



(21) 申請案號：101217741

(22) 申請日：中華民國 101 (2012) 年 09 月 14 日

(51) Int. Cl. : C12M1/00 (2006.01)

(71) 申請人：輔英科技大學附設醫院(中華民國) (TW)

屏東縣東港鎮中山路 5 號

(72) 新型創作人：鍾富晏 (TW)；林綉茹 (TW)；張惠人 (TW)；黃雅堂 (TW)

(74) 代理人：歐奉璋

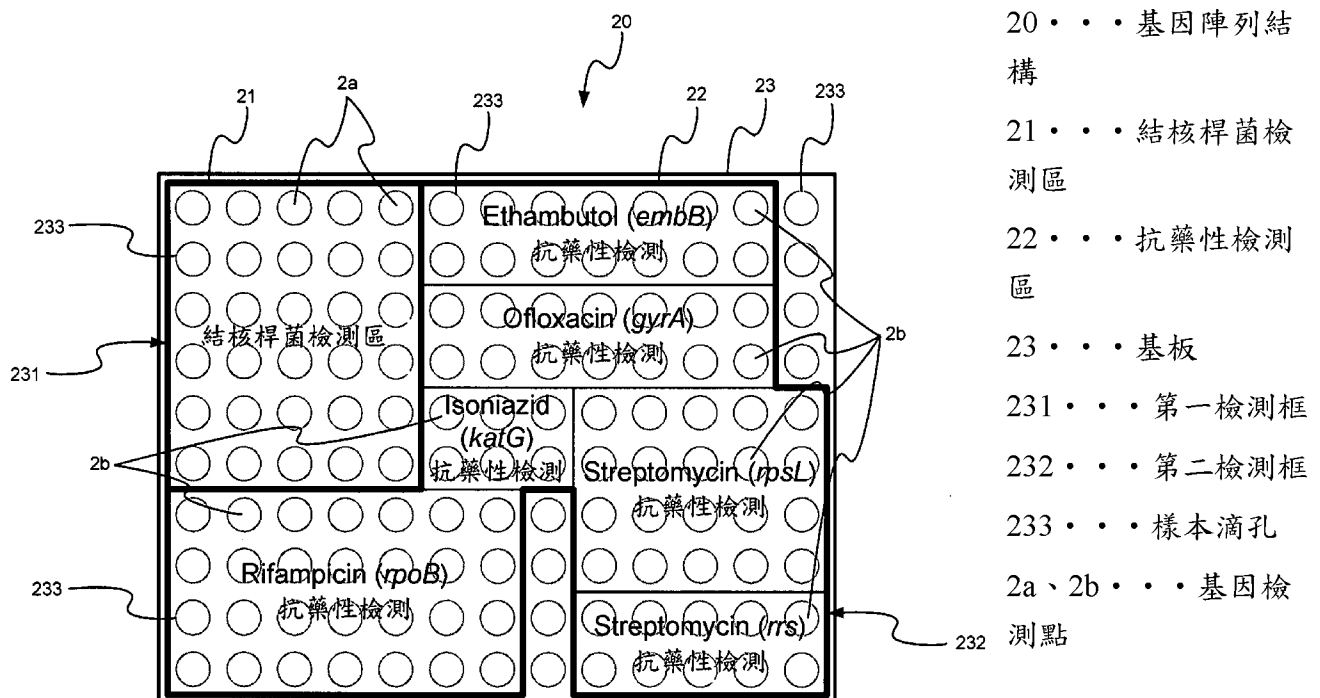
申請專利範圍項數：3 項 圖式數：4 共 17 頁

## (54) 名稱

結核病快速診斷及藥效檢測結構

## (57) 摘要

一種結核病快速診斷及藥效檢測結構，係包括一基板、一結核桿菌檢測區以及一抗藥性檢測區所構成之基因陣列結構。該基板上具有一第一、二檢測框，及多數於該基板表面呈陣列狀排列之樣本滴孔，該第一、二檢測框內之樣本滴孔係分別供承接結核桿菌中特異性區段樣本與抗結核藥物樣本；該結核桿菌檢測區係具有多數被覆於基板表面且分別接合有可與特定生物分子反應而產生不同呈色表現之生物探針之基因檢測點於第一檢測框內之樣本滴孔中，該些基因檢測點中包含 13 個結核桿菌特異性基因之結核桿菌特異性基因群；以及該抗藥性檢測區係具有多數被覆於基板表面且分別接合有可與 Isoniazid、Rifampicin、Ofloxacin、Ethambutol 及 Streptomycin 之抗結核藥物反應而產生不同呈色表現之基因檢測點於第二檢測框內之樣本滴孔中，該些基因檢測點中包含 6 個抗藥性基因之抗藥性基因群。



第 1 圖



# 新型摘要

102年.04月.30日 修正替換頁

申請日: 101.9.14

IPC分類: C12M 1/00 (2006.01)

公告本

**【新型摘要】****【中文新型名稱】** 結核病快速診斷及藥效檢測結構**【英文新型名稱】****【中文】**

一種結核病快速診斷及藥效檢測結構，係包括一基板、一結核桿菌檢測區以及一抗藥性檢測區所構成之基因陣列結構。該基板上具有一第一、二檢測框，及多數於該基板表面呈陣列狀排列之樣本滴孔，該第一、二檢測框內之樣本滴孔係分別供承接結核桿菌中特異性區段樣本與抗結核藥物樣本；該結核桿菌檢測區係具有多數被覆於基板表面且分別接合有可與特定生物分子反應而產生不同呈色表現之生物探針之基因檢測點於第一檢測框內之樣本滴孔中，該些基因檢測點中包含13個結核桿菌特異性基因之結核桿菌特異性基因群；以及該抗藥性檢測區係具有多數被覆於基板表面且分別接合有可與Isoniazid、Rifampicin、Ofloxacin、Ethambutol及Streptomycin之抗結核藥物反應而產生不同呈色表現之基因檢測點於第二檢測框內之樣本滴孔中，該些基因檢測點中包含6個抗藥性基因之抗藥性基因群。

**【英文】**

【指定代表圖】 第1圖

【代表圖之符號簡單說明】

基因陣列結構 2 0

結核桿菌檢測區 2 1

抗藥性檢測區 2 2

基板 2 3

第一檢測框 2 3 1

第二檢測框 2 3 2

樣本滴孔 2 3 3

基因檢測點 2 a 、 2 b

# 新型專利說明書

## 【新型說明書】

【中文新型名稱】 結核病快速診斷及藥效檢測結構

【英文新型名稱】

【技術領域】

【0001】 本創作係有關於一種結核病快速診斷及藥效檢測結構，特別係指兼具結核桿菌分型與抗藥性分析，可同時檢測結核桿菌與抗藥性基因之基因陣列結構者。

## 【先前技術】

【0002】 結核病 (Tuberculosis, TB) 係一種相當古老之傳染性疾病，雖然全球科學家經過長久之努力，研究預防、控制及治療之方法，然而，結核病目前仍然係全球重要之公共衛生上之問題，其同時也是單一病原引起死亡病例最高之傳染病。根據世界衛生組織 (World Health Organization, WHO) 之預估，全球超過三分之一之人口，已經受過結核分枝桿菌 (Mycobacterium Tuberculosis) 之感染，經統計顯示，每年大約新增八百萬結核病新病例且造成兩百萬人因結核病而死亡。

結核病之特色在於受到結核分枝桿菌感染後，通常並不會立即發病，感染者僅約10%之機率發病，而成爲活動性結核病患者 (Active TB)。另大部分患者受結核分枝桿菌感染後，菌體可長期潛存在宿主體內等待伺機發病。當結核分枝桿菌及宿主防禦機轉之間微妙之平衡破壞，潛伏性病灶才會活化而成爲活動性患者。因此，整體而言，潛藏性結核病患 (Latent TB) 轉變爲活動性結核病患之發病成因，可能係再次感染 (Exogenous Reinfection)，也有可能係病原菌之再活化 (Endogenous Reactivation)。

結核病之臨床表現千變萬化，發病之初往往沒有明顯或特異性之症狀，且病程發展緩慢，時好時壞，臨床診斷上十分困難。因此，臨床上結核病之診斷，必須綜合患者之臨床表徵，加上X光片上之變化，最後再以實驗室檢驗加以證實才能正確判斷。

在結核病之實驗診斷方面，主要以組織病理學、抗酸菌染色與肺結核桿菌培養等技術為主。然而這些檢驗技術都有它們之檢測侷限。以痰液抹片之顯微鏡染色檢查而言，其係傳統方式中最快檢測抗酸菌之方法，但痰液檢體中，必需每毫升（ml）至少含5000至10000隻菌，才可由染色之抹片鏡檢查出。另外，此技術之偽陽性也很高，因為除了結核分枝桿菌外，非典型分枝桿菌（Non-Tuberculous Mycobacteria, NTM）及少數其他之桿菌，亦可呈染色陽性。至於結核分枝桿菌之培養方法為傳統上結核病之確定診斷方法之一，雖有敏感性為80至85%，特異性為98%之特性，惟其需要至少4到8週之時間才能得到檢驗結果，時效上嚴重達不到臨床上之需求。隨著分子生物技術之蓬勃發展，且廣泛應用於生物醫學之探討，利用分子生物學相關技術，如聚合酶連鎖反應（Polymerase Chain Reaction, PCR）與聚合酶連鎖反應-限制酵素切割片段長度多型性（PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism, PCR-RFLP）等，對結核病進行分子診斷，使結核病之臨床診斷有了革命性之進步。發展初期，一般檢驗單位多利用聚合酶連鎖反應，直接偵測受檢者痰液檢體之中，是否存在肺結核分枝桿菌之分子標記，如熱休克蛋白65（hsp65）與插入片段6110（IS6110）之去氧核糖核酸（Deoxyribonucleic Acid, DNA）或核糖核酸（Ribonucleic Acid, RNA）。並結合限制酵素切割片段長度多型性，對所偵測之菌體核酸進行分子分型。然而，此種方法雖可快速地偵測結核桿菌之存在，但不管檢測宿主檢體中所含結核分枝桿菌特有之DNA或訊息核糖核酸（messenger RNA, mRNA）表現量，其在臨床診斷上

仍舊無法達到令人滿意之正確性。

這幾年，由於結核分枝桿菌全基因體之解碼，科學家們發現結核分枝桿菌與牛分枝桿菌減毒菌株（*Mycobacterium bovis* BCG）之間存在基因體缺失（Genomic Deletion）之現象，並將缺失片段位置統稱為差異性區段（Regions-of-Difference, RD）。許多研究報告指出，此種差異性區段造成之原因可能為基因體中DNA複製時之錯誤或是插入性片段之插入，造成基因體之片段缺失（Deletion）、插入（Insertion）、倒置（Inversion）或複製（Replication）等，最後終於造成菌種間差異性區段之產生。差異性區段上存有許多重要之基因以及致病因子，這些區段之存在或缺失可因而造成結核桿菌群中各個菌種致病性之不同。因此，以差異性區段作為結核分枝桿菌分型標的，不但可保有分子診斷技術快速敏感性高之優點，亦可彌補傳統分子檢測方式無法鑑定結核分枝桿菌群中各菌株之缺點，係相當具潛力性結核病診斷之分子標記。

黃等人曾於2009年發表在每一個差異性區段中選出特異性目標基因共14個，作為建構結核病基因診斷晶片之檢測標的。並利用可同時檢測多基因標的之微量核酸檢測技術平台，使其靈敏度可達每毫升全血中只要有5個細胞即可檢測，藉此建立以痰液檢體為檢測對象之結核病基因診斷晶片。

該實驗先自臨床檢體分離致病性分枝桿菌群菌株，以傳統生化反應及核酸定序確認分離菌株後，記錄每一病患所感染之結核菌作為標準參考資料，繼而利用現行分子檢測技術PCR-RFLP及基因晶片檢測技術，直接由結核病患者之痰液檢體偵測結核分枝桿菌之存在，並且進一步比較兩種方法間之一致性及方便性。結果顯示，由收集之246個結核病患者之臨床痰液檢體中，可直接以PCR-RFLP偵測出結核分枝桿菌群（TB Complex, TBC）存在之比例為62.5%，而以基因晶片檢測技術可偵測出之比例為85%；並且，此兩種方法檢測出之菌株種類完全一致。分析兩種方法檢測結果與痰液染色之

相關性，在56個陽性培養且痰液染色陽性之檢體中，PCR-RFLP可偵測出39個，而基因晶片檢測技術之檢出率可大於90%，能偵測出52個；而在24個陽性培養但痰液染色呈陰性之檢體中，PCR-RFLP可檢測出11個，而基因晶片檢測技術之檢出率可高達67%，能偵測出16個。

由上述結果可知基因晶片檢測技術不但操作方便，可有效節省人力、時間之耗費，其靈敏度更遠比PCR-RFLP技術高出許多，係結核病分子診斷未來發展之新趨勢。

然而，針對世界市面上結核分枝桿菌檢測/藥效檢測套組，如

Spoligotyping Method (荷蘭-Isogen)、TB Ag Rapid Test (台灣-台塑生醫科技)、Amplified MTDR (美國-Gene Probe)、DR. MTBC Screen Kit (台灣-晶宇生物科技)及GenoType MTBDRplus (德國-Hain Lifescience)。其中Spoligotyping Method係檢測結核分枝桿菌特異性間隔寡核苷酸圖譜，再從已建立之資料庫進行比對分型，惟其分辨菌株能力不及標準方法，具有鑑別率低之缺點，並且不具抗藥性分析之藥效檢測功能；TB Ag Rapid Test係以結核桿菌特異性抗原，利用抗原抗體反應直接偵測結核菌，惟其具有成本高，並需進行分枝桿菌菌落培養，步驟繁雜且耗時之缺點，同時亦不具抗藥性分析之藥效檢測功能；Amplified MTDR係檢測結核桿菌核糖體核糖核酸(ribosomal RNA, rRNA)與特異性DNA探針雜合並以冷光偵測，惟其需進行分枝桿菌菌落培養，具有步驟繁雜且耗時之缺點，並同樣不具抗藥性分析之藥效檢測功能；DR. MTBC Screen Kit係針對結核桿菌內特有之基因片段，以PCR進行放大，再利用晶片進行探針雜合反應，雖可採以痰液樣本進行結核桿菌檢測並找出結核桿菌群之Rifampicin之抗藥性基因，惟其每毫升之痰中需有10萬隻細菌才能驗出，敏感度也僅有65%，具有敏感度低之缺點；GenoType MTBDRplus係以PCR增幅結核桿菌抗藥性基因，再與探針進行雜合反應，雖可找出結核桿菌群

之Ofloxacin、Streptomycin及Ethambutol之抗藥性基因，惟其具有成本高，技術複雜度高、耗時且需持續品管之缺點，並且僅具藥效檢測而不具結核桿菌檢測功能。

另外，按中華民國申請專利第201005098號之活動性肺結核桿菌晶片檢測法，其係一種能直接經宿主痰液檢體檢測結核桿菌感染之活動期肺結核桿菌診斷晶片，惟其僅能提供結核菌篩檢，並不具藥效分析基因群之功能。故，一般習用者係無法符合使用者於實際使用時達到快速診斷結核病之同時並兼具藥效檢測抗藥性之所需。

### 【新型內容】

【0003】 本創作之主要目的係在於，克服習知技藝所遭遇之上述問題並提供一種兼具結核桿菌分型與抗藥性分析，可同時檢測結核桿菌與抗藥性基因之基因陣列結構者。

為達以上之目的，本創作係一種結核病快速診斷及藥效檢測結構，係包括一基板、一結核桿菌檢測區以及一抗藥性檢測區所構成之基因陣列結構。其中該基板上具有一第一檢測框、一第二檢測框、及多數可供容納各種基因檢測片段之樣本滴孔，且該等樣本滴孔係於該基板表面按照行與列整齊地呈陣列狀排列，於其中該第一檢測框內之樣本滴孔係為供承接結核桿菌中特異性區段樣本，該第二檢測框內之樣本滴孔則供承接抗結核藥物樣本；該結核桿菌檢測區係具有多數被覆於該基板表面且分別接合有可與特定生物分子反應而產生不同呈色表現之生物探針之基因檢測點於該第一檢測框內之樣本滴孔中，該些基因檢測點中包含13個結核桿菌特異性基因之結核桿菌特異性基因群；以及該抗藥性檢測區係具有多數被覆於該基板表面且分別接合有可與Isoniazid、Rifampicin、Ofloxacin、Ethambutol及Streptomycin之抗結核藥物反應而產生不同呈色表現之基因檢測點於該第二檢測框內之樣本滴孔中，該些基因檢測點中包含6個抗藥性基因之抗藥性



基因群。藉此，以該結核桿菌特異基因與該抗藥性基因為探針，以雜合反應進行分析，可同時檢測結核桿菌與抗藥性基因，達到快速、低成本並能兼測抗結核藥物之抗藥性之功效。

上述所提之13個結核桿菌特異性基因係分別為hsp65、Rv0577、Rv3120、Rv2073c、Rv1970、Rv3875、Rv3347c、Rv1510、Rv0186、Rv0124、TbD1、mtp40及mpb83。

上述所提之6個抗藥性基因分別為katG、rpoB、gyrA、embB、rpsL及rrs。

#### 【圖式簡單說明】

【0004】 第1圖，係本創作基因陣列結構之檢測區塊示意圖。

第2圖，係本創作基因陣列結構之基因排列示意圖。

第3圖，係本創作一較佳實施例之結核桿菌檢測區判讀示意圖。

第4圖，係本創作一較佳實施例之抗藥性檢測區判讀示意圖。

#### 【實施方式】

【0005】 請參閱『第1圖及第2圖』所示，係分別為本創作基因陣列結構之檢測區塊示意圖及本創作基因陣列結構之基因排列示意圖。如圖所示：本創作係一種結核病快速診斷及藥效檢測結構，為至少包括由一基板23、一結核桿菌檢測區21及一抗藥性檢測區22所構成之基因陣列結構20，圖中P代表陽性控制組、N代表陰性控制組以及B代表空白控制組。

上述所提之基板23，其上具有一第一檢測框231、一第二檢測框232、及多數可供容納各種基因檢測片段之樣本滴孔233，且該等樣本滴孔233係於該基板23表面按照行與列整齊地呈陣列狀排列，其中該第一檢測框231內之樣本滴孔233係為供承接結核桿菌中特異性區段樣本，該第二檢測框232內之樣本滴孔233則供承接抗結核藥物樣本。

上述所提之該結核桿菌檢測區 2 1，係具有多數被覆於該基板 2 3 表面且分別接合有可與特定生物分子反應而產生不同呈色表現之生物探針之基因檢測點 2 a，該些基因檢測點 2 a 該第一檢測框內 2 3 1 之樣本滴孔 2 3 3 中，該些基因檢測點 2 a 中包含 13 個結核桿菌特異性基因之結核桿菌特異性基因群，其中，具診斷結核桿菌之結核桿菌特異性基因群，主要包含如表一所示之結核桿菌特異性基因所挑選之特異性寡核苷酸序列，而由表一可知此包含 13 個結核桿菌特異性基因之結核桿菌特異性基因群係分別為 hsp65、Rv0577、Rv3120、Rv2073c、Rv1970、Rv3875、Rv3347c、Rv1510、Rv0186、Rv0124、TbD1、mtp40 及 mpb83。

表 一

| 序列辨識號碼 | 基因名稱<br>(Gene Name) | 寡核苷酸序列<br>(Oligonucleotide Sequence)           |
|--------|---------------------|--|
| 1      | hsp65               | CAT CGG TCT TCT TGG CTA CCT CTT TGA CCA GCT CG |
| 2      | Rv0577              | CGT CGT AAC CCC AGC CGA ACA ACG ATG TGT AGA AC |
| 3      | Rv3120              | CGG ATG CCA GAA TAG TCG GCA AAG TAC CAG AGC A  |
| 4      | Rv2073c             | GCC GGC TTT GGC CGA TCC GTA GAC ATA GTT G      |
| 5      | Rv1970              | GTC ACC GGA CTG GTT GTT GAG GTA TGC GGT G      |
| 6      | Rv3875              | CTT CCC CTC GTC AAG GAG GGA ATG AAT GGA CGT G  |
| 7      | Rv3347c             | GTG TTG TAG CTG CCC GAG TTG AAT ACC CCG AAG TT |
| 8      | Rv1510              | CCA GAT AGA TGA CCG TGT AGA CGC AGG CAA CGG    |
| 9      | Rv0186              | GGT CCT CGG AAA GGT ACT CGA AGT TGC GGC        |
| 10     | Rv0124              | CGT CTG CAC GAA CTG CTG ATG AAA CGC CG         |
| 11     | TbD1                | TCG GCT GCT CGG TCC CTC TGA TAC TTG AGA TTC TG |
| 12     | mtp40               | ATC CGC AGT GAT GCC AAC TCA GGA AAC CAC AC     |
| 13     | mpb83               | GAG GTC AGG GTA CTG AGC ATC GGG TTG TTG GAA G  |

上述所提之抗藥性檢測區 2 2，係具有多數被覆於該基板 2 3 表面且分別接合有可與 Isoniazid、Rifampicin、Ofloxacin、Ethambutol 及 Streptomycin 等抗結核藥物反應而產生不同呈色表現之基因檢測點 2 b 於該第二檢測框 2 3 2 內之樣本滴孔 2 3 3 中，該些基因檢測點 2 b 中包含 6 個抗藥性基因之抗藥性基因群，其中，具檢測抗結核藥物藥效之抗藥性基

因群，主要包含如表二所示之抗藥性基因所挑選之序列，而由表二可知此包含6個抗藥性基因之抗藥性基因群係分別為katG、rpoB、gyrA、embB、rpsL及rrs。

表二

| 藥物               | 寡核苷酸名稱                      | 序列 (5'至3')                                  |
|------------------|-----------------------------|---|
| Isoniazid        | katG-W1                     | AAC TAG CTG TGA GAC AGT CAA TCC CGA TGC CCG |
|                  | katG-W315                   | CGA TGC CGC TGG TGA TCG CGT CCT TA          |
|                  | katG-Q315                   | CGA TGC CGC TGG TGA TCG TGT CCT TA          |
| Rifampicin       | rpoB-W1                     | GAC TCG GAC TAG GAC TAG CGG CTG TTT TGC TCT |
|                  | rpoB-W450                   | CCC TCA GGG GTT TCG ATC GGG CAC AT          |
|                  | rpoB-Q450                   | CCC TCA GGG GTT TCG ATC GAG CAC AT          |
|                  | rpoB-W513                   | TCG ACC ACC TTG CGG TAC GGC GTT TC          |
|                  | rpoB-Q513                   | TCG ACC ACC TTG CGG TAC GGA GTT TC          |
|                  | rpoB-W522                   | GTA CAC GAT CTC GTC GCT AAC CAC GCC GT      |
|                  | rpoB-Q522                   | GTA CAC GAT CTC GTC GCT AAC TAC GCC GT      |
|                  | rpoB-W526                   | GTC GGC GGT CAG GTA CAC GAT CTC GT          |
|                  | rpoB-Q526                   | GTC GGC GGT CAG GTA CAT GAT CTC GT          |
|                  | rpoB-W529                   | TCC TCC TCG TCG GCG CTC AGG TAC A           |
|                  | rpoB-Q529                   | TCC TCC TCG TCG GAG CTC AGG TAC A           |
|                  | rpoB-W531                   | CCA CCA CGT GGC GGT CCT C                   |
| rpoB-Q531        | CCA CTA CGT GGC GGT CCT C   |   |
| Ofloxacin        | gyrA-W1                     | CGG GAA TCC TCT TCT ACC TCA ACA ACT CCG CGC |
|                  | gyrA-W80                    | CCC ATG GTC TCG GCA ACC GAC CG              |
|                  | gyrA-Q80                    | CCC ATG GTC TCG GCA ACT GAC CG              |
|                  | gyrA-W88-91                 | CGT AGA TCG ACG CGT CGC CGT GC              |
|                  | gyrA-Q88-91                 | CGT ATA TCG ACG CGT CGC CGT GC              |
|                  | gyrA-W94                    | GCC ATG CGC ACC AGG CTG TCG TAG AT          |
|                  | gyrA-Q94                    | GCC ATG CTC ACC AGG CTG TCG TAG AT          |
| Ethambutol       | embB-W1                     | GTG TCC AGC TTC TTA GCC GAG TAG TCC GGT GT  |
|                  | embB-W306                   | CGG GCC ATG CCC AGG ATG TAG CC              |
|                  | embB-Q306                   | CGG GCC ATG CCC AGG ATA TAG CC              |
|                  | embB-W319                   | GGG CTG CCG AAC CAG CGG AAA TAG TTG G       |
|                  | embB-Q319                   | GGG CTG TCG AAC CAG CGG AAA TAG TTG G       |
|                  | embB-W406                   | CGA GCG CGA TGA TGC CCT CCG                 |
| embB-Q406        | CGA GCT CGA TGA TGC CCT CCG |   |
| Streptomycin     | rpsL-W1                     | GCG GTC TTG ACC TTA CTG ATC TTG TCC CGA     |
|                  | rpsL-W43                    | GAA GCG CCG AGT TCG GCT TCT TCG GAG         |
|                  | rpsL-Q43                    | GAA GCG TCG AGT TCG GCT TCT TCG GAG         |
|                  | rpsL-W88                    | GCA CAC CAG GCA GGT CCT TCA CCC             |
|                  | rpsL-Q88                    | GCA CAC TAG GCA GGT CCT TCA CCC             |
| Streptomycin     | rrs-W1                      | CGT AGG AGT CTG GGC CGT ATC TCA GTC CCA     |
|                  | rrs-W513                    | CCT ACG TAT TAC CGC GGC TGC TGG CA          |
|                  | rrs-Q513                    | CCT ACT TAT TAC CGC GGC TGC TGG CA          |
|                  | rrs-W514                    | GCA CCC TAC GTA TTA CCG CGG CTG CT          |
|                  | rrs-Q514                    | GCA CTC TAC GTA TTA CCG CGG CTG CT          |
|                  | rrs-W1401                   | TGA CGT GAC GGG CGG TGT GTA CAA GG          |
|                  | rrs-Q1401                   | TGA CGT GAC GGG CGG TAT GTA CAA GG          |
|                  | rrs-W1484                   | GAC TTC GTC CCA ATC GCC GAT CCC ACC TTC     |
|                  | rrs-Q1484                   | GAC TTC GTC CCA ATC GCC GAT CCT ACC TTC     |
| Positive control | rri                         | GTG TTA CCA CTG ACT GGT ACG GCT ACC TTC CTG |

請參閱『第3圖』所示，係本創作一較佳實施例之結核桿菌檢測區判讀示意圖。如圖所示：本創作將13個選定之結核桿菌特異性基因以及6個選定之抗藥性基因，於一尼龍膜片上建構基因陣列結構，其中該結核桿菌檢測區21經一較佳實施例，以結核桿菌特異基因為探針，由雜合反應進行分析，再以呈色反應檢測雜合訊息，若有呈色反應即代表有該基因表現，並依照此基因表現差異進行結核桿菌分型。圖中顯示：結核桿菌於該基因陣列結構呈色結果為hsp65 (+)、Rv0577 (+)、Rv3120 (-)、Rv2073c (-)、TbD1 (+)、Rv1970 (-)、Rv3875 (+)、Rv3347c (+)、Rv1510 (-)、Rv0186 (+)、Rv0124 (+)、mtp40 (+) 以及mpb83 (+)；其中判讀結果為 (+) 者代表陽性反應。

更詳細之比較可由下表三所示。

表三

|                                    | hsp65 | Rv0577 | Rv3120 | Rv2073c | TbD1 | Rv1970 | Rv3875 | Rv3347c | Rv1510 | Rv0186 | Rv0124 | mtp40 | mpb83 |
|------------------------------------|-------|--------|--------|---------|------|--------|--------|---------|--------|--------|--------|-------|-------|
| Organisms other than Mycobacterium | -     | -      |        |         |      |        |        |         |        |        |        |       |       |
| NTM*                               | +     | -      |        |         |      |        |        |         |        |        |        |       |       |
| <i>M. canettii</i>                 | +     | +      | -      | +       | +    | +      | +      | +       | +      | +      | +      | +     | +     |
| <i>M. tuberculosis</i>             | +     | +      | +      | +       | -    | +      | +      | +       | +      | +      | +      | +     | +     |
| <i>M. africanum</i> (lb)           | +     | +      | +      | -       | +    | +      | +      | +       | +      | +      | +      | +     | +     |
| <i>Oryx bacillus</i>               | +     | +      | +      | -       | +    | -      | +      | +       | +      | +      | +      | +     | +     |
| <i>M. africanum</i> (lib)          | +     | +      | +      | -       | +    | -      | +      | +       | +      | -      | -      | +     | +     |
| <i>Dassiebacillus</i>              | +     | +      | +      | -       | +    | -      | -      | +       | +      | +      | +      | +     | +     |
| <i>M. microti</i>                  | +     | +      | +      | -       | +    | -      | -      | -       | +      | +      | +      | +     | +     |
| <i>M. caprie</i>                   | +     | +      | -      | -       | +    | -      | +      | +       | +      | +      | +      | +     | +     |
| <i>M. bovis</i>                    | +     | +      | -      | -       | +    | -      | +      | +       | -      | +      | +      | +     | +     |
| <i>M. bovis</i> BCG                | +     | +      | -      | -       | +    | -      | -      | +       | -      | +      | +      | +     | +     |

\*NTM:非結核分枝桿菌(Non-tuberculous Mycobacterium)

請參閱『第4圖』所示，係本創作一較佳實施例之抗藥性檢測區判讀示意圖。如圖所示：本創作將13個選定之結核桿菌特異性基因以及6個選定之抗藥性基因，於一尼龍膜片上建構基因陣列結構，其中以該抗藥性檢測區22中Ethambutol藥效檢測為例，並以embB-W1設定為一定會呈色出現之embB陽性控制組，而embB-W306、embB-W319與embB-W406為野生型探針embB codon 306、319與406，且以embB-Q306、embB-Q319與embB-Q406作為容易突變的位點所帶有之內控制組embB codon 306、319與406。其

經一較佳實施例，以抗藥性基因為探針，由雜合反應進行分析，再以呈色反應檢測雜合訊息以分析抗藥性基因是否有突變，若有突變則無法與野生型探針接上，進而無法呈色。圖中顯示：抗藥性基因embB於該基因陣列結構呈色結果為codon 306（-）、codon 319（+）以及codon 306（+）；其判讀結果為embB codon 306突變，顯示此菌對於Ethambutol有抗藥性。

綜上所述，本創作係一種結核病快速診斷及藥效檢測結構，可有效改善習用之種種缺點，係以結核桿菌特異基因與抗藥性基因為探針，以雜合反應進行分析，可同時檢測結核桿菌與抗藥性基因，達到快速、低成本並能兼測抗結核藥物之抗藥性等功效，進而使本創作之產生能更進步、更實用、更符合使用者之所須，確已符合新型專利申請之要件，爰依法提出專利申請。

惟以上所述者，僅為本創作之較佳實施例而已，當不能以此限定本創作實施之範圍；故，凡依本創作申請專利範圍及新型說明書內容所作之簡單的等效變化與修飾，皆應仍屬本創作專利涵蓋之範圍內。

#### 【符號說明】

- 【0006】 基因陣列結構 2 0
- 結核桿菌檢測區 2 1
- 抗藥性檢測區 2 2
- 基板 2 3
- 第一檢測框 2 3 1
- 第二檢測框 2 3 2
- 樣本滴孔 2 3 3
- 基因檢測點 2 a、2 b

# 申請專利範圍

## 【新型申請專利範圍】

【第1項】 一種用於結核病快速診斷及藥效檢測之基因陣列結構，係包括：

一基板，其上具有一第一檢測框、一第二檢測框、及多數可供容納各種基因檢測片段之樣本滴孔，且該等樣本滴孔係於該基板表面按照行與列整齊地呈陣列狀排列，其中該第一檢測框內之樣本滴孔係為供承接結核桿菌中特異性區段樣本，該第二檢測框內之樣本滴孔則供承接抗結核藥物樣本；

一結核桿菌檢測區，其具有多數被覆於該基板表面且分別接合有可與特定生物分子反應而產生不同呈色表現之生物探針之基因檢測點於該第一檢測框內之樣本滴孔中，該些基因檢測點中包含13個結核桿菌特異性基因之結核桿菌特異性基因群，且該13個結核桿菌特異性基因係分別為hsp65、Rv0577、Rv3120、Rv2073c、Rv1970、Rv3875、Rv3347c、Rv1510、Rv0186、Rv0124、TbD1、mtp40及mpb83；以及

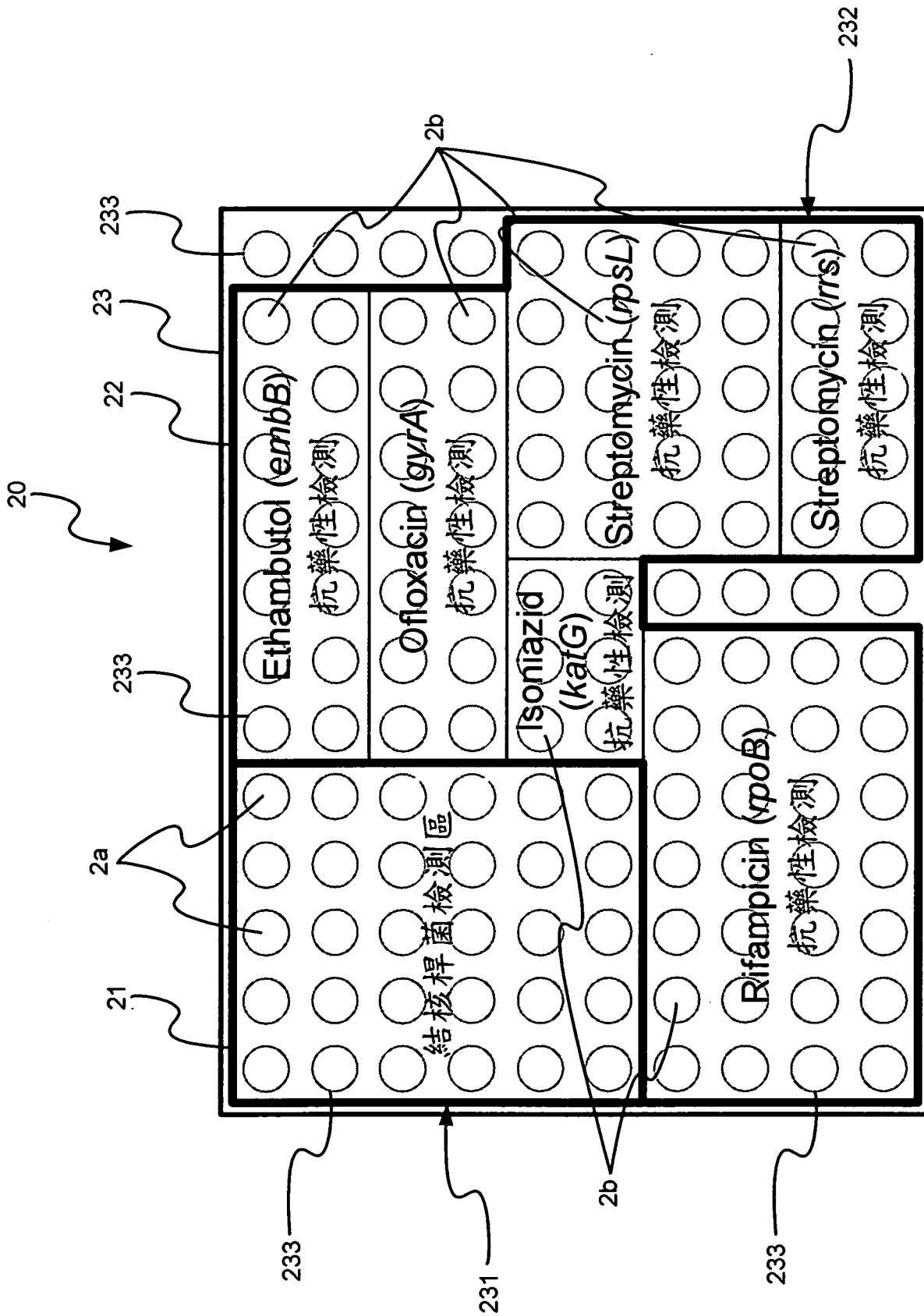
一抗藥性檢測區，其具有多數被覆於該基板表面且分別接合有可與Isoniazid、Rifampicin、Ofloxacin、Ethambutol及Streptomycin之抗結核藥物反應而產生不同呈色表現之基因檢測點於該第二檢測框內之樣本滴孔中，該些基因檢測點中包含6個抗藥性基因之抗藥性基因群，且該6個抗藥性基因分別為katG、rpoB、gyrA、embB、rpsL及rrs。

【第2項】 依申請專利範圍第1項所述之用於結核病快速診斷及藥效檢測之基因陣列結構，其上所有之基因檢測點係呈陣列排列狀。

【第3項】 依申請專利範圍第1項所述之用於結核病快速診斷及藥效檢測之基因陣列結構，更包括一陽性控制組、一陰性控制組及一空白控制組。

【新型圖式】

# 圖式



第 1 圖

21  
20  
22

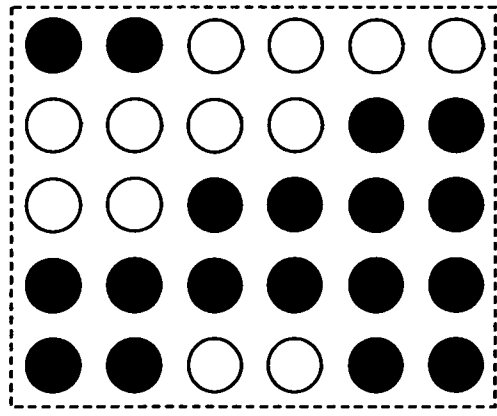
|         |           |           |           |           |           |           |           |             |             |           |           |           |
|---------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-------------|-------------|-----------|-----------|-----------|
| hsp65   | Rv0577    | Rv3120    | Rv2073c   | TbD1      | embB-W1   | embB-W306 | embB-Q306 | embB-W319   | embB-Q319   | embB-W406 | embB-Q406 | N         |
| hsp65   | Rv0577    | Rv3120    | Rv2073c   | TbD1      | embB-W1   | embB-W306 | embB-Q306 | embB-W319   | embB-Q319   | embB-W406 | embB-Q406 | N         |
| Rv1970  | Rv3875    | Rv3347c   | Rv1510    | B         | gyrA-W1   | gyrA-W80  | gyrA-Q80  | gyrA-W88-91 | gyrA-Q88-91 | gyrA-W94  | gyrA-Q94  | P         |
| Rv1970  | Rv3875    | Rv3347c   | Rv1510    | B         | gyrA-W1   | gyrA-W80  | gyrA-Q80  | gyrA-W88-91 | gyrA-Q88-91 | gyrA-W94  | gyrA-Q94  | P         |
| Rv0186  | Rv0124    | mtp40     | mpb83     | B         | katG-W1   | katG-W315 | katG-Q315 | rrs-W1      | rrs-W513    | rrs-Q513  | rrs-W1404 | rrs-Q1404 |
| Rv0186  | Rv0124    | mtp40     | mpb83     | B         | katG-W1   | katG-W315 | katG-Q315 | rrs-W1      | rrs-W513    | rrs-Q513  | rrs-W1404 | rrs-Q1404 |
| rpoB-W1 | rpoB-W450 | rpoB-Q450 | rpoB-W513 | rpoB-Q513 | rpoB-W522 | rpoB-Q522 | N         | B           | rrs-W1484   | rrs-Q1484 | rrs-W514  | rrs-Q514  |
| rpoB-W1 | rpoB-W450 | rpoB-Q450 | rpoB-W513 | rpoB-Q513 | rpoB-W522 | rpoB-Q522 | N         | B           | rrs-W1484   | rrs-Q1484 | rrs-W514  | rrs-Q514  |
| B       | rpoB-W526 | rpoB-Q526 | rpoB-W529 | rpoB-Q529 | rpoB-W531 | rpoB-Q531 | P         | rpsL-W1     | rpsL-W43    | rpsL-Q43  | rpsL-W88  | rpsL-Q88  |
| B       | rpoB-W526 | rpoB-Q526 | rpoB-W529 | rpoB-Q529 | rpoB-W531 | rpoB-Q531 | P         | rpsL-W1     | rpsL-W43    | rpsL-Q43  | rpsL-W88  | rpsL-Q88  |

第2圖



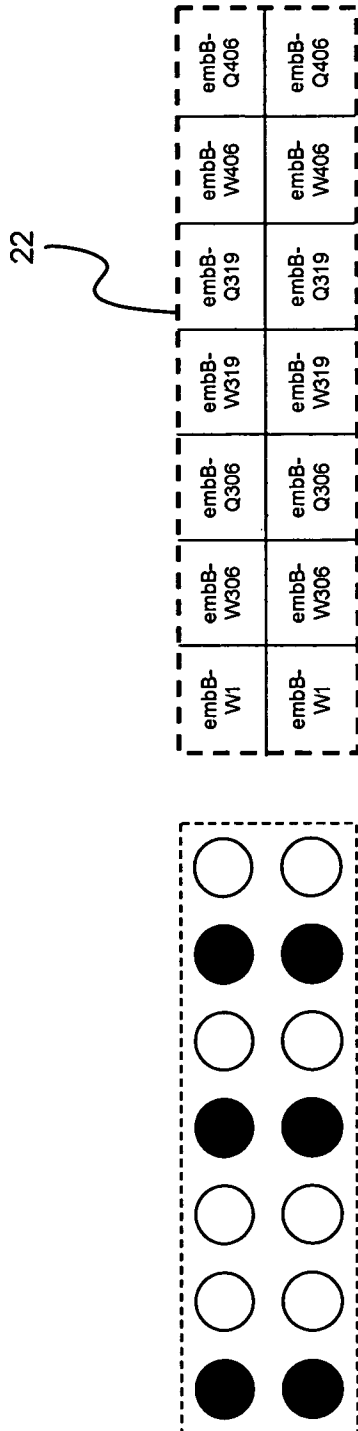
21

|        |        |         |         |      |
|--------|--------|---------|---------|------|
| hsp65  | Rv0577 | Rv3120  | Rv2073c | TbD1 |
| hsp65  | Rv0577 | Rv3120  | Rv2073c | TbD1 |
| Rv1970 | Rv3875 | Rv3347c | Rv1510  | B    |
| Rv1970 | Rv3875 | Rv3347c | Rv1510  | B    |
| Rv0186 | Rv0124 | mtp40   | mpb83   | B    |
| Rv0186 | Rv0124 | mtp40   | mpb83   | B    |



|    |       |        |        |         |      |        |        |         |        |        |        |       |       |
|----|-------|--------|--------|---------|------|--------|--------|---------|--------|--------|--------|-------|-------|
| 基因 | hsp65 | Rv0577 | Rv3120 | Rv2073c | TbD1 | Rv1790 | Rv3875 | Rv3347c | Rv1510 | Rv0186 | Rv0124 | mtp40 | mpb83 |
| 結果 | +     | +      | -      | -       | +    | -      | +      | +       | -      | +      | +      | +     | +     |

第 3 圖



|      |           |           |           |
|------|-----------|-----------|-----------|
| embB | codon 306 | codon 319 | codon 406 |
| 結果   | -         | +         | +         |

第4圖