

本案已向

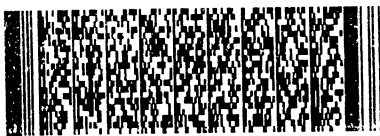
國(地區)申請專利	申請日期	案號	主張優先權
美國 US	1999/11/22	60/166,898	有
美國 US	2000/07/17	09/618,129	有

有關微生物已寄存於

寄存日期

寄存號碼

無



五、發明說明 (1)

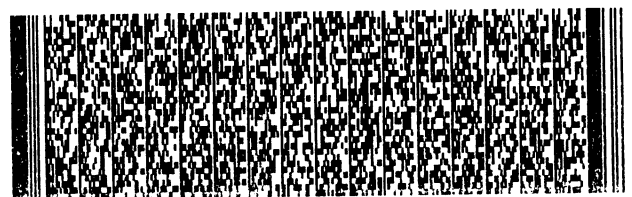
發明背景

本發明是有關於核酸序列偵測的領域。本發明是有關於在有興趣的預定核酸鹼基位置上偵測任何形式的突變之方法。本發明是針對一種稱為飄移末端分析的方法，也稱為特定末端分析 (specific termination assay)，或飄移終止子校準 (shifted terminator alignment)，可簡稱為STA。

這個創造性發明的實際應用包括基因疾病診斷、感染性疾病診斷、法庭技術、親緣鑑定以及基因圖譜分析，其中要偵測的突變位置是已知的。

在過去十年中，已經鑑定出牽涉到遺傳敏感性而形成癌症的基因，並且已經說明了許多癌症相關的突變之特徵。對於這些突變的診斷測試可提供對於病人發展癌症風險之更精確的估算。癌症相關突變的早期診斷是本發明的目標之一。

基因突變的主要形式有四種。第一種是點突變，是藉由正常DNA序列中的單一核苷酸取代所引起。在大部分的情況下，這種突變引起編碼股的讀架移動 (frame shift)，其造成正常蛋白質合成的終止。在家族性腺息肉症 (FAP, adenopolyposis) 病患所發現的APC基因點突變是一個典型的實例 (Kinzler 等人, Science, 253, 661-665 (1991); Joslyn 等人, Cell, 66, 601-613 (1991); Nishisho 等人, Science, 253, 665-669 (1991))。第二種是插入型突變，其中單一或多個核苷酸插入一正常DNA

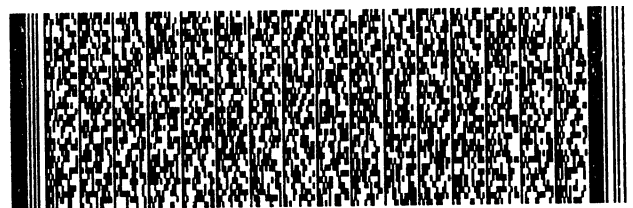
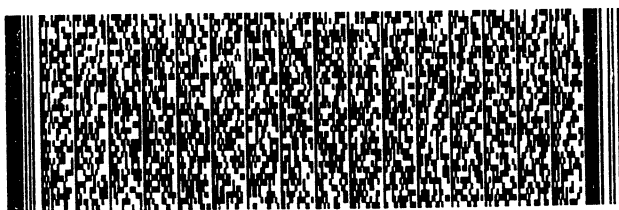


五、發明說明 (2)

序列之中。第三種是刪除型突變，其中單一核苷酸或多個核苷酸從一正常DNA序列中刪除。插入或刪除形式的突變都會引起嚴重的改變，例如讀架移動、蛋白質合成的提早終止以及加入或刪除一個或多個胺基酸。第四種是基因移位 (translocation)，當基因片段嵌入另一個基因之中時，便會發生基因移位。在慢性脊髓血癌病患所見的費城染色體 (Philadelphia chromosome) 是這種現象的一個實例 (Konopka 等人, Cell, 37, 1035 (1984))。蛋白質構造的改變在細胞中引起一連串的失調，這些失調會造成癌症的啟動。

在數千個正常DNA中偵測一個突變的DNA是困難的。化學或酵素的DNA定序方法是在研究實驗室中，對於分析及鑑定基因突變最徹底的方法。然而，這種定序方法的臨床應用是不切實際的，因為這種方法受限於執行這個分析方法所需要的專業技能、勞力密集、獲取實施定序反應之設備、及試劑相關的高成本、以及完成這個計畫所需要的長期持續時間。最後，定序方法的另一個缺點是這種程序需要大量的DNA模板，通常從病人收集的10毫升血液樣本要獲得這樣大量的DNA模板是困難的。

習知的突變偵測技術的實例包括：限制片段長度多形性 (RFLP) (Botstein 等人, Am. J. Hum. Genet., 32, 314-331 (1980)，以及White 等人, Scientific American, 258, 40-48 (1988))；單股構形多形性 (SSCP) (Howell 等人, Am. J. Hum. Genet., 55,

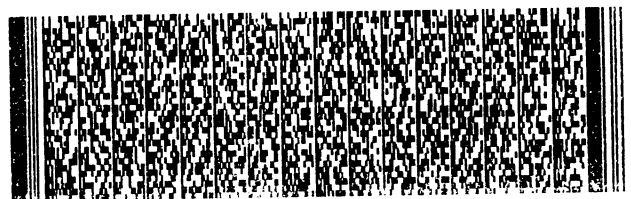
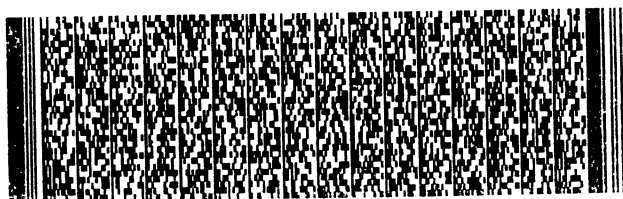


五、發明說明 (3)

203-206 (1994)) ; 對偶基因特異性寡核苷酸雜合作用 (Studencki 等人, Am. J. Hum. Genet., 37, 42-51 (1985), 以及 Saiki 等人, Nature, 324, 163-166) ; 寡核苷酸黏合分析 (Landgrun 等人, Science, 241, 1077-1080 (1990)) ; 以及對偶基因特異性聚合酶連鎖反應 (ASPCR) (Wu 等人, Proc. Natl. Acad. Sci., 86, 2757-2760 (1989)), 以及 Okayama 等人, J. Lab. Clin. Med. 114, 105-113 (1989)) 。

一些技術只適合用於偵測點突變。一些其他的技術只可用來偵測插入或刪除, 而這些突變, 例如, 可能破壞或建立限制酵素切割位置, 但這些技術不適合用於偵測單一鹼基突變。例如, 不會影響酵素切割位置的點突變就會被這樣的方法, 例如 RFLP 所忽略。其他的技術需要使特殊的探針雜合作用條件最佳化。此外, 所有的上述技術需要特殊的實驗室設備, 例如凝膠電泳裝置以及雜合作用設備, 時間以及勞力。

一些根據引子延伸以用於偵測突變的方法也是已知的 (Mohan 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 1143-1147 (1991); Prezant 等人, Hum. Mutation, 1, 159-164 (1992); Fahy 等人, Nucleic Acid Research, 25, 3102-3109 (1997); 以及美國專利第 5,846,710 號 (1998) 以及第 5,888,819 號 (1998))。這樣的方法包括: 運用含硫核苷酸的引子延伸; 運用互補於突變核苷酸鹼基的標示核苷酸, 從突變核苷酸周圍之核苷酸引子開始的引



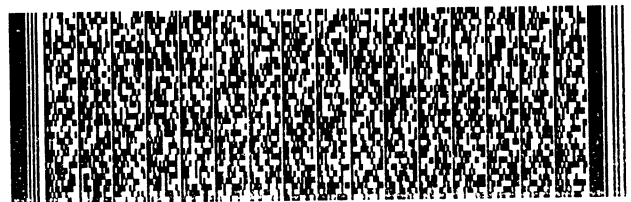
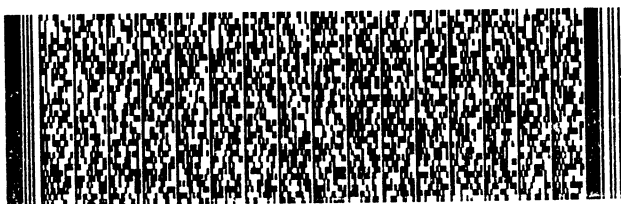
五、發明說明 (4)

子延伸；以及運用互補於突變鹼基之二去氧核苷酸終結子 (dideoxynucleotide terminator) 的引子延伸。

這些根據引子延伸的突變偵測方法是快速的、容易操作的、並且可能適用於臨床使用。然而，使用這個方法仍有至少兩個缺點。第一，所有的這些技術是基於只將一個標示核苷酸加入引子延伸股。只加入選擇自A、C、G、T或U之其中一種形式的標示核苷酸或標示的二去氧核苷酸，只能偵測特定於核苷酸鹼基的特定點突變，其中該核苷酸鹼基是互補於這個分析方法所使用的標示核苷酸。

假設，當不同形式或性質的突變發生在相同的位置上，例如，如果A變成C或GT或TCT，並具有無數個其他突變時，則這些已知的方法需要以標示的G、C、A進行至少三次的個別測試。或者，可進行一次的測試，而該測試使用不同標示的核苷酸，並加上凝膠分析以及特別的標記偵測 (marker detection) 系統，以分別偵測G、C、A突變。然而，進行三次個別的測試需要三倍的血液樣本，而血液樣本一般要從病患獲得。這樣高體積的血液樣本或複雜的凝膠分析程序不僅增加測試的成本，並且包含時間及勞力，而且更重要的是，由於錯誤標示試管的可能性的以及進行這個分析方法所需要的許多步驟，因此增加錯誤的機會。因此，這些基於引子延伸的方法對於篩檢大量樣本數、或在臨床上進行例行的測試是不方便或不適合的。

第二個缺點，這些基於引子延伸的分析方法之靈敏度需要改進。因為這些測試所獲得的引子延伸股只具有一個



五、發明說明 (5)

標示的核苷酸或標示的二去氧核苷酸，所以產生的訊號是多變的，並且它們的強度係由所使用的化學標示種類而決定。不過一般而言，這些訊號都很微弱。

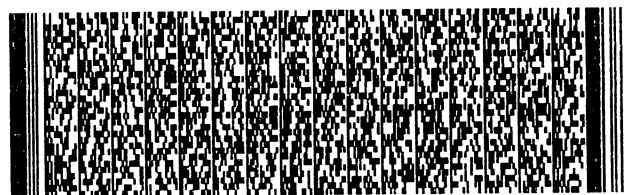
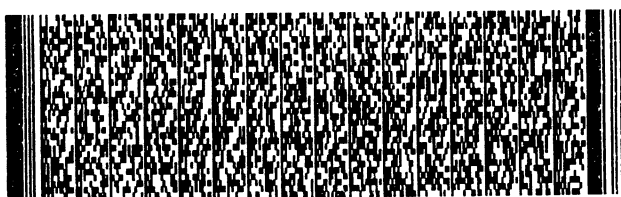
因此，在突變偵測領域中，需要一種快速、低成本、非勞力密集而且是臨床上可應用的技術，這種技術可偵測發生於一特定預定位置上之核酸鹼基的任何形式突變，並提供一強烈且精確的偵測訊號。

發明摘述

本發明已經滿足此處在先前所說明的需求。

即使本發明享有一般引子延伸之方法的一些相關優點特徵，例如在一特定位置上測試一突變之設計上的簡單性，但是本發明提供一種克服上述引子延伸方法之相關缺點的方法。本發明具有廣泛的應用性，用於偵測並鑑定所有形式的突變。本方法在成本上是有力的，是節省時間的，並且比起習知方法較不具勞力密集。

本發明優於上述方法的一些關鍵優點是：(1) 只在一個反應試管偵測所有形式突變的能力，並且不需要進行凝膠電泳大小分離方法；(2) 經由所發出的強烈訊號所產生的高度偵測靈敏度，而這是由於將多數個標示核苷酸加入引子延伸股所致；以及(3) 高度的精準度，這是因為二個或三個不同形式的核苷酸或核苷酸類似物標記可在同一時間插入引子延伸股。這些優點特徵提供一個機會使用本發明，以根據這個簡單的發明程序例行地在任何臨床上測試基因突變的存在。本發明也無疑地適合自動化篩檢



五、發明說明 (6)

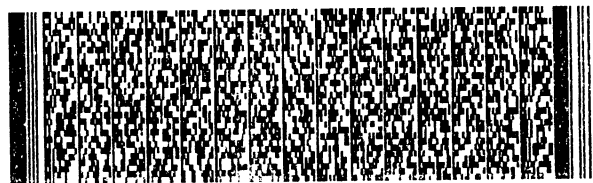
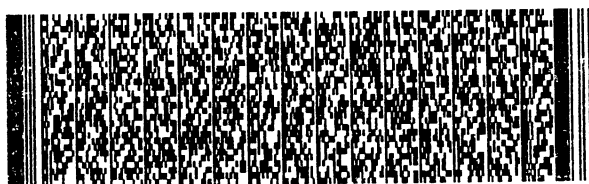
大量的樣本。

本發明是有關於在單一反應中偵測發生在一已知核酸序列中之預定核苷酸（目標鹼基）的任何突變之方法。本發明使用一引子延伸分析以偵測突變。較佳地，該引子是位在緊鄰於該預定核苷酸鹼基的位置上，而與有興趣的核酸互補或序列專一性地雜合以形成雙重體（duplex），使得在這個有興趣的核酸中的該目標鹼基是緊鄰於引子3'端下游的未配對鹼基。引子延伸反應試劑包括一種形式的未標示終結子核苷酸（或可選擇地，不包括相對應的核苷酸鹼基）以及三種形式之標示的（或可選擇地，差別性標示或未標示的）非終結子核苷酸，其中該終結子核苷酸與有興趣之核苷酸的預定位置上的目標鹼基互補。該標示的非終結子核苷酸並不與目標鹼基互補。終結子核苷酸加入互補於有興趣之核酸中的目標鹼基的引子3'端，將會不再加入任何標示的非終結子核苷酸而終止引子延伸。如果目標鹼基因為突變而發生改變，則一標示的非終結子序列會因此加入這個引子之中。因此，任何在這個引子所偵測到的標示訊號表示在該預定核酸鹼基位置上有發生突變。

本發明的目的是提供一種用於在樣本中偵測或定量一目標核酸的方法，包括：

(a) 製備一引子，該引子互補於緊接在一目標核苷酸鹼基上游的序列，而該目標核苷酸位於一有興趣的核酸模板的一預定位置；

(b) 如果該核酸是雙股的話，則處理含有這個有興



五、發明說明 (7)

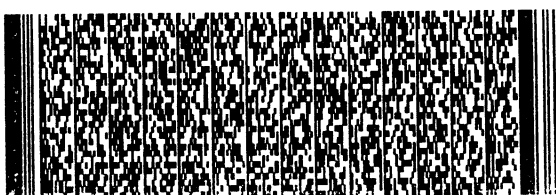
趣之核酸的樣本，以獲得跨過這個特定位置的未配對核苷酸鹼基，或是如果這個有興趣的核酸是單股的話，則直接進行步驟 (c)；

(c) 在高度嚴格的條件下黏合來自 (a) 的引子與來自 (b) 的目標核酸，以獲得一引子-核酸的雙重體，其中位於這個有興趣之核酸中的該目標核苷酸鹼基是緊接於該引子之 3' 端下游的第一個未配對鹼基；

(d) 混合來自 (c) 的引子-核酸雙重體與一引子延伸反應試劑，該試劑包括

(i) 一種形式的終結子核苷酸，或可選擇地缺少與這個有興趣之核酸的該預定位置之目標鹼基互補的核苷酸，以及 (ii) 不同於 (i) 之終結子核苷酸之三種形式的非終結子核苷酸，並且至少一種形式是可選擇地以一可偵測的標記來標示。

(e) 以酵素或化學方法進行引子延伸反應，其中該終結子核苷酸或非終結子核苷酸加入該引子的情形是取決於緊接著該引子 3' 端下游的核酸模板之未配對核苷酸鹼基的身分，並且其中該終結子核苷酸加入互補於這個有興趣之核酸中的該目標核苷酸鹼基的序列之中，會使任何標示的非終結子核苷酸不再加入該引子之中，因而終止該引子延伸，其中該引子沒有標示，並且進一步其中當這個目標核苷酸改變成任何其他形式的核苷酸時，則以該可偵測標記所標示的非終結子核苷酸的其中之一（其與突變核苷酸鹼基互補），或可選擇地不用任何標記進行標示（如果以



五、發明說明 (8)

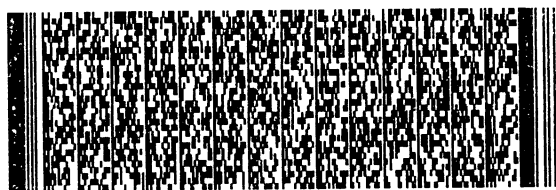
質譜儀作為偵測方法的話)，會藉由引子延伸反應而依照序列加入引子之後；以及

(f) 藉由偵測併入引子之標示的非終結子而決定在這個有興趣之核酸的該預定位置上的核苷酸鹼基之存在與身分。

在一較佳具體實施例中，在步驟(b)，有興趣的核酸鹼基是緊鄰於欲在該預定位置確定身分的該核酸鹼基，並且欲確定的核苷酸鹼基是位於緊接著該雙重體之3'端下游之一預定位置的未配對鹼基。在一較佳具體實施例中，在本方法中的步驟(d)，將來自步驟(c)中的雙重體與至少一個標示的非終結子以及至少一個未標示的終結子接觸。或者，在本方法中的步驟(d)，將來自步驟(c)中的雙重體與非終結子接觸，其中每個非終結子以相同或不同的可標示標籤進行標示。

在另一較佳具體實施例中，可實施上述方法，其中模板依賴的酵素是大腸桿菌DNA聚合酶I或其"克勒諾片段"(Klenow fragment)、T4 DNA聚合酶、T. aquaticus DNA聚合酶、反轉錄病毒之反轉錄酶或其組合物。

在其他較佳具體實施例中，本發明的核酸是一去氧核糖核酸、一核糖核酸、或去氧核糖核酸與核糖核酸的共聚物。引子是一寡去氧核糖核苷酸、一寡核糖核苷酸或去氧核糖核酸與核糖核酸的共聚物。模板是一去氧核糖核酸、引子是一寡去氧核糖核苷酸、寡核糖核苷酸、或寡去氧核糖核苷酸與寡核糖核苷酸的共聚物，並且模板依賴的酵素



五、發明說明 (9)

是DNA聚合酶。模板較佳地是一核糖核酸、引子是一寡去氧核糖核苷酸、寡核糖核苷酸、或寡去氧核糖核苷酸與寡核糖核苷酸的共聚物，並且模板依賴的酵素是反轉錄酶。較佳地，模板是一去氧核糖核酸、引子是一寡核糖核苷酸，並且酵素是RNA聚合酶。較佳地，模板是一核糖核酸、引子是一寡核糖核苷酸，並且酵素是RNA複製酶。

在上述方法的步驟(d)中，來自步驟(c)的雙重體與至少一個標示的非終結子以及至少一個不同於該非終結子之標示的終結子進行接觸。此外，在步驟(e)中，偵測所加入之標示的非終結子以及至少一個不同於該非終結子之標示的終結子的訊號。

根據本發明之方法，已經在活體內酵素地合成、在活體外酵素地合成、或非酵素地合成有興趣的核酸。在本發明之方法中的另一具體實施例中，已經在活體內酵素地合成、在活體外酵素地合成、或非酵素地合成寡核苷酸引子。此外，該寡核苷酸引子可包括一種或多種分子部份，使得引子與未加入的試劑及/或有興趣的核酸進行親和力的分離。

特別地，如同一個較佳的具體實施例所示，寡核苷酸引子包括生物素，該生物素藉由結合依附在固定支持物上的鏈黴抗生物素蛋白(streptoavidin)而使得引子與未加入的試劑及/或有興趣的核酸進行親和力的分離。在本發明之另一具體實施例中，寡核苷酸引子的序列包括一DNA序列，該DNA序列係藉由鹼基配對(base pairing)於



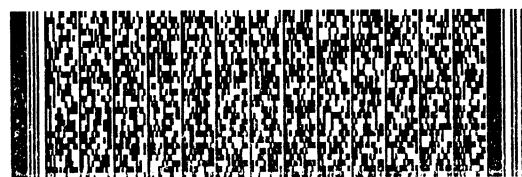
五、發明說明 (10)

依附在固定支持物上的一核酸所存在的互補序列，而使得引子與未加入的試劑及/或有興趣的核酸進行親和力的分離。在本發明之另一具體實施例中，有興趣的核酸包括一種或多種分子部份，使得該有興趣的核酸與未加入的試劑及/或引子進行親和力的分離。有興趣的核酸可包括生物素，該生物素藉由結合依附在固定支持物上的鏈黴抗生物素蛋白而使得有興趣的核酸與未加入的試劑及/或引子進行親和力的分離。

在本發明的一方法中，有興趣的核酸序列包括一DNA序列，該DNA序列藉由鹼基配對 (base pairing) 於依附在固定支持物上的一核酸所存在的互補序列，而使得該有興趣的核酸與未加入的試劑及/或引子進行親和力的分離。寡核苷酸引子可用一可偵測的標記進行標示。寡核苷酸引子可用一可偵測的標記進行標示，而這個標示是不同於任何存在於試劑中或黏附在有興趣的核酸上的任何可偵測標記。有興趣的核酸可用一可偵測的標記進行標示。有興趣的核酸較佳地是用一可偵測的標記進行標示，而該標記是不同於任何存在於試劑中或黏附在該引子上的任何可偵測標記。

在本發明的另一具體實施例中，有興趣的核酸包括非天然的核苷酸類似物。該非天然的核苷酸類似物包括去氧肌苷或7-去氮-2'-去氧鳥糞嘌呤。有興趣的核酸可藉由聚合酶連鎖反應而合成。

在本發明之另一方法中，樣本包括來自一生物體的基



五、發明說明 (11)

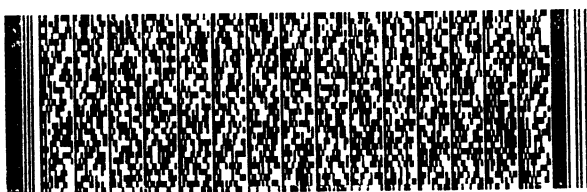
因組DNA、其RNA轉錄物或其RNA轉錄物所製備的cDNA。樣本可包括來自一生物體的基因組外DNA、其RNA轉錄物或其RNA轉錄物所製備的cDNA。在本發明之方法中，藉由使用適當的變性條件，在步驟(d)中的引子延伸反應之後，引子可較佳地從有興趣的核酸分開。較佳地，該變性條件包括熱、鹼、甲醯胺、尿素、乙二醛、酵素及其組合物。還要更佳地，該變性條件包括以0.2 N的NaOH處理。

可使用來自任何生物體的核酸而實施本發明之方法，包括植物、微生物、病毒或鳥類。生物體可以是脊椎動物或無脊椎動物。生物體較佳地是一哺乳類動物。還要更佳地，該哺乳類動物是人類。哺乳動物也可以是馬、狗、牛、貓、豬或羊。

從以下的說明、隨附的參考圖示以及附錄的申請專利範圍，將更完全地了解本發明的這些及其他目的。

圖示之簡單說明

第1A-1C圖顯示本發明之突變偵測方法的較佳具體實施例的圖示。"L"表示野生型核苷酸，其可包括A、G、C、T或U。"L*"表示一未標示的終結子，例如二去氧核苷酸，其互補於L。"M"表示在位置L上的突變，並且該突變包括A、G、C、T或U。"W"代表互補於M的核苷酸，並且包括以一可偵測的標記所標示的A、G、C、T或U。"n"代表一種或多種核苷酸或核苷酸類似物，包括A、G、C、T以及U。"y"代表一核苷酸或核苷酸類似物，包括以一可偵測的標記所標示並互補於M或n的A、G、C、T以及U。



五、發明說明 (12)

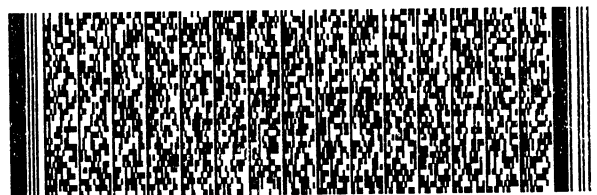
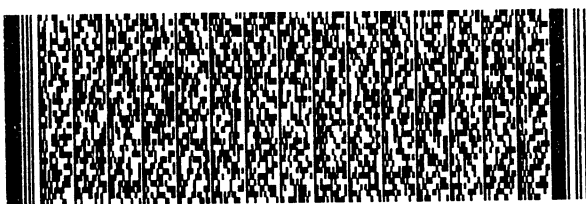
第2圖係將1微升的STA反應混合物施用於薄層色層分析條片(strip)，然後該條片用於含有1M NaCl及1M HCl的溶劑之中。接著在室溫中使該條帶乾燥10分鐘，並曝露於柯達底片30分鐘，並且藉由自動底面顯像儀使底片顯像。將使用STA測試的模板標示在每個條帶下方。上方的箭頭代表前面的自由核苷酸，並且底部的箭頭代表加入 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ 的引子延伸股。

發明詳述

如同在此處所使用的"核酸"或"核苷酸"可以是去氧核糖核酸、核糖核酸或是去氧核糖核酸以及核糖核酸的共聚物。核酸的樣本可以是天然或是合成的。核酸的樣本可以是天然發生的核酸，並且可從任何生物體中獲得。可適用本發明之方法的一些生物體的實例包括植物、微生物、病毒、鳥類、脊椎動物、哺乳類動物、人類、馬、狗、牛、貓、豬或羊。可天然地發生、或在活體內酵素地合成、在活體外酵素地合成、或非酵素地合成有興趣的核酸。

包含有興趣之核酸的樣本包括來自一生物體的基因組DNA、其RNA轉錄物或其RNA轉錄物所製備的cDNA。包含有興趣之核酸的樣本也可包括來自一生物體的基因組外DNA、其RNA轉錄物或其RNA轉錄物所製備的cDNA。此外，可藉由聚合酶連鎖反應合成有興趣的核酸。

有興趣的核酸可包括非天然的核苷酸類似物，例如去氧肌苷或7-去氮-2'-去氧鳥糞嘌呤。這些類似物使DNA雙重體不穩定，並且可以在雙股樣本中發生引子黏合以及延



五、發明說明 (13)

伸反應，而不需要完全地將兩股分開。

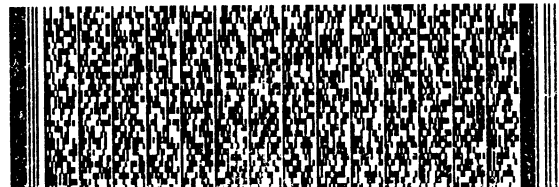
有興趣的核酸包括一種或多種分子部份，使得該有興趣的核酸與未加入的試劑及/或引子進行親和力的分離。

例如，有興趣的核酸可包括生物素，該生物素藉由結合依附在固定支持物上的抗生物素蛋白及其類似物而使得有興趣的核酸與未加入的試劑及/或引子進行親和力的分離。

有興趣的核酸序列包括一DNA序列，該DNA序列藉由鹼基配對 (base pairing) 於依附在固定支持物上的一核酸所存在的互補序列，而使得該有興趣的核酸與未加入的試劑及/或引子進行親和力的分離。有興趣的核酸可用一可偵測的標記進行標示；這個可偵測的標記是不同於任何存在於試劑中或黏附在引子上的任何可偵測標記。

在這一方面，名詞"正常核苷酸"或"正常鹼基"是定義為野生型或先前已知的標準核苷酸鹼基，從這個鹼基找到並定義一突變。"標準的核苷酸"包括任何已知的鹼基，其可能包括野生型或已知的突變鹼基，只要這個鹼基是已知的，並且需要知道它的變異體。因此，例如正常鹼基可以是一已知的野生型鹼基，在這個位置上尋找一突變。相反地，已知的鹼基可以是一已知的突變，在這個位置上尋找野生型鹼基的存在。或者，已知的正常鹼基可以是一已知的突變，而找尋另一個突變的變異體。因此，本發明之方法可適用於任何已知的序列，該方法可決定在這個位置上任何其他鹼基變異體的存在。

此處所使用的名詞"引子"或"寡核苷酸引子"是指一寡



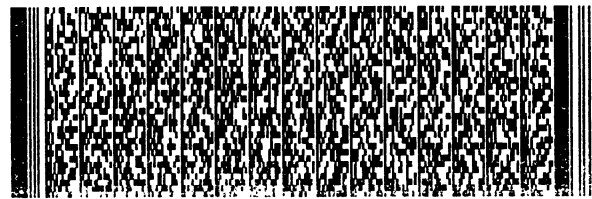
五、發明說明 (14)

核苷酸，在各種因素的存在下，例如核苷酸以及酵素，例如DNA聚合酶以及適當溫度和pH，當置於容許引子延伸產物之合成的條件下的時候，該寡核苷酸可作為合成的起始點，其中該引子延伸產物互補於一核酸股（模板）。

另外，名詞“引子”也定義為任何來源所得到的任何核酸片段。例如，可藉由將較大的核酸片段分成碎片而獲得引子，舉例而言，這些較大的核酸片段是基因體DNA、cDNA或經由PCR所獲得的DNA。換句話說，如何得到這個引子，不論是藉由天然的片段化或藉由合成而產生，並不會因此限制這個引子的本質。此外，引子可以是寡去氧核糖核苷酸、寡去氧核糖核苷酸的共聚物、寡核糖核苷酸、寡核糖核苷酸的共聚物、或是去氧核糖核苷酸和核糖核苷酸的共聚物。引子可以是天然的或是合成的。寡核苷酸引子可以在活體內或活體外以酵素的方式合成、或是在活體外以非酵素的方式合成。可用可偵測的標記對引子進行標示；這個可偵測的標記可與任何存在於試劑或附著於有興趣之核酸上的可偵測標記有所不同。此外，引子必須具備相對於周圍序列的序列，該周圍序列是位於欲確認之核苷酸鹼基的周圍或上游的有興趣的位置上。

此外，引子必須有能力與存在於有興趣之核酸中的核苷酸進行雜合或黏合。一種用於達成理想雜合的方式是擁有模板依賴的引子，而該引子實質上地互補或完全互補於已知的鹼基序列。

寡核苷酸引子可包括一種或多種分子部份，使得引子



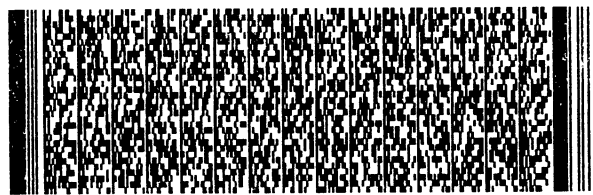
五、發明說明 (15)

與未加入的試劑及/或有興趣的核酸進行親和力的分離。該親合力分子包括，但不限於毛地黃苷 (digitoxin)、磁粒以及配體，例如蛋白質配體，包括抗體。較佳地，這個分子是生物素。在使用生物素的實例中，含有生物素的引子藉由結合依附在固定支持物上的抗生物素蛋白及其類似物，而使得引子與未加入的試劑及/或有興趣的核酸進行親和力的分離。寡核苷酸引子的序列可包括DNA序列，該DNA序列藉由鹼基配對 (base pairing) 於依附在固定支持物上的一核酸所存在的互補序列，而使得引子與未加入的試劑及/或有興趣的核酸進行親和力的分離。

在此處所使用的名詞"引子延伸反應"是指進行模板依賴的核酸合成反應之反應條件。用於發生模板依賴的引子延伸反應之條件，部份可藉由模板依賴酵素的存在而進行。一些適當的模板依賴酵素是DNA聚合酶。DNA聚合酶可以有各種形式。然而，這個DNA聚合酶必須是引子以及模板依賴的。例如，可使用大腸桿菌DNA聚合酶或是其中的"克勒諾片段"、T4 DNA聚合酶、T7 DNA聚合酶

("Sequenase")、*T. aquaticus* DNA聚合酶或反轉錄病毒之反轉錄酶或其組合物。在一些方法中可使用RNA聚合酶，例如T3或T7 RNA聚合酶。依聚合酶而定，可使用不同的條件，並且可能需要不同的溫度範圍以用於雜合以及延伸反應。

如同此處所使用的名詞"引子延伸股"包括加入引子之後，在雙重體中之模板對面所形成的股。較佳地，引子的



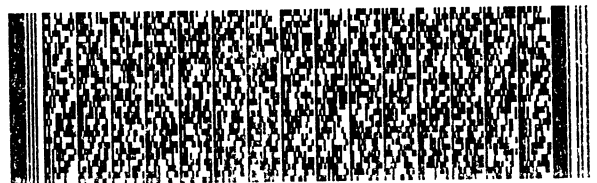
五、發明說明 (16)

延伸已經藉由結合子與模板的結合而終止。

如同此處所使用的名詞"模板"是定義為一核酸，包括雙股DNA、單股DNA以及RNA、或是其中的任何修飾，並且可以是任何長度或是序列。

如同此處所使用的名詞"終結子"或"股終結子"是指一核酸鹼基，例如A、G、C、T或U或類似物，當加入模板股對面的引子延伸股時，可有效地終止引子延伸反應。較佳地，終結子是去氧核糖核苷酸。也是較佳地是，終結子是未標示或是已標示，使得終結子可以與非終結子的標示區隔。在此處所使用的說明，當名詞"終結子"或"股終結子"被指明為單數的時候，並不是指使用單一個核苷酸分子。正確的說法是，名詞"終結子"的單數形式是指核苷酸、核酸鹼基或是在此分析方法中所使用的核酸類似物之形式。例如，如果終結子是ddA，那麼所有總計的ddA是意指為單數形式，而非僅為單一個ddA核苷酸。另外，名詞"終結子"可能是缺少特定形式的核苷酸，使得引子延伸反應因為所在地缺少特定核苷酸而終止。例如，如果想要引子延伸反應會在模板股上的"C"對面停止，則引子延伸反應混合物應該包括非終結子鹼基A、T、C，但不包括與"C"互補的"G"。因此，缺少互補鹼基將會引起引子延伸反應的終止，這與加入，例如二去氧終結子核苷酸的結果是相似的。

此處所使用的名詞"非終結子"或"非股終結子"包括一核苷酸鹼基，當加入引子延伸股的時候，該核苷酸鹼基不



五、發明說明 (17)

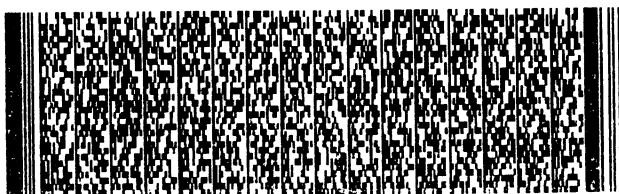
會終止引子延伸反應。較佳地，在引子延伸反應中標示至少一個非終結子。此處所使用，當名詞"非終結子"或"非股終結子"被指明為單數的時候，並不是指使用單一個核苷酸分子。正確的說法是，名詞"非終結子"的單數形式是指核苷酸、核酸鹼基或是在此分析方法中所使用的核酸類似物之形式。例如，如果終結子是G，那麼所有總計的G是指為單數形式，而非僅為單一個G核苷酸。

此處所使用的"突變 (mutant)"或"突變 (mutation)"是指模板股上任何與野生型或正常鹼基不同的鹼基。使用本發明之方法所偵測的突變根本可以是任何形式的突變，包括單一鹼基突變、插入、刪除或基因移位，只要直接位於緊接在黏合引子3'端對面的模板上的鹼基受到影響的話。

此處所使用的名詞"標示"是連接在終結子或非終結核苷酸上的任何分子，以提供一可偵測的標記。這個標示可以是具有活性、化學冷光、蛋白質配體，例如抗體，或者如果使用螢光族群的話，每個形式的非終結子核苷酸鹼基可能使用不同的螢光族群。這些螢光標籤將具有光譜可區分的發射光譜之特性。

另外，測定一核苷酸鹼基加入引子延伸產物的程度之方法可藉由質譜分析技術而測量，如同美國專利第5,885,775號所列舉的實例，其整體在此處列為參考文獻。

如同此處所使用的片語"高度嚴格的雜合條件"是指核酸雜合的條件，例如，但不限於0.1倍SSC，42℃的清洗條



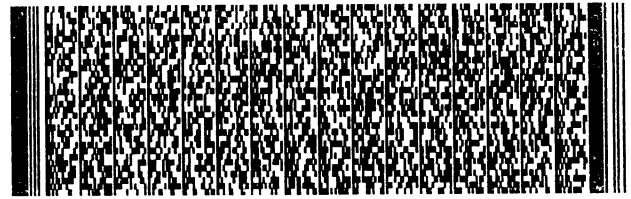
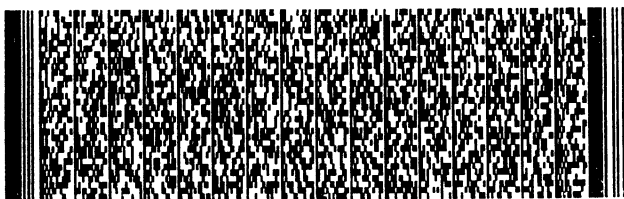
五、發明說明 (18)

件。一般可在普通的分子生物方法書本中找到雜合條件，例如Ausubel等人，Current protocols in Molecular Biology，Greene以及Wiley，出版（1994），其整體在此處列為參考資料。

在此處所使用的"薄層色層分析"可在以纖維產品為基礎的紙張媒介中進行，但也可在任何使分子細微地分開並且形成一致層次的物質所組成的媒介中進行。這個物質包括但不限於無機物質，例如矽膠、氧化鋁、矽藻土或鎂矽酸鹽。有機物質包括但不限於纖維素、多醣胺或聚乙烯粉末。薄層色層分析方法一般說明於化學方法書本中，例如一般會在以下書籍提到，就是Freifelder，Physical Biochemistry - Applications to Biochemistry and Molecular Biology，第二版，Freeman公司（1982）出版，其整體在此處列為參考文獻，特別是第8章，其討論色層分析技術，特別是229至232頁的薄層色層分析。

熟悉此技藝者將了解終結子可用不同於非終結子的標示來進行標示，這樣可以區分終結子或非終結子加入引子延伸股的情形。以缺少特定形式核苷酸作為終結子是本申請案中的實例，僅作為說明的目的，並非以任何方式作為限制申請專利範圍之用。區別性的標示或是未標示的終結子也包含在本發明的範圍之內，只要終結子上的標示與非終結子上的標示不同。

熟悉此技藝者也將了解的是，只要至少知道部份的模板序列，即可設計出引子，使得引子結合到模板股上。



五、發明說明 (19)

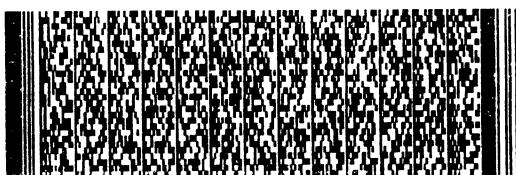
熟悉此技藝者也將了解的是本發明之方法可在一個或多個分析試管中，藉由各種引子來實施。

本發明之特徵及方法是如果非終結子被一致地標示，則可以產生強烈的訊息，這是因為加成性訊號效應的關係，這種效應是藉由加入數個標示的非終結子而產生，其中當預定位置具有一突變的時候，該非終結子加入引子延伸股之中。這產生優於習知突變方法的訊號強度，該習知方法在每個引子延伸股中僅加入單一標示。當使用專一於各種終結子或非終結子之不同標示所觀察到的訊號時，可提升精確度。

以下實施例是用以說明，而非限制本發明。

實施例1

選擇人類APC基因序列作為本發明之STA測試的目標序列。合成相對應於野生型APC序列4317-4347的寡核苷酸以及三種不同形式的突變，並用來作為模板。將這個STA測試所實施的引子列於表一。

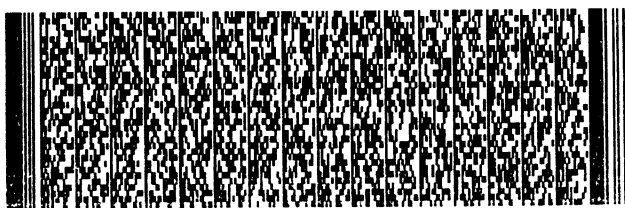


五、發明說明 (20)

表一

名稱	序列	說明
Oapc-w	5'CCTGGA C AACCATGCCACCAAGCAGAAGTA (序列辨識編號1)	野生型
Oapc-p	5'CCTGGA t AACCATGCCACCAAGCAGAAGTA (序列辨識編號2)	點突變
Oapc-l	5'CCTGGA tgt AACCATGCCACCAAGCAGAAGTA (序列辨識編號3)	插入型突變
Oapc-d	5'CCTGGA.....AACCATGCCACCAAGCAGAAGTA (序列辨識編號4)	刪除型突變
STA 引子		
STA0902	TTGGTACGGTGGTTCGTCTT5' (序列辨識編號5)	

STA：每個STA反應是在20微升的緩衝液（10 mM的Tris-HCl, pH 7.5, 50 mM的KCl, 以及5 mM的MgCl₂）中進行，其包含50ng的模板寡核苷酸、1 μM的引子、2個單位的DNA聚合酶、1微升的α-[³²P]標示的dCTP（250微居禮/毫升，3000居禮/毫莫耳之杜邦新英格蘭核子）、dATP、dTTP以及1微升未標示的ddGTP。將這個混合液在37°C培養30分鐘，並在100°C加熱3分鐘。將1微升的反應混合液加入TI條片，這是薄層色層分析（TRIM USA, MD）的條片。用含有1M HCl以及1M NaCl的溶液延展這個條片。藉由這個程序，引子完全與TI條片上的未加入核苷酸分離。藉由



五、發明說明 (21)

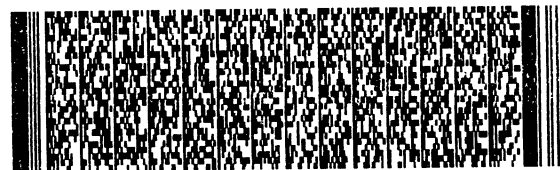
自動顯影可觀看到標示的引子，並且藉由閃爍計數器 (Beckman LS 5000) 計數輻射活性。圖2顯示自動顯影圖，並且在表二顯示計數相對應的自動顯影圖之結果。

表二

模板	總計數量	標示的引子
無模板	76,675	95
Oapc-w	79,599	117
Oapc-p	82,584	4,821
Oapc-i	75,376	8,602
Oapc-d	100,634	6,571

在表二所顯示的計數中，右欄代表加入引子延伸 Oapc-w 的 [α - ^{32}P]dCTP 量，其中 Oapc-w 是野生型寡核苷酸，用來作為模板。在引子黏合之後的第一個未配對核苷酸是 C，而 C 是互補於終結子 ddG。當模板依賴的引子延伸開始的時候，終結子 ddG 很快地加入引子的 3' 端，以作為第一個延伸出來的核苷酸，並且這個結合的 ddG 會阻止進一步加入標示的核苷酸。結果是引子僅僅延伸出一個核苷酸鹼基，也就是終結子核苷酸。既然終結子結合之後，其它核苷酸鹼基就不可能結合至模板，所以引子延伸反應就停止下來。Oapc-w 樣本的輻射活性計數顯示其與不含任何模板的樣本（也就是背景對照組）是相似的。

相較之下，Oapc-p 是具有一點突變的寡核苷酸。這個



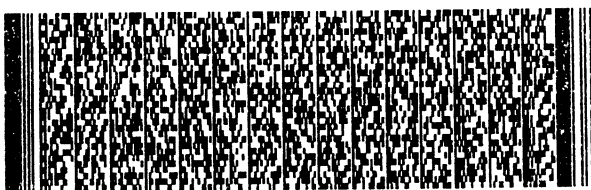
五、發明說明 (22)

模板的產生是在野生型模板的3'端之第一個未配對核苷酸的位置上，將野生型的C取代成T。在這個情形中，當引子延伸反應開始的時候，由dATP（而非終結子ddG）互補於突變的核苷酸T。在終結子ddG加入模板股之C殘基對面的位置時，則引子延伸反應終止。

在具有插入型突變的突變寡核苷酸中，表一及表二中的Oapc-1，其第一個未配對的核苷酸是T，其並不會與ddG終結子互補。在這個情形之中，引子會藉由在引子延伸股對面結合dATP而延伸，接著藉由加入 α -[³²P] dCTP、dATP、二個 α -[³²P] dCTP以及dATP延長。由核苷酸聚合酶第一次遇到C而依序加入的ddG會終止延長過程。最後的結果是有三個 α -[³²P] dCTP加入引子延伸股。

如同這個插入型突變所示，使用具有發明性的STA試劑及方法進行寡核苷酸刪除型突變，Oapc-d（表一及表二）的分析。藉由順序地加入二個 α -[³²P] dCTP、dATP而延長，並以ddG終止。因此，會有二個 α -[³²P] dCTP加入引子延伸股。這些結果提供此具有發明性的STA方法可偵測所有形式之突變的強烈證據。

特別是在刪除以及插入型突變（Oapc-I以及Oapc-d），其中有多個標示的核苷酸加入引子延伸股。這些多個標示大大地提升偵測的靈敏度。此外，可藉由使用具有相同偵測標記的不同核苷酸而進一步增加該測試的靈敏度，例如在延伸引子的時候，加入 α -[³²P] -CTP、 α -[³²P] -ATP、 α -[³²P] -TTP。



五、發明說明 (23)

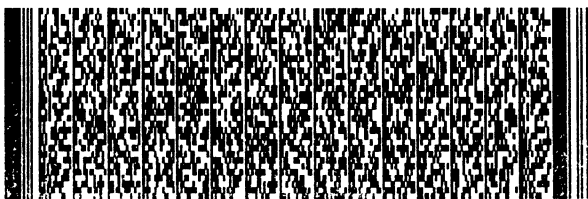
多數的標示也提供使用不同可偵測的標記對非終結子核苷酸進行標示的機會、以區別每個非終結子鹼基。例如，可用不同的螢光染劑標示核苷酸，然後帶著不同的螢光標示而延伸。同時偵測不同的訊號將會增加STA測試的精準度。具發明性的SAT試劑以及方法相關的這些先進的多數標示特徵提供優於習知技術方法中之更高的偵測靈敏度以及精準度。

實施例2

使用人類APC基因的PCR產物作為測試樣本。APC基因的片段藉由標準的PCR方法由PCR放大。使用人類APC cDNA作為一模板。用於PCR的引子列於表三。

表三

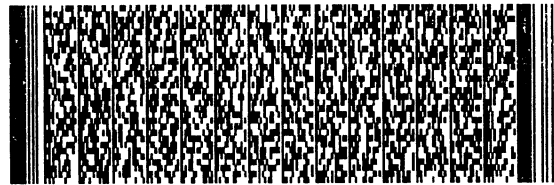
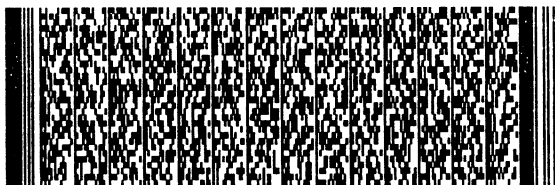
引子	方向	說明
5'TCCACCTGAACACTATGTTC (序列辨識編號6)	正向	野生型
5'AGGTGGTGGAGGTGTTTTACTTCTGCTTGGCGGC A (序列辨識編號7)	反向	野生型
5'AGGTGGTGGAGGTGTTTTACTTCaGCTTGGCGGC A (序列辨識編號8)	反向	點突變T至A
5'AGGTGGTGGAGGTGTTTTACTTCgcaGCTTGGCGG CA (序列辨識編號9)	反向	插入型突變 GCA
5'AGGTGGTGGAGGTGTTTTACTTC.....GGCG GCATGGT (序列辨識編號10)	反向	刪除型突變 TGCTT



五、發明說明 (24)

藉由引子的組合而產生四個不同的PCR產物，大小大約200 bp。它們是APC-w：野生型；APC-p：具有一點突變；APC-i：具有一插入型突變以及APC-d：具有一刪除型突變。將PCR產物施用於1%的洋菜凝膠，以去除模板以及自由的核苷酸。接著用Qiax DNA純化套組試劑 (Qiagen) 純化產物。STA引子設計為

5'-AGGTGGTGGAGGTGTTTTACTTA-3' (序列辨識編號：11) 並且在總體積20微升的緩衝液中進行STA反應，其中該緩衝液包含10 mM的Tris-HCl，pH 8.3，50 mM的KCl，2 mM的MgCl₂，0.05 pmol的雙股PCR產物，5 pmol的引子，20 μM的dATP、dGTP，1微居禮的α-[³²P]-標示的CTP，20 μM之未標示的二去氧TTP以及2單位的Taq DNA聚合酶。在熱循環儀 (Perkin Elmer, geneAmp 9600) 進行20次94°C 20秒、55°C 1分鐘的循環。將1微升的STA產物施用於Trim Strip，這是日本TRIM公司製造的薄層色層分析條片，並且如實施例1所述進行輻射活性的計數。結果顯示於表四。



五、發明說明 (25)

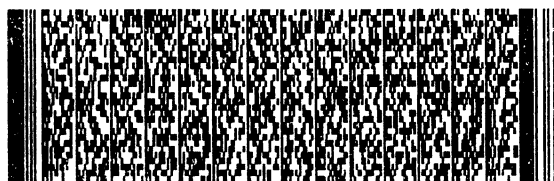
表四

	總計數	標示的引子
沒有模板	182,245	343
Papc-w	208,271	595
Papc-p	197,494	5,568
Papc-i	176,984	10,372
Papc-d	195,570	12,010

所有形式之突變樣本的引子已經用 α - $[^{32}\text{P}]$ -dCTP 延伸。加入標示的引子延伸所產生的訊號強度與引子延伸股攜帶的標示的核苷酸具有良好的相關性。

實施例3

具發明性的STA試劑以及方法施用於人類APC基因的RNA片段。將實施例2之人類APC基因的PCR產物黏結進入TA選殖載體3.1 (TA選殖套組試劑, Invitrogen)。建構四種載體, 並將它們列於表五。



五、發明說明 (26)

表五

載體	插入物	說明	RNA 產物的名稱
Tapc-w	APC-w	野生型	Rapc-w
Tapc-p	APC-p	點突變	Rapc-p
Tapc-I	APC-i	插入型突變	Rapc-I
Tapc-d	APC-d	刪除型突變	Rapc-d

使用活體外RNA合成套組試劑 (Promega, WI) 合成對應於每個載體的RNA品種。在含有2 ug載體及T7聚合酶的緩衝液中，以37°C進行一小時，以合成RNA。藉由加入LiCl以及100%的酒精而終止反應。在-20°C培養5分鐘之後，藉由14,000 g離心15分鐘而沈澱RNA，並且用不含RNase的水重新懸浮純化的RNA。將5微克的RNA與實施例2中的STA引子混合，其總體積為10微升的緩衝液，其包含10 mM的Tris-HCl pH 7.6，50 mM的NaCl以及10 mM的KCL。將混合物在65°C進行加熱變性3分鐘，接著在冰上冷卻2分鐘。如實施例1所示進行STA反應，緩衝液包含1微升的 α -[³²P] 標示的dCTP (250微居禮/毫升、3000居禮/毫莫耳之杜邦新英格蘭核子)、10 μ M的dATP、dGTP以及10 μ M之未標示的ddTTP、以及20單位的反轉錄酶。在40°C培養15分鐘之後，藉由100°C加熱2分鐘而終止反應。將1微升的反應產物施用於Trim條片，並且如實施例1所示計數輻射活性。結果顯示在表六。



五、發明說明 (27)

表六

樣本	總計數	標示的引子
沒有模板	167,496	690
Rapc-w	172,734	435
Rapc-p	166,979	1,745
Rapc-i	170,801	7,348
Rapc-d	174,888	7,360

上述所有步驟牽涉已經或考慮可以自動化的化學、運作以及方法。因此，將本發明之實施的較佳模式加入適當程式化機械工作站的運作，對於根據偵測特定核苷酸序列或衍生自生物性樣本之核酸中的序列差異所進行的幾乎任何診斷程序而言，應該會導致顯著的成節省以及產量的增加。

所有此處所列的參考資料完整地作為參考資料。



891-354

野生型 1

AGTCGTACGLLCTGA 5'
5' TCAGCATGCL*
引子 →

野生型 2

AGTCGTACGLnnnnLCTGA 5'
5' TCAGCATGCL*
引子 →

第 1A 圖

點突變 1

AGTCGTACGMLCTGA 5'
5' TCAGCATGC yL*
引子 →

點突變 2

AGTCGTACGMnnnnLCTGA 5'
5' TCAGCATGC y yyyyL*
引子 →

第 1B 圖

插入突變

AGTCGTACGMnnnLCTGA 5'
5' TCAGCATGC yyyyL*
引子 →

刪除突變

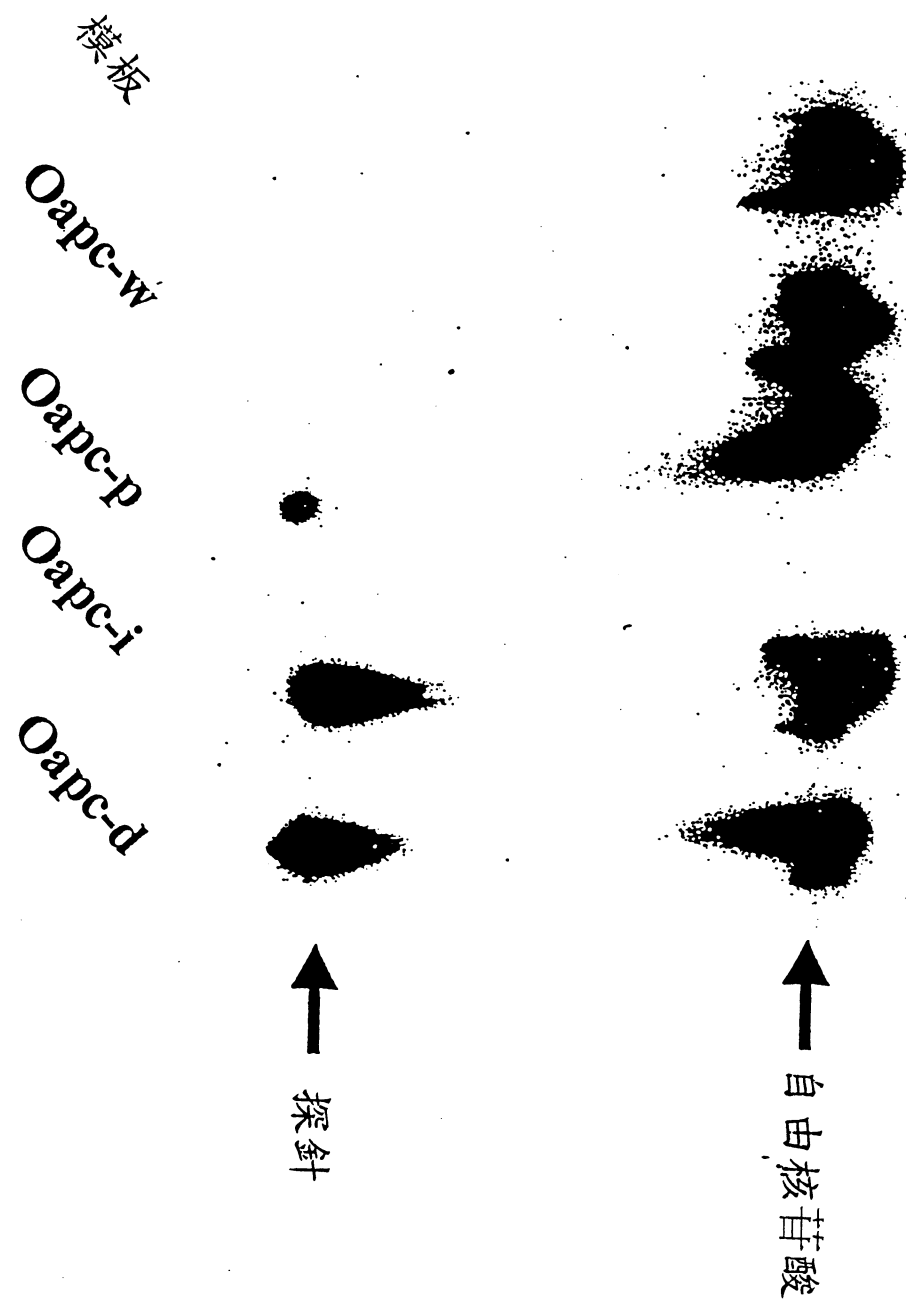
AGTCGTACGMnnnLnnnn 5'
5' TCAGCATGC y yyL*
引子 →

移位突變

AGTCGTACGMnnnLnnn 5'
5' TCAGCATGC y yyL*
引子 →

第 1C 圖

第2圖



94年6月28日

修正頁

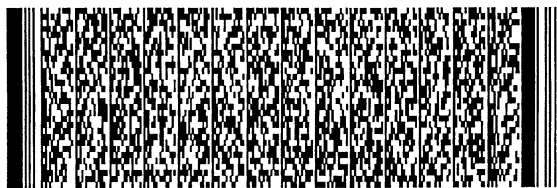
I252254

申請日期： 89.11.8	案號： 89123547
類別： C12Q 1/68	

(以上各欄由本局填註)

發明專利說明書

一、 發明名稱	中文	利用飄移末端分析來偵測核酸序列變化之方法
	英文	Detection of Sequence Variation of Nucleic Acid By Shifted Termination Analysis
二、 發明人	姓名 (中文)	1. 王小兵
	姓名 (英文)	1. Xiao Bing WANG
	國籍	1. 中國
	住、居所	1. 美國馬里蘭州21093路德鎮摩而灣道1315號
三、 申請人	姓名 (名稱) (中文)	1. 森澤紳勝
	姓名 (名稱) (英文)	1. Shinkatsu MORISAWA
	國籍	1. 日本
	住、居所 (事務所)	1. 日本國大阪府大阪市北區大淀中1-8-34
	代表人 姓名 (中文)	1.
代表人 姓名 (英文)	1.	

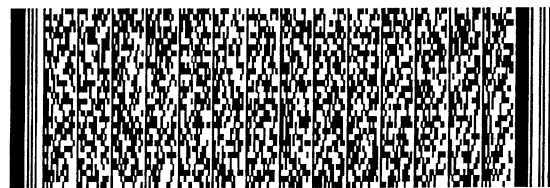


四、中文發明摘要 (發明之名稱：利用飄移末端分析來偵測核酸序列變化之方法)

本發明是有關於偵測發生在已知核酸序列之預定位置上的任何突變之方法。本發明使用引子延伸分析以偵測突變。在引子延伸反應中，提供未標示的終結子以及標示的非終結子，以偵測是否模板股上在緊接於引子3'端之核酸鹼基對面的第一個核酸鹼基是突變。在引子延伸反應中，終結子是互補於模板上緊接於引子3'端之野生型核酸鹼基。非終結子是其他的核苷酸，並且是標示的。當終結子加入引子延伸股的時候，引子延伸反應便終止。將標示的非終結子加入引子延伸股表示在預定的核酸鹼基位置上有發生突變。

英文發明摘要 (發明之名稱：Detection of Sequence Variation of Nucleic Acid By Shifted Termination Analysis)

The invention relates to a method for detecting any mutation at a predetermined site occurring in a known nucleic acid sequence. The method uses primer extension analysis to detect the mutation. Unlabeled terminator is supplied along with labeled non-terminator in the primer extension reaction to detect whether the first nucleic acid base on the template strand that is directly opposite the nucleic acid base immediately 3' to a primer is a mutant. In the primer extension reaction, the



四、中文發明摘要 (發明之名稱：利用飄移末端分析來偵測核酸序列變化之方法)

英文發明摘要 (發明之名稱：Detection of Sequence Variation of Nucleic Acid By Shifted Termination Analysis)

terminator is complementary to the wild-type base on the template strand that is directly opposite the nucleic acid base immediately 3' to the primer. Non-terminators are the other nucleotides and are labeled. When the terminator is incorporated into the primer extension strand, primer extension reaction terminates. Incorporation of a labeled non-terminator in the primer extension strand indicates that a mutation has occurred at the predetermined nucleic acid base site.



六、申請專利範圍

1. 一種偵測樣本中目標的已知核酸存在之方法，係偵測一引子延伸反應之產物中複數個標示核苷酸之訊息，包括

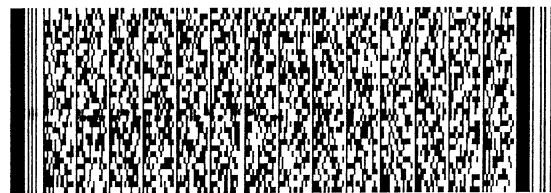
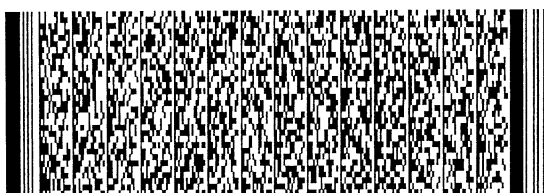
(a) 選擇一核酸，其具有一目標核苷酸鹼基，該目標核苷酸鹼基位於具有一有興趣之核酸的一模板上的一預定位置，其中該目標核苷酸鹼基係一已知突變的核苷酸鹼基或一已知野生型核苷酸鹼基；

(b) 製備一未標示之引子，互補於緊接在該目標核苷酸鹼基上游之序列；

(c) 若該核酸為雙股，則處理含有該有興趣之核酸的一樣本，以致於獲得跨過該預定位置之未配對的核苷酸鹼基，或若該有興趣的核酸為單股，則直接進行步驟(d)；

(d) 將來自(b)的引子與來自(c)之有興趣的核酸黏合，以獲得一引子-核酸雙重體，其中該有興趣之核酸中的該目標核苷酸鹼基是緊接在該引子之3'端下游的第一個未配對鹼基；

(e) 將來自(d)的該引子-核酸雙重體與一引子延伸反應試劑混合，其中該試劑包括：(i)三種形式的非終結子核苷酸，其與已知野生型目標核苷酸未互補配對，其中至少一種形式之非終結子核苷酸是以一可偵測的標記進行標示，其中該可偵測的標記包括酵素、輻射活性同位素、螢光分子或蛋白質配體；以及選擇性地(ii)一種形式的終結子核苷酸，其互補於已知野生型目標核苷酸，其中該終結子核苷酸係未標示；



六、申請專利範圍

(f) 藉由酵素或是化學的方法進行該引子延伸反應，以形成一標示引子延伸產物，該產物包括複數個標識之非終結子核苷酸，其中當目標核苷酸鹼基係野生型時不會形成標示引子延伸產物，其中該酵素包括DNA聚合酶、RNA聚合酶或反轉錄酶；以及

(g) 藉由偵測標示引子延伸產物之存在決定該有興趣之核酸中的該預定位置上之突變目標核苷酸的存在，其中偵測標示引子延伸產物不是基於大小。

2. 如申請專利範圍第1項所述之方法，其中該引子是一段去氧核糖核酸或核糖核酸、寡去氧核糖核苷酸、寡核糖核苷酸或去氧核糖核酸以及核糖核酸之共聚物。

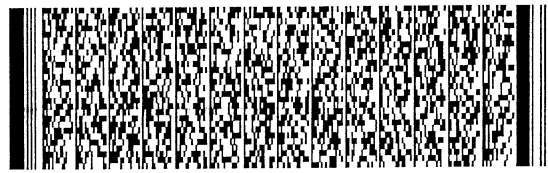
3. 如申請專利範圍第1項所述之方法，其中該有興趣之核苷酸是去氧核糖核酸、核糖核酸或去氧核糖核酸以及核糖核酸之共聚物。

4. 如申請專利範圍第1項所述之方法，其中該目標核苷酸是定義為任何已知的鹼基，其包括野生型或一已知突變鹼基，只要該鹼基是已知的並且想要知道其變體。

5. 如申請專利範圍第1項所述之方法，其中該終結子核苷酸是二去氧核糖核苷酸或其類似物，並且該非終結子核苷酸是去氧核糖核苷酸或核糖核苷酸或其類似物。

6. 如申請專利範圍第1項所述之方法，其中該終結子核苷酸是未標示的。

7. 如申請專利範圍第1項所述之方法，其中該終結子核苷酸以一可偵測的標記進行標示，其中該標記不同於非



六、申請專利範圍

終結子上的標記。

8. 如申請專利範圍第1項所述之方法，其中在步驟(d)中，來自步驟(c)的該雙重體與非終結子核苷酸接觸，其中每個非終結子以相同或不同的可偵測標記進行標示。

9. 如申請專利範圍第1項所述之方法，其中該DNA聚合酶是大腸桿菌DNA聚合酶或其"克勒諾片段"(Klenow fragment)、T4 DNA聚合酶、T7 DNA聚合酶或T. aquaticus DNA聚合酶。

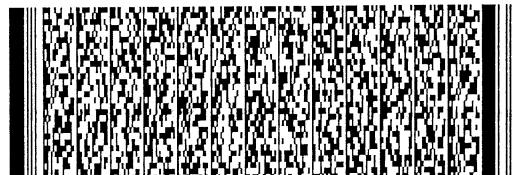
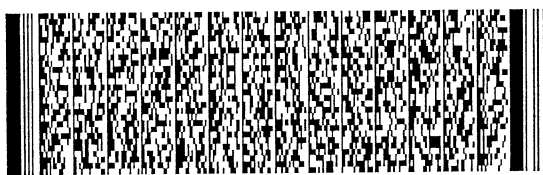
10. 如申請專利範圍第1項所述之方法，其中該引子包括一個或多個特殊構造(moiety)，而該特殊構造容許該引子與未加入試劑及/或該有興趣的核酸產生親和力的分離。

11. 如申請專利範圍第1項所述之方法，其中該引子包括一個或多個部分，其容許將該引子結合至一固體表面。

12. 如申請專利範圍第10項所述之方法，其中該特殊構造包括生物素或毛地黃苷。

13. 如申請專利範圍第11項所述之方法，其中該特殊構造包括生物素或毛地黃苷。

14. 如申請專利範圍第10項所述之方法，其中該特殊構造包括一DNA或RNA序列，其容許藉由鹼基配對於依附在一固定支持物上的一核酸所存在的一互補序列，而使得該引子與該未加入的試劑及/或該有興趣的核酸產生親和力的分離。



六、申請專利範圍

15. 如申請專利範圍第11項所述之方法，其中該特殊構造包括一DNA或RNA序列，其容許藉由鹼基配對於依附在一固定支持物上的一核酸所存在的一互補序列，而使得該引子與該未加入的試劑及/或該有興趣的核酸產生親和力的分離。

16. 如申請專利範圍第10項所述之方法，其中該特殊構造包括一DNA或RNA序列，其容許藉由鹼基配對於依附在一固定支持物上的一互補序列，而使得該引子連接至一固體支持物。

17. 如申請專利範圍第11項所述之方法，其中該特殊構造包括一DNA或RNA序列，其容許藉由鹼基配對於依附在一固定支持物上的一互補序列，而使得該引子連接至一固體支持物。

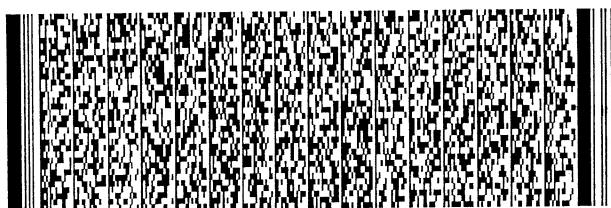
18. 如申請專利範圍第1項所述之方法，其中該有興趣的核酸已經在活體內、活體外以酵素的方式合成，或以非酵素的方式合成。

19. 如申請專利範圍第1項所述之方法，其中該有興趣的核酸是藉由聚合酶連鎖反應而合成。

20. 如申請專利範圍第1項所述之方法，其中該有興趣的核酸包括非天然的核苷酸類似物。

21. 如申請專利範圍第20項所述之方法，其中該非天然的核苷酸類似物包括去氧肌苷或7-去氮-2'-去氧鳥糞嘌呤。

22. 如申請專利範圍第1項所述之方法，其中該樣本包



六、申請專利範圍

括來自一生物體的基因組DNA、其RNA轉錄物或來自其RNA轉錄物所製備的cDNA。

23. 如申請專利範圍第1項所述之方法，其中該樣本包括來自一生物體的基因組外DNA、其RNA轉錄物或其RNA轉錄物所製備的cDNA。

24. 如申請專利範圍第22項所述之方法，其中該生物體是一植物、微生物、細菌或病毒。

25. 如申請專利範圍第23項所述之方法，其中該生物體是一植物、微生物、細菌或病毒。

26. 如申請專利範圍第22項所述之方法，其中該生物體是一脊椎動物或非脊椎動物。

27. 如申請專利範圍第23項所述之方法，其中該生物體是一脊椎動物或非脊椎動物。

28. 如申請專利範圍第22項所述之方法，其中該生物體是哺乳動物。

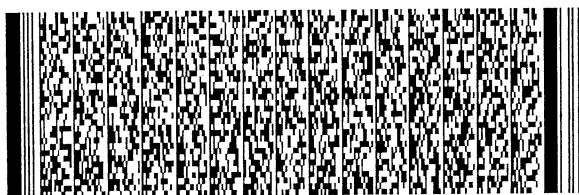
29. 如申請專利範圍第23項所述之方法，其中該生物體是哺乳動物。

30. 如申請專利範圍第22項所述之方法，其中該生物體是人類。

31. 如申請專利範圍第23項所述之方法，其中該生物體是人類。

32. 一種偵測已知的核酸存在之方法，包括：

提供一核酸，其具有一已知野生型目標核苷酸鹼基或一已知突變目標核苷酸鹼基，其位於一預定位置；



六、申請專利範圍

將一引子黏合至該核酸緊接在該預定位置3'端；

藉由酵素或是化學的方法將該引子於一延伸反應進行延伸以形成一引子延伸產物，使用包括非終結子核苷酸之反應混合物，其中該酵素包括DNA聚合酶、RNA聚合酶或反轉錄酶；其中至少一種非終結子核苷酸是互補於該突變目標核苷酸鹼基且至少一非終結子核苷酸係以一可偵測的標記進行標示，其中該可偵測的標記包括酵素、輻射活性同位素、螢光分子或蛋白質配體；以及其中當目標核苷酸鹼基係野生型時不會形成標示引子延伸產物；

偵測標示引子延伸產物之存在；以及

使標示引子延伸產物之存在與該核酸中突變目標核苷酸鹼基之存在相關聯。

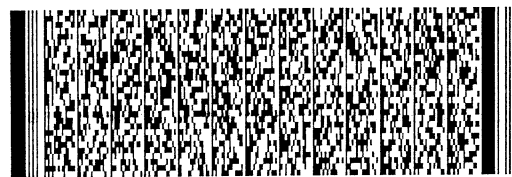
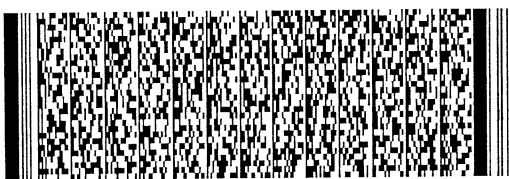
33. 一種偵測已知的核酸中突變核苷酸存在之方法，

包括：

提供一核酸，其具有一已知野生型目標核苷酸鹼基或一已知突變目標核苷酸鹼基，其位於一預定位置；

將一引子黏合至該核酸緊接在該預定位置3'端；

藉由酵素或是化學的方法該引子於一延伸反應進行延伸以形成一標示引子延伸產物，使用包括非終結子核苷酸之反應混合物，其中該酵素包括DNA聚合酶、RNA聚合酶或反轉錄酶；其中非終結子核苷酸不會互補於該已知野生型目標核苷酸鹼基且至少一非終結子核苷酸係以一可偵測的標記進行標示，其中該可偵測的標記包括酵素、輻射活性同位素、螢光分子或蛋白質配體；以及其中當目標核苷酸



六、申請專利範圍

鹼基係野生型時不會形成標示引子延伸產物；

偵測標示引子延伸產物之存在，其中偵測該標示引子延伸產物之存在不是基於標示延伸產物之大小，且其中偵測到一標示引子延伸產物代表該核酸中存在有一突變核苷酸。

34. 一種偵測樣本中目標的已知核酸存在之方法，係偵測一引子延伸反應之產物中複數個標示核苷酸之訊息，包括：

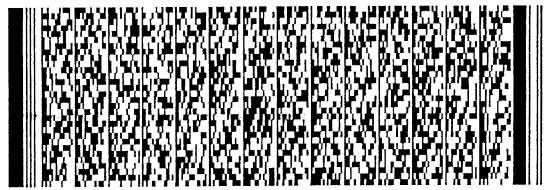
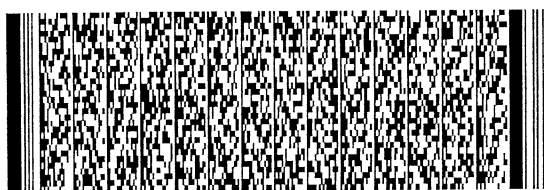
(a) 選擇一核酸，其具有一目標核苷酸鹼基，該目標核苷酸鹼基位於具有一有興趣之核酸的一模板上的一預定位置，其中該目標核苷酸鹼基係一已知突變的核苷酸鹼基或一已知野生型核苷酸鹼基；

(b) 製備一未標示之引子，互補於緊接在該目標核苷酸鹼基上游之序列；

(c) 若該核酸為雙股，則處理含有該有興趣之核酸的一樣本，以致於獲得跨過該預定位置之未配對的核苷酸鹼基，或若該有興趣的核酸為單股，則直接進行步驟(d)；

(d) 將來自(b)的引子與來自(c)之有興趣的核酸黏合，以獲得一引子-核酸雙重體，其中該有興趣之核酸中的該目標核苷酸鹼基是緊接在該引子之3'端下游的第一個未配對鹼基；

(e) 將來自(d)的該引子-核酸雙重體與一引子延伸反應試劑混合，其中該試劑包括：(i) 至少一種形式之非終結子核苷酸，其與已知突變目標核苷酸鹼基未互補配對，



六、申請專利範圍

其中至少一種形式之非終結子核苷酸是以一可偵測的標記進行標示，其中該可偵測的標記包括酵素、輻射活性同位素、螢光分子或蛋白質配體；以及選擇性地(ii)一種形式的終結子核苷酸，其互補於已知突變目標核苷酸，其中該終結子核苷酸鹼基係未標示；

(f)藉由酵素或是化學的方法進行該引子延伸反應，以形成一標示引子延伸產物，該產物包括複數個標識之非終結子核苷酸，其中當目標核苷酸鹼基係突變時不會形成標示引子延伸產物，其中該酵素包括DNA聚合酶、RNA聚合酶或反轉錄酶；以及

(g)藉由偵測引子延伸產物中標示核苷酸之存在決定該有興趣之核酸中的該預定位置上之野生型目標核苷酸的存在，從而偵測目標的已知核酸的存在，其中偵測標示引子延伸產物不是基於大小。

