

**發明專利說明書 200533751**

(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：94106141

※ 申請日期：2005 年 3 月 1 日

※IPC 分類：

一、發明名稱：(中文/英文)

C12N 15/11

核酸複合體

NUCLEIC ACID COMPLEXES

二、申請人：(共 1 人)

姓名或名稱：(中文/英文)

王長寧

WANG, CHANG-NING J.

代表人：(中文/英文)

無

無

住居所或營業所地址：(中文/英文)

美國麻薩諸塞州安道夫市瓦本街 2 號

2 Woburn Street, Andover, MA 01810, U.S.A.

國 籍：(中文/英文)

美國/USA

三、發明人：(共 1 人)

姓 名：(中文/英文)

王長寧/WANG, CHANG-NING J.

國 籍：(中文/英文)

美國/USA

#### 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：

美國；2004 年 2 月 28 日；60/548,963

☐ 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。

## 玖、發明說明：

### 【發明所屬之技術領域】

本發明有關於一種交聯核酸複合體及其製備方法。

### 【先前技術】

探針雜合法 (probe hybridization) 已被用來偵測小量的特定核酸序列。此偵測方法並非極為靈敏，例如該方法經常無法區分真實信號與非專一性結合所產生的雜訊。近來發展出的方法著重於藉著放大目標序列的量以解決上述問題。

藉著反覆進行一特定目標序列的生合成反應 (de novo synthesis)，可放大目標序列以增進偵測靈敏度 (參考 US4,683,195、US4,683,202、US4,800,159、US5,455,166、US5,288,611、US5,639,604、US5,658,737 及 US5,854,033；EP No.320,308A2；國際申請案 PCT/US87/00880；以及 Zehbet et al., 20 Cell Vision, vol.1, No.1, 1994 等文獻資料)。然而這些方法既麻煩且須使用昂貴的設備與酵素。再者，該些方法的成功與否，取決於目標序列的完整性。該些方法無法偵測受損的目標序列。

亦可利用放大信號、循環目標序列、循環探針或使用分枝狀 DNA 分子作為信號產生因子 (signal generator) 等方法來提高偵測靈敏度 (參考美國專利案 4,699,876、6,114,117 與 5,118,605 號；以及 Bekkaoui, et al., BioTechniques, 20:240-248, 1996)。然而，由於核酸雜和

反應中的背景雜訊亦一併放大，導致該些方法之應用有限。

重組酶 *recA*-系之相似 DNA 序列交換作用 (*recombinase recA-based homologous DNA strand exchange*) 及生成 D 環 (*D-loop*)，也被用於核酸的增量與偵測上 (參考美國專利案 5,670,316 號與 6,335,164 號)。然而這些方法卻會受到外來 DNA (*heterologous DNA*，或稱異源 DNA) 的干擾。

因此需要發展一種較靈敏、具專一性、且比現行方法更便宜的核酸偵測方法。

#### 【發明內容】

本發明係根據交聯核酸複合體之發現所做的發明，此交聯核酸複合體只有在其核酸成員中的三者含有彼此相似之序列時才會形成。僅需極少量套數之感興趣的核酸序列即可有效地啟動該複合體之形成。並且，該複合體經螢光染料染色後具有大幅提高的螢光強度，故可偵測極微量之感興趣的核酸序列。亦可由感興趣之序列的片段來引導該複合物之形成，故其偵測敏感度不受序列完整性影響。

因此，本發明有關於一種藉著在多個第一與第二核酸中加入微量的第三核酸，以製備出交聯核酸複合體的方法。此處所使用之「多個 (*plurality*)」一詞係指數目至少為  $10^2$  個 (例如  $10^6$ )。此處「微量 (*trace*)」一詞係指數目至少為 1 個。每個第一核酸與每個第二核酸相互補，且每個

第一核酸中含有與一目標位置(如每個第三核酸中之一片段)相互補的一段序列。第一核酸與第二核酸可為雙股DNA (double stranded DNA)，且兩者的數目各自約為第三核酸之數目的 1 至  $10^{16}$  倍，且以  $10^3$  至  $10^{13}$  倍為佳。該第一與該第二核酸之長度分別為 100 至 20,000 個核苷酸，如 200 至 8,000 個核苷酸。第一核酸與第二核酸之間互補序列的長度約為 10 至 20,000 個核苷酸，例如 20 至 8,000 個核苷酸。為幫助交聯核酸複合體的形成，首先使第一、第二與第三核酸變性(denature)，且使其位於一平坦表面上。例如，可利用一鉗合性水溶劑(chaotropic aqueous solvent)使該些核酸變性，隨後在該鉗合性水溶劑中加入疏水性有機溶劑使該些核酸位於兩溶劑之間的界面上。如有需要，可自兩種溶劑之混合物中萃取出由上述步驟所形成的交聯核酸複合體。

在根據本發明所獲得之交聯核酸複合體中，第一或第二核酸的數目約為第三核酸數目的 1 至  $10^{12}$  倍，且以  $10^3$  至  $10^8$  倍為佳。該交聯核酸複合體具有超乎尋常的螢光特性。當該交連核酸複合體經溴化乙錠(ethidium bromide)染色後，可發出波長 605 毫微米(nm)的螢光，其強度至少是經溴化乙錠染色之非交聯的第一、第二與第三核酸之螢光強度的 10 倍。

交聯核酸複合體可作為偵測方法中的偵測工具，用以辨識出一樣品之核酸序列中的目標位置。特別是當第三核酸為可能含有與每個第一核酸中之一序列相互補之目標

位置的 DNA 或 RNA 分子時，執行如上述之方法可辨識出該目標位置。由於第三核酸中若缺乏該目標位置便無法形成一交聯核酸複合體，因此若偵測到複合體的出現，即表示序列中具有該目標位置。可藉著增加該核酸複合體的分子量來改變該交聯核酸複合體的形成，並且待以一雙股 DNA 嵌入性螢光染料(double DNA strand intercalating fluorescent dye)對該交聯核酸複合體進行染色後，測量其所發出之螢光強度。

需注意到，由於不需進行 DNA 生合成反應，因此該第三核酸的序列完整性並不影響偵測工作。因具有此優點，故即使是均勻受損的 DNA 也能進行偵測，其中均勻受損的 DNA 即是指 DNA 上沒有一個完整的目標位置，且無法以聚合酶鏈鎖反應將其放大。

本發明範圍中亦提供一多相系統(multiphase system)，可在該多相系統中執行上述方法，以形成一交聯核酸複合物。此多相系統含有一疏水性有機溶劑(hydrophobic organic solvent)與一鉗合性水溶劑，當這兩種溶劑混合時，其會相互分離成兩相，以及含有多個核酸位在兩溶劑之間的平坦界面上。位在平坦界面上的核酸可為該第一、第二與第三核酸的混合物(上述內容曾提及)，且核酸為該第一與第二核酸之混合物，或為該第三核酸之混合物則取決於三種核酸加入疏水性有機溶劑與鉗合性水溶劑混合物中的順序來決定。

將可由本發明之敘述內容及申請專利範圍中明顯看

出本發明之其他特徵、目的與優點。

### 【實施方式】

為展示如何製備本發明之核酸複合體，以下內容係詳述在一用以偵測一目標核酸位置的方法中，如何形成上述這類複合體。

該目標位置可為一單股核酸(如單股之病毒 DNA 或人類 mRNA)、一雙股 DNA(如雙股之病毒 DNA 或人類基因體 DNA)、一 DNA-RNA 雜合物(DNA-RNA hybrids)以及上述一種或多種分子之混合物的一部分。例如自人類血液分離出來的雙股病毒 DNA 即可利用以下方法進行偵測。首先，藉著辨識病毒基因體中一段為該病毒特有且人類與其他病毒之基因中並未存在的一致序列(consensus sequence)，以選出一個欲接受偵測之目標位置。隨後利用標準分子選殖技術來構築一個雙股 DNA 探針(probe)，其含有一段與該選擇目標位置相互補的序列。於一鉗合性水溶劑中使該雙股病毒 DNA 及該探針變性(其中該探針之數目為該病毒 DNA 之數目的  $10^3$  至  $10^{10}$  倍較佳)，由於該鉗合性水溶劑使病毒 DNA 與探針不穩定，故各自與其互補股分離而成為解開的結構。隨後將一疏水性有機溶劑加入該水溶劑中，以創造一個兩相系統(biphase system)，且在兩溶劑之間形成一平坦表面。適合的疏水性有機溶劑包含苯胺(alanine)、正丁醇(*n*-butylalcohol)、第三戊醇(*tert*-amylalcohol)、環己醇(cyclohexyl alcohol)、酚

(phenol)、對甲氧基酚(*p*-methoxyphenol)、苯甲醇(benzyl alcohol)、吡啶(pyridine)、嘌呤(purine)、3-氨基三唑(3-aminotriazole)、丁醯胺(butylamide)、己醯胺(hexamide)、硫代乙醯胺(thioacetamide)、 $\delta$ -戊內醯胺( $\delta$ -valerolactam)、第三丁基脲(*tert*-butylurea)、次乙基硫脲(ethylenethiourea)、烯硫脲(allylthiourea)、硫脲(thiourea)、氨基甲酸乙酯(urethane)、*N*-丙基氨基甲酸乙酯(*N*-propylurethane)、*N*-甲基氨基甲酸乙酯(*N*-methylurethane)、氰代亞氨基甲二胺(cyanoguanidine)以及兩種或多種上述物質之組合物。適合的鉗合性水溶劑包括該些含有一種或多種之  $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ 、 $\text{NH}_4^+$ 、 $\text{Cs}^+$ 、 $\text{Li}^+$ 、 $(\text{CH}_3)_4\text{N}^+$ 等離子的水溶劑，以及該些含有一種或多種之甲苯磺酸酯<sup>-</sup>、 $\text{Cl}_3\text{CCOO}^-$ 、 $\text{SCN}^-$ 、 $\text{ClO}_4^-$ 、 $\text{I}^-$ 、 $\text{Br}^-$ 、 $\text{Cl}^-$ 、 $\text{BrO}_3^-$ 、 $\text{CH}_3\text{COO}^-$ 、 $\text{HSO}_3^-$ 、 $\text{F}^-$ 、 $\text{SO}_4^-$ 、 $(\text{CH}_3)_3\text{CCOO}^-$ 、 $\text{HPO}_4^-$ 等分子之水溶劑。

下述內容為一假設機轉，透過該機轉可形成一交聯核酸複合體。在該鉗合性水溶劑-疏水性有機溶劑系統(即兩性系統，amphipathic system)中的雙股探針與雙股病毒DNA將會被吸引至有機相與水相之間的界面上，並將其親水性磷酸五碳糖的部分暴露於水相中，以及使其疏水性之環狀結構部份暴露於有機相中。也就是該些探針與病毒DNA無法維持其Watson-Crick配對之結構。此外，互補的兩股探針會因此而成對且緊密相鄰地排列在同一表面上(該病毒DNA之兩條互補股亦然)，即是呈平行配對

(paranemic pairing)的狀態。單股之含有目標位置的病毒 DNA 將會與具有能與目標位置互補之序列的探針進行配對，而破壞一對平行排列之探針之間的局部配對作用。而除了被破壞的區域外，該些探針仍維持平行配對的結合狀態。也就是說互補的兩股探針僅部分分離，因此會在被破壞區域的兩端產生扭結(kink)。扭結會扭曲平行探針股鏈的拓撲結構(topological structure)，並迫使部分探針從平坦表面進入水相溶劑。在該平坦表面上，該些具有與目標位置相同之一序列的部份解開之探針中的其中一股，會與一對平行探針中的其中一股進行並肩式的配對，而其另一股在與又另一對平行探針中的其中一股進行配對。在控制條件的情況下，上述過程會持續發生，直到該些探針已被消耗殆盡，且無法在進行更多的平行配對時，該複合體形成過程方會停止。因此，僅需要極少數目的病毒 DNA 便足以誘導探針分子之間一系列的交聯反應(a cascade of crosslinking event)的發生，並產生交聯核酸複合體。可在一鉗核性水溶液中加入乙醇或異丙醇，經沉澱作用而輕易地分離出所形成的交聯核酸複合體。

根據上述方法所獲得之交聯核酸複合體經過溴化乙錠染色後，可在波長 518 毫微米之光線的激發下放出波長 605 毫微米的螢光，且其強度至少是該些經溴化乙錠染色且未交聯之核酸探針與病毒 DNA 的 10 倍。且該提高後的螢光強度可根據下列方法來偵測之。係將 100 毫微克(ng)交聯核酸複合體以 0.25 微克/毫升( $\mu\text{g/ml}$ )之溴化乙錠染色

5 分鐘。偵測該交聯核酸複合體之螢光強度，並將之與 100 毫微克未處理之核酸(即病毒 DNA 與雙股探針)的螢光強度進行比較。亦可採用其他方法來偵測該複合體之螢光強度，例如以瓊脂膠電泳法分析該複合體且以目測方式觀察之。若膠體上出現分子量大於該未處理核酸之分子量的帶狀信號(bands)，即表示有交聯核酸複合體形成。或是在沉降平衡過程(sedimentation equilibrium process)中，利用是否有物質離轉軸的距離較該未處理核酸離轉軸的距離更遠之原理來偵測是否有交聯複合體形成。更可利用顯微鏡來偵測該複合體，例如以螢光染料將複合體染色後，置於顯微鏡玻片上，並以濕氣室揮發法(moisture chamber vaporization)使之乾燥後，可於顯微鏡下觀察到經螢光染料染色後的複合體。亦可利用如綠豆核酸水解酶(mung bean nuclease)等單股 DNA 特異性核酸水解酶(single stranded DNA specific nuclease)來剪切該些未反應且呈單股狀之探針後，以定量聚合酶鏈鎖反應(quantitative PCR, QPCR)來偵測所形成之複合體的量。可使用對目標具有特異性的引子(如 AmpliSensor)或探針(如 TagMan probe)來顯現該些結合在複合體中之核酸探針的量。

最好在進行偵測試驗之前，先自生物或其他樣品中純化出核酸。例如，可先將樣品(如血液、淋巴液、尿液、食物或污水)置於一溶胞緩衝液(lysis buffer)中。隨後在含有樣品之溶胞緩衝液中加入乙醇或異丙醇以幫助核酸沉澱。可如上述方法，利用上述之鉗合性水溶劑使該些可作

為雙股之探針的核酸變性。可調整該鉗合性水溶劑之濃度，以使該些核酸探針互補的兩股在變性後，仍能在一平坦表面上以並列的方式彼此相互配對。

總之，可藉著增加探針的用量或其長度而提升偵測靈敏度。由於該探針中的高能量屏障(energy barrier 區域)，即較高 GC 含量之區域，具有如鉗子(clamp)般地作用，故可避免分枝遷移現象(branch migration)，同時待複合體形成後，亦有穩定複合體結構的能力。亦可將反應後產生的複合體剪切成小片段之後，利用該些小片段再次執行上述之複合體生成步驟，並重複此循環數次，以提高偵測靈敏度。T7 核酸內切酶 I (T7 endonuclease I)會剪切配對錯誤的 DNA 位置及霍利迪結構(Holliday structure)，故可利用 T7 核酸內切酶 I 將該複合體剪切成小片段。將成為片段狀的複合體將繼續進行標準 B 型螺旋(canonical B form helix)之 Watson Crick 鹼基配對，而能誘導其與新增添的雙股引子發生交聯反應。

可在單一試驗中使用對一目標位置具專一性的多種探針或對多個目標位置具專一性的單一探針來偵測不同的目標位置。由於該訊號(甚至是所有訊號)將與反應中各自目標位置的量有直接相關性，故本方法特別適合用來即時偵測樣品中的多種病源體。

如有需要，可以適當之核酸序列來取代病毒 DNA，即可利用上述方法來製備塗佈材料(coating material)。由於核酸上的聚陰離子基團(polyanionic group)，使得該交

聯複合體上具有高電荷密度，故可將其塗佈於一表面上以固定陽離子分子(cationic molecular)。可利用一般的噴霧技術將其塗佈於一表面上以形成一薄膜。

本發明之範圍亦涵蓋一種能根據上述方法來偵測一核酸序列之試劑組合(kit)。該試劑組合中可含有一種或多種以下試劑：一核酸探針，其對一目標序列具專一性、一鉗合性試劑或一鉗合性水溶劑、一疏水性有機溶劑、以及用來偵測之一螢光染料。

需明白，習知技藝者可根據上述內容(包括一假設機轉，其並不能用以限制本發明之申請範圍)，將本發明之應用至最大範圍。文中引用之所有公開文獻及前案之美國臨時申請案 60/548,963 號均於此處將其全文納入參考。下述特定範例僅用來說明，並非做限制本發明之用。

#### 範例

利用含有相對應於 HBV 表面抗原特定序列(HBVSAg)之片段的一核酸序列來偵測人類 B 型肝炎病毒(Human hepatitis B virus, HBV)之基因體(genome)。使用引子(primer): TCG TGG TGG ACT TCT CTC AAT TTT CAT GG (SEQ ID NO:1)與引子: CGA GGC ATA GCA GCA GGA TGA AGA GA (SEQ ID NO:2)以聚合酶鏈鎖反應(PCR)自 HBV 基因體中放大 HBVSAg 片段之數目。將放大後的 HBVSAg 片段次選殖(sub-cloning)至一改良的 PUC18 質體(modified PUC18 plasimd)中之 HincII 限制酶位址中。隨

後，使獲得的 HBVSAg/PUC18 質體在大腸桿菌之 DH5  $\alpha$  菌株 (E. coli DH5  $\alpha$ ) 中進行質體複製。利用質體萃取法 (plasmid extraction) 由大腸桿菌細胞中分離出 HBVSAg/PUC18 質體，隨後以限制酶 EcoRI 來剪切 10 微克之該質體，以產生大小約 3 kb 且含有 HBVSAg 片段之質體片段 (fragment)。將所得之質體片段作為一雙股 DNA 探針，用以偵測 B 型肝炎病毒之基因體。以下顯示之序列係為該雙股 DNA 探針之其中一股的序列。該序列含有一「鉗狀區域 (clamp region)」(圖中粗體字型)，其提供足夠的能量屏障以避免兩股序列分離。

將  $5 \times 10^2$  至  $5 \times 10^{-2}$  個 HBV 基因體懸浮於 20 微毫升 ( $\mu$ l) 之含 1.0 M GuSCN 與 50 mM 磷酸鉀的溶液中 (pH6.0)。在每個 HBV 基因體溶液中加入 15 毫微克之該探針後，再加入 20 微毫升的苯胺，以形成含有一鉗合性水溶劑與一疏水性有機溶劑的兩相系統。激烈震盪該混合物後，將之置於 30  $^{\circ}$ C 下反應 15 分鐘，以形成該複合體。

如以下步驟來分離該複合體，係將 5 M 之氯化胍 (guanidinium chloride) 與異丙醇 (isopropanol) 加入上述混合物中。隨後劇烈震盪該混合物，並以 14000 rpm 之轉速離心該混合物 5 分鐘。丟棄離心後的上清液，以濃度 75 % 的乙醇清洗含有該複合體之沉澱物，且使該沉澱物於空氣中乾燥 10 分鐘後，重新將之懸浮於 20 微毫升的 Tris-EDTA 緩衝液中。

可如下數步驟來觀察該複合體。係在 10 微毫升之重

新懸浮的複合體中加入將 0.2 微毫升的 PicoGreen dsDNA 定量試劑 (Molecular Probe, Inc. 貨號 P-7581)。再將 0.5 微毫升之已標記的核酸複合體置於一顯微鏡玻片 (Kevley Technology, 商品名為 CFR) 上後, 使該玻片以空氣乾燥法 (air-dried) 乾燥一個晚上。最後將複合物的聚集體置於顯微鏡下, 以 250 倍之放大倍數於螢光及光學條件設定下觀察之。

```

1 aattcgtaat catggtcata gctgtttcct gtgtgaaatt gttatccgct cacaattcca
5 61 cacaacatac gagccggaag cataaagtgt aaagcctggg gtgcctaata agtgagctaa
121 ctcacattaa ttgcgttgcg ctcaactgcc gctttccagt cgggaaacct gtcgtgccag
181 ctgcattaat gaatcggcca acgcgcgggg agaggcgggt tgcgtattgg gcgctottcc
241 gcttctctcg tcaactgact gctgcgctcg gtcgttcggc tgcggcgagc ggtatcagct
301 cactcaaaag cggtaatacg gttatccaca gaatcagggg ataacgcagg aaagaacatg
361 tgagcaaaag gccagcaaaa ggccaggaac cgtaaaaagg ccgcgttgct ggcgtttttc
10 421 cataggtccc gccccctga cgagcatcac aaaaatcgac gctcaagtca gaggtggcga
481 aaccgcacag gactataaag ataccaggcg ttccccctg gaagctccct cgtgcgctct
541 cctgttccga ccctgccgct taccggatac ctgtccgcct ttctcccttc gggaaagcgtg
601 gcgctttctc atagctcacg ctgtaggtat ctcaagttcg tgtaggtcgt tcgctccaag
661 ctgggctgtg tgcacgaacc cccggttcag ccgcaccgct gcgccttata cggtaactat
15 721 cgtcttgagt ccaaccggg aagacacgac ttatcgccac tggcagcagc cactggtaac
781 aggttagca gagcgaggt ttagggcggt gctacagagt tcttgaagt gtggcctaac
841 tacggctcac ctagaaggac agtatgtgtt atctgcgctc tgctgaagcc agttaccttc
901 ggaaaaagag ttggtagctc ttgatccggc aaacaaacca ccgctggtag cggtggtttt
961 tttgtttgca agcagcagat tacgcgcaga aaaaaaggat ctcaagaaga tcctttgatc
20 1021 ttttctacgg ggtctgacgc tcagtggaaac gaaaactcac gtttaagggt tttggtcatg
1081 agattatcaa aaaggatctt cacctagatc cttttaaatt aaaaatgaag ttttaaatca
1141 atctaaagta tatatgagta aacttggtct gacagttacc aatgcttaac cagtggagca
1201 cctatctcag cgatctgtct atttcgttca tccatagttg cctgactccc cgtcgtgtag
1261 ataactacga tacgggaggg cttaccatct ggccccagtg ctgcaatgat accgcgagac
25 1321 ccacgctcac cggctccaga tttatcagca ataaaccagc cagccggaag ggccgagcgc
1381 agaagtggtc ctgcaacttt atccgcctcc atccagttc ttaattgttg ccgggaagct
1441 agagtaagta gttcgccagt taatagtttg cgcaacgttg ttgccattgc tacaggcatc
1501 gtggtgtcac gctcgtcggt tggtatggct tcattcagct ccggttccca acgatcaagg
1561 cgagttacat gatcccccat gttgtgcaaa aaagcgggta gctccttcgg tcctccgac
30 1621 gttgtcagaa gtaagttggc cgcagtggtt tcaactcatg ttatggcagc actgcataat
1681 tctcttactg tcatgccatc cgtaagatgc tttctgtgta ctggtgagta ctcaaccaag
1741 tcattctgag aatagtgtat ggcgcgaccg agttgctctt gccggcgctc aatacgggat
1801 aataccgcgc cacatagcag aactttaaaa gtgctcatca ttggaanaac ttcttcgggg
1861 cgaaaactct caaggatctt accgctgttg agatocagtt cgatgtaacc cactcgtgca
35 1921 cccaactgat cttcagcatc ttttactttc accagcgttt ctgggtgagc aaaaacagga
1981 aggcaaaatg ccgcaaaaaa gggaataagg gcgacacgga aatgttgaat actcatactc
2041 ttcctttttc aatattattg aagcatttat cagggttatt gtctcatgag cggatacata
2101 tttgaatgta tttagaaaaa taacaaataa ggggttcgcg gcacatttcc ccgaaaagtg
2161 ccacctgacg tctaagaaac cattattatc atgacattaa cctataaaaa taggcgtatc
40 2221 acgaggccct ttcgtctcgc gogtttcggt gatgacgggt aaaacctctg acacatgcag
2281 ctcccggaga cggtcacagc ttgtctgtaa gcggatgccg ggagcagaca agcccgctcag
2341 ggccgctcag cgggtgttgg cgggtgtcgg ggctggctta actatgcggc atcagagcag
2401 attgtactga gagtgcacca tatgcggtgt gaaataccgc acagatgcgt aaggagaaaa
2461 taccgcatca ggcgccattc gccattcagg ctgcgcaact gttgggaagg gcgatcgggtg
45 2521 cgggcctctt cgctattacg ccagctggcg aaagggggat gtgctgcaag gcgattaagt
2581 tgggttaacgc cagggttttc ccagtcacga cgttgtaaaa cgacggccag tggcaagctt
2641 gcatgcctgc aggtctcgtg gtggacttct ctcaattttc tagggggaac acccgtgtgt
2701 cttggccaaa attcgcagtc ccaaactctc agtcaactac caacttggtg tctccgattt
2761 tgtcctggtt atcgtcggat gtgtctgcgg cgttttatca tctttctctt catcctgctg
50 2821 ctatgcctcg gactctagag gatccccggg taccgagctc g (SEQ ID NO:3)

```

參考下述步驟以瓊脂膠電泳法來分析該複合體。係將 10 微毫升的核酸複合體載入水平的 1 %瓊脂膠中，以 0.5 倍的 TBE 緩衝液為電泳容液，於 4 伏特/公分 (V/cm) 的電壓下進行 8 小時的電泳分析。隨後以 0.5 微克/毫升之溴化乙錠對該膠體進行染色。將以紫外線 (UV) 照射該染色後的膠體，且透過一紅色濾片 (red filter) 拍攝該膠體。可觀察到該複合體之電泳結果中出現兩條明顯的帶狀信號 (bands)，且其分子大小分別為 10 kb (呈鬆散狀時) 與 4 kb (呈緊密狀時)。在同一膠體中確認出含有 HBVSAg 片段之核酸序列的大小約為 2.8 kb，以及 HBV 基因體之大小約為 3.2 kb。因此，該複合體之分子大小 (即呈鬆散狀時約為 10 kb 的大小) 會大於具有 HBVSAg 片段之核酸序列與 HBV 基因體大小的總合。

此外，根據下述步驟，利用 T7 核酸內切酶 I 來剪切 (digest) 該核酸複合體，使之成為片段狀。係混合 10 微毫升之核酸複合體與 2 單位之 T7 核酸內切酶 I (New England BioLabs, Inc., 商品編號 M0292S)，使其成為總體積 15 微毫升且含有 50mM 醋酸鉀 (potassium acetate)、20 mM 三羥甲基氨基甲烷醋酸鹽 (Tris-acetate, pH7.9)、10 mM 醋酸鎂 (magnesium acetate)、1 mM 二流蘇糖醇 (dithiothreitol, DTT) 之混合液，並將其置於 42 °C 下反應 1 小時。將反應後所得之片段狀複合體作為下一回合複合體生成反應的起始物。

### 其他較佳實施例

本說明書所揭露之所有特徵可以任何組合形式加以組合使用。本說明書中所揭露之每個特徵可以其他能達成相同、相等或相似目的之其他特徵來替代。因此，除非另有說明，文中所揭露之每個特徵僅是各種等效或相似特徵之範例。

習知技藝者可輕易地根據上述內容來確認本發明之必要特徵，且在不偏離本發明之精神與範圍下，對本發明作各種修飾與變化，以滿足各種用途與條件。因此，其他實施例亦為本發明所涵蓋。

### 【圖式簡單說明】

無

### 【元件代表符號簡單說明】

無

## 伍、中文發明摘要：

本發明關於一種交聯核酸複合體(croslinked nucleic acid complex)，其含有多個第一核酸、多個第二核酸與多個第三核酸，其中，與每個該些第二核酸相互補的每個該些第一核酸中，具有一段序列互補於每個該些第三核酸中的一位置。該些第一核酸與該些第二核酸之數目各約為該些第三核酸之數目的1至 $10^{12}$ 倍。以及該些第一、第二與第三核酸相互交聯以形成該核酸複合體。本發明亦揭露一種偵測方法，該方法中使用上述核酸複合體作為辨識特定核酸目標位置的一種偵測工具。

## 陸、英文發明摘要：

A nucleic acid complex that contains a plurality of first nucleic acids, a plurality of second nucleic acids, and a plurality of third nucleic acids, in which each of the first nucleic acids, complementary to each of the second nucleic acids, contains a sequence which is complementary to a site of each of the third nucleic acids; the number of the first nucleic acids and that of the second nucleic acids are each 1 to  $10^{12}$  times that of the third nucleic acids; and the first, second, and third nucleic acids are crosslinked to form the nucleic acid complex. Also disclosed is a detection method in which the above-described nucleic acid complex is used as a detectable means for identifying a specific nucleic acid target site.

## 拾、申請專利範圍：

1. 一種核酸複合體，其至少包括多個第一核酸、多個第二核酸、以及多個第三核酸，其中與每個該些第二核酸互補的每個該些第一核酸含有一序列，該序列與每個該些第三核酸之目標位置互補；以及該些第一核酸與該些第二核酸之數目各自約為該些第三核酸之數目的 1 至  $10^{12}$  倍；以及該些第一核酸、該些第二核酸及該些第三核酸會被交聯以形成該核酸複合體，該核酸複合體經過溴化乙錠染色後，當受到 518 毫微米之波長激發時，會放出波長 605 毫微米之螢光，且該螢光強度至少為該些非交聯之第一、第二及第三核酸之螢光強度的 10 倍。

2. 如申請專利範圍第 1 項所述之核酸複合體，其中該些第一核酸及該些第二核酸之數目各自約為該些第三核酸之數目的  $10^3$  至  $10^8$  倍。

3. 如申請專利範圍第 2 項所述之核酸複合體，其中該些第一核酸與該些第二核酸之長度各自約為 100 至 20,000 個核苷酸。

4. 如申請專利範圍第 3 項所述之核酸複合體，其中該些第一核酸與該些第二核酸之長度各自約為 200 至 8,000 個核苷酸。

5. 如申請專利範圍第4項所述之核酸複合體，其中該互補序列之長度約為10至20,000個核苷酸。

6. 如申請專利範圍第5項所述之核酸複合體，其中該互補序列之長度約為20至8,000個核苷酸。

7. 如申請專利範圍第2項所述之核酸複合體，其中該互補序列之長度約為10至20,000個核苷酸。

8. 如申請專利範圍第7項所述之核酸複合體，其中該互補序列之長度約為20至8,000個核苷酸。

9. 如申請專利範圍第3項所述之核酸複合體，其中該互補序列之長度約為10至20,000個核苷酸。

10. 如申請專利範圍第9項所述之核酸複合體，其中該互補序列之長度約為20至8,000個核苷酸。

11. 一種偵測核酸中之一目標位置的方法，其至少包括：

提供多個第一核酸、多個第二核酸、以及被懷疑含有一目標位置的多個第三核酸；其中與每個該些第二核酸互補的每個該些第一核酸含有一序列，該序列與每個該些第三核酸之目標位置互補；以及該些第一核酸與該些第二核

酸之數目各自約為該些第三核酸之數目的 1 至  $10^{16}$  倍；

若每個該些第三核酸含有該目標位置之序列時，則使該些第一、第二及第三核酸變性並定位在一平坦表面上，以幫助形成一交聯核酸複合體；以及

偵測是否有交聯核酸複合體產生。

12. 如申請專利範圍第 11 項所述之方法，其中該些第一核酸及該些第二核酸之數目各自約為該些第三核酸之數目的  $10^3$  至  $10^{13}$  倍。

13. 如申請專利範圍第 12 項所述之方法，其中該些第一核酸與該些第二核酸之長度各自約為 100 至 20,000 個核苷酸。

14. 如申請專利範圍第 13 項所述之方法，其中該些第一核酸與該些第二核酸之長度各自約為 200 至 8,000 個核苷酸。

15. 如申請專利範圍第 14 項所述之方法，其中該互補序列之長度約為 10 至 20,000 個核苷酸。

16. 如申請專利範圍第 15 項所述之方法，其中該互補序列之長度約為 20 至 8,000 個核苷酸。

17. 如申請專利範圍第 16 項所述之方法，其中該變性步驟係將該些第一、第二以及第三核酸混入一鉗合性水溶劑中。

18. 如申請專利範圍第 17 項所述之方法，其中該定位步驟係在該鉗合性水溶劑中加入一疏水性有機溶劑，以在該兩溶劑之間的界面上形成該平坦表面。

19. 如申請專利範圍第 18 項所述之方法，其中該疏水性有機溶劑為正丁醇、第三戊醇、環己醇、酚、對甲氧基酚、苯甲醇、苯胺、吡啶、嘌呤、3-胺基三唑、丁醯胺、己醯胺、硫代乙醯胺、 $\delta$ -戊內醯胺、第三丁基脲、次乙基硫脲、丙烯硫脲、硫脲、氨基甲酸乙酯、*N*-丙基氨基甲酸乙酯、*N*-甲基氨基甲酸乙酯、氰代亞氨基甲二胺或其組合物。

20. 如申請專利範圍第 19 項所述之方法，其中該疏水性有機溶劑為苯胺。

21. 如申請專利範圍第 18 項所述之方法，其中該鉗合性水溶劑含有  $Mg^{2+}$ 、 $Ca^{2+}$ 、 $Na^{+}$ 、 $K^{+}$ 、 $NH_4^{+}$ 、 $Cs^{+}$ 、 $Li^{+}$ 、 $(CH_3)_4N^{+}$  或其組合物。

22. 如申請專利範圍第 18 項所述之方法，其中該鉗

合性水溶劑含甲苯磺酸酯<sup>-</sup>、 $\text{Cl}_3\text{CCOO}^-$ 、 $\text{SCN}^-$ 、 $\text{ClO}_4^-$ 、 $\text{I}^-$ 、 $\text{Br}^-$ 、 $\text{Cl}^-$ 、 $\text{BrO}_3^-$ 、 $\text{CH}_3\text{COO}^-$ 、 $\text{HSO}_3^-$ 、 $\text{F}^-$ 、 $\text{SO}_4^-$ 、 $(\text{CH}_3)_3\text{CCOO}^-$ 、 $\text{HPO}_4^-$ 或其組合物。

23. 如申請專利範圍第 22 項所述之方法，其中該鉗合性水溶劑含有  $\text{SCN}^-$ 。

24. 如申請專利範圍第 12 項所述之方法，其中該變性步驟係將該些第一、第二以及第三核酸混入一鉗合性水溶劑中。

25. 如申請專利範圍第 24 項所述之方法，其中該定位步驟係在該鉗合性水溶劑中加入一疏水性有機溶劑，以在該兩溶劑之間的界面上形成該平坦表面。

26. 如申請專利範圍第 25 項所述之方法，其中該偵測步驟係以一雙股 DNA 嵌入性螢光染料對該交聯核酸複合體進行染色後，偵測該交聯核酸複合體所發出之螢光強度。

27. 一種以一方法製備而成的交聯核酸複合體，該方法至少包括：

提供多個第一核酸、多個第二核酸、以及多個第三核酸；其中與每個該些第二核酸互補的每個該些第一核酸含

有一序列，該序列與每個該些第三核酸中之位置互補；以及該些第一核酸與該些第二核酸之數目各自約為該些第三核酸之數目的 1 至  $10^{16}$  倍；以及

使該些第一、第二及第三核酸變性且定位在一平坦表面上，以幫助一交聯核酸複合體之形成，該核酸複合體經過溴化乙錠染色後，當受到 518 毫微米之波長激發時，會放出波長 605 毫微米之螢光，且該螢光強度至少為該些非交聯之第一、第二及第三核酸之螢光強度的 10 倍。

28. 如申請專利範圍第 27 項所述之交聯核酸複合體，其中該些第一核酸及該些第二核酸之數目各自約為該些第三核酸之數目的  $10^3$  至  $10^{13}$  倍。

29. 如申請專利範圍第 28 項所述之交聯核酸複合體，其中該變性步驟係將該些第一、第二以及第三核酸置於一鉗合性水溶劑中。

30. 如申請專利範圍第 29 項所述之交聯核酸複合體，其中該定位步驟係在該鉗合性水溶劑中加入一疏水性有機溶劑，以在該兩溶劑之間的界面上形成該平坦表面。

31. 如申請專利範圍第 30 項所述之交聯核酸複合體，更至少包括自該水溶劑與該疏水性有機溶劑之混合物中萃取該交聯核酸複合體。

32. 如申請專利範圍第 30 項所述之交聯核酸複合體，其中該疏水性有機溶劑為正丁醇、第三戊醇、環己醇、酚、對甲氧基酚、苯甲醇、苯胺、吡啶、嘌呤、3-氨基三唑、丁醯胺、己醯胺、硫代乙醯胺、 $\delta$ -戊內醯胺、第三丁基脲、次乙基硫脲、丙烯硫脲、硫脲、氨基甲酸乙酯、*N*-丙基氨基甲酸乙酯、*N*-甲基氨基甲酸乙酯、氰代亞氨基甲二胺或其組合物。

33. 如申請專利範圍第 32 項所述之交聯核酸複合體，其中該疏水性有機溶劑為苯胺。

34. 如申請專利範圍第 30 項所述之交聯核酸複合體，其中該鉗合性水溶劑含有  $Mg^{2+}$ 、 $Ca^{2+}$ 、 $Na^{+}$ 、 $K^{+}$ 、 $NH_4^{+}$ 、 $Cs^{+}$ 、 $Li^{+}$ 、 $(CH_3)_4N^{+}$  或其組合物。

35. 如申請專利範圍第 30 項所述之交聯核酸複合體，其中該鉗合性水溶劑含甲苯磺酸酯<sup>-</sup>、 $Cl_3CCOO^{-}$ 、 $SCN^{-}$ 、 $ClO_4^{-}$ 、 $I^{-}$ 、 $Br^{-}$ 、 $Cl^{-}$ 、 $BrO_3^{-}$ 、 $CH_3COO^{-}$ 、 $HSO_3^{-}$ 、 $F^{-}$ 、 $SO_4^{-}$ 、 $(CH_3)_3CCOO^{-}$ 、 $HPO_4^{-}$  或其組合物。

36. 如申請專利範圍第 35 項所述之交聯核酸複合體，其中該鉗合性水溶劑含有  $SCN^{-}$ 。

37. 如申請專利範圍第 30 項所述之交聯核酸複合體，其中該些第一核酸與該些第二核酸之長度分別約為 100 至 20,000 個核苷酸。

38. 如申請專利範圍第 37 項所述之交聯核酸複合體，其中該些第一核酸與該些第二核酸之長度各自約為 200 至 8,000 個核苷酸。

39. 如申請專利範圍第 38 項所述之交聯核酸複合體，其中該互補序列之長度約為 10 至 20,000 個核苷酸。

40. 如申請專利範圍第 39 項所述之交聯核酸複合體，其中該互補序列之長度約為 20 至 8,000 個核苷酸。

41. 如申請專利範圍第 37 項所述之交聯核酸複合體，其中該互補序列之長度約為 10 至 20,000 個核苷酸。

42. 如申請專利範圍第 41 項所述之交聯核酸複合體，其中該互補序列之長度約為 20 至 8,000 個核苷酸。

43. 一種多相系統，其至少包括分成兩相之一疏水性有機溶劑與一鉗合性水溶劑，以及位在該有機溶劑與該水溶劑之界面的多個核酸，其中該有機溶劑與水溶劑可幫助該些核酸之變性與定位。

44. 如申請專利範圍第 43 項所述之多相系統，其中該疏水性有機溶劑為正丁醇、第三戊醇、環己醇、酚、對甲氧基酚、苯甲醇、苯胺、吡啶、嘌呤、3-胺基三唑、丁醯胺、己醯胺、硫代乙醯胺、 $\delta$ -戊內醯胺、第三丁基脲、次乙基硫脲、丙烯硫脲、硫脲、氨基甲酸乙酯、*N*-丙基氨基甲酸乙酯、*N*-甲基氨基甲酸乙酯、氰代亞氨基甲二胺或其組合物。

45. 如申請專利範圍第 44 項所述之多相系統，中該疏水性有機溶劑為苯胺。

46. 如申請專利範圍第 43 項所述之多相系統，其中該鉗合性水溶劑含有  $Mg^{2+}$ 、 $Ca^{2+}$ 、 $Na^{+}$ 、 $K^{+}$ 、 $NH_4^{+}$ 、 $Cs^{+}$ 、 $Li^{+}$ 、 $(CH_3)_4N^{+}$  或其組合物。

47. 如申請專利範圍第 43 項所述之多相系統，其中該鉗合性水溶劑含有甲苯磺酸酯<sup>-</sup>、 $Cl_3CCOO^{-}$ 、 $SCN^{-}$ 、 $ClO_4^{-}$ 、 $I^{-}$ 、 $Br^{-}$ 、 $Cl^{-}$ 、 $BrO_3^{-}$ 、 $CH_3COO^{-}$ 、 $HSO_3^{-}$ 、 $F^{-}$ 、 $SO_4^{-}$ 、 $(CH_3)_3CCOO^{-}$ 、 $HPO_4^{-}$  或其組合物。

48. 如申請專利範圍第 47 項所述之多相系統，其中該鉗合性水溶劑含有  $SCN^{-}$ 。

49. 如申請專利範圍第 43 項所述之多相系統，其中該疏水性有機溶劑為正丁醇、第三戊醇、環己醇、酚、對甲氧基酚、苯甲醇、苯胺、吡啶、嘌呤、3-胺基三唑、丁醯胺、己醯胺、硫代乙醯胺、 $\delta$ -戊內醯胺、第三丁基脲、次乙基硫脲、丙烯硫脲、硫脲、氨基甲酸乙酯、*N*-丙基氨基甲酸乙酯、*N*-甲基氨基甲酸乙酯、氰代亞氨基甲二胺或其組合物；以及該鉗合性水溶劑含有甲苯磺酸酯<sup>-</sup>、 $\text{Cl}_3\text{CCOO}^-$ 、 $\text{SCN}^-$ 、 $\text{ClO}_4^-$ 、 $\text{I}^-$ 、 $\text{Br}^-$ 、 $\text{Cl}^-$ 、 $\text{BrO}_3^-$ 、 $\text{CH}_3\text{COO}^-$ 、 $\text{HSO}_3^-$ 、 $\text{F}^-$ 、 $\text{SO}_4^-$ 、 $(\text{CH}_3)_3\text{CCOO}^-$ 、 $\text{HPO}_4^-$ 或其組合物。

50. 如申請專利範圍第 43 項所述之多相系統，其中該些核酸包含多個第一核酸及多個第二核酸，每個該些第一核酸與每個該些第二核酸互補。

51. 如申請專利範圍第 43 項所述之多相系統，其中該些核酸包含來自一樣品之多個第三核酸，每個該些第三核酸含有一位置與每個該些第一核酸之一序列互補。

52. 如申請專利範圍第 50 項所述之多相系統，更至少包含來自一樣品之多個第三核酸，每個該些第三核酸含有一位置與每個該些第一核酸之一序列互補。

53. 如申請專利範圍第 49 項所述之多相系統，其中

該些核酸包含多個第一核酸、多個第二核酸、以及來自一樣品之多個第三核酸，每個該些第一核酸與每個該些第二核酸互補，且每個該些第一核酸含有一序列與每個該些第三核酸之一位置互補。

柒、指定代表圖：

(一)、本案指定代表圖為：無。

(二)、本代表圖之元件代表符號簡單說明：

無

本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

無