

20352
五、發明說明 (1)

本申請案為系列號 0 7 / 4 7 0 , 6 7 4 之部份連續案，標題為利用連接酶鏈反應放大標的核酸之改良方法，公告於 1 9 9 0 年 1 月 2 6 日，其享有一般的所有權，且在此列為本案參考之用。

背景

本發明是有關放大標的核酸之方法，且特別是進行連接酶或聚合酶鏈反應放大作用之方法，其中至少一個探針或引子在反應起始位置上被可逆地修飾，因而其非酵素催化反應之受質。可供示例之處理修飾包括反應基團之化學阻斷，添加一個以上之核酸鹼基以形成“突出物”，或缺乏一個以上之核酸鹼基以形成“凹處”。此經修飾之末端可避免或減少標的物依賴性偽裝訊號之發展，且後來以標的依賴性方式校正以使進行放大作用。

於許多例子，以核酸為基礎之診斷分析法之可行性是依據放大由僅數分子標的物所產生訊號之能力而定。雖然訊號放大作用是一個潛在的解決方法，標的物放大常是以核酸為基礎之分析法中的較佳解決方法。標的物放大作用涉及被命名為標的物之核酸段落之重覆仿倣或複製。

於稱之為聚合酶鏈反應 (P C R) 之標的物放大作用技術中，多量使用一對引子 (一個第一及一個第二) ，以與標的的核酸互補股之外側端雜交。各自引子由聚合酶伸展，採用標的核酸為模板。伸展產物本身變成標的序列，接著自原來的標的股解離。新的引子再雜交並由聚合酶伸

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝
訂
線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明 (2)

展，重覆此循環以幾何地增加標的序列分子之數目。PCR 進一步描述於美國專利第 4, 683, 195 及 4, 683, 202 號中。

標的物擴大作用的另一個機制，已知為連接酶鏈反應 (LCR)。於 LCR，過量使用二個第一 (一號及二號探針) 及二個第二 (三號及四號) 探針。一號探子與標的股的第一段雜交，二號探子與標的股的第二段雜交，第一及第二段是連續的，如此第一探針以 5' 磷酸 - 3' 羥基之相互關係互相緊靠，且如此連接酶可共價地融合或連接二個探針成一個融合產物。此外，三號 (第二) 探針與一號探針雜交，四號 (即第二) 探針與二號探針以相似之緊靠方式雜交。當然，若標的物最初是雙股的，第二探針也可與互補於第一例中之標的物雜交。一旦第一探針之融合股自標的股分出來，其可與三及四號探針雜交，其連接形成一個互補的，第二個融合的產物。為了了解 LCR 及此處所述之改良方法，了解融合產物係與標的物或其互補物官能上相當是十分重要的。藉著雜交及連接之重覆循環，可達成標的序列之放大作用。此技術詳述於 EP - A - 3 20 308 中，其全部揭示已列為本案參考之用。

放大作用反應的一個大力量是其偵測極少數標的分子之能力。然而，很重要的一點是放大作用過程必須具高度特異性，因為非標的序列加上訊號之放大，可潛在地破壞放大過程之可信度。PCR 及 LCR 均可產生甚至放大非特異性或偽裝之背景訊號。由於 PCR 及 LCR 不同的原

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝
訂
線

五、發明說明 (3)

則，因此互相間之背景訊號來源不同，將分別討論。

與連接酶鏈反應相關的一個潛在問題是由標的物獨立地與探針連接所致之背景訊號。由於三號探針與二號探針雜交，且四號探針與二號探針雜交，探針當多量加入時可在其中很容易造成雙聯式。這些雙聯物會不顧標的物之存在而連接形成一個融合產物，其則與欲求之放大標的物無可區別，然其仍可以支持進一步的放大作用。雖然這些雙聯物不顧標的物之平齊端連接作用是極罕有事件，但足以共通地造成診斷分析中不必要之高背景訊號。

於 P C R 中共同確認的偽裝背景訊號來源，是引子序列與非放大之 D N A 分子區域之雜交作用。通常這些雜交之所以發生是因為標的樣品除了標的序列本身以外，尚含有與標的序列具某程度相似性之其他序列。雖然引子與這些相似序列之雜交並不如標的序列般可能，但乃有某程度之雜交。當此種非欲求之非特異性雜交發生時，若引子分子的 3' 末端核苷酸成功地與標的分子之互補核苷酸雜交，則引子伸展作用可能由聚合酶成功地啓動，造成異於標的序列之寡核苷酸生成。在某些狀況下，此種核苷酸甚至可進行對數地放大作用。不論放大與否，在某些分析狀況下，偽裝之核苷酸序列可被當做標的序列，且因此造成錯誤的結果。

發明要點

雖然探針及引子在 L C R 及 P C R 中分別有顯著不同

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝
訂
線

五、發明說明(4)

的角色，而此處所應用的“起始子”及“探子／引子”一詞是一般討論可應用的。本發明的第一個目的是藉著降低偽訊號產生之發生率，以增進以核酸為基礎分析法之靈敏性。此目的藉著修飾至少一個探子／引子末端而符合於本發明，如此由於探子／引子所造成偽訊號展開之可能性即大大地減低。只有當經修飾之探子／引子與標的物特異雜交後，經修飾之末端才以一種標的物依賴的方式進行“校正”，以令探子／引子可參與酵素性放大反應中。

本發明的一個特色，用於LCR或PCR，係提出核酸探子／引子，其中一個化學部份阻斷或遮蓋一個必須涉及於放大反應中酵素催化步驟之基團。此酵素步驟係指LCR中的連接作用，及PCR中之伸展或延伸作用。不論在何種情況下，探子／引子可與標的物雜交，並起始酵素反應（因此稱之為“起始子”），且經連接或伸展之產物稱之為“放大產物”。選擇阻斷基團，如此只有當探子／引子與標的物雜交時，其才可被酵素所移去。在另一方面，修飾探子／引子使一端含有額外鹼基之突出物。之後鹼基以一種標的物依賴方式解離，以令放大反應可發生。

依據LCR特有的另一特色，探子在相對於連接點有凹處，其與標的物雜交時可造成一個裂口。此裂口再以標的物依賴方式充填，使探子可連接。裂口充填可由一種以上探子伸展而完成，或使用額外的四號及五號探子，再行連接作用。

本發明的另一方面是提出區別第一序列及第二序列的

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝
訂
線

203522

五、發明說明 (5)

改良方法，二者的差異只在標的區域中的一個單一鹼基。可將第一序列看做一個標的物，第二序列可被視為一個潛在的交叉反應股而被區分出來。

簡言之，本發明是有關酵素性放大標的核酸序列之方法以生成放大產物，其中酵素利用：一個核酸起起子；可與其雜交而當成模板的標的序列或放大產物；及至少一個額外的含核苷之反應物，當做建築材料以酵素性組合互補於標的物之放大產物，放大產物本身當做進一步的模板；其中改良方法包括：

(a) 提出可與標的物雜交之必要起始子，其中至少一個起始子被修飾，如此當起始子雜交時，酵素實質上無法作用於起始子上當其受質，如此放大產物無法被組合；

(b) 標的物若存在時，將起始子與之雜交，以形成一個起始子一模板複合物；

(c) 以一種標的依賴方式校正修飾作用，以令起始子一模板複合物可為酵素所作用；

(d) 酵素性組合放大產物；及

(e) 自標的物中解離放大產物，並重覆雜交，校正及組合步驟以擴大欲求之標的序列。

因此，所使用的“起始子”係指於PCR中所用的引子或LCR中所用的一個以上的探子。當用於伸展作用／延伸作用內容時，含核苷之反應物包括核苷三磷酸或其類似物。當用於連接作用內容時，起始子只包括一對配對探子中的一個探子（即一個第一探子及／或一個第二探子）

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝
訂
線

五、發明說明 (6)

，而含核苷之反應物包括一個第二寡核苷酸探子（即成對之另一配對探子，其最終與起始子連接）。

修飾之校正依據所做的修飾而定。然而，為了可完全了解本發明的益處，校正必須在實質上經修飾之起始子與標的或放大產物雜交時才進行，後者之放大產物由酵素性組合而成，任一者均可當做正確的模板。因此，校正係“依賴模板的”。校正及組合用試劑以下有詳述。

附圖簡要說明

圖 1 為先前技藝已知之連接酶鏈反應之過程。

圖 2 A 及 B 代表突出之具體實例，其中 R 代表阻斷部份，且“r B r B r B”代表核糖核苷酸伸展作用。

圖 3 代表第二具體實例之單一裂口變化。

圖 4 代表第二具體實例之一般化雙重裂口變化。

圖 5 代表第二具體實例之第三種變化，利用額外的探子以充填裂口。

詳細說明

針對本發明目的，所描述的標的序列是單股的。然而，應了解此中包括標的確實是雙股的，但在與探子／引子雜交前先簡易地自其互補物中分離。於雙股標的物例子中，第二探子（於 L C R 是三號及四號探子，A' 及 B'；於 P C R 是額外的引子，B）藉著與標的互補物雜交也參與於起始步驟。於單股標的物例子，第二探子或引子不參

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

· · · · · · 裝 · · · · · · 訂 · · · · · · 線 · · · · · ·

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明(7)

與起始雜交步驟，但可參與接續的雜交步驟。標的序列可包括去氧核糖核酸(DNA)或核糖核酸(RNA)。

本案前後文中，所設計之“引子”(´)用來表示互補的鹼基或序列。一個探子或引子若與序列雜交則是“互補”於另一序列，且在已雜交區域中有實質上互補之鹼基對。因此，探子A可互補於A´，即使其有未與A´相連之末端。對B與B´亦然。同樣地，短序列X_n及Y_m分別具有互補序列，命名為X_n´及Y_m´。最後，一個單一鹼基，如Q´之互補物命之為Q´。關於此處所用之序列，“互補”包括在雜交區中有未配對鹼基對之序列，但其可在分析條件下使之雜交。

也要了解，“4鹼基”一詞於內容是DNA時應指鳥嘌呤(G)，胞嘧啶(C)，腺嘌呤(A)及胸腺嘧啶(T)；而於內容是RNA時，指的是鳥嘌呤(G)，胞嘧啶(C)，腺嘌呤(α)，及尿嘧啶(U)。此名詞也包括上文命名鹼基之類似物及衍生物。雖然，簡併的鹼基—肌苷(I)也可應用於本發明中，但依據本發明最好不要在探子的經修飾部份中使用I。

I. L C R

述及LCR，其為本發明一個重要特色，其中不採用可形成平齊端雙聯體的二對探子，探子對之一的至少一個探子，最初包括一個“經修飾的”末端，其使所生成的雙聯體“非平齊”及/或非連接酶所催化之二探子雙聯體融

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝
訂
線

五、發明說明 (8)

合物中之適當受質。一個“經修飾的末端”係基於連接作用點而定義，並非基於其互補之探子。一個“經修飾的末端”具有(1)在一基團上(如5'磷酸或3'羥基)有一個阻斷部份(或額外的鹼基殘基)，其在一般的LCR條件下必須參與於連接酶催化之融合作用(如圖2A及2B中之探子A)；或(2)省略掉之鹼基，以在一個探子末端及下一個探子末端之間形成一個“裂口”(如圖3之探子B；圖4之探子A'及B；及圖5中之探子D及E)。

基於本發明案方便起見，將第一種型式之經修飾末端稱之為“突出物”，突出物為一個額外的阻斷部份或額外的鹼基殘基，其當與標的序列雜交可伸展在連接作用點之外。“突出物”一詞，並不應與其互補一個探子之伸展者搞混，原因在於其未必是相連的事實。第二種型式之經修飾末端，在此稱之為“凹處”，凹處為二個第一或第二探子於雜交至標的物後，其間之裂口。這些經修飾末端之存在，可減少互補探子雙聯體於標的物不存在時互相間平齊端連接所造成之偽陽性訊號。

修飾處理之“校正”係實質地進行，以使探子成為可連接的。此處所用的“校正”係指以一種標的依賴方式，使二個第一探子或二個第二探子可與其配對連接。因此，只有這些可與標的，標的互補物，或由其中形成之聚核苷酸序列雜交之探子才可被“校正”。“校正”可以許多方法完成，依所使用之經修飾末端型式而定。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝
訂
線

03582

A 6
B 6

五、發明說明 (9)

此中所用的“連接點”或“連接欲求點”係指二個探子配對間的一個特殊位置，其係以一種模板一依賴方式連接。在此位置，“經校正”之探子以5' - 磷酸 - 3' 羥基之相互關係緊靠其配對。對4個LCR探子的一每一組而言，有二個“連接點”，一點給第一探子配對，一點給第二探子配對。於傳統的LCR中，此二個連接點互相對應，因此當探子對互相雜交時可形成平齊端之雙聯體。於本發明中，連接點只有在“突出物”具體實例中可互相對立。其在“凹處”具體實例中靠著裂口而被一個以上鹼基取代。連接作用的確實點依具體實例而定，且因此此名詞於每一具體實例中被進一步定義。

每一探子可包括去氧核糖核酸(DNA)或核糖核酸(RNA)。利用傳統的核苷酸胺基磷酸化學合成欲求的探子是例常的工作，且儀器可購自Applied Biosystems, Inc., (Foster City, CA); DuPont (Wilmington, DE), 或Miliqen, (Bedford, MA)。探子5'端之磷酸化作用，雖然必須依賴連接酶之連接作用，但也可利用激酶完成，如技藝中已知的。

在本案前後文中，鹼基X, Y及Q, 及其互補物如所述係選自4鹼基中的某些亞集(N或M)。實際上序列並非“選擇”的，而是由標的股之序列所指令。在本內容中“選擇的”一詞意表具有欲求特性之標的序列座落處，且探子包圍在標的序列適當片段處構築。

一般而言，本發明的方法包括以下之重覆步驟：(a

.....
 (請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

.....
 裝.....訂.....線.....

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明 (10)

) 將經修飾之探子與標的物雜交 (且, 若是雙股則存在有標的互補物, 則與標的互補物雜交); (b) 以標的依賴方式校正修飾以使探子可連接; (c) 將經校正之探子與其配對連接以形成一個融合的或連接產物; 及 (d) 自標的中解離融合產物, 並重覆雜交, 校正及連接步驟以放大欲求之標的序列。步驟 (a), (c) 及 (d) 基本上在所有具體實例中均相同, 且可一起討論。其通常為可應用於傳統 L C R 之相同步驟。步驟 (b) 依所應用的處理修飾型式而變化, 且每一種不同型式將分別討論。

經修飾探子與標的之雜交 (及任意至標的互補物) 在先前技藝中有足夠的解釋; 如 E P - 3 2 0 3 0 8。探子長度, 探子濃度及條件的迫切性均影響雜交可發生之程度及速率。最好, 探子夠長可提供欲求之特異性; 即避免與樣品中之任意序列雜交。典型而言, 長 1 5 至 1 0 0 個鹼基之探子可用於此目的。目前較佳者為長約 1 5 至約 4 0 個鹼基之探子。

探子以大約等莫耳濃度加入, 因預期其可化學計量地反應。每一探子存在的濃度範圍為約 5 毫微莫耳濃度 ($n M$) 至約 $9 0 n M$; 最好是約 $1 0 n M$ 至約 $3 0 n M$ 。用於每一反應中之探子最適當量也依據循環數而定, 此循環數目係指必須進行之循環。對一般精於此技藝人士可容易地決定出最佳濃度。

條件之迫切性對於技藝人士通常是已知的, 但依溫度, 溶劑及其他變數而定。在這些變數中最容易控制的可能

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

五、發明說明 (11)

是溫度，因此溫度通常是 L C R 進行中變化最迫切之變數。由於進行本發明所需之迫切條件和一般 L C R 的不同，進一步詳述確實無必要，例常之參與者可由以下之實例引導。

於一般方法中之下一步驟是緊接著特異校正步驟，且包括一個探子與其相鄰配對之連接作用。因此，每一第一探子連接至其相關之第一探子，且每一個第二探子連接至其相關的第三探子。一個“相鄰”的探子為可以連續方向與標的雜交的二個探子中任一個，其中一個以其經磷酸化之 5' 端與另一配對探子之 3' 經基端緊接。經修飾之末端經由標的依賴方式校正後可產生“相鄰”的探子。由於酵素性連接為二相鄰探子共價粘附之較佳方法，因此“連接作用”可應用於本案全文中。然而，“連接作用”為一般說明，且要了解包括二探子共價粘附的任何方法。若酵素性連接作用不同的另一方法為先一連接作用，述於 E P - A - 3 2 4 6 1 6 中。

進行較佳酵素性連接作用步驟之條件及試劑，對於一般精於此技藝人士是已知的，且述於所述參考文獻之背景中。可用於本發明中之連接試劑包括原核動物之連接酶，如大腸桿菌連接酶，T₄ 連接酶及嗜熱菌連接酶（如 A T C C 2 7 6 3 4），教示於 E P - 3 2 0 3 0 8。係一種目前為較佳的連接酶，因其在 L C R 熱循環中仍有保持活性之能力。缺乏熱穩定之連接酶，則於每次循環重覆時要再加連接酶。真核細胞之連接酶也可使用，包括果蠅

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

五、發明說明 (12)

之 DNA 連接酶，由 Rabin et al., 報告於 J. Biol. Chem. 261: 10637-10647 (1986)。

一旦經連接，融合的探子自標的解離（如熔化），且於傳統 LCR 時此過程重數次。重覆循環之次數可由 1 變化至約 100，目前則以由約 15 至約 70 為較佳。

希望可設計探子，如此當與其互補的（第二）探子雜交時，遠離欲求連接點之末端，但本身不會自由參與其他要的連接反應。因此可避免可連接之不齊或平齊端。若必須使用此種末端，則應避免或消除游離的 5' 末端磷酸。此可經由合成寡核苷酸探子（其正常情況下不帶 5' 末端磷酸基）或經由磷酸酶之使用除去末端磷酸（如由 DNA 限解酶水解而生成之寡核苷酸中獲得）而完成。此外，探子“錯誤的”外側端連接作用，可藉著以“鉤子”或標誌部份阻斷至少一個探子之末端而予以避免，此在下文中將詳述。

經由放大作用後，經放大的序列可由技藝上已知的各種傳統方式偵測。於一個特別佳方式中，鉤子粘附在至少二個探子可應用的外側端（融合產物之相對末端），且最好是所有四個探子的外側端。“鉤子”為具有特異配位—受體親和力的任一部份。典型而言，位於融合產物一端之鉤子（如 A 之 5' 端及 A' 之 3' 端）包括一個抗原或半抗原，可被塗覆在固相的試劑（如抗體或抗生物素）所固化。位於另一端之鉤子（如 B 之 3' 端及 B' 之 5' 端）含有一個不同的抗原或半抗原，可被標誌或標誌系統所確

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝
訂
線

203587

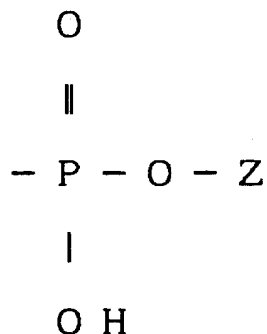
五、發明說明 (13)

認，如抗體 - 酵素共軛物。鈎子的實例包括：生物素，螢光素及異脛基洋地黃毒苷 (digoxin)，及其他許多技藝中已知的。之後再加入受質，其為酵素轉化成一個可偵測的產物。EnZo 的 EP - A - 330 221 號中描述寡核苷酸，在其一末端粘附有生物素分子。

A. 突出的經修飾末端

如所述的，一個第一具體實例涉及一個經修飾的末端，其中阻斷部份或額外的鹼基加至至少一個探子，超過欲求連接作用的點。阻斷部份或額外的鹼基包括“突出處”，且是無法進行平齊端連接作用之理由。於第一變化中，突出物包括一個化學阻斷作用物，R。

熟知的，標準的 DNA 連接酶反應必須在受股部份，在連接點有一個 3' 羥基及一個 5' 磷酸。許多處理修飾，特別是在 3' 羥基已知可引入一個 R 基，其可使經修飾的末端無法參與連接反應，但當經修飾股為雙股結構中的一部份時其可被除去。此種修飾作用包括以下示例之 R 基，粘附至 3' 羥基氧以取代氫原子：



(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明 (14)

其中 Z 選自下列包括：-H；- (CH₂)_nCHO，其中 n 是由 1 至約 3，最好是 1 或 2；一脫氧核糖；及一二脫氧核糖。

探子的合成，此探子具有適於被 R 基修飾之末端，此係技藝中熟知的。例如，具有 3' 磷酸基之寡核苷酸之化學合成，述於 Markiewicz and Wyrzykiewicz, Nucl. Acids Res. 17 : 7149 - 7158 (1989)。較大的阻斷基，其具有阻斷 3' 磷酸基不受非特異磷酸酶作用的好處，其可存在於某些實例中，其可由寡核苷酸探子以末端轉移酶及 dUTP 或 ddUTP 反應，再經尿嘧啶糖基化酶處理而合宜地製備。尿嘧啶糖基化酶之純化教示於 Lindahl 等人, J.B.C. 252 : 3286 - 3924 (1977)。於 dUTP 加成作用例子中，以強鹼處理再用尿嘧啶糖基化酶處理可用來製備糖基醛衍生物。要了解，上述所給之 R 基團實例只供說明而已，且一般有技藝人士可合成許多變化型式，仍一樣可處理得很好。

酵素核酸內切酶 I V (Siwek, et al., Nucl. Acids Res. 16 : 5031 - 5038 (1988)) 可除去此種阻斷基且曝出 3' 羥基，這實質上只有當含有阻斷基之股與互補股雜交時才會如此。雖然經修飾末端之不需要標的之校正作用極少，此校正作用係由於核酸內切酶 I V 於 AA' 或 BB' 雙聯式之活性所致，若必要時，其可設計互補於經修飾末端之探子而予以進一步減少，因如此其

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

五、發明說明 (15)

可為一種以上的核苷酸所隱藏。

於突出末端的另一變化中，突出物包括額外的核酸鹼基，一旦探子與標的雜交時其可被解離。突出物可經由其位於連接作用欲求點之外突而可避免被連接，並立體化學地阻斷或遮斷基團，其係強制地參與於連接酶反應中（如經阻斷末端中所述）。將此與上述的簡易化學阻斷區別者，是在於“阻斷”基之本質及大小（即突出物）。其本來即是由與探子分子相關之核酸殘基所組成的。然而，基團的大小，太大以致當與標的雜交時，令分子之經修飾末端不能留在連接點近處。再者，由於突出物是可移動的，其可經由設計使其根本無法參與於連接酶所催化的反應中（如可使其5'磷酸基缺乏）。

描述三類突出物，雖然選擇係僅供說明而已。精於此技藝人士可了解其他可類似地除去突出物之酵素，而以完全類似方式使用。實例如下：

1. 一個突出物基本上含有核糖核苷酸
（當標的物由DNA組成）；
2. 一個突出物含有一個降低的位置；及
3. 一個突出物含有一個鹼基，其造成與標的中一個鹼基的不配對鹼基對。

然而一般而言，突出物必須互補於標的，如此其除去可如下述之模板依賴性。突出物可含1 - 10個鹼基，最好長1 - 5個鹼基。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝
訂
線

五、發明說明 (16)

1. 核糖核苷酸修飾作用。含有核糖核苷酸之DNA寡核苷酸的合成，述於Atabekov, et al, FEBS Let 232: 96-98 (1988)。DNA探子，含有由核糖核苷酸殘基伸展所組成之經修飾末端者，可用於本發明中。核糖核苷酸無法呈現一個供連接酶之適當受質，且經修飾之探子無法被連接或放大，這些伸展作用可在所選用探子之5'或3'端。

“校正”是核糖核苷酸之除去。稱之為核糖核酸酶H之酵素已知自然界中廣泛分佈。其中一種核糖核酸酶H可購自Sigma化學公司(Cat# R6501)。此種酵素可自核酸股中將核糖核苷酸選擇性除去，其中只有當(且實質上也是如此)該股與DNA一股雜交時才存在。雖然對於是否一個特殊的核糖核酸酶(RNase)除去一股上所有的，或是除一個核糖核苷酸外所有的核糖核苷酸仍有爭議，但此點通常無所謂，因為已知至少有某些連接酶(如T₄連接酶)可將核糖核苷酸與脫氧核糖核苷酸連接。對任一特殊的RNase H而言，針對LCR目的可很容易地決定其到底是留下零個或一個核糖核苷酸殘基。我們只需製成二個經核糖修飾的LCR探子組，依據酵素移去所有的，或除一個以外的所有核糖核苷酸為基準而設計，並決定於每一例子中LCR反應之進行。一旦設定，之後即如設定酵素行為。實際上，不同的RNase H種類在3'或5'處理修飾上多少是可易控制的。對任一給定之RNase H種類，此是可由經驗容易地決定

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝
訂
線

五、發明說明 (17)

。此種核糖核苷酸經修飾探子可用於LCR反應。當二個探子配對雜交在標的之相鄰區域，其無法由連接酶相接，且除非或直到RNase H“校正”——即自經修飾之探子除去核糖核苷酸為止。當核糖核苷酸是位於探子的5'端時，內部的磷酸基可曝出，當做連接酶反應中之受質。此排除探子加上此種5'磷酸之特殊步驟。

一旦連接，經融合的探子如一個新標的物般作用，如同在標準LCR中。

2. 未配對位置之解離。各種廣泛分佈的酵素（如核酸內切酶IV；Simek et al., 上文）可解離位於未配對位置處之單股DNA，實質上只有當DNA與其互補物雜交呈雙聯式時才如此。帶有降低位置之寡核苷酸之合成，由Takeshita et al JBC 262: 10171-10179 (1987) 中已有述。可合成經修飾之寡核苷酸探子，如此可在欲貢獻其5'端之探子上緊鄰連接點5'處定出一個未配對位置，或在欲貢獻其3'端之探子上緊鄰連接點3'處定出一個未配對位置。在何種情況下，均可設計互補股以致當一起雜交時，二個探子將不致使標的物之未配對位置被所使用之酵素獨立地解離。可設計帶有二個連接點短分支之探子組，如此除了當探子與真實之標的雜交之外，於未配對位置之緊鄰區域不致有雙股結構生成。以此方式，校正作用屬於標的依賴性。

五、發明說明 (18)

於與標的雜交之例子中，在未配對位置解離可曝出一個可被連接酶連接至相鄰探子之一端（係以其位置及化學本質而連接）。一旦連接後，融合分子如一個新標的般作用，如同標準 C L R 中一般。

3. 未配合對，可能在所有“經修飾”的寡核苷酸中最早的為不含特色者，不論雜交狀況如何。此種寡核苷酸可利用標準商品化試劑，採標準合成技術容易地製備。然而，當與標的雜交時，此種探子獨特的處理修飾本身可明示：在雙聯式中存在一個未配合之鹼基對。已知有許多生物系統可用來校正或修補此種未配合之鹼基對。雖然任一此種系統，事實上可適合於 L C R 探子組中用於校正處理修飾，我們仍將進一步深入討論一個系統，做為一般途徑之說明。

Karin 等人已報告一種酵素（或酵素複合物），Proc Natl. Acad. Sci. USA 86: 8877-88810 (1989)，其可特異地確認 A 相對 G 之未配對。於此種“A/G 未配對中”，酵素在含有 A 之股上，於 A 及鏈上下一個殘基間解離。如此，可設計探子，其中突出物藉著一個 A 殘基與探子其餘部份分別，且當探子與真實的標的雜交時，A 殘基發生在相對於 G 殘基處。一旦與真實標的雜交後，突出物自探子剩餘部份中解離，包括未配對之 A 殘基，曝出一末端其因著其位置及化學本質，可由連接酶連接至位置上緊鄰之探子。一旦連接後，生成之融合分子

五、發明說明 (19)

如標的物般作用，且應用於接續的 L C R 循環中。

至於進一步特色，此種程序可用來決定其中呈現對偶性之特異鹼基區域本身。例如，於一個特異的 A G 未配對實例中，約 5 / 6 的此種變化可容易地分析。特殊區域之最初本身必須為 A，T，G 或 C。若為 G，則為 G 以外之突變；同樣地若為 C，其互補是 G，且突變之互補非 G。若為 A 或 T，則此種突變 2 / 3 為 G 或 C。因此單一鹼基突變之對偶基因的一半造成特殊 G 之喪失，且剩下的 2 / 3 造成特殊 G 殘基之出現。於任一例子中，將一個 A 殘基策略性地置於 L C R 探子組其中一成員上，可強烈地影響融合探子分子出現之速率。於喪失一個 G 殘基例中，無法解離含 A 之探子，且 L C R 反應之進行將被嚴重地破壞。於出現一個新 G 之例子中，解離含 A 之探子可使 L C R 反應之速率大大加強。精於此技藝人士可容易地了解，其他帶不同特異性之未配對修補系統，可容易地適用於於特殊區域中鑑定其他單一鹼基變化，其方式類似於所述之 A G 配對修補系統。

B. 凹處之末端修飾

於第二具體實例中，藉著減少一個以上探子中之鹼基短序列可生成經修飾之末端，如上在一探子的 5' 端及另一探子之 3' 端，當其與標的（或標的互補物，或由其中生成之聚核苷酸）雜交時，在其間可留下一個凹處或裂口。為了使 L C R 可加大標的物，探子間之裂口必須予以充

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝
訂
線

五、發明說明 (20)

填（即處理修飾必須予以“校正”）。於一個第一說法中，可利用聚合酶或逆轉錄酶，及多量的去氧核苷酸三磷酸進行，後者互補於相對於裂口之標的股。另外，此可由供應一個互補於標的之第五探子及互補於第五探子之第六探子而完成。這些不同的說明在下文中分別描述。

然而，在詳述此具體實例之先，稍微離題做術語定論是有用的。A組（如S）包括所有含於S組之要件。“非S”組則含“萬有”中剩餘的要件，其不見於S。針對本案目的之“萬有”包括四種鹼基G，C，A及T，或G，C，A及U，如上述。S組及其他組（如R）之交點包括只見於S及R中之要件。因此，如本案中所應用的，“非N及非M”組包括存在於非裂口 X_n 及裂口 Y_m 中之鹼基。依據本發明，“非N及非M”組不可是空的組，即在此組中至少要有一個鹼基存在以指導合成“停止鹼基”。

1. 以伸展作用充填裂口

依據此第一種說法，本發明是有關下列之重覆步驟：

(a) 探子與標的之雜交（且若是雙股則存在有標的互補物，則與標的互補物雜交）；(b) 伸展至少一個探子以充填至少一個裂口，命名為 X_n ；(c) 將已伸展的探子連接至相鄰探子以形成一個融合的或連接的產物；及(d) 自標的中解離融合產物，並重覆雜交，伸展及連接步驟以放大欲求的標的序列。

於此說法中，“裂口” X_n 其破壞“經修飾之末端”

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝
訂
線

五、發明說明 (21)

可藉著以聚合酶或逆轉錄酶伸展一個以上的探子而予以“校正”。通常，雜交至DNA標的之探子伸展作用，可由技藝中已知之DNA聚合酶或克林諾片段完成。於RNA標的例子中，伸展作用可由逆轉錄酶完成。供示例之逆轉錄酶包括得自禽骨髓母細胞瘤病毒 (AMV) 及 Moloney 鼠白血病毒 (M-MuLV) 者，通常可為精於此技藝人士所應用。當然，最好是利用伸展試劑，如 Taq 聚合酶，其係熱穩定的，且PCR所須的高溫循環中可經得起。若伸展試劑非熱穩定的，其在每一個PCR循環中通常必須再加入。

以此方式藉伸展作用而校正，必須在裂口區有互補於標的鹼基之去氧核苷酸三磷酸 (dNTP) 之反應混合物之存在。更特言之，對於X_n序列之裂口，將必須供應的dNTP命之為dX'TP，其中X'代表裂口X_n中每一鹼基之互補物。dNTP可普遍購自各種來源，包括Phermacia (Piscataway, NJ)及Bethesda Research Laboratories (Gaithersburg, MD)。

連接作用必須在連接點處精細地終止，如此伸展探子緊靠相鄰的探子，且可與之連接。於本目的中應用“停止鹼基” (見圖3及4)，命名為Q'之“停止鹼基”，係基於其互補物Q而定義，且係將反應混合物中互補於Q之dNTP省去而完成，即自反應混合物中省去dQ'TP。因此可了解到如何自由4個鹼基中其中三個組成之N組中針對裂口序列選擇鹼基，如此4個dNTP中互補的3

(請先閱讀背而之注意事項再填寫本頁)

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明 (22)

個被加至反應混合物中。當第 4 個 d N T P - d Q ' T P 不存在於反應混合物中，則伸展作用可於欲求之連接點處終止。可了解到 Q ' 為相鄰探子中的第一個鹼基，且位於標的中指導合成停止鹼基之鹼基為鄰近裂口的第一個鹼基（於圖 3 中其 5 ' 端上）。可注意到，停止鹼基 Q ' 本身（非互補的 Q）必須是在鄰近 X n 裂口之 3 ' 端。此乃因為 Q ' 停止鹼基必須存在，以避免探子 B ' 不必要的 3 ' 端伸展作用。（見圖 3）。

由於掌握其較簡易之特殊例子是最早的觀念，故先描述單一裂口方法。然而要了解，單一裂口變化僅是後述雙重裂口變化中的一個特殊例子。圖 3 示出一個稱之為單一裂口之具體實例，因為只有一個探子（即 B）在其 5 ' 端有一個裂口。第一個探子 - A，與標的股 T 之第一片段雜交。第二個探子 - B，與標的股的第二段雜交，留下第一片段 5 ' 端及第二段 3 ' 端之間，一個以上鹼基之裂口。此裂口命名為 X n。第三個探子 - A '，與第一探子 A 雜交；且第四個探子 B ' 與第二探子雜交。如圖 3 中所示，標的股 T 可為雙股，有一個標的互補物，T '。於此例子中，A ' 及 B ' 探子將藉著與標的互補物第一及第二段雜交，而參與於最初的雜交反應。

由聚合酶或逆轉錄酶進行之伸展作用，係依循 5 ' 至 3 ' 的方向。因此，A 及 B ' 的 3 端於不存有任何阻止伸展之作用物存在下可為聚合酶所伸展。若探子 A ' 雜交於標的互補物上，其可位阻地避免 B ' 之伸展。然而若 A '

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝
訂
線

五、發明說明 (23)

非與標的互補物雜交，且若 B[′] 伸展中所需要的下一個鹼基（在此為 Q[′]）不存在於反應混合物中，則伸展作用仍會終止。相反地，探子 A 繼續伸展，直到探子 B 或停止鹼基互補物（Q）遇到標的股。由於 A[′] 不當做 A 伸展用之模板，只有當與標的雜交時探子 A 才伸展。

如上文中所提及的，在裂口末端（即在連接點）終止 A 之伸展作用是十分重要的，如此伸展的探子可連接至相鄰探子 B 之 5[′] 端。因此，反應混合物中省去互補於裂口 X_n 5[′] 端緊鄰鹼基之脫氧核苷酸三磷酸。因此，X_n 可為任何數目之鹼基長，即 n 可為大於或等於 1 的任何整數。對於鹼基 X 的唯一限制是其係選自 N 組，其中 4 個鹼基中 1 至任 3 個所組成。至少一個鹼基必須保留以指導合成停止鹼基 Q[′]。要了解，當於 X_n 序列中使用 3 個以下的鹼基，則剩下的任一鹼基可當做停止鹼基。因此，Q 係選自“非 N”組，“非 N”組由 4 個鹼基組成（萬有的），少於 N 組中所含的任何要件。

目前很明顯地，於此具體實例中的連接點始終是 A[′] 及 B 探子的 5[′] 端。其並非僅是巧合，此也是停止鹼基 Q[′] 之座落。

雖然於本申請案末了提出更詳細之實例，現在描述一個一般實例。假設於圖 3 中，裂口 X_n 代表序列 G A。因此鹼基選自 N 組中（N = {G, A}），其由 4 個鹼基中 2 個所組成。於探子伸展中必須加入之 d N T P 為 d C T P 及 d T T P。於此實例中，停止鹼基 Q[′] 可為 G

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝
訂
線

五、發明說明 (24)

或 A，且其互補物 Q 必須是 C 或 T。因此，可了解到一即 Q 選自“非 N”組之要求是如何地達成。

於適當的聚合酶存在下，探子 A 經由 C 及 T 添加至其 3' 端而伸展，並以標的股為模板。然而，當聚合酶在模板 Q 位置上遇到 C 或 T 時，則無法進一步伸展探子 A，因 G 及 A 均非如 d N T P 般供應至反應混合物中。伸展作用在連接點精確地終止，而探子 A 之經伸展 3' 端緊靠著探子 B 之 5' 端。

接下來，應用連接酶以將經伸展之 A 探子 3' 經基端連接至探子 B 的 5' 磷酸端，形成融合的或連接的第一探子及標的股之雙股複合體。若標的物為雙股，且具有互補物 T'，則連接酶仍可於最初循環中連接探子 A' 及 B'，此係當其與標的互補物雜交時。若其與多量的探子 A 及 B 而非標的互補物雜交，則由於末端即非平齊也非不齊，且此中無可供連接之受質，則連接作用受阻。

接下來，分開雙股複合體，且令新探子 A，A'，B 及 B' 與標的，標的互補物，及自第一循環中獲得的經融合的聚核苷酸雜交。伸展作用及連接作用如前般發生，且重覆此過程。

X_n，Q 及 Q' 鹼基之組合實例示於表 I 可了解，本發明並不限於這些特殊組合，但其選擇只為許多可能組合之說明而已。表 I 示出 Q 由非 N 組鹼基中選出之需求。此意味停止鹼基 Q' 必須具有一個鹼基為其互補物，此鹼基不見於 X_n 序列中。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝
訂
線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明 (25)

表 I

供說明之裂口序列，所須的 d N T P s
乃於單一裂口變化中可能的 Q 及 Q' 組合

<u>X_n / N</u>	<u>X' T P s</u>	<u>非 N*</u>	<u>停止鹼基</u> <u>Q'</u>
A	T	T, C, G	A, C, G
G T	C, A	C, A	G, T
G C	G, C	A, T	A, T
A A	T	T, G, C	A, C, G
G C A	C, G, T	T,	A
G C A G	C, G, T	T	A
A A A T T	T, A	G, C	C, G
G C A G A	C, G, T	T	A
		空的，因無	鹼基
		停止	

*非 N 組對停止鹼基 Q' 提供可能的互補物 (Q)。確實
停止鹼基 (Q') 之可能性示於下欄中。

如先前所示，單一裂口變化為更一般化雙重裂口變化
中的一個特例，其中 m = 0。雙重裂口變化也應用 4 種探
子：A, A', B 及 B'。於此變化中，如同先前的變化
，探子 B' 在 5' 端被縮短，而在第一探子 A 及 B 雜交之

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)
裝
訂
線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

203527

A 6
B 6

五、發明說明 (26)

標的第一及第二段間生成一個 X_n 鹼基之裂口。裂口 X_n 之鹼基，接受如單一裂口變化中相同的限制。

此外，3號探子 A' 也在其 $5'$ 端被縮短（見圖4），關於標的互補物及1號探子 A ，而在第二（3及4號）探子間生成一個 Y_m 鹼基之第二裂口。裂口 Y_m 可為任何數目之鹼基長，且勿需與 X_n 為相同長度，即 m 未必與 n 相等。確實， m 可為零，此時雙重裂口變化退化成單一裂口之特例。

於本發明的較佳方法中，4號探子 B' 包括一個 X_n 之 $3'$ 末端序列，和標的中 X_n 序列裂口相同。然而，此安排對本發明並非必要，因為裂口只在探子間形成。因此，4號探子 B' 之 $3'$ 末端可停止缺乏序列 X_n 之 $3'$ 端，但關於2號探子 B 此中無 $3'$ 凹處端。由於伸展以 $5'$ 至 $3'$ 方向發生，且 $dX'TP$ 必須供應，探子 B' 可穿過裂口伸展（ X_n 及 Y_m ），如同1號探子 A 穿過 X_n 裂口伸展一般。

本發明應用雙重裂口具體實例之方法，極相似於應用單一裂口之具體實例。雜交、伸展及連接步驟基本上保持相同。在促進伸展之條件下， A 及 B' 探子均自其 $3'$ 端伸展，以分別充填裂口 X_n 及 Y_m 。停止鹼基在連接點終止二種探子之伸展，且探子與其目前相接之探子連接。

然而，對於 Y_m 序列中所含之鹼基殘基有一些限制。因為至少要保持一個停止鹼基 Q' ，代表 X 及 Y 可能鹼基之 N 及 M 之混合組，必須不超過4個鹼基中3個。因此，

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝
訂
線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明 (27)

Y 可由零至 4 個鹼基中任 3 個，但至少一個鹼基保持於“非 N 及非 M”組中。若 N 組之組成少於 4 個鹼基中 3 個，則 Y 可於非 N 內之鹼基，只要其中留有一個鹼基，其互補物可當做停止鹼基 Q' 以終止探子之伸展作用。一個單一停止鹼基可用來終止 X_n 及 Y_m 裂口之伸展作用。

對於序列 Y_m 的第二種限制只發生在當 m 等於 n 時。若裂口為相同長度，序列 Y_m 應非互補於序列 X_n ，或探子之 A 及 B' 之 3' 端可構成“不齊端”。“不齊端”可令形成一種標的物獨立性雙股複合體，其中探子 A 與探子 B 雜交，如此連接作用及放大可進行。反而當 m 等於 n 時，最好 Y_m 不互補於 X_n 。換言之：A 及 B' 探子之末端應至少是“整齊的末端”，其可為相同長度，但非互補。

然而，即使發生標的獨立地連接作用及放大，例如利用不齊端（或較不像整齊端），這些融合產物可與放大標的有所分別。於 m 等於 n 之例子中，有一個小但有限的機會，即 A : A' 之雙股複合物可連接至 B : B' 之雙股複合物，而與標的無關。這些複合物較欲求之標的序列短 m 個（或 n ）鹼基，且可在長度上有所分別。此外，若末端是“平滑的”，可利用許多試劑偵測未配對之鹼基，此試劑係可偵測及／或破壞未配對之鹼基。例如，鹼基末配對可由脛胺—四氧化鐵技術化學地決定，其揭示於 Cotton, et al, Proc. Natl. Acad. Sci. 85 : 4397 - 4401 (1988)；且可由如 S1 核酸酶及菜豆核酸酶一類之試劑酵素性決定。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝
訂
線

五、發明說明 (28)

X' s 及 Y s ' 的某些組合實例，其 d N T P 相對部份及 Q 及 Q ' 之生成可能性示於表 I I 中。

表 I I

供說明之裂口序列，所須之 d N T P 及於雙裂口變化中 Q 及 Q ' 可能之組合

<u>X_n/N</u>	<u>Y_m/M</u>	<u>X' TP_s</u>	<u>Y' TP_s</u>	<u>非 N 及 非 M*</u>	<u>停止鹼基 Q'</u>
A	A	T	T	T, C, G,	A, C, G
G	T	C	A	C, A	G, T
AT	AT	T, A	T, A	C, G	C, G
AC	GA	T, G	C, T	T	A
ATG	AAA	T, A, C	T	C	G
GGCC	AAACG	C, G	T, G, C	T	A
ATTGA	AGGT	T, A, C	T, C, A	C	G
CGC	GCG	互補			
		未			
		許多			

* 非 N 及非 M 組提供停止鹼基 Q ' 可能之互補物 (Q) 。

確實之停止鹼基 (Q ') 可能性示於下欄。

裂口 X_n 及 Y_m 之長度可為零 (只有 Y_m) , 1 或任

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝
訂
線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明 (29)

何大於 1 之整數。例如，由 1 至 20 個鹼基之裂口是可能的。然而實際上，以較短長度之裂口為較佳，例如由 1 至 3 或 5 個鹼基。目前最佳的為只有一個鹼基之裂口。頃發現，單一鹼基之裂口可大大增加真實訊號對背景值之比率，且留下對停止鹼基及 d X T P 最大的選擇機會。由於探子探子係在即存標的之四週確實設計，而非“選擇”停止鹼基，因此在大多數例子中以單一鹼基裂口為較有用。

進一步特性

於任一“凹處的”具體實例變化中，用以充填裂口之脫氧核苷酸三磷酸可經修飾以含有標誌部份。標誌之實例包括直接的標誌，如放射同位素，或鈎子如生物素，異羥基洋地黃毒苷，或其他可為固相或產生標誌系統所確認之半載體。同位素標誌包括 ^{32}P ，及氘等。

將標誌納入 d N T P 中，通常是傳統的有機化學。可使用連接子及空間子，但非必要，很重要的是經修飾之 d N T P 可納入標的股上相對其互補物之裂口內，且可與相鄰鹼基共價鍵結。

再者，任一具體實例可用來分別差異僅一個單一鹼基 Z 之第一（或標的）序列及第二（非標的）序列，此係當鹼基差異於第二股的二個座落上。在此二種例子中，可使用只具一個鹼基（集合詞，非長度）之裂口來分別單一鹼基差異。

首先，發生於非標的區裂口中之一個不同的鹼基 Z，

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝
訂
線

五、發明說明 (30)

可藉著省略反應混合物中之 d N T P 而予以分別。因此，可謂 Z 必須也是屬於非 N 及非 M 組中。不同的股無法為聚合酶所伸展，因未供應適當的核苷酸三磷酸。可看出，分別不同鹼基 Z 之最大能力，只當單一裂口為一個鹼基長時，留下非 N 及非 M 組最大的可能性。

其次，若不同的鹼基 Z 存在於 Q 位置，則股可被分別因為伸展作用不會正確地終止，且所生成的伸展產物將太長以致無法沿著標的股與其相關探子連接。於此變化中，當只有一個停止鹼基可能性時可有最大的分別能力，其他所有的會使產物太長。

雙重裂口具體實例可相似地用於分別在一個或另一個裂口處有單一鹼基差異之序列。也可用來分別在停止鹼基或 Q 位置上有一個差異鹼基之序列。

2. 以額外的探子充填裂口

依據凹處具體實例之此說法，本發明涉及下列步驟之重覆：(a) 將經處理修飾之探子與標的雜交（且，若是雙股則存在有標的互補物，則與標的互補物雜交）；(b) 提出 5 號及 6 號充填裂口之探子，以充填介於第一及第二探子間之裂口；(c) 將充填裂口探子的二末端連接至相鄰的探子，以形成一個融合的或連接產物；及 (d) 自標的解離融合產物，並重覆雜交，裂口充填及連接步驟以放大欲求之標的序列。於此具體實例中，使用探子 D，D'，E 及 E' 取代 4 個探子 A，A'，B 及 B'（見圖 5

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝
訂
線

五、發明說明 (31)

)。5 及 6 號“裂口充填”探子 F 及 F' 取代聚合酶及 dNTP 以充填二個探子間之凹處或裂口。

於此具體實例中應用三對探子。1 號及 2 號探子 D 及 D'，分別互相雜交，分別如 3 及 4 號探子在 E 及 E'。

(注意，此實例中探子的命名和先前實例有異；即此中的 2 號探子為 1 號的互補物，而非其相關之配對。因此，1 及 3 號探子變成第一探子)。當第一探子 D 及 E 與標的股雜交，此處有一個至少一鹼基之裂口，最好是數個鹼基，介於 D 之 3' 羥基端及 E 5' 磷酸末端之間。相似地，當探子 D' 及 E' 與標的互補物 T' 雜交，則在其間也有 1 個至數個鹼基之裂口，雖然裂口並不排一列。因此，探子 D 及 E，及探子 D' 及 E' 經修飾為非相鄰的且非平齊端 (當與其互補物呈雙聯體)。於本說法中之裂口藉著供應 5 及 6 號探子 F 及 F' 而“校正”，其分別與介於第一及第二探子間之標的及標的互補物雜交 (及與互相雜交) 以充填裂口。

如圖 5 中所見，最好其中一個裂口充填探子較另一個在二末端均短些。換言之，二個第二探子 D' 及 E' 均伸展通過個別的第一探子，或任擇其一地，二個第一探子均伸展通過其個別的第二探子。此外，如實例 13 中所述，一個第一探子 (D) 可伸展通過其第二互補物 (D')，而另一第一探子 (E) 中斷其互補物 (E')。然而在此不同的結構中，很重要的是經修飾之末端在關於“錯誤”的探子時並非“不齊的”。例如，D 之 3' 端其伸展超過

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝
訂
線

五、發明說明 (32)

D'，只有當 F' 之 3' 端伸展超過 F 時才互補。其不應互補於 F 之 3' 端，其伸展超過 F'，或互補於 E' 之 3' 端，後者則伸展超過 E。若此點未予留意，探子雙聯體可於真實標的不存在下再重新組織而造成高的背景訊號。

依據本具體實例之探子，可如先前具體實例之探子般以相同方式製作。典型而言，探子應具有如先前具體實例中之可相容之長度。最後，可用於上述具體實例中之反應條件也可用於本具體實例，除了在此具體實例中伸展作用及聚合酶是非必要的。

一旦介於第一及第二探子的裂口已被裂口充填探子所充填，則裂口充填探子以其二端與個別的第二或第一探子連接，形成連續的聚核苷酸股。第一探子及 1 號裂口充填探子 F 形成一個第一聚核苷酸股且互補於標的股，而第二探子及 2 號裂口充填探子 F' 形成一個第二聚核苷酸股，且互補於標的互補股。當然，第一聚核苷酸及第二聚核苷酸也是互相互補。因此，重覆的雜交及連接循環可產生標的序列之放大，就如同傳統的 LCR 一般。然而相反地，由於平齊端連接作用所致之偽陽性訊號，在此具體實例中顯著地減低，此乃因為雙股複合體 D 及 D' 無法與雙股複合體 E 及 E' 平齊端相連之故。此乃因為一個以上的鹼基已自二個第二探子，或是二個第一探子中省去之故。

當然要了解，除了欲求之聚核苷酸之外也可能產生其他產物。例如，可預期到可形成較短的片段（“二聚體”），包括 D : F 及 D' : F' 或 E : F 及 F' : E'。要

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝
訂
線

五、發明說明 (33)

進一步了解，這些副產物或不完全產物會傾向利用欲求之試劑。然而，藉著添加多量的試劑及自不完全產物中俐落地分出欲求之聚核苷酸，此具體實例目前雖非較佳但仍是有益的。

依據此說法，已連接探子之分離及偵測可以技藝中已知之任何方式完成。較佳之偵測方法應用粘附至第一或第二探子之標誌。最好，可為固相捕獲之鈎子粘附至探子 D 之 5' 端，而可捕獲標誌之鈎子或標誌粘附至探子 E' 之 5' 端。再以固相捕捉第一鈎子使欲求的聚核苷酸股為可偵測的，自溶液中分出固相，偵測與固相相關之標誌。於反應中所形成的不完全產物將無法為固相所捕獲，或無法做標誌之偵測。因此，一旦分離及偵測，於標的不存在時根本無訊號或極少訊號會產生，因為平齊端之連接無法將捕獲鈎子與標誌鈎子相接。

II P C R

P C R 之原理在文獻上已有充份描述（見美國專利 4, 683, 195 及 4, 683, 202 號）；在此不再詳述。基本上，引子與標的雜交，且聚合酶伸展或加長引子，以核苷酸三磷酸為建築材料。伸展產物（及其互補物）進一步當做模板以供雜交。通常而言，欲進行伸展作用，引子之 3' 端必須與標的正好互補。許多聚合酶包括熱穩定聚合酶均是已知的。

依據本發明，P C R 引子的 3' 端經修飾，如此引子

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝
訂
線

五、發明說明 (34)

無法以聚合酶伸展。當這些處理修飾可以模板依賴方式移去時，另一層次之迫切性加至雜交要求中，以供聚合酶酵素之引子伸展。此加入之迫切性水平，特別是當第一及第二引子均帶有經修飾末端時，可有效地減低 PCR 中偽訊號之產生。

關於阻斷基團之選擇，及校正方法，許多 LCR 有用的相同一般策略，也可應用於 PCR。然而在 LCR 中，處理修飾必須阻斷偽連接，於 PCR 處理修飾必須阻斷偽加長作用（伸展作用）。因此，經處理修飾或阻斷的 3' 端，當與標的序列雜交，必須無法支持聚合酶之加長作用。欲應用上述 LCR 經修飾末端具體實例之說明，“連接點”或“欲連接點”應以“加長起始點”取代之。

A. 突出的經修飾端

突出的末端係指上述 LCR 狀況下互補探子之相互關係。於 PCR 例子中，所謂“突出端”不具可比較之意義。於 PCR，這些經修飾的末端可較適切地描述成“模板依賴性阻斷基”。然而，LCR 中“突出端”之處理修飾及校正，可大體地應用至 PCR。

於化學阻斷處理修飾時，LCR 所用的 R 基中所有可能的 `Z` 部份（除了一去氧核糖之外），也可用於 PCR 中阻斷聚合作用。此外，應用核酸內切酶 I V 之相同的校正機制也可用於 PCR。

LCR 中“突出”的處理修飾（包括超過欲求連接點

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝
訂
線

五、發明說明 (35)

之額外的核酸) 在此示出, 其為:

1. 基本上核糖核苷酸突出物,
2. 降低位置突出物, 及
3. 帶未配對鹼基之突出物。

然這些處理修飾似乎不為 PCR 所喜用, 經處理修飾末端的每一突出物種類, 也可以類似方法應用於 PCR, 只要欲校正 (解離) 之突出物本身可呈失活性而當做伸展酵素 (如聚合酶) 之受質。若突出物非失活性, 則其當解離時可當做引子用於接續不要的伸展作用。使突出物失活的典型方法是使其 3' 末端不適於為伸展酵素所確認。上述與引子有關之處理修飾, 通常也可使突出物的 3' 端失活。然而, 和引子之處理修飾不同的, 突出物 3' 端之處理修飾應不為相同的機制所校正, 其係用來校正引子處理修飾。另外二者也可相繼校正。適當的處理修飾但不易被校正者包括一個末端二去氧核苷酸, 3' - 去氧腺苷, 或其他任何化學處理修飾, 不論是已知的或是將被發現的, 可相當持久性地避免引子自 3' 末端之伸展作用。

於 LCR 例子中, 這些處理修飾可以模板依賴方式校正。校正方法及試劑和 LCR 相同。

B. 末端之凹處處理修飾

目前我們尚不知凹處端處理修飾如何應用於 PCR 中

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝
訂
線

五、發明說明 (36)

減低偽訊號之發展。

一旦選擇一個修飾處理的策略，可製備末端有經修飾之適當的引子。引子與標的 DNA 雜交之條件和標準 PCR 中相同，且可見於文獻中。接下來的加長作用，變性及再雜交循環，也和標準 PCR 相同，差別只在包括酵素或其他作用物以利用標的依賴方式校正經修飾之末端。

實例

本發明經由實例予以說明。實例僅供說明不欲予以限制。除非另有所示，實例中之探子之標的序列由 5' 端向左寫。

實例 1

呈現以下的雙聯式標的 DNA 序列，但為簡易起見只示出單股。“-”符號代表 LCR 探子欲求之連接點。

```

3' - ... T T A A G C T C G A G C C A T G G G - C C
      C C T A G G A G A T C T C A G C T G G A C
      G T ... - 5'
  
```

以下探子用以利用 LCR 偵測以上之標的序列，而有減低的背景水平。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝
訂
線

五、發明說明 (37)

A 5' - A A T T C G A G C T C G G T A C C C C p
 A 3' - G C T C G A G C C A T G G G
 B 5' - G G G G A T C C T C T A G A G T C G A C
 C T G C A
 B 3' - p C C C C T A G G A G A T C T C A G C T
 G

探子組的特色在二個探子 (A 及 B') 含有末端 3' 磷酸阻斷基團 (底下劃線)。

利用各種劑量之標的 (p U C 1 9) 進行 L C R 反應 (基本上如 E P - A - 3 2 0 3 0 8 中所述)。在每一循環雜交步驟之後，將純化自大腸桿菌之核酸內切酶 I V 加至反應中，此可在標準 L C R 條件下進行，因為大腸桿菌核酸內切酶 I V 多少是耐熱的。至於對照組，進行 L C R，採用相同數目之標的分子但不加核酸內切酶 I V。於這些對照組中，使用類似上示之探子組，只是在探子 A 及 B' 上不包括一個 3' 末端核苷酸 (含 3' 磷酸)。

於實驗及對照反應中，連接產物出現之速率以所加之標的分子最初數目校正之。此二個策略之區別處在於第二個例子中，不含標的分子的一個“空白”管中所生成的訊號和含 1 0 0 0 個標的分子之管速率相同，而於使用經修飾之探子及核酸內切酶 I V 例子時，不含標的分子之“空白”管所生成的訊號顯然較含 1 0 0 0 個標的分子之管慢

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝
訂
線

五、發明說明 (38)

許多。此背景之壓抑提供一個優點，即增加分析靈敏度之可用範圍。

精於此技藝人士可立即了解應用高度耐熱的核酸內切酶 I V 之企求性，基於相同理由，高度耐熱的連接酶及聚合酶是有用的，且分別於 L C R 及 P C R 是企求的。精於此技藝人士可了解，其他酵素不論是已知的或尚未知的，可以模板依賴方式除去 D N A 股 5 ' 或 3 ' 端處理修飾作用，而留下先前完整的經阻斷 5 ' 磷酸或 3 ' 羥基之其他酵素，也可以如上述完全類似核酸內切酶 I V 之方式而應用。

實例 2

以下探子組可用來偵測實例 1 之標的 D N A ，而具減低的背景值。

A 5 ' - A A T T C G A G C T C G G T A C C C

A ' 3 ' - G C T C G A G C C A T G G G r C r C C C

B 5 ' - T A C r C r C G G G G A T C C T C T A G A

 G T C G A C C T G C A

B ' 3 ' - C C C C T A G G A G A T C T C A G C T G

探子 A ' 及 B 含嵌合的核糖 / 去氧核糖核苷酸伸展作用 (粗字及底下劃線)。核糖核苷酸鹼基前加有 " r " 字母。

L C R 反應如實例 1 中所述進行，而以核糖核苷酸 H 取代

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝
訂
線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

203027

五、發明說明 (39)

核酸內切酶 I V。至於對照組，可使用如實例 1 之相同的對照用探子。

結果及說明和實例 1 相同。

實例 3

可使用以下探子組來偵測實例 1 的標的 DNA，而具減低的背景值。

A 5' - A A T T C G A G C T C G G T A C C C J G

A' 3' - G C T C G A G C C A T G G G

B 5' - G G G G A T C C T C T A G A G T C G A C C
T G C A

B' 3' - G J C C C C T A G G A G A T C T C A G C
T G

探子 A 及 B' 含伸展作用（底下劃線，粗線式）特色在於一個未配對的位置（“J”）接著是一個標準的核苷酸。

LCR 反應如實例 1 所述進行。結果及說明和實例 1 相同。

實例 4

以下探子組可用來偵測實例 1 之標的 DNA，而帶減低之背景值。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝
訂
線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明 (40)

A 5' - A A T T C G A G C T C G G T A C C C

A' 3' - G C T C G A G C C A T G G G A C

B 5' - C A G G G G A T C C T C T A G A G T C G A
C C T G C A

B' 3' - C C C C T A G G A G A T C T C A G C T G

探子 A 及 B' 含二個核苷酸伸展作用 (底下劃線, 粗線式), 其當與模板 DNA 雜交時特色在於一個第一核苷酸, A / G 未配對及一個可雜交的第二核苷酸。LCR 反應如實例 1 般進行, 而以 A / G 未配對修飾酵素 (複合物) 取代核酸內切酶 I V。結果及說明如同實例 1。

實例 5

在一個丹麥研究小組中, 單套 3 苯丙酮酸尿症 (PKU) 在所有 PKU 對偶基因的約 38%。此乃因於編碼苯丙胺酸羧化酶 (DAH) 之基因序列上, 於 12 號插入子 5' 剪接供予位置有一個單一鹼基之突變所致 (G > A)。如實例 4 所示, 用於減低背的未配對修補方法, 也可當做一種靈敏的分析法, 用以決定於疑似帶有此傾向之個體血樣或其他體液中偵測此遺傳缺陷之存在與否。

製備探子, 其末端部份有下示之特色, 且互補於 PAH 基因第 12 號插入子中的以下標的 DNA :

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

03587

五、發明說明 (41)

3' - T T T A A T G A A T G A C A A T T A C C T
 5' 正常的 P A H D N A

3' - T T T A A T G A A T A A C A A T T A C
 C T - 5' P K U D N A

A 5' - A A A T T A C T T A

A' 3 - T T T A A T G A A T A A C

B 5 - C T G T T A A T G G A

B' 3 - G A C A A T T A C C T

依據標準的 L C R 考慮設計探子 (即 1 5 - 3 0 成員) ,
 在 B 及 B' 添加單一的核苷酸伸展作用。這些伸展作用 (關於標的 D N A) 包括第一個未配對的核苷酸 , 接著是二個可雜交之核苷酸。

人類 D N A 純化自欲進行 P K U 存在與否測試個體之血液。可將 D N A 剪成平均 $\leq 1 0 k b$ 之大小。樣品接受 L C R , 採用以上探子 , 並在每一循環的雜交步驟後 (見實例 4) 加入 A G 未配對修補系統酵素。若樣品不含野生型對偶基因 , 若有任何 L C R 反應產物之出現 , 則利用未修飾之探子可顯著地延緩與標準 L C R 反應之比較。而若在另一方面 , 存在有野生型對偶基因時 , 可發生融合探子自 L C R 反應中快速的出現。

實例 6

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝
訂
線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

203072

五、發明說明 (42)

進行 80 個循環的單一裂口 LCR 伸展作用，每一循環包括在 85 °C 下培育 30 秒，及在 50 °C 下培育 20 秒，利用 C o y 熱循環器 (Key Scientific)。選擇循環數目以加大平齊端連接作用之背景值。反應由 0 或 10^6 個標的 DNA 分子組成。標的 DNA 為經 S c r F 1 水解的 H P V 16 基因體 DNA，選殖至一個 p G E M 載體中。每一反應也含有 10 毫微克的人類胎盤背景 DNA。以標準的平齊端寡核苷酸進行二個反應，另二個反應以單一製口之寡核苷酸組進行。標準平齊端 LCR 反應所進行之緩衝液含有 50 m M E P P S p H 7.8, 100 m M K C l, 10 m M M g C l₂, 1 m M D T T, 10 m M N H₄ C l, 100 μ M N A D, 10 μ g / m l B S A, 5×10^{11} 分子的每一寡核苷酸 A 及 B' (表 6 a), 7.5×10^{11} 分子的每一寡核苷酸 B 及 A'' (表 6 a) 及 1 x 嗜熱菌 DNA 連接酶。於相同緩衝液中進行有裂口之 LCR 反應，除了以寡核苷酸 A' 取代 A''，且加上 25 m M 2'-脫氧腺苷 5'-磷酸及 1.25 單位的 T a q DNA 聚合酶。此寡核苷酸與 H P V 16 基因體上 5695 - 5744 之與圖位置具特異性。於所有例子中，反應體積均為 50 微升，且反應於循環前均覆上 25 微升之礦油。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝
訂
線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明 (43)

表 6 a

寡核苷酸

A	FL - AAGTTGTAAGCACGGATG
	AAATATGT
A'	CATATTCATCCGTGCTT
	ACA ACT
A''	CATATTCATCCGTGCTT
	ACA ACT
B	TGCACGCACAAACATAATA
	TTATCA - BIO
B'	BIO - ATGATAATAATGT
	TTGTGCGTGCA
C	FL - ATTTATACATTAAG
	GCTCTGGGTC
C'	ACCCAGAGCCTTTAA
	TGTATAAA - FL
D	ACTGCAAAATTTAGCC
	AGTTCAA - BIO
D'	BIO - TTTGA ACTGGCTA
	AAATTTGCAGTA

經過放大作用後，反應以無菌的蒸餾水以 1 : 1 稀釋，且經雙重標記之 LCR 放大產物利用三明治式免疫分析

.....
(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)
.....

.....
裝.....訂.....線.....

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

20397

五、發明說明 (44)

偵測，係於 A b b o t t I M x 系統之原型上進行，結果如下。

	<u>分子數目</u>	<u>速率 (c / s / s)</u>
0	標準 L C R	9 1 1 . 3
1 0 ⁶	標準 L C R	9 2 5 . 9
0	經修飾的 L C R	6 2 . 0
1 0 ⁶	經修飾的 L C R	9 8 5 . 4

實例 7

進行 3 5 個循環的雙重裂口 L C R 伸展作用，利用 C O Y 熱循環器 (Key Scientific)。培育時間和上述相同。反應由 0，1 0³ 或 1 0⁶ 個標的分子組成。標的 D N A 為經 S c r F 1 水解的 H P V 1 6 基因體 D N A，選殖至一個 p G E M 載體中。每一反應也含有 1 0 毫微克的人類胎盤背景 D N A。反應條件和上述實例 6 之單一裂口伸展實驗相同，除了每一反應含有 5 × 1 0¹¹ 分子的各個寡核苷酸 C 及 D^ˆ (見上表 6 a)，7. 5 × 1 0¹¹ 分子的各個寡核苷酸 D 及 C^ˆ，及各 2 5 m M 的 2^ˆ - 脫氧胸苷磷酸及 2^ˆ - 脫氧鳥嘌呤核苷 5^ˆ - 三磷酸。寡核苷酸係與 H P V 1 6 基因體上 6 4 5 7 - 6 5 0 5 之輿圖位置具特异性。

經過放大作用後，反應產物以無菌的 d H₂ O 1 : 1 稀釋，且經雙重標記之 L C R 放大產物利用三明治式免

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝
訂
線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明 (45)

疫分析偵測，係於 A b b o t t I M x 系統之原型上進行，結果如下。

分子數目	速率 (c / s / s)
0	1 5 . 4 4
1 0 ³	4 2 . 4 7
1 0 ⁶	1 3 7 5 . 1 9

實例 8

大於 1 個鹼基之裂口可用於 L C R 伸展作用中。例如，可以寡核苷酸，T A T T C A T C C G T G C T T A C A A C T (在此稱為寡 E) 取代表 6 a 中 H P V 1 6 特異的寡核苷酸 A'，於 L C R 組 (A, A', B 及 B') 用於 H P V 1 6 序列之放大，如實例 6 所述。當雜交至適當的單股 H P V 1 6 標的序列，寡核苷酸 B 及 E 可以 3 個核苷酸之裂口而分離。放大反應條件和上述相同，除了 2'-脫氧胞苷 5'-三磷酸除了 d A T P 外也應包括在內，以完全充填 3 個核苷酸之裂口。不同大小之裂口，也可以單一及雙重裂口模式之相似方式檢查之。

實例 9

於囊腫性纖維化基因中約有 7 0 % 的突變對偶基因於表現子 1 0 中呈現一個單一三核苷酸之缺失 (Riordaw, J. R. et al, Science 2 4 5 : 1 0 6 6 , 1 9 8 9 , Ker-

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝
訂
線

五、發明說明 (46)

em B. et al Science 245 : 1073 (1989)。

示於下表 9 a 中之寡核苷酸，可用於正常（寡核苷酸 A，A'，B 及 B'）及突變型（寡核苷酸 C，C'，B 及 B'）CF 基因對偶基因中之單一裂口 LCR 放大作用。

表 9 a

A	FL - C A C C A T T A A A G A A A A T A T C A T C T T
A'	A A G A T G A T A T T T T C T T T A A T G G T G C - F l
B	G G T G T T T C C T A T G A T G A A T A T A G A - B l O
B'	B l O - C T A T A T T C A T C A T A G G A A A C A C C A
C	F L - T G G C A C C A T T A A A G A A A A T A T C A T
C'	A T G A T A T T T T C T T T A A T G G T G C C A G - F L

使用 LCR 寡核苷酸 A，A'，B 及 B' 以放大人類胎盤 DNA 中囊腫性纖維化基因之野生型序列。反應由無標的 / 背景 DNA，或 1.5 微克人類胎盤 DNA 所組成。於如實例 6 所述之相同緩衝液中進行一式二樣反應，含有 5×10^{11} 分子的各個寡核苷酸 A 及 B'， 7.5×1

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝
訂
線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明 (47)

0''分子的各個寡核苷酸 A' 及 B, 25 mM 2'-脫氧胸苷 5'-三磷酸, 及 1.25 單位的 Taq DNA 聚合酶, 共進行 30 個循環。經雙重標記的放大產物如所述般偵測。

標 的	速 率 (c / s / s)
無 標 的	9 . 3
胎 盤 D N A	7 3 8 . 5

實例 1 0

寡核苷酸 A, A', B 及 B' (表 6 a) 可在 17 - 35 個核苷酸長度中變化。最初的實驗集中在表 10 a 所示之 19 個成員及 30 個成員之寡核苷酸組中。寡核苷酸大小之確實上及下限可由經驗決定。重覆實例 6 步驟, 利用表 10 a 之探子做單一裂口 LCR 伸展作用。可以雙重裂口寡核苷酸組進行相似的研究。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝
訂
線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明 (48)

表 1 0 a

1 9 - m e r 組 :

A : F l - T A A G C A C G G A T G A A
T A T G T

A ' : C A T A T T C A T C C G T G C T
T A C

B : T G C A C G C A C A A A C A T A T
A T - B l O

B ' : B l O - A T A T A T G T T T G T
G C G T G C A

3 0 - m e r 組 :

A : F l - T A T C T A A G T T G T A A
G C A C G G A T G A A T A T
G T

A ' : C A T A T T C A T C C G T G C T
T A C A A C T T A G A T A C

B : T G C A C G C A C A A A C A T A T
A T T A T C A T G C A G G - B l O

B " : B i o - C C T G C A T G A T A A
T A T A T G T T T G T G
C G T G C A

實例 1 1

於單一及雙重裂口 L C R 伸展作用中可使用較多之循

.....
(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)
.....

.....裝.....訂.....線.....

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明 (49)

環數目，因為平齊端連接作用之背景被大大地減低。背景之減低以及使用額外的 L C R 循環，預期可大大加強 L C R 技術之靈敏度。寡核苷酸 A，A'，A''，B 及 B' (表 6 a) 可用於各種循環數目之平齊端及單一裂口 L C R 中，以決定靈敏度加強之程度。反應條件可和實例 6 所述相同，除了可於 20，25，30，35，40，45 及 50 個循環後檢查重複的陽性及陰性反應。必要時利用更多循環數目，及 / 或示於實例 7 之雙重裂口 L C R 伸展作用也可進行相似的實驗。

實例 1 2

單一裂口 L C R 伸展作用以區別單一鹼基未配對之能力，可利用合成的 H P V 1 6 寡核苷酸標的序列檢查之。用於放大作用之寡核苷酸 (A，A'，B 及 B') 示於實例 6 之表 6 a 中。所使用之合成的標的序列示於下表 1 2 a 中。標的序列 A (表 1 2 a)，代表野生型 H P V 序列，與 H P V 1 6 基因體中 5 6 9 5 - 5 7 4 4 之輿圖位置具特異性。標的序列 B 與序列 A 相同，除了 2 5 位置之胸苷鹼基當做裂口充填之模板，以 d A T P 交換腺嘌呤上。因此，寡核苷酸 B' (表 6 a，實例 6) 在實例 6 所述條件下，當雜交至此標的序列時無法伸展。標的序列 C 和序列 A 相同，除了在終止鹼基 (標的鹼基第 2 4 號位置) 上有 G 至 T 之單一變化。當雜交至此標的序列，寡核苷酸 B' 可伸展 3 個鹼基。因此，伸展作用可超過裂口區。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

五、發明說明 (50)

合成的標的

A A A G T T G T A A G C A C G G A T G A A T A
 T G T T G C A C G C A C A A A C A T A T A T
 T A T C A

B A A G T T G T A A G C A C G G A T G A A T A
 T G A T G C A C G C A C A A A C A T A T A T
 T A T C A

C A A G T T G T A A G C A C G G A T G A A T A
 T T T T G C A C G C A C A A A C A T A T A T
 T A T C A

反應重覆三次，由人類胎盤背景DNA（無標的之對照組）及含 10^6 分子來自一定合成標的之胎盤DNA組成。反應條件和實例6所述相同。單一裂口LCR伸展作用進行50個循環。經過放大作用後，反應產物以無菌的dH₂O 1:1稀釋，且經雙重標記之LCR反應產物利用三明治式免疫分析偵測，係於Abbott IMx系統之原型上進行，有以下結果。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

203082

五、發明說明 (51)

標 的	速 率 (c / s / s)
無 標 的	1 5 . 2
標 的 A	1 6 7 . 7
標 的 B	8 . 2
標 的 C	1 2 . 5

實例 1 3

於裂口充填技術的另一具體實例中，可使用額外的探子充填裂口，取代 d N T P s 及 D N A 聚合酶之使用。可用的探子示於下表 1 3 a，且與 H P V 1 6 基因體上 5 6 7 0 - 5 7 4 3 之輿圖位置具特異性。依本內容設計寡核甘酸。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝
訂
線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

203082

五、發明說明 (52)

表 1 3 a

D	F 1 - T A C C T G C C T C C T G T A C C
	T G T A T C T A
D	A G A T A C A G G T A C A G G A G G
	C A G G T A - F 1
F	A A G T T G T A A G C A C G G A T G
	A A T A T G
F	A T A T T C A T C C G T G C T T A C
	A A C T T T
E	T T G C A C G C A C A A A C A T A
	T A T T A T C A - B i o
E	B i o - T G A T A A T A T A T G T T T G
	T G C G T G C A A C

LCR可進行各種循環數目，利用如實例6所述之相同的培育時間及反應條件，除了dATP及DNA聚合酶不再需要。要注意，也可使用不同長度之寡核苷酸（如17-35個核苷酸）。所有的寡核苷酸在反應中各存在 $5.0 - 7.5 \times 10^{11}$ 。經過放大作用後，反應產物如先前實例所述般稀釋及偵測。

實例 1 4

製備以下合成的寡核苷酸，並當做PCR反應之引子

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 · · · · · 訂 · · · · · 線 · · · · ·

203007

A 6
B 6

五、發明說明 (53)

，以 P U C 1 8 為欲求之標的 D N A 。

引 子	互補於 P C U 1 8 (n t) *
-----	-------------------------

此外製備含有未配對位置之經修飾引子 A m o d 及 B m o d 。使用這些引子分別取代引子 A 及 B 。經修飾引子之序列，及其互補於 P C U 1 8 D N A 者示於下：

引 子	互補於 P C U 1 8 (n t) *
-----	-------------------------

※核苷酸 (N T) 命名系統係指由 DNA Star Inc 所發表的
(Madison, WI) 。

實驗的寡核苷酸含有原來的序列 (A 或 B ， 上述) 經修飾包括一個單一的降低的殘基 (J) 及互補於 P U C 1 8 標的之額外的核苷酸。製備含有未配對殘基之方法，示於 Takeshita, et al., 上文中。處理修飾之 3' 末端 (“ 突出處 ”) 藉著含有一個二去氧腺苷 (X) 殘基而被失活性，如利用末端轉移酶，如 Berger, et al., Guide to

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝
訂
線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明 (54)

Molecular Cloning Techniques, p. 104 (1987))。

依據 Mullis et al. (見美國專利第 4, 683, 195 及 4, 683, 202 號) 的方法進行 PCR, 而在核苷酸混合物中存在有 $^{32}P-dCTP$ 。如下所述, 在每一循環之雜交步驟後, 加核酸內切酶 IV (Endo IV) 至反應混合物中。

經 PCR 之後, 放大產物以三氯醋酸 (TCA) 沈澱, 洗滌, 並偵測訊號。下表示出各種反應流程下的預期相對訊號強度

<u>引子混合物</u>	<u>有標的 DNA</u>	<u>無標的 DNA</u>
A+B	+++	++
Amod+Bmod+EndoIV	+++	-
Amod+Bmod-EndoIV	-	-
A+B, 無聚合酶	-	-

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

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： 可應用至連接酶鏈反應之放大標的) 核酸的方法

本發明是有關一種酵素性放大標的核酸序列之方法以生成放大產物，其中酵素利用：核酸起始子；標的序列或放大產物，對此與之雜交當做模板；及至少一個額外的含核苷之反應物，其可酵素性組合成放大產物互補於標的物；放大產物本身當做進一步的模板；此改良方法包括：

(a) 提供可與標的物雜交之必要起始子，其中至少一個起動子經修飾，如此當起動子雜交時酵素實質上無法作用於起動子當做其受質，如此放大產物無法被組合；

(b) 標的物若存在時，將起始子與之雜交形成一個起始子一模板複合物；

(c) 以標的物依賴的方式校正修飾作用，以令起始子一模板複合物可為酵素的作用；

(d) 酵素性組合放大產物；及

(e) 自標的物中解離放大產物，並重覆雜交，校正及組合步驟以放大欲求之標的序列。

英文發明摘要(發明之名稱： Improved method of amplifying target nucleic acids applicable to ligase chain reaction)

In a method of amplifying a target nucleic acid sequence enzymatically to yield amplification products, wherein an enzyme utilizes: a nucleic acid initiator; the target sequence or amplification product to which it hybridizes as a template; and at least one additional nucleoside-containing reactant which can be enzymatically assembled to form amplification products complementary to the target, the amplification products themselves serving as further templates; the improvement comprising:

(a) providing requisite initiators capable of hybridizing with the target, wherein at least one of the initiators is modified such that, when the initiator is hybridized, the enzyme is substantially incapable of acting on the initiator as its substrate, so that

附註：本案已向 美國 國(地區) 申請專利，申請日期：1990.1.26 案號：470,674
1991.1.9 634,771

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄)

裝

訂

線

四、中文發明摘要(發明之名稱：)

英文發明摘要(發明之名稱：)

amplification product is not assembled;

(b) hybridizing the initiator to the target, if present, to form an initiator-template complex;

(c) correcting the modification in a target dependent manner to allow the initiator-template complex to be acted upon by the enzyme;

(d) enzymatically assembling an amplification product; and

(e) dissociating the amplification product from the target and repeating the hybridization, correction and assembling steps to amplify the desired target sequence.

附註：本案已向

國(地區) 申請專利，申請日期：

案號：

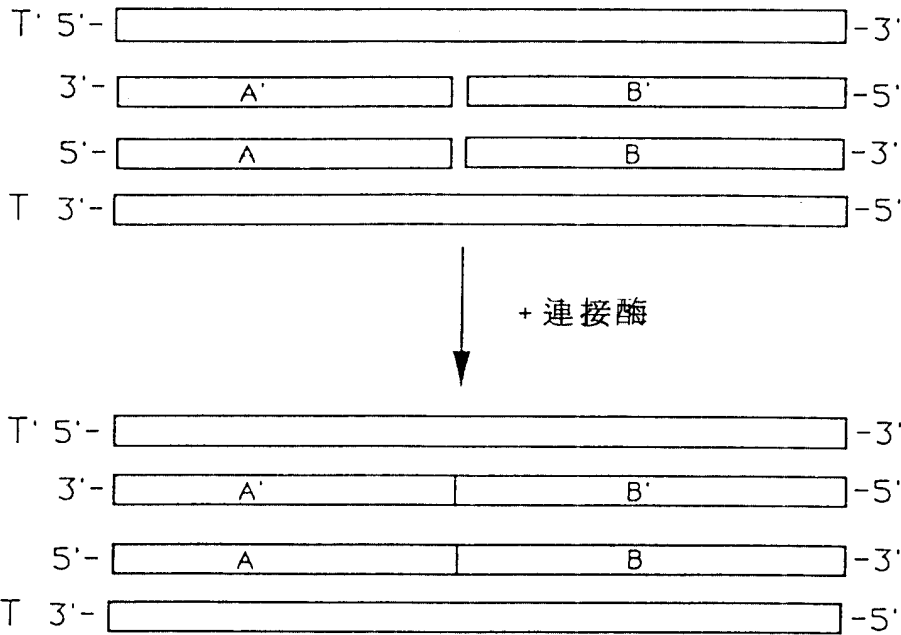
(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄)

裝

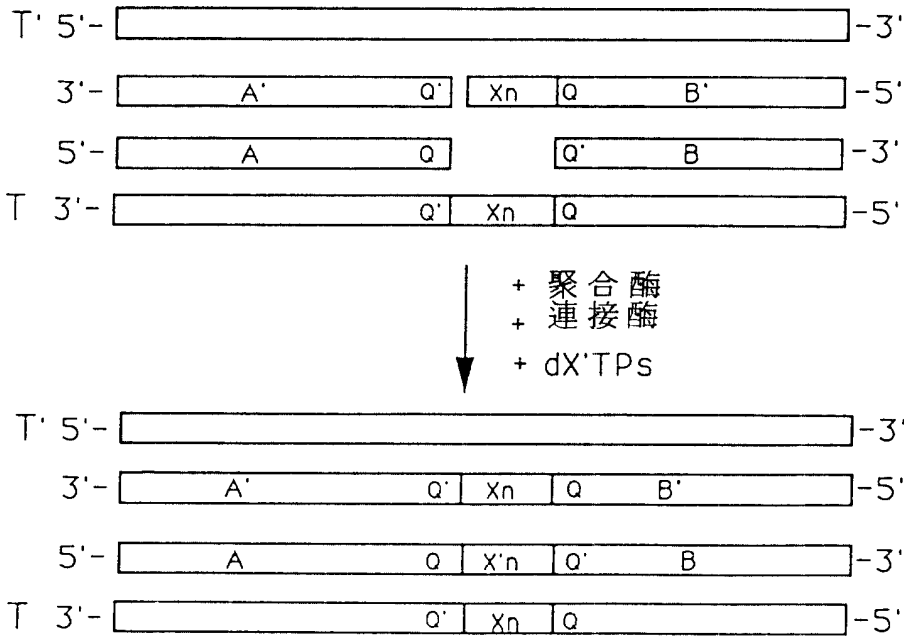
打

線

公告本

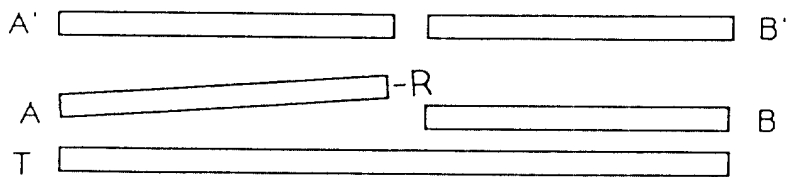


第1圖

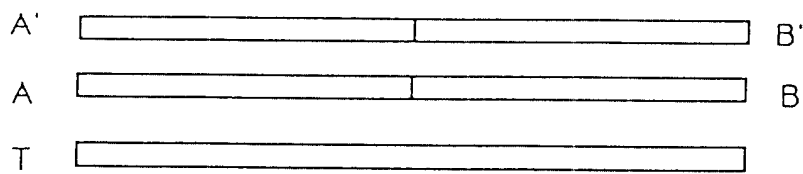


第3圖

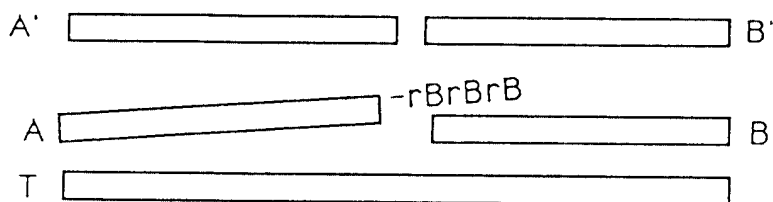
203582



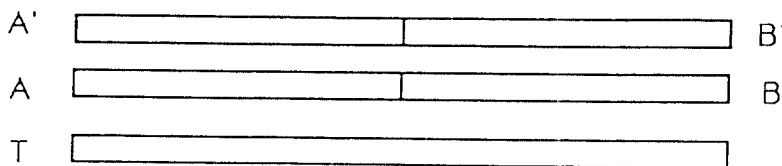
↓
+ 核酸内切酶 IV
+ 连接酶



第 2 圖 A

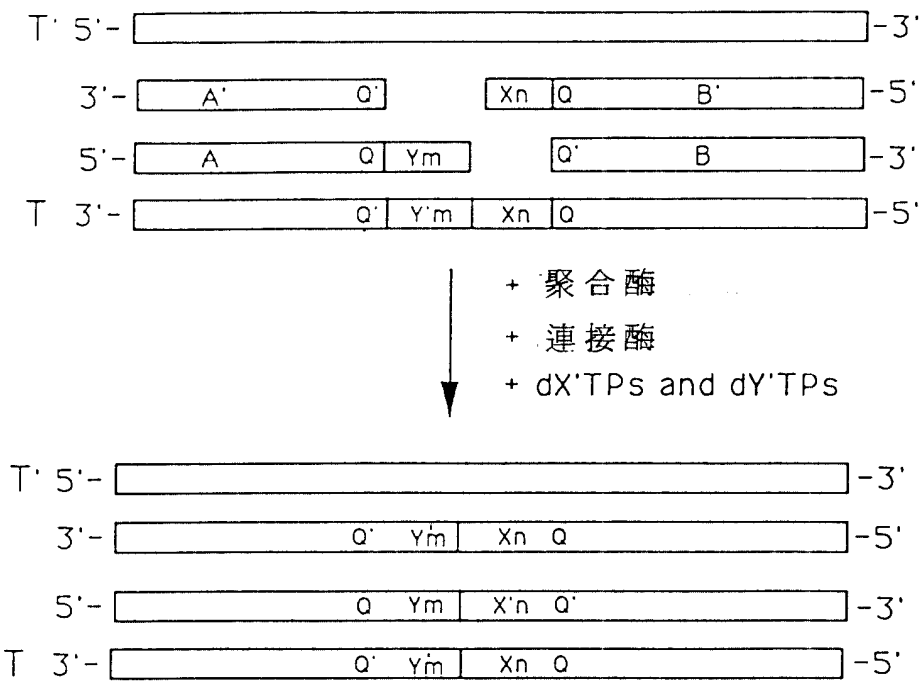


↓
+ RNase H
+ 连接酶

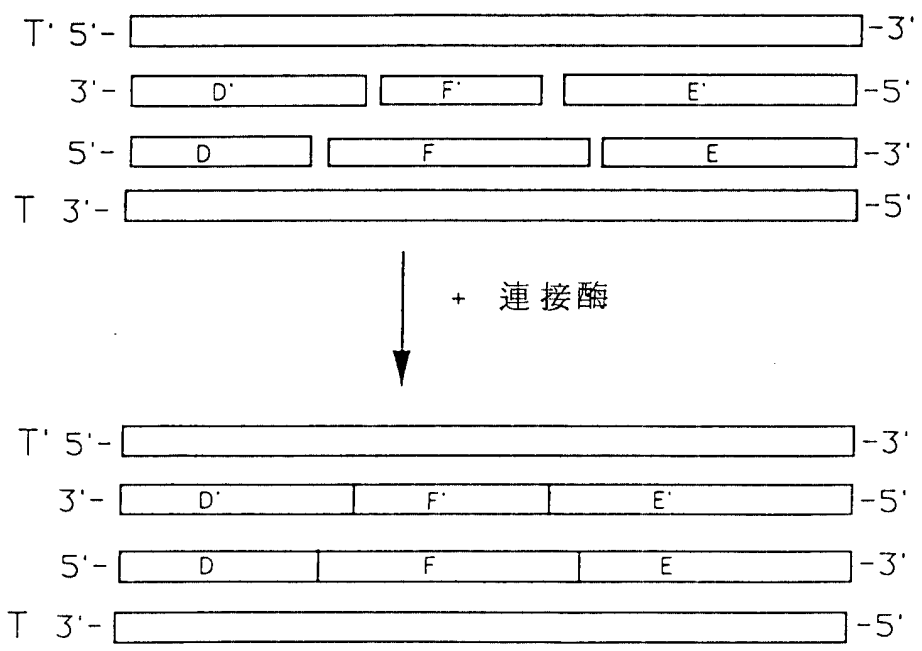


第 2 圖 B

203587



第4圖



第5圖

民國 82 年 1 月呈

修正
 1993年1月17日
 補充

經連接之百分比

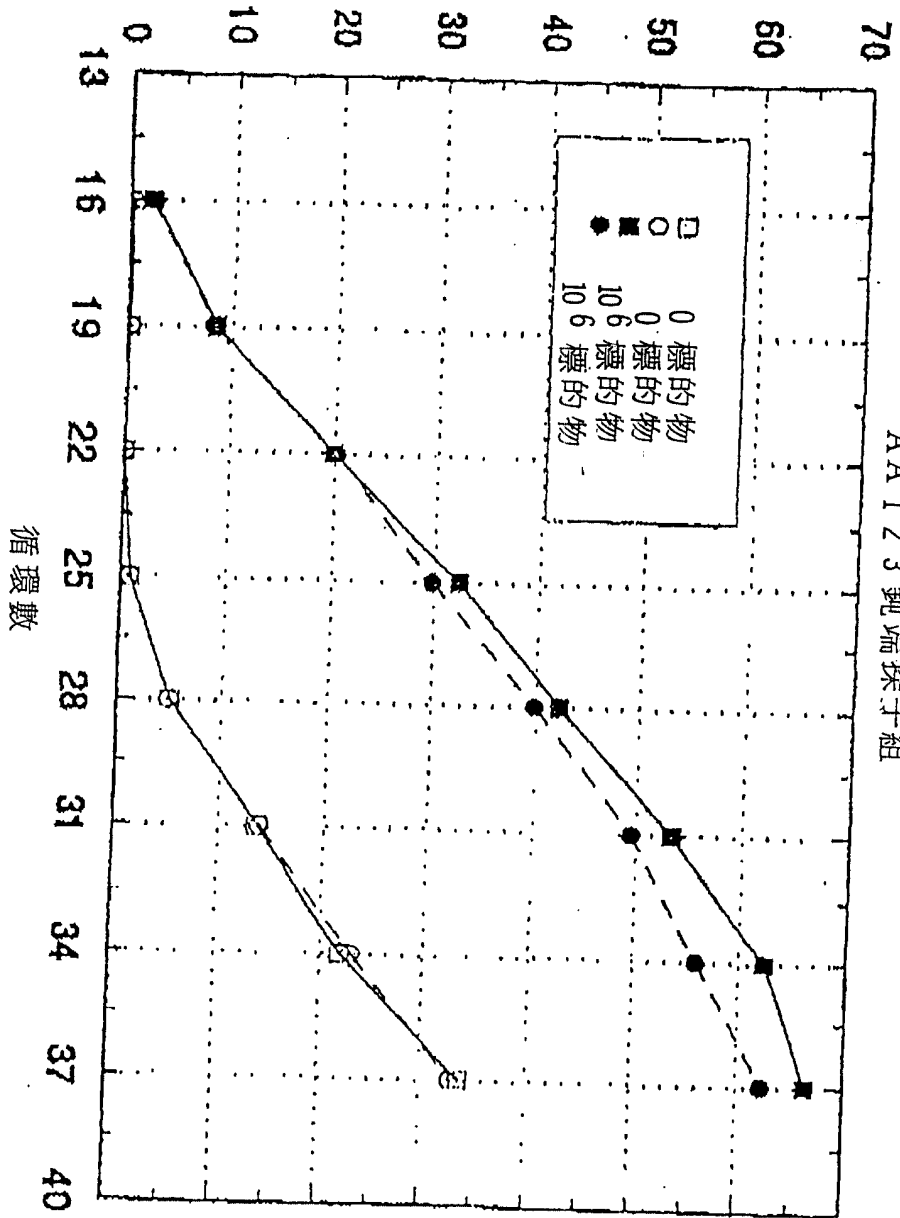


圖 6

203582

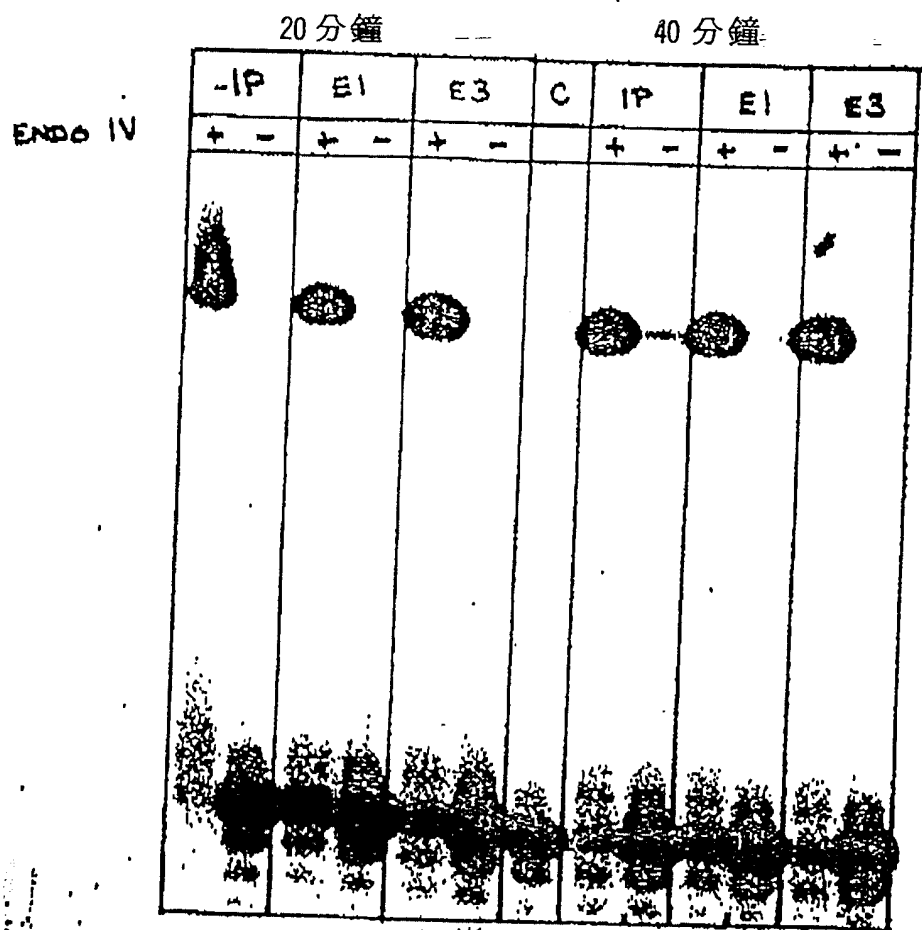
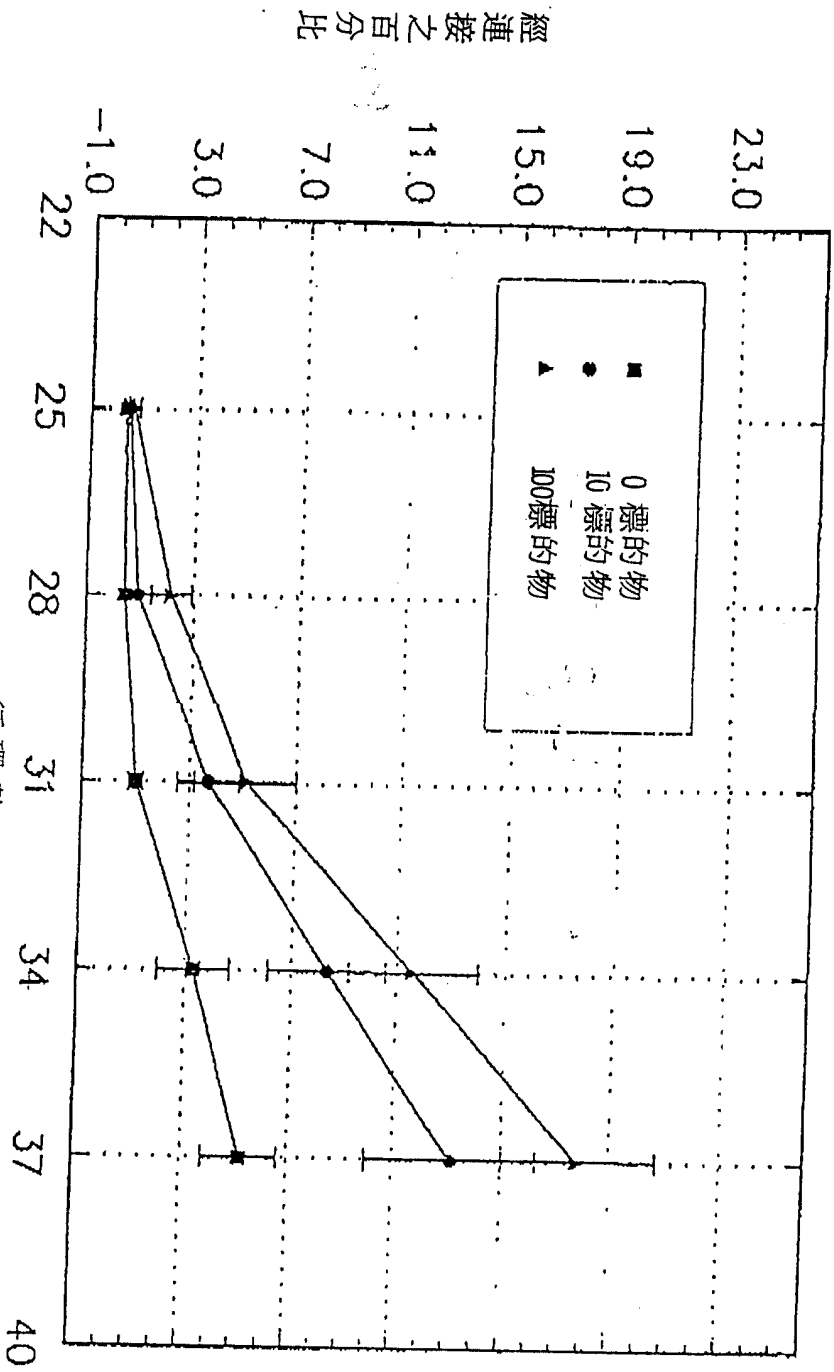


圖 7

ENDO IV - LCR
AA1 23-iP(20) & 4P(20)



95°C - 30秒 ; 55°C - 110秒
ENDO IV [1] (5/9-4, 1:1000 連接酶 21879:2 1:3333)

203522

203687

附件 1 :

第 80100655 號專利申請案
中文說明書修正本

民國 81 年 6 月 呈

申請日期	80年1月26日
案 號	80100655
類 別	C12P19/34

(以上各欄由本局填註)

修正
81年6月17日
補充A4
公 告 本發明
新型 專利說明書

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄)

一、發明 名稱	中 文	可應用至連接酶鏈反應之放大標的核酸的方法
	英 文	Improved method of amplifying target nucleic acids applicable to ligase chain reaction
二、發明 人	姓 名	1. 凱斯·貝克門 Backman Keith C. 2. 席拉·邦德 Bond Sheila B. 3. 約翰·卡瑞諾 Carrino John J. 4. 湯姆士·居·拉佛勒 Laffler Thomas G.
	籍 貫 (國籍)	美國
	住、居所	1. 美國麻省01730貝福德·卡利索路200號 200 Carlisle Road, Bedford, MA 01730, USA 2. 美國伊利諾州60045森林湖·小麥樂迪巷96號 96 Little Melody Lane, Lake Forest, IL 60045, USA 3. 美國伊利諾州60031憲法古尼4774號 4774 Constitution Gurnee, IL 60031, USA 4. 美國伊利諾州60048利伯堤維爾·松林廣場1964號 1964 Pinehurst Court, Libertyville, IL 60048, USA
三、申請人	姓 名 (名稱)	亞寶特化工廠 Abbott Laboratories
	籍 貫 (國籍)	美國
	住、居所 (事務所)	美國伊利諾州60064-3500亞寶特公園 Abbott Park, Illinois 60064-3500, U.S.A.
	代表人 姓 名	查爾斯·布拉克 Brock Charles M.

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)甲4規格(210×297公釐)

203582

修正	82	年	1	月	1	日
補充						

附件三a: 第80100655號專利申請案中文說明書修正頁

民國82年1月呈

補充實施例

下述實例 15 至 20，描述使用具有突出端之經修飾探子，以內核酸酶 I V 校正而應用的 L C R。探子序列示於如下之表 1 及表 2。該探子可特異地針對 *Actinobacillus actinomycetemcomitans* 內的一標的 DNA 序列，因此將其名為 "AA" (或圖示數據中的 "AA 1 2 3")。其後編號係指明一組為 4 個探子的位置：探子 1 及 2 具有相同的 5' - 3' 方位，而探子 3 及 4 具有相反方位。探子 1 與 3 會雜交，探子 2 與 4 亦會雜交。"P" 及 "p" 係指一磷酸基引子其在 5' 端一般是需要的 (如引子 2 及 3)，但在 3' 端時可作為一連接阻斷的修飾作用 (如引子 1 及 4)。"E" 及 "X" 係指一無鹼基的位置 (下文更有詳細描述)。“E” 之後的編號 (1, 3 或 5) 係指無鹼其位之上的互補鹼基 (突出者) 之長度。括弧內號碼代表探子的長度。

表 1：未經修飾之鈍端探子

AA-1	5'-TTGTCGAGCACCTTGAATAA	-3'
AA-2	5'-	pTTAATGGCTTCGATTGGGCT-3'
AA-3	3'-AACAGCTCGTGGA ACTTATTp	-5'
AA-4	3'-	AATTACCGAAGCTAACCCGA-5'

表 2 : 突出之經修飾探子

AA-1P(20)	5' -TTGTCGAGCACCTTGAATAAp	-3'
AA-1E1	5' -TTGTCGAGCACCTTGAATAAxT	-3'
AA-1E3	5' -TTGTCGAGCACCTTGAATAAxTAA	-3'
AA-1E5	5' -TTGTCGAGCACCTTGAATAAxTAATG	-3'
AA-2	5' -	pTTAATGGCTTCGATTGGGCT-3'
AA-3	3' -AACAGCTCGTGGAACTTATTp	-5'
AA-3(18)	3' -AACAGCTCGTGGAACTTAp	-5'
AA-4P(20)	3' -	pAATTACCGAAGCTAACCCGA-5'
AA-4P(22)	3' -	pTTAATTACCGAAGCTAACCCGA-5'
AA-4E5	3' -	AACTT \times TTAATTACCGAAGCTAACCCGA-5'

實例 15 : 鈍端 L C R

使用表 1 之鈍端探子操作 L C R 於一Coy Model 50的溫度循環器 (thermoeycler) , 設定 90 °C , 30 秒 , 繼以作用 50 °C , 30 秒。反應物在含有 45 mM E P P S , P H 7.8 , 80mM K C l , 10mM M g C l 2 , 0.5mM NAD⁺及 300 微毫克之人類胎盤 D N A 的 20 微升體積中反應。探子為 83nM (約 5 % 的探子 A A - 2 是以放射活之 [$\alpha - ^{32}P$] - cordycepin 三磷酸標記於探子 3' - 端而得以測定) 且加入 0.15 微克 / 毫升之 *Thermus thermophilus* (Tth) 連接酶。樣品含有 0 或 10¹⁶ 個分子的標的物。

在特定的循環次數 (圖 6) , 取出 . 4 微升且與終止緩衝液 (80 % 四醛 , 20 mM E D T A 及 0 . 05 % (重量 : 體積) 二甲苯cylanol) 及溴酚藍混合。以 PAGE (8.3M 尿素) 於 T B E 中分離樣品。膠體經自動顯影且此自動顯

影物用來作為剔除連接與未連接探子的模板，以進行閃爍計數。圖6 繪示在不同循環次數時，經連接探子的百分比（每一行以總放射活性的部分表示）。數據顯示 10^6 之標的物可與 0 標的者區別。然而其它顯示，低於 10^5 標的物的測定，未經修飾的探子，不能適當地再次重覆。

實例 16: 修飾作用所加強的阻斷效果

經 $3'$ [α - ^{32}P] - cordycepin 標記之探子 AA-2，培養 20 或 40 分鐘在有如實例 15 之大量標的物及連接酶的存在下，並有探子 AA-1P (20)，AA-1E1 或 AA-1E3 (參見表 2)，有或無內核酸酶 I V。培養後，如實例 15 所載，以 PAGE 分離寡核苷酸。圖 7 為顯示這些結果的放射顯影圖。該數據顯示無內核酸酶 I V 存在時，探子 1 不會連接到探子 2，因此證實 1-3 個鹼基之突出物及 $3'$ 端磷酸基的阻斷作用。其它數據 (未顯示) 證實 5 個鹼基之突出物的用途。此外，內核酸酶 I V 可藉由切除 $3'$ 端之磷酸基 (AA-1P (20)) 或無鹼基位置 (AA-1E1 及 AA-1E3) 之突出物，而得以“校正”探子，令探子 1 能連接至探子 2。

實例 17: 使用一無鹼基位置之探子的 LCR

使用表 1 之探子 AA-1，AA-2 及 AA-3 及表 2 之探子 AA-4E5 操作 LCR 於一 Coymodel 50 溫度循環器，設定 95°C ，30 秒，繼而 55°C ，110 秒。反

應在含有45 mM EPPS, PH 7.8, 80 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 0.5 mM NAD⁺, 1 mM COCl₂及300微毫克之人類胎盤DNA的20微升體積中進行。除非另外指明, 探子為83 nM (5%之探子AA-2, 其3'端被標記放射活性之[α-³²P]-cordycepin三磷酸而得以偵測) 且加入 *Thermus thermophilus* (Tth) 連接酶 (參見表中數據變化其量)。標的物為所之 0, 10², 10³或10⁴個分子的經EcoR1及Pst I水解的AA DNA。

以如下表3的數據作為訊號對背景之比值。符合至少3-4倍背景值的訊號通常足夠使標的物與背景區分。

表3：訊號對背景之比值

第4探子	Endo IV 稀釋比	循環數	10 ³ 標的物	10 ⁴ 標的物	10 ⁵ 標的物
AA-4E5	1:5000	30			12.0
AA-4E5	1:2000	30			9.7 ¹
AA-4E5	1:10000	30			22.4 ²
AA-4E5	1:50000	30	1	3.5	11.6
	"	40	3.1	6.5	9.8

1. 在相同條件下, 未修飾探子AA-4所產生之S/B比只有1.6。
2. 在相同條件下, 探子AA-4E3, 在30次循環下, 亦可產S/B比為20。

實例18：不同無鹼基位置探子的比較

203587

重覆實例 17，除了探子濃度降至 17 nM，於一反應體積為 50 微升中，且第 4 探子為 AA-4E5 或 AA-4E3。數據如下所示，作為一訊號對背景比值。

表 4：訊號對背景之比值

第 4 探子	Endo IV 稀釋比	循環數	標的物	
			10 ³ 標的物	10 ⁵ 標的物
AA-4E3	1:5000	40	1	6.7
AA-4E5	"	40	1	5.0
AA-4E3	1:10000	40	1	7.7
"	"	45	1	6.2
AA-4E5	"	40	1	11.5
"	"	45	1	5.0

實例 19：使用一個 3' 磷酸阻斷之探子的 LCR

如上補充實例 5 之反應條件下，操作 PCR，使用表 1 之探子 AA-1 及 AA-2 及表 2 之 AA-3 (18) 與 AA-4P (22)。如下表所示數據作為一訊號對背景之比值。大於 3 或 4 的相當值通常足以將標的物與背景區分開來。

表 5：訊號對背景之比值

Endo IV 稀釋比	循環數	標的物	
		10 ³ 標的物	10 ⁴ 標的物
1:10000	28	1	3.3
"	31	2.4	5.8
"	34	2.3	3.8
1:5000	25	1	1.8
"	28	2.0	3.8
"	31	2.0	3.2
"	34	1.6	2.0

實例 20：使用 2 個 3' 磷酸阻斷之探子的 LCR

1
5
10
15
20

如上實例17 操作LCR，使用表一之一般探子AA-2及AA-3及表2之經修飾的探子AA-1P(20)，AA-4P(20)。數據示於圖8，其繪示對於標的物三種量的循環次數與連接量的關係。由圖8可知，10及100分子的標的物可與○標的物者區別。

203687

公告本

A7
B7
C7
D7

六、申請專利範圍

修正
182年1月12日
補充

附件 1A:

第 80100655 號 專利 申請 案

中文 申請 專利 範圍 修正 本

民國 82 年 1 月 修正

1. 一種藉由連接酶鏈反應而放大標的核酸序列之方法，其中於探針雜交至標的物一模板之際，將一對互補探針連接至一對相鄰互補探針，以形成互補於標的物之放大產物，該放大產物本身作為進一步模板；其改良處包括：

(a) 提供可與標的雜交的所需探針，其中至少一個探針經修飾處理，如此當探針雜交時，酵素實質上無法辨識探針作為其受質，如此無法形成放大產物，其中該修飾處理係選自：

(i) 化學阻斷基團，其遮蓋或保護於連接步驟所需之化學基團；

(i i) 含有不配對位置之核酸突出物；或

(i i i) 當經修飾探針與其它探針雜交至標的物時，於此兩種探針之間所形成之一個或多個核苷大小的裂口；

(b) 若有標的物存在時，將經修飾探針與其雜交以形成經修飾探針一模板複合物；

(c) 以標的物依賴的方式校正修飾，以令經修飾探針一模板複合物可為連接酶酵素辨識而將其它探針對緊接在該探針；

其中該校正包括使用選自下列之試劑：

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

永

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

六、申請專利範圍

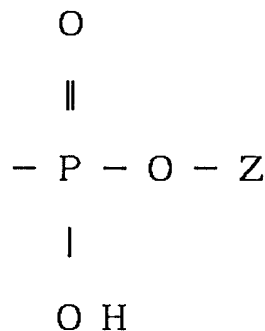
(i) 核酸內切酶；或

(ii) 用以填補裂口之聚合酶及核苷三磷酸；

(d) 將經校正之探針連接至相鄰接之探針，以形成放大產物，及

(e) 自標的物解離放大產物，並重覆雜交，校正及連接步驟以放大所欲之標的序列。

2. 根據申請專利範圍第1項之方法，其中阻斷部份具以下型式：



其中Z選自包括-H；-(CH₂)_nCHO之基團，其中n是由1至約3；一去氧核糖；及一二去氧核糖。

3. 根據申請專利範圍第1項之方法，其中步驟(a)中經處理修飾之起始子包括一個可與標的的第一片段雜交的1號探子，一個可與標的的第二片段雜交的2號探子，一個可與1號探子雜交的3號探子及可與2號探子雜交的4號探子，其中當修飾時；

(i) 標的第一片段之5'端與第二片段3'端有X_n鹼基之間隔，每個X獨立地選自1至4個鹼基中任3個

六、申請專利範圍

所組成的 N 組中，且 n 為大於或等於 1 之任何整數；

(i i) 3 號探子雜交至 1 號探子，如此位於 1 號探子上互補於 3 號探子 5' 端之鹼基，以 Y_m 個鹼基與 1 號探子 3' 端相隔，每個 Y 獨立地選自 0 至 4 個鹼基中任 3 個所組成的 M 組中，且 m 為 0 或任何大於或等於 1 之整數，但至少保持一個鹼基未被應用於 X_n 及 Y_m 序列中，以包括非 N 及非 M 組，且 X_n 鹼基之序列不互補於 Y_m 鹼基之序列；且

(i i i) 鄰近 X_n 5' 端及鄰近 Y_m 5' 端之鹼基選自 Q 組，其由非 N 及非 M 組成；

且其中該步驟 (c) 包括伸展 1 號探子以充填 X_n 裂口，及 4 號探子任意地充填 Y_m 裂口，利用多量的去氧基 X' 三磷酸及去氧基 Y' 三磷酸，其中 X' 及 Y' 分別代表 X 及 Y 之互補物。

4. 根據申請專利範圍第 3 項之方法，其中 n 等於 1 至 3。

5. 根據申請專利範圍第 3 項之方法，其中 m 等於 0。

6. 根據申請專利範圍第 3 項之方法，其中於步驟 c 中加入的去氧基 X' 三磷酸包括經含有一個標誌所修飾的鹼基，選自標誌，鈎子及半抗原所組成之基團。

7. 根據申請專利範圍第 3 項之方法，且包括偵測放大標的序列存在之進一步步驟，係利用粘附至 2 號及 3 號探子 5' 端之半抗原標誌。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

203882

A7
B7
C7
D7

六、申請專利範圍

8. 一種診斷套組，包括下列組合：

(a) 一種起始子，含有可與標的雜交的二對探子，如此其可於 L C R 中連接，其中至少一個探子係經修飾處理的，如此當起始子雜交時，連接酶實質上無法作用於作為其受質之起始子上；其中該修飾處理係選自：

(i) 化學阻斷基團，其遮蓋或保護於連接步驟所需之化學基團；

(i i) 含有不配對位置之核酸突出物；或

(i i i) 當經修飾探針與其它探針雜交至標的物時，於此兩種探針之間所形成之一個或多個核苷大小的裂口；

(b) 一種組合連接酶試劑，其用以組合放大產物；及

(c) 一種校正試劑，可以標的物依賴之方式校正經修飾之探子，以令探子一模板複合物可為連接酶所作用；

其中該校正試劑包括選自下列之作用物

(i) 核酸內切酶；或

(i i) 用以填補裂口之聚合酶及核苷三磷酸。

9. 根據申請專利範圍第 8 項之套組，其中校正試劑包括一種聚合酶。

10. 一種方法，其係用以自一個第二非標的序列中區別第一標的核酸序列，前者與標的差別在於至少一個鹼基，該方法包括：

a. 提出多量的四種不同探子，1 號探子互補於標的

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

水

203587

A7
B7
C7
D7

六、申請專利範圍

的第一片段，2號探子互補於標的的第二片段，3號探子互補於1號探子且4號探子互補於2號探子，

(i) 其中標的第一片段之5'端與第二片段3'端間隔 X_n 個鹼基，每個 X 獨立地選自1至4個鹼基中任3個所組成的 N 組中，且 n 為大於或等於1之任何整數；

(ii) 其中3號探子與1號探子雜交，如此位於1號探子上且互補於3號探子5'端之鹼基與1號探子之3'端間隔 Y_m 個鹼基，每個 Y 獨立地選自0至4個鹼基中任3個所組成的 M 組中， m 為0或任何大於或等於1之整數，但於 X_n 及 Y_m 序列中至少保留1個鹼基未應用，且 X_n 鹼基序列未與 Y_m 鹼基序列互補；

(iii) 其中緊鄰 X_n 5'端及 Y_m 5'端之鹼基係選自 Q 組，其由非 N 及非 M 組成；且

(iv) 其中非標的序列與標的序列差別至少一個鹼基， Z ，位於 X_n 區或 Y_m 區；

b. 將該4種探子在雜交條件下與單股標的或雙股標的或自其互補股分開之雙股標的混合；

c. 當與標的雜交，伸展1號探子以充填 X_n 裂口，及視所需的，以4號探子充填 Y_m 裂口，利用多量的去氧基 X' 三磷酸及去氧基 Y' 三磷酸，其中 X' 及 Y' 分別代表 X 及 Y 之互補物，其位於標的股但缺少去氧基 Z' 三磷酸，互補於非標的裂口中之單一差異鹼基；

d. 當與標的雜交時，經伸展之1號探子與2號探子連接，且視所需的將伸展出的4號探子與3號探子連接，

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝
訂

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

203587

A7
B7
C7
D7

六、申請專利範圍

以形成至少一個經連接探子雜交至標的序列的雙股複合體；及

e. 將適當伸展且連接的探子與未適當伸展且未連接的探子分離及偵測。

1 1. 一種方法，其係用以自一個第二非標的序列中區別第一標的核酸序列，前者與標的差別在於至少一個鹼基，該方法包括：

a. 提出多量的四種不同探子，1號探子互補於標的的第一片段，2號探子互補於標的的第二片段，3號探子互補於1號探子且4號探子互補於2號探子，

(i) 其中標的第一片段之5'端與第二片段3'端間隔 X_n 鹼基，每個 X 獨立地選自1至4個鹼基中任3個所組成的 N 組中，且 n 為大於或等於1之任何整數；

(ii) 其中3號探子與1號探子雜交，如此位於1號探子上且互補於3號探子5'端之鹼基與1號探子之3'端間隔 Y_m 個鹼基，每個 Y 獨立地選自0至4個鹼基中任3個所組成的 M 組中， m 為0或任何大於或等於1之整數，但於 X_n 及 Y_m 序列中至少保留1個鹼基未應用，且 X_n 鹼基序列未與 Y_m 鹼基序列互補；

(iii) 其中緊鄰 X_n 5'端及鄰近 Y_m 5'端之鹼基係選自 Q 組，其由非 N 及非 M 組成；且

(iv) 其中非標的序列與標的序列差別至少一個鹼基， Z ，於 Q 區，如此 Z 為含於 N 組， M 組或二者的鹼基；

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝
訂

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

203682

六、申請專利範圍

b. 將該4種探子在雜交條件下與單股標的或雙股標的或自其互補股分開之雙股標的混合；

c. 當與標的雜交，令1號探子伸展以充填 X_n 裂口，及視情況所需的，令4號探子充填 Y_m 裂口，利用多量的去氧基 X' 三磷酸及去氧基 Y' 三磷酸，其中 X' 及 Y' 分別代表 X 及 Y 之互補物，然而 Z 無法終止1號及視情況所需4號探子之伸展作用；

d. 當與標的雜交時，將適當伸展之1號探子與2號探子連接，且視所需的將適當伸展的4號探子與3號探子連接，形成至少一個經連接探子雜交至標的序列的雙股複合體；及

e. 將適當伸展且連接的探子與未適當伸展且未連接的探子分離及偵測。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝
訂