

【11】證書號數：I287581

【45】公告日：中華民國96(2007) 年 10 月 1 日

【51】Int. Cl. :

*C12Q1/68 (2006.01)**G01N33/50 (2006.01)**G06T7/60 (2006.01)*

發明

全 7 頁

【54】名稱：微量細胞核酸檢測晶片之方法

METHOD FOR BIOCHIP DETECTING LIMITED CELLS

【21】申請案號：093128136

【22】申請日：中華民國93(2004)年9月17日

【11】公開編號：200610823

【43】公開日：中華民國95(2006)年4月1日

【72】發明人：林綉茹 LIN, SHIU RU；鄭添祿 CHENG, TIAN LU；陳怡芳；吳昌翰

【71】申請人：高雄醫學大學 KAOHSIUNG MEDICAL UNIVERSITY
高雄市三民區十全一路100號

【74】代理人：歐奉璋

1

2

[57]申請專利範圍：

1.一種微量細胞核酸檢測晶片之方法，其步驟包括：

a.選定一尼龍模晶片，利用一手動打點機，將所需之基因核苷酸片段整齊排列點陣於晶片上；

b.手動打點後自然烘乾，再以一核酸快速固著器(cross-linker)，將核苷酸片段固著於尼龍模上，即完成晶片製備；

c.收集一般血液作為檢體；

5.

10.

d.萃取上述血液中之核糖核酸並進行線性放大；

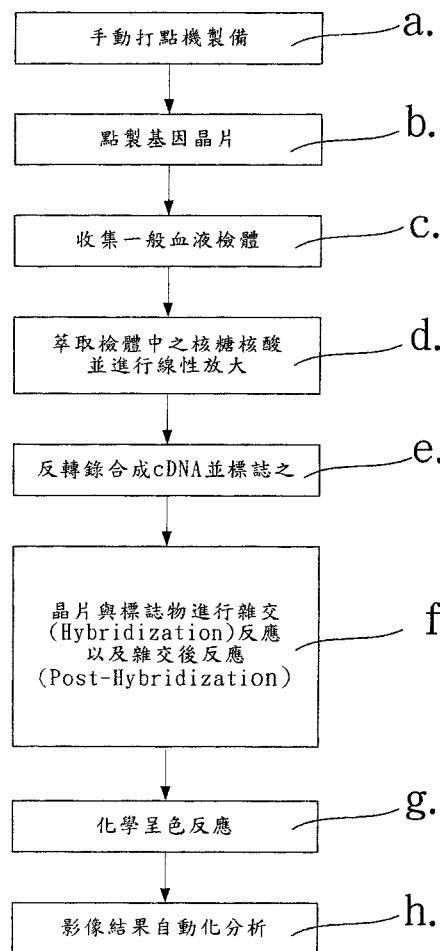
e.反轉錄試驗合成足量所需之互補去氧核糖核(cDNA)並加以標誌，使其形成一作為探針之標誌物；

f.將上述之晶片與標誌物進行探針標誌反應、雜交反應(Hybridization)以及雜交後反應(Post-Hybridization)處理；

g.將上述雜交後反應之晶片與標誌物

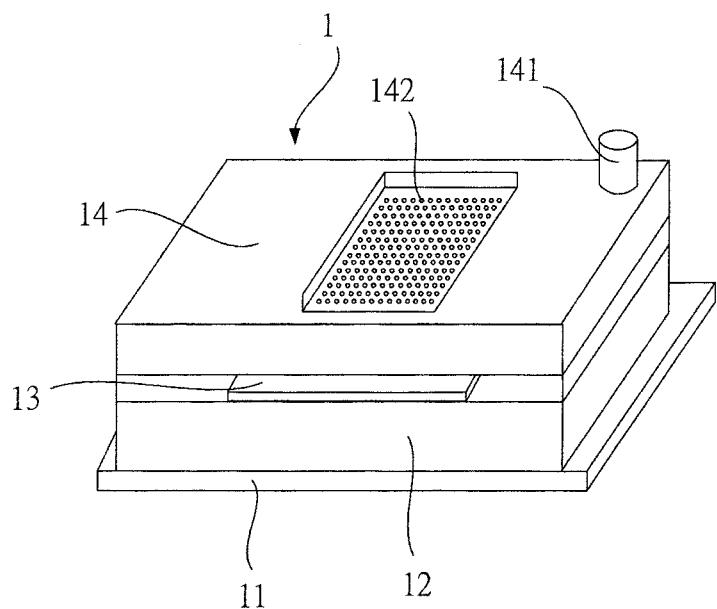
- 進行化學呈色反應；
- h. 將上述化學呈色反應後之影像結果進行自動化分析。
2. 依據申請專利範圍第1項所述之微量細胞核酸檢測晶片之方法，其中，該手動打點機係包括有一底座、一設置於底座上之晶片放置層、一設置於晶片放置層上之晶片固定層、及一設置於晶片固定層上之打點層所構成。
3. 依據申請專利範圍第2項所述之微量細胞核酸檢測晶片之方法，其中，該晶片放置層及打點層之一側係以一夾層樞紐加以連接，藉以使該打點層可作開啟之動作。
4. 依據申請專利範圍第2項所述之微量細胞核酸檢測晶片之方法，其中，該打點層之適當處係設置有一啟動手把。
5. 依據申請專利範圍第2項所述之微量細胞核酸檢測晶片之方法，其中，該打點層之正中央處係設置有多數個孔洞，而該正中央處係選取 $4.5 \times 4.5\text{ cm}$ 的區塊，並以 3mm 的孔距製備出 196 個(行：14；列：14)內徑 1.2mm 的孔洞，做為之後微量吸取管插入處(即打點處)。
6. 依據申請專利範圍第1項所述之微量細胞核酸檢測晶片之方法，其中，該所需之基因核苷酸片段係以二次水泡製成 $200\text{ }\mu\text{M}$ 以 100nL 整齊排列點陣於晶片上。
7. 依據申請專利範圍第1項所述之微量細胞核酸檢測晶片之方法，其中，係利用手動打點機將每一基因核苷酸片段以 100nL 之大小、 1.5mm 間距點陣排列於晶片上。
8. 依據申請專利範圍第1項所述之微量

- 細胞核酸檢測晶片之方法，其中，該核酸快速固著器係以 1200 焦耳之高能量進行交叉結合(crosslink)，而將核苷酸片段固著於尼龍模上。
5. 9. 依據申請專利範圍第1項所述之微量細胞核酸檢測晶片之方法，其中，該步驟c僅需收集 1c.c 的血液檢體即可進行檢測。
10. 10. 依據申請專利範圍第1項所述之微量細胞核酸檢測晶片之方法，其中，該探針標誌反應時間及雜交反應時間係為 24 小時。
11. 11. 依據申請專利範圍第1項所述之微量細胞核酸檢測晶片之方法，其中，該雜交後反應處理時，其偵測(Detection)的時間為 30 分鐘。
12. 12. 依據申請專利範圍第1項所述之微量細胞核酸檢測晶片之方法，其中，分析該步驟h之影像結果的密度分析軟體係為 Alpha Ease FC Stand Alone，及 GeneTAC™ Integrator 擇其一。
- 圖式簡單說明：
20. 第 1 圖，係本發明之流程方塊示意圖。
25. 第 2 圖，手動打點機之立體外觀示意圖。
30. 第 3 圖，手動打點機之立體分解示意圖。
35. 第 4 圖，生物統計軟體分析實驗結果示意圖。
- 第 5 圖，K-ras 致癌基因穩定轉染之人類腎上腺皮質細胞株實驗結果示意圖。
- 第 6 圖，係本發明利用微量細胞核酸檢測晶片技術平台檢測各種癌症病人血液中細胞與特定基因群之反應表現示意圖。

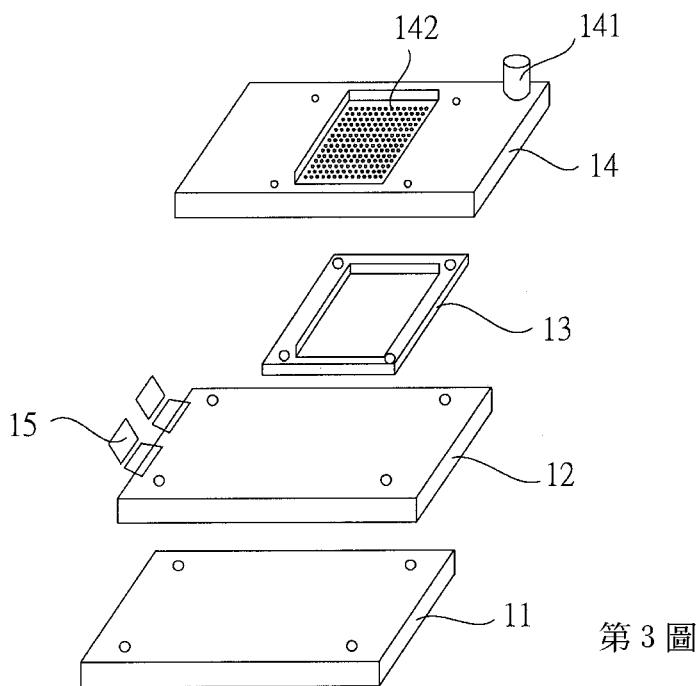


第1圖

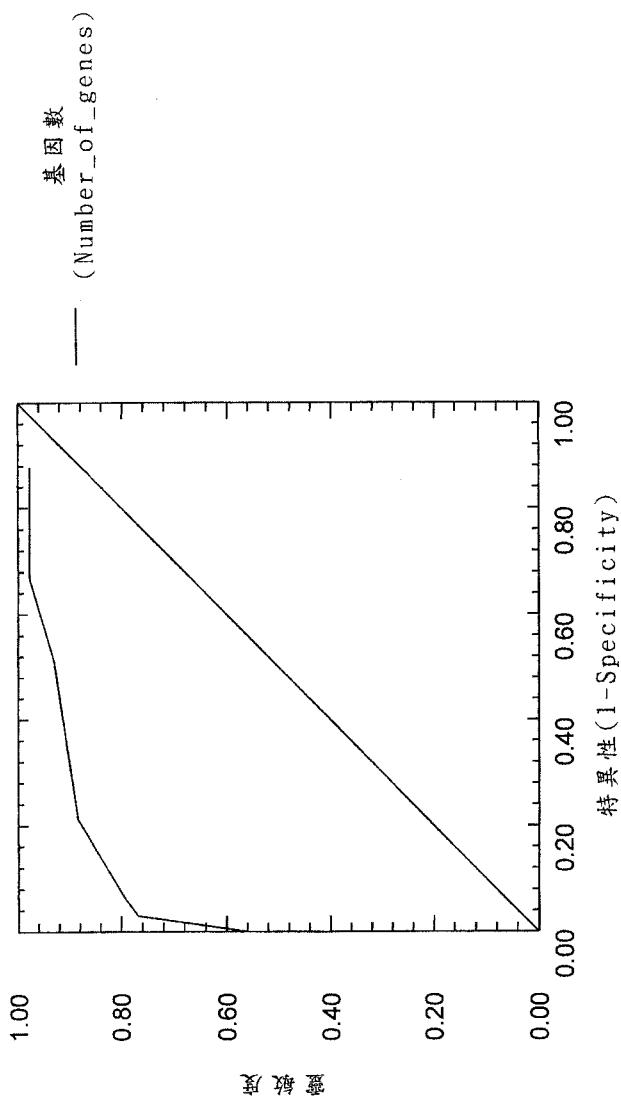
(4)



第2圖



第3圖



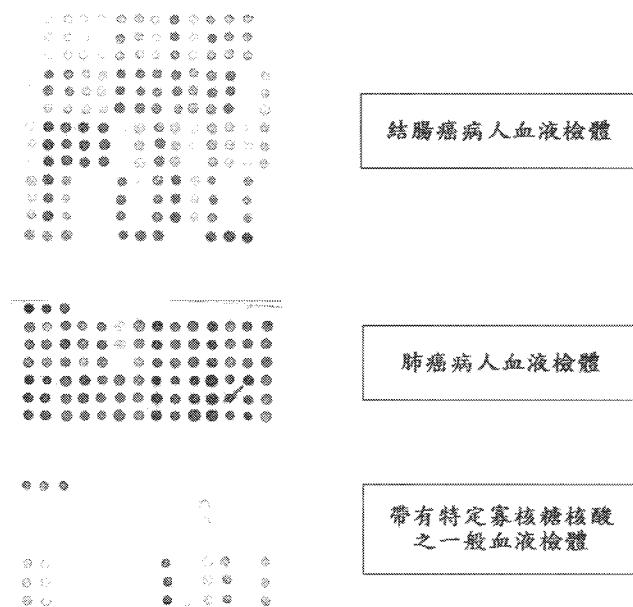
第4圖

S.C.C. 淚中之 K-ras 故 癌基因擴定株系之人 類腎上腺皮膚細胞株	100	25	12	6
本發明 之 檢測晶片 反應影像圖				
判定 結果	+	(12/22)	(3/22)	(1/22)

+ - - - -

16 16 16 16

第 5 圖



第 6 圖

