

東海大學理學院化學研究所

碩士論文

Graduate Institute of Chemistry

College of Science

Tunghai University

Master Thesis

以超解析影像技術觀測端粒長度

Observation of telomere lengths by super-resolution
imaging technology

林蔚青

Wei-Ching Lin

指導教授：張柏齡 博士

Advisor : Dr. Po-Ling Chang

中華民國 108 年 7 月

東海大學碩士班研究生
論文指導教授推薦書

化學系 碩士班 林蔚青 君所提之論文

以超解析影像技術觀測端粒長度

Observation of telomere lengths by super-resolution
imaging technology

係由本人指導撰述，同意提付審查。

指導教授  (簽章)

108年07月05日

東 海 大 學 碩 士 班 研 究 生

論 文 口 試 委 員 審 定 書

化學系 碩士班 林蔚青 君所提之論文

以超解析影像技術觀測端粒長度

Observation of telomere lengths by super-resolution
imaging technology

論文口試委員會 召集人 曾中龍 (簽章)

委 員

黃景帆

林國樞

沈如

中 華 民 國 108 年 07 月 10 日

謝誌

隨著碩士論文的完成，也代表我將要畢業，在實驗室的這五年，起初我對未來沒有太大的志向及憧憬，因為一個偶然的機會進了張柏齡老師的實驗室，遇到了很盡責的學長姊，在實驗上給予我很多幫助及建議，待在實驗室的漫長日子，即便有時候感到疲憊，也因為實驗夥伴彼此間的互相勉勵，一路走來一起克服許多困難。

另外我想要特別感謝我的指導教授-張柏齡老師，感謝老師在實驗上給我很多的空間，讓我能在自己的實驗充分發揮，也感謝老師在我遇到瓶頸的時候，神來一筆，給我許多新的靈感。再來要感謝老師帶著我組裝螢光顯微鏡，雖然老師在校光的時候一直使喚我拿東拿西，每當有一點進展時，老師就會興奮地歡呼，一開始我總是不知道他在高興什麼，但隨著校光次數的增加，我漸漸明白顯微鏡系統每一個組件的功用及如何擺置，因為老師曾說過全台灣沒有幾個教授會自組裝螢光顯微鏡系統，那代表全台灣會自組裝顯微鏡的學生就更沒幾個，學生雖然沒有很熟練，但還是很感謝老師讓我學會這個技能。

最後我要感謝我的兩個學弟妹，在我不知道要如何打謝誌的時候，給予我無限的靈感與鼓勵，我即將要離開這美麗的校園，希望老師及學弟妹們都能有很好的歸宿。

中文摘要

端粒 (telomere) 是位於染色體末端由重複核酸序列組合而成的結構，用於維持染色體的完整性，而端粒的長度會隨著細胞分裂或是環境壓力而逐漸縮短，研究指出端粒長度的變化是導致人體衰老及癌症產生的重要指針，因此端粒長度變化的測量是癌症預防的重要手段。近年來報導了許多方法來測量端粒長度，例如末端限制性片段分析 (terminal restriction fragmentation, TRF)，定量即時聚合酶連鎖反應 (quantitative real-time polymerase chain reaction, Q-PCR)，定量螢光原位雜合 (quantitative fluorescence in situ hybridization, Q-FISH) 及流式細胞螢光原位雜合 (flow cytometry and flow fluorescence in situ hybridization, Flow-FISH) 等。這些方法都有各自的優點，但卻有一個共通的弊病——無法測量線性化端粒 DNA 的絕對長度，因此本實驗發展利用超解析影像技術來觀測端粒的絕對長度。目前我們已經成功將端粒 DNA 線性沉積在疏水性玻片表面，透過端粒螢光標記探針定位測量端粒絕對長度，同時我們也成功分離出單顆細胞 DNA 並嘗試將其完整的線性沉積在玻片上，希望未來能夠在單顆細胞的水平上測量出細胞端粒長度。

Abstract

Telomere is the structure composed by repeating nucleic acid sequences at the end of a chromosome, and which to maintain the integrity of the chromosome. The length of the telomere is gradually shortened when the cell divides or the environmental pressure. The study shows that the change of the telomere length is an important indicator of human aging and cancer. Therefore, the measurement of telomere length changes is crucial means of cancer prevention. In recent years, a lot of methods have been reported to measure the length of telomere, such as terminal restriction fragmentation (TRF), quantitative real-time polymerase chain reaction (Q-PCR), quantitative fluorescein Quantitative fluorescence in situ hybridization (Q-FISH) and flow cytometry and flow fluorescence in situ hybridization (Flow-FISH). All above the mentions, these methods have their own advantages, however, there is a common drawback—the absolute length of linearized telomere DNA cannot be measured. Hence, this experiment develops the techniques of super-resolution image to measure the absolute length of telomeres. We have successfully deposited telomere DNA on the surface of hydrophobic slides and measured the absolute length of telomeres through telomere fluorescent labeled probes at the present time. Simultaneously, we also achieved to isolate the DNA of a single cell and tried to completely deposit it on slides. It is hope that we can measure the telomere lengths at the level of single cell.

目錄

中文摘要.....	I
Abstract	II
圖目錄.....	V
第一章 單分子螢光顯微鏡之簡介	1
1.1 緒論	1
1.2 螢光物理原理	3
1.3 雷射掃描共軛焦顯微鏡	6
1.4 全內反射式螢光顯微鏡	8
1.5 超解析螢光顯微鏡	12
1.5.1 受激放射耗乏顯微鏡技術.....	12
1.5.2 單分子定位顯微鏡.....	18
1.5.2.1 光啟動定位顯微鏡.....	20
1.5.2.2 隨機光學重建顯微鏡.....	23
1.5.2.3 直接隨機光學重建顯微術.....	27
第二章 端粒之簡介	33
2.1 端粒的發現	33
2.2 人類端粒結構與功能	34
2.3 人類端粒結合蛋白	37
2.3.1 TRF1 和 TRF2 之功能.....	38
2.3.2 TIN2 之功能.....	39
2.3.3 TPP1 和 POT1 之功能.....	40
2.3.4 Rap1 之功能	41
2.4 端粒長度維持機制	42
2.4.1 端粒酶介導延長機制.....	42
2.4.2 端粒替代延長機制.....	43
2.5 端粒長度與衰老、癌症之關係.....	43
2.6 端粒長度檢測方法	44
2.6.1 末端限制性片段分析.....	44
2.6.2 聚合酶連鎖反應法.....	46

2.6.3 定量螢光原位雜合.....	47
2.6.4 流式細胞螢光原位雜合.....	48
第三章 以超解析影像技術觀測端粒長度.....	50
3.1 研究動機.....	50
3.2 實驗材料與方法.....	50
3.2.1 實驗試藥.....	50
3.2.2 螢光顯微鏡系統架構.....	52
3.2.3 實驗方法.....	57
3.2.3.1 玻片製備.....	57
3.2.3.2 細胞培養.....	58
3.2.3.3 中期細胞染色體製備.....	58
3.2.3.4 Genomic DNA 萃取.....	59
3.2.3.5 液珠蒸發線性沉積 DNA.....	60
3.2.3.6 液珠平移線性沉積 DNA.....	60
3.2.3.7 以螢光原位雜合法定位染色體端粒.....	60
3.2.3.8 以螢光原位雜合法定位端粒 DNA.....	62
3.2.3.9 以微米毛細管提取單顆細胞 DNA.....	64
3.2.3.10 破壞細胞之細胞膜與細胞核膜.....	65
3.2.3.11 以微米毛細管分離單顆細胞.....	65
3.3 結果與討論.....	66
3.3.1 以螢光原位雜合法定位染色體端粒.....	66
3.3.2 比較不同表面修飾玻片影響 DNA 線性沉積.....	69
3.3.3 比較不同沉積方法影響 DNA 線性沉積.....	70
3.3.4 以液珠平移沉積不同濃度 λ DNA.....	75
3.3.5 以螢光原位雜合法定位端粒 DNA.....	78
3.3.6 以微米毛細管提取單顆細胞 DNA.....	84
3.3.7 破壞細胞之細胞膜與細胞核膜.....	84
3.3.8 以微米毛細管分離單顆細胞.....	86
3.3.9 單顆細胞 DNA 萃取.....	89
3.3.10 單顆細胞 DNA 片段化.....	91
3.3.10.1 高溫剪切法.....	92
3.3.10.2 超音波剪切法.....	92
3.3.10.3 金屬離子催化剪切法.....	96
3.3.10.4 限制性內切酶消化法.....	104
3.4 結論與未來展望.....	107
3.5 參考文獻.....	108

圖目錄

圖 1-1 Jablonski 模型	5
圖 1-2 共軛焦顯微鏡裝置示意圖	7
圖 1-3 螢光顯微鏡照射系統示意圖	9
圖 1-4 光在不同介質之折射與全反射示意圖	10
圖 1-5 物質與電磁波相互作用之能階變化示意圖	13
圖 1-6 受激放射耗乏顯微鏡運作原理示意圖	17
圖 1-7 光啟動定位顯微鏡運作原理示意圖	22
圖 1-8 Cy5 螢光分子之光轉化示意圖	25
圖 1-9 隨機光學重建顯微運作原理示意圖	26
圖 1-10 dSTORM 螢光分子光轉換機制	30
圖 2-1 端粒結構示意圖	35
圖 3-1 螢光顯微鏡系統裝置圖	53
圖 3-2 100X 物鏡下之微米尺	55
圖 3-3 100X 物鏡下之 λ DNA	56
圖 3-4 以螢光原位雜合法定位染色體端粒實驗流程圖	61
圖 3-5 以螢光原位雜合法定位端粒 DNA 實驗流程圖	63

圖 3-6 以螢光原位雜合法定位染色體端粒	67
圖 3-7 比較不同表面修飾玻片影響 DNA 線性沉積	71
圖 3-8 以液珠蒸發沉積法拉伸 DNA	73
圖 3-9 於不同表面修飾玻片上觀察液珠接觸角	74
圖 3-10 以液珠平移法沉積 λ DNA	76
圖 3-11 以液珠平移法沉積不同濃度 λ DNA	77
圖 3-12 比較 DNA 樣品於 EDC 固定前後與 Blocking 前後之差異 ..	79
圖 3-13 以傳統螢光顯微鏡系統觀測不同長度之端粒 DNA	82
圖 3-14 比較傳統顯微鏡端粒 DNA 影像與 dSTORM 超解析端粒 DNA 影像之差異	83
圖 3-15 嘗試以微米毛細管吸取單顆細胞 DNA	85
圖 3-16 破壞細胞之細胞膜與細胞核膜	87
圖 3-17 以內徑為 50 μ m 之微米毛細管分離單顆細胞	88
圖 3-18 單顆細胞 DNA 萃取	90
圖 3-19 95°C 加熱 30 分鐘片段化 DNA	93
圖 3-20 95°C 加熱 1 小時片段化 DNA	94
圖 3-21 95°C 加熱 2 小時片段化 DNA	95

圖 3-22 超音波剪切法片段化 DNA	97
圖 3-23 以 1 mM 銅離子催化切割 DNA.....	99
圖 3-24 以 5 mM 銅離子催化切割 DNA.....	100
圖 3-25 三聯吡啶氯化鈦六水合物之吸收圖	101
圖 3-26 以 1 mM 三聯吡啶鈦(II)催化切割 DNA.....	102
圖 3-27 以 5 mM 三聯吡啶鈦(II)催化切割 DNA.....	103
圖 3-28 以限制性內切酶消化單顆細胞 DNA 之 TIRF 螢光顯微鏡影像 圖	106

第一章 單分子螢光顯微鏡之簡介

1.1 緒論

西元 1665 年，英國科學家虎克 (Robert Hooke) 首次以光學顯微鏡觀察到細胞的存在，至今光學顯微鏡在生物學觀察研究上仍舊扮演著非常重要的角色。經過多年的技術發展，相較於其他常見的影像技術如原子力顯微鏡 (atomic force microscopy, 簡稱為 AFM) 與穿透式電子顯微鏡 (transmission electron microscopy, TEM)，光學顯微鏡仍具有更多的優勢，不僅在使用上即時可見，且對樣品低擾動破壞，也能在活細胞內作動態觀察，更能引入螢光分子相關技術以提供對生物學特徵高特异性標記及高對比度成像觀察。儘管光學顯微鏡具備了這些優點，但在光學繞射極限的限制下而無法達成如原子力顯微鏡與穿透式電子顯微鏡般的高解析度，因此 200 nm 解析度一直是傳統光學顯微鏡無法突破的瓶頸，這意味著我們不能清楚辨別更微小的生物分子如細胞胞器、蛋白質分子等。

螢光顯微鏡於 19 世紀末到 20 世紀逐漸發展出現，相較於亮視野顯微鏡 (bright-field microscope)，螢光顯微鏡具有更佳的影像對比度與標記專一性。由於只有被標記的區域能夠成像，所以可以大幅提高影像的對比度，而被標記的區域可以是細胞內部結構，藉由觀察這些細胞內部結構的變化，可以為生物學領域帶來更多新的發現。隨著

生物學研究越來越深入細胞中微小結構，對生物體的觀察已進步到分子層級，因此科學家致力於開發提升解析度的單分子螢光顯微鏡技術，西元 1960 年，共軛焦顯微鏡（confocal microscopy）的概念被提出，其原理為利用針孔光圈（pinhole）去除非成像焦平面的訊號以提高橫向解析度。西元 1981 年，全內反射式螢光顯微鏡（total internal reflection fluorescence microscopy，簡稱為 TIRFM）使入射激發光源以傾斜角度入射，當入射角大於臨界角時，入射光將會全反射，同時只會激發縱軸向約 200 nm 以內的螢光分子，大幅降低背景訊號並提高對比度。雖然這兩種顯微鏡技術相較於傳統光學顯微鏡技術提高了空間的解析能力，但在橫軸向的解析度仍受到繞射極限限制。為了觀察這些小於繞射極限的微小結構，近年來科學家陸續開發出新的超高分辨螢光顯微鏡技術（super-resolution fluorescence microscopy），其可以從空間與時間的角度上區分為兩類：一種是藉由調控螢光激發光學系統與過程，在空間上縮小聚焦激發光之繞射成像寬度，以類似這樣觀念所衍生出來顯微鏡技術主要有近場光學顯微鏡技術與受激放射耗乏顯微鏡技術（stimulated emission depletion microscopy，簡稱為 STED）。另一種則是在時間上隨機激發不同的螢光分子，使螢光分子的點分散函數能夠被區分，再透過分析每一個螢光分子的點分散函數，定位該螢光分子的空間位置，最後將所有被定位的螢光分子組合成一

張超解析影像，而以此概念為基礎的顯微鏡技術則稱之為單分子定位顯微鏡技術（single molecule localization microscopy, 簡稱為 SMLM），如光啟動定位顯微鏡技術（photoactivated localization microscopy, 簡稱為 PALM），隨機光學重建顯微鏡技術（stochastic optical reconstruction microscopy, 簡稱為 STORM)及直接隨機光學重建顯微鏡技術（direct stochastic optical reconstruction microscopy, 簡稱為 dSTORM）。其中受激放射耗乏顯微鏡技術與光啟動定位顯微鏡技術也因為成功突破了提出超過一個世紀的阿貝繞射極限，在生物樣品觀察上提供更高的解析能力，因此獲頒 2014 年諾貝爾化學獎。目前這些技術已經成功應用在生物學研究上，如研究不同表觀遺傳狀態下染色質的 3D 結構¹，大腸桿菌中核體伴隨蛋白之分布²等，因此想要了解生物分子的機制，超解析螢光顯微鏡技術絕對是一套適合的工具。

1.2 螢光物理原理

螢光（fluorescence）是於西元 1852 年由英國科學家斯托克斯（George Gabriel Stokes）根據螢石（mineral fluorspar）所命名，他發現當螢石以紫外光照射過後會發射出紅色的光，並將此現象稱之為螢光，同時他也發現此螢光的波長一定會大於入射光之波長，此現象也因此稱為斯托克斯位移（Stokes Shift）。西元 1933 年，波蘭物理學家

Jablonski 提出了 Jablonski 模型試圖描述有機分子發光現象³，如圖 1-1 所示，當處於單重基態能階（ground state）的螢光分子吸收了激發光能量後，其電子會躍遷至能量較高的單重激發態能階（excited state），此過程稱之為吸收（absorption），全程約為 10^{-15} 秒。電子再經由振動鬆弛（vibrational relaxation）及內轉換（internal conversion）釋放能量落至單重激發態的最低能階，此過程約為 $10^{-14} \sim 10^{-11}$ 秒，最終以放光的形式釋放能量回到基態能階，而此種較激發光波長長且能量低的光，稱之為螢光，其放光過程約為 $10^{-9} \sim 10^{-7}$ 秒。相反的，激發電子若是經由系間跨越（intersystem crossing）至三重激發態能階（triplet excited state），再從三重激發態的最低能階以放光的方式回到基態能階，此種光則稱之為磷光（phosphorescence），其放光過程較長，全程約為 $10^{-3} \sim 10^2$ 秒。除了以螢光或磷光釋能的方式外，電子還能以非放光的方式從激發態最低能階回到基態能階，其稱之為非輻射緩解（non-radiative relaxation）。

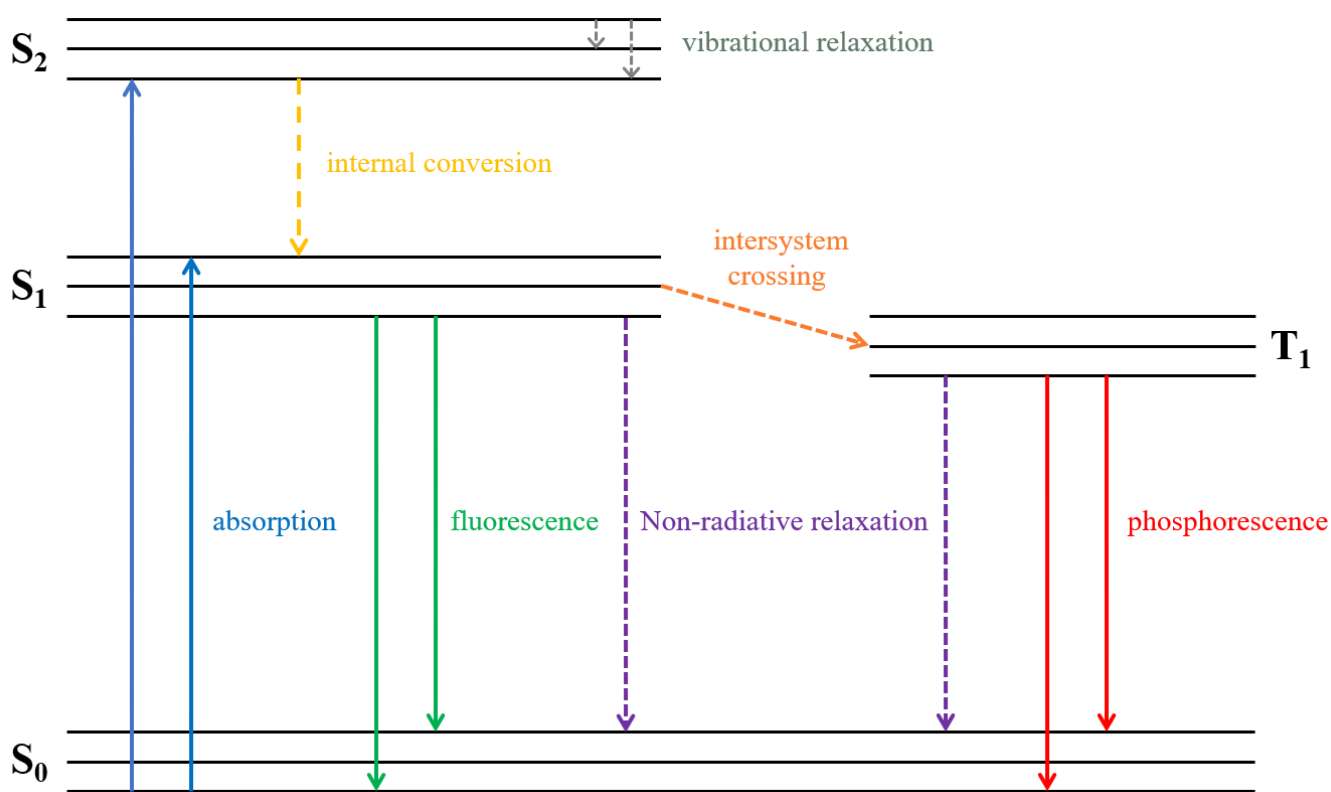


圖 1-1 Jablonski 模型。S 表示為單重態，T 表示為三重態。

1.3 雷射掃描共軛焦顯微鏡

雷射掃描共軛焦顯微鏡 (laser scanning confocal microscopy, 簡稱為 LSCM) 是研究者常用來觀察生物影像的儀器之一，其可以提供更高的影像分辨率，以往傳統螢光顯微鏡下所觀察到的影像不單有來自聚焦平面的訊號，非聚焦平面的訊號也同樣能蒐集的到，因此影響了最終成像的解析度。為了追求更高的影像解析度因而發展出雷射掃描共軛焦顯微鏡技術，其不但能去除傳統螢光顯微鏡中來自非聚焦平面的光，同時也能觀察具有厚度的生物樣品，提供了更高的影像對比度與解析度。

共軛焦顯微鏡光學原理如圖 1-2，將激發光源聚焦於樣品上，其聚焦點的切面稱之為聚焦平面，聚焦平面外的樣品平面，則稱為非聚焦平面 (out-of focal plane)。當激發光源通過照明針孔光圈後聚焦到樣品聚焦平面上時，只允許該聚焦平面產生的螢光訊號通過探測針孔光圈進入偵測器並成像，而聚焦平面以外的螢光訊號則被探測針孔光圈阻擋濾除。照明針孔光圈與探測針孔光圈對於樣品偵測點來說是共軛的，我們將此偵測點稱為共軛焦點，共軛焦點所在的平面即稱為共軛焦平面。雷射掃描共軛焦顯微鏡以點的方式在樣品聚焦平面上作掃描，從而產生一完整的共軛焦光學切面影像，隨著載物台沿著 Z 軸方向移動就可以得到樣品不同層連續的光學切面影像⁴。

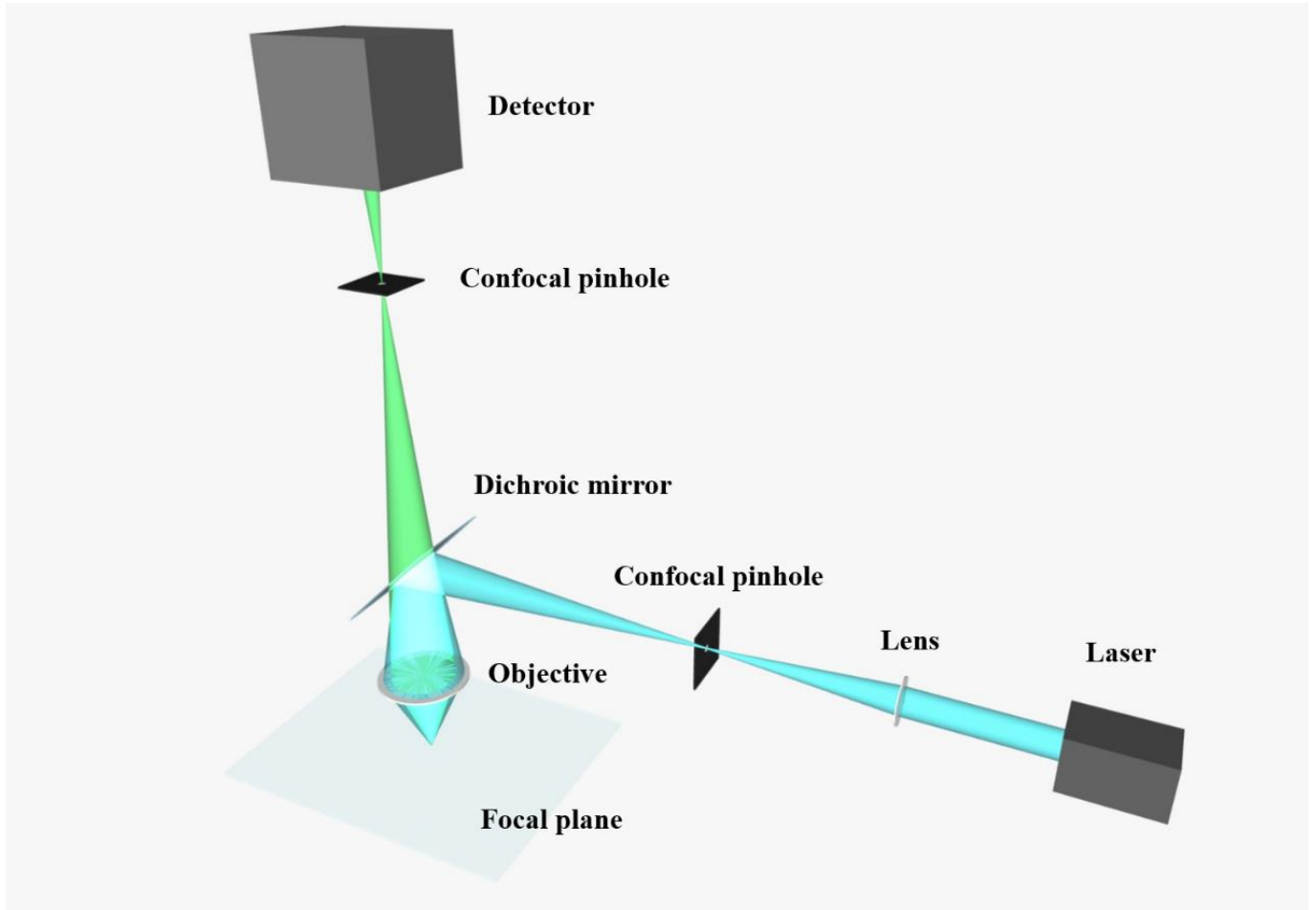


圖 1-2 共軛焦顯微鏡裝置示意圖。

1.4 全內反射式螢光顯微鏡

螢光顯微鏡依照射方式不同，主要可分為傳統的落射螢光顯微鏡（epi-fluorescence microscopes），大入射角光學薄層照明顯微鏡（highly inclined and laminated optical sheet，簡稱為 HILO），以及全內反射式螢光顯微鏡（total internal reflection fluorescence microscopy, TIRFM）。如圖 1-3 所示，落射螢光顯微鏡之入射光在通過物鏡後直接穿透樣品，使螢光背景訊號增高，而單一的螢光訊號相對下較為微弱，導致無法區分單分子螢光，不利於單分子成像⁵；HILO 顯微鏡之入射光是以一個傾斜的薄層光束通過樣品中心，由於此薄層光束只允許激發樣品數十微米深度內的螢光分子，因此可以減少背景雜訊並增加成像對比度，且不同平面的螢光分子訊號皆能夠被觀測到⁶；全內反射式螢光顯微鏡技術是目前單分子螢光顯微鏡中最常使用的成像方法，該方法是基於來自玻璃與水之界面入射光的全內反射。如圖 1-4，當光束從光密介質（如玻璃，折射係數 $n_1=1.52$ ）射入光疏介質（如水，折射係數 $n_1=1.33$ ）時，折射光會偏離法線，而入射角與折射角遵守司乃耳定律（Snell's Law）：

$$n_1 \sin \theta_1 = n_2 \sin \theta_2 \quad (1-1)$$

n_1 及 n_2 代表不同介質的折射係數， θ_1 為入射角， θ_2 為折射角，在折射

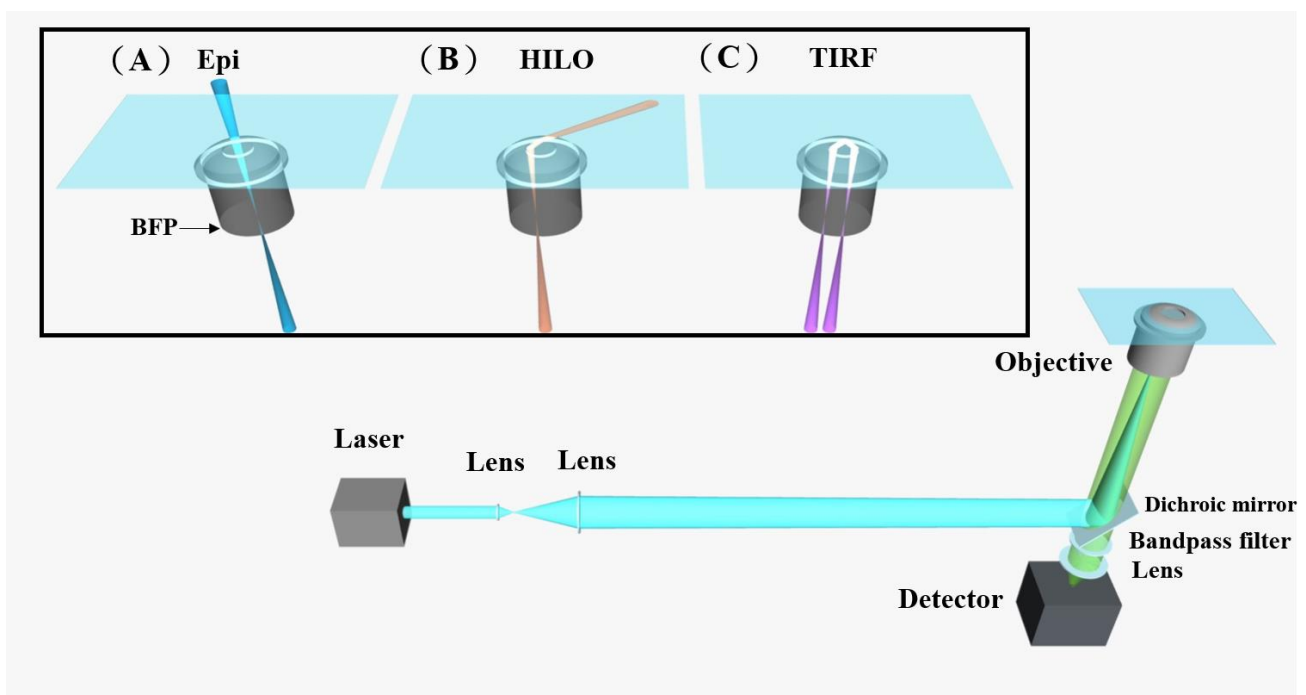


圖 1-3 螢光顯微鏡照射系統示意圖。(A) 落射螢光顯微鏡。(B) 大入射角光學薄層照明顯微鏡。(C) 全內反射式螢光顯微鏡。

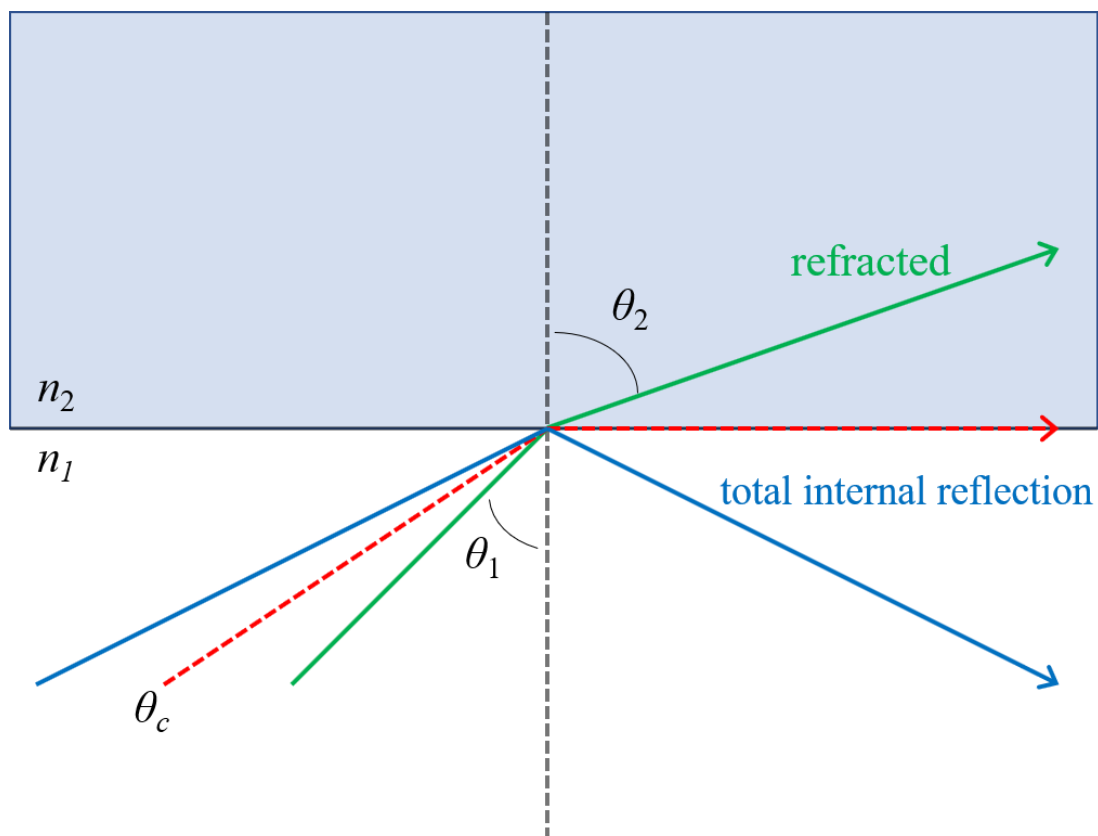


圖 1-4 光在不同介質之折射與全反射示意圖。當入射角小於臨界角時產生偏離法線之折射（綠色線）；當入射角大於臨界角時產生全反射（藍色線）。

係數 $n_1 > n_2$ 的情況下，當入射角 θ_1 大於臨界角 $\theta_c = \sin^{-1}(n_2/n_1)$ 時，沒有任何折射光會穿透介質，此現象稱為全內反射。

全內反射發生的時候並非所有的能量都在界面反射，在反射面後極短的距離內會產生漸逝波穿透介質，漸逝波不會長距離傳遞，其透光強度隨著穿透距離呈指數衰減，而漸逝波強度與穿透深度可用下列關係式表示：

$$I_z = I_0 e^{-z/d} \quad (1-2)$$

$$d = \frac{\lambda}{4\pi\sqrt{n_1^2 \sin^2 \theta_1 - n_2^2}} \quad (1-3)$$

其中 I_z 為沿著縱軸垂直於界面的強度， I_0 為入射光強度， z 為縱軸距離， d 為穿透深度 (penetration depth)， λ 為入射光在真空中波長，由 1-2 式可知，在入射角大於臨界角時，光波在另一個界面的穿透深度與入射光及入射角度有關，藉由改變入射角度和入射光強度來調整漸逝波的強度。由於漸逝波強度具有隨距離急速衰減的特性，只有在界面附近的螢光分子才能有效被激發產生螢光訊號，激發縱深約在 5 nm 到 200 nm 奈米之間，因此在有效激發距離以外的背景螢光分子將不會被激發進而改善了傳統螢光顯微鏡因背景螢光導致影像模糊的情況，有效提高螢光的訊號雜訊比，縱向的空間解析度也提高到奈米

等級，有利於單分子成像⁷⁻⁸。

1.5 超解析螢光顯微鏡

1.5.1 受激放射耗乏顯微鏡技術

受激放射的概念是由愛因斯坦於西元 1917 年所提出，他認為物質與電磁波的相互作用有三個基本的過程，即受激吸收 (stimulated absorption)，自發放射 (spontaneous emission) 以及受激放射 (stimulated emission) 三種，其能階躍遷變化如圖 1-5 所示，假設 E_0 與 E_1 分別為物質的基態能階與激發態能階，兩能階之能量差為 $h\nu$ ，則當一處於基態 E_0 的電子再吸收了一能量為 $h\nu$ 的光子後躍遷至激發態 E_1 的過程便稱為受激吸收。而此被激發至 E_1 能階的電子在激發態是不穩定的，所以會自發性往最低能階的基態移動，在沒有任何外界作用的情況下從激發態回到基態並以放熱或放光的形式釋放能量為 $h\nu$ 的光子，此過程稱為自發放射。若當電子處於激發態 E_1 能階時給予一外加能量為 $h\nu$ 的光子，將會誘發電子以非放光的方式從激發態回到基態，同時放射出與入射激發光子相同能量、方向與相位的光子，此過程便是所謂的受激放射。

受激放射耗乏顯微鏡技術⁹的基本觀念就是藉由受激放射的形式，將受激發螢光分子以非釋放螢光的方式返回到基態，如此便能利用受激放射有效限制自發放射螢光產生的範圍。假設螢光分子存在於不同

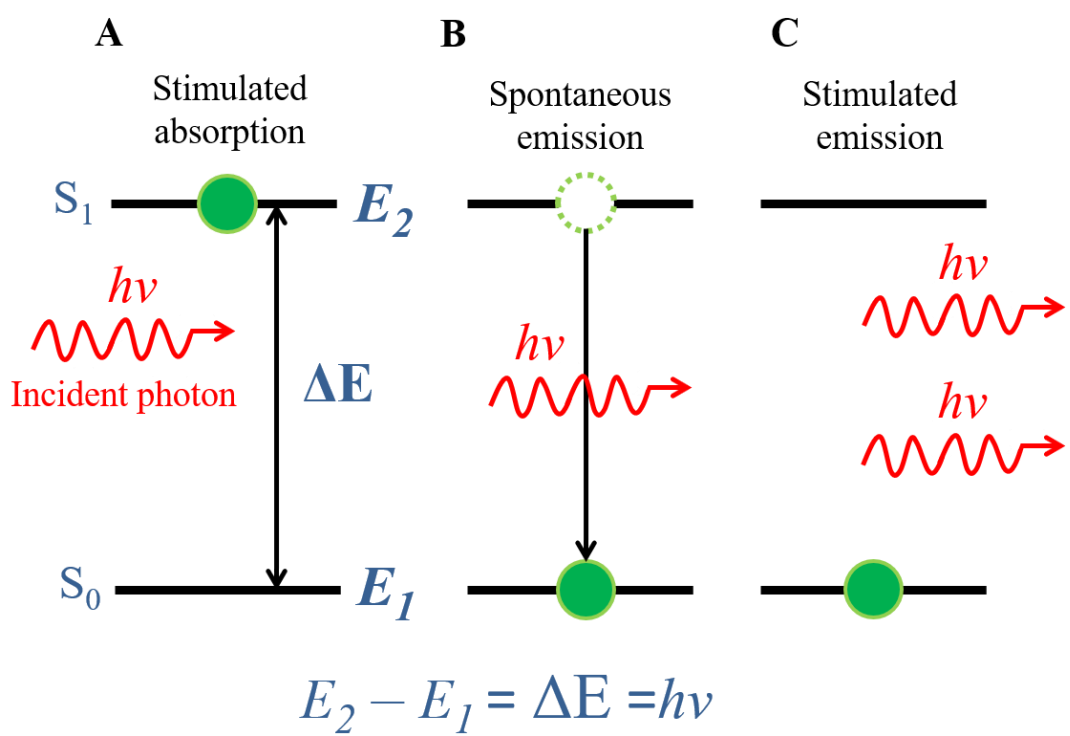


圖 1-5 物質與電磁波相互作用之能階變化示意圖。(A) 受激吸收。
(B) 自發放射。(C) 受激放射。

的 A、B 兩狀態，且能在兩狀態間相互轉換。螢光分子從 A 狀態至 B 狀態的速率常數以 k_{AB} 表示，而由 B 狀態回到 A 狀態的速率常數則以 k_{BA} 表示，螢光分子分布於 A 狀態與 B 狀態的分布機率 (population probability) 分別以 N_A 、 N_B 表示，則分布機率隨時間的變化量可表示為下列式子：

$$\frac{dN_A}{dt} = -k_{AB}N_A + k_{BA}N_B = -\frac{dN_B}{dt} \quad (1-4)$$

由 1-4 式可知分子處於 A、B 狀態的機率與各自的分布機率與轉換速率常數相關。同時我們能透過光子來誘發螢光分子躍遷，若螢光分子一開始處於 A 狀態，其速率常數 k_{AB} 與入射光強度 I 的關係可表示為：

$$k_{AB} = \sigma I \quad (1-5)$$

其中， σ 為受激分子表面積。當分子在 A、B 狀態之轉換已達到平衡時，即反應時間 $t \gg (k_{AB} + k_{BA})^{-1}$ ，各狀態之分布機率將維持在一個動態平衡上，則分子處於 A 狀態的分布機率將可達到穩定值 N_A^∞ ：

$$N_A^\infty = \frac{k_{BA}}{k_{AB} + k_{BA}} = \frac{k_{BA}}{(\sigma I + k_{BA})} \quad (1-6)$$

由 1-6 式可知，我們可以藉由調控入射光強度 I 來調整分子在 A 狀態

的分布機率，當入射光強度 I 越高時， N_A^∞ 之值越低。當入射光強度 I 之值為 $\frac{k_{BA}}{\sigma}$ 時， $N_A^\infty = \frac{1}{2}$ ，表示分子在 A、B 狀態的機率各為 50%，因此我們定義此入射光強度為飽和強度 $I^{sat} = \frac{k_{BA}}{\sigma}$ 。若持續提高入射光強度至 $I \gg I^{sat}$ ，則 N_A^∞ 將趨近於零，表示在此遠大於飽和強度的入射光照射之下，分子之分布機率將從原本的 A 狀態全部轉換至 B 狀態，也就是原本處於 A 狀態的分子幾乎被耗乏，由於兩態之間是可逆的，當耗乏條件消失，處於 B 狀態的分子仍可以透過吸收或釋放能量再回到 A 狀態，而此概念後來也發展成可逆式飽和線性螢光躍遷 (reversible saturable optical linear fluorescence transition)，也就是透過調控分子在兩態的分布來限制產生躍遷的區域，從而提升顯微鏡空間解析能力。

受激放射耗乏顯微鏡技術便是綜合了受激放射與可逆式飽和線性螢光躍遷兩原理，一開始螢光分子之電子處於能階較高的激發態 A，而 B 態為能階較低的基態，透過雷射光誘發電子以受激放射之方式回到基態，抑制自發螢光的產生，而在耗乏條件消失後，螢光分子仍可以重新再被激發而發出螢光。在受激放射耗乏顯微鏡技術中，解析度有新的定義¹⁰：

$$d \approx \frac{\lambda}{2n \sin \alpha \sqrt{1 + I^{max}/I^{sat}}} \quad (1-7)$$

其中， d 為顯微鏡最小解析距離， λ 是入射光波長， α 是光進出透鏡時最大錐角的一半， I^{max} 為誘發分子產生受激放射的雷射強度，此雷射稱之為受激放射雷射，由 1-7 式可知，只要提高受激放射雷射強度，便能提高顯微鏡解析度。如圖 1-6，在螢光顯微鏡中，入射激發光透過光學系統聚焦後的焦點大小即為螢光產生的區域，因此若能縮小入射激發光激發之範圍，便能有效提高解析度。為了實現這個想法，受激放射耗乏顯微鏡技術在原本的掃描式螢光顯微鏡系統裡引入一道受激放射雷射 (STED beam)，此雷射在通過螺旋相位板 (vortex phase plate) 或空間光調變器 (spatial light modulator) 後，產生一中心強度為零的環形耗乏雷射光 (donut-shaped depletion beam)。當螢光分子受到受激放射雷射照明時，抑制焦點外圍的螢光分子以受激放射之方式回到基態，並限制只有在光束中心強度為零的螢光分子能夠被激發放光。然而受激放射雷射大小仍受繞射限制，但只要增加受激放射雷射強度，螢光產生的區域便能縮小至一百奈米以下，因此受激放射耗乏顯微鏡技術實現了在空間上直接縮小螢光分子成像範圍，突破了傳統顯微鏡的繞射極限並且得到了一超高解析的螢光成像。

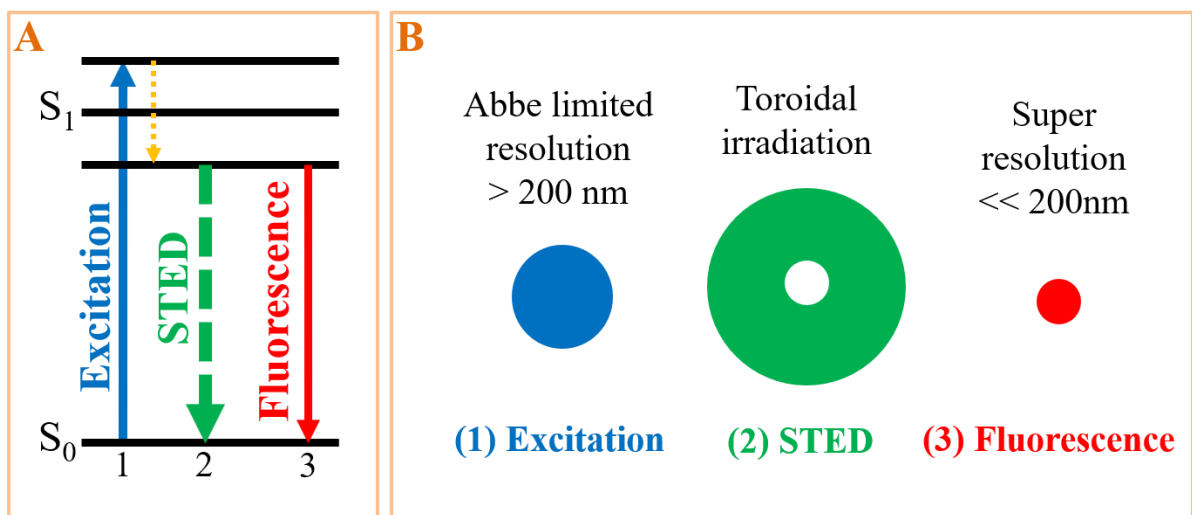


圖 1-6 受激放射耗乏顯微鏡運作原理示意圖。(A) 螢光分子吸收激發光能量時由基態躍遷至激發態，其後可以放出螢光的方式回到基態或是吸收受激放射雷射能量以非放光形式回到基態。(B) 兩道雷射光，藍色為正常激發光源，綠色是中心強度為零的受激放射雷射，當兩道雷射同時照射螢光分子時只允許中間強度為零的地方放出螢光。

1.5.2 單分子定位顯微鏡

除了上述所討論在空間上透過受激放射來縮減螢光產生範圍以提高顯微鏡解析度的受激放射耗乏顯微鏡技術外，近年來也發展出其他能夠突破繞射極限的單分子定位顯微術，如光啟動定位顯微鏡技術、隨機光學重建顯微鏡技術與直接隨機光學重建顯微鏡技術。不同於受激放射耗乏顯微鏡技術，單分子定位顯微技術需要利用螢光標記分子光轉化的特殊性質，在時間上經過多次成像及定位重建的過程來達到超解析的目的。利用單分子定位顯微技術得到超解析成像需具備兩種要素：區分不同螢光分子的點分散函數與定位重建螢光分子位置。而後者相對較容易達成，我們可以透過點分散函數的本質和統計學計算來實現。在大多情況下，點分散函數可以視為一個能夠表現未解析物體圖像中的一個擴展區塊，我們可以透過理論推算或實驗的方式獲得點分散函數形式，因此對於任何透過光學成像的螢光分子，我們皆能以已知的點分散函數擬合 (fitting) 出螢光分子的理想成像中心位置。單分子定位顯微鏡的解析分辨極限 σ (空間定位偏差) 可用下列式子定義¹¹：

$$\sigma_{x,y}^2 = \frac{s^2 + a^2/12}{N} + \frac{4\sqrt{\pi}s^3b^2}{aN^2} \cong \frac{s^2}{N^2} \quad (1-8)$$

其中， N 為光子數， s 為點分散函數之標準偏差， a 為像素大小， b 為

平均背景訊號。從 1-8 式可看出，在成像的過程中，蒐集到的光子數越多以及越低的背景訊號都能提高空間的分辨率，通過全內反射螢光顯微鏡技術可大幅減少背景螢光的產生。至於如何區分不同螢光分子的點分散函數，若能調控螢光分子的發光性質，那麼就能夠避免兩個鄰近的螢光分子同時放光而造成的兩點分散函數重疊的情況發生。西元 1997 年，美國科學家莫厄納（William E. Moerner）首先實現了這樣的觀察，他發現有一種綠色螢光蛋白具有顯著的光閃爍性質，當使用激發波長約為 480 nm 的光去激發螢光蛋白時，螢光蛋白會開始釋出螢光，但在經過短暫時間後就會熄滅，此時不管再用多強的光去照射螢光蛋白也不會放出螢光，但如果改以波長約為 400 nm 的光去照射後，螢光蛋白又會重新被活化，能再度吸收波長為 480nm 的光並放出螢光，這樣的現象證實了螢光分子可透過光來控制其發光性質的可能。而真正藉由此現象實現超解析螢光成像的結果則是由美國科學家貝齊格（Eric Betzig）與莊小威（Xiaowei Zhuang）所實現，他們分別藉由光啟動綠色螢光蛋白（PAGFP）與 Cy3-Cy5 有機螢光小分子對達成，並且將各自的顯微鏡技術命名為光啟動定位顯微術與（PALM）與隨機光學重建顯微術（STORM），在這之後 Heilemann 等人也以隨機光學重建顯微技術為基礎，發展出只需要單一螢光染料便能實現超解析成像的直接隨機光學重建顯微術（dSTORM）。

1.5.2.1 光啟動定位顯微鏡

西元 1995 年，貝齊格 (Eric Betzig) 提出了一個特別的想法，他認為螢光分子若具有可光轉化的發光性質，便可利用其性質在空間上區分每個螢光分子並對其精確定位。因此如果能找到方法讓兩個鄰近的螢光分子不在同一時間被激發，則當其中一螢光分子被激發時，其螢光便可透過二維高斯函數進行擬合，利用數學計算將二維高斯函數縮減便可推算出單分子螢光分子的中心位置，並把經由光學系統成像的螢光點分散函數限制在更小的尺度上。同理，當第二個螢光分子被激發的同時，第一個螢光分子不發光，那麼第二個螢光分子仍可以當作單一點函數來計算出其中心位置，如此一來便能排除兩個螢光分子同時被激發而造成的干涉效應而定位出更精確的中心位置，並且得到突破傳統螢光顯微鏡繞射極限的超解析螢光圖像¹²。

由於螢光分子對於激發光是較為敏感的，很難做到分別激發緊鄰的螢光分子，因此要實現這個想法並不是一件容易的事，但也因生物學領域的蓬勃發展為科學家提供了解決的方法。早在西元 1962 年，綠螢光蛋白 (green fluorescent protein, 簡稱為 GFP) 首度在一種學名為 *Aequorea victoria* 的水母體中發現¹³，後續研究發現此綠色螢光蛋白可以被波長約為 400 nm 與 480 nm 的兩種不同激發光所激發，並發射出波長約為 510 nm 的綠色螢光。近年來，又有一類對野生型綠色

螢光蛋白點突變後產生的新型綠色螢光蛋白，相較於原本的野生型綠色螢光蛋白，此點突變後的綠色螢光蛋白失去了 480 nm 的吸收峰，僅保留原本 400 nm 的吸收峰，且只有在通過 400 nm 左右的光激活後才能被 480 nm 左右的激發光激發，而其放射波長與野生型綠色螢光並無顯著差異，此種突變的綠色螢光蛋白後來被命名為光活化綠色螢光蛋白（photoactivatable green fluorescence protein，簡稱為 PAGFP）。

光活化綠色螢光蛋白在經過波長約為 400 nm 的紫色光激活後，再以約為 480 nm 的激發光激發成像，而光活化區域與周邊未活化區域形成了強烈的螢光對比度，因此很快地就被廣泛使用在對活體細胞蛋白質進行標記追蹤，同時也被貝齊格應用於光啟動定位顯微鏡成像中。光啟動定位顯微鏡原理如圖 1-7，用於激活光活化綠色螢光蛋白的活化光源需要一定的強度，且光活化綠色螢光蛋白被激活存在一定的機率，通過調整 400 nm 活化光與 480 nm 激發光的強度並在長時間照射下，可使同一區域內的螢光蛋白在不同時間上發射出螢光並成像，成像的單分子再通過高斯函數擬合來精確定位，在確定這些分子位置後，以 480 nm 激發光照射來光漂白這些已經定位完成的螢光分子，如此能確保它們不被下一輪的活化光激活，反覆重複以 400 nm 與 480 nm 的光來激活與激發並光漂白其他螢光蛋白，經過多次循環後可獲得幾乎所有螢光分子的精確定位，將這些分子圖像疊合在一起後就能

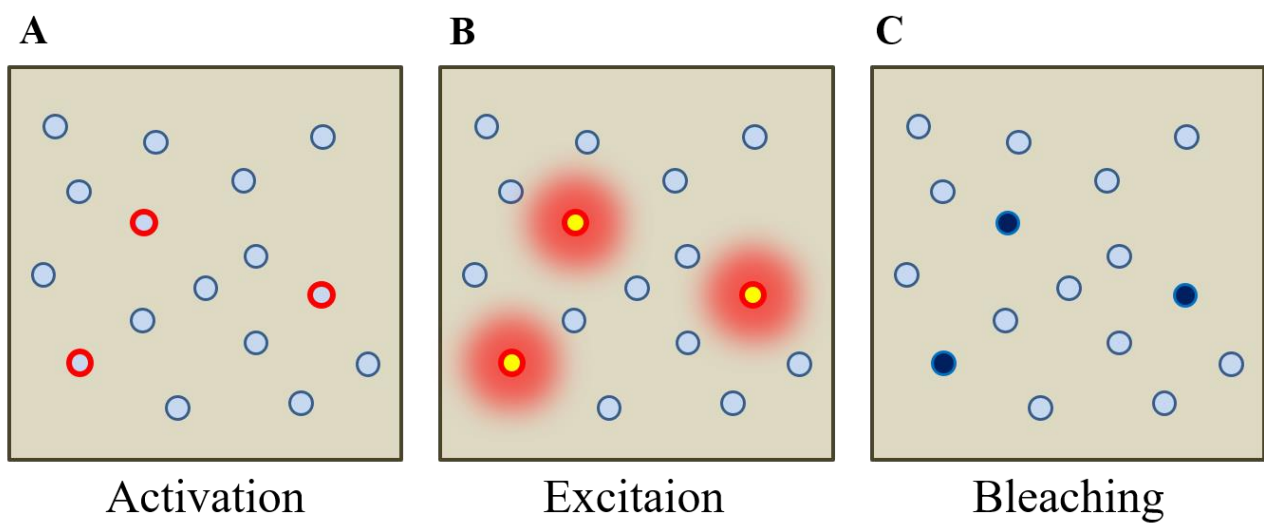


圖 1-7 光啟動定位顯微鏡運作原理示意圖。(A)隨機活化螢光分子。

(B) 激發隨機活化之螢光分子。(C) 光漂白隨機活化之螢光分子。

獲得比傳統顯微鏡解析能力高 10 倍以上的超高解析螢光圖。

1.5.2.2 隨機光學重建顯微鏡

西元 2006 年，美國科學家莊小威開發了一種藉由可光轉換的螢光分子對來突破繞射極限的顯微鏡技術，此技術被稱為隨機光學重建顯微術¹⁴。這項技術的原理與先前提到的光啟動定位顯微術相似，不同之處在於其成像過程使用的染料是由 Cy3 和 Cy5 組成的有機螢光小分子對而不是蛋白質大分子，其中，花青染料 Cy5 是主要的可光轉換螢光分子，而 Cy3 為輔助螢光分子，用來促進 Cy5 的轉換。研究指出，透過將 Cy3 和 Cy5 同時共價鍵結至雙股 DNA 分子的相反鏈上，使兩螢光團距離接近足夠組成能量傳遞體系，同時透過具有除氧系統的 Tris-HCl (pH=7.5) 緩衝溶液成像，以降低螢光染料光漂白的速率。當以波長為 638 nm 紅光雷射與 532 nm 的綠光雷射交替照射 Cy3-Cy5 螢光分子對時，同時另外以低強度的 638 nm 紅光雷射連續照射來偵測螢光狀態，發現 Cy5 螢光分子在不同波長光照射下能在兩種不同狀態之間相互轉換，分別為在紅光雷射照射後不發光的暗態 (off state) 以及在綠光雷射活化後的螢光態 (on state)。若改以紅光雷射持續照射螢光分子對，期間再週期性的打開和關閉綠光雷射。當綠光射關閉時，紅光雷射將 Cy5 螢光分子轉換至暗態，而當綠光雷射

打開並控制其強度至足以與紅光雷射的作用競爭時，Cy5 螢光分子便會恢復到螢光態¹⁵。

如圖 1-8 所示，Cy5 螢光分子的光轉化性質是由於在長波長的光照條件下，Cy5 分子與硫基化合物產生親核加成反應，破壞了 Cy5 分子的共軛結構使染料進入暗態，若在沒有任何激發光下，其在暗態的生命期可達到數小時。在短波長的光照條件下產生逆向反應釋放加成的硫基化合物，恢復了 Cy5 分子原本的共軛結構使其進入螢光態⁽¹¹⁾，值得注意的是，該反應的難易度與反應速率與螢光分子多甲川鏈的共軛長度有關，類似的反應是無法發生在 Cy3 分子上，但若是缺少 Cy3 輔助螢光分子或是增加 Cy3 分子與 Cy5 分子間的距離，將會造成 Cy5 分子螢光態的光轉換率與轉換速度大幅降低⁽¹⁰⁾，儘管 Cy3 分子輔助促進 Cy5 分子光轉換恢復的機制仍不清楚，Cy3 螢光分子對於將 Cy5 分子從暗態轉變為螢光態仍是不可或缺的。

隨機光學重建顯微鏡技術採用了 Cy3-Cy5 螢光分子對，利用其可光轉化的光學性質，在時間上分離相互重疊發光的螢光分子，然後重建得到高解析度的螢光圖像。隨機光學重建顯微術成像的過程包含一系列的週期成像，如圖 1-9 所示，假設一個以 Cy3-Cy5 螢光分子對標記的六聚體，所有的螢光分子都可被高強度的紅光雷射轉化至暗態，在每個成像循環裡，綠光雷射只會活化螢光分子團的一小部分，因此

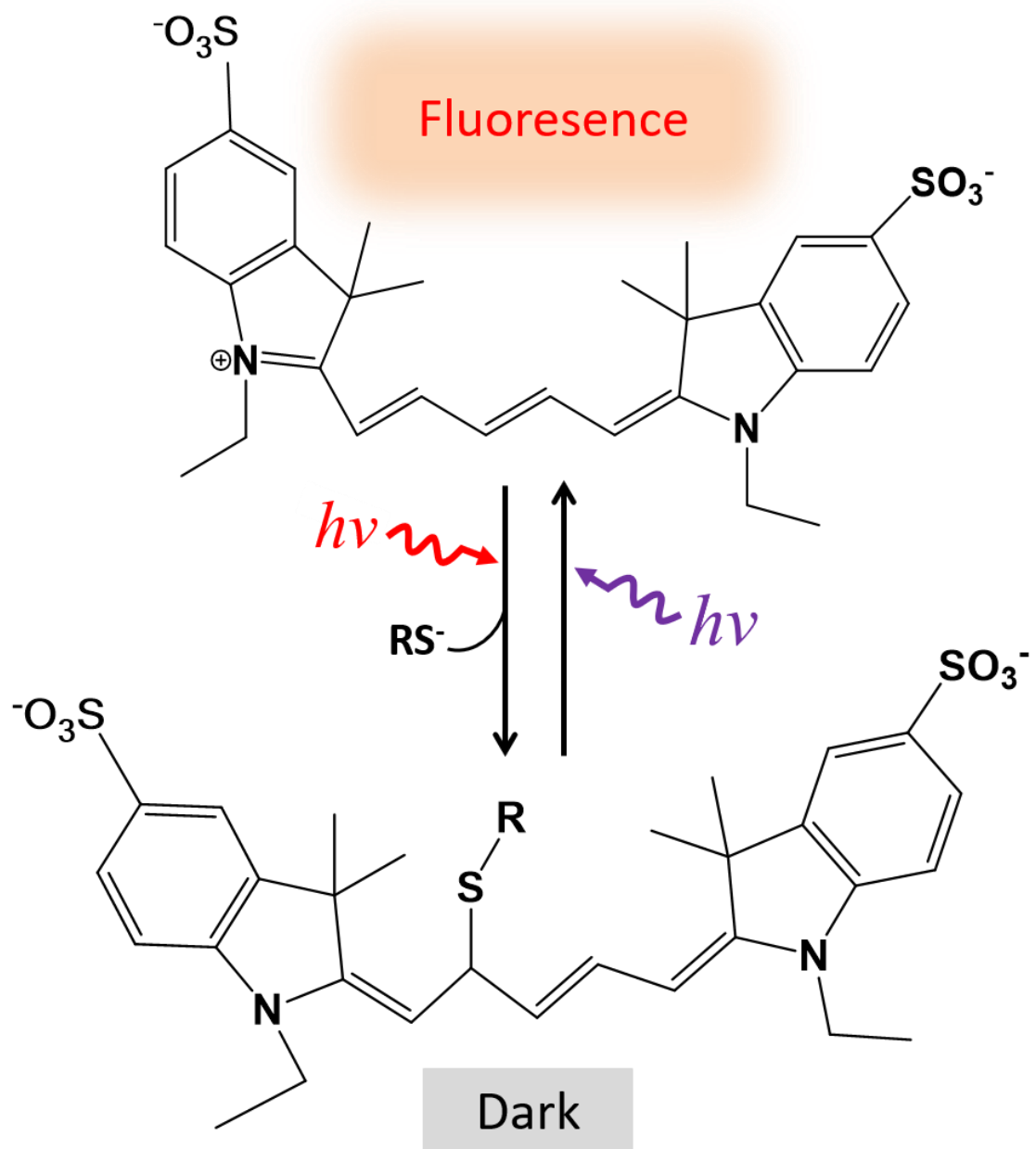


圖 1-8 Cy5 螢光分子之光轉化示意圖。在波長 647 nm 雷射照射下，Cy5 螢光分子能與硫醇產生親核加成反應進入暗態；Cy5 螢光分子在波長 405 nm 雷射照射下能釋放硫醇進入螢光態。

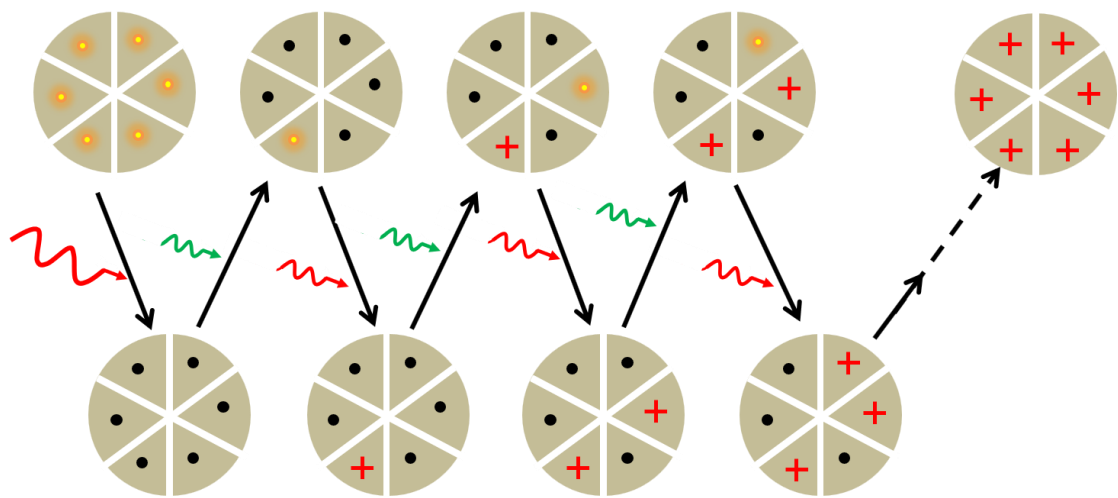


圖 1-9 隨機光學重建顯微鏡運作原理示意圖。首先通過高強度的 640nm 雷射將所有螢光分子轉換至暗態，接著以 532 nm 雷射隨機轉換部分螢光分子至螢光態，再以 640 nm 雷射激發螢光分子並定位其中心位置，最後經由多次成像循環重建成超解析圖像。

能在密集的螢光分子中區分個別的成像。接下來在紅光雷射照明下，Cy5 分子持續放出螢光直到其再度回到暗態，過程中單個螢光團成像提供了點分散函數，再以二維高斯函數擬合該圖像定位螢光分子中心位置。在螢光分子對永久性光漂白之前能夠被打開關閉數百次，且每個轉換週期能夠偵測到約 3000 個光子，多次重複這個過程，每次隨機活化不同的螢光分子並成像定位其精確位置，最後再把所有成像重建成一分辨率約為 20 奈米的超解析螢光圖像。

1.5.2.3 直接隨機光學重建顯微術

西元 2008 年至西元 2009 年間，Heilemann 等人發現商品化的花青螢光染料（如 Cy5）、羅丹明螢光染料（如 Alexa Fluor 647）及噁嗪螢光染料（如 ATTO655）可以在沒有輔助螢光分子促進下同樣能在不同波長的光照射下實現暗態與螢光態之間的轉換¹⁶⁻¹⁷，由於其超解析成像概念類似於隨機光學重建顯微術，但操作過程更簡單直接，因此將該方法命名為直接隨機光學重建顯微術（direct stochastic optical reconstruction microscopy，簡稱為 dSTORM）。

直接隨機光學重建顯微術成像循環依賴三大要素：(1) 使用單一可光轉換的螢光分子染料。(2) 在不同時間隨機激活部分螢光分子以實現區分空間中個別的螢光訊號。(3) 以奈米級精準度定位螢光單分

子。以 Cy5 螢光分子為例，不同於隨機光學重建顯微術中的 Cy3-Cy5 螢光分子對，Cy5 分子可以在沒有 Cy3 分子輔助下，以激發波長為 647 nm 紅光雷射和 514 nm 綠光雷射同時照射下達到在暗態與螢光態之間的可逆轉換數百個循環。在 647 nm 紅光雷射照射下，螢光分子轉換至暗態，其速率常數為 k_{off} ，改以 514 nm 綠光雷射照射時，螢光分子由暗態轉換至螢光態，其激活速率常數為 k_{on} ，值得注意的是，在 dSTORM 系統中所使用的綠光雷射強度必須比使用輔助螢光分子的方法還高約 200 倍才足夠將螢光分子恢復至螢光態，同時速率常數 k_{on} 、 k_{off} 與相對的照射光強度呈現線性關係，這意味著我們可以藉由調節紅光雷射與綠光雷射的強度來控制螢光分子在暗態與螢光態之間的轉換速率與螢光分子成像密度。dSTORM 的操作是從明亮的螢光態開始，其中螢光分子必須轉換至較穩定且可逆的暗態，先以足夠低的紅光雷射將螢光分子轉入暗態，以確保最小程度上的光破壞，再調節綠光強度以確保視野中螢光分子在不同時間下僅部分被激活並放射螢光，並通過全內反射螢光顯微鏡產生螢光成像，期間所得到的螢光分子訊號將藉由高斯函數擬合分析其點分散函數來定位出精確位置，在經過數千次定位分析單分子螢光基團後重建出 dSTORM 圖像。

研究指出螢光分子在暗態與螢光態之間的可逆轉換涉及到硫醇

的還原與氧分子的氧化，如將 ATTO 655 螢光染料溶解在含 MEA 的溶液中，並以波長為 658 nm 激發光照射，暗態的形成導致螢光強度幾乎成指數下降，透過打開比色管以輕微攪拌的方式使氧回溶，在幾秒鐘內螢光分子即可回到螢光態。相反的，螢光分子若在沒有硫醇的情況下，其螢光強度保持恆定，因此證明硫醇的添加有助於將螢光分子轉換至暗態及氧分子的存在能氧化螢光分子回到螢光態。螢光分子光轉換機制如圖 1-10 所示，螢光分子在激發光照射之下從單重基態躍遷至單重激發態，經由震動鬆弛或內轉換至第一激發態，從第一激發態可產生自發螢光回到單重基態或是通過系間跨越至三重態。三重態螢光分子可藉由能量轉換與三重態氧反應產生單重態氧回到單重基態，或是與硫醇反應形成螢光分子自由基陰離子。螢光分子自由基陰離子可以透過氧分子氧化或是以波長為 400 nm 左右的光照射回到單重基態。對於一些螢光分子（如 ATTO 655 和 ATTO 680）可以再接受第二個電子後轉換至完全還原的無色形式（leuco-form），其也能與氧分子反應恢復到單重基態。

螢光分子穩定的暗態形成與轉換速率的調節是實現超解析影像的關鍵要素，在 dSTORM 的操作中，一開始必須將可光轉換的有機螢光團藉由硫醇的還原以 k_{off} 的速率轉換至暗態（穩定的自由基陰離子），再通過氧分子還原或紫外光以 k_{on} 的速率恢復至螢光態。這些轉

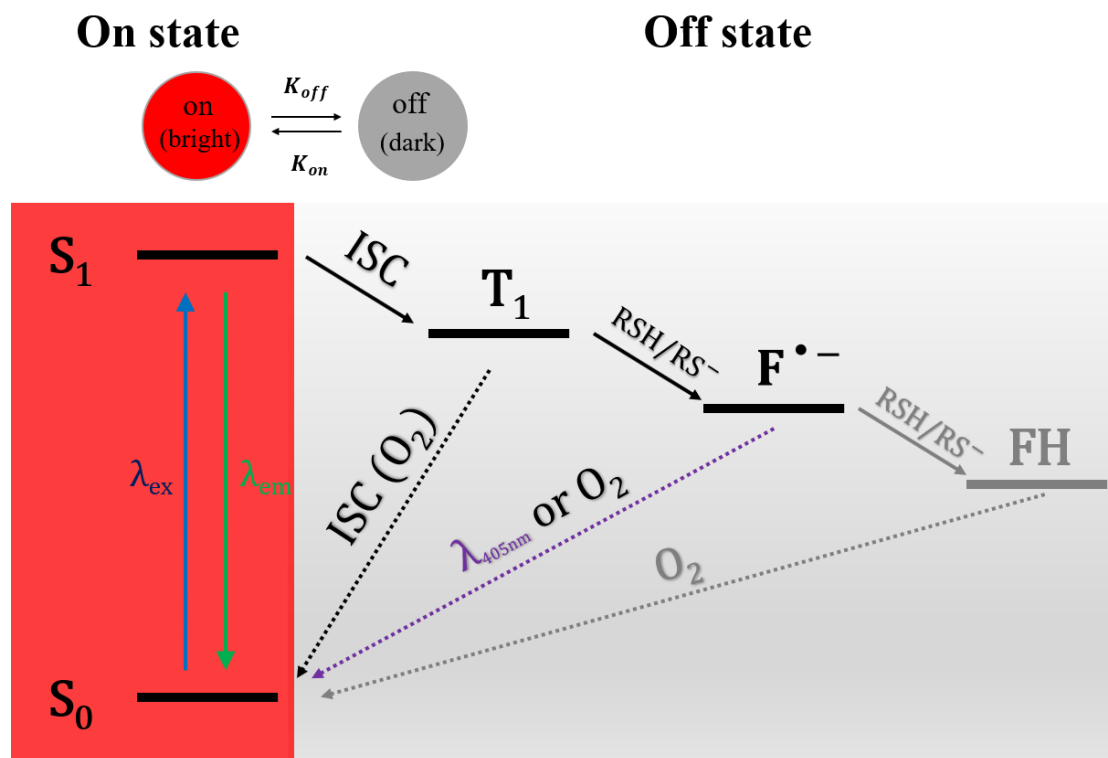


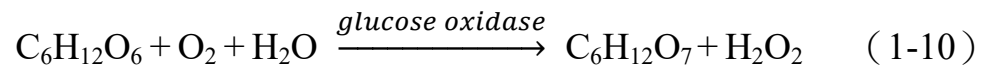
圖 1-10 dSTORM 螢光分子光轉換機制。螢光分子可藉由激發光激發至激發態後回到基態並釋放出螢光，同時激發態螢光分子也可透過系間跨越至三重態，再藉由硫醇還原至三重態不同能階，最後透過波長為 405 nm 紫光雷射照射或是氧氣氧化以非放光方式恢復到基態。

換速率直接控制螢光態分子的密度，因此對超解析圖像的品質具有顯著的影響。在此我們引入兩轉換速率與兩態生命週期的比值 r 做更詳細的討論。

$$r = k_{off}/k_{on} = \tau_{off}/\tau_{on} \quad (1-9)$$

其中， τ_{off} 與 τ_{on} 分別代表暗態與螢光態的生命週期。由 1-8 式可知 r 值越高可確保在螢光態的分子越少，可避免空間上點分散函數的重疊。文獻指出，可光轉換螢光分子其暗態的生命週期為 10 毫秒至 100 毫秒之間¹⁸⁻²⁰，對於 τ_{off} 短的螢光分子，可透過增加激發光強度以減少 τ_{on} 來產生高的 r 值。相反的，若是對於 τ_{off} 長的螢光分子，僅需要較低激發光強度就能產生足夠高的 r 值。暗態與螢光態之間的轉換速率常數（分別為 k_{off} 和 k_{on} ）與照射光強度呈線性關係，而 k_{off} 值可由單重態激發光強度、系間跨越產率及還原硫醇試劑濃度來決定。 k_{on} 之值可由紫外光強度與氧分子濃度來決定，其中氧分子濃度由除氧系統（oxygen scavenger system）來控制，除氧系統包含過氧化氫酶（catalase），葡萄糖（glucose）及葡萄糖氧化酶（glucose oxidase）三種成分。如 1-10 式，葡萄糖在葡萄糖氧化酶催化下氧化形成過氧化氫，如 1-11 式，過氧化氫酶又將過氧化氫還原成氧和水，每當經過一次氧化還原反應後，氧分子濃度將越來越低，因此可以透過調控除氧

系統中各成分濃度來控制氧分子濃度。最後我們藉由控制 k_{off} 和 k_{on} 值找出最適當的轉換速率比值 r 以符合不同樣品所需要的條件並得到高品質的超高解析螢光圖像。



第二章 端粒之簡介

2.1 端粒的發現

西元 1930 年，美國科學家穆勒（Hermann Muller）與麥克林托克（Barbara McClintock）分別以 X 射線誘導果蠅與玉米染色體使其缺失斷裂，發現斷裂的染色體彼此之間會連接在一起，即所謂的染色體融合，而原本完整的染色體卻不會有這種現象，因此他們推論染色體末端一定有特殊的結構來保護染色體間不會相連接，同時穆勒也結合希臘字中「末端」（telo）與「部分」（mere）兩詞，將這個末端結構命名為端粒（telomere）。儘管當時他們推測染色體末端存在這種保護結構，但對端粒序列及保護染色體的機制仍然是個謎團，一直到西元 1978 年，美國科學家布萊克本（Elizabeth Blackburn）透過純化出原生動物四膜蟲（tetrahymena）細胞內線性核糖體核酸（ribosomal DNA，簡稱為 rDNA），再以限制性內切酶消化 rDNA 獲取其末端端粒 DNA 片段並定序，她發現端粒 DNA 是由六個鹼基序列 TTGGGG 隨機重複 20~70 次所組成²¹，雖然布萊克本是首位解出端粒序列的科學家，但她卻無法證實這樣重複的端粒序列是否就能保護染色體的完整性。西元 1980 年，布萊克本與索斯塔克（Jack Szostak）在一場核酸研討會中相遇，當時索斯塔克在自己的研究中觀察到當送入一線性 DNA 至酵母菌後，此線性 DNA 最後不是被重組就是被降解，而布萊

克本所研究的四膜蟲核糖體核酸同樣也是線性 DNA，但卻能穩定存在於四膜蟲細胞內，因此她大膽提出四膜蟲 DNA 末端 TTGGGG 重複序列能夠保護線性 DNA 的假設。最後他們合作將純化的四膜蟲 TTGGGG 重複序列與酵母載體連接起來形成一線性酵母質體並送入酵母菌中，實驗結果發現此線性質體不但沒有被重組或降解，而且還可以被複製，這證明了重複的端粒序列確實能夠維持染色體的完整性。另外他們還發現，酵母菌竟然還能將本身不同於四膜蟲的端粒序列添加到原本四膜蟲端粒序列後面，這說明了儘管酵母菌與四膜蟲在真核生物界中親緣關係非常遙遠，但酵母菌卻能透過自身端粒延長的機制來延長四膜蟲端粒序列，證明了真核生物可能是以類似的端粒延長機制來維持端粒長度以保護染色體之完整性²²，同時這兩位科學家也因為發現了端粒保護機制而獲頒 2009 諾貝爾生醫獎。

2.2 人類端粒結構與功能

端粒是位於真核生物染色體末端特化的結構，其由富含 G/C 重複序列雙股 DNA 與端粒結合蛋白（telomere-binding protein）所組成²³，如圖 2-1。其中人類的端粒重複序列由 5' TTAGGG 3' 及互補序列 3' AATCCC 5' 構成，長度約為 5~15 kb²⁴，且研究發現端粒序列 3' 末端會比 5' 末端多出約 50~500 個核苷酸，形成一富含 G (G-rich) 的懸垂

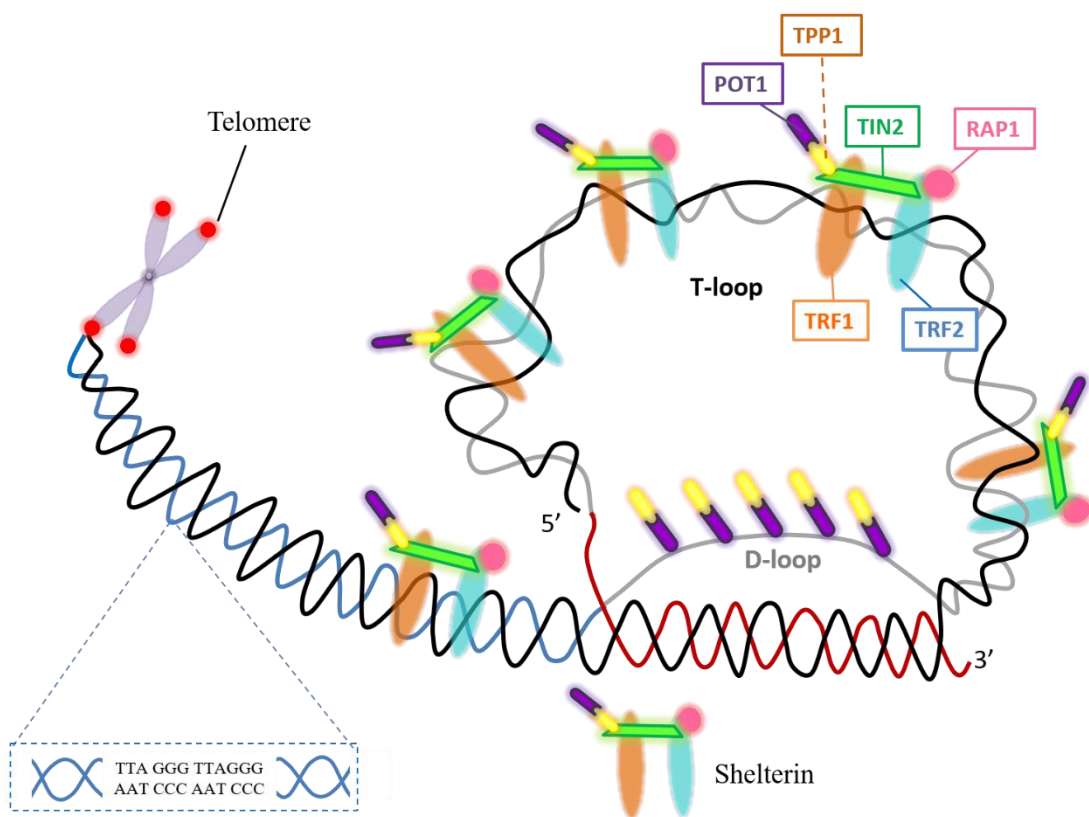


圖 2-1 端粒結構示意圖。

單股區域 (G-overhang)，此懸垂單股會在 DNA 複製完成後插入端粒 DNA 雙股區域形成 T 環 (T-loop) 與 D 環 (D-loop) 兩種高級結構，這種環型結構就如同在 DNA 末端加上一個帽子，不僅能防止端粒 DNA 被降解，同時也能保護染色體末端避免染色體融合或重排以維持其完整性。

端粒的存在也解決了西元 1972 年沃森 (James D. Watson) 所提出的 DNA 末端複製缺陷 (end-replication problem) 的問題²⁵，我們都知道 DNA 複製發生在細胞週期中的 S 期，首先由 DNA 解旋酶 (helicase) 將 DNA 雙股分開形成一複製叉 (replication fork) 的結構以產生兩個單股 DNA 作為複製模板，接著引子酶 (primase) 合成出一小片段的 RNA 引子 (primer) 提供了 DNA 新股複製的起點，當 DNA 聚合酶 (DNA Polymerase) 連接到 RNA 引子上後便可開始進行 DNA 複製。由於 DNA 聚合酶只能以 5'→3' 的方向進行合成，因此 DNA 複製又分為領先股 (leading strand) 與遲滯股 (lagging strand) 兩種不同方式來合成，其中領先股可依 5'→3' 的方向一直合成到 DNA 末端，而遲滯股卻因為合成的方向與解旋酶運作的方向相反，所以無法以此種方式持續合成，因此 DNA 聚合酶只能以岡崎片段 (Okazaki fragment) 一段一段添加的方式來進行合成。當新的 DNA 被製造完成後，核糖核酸酶 (ribonuclease，簡稱 RNase) 會移除所有 RNA 引

子，而 DNA 聚合酶會再合成新的 DNA 來填補這些缺口，最後由 DNA 連接酶（DNA ligase）連接所有 DNA 片段以完成 DNA 複製。雖然 DNA 複製機制看似完美，但唯一美中不足之處就是當遲滯股中最後一個 RNA 引子被去除後，由於 5'端沒有前一個核苷酸可以讓 DNA 聚合酶複製延長，導致在每一個 DNA 新股的 5'端都會形成一缺口（gap），此現象就是所謂的 DNA 末端複製缺陷。細胞若每複製一次就必須損失末端一小片段 DNA，如此細胞經過不斷的複製分裂，可想而知最後重要的基因必定會丟失，因此端粒的存在便成了重要的緩衝機制，其提供了可消耗的重複序列以確保 DNA 複製時基因的完整性。特別要注意的是，即使端粒提供了重複的緩衝序列，但不代表細胞因而得到永生能不停的分裂，隨著細胞分裂次數增加，端粒長度也會逐漸縮短，當端粒縮短至一臨界長度時，細胞便會達到海佛烈克極限而停止分裂最終進入凋亡期，所以端粒長度又被稱為「生物鐘」（biological clock），其可以決定細胞持續分裂增生或是退出細胞週期邁入死亡。

2.3 人類端粒結合蛋白

人類端粒結合蛋白（shelterin，又稱 telosome）是由六個亞基蛋白所組成，分別為端粒重複序列結合因子 1（telomeric repeat binding

factor 1，簡稱為 TRF1）、端粒重複序列結合因子 2（telomeric repeat binding factor 2，簡稱為 TRF2）、端粒保護蛋白 1（protection of telomeres 1，簡稱為 POT1）、TRF1 相互作用核蛋白 2（TRF1-interacting nuclear protein 2，簡稱為 TIN2）、三肽基肽酶 1（tripeptidyl peptidase 1，簡稱為 TPP1）及阻滯活化蛋白 1（repressor/activator protein 1，簡稱為 Rap1）。Shelterin 是透過 TRF1 和 TRF2 兩種雙股 DNA 結合蛋白連接在端粒上，而 TPP1 緊鄰著 POT1 及 TIN2 兩種亞基蛋白，一端藉由 POT1 結合至端粒單股 DNA 上，而另一端則藉由 TIN2 同時與 TRF1 和 TRF2 相連接，最後一個 Rap1 亞基蛋白僅單獨連接在 TRF2 上。

2.3.1 TRF1 和 TRF2 之功能

TRF1 與 TRF2 包含各自的 C 端 Myb 結構域，其能識別端粒 DNA 中 5'YTAGGGTTR 3'序列進而與 DNA 雙股結合，並透過共同的 TRF 同源（TRF homology，簡稱 TRFH）結構域（domain）連接形成一同源二聚體。其中 TRF1 的 N 端是由天門冬胺酸（aspartic acid，簡稱為 Asp 或 D）及麩胺酸（glutamic acid，簡稱為 Glu 或 E）兩種不同的酸性胺基酸所組成。相反的，TRF2 的 N 端是由甘胺酸（glycine，簡稱為 Gly 或 G）及精胺酸（arginine，簡稱 Arg 或 R）兩種鹼性胺基酸所

組成的 Gly/Arg-rich 結構域(GAR domain)。研究指出 TRF1 與 TRF2 皆是端粒長度的負調控因子，其中 TRF1 負責監控端粒長度，通過募集端粒酶抑制劑 PINX1 (PIN2/TERF1-interacting telomerase inhibitor 1, 簡稱 PINX1) 至端粒來抑制端粒酶的活性以防止端粒延長，因此 TRF1 過度表達會造成端粒長度逐漸縮短，反之，若端粒含有較少的 TRF1，則端粒就越有機會被延長²⁶。

TRF2 在端粒中扮演的角色則是促使端粒 DNA 3'末端懸垂單股區域 (G-overhang) 插入端粒 DNA 雙股區域內與雙股部分重複序列重新互補配對，同時也置換出與懸垂單股區域序列相同的單股 DNA 因而形成 T 環 (T-loop) 與 D 環 (D-loop) 結構來保護端粒末端，而這種特殊結構同時也會阻礙端粒酶對端粒的延長，倘若 TRF2 表達量過高可能導致端粒縮短，而抑制 TRF2 表達量卻也會使 T 環結構無法形成而使端粒失去保護²⁷。

2.3.2 TIN2 之功能

TIN2 位於 shelterin 的中心位置，其能同時和 TRF1, TRF2 與 TPP1 連接，從而在與端粒 DNA 雙股及單股作用的亞基蛋白間形成橋梁。其中，TIN2 與 TRF1 相互作用是由 TIN2 C 端的 FxLxP (x 可為任何胺基酸) 結構序列 (motif) 與 TRF1 的 TRFH 結構域所介導，TIN2 又

以不同的 N 端結構域分別與 TRF2 鉸鏈 (hinge) 結構域及 TPP1 C 端連接。研究指出 TIN2 能維持 TRF1 及 TRF2 之活性，穩定它們在端粒的水平與位置以及加帽 (capping) 的功能⁽⁷⁾，TIN2 的缺失或突變會導致 DNA 損傷反應 (DNA damage response) 及阻礙端粒酶募集至端粒影響端粒長度調節²⁸⁻³⁰。

2.3.3 TPP1 和 POT1 之功能

TPP1 為連接 TIN2 與 POT1 的橋樑，TPP1 分別藉由其 C 端和 N 端結構域與 TIN2 N 端及 POT1 C 端結構域相連接，而 POT1 又透過 N 端寡核苷酸結合折疊 (oligosaccharide binding fold, 簡稱 OB-fold) 結構域結合至端粒 DNA 單股上。研究結果表示 TPP1 能募集 POT1 至端粒，TPP1 與 POT1 的結合成異源二聚體能使 POT1 與端粒單股 DNA 間有更強的親和力，TPP1 的高度表達能吸引更多的 POT1 結合至端粒單股 DNA 上，而抑制 TPP1 之表達將影響 POT1 穩定性進而從端粒脫落，若更進一步抑制 TIN2 表達，TPP1 和 POT1 兩者皆會從端粒脫落，說明此異源二聚體也是需要 TIN2 存在才能結合至端粒 DNA 單股上。除此之外，TPP1 也具有調節端粒長度的功能，研究發現 TPP1 可通過其 OB 結構域募集端粒酶至端粒 3' 末端懸垂單股區域進行端粒延長，當 OB 結構發生突變則此募集作用將被迫停止，而

TPP1 的表達量又受 TIN2 影響，因此兩者被視為具有協同募集端粒酶的作用，另外 TPP1 與 POT1 也能協同提高端粒酶活性增強其合成能力³¹。

POT1 會優先與 3'末端懸垂單股 DNA 和 D 環上被置換出的單股 DNA 結合，當 POT1 表達量輕度減少於 3'末端單股 DNA，部分裸露出的單股 DNA 為端粒酶提供了合成模板，有助於端粒長度的增長，反之 POT1 表達量過高將會阻礙端粒酶對端粒 DNA 進行複製延長，另外 POT1 表達量若重度減少於 3'末端單股 DNA 時將導致複製蛋白 A(replication protein A，簡稱 RPA)與端粒單股 DNA 結合，進而活化 ATR 訊號途徑引發 DNA 損傷反應³²。

2.3.4 Rap1 之功能

Rap1 包含 RCT、Myb、BRCT、捲曲螺旋 (coiled-coil) 四種結構域，其中以 C 端 RCT 結構域連接至 TRF2。研究表示 Rap1 可透過 RCT、BRCT 及捲曲螺旋三種結構域協同 TRF2 共同募集如 Rad50、Mre11、PARP1 和 Ku86 / Ku70 等 DNA 修復蛋白來維持端粒長度。人類 Rap1 為端粒長度的負調控因子，抑制 Rap1 表達量將使端粒長度變長³³。

2.4 端粒長度維持機制

細胞複製分裂期間由於 DNA 末端端粒的存在，使基因組能完整被複製，然而在複製過程中當遲滯股最後一個 RNA 引子被去除後，5'端缺少前一個核苷酸讓 DNA 聚合酶進行複製，導致端粒重複序列 DNA 在每次細胞分裂後逐漸縮短進而限制大多數細胞的壽命，因此端粒維持機制是細胞增殖的必需條件，端粒維持機制共有兩種，一種為端粒酶介導延長機制，另一種則是端粒替代延長機制。

2.4.1 端粒酶介導延長機制

西元 1985 年，美國科學家格萊德（Carol W. Greider）首次在四膜蟲中發現一種用來延長 DNA 末端端粒序列的轉移酶，並把它命名為端粒序列轉移酶（telomere terminal transferase），簡稱為端粒酶（telomerase）。端粒酶是一種核糖核蛋白複合物，其核心由催化端粒酶活性的端粒酶逆轉錄酶（telomerase reverse transcriptase，簡稱 TERT）及提供複製延長模板的端粒酶核糖核酸（telomerase RNA，簡稱 TER）所組成。端粒複製的啟動首先需要端粒結合蛋白協同募集端粒酶至端粒中，接著透過端粒酶核糖核酸與部分端粒 3'末端懸垂單股進行互補配對，由端粒序列轉移酶催化合成 TTAGGG 重複序列，在複製出一個完整的重複序列後，單股 DNA 和 RNA 會分離以允許 RNA 模板與

下一個單股 DNA 配對並啟動另一個端粒序列複製³⁴。

2.4.2 端粒替代延長機制

在端粒酶失活或不足的狀況下，部分細胞可以啟動端粒延長替代機制（alternative lengthening of telomeres，簡稱為 ALT），透過同源介導 DNA 修復（homology-directed DNA repair，簡稱為 HDR）之方式來維持端粒長度。當端粒中雙股 DNA 發生斷裂時，複製因子 C1-5（replication factor C subunit 1-5，簡稱為 RFC1-5）會迅速與雙股 DNA 損傷位點結合，接著募集增殖細胞核抗原（Proliferating cell nuclear antigen，簡稱為 PCNA）與 DNA 聚合酶 δ （DNA polymerase δ ，簡稱為 Pol δ ）至雙股斷裂處，最後以配對染色體同源 DNA 片段或是染色體外重複序列（extra-chromosomal telomeric repeats，簡稱為 ECTR）DNA 為複製模板，從而對端粒進行延長³⁵。

2.5 端粒長度與衰老、癌症之關係

雖然端粒酶介導延長機制與端粒替代延長機制能克服 DNA 末端複製缺陷並且延長端粒，但由於端粒酶只高度表達在幹細胞、生殖細胞及癌細胞中，且替代延長機制也只發生在癌細胞內，因此缺乏端粒酶的人體正常體細胞是無法透過此兩種延長機制來維持端粒長度。隨

著細胞分裂次數增加或是環境氧化壓力都能導致端粒長度縮短，當端粒長度達到臨界長度時細胞便進入停滯狀態不再分裂生長，同時長度短的端粒將失去其封端能力並激活 DNA 損傷反應機制途徑誘導細胞衰老甚至凋亡³⁶⁻³⁷。人體正常體細胞與癌症細胞最大的差異在於正常體細胞分裂次數備受限制，而癌症細胞卻能夠無限增殖，研究指出百分之八十五的癌症細胞可透過端粒酶介導延長機制來維持端粒長度，另外百分之十五的癌細胞則是藉由端粒替代延長機制來保持端粒長度，如此癌細胞便能巧妙的躲過複製衰老而無限的進行細胞分裂與增殖³⁸⁻³⁹。

2.6 端粒長度檢測方法

2.6.1 末端限制性片段分析

末端限制性片段分析 (terminal restriction fragment, 簡稱為 TRF) 是最早被用來確定端粒長度而開發的技術，目前此方法也是一致被認同的金標準 (gold standard) 方法且被廣泛使用。該方法使用限制性內切酶組合如 *HinfI/RsaI*、*HphI/MnII*、*MseI/NdeI*、*BfaI/CviAII/MseI/NdeI* 來消化 DNA 至小片段，由於這些內切酶在端粒與亞端粒區域缺乏辨識位點，因此不會切割到端粒序列。DNA 徹底消化完後以瓊脂糖凝膠電泳 (agarose gel electrophoresis) 分離不同大小的 DNA 片段，接

著透過使用專一性端粒雜合探針的南方墨點法（southern blotting）或是凝膠內雜合（in-gel hybridization）來可視化端粒 DNA 片段，端粒平均長度檢測則藉由測量可視化端粒 DNA 片段之光密度與已知長度的 DNA 梯度片段（DNA ladder）標準品來進行評估。目前用於計算端粒平均長度的方程式有如下兩種：

$$\text{mean TRF length} = \frac{\sum(OD_i)}{\sum(OD_i/L_i)} \quad (2-1)$$

$$\text{mean TRF length} = \frac{\sum(OD_i \times L_i)}{\sum(OD_i)} \quad (2-2)$$

其中 OD_i 代表位於 i 處位置之光密度（optical densit）， L_i 代表位於 i 處位置之末端限制性片段長度。此兩種計算方式現在都有人在使用，2-1 式可能會低估端粒真實長度，而 2-2 式則可能會低估端粒真實長度⁴⁰。

末端限制性分析技術之所以廣泛被使用，其原因在於不需要昂貴的實驗設備且便利於對新概念研究提供佐證。該方法的局限在於限制性內切酶無法完全消化鄰近端粒區的亞端粒 DNA 導致實驗結果將高估真實端粒長度。此外，根據使用不同的限制性內切酶組合也會產生不同大小的亞端粒長度，因此若各實驗在使用限制性內切酶組合上無法達到共識，則所測得之端粒平均長度則無法在各種研究之間進行比

較。其他限制還包括需要大量的 DNA 起始物（約為 0.5~5 μ g）和相對長的實驗時間，對於小於約 2kb 的短端粒 DNA 則難以檢測和定量。實驗最後測得之端粒長度為平均值，並不能得知個別端粒長度因而無法提供單個染色體之端粒訊息。

2.6.2 聚合酶連鎖反應法

為了克服末端限制性片段分析需要大量 DNA 起始物的缺點，近年來發展出一些基於聚合酶連鎖反應的端粒長度分析方法，如定量即時聚合酶連鎖反應（quantitative real-time polymerase chain reaction，簡稱為 Q-PCR），單色多重定量聚合酶連鎖反應（monochrome multiplex quantitative PCR，簡稱為 MMqPCR），絕對端粒長度（absolute telomere length，簡稱為 aTL）定量即時聚合酶連鎖反應。在端粒 DNA 擴增過程中所使用的引子對被設計成每六個鹼基含有一個錯配位鹼基，每六個鹼基中只有 3' 末端最後五個鹼基能與端粒 DNA 互補以提供 DNA 聚合酶在雜合過程中在 3' 末端進行延伸，由於引子對間 3' 末端鹼基不能與其相對應的鹼基形成穩定的鹼基對，因此能防止 DNA 聚合酶對引子對二聚體進行延伸。

定量即時聚合酶連鎖反應法是最先用來檢測端粒長度的聚合酶連鎖反應方法，通過測量端粒擴增產物訊號（T）與另一管中單拷貝

基因訊號 (S) 之比值 (T/S) 來定量端粒長度，但由於在製備端粒反應管及單拷貝基因反應管過程中會有不可避免的取樣誤差，導致兩管 DNA 質量不在同一個水平上從而影響測量的精確度⁴¹，因此後來又衍生出單色多重定量聚合酶連鎖反應法來解決這項缺點，此方法允許端粒 DNA 與單拷貝基因在同一管中進行擴增，並可在不同 DNA 質量的樣品之間做比較⁴²。另外，絕對端粒長度定量即時聚合酶連鎖反應法則是使用已知的 84 個鹼基端粒，經過一系列的稀釋建立成標準曲線，以提供端粒鹼基長度之評估⁴³。

基於聚合酶連鎖反應的端粒長度分析優點在於不需要大量的 DNA 起始物（約為 50ng），研究設備取得容易且相對成本較低因而允許高通量檢測。其缺點在於只能測量端粒平均長度而無法提供單個染色體上端粒長度訊息，又單拷貝基因在癌症細胞中因多倍體（polyploidy）或非整倍體（aneuploidy）的情況而被複製或丟失導致表達量不同，所以只適用於檢測正常二倍體（diploid）或核型穩定的樣品。

2.6.3 定量螢光原位雜合

端粒重複序列之定量螢光原位雜合（quantitative fluorescence in situ hybridization，簡稱為 Q-FISH）是透過端粒螢光標記探針與中期

染色體進行雜合，再檢測其螢光強度並與已知端粒長度標準品做比較來分析端粒長度。通常用於該測量方法的端粒螢光標記探針為合成肽核酸 (PNA)，其由中性不帶電荷之骨架構成，已有研究指出 PNA 探針相較於 DNA 探針能提供更高的雜合效率。定量螢光原位雜合法的優勢在於可以測量所有染色體上端粒個體的長度，其長度分辨率可達到約 200 個鹼基，同時該方法也能提供單個染色體上 p 臂 (p-arms) 及 q 臂 (q-arms) 端粒長度訊息，且能夠計算出更精確的平均端粒長度。此技術最大的缺點在於無法檢測不具有絲分裂活性之細胞 (如衰老細胞) 或低增殖率細胞，同時中期 Q-FISH 方法耗時也耗力，檢測上需使用螢光顯微鏡，因此成本相對較高⁴⁴⁻⁴⁵。

2.6.4 流式細胞螢光原位雜合

流式細胞螢光原位雜合法 (flow cytometry and flow fluorescence in situ hybridization, 簡稱為 Flow-FISH) 為結合螢光原位雜合法與流式細胞儀之技術，利用端粒螢光標記肽核酸探針與溶液中懸浮細胞雜合，端粒螢光訊號則透過流式細胞儀進行測量，接著以末端限制性片段分析所檢測出之平均端粒長度為參考標準來分析端粒平均長度。該方法的優點在於可同時分析複雜的細胞混合群體，依照懸浮細胞不同大小、形態及抗體標記之特性來分選出不同的細胞亞群，並檢測出每

一顆細胞的端粒平均長度。其缺點也與大多數端粒長度分析方法一樣，僅能測得端粒平均長度而無法獲得單個染色體端粒長度資訊，同時對技術要求較高，耗時且不易操作⁴⁶。

第三章 以超解析影像技術觀測端粒長度

3.1 研究動機

端粒是人體中參與基因穩定維持的重要細胞元素，完整的端粒功能必須依賴其在 DNA 末端長度之維持。近十年來的研究已表明端粒長度變化在衰老及包括癌症的各種疾病中扮演著極為重要的角色，因此分析端粒長度的變化便顯得格外重要。至今已發展出許多檢測端粒長度的方法，其中包括末端限制性片段分析 (TRF)，定量即時聚合酶連鎖反應 (Q-PCR)，定量螢光原位雜合 (Q-FISH) 及流式細胞螢光原位雜合 (Flow-FISH) 等，這些方法所測量到的長度皆為未線性化拉伸的端粒相對長度或平均長度，目前基於線性化端粒絕對長度之檢測方法還未曾被發表過，因此本實驗將透過線性化沉積端粒 DNA 至修飾有疏水性聚合物之玻片表面，並結合 dSTORM 超解析影像顯微技術來觀測端粒絕對長度。

3.2 實驗材料與方法

3.2.1 實驗試藥

實驗所使用之培養基 (DMEM)、胎牛血清 (FBS) 及 0.5% Trypsin-EDTA 係由美國 Gibco 公司所購買。三合一抗生素 (Pen-Strep Ampho. Solution) 及丙酮酸鈉 (sodium pyruvate) 係由美國 Biological Industries

公司所購買。氯化鈉 (sodium chloride)、檸檬酸鈉 (sodium citrate)、醋酸 (acetic acid)、鹽酸 (hydrochloric acid)、氫氧化鈉 (sodium hydroxide)、葡萄糖 (dextrose)、半胱胺鹽酸鹽 (cysteamine hydrochloride)、維生素 C (L-ascorbic acid)、葡萄糖氧化酶 (glucose oxidase)、過氧化氫酶 (catalase)、胃蛋白酶 (pepsin) 及三聯吡啶氯化鈦六水合物 (Tris(2,2'-bipyridyl)dichlororuthenium(II) hexahydrate) 係由美國 Sigma-Aldrich 公司所購買。氯化鉀 (potassium chloride)、磷酸氫鈉 (disodium hydrogen phosphate) 及磷酸二氫鉀 (potassium dihydrogen phosphate) 係由日本 SHOWA 公司所購買。脫羧秋水仙素 (demecolcine)、三(2-羧基乙基)磷鹽酸鹽 (Tris-(2-Carboxyethyl)phosphine hydrochloride)、DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole)、蛋白酶 Proteinase K 及基因組 DNA 萃取套組 (Genomic DNA Mini Kit) 係由美國 Thermo Fisher Scientific 公司所購買。甲醯胺 (formamide) 與甲醇 (methanol) 係由德國 Merck 公司所購買。牛血清蛋白 (bovine serum albumin) 係由美國 UniRegion Bio-Tech 公司所購買。乙醇 (ethanol) 係由台灣景明化工所購買。甘油 (glycerin) 係由台灣聯工化學所購買。三羥甲基氨基甲烷 (Tris(hydroxymethyl)aminomethane) 係由美國 J. T. Baker 公司所購買。乙基苯基聚乙二醇 (NP 40) 係由英國 abcam 公司所購買。聚山

梨醇酯二十 (Tween 20)、3-氨基丙基三乙氧基矽烷 ((3-Aminopropyl)triethoxysilane)、硫酸銅 (cupric sulfate)、1-甲基咪唑 (1-methylimidazole) 及 1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亞胺鹽酸鹽 (1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride) 係由美國 Alfa Aesar 公司所購買。端粒螢光標記探針 TelC-Alexa 647 係由美國 PNA BIO 公司所購買。Zeonex 係由日本 ZEON 公司所購買。

3.2.2 螢光顯微鏡系統架構

本實驗使用之螢光顯微系統如圖 3-1 所示，包含四道功率可調式雷射光源，波長分別為 405 nm、488 nm、561 nm 及 647 nm，最大輸出功率皆為 140 mW，與另外一道功率固定為 50 mW 之雷射光源，波長為 532 nm。不同雷射光源分別利用美國 Semrock 公司製造之 dichroic beamsplitters LM01-427-25，LM01-503-25，LM01-552-25 及 LM01-613-25 將五道雷射匯聚成單一光束，以聲光可調濾波器 (acousto-optic tunable filter，簡稱為 AOTF) 來控制不同波長雷射通過與否，再經由雷射擴束鏡 (beam expander) 放大光束至約 1 inch 後使用可移動之透鏡將光束聚焦到顯微鏡中物鏡之後焦平面上，並透過調整此透鏡之垂直方向來實現全內反射式顯微鏡照射系統。

本實驗使用之倒立式螢光顯微鏡型號為 IX71，由美國 Olympus

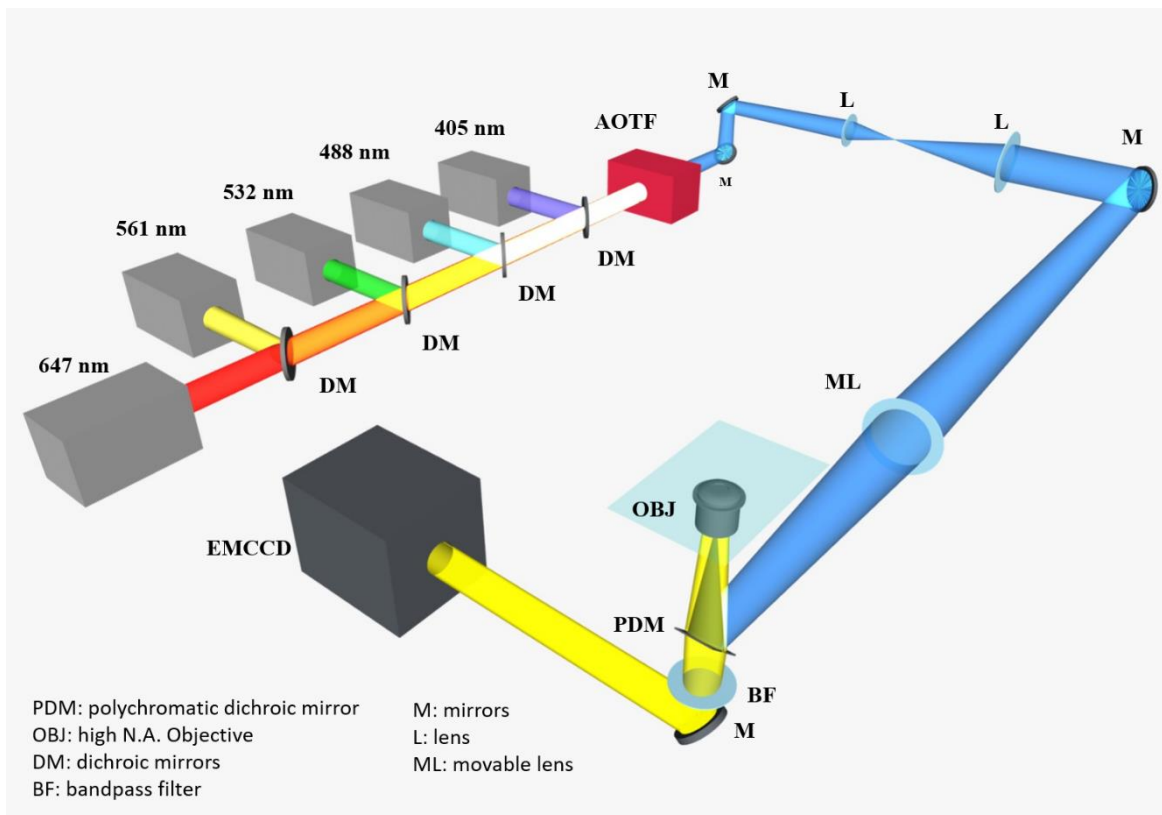


圖 3-1 螢光顯微鏡系統裝置圖。

公司生產製造，上方搭載二維電動移動平台，藉由控制平台之 X 軸及 Y 軸至欲觀測之樣品玻片位置。顯微鏡使用物鏡型號為 ZEISS 100X 油鏡，由德國 ZEISS 公司生產製造，其 N.A. 為 1.46，油鏡所使用鏡油為 Olympus 所生產製造的 Immersion Oil Type-F。螢光顯微鏡內部之濾鏡盒 (filter cube) 包含可反射激發光源與可使螢光穿透之 dichroic beamsplitters，型號為 89100bs，係由美國 Chroma 公司製造，另一型號為 ff552-Di02 係由美國 Semrock 公司製造，加上可過濾螢光訊號之 bandpass filter，型號為 FF01-446/523/600/677-25 及 FF01-559/34-25 亦由美國 Semrock 公司製造。

由於單分子之螢光訊號非常微弱，故需要使用較靈敏的 EMCCD 收集螢光影像，所使用之電子倍增電荷耦合裝置 (electron multiplying charge coupled device, EMCCD) 型號為 ProEMHS : 512B，係由美國 Princeton Instruments 公司生產製造，此型號為 512×512 個像素。使用之 EMCCD 設定為 ADC 速率 20 赫茲 (Hz)、曝光時間為 30 毫秒 (msec.) 及 gain 值為 100，並藉由 LightField 軟體儲存影像，最後以 Image J 軟體進行影像處理計算。如圖 3-2 與圖 3-3，我們同時也使用微米尺 ($10 \mu\text{m}$) 與 λDNA (48502 bp ，理論長度為 $16 \mu\text{m}$) 為標準長度對影像畫面及端粒長度進行實際尺寸量測，其中 λDNA 總長為 187 ± 2 ($n=10$) pixel，藉由 Image J 軟體計算得知每單位 pixel 邊長

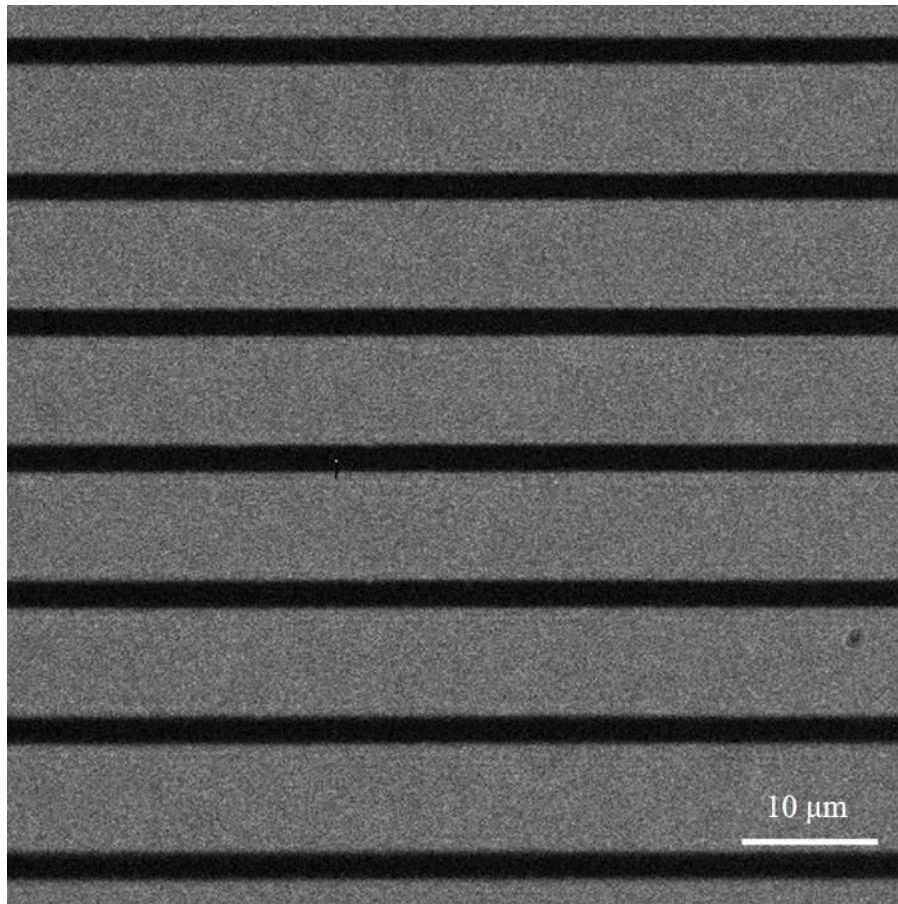


圖 3-2 100X 物鏡下之微米尺，147 nm/pixel。

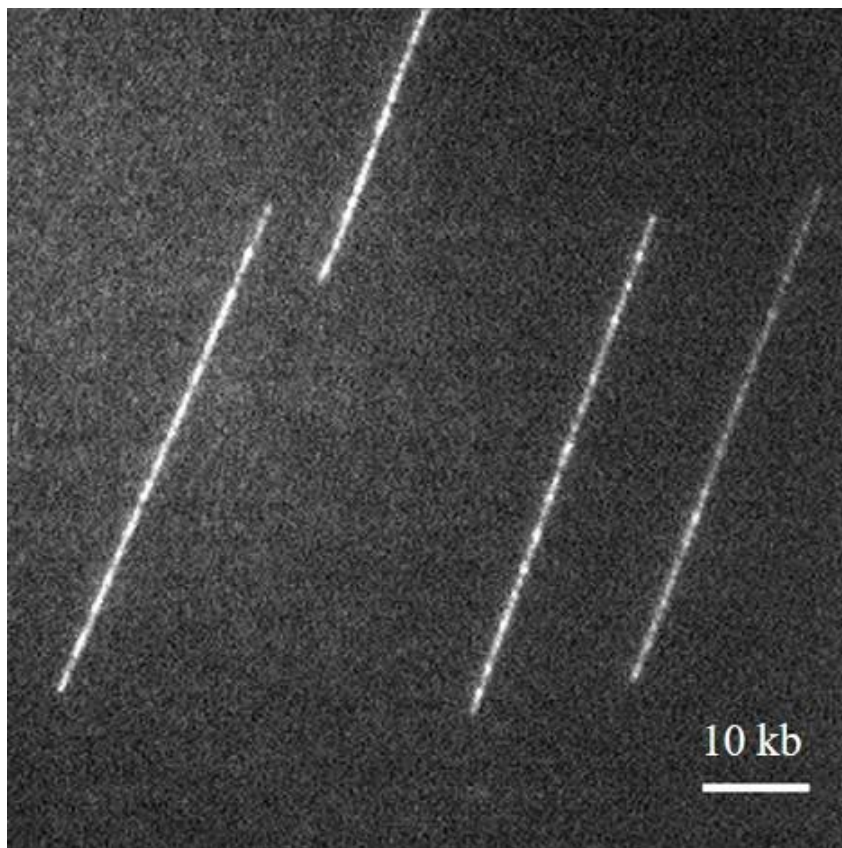


圖 3-3 100X 物鏡下之 λ DNA，259 bp/pixel。

約為 147 nm 及 259 bp。值得注意的是本實驗線性沉積方法能將 λ DNA 均勻過度拉伸至總長為 27.5 μm ，比 λ DNA 理論長度 16.0 μm 長 172 %。

3.2.3 實驗方法

3.2.3.1 玻片製備

本實驗所使用之玻片為 High Precision Cover Glass NO. 1.5H，係由德國 Paul Marienfeld 公司製造生產，厚度約為 170 $\mu\text{m} \pm 5 \mu\text{m}$ 。玻片使用前先浸泡在二次水中於超音波震盪 30 分鐘，之後分別以 1M NaOH 與 1M HCl 的強鹼強酸於超音波震盪 30 分鐘，再以二次水震盪清洗 30 分鐘，最後使用 95%乙醇震盪清洗 10 分鐘兩次，放入 80°C 恆溫箱烘乾後完成玻片清洗。APTES 玻片之製備為將清洗過後的玻片浸泡在含有 5% APTES 的 95%乙醇中反應 1 小時，目的為將 APTES 以共價鍵鍵結至玻片上，使玻片表面修飾成帶有正電荷的氨基，最後以 95%乙醇震盪清洗 10 分鐘兩次，放入 80°C 恆溫箱烘乾後室溫保存以備用。Zeonex 玻片之製備為將含有 1.5% Zeonex 的氯苯溶液以旋轉塗佈的方式覆蓋至 APTES 玻片表面，並放入 85°C 恆溫箱烘乾 1 小時後室溫保存以備用。

3.2.3.2 細胞培養

本實驗所使用之 Huh7 肝癌細胞株係由台灣大學基因體中心腫瘤醫學研究所歐大諒教授提供。將肝癌細胞培養於含有 3 ml 培養基的培養皿（直徑為 6 公分）中，其培養基由 10% FBS，0.01X PSA 及 1 mM 丙酮酸所組成，並將細胞置於 37°C，5% CO₂ 培養箱中培養二至三天，待細胞生長至約 80% 匯合（confluence）時，先吸棄培養液，以 2 ml 1X PBS 清洗細胞兩次，再加入 2 ml 0.05% trypsin-EDTA 溶液於 37°C 反應 3 分鐘，輕敲培養皿邊緣使細胞自培養皿表面脫落，加入等體積的培養基中止胰蛋白酶反應，收集細胞並以轉速 100x g 離心五分鐘後去除上清液，添加新鮮培養基後依稀釋比例轉移至新的培養皿中，依正常條件繼續繼代培養。本實驗亦有將細胞培養於玻片上，將細胞以培養基稀釋至低濃度並培養於經高壓滅菌處理的 APTES 玻片上，待細胞貼盤尾足生成後以 1X PBS 清洗之，即可接續之後的實驗。

3.2.3.3 中期細胞染色體製備

當 Huh7 細胞培養至約 80% 匯合（confluence）時，加入 0.1 μg/ml demecolcine 培養 8 小時使細胞停留在中期，經 trypsin-EDTA 處理後以 100x g 離心五分鐘，收集細胞並回溶於 5 ml 0.075 M 氯化鉀中，

於 37°C 恆溫水槽中靜置 10 分鐘使細胞膨脹，再以轉速 100x g 離心五分鐘後去除上清液，回溶於 5 ml 4°C 酸性甲醇(包含甲醇及醋酸以 3:1 混合)，靜置於 4°C 冰箱中 1 時，取出放置室溫 10 分鐘，以轉速 100x g 離心 5 分鐘後去除上清液，回溶於 5 ml 4°C 酸性甲醇，靜置於 4°C 冰箱 12 小時使細胞固定，最後再以轉速 100x g 離心 5 分鐘後去除上清液，回溶 1 ml 4°C 酸性甲醇，即完成中期染色體製備。

3.2.3.4 Genomic DNA 萃取

本實驗使用 Genomic DNA 萃取套組來萃取出細胞 Genomic DNA。首先將 Huh7 細胞培養至約 80% 匯合 (confluence)，經 trypsin-EDTA 處理後以 100x g 離心 5 分鐘，收集細胞並回溶於 200 μ l 1X PBS，加入 20 μ l Proteinase K 與 20 μ l RNase A 混合均勻後靜置室溫反應 2 分鐘，加入 200 μ l PureLink® Genomic Lysis/Binding Buffer 混合均勻後靜置於 55°C 恆溫箱中反應 10 分鐘以促進消化蛋白質，加入 200 μ l 99.5% 酒精混合均勻後將溶液移至離心管中以 10000x g 離心 1 分鐘，加入 500 μ l Wash Buffer 1 以 10000x g 離心 3 分鐘，加入 500 μ l Wash Buffer 2 以 16000x g 離心 3 分鐘，最後加入 100 μ l PureLink® Genomic Elution Buffer 靜置 1 分鐘後以 16000x g 離心 1 分鐘，收集含有 Genomic DNA 離心液並保存於 -20°C 冰箱中。

3.2.3.5 液珠蒸發線性沉積 DNA

取 10 μ l DNA 溶液滴至 Zeonex 480R 玻片上，於 80°C 恆溫箱中烘乾，使 DNA 沉積在玻片上⁴⁷。

3.2.3.6 液珠平移線性沉積 DNA

取 5 μ l DNA 溶液滴至 Zeonex 玻片上，降低 pipette tip 使尖端接觸液珠表面，在溼度為 99% 密閉潮濕環境中透過電動移動平台以 1mm/min 的速度移動尖端來平移液珠以確保液珠蒸發的最小化並使 DNA 均勻沉積在玻片上。

3.2.3.7 以螢光原位雜合法定位染色體端粒

實驗流程圖如圖 3-4，將染色體以 50 公分的高度 spreading 至冰的玻片上，酒精燈過火讓甲醇瞬間揮發後放入 50°C 恆溫箱至隔日，使染色體確實固定在玻片上，接著以 1X PBS 清洗玻片兩次，加入 50 μ l RNase solution（包含 1X PBS，和 100 μ g/ml RNase A）覆蓋樣品表面，於 37°C 恆溫箱中反應 20 分鐘將細胞中單股 RNA 進行水解，使用 1X PBS 清洗兩次後再以二次水清洗一次，以中止 RNase A 之反應，接著加入 50 μ l pepsin solution（包含 10 mM HCl，和 0.005% pepsin）覆蓋樣品表面，於 37°C 恆溫箱中反應 5 分鐘將細胞膜破壞，幫助後續加入的端粒螢光標記探針可以進入細胞內，使用 1X PBS 清

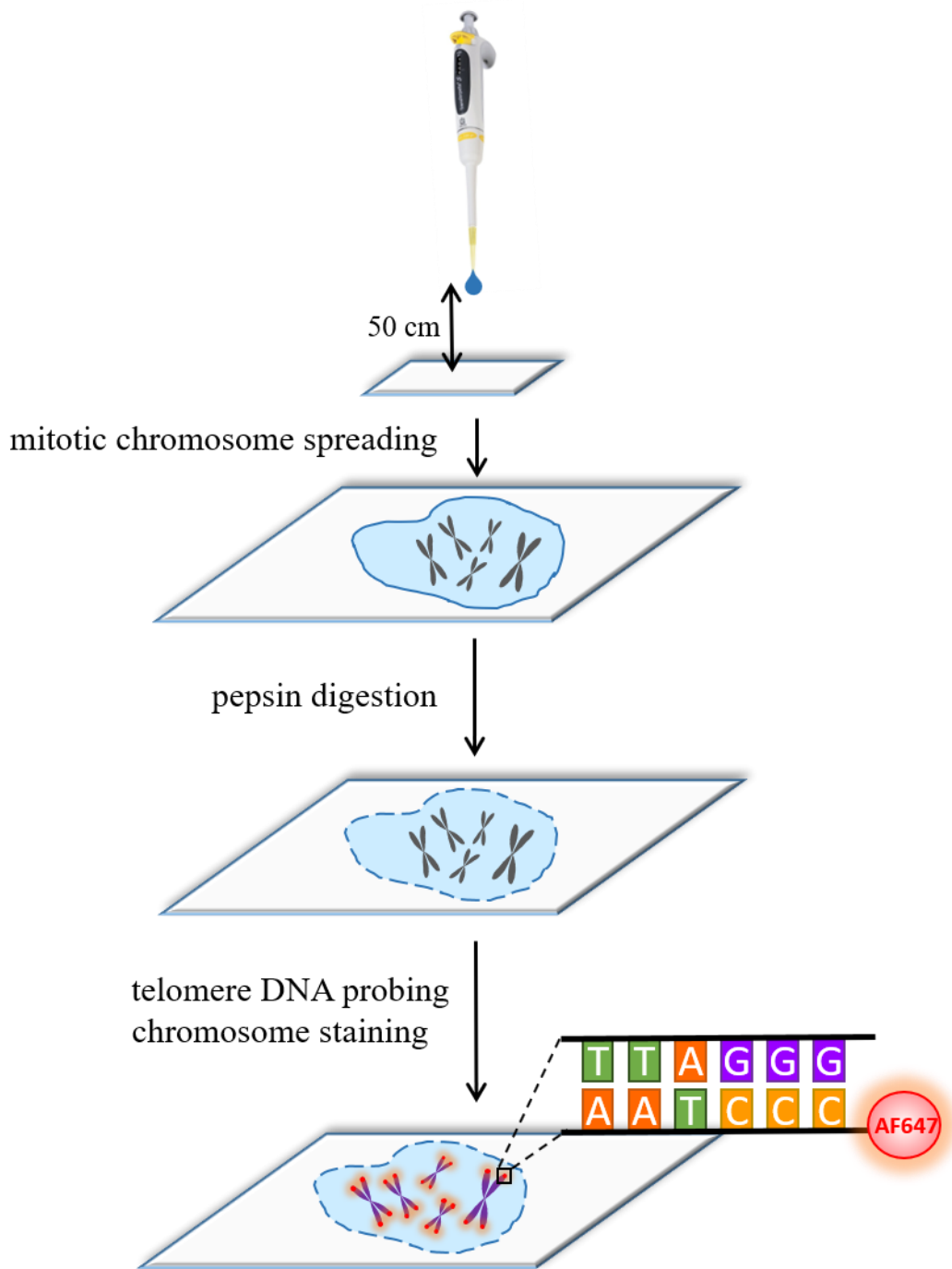


圖 3-4 以螢光原位雜合法定位染色體端粒實驗流程圖。

洗兩次以中止 pepsin 之反應，接著將玻片分別放入 75%，85% 及 100% 冰乙醇中各 2 分鐘，以去除殘留溶液，最後放置室溫風乾玻片。在進行雜合之前，需先將玻片與 hybridization buffer1（包含 20 mM Tris-HCl，pH 7.4，60% formamide，和 10^{-6} M primer）置於 85°C 恆溫箱中預溫 5 分鐘，再將 2 μ l TelC -Alexa 647 端粒螢光標記探針溶於 18 μ l hybridization buffer1 中，使 TelC 端粒螢光標記探針最後濃度為 200 nM，接著將 20 μ l 含有 TelC 端粒螢光標記探針的 hybridization buffer1 加入玻片，並以蓋玻片將溶液完全覆蓋在玻片上，於 85°C 恆溫箱中加熱 10 分鐘將染色體雙股 DNA 打開，再將玻片放置室溫避光進行雜合反應 2 小時，反應結束後使用 wash buffer（包含 2X SSC，和 0.1% Tween-20）分別於 60°C 恆溫箱中清洗玻片 10 分鐘兩次及室溫中清洗玻片 10 分鐘一次，接著加入 DAPI solution 反應 10 分鐘進行染色體染色，最後分別以 2X SSC，1X SSC 和二次水各清洗一次，即完成樣品製備。

3.2.3.8 以螢光原位雜合法定位端粒 DNA

實驗流程圖如圖 3-5，將萃取出之 Genomic DNA 拉直至 Zeonex 480R 玻片後，加入 50 μ l EDC solution（包含 0.13 M 1-methylimidazole，pH 8.0，和 0.16 M EDC）覆蓋樣品表面，於室溫靜置反應 1 小時將

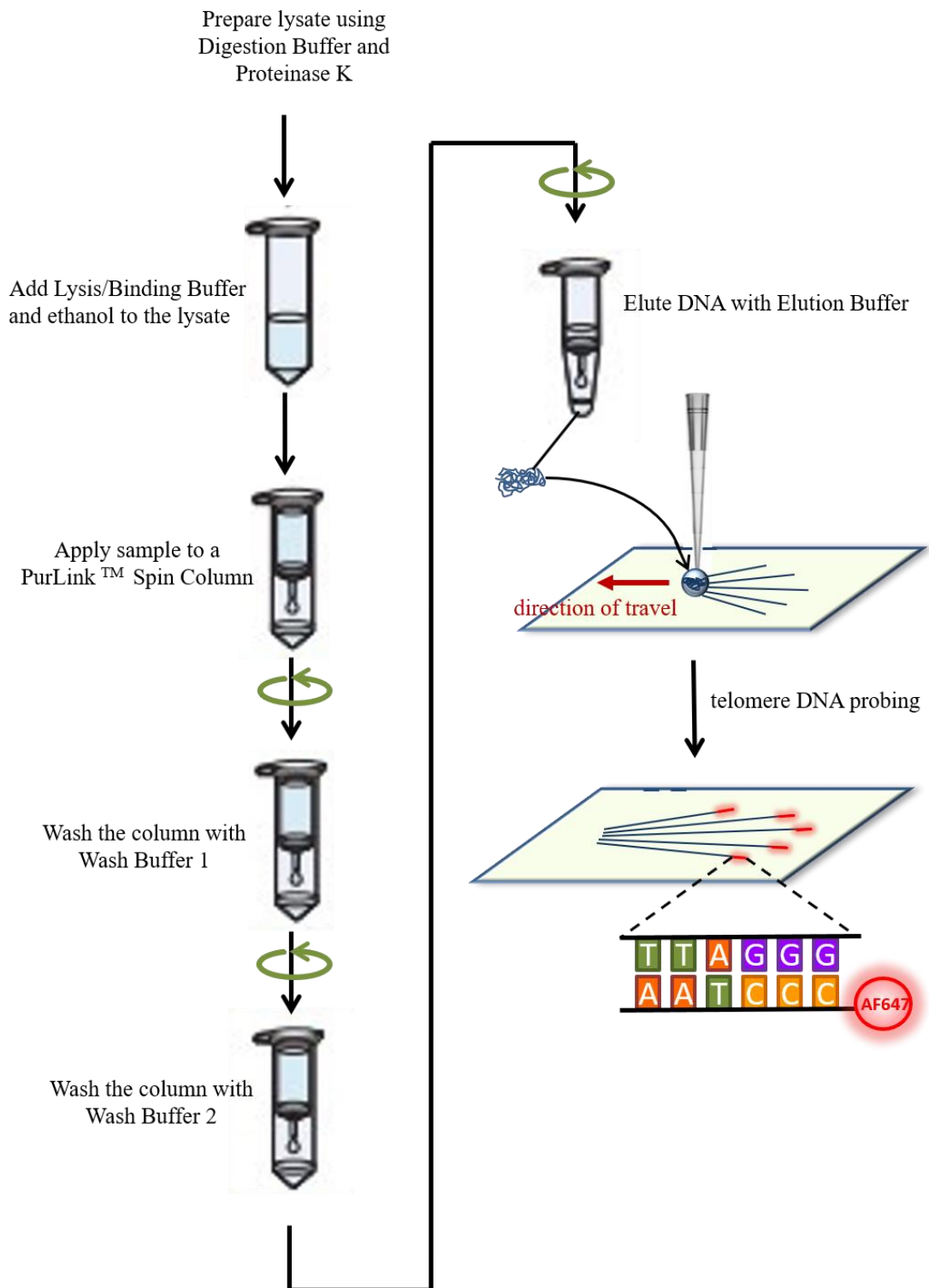


圖 3-5 以螢光原位雜合法定位端粒 DNA 實驗流程圖。

DNA 固定在玻片上，固定完成後傾斜玻片移除 EDC solution，接著加入 50 μl blocking solution（包含 5% BSA，和 10^{-6}M primer）覆蓋樣品表面，於室溫靜置反應 1 小時以防止後續加入之端粒探針非特異性吸附在玻片上，blocking 完成後傾斜玻片移除 blocking solution。在進行雜合之前，先將 2 μl TelC -Alexa 647 端粒螢光標記探針溶於 18 μl hybridization buffer 2（包含 0.06X SSC，和 10^{-6}M primer）中，使 TelC 端粒螢光標記探針最後濃度為 200 nM，接著將 20 μl 含有 TelC -Alexa 647 端粒螢光標記探針的 hybridization buffer 2 加入玻片，並以蓋玻片將溶液完全覆蓋在玻片上，於 60°C 恆溫箱中進行雜合反應 2 小時，反應結束後使用 2X SSC 分別於 60°C 恆溫箱中清洗玻片 10 分鐘兩次及室溫中清洗玻片 10 分鐘一次，最後再以二次水清洗一次，即完成樣品製備。

3.2.3.9 以微米毛細管提取單顆細胞 DNA

實驗所使用之微米毛細管係由微型管成型機制被而得。首先以轉接環將長度為 1 公分，尖端內徑為 1 微米的毛細管與長度為 40 公分內徑為 75 微米的毛細管連接在一起，將內徑大的一端固定在針筒上，並以注射幫浦來來控制抽取與灌注，接著將毛細管固定在支撐桿上並以奈米級三軸移動平台控制毛細管在三軸方向之移動，在顯微鏡下以

40X 物鏡觀察定位細胞位置後，透過降低毛細管尖端至進入細胞核內，最後啟動注射幫浦並觀察細胞變化。

3.2.3.10 破壞細胞之細胞膜與細胞核膜

將細胞溶於 1X PBS 中並滴 100 μ l 在 APTES 玻片上，由於細胞膜帶負電，因此可以靜電吸引力固定在表面帶正電的玻片上，待細胞吸附於玻片後，將 1X PBS 吸棄並加入 100 μ l 含有 0.5%NP-40 及 100 μ g/ml Proteinase K 的 HSB（包含 20 mM HEPES，pH 7.5，0.65 M NaCl，1 mM EDTA，和 0.34 M sucrose），接著在顯微鏡下以 100X 物鏡觀察細胞變化。

3.2.3.11 以微米毛細管分離單顆細胞

將玻片浸泡至 0.5M NaOH 5 分鐘後使玻片表面帶負電，再將細胞以 1X PBS 稀釋至低濃度後滴至於玻片上，由於細胞膜帶負電與玻片表面相斥，因此細胞會懸浮在溶液中而不會吸附在玻片上，有利於我們對單顆細胞的分離。接著將長度為 40 公分，內徑為 50 微米的毛細管一端固定在支撐桿上並以奈米級三軸移動平台控制毛細管在三軸方向之移動，另一端則浸泡在 1.5ml 1X PBS 離心管中。在顯微鏡下以 40X 物鏡找到單顆細胞後，慢慢降低毛細管靠近細胞，接著將離

心管放低於玻片約 30 公分使毛細管兩端形成高度差，利用虹吸現象將單顆細胞吸進毛細管內，將毛細管開口端提高移至另一無細胞的溶液上方後再降低至溶液內，接下來把離心管抬高於玻片約 30 公分讓細胞從毛細管中離開進入新的溶液中，即完成單顆細胞分離。

3.3 結果與討論

3.3.1 以螢光原位雜合法定位染色體端粒

本實驗所使用之端粒探針是由肽核酸 (peptide nucleic acid, 簡稱 PNA) 所組成, PNA 是一種與 DNA 相似的合成物, 能夠以符合 Watson-Crick 鹼基配對原則與 DNA 結合。在 PNA 中, 其原本的磷酸雙酯鍵骨架被重複 N-(2-aminoethyl) glycine 單元所取代。由於 PNA 沒有如 DNA 上的磷酸基團, 其骨架本身不帶電荷, 為中性骨架, 因此與 DNA 之間並不會有靜電排斥的現象, 使 PNA/DNA 複合物擁有比 DNA/DNA 複合物更高的穩定性, 且不易被蛋白酶或核酸酶水解, 因此以 PNA 做為探針是螢光原位雜合法理想的工具。

為了定位偵測染色體端粒, 首先將細胞週期固定在染色體產生的階段, 並將染色體 spreading 至玻片上, 再以螢光原位雜合法將修飾有 Alexa Fluor 647 螢光分子的 PNA 端粒探針與染色體進行雜合。圖 3-6 (a) 為以 DAPI 染料對染色體進行染色, 並使用波長為 405

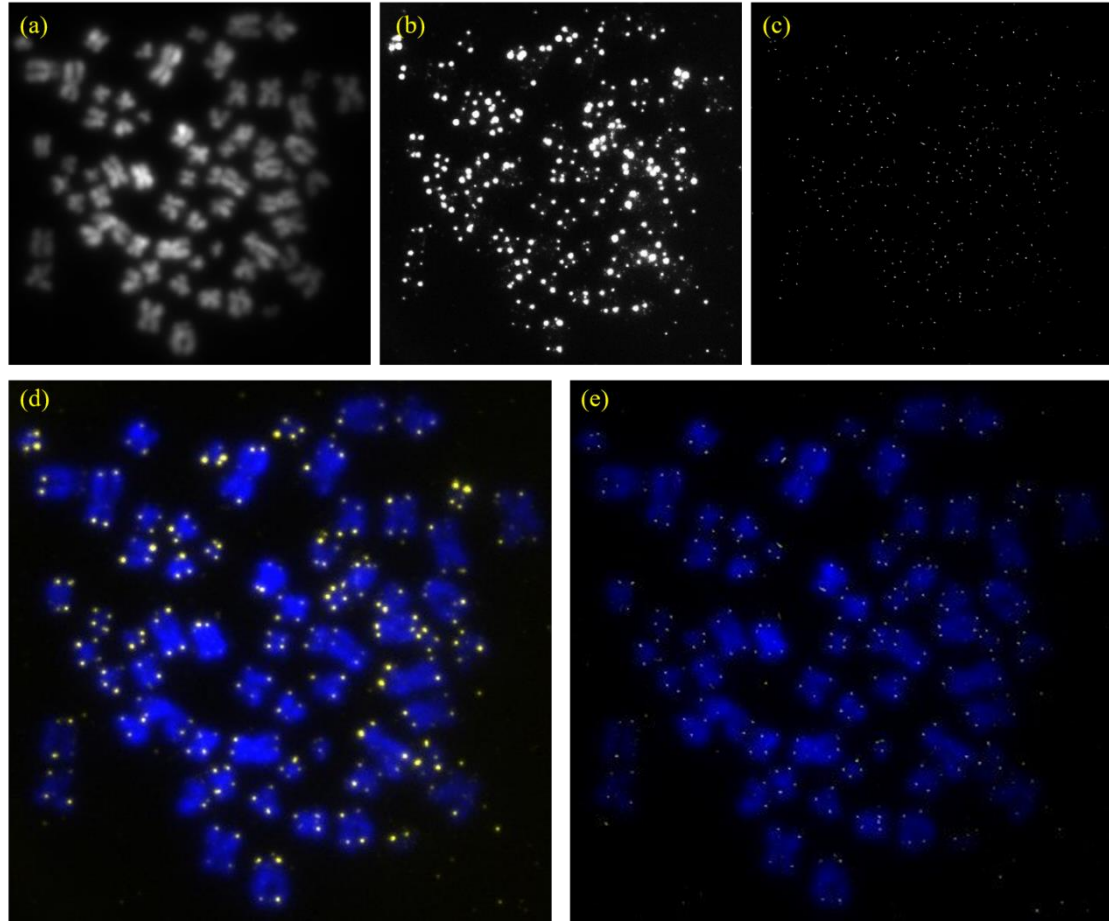


圖 3-6 以螢光原位雜合法定位染色體端粒。(a) 以 DAPI 染色定位染色體之 TIRF 螢光顯微鏡影像圖。(b) 透過將端粒探針 TelC - Alexa Fluor 647 (in hybridization buffer 1) 與染色體端粒在室溫下雜合 2 小時定位染色體端粒位置之 TIRF 螢光顯微鏡影像圖。(c) 以端粒探針 TelC - Alexa Fluor 647 定位染色體端粒，在 dSTORM 系統中收集一萬張螢光影像子圖後重建之 dSTORM 超解析螢光影像圖。(d) 為 (a) (b) 兩圖之疊圖。(e) 為 (a) (c) 兩圖之疊圖。DAPI 及 Alexa Fluor 647 分別使用 488 nm 與 647 nm 雷射激發。

nm, 功率為 1mW 的紫光雷射激發 DAPI 染料分子以實現染色體觀測, 圖 3-6 (b) 為使用波長為 647 nm, 功率為 1mW 的紅光雷射激發 PNA 上 Alexa Fluor 647 螢光分子以實現端粒觀測。圖 3-6 (c) 為染色體端粒 dSTORM 超解析影像圖, 透過加入 switching buffer 至樣品玻片, switching buffer 由 5 μ l enzyme stock solution (20 μ g/ml catalase, 4 mM Tris (2-carboxyethyl) phosphine hydrochloride, 50% glycerin, 25 mM KCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 mg/ml glucose oxidase), 40 μ l glucose stock solution (100 mg/ml glucose, 10% glycerin), 10 μ l reducing agent stock solution (1M MEA-HCl) 及 45 μ l 1X PBS 混合而成, 在波長為 647 nm, 功率為 20mW 的紅光雷射與波長為 405 nm, 功率為 1mW 的紫光雷射交互照射下, 使與其雜合互補上去的端粒螢光探針在螢光態與暗態之間轉換, 並在螢光分子閃爍的同時以 EMCCD 收集一萬張螢光影像, 最後以 ThunderSTORM 影像分析軟體將所有蒐集到螢光影像定位重組成一張解析度高於傳統螢光顯位鏡螢光影像的 dSTORM 螢光影像。由圖 3-6 (d) (e) 可以看出, 端粒的位置是位於染色體末端的四個端點。實驗結果表示, 由於染色體是一種高度纏繞的結構, 這意味著我們只能定位端粒在染色體上的位置, 而不能實際測量出端粒長度, 因此若欲測量細胞端粒真實長度, 就必須設法將緊緊纏繞的端粒 DNA 分子拉伸再做量測。

3.3.2 比較不同表面修飾玻片影響 DNA 線性沉積

線性 DNA 沉積的技術一直以來都是許多單分子基因組研究的關鍵步驟，而螢光顯微鏡技術也極大的方便我們對 DNA 單分子的觀察。在理想的狀況下，DNA 單分子的線性沉積且均勻拉伸有助於我們實現對端粒 DNA 分子精確長度的直觀測量。沉積 DNA 分子可透過沉積表面不同的修飾來達成，通常會以帶正電荷的官能基修飾表面來吸引沉積帶負電荷的 DNA 骨架，或是透過疏水性聚合物修飾表面促使 DNA 鹼基吸附來捕捉 DNA 分子，至於 DNA 分子的線性化則是藉由液體與空氣界面(通稱為彎月面)的平移來實現 DNA 分子的拉伸。

為了得到線性化的 DNA，我們比較了三種不同表面修飾的玻片用於沉積拉直 DNA，以液珠蒸發沉積的方式將 λ DNA 以 1ng/ μ l 的濃度回溶在 HSB 中並滴 10 μ l 在不同表面修飾的玻片上，於 50°C 恆溫箱中烘乾後，以 10⁻⁸ M 的 YOSeta-1 染料對 λ DNA 進行染色，再以波長為 488 nm，功率為 1mW 的藍光雷射激發 YOSeta-1 染料分子對 λ DNA 測試，如圖 3-7 (a)，我們可以觀察到 λ DNA 分子是以纏繞在一起的點狀形式分布在玻片上，單分子無法有效被拉伸。接下來我們以 APTES 玻片作測試，如圖 3-7 (b)，儘管我們在玻片上修飾了帶正電荷的氨基以利於帶負電的 DNA 骨架吸附在玻片表面，但是 DNA 分子仍然是纏繞在一起無法被拉直。最後我們改以表面塗佈有疏水性聚

合物的 Zeonex 玻片來作測試，如圖 3-7 (c)，我們可以明顯觀察到不同於前兩者玻片的實驗結果，每一個單分子 DNA 皆線性沉積在玻片表面且均勻的被拉伸，因此我們找到了一個最佳的玻片表面修飾條件來實現線性 DNA 樣品製備，也將利於我們之後對端粒 DNA 分子長度的觀測。

3.3.3 比較不同沉積方法影響 DNA 線性沉積

在實現 DNA 分子線性化後，接下來要探討如何將溶液中所有 DNA 分子完整線性沉積在玻片上，就好比一個含有單顆細胞所有 DNA 的溶液，若欲測量其端粒總長度，意味著必須將溶液中所有 DNA 分子都拉直在玻片上。我們比較兩種不同的沉積方法來探討溶液中 λ DNA 線性沉積的完整性，沉積完成後以 10^{-8} M 的 YOSeta-1 染料對 λ DNA 進行染色，再以波長為 488 nm，功率為 1mW 的藍光雷射激發 YOSeta-1 染料分子對 λ DNA 進行定位觀測。首先以液珠蒸發沉積的方式將 λ DNA 沉積在 Zeonex 玻片上，由於水的蒸發，空氣與溶液的交界線開始內縮，吸附在玻片表面的 λ DNA 以垂直於交界線的方向往液珠圓心拉伸並呈現放射狀分布在玻片上，形狀類似於太陽射線，如圖 3-8 所示。但實驗結果發現只有分布在液珠外圍的 DNA 被有效拉伸，而靠近液珠圓心的 λ DNA 仍纏繞在一起，造成此結果的原因可

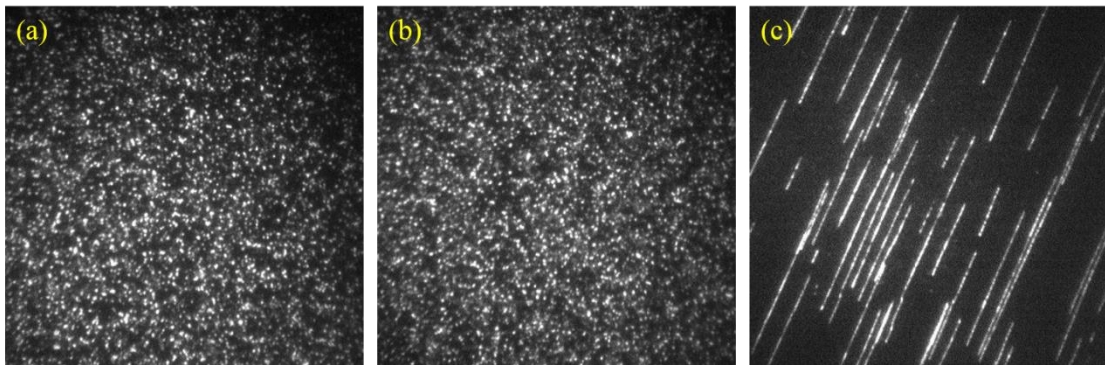


圖 3-7 比較不同表面修飾玻片影響 DNA 線性沉積之 TIRF 螢光顯微鏡影像圖。(a) 以未修飾一般玻片沉積 DNA (b) 以修飾有 APTES 之玻片沉積 DNA。(c) 以修飾有 Zeonex 之玻片沉積 DNA。使用 YOSeta-1 染色定位 DNA 位置並以 488 nm 雷射激發 YOSeta-1。

能為當溶液水份開始蒸發時，其鹽類濃度開始增加，達到飽和濃度後鹽類便開始析出，析出的鹽類猶如障礙物覆蓋在玻片表面，阻礙交界線對 λ DNA 的拉直，因此 λ DNA 有效拉直的區域只分布在鹽類未析出前的液珠外圍，而靠近液珠圓心的 λ DNA 因鹽類結晶的產生而無法有效拉伸。

雖然液珠蒸發沉積的方法可以說是將溶液中 DNA 分子全部保留並沉積在玻片上最簡單的方法，但是實驗結果表明並不是所有的 DNA 都能有效拉直，因此我們改以液珠平移沉積的方式來拉直 DNA。透過降低垂直於玻片的 pipette tip 至輕微接觸到液珠表面，以毛細現象將液珠保持在 tip 尖端開口處，並使用電動移動平台控制 tip 尖端運動達到將液珠緩慢在玻片表面上平移的效果，利用此方法可以將液珠以恆定的速度在玻片表面移動並沉積 DNA 分子。此外還有一點要特別注意，欲實現以 tip 尖端拖曳液珠，其液珠與玻片表面的接觸角要夠大才能達成。如圖 3-9 所示，由於液珠本身為水溶液，因此需要在疏水性的表面才能有較大的接觸角，接觸角越大代表液珠受玻片表面之作用力越弱，如此才能以 tip 尖端毛細現象來移動液珠，反之，若接觸角越小，液珠與玻片間的作用力越大，毛細現象則不足以將液珠保持在 tip 尖端，液珠也將無法拉動。

我們以 1mm/min 的速度來平移液珠，平移的過程同時以 100X

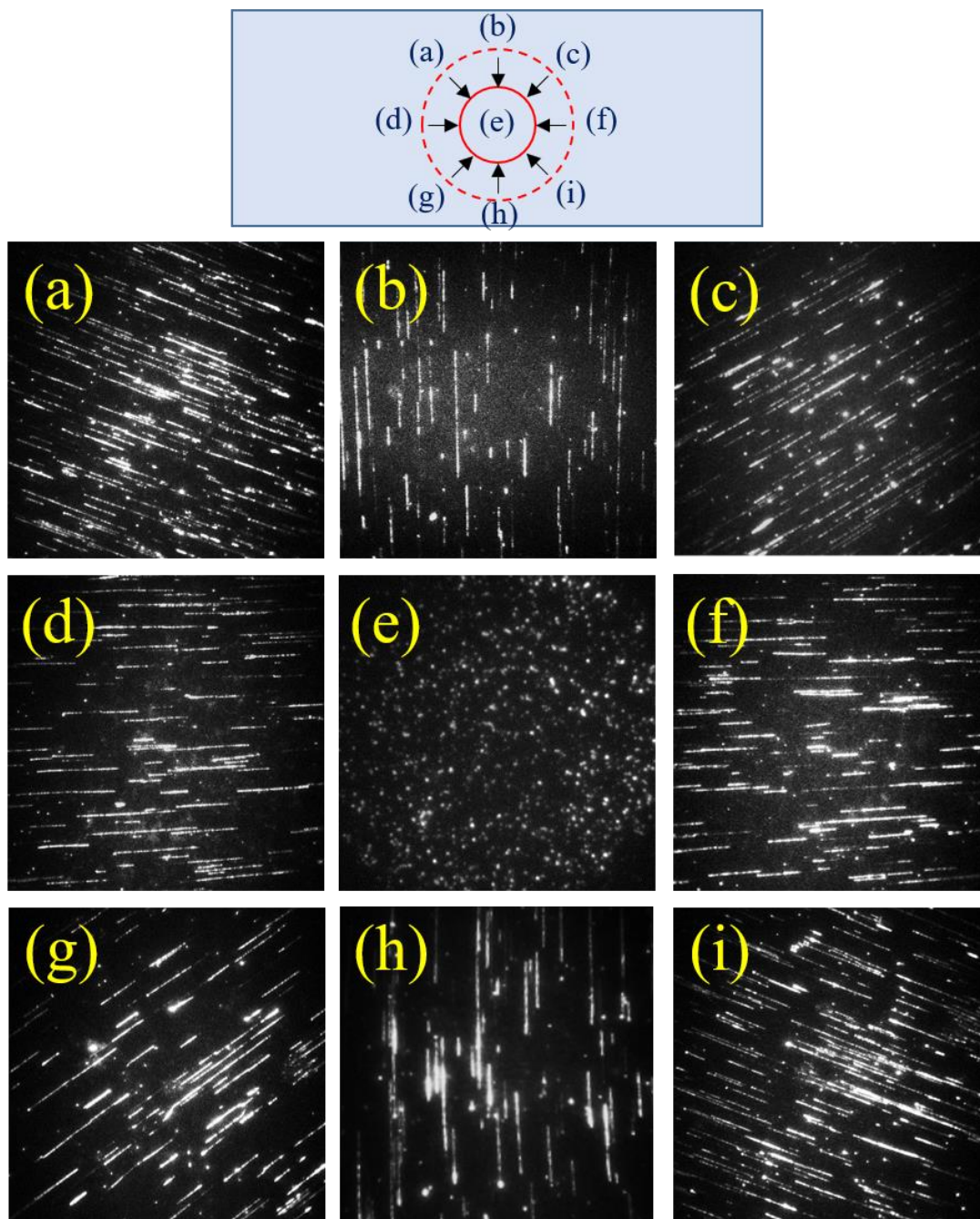


圖 3-8 以液珠蒸發沉積法拉伸 DNA 之 TIRF 螢光顯微鏡影像圖。(a-i) 為液珠沉積完成後不同位置之 DNA 螢光影像圖。使用 YOSeta-1 染色定位 DNA 位置並以 488 nm 雷射激發 YOSeta-1。

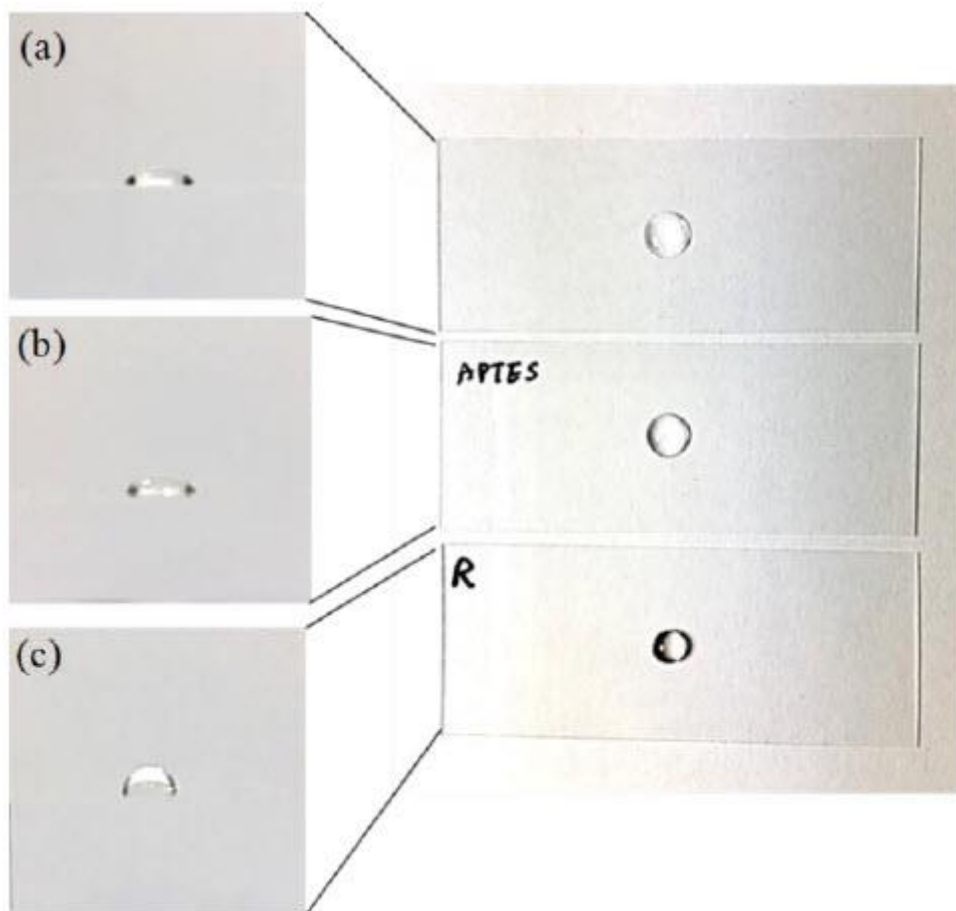


圖 3-9 於不同表面修飾玻片上觀察液珠接觸角。(a) 未修飾一般玻片。(b) 修飾 APTES 之玻片。(c) 修飾 Zeonex 之玻片。

物鏡對空氣液珠交界線作動態觀察，實驗結果如圖 3-10 (a)，可以觀察到 λ DNA 分子在溶液中自發吸附在玻片上，證明塗佈有疏水性聚合物的表面對 DNA 分子有捕捉沉積的能力。隨著液珠的平移，可以觀察到當交界線通過吸附在玻片上的 λ DNA 分子時，DNA 分子會以垂直於交界線的方向被拉伸，如圖 3-10 (b) (c)。由於整個實驗過程是在溼度飽和的密閉潮濕環境中進行以確保液珠蒸發的最小化，因此不會有任何鹽類結晶析出影響 DNA 分子的拉直，同時只需要增加液珠平移的距離即可最大化將溶液中所有 DNA 分子線性沉積在玻片上。

3.3.4 以液珠平移沉積不同濃度 λ DNA

為了知道以液珠平移沉積之方法能夠沉積多微量的 DNA，因此我們將 λ DNA 稀釋至四種不同的濃度，分別為 1ng/ μ l，100pg/ μ l，10pg/ μ l及 1pg/ μ l，以液珠平移沉積在 Zeonex 玻片後使用 10^{-8} M 的 YOSeta-1 染料對 λ DNA 進行染色，再以波長為 488 nm，功率為 1mW 的藍光雷射激發 YOSeta-1 染料分子對 λ DNA 進行觀測。如圖 3-11，如同我們所預期的結果，隨著濃度以 10 倍往下稀釋，一個顯微鏡視野中 λ DNA 沉積的量也相對減少，濃度直到稀釋至 1pg/ μ l， λ DNA 仍然能夠有效線性沉積且被觀察。單顆細胞 DNA 總質量約為 6.6 pg，

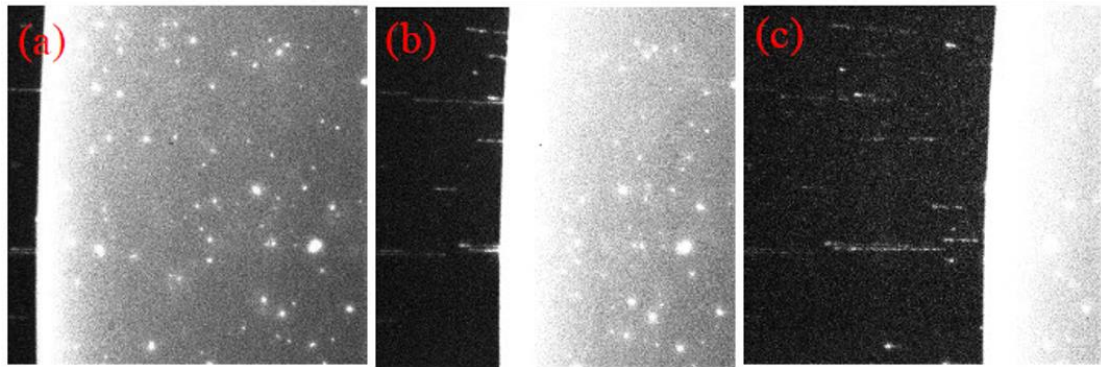
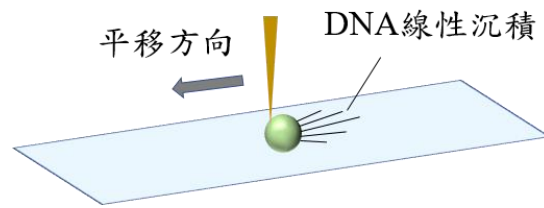


圖 3-10 以液珠平移法沉澱 DNA 之 TIRF 螢光顯微鏡影像圖。(a) DNA 分子自發吸附於 Zeonex 玻片上。(b)(c) 平移液珠，藉由空氣與水的交界線拉伸 DNA。使用 YOSeta-1 染色定位 DNA 位置並以 488 nm 雷射激發 YOSeta-1。

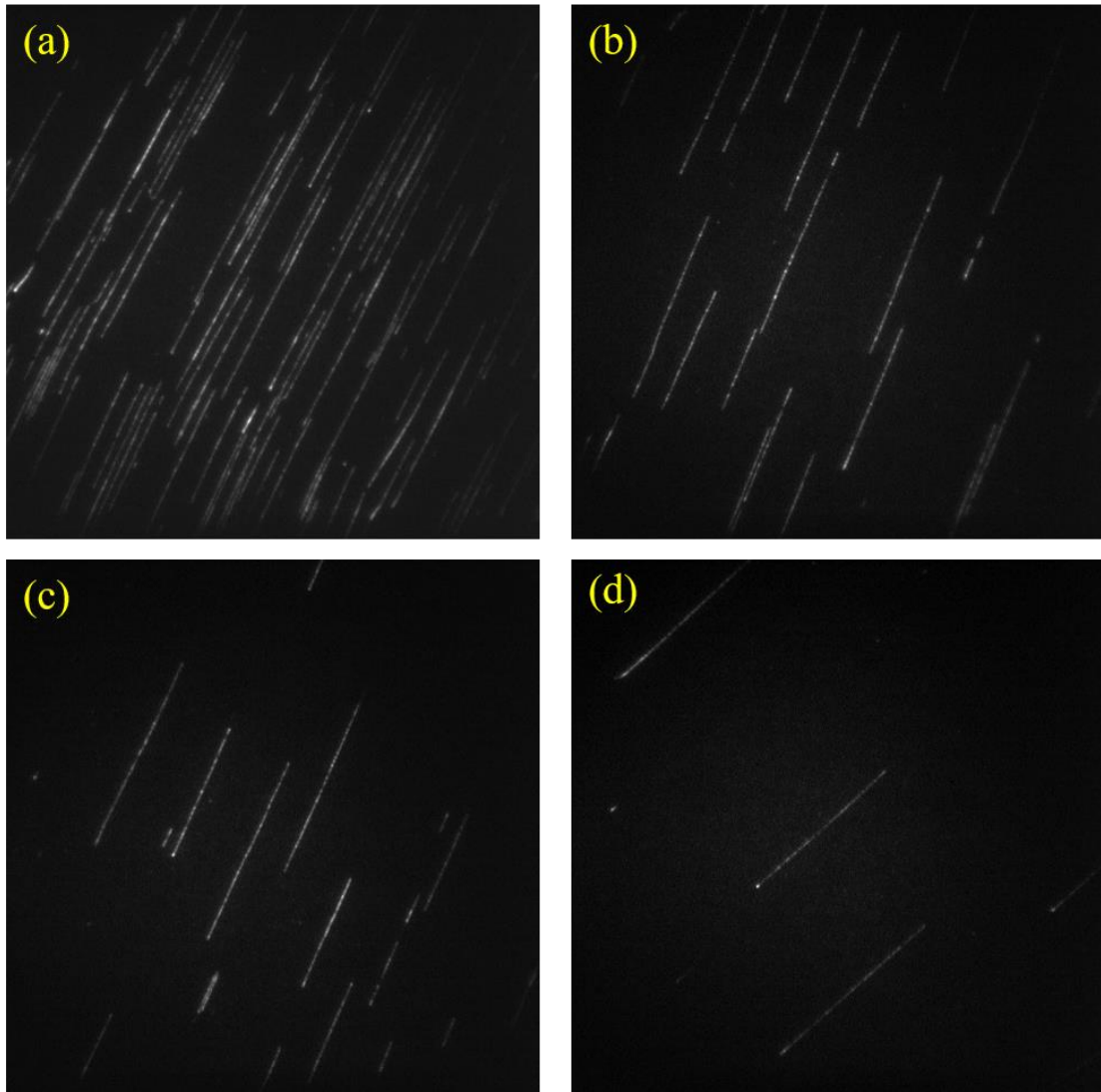


圖 3-11 以液珠平移法沉積不同濃度 λ DNA 之 TIRF 螢光顯微鏡影像圖。(a) 1ng/ μ l λ DNA (b) 100pg/ μ l λ DNA (c) 10pg/ μ l λ DNA (d) 1pg/ μ l λ DNA。使用 YOSeta-1 染色定位 λ DNA 位置並以 488 nm 雷射激發 YOSeta-1。

回溶在 5 μ l 的液珠濃度恰恰好約為 1pg/ μ l，因此未來我們若能夠將 DNA 從單顆細胞提取純化，便能透過液珠平移將 DNA 線性沉積在玻片上，以利於後續單顆細胞基因組分析。

3.3.5 以螢光原位雜合法定位端粒 DNA

為了避免 DNA 在雜合清洗的過程中脫落，我們以 EDC 反應將 DNA 固定在 Zeonex 玻片，並在一系列 2X SSC 與 1X PBS 清洗後比較 EDC 固定前後之差異。使用 10^{-8} M 的 YOSeta-1 染料對 DNA 進行染色，再以波長為 488 nm，功率為 1mW 的藍光雷射激發 YOSeta-1 染料分子對 DNA 進行定位觀測，如圖 3-12(a)，可以看到未經過 EDC 固定的 DNA 在經過溶液清洗後明顯的脫落，僅殘存少數形狀扭曲變形的 DNA 在玻片上，相反的，DNA 若是經 EDC 固定在玻片上，如圖 3-12(b)，可以看到 DNA 在溶液清洗過後仍然完整的保留在玻片上，因此證明 EDC 反應能有效地將 DNA 固定在玻片上。

在確保 DNA 固定在玻片上後，接下來要防止 PNA 端粒探針非特異性吸附在玻片上造成偽訊號影響實驗觀察。我們將含有牛血清蛋白及隨機序列 DNA 的 blocking buffer 加入玻片，先將其預吸附於玻片上以降低後續加入的 PNA 端粒探針直接吸附玻片。由圖 3-12(c) 可以看到若玻片未經過 blocking 處理，PNA 端粒探針會非特異吸附於

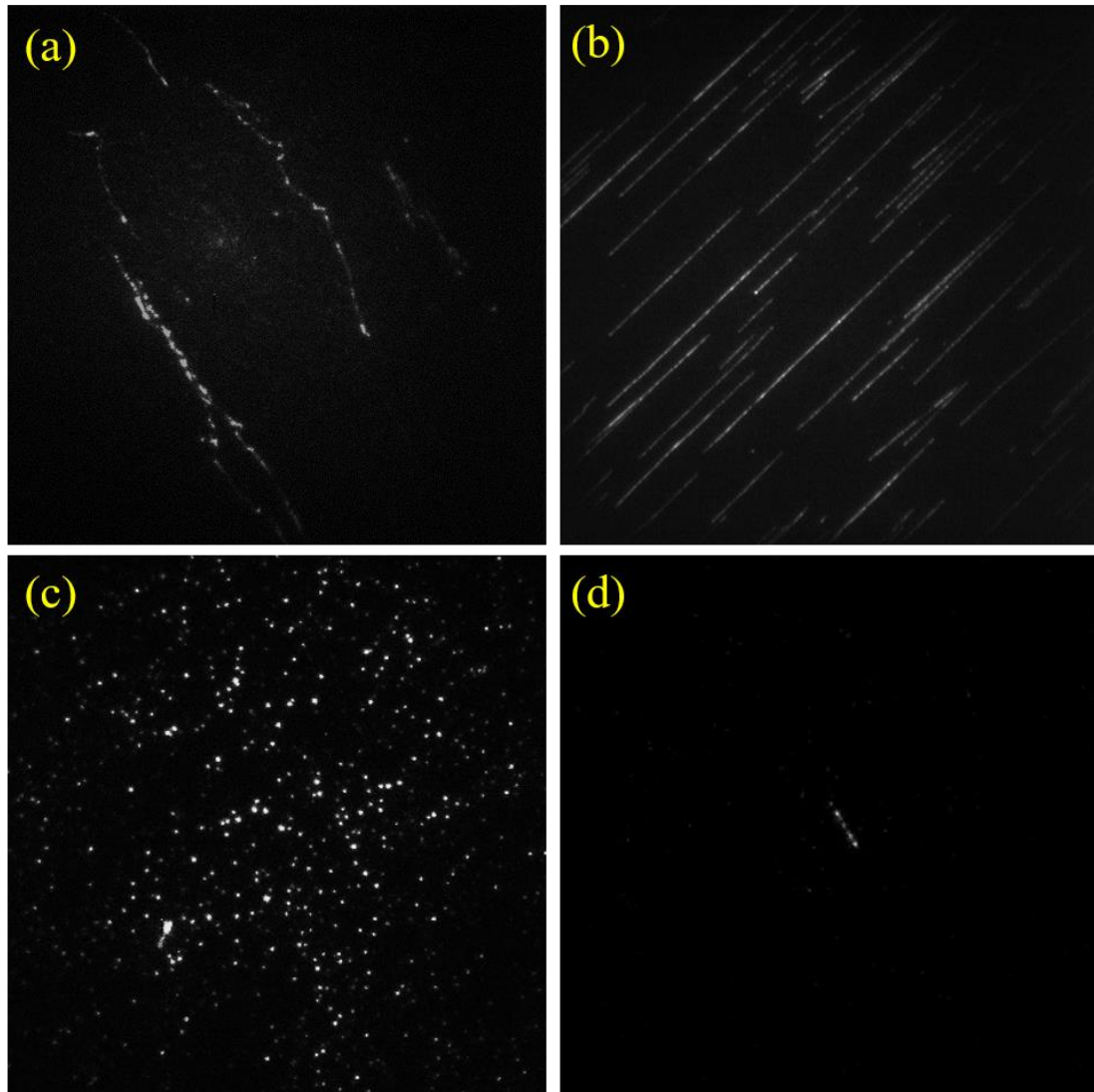


圖 3-12 比較 DNA 樣品於 EDC 固定前後與 Blocking 前後差異之 TIRF 螢光顯微鏡影像圖。(a) EDC 固定前之 DNA 螢光影像圖。(b) 以 0.16 M EDC / 0.13 M 1-methylimidazole 於室溫固定 1 小時後 DNA 螢光影像圖。(c) Blocking 前之端粒 DNA 螢光影像圖 (d) 以 5% BSA, 10^{-6} M Primer 於室溫 blocking 1 小時後端粒 DNA 螢光影像圖。使用 YOSeta-1 與端粒探針 TelC- Alexa Fluor 647 定位 DNA 及端粒 DNA 位置，並以 488 nm 與 647 nm 雷射激發 YOSeta-1 和 Alexa Fluor 647。

玻片上造成偽訊號，導致我們無法分辨端粒真正的訊號位置，相較之下，若玻片先經過 blocking 處理，如圖 3-12(d)，我們可以看到只有端粒的位置才有螢光訊號，因此證明端粒以外的區域在牛血清蛋白及隨機序列 DNA 的預吸附下有效阻擋端粒探針直接吸附在玻片上。

樣品玻片雜合前處理完成後，再來我們也對雜合條件進行優化。首先我們使用相同於定位染色體端粒的雜合條件，將 DNA 浸泡在 Hybridization buffer1 中，先以 85°C 加熱 10 分鐘後再靜置於室溫兩小時進行雜合反應，雖然成功將 PNA 端粒探針與端粒 DNA 結合成雙股，但是在藍光雷射激發下卻看不到如先前完整的線性 DNA，由於樣品已經有經過 EDC 固定處理，所以可以排除 DNA 脫落的可能性。我們認為此雜合條件是針對染色體所設計，原因在於染色體是高度縮合的結構，為了要將高度纏繞在染色體末端的端粒 DNA 雙股變性，所以必須在含有 60% 甲醯胺的溶液中於 85°C 高溫下打開 DNA 雙股。而線性 DNA 樣品相較於染色體來說具有更低的 T_m 值，此時若樣品若在高溫與高濃度甲醯胺環境中使 DNA 雙股變性，第一個可能造成的結果是雙股完全打開變成單股且無法在降溫過程中黏合回去，而另外一個可能是在高濃度的甲醯胺溶液中，甲醯胺也會與 DNA 鹼基產生氫鍵，綜合以上兩種可能皆會導致 YOSeta-1 染料無法嵌入 DNA 雙股並對其染色。為了使 DNA 能被正常染色且觀察，我們改

以不含甲醯胺的 0.06xSSC 為雜合溶液，於 60°C 進行雜合反應 2 小時。

如圖 3-13，在成功將 PNA 端粒螢光探針與端粒 DNA 雜合完成之後，我們可以在傳統螢光顯微鏡系統中觀察到不同長度線性端粒 DNA，並透過 Image J 軟體計算個別的端粒 DNA 絕對長度。由於傳統螢光顯微鏡系統無法突破 200 nm 繞射極限的限制，這意味著若兩端粒 DNA 長度差異小於約 350 bp 時就不能區分此兩端粒之長度。為了能夠區分更小長度差異的端粒 DNA，我們選擇在 dSTORM 超解析螢光顯微鏡系統中對端粒 DNA 進行超解析成像，實驗結果如圖 3-14 所示，將 switching buffer 加入樣品玻片中，以波長為 647 nm，功率為 20mW 的紅光雷射與波長為 405 nm，功率為 1mW 的紫光雷射交叉照射端粒 DNA，使與其雜合互補上去的端粒螢光探針在螢光態與暗態之間轉換，並在螢光分子閃爍的同時以 EMCCD 收集一萬張螢光影像，最後以 ThunderSTORM 影像分析軟體將所有蒐集到螢光影像定位重組成一張解析度高於傳統螢光顯微鏡螢光影像的 dSTORM 螢光影像，並透過 Image J 軟體計算個別的端粒 DNA 絕對長度。

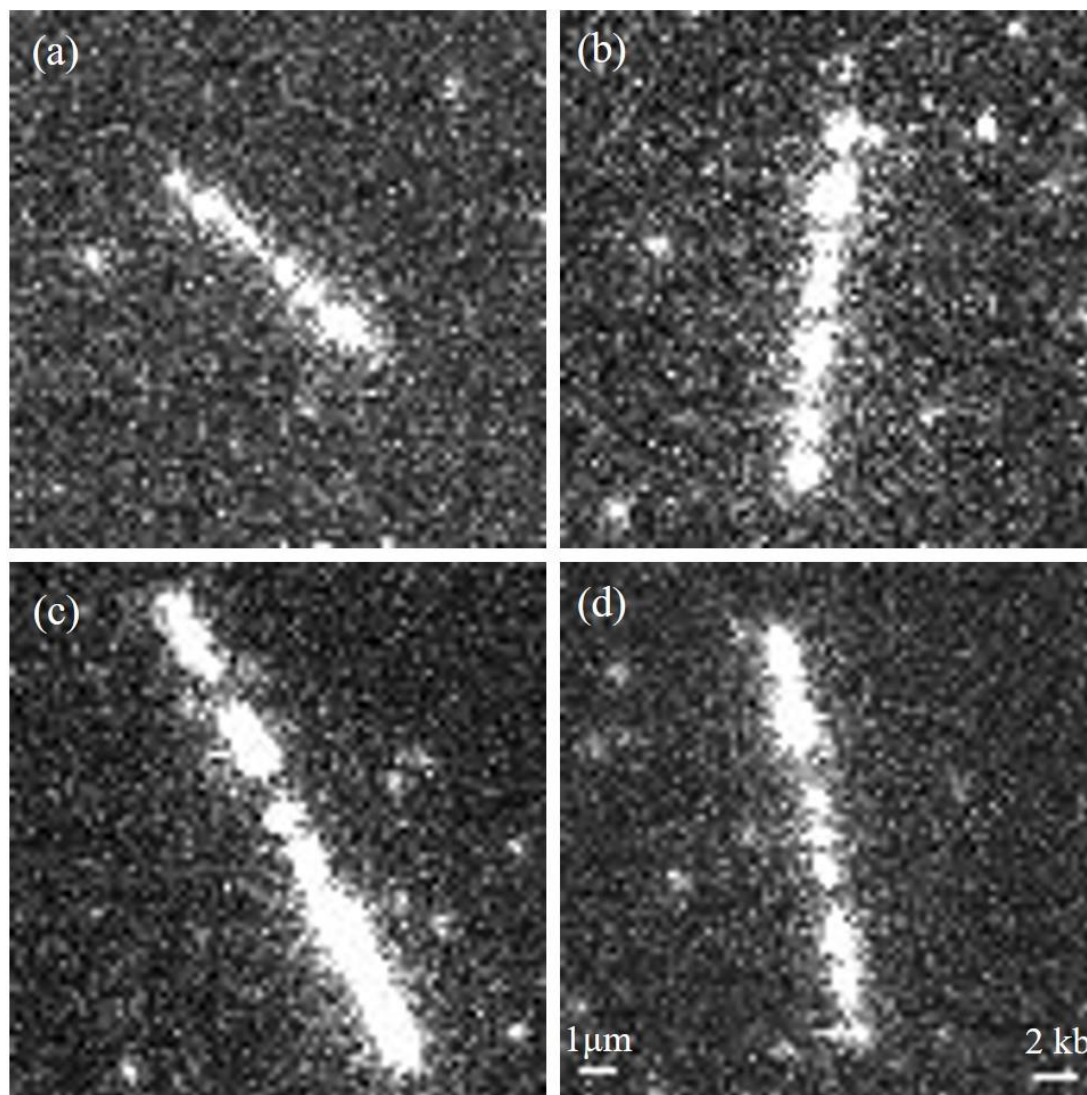


圖 3-13 以傳統螢光顯微鏡系統觀測不同長度之端粒 DNA。(a) 長度為 10.7 kb (6.1 μ m) 之端粒 DNA。(b) 長度為 15.8 kb (9.0 μ m) 之端粒 DNA。(c) 長度為 21.8 kb (12.4 μ m) 之端粒 DNA。(d) 長度為 16.8 kb (9.5 μ m) 之端粒 DNA。(a-d) 比例尺為 1 μ m 及 2kb。透過將端粒探針 TelC - Alexa Fluor 647 (in hybridization buffer 2) 於 50°C 與端粒 DNA 雜合 2 小時定位端粒 DNA 位置，並以 647 nm 雷射激發 Alexa Fluor 647。

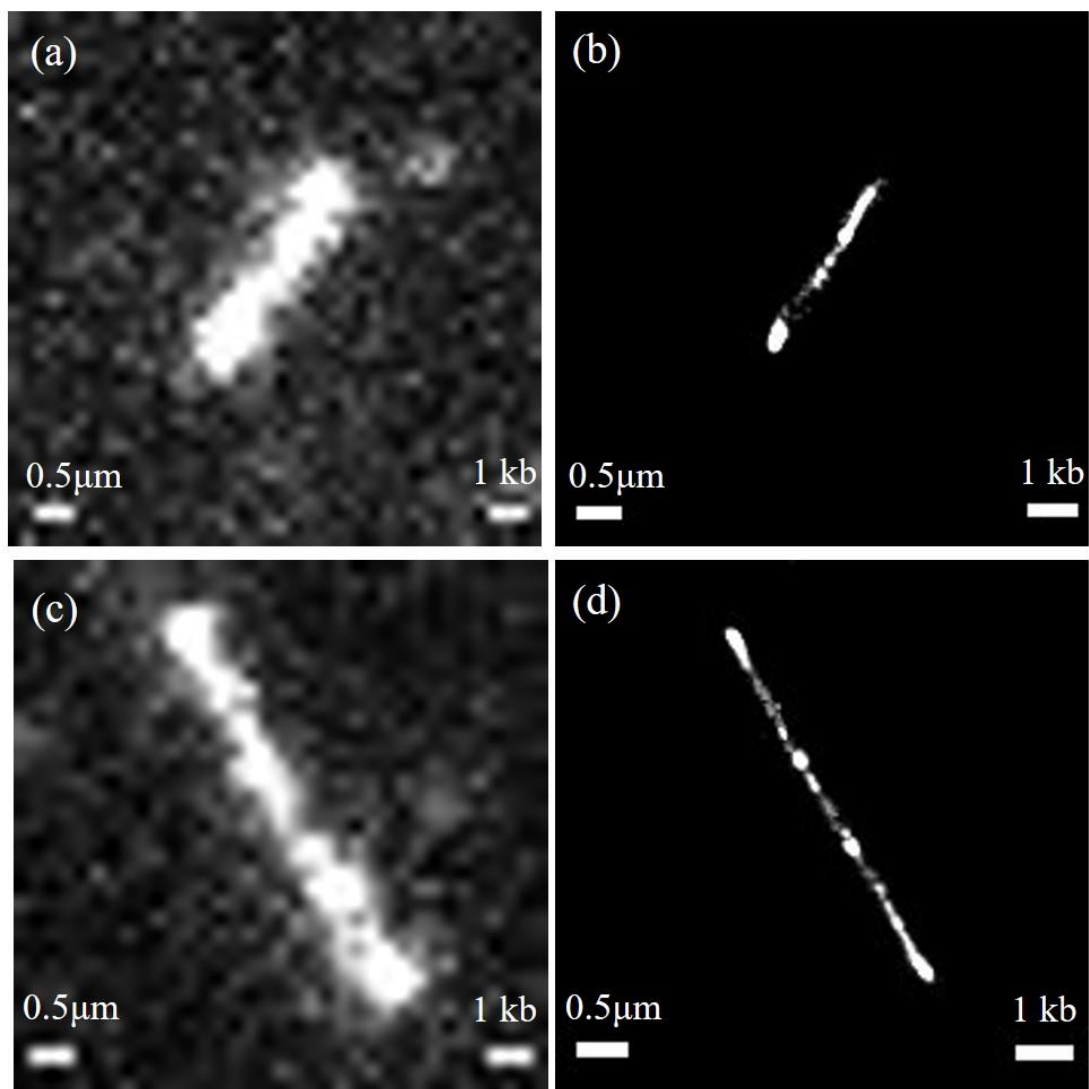


圖 3-14 比較傳統顯微鏡端粒 DNA 影像與 dSTORM 超解析端粒 DNA 影像之差異。(a)(c) 為傳統顯微鏡端粒 DNA 螢光影像。(b)(d) 為在 dSTORM 系統中收集一萬張螢光影像子圖後重建之端粒 DNA dSTORM 超解析螢光影像圖，長度分別為 4.0 kb (2.3 μ m) 及 7.0 kb (4.0 μ m)。透過將端粒探針 TelC - Alexa Fluor 647 (in hybridization buffer 2) 於 50°C 與端粒 DNA 雜合 2 小時定位端粒 DNA 位置，並以 647 nm 雷射激發 Alexa Fluor 647。

3.3.6 以微米毛細管提取單顆細胞 DNA

由於本實驗最終目的為觀測單顆細胞端粒長度，因此單顆細胞 DNA 的提取是首先必須要跨出的第一步。如圖 3-15 所示，我們嘗試以尖端開口直徑為 1 微米的毛細管刺入細胞核內，並以注射幫浦控制抽取細胞核內 DNA，但在數十分鐘的抽取下細胞仍維持原來的樣子，並沒有內縮的現象出現，且毛細管尖端最後甚至有堵塞情況。我們認為此方法失敗的原因在於單顆細胞是由總長約為 2 公尺的 DNA 濃縮在微米等級的細胞核裡，想像成一個高密度纏繞的毛線球，是不可能以吸管將毛線如抽絲剝繭般抽出，反而還可能因此而塞住，因此證明此方法無法成功。

3.3.7 破壞細胞之細胞膜與細胞核膜

既然無法藉由微米毛細管刺入細胞核膜內直接提取細胞內 DNA，因此勢必要經過破壞細胞膜與核膜的步驟才能得到 DNA。首先待細胞吸附於玻片表面後，吸棄表面溶液並加入含有 0.5% NP-40 及 100 μ g/ml Proteinase K 的 HSB 溶液。添加界面活性劑 NP-40 與蛋白酶 Proteinase K 目的為消化細胞膜與核膜，而含有高鹽類 650mM NaCl 的 HSB 溶液目的為去除染色質中連接組蛋白 H1 (Histone H1)，使 DNA 能夠分散開來。我們以 10^{-7} M 的 SYTO 9 染料對細胞核 DNA 進



圖 3-15 嘗試以微米毛細管吸取單顆細胞 DNA。使用奈米三軸平台移動尖端開口直徑為 $1\mu\text{m}$ 之毛細管進入細胞內，並以注射幫浦控制抽取細胞核內 DNA。

行染色，再以波長為 488 nm，功率為 20mW 的藍光雷射激發 SYTO 9 染料分子對細胞核進行定位觀測。實驗結果如圖 3-16，我們可以看到實驗一開始細胞在 1X PBS 中保持著正常的細胞型態，但在更換成裂解溶液後 30 秒細胞型態明顯改變，但 DNA 仍然包覆在細胞內。在更換溶液後 60 秒可以觀察到整顆細胞已經開始瓦解，細胞碎片逐漸擴散至溶液中，且原本包覆於細胞內的 DNA 也開始慢慢地往外擴散，因此我們證明了藉由破壞細胞膜與核膜可以成功使 DNA 游離出來，有利於我們對單顆細胞完整 DNA 的提取。

3.3.8 以微米毛細管分離單顆細胞

我們已證明能夠藉由破壞細胞使 DNA 游離出來，因此接下來必須先分離單顆細胞，再對其破壞。目前常用來分離單科細胞的方法有流式細胞分選技術 (Fluorescence-Activated Cell Sorting)，雷射顯微捕捉技術 (Laser capture microdissection，簡稱為 LCM) 及微流體技術 (microfluidics) 等等⁴⁸。但礙於以上技術花費較昂貴，因此我們使用手動採集的方式，將細胞溶液先稀釋至低濃度以確保在一個顯微鏡視野下只有單一顆細胞，避免細胞過度擁擠影響單顆細胞分離。如圖 3-17，利用奈米級三軸移動平台將毛細管開口端降低至細胞附近，並將毛細管另一端放低於玻片 15 公分，利用虹吸現象將單顆細胞吸進毛

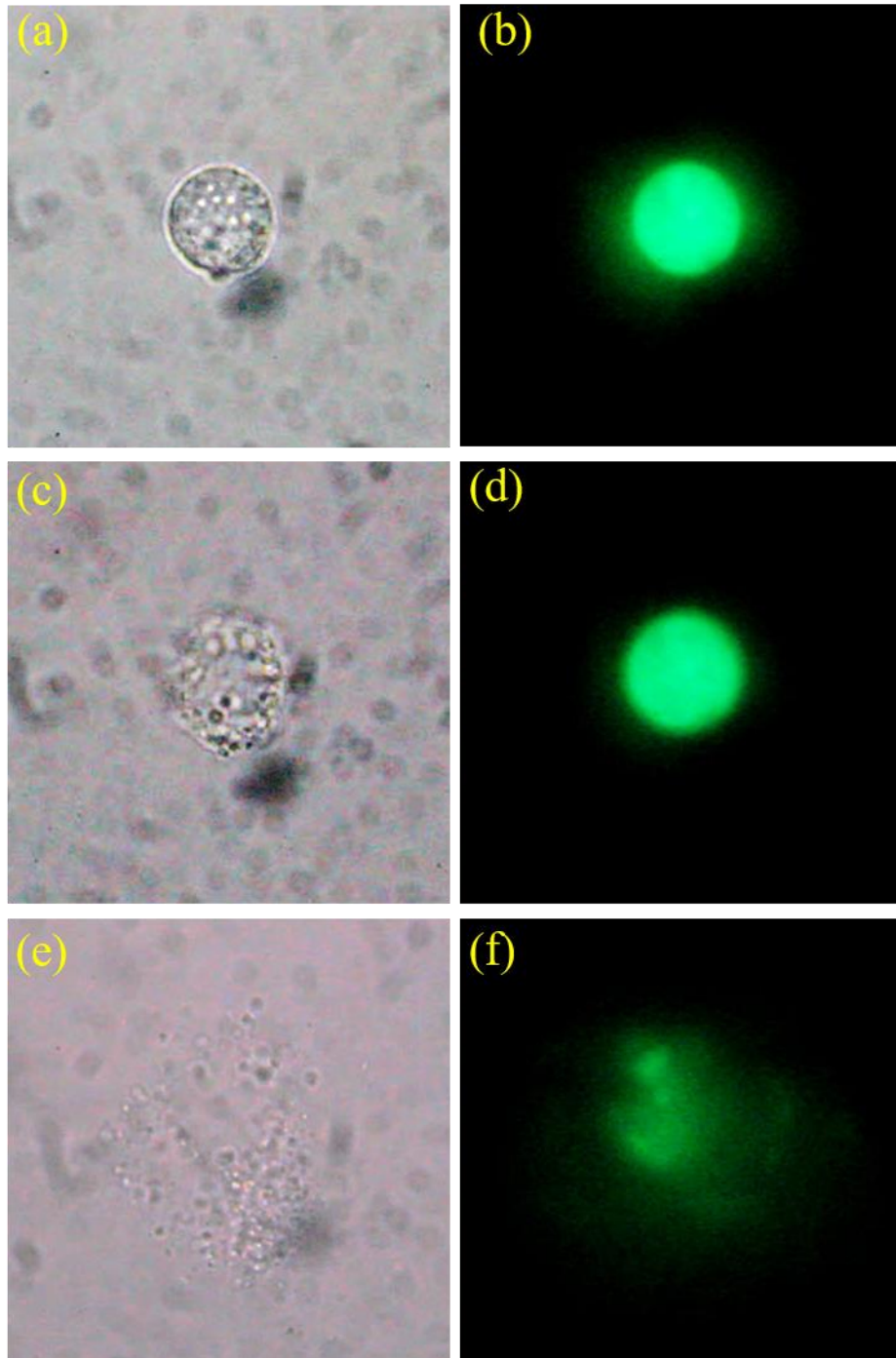


圖 3-16 破壞細胞之細胞膜與細胞核膜。(a) (b) 分別為未反應前細胞之亮視野與螢光影像圖。
(c) (d) 分別為加入 0.5% NP-40 及 100µg/ml Proteinase K 反應 30 秒後之細胞亮視野與螢光影像圖。
(e) (f) 分別為加入 0.5% NP-40 及 100µg/ml Proteinase K 反應 60 秒後之細胞亮視野與螢光影像圖。使用 SYTO 9 定位 DNA 位置，並以 488 nm 雷射激發 SYTO 9。

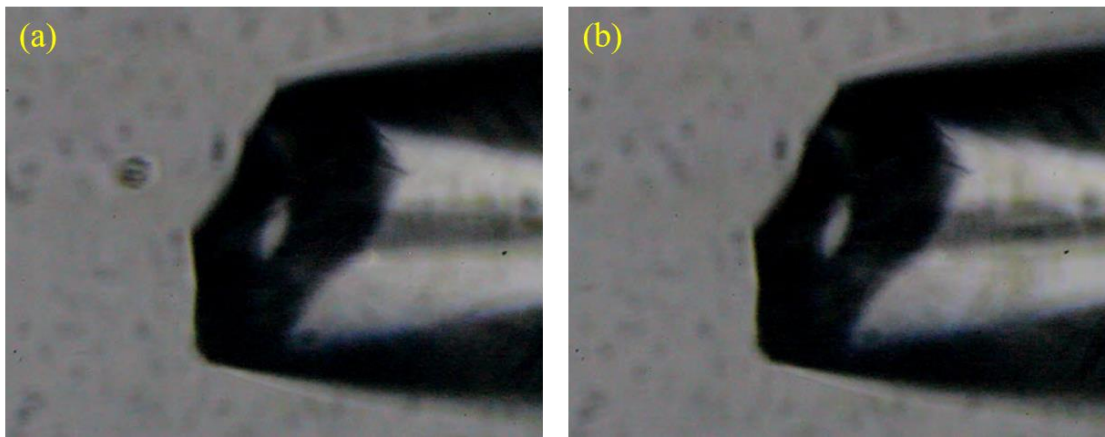


圖 3-17 以內徑為 $50\mu\text{m}$ 之微米毛細管分離單顆細胞。(a) 將毛細管開口端降至細胞附近位置 (b) 藉由虹吸現象將單顆細胞吸入毛細管內，即完成單顆細胞分離。

細管內，將毛細管開口端移至另一細胞裂解溶液中，接下來把毛細管另一端抬高於玻片 15 公分讓細胞從毛細管中離開，即完成單顆細胞分離。

3.3.9 單顆細胞 DNA 萃取

首先我們在顯微鏡觀察下利用微米毛細管將單顆細胞提取移至含有 0.5%NP-40 及 100 μ g/ml Proteinase K 的 HSB 溶液中，雖然先前已經證明在此條件下能夠破壞細胞分離單顆細胞 DNA，但是由於添加了界面活性劑使液珠與玻片之接觸角變小，所以整顆液珠幾乎攤平在玻片上，礙於液珠與玻片之間作用力遠大於液珠與 tip 尖端的毛細現象，因此無法以液珠平移沉積之方法拉直單顆細胞 DNA。為了恢復液珠與玻片之間的接觸角，我們選擇不添加界面活性劑 NP-40，改將單顆細胞回溶於 5 μ l 只含有 200ng/ml Proteinase K 的 HSB 溶液中，於 55 $^{\circ}$ C 中反應 1 小時以提高蛋白酶活性，有利於破壞細胞結構。接著利用液珠平移將 DNA 沉積在玻片上，以 10 $^{-8}$ M 的 YOSeta-1 染料對 DNA 進行染色，再以波長為 488 nm，功率為 1mW 的藍光雷射激發 YOSeta-1 染料分子對 DNA 進行定位觀測。實驗結果如圖 3-18，雖然我們成功破壞細胞得到單顆細胞 DNA，但是 DNA 卻是以整團纏繞在一起的形式沉積在玻片上而無法有效拉直，依照目前的結果是沒

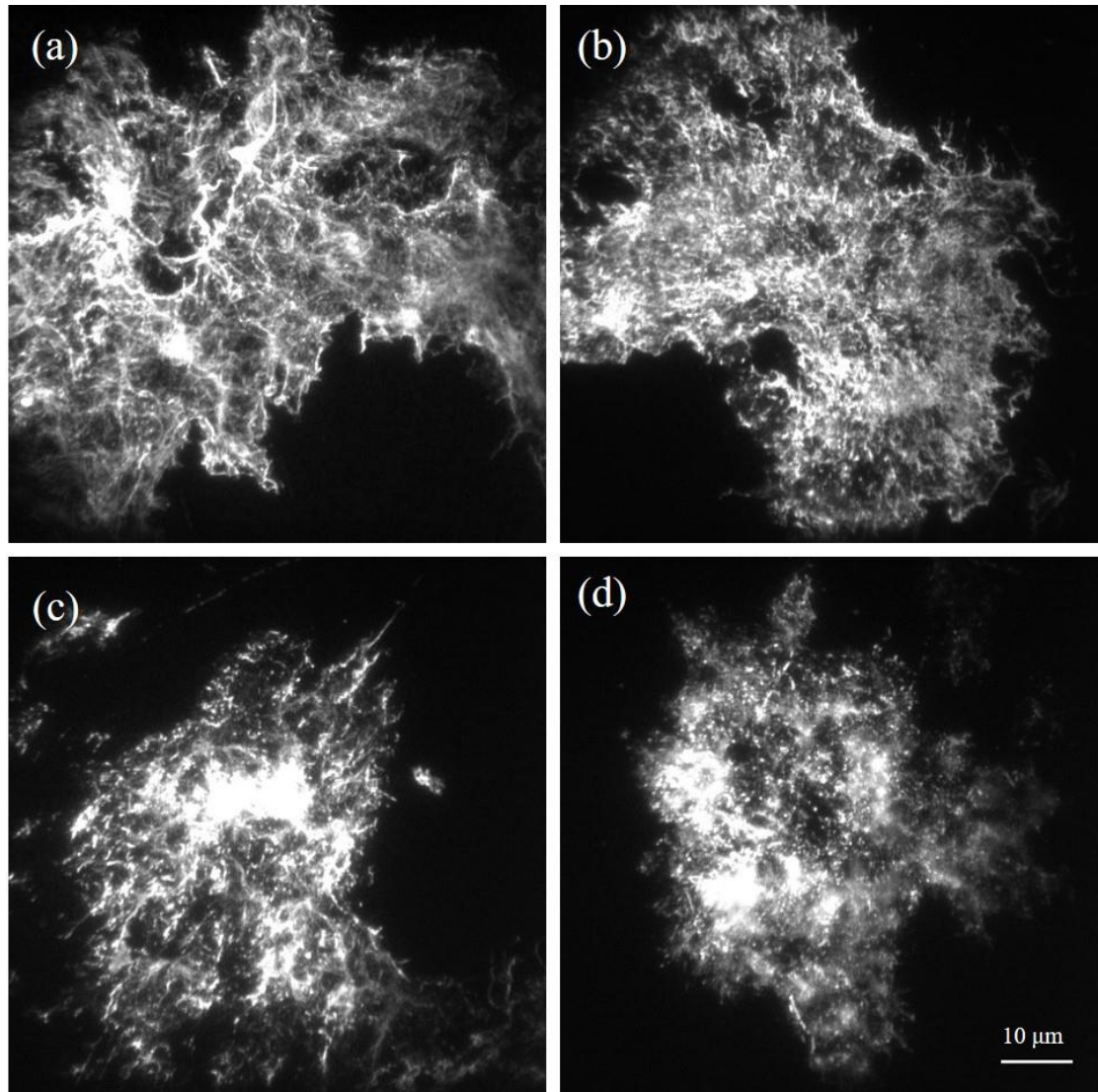


圖 3-18 單顆細胞 DNA 萃取之 TIRF 螢光顯微鏡影像圖。(a-d) 為將單顆細胞回溶於 200 ng/ml Proteinase K (in HSB) 溶液中，於 55°C 反應 1 小時後 DNA 螢光影像圖，比例尺為 10 μm 。使用 YOSeta-1 染色定位 DNA 位置並以 488 nm 雷射激發 YOSeta-1。

有辦法對端粒 DNA 長度做準確的量測。因此接下來為了將單顆細胞 DNA 分散並片段化，我們嘗試了許多不同的條件。

3.3.10 單顆細胞 DNA 片段化

目前常用於 DNA 片段化的方法包括限制性內切酶消化法，超音波剪切法，霧化法，水力剪切法及高溫剪切法，金屬離子催化剪切法。這些方法目前都被用於片段化 DNA 的生成，每一個方法都有其優點。限制性內切酶消化法的優點在於能使 DNA 在特定的位置被剪切而得到非隨機切斷的 DNA 片段。超音波剪切法，霧化法與水力剪切法皆屬於物理隨機剪切方法，因此能有效控制 DNA 片段化後的大小分佈。高溫剪切法與金屬離子催化剪切法皆屬於化學剪切法，優點在於操作簡單。後續我們將選擇其中幾種方式來打斷單顆細胞緊密纏繞的 DNA，以液珠平移沉積的方式將 DNA 沉積在玻片上，並以 10^{-8} M 的 YOSeta-1 染料對 DNA 進行染色，再以波長為 488 nm，功率為 1mW 的藍光雷射激發 YOSeta-1 染料分子對 DNA 做觀察。

3.3.10.1 高溫剪切法

高溫加熱使 DNA 片段化是目前最簡單且便宜的方法⁴⁹，透過將單顆細胞 DNA 於 95°C 恆溫箱中加熱使 DNA 片段化。實驗結果如圖 3-19，我們可以觀察到在經過 95°C 加熱 30 分鐘後成功將部分 DNA 打斷並拉直在玻片上，此反應條件所得到的 DNA 長度相對較長，約在 100~200 kb 左右，但是仍然觀察的到聚集的 DNA，因此我們將加熱時間提高至 1 小時，實驗結果如圖 3-20，我們可以觀察到片段化的 DNA 長度變短了，長度約在 10~50 kb 左右，但也仍然觀察的到聚集的 DNA，我們又將反應時間增加到 2 小時，實驗結果如圖 3-21，我們可以觀察到片化的 DNA 長度約在 3~20 kb 左右，且仍然觀察的到聚集的 DNA。隨著加熱時間的增加，DNA 片段化的長度變得更短，在 95°C 加熱 2 小時之條件下我們觀察到部分 DNA 長度已經小於人體端粒平均長度，因此端粒 DNA 也有可能被打斷進而影響我們對端粒 DNA 做正確長度的量測，同時在此條件仍有聚集的 DNA 無法有效拉伸，所以證明高溫加熱無法均勻地片段化單顆細胞 DNA。

3.3.10.2 超音波剪切法

在這裡我們使用功率可調手持式超音波細胞破碎機來片段化單顆細胞 DNA。一開始即把功率調到最大值 150W，先測試在最大強度

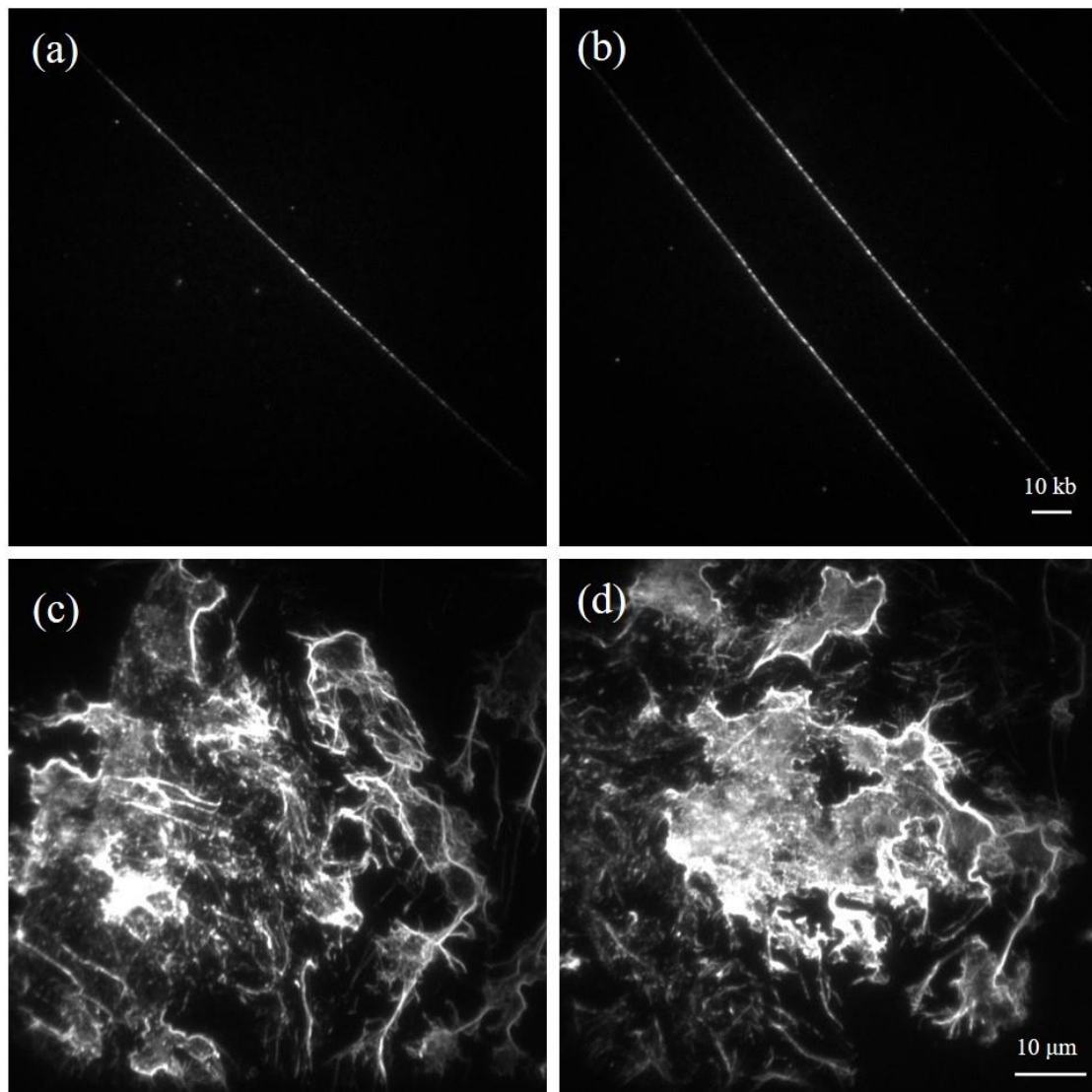


圖 3-19 95°C 加熱 30 分鐘片段化單顆細胞 DNA 之 TIRF 螢光顯微鏡影像圖。(a)(b) 為片段化 DNA 之螢光影像圖，比例尺為 10 kb。(c)(d) 為聚集 DNA 之螢光影像圖，比例尺為 10 μm 。使用 YOSeta-1 染色定位 DNA 位置並以 488 nm 雷射激發 YOSeta-1。

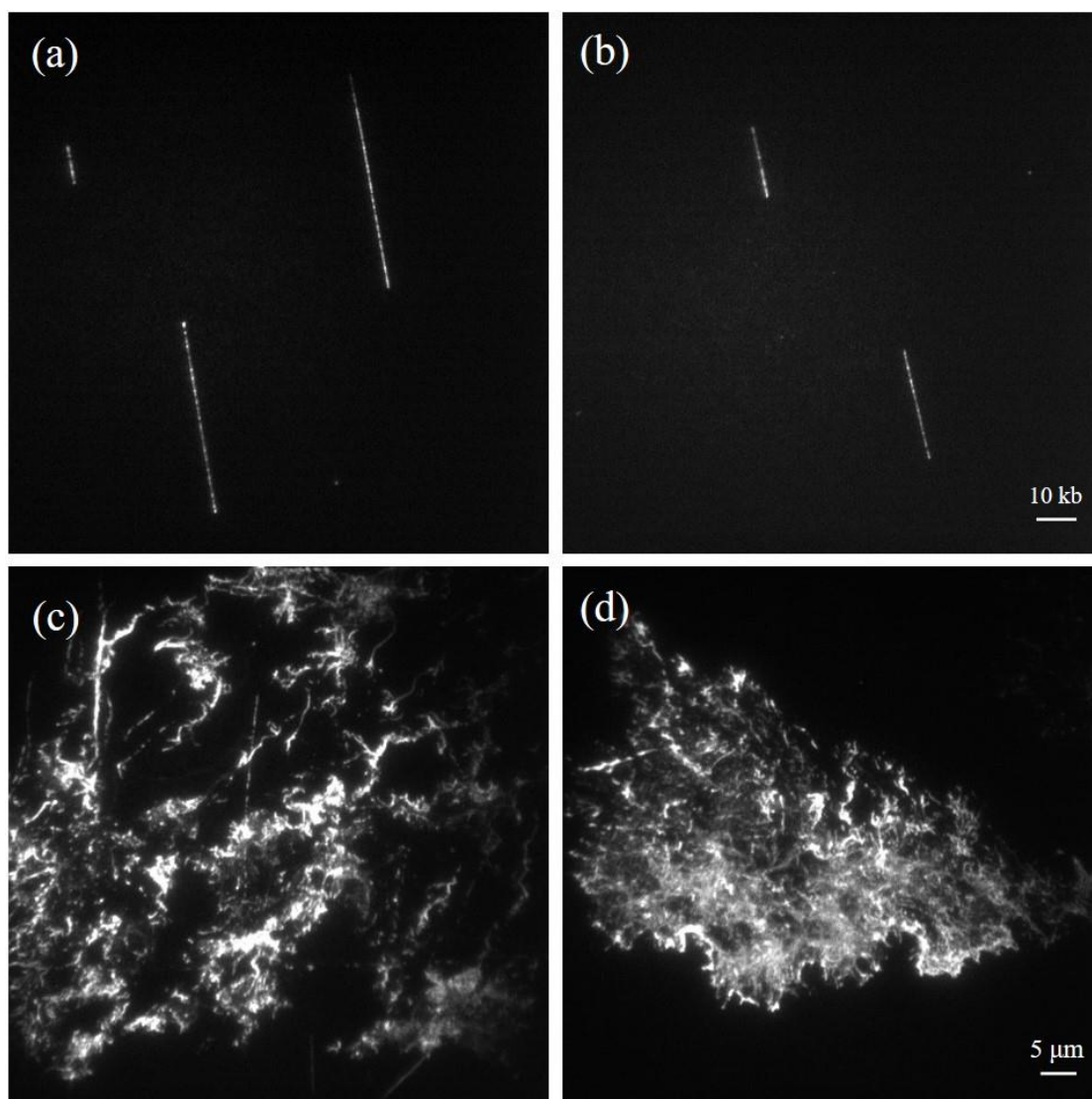


圖 3-20 95°C 加熱 1 小時片段化單顆細胞 DNA 之 TIRF 螢光顯微鏡影像圖。(a) (b) 為片段化 DNA 之螢光影像圖，比例尺為 10 kb。(c) (d) 為聚集 DNA 之螢光影像圖，比例尺為 5 μm。使用 YOSeta-1 染色定位 DNA 位置並以 488 nm 雷射激發 YOSeta-1。

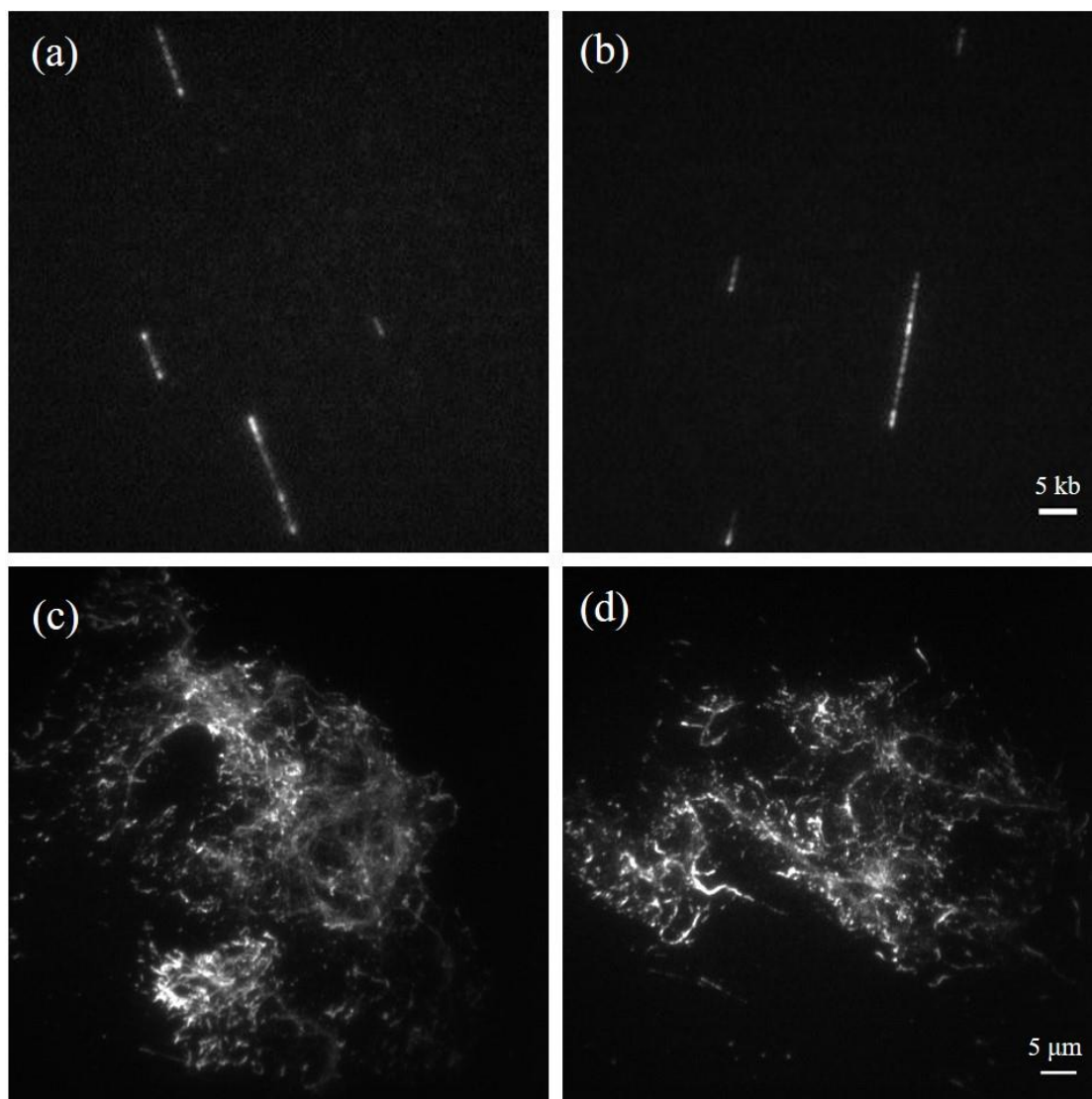
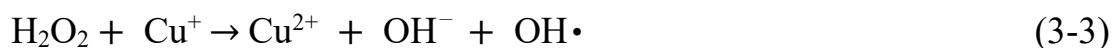


圖 3-21 95°C 加熱 2 小時片段化單顆細胞 DNA 之 TIRF 螢光顯微鏡影像圖。(a) (b) 為片段化 DNA 之螢光影像圖，比例尺為 5 kb。(c) (d) 為聚集 DNA 之螢光影像圖，比例尺為 5 μm。使用 YOSeta-1 染色定位 DNA 位置並以 488 nm 雷射激發 YOSeta-1。

時能否將聚集的 DNA 震碎分散，實驗結果如圖 3-22，在經過 1 分鐘反應時間後，可以看到大部分震斷後的 DNA 長度小於 2 kb，已經小於人體平均端粒長度，但是仍然有觀察到未拆散聚集的 DNA。實驗結果證明以超音波處理過後的 DNA 長度過短，有可能會使原本完整的端粒 DNA 斷成好幾段，且即使在最大強度震碎之下仍有聚集拆不散的 DNA，因此無法有效切割單顆細胞 DNA。

3.3.10.3 金屬離子催化剪切法

研究指出結合硫酸銅與抗壞血酸能有效切割 DNA⁵⁰，其反應機制如下：



由於抗壞血酸分別與二價銅離子與分子氧反應產生一價銅離子與過氧化氫，而一價銅離子又會與過氧化氫反應產生氧化能力極強的氫氧自由基，因此能透過氫氧自由基來破壞 DNA 的磷酸雙酯鍵使其

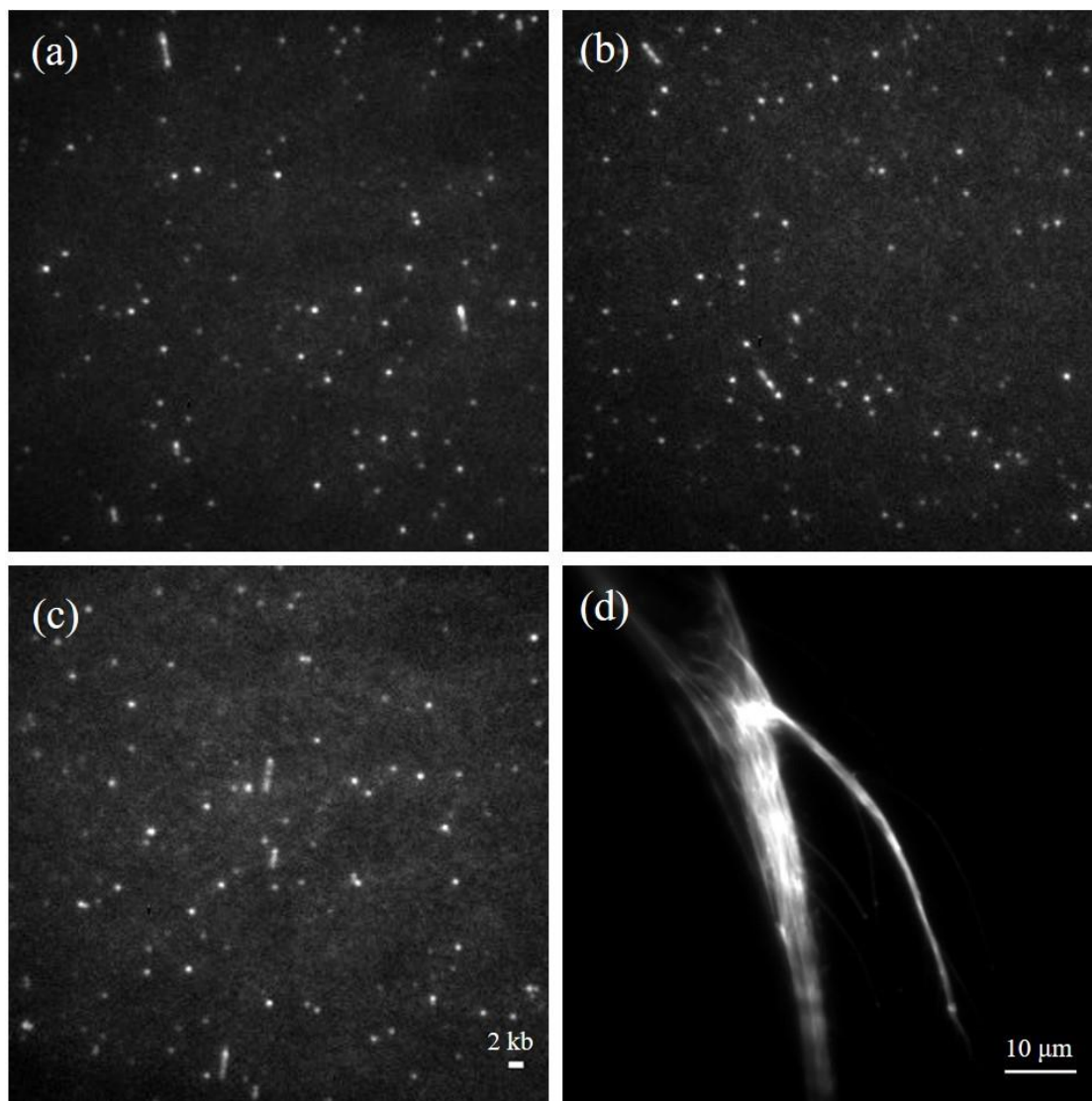


圖 3-22 以功率為 150W 超音波片段化單顆細胞 DNA 之 TIRF 螢光顯微鏡影像圖。(a-c) 反應時間為 1 分鐘之 DNA 螢光影像圖，比例尺為 2 kb。(d) 反應時間為 1 分鐘之聚集 DNA 螢光影像圖，比例尺為 10 μm 。使用 YOSeta-1 染色定位 DNA 位置並以 488 nm 雷射激發 YOSeta-1。

斷裂。此外，在氧氣存在的條件下，三聯吡啶鈦(II)經可見光照射後透過能量轉移將能量傳遞給三線態氧產生具有強氧化力的單線態氧來斷裂 DNA⁵¹。

首先我們於單顆細胞 DNA 樣品溶液中加入硫酸銅與抗壞血酸混合溶液，最終濃度為 1 mM，於室溫震盪反應 30 分鐘使 DNA 片段化，實驗結果如圖 3-23，此反應條件所得到的 DNA 長度約在 50~100 kb 左右，但是仍然觀察的到聚集的 DNA，因此我們將最終濃度提高至 5 mM，於室溫震盪反應 30 分鐘使 DNA 片段化，實驗結果如圖 3-24，我們可以觀察到片段化的 DNA 長度變短了，長度約在 1~20 kb 左右，已經小於人體平均端粒長度，但也仍然觀察的到聚集的 DNA。另外我們也嘗試使用三聯吡啶鈦(II)來切割單顆細胞 DNA，如圖 3-25，由於三聯吡啶鈦(II)最大吸收波長在 450 nm，因此我們於單顆細胞 DNA 樣品溶液中加入三聯吡啶鈦(II)，最終濃度為 1mM，在功率為 1W，波長為 460 nm 的藍光 LED 燈照射下反應 30 分鐘使 DNA 片段化，實驗結果如圖 3-26，此反應條件所得到的 DNA 長度約在 1~25 kb 左右，但是仍然觀察的到聚集的 DNA，因此我們將最終濃度提高至 5 mM，於室溫震盪反應 30 分鐘使 DNA 片段化，實驗結果如圖 3-27，我們可以觀察到片段化的 DNA 長度變短了，長度約在 1~5 kb 左右，

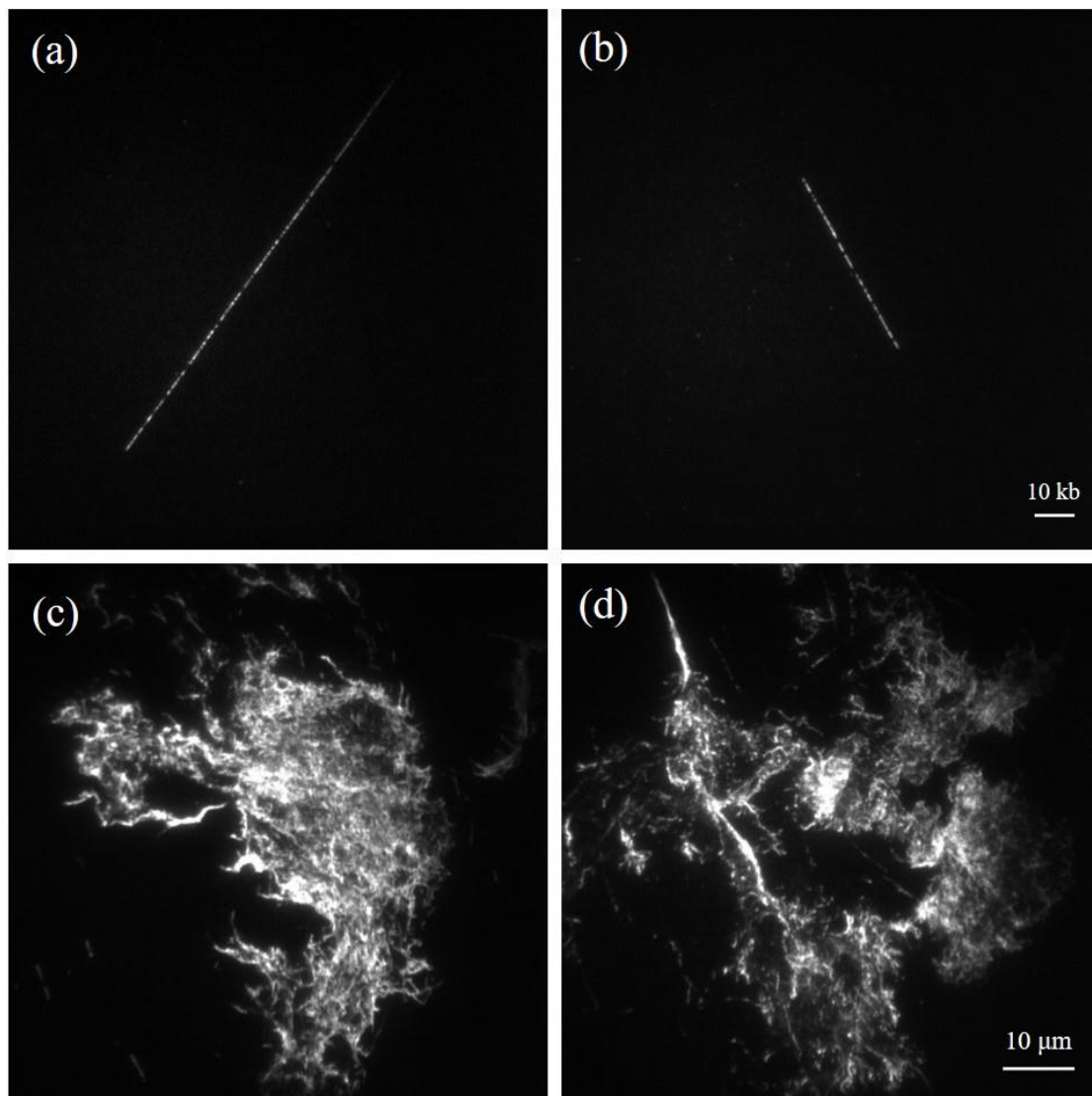


圖 3-23 以 1 mM 銅離子催化切割單顆細胞 DNA 30 分鐘之 TIRF 螢光顯微鏡影像圖。(a) (b) 為片段化 DNA 之螢光影像圖，比例尺為 10 kb。(c) (d) 為聚集 DNA 之螢光影像圖，比例尺為 10 μm 。使用 YOSeta-1 染色定位 DNA 位置並以 488 nm 雷射激發 YOSeta-1。

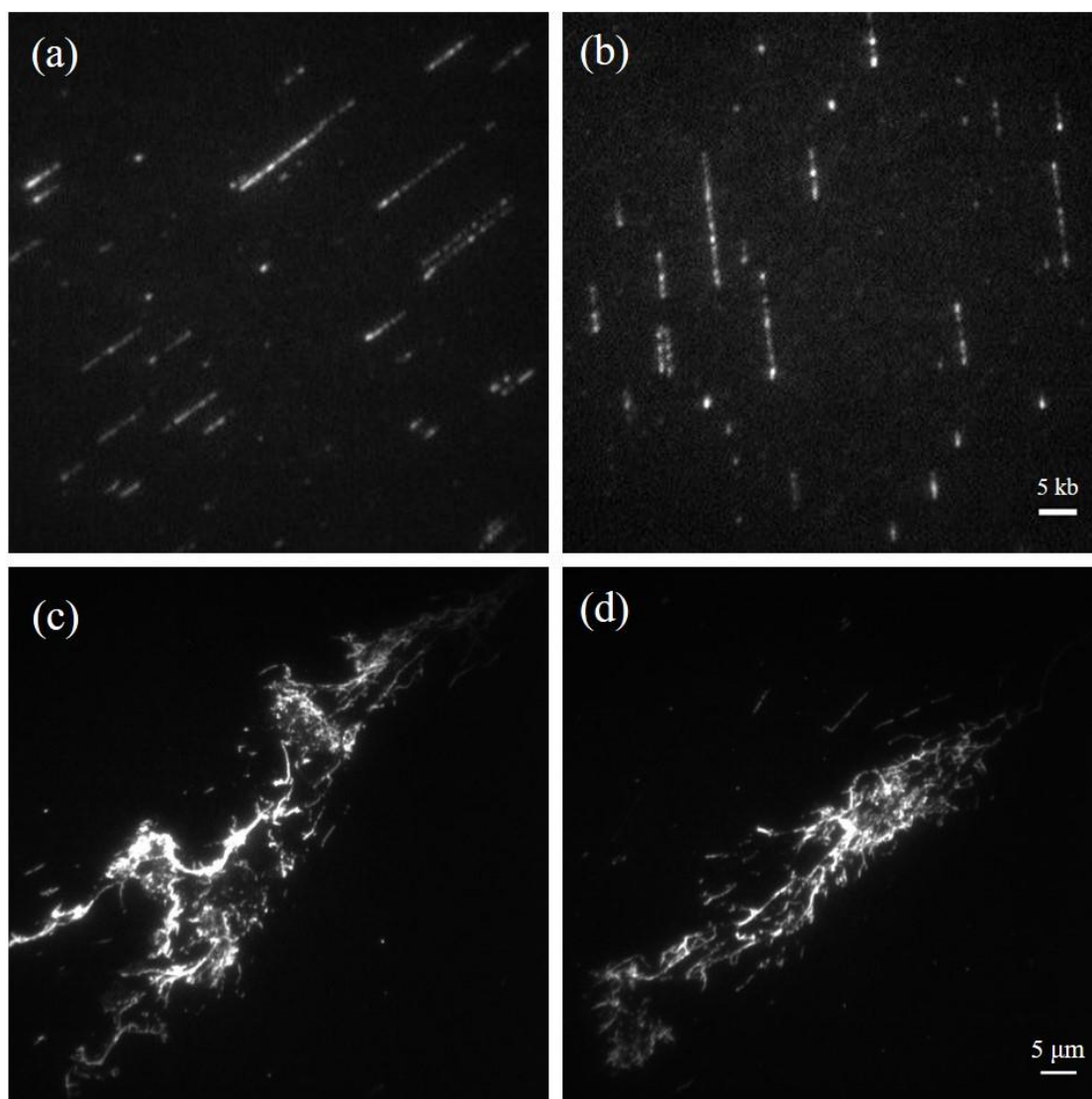


圖 3-24 以 5 mM 銅離子催化切割單顆細胞 DNA 30 分鐘之 TIRF 螢光顯微鏡影像圖。(a) (b) 為片段化 DNA 之螢光影像圖，比例尺為 5 kb。(c) (d) 為聚集 DNA 之螢光影像圖，比例尺為 5 μm 。使用 YOSeta-1 染色定位 DNA 位置並以 488 nm 雷射激發 YOSeta-1。

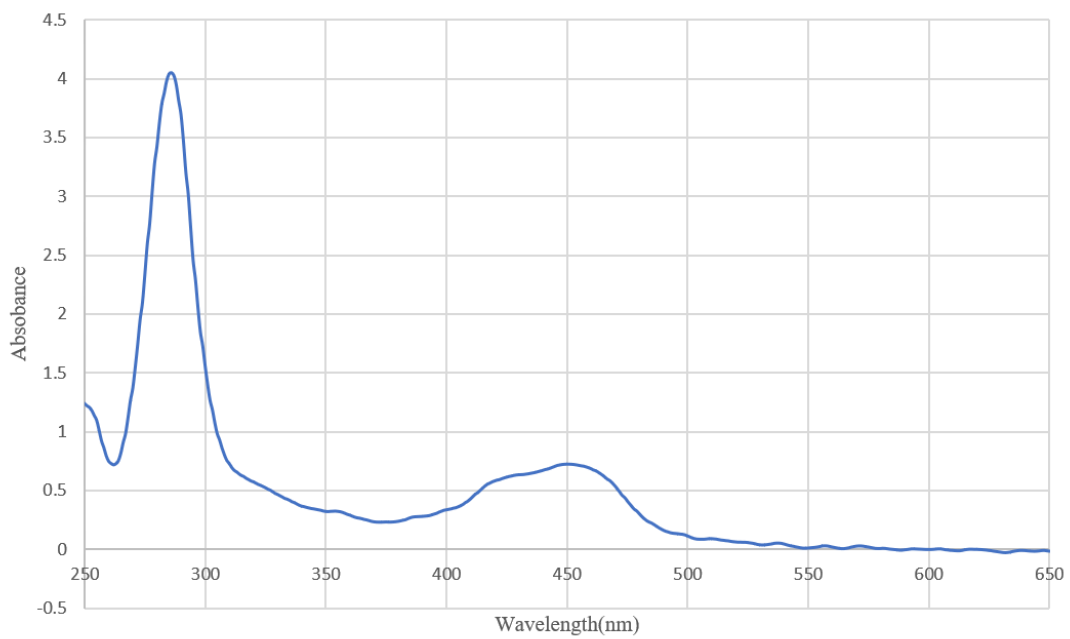


圖 3-25 三聯吡啶氯化鈎六水合物之吸收圖。

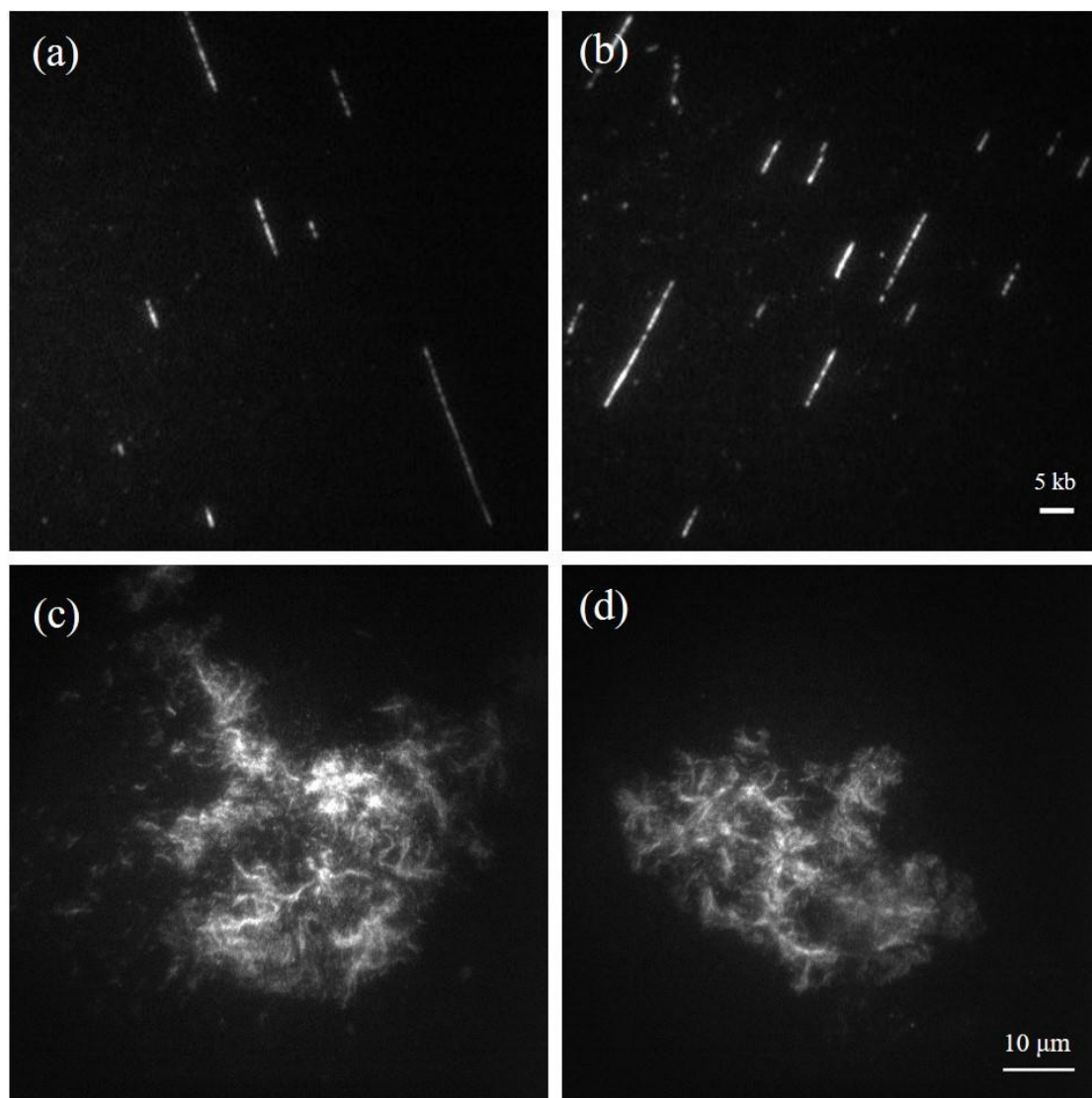


圖 3-26 以 1 mM 三聯吡啶鈉(II)催化切割單顆細胞 DNA 30 分鐘之 TIRF 螢光顯微鏡影像圖。(a)(b) 為片段化 DNA 之螢光影像圖，比例尺為 5 kb。(c)(d) 為聚集 DNA 之螢光影像圖，比例尺為 10 μm 。使用 YOSeta-1 染色定位 DNA 位置並以 488 nm 雷射激發 YOSeta-1。

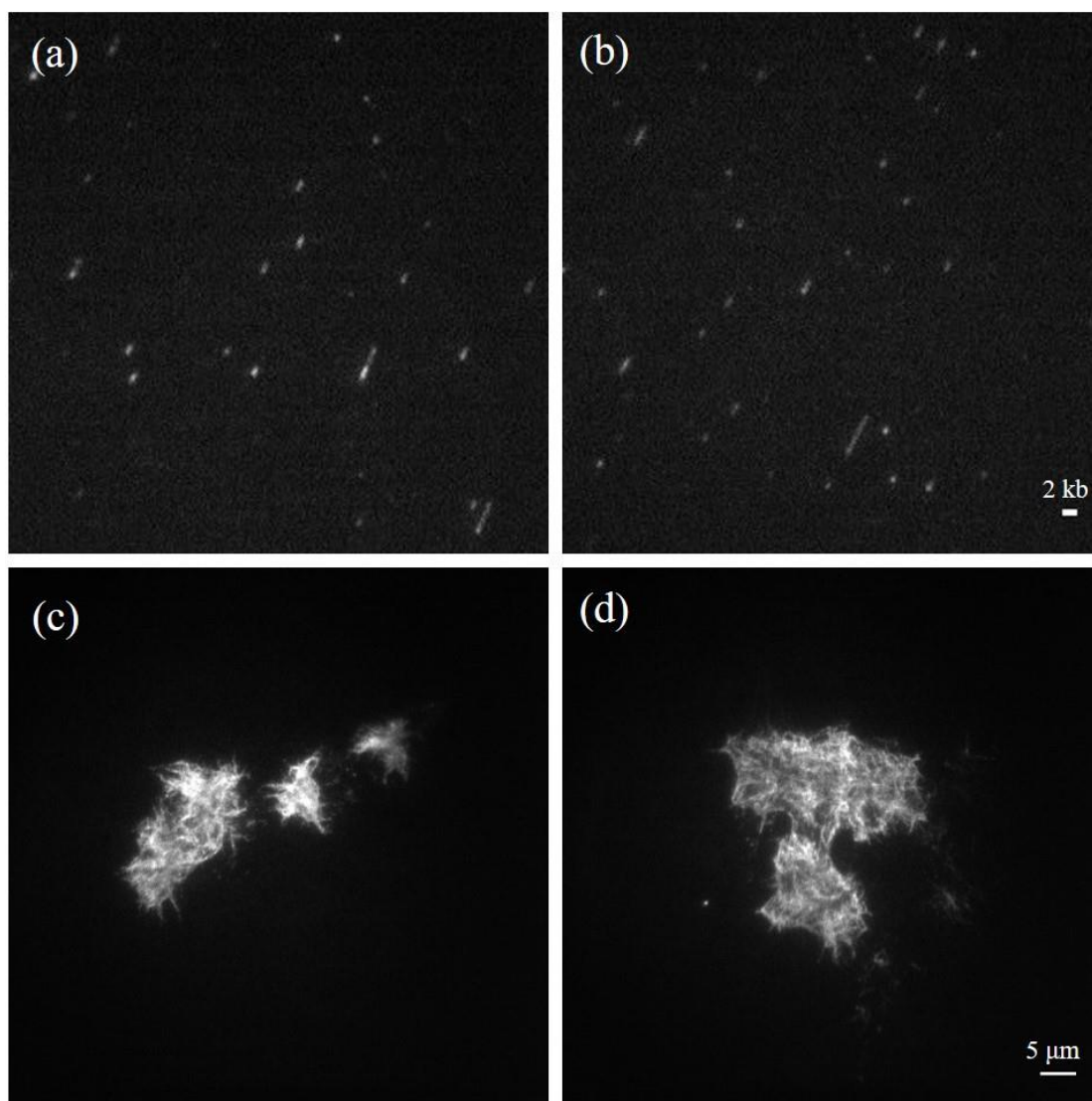


圖 3-27 以 5 mM 三聯吡啶鈉(II)催化切割單顆細胞 DNA 30 分鐘之 TIRF 螢光顯微鏡影像圖。(a) (b) 為片段化 DNA 之螢光影像圖，比例尺為 2 kb。(c) (d) 為聚集 DNA 之螢光影像圖，比例尺為 5 μm 。使用 YOSeta-1 染色定位 DNA 位置並以 488 nm 雷射激發 YOSeta-1。

已經小於人體平均端粒長度，但也仍然觀察的到聚集的 DNA。隨著金屬離子濃度的增加，DNA 片段化的長度變得更短，在 5 mM 銅離子與 5 mM 三聯吡啶鈉(II)催化切割 DNA 之條件下我們觀察到部分 DNA 長度已經小於人體端粒平均長度，因此端粒 DNA 也有可能會被打斷進而影響我們對端粒 DNA 做正確長度的量測，同時在此條件仍有聚集的 DNA 無法有效拉伸，所以證明利用此二金屬催化剪切法無法均勻地片段化單顆細胞 DNA。

3.3.10.4 限制性內切酶消化法

在這裡我們使用限制性內切酶組合 *Bst*UI/*Taq*^αI/*Hpa*II 來消化單顆細胞 DNA，由於這些內切酶在端粒區域缺乏辨識位點，因此不會切割到端粒序列。透過將單顆細胞 DNA 回溶於 10μl 含有 0.1U/ μl *Bst*UI/*Taq*^αI/*Hpa*II 的 1X NEBuffer 4 (50 mM potassium acetate, 20 mM Tris-acetate, 10 mM magnesium acetate, 1 mM DTT, pH 7.9) 中，於 37°C 反應 overnight 消化單顆細胞 DNA。如圖 3-28，我們可以觀察到以限制性內切酶消化法切割單顆細胞 DNA 之實驗結果，相較於先前的高溫加熱法及金屬催化切割法所得到的 DNA 更為分散，但 DNA 長度仍然過長因而無法有效線性拉直在玻片上，且過長的 DNA 無法以 EDC 反應將其牢牢固定在玻片上，因此在端粒 DNA 雜合 wash 步

驟中 DNA 將會脫離玻片進而影響我們對端粒長度之觀測。

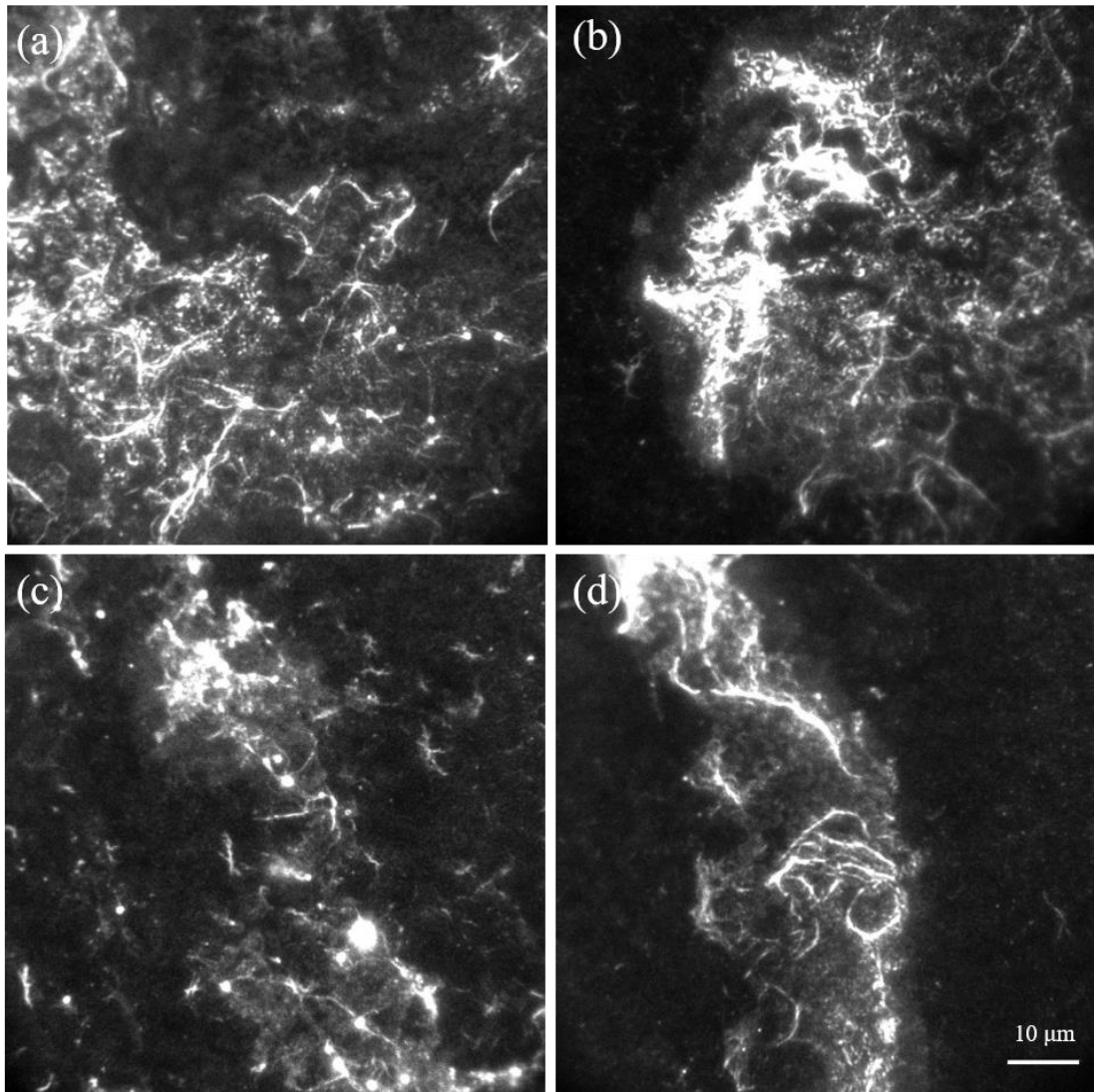


圖 3-28 以限制性內切酶消化單顆細胞 DNA 之 TIRF 螢光顯微鏡影像圖。(a-d) 以限制性內切酶 *Bst*UI/*Taq*^αI/*Hpa*II 於 37°C 消化單顆細胞 DNA overnight 之螢光影像圖，比例尺為 10 μm。使用 YOSeta-1 染色定位 DNA 位置並以 488 nm 雷射激發 YOSeta-1。

3.4 結論與未來展望

本實驗比較了以三種不同表面修飾的玻璃片及兩種線性沉積 DNA 之方法來拉伸 DNA，其中以 Zeonex 玻片與液珠平移沉積法為最佳玻片表面修飾及 DNA 線性化方法，透過液珠平移沉積之方式可將體積小至 5 μ l 的 DNA 樣品線性沉積在修飾有疏水性聚合物 Zeonex 玻片表面上，且最低 DNA 樣品線性沉積濃度可以達到約一顆細胞的 DNA 含量。同時我們將細胞萃取出來的 DNA 線性沉積在玻片表面後，成功以螢光原位雜合法將端粒螢光標記探針與端粒 DNA 雜合並以 dSTORM 超解析螢光顯微鏡成像觀測端粒長度。另外，我們也成功以微米毛細管分離出單顆細胞，並透過 Proteinase K 蛋白酶來破壞細胞膜與細胞核膜使 DNA 游離出來，接著我們也嘗試以高溫剪切法，超音波剪切法，金屬離子催化剪切法及限制性內切酶消化法來片段化單顆細胞 DNA，隨著高溫剪切反應時間與金屬離子濃度的增加，片段化 DNA 之長度也越來越短，當長度短至小於人體端粒 DNA 平均長度時，仍有纏繞聚集的 DNA 未能被切割拉直在玻片上，因此未來希望能找夠到均勻切割 DNA 的最佳條件，以利於在單顆細胞的水平上觀測端粒長度。

3.5 參考文獻

1. Boettiger, A. N.; Bintu, B.; Moffitt, J. R.; Wang, S.; Beliveau, B. J.; Fudenberg, G.; Imakaev, M.; Mirny, L. A.; Wu, C. T.; Zhuang, X., Super-resolution imaging reveals distinct chromatin folding for different epigenetic states. *Nature* **2016**, *529* (7586), 418-22.
2. Wang, W.; Li, G. W.; Chen, C.; Xie, X. S.; Zhuang, X., Chromosome organization by a nucleoid-associated protein in live bacteria. *Science* **2011**, *333* (6048), 1445-9.
3. Jablonski, A., Efficiency of anti-Stokes fluorescence in dyes. *Nature* **1933**, *131* (3319), 839.
4. Nwaneshiudu, A.; Kuschal, C.; Sakamoto, F. H.; Anderson, R. R.; Schwarzenberger, K.; Young, R. C., Introduction to confocal microscopy. *Journal of Investigative Dermatology* **2012**, *132* (12), 1-5.
5. Webb, D. J.; Brown, C. M., Epi-fluorescence microscopy. In *Cell Imaging Techniques*, Springer: 2012; pp 29-59.
6. Lin, Y.-Z.; Ou, D.-L.; Chang, H.-Y.; Lin, W.-Y.; Hsu, C.; Chang, P.-L., Simultaneous visualization of the subfemtomolar expression of microRNA and microRNA target gene using HILO microscopy. *Chemical Science* **2017**, *8* (9), 6670-6678.
7. Fish, K. N., Total internal reflection fluorescence (TIRF) microscopy. *Current protocols in cytometry* **2009**, *50* (1), 12.18. 1-12.18. 13.
8. Schneckenburger, H., Total internal reflection fluorescence microscopy: technical innovations and novel applications. *Current opinion in biotechnology* **2005**, *16* (1), 13-18.
9. Hell, S. W., Toward fluorescence nanoscopy. *Nat Biotechnol* **2003**, *21* (11), 1347-55.
10. Hell, S. W., Far-field optical nanoscopy. *Science* **2007**, *316* (5828), 1153-8.
11. Minoshima, M.; Kikuchi, K., Photostable and photoswitching fluorescent dyes for super-resolution imaging. *J Biol Inorg Chem* **2017**, *22* (5), 639-652.
12. Betzig, E., Proposed method for molecular optical imaging. *Optics letters* **1995**, *20* (3), 237-239.
13. Shimomura, O.; Johnson, F. H.; Saiga, Y., Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, Aequorea. *Journal of cellular and comparative physiology* **1962**, *59* (3), 223-239.
14. Rust, M. J.; Bates, M.; Zhuang, X., Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM). *Nature methods* **2006**, *3* (10), 793.
15. Bates, M.; Blosser, T. R.; Zhuang, X., Short-range spectroscopic ruler based on a

- single-molecule optical switch. *Physical review letters* **2005**, *94* (10), 108101.
16. Heilemann, M.; Van De Linde, S.; Schüttelz, M.; Kasper, R.; Seefeldt, B.; Mukherjee, A.; Tinnefeld, P.; Sauer, M., Subdiffraction-resolution fluorescence imaging with conventional fluorescent probes. *Angewandte Chemie International Edition* **2008**, *47* (33), 6172-6176.
 17. Heilemann, M.; van de Linde, S.; Mukherjee, A.; Sauer, M., Super-resolution imaging with small organic fluorophores. *Angewandte Chemie International Edition* **2009**, *48* (37), 6903-6908.
 18. Fölling, J.; Bossi, M.; Bock, H.; Medda, R.; Wurm, C. A.; Hein, B.; Jakobs, S.; Eggeling, C.; Hell, S. W., Fluorescence nanoscopy by ground-state depletion and single-molecule return. *Nature methods* **2008**, *5* (11), 943.
 19. Steinhauer, C.; Forthmann, C.; Vogelsang, J.; Tinnefeld, P., Superresolution microscopy on the basis of engineered dark states. *Journal of the American Chemical Society* **2008**, *130* (50), 16840-16841.
 20. Vogelsang, J.; Cordes, T.; Forthmann, C.; Steinhauer, C.; Tinnefeld, P., Controlling the fluorescence of ordinary oxazine dyes for single-molecule switching and superresolution microscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2009**, *106* (20), 8107-8112.
 21. Blackburn, E. H.; Gall, J. G., A tandemly repeated sequence at the termini of the extrachromosomal ribosomal RNA genes in Tetrahymena. *Journal of molecular biology* **1978**, *120* (1), 33-53.
 22. Szostak, J. W.; Blackburn, E. H., Cloning yeast telomeres on linear plasmid vectors. *Cell* **1982**, *29* (1), 245-255.
 23. Palm, W.; de Lange, T., How shelterin protects mammalian telomeres. *Annual review of genetics* **2008**, *42*, 301-334.
 24. Samassekou, O.; Gadji, M.; Drouin, R.; Yan, J., Sizing the ends: normal length of human telomeres. *Annals of Anatomy-Anatomischer Anzeiger* **2010**, *192* (5), 284-291.
 25. Watson, J. D., Origin of concatemeric T7DNA. *Nature New Biology* **1972**, *239* (94), 197-201.
 26. Soohoo, C. Y.; Shi, R.; Lee, T. H.; Huang, P.; Lu, K. P.; Zhou, X. Z., Telomerase inhibitor PinX1 provides a link between TRF1 and telomerase to prevent telomere elongation. *Journal of Biological Chemistry* **2011**, *286* (5), 3894-3906.
 27. Stansel, R. M.; de Lange, T.; Griffith, J. D., T-loop assembly in vitro involves binding of TRF2 near the 3' telomeric overhang. *The EMBO journal* **2001**, *20* (19), 5532-5540.
 28. Kim, S.-h.; Beausejour, C.; Davalos, A. R.; Kaminker, P.; Heo, S.-J.; Campisi, J., TIN2 mediates functions of TRF2 at human telomeres. *Journal of Biological Chemistry* **2004**, *279* (42), 43799-43804.

29. Frank, A. K.; Tran, D. C.; Qu, R. W.; Stohr, B. A.; Segal, D. J.; Xu, L., The shelterin TIN2 subunit mediates recruitment of telomerase to telomeres. *PLoS genetics* **2015**, *11* (7), e1005410.
30. Takai, K. K.; Kibe, T.; Donigian, J. R.; Frescas, D.; De Lange, T., Telomere protection by TPP1/POT1 requires tethering to TIN2. *Molecular cell* **2011**, *44* (4), 647-659.
31. Wang, F.; Podell, E. R.; Zaug, A. J.; Yang, Y.; Baciu, P.; Cech, T. R.; Lei, M., The POT1–TPP1 telomere complex is a telomerase processivity factor. *Nature* **2007**, *445* (7127), 506.
32. Baumann, P.; Price, C., Pot1 and telomere maintenance. *FEBS letters* **2010**, *584* (17), 3779-3784.
33. O'Connor, M. S.; Safari, A.; Liu, D.; Qin, J.; Songyang, Z., The human Rap1 protein complex and modulation of telomere length. *Journal of Biological Chemistry* **2004**, *279* (27), 28585-28591.
34. Mason, M.; Schuller, A.; Skordalakes, E., Telomerase structure function. *Current opinion in structural biology* **2011**, *21* (1), 92-100.
35. Dilley, R. L.; Verma, P.; Cho, N. W.; Winters, H. D.; Wondisford, A. R.; Greenberg, R. A., Break-induced telomere synthesis underlies alternative telomere maintenance. *Nature* **2016**, *539* (7627), 54.
36. Zglinicki, T. v.; Martin-Ruiz, C., Telomeres as biomarkers for ageing and age-related diseases. *Current molecular medicine* **2005**, *5* (2), 197-203.
37. Hezel, A. F.; Bardeesy, N.; Maser, R. S., Telomere induced senescence: end game signaling. *Current molecular medicine* **2005**, *5* (2), 145-152.
38. Shay, J. W.; Wright, W. E. In *Role of telomeres and telomerase in cancer*, Seminars in cancer biology, Elsevier: 2011; pp 349-353.
39. Shay, J. W.; Zou, Y.; Hiyama, E.; Wright, W. E., Telomerase and cancer. *Human molecular genetics* **2001**, *10* (7), 677-685.
40. Kimura, M.; Stone, R. C.; Hunt, S. C.; Skurnick, J.; Lu, X.; Cao, X.; Harley, C. B.; Aviv, A., Measurement of telomere length by the Southern blot analysis of terminal restriction fragment lengths. *Nature protocols* **2010**, *5* (9), 1596.
41. Cawthon, R. M., Telomere measurement by quantitative PCR. *Nucleic acids research* **2002**, *30* (10), e47-e47.
42. Cawthon, R. M., Telomere length measurement by a novel monochrome multiplex quantitative PCR method. *Nucleic acids research* **2009**, *37* (3), e21-e21.
43. O'Callaghan, N. J.; Fenech, M., A quantitative PCR method for measuring absolute telomere length. *Biological procedures online* **2011**, *13* (1), 3.
44. Slijepcevic, P., Telomere length measurement by Q-FISH. In *Chromosome painting*, Springer: 2001; pp 17-22.

45. Poon, S. S.; Lansdorp, P. M., Quantitative fluorescence in situ hybridization (Q-FISH). *Current protocols in cell biology* **2001**, *12* (1), 18.4. 1-18.4. 21.
46. Baerlocher, G. M.; Vulto, I.; De Jong, G.; Lansdorp, P. M., Flow cytometry and FISH to measure the average length of telomeres (flow FISH). *Nature protocols* **2006**, *1* (5), 2365.
47. Deen, J.; Sempels, W.; De Dier, R.; Vermant, J.; Dedecker, P.; Hofkens, J.; Neely, R. K., Combing of genomic DNA from droplets containing picograms of material. *ACS Nano* **2015**, *9* (1), 809-16.
48. Gross, A.; Schoendube, J.; Zimmermann, S.; Steeb, M.; Zengerle, R.; Koltay, P., Technologies for single-cell isolation. *International journal of molecular sciences* **2015**, *16* (8), 16897-16919.
49. Kang, Q.; Parkin, B.; Giraldez, M. D.; Tewari, M., Mutant DNA quantification by digital PCR can be confounded by heating during DNA fragmentation. *BioTechniques* **2016**, *60* (4), 175-185.
50. Chiou, S.-H., DNA-and protein-scission activities of ascorbate in the presence of copper ion and a copper-peptide complex. *The Journal of Biochemistry* **1983**, *94* (4), 1259-1267.
51. Sun, Y.; Joyce, L. E.; Dickson, N. M.; Turro, C., Efficient DNA photocleavage by [Ru (bpy) ₂ (dppn)] ²⁺ with visible light. *Chemical Communications* **2010**, *46* (14), 2426-2428.