根据常规的基因扩增方法 PCR，一旦合成错误的互补链，就不可能准确地评价结果。因此，PCR 实际上不适用于这种类型的分析。在基于引物杂交的所有类型的核苷酸序列检验机制中，出现某些错误是无法避免的。本发明已取得了以下进步：高 S/N 比率，使核酸互补链合成中错误的影响最小化，同时积累大量正确的反应产物而无任何错误。因此，本发明是先进的发明，首次建立了基于核酸扩增反应区分核苷酸序列的方法。

另外，本发明的特征是所有反应的过程在多个区域受控制，该特征有利于在存在具有类似核苷酸序列的多个基因时检测核苷酸序列的微小差异。由于这一特征，根据本发明可以准确而方便地进行 HLA 和血小板同种抗原或致病性微生物的定型。另外，根据本发明也可以方便地检测参与与药物代谢有关的酶活性的 SNP。

序列表

<110> 荣研化学株式会社(EIKEN KAGAKU KABUSHIKI KAISHA)

<120> 检测突变和/或多态性的方法

<130> E2-A0002P

<140>

<141>

<150> PCT/JP99/06213

<151> 1999-11-08

<150> JP 2000-134334

<151> 2000-04-28

<160> 15

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 57

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 人工合成的引物序列

<400> 1

gggaacccat aacaaattac ttaaaacct gtgttctttt actttctcca aaatatac 57

<210> 2

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 人工合成的引物序列

<400> 2

agggttggtg atgtccatc 19

<210> 3

<211> 65

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 人工合成的引物序列

<400> 3

cgggaaataa tcaatgatag tgggaaaata tgcttttaat ttaataaatt attgttttct 60
cttag 65

<210> 4

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 人工合成的引物序列 e

<400> 4

ccagagcttg gcatattgta tc 22

<210> 5

<211> 210

<212> DNA

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 5

ccagagcttg gcatattgta tctatacctt tattaaatgc ttttaattta ataaattatt 60
gttttctctt agatatgcaa taattttccc actatcatig attatttccc gggaacccat 120
aacaattac ttaaaaacct tgcttttatg gaaagtata ttttgagaa agtaaaagaa 180
caccaagaat cgatggacat caacaaccct 210

<210> 6

<211> 46

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 人工合成的引物序列

<400> 6

ccgggaaata atcaatgtaa ttttaataaat tattgttttc tcttag 46

<210> 7

<211> 32

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 人工合成的引物序列

<400> 7

cgggaaccca taactgttct tttactttct cc 32

<210> 8

<211> 42

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 人工合成的引物序列

<400> 8

caggaaccca taacaaatta cttagtgttc ttttactttc tc 42

<210> 9

<211> 37

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 人工合成的引物序列

<400> 9

caggaaccca taacaaatgt gttctttttac tttctcc 37

<210> 10

<211> 42

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 人工合成的引物序列

<400> 10

ccgggaaata atctaattta ataaattatt gttttctctt ag

42

<210> 11

<211> 27

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 人工合成的引物序列

<400> 11

cgggaaccct gttctttttac tttctcc

27

<210> 12

<211> 43

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 人工合成的引物序列

<400> 12

ctgggaaata atcataattt aataaattat tgttttctct tag

43

<210> 13

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 人工合成的引物序列

<400> 13

caggaacca tatgttcttt tactttctcc

30

<210> 14

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 人工合成的引物序列

<400> 14

gatagtggga aaattattgc

20

<210> 15

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 人工合成的引物序列

<400> 15

caaattactt aaaaaccttg ctt

23

图 1

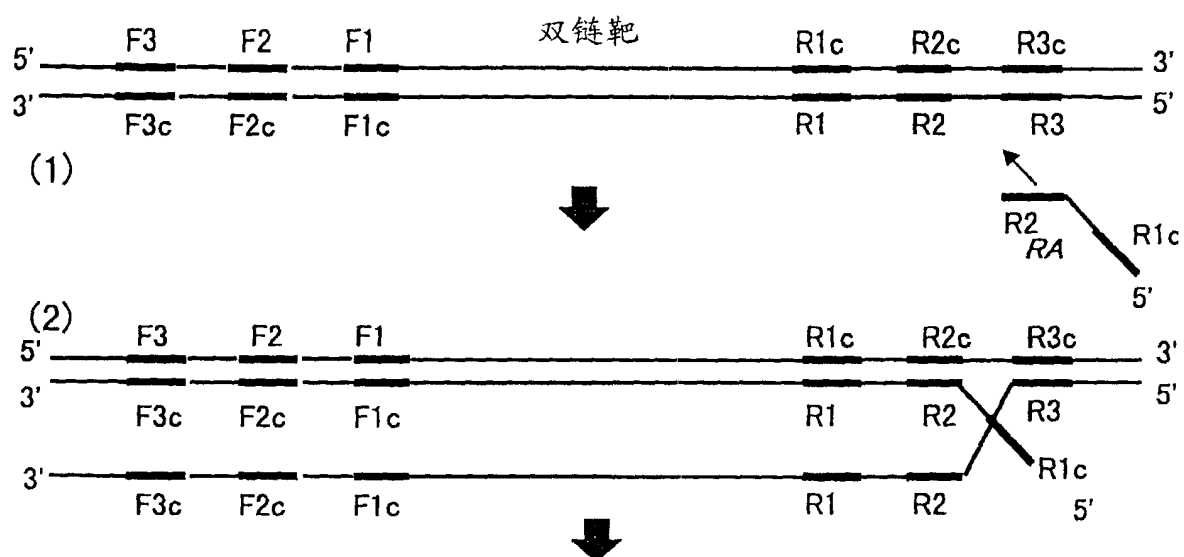


图 2

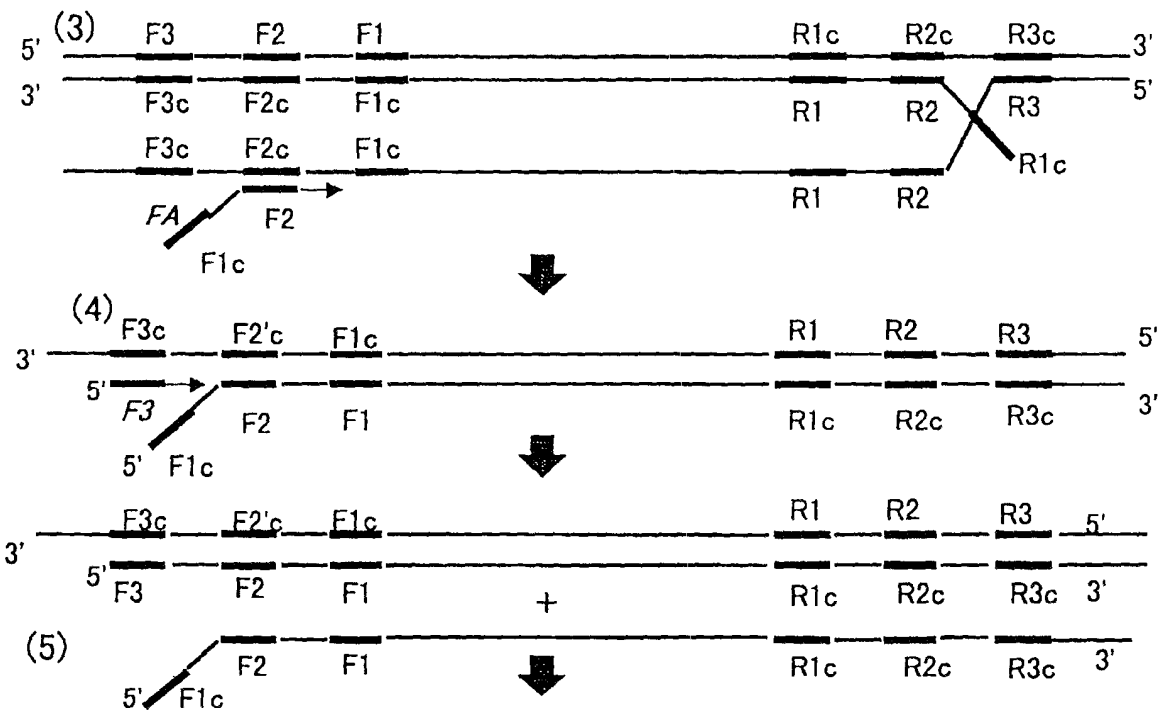


图 3

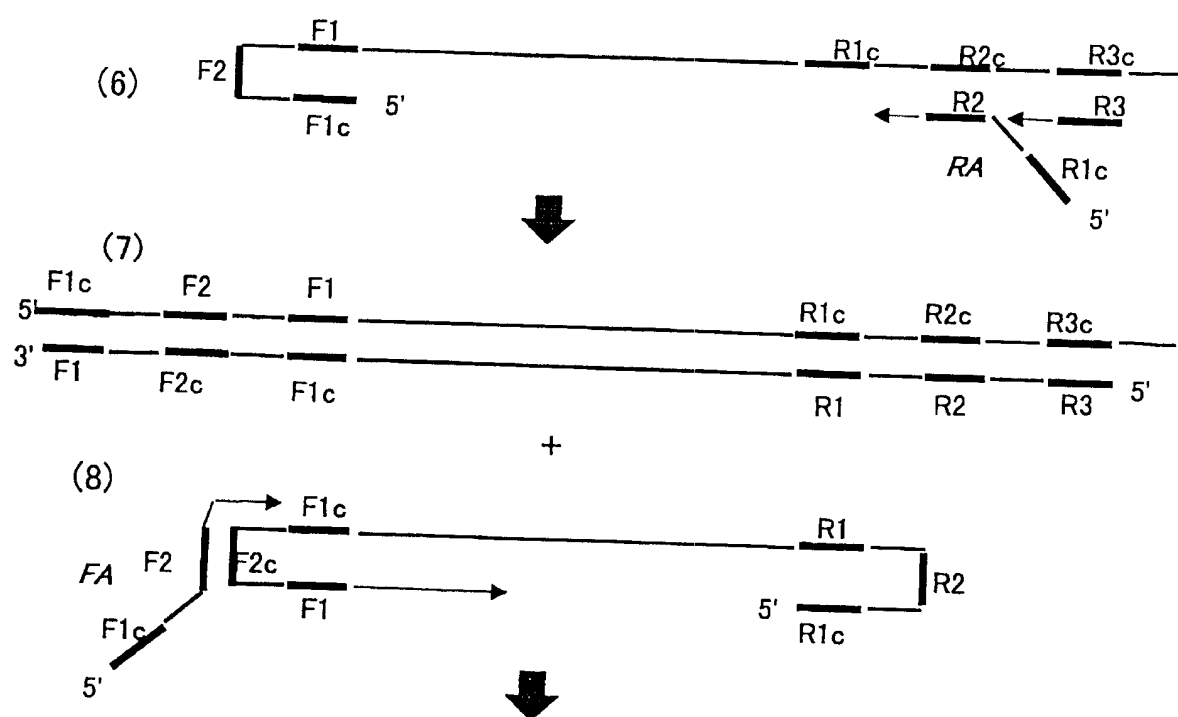
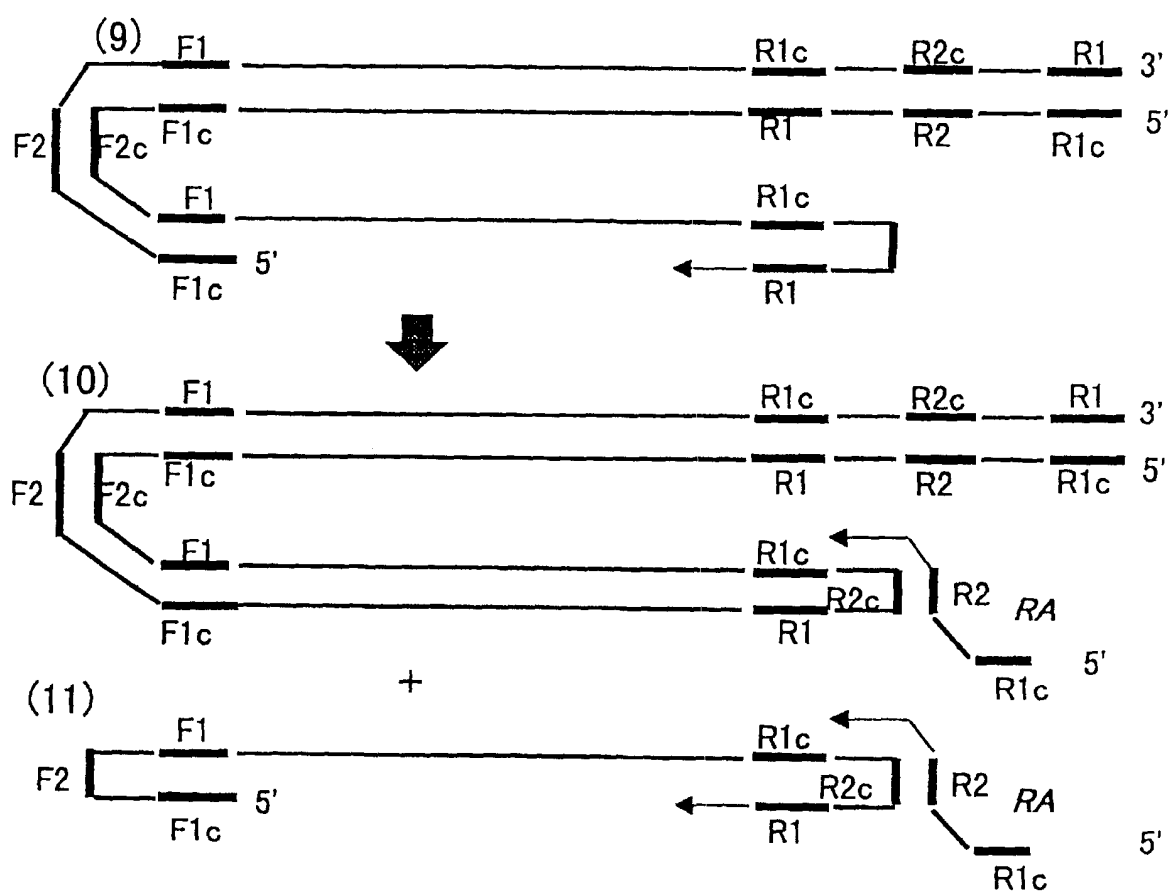


图 4



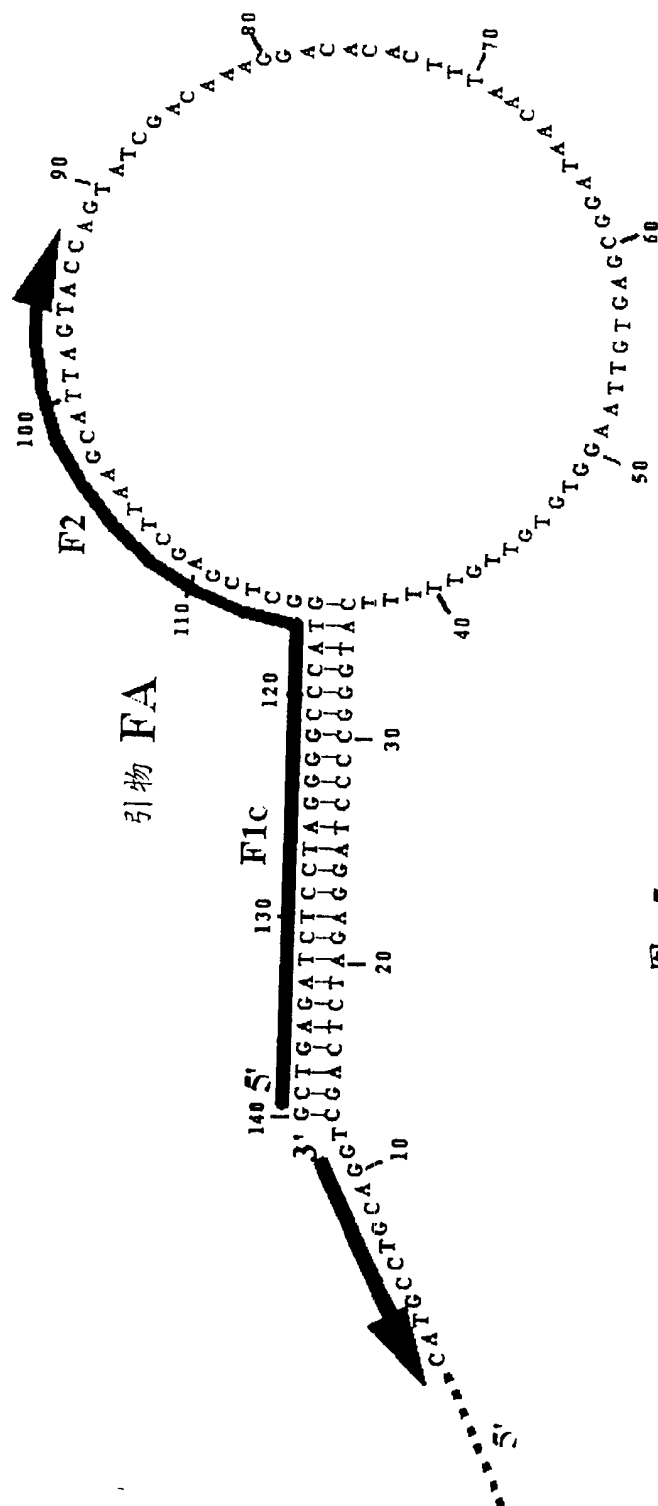
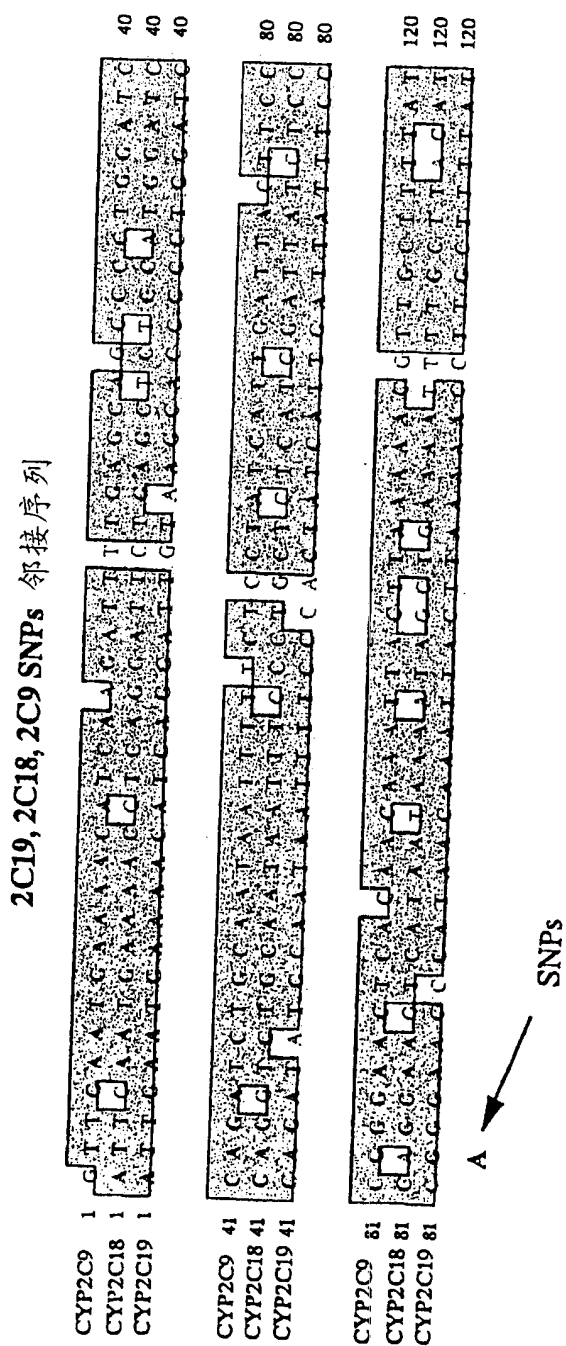


图 5



四 6

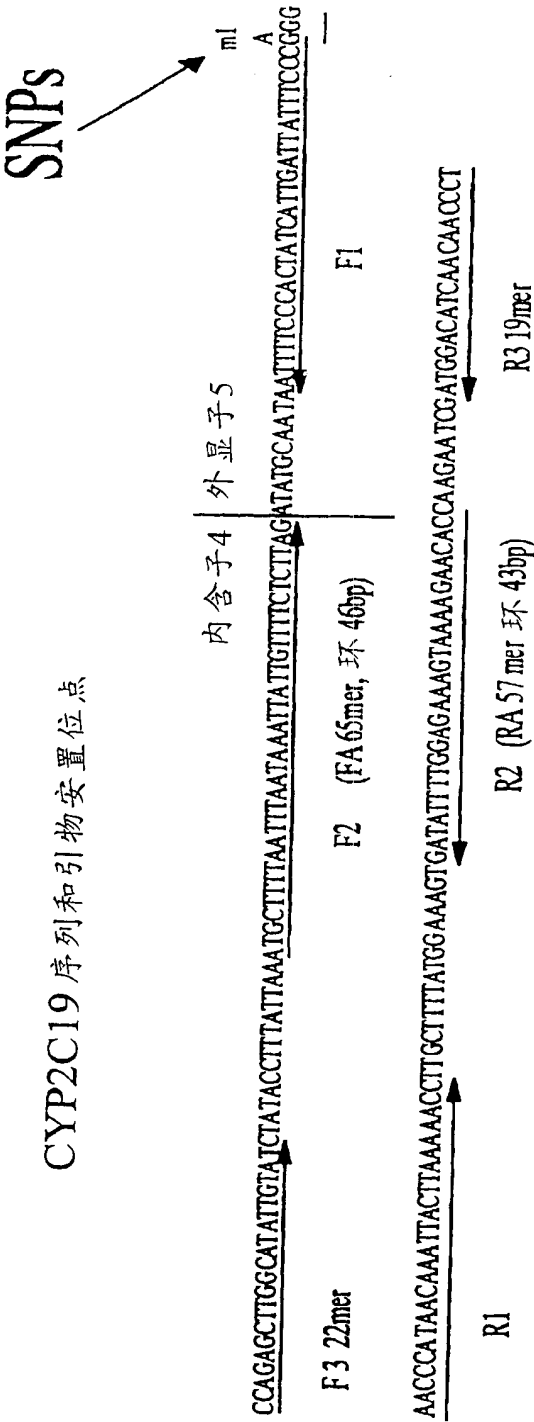


图 8

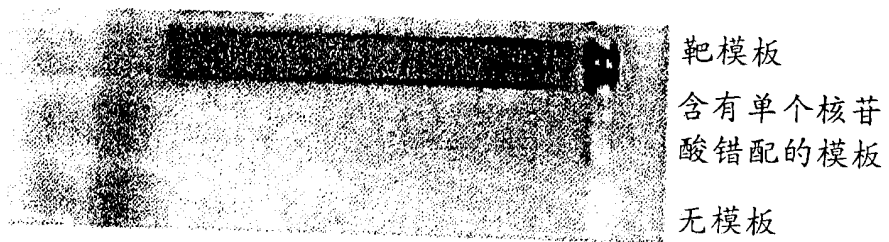


图 9

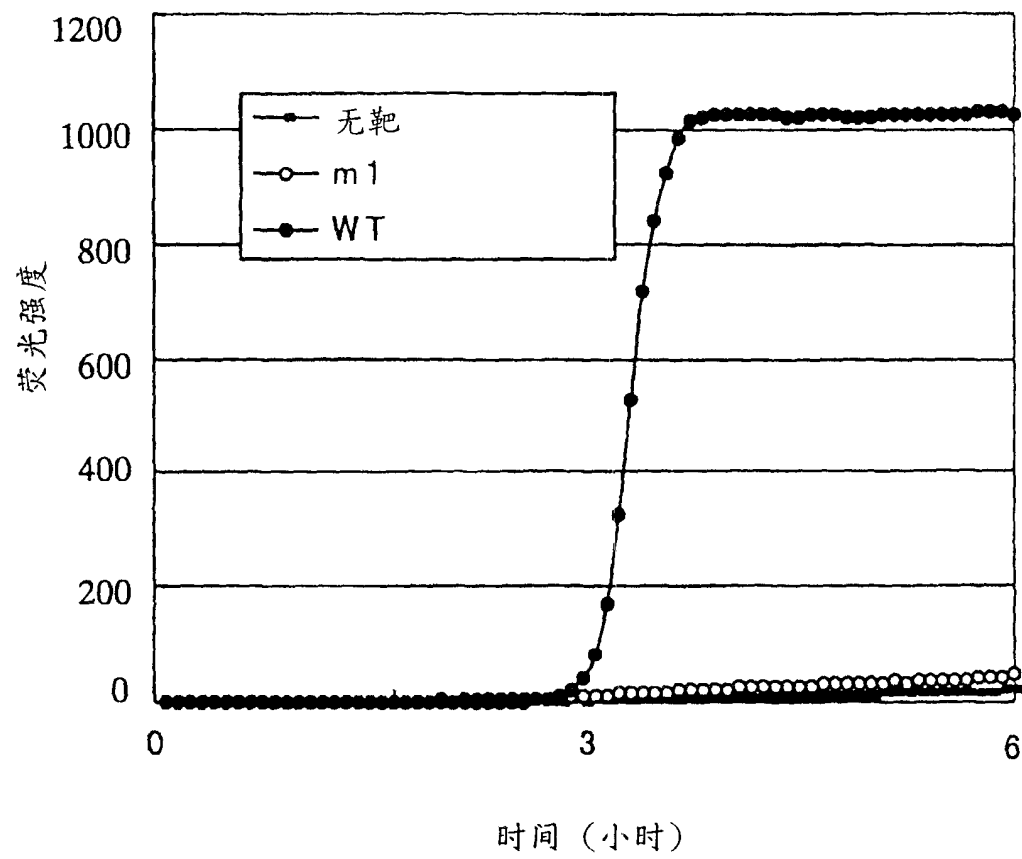


图 10

CYP2C19 序列和引物安置位点

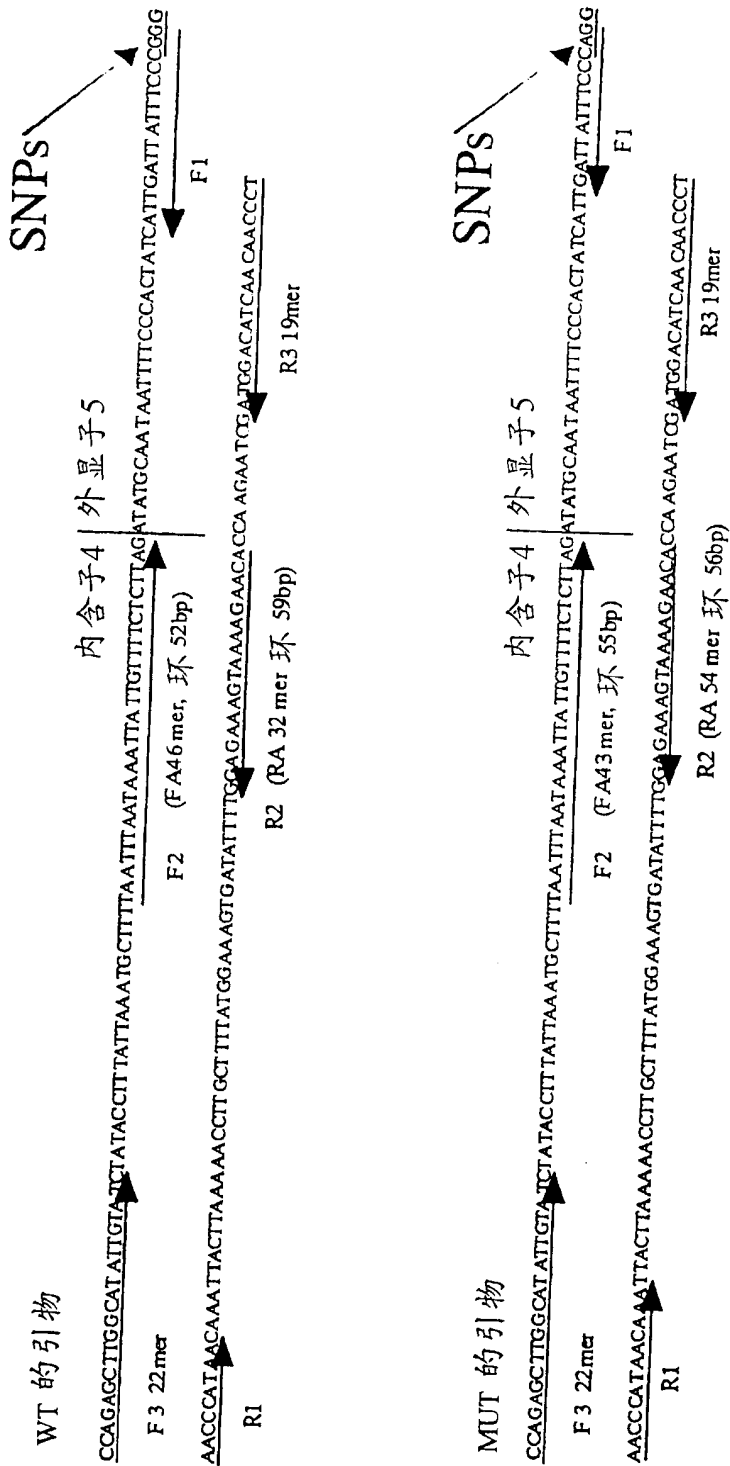


图 11

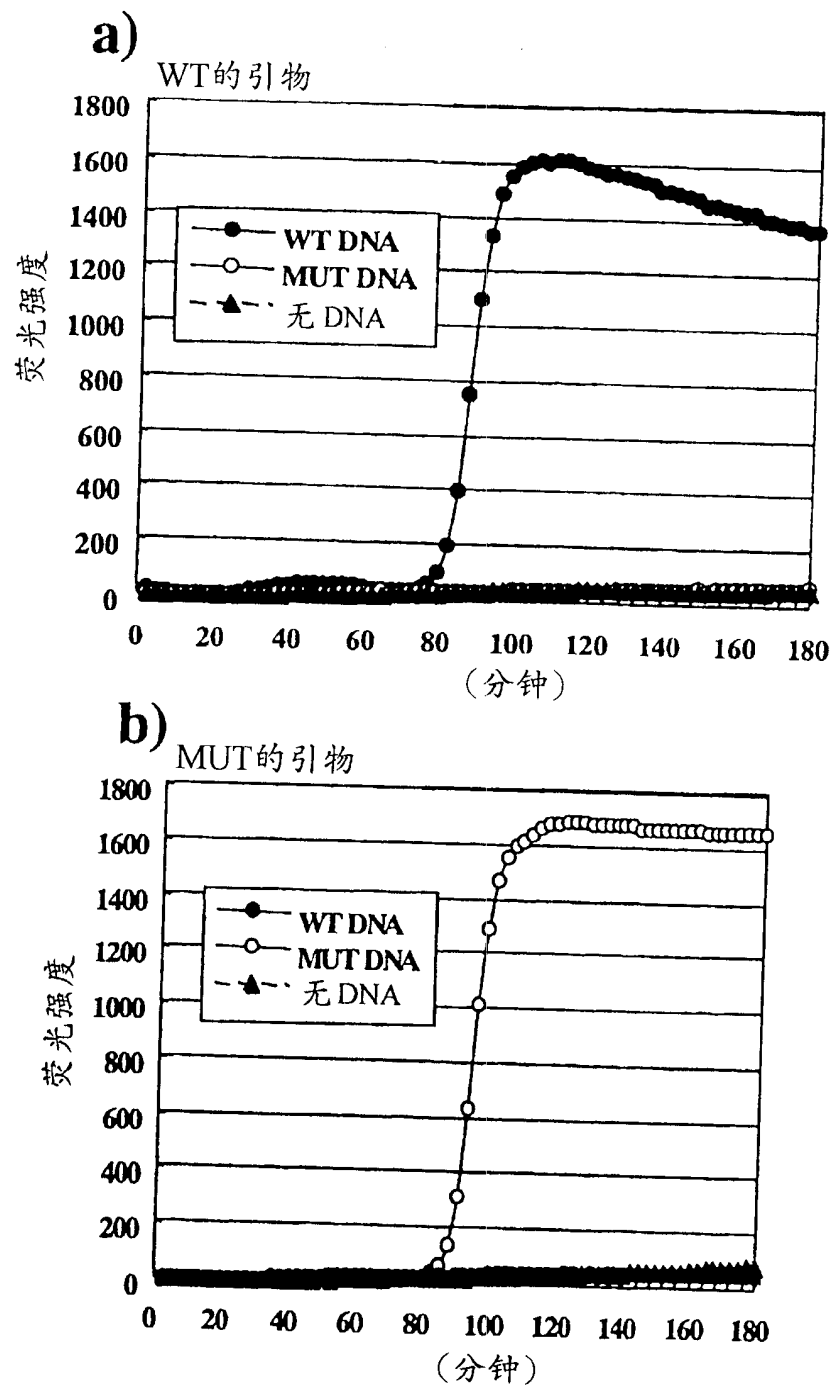


图 12

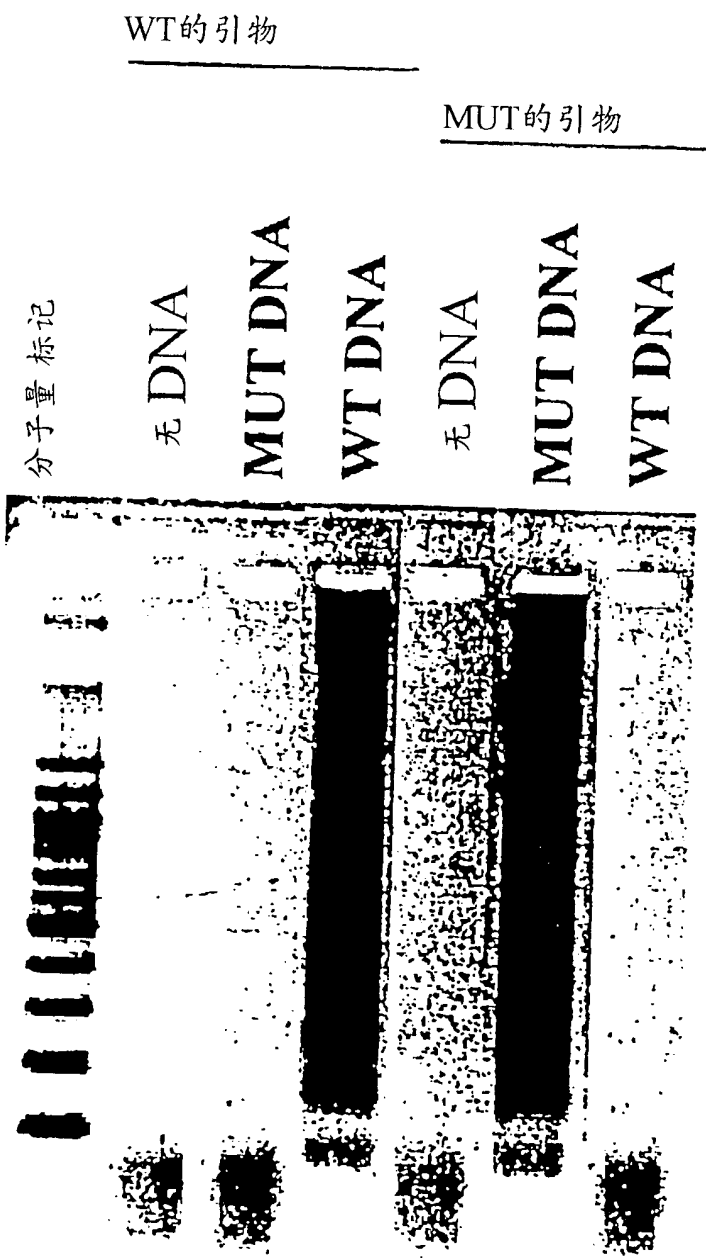
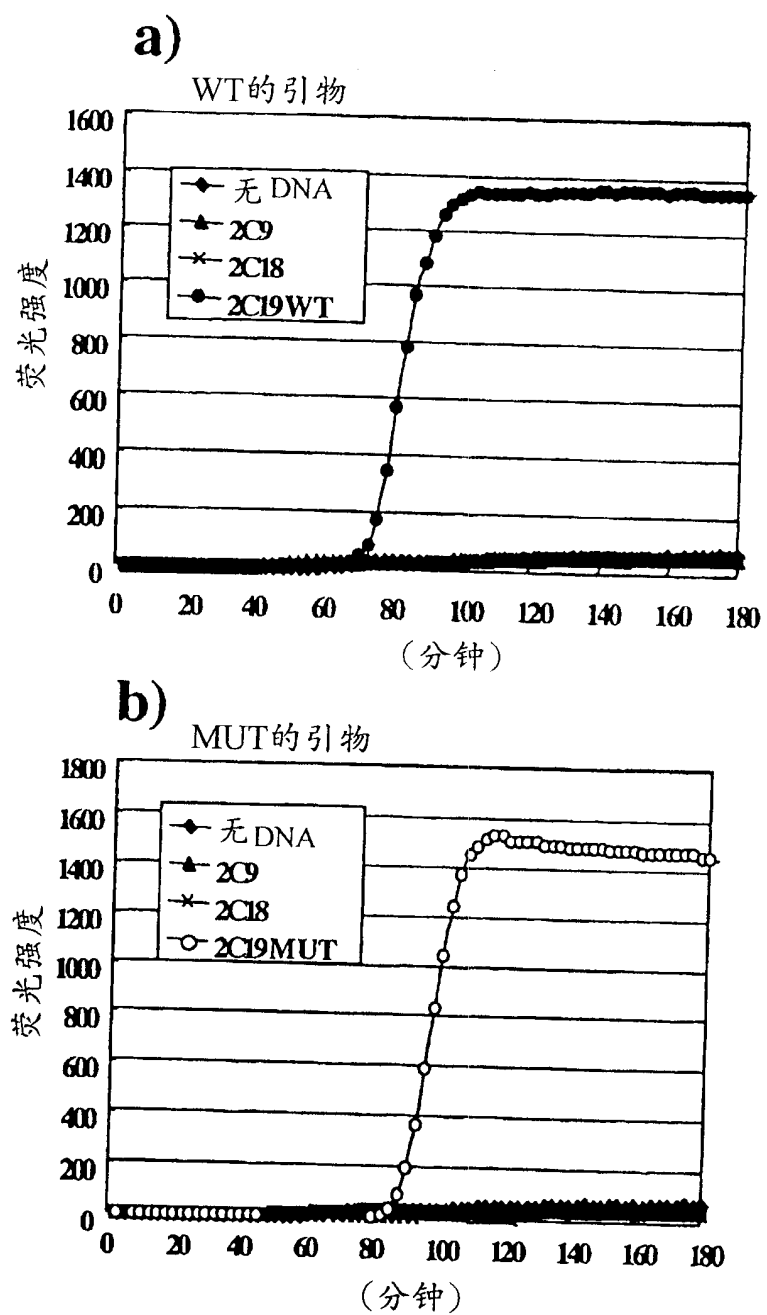


图 13



14

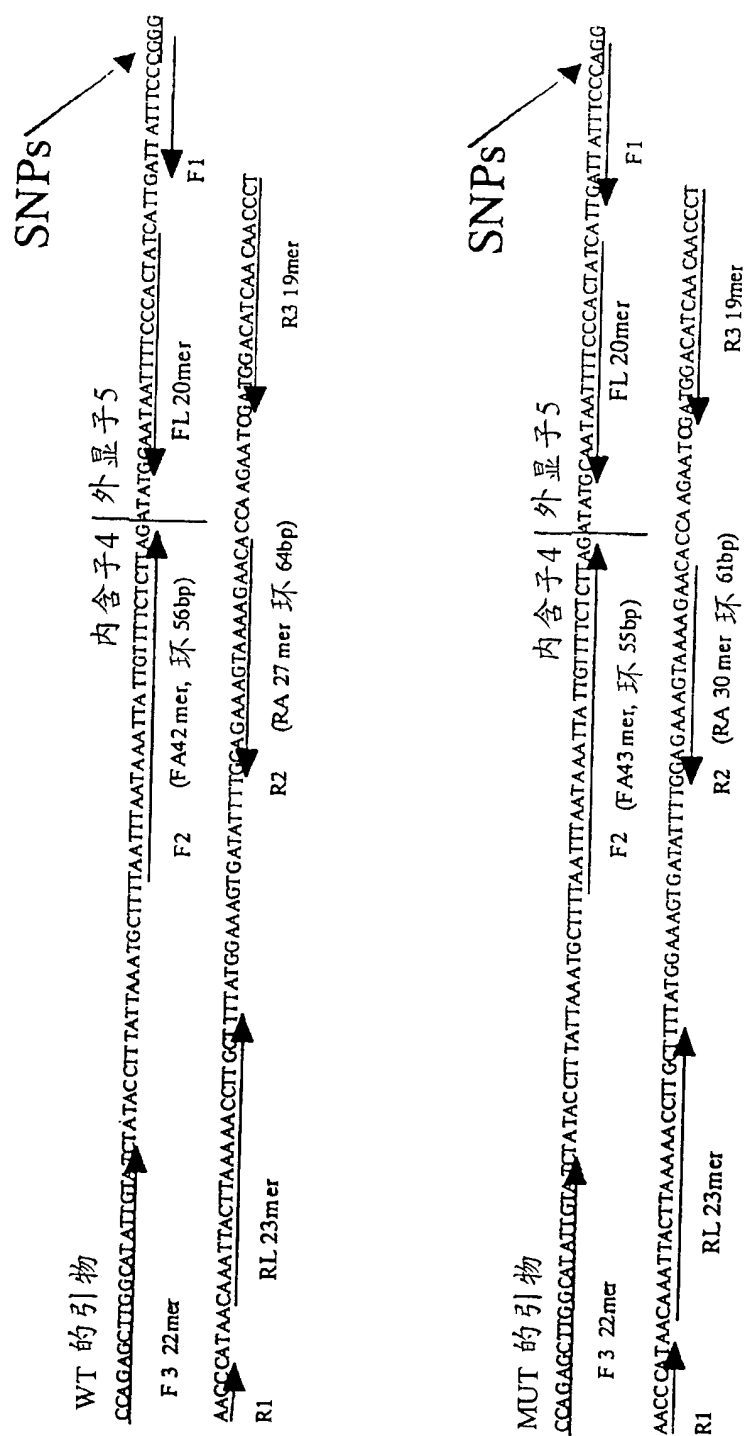


图 15

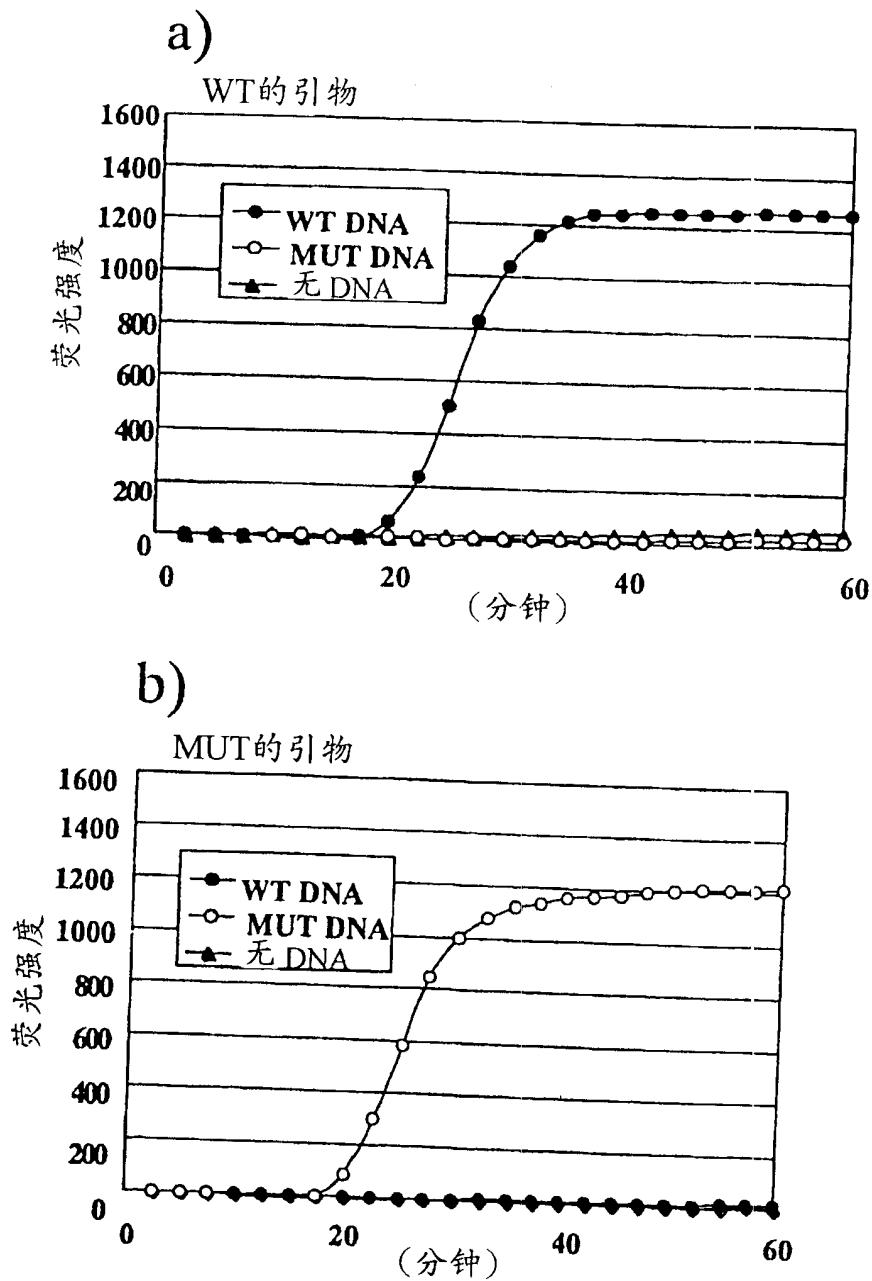


图 16

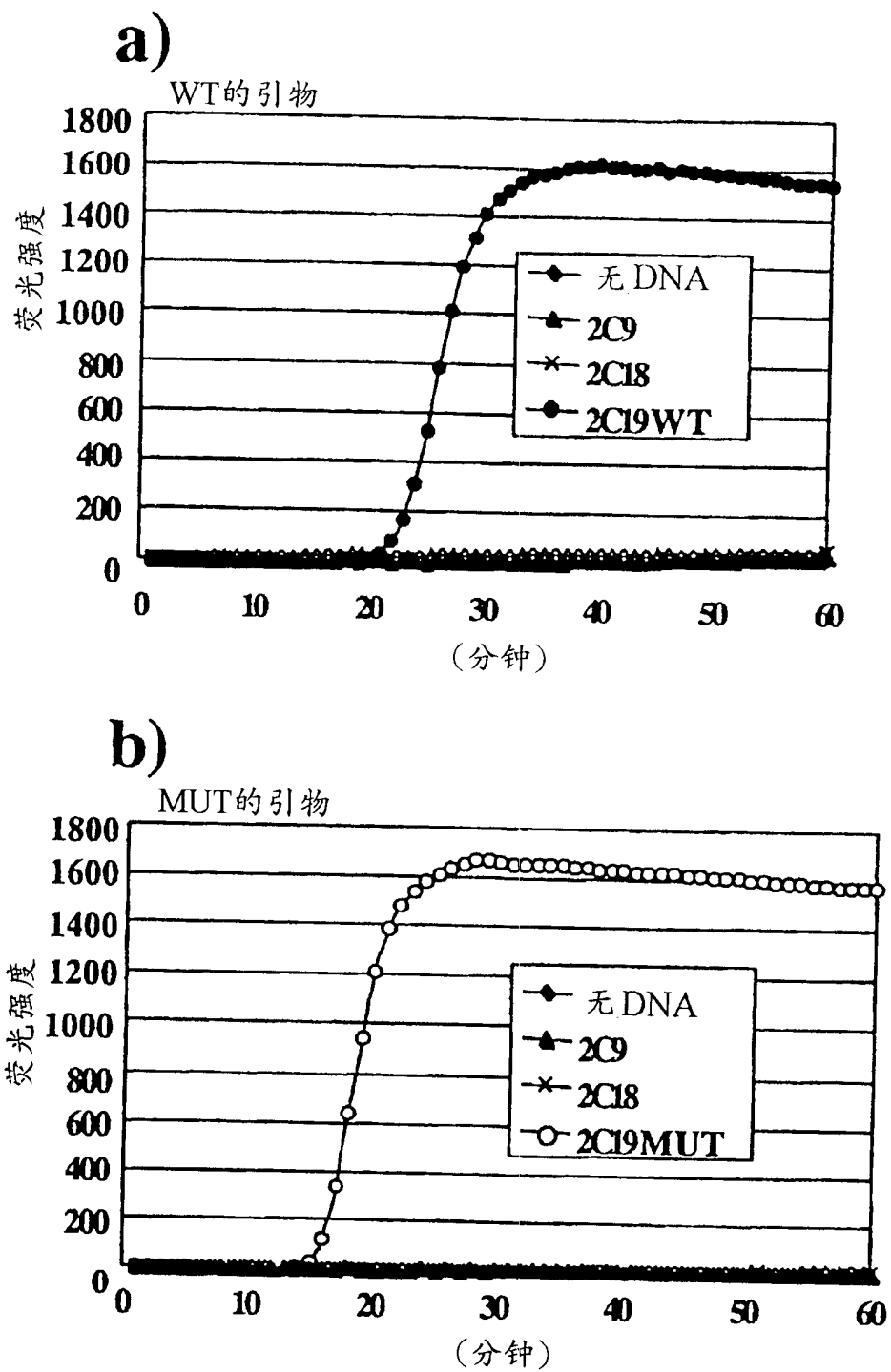


图 17

