

東海大學化學研究所

碩士論文

Department of Chemistry

Tunghai University

Master Thesis

生物分子邏輯閘式肺結核桿菌及其抗藥性分析方法

之研究

Analytical Method for *M. tuberculosis* and Its Antibiotic

Resistance based on Biomolecular Logic Gates

黃詩穎

Shih-Ying Huang

指導教授：莊旻傑 博士

Advisor: Min-Chieh Chuang, Ph.D.

中華民國 106 年 4 月

April, 2017

謝誌

本論文得以順利完成要感謝一路走來遇到的老師、同學以及家人的陪伴。首先要感謝我的指導教授莊旻傑老師，感謝老師的引導與匡正，讓我學習到更有邏輯性的思考方式以及正確的學習態度，在面對問題時能更理性的分析判斷；感謝賴英煌老師以及鄭秀瑤老師在研究過程中曾給予指教、提供專業的知識；承蒙東海大學化材系的顧野松老師、中山大學化學系的曾韋龍老師以及國家衛生研究院感染症與疫苗研究所的杜鴻運老師擔任口試委員，於百忙之中撥空檢視我的論文，並在口試時給予寶貴的意見以及疏漏的指正，使本論文研究更趨於完善。

在碩士生涯裡，學長姊、同儕以及學弟妹的陪伴與幫助，亦是學習的動力。感謝萃敏學姊指導我認識電化學的相關知識以及儀器操作；感謝俊慶學長帶領我跨入 DNA 領域、花時間教導我操作核酸及酵素的相關實驗、在我實驗上遇到困難時耐心地給予幫助以及指正；感謝佩姻學姊在我研究過程中時時給予意見交流以及各方面的協助，並在我繁忙時一同處理實驗室的事務；感謝心慈學姊一同討論文獻內容以及實驗研究等各方面曾給予的幫助；感謝國誠、于倫、天成一同參與實驗討論；感謝家蓁協助處理事務；感謝研究所同學瑋諭、涵鈺在研究上相互砥礪。

最重要的是，感謝我的家人以及摯友們在這些日子給予的支持與鼓勵，讓我在面對挫折與問題時，有力量往前邁進。期許自己能不枉父母栽培，畢業後能有所回饋。

最後，感謝所有曾給予支持、協助，卻未提及的朋友們，在此獻上我最誠摯的謝意。

中文摘要

結核分支桿菌(*Mycobacterium tuberculosis*)所引起的“結核病”一直是公共衛生關注的議題。經由人與人的傳染過程中，細菌可能演化形成具有抗藥性基因的菌株，造成疾病防治及治療上的困難，因此，於臨床診斷上，迫切需要符合經濟效益且快速、準確的方法，從樣品中篩檢含有抗藥性的菌株，以便給予更適當的治療、有效控制結核病的流行。

本研究利用四條核酸序列雜合形成霍利迪交叉結構(Holliday junction)的概念，以單個分子探針(molecular beacon)與經過設計的輔助鏈(assistant strand)為核心，設計出一個分析方法，可以同時偵測結核菌的核酸特异性片段(IS6110)以及有單核苷酸變異而表現抗藥性的片段(*rpoB*)。為了更了解霍利迪交叉結構的形成條件，我們探討各種熱力學參數(平衡常數、自由能變化量、熵變化量、焓變化量)。

因應快速診斷結核病的實際需求，我們提出利用調控輔助鏈長度而達到螢光層級式應答(訊號輸出 1、1/2、0)的分析機制，解決傳統布林邏輯閘 AND gate (訊號輸出 1、0)無法說明樣品為結核桿菌但不具抗藥性的分析缺點。

為了達成提高靈敏度的目標，我們進一步設計聚合酶(polymerase)進行鏈取代反應(strand displacement)及核酸內切酶(endonuclease)參與的訊號擴增機制，有效增大訊號達 64 倍，偵測濃度可低至 300 pM (符合上述三階級應答機制)。動力學的研究指出，雙酵素催化下的速率常數($k_{t < 1 \text{ min}}$)約為無酵素存在的 12 (無單核苷酸變異)、71 (單核苷酸變異)倍，而且，雙酵素催化擴增反應可使速率常數比值(無單核苷酸變異/存在單核苷酸變異)穩定維持於 1/2 範圍(研究時間達 250 分鐘)。

在真實樣品分析方面，針對非對稱式聚合酶連鎖反應後的產物，不論以抽取的核酸為檢體或是直接將煮沸的菌液進行偵測，系統均能偵測結核桿菌的存在，有別於非結核性分枝桿菌(nontuberculous mycobacterium, NTM)，及有效分辨藥敏性結核菌及具抗藥性結核菌，證實本系統具有良好的感測能力，可達成快速、專

一旦多工的結核菌樣品檢測目標。



Abstract

Tuberculosis (TB), an infectious disease caused by *Mycobacterium tuberculosis* (*M.tb*), is one of the leading causes of morbidity and mortality around the world. It is noteworthy that the bacteria may evolve into the strains with drug-resistance gene during spreading among mankind, which is now bringing great challenge to disease prevention and treatment. These features underscore the significance of an economic, quick and accurate diagnostic method which is capable of identifying the drug-resistant bacteria, so as to take control the epidemic efficiently.

In this work, we present an analytical method for detecting both specific nucleic acid fragment and single nucleotide substitution (SNS) at the same time. The method was inherent with a construction of Holliday junction formed by the hybridization of four probes which harnessed one molecular beacon and the designed assistant strand as the core. To further understand the condition for junction formation, we discussed association and dissociation of the junction thermodynamically and kinetically.

To identify *M.tb* and determine its drug resistance simultaneously, we regulated the length of the analyte-binding arm to yield tiered fluorescence output which interpreted not only the sole presence of either specific fragment or point mutation, but also concurrent existence of both targets of interest. To achieve higher sensitivity, we designed the signal amplification mechanism driven by strand displacement polymerase (KF) and endonuclease (Nt.A1wI). The amplification driven by the biocatalytic reactions resulted in a 64-fold signal enhancement, pushing limit of detection down to 300 pM.

The sensing system was also successfully demonstrated to implement accurate detection of *M.tb* in the sample containing amplicons templated with DNA extract and

boiling broth cultures. Influence caused by nontuberculous mycobacteria is minimal. The tiered-output mechanism worked out at bacterial concentration ranging $2.5 \times 10^2 \sim 2.5 \times 10^6$ CFU/mL. The results showed integrity of the sensing method as an alternative strategy in rapid screening of *M.tb* and its rifampin-resistance.



目錄

謝誌.....	
中文摘要.....	II
Abstract.....	IV
目錄.....	VI
圖目錄.....	IX
表目錄.....	XII
第一章 緒論.....	1
1.1 單核苷酸多態性(SNPs).....	1
1.2 結核病(Tuberculosis).....	2
1.2.1 結核病介紹.....	2
1.2.2 結核病的檢驗方式.....	3
1.2.3 電化學方法作為核酸檢測平台.....	7
1.2.4 螢光輸出作為核酸檢測平台.....	10
1.3 擴增應答的分析方法.....	13
1.3.1 擴增技術.....	13
1.3.2 多酵素參與反應的信號擴增.....	14
1.4 分子邏輯閘式(molecular logic gates)的分析方法.....	18
1.5 動機.....	19
第二章 實驗材料與方法.....	21
2.1 藥品與試劑.....	21
2.2 儀器與材料.....	23
2.3 去氧核糖核酸(DNA)序列.....	25

2.4 單核苷酸位點分析.....	29
2.5 分子探針解折疊行為分析.....	29
2.6 分子邏輯閘的分析方法.....	30
2.7 聚丙烯酰胺凝膠電泳(polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE).....	30
2.8 層級式應答的分析方法.....	31
2.9 雙酵素參與的探針設計與優化.....	31
2.10 含有聚合酶 KF 擴增系統最佳化研究	32
2.11 聚合酶 KF 擴增系統的層級式應答分析.....	33
2.12 雙酵素系統中甲基化髮夾探針的行為分析.....	34
2.13 雙酵素訊號擴增系統最佳化研究.....	34
2.14 雙酵素訊號擴增系統的層級式應答分析.....	35
2.15 雙酵素訊號擴增系統的偵測範圍分析.....	36
2.16 平衡常數分析.....	37
2.17 熱力學分析.....	40
2.18 動力學分析.....	42
2.19 非對稱式聚合酶連鎖反應.....	44
2.20 非對稱式聚合酶連鎖反應產物分析.....	45
第三章 結果與討論.....	47
3.1 單核苷酸變異位點分析.....	47
3.2 肺結核桿菌核酸序列設計.....	49
3.3 序列設計結果分析.....	51
3.4 分子邏輯閘的應用.....	53
3.5 熱力學參數的測定.....	55
3.6 層級式應答的分析方法.....	58
3.7 雙酵素參與的擴增機制.....	61

3.8 酵素系統的探針設計.....	63
3.9 KF 系統的探討	66
3.10 KF 系統最佳化	67
3.11 KF 系統的層級式應答.....	69
3.12 KF 與 Nt.A1wI 系統的探討	69
3.13 KF 與 Nt.A1wI 系統最佳化	74
3.14 KF 與 Nt.A1wI 系統的層級式應答	78
3.15 層級式應答的偵測範圍.....	78
3.16 反應速率常數的估算.....	80
3.17 真實樣品 aPCR 產物分析	84
3.17.1 核酸檢體.....	84
3.17.2 菌液檢體.....	86
第四章 結論.....	88
第五章 參考文獻.....	90

圖目錄

圖 1.1 有 96 % 機率發生抗藥性的 <i>rpoB</i> 基因示意圖	2
圖 1.2 以金電極為感測平台的結核菌基因感測器機制圖.....	7
圖 1.3 以金奈米粒子結合磁珠的感測機制圖.....	8
圖 1.4 以修飾釘錯合物的氧化石墨烯作為感測界面的機制示意圖.....	9
圖 1.5 生物微流體平臺示意圖.....	9
圖 1.6 使用 TaqMan probe、Molecular beacons 與 FRET probe 的機制示意圖	10
圖 1.7 修飾不同螢光基團的雜合探針與待測基因片段互補序列圖.....	11
圖 1.8 互補 <i>rpoB</i> 序列的三個分子探針序列圖.....	12
圖 1.9 Xpert [®] MTB/RIF 的機制示意圖	12
圖 1.10 檢測低濃度的核酸雜合擴增技術分類.....	13
圖 1.11 三酵素參與擴增信號的一次循環反應(One-pot assay)機制圖	15
圖 1.12 雙酵素參與擴增信號的二次循環反應(Two step assay)機制圖.....	16
圖 1.13 三酵素參與擴增信號的三次循環反應(Three step assay)機制圖	17
圖 1.14 邏輯閘式結核基因片段及其抗藥性分析方法機制圖.....	18
圖 1.15 分子邏輯閘 AND Gate 的機制運算概念	20
圖 2.1 分子探針與目標物不同相態轉換的示意圖.....	39
圖 3.1 (A)輔助鏈及兩條目標序列雜合解折疊分子探針，形成霍利迪交叉結構並釋放螢光訊號。(B)目標序列存在一個核苷酸變異，霍利迪交叉結構無法穩定形成，分子探針未解折疊放光。.....	47
圖 3.2 (A)分子探針及單股核酸序列，紅色框顯示單一核苷酸變異(G→C)。(B)完	

全互補、存在單核苷酸變異、及背景訊號之熱熔解曲線圖。.....	48
圖 3.3 (A)不同單核苷酸變異位點於霍利迪交叉結構的分佈圖。(B)不同單核苷酸變異位置與形成完全互補的霍利迪交叉結構的熱熔解曲線圖。.....	49
圖 3.4 (A)IS6110 片段(TR)以及 <i>rpoB</i> 片段(TS)自身形成結構。(B)序列 G-C pairs 較多，因此容易形成 TS-TS 以及 TR-TR 二聚體。.....	50
圖 3.5 設計檢測肺結核桿菌及其抗藥性的序列示意圖.....	51
圖 3.6 輔助鏈、雙重目標物和分子探針共同存在下的熱熔解曲線圖.....	52
圖 3.7 (A)輔助鏈與目標分析物不同互補長度形成的霍利迪交叉結構序列圖。(B)含有單核苷酸變異的熱熔解曲線比較圖。(C)不同互補長度的凝膠電泳圖。..	54
圖 3.8 熱力學參數測量圖.....	57
圖 3.9 (A)熱熔解曲線圖。黑色曲線組成為 MB，紅色曲線組成為 MB/A27/TR/TT，藍色曲線組成為 MB/A27/TR/TS。(B)三相態間的自由能關係圖。.....	58
圖 3.10 動力學曲線圖，輔助鏈互補數分別為 13、12、11、10 以及 9.....	59
圖 3.11 螢光強度比率和輔助鏈互補數關係圖.....	60
圖 3.12 輔助鏈互補數為 12 的系統熱熔解曲線圖.....	60
圖 3.13 動力學曲線圖，分析物濃度分別為 1.2、0.8、0.4、0.2 以及 0.05 μM	61
圖 3.14 雙酵素訊號擴增偵測機制圖.....	63
圖 3.15 (A)探針設計序列圖。HB 為未考慮使用酵素的髮夾探針，HE、HF 以及 HG 為參與酵素反應所設計的髮夾探針。(B)髮夾探針解離曲線微分圖。.....	64
圖 3.16 酵素參與反應的系統所使用的序列及結構圖.....	65
圖 3.17 KF 參與擴增反應動力曲線圖.....	66
圖 3.18 KF 擴增系統條件最佳化.....	68

圖 3.19 螢光訊號比例和輔助鏈互補長度關係圖.....	69
圖 3.20 分子探針於 Nt.A1wI 存在下螢光動力曲線圖	70
圖 3.21 相同序列片段經由 Mfold 軟體模擬可能形成不同的構型。(A)常規的髮夾結構。(B)複雜的二級結構。	70
圖 3.22 (A)甲基化分子探針螢光微分解離曲線圖。(B)包含甲基化修飾的分子探針在不同組成下的動力學曲線圖。	71
圖 3.23 雙酵素擴增反應動力學及產物膠片圖.....	73
圖 3.24 雙酵素參與訊號擴增系統的最佳化.....	75
圖 3.25 雙酵素參與訊號擴增系統的溫度探討.....	77
圖 3.26 雙酵素系統螢光訊號比例和互補長度關係圖.....	78
圖 3.27 雙酵素系統螢光訊號比例和待測序列濃度關係圖.....	79
圖 3.28 無酵素、KF 單酵素、以及 KF+Nt.A1wI 雙酵素系統動力學曲線圖	80
圖 3.29 無酵素、KF 單酵素、以及 KF+Nt.A1wI 雙酵素系統螢光強度比值隨時間變化圖.....	83
圖 3.30 聚丙烯酰胺凝膠電泳圖.....	84
圖 3.31 採用結核桿菌核酸抽取液偵測結果.....	85
圖 3.32 採用煮沸菌液為檢體偵測結果.....	86
圖 3.33 採用煮沸菌液為檢體，不同稀釋倍數的 W06 與 M24 比率	87

表目錄

表 1.1 結核病的診斷方法.....	5
表 1.2 層級式應答的分析方法.....	20
表 2.1 藥品名稱及廠牌.....	21
表 2.2 儀器名稱及廠牌.....	23
表 2.3 實驗用核酸序列表.....	25
表 3.1 完全互補與單一核苷酸變異系統平衡常數.....	56
表 3.2 分子探針於相態 2 至相態 3 之間的熵變化和焓變化.....	56
表 3.3 系統於相態 1 至相態 2 之間的熵變化和焓變化.....	56
表 3.4 不同反應系統有無錯配鹼基的分析物與分子探針解折疊的速率常數.....	82



第一章 緒論(Introduction)

1.1 單核苷酸多態性(SNPs)

單核苷酸多態性(Single nucleotide polymorphisms, SNPs)是指核酸序列中一個特定位點出現兩種或多種核苷酸的可能性，會造成這樣的變異原因為基因發生刪除、插入或是取代反應，當族群中變異發生率大於 1 % 時即為 SNPs¹⁻²。人類遺傳基因的各種差異，有 90 % 都可歸因於 SNPs 的變異³。不同個體基因上所發生的 SNPs 型態皆不同，大多數的 SNPs 發生於非編碼區，非編碼區的 SNPs 位點可以調節基因的表達，故 SNPs 也被視為一種基因遺傳的生物標記(genetic biomarker)⁴。

近年來，研究人員對於 SNPs 已有系統地進行檢測，逐步建立其與各種疾病或癌症之間的關聯性，並將 SNPs 的篩檢應用在遺傳學、藥物學、腫瘤疾病與個別化醫學的相關研究上。由於 SNPs 的產生可能會造成蛋白質表現的改變，進而改變個體罹患某種疾病的傾向、或是造成個體對於藥物治療反應的差異，有些 SNPs 的發生對人體造成的影響屬為正向，例如引起後天性免疫缺乏症候群的 HIV 病毒在感染人類免疫細胞時，細胞表面必須具有輔助受體 CCR2 與 CCR5，當 HIV 病毒之陽性感染者的免疫細胞帶有 CCR2 的突變基因 CCR2 V64I (第 64 個氨基酸由 Valine 轉變成 Isoleucine) 時，該患者的發病時間會比其他感染者晚 2 到 4 年⁵。另外，只存在白種人基因上的 CCR5 變異成 CCR5 Δ 32 (基因上有 32 個核苷酸的序列缺失)，會導致 HIV 病毒難以感染具有此突變的個體，但目前這種突變在黑人與黃種人身上尚未發現⁶⁻⁷。

然而多數 SNPs 的發生對人體所造成的影響較為負面，例如血紅素 β 鏈突變造成的鐮刀型血球性貧血⁸、載脂蛋白(Apolipoprotein) E4 突變造成的阿茲海默症⁹ 等例子。本篇論文研究中，針對 SNPs 而引發結核分枝桿菌(*Mycobacterium tuberculosis*, *M.tb*)的抗藥性¹⁰⁻¹² 進行探討，已有研究指出，結核分枝桿菌產生抗

藥性的機制為染色體上的編碼基因或和藥物活性相關的酶基因，存在數個單核苷酸變異所造成，而單核苷酸的變異，可能導致結核分枝桿菌對於特定抗生素產生抗藥性¹³⁻¹⁴。文獻指出，對於治療結核病的一線抗生素(例如 Rifampin 以及 Isoniazid)的抗藥性主要來自於 *rpoB* 基因片段上的單核苷酸變異¹⁵⁻¹⁶，如圖 1.1 所示，80 % 以上的抗藥性發生於轉譯氨基酸 Ser531 以及 His526 的核苷酸突變¹⁷，其中 S531L 的變異發生率高達約 65 %¹⁸⁻¹⁹。因此，準確檢測這些突變位點，可實質助益於結核病的控制與治療。

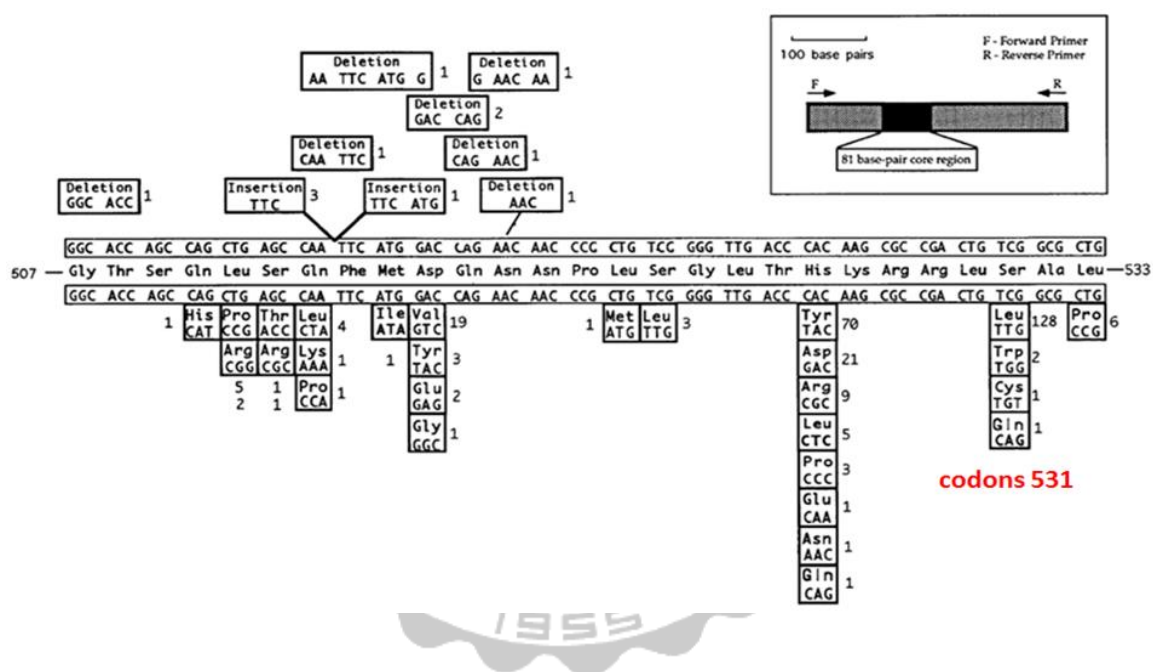


圖 1.1 有 96 % 機率發生抗藥性的 *rpoB* 基因示意圖¹⁰。

1.2 結核病(Tuberculosis)

1.2.1 結核病介紹

結核病為現今流行最廣泛的傳染病之一²⁰⁻²²，由結核分枝桿菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) 感染所導致，由於結核菌屬於偏性好氣菌 (strict aerobes)，繁殖時需要氧氣，在人體中主要感染的器官是肺部。根據世界衛生組

織(World Health Organization, WHO) 2015 年公布的報告指出，儘管從 1990 年起至 2015 年，結核病的盛行率已降低 42 %，死亡率已降低 47 %²³，2014 年全球仍有 960 萬人受感染，約有 150 萬人因此而死亡²³，而在該年的全球死因統計中，結核病仍是十大排名之一²⁴，死亡個案集中在 4 個世衛地區(美洲、中東、東南亞及西太平洋)，主要 11 個高病發國家包括中國、印度、巴基斯坦及越南等，因此結核病的防範與早期診斷一直為各國醫療所關心的主要議題²⁰。由於結核病是人與人之間的傳染性疾病，一般患者與其密切接觸者之傳染性高達 30 ~ 50 %^{20, 22-23}。近年來結核疫情對於人類的威脅主要為用藥不當或是傳染過程中細菌經演化成為具抗藥性(drug-resistant)的菌種，其他人若是被帶有抗藥性基因的患者所感染，一旦發病便成為較難根治的具抗藥性肺結核病^{11, 20}。而抗藥性結核病的患者約有 80 % 是對一種以上的一線治療藥物同時產生抗藥性^{11, 25}，演變成多重抗藥性結核(multidrug resistant tuberculosis, MDRTB)，2014 年，大約有 48 萬(佔受感染人數 5 %)的病患所感染的肺結核桿菌是具有抗藥性的²³，此外，多重抗藥性結核病更可能進一步對於其治療的二線藥物也產生抗藥性，就會演變成治癒率只有約 30 %、復發率約有 10 % 的超級抗藥性結核(extensively drug resistant tuberculosis, XDRTB)²⁶⁻²⁸。因此，結核病演變的防治及治療是目前公共衛生所面臨的重要課題，迫切需要符合經濟效益而快速、準確的診斷方法，分辨不同特性的結核桿菌菌株，方能給予適當的醫療協助，控制結核病的發生與流行。

1.2.2 結核病的檢驗方式

常見用於檢測結核病的幾項方法，如表 1.1 所示，其中臨床診斷上普遍應用的方法有結核菌素皮膚試驗(tuberculin skin patch test, T.T.)²⁹⁻³¹、 γ 干擾素釋放分析(interferon gamma release assay)³²⁻³³、痰液塗片與塗片耐酸性染色分析³⁴、胸部 X 光檢驗²⁹ 等，這些方法因成本較低，因此普遍做為臨床醫師初步診斷結核病的方法，但缺點是檢測完畢到確診結果之間耗時長，加上方法的靈敏度及特异性皆

不高，因此常需要多方檢驗或是三重複的檢測結果以及後續追蹤才能確診，過程中可能導致患者未經妥善照顧而病情惡化進而導致結核病疫情的擴散。

近年來科學家不斷提出新方法，改善診斷的靈敏度以及提升檢驗的準確性，像是 *M.tb* 分泌抗原的免疫分析，包括免疫層析檢測法(immunochromatographic assay)³⁵⁻³⁶、免疫組織化學法(immunohistochemistry)³⁷⁻³⁸、酵素免疫分析法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)³⁹等，這些方法的優點是其靈敏度及特异性皆很高，能準確的分析檢體是否帶有結核菌，但缺點為分析技術繁瑣，因此需要專業操作人員於特定地點進行檢測，且更為耗時，不適用於快速臨床診斷。

簡便的核酸檢測平台為技術發展的方向之一⁴⁰⁻⁴¹，這些方法提供高靈敏度及高特异性，有效縮短檢測時間，並結合電化學⁴²⁻⁴⁵或是螢光訊號輸出⁴⁶⁻⁴⁹的方式成為核酸檢測平台，如已商業化的方法 Xpert[®] MTB/RIF⁵⁰ 便是以即時定量聚合酶連鎖反應儀(real-time quantitative polymerase chain reaction, Q-PCR)為平台的結核菌基因及抗藥性檢測系統。

表 1.1 結核病的診斷方法。

目標物	分析方法	時間	優點	缺點
病人	結核菌素皮膚試驗 (Tuberculin skin patch test)	2~4 天	<ul style="list-style-type: none"> • 無需樣品製備/處理 • 方法簡單 • 無需特定實驗室設備與人員 	<ul style="list-style-type: none"> • 需要後續追蹤確診 • 人員之間的判讀可能有誤差 • 靈敏度和特异性較低
病人	γ 干擾素釋放分析 (Interferon gamma release assay)	48 小時	<ul style="list-style-type: none"> • 比結核菌素皮膚試驗更客觀 • 可對多種抗原進行評估 • 與卡介苗無交叉反應 	<ul style="list-style-type: none"> • 為血液檢查 • 需要專業的人員或儀器判讀
細菌	痰液塗片與塗片耐酸性染色 分析 (Sputum specimens smear)	8~24 小時	<ul style="list-style-type: none"> • 臨床醫師初步診斷結核病 • 方法簡單 	<ul style="list-style-type: none"> • 必須取得三套痰檢體執行塗片與培養 • 靈敏度和特异性較低
細菌	免疫層析檢測法 (Immunochromatogram assay)	1~2 週	<ul style="list-style-type: none"> • 可區分 <i>M.tb complex</i> • 高靈敏度及特异性 • 成本相對其他方法較低 	<ul style="list-style-type: none"> • 需特殊的實驗室設備與措施。 • 基因的突變或缺失可能導致假陰性
細菌	免疫組織化學法 (Immunohistochemistry)	1~3 週	<ul style="list-style-type: none"> • 高靈敏度及特异性 • 可檢測淋巴吸出物，腦脊髓液，和胸腔積液 	<ul style="list-style-type: none"> • 切片檢體必須以福馬林與石蠟處理 • 有交叉反應性影響 • 必須使用其它診斷技術驗證

目標物	分析方法	時間	優點	缺點
細菌	酵素免疫分析法 (Enzyme-linked immunosorbent assay)	13 週	<ul style="list-style-type: none"> • 高靈敏度及特异性 • 蛋白質分析物最低可檢測濃度：0.01 mg/L • 不需要複雜的儀器 	<ul style="list-style-type: none"> • 需要生物安全 3 級實驗室 • 樣品前處理需要很長的時間 • 不適合用於臨床樣品的直接分析
核酸	PCR 與自動化定序系統	1 ~ 2	<ul style="list-style-type: none"> • 高靈敏度及特异性 	<ul style="list-style-type: none"> • 需要複雜的儀器和試劑
核酸	Xpert® MTB/RIF (Commercial Method)	2 小時	<ul style="list-style-type: none"> • 全自動系統, 無需特別專業人員與實驗室, 減少人為誤差 • 高靈敏度及特异性 	<ul style="list-style-type: none"> • 需要使用多通道訊號輸出的一機台 • 試劑成本過高 • 結果需要專業的人員或儀器判讀
核酸	生物傳感器 (Biosensors)	依感測方法決定	<ul style="list-style-type: none"> • 提供快速、靈敏以及特异性檢測 • 方法可重複使用 	<ul style="list-style-type: none"> • 依感測方法而不同

1.2.3 電化學方法作為核酸檢測平台

以電化學為傳感機制的感測器具有操作簡單、可有效降低成本等特點。B. D. Malhotra 等人於 2010 年提出以金電極為感測平台的結核菌基因感測器，機制如圖 1.2 所示，以電化學方法於金表面電鍍具納米結構的氧化鋯薄膜，接著帶有磷酸基團修飾的肺結核 ssDNA 探針利用氧原子和鋯金屬之間的親和力形成 ssDNA-ZrO₂/Au，最後加入亞甲基藍(methylene blue)做為指示劑，在有分析物序列存在的情況下，分析物與 ssDNA 雜合後會造成電極空間結構的改變，導致亞甲基藍訊號峰值降低⁵¹。

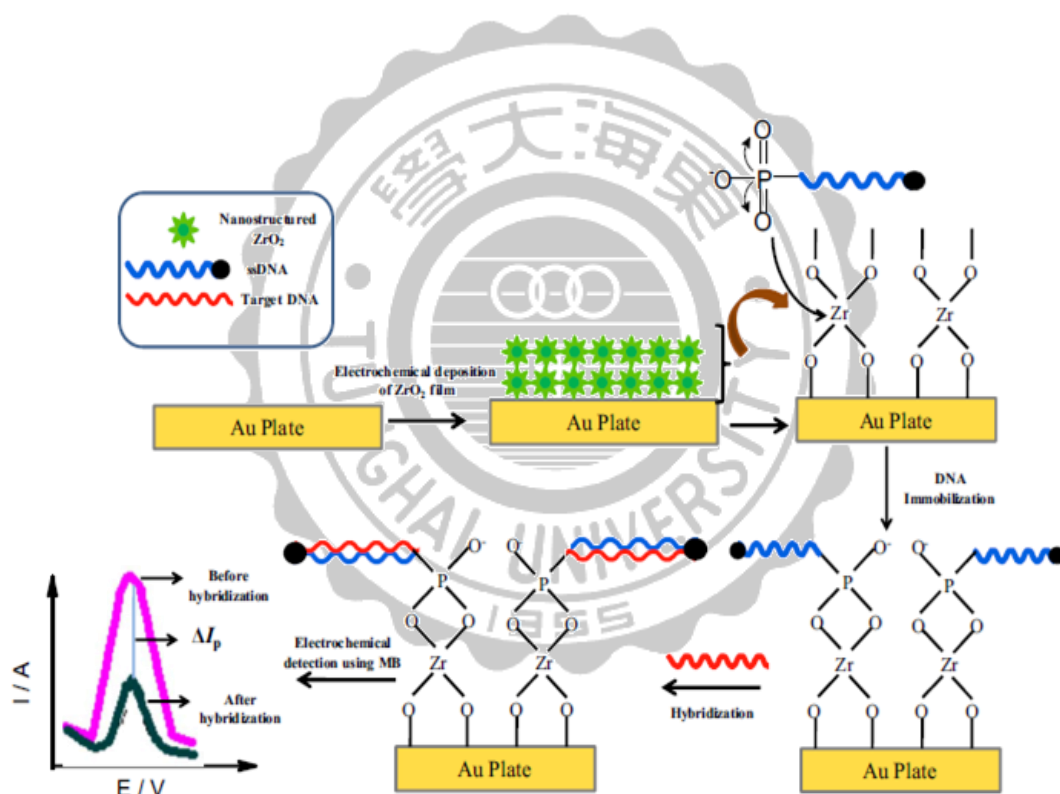


圖 1.2 以金電極為感測平台的結核菌基因感測器機制圖⁵¹。

Evangelyn C. Alocilja 等人於 2011 年提出以金奈米粒子(AuNPs)結合磁珠(MNP)的方式，作為電化學訊號調控器，如圖 1.3，作者針對 IS6110 片段進行偵測，首先在磁珠與金奈米粒子上分別修飾與分析物互補的不同核酸片段，在分析

物存在下，將形成 MNP-target-AuNP 雜合複合物，最後將所形成的複合物 MNP-target-AuNP 於溶液中進行磁性分離，並於碳電極上進行電化學檢測。此方法優點是具有高特異性，因為所放入的核酸片段若非偵測的目標物，就不會形成 MNP-target-AuNP 複合物，便不會有訊號輸出⁵²。

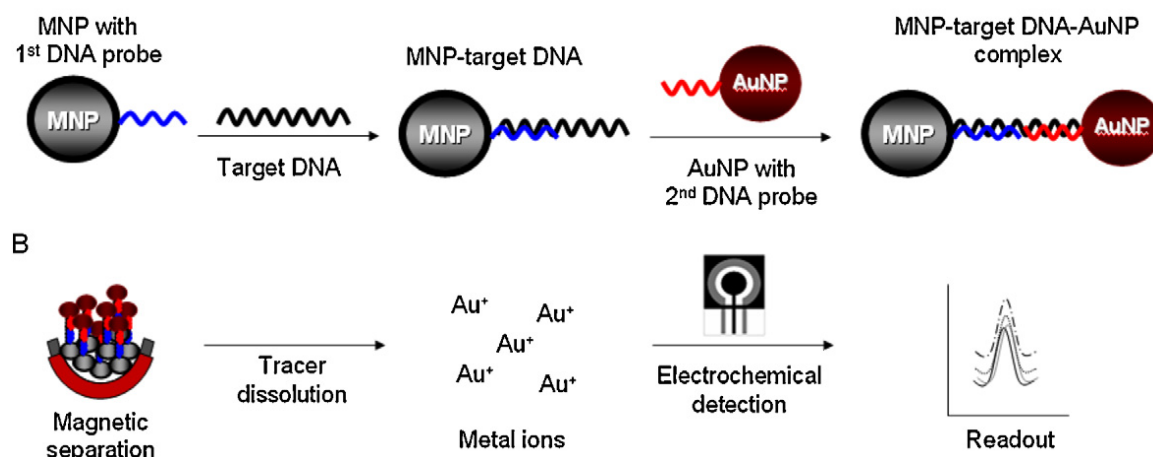


圖 1.3 以金奈米粒子結合磁珠的感測機制圖⁵²。

Hua Cui 等人於 2014 年提出使用修飾有鈦錯合物的氧化石墨烯(Ru-GO)作為感測界面，並利用二茂鐵標記的單鏈 DNA(Fc-ssDNA)，作為電化學發光的控制器。如圖 1.4，作者偵測 *rpoB* 片段，針對片段上突變率最高的 S531L 位點進行偵測，所設計的 Fc-ssDNA 會與此片段完全互補(TM)。將 Fc-ssDNA 吸附在 Ru-GO 納米片上，Fc-ssDNA 會淬滅原本放光的 Ru-GO，加入分析物後，由於氧化石墨烯(GO)會優先與單鏈 DNA 結合，因此當完全互補的 DNA 與其雜合便會遠離 GO 表面，而使化學發光恢復。檢測結果可以清楚判別樣品是否為抗藥性的 *rpoB* 基因⁵³。

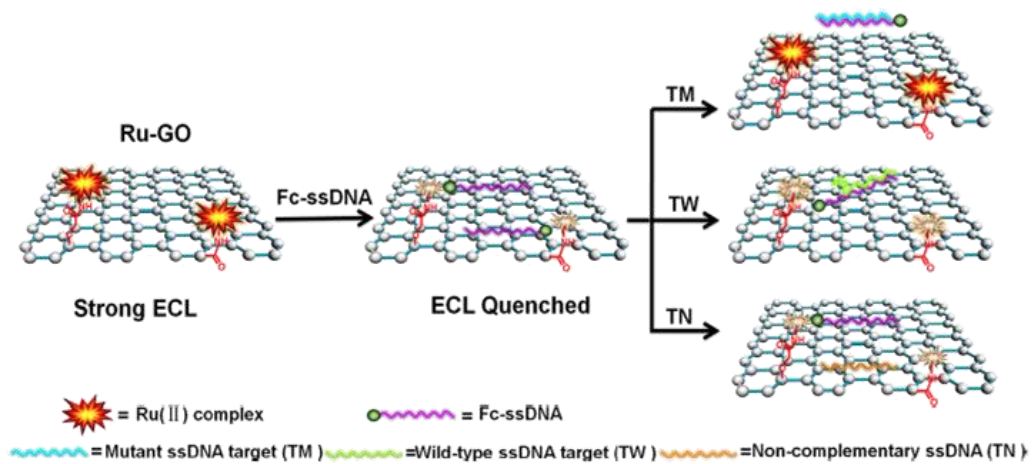


圖 1.4 以修飾鈦錯合物的氧化石墨烯作為感測界面的機制示意圖⁵³。

Pedro Viana Baptista 等人於 2013 年提出使用金納米粒子探針做為檢測結核菌基因的生物微流體平臺。如圖 1.5 所示，生物微流體平臺是用微電子加工技術，在微晶片上做出微米級的容器、泵、閥、管道，把操縱液體的元件微小化，並且把偵測感應全部整合在一塊晶片上，類似 lab-on-a chip 的概念。而這類的生物晶片優點是需要的樣品量少、能快速檢測⁵⁴。

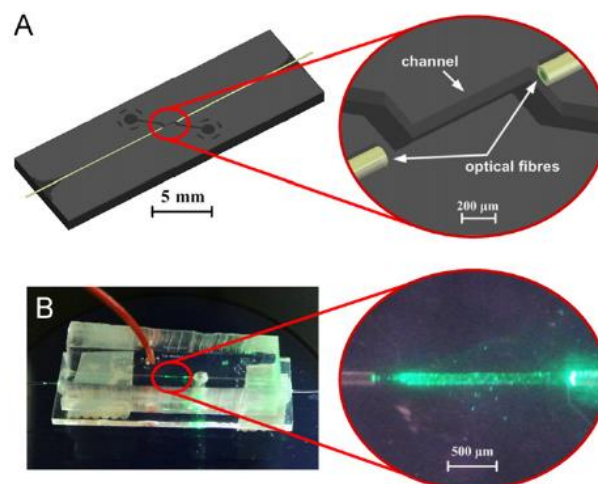


圖 1.5 生物微流體平臺示意圖⁵⁴。

1.2.4 螢光輸出作為核酸檢測平台

具螢光輸出訊號的偵測平台通常建立於即時定量聚合酶連鎖反應儀 (Real-time Quantitative Polymerase Chain Reaction, Q-PCR) 的檢測原理，利用聚合酶連鎖反應大量複製待測核酸序列，並使用不同螢光基團辨識特異性片段，常用修飾有螢光基團的辨識探針包括 TaqMan probe、Molecular beacons、FRET probe，其機制如圖 1.6 所示⁵⁵。

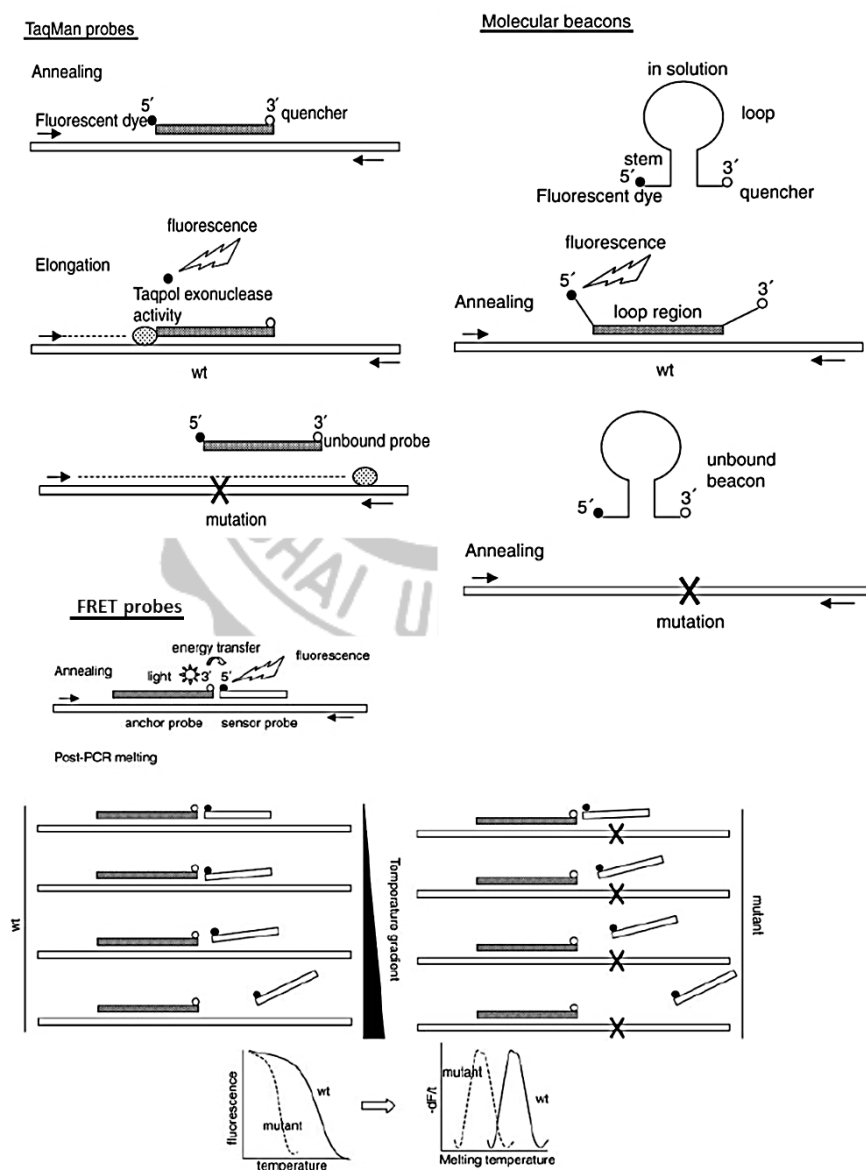


圖 1.6 使用 TaqMan probe、Molecular beacons 與 FRET probe 的機制示意圖⁵⁵。

由於發生於溶液中的雜合反應速率遠大於發生於固相表面，所以螢光檢測機制具有更高靈敏度的優點，亦可藉由溫度控制特定互補核酸序列的雜合及分離，因此機制的設計較具彈性。David Alland 等人於 2000 年針對具抗藥性的基因片段 *KatG*、*mabA-inhA*、*oxyR*、*ahpC* 以及 *rpoB* 進行分析，作者分別設計了 9 個不同的螢光雜合探針，各探針互補於不同的抗藥性基因片段，最後藉由感測訊號的差異，判斷互補片段是否含有突變位點，如圖 1.7 所示⁵⁶。

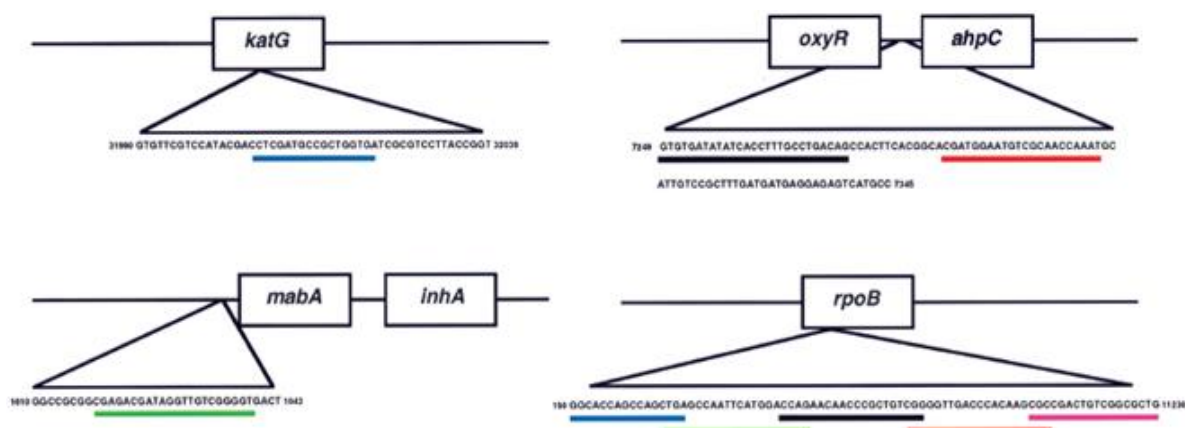


圖 1.7 修飾不同螢光基團的雜合探針與待測基因片段互補序列圖⁵⁶。

Bola Aladegbami 等人於 2012 年利用 3 個分子探針(*rpo1*、*rpo2* 與 *rpo3*)偵測 *rpoB* 基因，此基因包含一段由 81 個核苷酸所組成，決定抗生素利福平抗藥性 (Rifampin Resistance) 的序列，被稱為抗藥性決定區 (Rifampin Resistance Determining Region, RRDR)，其中 *rpo1* 互補於胺基酸編碼 507 到 516，包含兩個可能核酸突變位點、*rpo2* 互補於胺基酸編碼 514 到 523，含有一個可能突變位點、*rpo3* 互補於胺基酸編碼 524 到 533，包含四個可能突變位點，如圖 1.8 所示。檢測結果證實可以藉由螢光訊號的強度差異，區分樣品中包含藥敏性或是抗藥性基因⁵⁷。

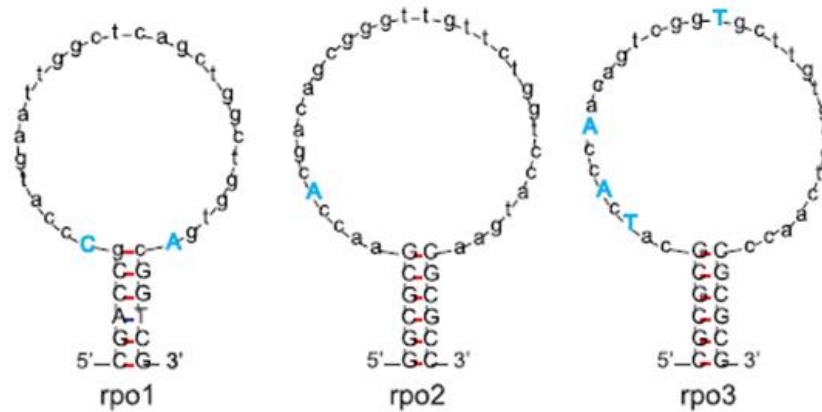


圖 1.8 互補 *rpoB* 序列的三個分子探針序列圖⁵⁷。

Xpert[®] MTB/RIF 為世界衛生組織於 2010 年推薦使用的肺結核桿菌核酸檢測平台⁵⁰，可於 2 小時內完成結核菌群鑑定與一線藥物利福平的抗藥性檢測。其序列示意圖，如圖 1.9 所示，使用五個標記不同螢光基團的核酸雜合探針，與 *rpoB* 基因的 RRDR 區域進行雜合反應，各探針序列被設計為與藥物敏感型 wild-type 的序列互補，因此，當待測基因為 wild-type 時，即產生螢光訊號，相反地，若任一組探針不產出螢光訊號，即表示此結核菌為抗藥性菌株⁵⁸。此方法的優點是步驟簡單，因此可以降低人為誤差，再者使用分子探針進行專一性的偵測，具有高特异性。

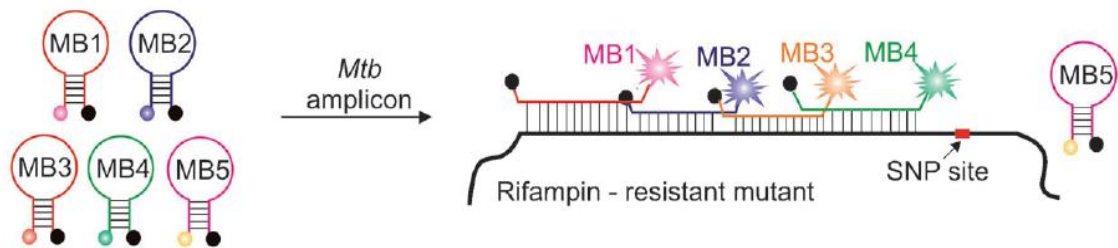


圖 1.9 Xpert[®] MTB/RIF 的機制示意圖⁵⁸。

1.3 擴增應答的分析方法

1.3.1 擴增技術

使用核酸探針與分析物雜合的檢測方式，通常是以等比的化學劑量進行反應並產生訊號，然而這種方式並不適用於低濃度樣品的檢測，因此為了提升感測靈敏度，不同的擴增方法已被提出，如圖 1.10 所示，使用目標物擴增(target amplification)、探針擴增(probe amplification)或是訊號擴增(signal amplification)的方法⁵⁹。

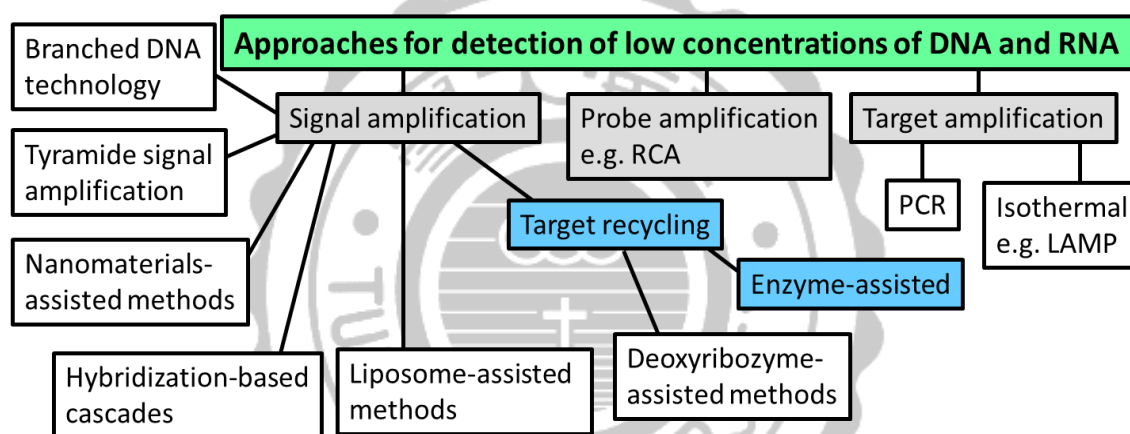


圖 1.10 檢測低濃度的核酸雜合擴增技術分類⁵⁹。主要是利用目標物擴增、探針擴增或是訊號擴增的方法，如灰色方格；其中最為常見的技術，是利用酵素的輔助催化使目標物再循環，進而訊號擴增，如藍色方格。

目標物擴增技術通常是使用聚合酶鏈鎖反應，於反應過程中需準確控制熱循環溫度以利引子和分子探針有效的進行雜合反應，而這樣的方法需使用特定的熱循環儀、並且常遇到引子的非特異性吸附造成的假陽性訊號等問題。

探針擴增的技術以滾環式擴增(Rolling Circle Amplification, RCA)為例子，此技術使用環狀的核酸探針並將環狀探針作為模板，藉由引子與環狀探針雜合使聚

合酶沿著環狀模板進行合成並使用雙股染劑(如：EvaGreen)進行訊號偵測，然而雙股染劑不具特定序列的選擇能力，因此容易導致背景訊號升高且造成誤判訊號的現象。

目前信號擴增是最為常見提升分析物感測靈敏度的分析技術，方法的原理是藉由分析物的存在下產生訊號，再用化學方法針對產生的訊號進行擴增。如圖 1.10 的藍色方格，利用酵素參與的輔助催化機制，使目標物再循環(target recycling)，進而達到提升感測訊號的目的。

1.3.2 多酵素參與反應的信號擴增

利用特定酵素的催化能力達到信號擴增的方式已被廣泛利用，如：鏈取代反應(strand displacement reaction)⁶⁰、裂解反應(cleaved reaction)⁶¹、連接反應(ligation reaction)⁶²等應用。近年來研究指出，結合多酵素參與反應的分析方法更能有效地應用於低濃度樣品的檢測，而目前常見的方式是結合聚合酶(polymerase)與核酸內切酶(endonuclease)或外切酶(exonuclease)參與反應，於等溫下進行偵測並同時達到機制循環與訊號擴增的目的。

利用多酵素的系統包括一次循環反應⁶³⁻⁶⁵與多次循環反應^{60, 66-68}，例如 Chun-yang Zhang 等人於 2014 年設計三個酵素參與反應的機制，有效地釋出含目標分析物的片段而達到一次循環擴增，如圖 1.11 所示，首先是含有鏈取代功能的 KF polymerase，在有分析物的情況下會以反應模板(2-aminopurine probe)進行延伸而取代模板上原有的輔助片段(Helper DNA)，接著所形成的雙股片段包含切口內切酶 Nb.BtsI 的辨識位點，切酶切口後雙股會露出磷酸化的五端，此時核酸外切酶 Lambda Exonuclease 會辨識雙股的磷酸化五端，並沿著五端將反應模板進行裂解消化。此機制的放光機制乃基於 2-氨基嘌呤 (2-aminopurine) 取代腺嘌呤 (adenine) 的位置，2-氨基嘌呤為腺嘌呤的類似物，是一種螢光分子，其螢光的猝滅主要是與相鄰鹼基的堆疊相互作用，因此當反應模板被裂解消化後便會釋出

2-氨基嘌呤，進而產出螢光。而此利用三個酵素結合的放大系統也證實可以大幅提升感測靈敏度，檢測極限可以到達 0.3 fmol⁶⁵。

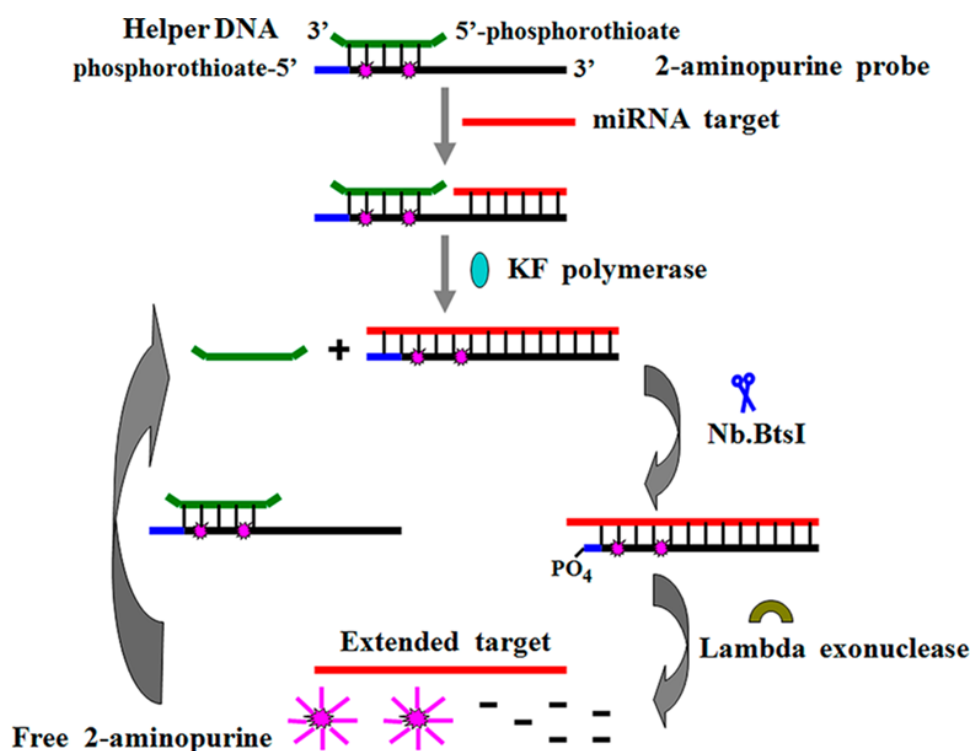


圖 1.11 三酵素參與擴增信號的一次循環反應(One-pot assay)機制圖⁶⁵。

Guohua Zhou 等人於 2014 年提出使用兩個酵素參與反應，有效地釋出目標分析物並且利用額外添加的輔助片段而達到多次循環擴增，機制如圖 1.12，作者利用有結構特異性的核酸切酶 Afu flap endonuclease (FEN) 參與反應，FEN 能識別特定的 DNA 分叉結構，並且切除含有游離 5 端的單鏈核酸，因此在有目標物為模板的條件下，便能不斷產出切口片段(Cleaved flaps)，同時也讓目標物模板釋出循環。接著將切口片段與分子探針進行反應，再藉由 KF polymerase 的輔助作用解折疊探針，並且同時藉由 KF polymerase 進行鏈取代反應達到擴增螢光訊號的產出。此分析方法雖然設計新穎且大幅提升感測靈敏度，卻不適用於判別分

析物是否含有單鹼基變異，因為有變異點即不觸發 FEN 的裂解反應，與沒有分析物存在狀況呈現相同情況⁶⁰。

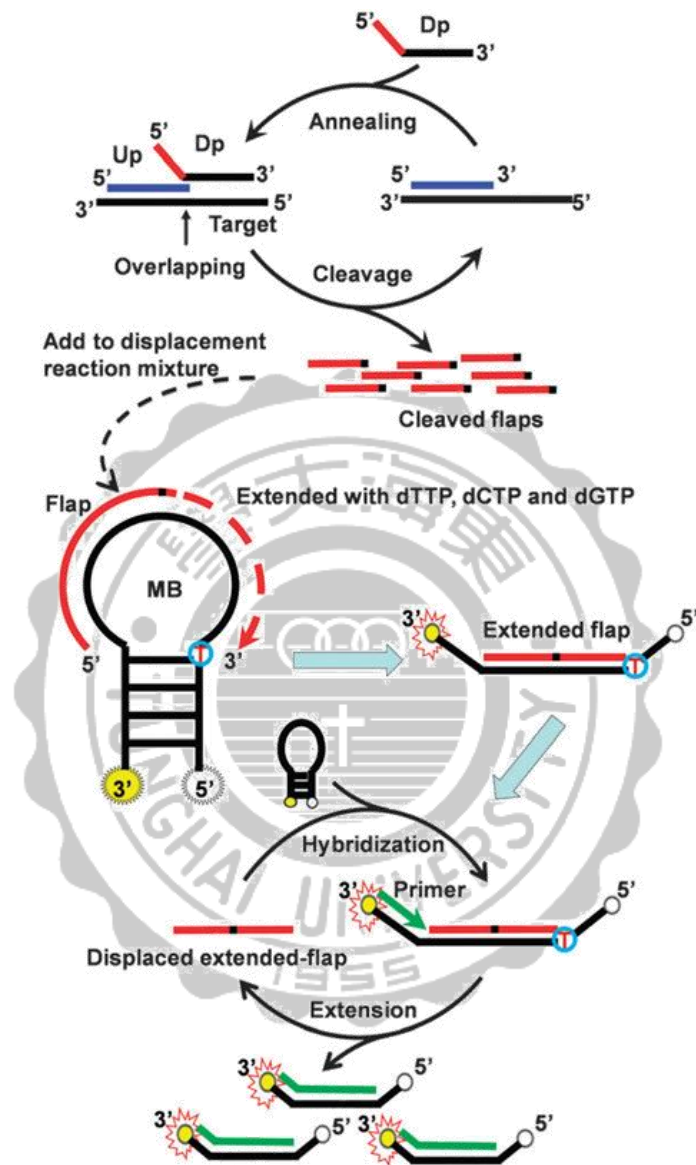


圖 1.12 雙酵素參與擴增信號的二次循環反應(Two step assay)機制圖⁶⁰。

Chun-yang Zhang 等人於 2015 年提出三個酵素參與反應而達到多次循環擴增的設計，機制如圖 1.13，首先在有目標分析物存在的狀況下，藉由核酸連接酶將探針與分析物進行連接反應(ligation reaction)，接著 KF polymerase 會合成以分析物為模板的雙股鏈，而合成出的雙股鏈上會包含核酸內切酶的特異性辨識位點，因此在此可以啟動循環擴增，接著再利用切口產出的片段(Triggers)與探針修飾的金奈米粒子反應，最後由拉曼光譜訊號為輸出；然而此機制設計的缺點亦是不易判別分析物為單鹼基變異或是沒有分析物的存在⁶⁸。

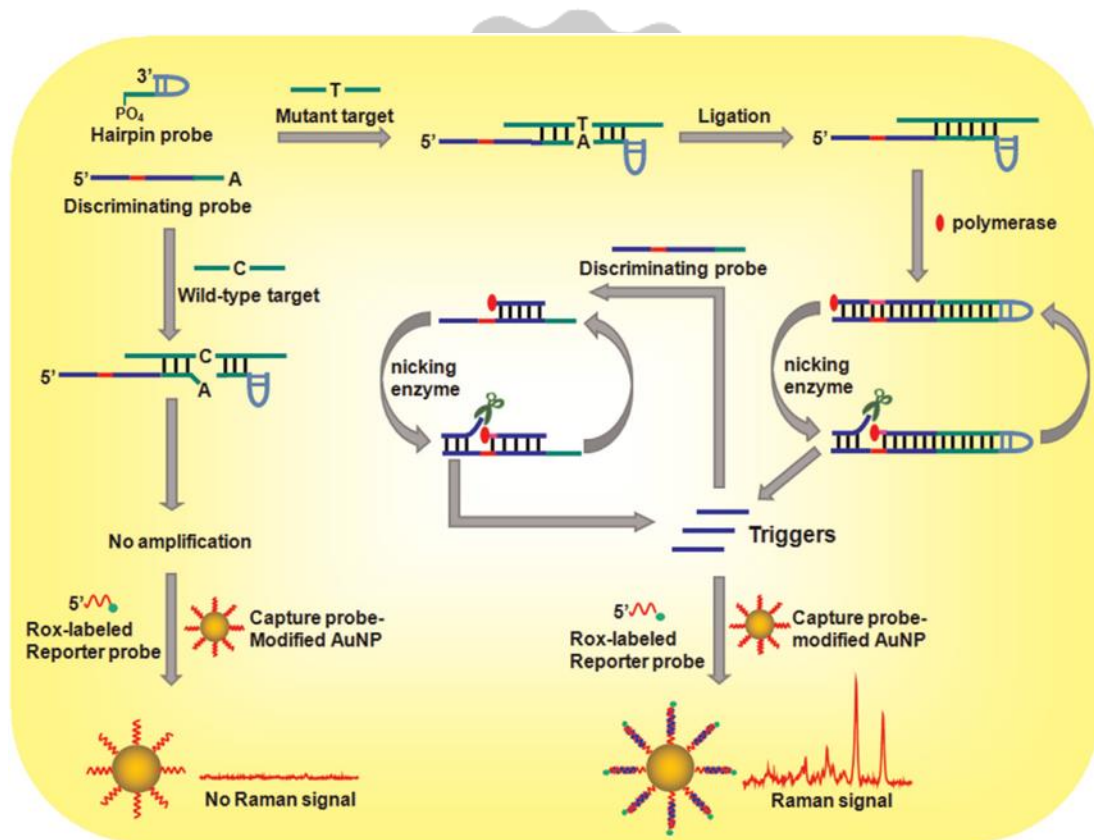


圖 1.13 三酵素參與擴增信號的三次循環反應(Three step assay)機制圖⁶⁸。

1.4 分子邏輯閘式(molecular logic gates)的分析方法

邏輯閘是指一對可接受多個輸入(input)訊號進行運算，並產生輸出(output)訊號的電子電路，當電子訊號以 0 或 1 輸入邏輯閘時，邏輯閘會將電子訊號依照設計的需求進行轉換動作，再將轉換後的電子訊號以 0 或 1 輸出，而分子邏輯閘是指以化學或生物分子為組成元素，具有模擬出布林邏輯閘(Boolean logic)運算功能的分子裝置。過去文獻已發表可成功利用蛋白質、酵素、去氧核糖核酸(DNA)、核糖核酸(RNA)或細胞，發展出可以進行邏輯操作的分子邏輯閘，而利用分子邏輯閘運算多重輸入的概念，可發展成同時分析多重基因序列的分析方法，將邏輯閘產出數位輸出(digital output)訊號的功能及特性，應用於產出 YES 或 NO 為應答的快速醫學診斷^{58, 69-71}。

Dmitry M. Kolpashchikov 等人於 2012 年設計分子邏輯閘運算多重基因序列，應用於偵測肺結核基因片段及其抗藥性的分析方法，如圖 1.14 所示，作者設計出兩個分子探針(UMB1 及 UMB2)，各探針對應不同邏輯閘的分析，藉由 UMB1 辨認樣品是否為肺結核桿菌的基因序列，UMB2 則用於判別肺結核菌有無抗藥性。其中，YES Gate 的設計為只要樣品為肺結核桿菌的基因序列，不管有沒有突變的基因都會有螢光訊號的輸出，而 OR Gate 的設計為用來辨認有無抗藥性，當有螢光輸出即為具有抗藥性基因而沒有螢光輸出則反之⁵⁸。

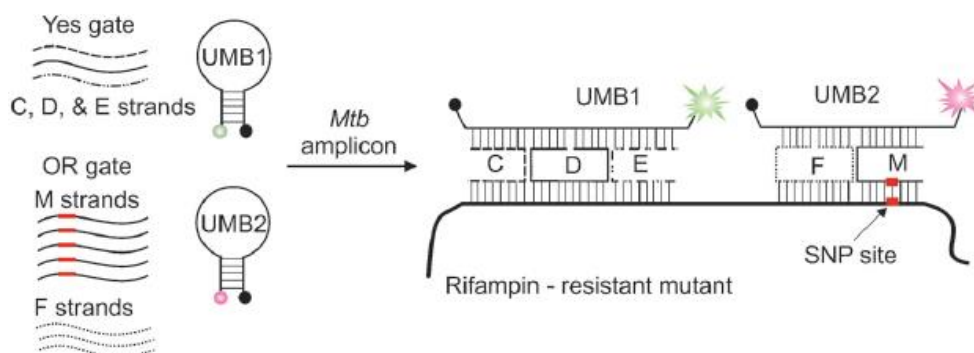


圖 1.14 邏輯閘式結核基因片段及其抗藥性分析方法機制圖⁵⁸。

1.5 動機

鑑於肺結核病對於人類健康的威脅，發展符合經濟效益、快速、準確的診斷方法是需要的。臨床上，肺結核病的診斷需要同時考量結核菌的確認與檢體中所含菌株抗藥性分析，通常需要技術繁瑣且耗時的過程。多重序列分析技術 (Multiple sequence analysis)^{46, 72-74} 理論上可解決此困境，一般使用單一個分子探針與單一目標分析物進行互補，因此必須使用數個核酸雜合探針進行分析，目前已商業化的方法 Xpert[®] MTB/RIF 即基於類似機理，其缺點為使用五個核酸雜合探針，需要使用多通道訊號輸出的機台進行偵測，同時受限於螢光基團激發及放射光譜彼此重疊，易產生干擾，訊號產出結果相對複雜，需要專業人員來判讀。較簡化的機制如 Zi-Yun Zhao 等人於 2013 年所報導的肺結核病多重序列 (IS6110 與 *rpoB*) 分析方法⁷⁴，結合 RT-PCR 使用兩個分子探針，在兩個分子探針上分別修飾不同螢光基團，分別用於感測 IS6110 與 *rpoB*，可以得知樣品是否為結核病基因、亦得知是藥敏型或是抗藥型，其機理仍為單一訊號輸出回答單一問題。

分子邏輯閘的機制由於可接受兩個輸入，觀念上類似多重分析物，已被運用於分析多重基因序列^{58, 75-76}。然而，一個邏輯閘只能提供一個結論，以應答 **0** 或應答 **1** 輸出，無法回答兩個問題，以診斷肺結核病為例，意即無法釐清樣品中是否為藥敏性的結核桿菌 (圖 1.15)，因此，我們希望設計出一個機制，除了應答 **0** 與應答 **1** 以外，可輸出一個可供辨識的中等訊號，用於指出上述“具藥敏性結核桿菌”，其真值表如表 1.2 所示，IS6110 的訊號輸入 **0** 或 **1** 分別表示系統內“不存在”或“存在”分析片段，以其判別偵測物是否為結核桿菌核酸，*rpoB* 的訊號輸入 **0** 或 **1** 分別表示系統內存在“藥敏性”或“抗藥性”片段，以其判別偵測物為藥敏型或是抗藥型結核。

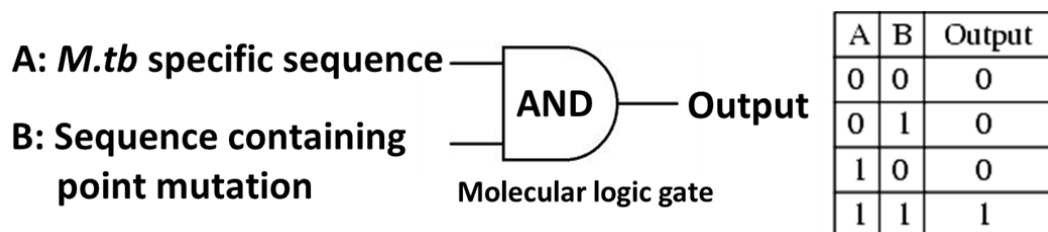


圖 1.15 分子邏輯閘 AND Gate 的機制運算概念。

表 1.2 層級式應答的分析方法。

<i>rpo B</i>	<i>IS6110</i>	Output	Implication
0	0	0 (low)	Non <i>M.tb</i>
1	0	0 (low)	Non <i>M.tb</i>
0	1	½ (medium)	<i>M.tb</i> DNA but no drug resistance genes
1	1	1 (high)	<i>M.tb</i> DNA and drug resistance genes

對於 *IS6110*，輸入 1 定義為”存在”分析片段，輸入 0 定義為”不存在”分析片段。對於 *rpoB*，輸入 1 定義為存在”抗藥性”的分析片段(即 SNP)，輸入 0 定義為存在”藥敏性”的分析片段(即 wild type)。

本篇論文中，我們設計一個新穎的感測機制，具特异性且靈敏地同時辨認雙重基因片段，針對肺結核桿菌核酸變異產生抗藥性有較高發生率的 S531L 位點進行探討。為了滿足多重片段的分析需求，我們提出使用單一個分子探針與額外添加一條能幫助結構穩定形成的輔助鏈參與雙重目標物的分析，並產生三位元的訊號輸出，供同時回答兩個問題。除此之外，我們也設計雙酵素參與的訊號擴增系統，有效提升系統感測靈敏度。

第二章 實驗材料與方法

2.1 藥品與試劑

表 2.1 藥品名稱及廠牌

藥品名稱	化學式/縮寫	廠牌
40% Acrylamide/Bis Solution,19:1		Bio-Rad
6X DNA Loading Dye		Thermo Scientific
6X DNA Loading Dye		PROTECH
Ammonium Persulfate	APS	Bio-Rad
Bio-25bp TM DNA Ladder		PROTECH
Boric acid	B(OH) ₃	PROTECH
Deoxynucleotide Mix	dNTPs	GeneDirex
Dimethyl sulfoxide	DMSO	Thermo Scientific
Dithiothreitol	DTT	New England Biolabs
Ethylenediaminetetraacetic acid	EDTA	PROTECH
EvaGreen [®] Dye, 20X in water	EG	Biotium
Hydrochloric acid	HCl	Sigma-Aldrich2
Klenow Fragment (3'→5' exo-)		New England Biolabs
Magnesium chloride	MgCl ₂	New England Biolabs
Magnesium chloride hexahydrate	MgCl ₂ · 6H ₂ O	Sigma-Aldrich
Magnesium chloride solution	MgCl ₂	Thermo Scientific
N,N,N',N'-tetramethylethylene-diamine	TEMED	Bio-Rad
Nt.AlwI		New England Biolabs
Phusion Hot Start II High-Fidelity DNA		Thermo Scientific

Polymerase		
Sodium Chloride	NaCl	Sigma-Aldrich
SYBR [®] Gold Nucleic Acid Gel Stain		Invitrogen
Tris (Base)	NH ₂ C(CH ₂ OH) ₃	J. T. Baker



2.2 儀器與材料

表 2.2 儀器名稱及廠牌

儀器/材料名稱	型號	廠牌
Centrifuge 離心機	C1801	Labnet
Centrifuge 離心機	MC-Cubee	AAT Bioquest
Compact CCD Image System CCD 凝膠成像儀	UVCI-01-312	Major Science
Freeze Dryer 冷凍乾燥機	FD2-6P	KINGMECH
Mini-Protean Tetra Cell 迷你垂直式電泳槽	165-8001	Bio-Rad
MS Orbital Shaker MS 迴轉式振盪器	MS-NOR	Major Science
Multimode Microplate Spectroscopy 多功能微量盤分析儀	SpectraMax M2 ^e	Molecular Devices
PowerPac Basic Power Supply 基本型電源供應器	164-5050	Bio-Rad
Real-Time QPCR 即時偵測同步定量聚合酶連鎖反應儀	MiniOpticon	Bio-Rad
Real-Time QPCR 即時偵測同步定量聚合酶連鎖反應儀	StepOne™ System	Applied Biosystems, Inc (ABI)
SmartView Pro 1100 Imager System 凝膠成像儀	UVCI-1100	Major Science
SpectraDrop Micro-Volume Starter Kit, 24-Well Microplate 24 孔微量盤套件	0200-6262	Molecular Devices

Thermal Cycler

MJ Mini

Bio-Rad

聚合酶鏈鎖反應儀

Vortex 振盪器

G-560

Scientific Industries



2.3 去氧核糖核酸(DNA)序列

表 2.3 實驗用核酸序列表

Name	Sequence and modification (5'→3')	Description
A11	CAT CAC TAC AGG GAG CTA TCA TGA TT	Assistant strand for MB1 system
A13	CGA TCG CGT CGA GGA GCG CCA ACA GTC GGC	Assistant strand (15,15) for AND gate system
A15	CGA TCG CGT CGA GGA GCG CCA ACA GT	Assistant strand (11,15) for AND gate system
A17	TCG ATC GCG TCG AGG GCG CCA ACA GTC GGC	Assistant strand (15,15)
A18	TCG ATC GCG TCG AGG GCG CCA ACA GT	Assistant strand (11,15) for w/o system
A20	TCG ATC GCG TCG AGG GCG CCA ACA GTC G	Assistant strand (13,15) for w/o system
A21	TCG ATC GCG TCG AGG GCG CCA ACA GTC	Assistant strand (12,15) for w/o system
A22	TCG ATC GCG TCG AGG GCG CCA ACA G	Assistant strand (10,15) for w/o system
A23	TCG ATC GCG TCG AGG GCG CCA A	Assistant strand (07,15) for w/o system
A24	TCG ATC GCG TCG AGG GCG CCA ACA	Assistant strand (09,15) for w/o system
A25	TCG ATC GCG TCG AGG GCG CCA ACA GTC GC	Assistant strand (13,15) for enzyme system

A26	TCG ATC GCG TCG AGG GCG CCA ACA GTC C	Assistant strand (12,15) for enzyme system
A27	TCG ATC GCG TCG AGG GCG CCA ACA GTG	Assistant strand (11,15) for enzyme system
A28	TCG ATC GCG TCG AGG GCG CCA ACA GC	Assistant strand (10,15) for enzyme system
A29	TCG ATC GCG TCG AGG GCG CCA ACA C	Assistant strand (09,15) for enzyme system
A30	TCG ATC GCG TCG AGG GCG CCA ACT	Assistant strand (08,15) for enzyme system
A31	TCG ATC GCG TCG AGG GCG CCA AG	Assistant strand (07,15) for enzyme system
HB	CGC AGG GCC CCA CAT GGA GGT CTG CG	Hairpin B
HE	AGG ATC GGG CCC CAC ATG GAG GTC GAT CCT	Hairpin E
HF	CGG ATC GGG CCC CAC ATG GAG GTT GAT CCG	Hairpin F
HG	CGG ATC CGG GCC CCA CAT GGA GGT CGA TCC G	Hairpin G
ISF	TCG CTT CCA CGA TGG CCA	Forward primer for IS6110
ISR	GCG GGT CCA GAT GGC TTG CT	Reverse primer for IS6110
MB1	FAM-CCG GCA ATG ATT GAT CGT TAC CCAAAT AGT ATG CCG G-Dabcyl	Molecular beacon 1
MB	FAM-CGG ATC CGG GCC CCA CAT GG A	Molecular beacon

	GGT CGA TCC G–Dabcyl	
mMB	FAM–CGG (A*)TC CGG GCC CCA CAT GGA GGT CGA TCC G–Dabcyl	Methylation-molecular beacon
	A* : N6–methylation	
mHG	CGG (A*)TC CGG GCC CCA CAT GGA GGT CGA TCC G	Methylation-Hairpin G
	A* : N6–methylation	
PC	TTT TCG GAT C	Primer C
PD	TTT CGG ATC G	Primer D
PE	TTT TTC GGAT T	Primer E
RF	ACC AGA ACA ACC CGC TGT CG	Forward primer for <i>rpoB</i>
RR	GCT CAC GTG ACA GAC CGC CG	Reverse primer for <i>rpoB</i>
TG	AAT GAA TCA TGA TAG CTC CAA ACG ATC AAT CAT T	Target sequence G
TI	ATA CTA TTT GGG TAT CTG TAG TGA TGA TGG GGC	Target sequence I
TN	ATA CTA TTT GGG AAT CTG TAG TGA TGA TGG GGC	Target sequence N
TM	ATA CTA GTT GGG TAT CTG TAG TGA TGA TGG GGC	Target sequence M
TP	ATA CTA TTT GGG TAT CTG TAC TGA TGA TGG GGC	Target sequence P
TR	ACC TCC ATG GTC CTC GAC GCG ATC GA	Target sequence R (IS6110 fragment)
TS	GCC GAC TGT TGG CGC TGG GGC CC	Target sequence S

(*rpoB* fragment)

TS2	GCC GAC TGT TGG CGC TGG GGC CCG G	Target sequence S2
TT	GCC GAC TGT CGG CGC TGG GGC CC	Target sequence T
TT2	GCC GAC TGT CGG CGC TGG GGC CCG G	Target sequence T2



2.4 單核苷酸位點分析

利用熱熔解曲線實驗探討霍利迪交叉結構中的單核苷酸變異位點。首先使用緩衝溶液(10 mM Tris-Base、50 mM NaCl 和 5 mM MgCl₂)分別回溶寡核苷酸(TG、TN、TP、TM 及 TI)、輔助鏈(A11)與分子探針(MB1)，依不同體積比例混合上述溶液形成下列組成的不同組合：MB1、MB1/A11/TG/TI、MB1/A11/TG/TN、MB1/A11/TG/TM 與 MB1/A11/TG/TP。每一混合液總體積皆為 20 μL，TG、TN、TP、TM、TI 及 A11 最終濃度為 1.2 μM，MB1 最終濃度為 0.2 μM。接著使用即時偵測同步定量聚合酶連鎖反應儀(Bio-Rad Mini-Opticon)進行升溫及螢光偵測，步驟包括：1. 溫度升到 95 °C 維持 5 分鐘，2. 溫度降回 15 °C 維持 5 分鐘，3. 以每上升 1 °C 維持 5 分鐘的速率將溫度從 15 °C 升至 85 °C，並偵測每 °C 下的螢光訊號。最後將所記錄的螢光訊號相對於溫度做圖即可得到熱熔解曲線圖。

2.5 分子探針解折疊行為分析

利用熱熔解曲線實驗探討分子探針解折疊行為。首先使用緩衝溶液(10 mM Tris-Base、50 mM NaCl 和 5 mM MgCl₂)分別回溶寡核苷酸(TR 及 TS2)、輔助鏈(A17)與分子探針(MB)，依不同體積比例混合上述溶液形成下列組成的不同組合：MB、MB/TR/TS2/A17、MB/TR/TS2、MB/TR/A17、MB/TS2/A17、MB/TR 與 MB/TS2。每一混合液總體積皆為 20 μL，TR、TS2、A17 最終濃度為 1.2 μM，MB 最終濃度為 0.2 μM。接著使用即時偵測同步定量聚合酶連鎖反應儀(Bio-Rad Mini-Opticon)進行升溫及螢光偵測，步驟包括：1. 溫度升到 95 °C 維持 5 分鐘，2. 溫度降回 15 °C 維持 5 分鐘，3. 以每上升 1 °C 維持 5 分鐘的速率將溫度從 15 °C 升至 85 °C，並偵測每 °C 下的螢光訊號。最後將所記錄的螢光訊號相對於溫度做圖即可得到熱熔解曲線圖。

2.6 分子邏輯閘的分析方法

利用熱熔解曲線實驗探討分子邏輯閘(1,0)的偵測方式。首先使用緩衝溶液(10 mM Tris-Base、50 mM NaCl 和 5 mM MgCl₂)分別回溶寡核苷酸(TR、TS2 及 TT2)、輔助鏈(A23)與分子探針(MB)，依不同體積比例混合上述溶液形成下列組成的不同組合：MB、MB/TR/TS2/A23 與 MB/TR/TT2/A23。每一混合液總體積皆為 20 μL，TR、TS2、TT2 及 A23 最終濃度為 1.2 μM，MB 最終濃度為 0.2 μM。接著使用即時偵測同步定量聚合酶連鎖反應儀(Bio-Rad Mini-Opticon)進行升溫及螢光偵測，步驟包括：1. 溫度升到 95 °C 維持 5 分鐘，2. 溫度降回 15 °C 維持 5 分鐘，3. 以每上升 1 °C 維持 5 分鐘的速率將溫度從 15 °C 升至 85 °C，並偵測每°C 下的螢光訊號。最後將所記錄的螢光訊號相對於溫度做圖即可得到熱熔解曲線圖。

2.7 聚丙烯酰胺凝膠電泳(polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE)

利用凝膠電泳實驗探討互補數差異與分子邏輯閘(1,0)的偵測方式。首先製備 12% 的聚丙烯酰胺凝膠，將 40% Acrylamide/Bis Solution(19:1)、10% APS、TEMED 與 1X TBE 緩衝溶液配置成總體積 6 μL 的混合液，充分混合後注入凝膠裝置並於室溫下靜置凝膠 1 個小時後備用。接著使用緩衝溶液(10 mM Tris-Base、50 mM NaCl 和 5 mM MgCl₂)分別回溶寡核苷酸(TR、TS2 及 TT2)、輔助鏈(A13 及 A15)與髮夾探針(HB)，依不同體積比例混合上述溶液形成下列組成的不同組合：HB/TR/TS2/A13、HB/TR/TT2/A13、HB/TR/TS2/A15 與 HB/TR/TT2/A15。每一混合液總體積皆為 20 μL，最終混合濃度皆為 0.2 μM。混合後使用聚合酶連鎖反應儀(Bio-Rad MJ Mini)進行升溫，步驟包括：1. 溫度升到 95 °C 維持 3 分鐘，2. 溫度降回 37 °C 維持 40 分鐘。將反應完的產物混合 6X DNA Loading dye 注入聚丙烯酰胺凝膠裝置，並且配製 DNA Ladder 作為片段大小的對照。最後使用迷你垂直式電泳槽(Bio-Rad 165-8001)進行反應，條件設定為 14 V/cm，反應時間為 150

分鐘，反應結束後將膠片取出浸泡於 1X SYBR Gold 溶液中進行染色，染色的過程放置於迴轉式振盪器(Major Science MS-NOR)搖晃 30 分鐘並設定轉速為 60 rpm，最後使用 40 萬像素 CCD 凝膠成像儀(Major Science UVCI-01-312)進行觀測，以紫外光激發加上 312 nm 的濾光片成像後拍照，即可對聚丙烯酰胺凝膠進行產物分析。

2.8 層級式應答的分析方法

利用動力學曲線實驗探討層級式應答的偵測方式。首先使用緩衝溶液(10 mM Tris-Base、50 mM NaCl 和 5 mM MgCl₂)分別回溶寡核苷酸(TR、TS2 及 TT2)、輔助鏈(A18、A20、A21 及 A22)與分子探針(MB)，依不同體積比例混合上述溶液形成下列組成的不同組合：MB、MB/TR/TS2/A18、MB/TR/TS2/A20、MB/TR/TS2/A21、MB/TR/TS2/A22、MB/TR/TT2/A18、MB/TR/TT2/A20、MB/TR/TT2/A21 與 MB/TR/TT2/A22。每一混合液總體積皆為 20 μ L，TR、TS2、TT2、A18、A20、A21 以及 A22 最終濃度為 1.2 μ M，MB 最終濃度為 0.2 μ M。接著使用即時偵測同步定量聚合酶連鎖反應儀(Bio-Rad Mini-Opticon)進行升溫及螢光偵測，步驟包括：1. 溫度升到 95 $^{\circ}$ C 維持 5 分鐘，2. 溫度降回 37 $^{\circ}$ C 反應環境下進行螢光訊號的偵測，偵測時間為 50 分鐘。最後將所記錄的螢光訊號相對於時間做圖即可得到動力學曲線圖。

2.9 雙酵素參與的探針設計與優化

利用熱熔解曲線實驗微分後的結果探討髮夾探針的穩定性。首先使用緩衝溶液(10 mM Tris-Base、50 mM NaCl 和 5 mM MgCl₂)分別回溶寡核苷酸(HB、HE、HF 及 HG)，並於上述溶液中分別加入雙股染劑 EvaGreen。每一混合液總體積皆

為 20 μL ，最終溶液中寡核苷酸濃度皆為 0.2 μM 與 1X EvaGreen。接著使用即時偵測同步定量聚合酶連鎖反應儀(Bio-Rad Mini-Opticon)進行升溫及螢光偵測，步驟包括：1. 溫度升到 95 $^{\circ}\text{C}$ 維持 3 分鐘，2. 溫度降回 15 $^{\circ}\text{C}$ 維持 3 分鐘，3. 以每上升 1 $^{\circ}\text{C}$ 維持 1 分鐘的速率將溫度從 15 $^{\circ}\text{C}$ 升至 85 $^{\circ}\text{C}$ ，並偵測每 $^{\circ}\text{C}$ 下的螢光訊號。最後將所記錄的螢光訊號相對於溫度微分做圖即可對髮夾探針的溶解溫度進行分析。

2.10 含有聚合酶 KF 擴增系統最佳化研究

利用動力學曲線實驗探討不同變因對於 KF 系統的影響。使用緩衝溶液 1X NEBuffer 2 (50 mM NaCl、10 mM Tris-HCl、10 mM MgCl_2 與 1 mM DTT)分別回溶寡核苷酸(TR 及 TS)、引子(PC、PD 及 PE)、輔助鏈(A17)與分子探針(MB)。探討不同互補長度引子的實驗中，在固定組成 TR/TS/A17/MB/dNTPs/KF 中分別加入 PC、PD 及 PE。每一混合液總體積皆為 20 μL ，TR、TS、A17、PC、PD、PE、MB 最終濃度為 1 μM ，dNTPs 最終濃度為 200 μM ，KF 最終濃度為 0.05 U/ μL 。藉由即時偵測同步定量聚合酶連鎖反應儀(Bio-Rad Mini-Opticon)進行升溫及螢光偵測，步驟包括：1. 溫度升到 95 $^{\circ}\text{C}$ 維持 5 分鐘，2. 溫度降回 42 $^{\circ}\text{C}$ 反應環境下進行螢光訊號的偵測，偵測時間為 120 分鐘。探討引子濃度的實驗中，在固定組成 TR/TS/A17/MB/dNTPs/KF 中分別加入不同濃度的引子 PD。每一混合液總體積皆為 20 μL ，TR、TS、A17、MB 最終濃度為 1 μM ，dNTPs 最終濃度為 200 μM ，KF 最終濃度為 0.05 U/ μL ，PD 分別為 0.5 μM 、1 μM 、2 μM 和 3 μM 。藉由即時偵測同步定量聚合酶連鎖反應儀(Bio-Rad Mini-Opticon)進行升溫及螢光偵測，步驟包括：1. 溫度升到 95 $^{\circ}\text{C}$ 維持 5 分鐘，2. 溫度降回 42 $^{\circ}\text{C}$ 反應環境下進行螢光訊號的偵測，偵測時間為 120 分鐘。探討酵素濃度的實驗中，在固定組成 TR/TS/A17/MB/dNTPs/PD 中分別加入不同濃度的酵素 KF。每一混合液總體積皆為 20 μL ，TR、TS、A17、MB、PD 最終濃度為 1 μM ，dNTPs 最終濃

度為 200 μM ，KF 分別為 0.01 U/ μL 、0.05 U/ μL 、0.1 U/ μL 和 0.25 U/ μL 。藉由即時偵測同步定量聚合酶連鎖反應儀(Bio-Rad Mini-Opticon)進行升溫及螢光偵測，步驟包括：1. 溫度升到 95 $^{\circ}\text{C}$ 維持 5 分鐘，2. 溫度降回 42 $^{\circ}\text{C}$ 反應環境下進行螢光訊號的偵測，偵測時間為 120 分鐘。探討反應溫度的實驗中，將固定組成 TR/TS/A17/MB/dNTPs/ PD/KF 分別於不同溫度(32 $^{\circ}\text{C}$ 、37 $^{\circ}\text{C}$ 、42 $^{\circ}\text{C}$ 和 47 $^{\circ}\text{C}$) 下定溫偵測訊號。每一混合液總體積皆為 20 μL ，TR、TS、A17、MB、PD 最終濃度為 1 μM ，dNTPs 最終濃度為 200 μM ，KF 最終濃度為 0.05 U/ μL 。藉由即時偵測同步定量聚合酶連鎖反應儀(Bio-Rad Mini-Opticon)進行升溫及螢光偵測，步驟包括：1. 溫度升到 95 $^{\circ}\text{C}$ 維持 5 分鐘，2. 溫度分別降至不同反應環境下進行螢光訊號的偵測，偵測時間為 120 分鐘。將以上所記錄的螢光訊號相對於時間做圖即可得到動力學曲線圖。

2.11 聚合酶 KF 擴增系統的層級式應答分析

利用動力學曲線實驗探討 KF 系統下層級式應答的偵測方式。首先使用緩衝溶液 1X NEBuffer 2 (50 mM NaCl、10 mM Tris-HCl、10 mM MgCl_2 與 1 mM DTT) 分別回溶寡核苷酸(TR、TS 及 TT)、引子(PD)、輔助鏈(A17、A25、A26、A27、A28、A29、A30 及 A31)與分子探針(MB)。依不同體積比例混合上述溶液，並替換不同條輔助鏈形成下列組成的組合：MB、MB/TR/TS/A、MB/TR/TT/A。每一混合液總體積皆為 20 μL ，TR、TS、TT、MB、PD、A17、A25、A26、A27、A28、A29、A30 及 A31 最終濃度為 1 μM ，dNTPs 最終濃度為 200 μM ，KF 最終濃度為 0.05 U/ μL 。接著使用即時偵測同步定量聚合酶連鎖反應儀(Bio-Rad Mini-Opticon)進行升溫及螢光偵測，步驟包括：1. 溫度升到 95 $^{\circ}\text{C}$ 維持 5 分鐘，2. 溫度降回 37 $^{\circ}\text{C}$ 反應環境下進行螢光訊號的偵測，偵測時間為 120 分鐘。最後將所記錄的螢光訊號相對於時間做圖即可得到動力學曲線圖。

2.12 雙酵素系統中甲基化髮夾探針的行為分析

利用熱熔解曲線微分圖(dF/dT vs. T)探討甲基化髮夾探針隨溫度變化的解折疊行為。首先使用緩衝溶液(10 mM Tris-Base、50 mM NaCl 和 5 mM MgCl₂)分別回溶寡核苷酸(Hairpin、Methyl-Hairpin)。準備不同組成溶液的組合包括：HG/EvaGreen、mHG/EvaGreen、HG/Nt.A1wI/EvaGreen、mHG/Nt.A1wI/EvaGreen，每一混合液總體積皆為 20 μL，HG、mHG 最終濃度為 1 μM、Nt.A1wI 最終濃度為 0.15 U/μL 以及 1X EvaGreen。使用即時偵測同步定量聚合酶連鎖反應儀(Bio-Rad Mini-Opticon)進行升溫及螢光偵測，反應分為兩個部分，第一部分分別將 HG 及 mHG 於下列步驟中反應：1. 溫度升到 95 °C 維持 3 分鐘，2. 溫度降回 37 °C 維持 5 分鐘後取出加入切酶 Nt.A1wI，3. 溫度維持在 37 °C 反應環境下 200 分鐘，隨後將溫度升至 80 °C 維持 20 分鐘。第二部分，取出前述兩管分析物 HG/Nt.A1wI 及 mHG/Nt.A1wI 與兩管未與切酶反應的對照組分析物 HG 及 mHG，在四管溶液中分別加入雙股染劑 EvaGreen 並於下列步驟中反應：1. 溫度升到 95 °C 維持 3 分鐘，2. 溫度降回 15 °C 維持 3 分鐘，3. 以每上升 1 °C 維持 1 分鐘的速率將溫度從 15 °C 升至 85 °C，並偵測每 °C 下的螢光訊號。最後將所記錄的螢光訊號相對於溫度微分做圖即可對髮夾探針的溶解溫度進行分析。

2.13 雙酵素訊號擴增系統最佳化研究

利用動力學曲線以及熱熔解曲線實驗探討不同變因對於雙酵素系統的影響。使用緩衝溶液 1X NEBuffer 2 (50 mM NaCl、10 mM Tris-HCl、10 mM MgCl₂ 與 1 mM DTT)分別回溶寡核苷酸(TR、TS 及 TT)、引子(PD)、輔助鏈(A27、A29)與分子探針(mMB)。探討引子濃度的實驗中，在固定組成 mMB/dNTPs/KF/Nt.A1wI 中分別加入不同濃度的 PD。每一混合液總體積皆為 20 μL，mMB 最終濃度為 1 μM，dNTPs 最終濃度為 200 μM，KF 最終濃度為 0.05 U/μL，Nt.A1wI 最終濃度為 0.15 U/μL，PD 分別為 0.02 μM、0.1 μM、0.5 μM 和 1 μM。藉由即時偵測同

步定量聚合酶連鎖反應儀(ABI Step-One)進行升溫及螢光偵測，步驟包括：1. 溫度升到 95 °C 維持 5 分鐘，2. 溫度降回 37 °C 反應環境下進行螢光訊號的偵測，偵測時間為 60 分鐘。探討分子探針濃度的實驗中，在固定組成 TR/TS/A27/PD/dNTPs/KF/Nt.A1wI 與 TR/TT/A27/PD/dNTPs/KF/Nt.A1wI 中分別加入不同濃度的 mMB。每一混合液總體積皆為 20 μ L，TR、TS、TT 最終濃度為 0.01 μ M，A27 最終濃度為 0.2 μ M，PD 最終濃度為 0.1 μ M，dNTPs 最終濃度為 200 μ M，KF 最終濃度為 0.05 U/ μ L，Nt.A1wI 最終濃度為 0.15 U/ μ L，mMB 最終濃度分別為 0.2 μ M、0.5 μ M、0.8 μ M、1 μ M 和 1.5 μ M。藉由即時偵測同步定量聚合酶連鎖反應儀(ABI Step-One)進行升溫及螢光偵測，步驟包括：1. 溫度升到 95 °C 維持 5 分鐘，2. 溫度降回 37 °C 反應環境下進行螢光訊號的偵測，偵測時間為 120 分鐘。將以上所記錄的螢光訊號相對於時間做圖即可得到動力學曲線圖。探討反應溫度實驗中，將固定組成 A29/PD/dNTPs/mMB/KF/Nt.A1wI、TR/TS/A29/PD/dNTPs/mMB/KF/Nt.A1wI 與 TR/TT/A29/PD/dNTPs/mMB/KF/Nt.A1wI 均勻混合後隨著溫度變化進行螢光訊號的偵測。每一混合液總體積皆為 20 μ L，TR、TS、TT、A29 最終濃度為 1.2 μ M，mMB 最終濃度為 0.2 μ M，PD 最終濃度為 0.1 μ M，dNTPs 最終濃度為 200 μ M，KF 最終濃度為 0.05 U/ μ L，Nt.A1wI 最終濃度為 0.15 U/ μ L。藉由即時偵測同步定量聚合酶連鎖反應儀(ABI Step-One)進行升溫及螢光偵測，步驟包括：1. 溫度升到 95 °C 維持 5 分鐘，2. 溫度降回 10 °C 維持 5 分鐘，3. 以每上升 1 °C 維持 5 分鐘的速率將溫度從 10 °C 升至 90 °C，並偵測每 °C 下的螢光訊號。將所記錄的螢光訊號相對於溫度做圖即可得到熱熔解曲線圖。

2.14 雙酵素訊號擴增系統的層級式應答分析

利用動力學曲線實驗探討雙酵素系統下層級式應答的偵測方式。首先使用緩衝溶液 1X NEBuffer 2 (50 mM NaCl、10 mM Tris-HCl、10 mM MgCl₂ 與 1 mM DTT)

分別回溶寡核苷酸(TR、TS及TT)、引子(PD)、輔助鏈(A17、A25、A26、A27、A28、A29、A30及A31)與分子探針(mMB)。依照實驗需求設計組成，將反應物均勻混合並且分為 Mixture 1 以及 Mixture 2，其中 Mixture 1 的組成包含 TR/TS(或 TT)/PD/A17(或 A25、A26、A27、A28、A29、A30、A31 任一條)，Mixture 2 的組成包含 mMB/dNTPs。每一混合液最終總體積皆為 20 μL ，TR、TS、TT、A17、A25、A26、A27、A28、A29、A30 及 A31 最終濃度為 1.2 μM ，PD 最終濃度為 0.1 μM ，mMB 最終濃度為 0.2 μM ，dNTPs 最終濃度為 200 μM ，KF 最終濃度為 0.05 U/ μL ，Nt.A1wI 最終濃度為 0.15 U/ μL 。接著使用即時偵測同步定量聚合酶連鎖反應儀(ABI Step-One)進行升溫及螢光偵測，反應分為兩個部份，第一部份進行 Mixture 1、Mixture 2 預反應，步驟包括：1. 溫度升到 95 $^{\circ}\text{C}$ 維持 3 分鐘，2. 溫度降至 37 $^{\circ}\text{C}$ 反應環境下維持 20 分鐘。第二部份為加入酵素參與 Mixture 1 與 Mixture 2 的反應，步驟包括：1. 取出 Mixture 2 並加入反應酵素 KF 與 Nt.A1wI，在 37 $^{\circ}\text{C}$ 反應環境下維持 3 分鐘，2. 接續上一步混合液中加入 Mixture 1，在 37 $^{\circ}\text{C}$ 反應環境下偵測隨時間變化螢光訊號，偵測時間為 120 分鐘。最後將所記錄的螢光訊號相對於時間做圖即可得到動力學曲線圖。

2.15 雙酵素訊號擴增系統的偵測範圍分析

利用動力學曲線實驗探討雙酵素系統下層級式應答的感測範圍。首先使用緩衝溶液 1X NEBuffer 2 (50 mM NaCl、10 mM Tris-HCl、10 mM MgCl_2 與 1 mM DTT) 分別回溶寡核苷酸(TR、TS及TT)、引子(PD)、輔助鏈(A27)與分子探針(mMB)。依照實驗需求設計組成，將反應物均勻混合並且分為 Mixture 1 以及 Mixture 2，其中 Mixture 1 的組成包含不同濃度的分析物 TR/TS(或 TT)加上固定組成 PD/A27，Mixture 2 的組成包含 mMB/dNTPs。每一混合液最終總體積皆為 20 μL ，PD 最終濃度為 0.1 μM ，A27 最終濃度為 0.2 μM ，mMB 最終濃度為 1 μM ，dNTPs 最終濃度為 200 μM ，KF 最終濃度為 0.05 U/ μL ，Nt.A1wI 最終濃度為 0.15 U/ μL ，TR、

TS、TT 最終濃度分別為 0.05 nM、0.1 nM、0.2 nM、0.3 nM、0.4 nM、0.5 nM、1 nM、2.5 nM、5 nM、10 nM、25 nM、50 nM、100 nM、120 nM、150 nM、200 nM 及 300 nM。接著使用即時偵測同步定量聚合酶連鎖反應儀(ABI Step-One)進行升溫及螢光偵測，反應分為兩個部份，第一部份分別將 Mixture 1 與 Mixture 2 反應，步驟包括：1. 溫度升到 95 °C 維持 3 分鐘，2. 溫度降至 37 °C 反應環境下維持 20 分鐘。第二部份為酵素參與 Mixture 1 與 Mixture 2 的反應，步驟包括：1. 取出 Mixture 2 並加入反應酵素 KF 與 Nt.A1wI，在 37 °C 反應環境下維持 3 分鐘，2. 於上一步混合液中加入 Mixture 1，在 37 °C 反應環境下隨時間變化偵測螢光訊號，偵測時間為 120 分鐘。最後將所記錄的螢光訊號相對於時間做圖即可得到動力學曲線圖。

2.16 平衡常數分析

利用熱熔解曲線實驗探討霍利迪交叉結構構型轉換間的平衡常數。首先是使用緩衝溶液 1X NEBuffer 2 (50 mM NaCl、10 mM Tris-HCl、10 mM MgCl₂ 與 1 mM DTT)分別回溶寡核苷酸(TR、TS 及 TT)、輔助鏈(A27)與分子探針(MB)，依不同體積比例混合上述溶液形成下列組成的不同組合：MB、MB/TR/TS/A27、MB/TR/TT/A27。每一混合液總體積皆為 20 μ L，TR、TS、A27 最終濃度為 1.2 μ M，MB 最終濃度為 0.2 μ M。接著使用即時偵測同步定量聚合酶連鎖反應儀(ABI Step-One)進行升溫及螢光偵測，步驟包括：1. 溫度升到 95 °C 維持 5 分鐘，2. 溫度降回 15 °C 維持 5 分鐘，3. 以每上升 1 °C 維持 5 分鐘的速率將溫度從 15 °C 升至 85 °C，並偵測每°C 下的螢光訊號。最後將所記錄的螢光訊號相對於溫度做圖即可得到熱熔解曲線圖。

實驗原理是利用分子探針(MB)與目標分析物(T)於液相溶液中的雜合反應，因為溫度的不同而分成 3 個相態，如圖 2.1 所示，相態 1 為分子探針與目標分析物進行雜合形成互補的狀態(表示為 MB•T)，相態 2 為分子探針與目標分析物分

離而此時分子探針為莖環結構的狀態(表示為 $MB_{\text{closed}}+T$)，相態 3 為分子探針與目標分析物分離而此時分子探針為無規則捲曲的狀態(表示為 $MB_{\text{open}}+T$)。用於描述不同相態之間的平衡常數分析方法，先前已由 Bonnet 等人⁷⁷和 Tsourkas 等人⁷⁸的 2 組團隊所提出，3 個相態的反應可以被表示為：



根據方程式(1)所得到的相對應 K_{12} 和 K_{23} 如下：

$$K_{12} = \frac{[MB_{\text{closed}}][T]}{[MB \bullet T]} \quad (2)$$

$$K_{23} = \frac{[MB_{\text{open}}]}{[MB_{\text{closed}}]} \quad (3)$$

螢光值 F 分別來自於 3 個相態所放射出來的螢光總和， α 、 β 和 γ 分別定義為每個相態中所放射的螢光強度，分子探針於溶液中不同相態的組成之總和表示為 $[MB_0]$ ，即為 $[MB \bullet T] + [MB_{\text{closed}}] + [MB_{\text{open}}]$ ，不同相態分別除以總濃度 $[MB_0]$ 再乘以每個相態所假設的螢光強度加總後即為總螢光值 F ，其表示方法如下：

$$F = \alpha \frac{[MB \bullet T]}{[MB_0]} + \beta \frac{[MB_{\text{closed}}]}{[MB_0]} + \gamma \frac{[MB_{\text{open}}]}{[MB_0]} \quad (4)$$

目標物的總濃度表示為 $[T_0]$ ，要使得方程式成立的先決條件是 $[T_0]$ 需遠大於 $[MB_0]$ ，因此 $[MB \bullet T]$ 所消耗掉的 $[T_0]$ 相當微量，所以即可把 $[T]$ 表示為 $[T_0]$ ，將方程式(2)和(3)帶入 $[MB_0] = [MB \bullet T] + [MB_{\text{closed}}] + [MB_{\text{open}}]$ 表示成方程式(1)在不同相態的螢光強度，並乘以 α 、 β 和 γ 即可得到下列方程式：

$$F = \frac{\alpha[T_0] + \beta K_{12} + \gamma K_{12} K_{23}}{[T_0] + K_{12} + K_{12} K_{23}} \quad (5)$$

將方程式(5)移項整理後可得：

$$K_{12} = \frac{(\alpha - F)[T_0]}{(F - \beta) + (F - \gamma)K_{23}} \quad (6)$$

K_{23} 為相態 2 和相態 3 之間的平衡常數，此相態間的分子探針從關閉到開啟的狀態是受溫度升高的影響，所以可以把目標物視為不存在的狀況，即 $[T_0]=0$ ，代入方程式(5)即可得到下列方程式：

$$K_{23} = \frac{F-\beta}{\gamma-F} \quad (7)$$

利用方程式(6)和(7)分別可以計算出不同溫度下的 K_{12} 和 K_{23} 。 K_{12} 方程式中的參數 F 可以從熱熔解曲線圖中得到，即選取所要探討溫度下分子探針含有目標分析物存在時的螢光強度，參數 α 為分子探針與目標分析物鍵結所得到的螢光強度最大值，參數 β 為分子探針為莖環結構時的螢光強度，通常會選取 15 °C 時的螢光強度(低溫下最小值)，參數 γ 為分子探針為無規則捲曲狀態下的螢光強度，通常會選取 85 °C 時的螢光強度(高溫下最大值)； K_{23} 方程式中的參數 F 同樣可以從熱熔解曲線圖中得到，即為目標分析物不存在時選取所要探討溫度下分子探針的螢光強度，其中，參數 β 與 γ 的選取條件和上述的 K_{12} 參數值相同。

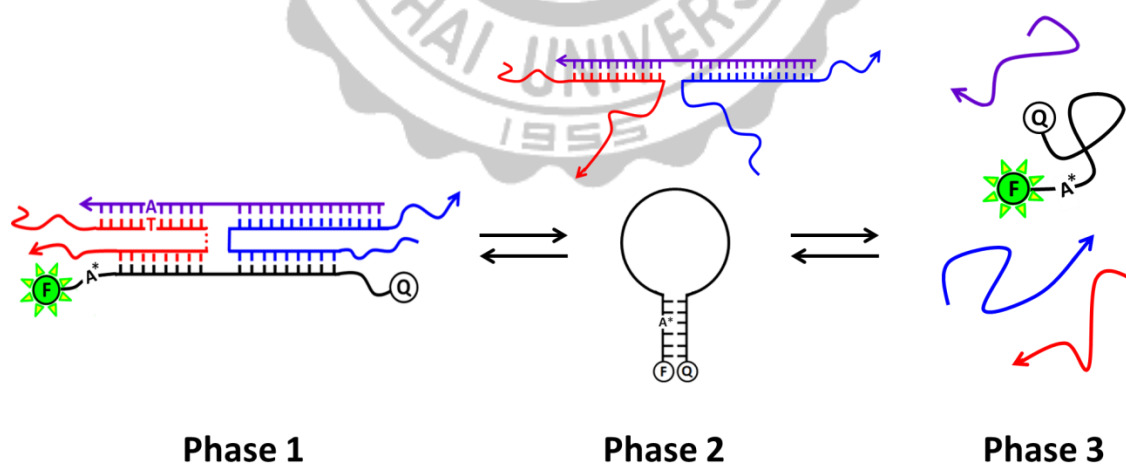


圖 2.1 分子探針與目標物不同相態轉換的示意圖。

2.17 熱力學分析

利用熱熔解曲線實驗探討熱力學參數 ΔH 、 ΔS 和 ΔG 。首先是使用緩衝溶液 1X NEBuffer 2 (50 mM NaCl、10 mM Tris-HCl、10 mM MgCl₂ 與 1 mM DTT)分別回溶寡核苷酸(TR、TS 及 TT)、輔助鏈(A27)、引子(PD)與分子探針(mMB)，依不同體積比例混合上述溶液形成下列組成的不同組合：mMB、mMB/TR/TS/A27/PD、mMB/TR/TT/A27/PD，其中分別使用不同濃度的 TR、TS、TT 及 A27 帶入組合之中。每一混合液總體積皆為 20 μ L，mMB 最終濃度為 0.05 μ M，PD 最終濃度為 0.1 μ M，TR、TS、TT、A27 最終濃度分別為 0.2 μ M、0.3 μ M、0.45 μ M、0.75 μ M、1.2 μ M 和 1.8 μ M。接著使用即時偵測同步定量聚合酶連鎖反應儀(ABI Step-One)進行升溫及螢光偵測，步驟包括：1. 溫度升到 95 $^{\circ}$ C 維持 5 分鐘，2. 溫度降回 15 $^{\circ}$ C 維持 5 分鐘，3. 以每上升 1 $^{\circ}$ C 維持 5 分鐘的速率將溫度從 15 $^{\circ}$ C 升至 85 $^{\circ}$ C，並偵測每 $^{\circ}$ C 下的螢光訊號。最後將所記錄的螢光訊號相對於溫度做圖即可得到熱熔解曲線圖。

實驗原理是利用分子探針與目標分析物進行雜合，通過一個溫度範圍的升溫過程時，分子探針與目標分析物從雜合到分離的狀態(即相態 1 到相態 2)，在升溫過程中當分子探針在特定溫度下達到 $[MB \cdot T] = [MB_{\text{closed}}]$ 時，此溫度稱為目標分析物與分子探針雜合的熔解溫度(即 T_m 值)，此時帶入方程式(2)可以推導出熔解溫度下的 K_{12} ：

$$K_{12} = [T] \quad (8)$$

由於 $[MB \cdot T] = [MB_{\text{closed}}]$ ，所以目標物 $[T_0]$ 在熔解溫度時會與一半的 $[MB_0]$ 形成雜合，此時 $[T]$ 可表示為：

$$[T] = [T_0] - \frac{1}{2}[MB_0] \quad (9)$$

將方程式(8)和(9)帶入吉布斯自由能(Gibbs Free Energy)的公式 $\Delta G = \Delta H - T\Delta S = -RT\ln(K)$ ，其中公式中的 T 表示為溫度；整理後可以推導出下列方程式：

$$R\ln\left([T_0] - \frac{1}{2}[MB_0]\right) = -\frac{1}{T_m}\Delta H_{12} + \Delta S_{12} \quad (10)$$

由不同目標物濃度計算出理論值 K'_{12} 並對照熱熔解曲線計算出來的實驗值 K_{12} ，取接近理論值 K'_{12} 對應的 K_{12} 值，其相對應溫度即為熔解溫度 T_m ，在每一個 $[T_0]$ 濃度下各求得一個 T_m 值後，用 $R\ln([T_0]-0.5[MB_0])$ 對 $1/T_m$ 作圖，即可得到線性曲線圖，其中線性曲線圖所得之斜率和截距即為熱力學參數 ΔH_{12} 和 ΔS_{12} 。

分子探針於升溫過程中，其構型轉換從莖環結構到無規則捲曲的狀態(即相態 2 到相態 3)所求得之平衡常數 K_{23} ，即上述提及之方程式(7)，將此方程式帶入吉布斯自由能(Gibbs Free Energy)的公式 $\Delta G = \Delta H - T\Delta S = -RT\ln(K)$ ；整理後可以推導出下列方程式：

$$R\ln\left(\frac{F-\beta}{\gamma-F}\right) = -\frac{1}{T_m}\Delta H_{23} + \Delta S_{23} \quad (11)$$

將 $R\ln((F - \beta)/(\gamma - F))$ 對相態 2 到相態 3 間的 $1/T_m$ 作圖，即可得到線性曲線圖，其中線性曲線圖所得之斜率和截距即為熱力學參數 ΔH_{23} 和 ΔS_{23} 。

經由上述計算求得之參數 ΔH 、 ΔS 帶入吉布斯自由能(Gibbs Free Energy)的公式 $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$ ，觀察分子探針與目標物在升溫過程中於 3 個相態的轉換。

於相態 3 時，分子探針受高溫影響而呈現無規則捲曲狀，此時目標物視為不存在的狀況，因此 $G_3 = 0$ 。

於相態 2 時，分子探針與目標物受溫度變化影響而分離，分子探針傾向自行折疊，其公式表示為 $G_2 = G_3 - \Delta G_{23}$ ，整理後可以推導出下列方程式：

$$G_2 = -\Delta H_{23} + T\Delta S_{23} \quad (12)$$

於相態 1 時，此溫度範圍下，分子探針與目標物能穩定雜合形成互補的狀態，其公式表示為 $G_1 = G_3 - \Delta G_{23} - \Delta G_{12}$ ，整理後可以推導出下列方程式：

$$G_1 = -(\Delta H_{23} + \Delta H_{12}) + T(\Delta S_{23} + \Delta S_{12}) \quad (13)$$

將 3 相態所得之自由能方程式對溫度作圖，並觀察溫度變化下，分子探針與目標物的相態變化，即可得知任意溫度下其生成傾向。

2.18 動力學分析

利用動力學曲線實驗探討不同反應系統下的速率常數。首先使用緩衝溶液 1X NEBuffer 2 (50 mM NaCl、10 mM Tris-HCl、10 mM MgCl₂ 與 1 mM DTT) 分別回溶寡核苷酸(TR、TS 及 TT)、引子(PD)、輔助鏈(A27)與分子探針(mMB)。依照實驗需求設計組成，將反應物均勻混合並且分為 Mixture 1 以及 Mixture 2，在無酵素參與反應的測定，Mixture 1 的組成包含 TR/TS(或 TT)/PD/A27，Mixture 2 的組成只有 mMB，在有酵素參與反應的測定，Mixture 1 的組成包含 TR/TS(或 TT)/PD/A27，Mixture 2 的組成包含 mMB/dNTPs。每一混合液最終總體積皆為 20 μ L，TR、TS、TT 最終濃度為 0.01 μ M，A27 最終濃度為 0.2 μ M，PD 最終濃度為 0.1 μ M，mMB 最終濃度為 1 μ M，dNTPs 最終濃度為 200 μ M，KF 最終濃度為 0.05 U/ μ L，Nt.A1wI 最終濃度為 0.15 U/ μ L。接著使用即時偵測同步定量聚合酶連鎖反應儀(ABI Step-One)進行升溫及螢光偵測，反應分為兩個部份，第一部份分別將 Mixture 1 與 Mixture 2 反應，在無酵素參與反應的測定下步驟包括：

1. 溫度升到 95 $^{\circ}$ C 維持 3 分鐘，2. 溫度降至 37 $^{\circ}$ C 反應環境下維持 20 分鐘。第二部份為 Mixture 1 與 Mixture 2 的反應，並在 37 $^{\circ}$ C 反應環境下隨時間變化偵測螢光訊號，每 10 秒偵測一點，偵測時間為 300 分鐘。最後將所記錄的螢光訊號相對於時間做圖即可得到動力學曲線圖。在有酵素參與反應的測定下步驟包括：
1. 溫度升到 95 $^{\circ}$ C 維持 3 分鐘，2. 溫度降至 37 $^{\circ}$ C 反應環境下維持 20 分鐘。第

二部份為酵素參與 Mixture 1 與 Mixture 2 的反應，步驟包括：1. 取出 Mixture 2 並加入反應酵素 KF 與 Nt.A1wI，在 37 °C 反應環境下維持 3 分鐘，2. 於上一步混合液中加入 Mixture 1，在 37 °C 反應環境下隨時間變化偵測螢光訊號，每 10 秒偵測一點，偵測時間為 300 分鐘。最後將所記錄的螢光訊號相對於時間做圖即可得到動力學曲線圖。

實驗原理是藉由定溫環境下偵測分子探針與目標分析物之間的作用，觀察分子探針隨時間增加而從閉合狀態到開啟狀態整個過程的數率變化，即可得知分子探針解折疊的速率常數。在此我們同時探討酵素參與反應的影響以及差異性，分別探討無酵素參與、單一酵素核酸聚合酶 KF 參與以及雙酵素核酸聚合酶 KF 與內切酶 Nt.A1wI 參與的系統。Tsourkas 等人⁷⁸已經提出如何將動力學曲線進行定量，將目標物與分子探針之間的作用表示如下：



將方程式(14)用時間對[MB•T]進行微分可以得到下式：

$$\frac{d[MB \cdot T]}{dt} = k_1[MB][T] - k_2[MB \cdot T] \quad (15)$$

其中 k_1 為解折疊的速率常數， k_2 為解折疊後閉合的速率常數，在此先將螢光進行標準化，計算的方程式如下：

$$\frac{[MB \cdot T]_t}{[MB \cdot T]_{eq}} = \frac{F(t) - F_0}{F_{eq} - F_0} = F_n \quad (16)$$

F_0 為不含目標物下的起始螢光強度， $F(t)$ 代表目標物與分子探針開始作用過程時不同時間下的螢光強度， F_{eq} 為螢光值趨近於平衡後的螢光強度，意旨 t 為無限大時螢光值不會隨著時間繼續變化，經由一連串複雜的方程式推倒最後可以得出方程式如下：

$$\frac{1 - F_n}{1 - \rho F_n} = e^{-\omega k_1 t} \quad (17)$$

將方程式(17)取自然對數後所得方程式如下：

$$\ln\left(\frac{1-F_n}{1-\rho F_n}\right) = -k_1\omega t \quad (18)$$

其中所需要的參數計算為： $\omega = \sqrt{([\text{MB}_0] + [\text{T}_0] + K_{12})^2 - 4[\text{MB}_0][\text{T}_0]}$ 、 $\rho = ([\text{MB}\cdot\text{T}]_{eq})^2/[\text{MB}_0][\text{T}_0]$ 、 $[\text{MB}\cdot\text{T}]_{eq} = ([\text{MB}_0] + [\text{T}_0] + K_{12} - \omega)/2$

藉由方程式(18)，將 $\ln\left(\frac{1-F_n}{1-\rho F_n}\right)$ 對時間作圖後即可得到線性曲線圖，其中線性曲線圖所得之斜率除以參數 ω 即為分子探針解折疊的速率常數 k_1 。

2.19 非對稱式聚合酶鏈鎖反應

非對稱式聚合酶鏈鎖反應原理是將特定的核酸片段進行單股擴增，用以此提升待測片段之濃度。本篇論文是選擇結核菌基因編碼中特有的高特异性插入序列 IS6110 及會表現出抗藥性單核苷酸多型性的 *rpoB* 基因序列進行單股片段的擴增。檢測樣品是由國家衛生研究院感染症與疫苗研究所杜鴻運博士的實驗室所提供；序列的模板來源有二，一是來自於結核性分枝桿菌的全基因核酸抽取液，包括藥敏性菌株 W06 以及抗藥性菌株 M24；二是直接以煮沸的未純化菌液為檢體，包括非結核性分枝桿菌 (Non-tuberculous mycobacteria, NTM) 中的 *M. avium*、*M. smegmatis*、*M. kansasii* 菌株與結核性分枝桿菌 W06 以及 M24 菌株。首先利用 NCBI/Primer-BLAST 的網頁軟體提供參考，設計出適當的前置引子 (forward primer) 和反置引子 (reverse primer)，設計的條件考量因素包含兩個引子的相對濃度的熔解溫度計算值不能大於 5 °C、單條引子的鳥嘌呤 (guanine) 及胞嘧啶 (cytosine) 含量以 40 至 60% 為宜、避免引子自身形成二級結構以及避免兩條引子形成互補等，藉以提高單股對雙股的擴增產物比例，最終所設計出來的引子其序列於表 2.3 所示，ISF/ISR、RF/RR。非對稱式聚合酶鏈鎖反應其條件組成如下，複製 IS6110 片段組成包含 1X Phusion GC Buffer、200 μM dNTP、4% DMSO、1 μM

ISF、0.2 μM ISR、40 ng的全基因核酸抽取液和0.8 U Phusion Hot Start II High-Fidelity DNA Polymerase，最後總體積為20 μL 。複製 *rpoB* 片段組成包含1X Phusion GC Buffer、200 μM dNTP、4% DMSO、1 μM RF、0.2 μM RR、40 ng的全基因核酸抽取液和0.8 U Phusion Hot Start II High-Fidelity DNA Polymerase，最後總體積為20 μL 。接著使用聚合酶鏈鎖反應儀進行模板擴增，步驟包括：

1. 溫度升到98 $^{\circ}\text{C}$ 維持2分鐘，
2. 在98 $^{\circ}\text{C}$ 維持10秒，
3. 溫度降回60.1 $^{\circ}\text{C}$ 維持30秒，
4. 溫度升到72 $^{\circ}\text{C}$ 維持30秒，
5. 將步驟2.至步驟4.進行70圈的循環，
6. 溫度降到4 $^{\circ}\text{C}$ 維持30秒後即完成IS6110與*rpoB*片段的擴增。最終非對稱式聚合酶連鎖反應的產物可以藉由聚丙烯酰胺凝膠電泳進行確認。

2.20 非對稱式聚合酶連鎖反應產物分析

利用動力學曲線實驗對非對稱式聚合酶連鎖反應產物進行分析。首先使用緩衝溶液 1X NEBuffer 2 (50 mM NaCl、10 mM Tris-HCl、10 mM MgCl_2 與 1 mM DTT) 分別回溶引子(PD)、輔助鏈(A27)與分子探針(mMB)。依照實驗需求設計組成，將反應物均勻混合並且分為 Mixture 1 以及 Mixture 2，其中 Mixture 1 的組成包含 PD/A27 與非對稱式聚合酶連鎖反應後的產物不同的組合，分別有 M24 (IS6110/*rpoB*)、W06 (IS6110/*rpoB*)、*M. avium* (IS6110/*rpoB*)、*M. smegmatis* (IS6110/*rpoB*) 以及 *M. kansasii* (IS6110/*rpoB*)，Mixture 2 的組成包含 mMB/dNTPs。每一混合液最終總體積皆為 40 μL ，A27 最終濃度為 0.2 μM ，PD 最終濃度為 0.1 μM ，mMB 最終濃度為 1 μM ，dNTPs 最終濃度為 200 μM ，KF 最終濃度為 0.05 U/ μL ，Nt.A1wI 最終濃度為 0.15 U/ μL 。接著使用即時偵測同步定量聚合酶連鎖反應儀(ABI Step-One)進行升溫及螢光偵測，反應分為兩個部份，第一部份分別將 Mixture 1 與 Mixture 2 反應，步驟包括：1. 溫度升到 95 $^{\circ}\text{C}$ 維持 3 分鐘，2. 溫度降至 37 $^{\circ}\text{C}$ 反應環境下維持 20 分鐘。第二部份為酵素參與 Mixture 1 與 Mixture 2 的反應，步驟包括：1. 取出 Mixture 2 並加入反應酵素 KF 與 Nt.A1wI，在 37 $^{\circ}\text{C}$ 反應環境

下維持 3 分鐘，2. 於上一步混合液中加入 Mixture 1，在 37 °C 反應環境下隨時間變化偵測螢光訊號，偵測時間為 60 分鐘。最後將所記錄的螢光訊號相對於時間做圖即可得到動力學曲線圖。



第三章 結果與討論

3.1 單核苷酸變異位點分析

利用輔助鏈與兩條目標序列雜合後，三股聚合物和分子探針傾向形成霍利迪交叉結構，分子探針莖部結構被解鏈而失去莖環結構，同時產出螢光，如圖 3.1 (A)。若目標序列(如圖 3.1 中的 analyte A)上有一單核苷酸變異位點，三股聚合物便沒有足夠的張力解折疊分子探針，使得霍利迪交叉結構無法穩定形成，造成沒有螢光訊號的產出，如圖 3.1 (B)。

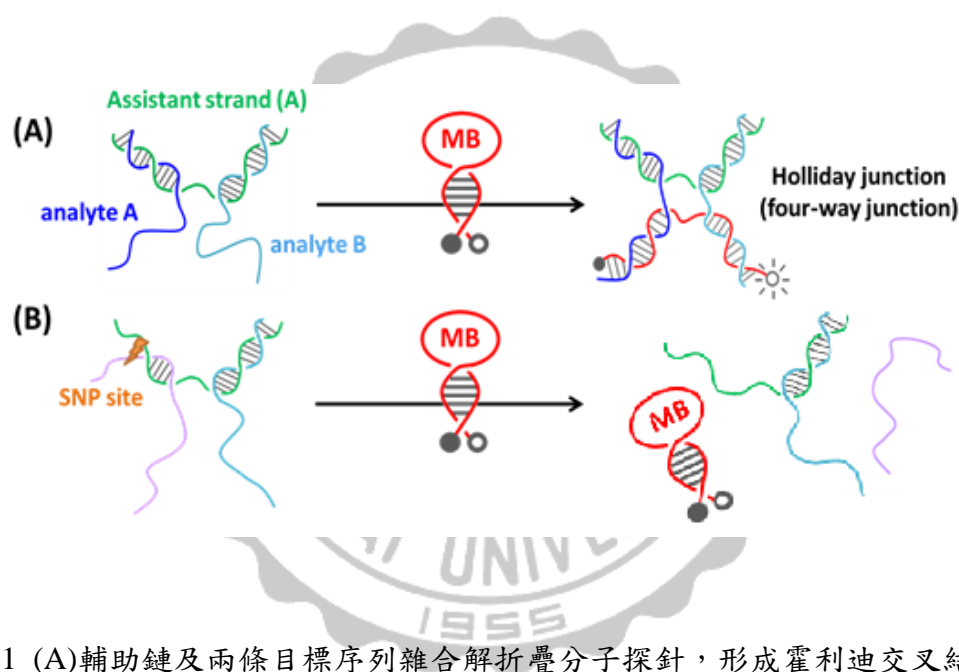


圖 3.1 (A)輔助鏈及兩條目標序列雜合解折疊分子探針，形成霍利迪交叉結構並釋放螢光訊號。(B)目標序列存在一個核苷酸變異，霍利迪交叉結構無法穩定形成，分子探針未解折疊放光。

為了達到同時偵測雙重目標序列，且其中一條序列帶有單核苷酸變異，首先探討霍利迪交叉結構經由單核苷酸變異後，產出訊號是否有明顯差異，我們利用熱熔解曲線圖的實驗進行研究。如圖 3.2 (A)所示，使用四條沒有生物學意義的核酸序列，將形成結構後的其中一點進行單核苷酸變異，如圖 3.2 (A)框框所示。熱熔解曲線實驗結果如圖 3.2 (B)所示，正方形曲線為結構完全互補，三角形曲線

有單核苷酸變異，可以發現螢光訊號值有明顯的降低，表示單一核苷酸的變異確實大幅度影響霍利迪交叉結構形成的穩定性。

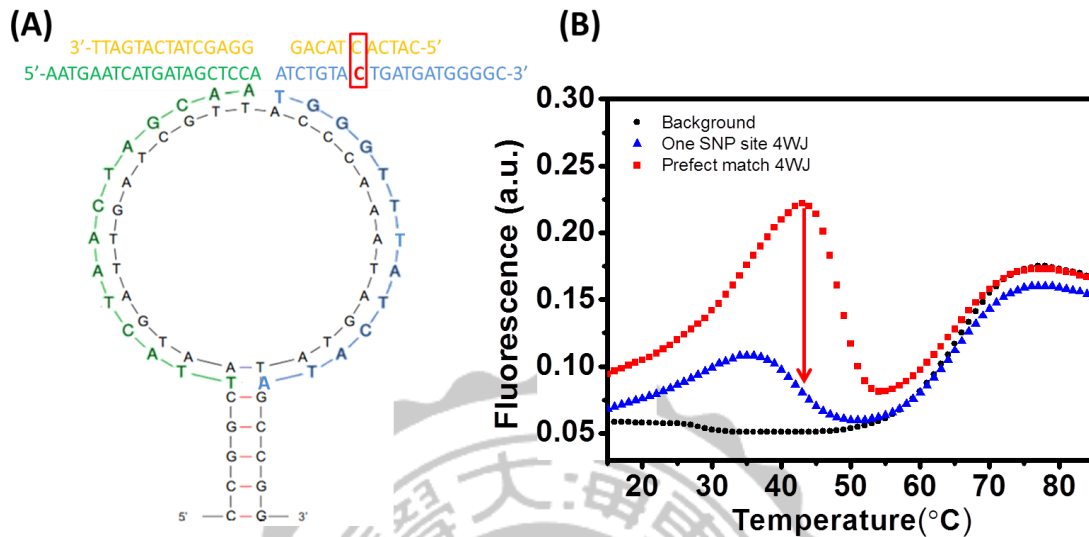


圖 3.2 (A)分子探針及單股核酸序列，紅色框顯示單一核苷酸變異(G→C)。(B) 完全互補(正方形)、存在單核苷酸變異(三角形)、及背景訊號(圓形)之熱熔解曲線圖。

接著探討變異位點對霍利迪交叉結構的影響，我們在霍利迪交叉結構中設計三處可能影響結構形成的位點，如圖 3.3 (A)所示，變異點分別位於輔助鏈與目標序列雜合中間處(I)、四股雜合交叉處(II)、以及目標序列與探針雜合中間處(III)。上述條件所得熱熔解曲線如圖 3.3 (B)所示，綠色曲線代表序列完全互補的結構，藍色曲線代表(III)，粉紅色曲線代表(II)，紅色曲線代表(I)；結果顯示，當變異點位於(III)，螢光訊號值下降最少，推測原因為三股聚合物仍穩定雜合，所以對於探針解折疊的影響差異較小；當變異點位於(II)，螢光訊號值明顯下降，原因為交叉處作用力變得較為鬆散，導致三股聚合物能解折疊探針的能力降低；當變異點位於(I)，螢光強度有最大的差異，原因為三股聚合物無法穩定雜合，沒有足夠

的張力使探針解折疊。

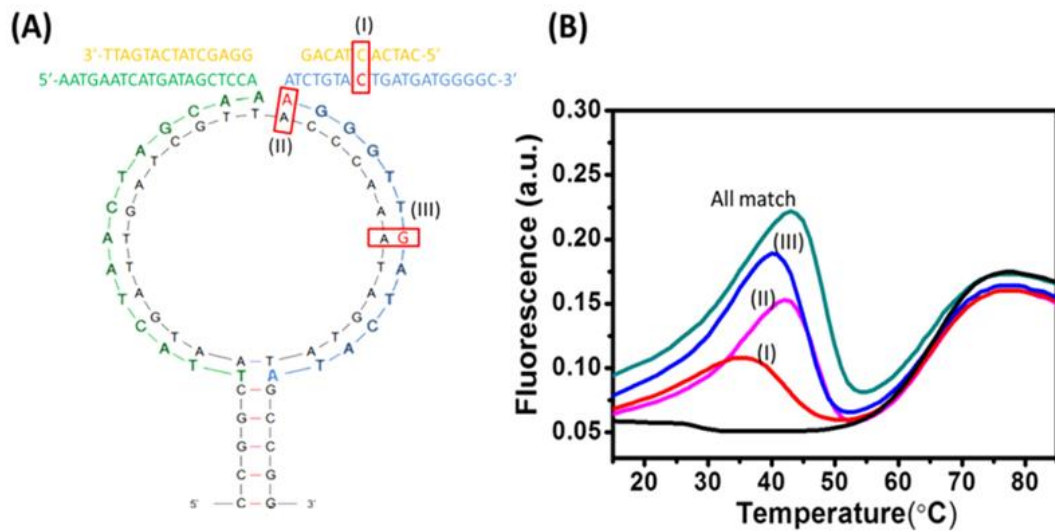


圖 3.3 (A)不同單核苷酸變異位點(I, II, III)於霍利迪交叉結構的分佈圖。(B)不同單核苷酸變異位置(I, II, III)與形成完全互補的霍利迪交叉結構的熱熔解曲線圖。

3.2 肺結核桿菌核酸序列設計

我們將上述研究結果應用於肺結核桿菌與其抗藥性的檢測機制設計，本研究在肺結核桿菌特有的重複性基因序列 *IS6110*，選出一段高特異性(specific)片段作為第一個待測目標序列，*IS6110* 基因於基因組中具有 1~19 個重覆單元，預期能夠提高感測靈敏度。另外一個目標片段挑選自 *rpoB* 基因，包含有第 531 位氨基酸(S531)的編碼序列，文獻已指出，對於一線抗生素表現出抗藥性的菌株，有最高比例在此位點上具有核酸變異。由於肺結核桿菌的基因序列組成含有高比例的鳥嘌呤(guanine)及胞嘧啶(cytosine)，上述挑選的目標 *IS6110* 片段及 *rpoB* 片段均自身折疊形成複雜的二級結構或是二聚體，增加機制設計以及檢測的困難度，如圖 3.4 所示。

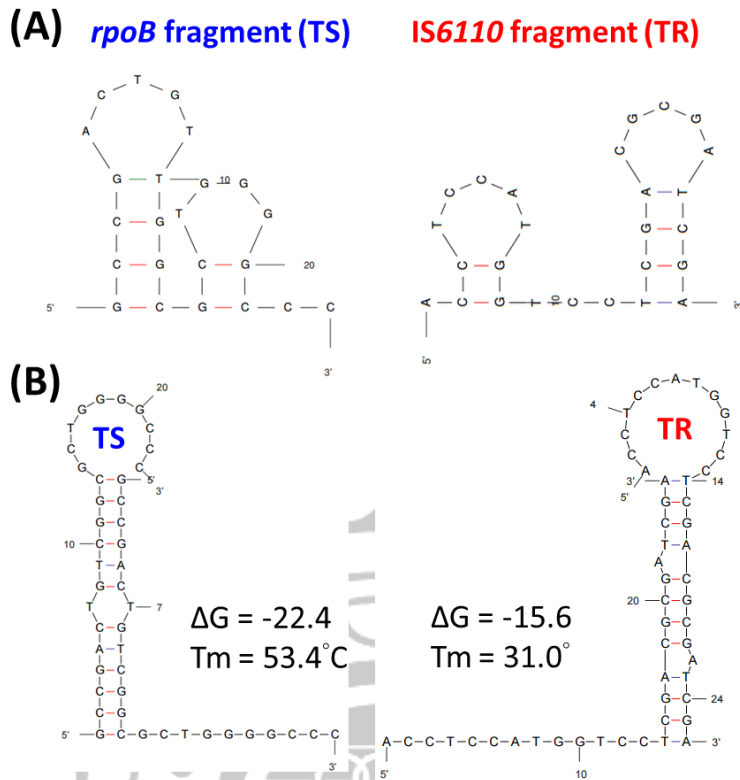


圖 3.4 (A)IS6110 片段(TR)以及 *rpoB* 片段(TS)自身形成結構。(B)序列 G-C pairs 較多，因此容易形成 TS-TS 以及 TR-TR 二聚體。

利用真實序列設計分子探針的考量因素，包括探針可能形成非莖環結構、交叉處未雜合核苷酸數目必需配合探針穩定度設計、任兩條序列含有非特异性互補、莖部緊臨修飾螢光分子的核苷酸不可為鳥嘌呤以避免螢光淬滅現象等。本研究選定偵測的基因序列片段，如表 2.3，雙重目標序列設計必需與輔助鏈和分子探針環上區域形成穩定的互補，以利穩定形成霍利迪交叉結構，同時要避免選用的互補片段可能存有除了 S531 以外的變異位點而造成輸出結果的誤判，在這些條件限制下，最終所選用的 *rpoB* 片段含有 23 個核苷酸，並且避開其餘可能有變異點的片段；IS6110 選用片段含有 26 個核苷酸，其中包含代表 IS6110 特异性片段的 21 個核苷酸組成。設計過程中亦採用 Mfold 等模擬軟體輔助研究，藉由模擬定

溫下雙股的自由能以及熔解溫度變化推測分子探針的解折疊情形。綜合上述考量因素，設計出的探針序列如圖 3.5，環區域有 16 個核苷酸、莖部有 5 對鹼基互補，由 Mfold 軟體預測得知探針的自由能為-2.58 kcal/mol、熔解溫度為 58.2 °C。

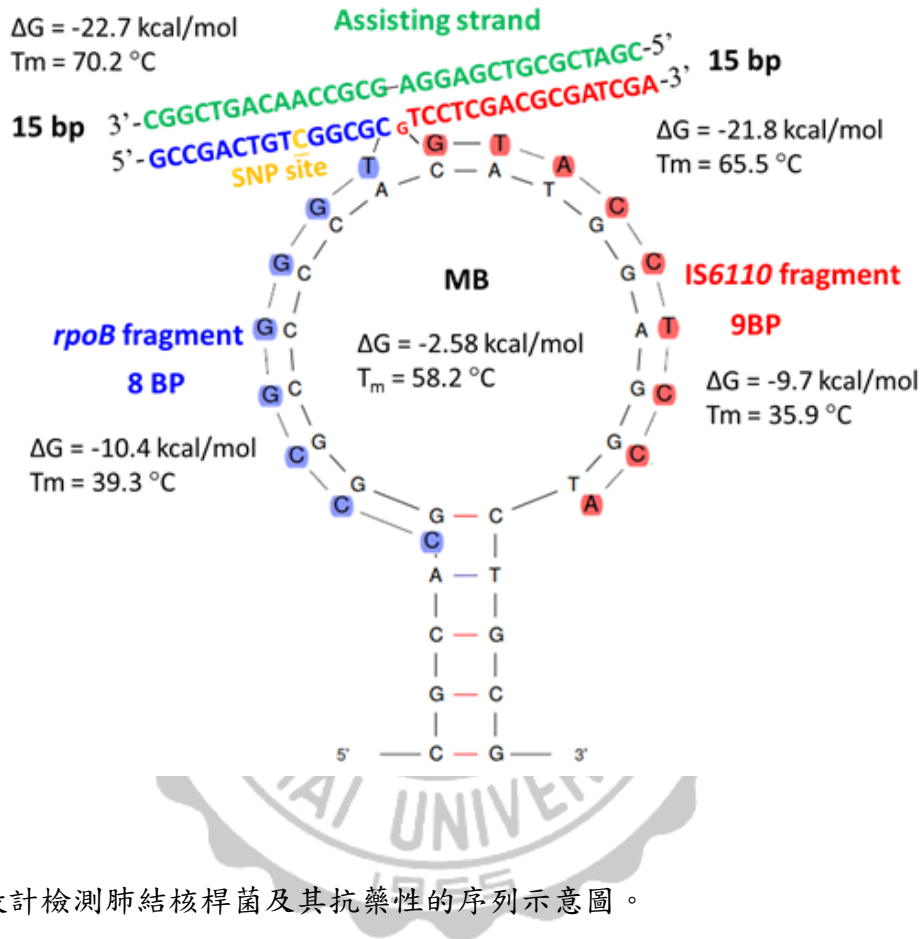


圖 3.5 設計檢測肺結核桿菌及其抗藥性的序列示意圖。

3.3 序列設計結果分析

為了確認分子探針是否成功設計以及有效辨認待測目標物，我們使用熱熔解曲線進行分析，如圖 3.6 所示，黑色曲線組成為 MB，紅色組成為 MB/A17/TR/TS2，其餘曲線組成只存在單條分析物或是缺少輔助鏈，實驗結果發現除了紅色曲線有明顯的螢光訊號產生之外，其餘組合皆沒有顯著的螢光訊號輸出，符合邏輯閘 AND 的分析概念。

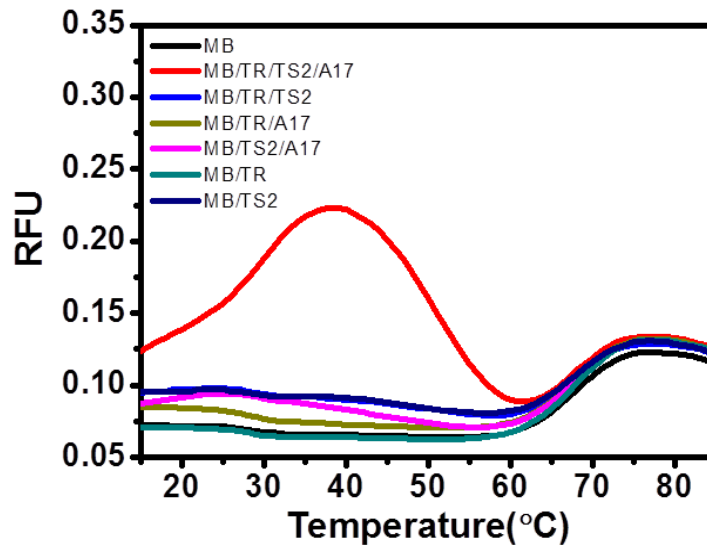


圖 3.6 輔助鏈、雙重目標物和分子探針共同存在下的熱熔解曲線圖。使用分子探針(MB)、輔助鏈(A17)、IS6110 片段(TR)和 *rpoB* 片段(TS2)的不同組合進行雜合。

分析圖 3.6 中紅色曲線，觀察到當溫度低於 25 °C 時，螢光訊號上升較為緩慢，推測可能原因有二：第一個原因為 TR 和 TS2 本身富含 G-C，因此低溫時傾向自身形成二聚體，第二個原因為在低溫時 MB 因為熱力學自身較穩定的關係故偏向形成莖環結構，從而導致 TR 和 TS2 無法完全有效的與 MB 進行雜合，而在 25~50 °C 由於 MB 自身結構穩定度下降，使得 TR 和 TS2 與 MB 之間的雜合能力提升，因此螢光訊號較為急劇的上升，其中在 37 °C 時的螢光強度到達最大值，而溫度在 38-62 °C 間螢光訊號的下降推測為 TR 和 TS2 與 MB 分離，經由 Mfold 軟體預測得知，TR 和 TS2 與 MB 之間的熔解溫度分別為 35.9 °C 和 39.3 °C，其結果與實驗值相符，當溫度高於 60 °C 時，由於 MB 的熱熔解溫度為 58.2 °C，因此溫度升高會使莖環結構產生解折疊，而形成無規則捲曲狀如黑色曲線。

3.4 分子邏輯閘的應用

我們進一步探討單核苷酸變異對於螢光訊號的影響，設計序列如圖 3.7 (A) 所示，將 TS2 與輔助鏈的互補數從原本設計的 15 個核苷酸降為 11 個核苷酸後，經由 Mfold 軟體預測得知，雙股的熔解溫度從 70.2 °C 降為 57.1 °C，而若結構上含有所設計的突變位點，雙股的熔解溫度將會從 57.1 °C 變為 38.6 °C，如此一來，我們推測原本因為輔助鏈的加入，而使雙重目標物產生足夠張力與分子探針雜合的能力將會失效，所形成的參股聚合物會因存在變異點而無法穩定雜合，沒有足夠的作用力使分子探針解折疊，因此沒有螢光訊號的產生。

上述設計藉由熱熔解曲線實驗進行分析，結果如圖 3.7 (B) 所示，正方形曲線為 MB，三角形曲線為 MB/TR/TS2/A23，圓形曲線為 MB/TR/TT2/A23，在有單鹼基錯配的情況下，螢光訊號輸出幾乎與背景訊號相似，只有完全互補的結構有明顯的螢光訊號輸出。聚丙烯胺凝膠電泳圖呼應此結果，如圖 3.7 (C) 所示，泳道 A 的組成為 HB/A13/TS2/TR，泳道 B 的組成為 HB/A13/TT2/TR，其中 A13 分別與兩分析物形成 15 對核苷酸的互補，以(15,15)為表示，泳道 C 的組成為 HB/A15/TS2/TR，泳道 D 的組成為 HB/A15/TT2/TR，其中 A15 分別與分析物形成(11,15)的互補，膠片圖指出，當輔助鏈與分析物形成 15 個互補時(泳道 A 與泳道 B)，因互補數足夠讓雙股穩定雜合，即使結構中存在單鹼基變異，並未影響霍利迪交叉結構的形成，霍利迪交叉結構顯示於分子量 100 鹼基對的位置，泳道 A 與泳道 B 的亮度幾乎沒有差異；當輔助鏈與分析物 TS2 的互補數降為 11 個核苷酸時(結果如泳道 C 與泳道 D)，泳道 C 因互補數減少而使得霍利迪交叉結構的穩定度下降，因此產物量比泳道 A 明顯減少，泳道 D 因互補數降低且結構中含有單鹼基變異，因此霍利迪交叉結構無法形成，由圖中相對應位置發現沒有產物出現。

上述實驗結果說明，我們已初步設計出符合結核病及其抗藥性偵測的判讀機制，當霍利迪交叉結構中含有一個突變位點即可以完成分子邏輯閘 AND gate (1,0)

的輸出方式，清楚地回答檢體中是存在藥敏性型肺結核基因或是抗藥性型肺結核基因。

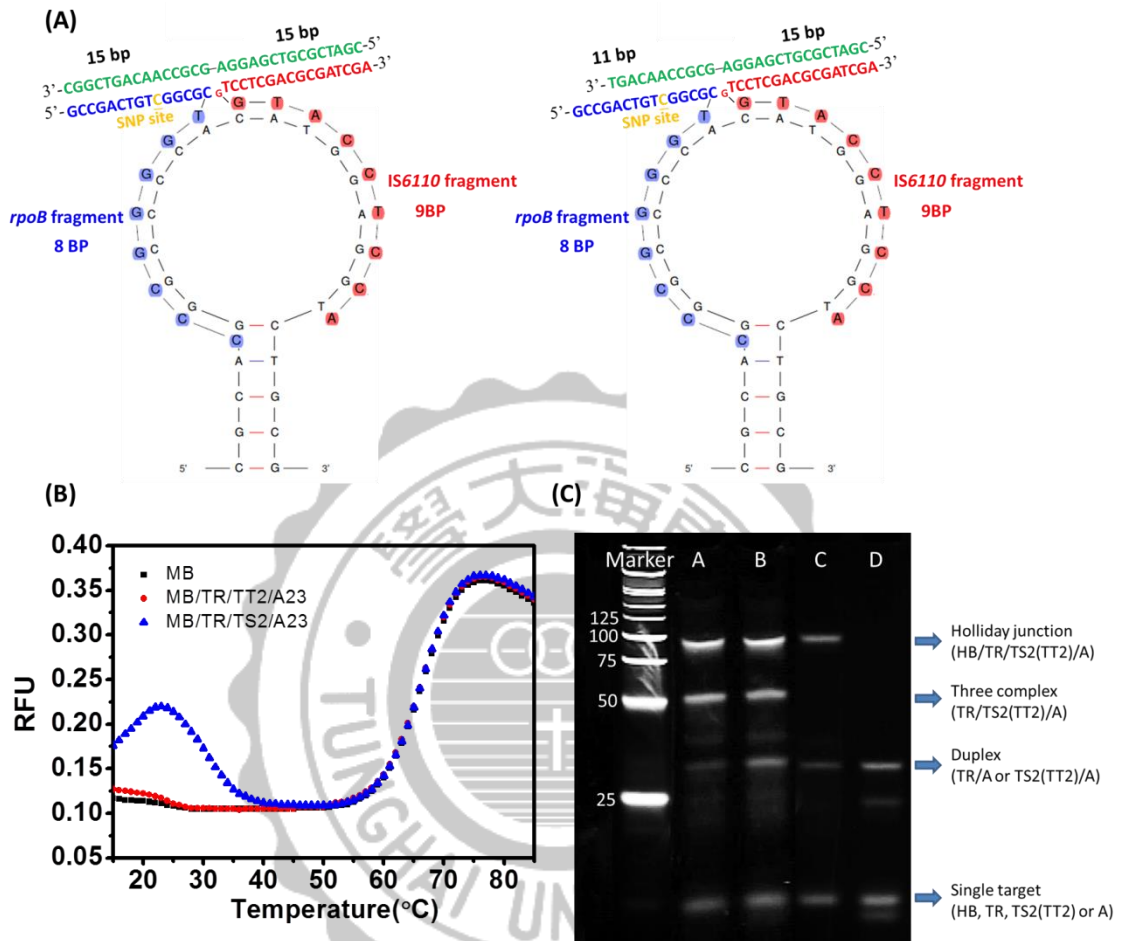


圖 3.7 (A)輔助鏈與目標分析物不同互補長度形成的霍利迪交叉結構序列圖。(B)含有單核苷酸變異的熱熔解曲線比較圖。(C)不同互補長度的凝膠電泳圖。

3.5 熱力學參數的測定

輔助鏈、雙重目標物、及分子探針間的互補雜合與分離乃是熱力學的平衡反應，因此可藉由估算熱力學參數了解單核苷酸變異對於結構轉換(三種相態如圖 2.1 所示)的影響。

依照 2.16 中所推倒的公式計算平衡常數，結果顯示於表 3.1。 K_{23} 說明分子探針本身具有的特性，所以在有/無錯配鹼基的系統內此參數都一樣，其值為 4.40×10^{-3} 。 K_{12} 包含目標物參與反應的過程，從表中可以觀察到完全互補的系統其 K_{12} 值為 3.26×10^{-7} ，有單核苷酸變異的系統其 K_{12} 值為 3.97×10^{-6} ，完全互補的系統較傾向形成霍利迪交叉結構，因此得到較小的 K_{12} 值。

進一步探討熱力學狀態函數—熵變化(ΔS)與焓變化(ΔH)，由於分子探針在相態 2 至相態 3 之間從關閉到開啟的狀態是受溫度升高的影響，所以可以把目標物視為不存在的狀況，利用熱變性曲線圖得到分子探針的螢光曲線後，藉由 $R\ln((F - \beta)/(\gamma - F))$ 與熔解溫度倒數作圖可得一線性曲線，如圖 3.8 (A)，其中斜率和截距即為熱力學參數 ΔH_{23} 和 ΔS_{23} ，估算結果顯示於表 3.2。接著探討相態 1 至相態 2 之間的熱力學參數，利用不同濃度的雙重目標物分別與相對應濃度的輔助鏈以及分子探針進行雜合，並利用熱變性曲線圖得到不同濃度下的螢光曲線圖，藉由 $R\ln([T_0]-0.5[MB_0])$ 與熔解溫度倒數作圖可得一線性曲線，如圖 3.8 (B) 所示，其中斜率和截距即為熱力學參數 ΔH_{12} 和 ΔS_{12} ，如表 3.3。

表 3.1 完全互補與單一核苷酸變異系統平衡常數。

	K_{23}	K_{12}
A27/TR/TS (Matched)	4.40×10^{-3}	3.26×10^{-7}
A27/TR/TT (Mismatched)	4.40×10^{-3}	3.97×10^{-6}

表 3.2 分子探針於相態 2 至相態 3 之間的熵變化和焓變化。

	ΔH_{23} (kJ/mol)	ΔS_{23} (J/mol·K)
MB	76	228

表 3.3 系統於相態 1 至相態 2 之間的熵變化和焓變化。

	ΔH_{12} (kJ/mol)	ΔS_{12} (J/mol·K)
A27/TR/TS (Matched)	382	1103
A27/TR/TT (Mismatched)	256	719

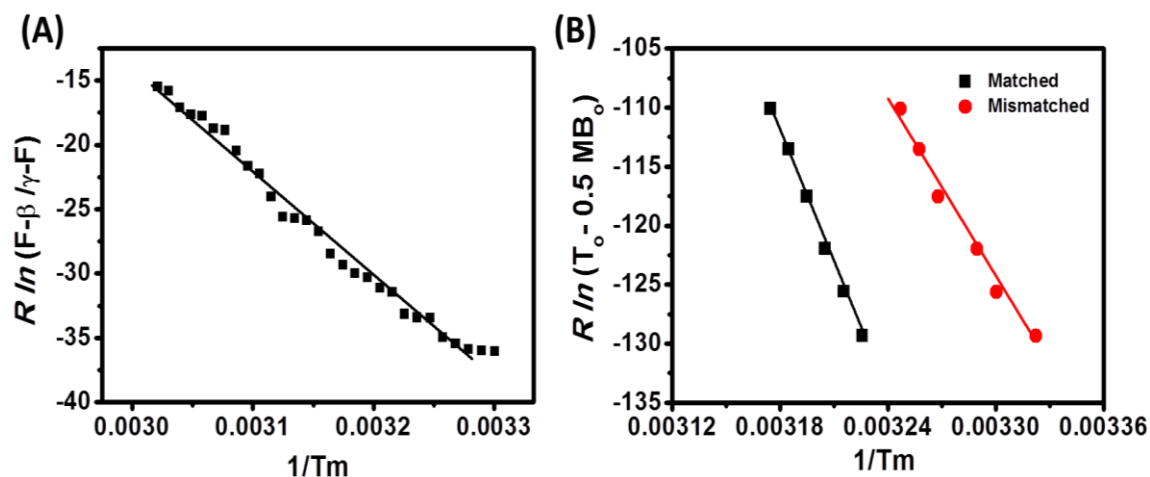


圖 3.8 熱力學參數測量圖。(A) $R \ln((F - \beta)/(\gamma - F))$ 與熔解溫度倒數關係圖。(B) $R \ln([T_0] - 0.5[MB_0])$ 與熔解溫度倒數關係圖，其中分子探針濃度為 $0.05 \mu\text{M}$ ，輔助鏈與雙重目標物濃度分別為 $0.2, 0.3, 0.45, 0.75, 1.2, 1.8 \mu\text{M}$ ，方框為完全互補之構型，圓框為有錯配鹼基之構型。

藉由上述結果所得到的焓數值與熵數值帶入吉布斯自由能(Gibbs Free Energy)的公式計算求得三相態的自由能變化(ΔG)，用以觀察分子探針與目標物在升溫過程中於三個相態的轉換並且探討系統在不同溫度下的生成傾向。

將反應方程式對溫度變化作圖結果可以得到三相態間的自由能關係圖，如圖 3.9 (B)所示，反應會傾向自由能越負的方向進行，因此將溫度對應 ΔG 圖數值結果，數值越負表示此溫度下相對應相態較穩定形成。將圖 3.9 (B)對應圖 3.9 (A)的熱熔解曲線圖進行討論， ΔG_1 與 ΔG_2 的交點可以用勒沙特列原理來解釋，表示此時相態 1 與相態 2 之間的狀態為 $[MB \cdot T] = [MB_{\text{closed}}]$ ，因此交點對應的溫度即為熔解溫度 T_m 值，同理解釋 ΔG_2 與 ΔG_3 的交點。於完全互補的系統中， $\Delta G_{1\text{matched}}$ 與 ΔG_2 交點對應溫度為 44.5°C ， ΔG_2 與 ΔG_3 交點對應溫度為 60.3°C ，表示在 44.5°C 以前反應傾向處於相態 1 目標物與探針雜合，在 44.5°C 到 60.3°C 之間反應傾向相態 2 目標物與探針解離，在 60.3°C 以後反應傾向相態 3 探針受高溫影響

而呈現無規則捲曲。在有錯配鹼基的系統中， $\Delta G_{1\text{mismatched}}$ 與 ΔG_2 交點對應溫度為 39.6°C ，表示在 39.6°C 以前反應傾向處於相態 1 目標物與探針雜合，在 39.6°C 到 60.3°C 之間反應傾向相態 2 目標物與探針解離，在 60.3°C 以後反應傾向相態 3 探針受高溫影響而呈現無規則捲曲。

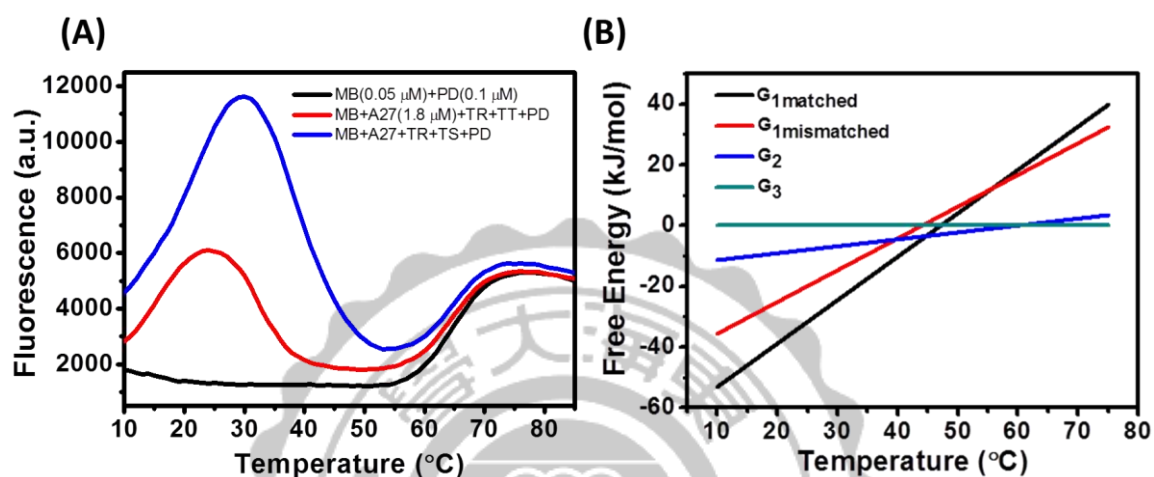


圖 3.9 (A) 熱熔解曲線圖。黑色曲線組成為 MB，紅色曲線組成為 MB/A27/TR/TT，藍色曲線組成為 MB/A27/TR/TS。(B) 三相態間的自由能關係圖。 $\Delta G_{1\text{matched}}$ 表示完全互補之構型於相態 1 時的自由能； $\Delta G_{1\text{mismatched}}$ 表示有錯配鹼基之構型於相態 1 時的自由能； ΔG_2 表示於相態 2 時的自由能； ΔG_3 表示於相態 3 時的自由能。

藉由自由能關係圖的結果可以說明選擇反應溫度介於 39.6°C 到 44.5°C 之間時預期可以符合 AND 邏輯閘(1,0)的機制運算，有效地區分完全互補與有錯配鹼基之構型，此結果將應用於之後定溫實驗的溫度選擇依據。

3.6 層級式應答的分析方法

雖然邏輯閘 AND gate 可以成功分辨目標基因是否含有抗藥性基因，但是無法指出不具抗藥性的肺結核，為了符合實際需求，本研究提出層級式應答的分析

方法，將邏輯閘二位元(1 或 0)的訊號輸出型式，改良成三位元層級式應答(1 或 1/2 或 0)。

我們利用調控輔助鏈與目標分析物的互補對數，進而影響霍利迪交叉結構因點突變造成雜合穩定度的差異，圖 3.10 顯示 9~13 個核苷酸互補數對於動力學曲線的影響，三角形曲線為不存在任何目標物的背景訊號，正方形曲線為核酸序列完全互補的情況，圓形曲線為核酸序列存在抗藥性的突變位點，當互補數為 13 時，突變已造成明顯的螢光訊號降低，互補數為 10 或更低時，則近似於二位元的輸出型式，互補數為 12 個核苷酸時，可表現出近似三位元輸出型式。

為了符合快速檢測的應用，我們取圖 3.10 中第 5 分鐘的螢光訊號並做比較，結果如圖 3.11 所示， F_m 為完全互補序列的螢光強度， F_{mm} 表示突變序列的螢光強度， F_0 為背景訊號，互補數為 12 時應答訊號的比率為 48.99 %，明顯和互補數 13 的 81.56% 及互補數 11 的 12.96 % 有所區格，證實調控輔助鏈的互補長度可達成層級式應答的目標。

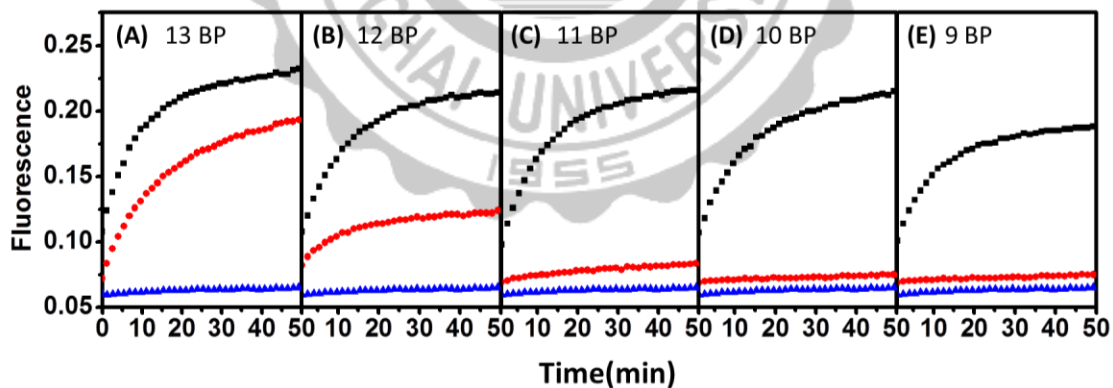


圖 3.10 動力學曲線圖，由(A)至(E)輔助鏈互補數分別為 13、12、11、10 以及 9。三角形曲線組成爲 MB、正方形曲線爲 MB/TR/TS2/A、圓形曲線爲 MB/TR/TT2/A。

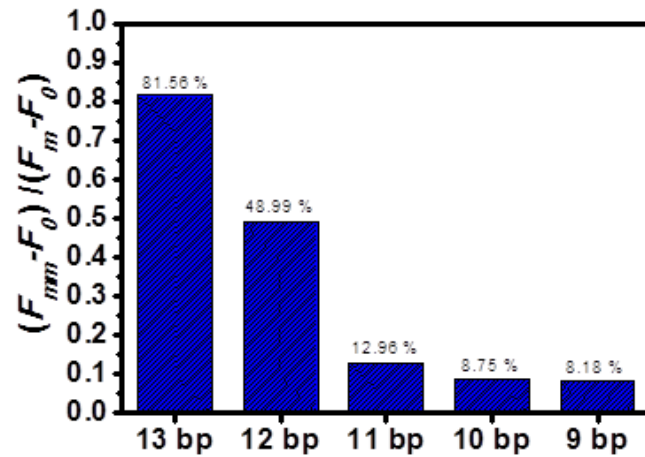


圖 3.11 螢光強度比率和輔助鏈互補數關係圖。

互補數為 12 的系統熱熔解曲線如圖 3.12 所示，代表序列完全互補的紅線(抗藥性肺結核菌)及代表序列具有單核酸未互補的藍線(藥敏性肺結核菌)，在 30~42 °C 範圍螢光值(扣除背景值)約呈現 2 倍，其它的條件組合所呈現的螢光雖然仍高於背景訊號(黑線)，但明顯低於藍線訊號。

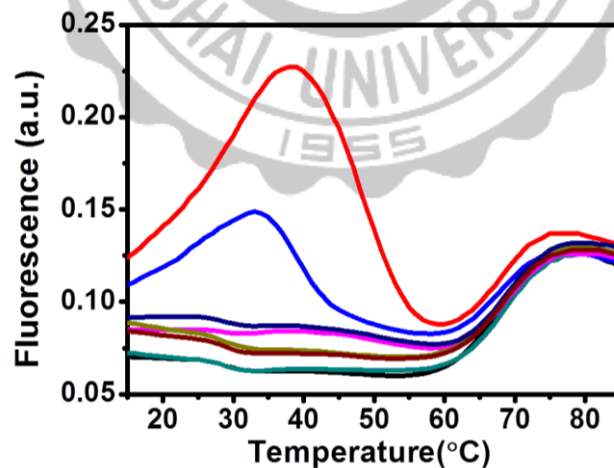


圖 3.12 輔助鏈互補數為 12 的系統熱熔解曲線圖。黑色曲線只有 MB，紅色曲線包含 MB/A21/TR/TS2，藍色曲線包含 MB/A21/TR/TT2，其餘組合為只存在輔助鏈或是只有單條分析物片段。

3.7 雙酵素參與的擴增機制

藉由三位元輸出的方式雖然可以釐清樣品中可能存在的情況，然而想要在有單核苷酸未互補的條件下，維持訊號輸出為完全互補序列的 1/2，卻會面臨分析物濃度限制的問題，如圖 3.13 所示，三角形曲線代表序列完全互補(抗藥性肺結核菌)，圓形曲線代表序列具有單核苷酸未互補(藥敏性肺結核菌)，當分析物濃度為 0.4 μM [圖 3.13 (C)]以下時，圓形曲線訊號趨近於背景訊號，三位元輸出機制即無法成立。

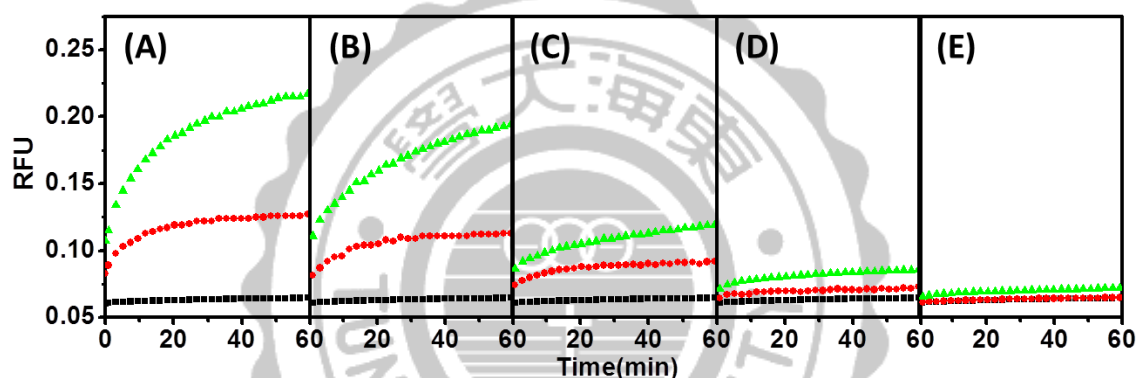


圖 3.13 動力學曲線圖，由(A)至(E)分析物濃度分別為 1.2、0.8、0.4、0.2 以及 0.05 μM 。正方形曲線組成為 MB、三角形曲線為 MB/TR/TS2/A21、圓形曲線為 MB/TR/TT2/A21。

為了符合實際應用的需求，可用於偵測更低濃度的待測基因，本研究設計雙酵素參與反應的二次循環擴增機制，希望達到同時偵測雙重目標物並且讓目標物循環釋出，進而擴增訊號、提升系統感測靈敏度。前述藉由圖 3.9 (B)的結果得知反應溫度介於 39.6 $^{\circ}\text{C}$ 到 44.5 $^{\circ}\text{C}$ 之間時，可用於完全分辨鹼基有無錯配，因此想要使單鹼基錯配達到 1/2，應當選用比 39.6 $^{\circ}\text{C}$ 低溫的條件，同時基於圖 3.12 結果，30~42 $^{\circ}\text{C}$ 範圍可呈現較佳的三位元輸出關係，最終我們選擇 30~39.6 $^{\circ}\text{C}$

的溫度範圍內可表現最高活性的鏈取代聚合酶 Klenow Fragment(KF)以及核酸內切酶 Nt.A1wI 進行反應。

感測及訊號擴增機制如圖 3.14，利用輔助鏈(A)以及分子探針(MB)辨認目標物 TR 和 TS，並確認同時存在 TR 和 TS 時才會使 MB 解折疊而形成霍利迪交叉結構，當霍利迪交叉結構有效的形成後，便能使具有莖環結構的 MB 展開呈現線性結構，此時引子(P)便會與呈線性的 MB 進行雜合，接著 KF 會以 MB 為模板進行合成作用，作用的過程會將原本雜合在 MB 上的 TR 和 TS 序列進行鏈取代反應而合成出雙股 DNA，此時被釋出的 A/TR/TS 複合物將會與剩餘的 MB 雜合進行下一圈擴增循環，進而持續產生雙股 DNA。

合成出的雙股 DNA 上面設計含有 Nt.A1wI 的特定辨認序列，當 Nt.A1wI 辨識到形成雙股狀態的此段序列便會進行切口(nicking)反應，同時 KF 會在切口的位點再次作用形成雙股而產生另外一次擴增循環，此循環中經鏈取代反應而產生的單股(NS)會與分子探針作用，也讓分子探針被解折疊(unfolding)後產生新的雙股片段。

此感測機制的訊號來自 MB 上螢光基團與淬滅基團(quencher)分離而顯現螢光，當 MB 與互補序列作用形成雙股後，此時螢光基團與淬滅基團即會分離，因此當作用出來的雙股越多，螢光訊號也會增加，進而達到訊號擴增的效果。

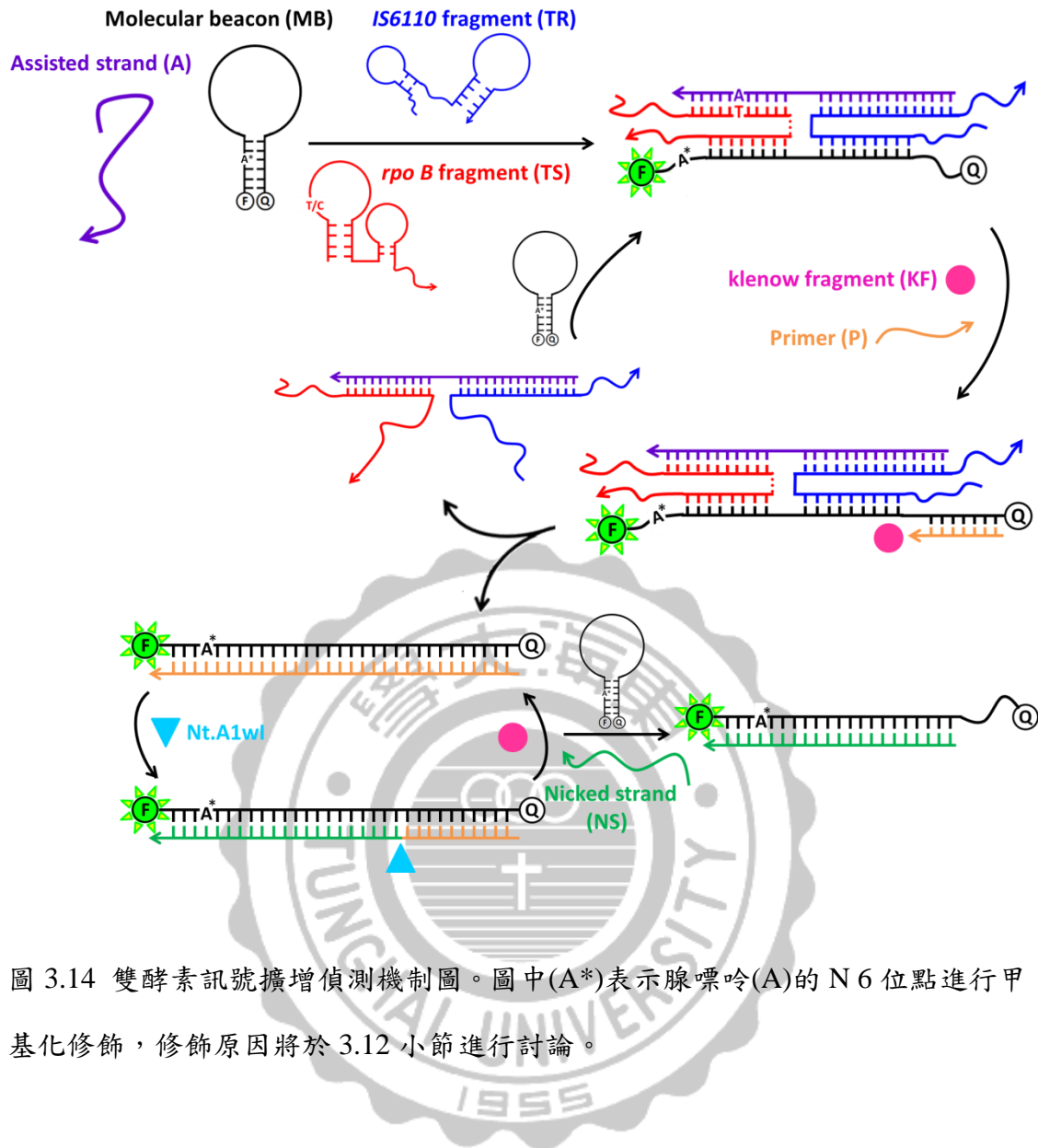


圖 3.14 雙酵素訊號擴增偵測機制圖。圖中(A*)表示腺嘌呤(A)的 N 6 位點進行甲基化修飾，修飾原因將於 3.12 小節進行討論。

3.8 酵素系統的探針設計

設計序列時，酵素參與的反應機制需要考慮切酶的特異性辨認序列，因此，以上述設計的分 子探針為基礎，設計與優化雙酵素參與反應所需要的分子探針，並以解離曲線微分圖進行探討。

如圖 3.15 (A)所示，HB 為未考慮擴增反應時所設計的分 子探針，HE、HF 以及 HG 為以 HB 為基礎，改變分子探針的莖部組成，加入切酶辨認序列及供引 子互補雜合，所形成的分子探針。

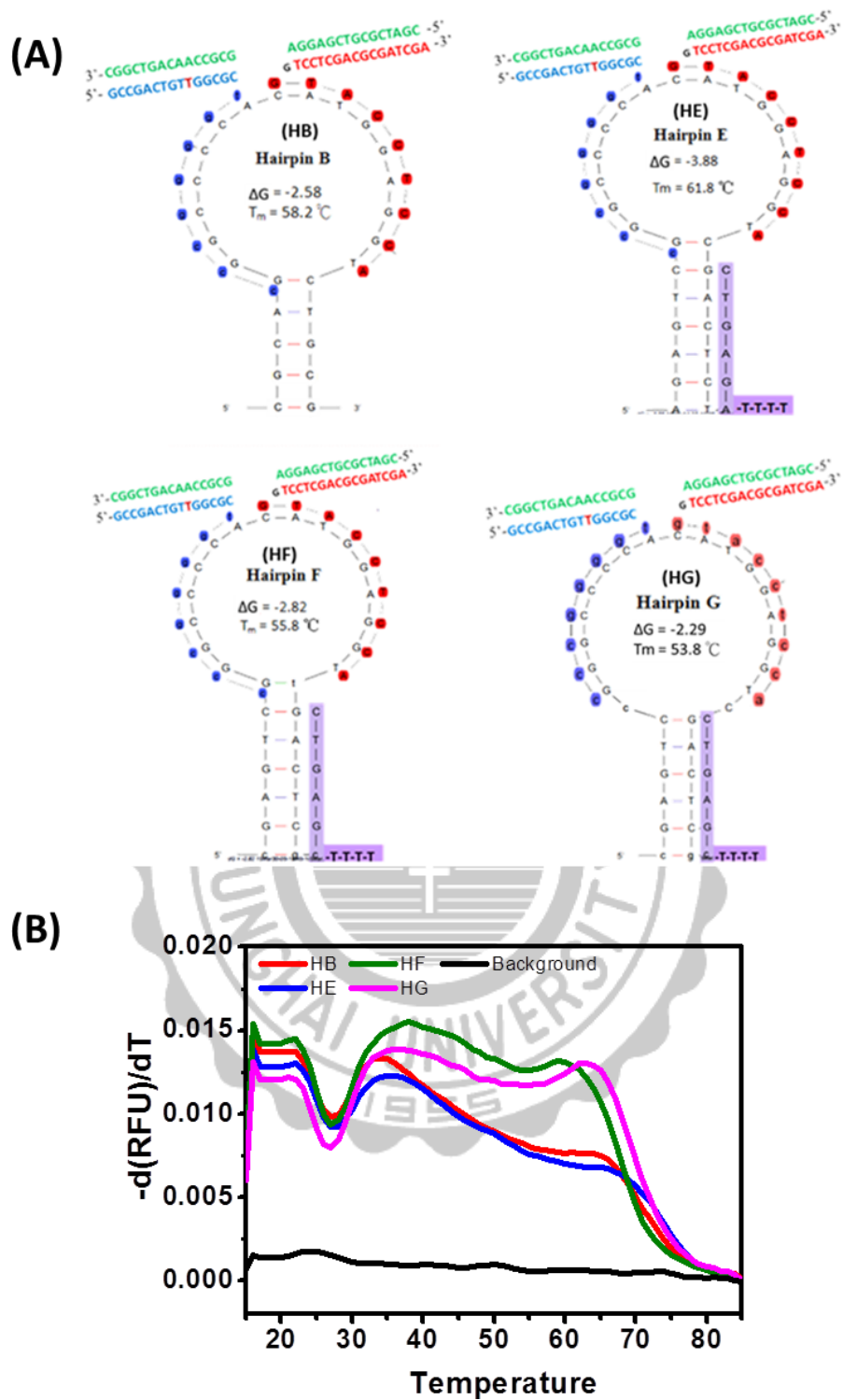


圖 3.15 (A)探針設計序列圖。HB 為未考慮使用酵素的髮夾探針，HE、HF 以及 HG 為參與酵素反應所設計的髮夾探針。(B)髮夾探針解離曲線微分圖。

利用染劑 Evagreen 嵌入(intercalate)雙股可產出螢光的特性，可估測四個髮夾探針的穩定性，將螢光訊號除以溫度作微分，結果如圖 3.15 (B)，第一個峰出現在 35 °C 左右，推論產生原因為除了髮夾結構以外的二級結構所造成，肺結核桿菌基因含有高比例的鳥嘌呤(guanine)以及胞嘧啶(cytosine)，因此依此序列所設計的探針易有分子內序列自我雜合現象，四個分子探針由於環狀序列大致相同，因此，峰皆出現在相同溫度。第二個峰出現於 60~70 °C，造成原因為莖部互補核鹼對的解離，出現最大峰值的溫度即為此髮夾探針的 T_m 值，四個髮夾探針的 T_m 值依序為 HE>HB>HG>HF，HE 的自身構型較穩定，可能導致目標物不易與其雜合而形成霍利迪交叉結構；HF 自身構型相較不穩定，容易在只有單條分析物的情況下即解折疊、釋出螢光；HG 與 HB 的 T_m 值較接近，預期形成霍利迪交叉結構的行為模式與 HB 較相近；因此，最終以 HG 為模型，同時設計輔助鏈、目標物與引子等序列，組成如圖 3.16。

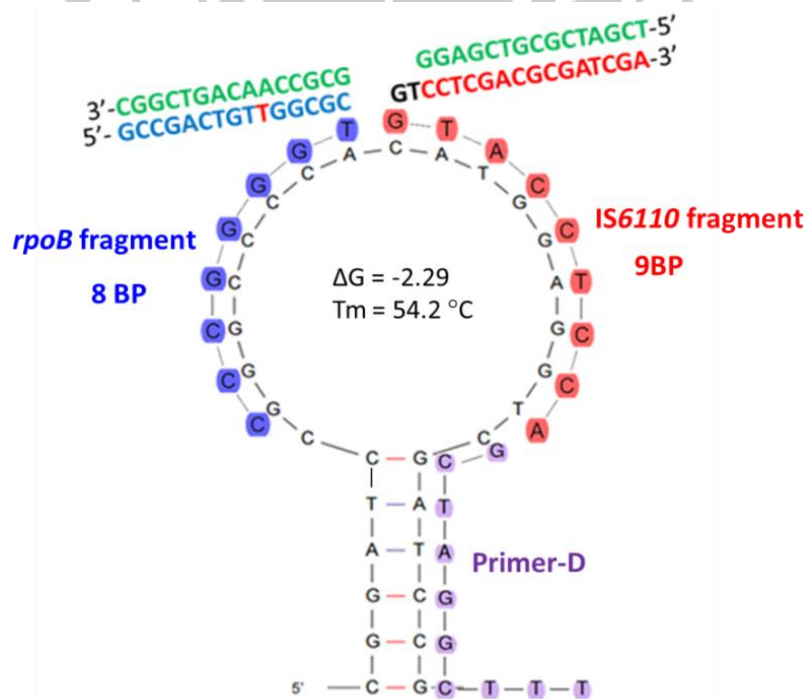


圖 3.16 酵素參與反應的系統所使用的序列及結構圖。

3.9 KF 系統的探討

我們逐步實現多酵素參與反應擴增信號系統，確認反應機制的確照我們所設計的方向進行，無自身非特異性黏合，造成假陽性訊號並擴增，又為了探討單一酵素對於訊號的貢獻程度，因此，先研究只含有 KF 的系統。

KF 參與擴增反應動力曲線圖如圖 3.17，在系統中，三角形曲線組成背景訊號 MB，正方形曲線組成包含 MB/A17/TR/TS，圓形曲線組成包含 MB/A17/TR/TS 並含有 3 mM 引子(P)及 0.25 U/ μ L KF，圓形曲線隨時間變化螢光值持續明顯上升，表示 KF 成功地造成 A/TR/TS 複合物的循環，持續與 MB 反應直到 MB 消耗殆盡。由圖 3.17 螢光值計算，第 5 分鐘時，加入酵素與未加入酵素的螢光值扣除背景值相除的結果為 3.8 倍，第 30 分鐘時可達到 8.5 倍。

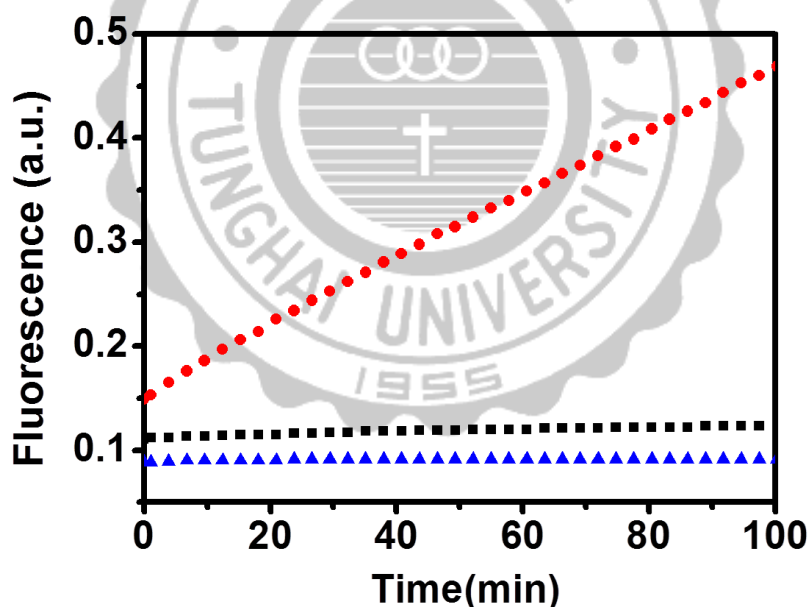


圖 3.17 KF 參與擴增反應動力曲線圖。三角形曲線組成為 MB(1 μ M)，正方形曲線組成包含 MB(1 μ M)/A17(0.2 μ M)/TR(40 nM)/TS(40 nM)，圓形曲線組成包含 MB(1 μ M)/A17(0.2 μ M)/TR(40 nM)/TS(40 nM)/P(3 mM)/KF(0.25 U/ μ L)。

3.10 KF 系統最佳化

偵測系統中各組成條件與主要成份的濃度皆可能影響最終訊號大小，因此，我們分別探討引子(P)互補長度、反應溫度、引子濃度以及酵素(KF)濃度對於螢光訊號的影響。

引子(P)會與呈線性的 MB 進行雜合，增加雜合的互補數有助於增加雜合效率，進而提升感測訊號，但互補數過高亦可能造成 P 和 MB 雜合後即解離莖部結構，產生假陽性訊號。圖 3.18 (A)顯示 3 種不同互補數所產生螢光值，由於互補數 8 明顯提升背景螢光，我們選擇 7 bp 為最佳引子與分子探針互補長度。

反應溫度對於核酸雜合反應及酵素活性均造成影響。圖 3.18 (B)指出系統於 37 °C 時螢光強度最大，推測原因為霍利迪交叉結構於 37 °C 時有最大螢光強度(圖 3.12)，KF 的產品資訊亦指出於 37 °C 時有最高催化活性，再者，霍利迪交叉結構於高溫時結構不穩定，因此 ΔF 值隨溫度升高而下降。

圖 3.18 (C)顯示引子濃度的影響，在 0.5 μM 到 3 μM 之間，螢光訊號隨濃度增加而變大，高於 2 μM 時，螢光值於飽和，引子濃度增大時與 MB 雜合的可能性提高，所以 ΔF 隨濃度增加而上升，但卻也同時增大背景訊號而降低信號雜訊比，結果如圖 3.18 (D)，最終我們選擇使用 1 μM 的引子濃度。

KF 濃度的影響如圖 3.18 (E)及(F)所示，螢光訊號隨 KF 濃度增加而變大，但信號雜訊比在 0.05 U/ μL 出現最大值，這可能是高濃度的 KF 導致背景訊號增大所致，最終選擇 0.05 U/ μL KF 繼續以下研究。

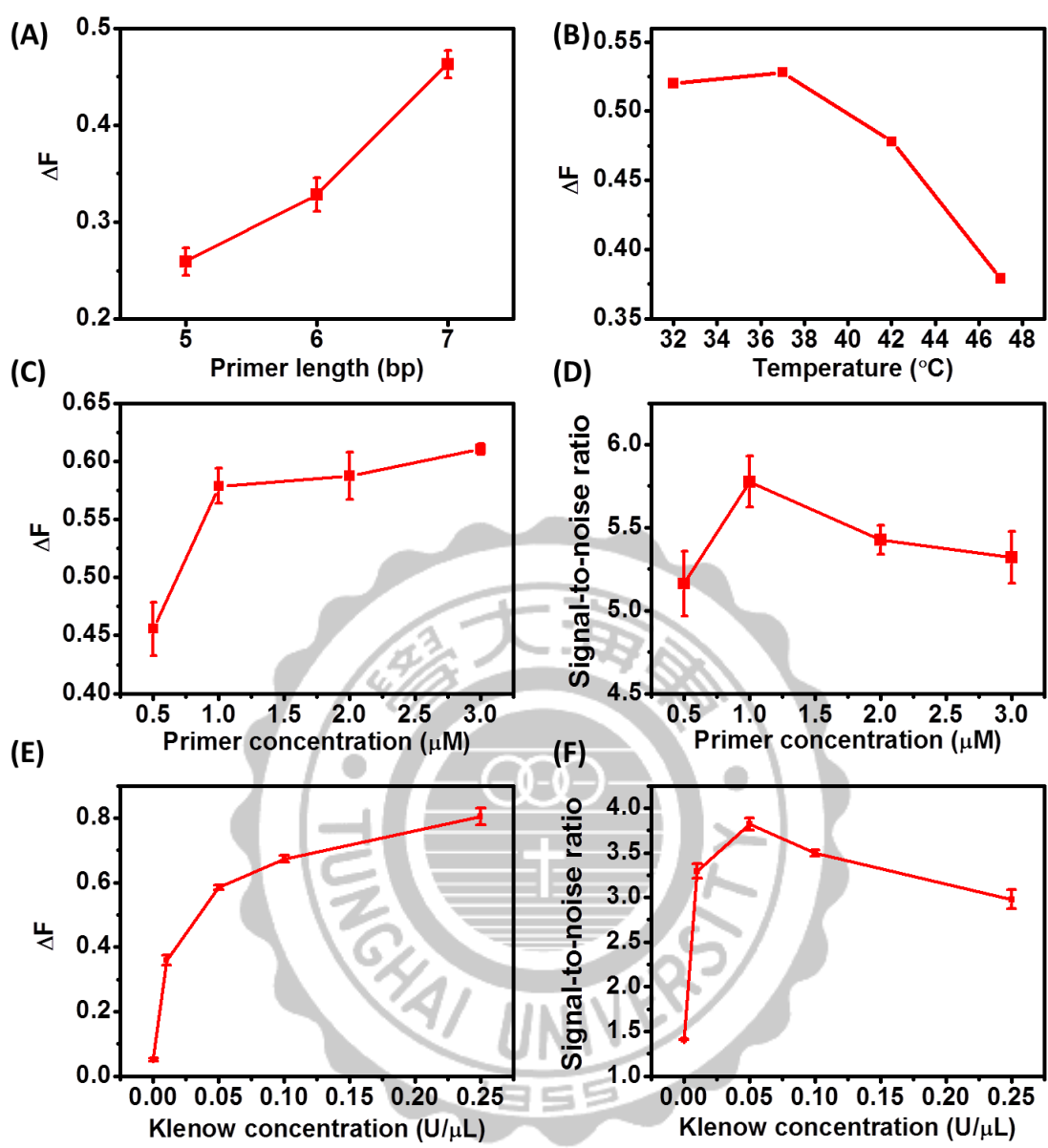


圖 3.18 KF 擴增系統條件最佳化。(A)引子互補長度的影響。(B)反應溫度的影響。(C, D)不同引子濃度的影響。(E, F)不同 KF 濃度的影響。

3.11 KF 系統的層級式應答

在含有 KF 的系統中，我們亦研究利用調控輔助鏈與目標分析物的互補數來達成層級式應答的目的，進行如圖 3.10 的動力學實驗，將不同互補長度的螢光訊號扣除背景值相除結果整理於圖 3.19，互補數 9~12 bp 的結果落於 40~60 % 之間，互補數 8 的結果約為 36 %，互補數 13 的結果則為 70 %，明顯有別於 50 %，指出於 KF 放大的系統中，9~12 個鹼基對的互補長度均可達成三位元式的應答。

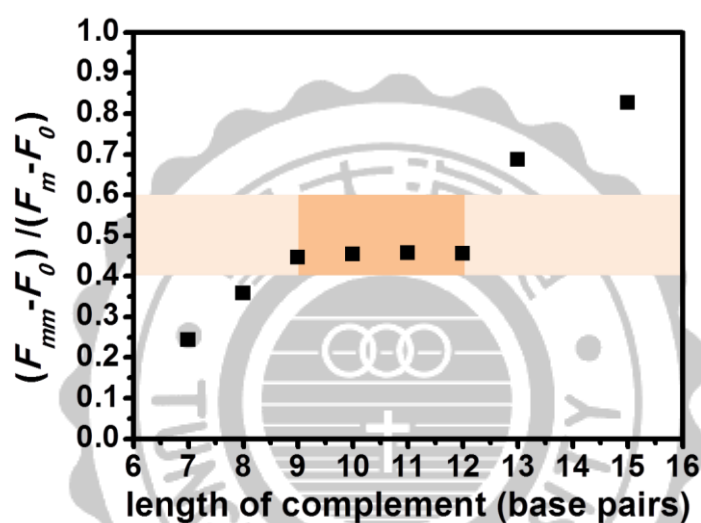


圖 3.19 螢光訊號比例和輔助鏈互補長度關係圖。 F_0 為不含雙重目標分析物(包含分子探針、輔助鏈、引子以及酵素 KF)的背景訊號值， F_m 為 F_0 組成外添加與輔助鏈完全互補的雙重目標物的螢光訊號值， F_{mm} 為 F_0 組成外添加與輔助鏈含單點突變的雙重目標物的螢光訊號值。

3.12 KF 與 Nt.A1wI 系統的探討

除了可以啟動第一圈擴增循環反應的 KF 以外，我們亦研究雙酵素 (KF+Nt.A1wI) 擴增系統，以便進行第二圈擴增循環反應。然而我們卻發現在只有 Nt.A1wI 存在下，即會造成 MB 輸出明顯螢光訊號，如圖 3.20 所示。

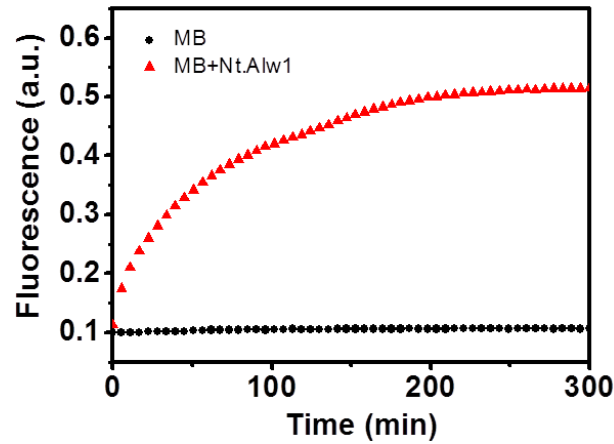


圖 3.20 分子探針於 Nt.A1wI 存在下螢光動力曲線圖。圓形曲線為 MB、三角形曲線為 MB+Nt.A1wI，操作溫度為 37 °C。

我們進一步研究發現，此分子探針序列亦會折疊成如圖 3.21 (B)的二級結構，此結構中含有類似 Nt.A1wI 辨識序列(5'-GGATCNNNNN-3'；其中 N 為任意核苷酸)的雙股(圖中以紅色表示)，因此造成切酶辨識錯誤而誤切分子探針(如圖中箭頭處)，進而產出螢光。

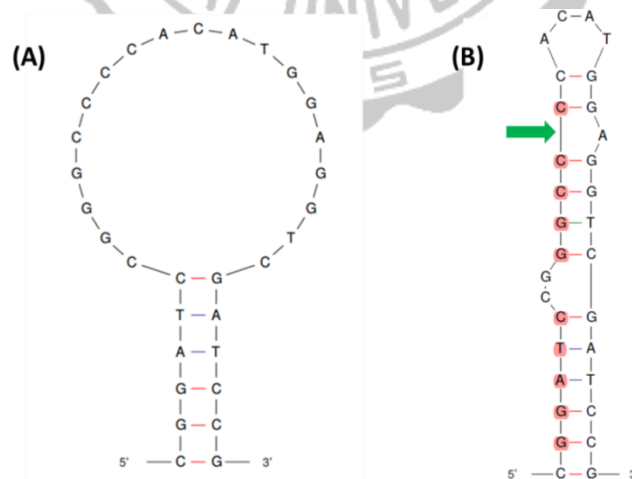


圖 3.21 相同序列片段經由 Mfold 軟體模擬可能形成不同的構型。(A)常規的髮夾結構。(B)複雜的二級結構。

基於上述的推論，我們提出的解法辦法是將連續序列 GGATC 中的 A 鹼基進行甲基化修飾，由於 Nt.A1wI 酵素存在 Dam 甲基化敏感的特性，一旦 A 鹼基進行甲基化修飾後，便能阻止 Nt.A1wI 進行辨識，進而抑制切口動作。利用螢光微分解離曲線分析經甲基化修飾的分子探針結果如圖 3.22 (A)，黑色曲線的組成為 HG，紅色曲線的組成為 mHG，藍色曲線的組成為 HG/Nt.A1wI，綠色曲線的組成為 mHG/Nt.A1wI，結果指出：第一，比較黑色與紅色曲線，發現第一個峰溫度 (~34 °C) 及第二個峰溫度 (~64 °C) 均相當接近，說明甲基化並未顯著影響分子探針的折疊結構；第二點，比較藍色與綠色曲線，HG/Nt.A1wI 因為發生切酶誤切反應，因此，代表著莖部結構的第二個峰已消失，相反地，mHG/Nt.A1wI 的曲線趨勢與 mHG 相同，第二個峰仍然存在，且位於相同溫度，證實甲基化修飾的髮夾探針可以成功避免 Nt.A1wI 的誤切反應。

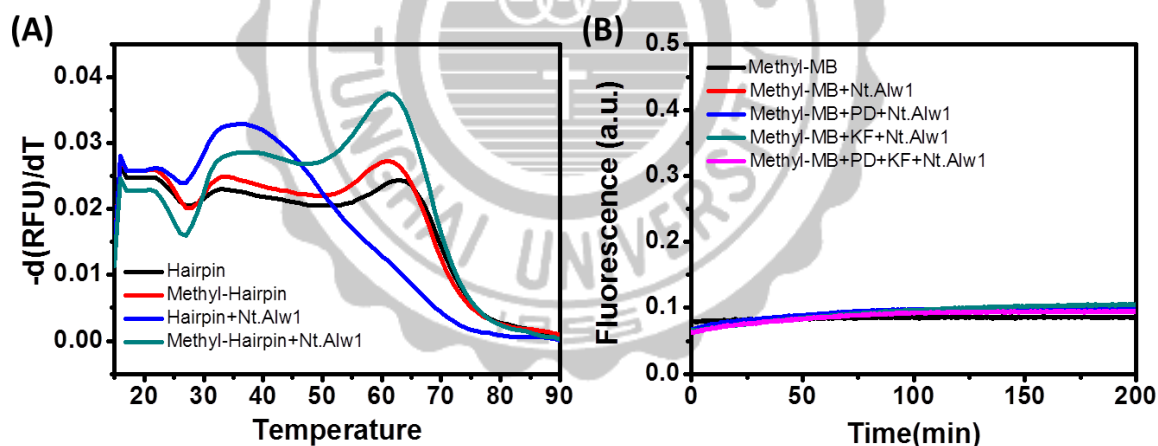


圖 3.22 (A) 甲基化分子探針螢光微分解離曲線圖。黑色曲線為原本設計的髮夾探針 HG，紅色曲線為經甲基化修飾的髮夾探針 mHG，藍色曲線的組成為 HG/Nt.A1wI，綠色曲線的組成為 mHG/Nt.A1wI。(B) 包含甲基化修飾的分子探針在不同組成下的動力學曲線圖。五條曲線的組成分別為 mMB、mMB/Nt.A1wI、mMB/PD/Nt.A1wI、mMB/KF/Nt.A1wI、mMB/PD/KF/Nt.A1wI。

接著我們以甲基化修飾的分子探針(mMB)的動力學曲線圖進行測試。結果如圖 3.22 (B)，有別於圖 3.20 的紅色曲線螢光訊號隨時間不斷增加，各條件下的螢光訊號均接近分子探針背景訊號，表示在沒有分析物的存在下，任何組成條件下分子探針均能穩定存在。

證實解決 Nt.A1wI 誤切分子探針後，我們以動力學曲線圖探討雙酵素造成的放大效益，結果如圖 3.23 (A)，黑色曲線組成包含 mMB、A17 與 PD，粉色曲線組成包含 mMB、A17、PD、TR 與 TS，綠色曲線組成為粉色曲線組成以外加上 Nt.A1wI，藍色曲線組成為粉色曲線組成以外加上 KF，紅色曲線組成為粉色曲線組成以外加上 KF 以及 Nt.A1wI。比較粉色、藍色以及紅色曲線可以發現，單一個酵素 KF 即可以使螢光值有明顯提升，而 KF+Nt.A1wI 同時作用下，訊號值大幅增加。結果說明反應如設計機制的方向進行，將反應第 300 分鐘的訊號值扣除背景值，單酵素(KF)比不含酵素(w/o)訊號增加 13 倍，雙酵素(KF+Nt.A1wI)比不含酵素(w/o)訊號增加 64 倍。

我們亦使用聚丙烯酰胺凝膠電泳圖證實機制的正確性，圖 3.23 (A)中各條件所形成的產物，相對電泳圖如圖 3.23 (B)所示，首先觀察模板 mMB 的變化量，泳道 A 因無產物生成，因此未有模板消耗；泳道 B 以及泳道 C 相對應在 75-100 鹼基對之間有霍利迪交叉結構的產物形成，因此 mMB 的表達量明顯減少；泳道 D 由於有 KF 參與反應，因此依照模板長度可以推測出所合成的雙股產物位置在 31 鹼基對，此時模板 mMB 幾乎被消耗盡；泳道 E 含有 KF 與 Nt.A1wI 參與反應，因此產物包含單股的切口鏈以及在 21 鹼基對所對應的切口鏈與 mMB 形成之雙股產物，此時模板 mMB 同樣已幾乎耗盡。進一步分析各產物帶的明亮程度，泳道 E 中的雙股產物與單股切口鏈的表達量很明顯高於其餘泳道形成的產物，表示系統有效地藉由雙酵素參與反應後，讓目標物釋出循環，並且合成出仿分析物序列的雙股產物，進而成功地提升系統檢測的靈敏度。

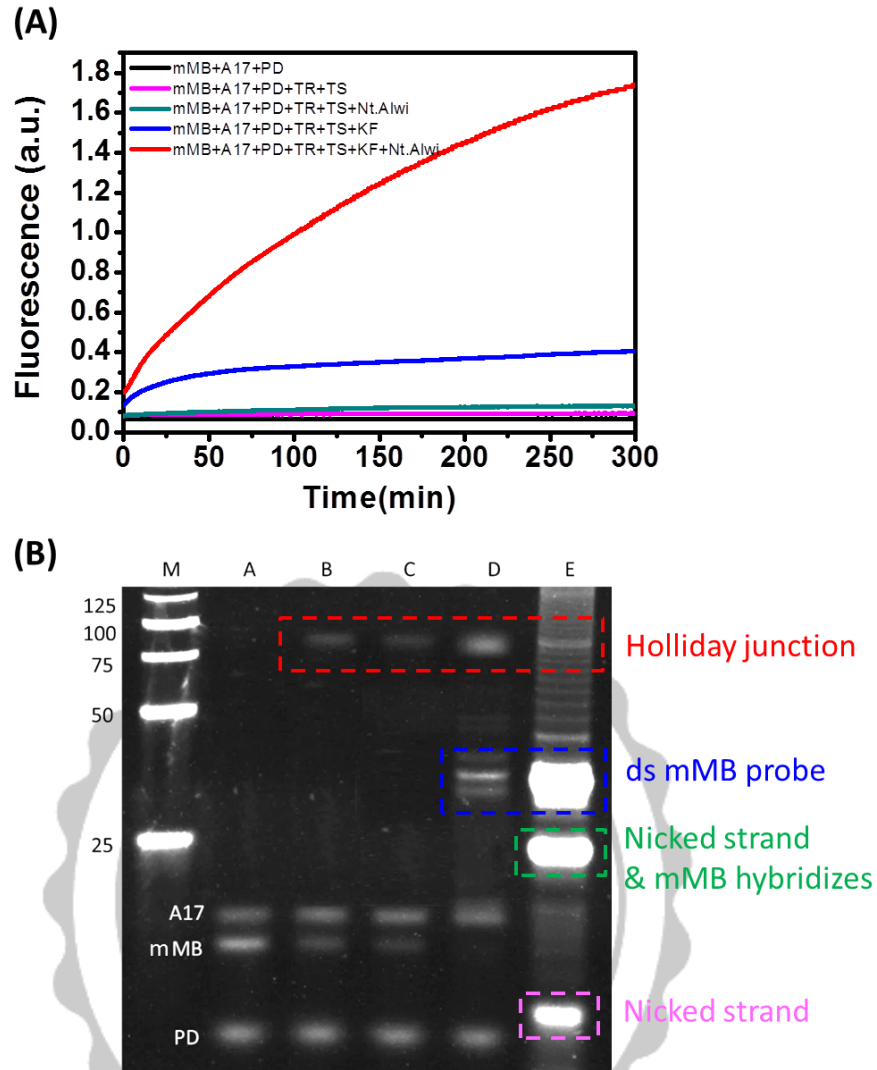


圖 3.23 雙酵素擴增反應動力學及產物膠片圖。(A)不同組成之動力學曲線圖。黑色曲線組成為 mMB/A17/PD，粉色曲線組成為 mMB/A17/PD/TR/TS，綠色曲線組成為 mMB/A17/PD/TR/TS/Nt.A1wi，藍色曲線組成為 mMB/A17/PD/TR/TS/KF，紅色曲線組成為 mMB/A17/PD/TR/TS/KF/Nt.A1wi，其中 mMB(1 μ M)、A17(0.1 μ M)、PD(1 μ M)、TR(0.1 μ M)、TS(0.1 μ M)、KF(0.05 U/ μ L)、Nt.A1wi(0.15 U/ μ L)。(B)為圖(A)曲線組成之聚丙烯酰胺凝膠電泳圖。泳道 A 對應黑色曲線組成，泳道 B 對應粉色曲線組成，泳道 C 對應綠色曲線組成，泳道 D 對應藍色曲線組成，泳道 E 對應紅色曲線組成，泳道 M 為 DNA 分子標記(單位為雙股鹼基對數目)。

3.13 KF 與 Nt.A1wI 系統最佳化

已知擴增系統內的反應組成條件與主要成份的濃度皆會影響最終訊號的產出，在此優化雙酵素參與的感測系統，分別探討引子濃度、探針濃度以及反應溫度。

藉由定溫偵測的動力學實驗探討不同的引子濃度，結果整理於圖 3.24 (A)，可以觀察到，雖然在 20 分鐘下不同濃度的引子所貢獻的信號皆沒有太大輸出，但隨著反應時間的增加， $1\ \mu\text{M}$ (mMB : P = 1 : 1) 與 $0.5\ \mu\text{M}$ (mMB : P = 2 : 1) 的引子開始有明顯的信號上升趨勢、 $0.1\ \mu\text{M}$ (mMB : P = 10 : 1) 的引子在反應近 60 分鐘才有些微的螢光信號、 $0.02\ \mu\text{M}$ (mMB : P = 1 : 50) 的引子不會隨時間變化影響螢光信號的產出。在此考量到引子是啟動鏈取代反應的關鍵，因此濃度太低可能導致放大效果不彰顯，對於感測應用，希望能在短時間內得到答案，因此考量系統放大效益與避免短時間內背景值造成的假陽性訊號的誤判，最終選擇 $0.1\ \mu\text{M}$ 的引子濃度。

在此系統中，mMB 持續消耗且有可能呈為限量試劑，最終訊號源亦是 mMB 解折疊後所產出的雙股產物，然而使用過多的 mMB 不但提高成本，更可能提升背景訊號，圖 3.24 (B) 顯示， $0.5\ \mu\text{M}$ 與 $1\ \mu\text{M}$ 造成的螢光增益效果較佳，而高於 $1\ \mu\text{M}$ 的趨勢變化量顯示濃度效應趨於飽和。我們也探討 mMB 濃度對於層級式應答的影響，針對 0.2 、 0.5 、 0.8 、 1.0 與 $1.5\ \mu\text{M}$ 的 mMB 濃度，其錯配結構與完全互補構型的螢光比值分別為 0.33 、 0.48 、 0.52 、 0.48 與 0.72 [圖 3.24 (B)]，說明 mMB 濃度過低 ($0.2\ \mu\text{M}$) 與過高 ($1.5\ \mu\text{M}$) 皆不利於達成層級式輸出，綜合以上考量，最後使用 $1\ \mu\text{M}$ 的 mMB 作為選擇。

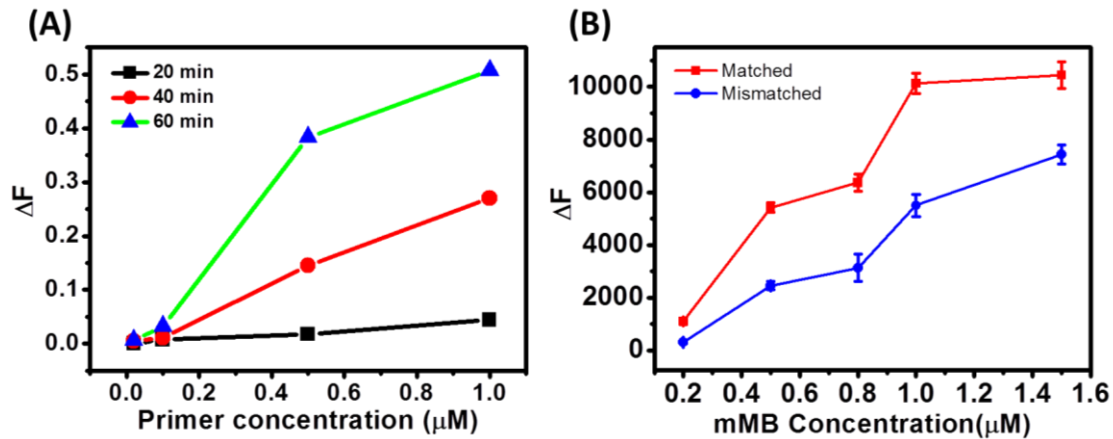
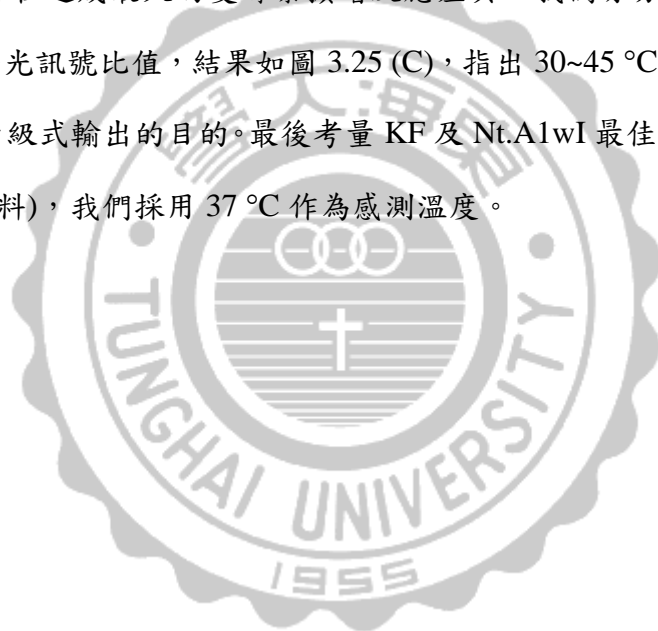


圖 3.24 雙酵素參與訊號擴增系統的最佳化。(A)引子濃度的影響，分別為 0.02 μM 、0.1 μM 、0.5 μM 和 1 μM 。其中 ΔF 即為 $F-F_0$ ， F_0 為 mMB， F 為 mMB+KF+Nt.A1wI+PD。(B) mMB 濃度的影響，分別為 0.2 μM 、0.5 μM 、0.8 μM 、1 μM 和 1.5 μM 。其中 ΔF 即為 $F-F_0$ ， F_0 為 mMB+A27+PD+KF+Nt.A1wI， F 為 mMB+A27+PD+KF+Nt.A1wI+TR+TS (或 TT)。

在沒有酵素參與的系統中，藉由自由能相圖[圖 3.9 (A)]已得知於 39.6 $^{\circ}\text{C}$ 到 44.5 $^{\circ}\text{C}$ 之間，此系統能有效區別完全互補與錯配鹼基之構型，然而，酵素催化活性受到溫度的影響，造成最終螢光訊號的產出相對複雜，因此，我們利用熱熔解曲線觀察螢光值隨溫度之變化，結果如圖 3.25 (A)，我們將此些曲線分成四個區間討論：10~30 $^{\circ}\text{C}$ 時，酵素活性因為低溫而非常低，所以溶液中的反應可視為沒有酵素存在下的反應，螢光訊號只受到核酸序列因溫度變化而雜合；30~47 $^{\circ}\text{C}$ 時，酵素展現活性並且明顯作用，因此可以看到斜率有較急遽上升的變化；47~65 $^{\circ}\text{C}$ 的溫度範圍內，酵素活性慢慢衰減甚至失活，不再繼續作用產生雙股，再者，當溫度到達 55~65 $^{\circ}\text{C}$ ，雙股也因為到達 T_m 值而開始解離，訊號因此降低；在 65 $^{\circ}\text{C}$ 之後，霍利迪交叉結構因為高溫影響而解折疊，因此訊號峰快速下降。

由圖 3.25 (A)的結果可以比較有雙酵素參與反應與沒有酵素參與反應時的差異，因此依照螢光的變化量對照圖 3.14 的反應機制，可以推測在 10~30 °C 的區域範圍內生成的產物為霍利迪交叉結構，而在 30~65 °C 左右，為酵素作用範圍，因此主要生成產物是以 mMB 為模板的雙股複合物，而雙股產物是擴增信號的來源，因此預期選擇在 30~65 °C 的溫度範圍內可以使感測機制有最佳效益。

我們進一步將螢光值對溫度微分，並將包含雙酵素的曲線值減去不含酵素的曲線值，結果如圖 3.25 (B)，Y 軸所得到的值即代表每個溫度下雙酵素所貢獻的螢光訊號，發現在 38 °C 左右，單核酸變異造成的差異最大，代表在此溫度下，單核酸變異的存在造成最大的雙酵素擴增反應差異。我們亦分析”含錯配鹼基”與”完全互補”螢光訊號比值，結果如圖 3.25 (C)，指出 30~45 °C 溫度範圍有較大機率可以達到層級式輸出的目的。最後考量 KF 及 Nt.A1wI 最佳活性溫度皆為 37 °C (根據產品資料)，我們採用 37 °C 作為感測溫度。



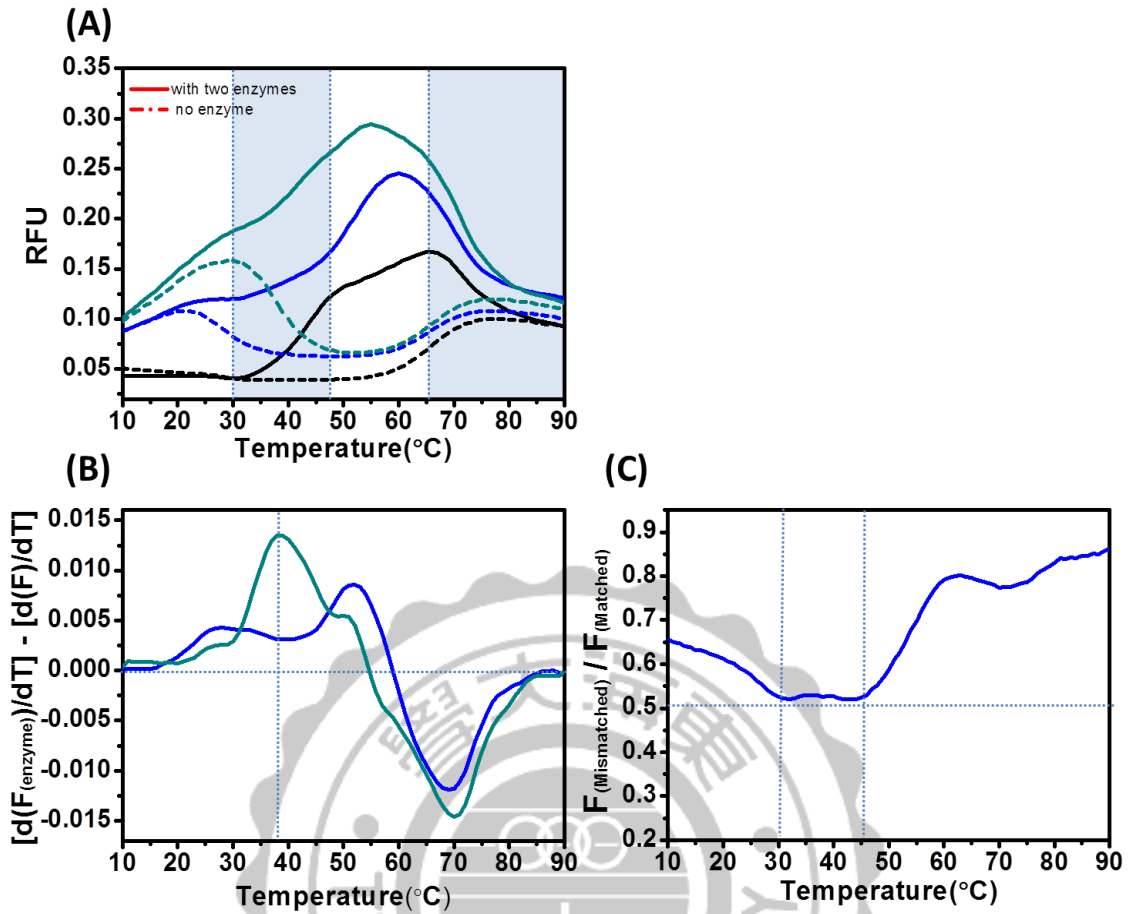


圖 3.25 雙酵素參與訊號擴增系統的溫度探討。(A)不含酵素(虛線)與包含雙酵素(實線)參與系統的熱溶解曲線圖。(B)螢光值對溫度微分後，包含雙酵素的曲線值與不含酵素的曲線值相扣結果。(C)包含雙酵素的系統下含錯配鹼基與完全互補的螢光曲線值相除結果。其中實線曲線為包含雙酵素參與的系統，虛線曲線為不含酵素參與的系統；黑色曲線的組成包含 mMB、A29 以及 PD；藍色曲線的組成包含 mMB、A29、PD、TR 以及 TT；綠色曲線的組成包含 mMB、A29、PD、TR 以及 TS。

3.14 KF 與 Nt.A1wI 系統的層級式應答

於前述沒有酵素的系統以及使用單個酵素的系統中皆已利用調控互補數有效地達到層級式(1,1/2,0)的輸出方式，良好得區分核酸屬於結核抗藥性、結核藥敏性或是不為結核菌基因片段。類似方法探討雙酵素擴增系統的結果如圖 3.26，若將 1/2 應答區域畫定在 45~55%，互補數 9~12 bp 會坐落於此範圍，此範圍和 KF 系統所得結果相同，說明原本的 KF 系統中加入 Nt.A1wI 後仍穩定作用，亦暗示 Nt.A1wI 並非此反應的速率決定步驟。

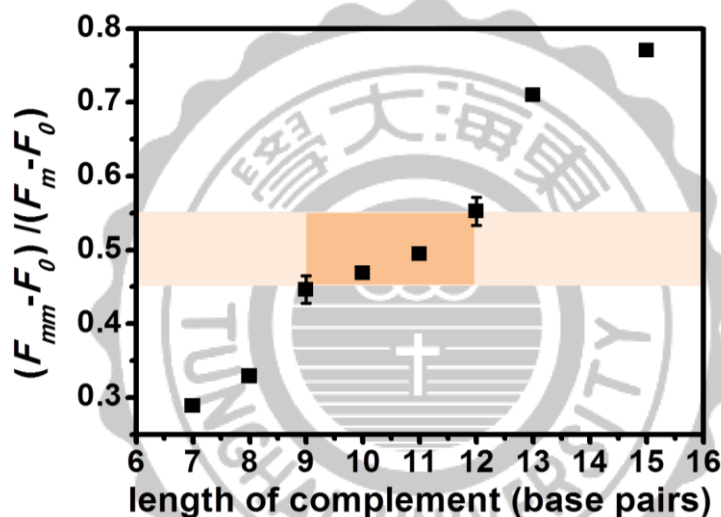


圖 3.26 雙酵素系統螢光訊號比例和互補長度關係圖。其中 F_0 為不含雙重目標分析物以外的背景訊號值，包含分子探針、輔助鏈、引子、KF 以及 Nt.A1wI， F_m 為 F_0 組成外添加與輔助鏈完全互補的雙重目標物的螢光訊號值， F_{mm} 為 F_0 組成外添加與輔助鏈含單點突變的雙重目標物的螢光訊號值。

3.15 層級式應答的偵測範圍

感測靈敏度為核酸感測器的重要指標，有別於文獻中其它系統，我們必需同時考量單核苷酸變異的訊號需落於 50% 附近，以動力學實驗進行測試，得到螢光

值相對於待測序列濃度關係圖如圖 3.27，將 1/2 應答畫定於 45~55 %，結果指出 0.3~120 nM 的待測序列濃度可使單核苷酸變異後螢光訊號落入 1/2 應答之中，濃度範圍橫跨三個數量級。此外，結果也發現較高濃度(大於 120 nM)以及較低濃度(小於 0.3 nM)的目標分析物比例會隨濃度變化呈線性關係，原因為有單核苷酸變異的目標物(TT)在此系統條件(1 μ M 分子探針、0.2 μ M 互補 11 bp 的輔助鏈、0.1 μ M 引子、0.05 U/ μ L KF 以及 0.15 U/ μ L Nt.A1wI)中，於高濃度時有較大的機會與探針雜合，因此鹼基錯配造成的效果較不明顯，而低濃度的目標物因為原本雜合效果即不佳，濃度低與探針作用的能力更為微弱，因此鹼基錯配造成的效果較明顯。

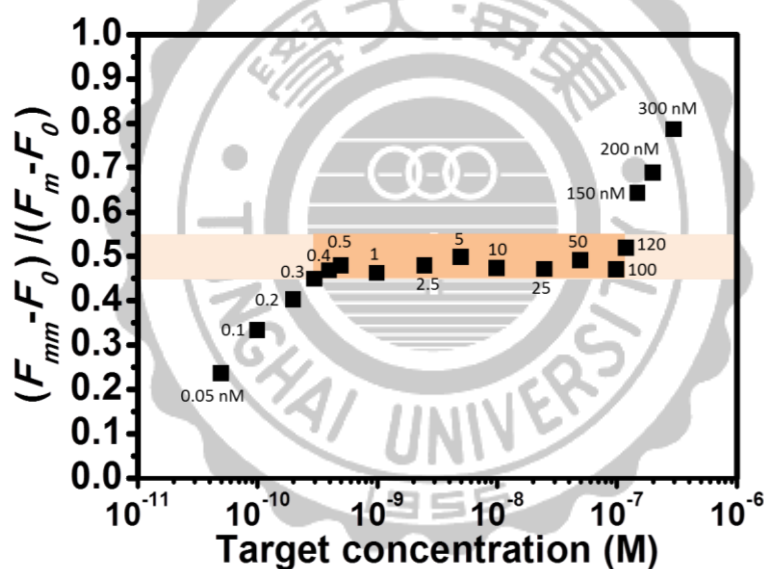


圖 3.27 雙酵素系統螢光訊號比例和待測序列濃度關係圖。其中 F_0 為不含雙重目標分析物以外的背景訊號值，包含分子探針、輔助鏈、引子、KF 以及 Nt.A1wI， F_m 為 F_0 組成外添加與輔助鏈完全互補的雙重目標物(TR 以及 TS)的螢光訊號值， F_{mm} 為 F_0 組成外添加與輔助鏈含單點突變的雙重目標物(TR 以及 TT)的螢光訊號值；探討濃度分別為 0.05 nM、0.1 nM、0.2 nM、0.3 nM、0.4 nM、0.5 nM、1 nM、2.5 nM、5 nM、10 nM、25 nM、50 nM、100 nM、120 nM、150 nM、200 nM 和 300 nM。

3.16 反應速率常數的估算

藉由輔助鏈與雙重目標物形成參股構型並與分子探針進行雜合反應，在 37 °C 反應溫度下經由動力學螢光訊號的表達，探討於不同反應環境下，包括無酵素系統、KF 單酵素系統以及 KF+Nt.A1wI 雙酵素系統，分子探針於結構穩定的互補結構或含有單核苷酸變異位點的結構中所產生解折疊差異的動力學研究。

選擇最佳化的反應條件以及符合層級式應答的濃度，利用動力學實驗進行探討，如圖 3.28 所示，圖中符號 a、b 與 a'、b'以及 a''、b''分別表示不同反應環境下所得之螢光曲線，分別為 w/o、KF 以及 KF+Nt.A1wI，由圖可以觀察到在 w/o 系統下，螢光曲線變化量很小，短時間內訊號即趨於平緩；在 KF 系統下，螢光曲線隨時間增加而持續上升；在 KF+Nt.A1wI 系統下，螢光曲線隨時間變化明顯大幅提升。

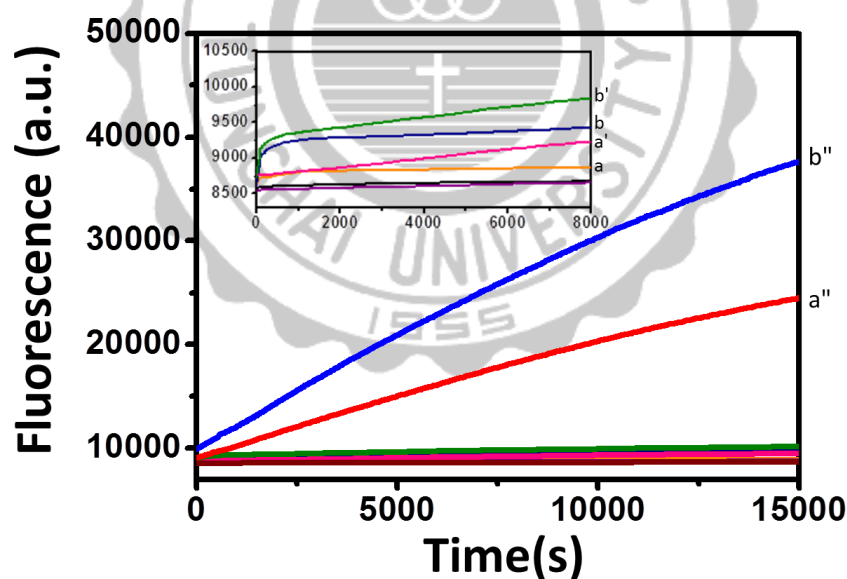


圖 3.28 無酵素、KF 單酵素、以及 KF+Nt.A1wI 雙酵素系統動力學曲線圖。曲線 a、a'、a''組成皆為 mMB(1 μ M)/TR(0.01 μ M)/TT(0.01 μ M)/A27(0.2 μ M)/PD(0.1 μ M)，曲線 b、b'、b''組成皆為 mMB(1 μ M)/TR(0.01 μ M)/TS(0.01 μ M)/A27(0.2 μ M)/PD(0.1 μ M)，圖中符號 a 與 b、a'與 b'以及 a''與 b''表示在 w/o、KF、以及 KF+Nt.A1wI。

將圖 3.28 所得到的螢光值做換算，探討分子探針解折疊的速率常數，結果如表 3.4，分別計算出不同時段下完全互補以及有錯配鹼基的系統所得之速率常數，其中每個數值表示各別條件下螢光值變化產生的速率，結果指出，不同系統下，速率常數的確因為酵素的存在而變大(因酵素參與而加速反應的進行)，在任一系統中，速率常數會隨著時間增長而變小(因反應逐漸趨近於平衡)，w/o 系統的 k_m/k_{mm} 在起始狀態就將近 20，可能原因為低濃度的分析物於錯配的系統中不易產生霍利迪交叉結構，因此有較低的速率常數，酵素參與反應的系統中，不同時段下的 k_m/k_{mm} 速率比值都約為 4 左右，暗示酵素參與反應對完全互補與有錯配鹼基的系統存在對等的貢獻(在兩個系統中，能使目標物穩定循環釋出)，除此之外，酵素在測定長時間內(4 小時)，仍然穩定具有活性。



表 3.4 不同反應系統下，有無錯配鹼基的分析物與分子探針解折疊的速率常數。

	1 min	1-3 min	15-20 min	4 hours
w/o enzyme				
k_m	3307	492	280	71
k_{mm}	152	76	38	2
k_m / k_{mm}	21.76	6.47	7.37	35.5
KF				
k_m	31166	10834	4854	2322
k_{mm}	8796	2635	1156	569
k_m / k_{mm}	3.54	4.11	4.20	4.08
KF+Nt.A1wI				
k_m	39616	33418	8794	4080
k_{mm}	10919	5403	1820	929
k_m / k_{mm}	3.63	6.19	4.83	4.39

反應溫度：37 °C； k_m 為完全互補系統(Matched)的速率常數； k_{mm} 為具錯配鹼基

系統(Mismatched)的速率常數，速率常數單位為 $M^{-1} s^{-1}$ 。1 分鐘為加入雙重目標物後開始至 1 分鐘內產生的螢光強度變化，1~3 分鐘為加入雙重目標物後 1~3 分鐘內產生的螢光強度變化，4 小時表示加入雙重目標物後第 4 小時當下之反應速率。

將圖 3.28 所得結果，”完全互補”與”含錯配鹼基”的螢光訊號扣除背景訊號後相除，結果如圖 3.29，正方形曲線為 w/o 系統，圓形曲線為 KF 系統，三角形曲線為 KF+Nt.A1wI 系統；w/o 系統由於分析物濃度較低的狀態下，有錯配鹼基不易形成結構，所以於任一時段下比值皆低於 1/2 範圍，KF 系統在反應 25~120 分鐘的時間範圍下，短時間可以維持於 1/2 應答，而 KF+Nt.A1wI 系統所得的訊號比例皆可保持在 1/2 範圍內，表示雙酵素對系統貢獻穩定，對於 TT 與 TS 的放大倍率長時間下幾乎一致，因此雙酵素參與的系統不僅能提升感測靈敏度，同時助於長時間穩定展現 1/2 之關係，增加檢測的穩定度。

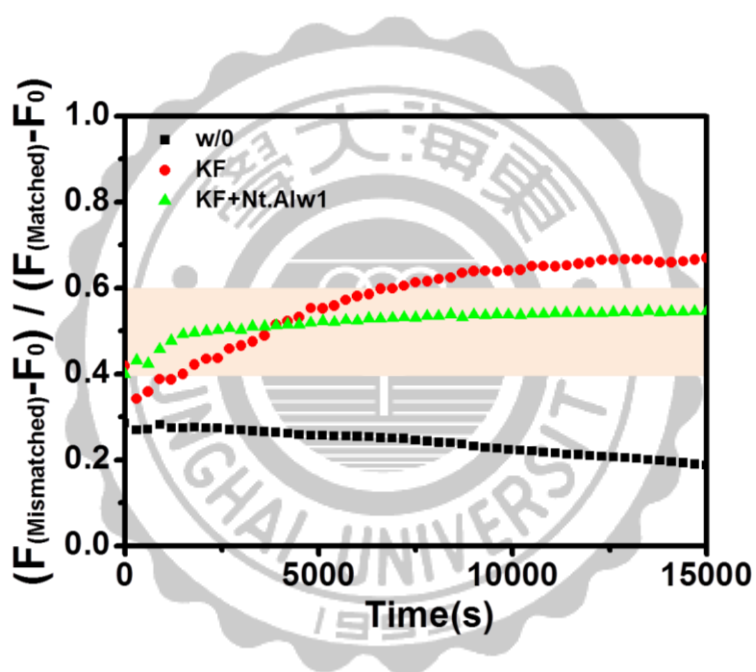


圖 3.29 無酵素、KF 單酵素、以及 KF+Nt.A1wI 雙酵素系統螢光強度比值隨時間變化圖。其中 F_0 代表 mMB/A27/PD、 $F_{(Matched)}$ 代表 mMB/A27/TR/TS/PD、 $F_{(Mismatched)}$ 代表 mMB/A27/TR/TT/PD。

3.17 真實樣品 aPCR 產物分析

前述實驗已證實分子探針、輔助鏈以及雙酵素參與的反應設計可以有效地用來辨認結核桿菌的序列片段，同時已藉由所提出的層級式應答分辨結核桿菌的基因為抗藥性片段或是藥敏性片段，考慮到實際應用，我們進行結核桿菌真實樣品的感測。結合非對稱式聚合酶鏈式反應(aPCR)，我們使用兩種待測檢體當成模板，一是來自於結核性分枝桿菌的全基因核酸抽取液，二是直接以煮沸的未純化菌液為檢體。

3.17.1 核酸檢體

以核酸抽取液為檢體，檢測樣品包括藥敏性菌株 W06 以及抗藥性菌株 M24；首先將 W06 與 M24 分別進行 aPCR 以產生 IS6110 和 *rpoB* 的單股產物(步驟於實驗材料與方法中)，接著以聚丙烯酰胺凝膠電泳驗證 aPCR 產物是否成功複製出含有待測序列的 IS6110 和 *rpoB* 的單股片段(如圖 3.30)。

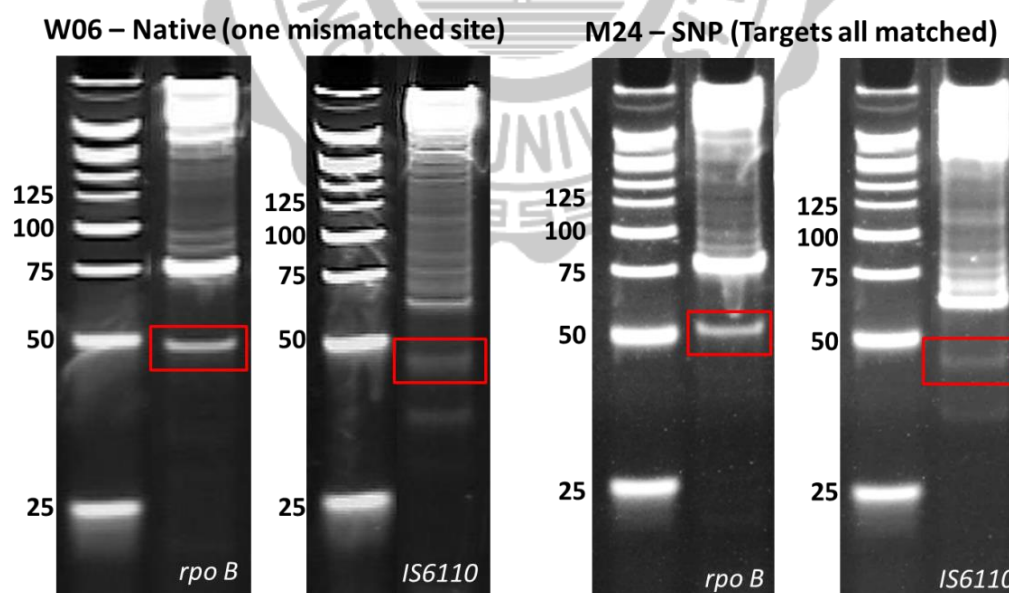


圖 3.30 聚丙烯酰胺凝膠電泳圖。以結核桿菌核酸抽取液為模板進行非對稱式聚合酶鏈鎖反應後的產物，紅色框框為所複製出的單股產物片段。

將成功複製出來的單股產物直接與 mMB、A27、PD、KF 以及 Nt.A1wI 一起感測，利用動力學實驗進行探討(圖 3.31 的插圖)，而為了符合快速的檢測應用，取反應 3 分鐘時所偵測到的螢光訊號並以柱狀圖呈現結果，如圖 3.31，結果指出，系統有效分辨檢測目標物為單條或是雙條的存在，當雙重目標物存在於系統中時才有顯著的螢光訊號產生，如紅色以及藍色柱狀數據，而且，藍色訊號約為紅色訊號的 60%，仍然接近 1/2 範圍，成功地分辨 W06 與 M24 菌株的差異。

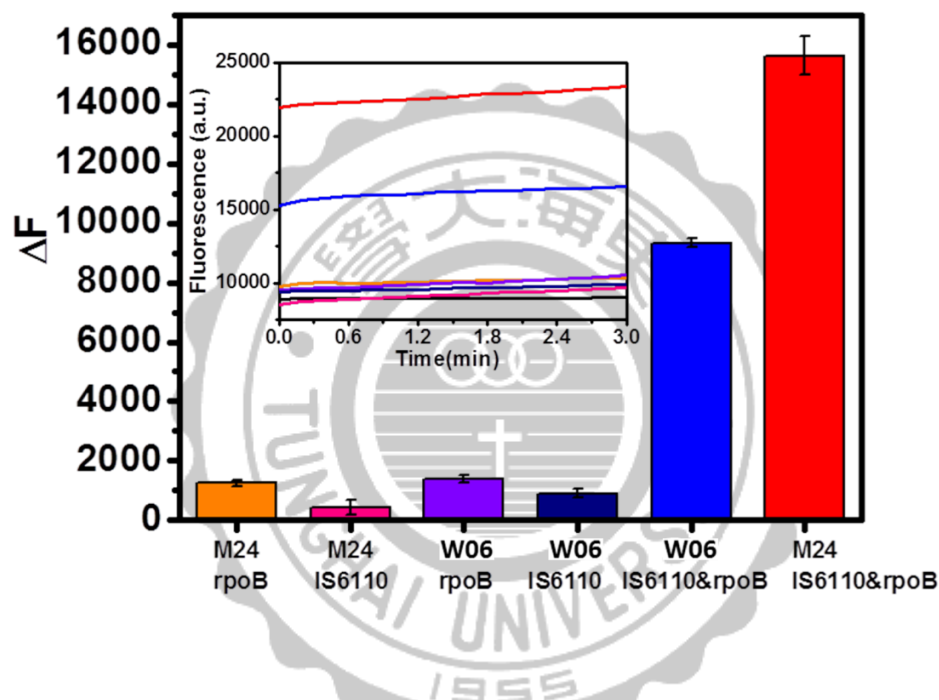


圖 3.31 採用結核桿菌核酸抽取液偵測結果。檢測的組合分別為 W06-IS6110 / W06-rpoB / W06-IS6110&rpoB / M24-IS6110 / M24-rpoB / M24-IS6110&rpoB。

3.17.2 菌液檢體

直接以煮沸的菌液為檢體，可省去很多樣品前處理步驟，加速分析，檢測樣品包括結核性分枝桿菌W06與M24菌株，此外我們也同時對非結核性分枝桿菌 (Non-tuberculous mycobacteria, NTM) 包括 *M. avium*、*M. smegmatis* 以及 *M. kansasii* 菌株進行分析，探討本系統的選擇性。

如圖 3.32 所示，本研究所設計的感測機制具有良好的專一性，對於分枝桿菌為 *M.tb* 或 NTM 的輸出訊號有明顯的區分能力，其中 *M. avium* 以及 *M. smegmatis* 造成的訊號相較 *M. kansasii* 來的大的可能原因為兩株 NTM 存在 *rpoB* 變異，但以輸出結果來看不影響判讀，此外，感測機制對於直接使用菌液為檢體，檢測 *M.tb* 為抗藥性型(M24)或是藥敏性型(W06)也可以明顯的區別。

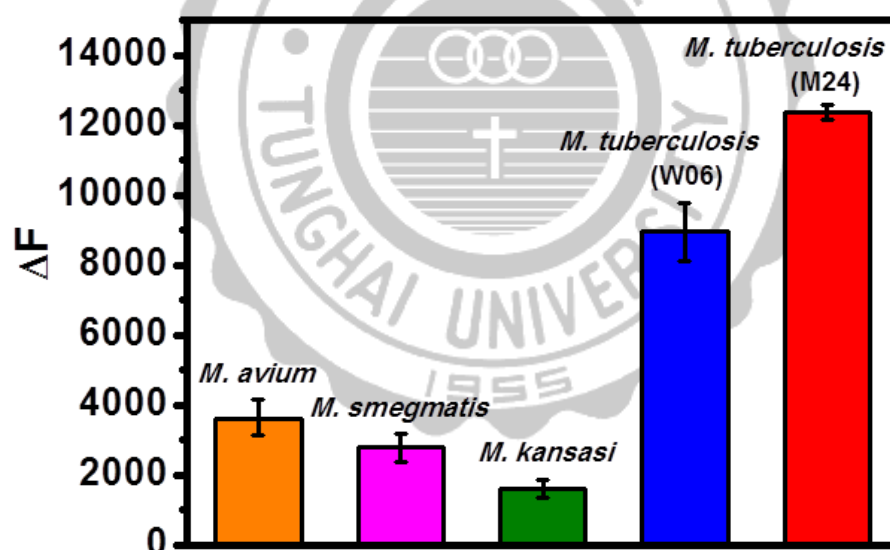


圖 3.32 採用煮沸菌液為檢體偵測結果。檢測的組合從左至右分別為 *M. avium*、*M. smegmatis*、*M. kansasii*、*M. tuberculosis* (W06) 以及 *M. tuberculosis* (M24)。

我們亦將菌液為的檢體的 W06 與 M24 菌株稀釋成不同濃度進行感測，並將其結果以比率直方圖顯示，如圖 3.33 所示，顯示此分析方法應用於低濃度的菌種檢測也能有效的以層級式應答分辨。

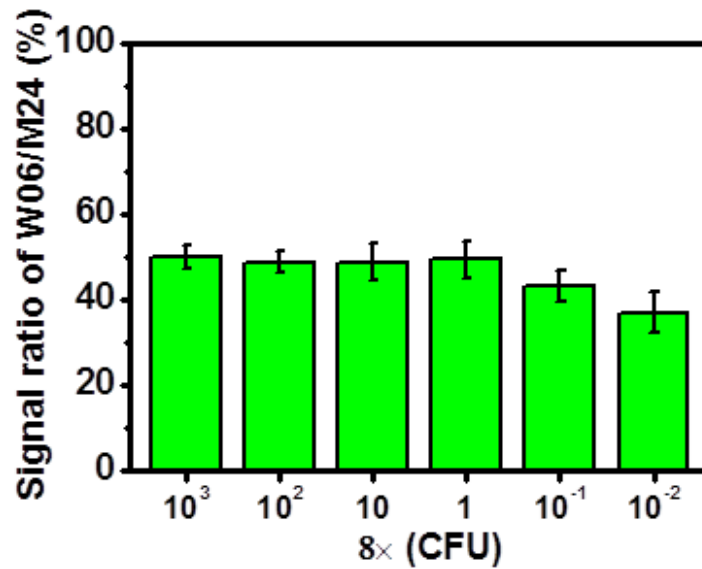


圖 3.33 採用煮沸菌液為檢體，不同稀釋倍數的 W06 與 M24 比率。檢測的組合從左至右分別為 8×10^3 、 8×10^2 、 8×10^1 、8、 8×10^{-1} 以及 8×10^{-2} CFU。

第四章 結論

本論文研究一種可同時偵測核酸片段及單核苷酸變異的方法，並成功應用於分析肺結核桿菌並指出該菌株是否含有抗藥性。使用一條具髮夾結構的分子探針 (molecular beacon, MB) 及一條輔助單股鏈 (Assistant strand)，和二條待測序列 (IS6110 及 *rpoB*) 進行反應形成霍利迪交叉結構 (Holliday junction)，並由分子探針產出螢光訊號。為了使單一輸出訊號可以說明三種不同情況，我們設計不同的核苷酸變異待測序列和輔助鏈互補長度 (length of arm)，用以調控霍利迪交叉結構的穩定度，及其輸出的螢光訊號，形成 0、1/2、及 1 三種應答階級，分別代表非結核菌、藥敏性結核菌、及抗藥性結核菌等臨床狀況。

為了更精確調控霍利迪交叉結構的形成，我們亦探討形成上述結構時自由能變化，及其受溫度之影響，結果指出，單核苷酸變異在 39.6 °C ~ 44.5 °C 溫度範圍下造成明顯螢光差異，說明此溫度範圍為有效辨別單核苷酸變異的適合條件，因此，我們選擇於此溫度範圍下可表現最高催化活性的聚合酶 (Klenow Fragment) 及核酸內切酶 (Nt.A1wI)，並以此酵素設計訊號放大機制。兩酵素同時運作下造成目標序列複合體循環，進而達到應答訊號擴增的效果，由螢光隨時間變化圖中觀察得到在 30 分鐘下，訊號可增進 22 倍，長時間偵測後訊號可增進 64 倍 (第 300 分鐘)，於 0.3 nM 至 120 nM 濃度範圍內，可符合上述三階級應答機制，偵測濃度可低至 300 pM。除此之外，動力學研究結果指出形成霍利迪交叉結構的起始 (一分鐘內) 速率常數 ($k_{t < 1 \text{ min}}$) 為 $3307 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (無酵素且無單核苷酸變異)、 $152 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (無酵素但存在單核苷酸變異)，具有雙酵素進行訊號擴增情況下速率常數 ($k_{t < 1 \text{ min}}$) 則為 $39616 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (無單核苷酸變異)、 $10919 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (存在單核苷酸變異)，相較於無酵素存在下的情況，雙酵素催化擴增反應可使速率常數比值 (無單核苷酸變異/存在單核苷酸變異) 穩定維持於 1/2 範圍 (研究時間達 250 分鐘)。此感測機制亦成功應用於檢測未經純化的 PCR 產物，不論以抽取的核酸為檢體或是直接將煮沸的菌液進行偵測，系統能偵測肺結核桿菌的存在，有別於非結核性分枝桿菌

(nontuberculous mycobacterium, NTM)包括 *M. avium*、*M. smegmatis*、*M. kansasii*，及有效分辨藥敏性結核菌及具抗藥性結核菌。本分析方法只需要一個分子探針，和文獻中的方法比較，大幅降低高成本分子探針的使用量，簡單的層級式訊號輸出方式使非專業人員也能清楚判讀結果，技術上，系統容許具有二級結構的目標序列。這樣的分析概念將可以擴展至其他疾病的快速篩檢，對於需要同時分析雙重基因片段或是探討生物學上有意義的單核苷酸變異的研究，尤其具有發展性。



第五章 參考文獻

- (1) Hirschhorn, J. N.; Daly, M. J. *Nat Rev Genet.* **2005**, *6*. 95-108.
- (2) McVean, G.; Spencer, C. C.; Chaix, R. *PLoS Genet.* **2005**, *1*. e54.
- (3) Collins, F. S.; Brooks, L. D.; Chakravarti, A. *Genome Res.* **1998**, *8*. 1229-31.
- (4) Shastri, B. S. *Methods Mol Biol.* **2009**, *578*. 3-22.
- (5) Fellay, J.; Ge, D.; Shianna, K. V.; Colombo, S.; Ledergerber, B.; Cirulli, E. T.; Urban, T. J.; Zhang, K.; Gumbs, C. E.; Smith, J. P.; Castagna, A.; Cozzi-Lepri, A.; De Luca, A.; Easterbrook, P.; Gunthard, H. F.; Mallal, S.; Mussini, C.; Dalmau, J.; Martinez-Picado, J.; Miro, J. M.; Obel, N.; Wolinsky, S. M.; Martinson, J. J.; Detels, R.; Margolick, J. B.; Jacobson, L. P.; Descombes, P.; Antonarakis, S. E.; Beckmann, J. S.; O'Brien, S. J.; Letvin, N. L.; McMichael, A. J.; Haynes, B. F.; Carrington, M.; Feng, S.; Telenti, A.; Goldstein, D. B.; Immunology, N. C. f. H. A. V. *PLoS Genet.* **2009**, *5*. e1000791.
- (6) Dean, M.; Carrington, M.; Winkler, C.; Huttley, G. A.; Smith, M. W.; Allikmets, R.; Goedert, J. J.; Buchbinder, S. P.; Vittinghoff, E.; Gomperts, E.; Donfield, S.; Vlahov, D.; Kaslow, R.; Saah, A.; Rinaldo, C.; Detels, R.; O'Brien, S. J. *Science.* **1996**, *273*. 1856-62.
- (7) Petersen, D. C.; Laten, A.; Zeier, M. D.; Grimwood, A.; Rensburg, E. J.; Hayes, V. M. *Hum Mutat.* **2002**, *20*. 253-9.
- (8) Lettre, G.; Sankaran, V. G.; Bezerra, M. A. C.; Araújo, A. S.; Uda, M.; Sanna, S.; Cao, A.; Schlessinger, D.; Costa, F. F.; Hirschhorn, J. N.; Orkin, S. H. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* **2008**, *105*. 11869-11874.
- (9) Corder, E. H.; Saunders, A. M.; Strittmatter, W. J.; Schmechel, D. E.; Gaskell, P. C.; Small, G. W.; Roses, A. D.; Haines, J. L.; Pericak-Vance, M. A. *Science.* **1993**, *261*. 921-3.
- (10) Musser, J. M. *Clin Microbiol Rev.* **1995**, *8*. 496-514.
- (11) Nachegea, J. B.; Chaisson, R. E. *Clin Infect Dis.* **2003**, *36*. S24-30.
- (12) Sandgren, A.; Strong, M.; Muthukrishnan, P.; Weiner, B. K.; Church, G. M.; Murray, M. B. *PLoS Med.* **2009**, *6*. e2.
- (13) Lipin, M. Y.; Stepanshina, V. N.; Shemyakin, I. G.; Shinnick, T. M. *Clin Microbiol Infect.* **2007**, *13*. 620-6.
- (14) Zhang, H.; Li, D.; Zhao, L.; Fleming, J.; Lin, N.; Wang, T.; Liu, Z.; Li, C.; Galwey, N.; Deng, J.; Zhou, Y.; Zhu, Y.; Gao, Y.; Wang, T.; Wang, S.; Huang, Y.; Wang, M.; Zhong, Q.; Zhou, L.; Chen, T.; Zhou, J.; Yang, R.; Zhu, G.; Hang, H.; Zhang, J.; Li, F.; Wan, K.; Wang, J.; Zhang, X. E.; Bi, L. *Nat Genet.* **2013**, *45*. 1255-60.
- (15) Morgan, M.; Kalantri, S.; Flores, L.; Pai, M. *BMC Infect Dis.* **2005**, *5*. 62.
- (16) Khosravi, A. D.; Goodarzi, H.; Alavi, S. M. *Braz J Infect Dis.* **2012**, *16*. 57-62.
- (17) Peng, J.; Yu, X.; Cui, Z.; Xue, W.; Luo, Z.; Wen, Z.; Liu, M.; Jiang, D.; Zheng, H.; Wu, H.; Zhang, S.; Li, Y. *Front Microbiol.* **2016**, *7*. 618.

- (18) Hillemann, D.; Kubica, T.; Agzamova, R.; Venera, B.; Rusch-Gerdes, S.; Niemann, S. *Int J Tuberc Lung Dis.* **2005**, *9*. 1161-7.
- (19) Lin, Y. H.; Tai, C. H.; Li, C. R.; Lin, C. F.; Shi, Z. Y. *J Microbiol Immunol Infect.* **2013**, *46*. 266-70.
- (20) WHO | Tuberculosis. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/en/>.
- (21) Dye, C.; Scheele, S.; Dolin, P.; Pathania, V.; Raviglione, M. C.; for the, W. H. O. G. S.; Monitoring, P. *JAMA.* **1999**, *282*. 677-686.
- (22) Dirlikov, E.; Raviglione, M.; Scano, F. *Ann Intern Med.* **2015**, *163*. 52-8.
- (23) Organization, W. H. Global tuberculosis report 2015. http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/191102/1/9789241565059_eng.pdf.
- (24) WHO | The top 10 causes of death. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/index1.html>.
- (25) Organization, W. H. Guidelines for surveillance of drug resistance in tuberculosis. http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44206/1/9789241598675_eng.pdf.
- (26) Shah, N. S.; Wright, A.; Bai, G. H.; Barrera, L.; Boulahbal, F.; Martin-Casabona, N.; Drobniewski, F.; Gilpin, C.; Havelkova, M.; Lepe, R.; Lumb, R.; Metchock, B.; Portaels, F.; Rodrigues, M. F.; Rusch-Gerdes, S.; Van Deun, A.; Vincent, V.; Laserson, K.; Wells, C.; Cegielski, J. P. *Emerg Infect Dis.* **2007**, *13*. 380-7.
- (27) Organization, W. H. Multidrug and extensively drug-resistant TB (M/XDR-TB): 2010 global report on surveillance and response. http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44286/1/9789241599191_eng.pdf.
- (28) Llamas-Gonzalez, Y. Y.; Flores-Valdez, M. A. *Rev Invest Clin.* **2013**, *65*. 255-62.
- (29) Chaturvedi, N.; Cockcroft, A. *Occup Med (Lond).* **1992**, *42*. 179-82.
- (30) Fuchs, I.; Avnon, L.; Freud, T.; Abu-Shakra, M. *Clin Rheumatol.* **2009**, *28*. 167-72.
- (31) Pai, M.; Minion, J.; Steingart, K.; Ramsay, A. *Curr Opin Pulm Med.* **2010**, *16*. 271-84.
- (32) Pai, M.; Riley, L. W.; Colford, J. M., Jr. *Lancet Infect Dis.* **2004**, *4*. 761-76.
- (33) Diel, R.; Goletti, D.; Ferrara, G.; Bothamley, G.; Cirillo, D.; Kampmann, B.; Lange, C.; Losi, M.; Markova, R.; Migliori, G. B.; Nienhaus, A.; Ruhwald, M.; Wagner, D.; Zellweger, J. P.; Huitric, E.; Sandgren, A.; Manissero, D. *Eur Respir J.* **2011**, *37*. 88-99.
- (34) Steingart, K. R.; Henry, M.; Ng, V.; Hopewell, P. C.; Ramsay, A.; Cunningham, J.; Urbanczik, R.; Perkins, M.; Aziz, M. A.; Pai, M. *Lancet Infect Dis.* **2006**, *6*. 570-81.
- (35) Martin, A.; Bombeeck, D.; Fissette, K.; de Rijk, P.; Hernandez-Neuta, I.; Del Portillo, P.; Palomino, J. C. *J Microbiol Methods.* **2011**, *84*. 255-7.
- (36) Ngeow, Y. F.; Wong, Y. L.; Ng, K. P.; Ong, C. S.; Aung, W. W. *J Clin Microbiol.* **2011**, *49*. 2776-7.
- (37) Mustafa, T.; Wiker, H. G.; Mfinanga, S. G.; Morkve, O.; Sviland, L. *Mod Pathol.* **2006**, *19*. 1606-14.

- (38) Purohit, M. R.; Mustafa, T.; Wiker, H. G.; Morkve, O.; Sviland, L. *Diagn Pathol.* **2007**, *2*. 36.
- (39) Zhou, L.; He, X.; He, D.; Wang, K.; Qin, D. *Clin Dev Immunol.* **2011**, *2011*. 193963.
- (40) Iovannisci, D. M.; Winn-Deen, E. S. *Mol Cell Probes.* **1993**, *7*. 35-43.
- (41) Sharma, K.; Sharma, A.; Sharma, S. K.; Sen, R. K.; Dhillon, M. S.; Sharma, M. *International Orthopaedics.* **2012**, *36*. 255-259.
- (42) Wang, J.; Rivas, G.; Cai, X.; Dontha, N.; Shiraishi, H.; Luo, D.; Valera, F. S. *Analytica Chimica Acta.* **1997**, *337*. 41-48.
- (43) Kara, P.; Cavusoglu, C.; Cavdar, S.; Ozsoz, M. *Biosens Bioelectron.* **2009**, *24*. 1796-800.
- (44) Liu, C.; Jiang, D.; Xiang, G.; Liu, L.; Liu, F.; Pu, X. *Analyst.* **2014**, *139*. 5460-5.
- (45) Miodek, A.; Mejri, N.; Gomgnimbou, M.; Sola, C.; Korri-Youssoufi, H. *Anal Chem.* **2015**, *87*. 9257-64.
- (46) Piatek, A. S.; Tyagi, S.; Pol, A. C.; Telenti, A.; Miller, L. P.; Kramer, F. R.; Alland, D. *Nat Biotechnol.* **1998**, *16*. 359-63.
- (47) El-Hajj, H. H.; Marras, S. A.; Tyagi, S.; Kramer, F. R.; Alland, D. *J Clin Microbiol.* **2001**, *39*. 4131-7.
- (48) Harkins, K. M.; Buikstra, J. E.; Campbell, T.; Bos, K. I.; Johnson, E. D.; Krause, J.; Stone, A. C. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* **2015**, *370*. 20130622.
- (49) Zhao, Y.; Li, G.; Sun, C.; Li, C.; Wang, X.; Liu, H.; Zhang, P.; Zhao, X.; Wang, X.; Jiang, Y.; Yang, R.; Wan, K.; Zhou, L. *PLoS One.* **2015**, *10*. e0143444.
- (50) Lawn, S. D.; Nicol, M. P. *Future Microbiology.* **2011**, *6*. 1067-1082.
- (51) *Applied Physics Letters.* **2010**, *96*. 133703.
- (52) Torres-Chavolla, E.; Alocilja, E. C. *Biosensors and Bioelectronics.* **2011**, *26*. 4614-4618.
- (53) Li, F.; Yu, Y.; Li, Q.; Zhou, M.; Cui, H. *Anal Chem.* **2014**, *86*. 1608-13.
- (54) Bernacka-Wojcik, I.; Lopes, P.; Catarina Vaz, A.; Veigas, B.; Jerzy Wojcik, P.; Simoes, P.; Barata, D.; Fortunato, E.; Viana Baptista, P.; Aguas, H.; Martins, R. *Biosens Bioelectron.* **2013**, *48*. 87-93.
- (55) Garcia de Viedma, D. *Clin Microbiol Infect.* **2003**, *9*. 349-59.
- (56) Piatek, A. S.; Telenti, A.; Murray, M. R.; El-Hajj, H.; Jacobs, W. R.; Kramer, F. R.; Alland, D. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* **2000**, *44*. 103-110.
- (57) Chakravorty, S.; Kothari, H.; Aladegbami, B.; Cho, E. J.; Lee, J. S.; Roh, S. S.; Kim, H.; Kwak, H.; Lee, E. G.; Hwang, S. H.; Banada, P. P.; Safi, H.; Via, L. E.; Cho, S.-N.; Barry, C. E.; Alland, D. *Journal of Clinical Microbiology.* **2012**, *50*. 2194-2202.
- (58) Cornett, E. M.; Campbell, E. A.; Gulenay, G.; Peterson, E.; Bhaskar, N.; Kolpashchikov, D. M. *Angew Chem Int Ed Engl.* **2012**, *51*. 9075-7.
- (59) Gerasimova, Y. V.; Kolpashchikov, D. M. *Chem Soc Rev.* **2014**, *43*. 6405-38.

- (60) Zou, B.; Song, Q.; Wang, J.; Liu, Y.; Zhou, G. *Chem Commun (Camb)*. **2014**, *50*. 13722-4.
- (61) Li, J. J.; Chu, Y.; Lee, B. Y.; Xie, X. S. *Nucleic Acids Res*. **2008**, *36*. e36.
- (62) Huang, Y.; Zhang, Y. L.; Xu, X.; Jiang, J. H.; Shen, G. L.; Yu, R. Q. *J Am Chem Soc*. **2009**, *131*. 2478-80.
- (63) Wang, X. P.; Yin, B. C.; Wang, P.; Ye, B. C. *Biosens Bioelectron*. **2013**, *42*. 131-5.
- (64) Zeng, Y.-p.; Hu, J.; Long, Y.; Zhang, C.-y. *Analytical Chemistry*. **2013**, *85*. 6143-6150.
- (65) Zhu, G.; Liang, L.; Zhang, C. Y. *Anal Chem*. **2014**, *86*. 11410-6.
- (66) Connolly, A. R.; Trau, M. *Angew Chem Int Ed Engl*. **2010**, *49*. 2720-3.
- (67) Jia, H.; Li, Z.; Liu, C.; Cheng, Y. *Angew Chem Int Ed Engl*. **2010**, *49*. 5498-501.
- (68) Huang, S.-q.; Hu, J.; Zhu, G.; Zhang, C.-y. *Biosensors and Bioelectronics*. **2015**, *65*. 191-197.
- (69) Hemphill, J.; Deiters, A. *J Am Chem Soc*. **2013**, *135*. 10512-8.
- (70) Lai, Y. H.; Liao, Y. C.; Mu, J. J.; Kuo, T. M.; Hsu, Y. H.; Chuang, M. C. *Chem Commun (Camb)*. **2014**, *50*. 12018-21.
- (71) Lee, C. C.; Liao, Y. C.; Lai, Y. H.; Lee, C. C.; Chuang, M. C. *Anal Chem*. **2015**, *87*. 5410-6.
- (72) Bell, A. S.; Ranford-Cartwright, L. C. *Trends Parasitol*. **2002**, *18*. 337-42.
- (73) Marras, S. A.; Tyagi, S.; Kramer, F. R. *Clin Chim Acta*. **2006**, *363*. 48-60.
- (74) Yu, C. X.; Zhao, Z. Y.; Lv, J. X.; Zhu, L. *Mol Biol Rep*. **2013**, *40*. 1883-92.
- (75) Liao, W. C.; Chuang, M. C.; Ho, J. A. *Biosens Bioelectron*. **2013**, *50*. 414-20.
- (76) Chen, Y.; Song, Y.; Wu, F.; Liu, W.; Fu, B.; Feng, B.; Zhou, X. *Chem Commun (Camb)*. **2015**, *51*. 6980-3.
- (77) Bonnet, G.; Tyagi, S.; Libchaber, A.; Kramer, F. R. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **1999**, *96*. 6171-6.
- (78) Tsourkas, A.; Behlke, M. A.; Rose, S. D.; Bao, G. *Nucleic Acids Res*. **2003**, *31*. 1319-30.