



#### 四、聲明事項：

主張專利法第二十二條第二項  第一款或  第二款規定之事實，其事實發生日期為： 年 月 日。

申請前已向下列國家（地區）申請專利：

【格式請依：受理國家（地區）、申請日、申請案號 順序註記】

有主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

1. 美國、2004/11/23、60/635,568

2. 美國、2005/11/18、11/282,491

無主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

主張專利法第二十九條第一項國內優先權：

【格式請依：申請日、申請案號 順序註記】

主張專利法第三十條生物材料：

須寄存生物材料者：

國內生物材料 【格式請依：寄存機構、日期、號碼 順序註記】

國外生物材料 【格式請依：寄存國家、機構、日期、號碼 順序註記】

不須寄存生物材料者：

所屬技術領域中具有通常知識者易於獲得時，不須寄存。



## 九、發明說明：

### 【發明所屬之技術領域】

本發明係有關一種偵測核酸的方法與組合物，特別是在特定位置具有一或多個特定核苷酸的核酸。

### 【先前技術】

遺傳性突變可能造成嚴重的生物學上的異常，例如癌症或遺傳性疾病。突變的偵測有助於遺傳性異常的早期診斷，並提供藥物治療的個人化訊息。

已知使用錯配修復酵素(mismatch repair enzyme)的非定序方法來偵測核酸變異(US Patent Nos. 5,698,400; 5,958,692; 5,217,863; 6,455,249; 6,110,684; and 5,891,629)。這些方法通常包括，(1)使一探針與一標的核酸雜交；(2)以一酵素或化學品切割該探針與該標的核酸間的錯配；以及(3)偵測該切割的片段。這些方法缺點之一在於低靈敏度，因為受限於偵測實際上被切割的片段。當一樣本具有少數的標的核酸例如變異對偶子時，即使使用了大量的標的核酸進行切割反應，標的核酸仍很難被偵測。其他的方法利用 PCR 增幅反應以供切割。然而，前 PCR-增幅的問題在於對核酸的非選擇性增幅。當樣本中多數為野生型對偶子時，增幅基本上會產生較多的野生型對偶子，而非變異形的複本。如此不相稱的增幅更會降低偵測的靈敏度。

**【發明內容】**

本發明之一型態提供一種用於偵測聚核苷酸中多態性的方法，包括：(1)準備具有不可延展的 3' 端的一基因專一性探針(下稱探針)；(2)使該探針與一標的核酸雜交以形成一二元體；(3)使該二元體暴露於一切割酵素或化學品，其中該酵素或化學品可辨識並切割由該探針與該標的核酸間之錯配所產生之一結構；(4)切割該錯配所產生之結構以自該探針移除該不可延展的 3' 端，並於該探針以及選擇性地該標的核酸產生一新的可延展的 3' 端；(5)以該切割的探針或標的核酸作為一引子或/及模版，以選擇性地以 RNA 聚合酶啟動子為基礎的增幅方法進行增幅；以及(6)偵測增幅的核酸產物，其中該增幅的核酸產物係表示在標的核酸中有序列變異或多態性的存在。

本發明之另一型態提供一種用於偵測聚核苷酸中多態性的方法，包括：(1)降溫配對一探針至可能具有一多態性之一聚核苷酸區域以形成一複合體，其中該探針包括一不可延展的 3' 端以及與該多態性不互補；(2)以一酵素或化學品接觸該複合體以在該探針與該聚核苷酸間的一錯配區域切割該探針與該聚核苷酸，產生具有可延展的 3' 端的一探針；(3)添加一人工模版，其中該切割探針係為增幅該人工模版之一引子；以及(4)增幅該人工模版，其中該增幅子的存在係表示該多態性的存在。

本發明之另一型態係提供一種方法，先切割變異對偶子再選擇性地增幅該切割的對偶子，而非增幅該野生型對

偶子。此一特點增加偵測靈敏度，並可以偵測具有大量野生型對偶子的樣本中的少量變異對偶子。

### 【實施方式】

本發明中所稱之“核酸”以及“聚核苷酸”是可以交替使用的，係指任何核酸，不論其組成為去氧核糖核酸或核糖核酸，也不論其組成為磷酸二酯(phosphodiester)鍵結或修改的鍵結，例如磷酸三酯(phosphotriester)、胺基磷酸脂(phosphoramidate)、矽氧烷(siloxane)、碳酸鹽(carbonate)、羧基甲基酯(carboxymethylester)、醋酸醯胺(acetamidate)、氨基甲酸鹽(carbamate)、硫醚(thioether)、橋接胺基磷酸脂(bridged phosphoramidate)、亞甲基磷酸酯(bridged methylene phosphonate)、磷硫醯(phosphorothioate)、甲基磷酸酯(methylphosphonate)、二硫代磷酸酯(phosphorodithioate)、橋接磷硫醯(bridged phosphorothioate)或磺基(sulfone)鍵結，以及這些鍵結的組合。

本發明所稱之核酸、聚核苷酸以及核苷酸亦特別地包括由除了五種生物學上自然發生的鹼基：腺嘌呤(adenine)、鳥糞嘌呤(guanine)、胸腺嘧啶(thymine)、胞嘧啶(cytosine)以及尿嘧啶(uracil)以外的鹼基所組成之核酸。例如，本發明之聚核苷酸可包含至少一個修飾過的鹼基，其係選自下列群組之一，包括但不限於：5-氟尿嘧

啉 (5-fluorouracil)、5-溴尿嘧啶 (5-bromouracil)、5-  
 氯尿嘧啶 (5-chlorouracil)、5-碘尿嘧啶  
 (5-iodouracil)、次黃嘌呤 (hypoxanthine)、黃嘌呤  
 (xanthine)、4-乙酰胞嘧啶 (4-acetylcytosine)、5-(羧基  
 羥基甲基)尿嘧啶 (5-(carboxyhydroxymethyl)uracil)、5-  
 羧基甲基氨基甲基-2-硫代尿苷  
 (5-carboxymethylaminomethyl-2-thiouridine)、5-羧基  
 氨基氨基甲基尿嘧啶  
 (5-carboxymethylaminomethyluracil)、二氫尿嘧啶  
 (dihydrouracil)、 $\beta$ -D-半乳糖 Q 核苷  
 (beta-D-galactosylqueosine)、肌苷 (inosine)、N6-異戊  
 烯基腺嘌呤 (N6-isopentenyladenine)、1-甲基鳥糞嘌呤  
 (1-methylguanaine)、1-甲基肌苷 (1-methylinosine)、2,2-  
 二甲基鳥糞嘌呤 (2,2-dimethylguanaine)、2-甲基腺嘌呤  
 (2-methyladenine)、2-甲基鳥糞嘌呤  
 (2-methylguanaine)、3-甲基胞嘧啶 (3-methylcytosine)、  
 5-甲基胞嘧啶 (5-methylcytosine)、N6-腺嘌呤  
 (N6-adenine)、7-甲基鳥糞嘌呤 (7-methylguanaine)、5-  
 甲基氨基甲基尿嘧啶 (5-methylaminomethyluracil)、5-甲氧  
 基氨基甲基-2-硫代尿苷  
 (5-methoxyaminomethyl-2-thiouracil)、 $\beta$ -D-甘露糖 Q  
 核苷 (beta-D-mannosylqueosine)、5-甲氧基羧基甲基尿嘧  
 啶 (5-methoxycarboxymethyluracil)、5-甲氧基尿嘧啶  
 (5-methoxyuracil)、2-甲基硫-N6-異戊烯基腺嘌呤

(2-methylthio-N6-isopentenyladenine)、尿嘧啶-5-氧化乙酸 (uracil-5-oxyacetic acid, v)、osyw(wybutoxosine)、假尿苷 (pseudouracil)、Q 核苷 (queosine)、2-硫胞嘧啶 (2-thiocytosine)、5-甲基-2-硫尿嘧啶 (5-methyl-2-thiouracil)、2-硫尿嘧啶 (2-thiouracil)、4-硫尿嘧啶 (4-thiouracil)、5-甲基尿嘧啶 (5-methyluracil)、尿嘧啶-5-氧化乙酸甲基酯 (uracil-5-oxyacetic acid methylester)、3-(3-氨基-3-N-2-羧基丙基) 尿嘧啶 (3-(3-amino-3-N-2-carboxypropyl) uracil)、(acp3)w 以及 2,6-二胺嘌呤 (2,6-diaminopurine)。

此外，本發明之聚核苷酸可包括至少一個修飾過的醣基，其係選自下列群組之一，包括但不限於：阿拉伯糖 (arabinose)、2-氟阿拉伯糖 (2-fluoroarabinose)、木酮糖 (xylulose) 以及六碳糖 (hexose)。本發明中，聚核苷酸的來源並不受限制。聚核苷酸可以來自人類或非人類的哺乳動物，或其他生物體，或任何重組的來源，活體外合成或化學合成。聚核苷酸可為 DNA、RNA、cDNA、DNA-RNA、肽核酸 (peptide nucleic acid, PNA)、其雜合物或混合物，以及可能以雙股、單股或部分雙股的形式存在。本發明之核酸包括核酸及其片段，純化或為純化的形式，包括基因、染色體、質體、生物材料例如微生物的基因組，例如細菌、酵母菌、病毒、病毒粒子、黏菌、真菌、植物、動物、人類或類似物。

核酸可僅為複雜混合物例如生物樣本中的一小部分。  
核酸可用習知技術由生物樣本中獲得。

舉例來說，為了偵測的目的，本發明之聚核苷酸可以衍生或修改為生物素化(biotinylation)、胺基修飾(amine modification)、烷化(alkylation)或其他類似的修飾。某些情形下，為了增加核酸酶的穩定性，本發明可使用具有修飾的核苷酸間鍵結(internucleoside linkages)的核酸。例如，合成核酸的方法，該核酸具有磷酸鹽(phosphonate)、磷硫醯(phosphorothioate)、二硫代磷酸酯(phosphorodithioate)、胺基磷酸脂(phosphoramidate)、甲氧基乙基胺基磷酸脂(methoxyethyl phosphoramidate)、甲縮醛(formacetal)、硫甲縮醛(thioformacetal)、二異丙基矽烷基(diisopropylsilyl)、醋酸醯胺(acetamidate)、氨基甲酸鹽(carbamate)、二亞甲基硫(dimethylene-sulfide)、二亞甲基氧化硫(dimethylenesulfoxide)、二亞甲基磺(dimethylene-sulfone)、2'-O-烷基(2'-O-alkyl)以及2'-去氧-2'-氟磷硫醯(2'-deoxy-2'-fluoro phosphorothioate)等先前技藝已知的核苷酸間鍵結(Uhlman et al., 1990, Chem. Rev. 90:543-584; Schneider et al. 1990, Tetrahedron Lett. 31:335, 以及其他所引用的文獻)。

本發明所稱之“寡核苷酸”係指相對較短、單股的聚

核苷酸，通常為合成的。寡核苷酸通常包括長度為 8 至 100 個核苷酸的序列，較佳為 20 至 80 個核苷酸，更佳為 30 至 60 個核苷酸。不同技術可用來準備用於本發明之寡核苷酸。此類寡核苷酸可由生物合成或化學合成而獲得。以化學合成 100 個核苷酸以下的短序列通常比生物合成經濟。除了經濟上的考量，化學合成在合成過程中提供方便的方法以加入低分子量化合物以/或修飾的鹼基。此外，化學合成在標的聚核苷酸結合序列區域與長度的選擇非常有彈性。寡核苷酸可藉由標準方法合成，例如商品化的自動核酸合成儀。DNA 在適當地修飾玻璃或樹脂上的化學合成可使 DNA 共價鍵結於表面上。這有利於清洗與樣本處理。對於較長的序列，可用分子生物學上標準的複製方法，例如使用 M13 以合成單股 DNA (J. Messing, 1983, *Methods Enzymol.* 101:20-78)。其他合成寡核苷酸的方法，包括磷酸三酯 (phosphotriester) 與磷酸二酯 (phosphodiester) 方法 (Narang et al., 1979, *Meth. Enzymol.* 68:90)、在支持物上合成 (Beaucage et al., 1981, *Tetrahedron Letters* 22:1859-1862)、胺基磷酸脂 (phosphoramidate) 合成 (Caruthers et al., 1988, *Meth. Enzymol.* 154:287-314)，以及其他如 “Synthesis and Applications of DNA and RNA” 所記載的方法 (S. A. Narang, editor, Academic Press, New York, 1987) 與相關文獻。

本發明所稱之寡核苷酸“引子”可用於與聚核苷酸模版的連鎖延展反應，例如核酸的增幅。寡核苷酸引子通常

為合成的寡核苷酸，其為單股並在或接近 3' 端具有可雜交的序列，可與標的或參考聚核苷酸的已知序列雜交。一般地，寡核苷酸的可雜交序列至少有 90%、較佳為 95%、更佳為 100% 與已知序列或引子結合序列的互補性。在本發明的某些實施例中，引子的序列可由理想的互補性到接下來要討論的導致增幅子發生突變之間變化。寡核苷酸引子的可雜交序列的核苷酸數目應用嚴厲條件使寡核苷酸雜交，以避免過多的隨機非專一性的雜交。通常地，寡核苷酸引子的可雜交序列的核苷酸數目至少為 10 個核苷酸，較佳為至少 15 個核苷酸、較佳為 20 至 50 個核苷酸。此外，引子在其 5' 端應具有不會跟標的或參考聚核苷酸雜交的序列，其為 1 至 60 個核苷酸，5 至 30 個核苷酸，或較佳為 8 至 30 個核苷酸。

本發明所稱之“樣本”係指可能具有目標核酸的物質。這類樣本包括生物體液，例如血液、血清、血漿、唾液、淋巴液、精液、陰道黏膜、排遺、尿液、脊髓液或類似物；生物組織例如頭髮或皮膚等等。其他樣本包括細胞培養與類似物、植物、食品、法庭樣本，例如紙張、布料與碎屑、水、污水、藥物等。當需要時，樣本可以試劑進行前處理，以液化樣本及/或由固著物質中釋出核酸。這樣的前處理均為習知技術。

本發明所稱之“增幅”(amplification)，應用於核酸，係指產生一或多個核酸複製物的任何方法，其中較佳為指數型(exponential)增幅。一個用於 DNA 特定序列的酵

素式的增幅為聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR)，參閱 Saiki et al., 1986, Science 230:1350-1354。PCR 中使用的引子長度從 10 至 50 或更多個核苷酸，通常選擇至少約 15 個核苷酸以確保足夠的專一性。所產生的雙股片段稱為“增幅子”(amplicon)，其長度少從約 30 個核苷酸，多至約 20,000 個核苷酸甚至更多。本發明所稱之“連鎖延展”(chain extension)係指聚核苷酸 3' 端藉由添加核苷酸或鹼基的延展。本發明有關的連鎖延展通常與模版相關，亦即，所增加的核苷酸是由模版核酸的序列所決定的，其與延展的序列雜交。所產生的連鎖延展產物的序列與模版序列互補。通常地，連鎖延展是由酵素所催化的，本發明中較佳為熱穩定的 DNA 聚合酶，例如衍生自 *Thermis aquaticus* (Taq 聚合酶)、*Thermococcus litoralis* 與 *Pyrococcus furiosis* 的酵素。

本發明中所稱兩個核酸序列“相關”(related)或“相對”(correspond)，是指當它們(1)完全相同，或(2)將會相同，若無部分不同的序列使兩者可區分。不同處可為在一個序列中替換、刪減或插入任何單一核苷酸或連續的核苷酸。這樣的相同稱之為“兩相關核酸序列的不同”(difference between two related nucleic acid sequences)。通常地，相關核酸序列相互間有單一核苷酸的區別。相關核酸序列典型地具有至少 15 個相同的核苷酸，但其長度不同或其中間序列具有至少一個不同的核苷酸。



本發明所稱之“突變”係指正常保守核酸序列的核酸序列的變化，其導致與正常(未變化)或野生型序列區別的突變體的產生。突變通常可區分為兩類，稱為鹼基對替換(base-pair substitutions)以及框架飄移突變(frame-shift mutations)，後者起因於一至數個核苷酸對的插入或刪除。一個核苷酸的不同可顯著地影響表形的正常或異常，例如鐮刀型貧血(sickle cell anemia)。

本發明所稱之“二元體”(duplex)係指一雙股核酸序列，包括兩個互相配對的互補序列。“部分二元體”(partial duplex)係指一個雙股核酸序列，其中一股的部分與另一股互補，並可形成二元體，但整股的全長並非互補，使該二元體的至少一端產生單股聚核苷酸的尾部。

本發明所稱聚核苷酸之“雜交”(hybridization)、“結合”(binding)與“降溫配對”(annealing)是可以交換使用的。兩個核苷酸序列相互雜交的能力係依據兩核苷酸序列互補性的程度，其係基於配對的互補核苷酸對的部分。一序列中與另一序列互補的核苷酸越多，可用於雜交的反應條件就越嚴苛，而兩序列的結合就越專一。增加的嚴苛條件可藉由提升溫度、增加共同溶劑的比例，降低鹽類的濃度，或任何習知的方法來達成。

本發明中稱兩序列為“互補的”係指當一序列可與另一序列反向(anti-parallel sense)結合時，其中每個序列的3'端與另一序列的5'端結合，同時一序列的每個A、T(U)、G與C係分別與另一序列的T(U)、A、C與G對齊。

此處所稱之“單一核苷酸多態性”(single nucleotide polymorphism, SNP)係指一個聚核苷酸以單一個核苷酸的置換而與另一聚核苷酸不同。例如，但不限於，聚核苷酸完整序列的一個 A 置換為一個 C、G 或 T 將產生一個 SNP。當然，在特定聚核苷酸中可能具有一個以上的 SNP。例如，一個聚核苷酸的一個位置(locus)，C 可能被置換為 T，在另一個位置，G 可能被置換為 A 等等。提到 SNP 時，通常聚核苷酸係為 DNA，而且 SNP 發生時經常為對個體有害的基因型。

所謂“可能具有多態性”(being suspected of containing a polymorphism)係指該聚核苷酸，通常為 DNA 或 RNA，其已知的序列為本發明之方法適用的標的，該序列已知在序列的已知位置可具有特定的多態性。

此處所稱之“模版”(template)係指一標的聚核苷酸股，例如，但不限於，一個未修飾、自然存在的 DNA 股，可被聚合酶辨識，並使核苷酸依次加入延長的股，以聚合該自然存在股的互補股。此類 DNA 股可為單股或其為雙股 DNA 模版的一部份。本發明的應用需要重複的聚合循環，例如 PCR，模版股本身可被加入修飾的核苷酸而修改，以供聚合酶作為合成額外聚核苷酸的模版。

此處所稱之“標識”(label)或“標籤”(tag)係指一添附於另一分子之分子，以提供或促進偵測該另一分子，舉例但不限於，該分子可為共價鍵結或雜交添附，該另一分子可為聚核苷酸或聚核苷酸的片段。當在不同波長被激

發時，螢光物質或螢光標識或標籤於特定波長發散可偵測的光線。放射性標識或放射活性標籤發散放射活性粒子，其可被儀器偵測，該儀器例如但不限於閃爍計數器 (scintillation counter)。

於一波長吸收光並於第二波長發散可偵測的光線的分  
子，包括如前述之螢光標識，並於此處稱為“螢光物質”  
(fluorophore)。

一個“質量修改”的核苷酸係為在一個核苷酸中增加、刪減或取代原子或化學取代基，但這樣的增加、刪減或取代並不產生修改的核苷酸性質，如此處所定義的，增加、刪減或取代的唯一效果是改變該核苷酸的質量。

#### 實施例

本發明之一實施例提供於一聚核苷酸中偵測多態性之方法。本方法包括使一探針降溫配對於一聚核苷酸可能具有多態性的區域以形成複合體，其中該探針包括一不可延展的 3' 端並與多態性不互補。一般地，該探針配對於該聚核苷酸，使該多態性位於該探針的 3' 與 5' 端之間。多態性可為 1、2、3、4、5、6 或多個連續或不連續的核苷酸。當探針降溫配對於具有多態性的聚核苷酸，產生變異結構 (variation structure) 或錯配結構 (mismatch structure)。該結構可為突起、環、或其他由於探針與聚核苷酸間的錯配所產生的型態。

本方法更包括以酵素或化學品接觸該複合體，以在探針與聚核苷酸之錯配區域切割探針與聚核苷酸，以產生具

有延展性的 3' 端。加入一個人工模版，而切割的探針係作為用於增幅該人工模版的引子。本方法更包括增幅該人工模版，而增幅產物的存在係表示多態性的存在。

本發明之另一實施例提供偵測核酸中核苷酸鹼基變異的方法，包括：(1)準備具有不可延展的 3' 端的基因專一性探針；(2)使該探針與一標的核酸雜交以形成一二元體；(3)使該二元體暴露於一切割酵素或化學品，其中該酵素或化學品可辨識並切割該探針與該標的核酸間的錯配所產生的結構；(4)切割該錯配所產生之結構以自該探針移除該不可延展的 3' 端，並於該探針，與選擇性地該標的核酸，產生一新的可延展的 3' 端；(5)使用該切割的探針或標的核酸作為引子或/及模版，以引子為基礎或聚合酶啟動子為基礎的增幅方法選擇性地增幅；以及(6)偵測增幅的核酸產物，其中增幅產物表示該標的核酸具有序列變異或多態性。

標的核酸(Target nucleic acid)

標的核酸或聚核苷酸可為活體外或活體內的天然或合成的 DNA、RNA 或 DNA-RNA 雜交物。聚核苷酸可為單股或雙股。典型地，聚核苷酸對應於可能在預先決定的位置具有多態性的基因，例如 SNP。多態形可為刪減、插入或替換的結果。多態形的特徵在相對於一個已知的序列，例如第一對偶子(allele)。因此，若已知第一對偶子的核苷酸序列，可以偵測該序列的變異或多態性。通常已知，單一的多態性可以導致疾病，例如鐮刀型貧血。本發明揭露之方法與組合物可用於偵測或診斷病患已知多態性相關的病理

學的存在或傾向。

### 基因專一性探針 (Gene specific probe)

不可延展的基因專一性探針(簡稱探針)包括一具有不可延展的 3' 端的序列專一性部分, 以及選擇性地在 5' 端的接合子(adapter)部分(第 1 圖)。序列專一性部分對標的核酸的特定區域具有序列互補性, 例如具有多態性的區域。探針的序列專一性部分可對野生型或感興趣的變異標的核酸特定區域具有互補性。可選擇性地, 基因專一性探針具有接合子序列, 其不與標的核酸互補。此一接合子序列可包括與 RNA 聚合酶啟動子, 例如 T7、T3 或 SP6 啟動子互補的序列, 以供將來增幅之用。基因專一性探針可為活體外或活體內合成的核酸, 包括 DNA、RNA 或其組合物。基因專一性探針的 3' 端被修改為不可延展, 以防止聚合酶的延展反應。此一修改可藉由添加阻卻引子延展反應的部份(moiety)而達成。阻卻部分, 包括但不限於化學基團, 如終結子核苷酸(terminator nucleotides)以及核苷酸類似物(nucleotide analogues)、額外非配對的核苷酸(extra un-matched nucleotides)、修飾過的核苷酸(modified nucleotides)或蛋白質部分(第 1 圖)。

### 人工模版(Artificial template)

人工模版亦可用於本發明之方法。人工模版係為一聚核苷酸, 包括在 3' 端有一基因專一性部分以及在 5' 端有一非專一性部分。模版的 3' 端被修改以阻卻聚合酶的延展。可藉由添加阻卻引子延展反應之部分來達成修改, 包括但

不限於，化學基團如終結子核苷酸以及核苷酸類似物、額外非配對的核苷酸、修飾過的核苷酸以及蛋白質部分。基因專一性部分具有與切割的基因專一性探針或標的核酸 3' 端互補的序列。非專一性部分不與基因專一性探針或標的核酸互補。選擇性地，非專一性部分具有與接合子引子互補的接合子序列或與 RNA 聚合酶啟動子序列互補的序列 (第 1B 圖)。

### 接合子引子(Adapter primer)

接合子引子(簡稱接合子)有與基因專一性探針接合子部分互補的核苷酸序列(第 1A 與 1B 圖)。

### 切割-增幅反應(The Cleavage-Amplification reaction)

將可能具有多態性的標的核酸或聚核苷酸與基因專一性探針混合。基因專一性探針設計與沒有多態性的聚合核苷酸互補。該混合物加熱以使核酸變性，隨即冷卻以使探針與標的核酸降溫配對，以形成二元體(第 2 圖)。若標的核酸具有序列變異或多態性，該探針與標的核酸在二元體形成一變異結構或錯配結構。變異結構可為由序列變異或錯配鹼基對而新產生的限制酵素位置。二元體曝露於具有切割酵素或化學品的反應溶液中，以切割二元體的變異結構。酵素切割變異結構，因此移除探針的不可延展 3' 端，以產生探針的新的可延展 3' 端。探針因此被活化，且變成可延展。切割亦在標的核酸產生新的可延展 3' 端。切割的探針與標的核酸係作為引子為基礎的增幅或 RNA 聚合酶啟動子為基礎的增幅的引子。任何增幅的核酸的偵測表示在

標的核酸存在變異或多態性(第 2 與 3 圖)。

以引子為基礎的增幅方法，包括但不限於 PCR、股置換增幅(strand displacement amplification)、滾動環形增幅(rolling circle amplification)以及等溫核酸增幅(isothermal nucleic acid amplification, WO2004067726A2, WO2004059005)。

就 PCR 增幅而言，切割的基因專一性探針或標的核酸作為引子，且 PCR 增幅在切割的基因專一性探針與人工模版間進行(第 2 圖)。

於另一實施例中，標的核酸或探針的新產生之 3' 端可經人工模版延展，其具有與 RNA 聚合酶互補序列以形成一啟動子結構(第 3 圖)。

另一實施例中，標的探針新產生的 3' 端可經未切割的探針或人工模版延展，其具有與 RNA 聚合酶互補序列以形成一啟動子結構。切割訊號可藉由 RNA 聚合酶增幅而偵測(第 3 圖)。

為了偵測增幅產物，基因專一性探針與接合子引子可加標籤、雜交或加入可偵測的部分或標識。該部分可為任何可偵測的分子，包括但不限於螢光物質(fluorophore)、生物素(biotin)、地高辛(digoxigenin)、蛋白質，例如蛋白質標籤或抗體。

基因專一性探針、基因專一性反轉引子(the gene specific reverse primer)以及接合子引子可以分離或偵測之目的固著於固體型態或支持物。

用於切割變異結構的切割酵素可為任何類型的限制內切核酸酶與內切核酸酶，其可識別並切割所有類型的錯配。這類酵素包括但不限於，噬菌體 T4 內切核酸酶 VII (bacteriophage T4 Endonuclease VII, Kosak et al., 1990, *Eur. J. Biochem.* 194:779) 或噬菌體 T7 內切核酸酶 I (bacteriophage T7 Endonuclease I, deMassy, B., et al., 1987, *J. Mol. Biol.* 193:359)、S1 核酸酶 (S1 nuclease)、綠豆核酸酶 (Mung bean nuclease) 與 Mut Y、Mut H、Mut S 以及 Mut L 修補蛋白家族 (Welsh, K.M. et al., 1987, *J. Biol. Chem.* 262, 15624-15629)、芹菜的錯配核酸酶的 CEL 核酸酶家族 (Oleykowski, C.A. et al., 1998, *Nuc. Acids Res.* 26:4597-4602)。

錯配結構亦可由化學品，例如羥胺 (hydroxylamine) 或四氧化錳 (osmium tetroxide) 處理而切割。

增幅的核酸可由測量紫外線 (UV) 吸收值或以可偵測染劑 (如螢光劑 cyber green) 染色而偵測。亦可由標識增幅產物而達到偵測目的，例如使用標識的探針、引子或在增幅產物加入標識的核苷酸。增幅產物可由量測增幅作用所產生的焦磷酸 (pyrophosphate, P<sub>PPi</sub>) 來偵測。該方法可利用尺寸分離方法 (size fractional approach)，例如可使用膠體電泳 (gel electrophoresis)、毛細管電泳 (capillary electrophoresis)、HPLC 以及質譜分析 (mass spectrometer) 或與標識方法結合使用以用於偵測。

增幅亦可以即時 PCR (real time PCR) 進行。用於即時

PCR 的標識探針設計雜交於基因專一性探針與接合子引子的接合子序列的任何部分，或是探針與引子間的序列(第 4 圖)。標識探針包括但不限於，Taqman 探針(Taqman probe)、分子燈塔探針(Molecular beacon probe)或 Scopinine 探針(Scopinine probe)。

另一實施例提供一種套組，包括設計用於偵測專一核酸多態性的探針、人工模版以及用於切割錯配結構的酵素或化學品。該套組選擇性地包括用於增幅人工模版的試劑以及供套組偵測特定多態性之儀器。

可偵測的標識(Detectable Labels)

本發明所揭露之探針或標的可包括一可偵測的標識，例如，第一可偵測標識。樣本聚核苷酸可包括可偵測的標識，例如第二可偵測標識。適當的標識包括放射性標識與非放射性標識，直接可偵測與不直接可偵測標識，及其他類似物。直接可偵測標識提供直接可偵測的訊號，而不用與一或多個額外的化學物質反應。合適的直接可偵測標識包括比色標識(colorimetric labels)、螢光標識(fluorescent labels)以及類似物。非直接可偵測標識與一或多個額外成員作用，以提供可偵測的訊號。合適的非直接偵測標識包括對應標識的抗體的配體(ligand)及類似物。

合適的螢光標識包括任何習知螢光標識的變化。專一性合適的螢光標識包括：氧雜蔥染料(xanthene dyes)，例如螢光素(fluorescein)以及玫瑰紅染料(rhodamine

dyes) , 例如 螢光素異硫氰酸 (fluorescein isothiocyanate, FITC) 、 6-羧基螢光素 (6-carboxyfluorescein, 通常縮寫為 FAM 與 F) 、 6-羧基-2', 4', 7', 4, 7-七氯螢光素 (6-carboxy-2', 4', 7', 4, 7-hexachlorofluorescein, HEX) 、 6-羧基-4', 5'-二氯-2', 7'-二甲氧基螢光素 (6-carboxy-4', 5'-dichloro-2', 7'-dimethoxyfluorescein, JOE 或 J) 、 N, N, N', N'-四甲基-6-羧基玫瑰紅 (N, N, N', N'-tetramethyl-6-carboxyrhodamine, TAMRA 或 T) 、 6-羧基-X-玫瑰紅 (6-carboxy-X-rhodamine, ROX 或 R) 、 5-羧基玫瑰紅-6G (5-carboxyrhodamine-6G, R6G5 或 G5) 、 6-羧基玫瑰紅-6G (6-carboxyrhodamine-6G, R6G6 或 G6) 以及玫瑰紅 110 (rhodamine 110) ; 花青染料 (cyanine dyes) , 例如 Cy3、Cy5 以及 Cy7 染料 ; 香豆素 (coumarins) , 例如 傘形酮 (umbelliferone) ; 苯亞胺染料 (benzimidazole dyes) , 例如 Hoechst 33258 ; 菲啉染料 (phenanthridine dyes) , 例如 德州紅 (Texas Red) ; 乙烯染料 (ethidium dyes) ; 啉染料 (acridine dyes) ; 咔唑染料 (carbazole dyes) ; 吩噁嗪染料 (phenoxazine dyes) ; 卟啉染料 (porphyrin dyes) ; 聚次甲基染料 (polymethine dyes) , 例如 花青染料 (cyanine dyes) , 如 Cy3、Cy5 等 ; BODIPY 染料 (BODIPY dyes) 以及 喹啉染料 (quinoline dyes) 。

#### 實施例 1

K-ras 在密碼 12 的點突變 (GGT>GAT) 的鑑定

(Identification of the K-ras point mutation in codon 12)

K-ras 在密碼 12 的突變 (GGT>GAT) 產生一個新的 BccI 限制酵素位置。為了偵測這個突變，設計與突變兩邊的側翼序列互補的探針以切割並延展。

不可延展的基因專一性探針

5' -TGTTCTTGTTTATTCGACACAGTTCTTCATAAACTTGTGGTAGTTG  
GAGCTGATGGTTT\* (SEQ ID NO: 1)

\*為倒轉的 dTTP (inverted dTTP)。

人工模版

5' -CTTGTTCTTGTTTATTCGACACAGTTCTTC                    GCTTTGGCCG  
CCGCCAGTC      CTGCTCGCTT      CGCTACTTGG      AGCCACTATC  
GACTACGCGA      TCATGGCGAC      CACACCCGTC      CTGTGGATCC  
TCTACGCCGG ACGCATCGTG GCTCCAACTACCACAAGTTTATCCGAAA\*  
(SEQ ID NO: 2)

\*為 ddATP。

接合子引子

CTTGTTTATTCGACACAGTTCTTC (SEQUENCE ID NO: 3)

DNA 樣本

野生型基因體 DNA 購自 Promega，突變 DNA (Mutant DNA) 利用商品化 DNA 萃取套組 (Qiagen) 萃取自人類胰腺癌細胞 (ATCC #CRL-2547)。基因體 DNA 的最終濃度調整為 100 奈克/微升 (ng/ul)。

雜交

雜交以含有 0.1 至 1 微克基因體 (ug)DNA、0.05uM 探針、10mM Tris-HCl(pH7.0)與 10mM NaCl 的總體積為 10 微升雜交溶液進行。混合物以 95°C 加熱 5 分鐘，隨即以 50°C 降溫 25 分鐘。

#### 酵素切割

切割以總體積 10 微升溶液於 37°C 進行 1 小時，該溶液包含 10mM Tris-HCl(pH7.0)、10mM MgCl<sub>2</sub>、1mM dithiothreitol、100 μg/ml 胎牛血清球蛋白 (Bovine Serum Albumin) 以及 2 單位 BccI (New England BioLab)。

#### 增幅

切割後，10 微升的切割混合物轉移到 40 微升的增幅溶液中，其最終濃度為 0.1uM 人工模版 (SEQ ID NO: 2)、0.5uM 接合子引子 (SEQ ID NO: 3)、0.2mM 的 dATP、dCTP、dGTP 以及 dTTP、20mM Tris-HCl(pH8.8)、15mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、1.5mM MgCl<sub>2</sub>、2 單位白金 Taq 聚合酶 (platinum Taq polymerase, Invitrogen)。PCR 增幅在熱循環器 (thermal cycler, Hybaid) 中進行，循環條件為：1 回合的 95°C 加熱 5 分鐘，35 回合的 95°C 加熱 1 分鐘、56°C 加熱 1 分鐘、72°C 加熱 1 分鐘，以及 1 回合的 72°C 加熱 10 分鐘。PCR 反應後，10 微升的 PCR 產物以 1.2% 洋菜膠 (agarose gel) 分析，並以溴化乙烯染色以檢視 DNA 斑帶。

結果如第 5 圖所示，並摘要如下表：

行號	試管內容	BccI 酵素處理	增幅產物
M	100bp DNA ladder		
1	野生型 DNA 0.2ug	-	-



TCTACGCCGG

ACGCATCGTG

CATTTCACTGTAGCTAGACCAAAAATCACCTTTT\* (SEQ ID NO: 5)

\*為 ddTTP。

## DNA 模版

基因體 DNA 取自胸腺癌細胞株 (J. Clinical Endocrinology & Metabolism 89(6):2867-2872)。基因體 DNA 的最終濃度調整為 100 奈克/微升 (ng/ul)。

## 雜交

雜交係於總體積 20 微升溶液中進行，其包括 1 微克基因體 DNA、0.05uM 探針 (SEQ ID NO: 4)、20mM Tris-HCl (pH8.0) 以及 50mM NaCl。混合物以 95°C 加熱 5 分鐘，隨即培養於 50°C、25 分鐘。

## 酵素切割

雜交後，於雜交混合物加入 2 單位的 Cel I 核酸酶 (Cel I nuclease, Transgenomic Inc)。切割於 37°C 進行 1 小時。切割後，於試管中以 95°C 加熱 10 分鐘使酵素去活性。

## 增幅

依照實驗例 1 所述的條件進行 PCR 增幅並分析結果。人工模版 (SEQ ID NO:5) 的最終濃度為 0.1uM，以及接合子引子 (SEQ ID NO: 3) 的最終濃度為 0.5uM。

結果如第 6 圖所示，並摘要如下表：

行號	試管內容	切割酵素處理	增幅產物
1	野生型 DNA	-	-
2	野生型 DNA	+	-
3	突變 DNA	-	-

具有探針與突變 DNA 的 4 號試管可以偵測到專一的 200 鹼基對的增幅產物 2 號試管則無。結果表示樣本中具有突變的存在。

### 【圖式簡單說明】

第 1A 至 1B 圖係為本發明切割-增幅系統之一實施例之基因專一性探針、人工模版以及接合子引子之示意圖。

第 2 圖係為本發明之切割-增幅的方法之一實施例之示意圖。

第 3A 至 3C 圖係為本發明以 RNA 聚合酶啟動子為基礎的增幅方法之一實施例之示意圖。

第 4 圖係為本發明用於以即時 PCR 方法增幅切割產物之探針設計之示意圖。

第 5 圖為依據本發明方法之一實施例增幅子之膠體電泳圖。

第 6 圖為依據本發明方法之另一實施例增幅子之膠體電泳圖。

### 【主要元件符號說明】

無。

五、中文發明摘要：

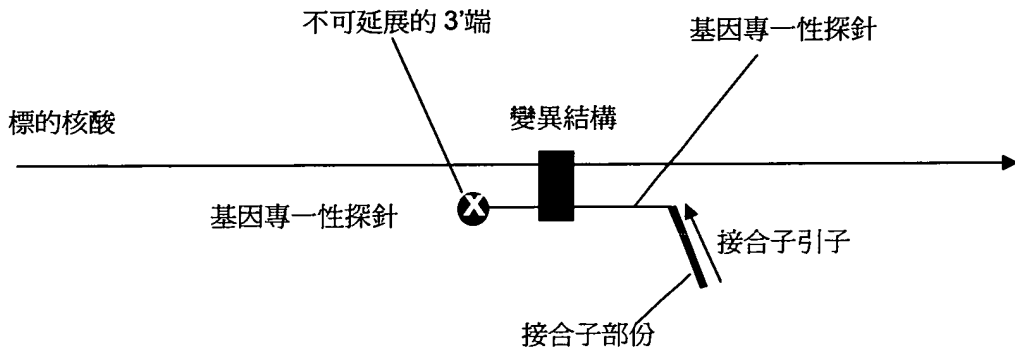
本發明係提供一種用於偵測核酸多態性的方法與組合物。

六、英文發明摘要：

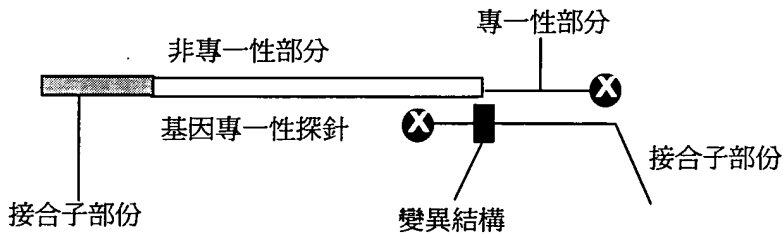
Methods and compositions for detecting nucleic acid polymorphisms are provided.



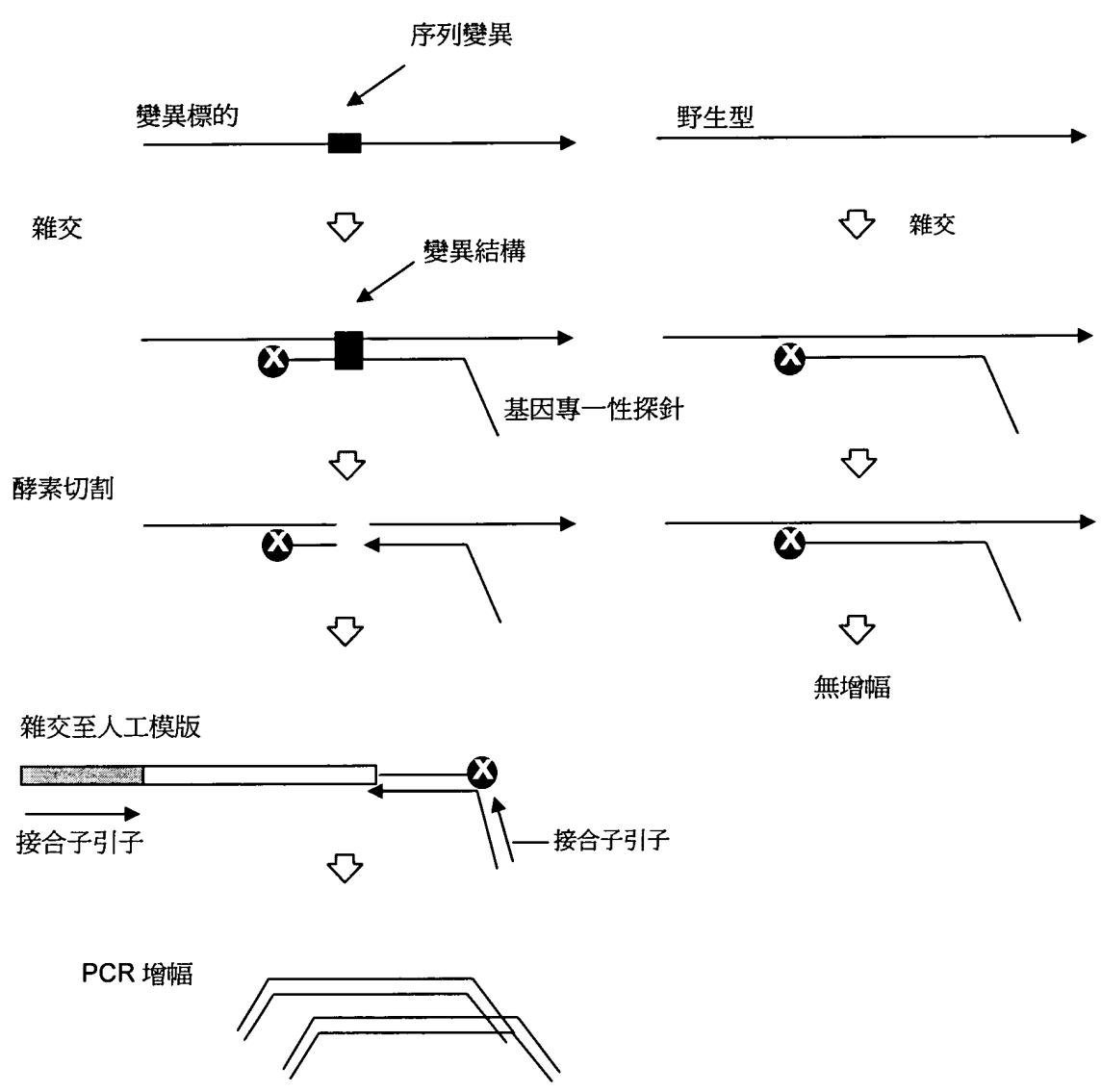
### A. 不可延展的基因專一性探針



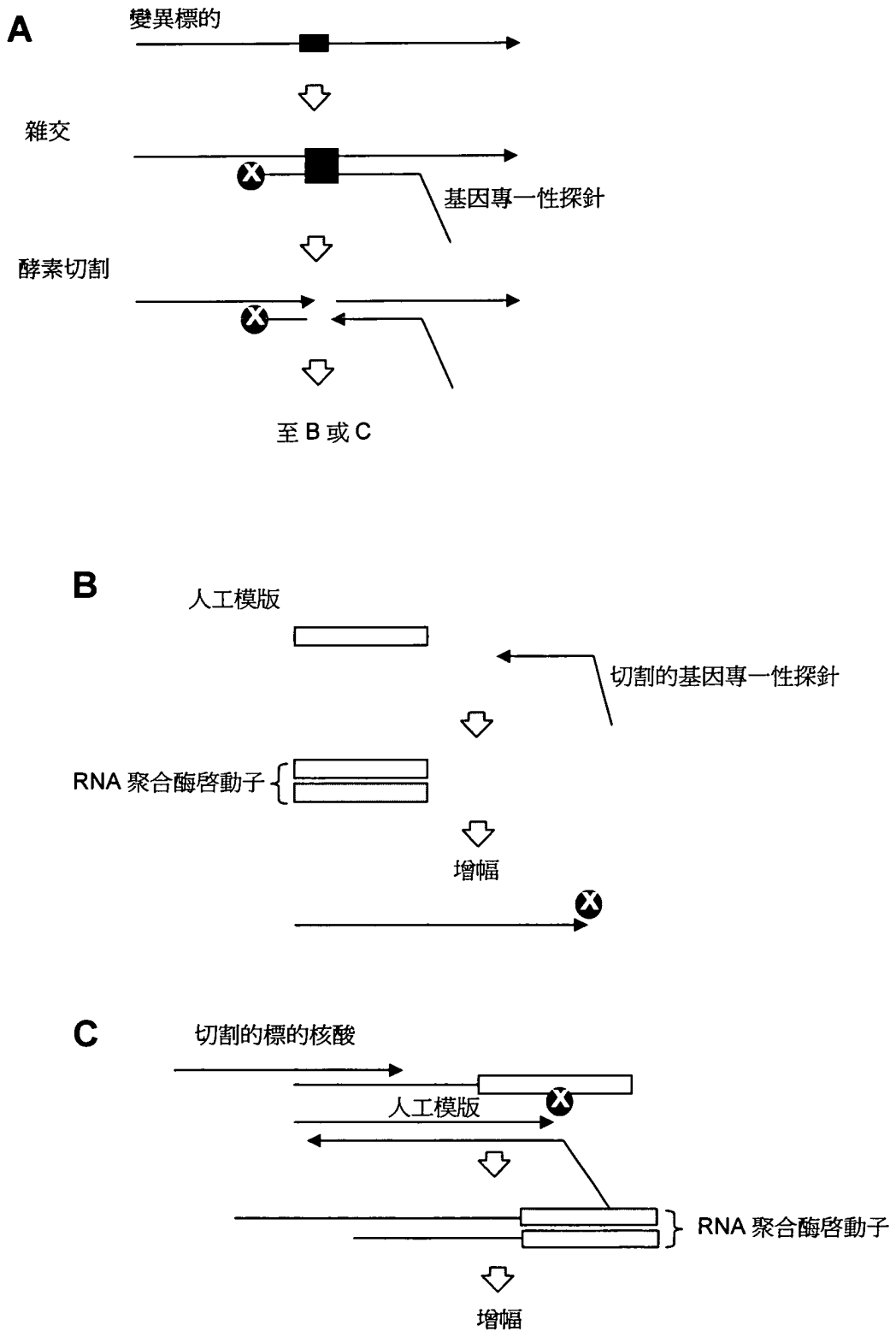
### B. 人工模版



第 1 圖

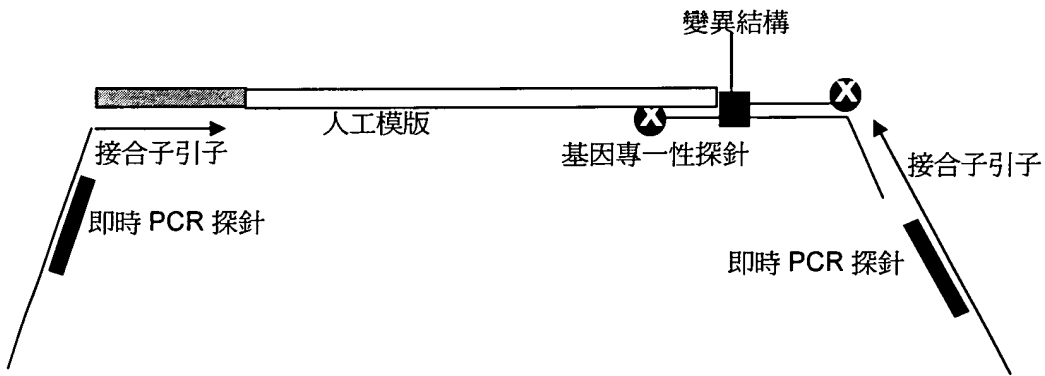
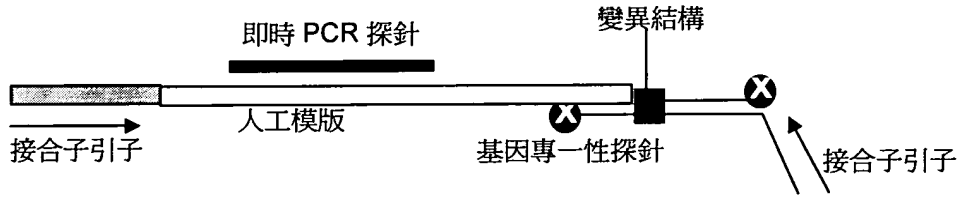


第 2 圖



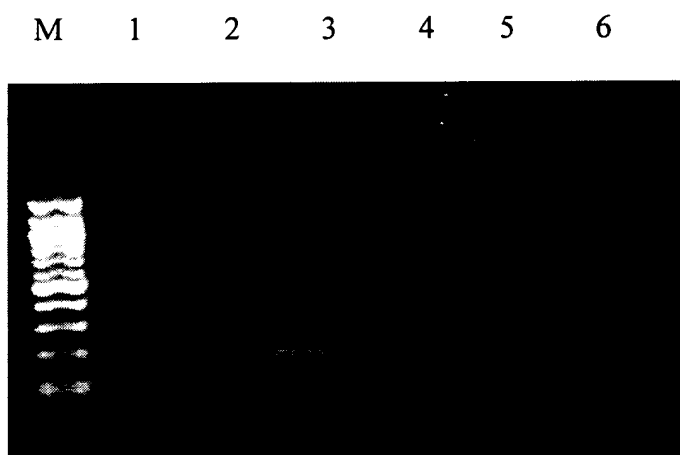
第 3 圖





第 4 圖

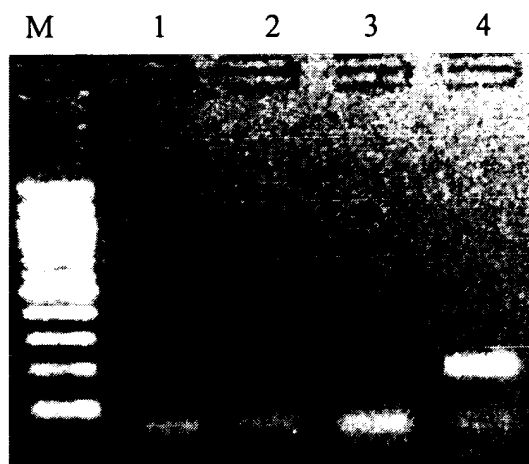
實施例 1 的數據



行號	試管內容	BclI 酵素處理	增幅產物
M	100 bp DNA ladder		
1	Wild type DNA 0.2 ug	-	-
2	Wild type DNA 0.2 ug	+	-
3	Mutant DNA 0.1 ug	+	++
4	Mutant DNA 0.2 ug	+	++
5	Mutant DNA 0.5 ug	+	++
6	Mutant DNA 1 ug	+	+++

第 5 圖

## 實施例 2 的數據



行號	試管內容	切割酵素 處理	增幅產物
M	100 bp DNA ladder		
1	Wild type DNA	-	-
2	Wild type DNA	+	-
3	Mutant DNA	-	-
4	Mutant DNA	+	+

第 6 圖

七、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第(2)圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：無。

八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

無。

公告本

# 發明專利說明書

95年 11月 2日 修正  
補充

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※ 申請案號： 94140952

※ 申請日期： 94.11.22

※IPC 分類： C12Q 1/68 (2000.01)

C12P 19/34 (2006.01)

## 一、發明名稱：(中文/英文)

以切割－增幅法偵測核酸變異 / Detection of Nucleic Acid Variation By Cleavage-Amplification Method

## 二、申請人：(共 2 人)

姓名或名稱：(中文/英文)

1. 森澤紳勝 / SHINKATSU MORISAWA
2. 王小兵 / XIAO BING WANG

代表人：(中文/英文)

住居所或營業所地址：(中文/英文)

1. 日本國京都府京都市西京區大枝北沓掛町五丁目 7 番地 4
2. 美國馬里蘭州 21093, 路德鎮, 摩而灣道 1315 號

國 籍：(中文/英文)

1. 日本 / JAPAN
2. 美國 / U.S.A.

## 三、發明人：(共 1 人)

姓 名：(中文/英文)

王小兵 / XIAO BING WANG

國 籍：(中文/英文)

美國 / U.S.A.



## 【序列表】

<110> 森澤紳勝 (SHINKATSU MORISAWA), 王小兵 (XIAO BING WANG)

<120> 以切割-增幅法偵測核酸變異

<130> 60204.0006USU1

<150> US60/635,568, US11/282,491

<151> 2004-11-23, 2005-11-18

<160> 5

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 59

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工探針序列

<400> 1

tgttcttggt tattcgacac agttcttcat aaacttgtag tagttggagc tgaatggtt 59

<210> 2

<211> 168

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工模版序列e

<400> 2

cttggtcttg tttattcgac acagttcttc gctttggccg ccgcccagtc ctgctcgtt 60

cgctacttgg agccactatc gactacgcga tcatggcgac cacaccgctc ctgtggatcc 120

tctacgccgg acgcatcgtg gctccaacta ccacaagttt atccgaaa 168

<210> 3

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 接合子引子

<400> 3

cttgtttatt cgacacagtt cttc

24

<210> 4

<211> 63

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工探針序列

<400> 4

gttcctgttt attcgacaca gttcttcggt gattttggtc tagctacagt gaaatctcag

60

ttt

63

<210> 5

<211> 173

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工模板序列

<400> 5

cttgttcttg tttattcgac acagttcttc gctttggccg ccgcccagtc ctgctcgctt

60

cgctacttgg agccactatc gactacgcca tcatggcgac cacaccgctc ctgtggatcc

120

tctacgccgg acgcatcgtg catttcaactg tagctagacc aaaatcacct ttt

173



## 十、申請專利範圍：

1. 一種用於偵測聚核苷酸中多態性的方法，包括：

(a) 降溫配對一探針至可能具有一多態性之一聚核苷酸區域以形成一複合體，其中該探針包括一不可延展的 3' 端以及與該多態性不互補；

(b) 以一酵素或化學品接觸該複合體以在該探針與該聚核苷酸間的一錯配區域切割該探針與該聚核苷酸，產生具有可延展的 3' 端的一探針；

(c) 添加一人工模版，其中該切割探針係作為一引子以增幅該人工模版；以及

(d) 增幅該人工模版，其中該增幅產物的存在係表示該多態性的存在。

2. 如申請專利範圍第 1 項所述之方法，其中該探針與該聚核苷酸之間的該錯配區域包括一新產生的限制酶位置。

3. 如申請專利範圍第 1 項所述之方法，其中該標的核酸係來自天然來源或活體內或活體外合成之核酸。

4. 如申請專利範圍第 1 項所述之方法，其中該探針係為活體內或活體外合成之 DNA、RNA 或 DNA 與 RNA 之嵌合物。

5. 如申請專利範圍第 1 項所述之方法，其中該探針在其 5' 端包括一接合子序列，其中該接合子序列與該聚核苷酸不互補。

6. 如申請專利範圍第 5 項所述之方法，其中該探針之該接合子序列包括與 RNA 聚合酶的啟動子互補之一序列。

7. 如申請專利範圍第 6 項所述之方法，其中該 RNA 聚合酶係選自由 T7、T3 與 SP6 聚合酶所組成之群組。

8. 如申請專利範圍第 1 項所述之方法，其中該酵素係為一限制性核酸內切酶。

9. 如申請專利範圍第 1 項所述之方法，其中該酵素係為一核酸內切酶。

10. 如申請專利範圍第 9 項所述之方法，其中該酵素係選自由噬菌體 T4 核酸內切酶 VII、噬菌體 T7 核酸內切酶 I、S1 核酸酶、綠豆核酸酶、Mut Y、Mut H、Mut S、Mut L 以及 CEL 核酸酶家族所組成之群組。

11. 如申請專利範圍第 1 項所述之方法，其中該化學品係選自由羥胺與四氧化鐵所組成之群組。

12. 如申請專利範圍第 1 項所述之方法，其中該延展與增幅係藉由 DNA 聚合酶來進行，該 DNA 聚合酶具有或不具有股置換活性。

13. 如申請專利範圍第 1 項所述之方法，其中該增幅係使用一選自由 PCR、股置換增幅、滾動環形增幅以及核酸等溫增幅方法所組成之群組之方法。

14. 如申請專利範圍第 1 項所述之方法，其中該人工模版包括一不可延展的 3' 端。

15. 如申請專利範圍第 14 項所述之方法，其中該人工模版包括一與該聚核苷酸互補的 3' 端區域以及在 5' 端有一非專一性區域。

16. 如申請專利範圍第 15 項所述之方法，其中該非專



一性區域包括一接合子，其與一 RNA 聚合酶之接合子引子或啟動子序列互補。

17. 如申請專利範圍第 1 項所述之方法，其中該探針之不可延展的 3' 端係被修飾以阻卻 DNA 聚合酶的延展。

18. 如申請專利範圍第 1 項所述之方法，其中該人工模版包括與人工模版包括與一 RNA 聚合酶的啟動子互補的一序列。

19. 如申請專利範圍第 1 項所述之方法，其中該人工模版係藉由量測紫外線吸收值來偵測。

20. 如申請專利範圍第 1 項所述之方法，其中該人工模版包括一標識的核苷酸。

21. 如申請專利範圍第 1 項所述之方法，其中增幅藉由量測增幅作用所產生的焦磷酸來偵測。

22. 如申請專利範圍第 1 項所述之方法，其中增幅可藉由膠體電泳、毛細管電泳、HPLC 或質譜分析來偵測。

23. 如申請專利範圍第 13、14 或 20 項所述之方法，其中該標識物係選自由螢光物質、生物素、地高辛 (digoxigenin)、蛋白質標籤、抗體或酵素結合物所組成之群組。

24. 如申請專利範圍第 1 項所述之方法，其中該探針、該人工模版，以及選擇性地該接合子引子，係固著於一固體支持物上。

25. 如申請專利範圍第 5 項所述之方法，其中該增幅係藉由即時 PCR 以標識的探針來進行，且該探針係依該接合

子序列的任何部分設計。

26. 一種用於偵測標的核酸間核苷酸變異的方法，包括：

(a) 製備具有不可延展的 3' 端的一基因專一性探針，其中該探針係與該標的核酸的一區域互補；

(b) 使該基因專一性探針與該標的核酸雜交以形成一二元體，其中該變異結構發生於該二元體，如果該標的核酸係包括一核苷酸變異；

(c) 使該二元體暴露於一切割酵素或化學品，其中該酵素或化學品在二元體切割該變異結構以自該基因專一性探針移除該不可延展的 3' 端，並於該探針與該標的核酸產生一新的可延展的 3' 端；以及

(d) 以該切割的基因專一性探針或標的核酸作為引子以增幅一人工模版。

27. 如申請專利範圍第 26 項所述的方法，其中增幅係以 RNA 聚合酶啟動子為基礎的增幅。

