

五、發明說明(1)

本發明係有關一種利用聚胺與核酸靜電結合的性質之偵測核酸方法。

以往，偵測核酸的方法係廣為使用溴化乙錠 (ethidium Bromide) 的方法。該方法係使溴化乙錠複合於核酸 (插入法, intercalation)，再藉由彼時所產生的螢光測知核酸位置的方法。不過，由於使用該方法時無法於亮光處確認螢光，必須在暗處紫外線照射下予以攝影，再將所攝得的影像與視物比較，才能確知核酸的位置，極為不便。此外，由於溴化乙錠具有很強的致癌性 (例如，「遺傳基因操作手冊」(講談社サイエンティフィック (scientific)) 第2頁18～21行)，於處理時極為危險。其他方法如使用陰離子性金膠體的方法及使用陽離子性卡可基酸鐵膠體的方法 (Gene Anal. Techn., 1986年, 1～5頁) 係為已知。不過，此等方法之靈敏度極差，且藉由金膠體的方法中由於背景經染色不易識別，有染色後之雜交作用受影響的缺點；而藉由鐵膠體的方法中，則有雜交後無法被染色的缺點。因此，對於開發沒有上述缺點，且容易、安全、確實、簡便的偵測核酸之方法極為企求。

聚胺可與DNA結合，且具有對RNA之親和性係為已知 (Biochemical Journal, 103卷, 811—815頁 (1967)；Journal of Molecular Biology, 24卷, 113—122頁 (1967)；Journal of Molecular Biology, 42卷, 363—373頁 (1969)

五、發明說明(2)

) ; Journal of Molecular Biology, 121 卷, 327
- 337 頁 (1978) 等)。此外, 與以聚胺所修飾之
蛋白質互補的核酸共有結合而成的探針 (probe), 偵測標
記聚核酸的方法係為已知 (日本特表昭
60-501488 號, 及其公告公報的日本特公平
2-59720 號與其分割申請案日本特開平
1-124400 號)。不過, 藉由使標記後之聚胺複合
於核酸的偵測核酸方法係不為所知的技術。

本發明係提供

- (1) 一種偵測核酸的方法, 其特徵為在使懷疑結合有或
含有核酸的固相載體, 與結合有測定時可能產生信
號之標記或彼之前驅體的聚胺接觸, 在核酸與聚胺
之間形成複合物; 使用前驅體時其標記會有所不同
, 並且必須除去反應前或反應後沒有形成複合物之
聚胺, 然後, 偵測標記者。
- (2) 一種區別標的核酸及其他核酸的偵測方法, 其特徵
為可以任意順序實施下述之處理步驟, 使懷疑結合
有或含有核酸的固相載體,
 - ① 在雜交化條件下, 與結合有測定時可能產生信號
之標記或彼之前驅體的標的核酸雜交而得的探針
接觸, 形成雜種; 使用前驅體時其標記會有所不
同, 並且必須去除反應前或反應後沒有形成雜種
的探針, 然後, 偵測標記的方法係為第 1 偵測處
理,

五、發明說明(3)

②與結合有測定時可能產生信號之標記或彼之前驅體的聚胺接觸，在核酸與聚胺之間形成複合物；使用前驅體時其標記會有所不同，並且必須去除反應前或反應後沒有形成複合物之聚胺，然後，偵測標記的方法係為第2偵測處理，以及

(3)一種偵測核酸用套組，其特徵為含有

(a)以酵素標記之聚胺

(b)藉由酵素產生信號之發色原體。

本發明所使用之用語如下述之說明。

〔核酸〕係為以嘌呤或嘧啶鹼，戊糖及磷酸結合而成之核酸為基本單位，藉由磷酸的酯類結合，聚合成聚合物。上述之鹼係包含腺嘌呤、胞嘧啶、鳥嘌呤、胸腺嘧啶、尿嘧啶及此等之修飾鹼。而且，由於核酸中糖的部份不同係有DNA與RNA，並有1支鏈、2支鏈等以及立體構造等。

〔固體載體〕係包含分離或偵測核酸所使用之薄板、片板、條板、厚板、薄膜、隔膜等。典型者有瓊脂糖膠、耐龍膜、濾紙、硝基纖維素膜等。

〔標記〕係為測定時可能產生信號之物質。包含酵素（與基質組合而成）、自旋化合物、放射性核素（nuclide）、螢光物質、化學發光物質、吸光物質等。較佳之標記為酵素。酵素係包含有過氧化物酵素、 β -半乳糖苷酵素、葡萄糖氧化酵素、鹼性磷酸酵素、葡萄糖-6-磷酸脫氫酵素等。酵素活性的測定方法有吸光度法、螢光法及化學

五、發明說明(4)

發光法。例如，過氧化物酵素使用如做為發色原體之 2，2'-聯氨基二(3-乙基噻唑啉)-6'-磺酸(ABTS)的基質，以吸光度法測定所產生的色素。由於葡萄糖氧化酵素係以葡萄糖為基質生成過氧化氫，與過氧化物酵素共軛作用，以上述同法予以測定。 β -半乳糖苷酵素係以正-硝基苯基- β -D-半乳糖苷為基質，予以測定。螢光法例如過氧化物酵素以對-羥基苯基丙酸作為基質， β -半乳糖苷酵素以螢光素- β -D-半乳糖苷酵素做為基質，且磷酸酵素以甲基蠟形基磷酸或溴基氫基吡啶基亞磷酸/硝基藍四唑鎢為基質予以測定。化學發光法，例如過氧化物酵素以魯米諾與過氧化氫做為基質予以測定。標記(例如酵素)與聚胺結合時，例如使用苯醌、雙[2-(琥珀醯亞胺羰基氧)乙基]碲(BS0COES)、雙[磺基琥珀醯亞胺基]辛二酸酯(BS3)、1,2-二氟基-2,4-二硝基苯(DFDNB)、4,4'-二異氰硫基-2,2'-二磺基-1,2-二苯乙烯(stilbene)、二鈉鹽(CDIDS)、己二醯二亞胺酸二甲基、二鹽酸鹽、N-(γ -馬來醯亞胺丁氧基)琥珀醯亞胺(GMBS)、N-(4-偶氮苯基硫基)酞醯亞胺(APTP)、N-琥珀醯亞胺基-6-(4'-偶氮苯基)-1,3'-二硫基丙酸鹽(SADP)、吡啶二硫化物、磺基酞醯亞胺等交聯試劑。

「標記前驅體」係例如以阻害物質使如經探針標記之標記不同的物質。

五、發明說明(5)

「信號」係為可見光、螢光、放射能、及其他之電磁波等。其中，以其測定值與所產生的物質間有關聯性的物質較佳。

「偵測標記」係包含使用如上述肉體性或機械性方法偵測所得者。

「聚胺」係為具有2個以上1級胺類之脂肪族構造的化合物，包含天然(生物)胺類及合成聚合物。通常係為在碳數為3~50之脂肪族鏈的兩端上具有1級胺基，較佳者碳數為6~15或20左右之脂肪族鏈；而該鏈係以胺基予以中段所得者。典型的天然聚胺係有1,3-二胺基丙烷、腐胺、屍胺、原精脒、精脒、均質精脒、胺基丙基屍胺、三胺、精胺、耐溫精胺、刀豆胺、胺基戊基原精脒、N,N'-雙(胺基丙基)屍胺、卡度(譯音)五胺($\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$)、均質卡度五胺($\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$)、卡度六胺($\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$)等。典型之合成聚胺係包含二乙烯三胺、三乙烯四胺、四乙烯五胺、五乙烯六胺、六乙烯二胺、聚乙烯亞胺(平均分子量約為10,000~200,000，較佳者為約20,000~100,000，例如BASF公司之聚胺G35)等。

「複合」或「複合物」係指以靜電及/或物理結合或

五、發明說明(6)

其結合物，而不是指以共有結合或共結合物。通常，複合係為可逆的，可以容易地予以解離者。

「雜交」或「雜化作用」係指2支之單鏈聚核苷酸互補或大致上（如70%以上，較佳者為80或85%以上，更佳者為90或95%以上）互補時，結合形成雙鏈者。

「雜化作用條件下」係指雜交所得的聚核酸形成雜種的條件。一般而言，該條件包含溫度為約70℃以下，較佳者為約60℃以下，通常為約40～55℃。時間係在短時間內可充分反應者即可。

「標的」係表示所關心的對象。

「探針」係指標的DNA或與其一部份互補性高的DNA，通常，較標的DNA為短，由約5～50鹼，較佳者為約10～40鹼，例如約20～30鹼所成。

圖面之簡單說明

圖1係為偵測實施例1之λDNA結果，所得之表示圖。

圖2係為偵測實施例1之E. coli rRNA結果，所得之表示圖。

圖3係為實施例1之λHindIII DNA之電泳照片。

圖4係為實施例1中，以抑制酵素使插入pBR322之部份DNA消化所得者（藉由本發明予以發色）的電泳照片。

圖5係為實施例1中，以抑制酵素使插入pBR322之

五、發明說明(7)

部份DNA消化所得者(X線像)的電泳照片。

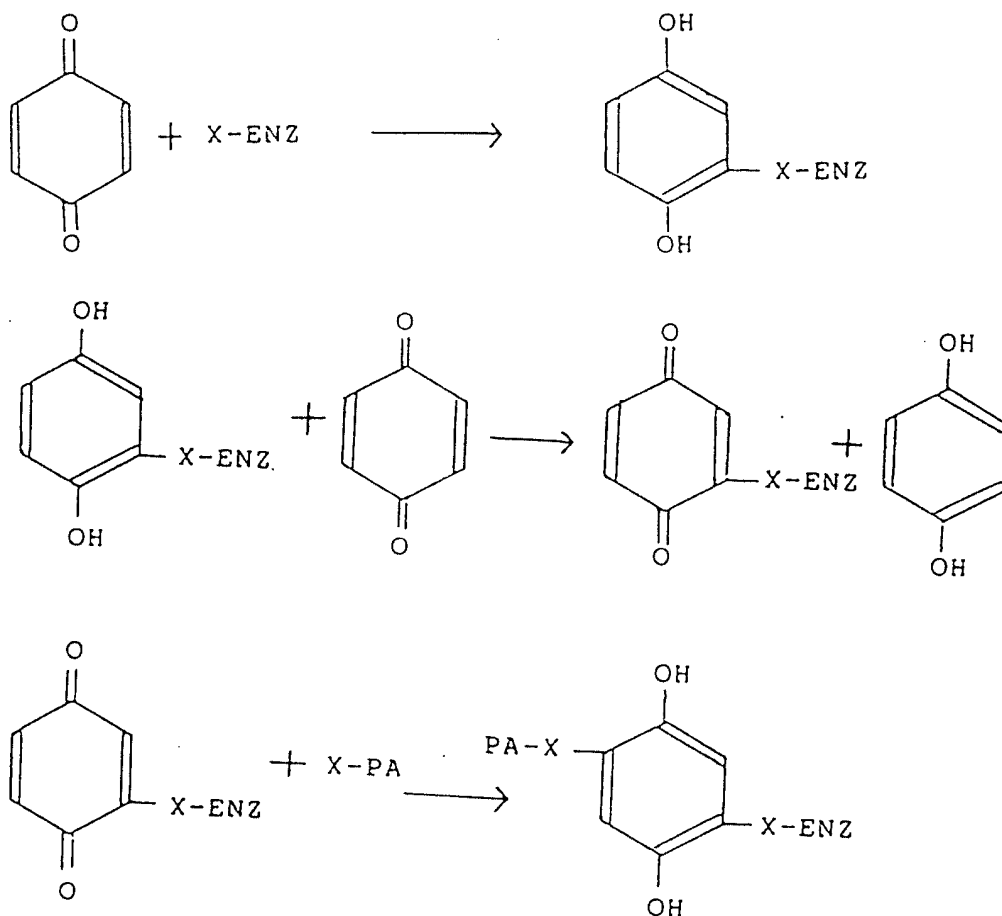
圖6係為實施例1之 λ Hind III DNA的電泳照片。

圖7係為與實施例1之圖6相同的 λ Hind III DNA之電泳照片。

圖8係表示與圖7顏色不同的圖。

爲了實施本發明所使用之最佳形態：

以使用苯醌之酵素與聚胺結合爲例，則反應係依照下述反應予以進行。



五、發明說明(8)

(其中，E N Z 係自酵素中去除胺基之殘基；P A 係自聚胺中去除胺基之殘基；X 係為 1 級或 2 級胺基。)

該反應係如下述予以進行。添加約 1 份的苯醌於以如透析方法精製所得的約 1 5 0 份酵素中，較佳者係僅經由加溫予以反應而成紅葡萄酒色的反應液。以膠體過濾等方法使其色層分離，分離成紫色、黃色，以及紅葡萄酒色的分離液。採取紅葡萄酒色的分離液，在有弱鹼存在下，微微地予以加溫使聚胺（其量為酵素的數分之一）反應，適當的精製而成經酵素標記之聚胺。

偵測核酸的方法，可如下述方法予以進行。

(1) 在膜 (membrane) 上使核酸試料點漬處理，或瓊脂糖膠電泳處理後，再使膜經電吸漬 (electrotransfer) 處理，且予以烘焙使其固定。加入緩衝液，以牛血清白蛋白處理後，加入結合有標記或前驅體的聚胺予以反應。洗淨後，為標記前驅體時，其標記不同，且予以偵測。

(2) 將 D N A 片段 (fragment) 付著於瓊脂糖膠電泳，且予以南方吸漬處理。使用放射能標記後之探針，在加溫下預先雜交化後，進行雜交處理。洗淨後，以 X 線底片檢查 D N A 的位置。然後，使結合有標記或前驅體之聚胺反應，使其適當地發色，且予以偵測。

(3) 使 D N A 片段藉由點漬處理或瓊脂糖膠電泳後之南方吸漬處理固定於膜上，預先雜交後，使用 B i o

五、發明說明(9)

— D N A 探針進行雜交處理。洗淨、吸漬後，使經酵素標記的生物素結合蛋白反應、洗淨、預先熔食後，再使經別的酵素標記的聚胺反應。洗淨後，各予以酵素發色處理，藉由2種發色可得不同之經雜交的 D N A 與未經雜交的 D N A 顏色所發色的影色。例如，鹼性磷酸酵素 / B C I P - N B T 系發色為紫色、過氧化物酵素 / D A B 系發色為褐色。

該方法中，探針與聚胺之處理順序可以顛倒過來。

如上述經發色處理的東西，由於不為 X 線底片，而是以膜發色，故可以在膜上直接確認核酸。而且，為 p C R 時，具有相同程度的分子量物，可以藉由使排列不同的增幅物雜交處理予以區別。

該發明的方法，不需使用危險的試藥，具高感度（例如 D N A 為數 p g，R N A 為數十 p g），而且，具有極易處理的優點。並且由於該發現於實施時必須將所需的試藥置於套組（kits）中，使處理上更為容易。

藉由下述之實施例具體的說明本發明之實施形態。

實施例 1

（過氧化物酶或鹼性磷酸酶所標記之聚乙烯亞胺之製造）

於 40 °C 下使 0.81 ml / 4.05 mg / 7500 單位的鹼性磷酸酵素（C I P，貝林卡、猛海姆公司（譯音）、Grade I）或西洋芥菜過氧化物酵素（貝林卡、猛

五、發明說明(10)

海姆公司製)置放一夜後,以0.1 M磷酸緩衝液予以透析,且依照Immuno Chemistry, 14卷767-774頁(1977年)所記載的方法,於遮光,37℃下,與對一苯醌(120 μl / 30 mg / 乙醇)反應60分鐘,以Cephadix G-25過濾膠體後,採取紅葡萄酒色的分離液(2.7 ml)。於其中加入300 μl之1 M - NaHCO₃ (pH值為9.0)、30 μl之聚乙烯亞胺(epomeil),均勻混合之。再於37℃、遮光下予以反應一夜後,以5 mM磷酸緩衝液(pH值為6.8)透析,製得酵素、聚乙烯亞胺、共軛體。該物於4℃下可以安定1年以上。

(膜上之核酸吸漬處理)

依照“Molecular Cloning”, 1982年, cold-spring-harbor-laboratory所記載的方法,使耐龍膜(波爾(譯音)公司製Biodyne A)上經變性的λ Hind III DNA或E. coli K-12 rRNA點漬處理。而且, vector pBR322之Hind III部位上,藉由定法使經無規選殖(random cloning之st. aureus基因組DNA之選殖株增幅、萃取後,以Hind III處理。以1%瓊脂糖膠電泳處理使試料分離後,於膜上電吸漬處理。(40 V、4小時)。同樣地,使λ Hind III DNA亦經吸漬處理。此等之DNA或RNA試料藉由烘焙處理(80℃, 2小時)固定於膜上。

五、發明說明(11)

(偵測膜上經探針的核酸)

將含有經固定的DNA或RNA之膜浸漬於5 mM磷酸緩衝液-1%牛血清白蛋白(BSA, 西古馬(譯音)公司, fraction V)中, 在室溫下培養60分鐘。繼後, 添加比例為100 μ l / 20 ml 經鹼性磷酸酵素(或過氧化物酵素)標記的聚乙烯亞胺, 在37 $^{\circ}$ C下培養120分鐘。以5 mM磷酸緩衝液-1%BSA-0.1% twin 20分3次、10分鐘洗淨, 再以0.1 M 參HCl (pH 9.5) - 10 mM - MgCl₂ 沖洗。在各添加有300 μ l / 50 ml 之75 mg / ml 溴氯基吡啶基磷酸鹽(BCIP)、20 ml 0.1 M 參HCl (pH 9.5) - 10 mM - MgCl₂, 以及50 mg / ml 硝基藍四(NBT)的發色液中, 使膜發色。

(南方吸漬雜交作用)

使用St. aureus基因組Kb P片段DNA, 依照常法使用³²P - dCTP或Bio - 11 - dUTP (BRL) 施予淨轉換(Net Translation)反應, 調製成³²P - DNA或Bio - DNA。藉由含有經變性探針的雜交緩衝液(5 $\times$ SSC、0.1%BSA、0.1% twin 20), 於42 ~ 55 $^{\circ}$ C下使膜雜交處理一夜。然後, 在55 $^{\circ}$ C下以0.16 $\times$ SSC - 0.1% twin 20洗淨30分鐘(時點A)。

五、發明說明(12)

使用 ^{32}P - DNA 探針時，膜以時點 A 濕潤時包住沙綸燈 (Saran lamp)，顯像於 X 線底片檢測信號。然後，在 42°C 下以 3% BSA - 0.1% twin 20 - 磷酸緩衝食鹽水 (PBS)，使膜做吸漬處理，且以 $100\ \mu\text{l}$ / 薄板，將過氧化物酵素標記聚乙烯亞胺添加於 0.1% BSA - 0.1% Twin - PBS 上予以反應 2 ~ 3 小時。繼後，以 0.1% Twin 20 - PBS 洗淨 3 次，每次 20 分鐘，以二胺基苯叉 (DAB) - H_2O_2 系予以發色。

使用 Bio - DNA 探針時，時點 A 後，在室溫下以 PBS - 0.5% Twin 20 處理 60 分鐘。然後，在 20°C 下藉由含有鹼性磷酸酵素標記生物素結合蛋白之 PBS - 0.05% Twin 20 處理 20 分鐘後，再以 PBS - 0.5% Twin 20 洗淨 2 次，每次 10 分鐘。繼後，在 20°C 下使用 PBS - 1% BSA - 0.1% Twin 20 預先培養 20 分鐘後，添加過氧化物酵素標記聚乙烯胺，在 42°C 下反應 3 小時。以 PBS - 0.1% Twin 20 洗淨膜 3 次，每次 10 分鐘後，再以 0.1 M 參 HCl (pH 9.5) - 10 mM - MgCl_2 沖洗，且在室溫下使用 BCIP - NBT 發色處理 20 分鐘。以 PBS 洗淨 3 次，每次 10 分鐘後，再以 DAB - H_2O_2 系予以發色處理。以 PBS - 0.1% Twin 20 洗淨膜後保存之。

五、發明說明 (13)

(結果)

(1) 使 λ DNA 或 *E. coli* rRNA 點漬處理，且以鹼性磷酸酵素標記聚乙烯胺偵測之，所得之結果各如圖 1 及圖 2 所示。點量由圖 1 可知， λ DNA ① 0.47 μ g ② 470 ng ③ 47 ng ④ 4.7 ng ⑤ 470 pg ⑥ 47 pg ⑦ 4.7 pg ⑧ 470 fg。由圖 2 可知 rRNA ① 5 μ g ② 500 ng ③ 50 ng ④ 5 ng ⑤ 500 pg ⑥ 50 pg。偵測出 DNA 為 470 fg、RNA 為 50 pg 之敏感度。

(2) 製作 λ Hind III DNA 的稀釋系列，使各試樣瓊糖脂膠電泳處理後，以鹼性磷酸酵素標記聚乙烯胺亞偵測由膠電吸漬至膜的物質，所得結果如圖 3 所示。此時，稀釋系列 (0.06 μ g) 之試樣中，自膠分離的溴化乙錠之染色圖案，與所偵測之吸漬圖案完全相同。由此可知，本發明之方法被證實為正確的。

(3) 以抑制酵素切出將插入含有 λ Hind III DNA 之大小記號的 pBR322 之 DNA 片段後，以瓊糖脂膠電泳予以分離，且在膜上電吸漬，並以 ^{32}P -DNA 探針雜交後，使其雜種顯像於 X 線底片，可得信號 (如圖 5)。為了特定該雜交後 DNA 的種類，使其膜做過氧化物酵素標記聚乙烯胺處理，且確認全部的經吸漬的 DNA 位置 (如圖 4)。

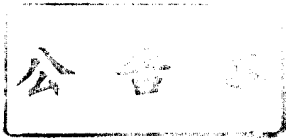
(4) 藉由將與上述 (3) 同樣處理的物質，以使用 Bio-DNA 探針系列予以雜交處理，同時偵測經雜交

五、發明說明⁽¹⁴⁾

的 D N A 與未經雜交的 D N A。此時，藉由使用各種不同的 B i o - 探針與鹼性磷酸酵素生物素結合蛋白，過氧化物酵素標記聚乙烯亞胺予以分離，藉由使經雜交的 D N A 與未經雜交的 D N A 重覆染色予以區分。所得結果如圖 7 所示。而且，不同的顏色如圖 8 所示。圖中，斜線部份為褐色（過氧化物酵素標記聚乙烯亞胺系列），黑色部份為紫色（鹼性磷酸酵素／生物素結合蛋白系列）。該圖案係與同樣地施予溴化乙錠染色的結果（如圖 6）相同。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

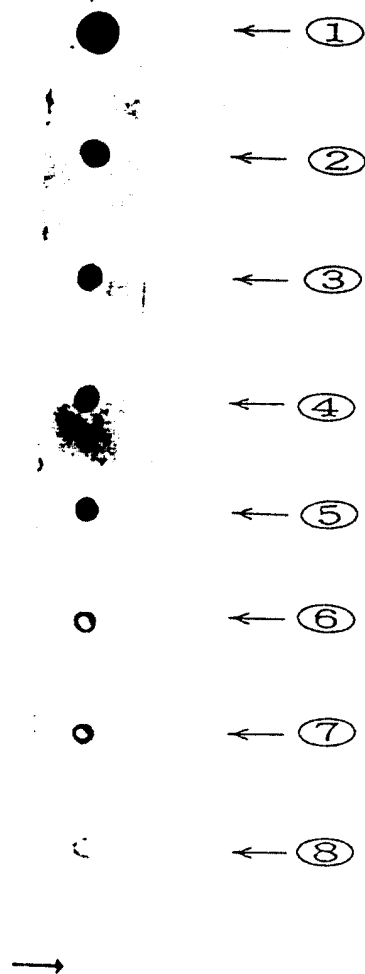
裝
訂
線



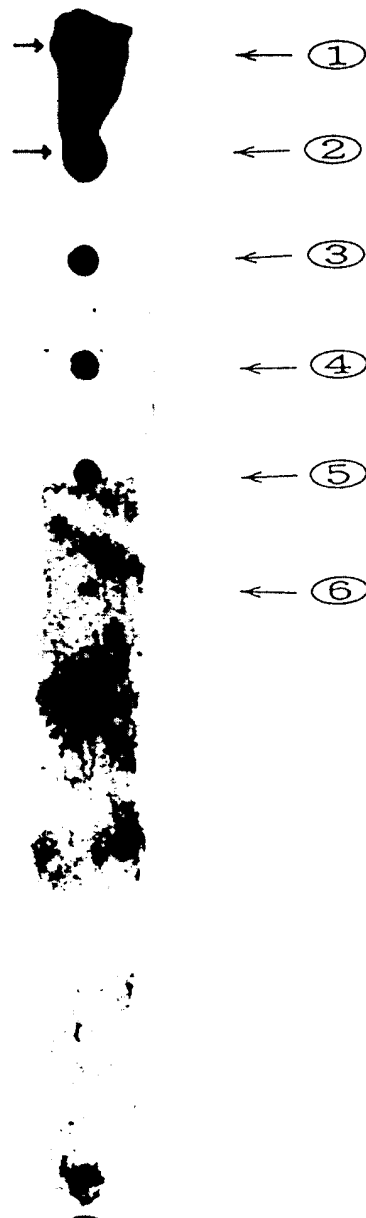
82106442

719380

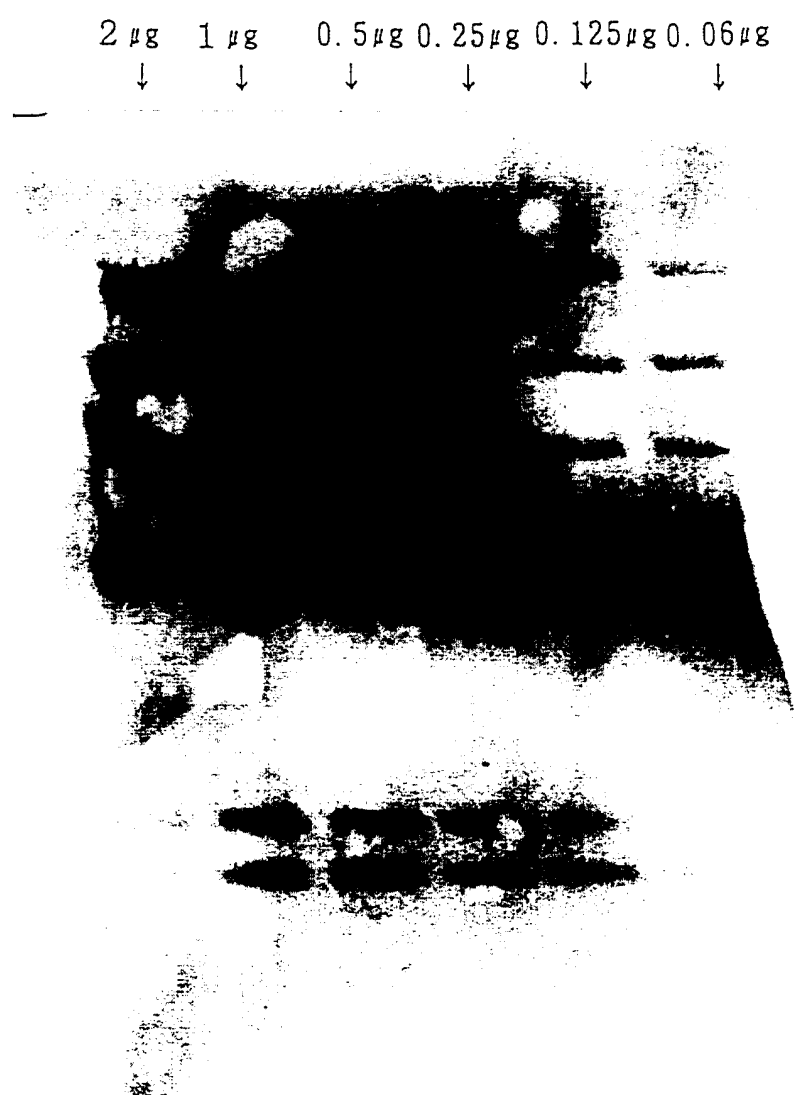
第 1 圖



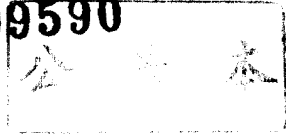
第 2 圖



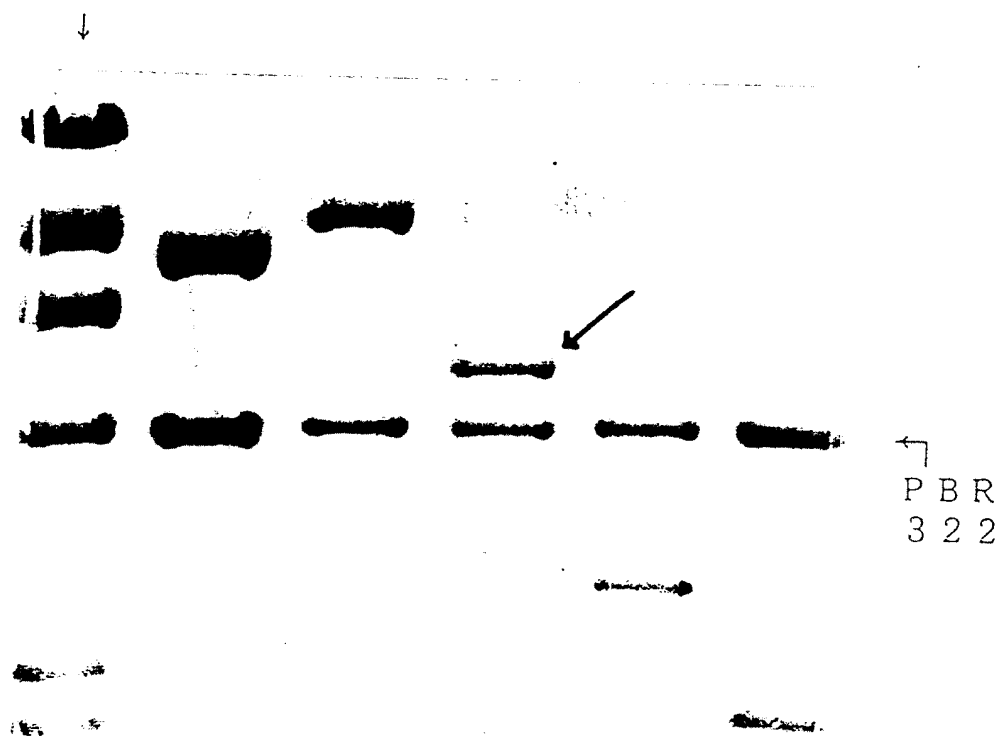
第 3 圖



309590



第4圖





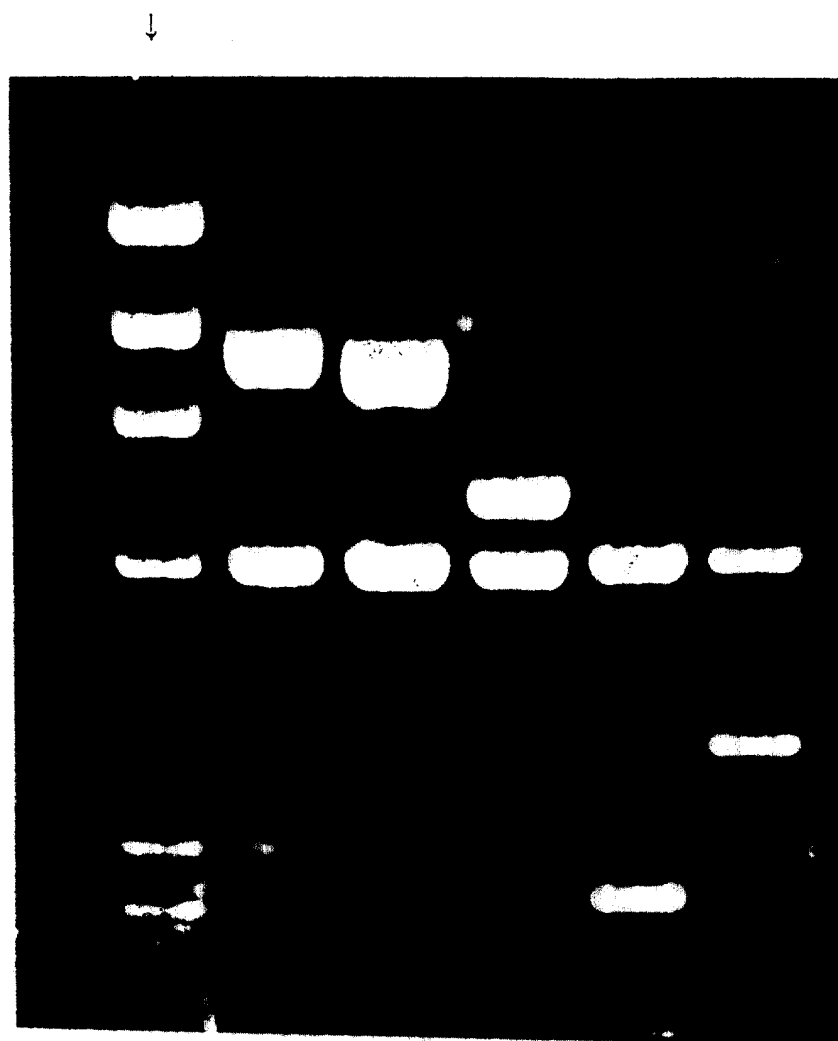
第 5 圖



309590

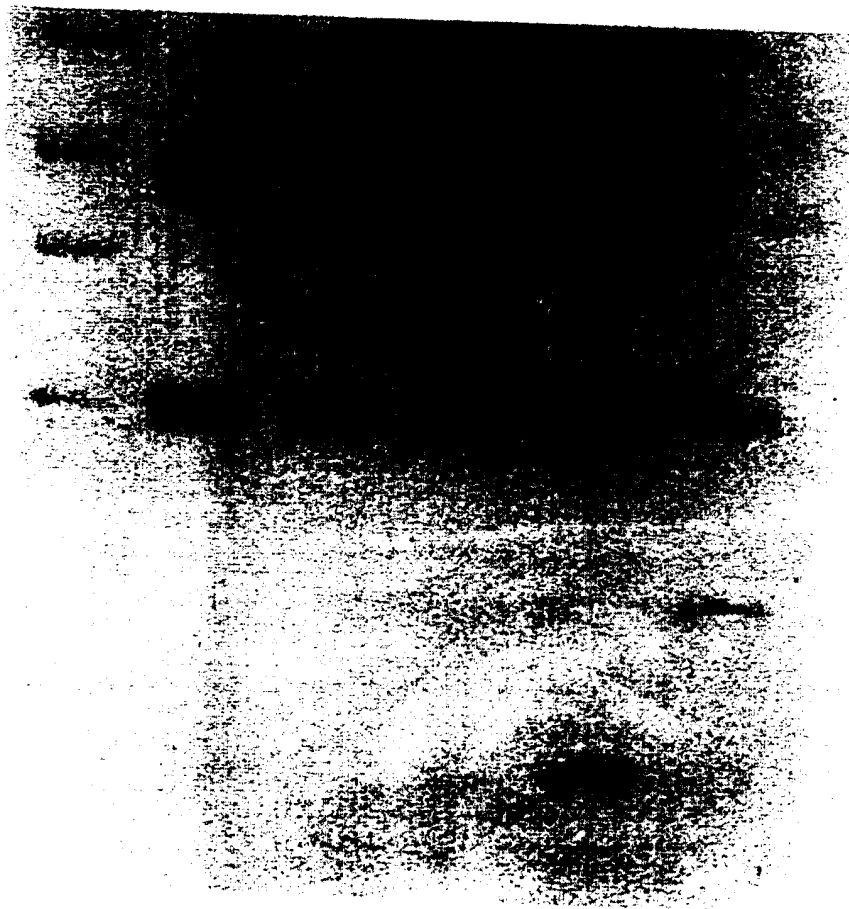
公 司 本

第 6 圖

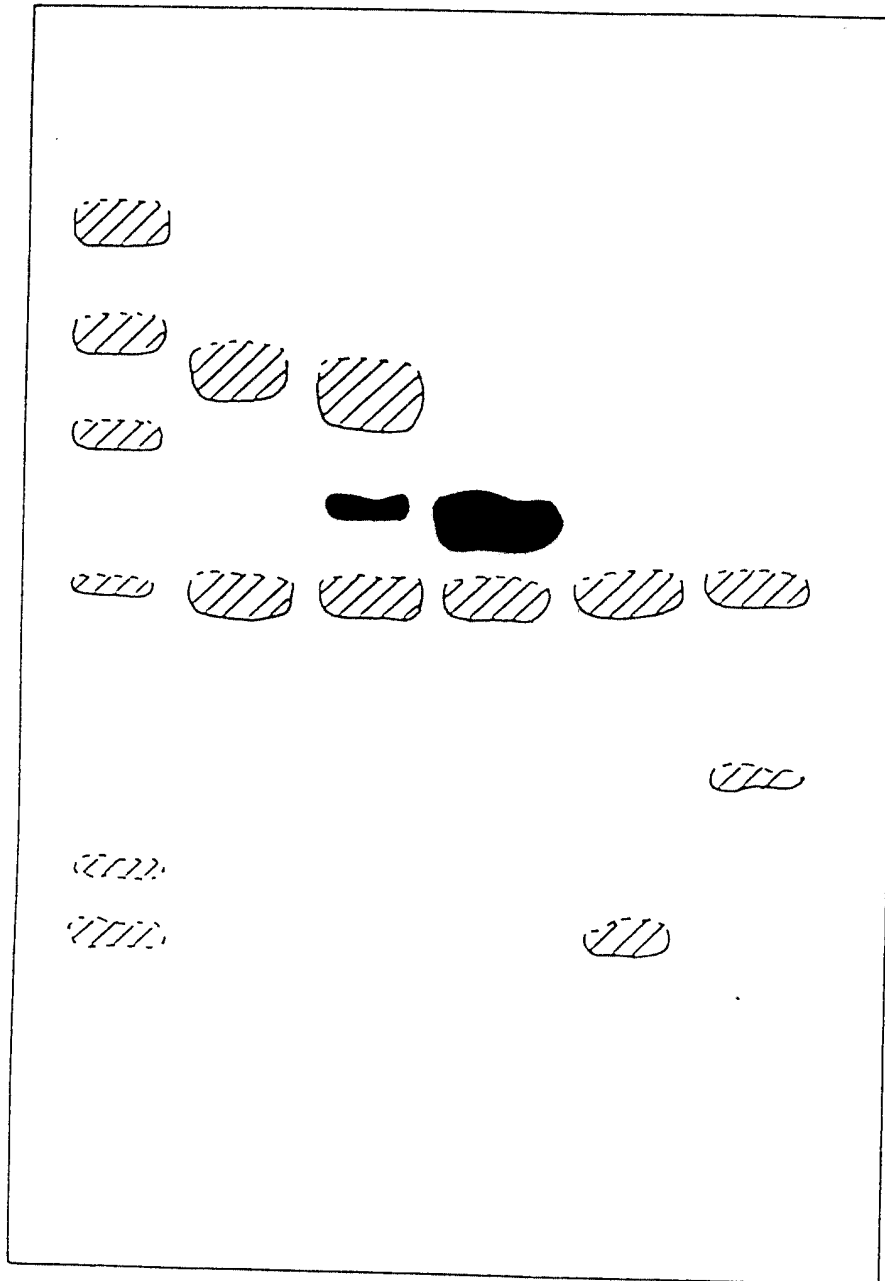


309590

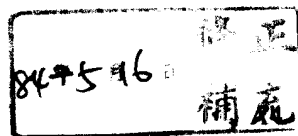
第7圖



第 8 圖



申請日期	82 年 8 月 11 日
案 號	82106442
類 別	發明 C1 S01N 33/53



C4

309590

309590

(以上各欄由本局填註)

發 明 專 利 說 明 書

一、發明 名稱	中 文 偵測核酸之方法、識別偵測法及偵測核酸用具
	日 文 核酸の検出法、識別検出法および核酸検出用キット
二、發明 人 創作	姓 名 (1) 松久明生 (2) 芝清隆 (3) 三河義一 國 籍 (1) 日本 (2) 日本 (3) 美國 (1) 日本國奈良縣奈良市右京二一一二二三二五〇四 住、居所 (2) 日本國東京都豐島區池袋本町四二八五三〇一 (3) 美國加州 90122 聖地牙哥崔蒙特路 740 5 號公路第 2222 公寓 Road 7405, Charmant Drive, Apartment 2222, Sandiego, California 90122 the United States of America
	姓 名 (1) 扶桑藥品工業股份有限公司 (名稱) 扶桑藥品工業株式会社 國 籍 (1) 日本 (1) 日本國大阪府大阪市中心區道修町 1 丁目 7 番 10 號 住、居所 (事務所) 代 表 人 姓 名 (1) 戶田幹雄
三、申請人	

裝

訂

線

309590

申請日期	82 年 8 月 11 日
索 號	82106442
類 別	

A4
C4

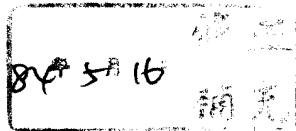
(以上各欄由本局填註)

發明 專利 說明 書 新型		
一、發明 名稱	中 文	
	英 文	
二、發明 人	姓 名	(4) 岸雄一郎
	籍 貫 (國籍)	(4) 日本 (4) 日本國和歌山縣和歌山市吹屋町五-五三-四
	住、居所	
三、申請人	姓 名 (名稱)	
	籍 貫 (國籍)	
	住、居所 (事務所)	
	代 表 人 姓 名	

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

裝
訂
線

309590



A6
B6

(由本局填寫)

承辦人代碼：
大 類：
I P C 分類：

本案已向：

國(地區) 申請專利，申請日期： 案號： ，☐有 ☐無主張優先權

日本 1992 年 6 月 18 日 159349/1992 ☒無主張優先權

有關微生物已寄存於： ，寄存日期： ，寄存號碼：

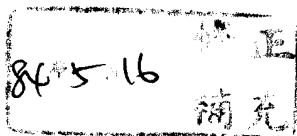
(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄)

裝

訂

線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製



四、中文發明摘要(發明之名稱：偵測核酸之方法，識別偵測法及偵測核酸用具)

本發明係有關一種偵測核酸的方法，使用該偵測法之識別偵測核酸之方法及偵測核酸用具，其特徵為懷疑附著或含有核酸的固相載體上，與介由交聯試藥結合之聚胺接觸，在核酸與聚胺之間形成複合物；去除沒有形成複合物的聚胺，然後偵測酵素。

英文發明摘要(發明之名稱：)

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄)

裝

訂

線

六、申請專利範圍

第 82106442 號 專 利 申 請 案

中 文 申 請 專 利 範 圍 修 正 本

民 國 84 年 5 月 修 正

1 . 一種偵測核酸之方法，其特徵為在懷疑附著或含有核酸之固相載體上，與介由交聯試藥結合酵素之聚胺接觸，在核酸與聚胺之間形成複合物；除去沒有形成複合物的聚胺，然後偵測酵素。

2 . 如申請專利範圍第 1 項之偵測核酸的方法，其中酵素為鹼性磷酸酵素或過氧化物酵素。

3 . 如申請專利範圍第 1 項之偵測核酸的方法，其中交聯試藥為苯醌。

4 . 如申請專利範圍第 1 項之偵測核酸的方法，其中聚胺為碳數 3 ~ 50 之脂肪族鏈，鏈的兩端有第 1 級胺，鏈係以亞胺基中斷而得；係為天然聚胺或合成聚胺。

5 . 如申請專利範圍第 4 項之偵測核酸的方法，其中聚胺係為碳數 6 ~ 15 之脂肪族鏈。

6 . 如申請專利範圍第 5 項之偵測核酸的方法，其中聚胺係為合成聚胺。

7 . 如申請專利範圍第 6 項之偵測核酸的方法，其中合成聚胺係為聚乙烯亞胺。

8 . 一種識別標的核酸與其他核酸之偵測方法，其特徵為懷疑附著或含有標的核酸之固相載體上，以任意的順序組合實施；

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

六、申請專利範圍

① 在雜交化條件下，與結合酵素之標的核酸雜交而得的探針接觸，形成雜種；去除沒有形成雜種的探針，然後，偵測酵素之第 1 偵測處理，及

② 與介由交聯試藥結合其他的酵素之聚胺接觸，在核酸與聚胺之間形成複合物；去除沒有形成複合物之聚胺，然後，偵測酵素之第 2 偵測處理。

9 . 如申請專利範圍第 8 項之識別偵測核酸的方法，其中第 1 偵測操作係藉由南方吸漬雜交法 (southern blot hybridization) 予以處理。

10 . 如申請專利範圍第 8 項之識別偵測核酸的方法，其中酵素為鹼性磷酸酵素或過氧化物酵素。

11 . 如申請專利範圍第 8 項之識別偵測核酸的方法，其中交聯試藥為苯醌。

12 . 如申請專利範圍第 8 項之識別偵測核酸的方法，其中聚胺為碳數 3 ~ 50 之脂肪族鏈，鏈的兩端為第 1 胺基，而鏈係以亞胺基中斷而得者，為天然聚胺或合成聚胺。

13 . 如申請專利範圍第 12 項之識別偵測核酸的方法，其中聚胺為碳數 6 ~ 15 之脂肪族鏈。

14 . 如申請專利範圍第 13 項之識別偵測核酸的方法，其中聚胺為合成聚胺。

15 . 如申請專利範圍第 14 項之識別偵測核酸的方法，其中合成聚胺為聚乙烯亞胺。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

六、申請專利範圍

1 6 . 一種偵測核酸用具，其特徵為含有：

- ① 介由交聯試藥以酵素所標記的聚胺，及
- ② 藉由酵素作用所產生信號的發色原體。

1 7 . 如申請專利範圍第 1 6 項之偵測核酸用具，其中酵素為磷酸酵素或過氧化物酵素。

1 8 . 如申請專利範圍第 1 6 項之偵測核酸用具，其中交聯試藥為苯醌。

1 9 . 如申請專利範圍第 1 6 項之偵測核酸用具，其中聚胺為碳數 3 ~ 5 0 之脂肪族鏈，鏈的兩端為第 1 級胺基，鏈係以亞胺基中斷所得，係為天然聚胺或合成聚胺。

2 0 . 如申請專利範圍第 1 9 項之偵測核酸用具，其中聚胺為碳數 6 ~ 1 5 之脂肪族鏈。

2 1 . 如申請專利範圍第 2 0 項之偵測核酸用具，其中聚胺為合成聚胺。

2 2 . 如申請專利範圍第 2 1 項之偵測核酸用具，其中合成聚胺為聚乙烯亞胺。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂