

公告本

年01月10日修(更)正本

(本)

發明專利說明書

(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：95131098

※ 申請日期：95.8.24

※IPC 分類：G01N33/574, 21/84

一、發明名稱：(中文/英文)

CXD1/68

複合式多標的癌細胞冷光偵測方法

二、申請人：(共 1 人)

姓名或名稱：(中文/英文) ID：76001900

高雄醫學大學

代表人：(中文/英文) 余幸司

住居所或營業所地址：(中文/英文)

高雄市三民區十全一路 100 號

國 籍：(中文/英文) 中華民國

三、發明人：(共 2 人)

姓 名：(中文/英文)

1. 林綉茹 ID：H220237656

2. 鄭添祿 ID：N122690699

國 籍：(中文/英文)

1. 中華民國

2. 中華民國

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：

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。

五、中文發明摘要：

一種複合式多標的癌細胞冷光偵測方法，本發明之方法係先製備基因晶片，另採取病患血液檢體，萃取血液檢體中之核糖核酸，並反轉錄合成為 cDNA，且以 Biotin 標誌，形成標誌物，然後將該基因晶片與標誌物進行雜交反應，於雜交反應後，再進行反應試驗，接著進行化學冷光反應，得到影像結果，對該影像結果進行冷光分析，並將分析結果以加權方式計算，即可精確地診斷癌症。

六、英文發明摘要：

七、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第(1)圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

步驟：a~e

八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

九、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係為一種複合式多標的癌細胞冷光偵測方法，尤指以低成本的基因晶片及易操作之冷光分析，並依據每個基因對於癌症形成的重要性給予加權計算，進而可精準地診斷癌症者。

【先前技術】

生物晶片是運用分子生物學、分析化學等原理進行設計，以矽晶片、玻璃、尼龍膜或高分子有機塑膠為基材，配合微機電或其他精密加工技術，所製成的高科技元件。由於生物晶片的體積小、反應快速並且能夠平行分析大量生物資訊，因此生物晶片可應用於如新藥開發、醫檢辨識、疾病篩檢、病原檢測、環境檢驗、食品檢驗，乃至於國防軍事偵防等領域。

而生物晶片中又以基因晶片發展最為快速、成熟且備受各界矚目，其主要的優點如下：

(1)具有快速、準確以及可以同時分析大量基因的優點，其效率是傳統生化檢測的上千倍，因此大大的改善了過去曠日費時、逐一比對基因功能的技術，此外大多數的生物反應或疾病會牽涉到很多的基因同時作用或交互調控，而基因晶片確實可提供研究學者更廣泛、更全面的基因資訊，也改變了先前研究人員終

其一生只鑽研一種基因的研究方式。

(2)微小化之優點：由於基因晶片使用的檢體量甚少，因此對於不易取得或微量的檢體，可以較少的量獲得相同的檢測結果，此外平行化的同步分析可降低試劑耗材的使用量，故利用晶片分析可減少檢測成本及檢體用量，發揮晶片微量檢測之優勢。

(3)自動化之分析：基因晶片上有數萬個密集排列的分子微陣列，通過自動化的檢測軟件，不但能夠在短時間內分析大量的生物分子，此外也可以達到基因定量、差異基因搜尋兩大基本功能，更能交互運用而衍生出許許多多應用，使人們快速準確地獲取樣品中的生物訊息。

而目前市場上所使用的基因晶片依承載核酸之材質不同主要可分兩類型如下所列：

(1)尼龍膜晶片：將所需之核苷酸片段固定在尼龍膜上，製備晶片。相較於玻璃晶片；尼龍膜晶片製備容易，實驗技術門檻低，且其所使用之化學呈色法實驗步驟簡易、試劑成本低，但化學呈色結果分析無自動化嚴重影響實驗靈敏度及精確性，因此尼龍膜晶片反而漸漸被玻璃晶片所取代。

(2)玻璃載體晶片：將玻璃晶片經由特殊方式處理後，以機器手臂快速、高密度的將核苷酸片段點印到

玻璃載體上，排列整齊成陣，製備為所需之基因晶片；此種晶片無法普及化於各種相關領域，主要原因如下：(1)玻璃處理技術門檻高、此外所製成之晶片成本很高，非一般實驗室或檢測單位所能負擔。(2)點製於玻璃材料的晶片及後續螢光標示試劑的使用，均易受到浮塵微粒的干擾，使結果產生誤差。(3)玻璃載體晶片所使用之螢光呈色暨雜交反應：所需檢體(核酸)品質要求高、反應步驟繁瑣且技術困難、螢光標示物(如 cy3 及 cy5)其成本為一般呈色用試劑 2-5 倍，且使用標示試劑後的保存時較短。(4)結果螢光呈色結果分析所需之特定掃描器，成本高昂絕非一般實驗單位所能負擔。

雖然上述之習知技術，基因晶片可運用於各相關領域，但機器價格高昂阻礙基因晶片之普及化。故，一般習用者係無法符合使用者於實際使用時之所需。

【發明內容】

本發明之主要目的係在於，提供一種複合式多標的癌細胞冷光偵測方法，以低成本的基因晶片及易操作之冷光分析，並依據每個基因對於癌症形成的重要性給予加權計算，進而可精準地診斷癌症。

為達上述之目的，本發明係一種複合式多標的癌細胞冷光偵測方法，本發明之方法係包含下列步驟：

(a)製備一基因晶片，該基因晶片係使用尼龍模晶片，而該基因晶片之製備方法係先由一打點機將基因寡核苷酸片段排列於晶片上，再利用一核酸快速固著裝置，以 1200 焦耳的高能量將基因寡核苷酸片段固著於晶片上。

(b)採取病患血液檢體，萃取血液檢體中之核糖核酸，並反轉錄合成為 cDNA，且以 Biotin 標誌，形成一標誌物。

(c)將該基因晶片與標誌物進行雜交反應，於雜交反應後，再進行反應試驗。

(d)於反應試驗後，再進行化學冷光反應，得到一影像結果。

(e)對該影像結果進行冷光分析，並將分析結果以加權方式計算，即可精確地診斷癌症。

【實施方式】

請參閱『第 1 圖』所示，係本發明之基本流程示意圖。如圖所示：本發明係為一種複合式多標的癌細胞冷光偵測方法，係包含下列步驟：

步驟 a：製備一基因晶片，該基因晶片係使用尼龍模晶片，而該基因晶片之製備方法係先由一打點機將基因寡核苷酸片段排列於晶片上，再利用一核酸快

速固著裝置，以 1200 焦耳的高能量將基因寡核苷酸片段固著於晶片上。

步驟 b：採取病患血液檢體，萃取血液檢體中之核糖核酸，並反轉錄合成為 cDNA，且以 Biotin 標誌，形成一標誌物。

步驟 c：將該基因晶片與標誌物加入雜交反應緩衝液，於 42°C 下進行雜交反應，於反應進行時，若該基因晶片上特異性之寡核苷酸序列可以辨識標誌之 cDNA 即會接合上，於雜交反應後，再進行反應試驗，利用該標誌物進行偵測，即可得知特定基因表現情形。

步驟 d：於反應試驗後，再進行化學冷光反應，該基因晶片經過清洗、固定後，加入抗 Biotin 抗體進行標誌物辨認，該抗體上有接合辣根過氧化物酶（Horseradish Peroxidase），後續加入受質（Luminol）後即可產生發光反應，並得到一影像結果。

步驟 e：該基因晶片產生之冷光以一光學鏡頭將冷光影像擷取於電腦中，對該影像結果進行冷光分析，若基因表現量較高則會產生強之冷光反應，藉由分析冷光之強度即可得基因表現數值，並將分析結果以加權方式計算，依照癌症特異性基因之重要性給予加權值，與癌症高度關聯性之基因之加權值分數較高，反之則較低；因此該基因晶片分析後，若基因呈現過度表現者會再乘上加權分數，即可得加權值，整

合該基因晶片上之加權值即可得加權總值並以此為判斷依據，即可精確地診斷癌症。

上述為本發明複合式多標的癌細胞冷光偵測方法，本發明係具有下列特點：

- 1.本發明係利用尼龍膜晶片，有效降低成本。
- 2.本發明簡化標誌反應及雜交反應，並使基因晶片的敏感度和特異性得以提升，且穩定性好。
- 3.本發明經化學冷光反應所得之影像結果可利用一般冷光分析軟體自動分析，解決過去呈色型反應實驗結果以目測定性的主觀因素判讀所導致不精確之問題，而冷光分析的成本較低且操作簡易。

4.由於每個基因在癌症中所扮演的角色不一，所以本發明之分析結果判讀會依據每個基因對於癌症形成的重要性給予加權計算，如此便能更準確的診斷癌症。

綜上所述，本發明複合式多標的癌細胞冷光偵測方法可有效改善習用之種種缺點，本發明係以低成本的基因晶片及易操作之冷光分析，並依據每個基因對於癌症形成的重要性給予加權計算，進而可精準地診斷癌症，進而使本發明之產生能更進步、更實用、更符合使用者之所須，確已符合發明專利申請之要件，爰依法提出專利申請。

惟以上所述者，僅為本發明之較佳實施例而已，當不能以此限定本發明實施之範圍；故，凡依本發明申請專利範圍及發明說明書內容所作之簡單的等效變化與修飾，皆應仍屬本發明專利涵蓋之範圍內。

【圖式簡單說明】

第 1 圖，係本發明之基本流程示意圖。

【主要元件符號說明】

步驟：a~e

十、申請專利範圍：

年 101. 10. 12 日 修(更)正 本 公 告 本

1. 一種複合式多標的癌細胞冷光偵測方法，係至少包含下列步驟：

(a) 製備一基因晶片，先利用一打點機，將基因寡核苷酸片段排列於晶片上，再利用一核酸快速固著裝置，將基因寡核苷酸片段固著於晶片上，於其中，該基因晶片係為尼龍模晶片；

(b) 取血液檢體，萃取血液檢體中之核糖核酸，並反轉錄合成為 cDNA，且以 Biotin 標誌，形成一標誌物；

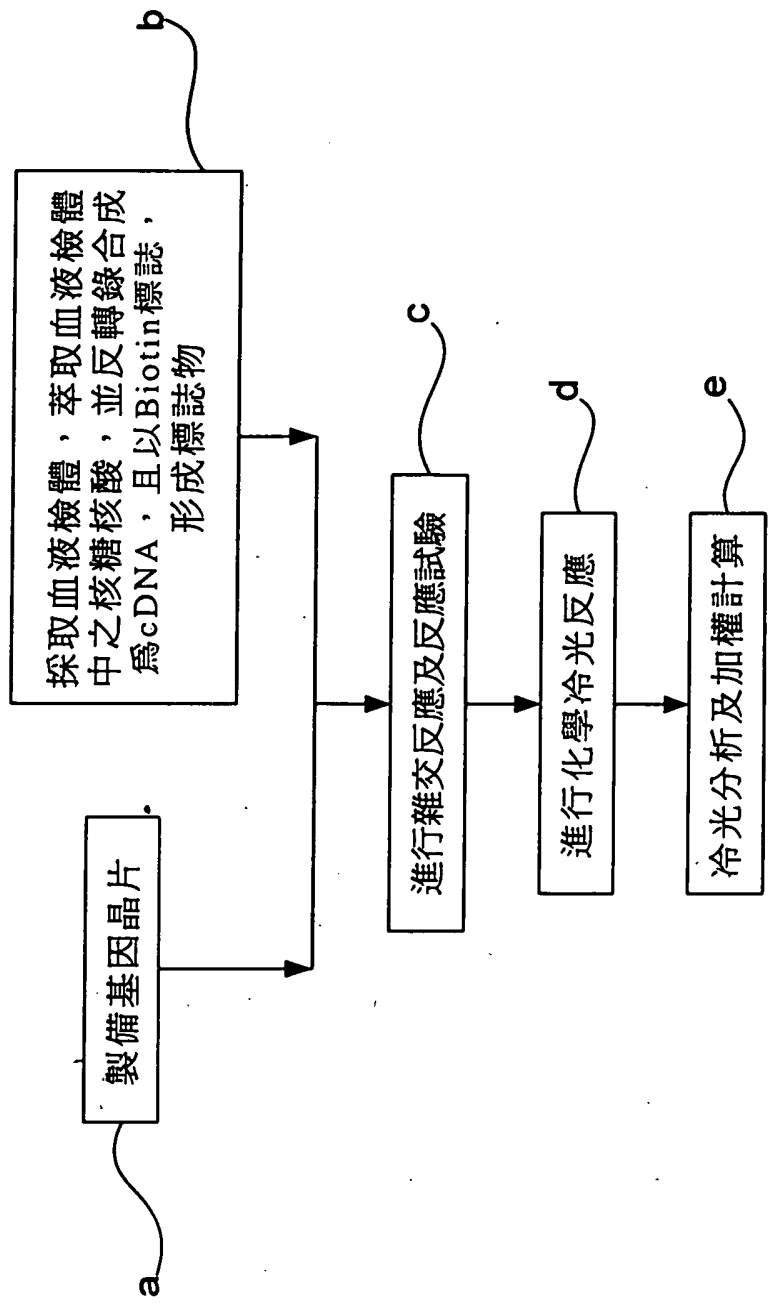
(c) 將該基因晶片與標誌物加入雜交反應緩衝液，於 42°C 下進行雜交反應，於反應進行時，若該基因晶片上特異性之寡核苷酸序列可以辨識標誌之 cDNA 即會接合上，於雜交反應後，再進行反應試驗，利用該標誌物進行偵測，即可得知特定基因表現情形；

(d) 於反應試驗後，再進行化學冷光反應，該基因晶片經過清洗、固定後，加入抗 Biotin 抗體進行標誌物辨認，該抗體上有接合辣根過氧化物酶 (Horseradish Peroxidase)，後續加入受質 (Luminol) 後即可產生發光反應，並得到一影像結果；

(e) 該基因晶片產生之冷光以一光學鏡頭將冷光影像擷取於電腦中，對該影像結果進行冷光分析，若基因表現量較高則會產生強之冷光反應，藉由分

析冷光之強度即可得基因表現數值，並將分析結果以加權方式計算，依照癌症特異性基因之重要性給予加權值，與癌症高度關聯性之基因之加權值分數較高，反之則較低；因此該基因晶片分析後，若基因呈現過度表現者會再乘上加權分數，即可得加權值，整合該基因晶片上之加權值即可得加權總值並以此為判斷依據。

公告本



第1圖