

私立東海大學化學工程與材料工程研究所

碩士論文

指導教授：顧野松 博士

建立 AS-PCR 分析 *hMYH* 基因多態性之方法

及其於大腸直腸癌之檢測應用

研究生：王心潔 撰

中華民國 一〇一年七月

## 中文摘要

研究發現，人類 *hMYH* 雙等位基因突變(biallelic germline mutations, G : C→T : A)與大腸直腸癌及其他癌症的產生有密切的關係。因此如何建立一套「早期發現，早期治療」的完善檢測分析是現今最重要的課題。

本研究是以 Allele Specific-PCR (AS-PCR)方法來進行 *hMYH* 基因中單核苷酸多態性(single nucleotide polymorphism, 簡稱 SNP)分析，並進一步針對如何提高 AS-PCR 靈敏度進行探討。由實驗結果發現，對偶性引子與 DNA 模板間之錯配模式設計為嘌呤：嘌呤配對，亦或嘧啶：嘧啶配對時，所呈現之 ON/OFF 訊號較清楚易分辨。另外，也證明了在對偶性引子的 3'端連續設計兩個鹼基錯配，可有效的提高 AS-PCR 之靈敏度。

此外，我們也同步建立其他新的檢測方法 - ON/OFF switch assay 與 OFF/ON switch assay 檢測 *hMYH* 基因之突變熱點 - Y165C，企圖提升檢測 *hMYH* 基因中 SNPs 分析之可信度。由 ON/OFF switch assay 之實驗結果得知，硫代磷酸化修飾(phosphorothioate-modified)之特異性引子搭配 *Pfu* polymerase 於適當之黏合溫度時，所呈現之 ON/OFF 訊號較明確；而鎖核酸修飾(locked nucleic acid modification, 簡稱 LNA modification)則與 *Taq* polymerase 一同進行 PCR 之分析訊號較佳。

關鍵字：AS-PCR、單核苷酸多態性、大腸直腸癌、硫代磷酸化、鎖核酸

## Abstract

The molecular biology of cancer literatures have shown that colorectal cancers are associated with biallelic germline mutations of the human *MutY* homologue gene (*hMYH*). Therefore, how to establish a perfect detection method for detecting *hMYH* mutations to achieve “early diagnosis and early treatment” is the one of the most important issues nowadays.

In this study, we have detected single nucleotide polymorphism (SNP) genotyping by using allele-specific polymerase chain reaction (AS-PCR), and also discussed how to improve the capability ability for SNPs of *hMYH* by AS-PCR. The experimental results have shown that it is clearly to distinguish with the ON/OFF signals for mismatch between the allele specific primer and template by the purine-purine and pyrimidine-pyrimidine mismatching model.

In addition, we also established other new methods such as ON/OFF switch assay and OFF/ON switch assay for the analysis of one of *hMYH* mutation, Y165C, regard to colorectal cancer. We attempted to enhance the reliability of the AS-PCR for *hMYH* gene analysis. Our results indicated that ON/OFF method displayed expected on/off signal to distinguish the mismatch at phosphorothioate-modified primers with *pfu* polymerase under a suitable annealing temperature. Meanwhile, the ON/OFF method was successful by using locked nucleic acid-modified primers with *Taq* polymerase under established conditions.

Key word: allele-specific polymerase chain reaction (AS-PCR), single nucleotide polymorphism (SNP), colorectal cancer, phosphorothioate modification, locked nucleic acid modification

## 誌謝

兩年的研究生生活即將落幕，也意味著即將卸下學生一職。回想起當初毅然決然的重回校園念書，到如今順利完成學業，這途中曾灰心沮喪，所幸碰到了許許多多的人，讓曾經迷惘的我如此幸運的得到了許多的幫助與支持。首先要感謝我的指導老師－顧野松教授，感謝老師耐心的指導，使我在這研究生涯裡獲益良多，更重要的是學會了如何架構一個完整的研究邏輯，以及如何發現問題與解決問題的思考能力，在這獻上最真摯誠懇的感謝，老師 謝謝您。此外，同時感謝口試委員－楊芳鏘老師、林松池老師、杜景順老師以及盧錫祺老師百忙中抽空給予指導，各位老師給予我的指導與寶貴建議，不只使得論文更加完整嚴謹，亦使我學習到從更多不同的角度去思考及判斷，在這要再次的謝謝各位老師的教導。

再來要感謝 104 實驗室的大家，謝謝大家的幫助與陪伴。感謝大郭總是耐心的聽著我們的問題，並協助我們解決問題，大郭 辛苦你了。感謝東柏、方亭以及 Kenji 總是很耐心的教我實驗上的技巧，以及當我灰心沮喪時的關心跟安慰，謝謝你們。感謝孟村、滷蛋與劉佳霖的幽默逗趣讓我在實驗室總是能開懷大笑，謝謝你們的照顧與“包容”。感謝貼心的“專題生”蘇政峰，雖然當我專題生的時間只有短短的幾週，但還是很謝謝你貼心的幫我配好藥品，讓我可以多偷懶一下。感謝總是照顧我

們三餐的亮均學長，謝謝你的照顧。感謝另外兩位夥伴－建成與森迪，謝謝你們的陪伴與付出，讓我總能忘記倒垃圾也沒關係，謝謝你們。感謝小沛、阿奴與方瑋，謝謝你們總在我需要人講話時出現在我的身旁陪伴我。感謝很愛搞驚喜驚嚇我的阿呆，謝謝你在我很煩躁的時候總記得提醒我該休息了，謝謝你。

另外，要感謝讓我很盡情當公主的小綠，謝謝你在那個電線桿下主動問我怎麼了，謝謝你在很冷的夜晚到補習班載我去看電影，謝謝你在我想偷懶的時候陪我玩，謝謝你讓我當個仿冒的公主。還有謝謝怕我寫論文很辛苦，買巧克力蛋糕慰勞我叫我加油的 Penny 麻吉，謝謝你溫柔的加油。

最後，我要感謝我最親愛的家人，他們是我最大的精神支柱，在我疲累沮喪時，總是溫暖的要我放輕鬆慢慢來，因為他們的鼓勵安慰，讓我總是能重拾信心繼續努力。謝謝爸爸、媽媽辛苦的工作只為了提供我們一個無憂無慮的學習空間，謝謝您們無私的奉獻與支持，謝謝您們讓我們擁有一個這麼溫暖幸福的家；謝謝姐姐跟弟弟的加油跟陪伴，因為你們不時的關心與問候，總讓我適時的宣洩我的無助。最後，謹以此論文獻給我最摯愛的家人。

# 目錄

中文摘要.....	I
Abstract .....	II
誌謝.....	III
目錄.....	V
表目錄.....	VIII
圖目錄.....	XII
第一章 文獻回顧.....	1
1-1 大腸直腸癌的簡介.....	1
1-2 DNA 氧化損傷與 DNA 切除修復.....	3
1-3 hMYH 在 DNA 氧化損傷修復機制中所扮演的角色.....	8
1-4 hMYH 單核苷酸多態性與大腸直腸癌的相互關係.....	10
1-5 Allele-Specific PCR 之原理與機制.....	13
1-6 應用於 SNP 檢測之其他分析方法的建立.....	18
1-7 研究動機.....	21
第二章 實驗材料及裝置.....	22
2-1 質體 DNA 來源.....	22
2-2 <i>hMYH</i> 基因突變熱點的選擇與引子的設計.....	23
2-3 實驗藥品.....	26

2-4	實驗生化試劑 .....	27
2-5	實驗儀器設備 .....	29
第三章 實驗方法 .....		31
3-1	實驗步驟與材料製備 .....	31
3-1-1	細菌培養 .....	31
3-1-2	質體 DNA 之製備 .....	34
3-1-3	利用 DNA 限制內切核酸酶確認質體 DNA 序列.....	36
3-1-4	模板 DNA 濃度測定 .....	38
3-1-5	瓊脂凝膠之製備與瓊脂凝膠電泳法 .....	39
3-1-6	聚合酶連鎖反應(Polymerase Chain Reaction, PCR).....	42
3-1-7	DNA 定序(Sequencing).....	44
3-2	確認 AS-PCR 方法之可行性 .....	46
3-3	其他分析方法的建立 .....	48
第四章 實驗結果與討論 .....		51
4-1	AS-PCR 反應條件最佳化之探討 .....	51
4-1-1	質體 DNA 製備之探討 .....	51
4-1-2	模板 DNA 濃度對 AS-PCR 影響之探討 .....	54
4-1-3	探討 dNTP 混合比例對 AS-PCR 之影響 .....	56
4-1-4	Mg <sup>2+</sup> 濃度對 AS-PCR 影響之探討.....	59

4-2	利用 AS-PCR 檢測 <i>hMYH</i> 基因之突變熱點 Y165C 之探討.....	63
4-3	改善 AS-PCR 之靈敏度 .....	69
4-3-1	藉由對偶性引子之設計提升 AS-PCR 靈敏度之探討.....	69
4-3-2	不同 DNA 聚合酶對於 AS-PCR 靈敏度之影響 .....	74
4-4	其他分析方法之建立 .....	78
4-4-1	ON/OFF switch assay 之建立.....	78
4-4-2	改善 ON/OFF switch assay 之靈敏度的探討.....	104
4-4-3	OFF/ON switch assay 之建立.....	112
4-4-4	改良式 OFF/ON switch assay 之建立.....	125
第五章	結論與建議.....	135
5-1	結論 .....	135
5-1-1	AS-PCR 反應條件最佳化之探討 .....	135
5-1-2	利用 AS-PCR 檢測 <i>hMYH</i> 基因之突變熱點 Y165C 之探討... ..	138
5-1-3	其他分析方法檢測 <i>hMYH</i> 基因之突變熱點 Y165C 之探討... ..	140
5-2	未來建議.....	145
參考文獻	.....	146
【附錄一】	<i>hMYH</i> 基因之定序結果： .....	154



## 表目錄

### 第一章：

表【1-1】 *hMYH* 突變點處之核苷酸改變及其相應胺基酸改變之情形... 12

表【1-2】 利用具有校正能力之 DNA 聚合酶的 SNP 檢測方法 ..... 19

### 第二章：

表【2-1】 AS-PCR 之特異性引子序列 ..... 24

表【2-2】 應用於 ON/OFF switch assay 中含有 Y165C 突變點之特異性引子序列 ..... 24

表【2-3】 應用於 OFF/ON switch assay 中含有 Y165C 突變點之特異性引子序列 ..... 25

表【2-4】 New OFF/ON switch assay 之特異性引子序列 ..... 25

表【2-5】 *hMYH* 基因之定序引子序列 ..... 25

表【2-6】 使實驗藥品之列表 ..... 26

表【2-7】 生化試劑之列表 ..... 27

表【2-8】 儀器設備之相關資料一覽表 ..... 29

### 第三章：

表【3-1】 配置 LB 培養液之藥品表 ..... 32

表【3-2】 配置 LB 培養基之藥品表 ..... 33

表【3-3】 實驗所用之限制內切核酸酶相關資料表 ..... 37

表【3-4】限制酶切割反應所需之試劑 .....	37
表【3-5】使用 <i>Taq</i> polymerase 進行 PCR 反應所需試劑表 .....	42
表【3-6】使用 <i>Pfu</i> polymerase 進行 PCR 反應所需試劑表.....	43
表【3-7】PCR 熱循環條件 .....	43
表【3-8】10X <i>Taq</i> reaction buffer 成份表 .....	43
表【3-9】10X <i>Pfu</i> reaction buffer 成份表 .....	43
<b>第四章：</b>	
表【4-1】DNA 模板濃度之稀釋倍數.....	55
表【4-2】改變 dNTP 混合比例之條件，且〔GC〕比例大於〔AT〕 ....	57
表【4-3】改變 dNTP 混合比例之條件，且〔AT〕比例大於〔GC〕 ....	58
表【4-4】Mg <sup>2+</sup> 濃度之添加量 .....	60
表【4-5】AS-PCR 檢測 <i>hMYH</i> 基因之突變熱點 Y165C 之預期結果 ....	64
表【4-6】THU-MYH-2M 應用於 AS-PCR 之預期結果 .....	70
表【4-7】THU-MYH-3M 應用於 AS-PCR 之預期結果 .....	72
表【4-8】改變 DNA polymerase 進行 AS-PCR 之反應條件表 .....	74
表【4-9】應用不同 Polymerase 於 AS-PCR 之產物定序結果 .....	77
表【4-10】修飾硫代磷酸之引子應用於 ON/OFF switch assay 之資料統整 .....	82
表【4-11】ON/OFF switch assay 之產物定序結果 .....	83

表【4- 12】 THU-MYH-3GPS、THU-MYH-2MPS 以及 THU-MYH-3PS 之 資料統整 .....	87
表【4- 13】 THU-MYH-2MPS 與 THU-MYH-3PS 反應於不同 DNA polymerase 之 ON/OFF switch assay 的結果統整 .....	90
表【4- 14】 ON/OFF switch assay by <i>Pfu</i> 與 AS-PCR 之結果統整 .....	93
表【4- 15】 修飾鎖核酸之引子應用於 ON/OFF switch assay 之資料統整 .....	96
表【4- 16】不同修飾之特異性引子反應於 <i>Pfu</i> polymerase 之 ON/OFF switch assay 結果統整 .....	101
表【4- 17】不同修飾之特異性引子反應於 <i>Taq</i> polymerase 之 ON/OFF switch assay 之統整 .....	102
表【4- 18】 PCR 熱循環條件 .....	107
表【4- 19】 OFF/ON switch assay 之預期結果 .....	112
表【4- 20】 OFF/ON switch assay 之 PCR 熱循環條件 .....	116
表【4- 21】 添加 <i>Taq</i> polymerase 於 <i>Pfu</i> polymerase 反應中所需試劑表	118
表【4- 22】 OFF/ON switch assay 之 PCR 熱循環條件 .....	119
表【4- 23】 OFF/ON switch assay 之 PCR 熱循環條件 .....	121
表【4- 24】 DNA 聚合酶混合比例之示意圖 .....	124
表【4- 25】 突變型對偶性引子與野生型模板之序列之 alignment score 分析	

結果.....	124
表【4- 26】改良式 OFF/ON switch assay 之 Y165C 突變點對偶性引子之序列.....	127
表【4- 27】改良式 OFF/ON switch assay 所改變之 DNA 模板濃度條件表.....	131

## 圖目錄

### 第一章：

圖【1-1】 7,8-dihydro-8-oxoguanine 之化學結構示意圖 .....	3
圖【1-2】 Base Excision Repair 機制之示意圖 .....	5
圖【1-3】 Nucleotide Excision Repair 機制之示意圖 .....	6
圖【1-4】 Mismatch Repair 機制之示意圖 .....	7
圖【1-5】 DNA 鹼基氧化損傷修復機制 .....	9
圖【1-6】 文獻已發表可能致癌的 <i>hMYH</i> 突變熱點及突變點分布的區域 .....	11
圖【1-7】 已發表的 <i>hMYH</i> 基因上各個突變熱點出現的相對頻率 .....	12
圖【1-8】 聚合酶連鎖反應示意圖 .....	14
圖【1-9】 Allele Specific PCR 原理示意圖 .....	15
圖【1-10】 判斷 PCR 合成正確性與否之統整示意圖 .....	17
圖【1-11】 ON/OFF switch assay 之示意圖 .....	19
圖【1-12】 OFF/ON switch assay 之示意圖 .....	20

### 第二章：

圖【2-1】 質體 <i>pET21a-hMYH</i> 之示意圖 .....	22
圖【2-2】 DNA Marker 標示圖 .....	28

### 第三章：

圖【3-1】瓊脂凝膠電泳法之示意圖 .....	39
圖【3-2】Sanger-Coulson DNA 定序原理 .....	45
圖【3-3】特異性引子之抗核酸外切酶修飾的分子結構圖 .....	49
圖【3-4】特異性引子之去羥基修飾的分子結構圖 .....	50
<b>第四章：</b>	
圖【4-1】限制核酸內切酶確認質體 DNA 大小之實驗結果.....	52
圖【4-2】質體 DNA 使用 <i>hMYH</i> 基因的定序引子之 PCR 反應結果 .....	53
圖【4-3】改變 DNA 模板濃度之實驗結果.....	55
圖【4-4】〔GC〕比例大於〔AT〕之 dNTP 混合比例的實驗結果 .....	57
圖【4-5】〔AT〕比例大於〔GC〕之 dNTP 混合比例的實驗結果 .....	58
圖【4-6】改變 $Mg^{2+}$ 濃度之實驗結果.....	60
圖【4-7】測試與野生型模板錯配之特異性引子於不同 $Mg^{2+}$ 濃度下之實 驗結果.....	62
圖【4-8】根據突變熱點 Y165C 所設計之對偶性引子與野生型模板之反 應結果.....	65
圖【4-9】THU-MYH-3 進行 AS-PCR 之反應產物定序圖.....	66
圖【4-10】根據突變熱點 Y165C 所設計之對偶性引子與野生型模板之反 應結果.....	67
圖【4-11】對偶性引子與野生型模板反應於 69°C 之黏合溫度的反應結果	

.....	67
圖【4- 12】 THU-MYH-2M 與野生型模板之 AS-PCR 反應結果 .....	71
圖【4- 13】 THU-MYH-3M 與野生型模板之 AS-PCR 反應結果 .....	73
圖【4- 14】 應用不同 Polymerase 於 AS-PCR 之實驗結果.....	76
圖【4- 15】 硫代磷酸化修飾之特異性引子的 ON/OFF switch assay 之電泳 圖 .....	83
圖【4- 16】 硫代磷酸化修飾之特異性引子的 ON/OFF switch assay 之電泳 圖 .....	84
圖【4- 17】 硫代磷酸化修飾之特異性引子的 ON/OFF switch assay 之電泳 圖 .....	86
圖【4- 18】 THU-MYH-3GPS 應用於 ON/OFF switch assay 之電泳圖 ....	89
圖【4- 19】 <i>Taq</i> polymerase 對於模板與引子 3'端之間距(gap)要求之示意圖 .....	92
圖【4- 20】 THU-MYH-3LNA 反應於 ON/OFF switch assay 之電泳圖 ...	97
圖【4- 21】 THU-MYH-2MLNA 反應於 ON/OFF switch assay 之電泳圖	98
圖【4- 22】 THU-MYH-3MLNA 反應於 ON/OFF switch assay 之電泳圖	99
圖【4- 23】 改變 dNTP 濃度為 0.05 mM 進行 PCR 反應之電泳圖 .....	105
圖【4- 24】 改變熱循環製程時間，並使用 <i>Pfu</i> polymerase 之 PCR 反應電 泳圖.....	106
圖【4- 25】 使用 <i>Pfu</i> polymerase 於 0.075 mM 之 dNTP 濃度下進行 PCR 反	

應 .....	108
圖【4-26】使用 <i>Taq</i> polymerase 於 0.005 mM–0.0001 mM 之 dNTP 濃度下 進行 PCR 反應 .....	109
圖【4-27】使用 <i>Pfu</i> polymerase 於 0.1 mM–0.01 mM 之 dNTP 濃度下進行 PCR 之反應結果 .....	111
圖【4-28】去羥基修飾之對偶性引子的 OFF/ON switch assay 之電泳圖 .....	114
圖【4-29】延長熱循環製程時間之 OFF/ON switch assay 反應結果.....	116
圖【4-30】改變熱循環製程溫度之 OFF/ON switch assay 反應結果.....	118
圖【4-31】降低熱循環製程溫度之 OFF/ON switch assay 反應結果.....	121
圖【4-32】改變 DNA 聚合酶混合比例之 OFF/ON switch assay 反應結果 .....	123
圖【4-33】改良式 OFF/ON switch assay 之機制示意圖 .....	126
圖【4-34】改良式 OFF/ON switch assay 之反應結果 .....	127
圖【4-35】改良式 OFF/ON switch assay 之反應結果 .....	129
圖【4-36】改良式 OFF/ON switch assay 並增加 DNA 模板濃度之反應結 果 .....	131
圖【4-37】改良式 OFF/ON switch assay 並提高 $Mg^{2+}$ 濃度之反應結果	133



# 第一章 文獻回顧

## 1-1 大腸直腸癌的簡介

由世界衛生組織(World Health Organization, 簡稱 WHO)公布的資料指出, 惡性腫瘤一直佔居十大死亡原因之首, 其中大腸直腸癌(Colorectal cancer) 為癌症死亡原因的前四名, 是世界上最普遍的惡性腫瘤之一(1)。在台灣地區, 由行政院衛生署統計的資料顯示, 民國九十八年的十大癌症死因的前三名為肺癌、肝癌、結腸直腸癌, 而且罹患結腸直腸癌的年齡逐年降低, 人數也有日益增加的趨勢。

大腸直腸癌的致癌因素有很多, 其中包括遺傳因子、基因突變、致癌物質以及飲食生活習慣等, 這些致癌因素互相作用導致癌症產生, 而非只是因為某個單一因素所引起的。致癌遺傳因子包括致癌基因(Oncogene)的被活化; 或是腫瘤抑制基因(Tumor suppressor gene)的失活; 亦或是調節基因(Modifier gene)的功能喪失或突變(2)。

大部分的大腸直腸癌是屬於偶發性的, 亦即不具遺傳傾向的類型。但病例中仍有約百分之十五的案例是具有明顯的家族傾向的, 這代表著大腸直腸癌的產生與遺傳基因是密不可分的(3)。目前在臨床上已可歸類出較明顯的兩大遺傳性大腸直腸癌, 即家族性結直腸瘻肉綜合症(Family adenomatous polyposis of colon, 簡稱 FAP)與遺傳性非瘻肉性大腸癌

(Hereditary nonpolyposis colorectal cancer，簡稱 HNPCC) (1-5)。

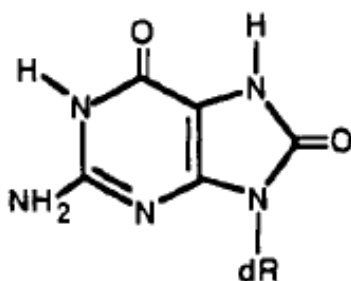
FAP 是一種顯性的遺傳疾病，此疾病的特徵是在大腸內分布著數百到數千個腺瘤性瘻肉，通常發生於童年晚期或成年初期，而某些瘻肉最終會發展成癌症。FAP 發展成大腸癌是無法避免的，患者的平均發病年齡大約在壯年期間，除非已預防性的進行切除帶有瘻肉的大腸手術 (1-5)。

HNPCC 是一種具遺傳傾向的癌症，主要是因為遺傳基因的生殖細胞突變(germline mutation)導致這種疾病在家族中持續發生。從研究中得知，HNPCC 與核苷酸錯配修復(Mismatch repair，簡稱 MMR)裡的修復基因有關，這些基因的功能主要是用來修復 DNA 複製時產生的錯誤，或是修補受到化學或物理傷害的 DNA (3)。若修補基因產生突變而失去修復功能，將無法修復受損傷的 DNA 或複製錯誤的 DNA，而使得這些錯誤的 DNA 不斷的複製累積，導致癌症的產生。此疾病的特徵為在靠近小腸附近的大腸會出現數目較少但體積較大的腫瘤性瘻肉，另外在臨床上也發現 HNPCC 發病年齡較早(1-5)。

## 1-2 DNA 氧化損傷與 DNA 切除修復

由文獻中得知，HNPCC 中的基因缺陷與 DNA 修復機制中的修復蛋白突變或失去功能有很密切的關係(3)。何謂 DNA 修復機制呢？何種 DNA 需要修復呢？在討論 DNA 修復機制之前，我們需先了解為什麼需要 DNA 修復機制，如果沒有修復對人體又會有什麼影響呢？

生活環境中的紫外線、游離輻射(ionizing radiation)與一些活性氧化物(reactive oxygen species，簡稱 ROS)等皆被指出可能導致基因產生變異(6,7)。活性氧化物是一種具有高度氧化力的分子，它會轉變成自由基，當人體進行代謝反應會生成這些自由基，並且累積在體內而導致細胞中的生物分子產生氧化，進而造成細胞結構的損傷、加速細胞的老化。文獻中指出，細胞中的 DNA 遭受氧化損傷是無可避免的，每天每個細胞大約有  $10^4$  個損傷產生(8)。各種 DNA 鹼基氧化損傷中又以 7,8 雙羥基-8-氧化鳥糞嘌呤(7,8-dihydro-8-oxoguanine，簡稱 8-oxoG 或 GO)最為穩定，也最有害，圖【1-1】為 8-oxoG 的化學結構示意圖(9,10)。



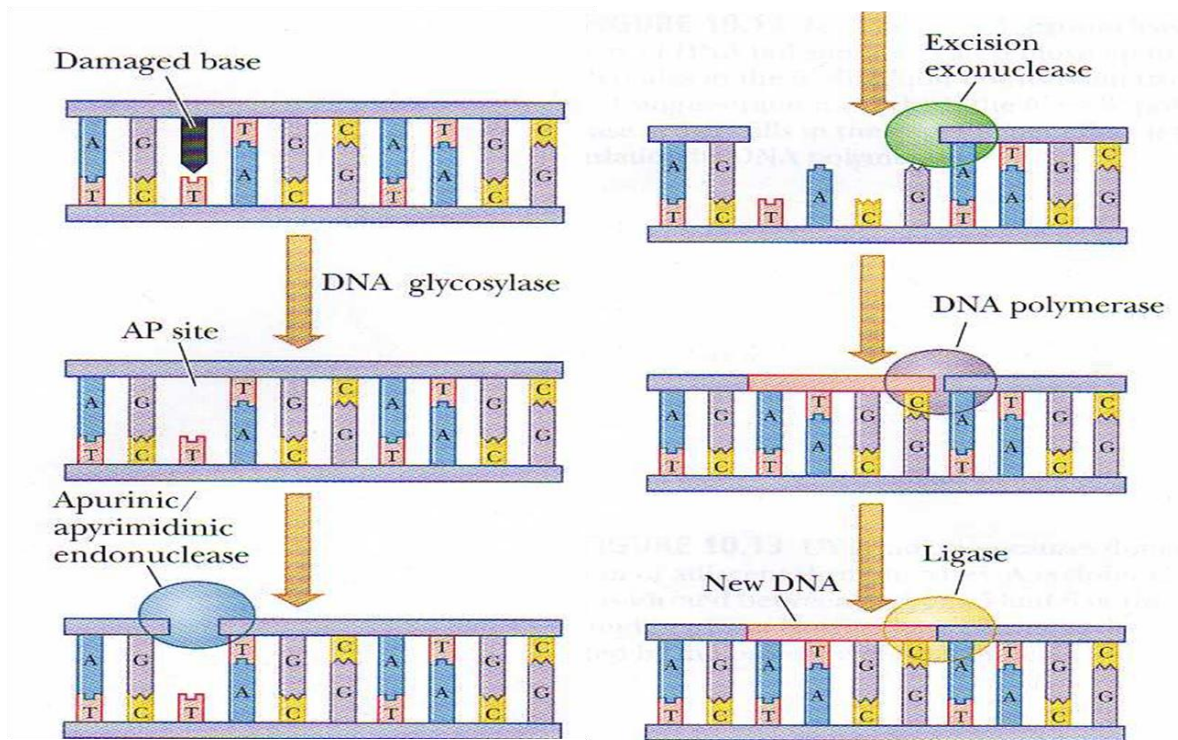
圖【1-1】7,8-dihydro-8-oxoguanine 之化學結構示意圖(9)。

核酸鹼基(nucleic acid bases)主要分成嘧啶(purine)與嘧啶(pyrimidine)兩種，DNA 中較常見的有 A (adenine，腺嘧啶)、T (thymine，胸腺嘧啶)、C (cytosine，胞嘧啶)、G (guanine，鳥糞嘧啶)四種，另外正確的鹼基配對為 A：T 與 C：G 配對。在 DNA 複製時，氧化損傷的 8-oxoG 不但與鹼基 C 互補配對也會與鹼基 A 形成 8-oxoG：A 的錯誤配對。若 8-oxoG：A 錯配未被修復將會造成原本的 G：C 配對轉置為 T：A 配對，導致基因永久性的突變，進而造成基因的功能喪失(9-11)。由此而知，DNA 修復機制是生物體維持正常生理機能的一個重要機制。

DNA 修復過程分為直接修復、重組修復和切除修復，其中切除修復又可細分為鹼基切除修復(Base excision repair，簡稱 BER)、核苷酸切除修復(Nucleotide excision repair，簡稱 NER)和錯配切除修復(Mismatch repair，簡稱 MMR) (12,13)。

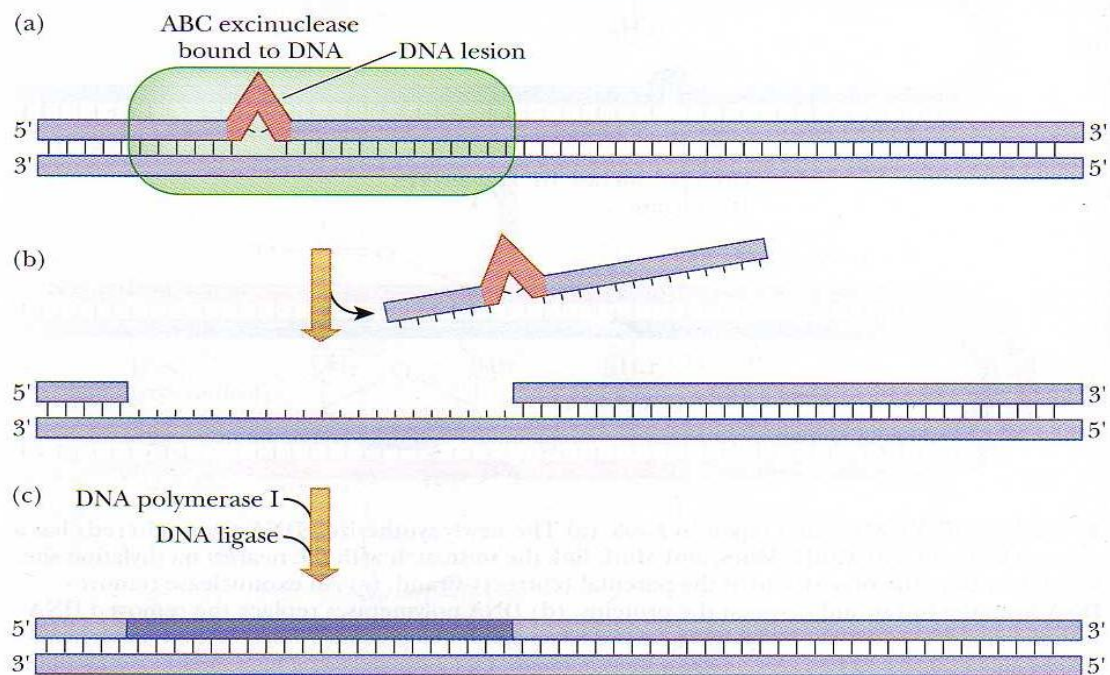
鹼基切除修復(BER)，主要針對因氧化而產生小缺失的損傷 DNA 做修補。藉由具有特定辨認 DNA 缺陷的專一性酵素，DNA 糖基化酶，移除錯配或損傷的鹼基，並形成一個缺嘧啶(apurine)或缺嘧啶(apyrimidine)的缺鹼基位置，亦即 AP 位置(AP site)，如圖【1-2】。接著利用 AP 內切核酸酶(AP endonuclease)切除核苷酸上的糖基與磷酸根，隨後再使用刪除外切核酸酶(excision exonuclease)移除更多的核苷酸，最後由 DNA 聚合酶(polymerase)填補缺口(gap)，及 DNA 連接酶(ligase)黏合磷酸雙酯鍵

(12,14)。



圖【1-2】Base Excision Repair 機制之示意圖(12)。

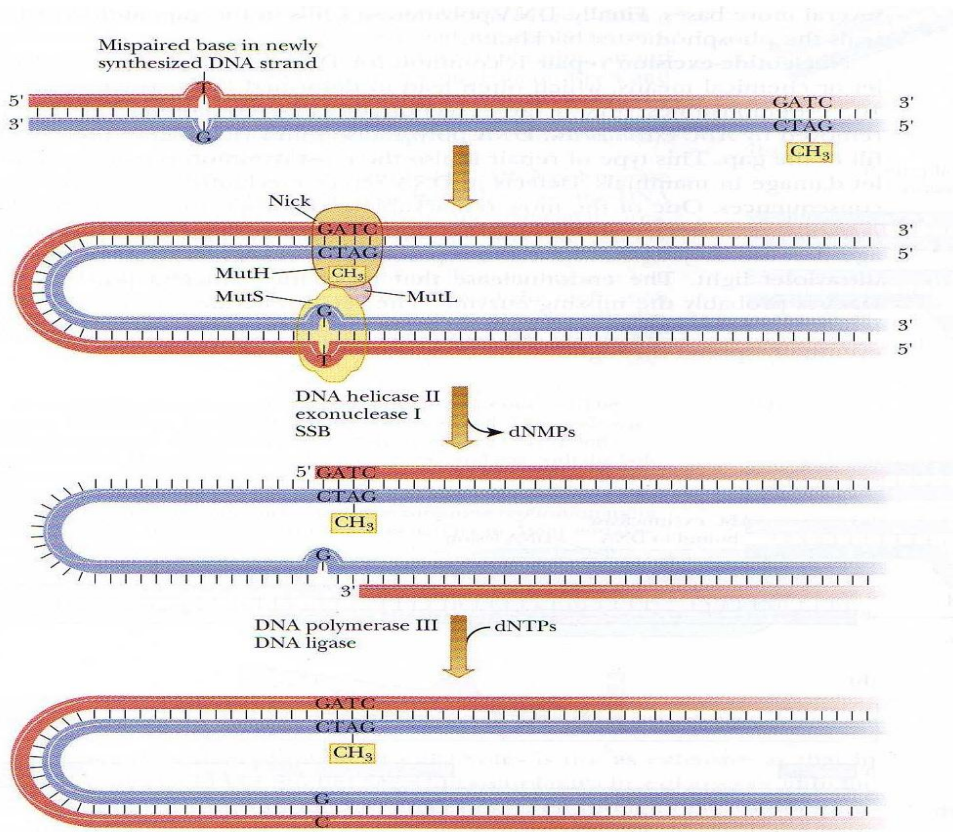
核苷酸切除修復(NER)，常用來修補因紫外線或化學物質引起的 DNA 損傷，這類的 DNA 傷害常造成 DNA 結構的破壞，圖【1-3】藉由 ABC 切除核酸酶(ABC excinuclease)來說明核苷酸切除修復的機制。一開始 ABC 切除核酸酶會識別出 DNA 損傷的部位，並結合到 DNA 受損的區域上，接著進一步的切斷移除包含損傷部位的一大段 DNA，最後再由 DNA 聚合酶與 DNA 連接酶進行合成與黏合 DNA (12)。



圖【1-3】Nucleotide Excision Repair 機制之示意圖(12)。

錯配切除修復(MMR)，主要用來校正 DNA 複製時產生的錯誤，藉由大腸桿菌(*E. coli*)內的錯配修復作用來說明何謂錯配切除修復機制，如圖【1-4】。當 DNA 在細胞核中不進行複製及轉錄時，會被甲基酵素(methylase)甲基化，因而使得舊股含有被甲基化的鹼基；相對的新合成的新股沒有甲基化的鹼基，透過此差異使得細胞內的蛋白質能夠辨識何者為新股，並且判斷出哪個鹼基是複製合成時錯誤的。判斷出錯配位點，接著 MutS 會辨識出 DNA 複製錯誤而產生歪曲雙螺旋的結構並與其鍵結，MutL 隨後會鍵結上去穩定此錯合物，而 MutS-MutL 錯合物會活化 MutH，因而帶有配對錯誤位點的新股將與最靠近甲基化位置的舊股連結起來形成一個環。接著 DNA 解旋酶(DNA helicase)解開 DNA 螺旋，而外切核酸

酶(exonuclease)則會移除含有錯配位點的 DNA 片段，這時單股結合蛋白 (single-stranded binding proteins) 會保護 DNA 舊股避免被降解，最後使用 DNA 聚合酶填補修復(12,15)。



圖【1-4】Mismatch Repair 機制之示意圖(12)。

### 1-3 hMYH 在 DNA 氧化損傷修復機制中所扮演的角色

當細胞中 DNA 鹼基受到氧化傷害而產生 8-oxoG 時，氧化物 8-oxoG 不只穩定還易與鹼基 A 產生錯配，而導致下一圈的 DNA 複製產生 G:C 置換成 T:A 的突變，這時細胞所執行的 DNA 氧化損傷修復功能是十分重要的(16)。如圖【1-5】所示，8-oxoG 糖基化酶 hOGG1、腺嘌呤糖基化酶 hMYH 與 8-oxoGTP 糖基水解酶 hMTH1 這三種修復蛋白為執行 DNA 氧化損傷修復機制裡最重要的角色(17-19)。

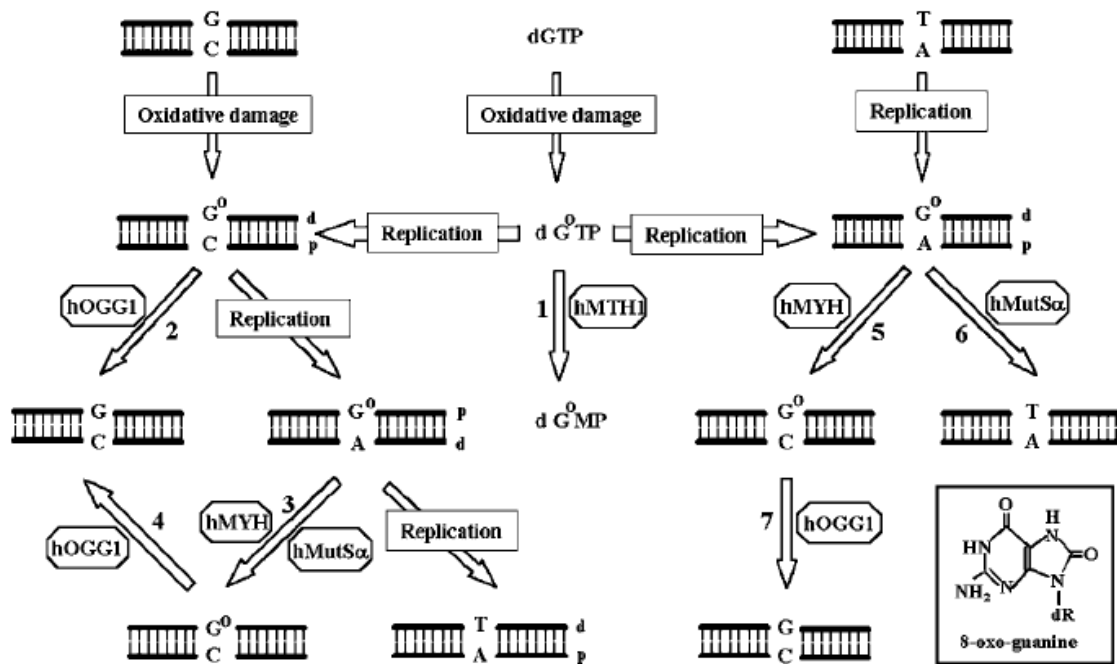
8-oxoGTP 糖基水解酶 - hMTH1，為 DNA 氧化損傷修復機制的第一道防線，當 dGTP 受到氧化損傷形成氧化態的鳥糞嘌呤腺苷三磷酸 8-oxoGTP，這時 hMTH1 會在核苷酸群集(nucleotide pool)中水解 8-oxoGTP，使其降解成單磷酸的 8-oxoGMP。在 DNA 複製過程中單磷酸的核苷酸無法與模板 DNA 結合，因此被降解成單磷酸的 8-oxoGMP 即無法進入 DNA 的複製而防止了錯配的產生(16,18)。

若 8-oxoGTP 累積量超過 hMTH1 的修復能力而使得損傷的鹼基進入複製過程中與模板 DNA 結合或是在複製過程中鳥嘌呤受到氧化，這些情況都可能產生 8-oxoG:C 的配對模式。此時 8-oxoG 糖基化酶 - hOGG1，將對 8-oxoG:C 配對中的 8-oxoG 進行移除修復，或是利用缺鹼基解酶(AP lyase)的活性將 DNA 中的鹼基嘌呤開環，進而再使用聚合酶合成完整的 G:C 配對(18,20)。倘若 8-oxoG:C 的累積量過多導致 hOGG1 修復不及，



就有可能在 DNA 複製時與 A 錯配形成 8-oxoG : A 的配對模式，若沒有進行修復將使得原本的 G : C 配對轉置成 T : A 配對，導致基因產生永久性的突變。

這時氧化損傷機制的最後一道防線 - hMYH，必須針對 8-oxoG : A 錯配中的腺嘌呤 A 進行移除的功能，同時修補正確的胞嘧啶 C 上去，使其成為 8-oxoG : C 配對，接著再利用 hOGG1 再次修復移除 8-oxoG (19,21-25)。如果連 hMYH 都未及時對損傷的鹼基進行修復，那基因將呈現 T : A 錯配的永久性突變，甚至嚴重到基因的功能喪失。



圖【1-5】DNA 鹼基氧化損傷修復機制(19)。

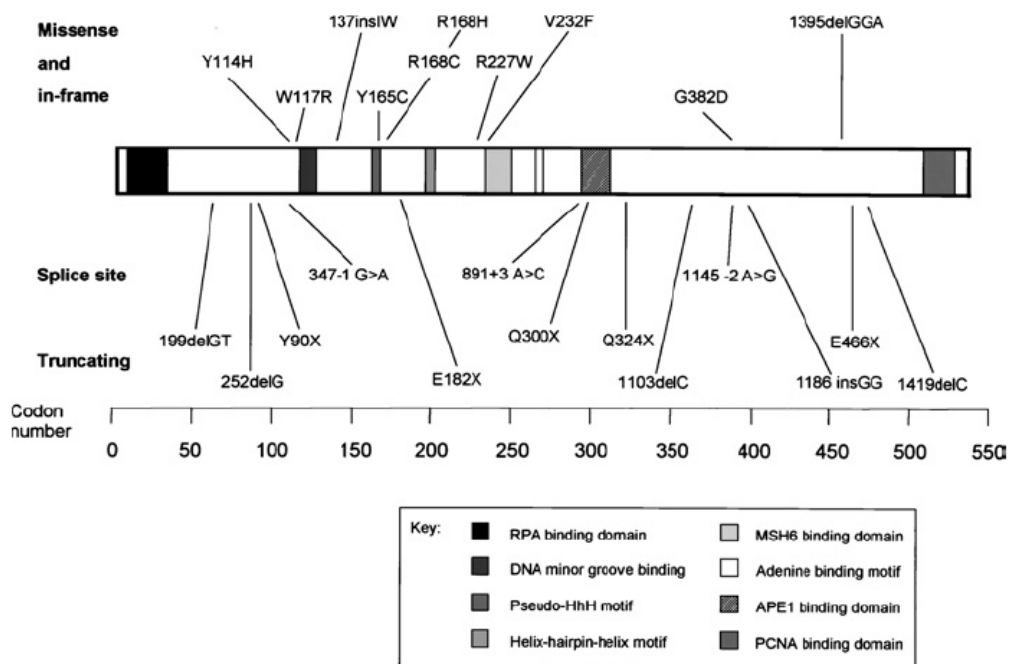
#### 1-4 hMYH 單核苷酸多態性與大腸直腸癌的相互關係

從前面的敘述可知，HNPCC 與 DNA 修復機制中的修復蛋白突變有密切的關係，而其中又以 DNA 損傷修復機制中的最後防線 - hMYH，最為重要。研究發現，人類 *hMYH* 雙等位基因突變(biallelic germline mutations)，亦即 G : C 轉置為 T : A，與遺傳性非瘻肉症大腸癌以及其他癌症皆有關係(3,26)。在探討 *hMYH* 單核苷酸多態性之前，先討論何謂單核苷酸多態性？

單核苷酸多態性(single nucleotide polymorphism，簡稱 SNP)是指在同樣的特定物種中的不同個體間，其基因體中的 DNA 序列發生單一核苷酸(A、T、C 或 G)的變異。在人群中這樣的變異頻率至少要大於 1%，才可被稱為 SNP。SNP 雖然只是基因上很微小的差異，卻造成個體間極大的差異，例如身高、膚色或是體型等差別，甚至當 SNP 發生在基因的編碼區域時，可能導致蛋白質的失活而罹患疾病。因此研究 SNP 不只可以了解致病的基因，最重要的是可以進一步的尋找出預防或治療疾病的方法(1)。

先前已有研究指出倘若細胞中缺乏 hMYH 活性，基因突變的機率就會比正常的細胞高出許多(3)。Al-Tassan et al.曾指出在研究某家族時，此家族七個兄弟姐妹間就有三個患有 HNPCC，進一步探討三位病患的 hOGG1、hMTH1 與 hMYH 時，檢測出三位患者的 hMYH 皆具有雙等位

*hMYH* 基因的突變，Y165C 和 G382D；相對的，其他家人在結腸鏡檢查中並無發現任何不尋常的情況，其 *hMYH* 亦無發現突變熱點(3)。目前已發表的突變熱點有 Y165C、G382D、V232F 和 R227W 等，如圖【1-6】(3,27)。由表【1-1】可知，當 *hMYH* 突變熱點之核苷酸發生改變，則其相應的胺基酸也將改變，故而影響其修復蛋白之活性(1)。

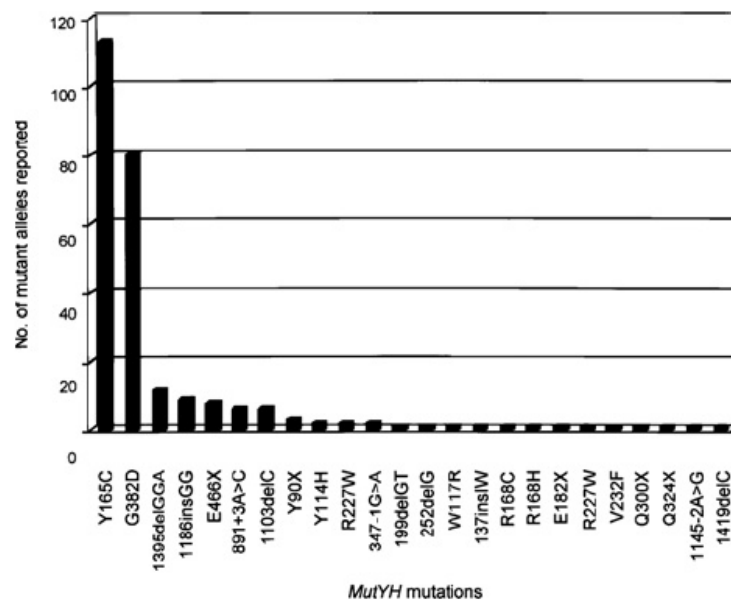


圖【1-6】文獻已發表可能致癌的 *hMYH* 突變熱點及突變點分布的區域(3)。

表【1-1】*hMYH* 突變點處之核苷酸改變及其相應胺基酸改變之情形(1)

突變點	核苷酸之改變	胺基酸之改變
Y165C	494A→G	Tyr→Cys
G382D	1145G→A	Gly→Asp
V232F	694G→T	Val→Phe
R227W	697C→T	Arg→Trp

Sampson et al.利用體外檢測大腸桿菌上 MutY 的醣基化酶活性，研究發現 MutY 上相對應的突變點 Y82C 和 G253D 突變會導致醣基化酶活性大幅喪失。根據研究的統計結果表示，位於 *hMYH* 基因 Pseudo-HhH motif 區域的突變熱點 Y165C 出現的頻率最高，其次為 G382D，如圖【1-7】所示(3)。



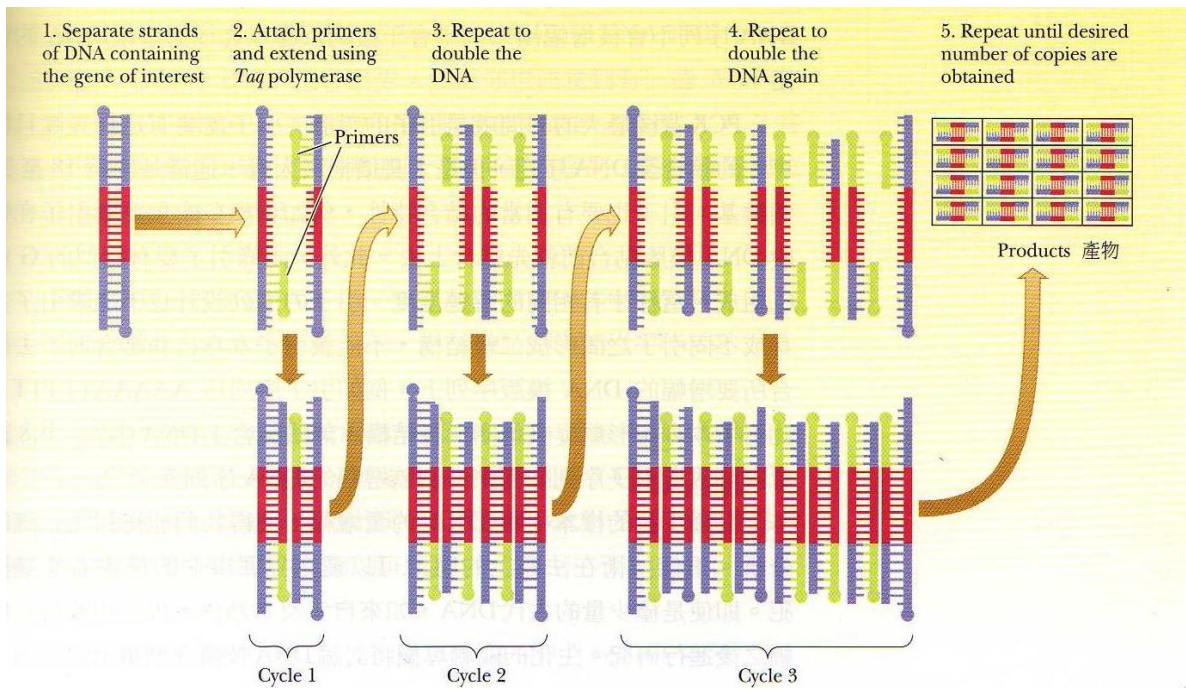
圖【1-7】已發表的 *hMYH* 基因上各個突變熱點出現的相對頻率(3)。

## 1-5 Allele-Specific PCR 之原理與機制

聚合酶連鎖反應(Polymerase Chain Reaction, 簡稱 PCR), 是個簡單便利且能夠在短時間內獲得大量特定 DNA 片段的技術, 為近代生物研究中最被廣泛利用的技術之一(1,28)。

Allele-Specific PCR (簡稱 AS-PCR) 常被用來檢測 SNP, 因其具備快速、簡單、成本低等優點(28)。但 SNP 的檢測條件不僅要具備簡便、快速、成本低等要求, 最重要的是必須擁有高水準的可靠度與靈敏度。因此, AS-PCR 的可靠度及靈敏度成了現今學者爭相探討的課題之一。

何謂 AS-PCR? AS-PCR 與 PCR 有什麼差別呢? AS-PCR 又是如何應用於 SNP 的檢測上呢? 討論 AS-PCR 之前, 我們必須先了解基礎 PCR 的反應原理及機制。簡單來說, PCR 的原理等同於大自然中的 DNA 合成機制, 只差別在於複製過程從生物體內移轉至體外(*in vitro*), 而 PCR 的合成機制如圖【1-8】所示(12)。一開始經由加熱將存在目標 DNA 的兩股變性分開, 之後加入過量的短核苷酸片段, 並降溫使其片段黏合在欲擴增的 DNA 末端上配對, 當成複製整段互補股的引子(primer)。引子黏合上模板後, 溫度上升到適合 *Taq* 聚合酶活性的溫度, 並開始從引子的 3'端合成新的 DNA, 兩條互補股由 5'端至 3'端方向來增長直到獲得想要的 DNA 長度為止。第一次循環會使得 DNA 的量加倍, 接著重複上個循環動作重複 25 至 40 個循環, 便可獲得數百萬甚至數億個 DNA 片段(12)。

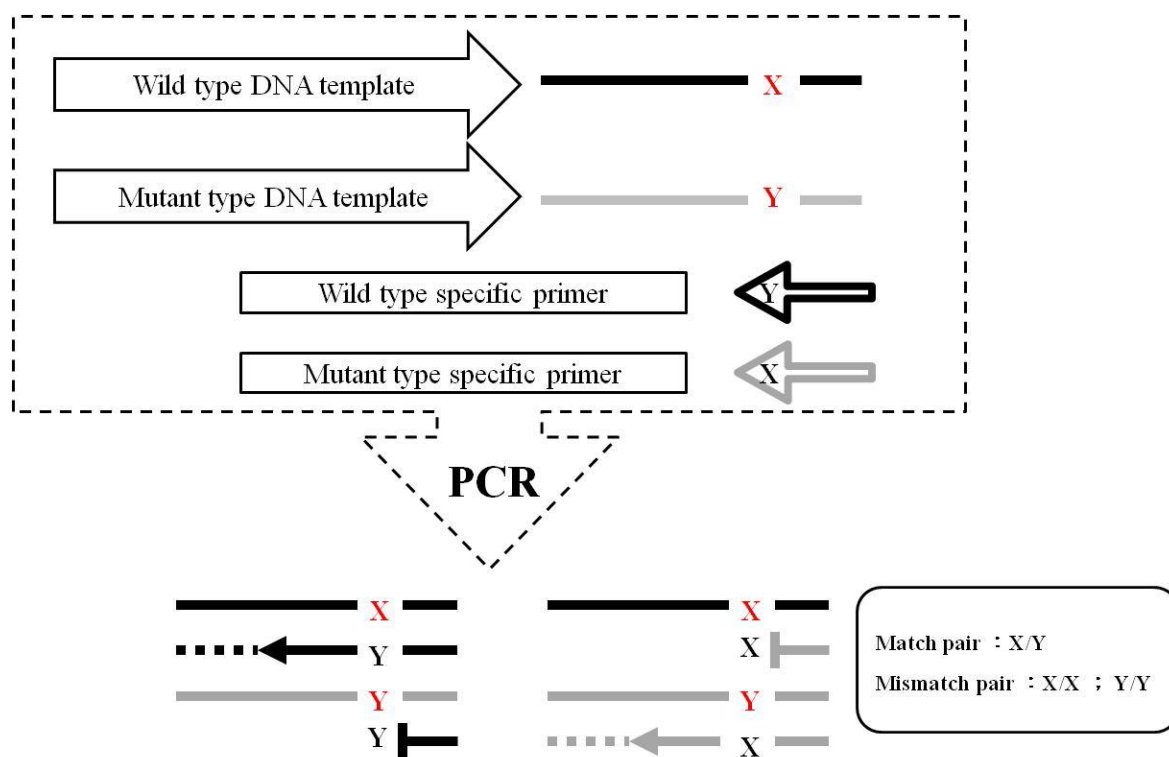


圖【1-8】聚合酶連鎖反應示意圖(12)。

PCR 最令人頭疼的問題是「目標產物的正確性」，故提高反應專一性是目前最需解決的。而影響反應專一性的因素有很多，例如熱循環的操作參數(循環溫度、時間以及熱循環數)、模板濃度和反應試劑等。其中引子設計是否最適化也是個值得探討的因素之一，足夠長度的引子能夠提供所期望之高專一性，使其順利黏合至模板上的目標位置，但成本較高且可能導致黏合溫度過高使得引子與模板無法順利黏合；相反的，若引子長度過短則可能造成引子黏合在非目標區域而產生非預期的 DNA 片段(28)。因此若欲提高 PCR 的準確性除了調整反應參數外，引子的設計更為重要。

AS-PCR 主要概念是在適當且嚴格的 PCR 反應條件下，使用不具有

3'→5'的外切酶修復活性(proofreading exonuclease activity)的 DNA 聚合酶，借此特性使特異性引子的 3'端鹼基只能與 SNP 等位基因(allele)完全互補時，才能繼續反應並擴增目標產物，呈現 ON 訊號；否則將停止聚合反應，而呈現無 PCR 產物的 OFF 訊號，如圖【1-9】(29)。概略來說，AS-PCR 就是個將已設計的特異性引子加入 PCR 反應，藉由反應呈現的產物訊號進行一系列判斷的技術。

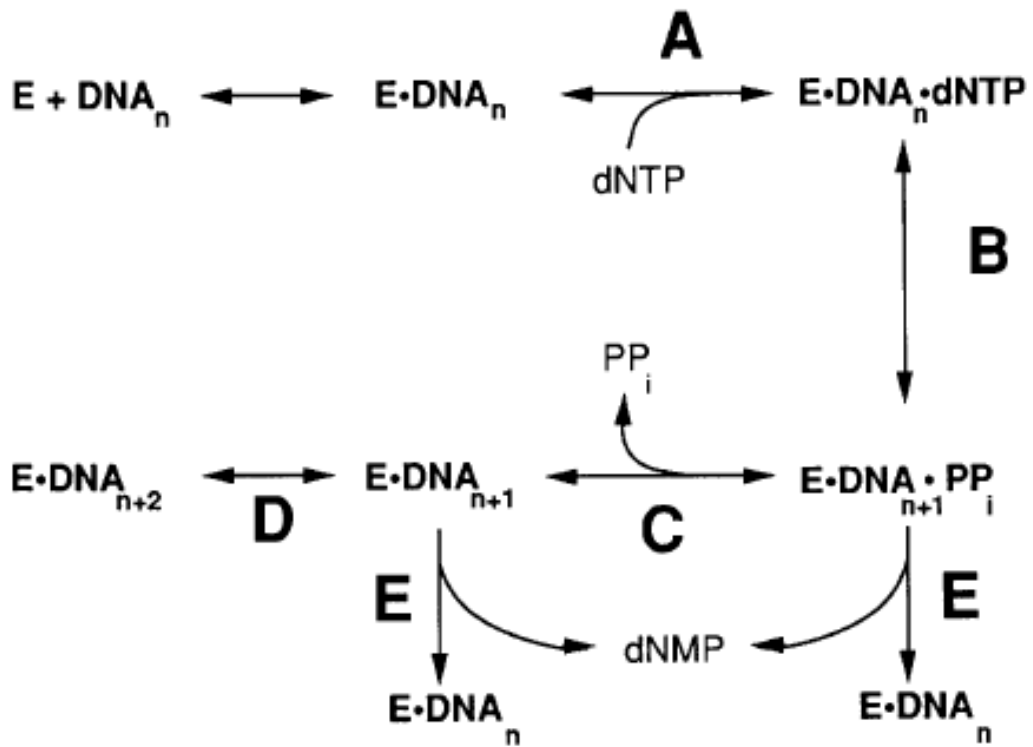


圖【1-9】Allele Specific PCR 原理示意圖(1)。

因此，欲利用 AS-PCR 準確的檢測 SNP，最基本的條件就是尋找適當且嚴謹的 PCR 反應條件與反應試劑，再者即為特異性引子的設計。根據文獻探討可知，PCR 反應中判別聚合正確性與否，主要分成圖【1-10】

所示的五大部分：第一部分為 dNTP 對聚合反應是否正確的差異，首先先假設預備接上的 dNTP 無論是正確或錯誤皆與 E·DNA<sub>n</sub> 複合物以相同速度鍵結。但正確的 dNTP 會因為氫鍵與鹼基堆疊效應而與 E·DNA<sub>n</sub> 複合物維持鍵結，並進而形成 E·DNA<sub>n+1</sub>·PP<sub>i</sub>；相反地，錯誤的則會迅速的從 E·DNA<sub>n</sub>·dNTP 複合物上脫落為 E·DNA<sub>n</sub>。第二部分為磷酸二酯鍵(phosphodiester bond)形成速率的快慢作探討，經由文獻表示，正確的 E·DNA<sub>n</sub>·dNTP 形成 E·DNA<sub>n+1</sub>·PP<sub>i</sub> 相較於錯誤的複合物快非常多。有研究表示，使用具有高焦磷酸酶解活性的 DNA 聚合酶能大大提高第二部分的差別性(8)。第三部分則是探討 DNA 引子與預接上的 dNTP 形成磷酸二酯鍵時放出焦磷酸的速度，研究表示，當引子接上錯誤的 dNTP 時，放出焦磷酸的速度會十分的緩慢(30)。此部分與第二部分相同，皆與 DNA 聚合酶的焦磷酸酶解活性有極大的關聯。第四部分為 DNA 聚合酶的延伸能力探討，簡單來說，即是當 DNA 聚合酶的專一性高，便能只對正確的 E·DNA<sub>n+1</sub> 繼續聚合為 E·DNA<sub>n+2</sub>。因此，如何提高 *Taq* polymerase 之專一性是個很值得探討的部分。最後，第五部份則是探討使用具有修復功能的 DNA 聚合酶，能針對錯誤的核苷酸進行移除修復，故也有學者表示，第三部分所提及的焦磷酸酶解快慢及 DNA 聚合酶延伸的差異性，皆是為了使具有修復功能的 DNA 聚合酶能順利的移除修復而拖延時間的(31)，故本實驗選擇了 *Pfu* polymerase 進一步作探討。





圖【1-10】判斷 PCR 合成正確性與否之統整示意圖(31)。

## 1-6 應用於 SNP 檢測之其他分析方法的建立

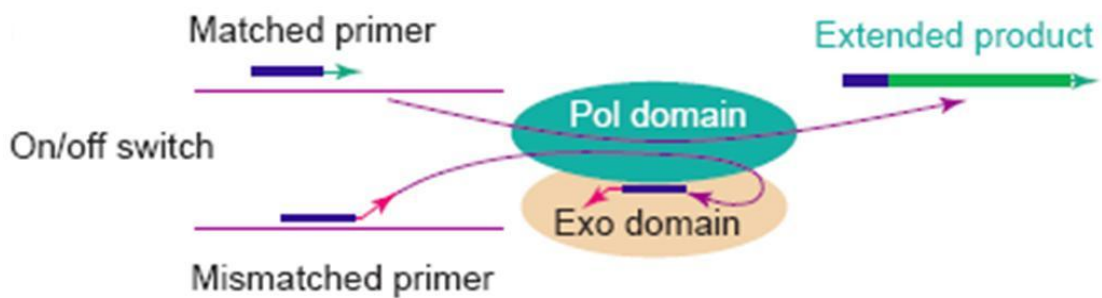
近年來有許多學者提出一些方法以求提高 AS-PCR 的可靠度與靈敏度，例如在靠近引子 3'端的位置額外增加與模板鹼基的錯配；或是在反應溶液裡添加奈米金，企圖藉由金屬易導熱特性改善熱循環溫度上升下降速度不夠快而產生的雜訊現象(32,33)。

由文獻得知，具有 3'→5'的外切酶修復能力的 *Pfu* DNA 聚合酶(*Pfu* DNA polymerase)錯配率相較於無校正能力的 *Taq* DNA 聚合酶(*Taq* DNA polymerase)來的低許多(34)，故選用 *Pfu* 聚合酶來提高反應的靈敏度。然而，具有修復能力的 *Pfu* 聚合酶碰上與模板錯配的特異性引子，會針對引子上錯配位點的核苷酸進行移除並修復的動作，導致無論引子正確配對與否皆會產生產物，而無法如 AS-PCR 機制一樣呈現 ON/OFF 訊號。因而，尋找一個能有效利用 *Pfu* 聚合酶高靈敏度特性，並且能使反應呈現 ON/OFF 訊號的特異性引子成了最亟欲解決的課題。我們從文獻統整出兩大方法，主要分成 ON/OFF switch assay 與 OFF/ON switch assay (35,36)，如表【1-2】。

表【1-2】利用具有校正能力之 DNA 聚合酶的 SNP 檢測方法(35)

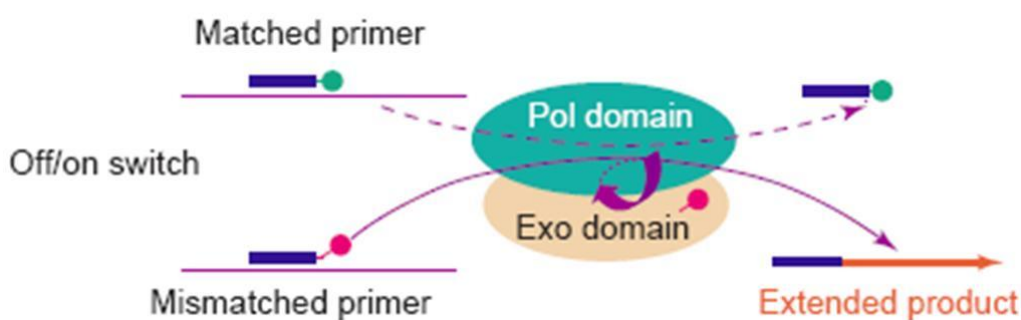
Method	Primers	Mechanisms
ON/OFF switch assay	3' exonuclease resistant modified	Resistant to 3' exonuclease, mismatch primer is not extended.
OFF/ON switch assay	3' dehydroxylation modified	Primer activation required, matched primer is not extended.

ON/OFF switch assay，是一種利用修飾過抗核酸外切酶修復的特異性引子搭配上具有高靈敏度的 *Pfu* 聚合酶的方法。實驗機制為圖【1-11】所示，事先將特異性引子 3' 端位置進行抗核酸外切酶的修飾，而此修飾能有效地抵抗 *Pfu* 聚合酶的外切修復功能。當特異性引子的 3' 端位點與模板為錯誤配對，錯配的 3' 端將由聚合區域進入到 *Pfu* 聚合酶的外切修復功能區域進行切除修復的動作，但因 *Pfu* 聚合酶無法對做過抗核酸外切酶修飾的 3' 端位點行使切除功能而使得反應終止於外切修復區域，進而呈現 OFF 訊號。相對地，當特異性引子的 3' 端位點與模板為正確配對，將直接進行聚合反應，也就不會受修飾的影響而能繼續聚合，使得反應呈現 ON 訊號(8,35,37,38)。



圖【1-11】ON/OFF switch assay 之示意圖(35)。

OFF/ON switch assay 雖然同樣利用 *Pfu* 聚合酶的外切修復功能進行分析，但其機制完全不同於 ON/OFF switch assay 的反應機制，如圖【1-12】所式。此方法是將特異性引子 3' 端上的核苷酸以惰性基團(inert group)替換掉 3' 端上的 OH 基團，使整個聚合反應因缺少 3' 端的羥基而無法與核苷三磷酸形成新磷酸雙酯鍵，故終止反應。因此修飾過的特異性引子與模板為正確配對時，因不需進行外切修復，而缺乏 3' 端的羥基導致聚合反應無法繼續進行，呈現 OFF 訊號。相反地，若引子的 3' 端與模板為錯誤配對，則修飾過惰性基團的 3' 端會藉由 *Pfu* 聚合酶的切除功能移除掉修飾上惰性基團的核苷酸，並且修復正確的新核苷酸上去並繼續聚合而呈現 ON 訊號(35,36,39)。



圖【1-12】 OFF/ON switch assay 之示意圖(35)。

## 1-7 研究動機

在台灣，隨著國人的生活步調越趨緊繃、飲食習慣偏於西方，加上環境與化學物質汙染等因素，使得大腸直腸癌總是位居國人十大癌症的前三名。然而，大腸直腸癌的症狀在早期並不容易發現，當症狀開始出現之後，往往可能已錯過治療的黃金時期。因此如何建立一套「早期發現，早期治療」的完善檢測分析是現今最重要的課題。

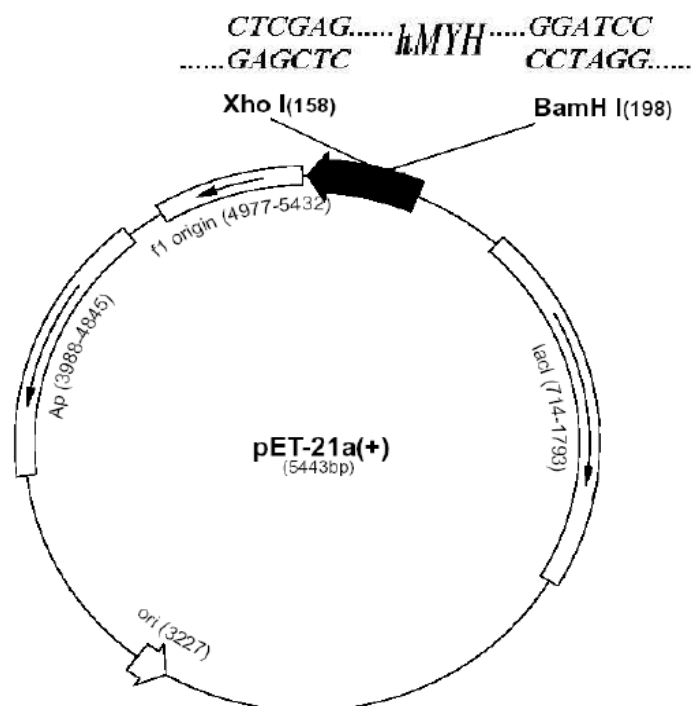
研究發現人類 *hMYH* 雙等位基因突變(G:C→T:A)與大腸直腸癌及其他癌症的產生有密切的關係。因此本實驗室曾與合作的醫院取得大腸直腸癌患者癌細胞組織的 genomic DNA，針對 *hMYH* 基因上已被證實的幾個突變熱點進行 AS-PCR 分析比較，藉以釐清 *hMYH* 基因突變與台灣大腸直腸癌病例之相關性(1)。然而，實驗室的數據結果與韓國學者所發表的文獻結果(40)相似，30 位患者的 *hMYH* 基因皆無檢測出突變熱點存在。因而推測 *hMYH* 基因突變的發生率是否會隨著種族的差異性而有所不同呢？或是檢測的樣本數不足呢？又或者是因為 DNA 的突變熱點相較於 DNA 總體而言比例過小，導致檢測方法靈敏度不足而無法篩選呢？

由先前實驗室針對 AS-PCR 探討其可行性的數據可知，DNA 模板濃度、dNTP 混合比例或是熱循環條件參數皆能提高 AS-PCR 靈敏度。故本研究將繼續針對提高 AS-PCR 靈敏度進行探討，並嘗試建立其他新的檢測方法，期許未來能走向「預防甚於治療」的診療方式。

## 第二章 實驗材料及裝置

### 2-1 質體 DNA 來源

選擇已重組的 *pET21a-hMYH* 質體，此質體內含野生型 *hMYH* 基因，並將其轉型入 BL-21 Gold strain 的宿主細胞中(5)，圖【2-1】為 *pET21a-hMYH* 質體之示意圖。將此細胞經由大量培養後，接著利用 Qiagen mini-preparation kit 萃取出質體 DNA，並將此質體命名為野生型質體 DNA。萃取出來的野生型質體 DNA 將利用限制酶切割及 DNA 定序分析以確認質體 DNA 正確性與否。



圖【2-1】質體 *pET21a-hMYH* 之示意圖(5)。

## 2-2 *hMYH* 基因突變熱點的選擇與引子的設計

由圖【1-7】可知，位於 *hMYH* 基因 Pseudo-HhH motif 區域的突變熱點 Y165C 出現突變的頻率最高，故本研究所用之引子主要是依據 *hMYH* 基因上 Y165C 序列位置所設計。表【2-1】為 AS-PCR 偵測 Y165C 突變點之特異性引子序列，引子的 3' 端為突變點位置，另外為了增加引子與模板的延伸阻力而提高 AS-PCR 靈敏度，也在特異性引子序列上設計不同的錯配位點；表【2-2】為利用於 ON/OFF switch assay 中的特異性引子序列，此引子序列依舊選用含 Y165C 突變點之特異性引子序列，並且進行抗核酸外切酶之特殊修飾；表【2-3】為利用 OFF/ON switch assay 系統中的特異性引子序列，這些引子序列不僅是含有 Y165C 突變點之序列，還必須具備在 3' 末端做 dehydroxylation 修飾；表【2-4】為應用於 New OFF/ON switch assay 中的特異性引子序列，此引子與表【2-3】修飾相同，皆位於 3' 末端進行 dehydroxylation 修飾，不同之處為此特異性引子與模板錯誤配對的位點不位於 3' 末端，而是位於 3' 末端數來第七個位點。

表【2-1】AS-PCR 之特異性引子序列

Mutation		Primer name	Sequence (5'→3')
Y165C	Forward	<b>THU-MYH-1</b>	CTACTATACCGGATGGATGC
	WT Reverse	<b>THU-MYH-2</b>	CGCCGGCCACGAGAATAGT
	MT Reverse	<b>THU-MYH-3</b>	CGCCGGCCACGAGAATAG <u>C</u>
	Reverse	<b>THU-MYH-2M</b>	CGCCGGCCACGAGAATA <u>CT</u>
	Reverse	<b>THU-MYH-3M</b>	CGCCGGCCACGAGAATA <u>CC</u>

WT：wild type specific，野生型特異性引子

MT：mutant type specific，突變型特異性引子

底線為錯配位點，亦即鹼基與野生型模板錯誤配對

表【2-2】應用於 ON/OFF switch assay 中含有 Y165C 突變點之特異性引子序列

Mutation		Primer name	Sequence (5'→3')
Y165C	Forward	<b>THU-MYH-1</b>	CTACTATACCGGATGGATGC
	WT Reverse	<b>THU-MYH-2PS</b>	CGCCGGCCACGAGAATAG* <u>T</u>
	MT Reverse	<b>THU-MYH-3PS</b>	CGCCGGCCACGAGAATAG* <u>C</u>
	Reverse	<b>THU-MYH-2MPS</b>	CGCCGGCCACGAGAATA* <u>CT</u>
	Reverse	<b>THU-MYH-3MPS</b>	CGCCGGCCACGAGAATA* <u>C*C</u>
	Reverse	<b>THU-MYH-3GPS</b>	CGCCGGCCACGAGAATAG* <u>G</u>
	WT Reverse	<b>THU-MYH-2LNA</b>	CGCCGGCCACGAGAATAG* <u>T</u>
	MT Reverse	<b>THU-MYH-3LNA</b>	CGCCGGCCACGAGAATAG* <u>C</u>
	Reverse	<b>THU-MYH-2MLNA</b>	CGCCGGCCACGAGAATA* <u>CT</u>
	Reverse	<b>THU-MYH-3MLNA</b>	CGCCGGCCACGAGAATA* <u>C*C</u>

WT：wild type specific，野生型特異性引子

MT：mutant type specific，突變型特異性引子

\*：表示 exonuclease resistant modified 位置，修飾之結構式請參見 3-3 節

底線為錯配位點，亦即鹼基與野生型模板錯誤配對



表【2-3】應用於 OFF/ON switch assay 中含有 Y165C 突變點之特異性引子序列

Mutation		Primer name	Sequence (5'→3')
	Forward	<b>THU-MYH-1</b>	CTACTATACCGGATGGATGC
	WT Reverse	<b>THU-MYH-2P</b>	CGCCGGCCACGAGAATAGT(P)
Y165C	MT Reverse	<b>THU-MYH-3P</b>	CGCCGGCCACGAGAATAG <u>C</u> (P)
	Reverse	<b>THU-MYH-3SH</b>	CGCCGGCCACGAGAATAG <u>C</u> (SH)
	Reverse	<b>THU-MYH-DJ1</b>	CGCCGGCCACGAGAATAG <u>C</u> (aa)

WT：wild type specific，野生型特異性引子

MT：mutant type specific，突變型特異性引子

(P)：表示為 Phosphate modified，修飾之結構式請參見 3-3 節

(SH)：表示為 thiol (C3SH) modified，修飾之結構式請參見 3-3 節

(aa)：表示為 aminoC6 modified，修飾之結構式請參見 3-3 節

底線為錯配位點，亦即鹼基與野生型模板錯誤配對

表【2-4】New OFF/ON switch assay 之特異性引子序列

Mutation		Primer name	Sequence (5'→3')
	Forward	<b>THU-MYH-1</b>	CTACTATACCGGATGGATGC
Y165C	WT Reverse	<b>TM2-25P</b>	CGCCGGCCACGAGAATAGTAGCCCA(P)
	MT Reverse	<b>TM3-25P</b>	CGCCGGCCACGAGAATAG <u>C</u> AGCCCA(P)

WT：wild type specific，野生型特異性引子

MT：mutant type specific，突變型特異性引子

(P)：表示為 Phosphate modified，修飾之結構式請參見 3-3 節

底線為錯配位點，亦即鹼基與野生型模板錯誤配對

表【2-5】hMYH 基因之定序引子序列

Primer name		Sequence (5'→3')
<b>PE1</b>	Forward primer	CGGGGATCCATGACACCG
<b>PE3</b>	Reverse primer	AATCTCGAGGCCCTGGGC

## 2-3 實驗藥品

本研究所使用之實驗藥品相關資訊如表【2-6】所示。

表【2-6】使實驗藥品之列表

藥品名稱	廠商	產品序號
Agar	USB (Cleveland, OH USA)	US10906
Agarose	USB (Cleveland, OH USA)	32803
Ampicillin	Sigma (St. Louis, MO USA )	A-0166
Ethidium bromide	USB (Cleveland, OH USA)	US32813
Ethyl alcohol	Showa (Tokyo, Japan)	0502-3160
Glycerol	NIHON SHIYAKU (Osaka, Japan)	170292
Hydrochloric acid	Merck (Darmstadt, Germany)	1.00317.2000
QIAprep <sup>®</sup> spin Miniprep Kit	Qiagen (Hilden, Germany)	27106
Sodium chloride	Merck (Darmstadt, Germany)	1.06404.1000
TAE buffer 50X	GeneMark (Taichung, Taiwan)	J00709
Tryptone	USB (Cleveland, OH USA)	US12855
Yeast extract	USB (Cleveland, OH USA)	US23547

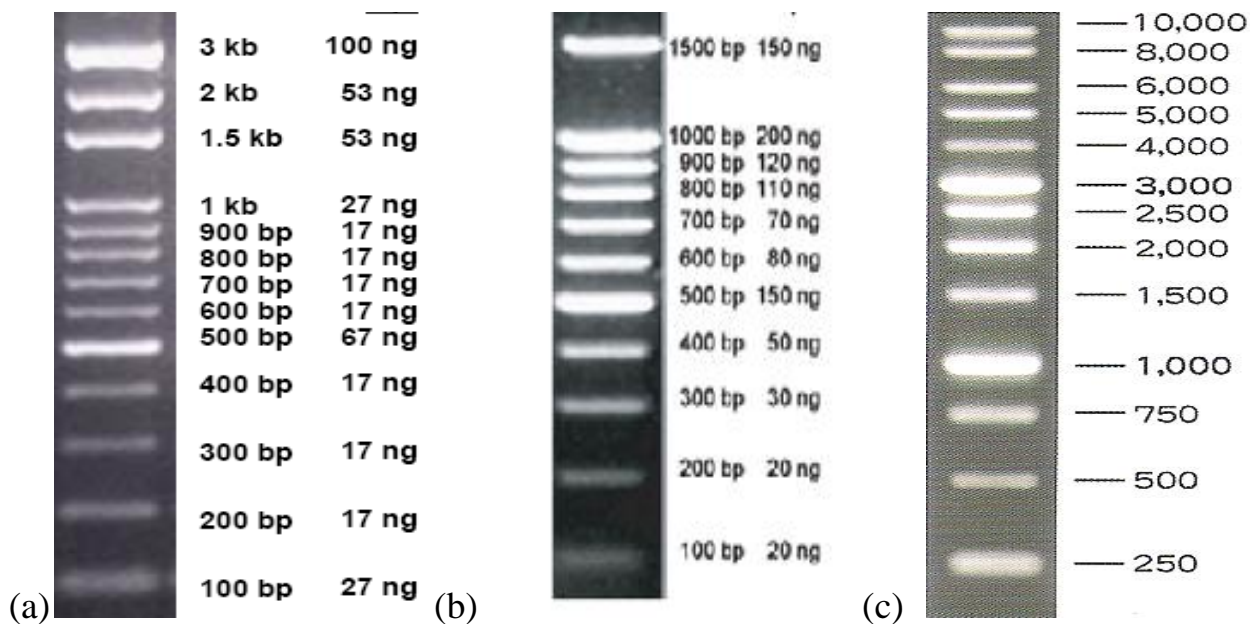
## 2-4 實驗生化試劑

本研究所使用之生化試劑相關資訊如表【2-7】所示，另外圖【2-2】為 DNA marker 標示圖。

表【2-7】生化試劑之列表

試劑名稱	廠商	產品序號
100bp DNA ladder LC	GeneMark (Taichung, Taiwan)	GM100-LC
100bp-1.5kb DNA ladder	GeneMark (Taichung, Taiwan)	M23
1kb ET Ladder	Blossom (Taipei, Taiwan)	GPM06
dATP	New England Biolabs (Ipswich, Australia)	N0446S
dTTP	New England Biolabs (Ipswich, Australia)	N0446S
dCTP	New England Biolabs (Ipswich, Australia)	N0446S
dGTP	New England Biolabs (Ipswich, Australia)	N0446S
<i>Taq</i> DNA polymerase	GeneMark (Taichung, Taiwan)	GM008-2
10X <i>Taq</i> reaction buffer	GeneMark (Taichung, Taiwan)	GM008-5
<i>Pfu Ultra</i> ® High-Fidelity DNA polymerase	Stratagene (La Jolla, USA)	0006075957
10X <i>PfuUltra</i> reaction buffer	Stratagene (La Jolla, USA)	0006075694
10X ThermoPol reaction	New England Biolabs	0311006

buffer	(Ipswich, Australia)	
Restriction enzyme <i>BamH</i> I	New England Biolabs (Ipswich, Australia)	R0136S
Restriction enzyme <i>Xho</i> I	New England Biolabs (Ipswich, Australia)	R0146S



圖【2-2】DNA Marker 標示圖。

(a)100 bp DNA ladder LC ; (b) 100 bp-1.5 kb DNA ladder ; (c)1 kb DNA marker

## 2-5 實驗儀器設備

實驗所需之儀器設備的相關資料如表【2-8】所示。

表【2-8】儀器設備之相關資料一覽表

儀器名稱	製造商名稱	型號
微量移液吸取器 (Micro-pipette)	Eppendorf (Hamburg, Germany)	Research 1000/200/100/ 20/2.5 $\mu$ L
紫外線及可見光光譜儀 (UV/visible Spectrophotometer)	Spectronic instruments (New York, USA)	Genesys2
滅菌釜 (Autoclave)	Trident (California, USA)	EA-635
微量電子天秤 (Micro-electronic balance meter)	OHAUS (New Jersey, USA)	AR1530
一般冰箱(4°C) (Refrigerator)	TECO (Taipei, Taiwan)	RE7222
低溫冰箱(-20°C) (Low temperature refrigerator)	Fisher & Paykel (Queensland, Australia)	Standard H160
超低溫冰箱(-80°C) (Ultra-low temperature Freezer)	Thermo (Waltham, USA)	Forma-86 ULT Freezer
電源供應器 (Power supply)	Bio-Rad (Hercules, USA)	Power Pac Basic
DNA 膠體電泳槽 (DNA electrophoresis cell)	Amersham bioscience (Buckinghamshire, UK)	Hoefer HE33

DNA/蛋白質影像系統 (DNA/protein Imaging system)	Kodak (Taipei, Taiwan)	DC290
DNA/蛋白質影像系統 (DNA/protein Imaging analysis system)	Kodak (Taipei, Taiwan)	1D Image Analysis
聚合酶連鎖反應儀 (PCR thermal cycler)	Applied Biosystems (Foster, USA)	Gene Amp PCR System 9700
離心機 (Centrifuge)	Eppendorf (Hamburg, Germany)	5415D
水鑽級超純水機 (Diamond Ultrapure Water system)	Barnstead (Dubuque, Iowa, USA)	NANO pure Dlamond <sup>TM</sup>
2/3D 震盪器 (2/3D Waver)	Major science (Taipei, Taiwan)	MW-23
試管震盪器 (Vortex-mixer)	Scientific Industries (New York, USA)	VORTEX-2 GENIE
培養箱 (Incubater)	Cheng Sang	Low temperature orbital shaking incubator
無菌無塵操作台 (Vertical laminar flow cabinet)	均泰 (Taichung, Taiwan)	GT-4L

## 第三章 實驗方法

根據文獻顯示，人類 *hMYH* 雙等位基因突變(biallelic germline mutations)對於 *hMYH* 的修復功能有很大的影響(3)，因此本實驗將利用 AS-PCR 方法來檢測修復基因 *hMYH* 的 SNPs。實驗方法主要分成三大階段：一、實驗步驟與材料製備，二、確認 AS-PCR 方法之可行性，三、其他分析方法的建立。

### 3-1 實驗步驟與材料製備

在實驗步驟與材料製備的部分主要分成以下七點來說明：〔 I 〕細菌培養、〔 II 〕內含野生型模板之質體 DNA 製備、〔 III 〕利用 DNA 限制內切核酸酶確認質體 DNA 序列、〔 IV 〕模板 DNA 濃度測定、〔 V 〕瓊脂凝膠(Agarose gel)之製備與 DNA 電泳法(Agarose gel electrophoresis)、〔 VI 〕聚合酶連鎖反應(Polymerase Chain Reaction, PCR)、〔 VII 〕DNA 定序(Sequencing)。

#### 3-1-1 細菌培養

進行細菌培養前，需先點燃酒精燈維持實驗環境的潔淨度。使用酒精燈時需小心注意安全，如要離開位置需先滅掉火焰再行離開。培養前必須事先準備 LB (Luria-Bertani)培養液於試管中，且 LB 培養液內需具有 0.1 % 抗生素 ampicillin (50 mg/ml)，緊接著從液態氮中取出含有質體 DNA 的大腸桿菌，並且快速接種於 LB 培養液內，接著放入培養箱以 37°C、

轉速 150 rpm 震盪培養 3、4 小時，培養至濁度值達 0.4–0.5 即可。

接著將含有大量大腸桿菌的菌液接種於含有 0.1 % 抗生素 ampicillin (50 mg/ml) 的 LB 培養基上，並且倒置培養皿於 37°C 的培養箱內培養 7、8 小時。接著從培養基中挑選單一菌落接種至含有 0.1 % ampicillin (50 mg/ml) 的 LB 培養液中，並且以 37°C、轉速 150 rpm 震盪培養，培養時間則由菌液濃度決定，約 O.D<sub>600</sub> 值為 0.4–0.5 即可。

### 【LB 培養液之製備】

秤取表【3-1】之藥品劑量溶解於去離子水中，並調整溶液體積至 800 ml，接著置於滅菌釜中進行滅菌。滅菌前需先略微鬆開血清瓶瓶蓋，避免因高溫高壓而有爆破危險。滅菌完畢後，冷卻至手碰觸可接受之溫度時再加入 800 µl 的 ampicillin (50 mg/ml)，混合均勻後保存於 4°C 冰箱，保存期限約一至三個月左右。

表【3-1】配置 LB 培養液之藥品表

藥品名稱	添加量(單位：克)
Tryptone	8
Yeast extract	4
NaCl	8

### 【LB 培養基之製備】

秤取表【3-2】之藥品劑量溶解於去離子水中，並調整溶液體積至 800



ml，接著置於滅菌釜中進行滅菌。滅菌前需先略微鬆開血清瓶瓶蓋，避免因高溫高壓而有爆破危險。滅菌完畢後，冷卻至手碰觸可接受之溫度時再加入 800  $\mu$ l 的 ampicillin (50 mg/ml)，加入 ampicillin 後快速混合均勻，並倒入事先放置的培養皿冷卻至凝固，蓋上培養皿蓋，封上封口膜倒放入 4°C 冰箱保存。

表【3-2】配置 LB 培養基之藥品表

藥品名稱	添加量(單位：克)
Tryptone	8
Yeast extract	4
NaCl	8
Agar	12

#### 【抗生素 Ampicillin (50 mg/ml)之製備】

秤取 0.5 克的抗生素 ampicillin，加入已事先滅過菌的去離子水內，並調整其溶液體積至 10 ml，保存於-20°C 冰箱。

### 3-1-2 質體 DNA 之製備

將細菌培養之菌液(參考於 3-1-1)批次加入 1.5 ml 的微量離心管中，並以轉速 6000 xg 於室溫下進行離心，離心後隨即移除上清液，並保留沉澱之菌體。接著利用 Qiagen mini-preparation kit 萃取出菌體中的質體 DNA。下面步驟為 Qiagen mini-preparation kit 之使用方法：

一開始先將沉澱的菌體加入 250  $\mu$ l 的 P1 緩衝溶液，並使其重新懸浮。接著在懸浮液裡加入 250  $\mu$ l 的 P2 緩衝溶液，蓋上微量離心管並上下翻轉使其完全混合。接著再加入 350  $\mu$ l 的 N3 緩衝溶液，再次蓋上微量離心管並上下翻轉使其完全混合。混合均勻後，將其溶液置於微量離心機以最高轉速 6000 xg 離心 10 分鐘，離心後微量離心管底部出現白色沉澱物，該沉澱物含有菌體的蛋白質與基因組 DNA。

接著小心取出前步驟得到的上清液並移至離心管柱(Spin column)，吸取上清液時需注意切勿取到白色沉澱物。接著將離心管柱放入微量離心機以最高轉速 6000 xg 離心 30 秒，並去除通過管柱的液體。緊接著加入 750  $\mu$ l 的 PE 緩衝溶液於離心管柱中，重複放入微量離心機以最高轉速 6000 xg 離心 30 秒，並再次去除通過管柱的液體。為了將離心管柱中的 PE 成份徹底移除，完成上步驟後再以最高轉速離心 1 分鐘，確保 PE 緩衝溶液裡的酒精成份能完全揮發。

最後將管柱移置一個乾淨的 1.5 ml 微量離心管上，接著加入 50  $\mu$ l 滅

過菌的去離子水，靜置一分鐘使 DNA 溶解於水中，然後以最高轉速離心一分鐘，接著移除管柱蓋上微量離心管，將所得之質體 DNA 保存於-20℃。

### 3-1-3 利用 DNA 限制內切核酸酶確認質體 DNA 序列

DNA 限制內切核酸酶(Restriction Endonucleases)，亦稱為分子剪刀，最常被應用於遺傳工程裡的切割技術。每一種限制內切核酸酶皆只能水解 DNA 上一段特殊序列的一個特定鍵，簡單來說就是個專一性極高，只能識別特定 DNA 序列，並準確地在特地序列上的特定位點剪切(5,12)。故本實驗將利用此特性確認 3-1-2 所萃取的質體 DNA 是否含有 *hMYH* 基因序列。

實驗所選之限制內切核酸酶為 *Xho* I 與 *Bam*H I，如表【3-3】所示。這兩種限制酶所識別的 DNA 片段有一明顯特徵，為編碼股(coding strand)由左至右與模板股(template strand)由右至左的序列相同(12)。而 *Bam*H I 在其雙股片段上水解 G 與 G 之間之磷酸雙酯鍵使其斷裂並在斷裂間留下黏滯末端(sticky ends)；*Xho* I 則在雙股片段上水解 C 與 T 之間的磷酸雙酯鍵並使其斷裂，且同樣在斷裂間留下黏滯末端。在本實驗中除了使用 *Bam*H I 與 *Xho* I 個別進行切割確認，也利用 *Xho* I 與 *Bam*H I 搭配做再次確認。

表【3-4】為限制酶切割反應時所需之試劑，依序加入所需藥品後，放入 37°C 水浴反應 30 至 90 分鐘不等。經反應而切開的 DNA 片段則藉由瓊脂凝膠體電泳，根據不同大小之 DNA 片段移動的速度不同來分離判斷。

表【3-3】實驗所用之限制內切核酸酶相關資料表

限制酶名稱	切割位點	DNA 片段大小 (單位：bp)	DNA 片段數
<i>Bam</i> H I	5'-G <sup>▼</sup> GATCC-3' 3'-CCTAG <sup>▲</sup> G-5'	6998	1
<i>Xho</i> I	5'-C <sup>▼</sup> TCGAG-3' 3'-GAGCT <sup>▲</sup> C-5'	6998	1
<i>Bam</i> H I + <i>Xho</i> I	/	1616, 5382*	2

\*： *Xho* I 與 *Bam*H I 搭配反應後的 DNA 片段大小

▲：限制酶之切割位點

表【3-4】限制酶切割反應所需之試劑

試劑名稱	添加劑量(單位：μl)
質體 DNA (250 ng/μl)	5
ddH <sub>2</sub> O	1
10X NE buffer 2	1
10X BSA	1
<i>Bam</i> H I (10 U/μl)	1
<i>Xho</i> I (10 U/μl)	1*

\*：如只反應 *Bam*H I 或 *Xho* I，此劑量使用 ddH<sub>2</sub>O 取代

### 3-1-4 模板 DNA 濃度測定

欲進行 AS-PCR 反應前，除了確認模板 DNA 的正確性與否(詳情參考 3-1-3)，亦需對欲加入反應之模板 DNA 進行定量，因此事先對製備完畢的質體 DNA 做濃度測定是必需的。以下為測量步驟：

先取去離子水為空白組，設定波長為 260 nm，接著放入紫外線分光光度計內校正歸零。校正完畢後，取出去離子水，替換成已事先稀釋 100 倍的 DNA 溶液，並且讀取樣品讀值。若吸光值讀值超過 1 表示 DNA 溶液濃度過濃超過測量範圍，故需再稀釋至讀值位於 1 以內。由於每一  $A_{260}$  單位相當於 50 ng/ $\mu$ l 的 DNA 濃度，故經由公式 (3-1) 換算即可得到原始濃度。

$$\text{DNA 濃度}(\text{ng}/\mu\text{l}) = \text{讀取之}A_{260}\text{值} \times \text{稀釋倍數} \times 50 \quad \text{式 (3-1)}$$

量測完畢，將石英比色槽先行以去離子水沖洗乾淨，接著再以石英比色槽清洗液沖洗浸泡，處理乾淨後置於室溫中自然乾燥，待石英比色槽乾燥完畢保存於防潮箱內。

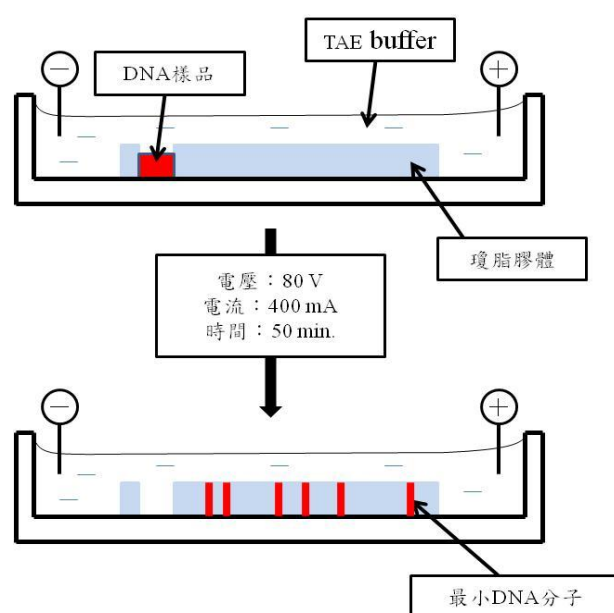
#### 【石英比色槽清洗液之製備】

事先準備一可封閉之洗滌瓶並加入 300 ml 酒精(95 %)與 150 ml 的 HCl (0.1 M)，配置完成後完全密封洗滌瓶保存。

### 3-1-5 瓊脂凝膠之製備與瓊脂凝膠電泳法

瓊脂凝膠電泳法(Agarose gel electrophoresis)在此實驗裡是個操作簡易，卻不可或缺的分析技術。無論是限制內切核酸酶反應之產物片段(詳情參考 3-1-3)，或是後面所要講到的 AS-PCR 反應產物 DNA 皆需利用瓊脂凝膠電泳法才能顯現產物訊號。

就像蛋白質分子一樣，DNA 分子亦帶負電荷。因此，當 DNA 分子置於電場中，它們會朝著正極的方向移動，因此搭配上瓊脂糖(agarose)組成的瓊脂凝膠，便可依 DNA 分子大小不同而分離(12)。瓊脂凝膠是一種多孔隙聚合體，所以當 DNA 分子在膠體內往正極移動時，越小的 DNA 分子移動的越快也越易通過凝膠的孔隙而陸續分離出 DNA 大小，DNA 分子越小越靠近正極端，如圖【3-1】所示。



圖【3-1】瓊脂凝膠電泳法之示意圖。

欲觀察膠體電泳結果最簡單的方法，就是選擇能對 DNA 分子染色的化合物，此實驗我們選擇溴化乙錠(Ethidium bromide，簡稱 EtBr)對 DNA 染色。故只要膠體中存在足夠的 DNA 分子，經由 EtBr 染色後，使用紫外光激發照射即可清楚地看到膠體上的 DNA 色帶。但此實驗過程是極具毒害性的，除了 EtBr 是極強的突變劑，使用的紫外光照射也可能造成嚴重的灼傷，故進行此實驗過程需格外的小心謹慎。接著將針對瓊脂凝膠膠體製備與瓊脂凝膠電泳法做進一步說明：

### 1.5 %瓊脂凝膠膠體(Agarose gel)之製備

秤取 1.2 克的瓊脂糖(Agarose)與 80 ml 的 1X TAE buffer 置於錐形瓶內。接著取一小塊保鮮膜蓋上錐形瓶瓶口並戳幾個小洞，接著放入微波爐加熱至完全溶解。取出已完全溶解之 Agarose 溶液並降其溫度至 50°C 左右，接著加入 20  $\mu$ l 的 0.2 % EtBr，並輕輕搖晃使其混合均勻。

將配置完成之 Agarose 溶液倒入事先準備好的製膠模具中，並架上齒梳(comb)，若過程中有氣泡產生，必須要趁膠體凝固前移除，否則會使膠體的孔隙度受氣泡影響，進而阻礙 DNA 分子的移動。待其冷卻後，輕輕拿開齒梳，並把瓊脂凝膠膠體與製膠板一同取出放入保鮮盒保存於 4 °C 冰箱。(註：最多只可保存一週)

### **【1X TAE buffer 之製備】**

取 16 ml 的 50X TAE buffer 置入血清瓶內，並加入去離子水 784 ml，



蓋上血清瓶蓋上下混合均勻，置於室溫保存即可。

### **【EtBr 之製備】**

秤取 0.2 克的 EtBr 放入一已事先包裹錫箔紙的 15 ml 離心管內，並加入去離子水至 10 ml，即可配製為 2 % (w/v) 的 EtBr，保存於室溫下即可，但需避免光線直射。欲使用時，只需從已配製好的 2 % (w/v) 的 EtBr 溶液中取 1 ml，並加入 9 ml 的去離子水即可稀釋為 0.2 % (w/v) 的 EtBr。

### **瓊脂凝膠電泳法**

將配製好的瓊脂凝膠放入已事先倒入 1X TAE buffer 的電泳槽中，而膠片的孔洞處應朝負電極處放置。接著於膠片的第一個孔洞處放置 DNA marker，做為 DNA 分子量與濃度的對照。再分別將 DNA 樣品與 6X DNA loading dye 混合(比例為 1 : 5)，並加入於其餘孔洞中。接著設定電源供應器為 80 伏特電壓、50 分鐘，待跑膠時間終止，取出膠片置於 UV 透射光源板上拍照存檔。

### 3-1-6 聚合酶連鎖反應(Polymerase Chain Reaction, PCR)

由文獻回顧之 1-5 節可知，探討 AS-PCR 分析法的靈敏度前，需先確認基本的 PCR 條件是否為最佳化，故此部分將針對本實驗 PCR 反應之條件做統整。表【3-5】為使用 *Taq* polymerase 進行 PCR 反應所需之試劑列表；表【3-6】則為使用 *Pfu* polymerase 進行 PCR 反應所需之試劑表；表【3-7】則為 PCR 熱循環參數條件。三個表格皆為本實驗的一般條件，如欲提高 AS-PCR 靈敏度而改變 PCR 之反應條件參數，將於那章節另外標示其反應條件。

表【3-5】使用 *Taq* polymerase 進行 PCR 反應所需試劑表

試劑名稱	試劑濃度	添加量(單位：μl)	最終濃度
ddH <sub>2</sub> O	/	19.125	/
10X <i>Taq</i> reaction buffer	/	2.5	1X
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	1.5	1.5 mM
dNTPs	20 mM	0.5	0.4 mM
DNA	250 ng/μl	0.5	5 ng/μl
Forward primer	20 μM	0.25	0.2 μM
Reverse primer	20 μM	0.25	0.2 μM
<i>Taq</i> polymerase	5 U/μl	0.375	0.075 U/μl
反應總體積		25	/

表【3-6】使用 *Pfu* polymerase 進行 PCR 反應所需試劑表

試劑名稱	試劑濃度	添加量(單位：μl)	最終濃度
ddH <sub>2</sub> O	/	20	/
10X <i>Pfu</i> reaction buffer	/	2.5	1X
dNTPs	20 mM	0.5	0.4 mM
DNA	250 ng/μl	0.5	5 ng/μl
Forward primer	20 μM	0.25	0.2 μM
Reverse primer	20 μM	0.25	0.2 μM
<i>Pfu</i> polymerase	2.5 U/μl	1	0.1 U/μl
反應總體積		25	/

表【3-7】PCR 熱循環條件

30 cycles					
94 °C	94 °C	Ta* °C	72 °C	72 °C	4 °C
5 min.	1 min.	0.5 min.	1 min.	7 min.	∞

\* : Ta 為 annealing temperature

表【3-8】10X *Taq* reaction buffer 成份表

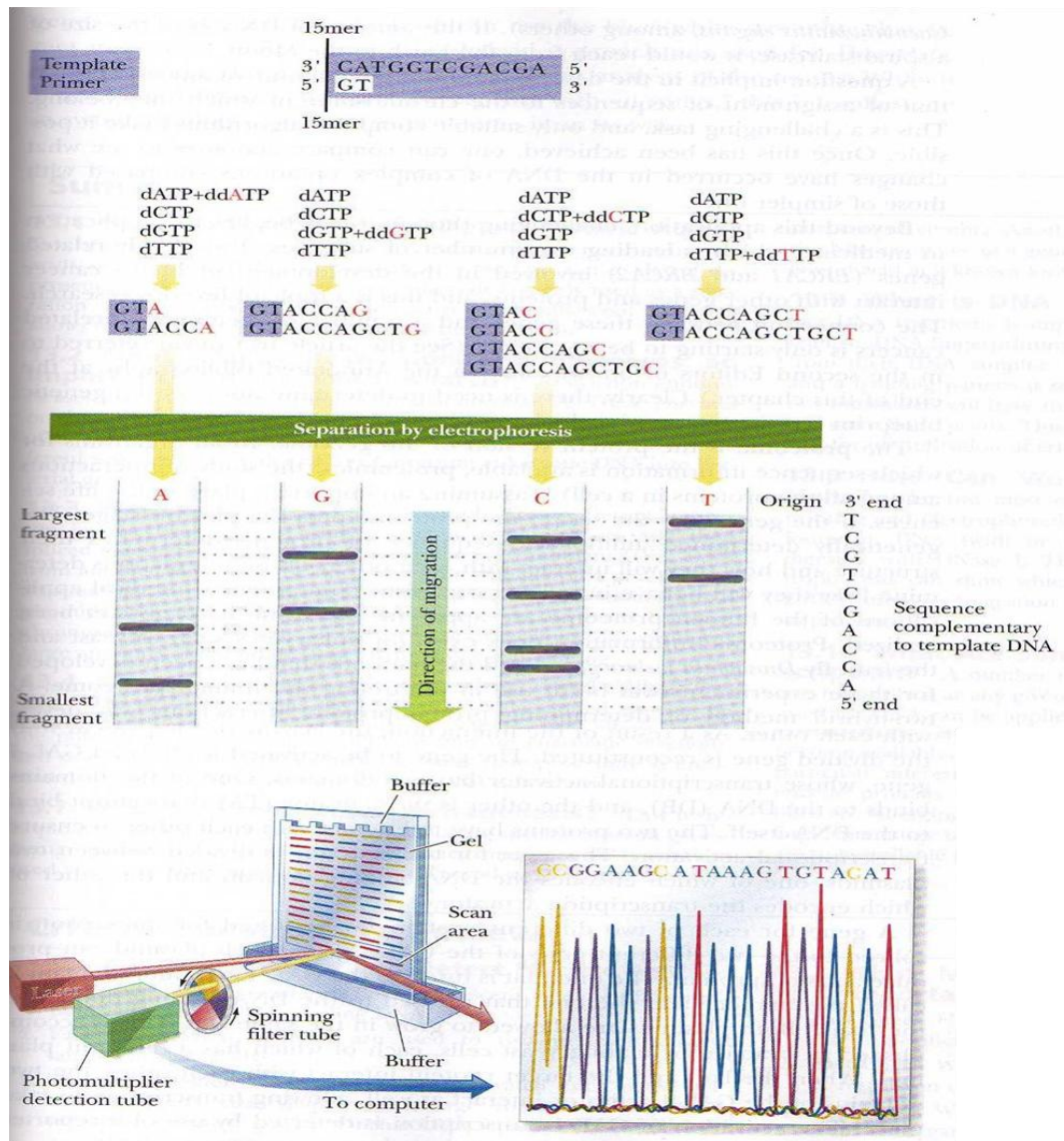
10X <i>Taq</i> reaction buffer
100 mM Tris-HCl (pH 9.0)
500 mM KCl
1 % Triton
0.1 % (w/v) gelatin
10 mg/ml BSA

表【3-9】10X *Pfu* reaction buffer 成份表

10X <i>Pfu</i> reaction buffer
200 mM Tris-HCl (pH 8.0)
100 mM KCl
1 % Triton X-100
20 mM MgCl <sub>2</sub>
60 mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
1 mg/ml BSA

### 3-1-7 DNA 定序(Sequencing)

無論是萃取完的質體 DNA 或是 AS-PCR 反應後的產物，最後皆需藉由 DNA 定序做最後確認。本實驗之定序工作是委由明欣科技公司以自動定序儀(ABI PRISM Model 3730)執行，此 DNA 定序儀是採用 Sanger-Coulson DNA 定序方法。原理如圖【3-2】，主要是在寡核苷酸合成時進行選擇性之干擾，也就是說以欲定序之 DNA 作為模板，接著加入適當比例的 dNTPs、聚合酶和四種不同螢光標示的 ddNTPs 等，進行 PCR 反應。由於 ddNTPs 是個核苷酸類似物，在結構上為缺乏 3'-hydroxyl group，因而無法與下一個核苷酸形成磷酸二酯鍵而使得聚合反應終止於這些 ddNTPs 位置上，產生各種長短不一的 DNA 片段。接著再以毛細管電泳技術分離這些長短不一的 DNA 片段，最後透過雷射光激發，並將放出的能量通過旋轉的有色濾鏡，再經由螢光儀偵測，即可組合其螢光訊號來判讀 DNA 序列(12)。



圖【3-2】Sanger-Coulson DNA 定序原理(12)。

### 3-2 確認 AS-PCR 方法之可行性

從文獻回顧中提到，欲利用 AS-PCR 技術正確的檢測 SNPs，除了具備適當的 PCR 反應條件與反應試劑外(參見於 3-1-6)，恰當的引子設計也十分重要，故本章節將針對改變反應條件與特異性引子之設計做進一步的介紹。

根據文獻回顧之 1-5 節可知，PCR 反應中判別合成正確性與否，主要分成圖【1-10】所示的五大部分，故本實驗將針對其五大部分設計實驗並探討。第一部分為 dNTP 對聚合反應是否正確的差異，故本實驗將藉由調整 dNTP 比例進行探討，希望能藉由 dNTP 比例的不平衡降低錯配率。第二部分為磷酸二酯鍵(phosphodiester bond)形成速率的快慢作探討，有文獻表示，使用具有高焦磷酸酶解活性的 DNA 聚合酶能大大提高第二部分的差別性，故針對本實驗所選用的 *Taq* polymerase 將進行改善焦磷酸酶解活性作探討。第三部分則是探討 DNA 引子與預接上的 dNTP 形成磷酸二酯鍵時放出焦磷酸的速度，此部分與第二部分相同，皆與 DNA 聚合酶的焦磷酸酶解活性有極大的關聯，故皆對 *Taq* polymerase 之酶解活性進行探討。第四部分為 DNA 聚合酶的延伸能力探討，故本實驗將探討如何提高 *Taq* polymerase 之專一性。最後，第五部份則是探討使用具有修復功能的 DNA 聚合酶，能針對錯誤的核苷酸進行移除修復，故本實驗選擇了 *Pfu* polymerase 進一步作探討。

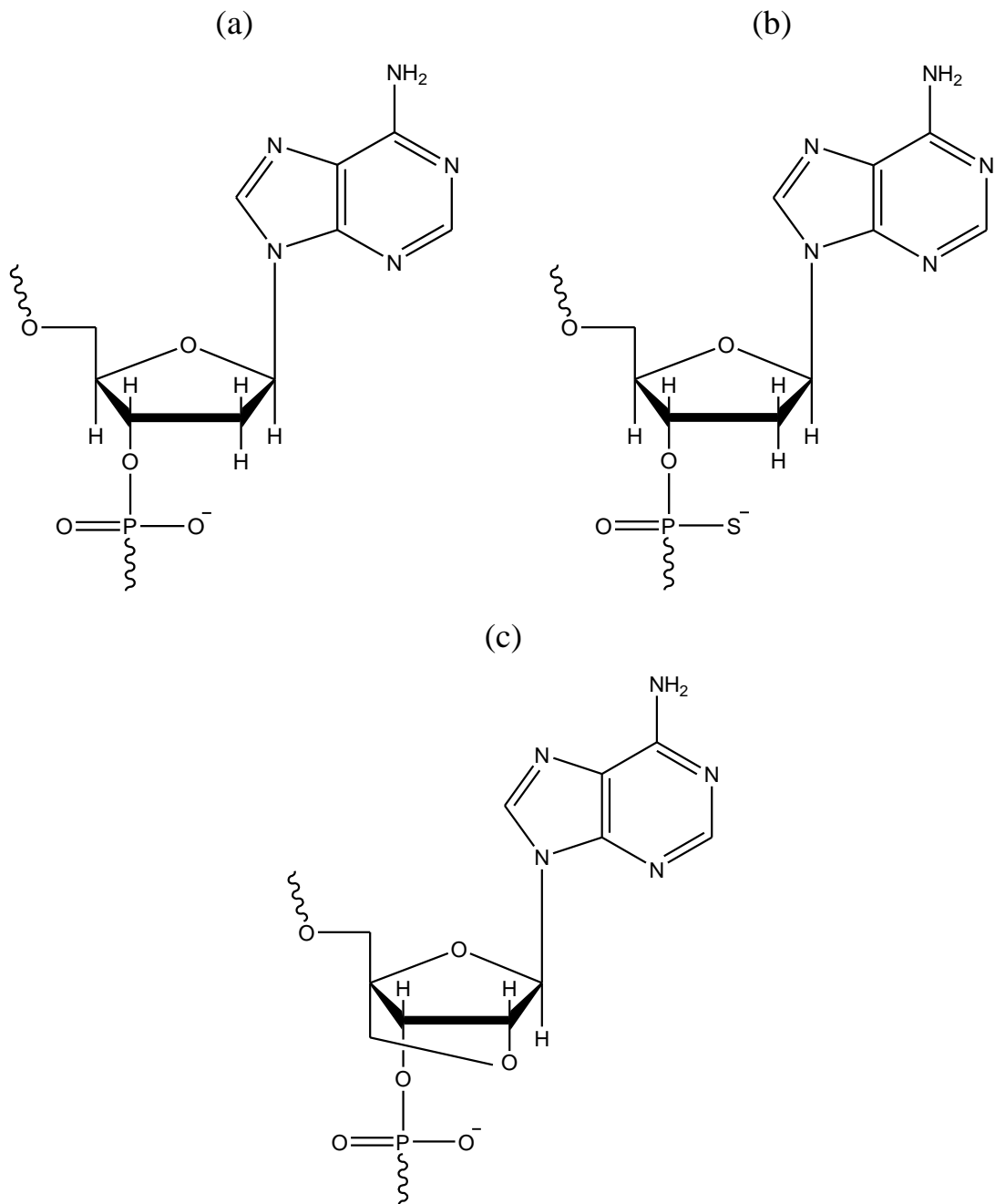
除了最佳化的 PCR 反應探討，恰當的引子設計也十分重要。故本實驗針對 *hMYH* 基因上之突變熱點 - Y165C，設計不同的特異性引子，詳細引子序列參見表【2-1】。表格中的 THU-MYH-1 與 THU-MYH-2 為與野生型模板互補的前置引子與反置引子；而 THU-MYH-3 則為與突變型模板互補的反置引子。另外為了增加引子延伸的阻力，本實驗分別設計了 THU-MYH-2M 與 THU-MYH-3M 兩種反置引子，其中 THU-MYH-2M 為 3' 端倒數第二位置的鹼基與野生型模板錯配；THU-MYH-3M 則為 3' 末端連續兩個鹼基錯配。

### 3-3 其他分析方法的建立

在文獻回顧中提及的 ON/OFF switch assay 與 OFF/ON switch assay (原理詳見 1-6)皆是利用具有 3'→5'的外切酶修復功能的 *Pfu* polymerase 搭配上不同修飾的特異性引子來進行分析。故本章節將針對特異性引子所作之修飾進一步說明：

表【2-2】為應用於 ON/OFF switch assay 的特異性引子，其 3'端皆做過抗外切核酸酶之修飾，而本實驗選擇了硫代磷酸化(Phosphorothioate，簡稱 PS)修飾與鎖核酸(Locked Nucleic Acid，簡稱 LNA)修飾作探討。簡單來說，硫代磷酸化修飾就是把磷酸二酯鍵上的 O 原子改成 S 原子，如圖【3-4 (b)】所示。此修飾除了可抵抗 *Pfu* 的外切修復功能，還會降低解鏈溫度(melting temperature,  $T_m$ ) (41-48)。另外，鎖核酸修飾結構如圖【3-4 (c)】，是個具有雙環結構的 DNA 分子。結構上除了五碳糖一個環，還有一個是由五碳糖上的二號氧原子與四號碳形成一個亞甲基橋所形成的 (49-53)。



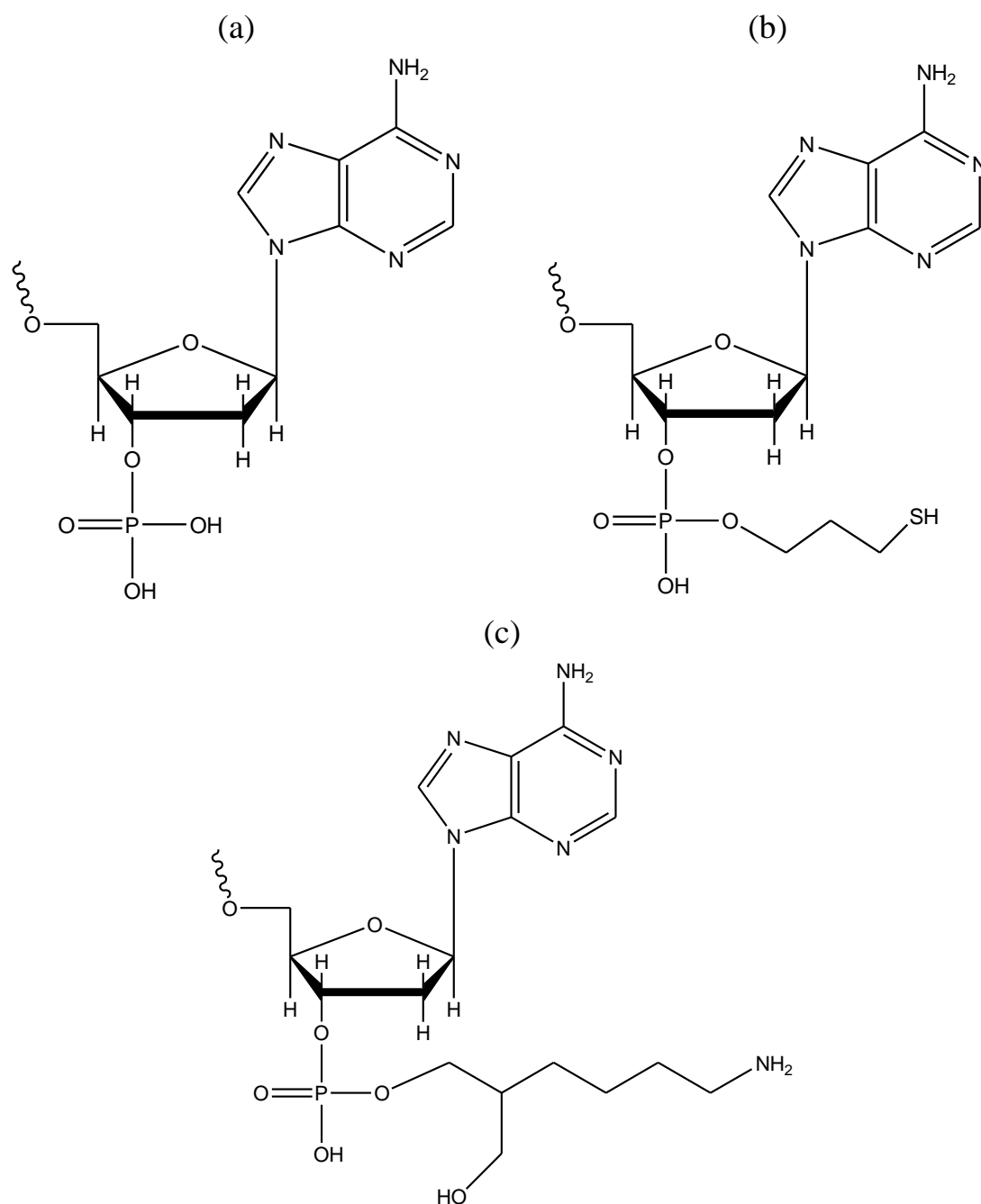


圖【3-3】特異性引子之抗核酸外切酶修飾的分子結構圖。

(a)DNA 分子、(b)硫代磷酸修飾之分子結構、(c)鎖核酸修飾之分子結構

表【2-3】、【2-4】為應用於 OFF/ON switch assay 之特異性引子，此引子則是將 3'端進行去羥基修飾，本實驗選擇了磷酸修飾(Phosphate modified)、Thiol 修飾(-C3SH)與 AminoC6 修飾作探討，圖【3-5】為三種

修飾之結構示意圖。此三種修飾皆為惰性基團，故特異性引子將因缺少 3' 端的羥基而無法與核苷三磷酸形成新磷酸雙酯鍵，而終止反應(原理參見 1-6 節)。



圖【3-4】特異性引子之去羥基修飾的分子結構圖。

(a)磷酸化修飾之結構、(b)Thiol 修飾之結構、(c) AminoC6 修飾之結構

## 第四章 實驗結果與討論

### 4-1 AS-PCR 反應條件最佳化之探討

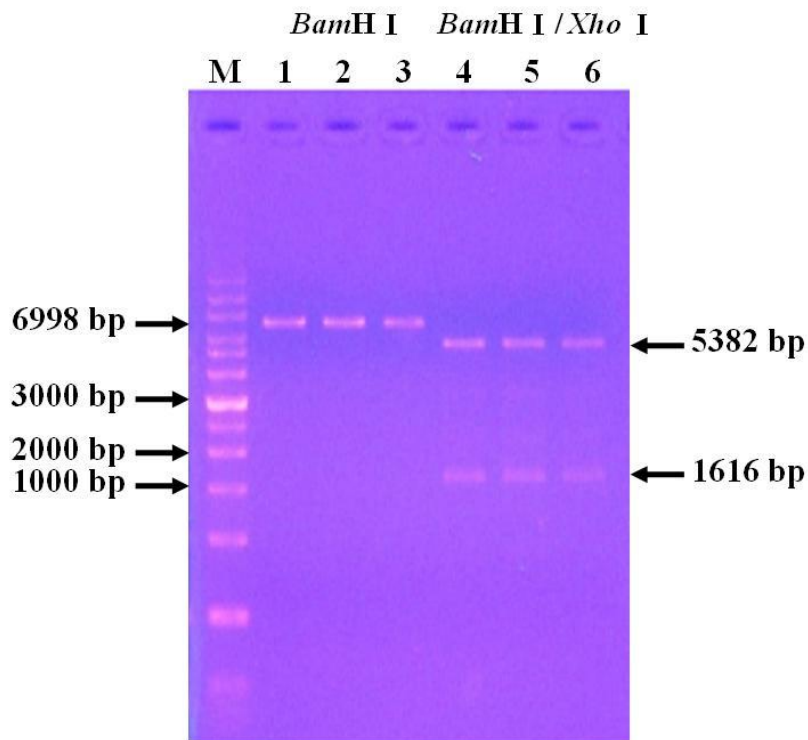
由文獻回顧之 1-5 節的敘述可知，欲使用 AS-PCR 準確地檢測 SNPs，其最基本之要求即為 PCR 反應條件與反應試劑之最佳化，故進行一系列實驗探討前，我們將先針對影響 PCR 反應結果的因素逐一測試調整，尋找適當且嚴謹的 PCR 反應條件，再行利用 AS-PCR 檢測 *hMYH* 基因之突變熱點 Y165C。

#### 4-1-1 質體 DNA 製備之探討

一開始我們先針對使用於 PCR 反應中的反應試劑作探討，表【3-5】與表【3-6】分別為使用 *Taq* polymerase 與使用 *Pfu* polymerase 反應時所需的試劑，除了模板 DNA 之外，其餘試劑皆由表【2-7】所敘述的廠商購得，而 PCR 反應所需之模板 DNA 則由 Qiagen mini-preparation kit 所製備而得。由 PCR 反應機制可知，欲得到準確的實驗結果，一開始所加入的 DNA 模板是個非常重要的關鍵。

本實驗所用之模板 DNA 為所製備的質體 DNA - *pET21a-hMYH* 質體，因此針對製備完成的質體 DNA 做進一步地確認是不可或缺的動作。當質體 DNA 製備完成後，我們選擇對質體 DNA 具專一切割特性的限制內切核酸酶對質體 DNA 進行切割確認，圖【4-1】為使用 *Xho* I 與 *Bam*H I 之切割結果。從圖中之 Lane 1-3 可判斷出，單獨使用 *Bam*H I 對質體 DNA

切割所得之片段大小訊號會落在 6000 bp 與 7000 bp 之間且較靠近 7000 bp，與我們所預估的 6998 bp 十分符合；另外圖中的 Lane 4-6 訊號為同時使用 *Xho* I 與 *Bam*H I 進行切割的結果，其片段訊號分別落在 1500 bp 與 2000 bp 之間及 5000 bp 與 6000 bp 之間，與我們所期望之 1616 bp 和 5382 bp 相符，故確認此 DNA 為 *pET21a-hMYH* 質體。限制內切核苷酸酶之相關資料列於表【3-3】；限制內切核苷酸酶之反應試劑與條件請參見 3-1-3。

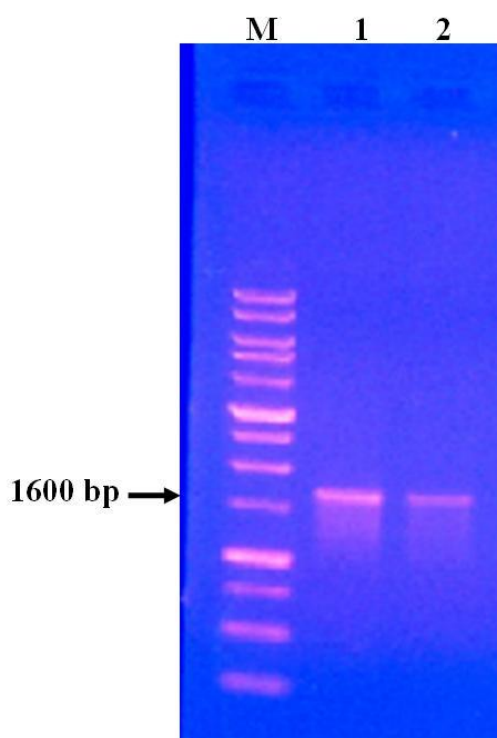


圖【4-1】限制核酸內切酶確認質體 DNA 大小之實驗結果。

Lane M 為 1 kb DNA marker；Lane 1-3 為使用 *Bam*H I 切割之產物大小；Lane 4-6 為同時使用 *Xho* I 與 *Bam*H I 切割之產物大小；瓊脂糖電泳膠為 0.8 %。

確認質體 DNA 的正確性後，我們將利用表【2-5】之 *hMYH* 基因的定序引子進一步進行 PCR 反應，藉以確認此質體 DNA 是否含有我們所

期望之 *hMYH* 基因，而此 *hMYH* 基因之片段大小為 1.6 kb。圖【4-2】為質體 DNA 使用引子 PE1 與 PE3 的 PCR 反應之結果，由圖中訊號可判斷其片段位於 1500 bp 與 2000 bp 且較靠近 1500 bp，故可初步判定此質體 DNA 含有目標基因 - *hMYH*。在確認過所製備之 *pET21a-hMYH* 質體含有我們所期望之 *hMYH* 基因後，我們將更進一步的將其 PCR 產物送定序，作最後之確認。定序結果完全符合目標 *hMYH* 基因之序列，其定序圖譜請參照【附錄一】。



圖【4-2】質體 DNA 使用 *hMYH* 基因的定序引子之 PCR 反應結果。

Lane M 為 1 kb DNA marker；Lane 1-2 為質體 DNA 之 PCR 反應結果。(PCR 反應條件請參考 3-1-6， $T_a$  為  $62^{\circ}\text{C}$ )

#### 4-1-2 模板 DNA 濃度對 AS-PCR 影響之探討

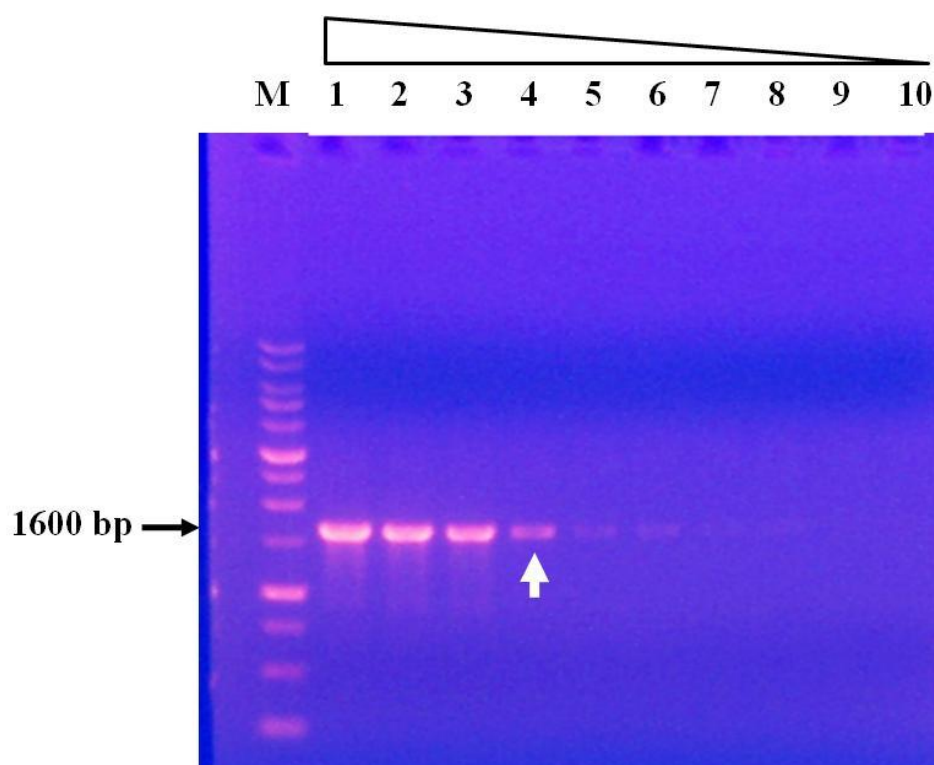
由 4-1-1 節之探討結果可確定其模板 DNA 之正確性，故確認反應原料皆無誤後，將進一步調整反應條件使其最佳化。一開始先藉由改變模板 DNA 之濃度，尋找適合之反應濃度。

在我們設計模板濃度對於 AS-PCR 影響之探討的實驗前，需先針對所製備之質體 DNA 進行定量。我們先將待測之 DNA 稀釋 60 倍，接著再稀釋 100 倍，並利用 3-1-4 節的濃度測量步驟進行量測，讀出吸光值讀值為 0.05，接著將讀值代入公式 (3-1)，算出其原始 DNA 濃度為 15  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 。

表【4-1】為其模板 DNA 濃度之稀釋倍數，圖【4-3】為改變模板 DNA 濃度於 PCR 反應的實驗結果。由其結果可知，當濃度稀釋至 375  $\text{ng}/\mu\text{l}$  與 37.5  $\text{ng}/\mu\text{l}$  之間時，訊號有很明顯地落差。故我們將在 375  $\text{ng}/\mu\text{l}$  與 37.5  $\text{ng}/\mu\text{l}$  之間選擇其最佳濃度，為降低未來實際應用於檢測上所需之 DNA 模板濃度量，本實驗選擇 250  $\text{ng}/\mu\text{l}$  作為實驗之模板濃度，亦即最終之 DNA 模板濃度為 5  $\text{ng}/\mu\text{l}$ 。

表【4-1】DNA 模板濃度之稀釋倍數

Lane	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
稀釋倍數	1	2	4	40	400	800	1600	3200	6400	12800
模板濃度 (ng/μl)	15000	7500	3750	375	37.5	18.75	9.375	4.6875	2.3438	1.1719
最終濃度 (ng/μl)	300	150	75	7.5	0.75	0.375	0.1875	0.0938	0.0464	0.0232



圖【4-3】改變 DNA 模板濃度之實驗結果。

Lane M 為 1 kb DNA marker；Lane 1-10 之 DNA 濃度條件為濃度高(15000 ng/μl)至濃度低(1.1719 ng/μl)，欲知詳細稀釋倍數請參考表【4-1】。(PCR 反應條件請參考 3-1-6， $T_a$  為 62°C)

### 4-1-3 探討 dNTP 混合比例對 AS-PCR 之影響

經由 4-1-2 節之探討結果，確認其 DNA 模板濃度後，我們接著尋找反應條件之最佳化。由文獻回顧之 1-5 節可知，當特異性引子接上正確的 dNTP 會牢牢地維持鍵結，而接上錯誤的 dNTP 則會迅速地脫落，可藉此特性判斷特異性引子與模板是否為正確配對。本實驗室曾利用改變 dNTP 之混合比例增加 AS-PCR 之特異性，由其實驗數據顯示，突變點 Y165C 之對偶性引子在〔GC〕：〔AT〕比例為 9：1 時，因突變型對偶性引子與野生型模板為 C；A 錯配，故能夠明顯區分對偶性引子之差異(1)。其訊號差異為突變型對偶性引子與野生型模板之錯誤配對，故終止反應而呈現 OFF 訊號；反之，野生型對偶性引子與野生型模板為正確配對，故呈現 ON 訊號，並與突變型對偶性引子之反應結果訊號成對比。

由上述之討論可知，改變 dNTP 混合比例能提高對偶性引子之特異性，故本章節將改變 dNTP 之混合比例進一步探討，並擇一適當之混合比例作為 AS-PCR 之最佳反應條件。

表【4-2】為改變 dNTP 之混合比例，且〔GC〕比例大於〔AT〕；圖【4-4】為其混合比例的實驗結果。由結果可知，當〔GC〕與〔AT〕比例的差距越大，其特異性隨之遞增。然而，當實驗設計改變成〔AT〕比例大於〔GC〕時，實驗條件列於表【4-3】，結果於圖【4-5】所示，亦得到相同結果。故推測改變 dNTP 之比例對於 PCR 之擴增速率影響較大。

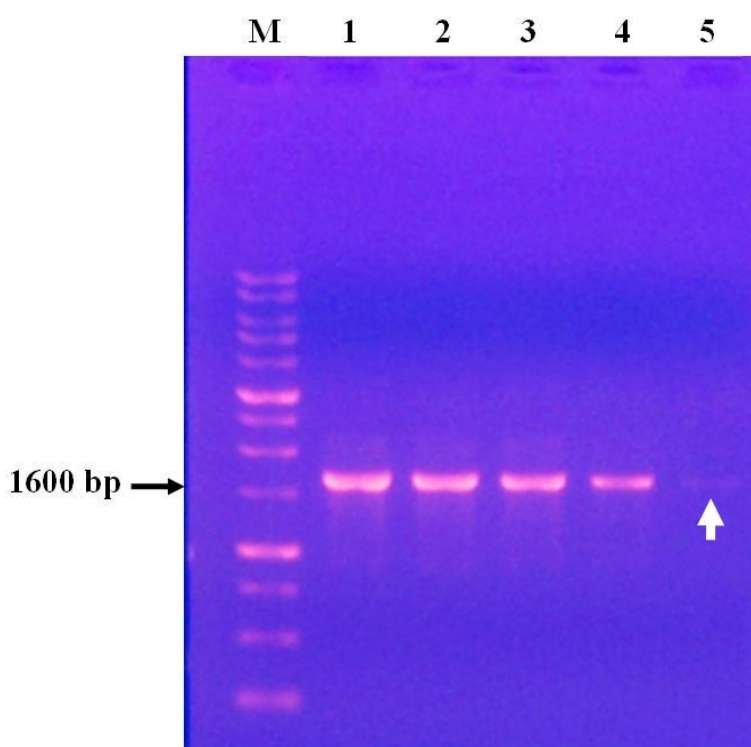


簡單來說，就是無論降低哪個去氧核糖核酸之鹼基都可能使反應聚合因缺乏某個去氧核糖核酸的鹼基，而使得整個聚合反應逐漸緩慢下來甚至是停止反應。故本實驗將不調整其混合比例，依舊選擇 1：1 的比例作為 AS-PCR 反應之條件。

表【4-2】改變 dNTP 混合比例之條件，且 [GC] 比例大於 [AT]

Lane	1	2	3	4	5
[GC]:[AT]*	1:1	3:2	7:3	4:1	9:1

\*:[GC]:[AT] 為 G+C 總量與 A+T 總量之混合比例



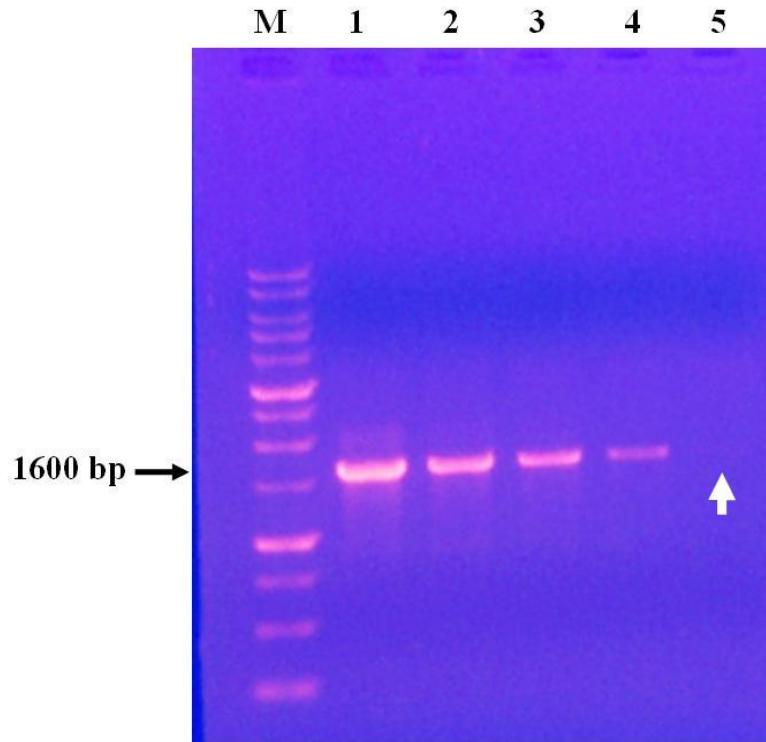
圖【4-4】[GC] 比例大於 [AT] 之 dNTP 混合比例的實驗結果。

Lane M 為 1 kb DNA marker；Lane 1-5 之混合比例為 1：1 至 9：1，詳細條件參考表【4-2】。(PCR 反應條件請參考 3-1-6， $T_a$  為  $62^\circ\text{C}$ )

表【4-3】改變 dNTP 混合比例之條件，且 [AT] 比例大於 [GC]

Lane	1	2	3	4	5
[GC]:[AT]*	1:1	2:3	3:7	1:4	1:9

\*:[GC]:[AT] 為 G+C 總量與 A+T 總量之混合比例



圖【4-5】[AT] 比例大於 [GC] 之 dNTP 混合比例的實驗結果。

Lane M 為 1 kb DNA marker；Lane 1-5 之混合比例為 1:1 至 1:9，詳細條件參考表【4-3】。(PCR 反應條件請參考 3-1-6， $T_a$  為  $62^\circ\text{C}$ )

#### 4-1-4 $Mg^{2+}$ 濃度對 AS-PCR 影響之探討

經由前面章節之探討結果，確認 DNA 模板之最終濃度為 5 ng/ $\mu$ l，dNTP 比例為 1：1，接著我們將進一步尋找  $Mg^{2+}$  濃度的最佳化。由文獻回顧之 1-5 節可知，當 *Taq* polymerase 具有高焦磷酸酶解活性與高專一性時，可大幅降低其錯配率。而其  $Mg^{2+}$  濃度對 *Taq* polymerase 的延伸活性有很大的影響，故調整  $Mg^{2+}$  濃度至最佳濃度能使得 *Taq* polymerase 於 PCR 中發揮最大的延伸活性。

另外， $Mg^{2+}$  離子會與反應溶液中帶負電的特異性引子及 dNTP 結合。一般而言， $Mg^{2+}$  離子濃度應比 dNTP 高出 1 至 5 倍(28)。然而，過多的  $Mg^{2+}$  離子容易造成非目標序列的錯誤產物產生，使得精確度下降；又  $Mg^{2+}$  離子濃度不足時，常使得 *Taq* polymerase 之延伸能力下降，導致目標序列產量少，不易分析(28)。由上述可知， $Mg^{2+}$  離子濃度對於引子的專一性及反應效率有很大的影響，故調整適當之  $Mg^{2+}$  濃度是不可或缺的。

本實驗將於 PCR 反應實驗中，改變  $Mg^{2+}$  濃度，尋找其最佳濃度。表【4-4】為  $Mg^{2+}$  置於 25  $\mu$ l 反應溶液裡之濃度，實驗結果如圖【4-6】所示。由實驗結果可知，當  $Mg^{2+}$  濃度增加至 1.5 mM (圖【4-6】之 Lane 3)，PCR 產物訊號開始出現，故推測  $Mg^{2+}$  濃度為 1.5 mM 時，*Taq* polymerase 的延伸活性開始作用。

進一步探討  $Mg^{2+}$  濃度為 2 mM 與 3 mM (圖【4-6】之 Lane 4、5)時，

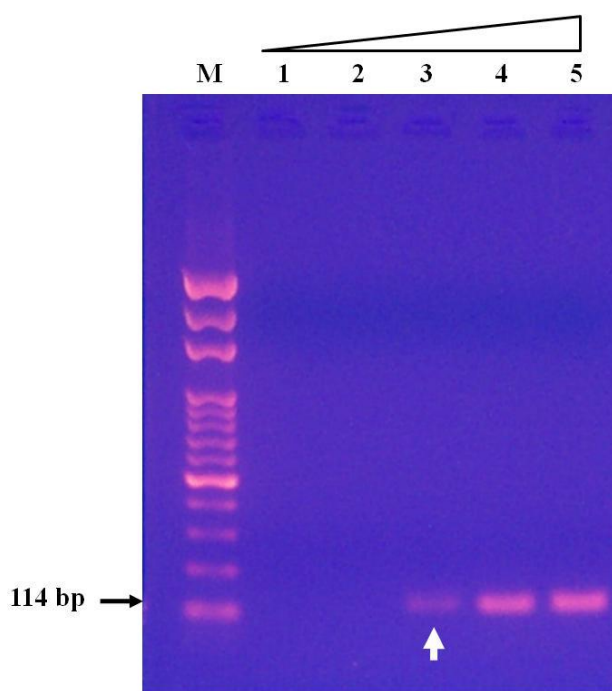
其訊號相對於 1.5 mM 來的強烈；然而，2 mM 與 3 mM 的訊號結果卻無明顯差別，故推測  $Mg^{2+}$  濃度提高至 2 mM 時 *Taq* polymerase 之延伸活性已達最高能力。

表【4-4】 $Mg^{2+}$  濃度之添加量

Lane	1	2	3	4	5
MgCl <sub>2</sub> 添加量 (單位：μl)	0.5	1.0	1.5	2.0	3.0
Mg <sup>2+</sup> 濃度 (單位：mM)*	0.5	1.0	1.5	2.0	3.0

\*： $Mg^{2+}$  濃度算法如公式 4-1

$$25 \text{ mM} \times \text{MgCl}_2 \text{ 添加量} \div 25 \text{ } \mu\text{l} = \text{Mg}^{2+} \text{ 濃度} \quad \text{式 4-1}$$



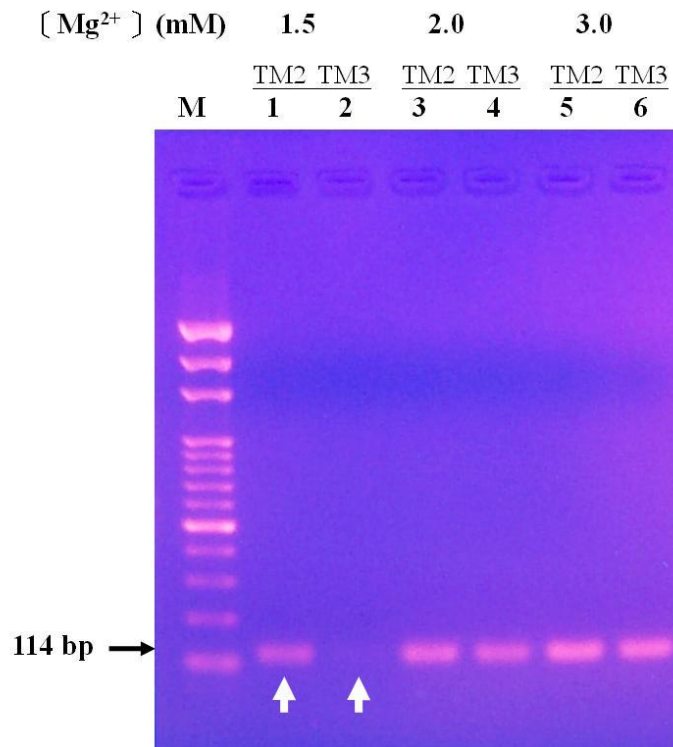
圖【4-6】改變  $Mg^{2+}$  濃度之實驗結果。

Lane M 為 100 bp DNA ladder LC；Lane1-5 為  $Mg^{2+}$  濃度條件由濃度低(0.5 mM)至濃度低(3 mM)，欲知詳細添加濃度請參考表【4-4】。(PCR 反應條件請參考 3-1-6， $T_a$  為 62°C)

由於圖【4-6】之特異性引子為使用與野生型模板互補之野生型對偶性引子(請參見表【2-1】之 THU-MYH-2)進行反應，故 Lane 4、Lane 5 如此強烈的產物訊號，難免令人憂慮如換成錯配之反置引子是否會因 *Taq* polymerase 的高延伸能力而產生假性訊號，故將加入與野生型模板錯配之特異性引子進一步測試。

圖【4-7】為加入突變型對偶性引子 - THU-MYH-3 之實驗結果，此特異性引子之 3'端與野生型模板形成 C:A 錯配，故將終止反應，進而與 THU-MYH-2 之產物訊號形成明顯對比。由實驗結果可知，當  $Mg^{2+}$  濃度為 1.5 mM 時，THU-MYH-3 雖然仍有些微產物訊號產生，但與對照組 - THU-MYH-2 之訊號相比，兩者之產物訊號如預期呈現明顯對比；反之， $Mg^{2+}$  濃度為 2 mM 與 3 mM 時，THU-MYH-3 與 THU-MYH-2 之訊號皆無法明顯區別。

由上述之討論可知，1.5 mM 之  $Mg^{2+}$  濃度能使 *Taq* polymerase 開始發揮其延伸活性，同時也使其特異性引子專一性提高，故將選擇 1.5 mM 作為  $Mg^{2+}$  濃度之最佳化。



**圖【4-7】** 測試與野生型模板錯配之特異性引子於不同 Mg<sup>2+</sup> 濃度下之實驗結果。Lane M 為 100 bp DNA ladder LC；TM2 為 THU-MYH-2；TM3 為 THU-MYH-3；Mg<sup>2+</sup> 濃度分別為 1.5 mM、2.0 mM、3.0 mM，欲知詳細添加濃度請參考表【4-4】。(PCR 反應條件請參考 3-1-6，Ta 為 65°C，特異性引子之序列請參照表【2-1】)

## 4-2 利用 AS-PCR 檢測 *hMYH* 基因之突變熱點 Y165C 之探討

藉由前面章節之探討，本實驗已逐一調整其反應條件，使 AS-PCR 能在最佳化的條件下進行反應。故本實驗選擇其反應條件為 DNA 模板濃度 250 ng/ $\mu$ l；dNTP 混和比例 1:1 且每 25  $\mu$ l 的反應溶液含有濃度為 0.4 mM； $Mg^{2+}$  濃度為 1.5 mM。

本章節我們將加入特異性引子於反應中進行 AS-PCR，藉由反應呈現的產物訊號進行一系列的探討。一開始我們先針對 *hMYH* 基因之突變熱點 Y165C 設計一突變型對偶性引子 - THU-MYH-3，其特異性引子與突變型模板完全互補，而與野生型模板形成 C:A 錯配(primer: template)；並同時設計一野生型對偶性引子 - THU-MYH-2 與其對照，其特異性引子之序列於表【2-1】所示。

接著我們加入所設計之對偶性引子與野生型模板，以缺乏 3'→5' 外切酶修復功能之 *Taq* polymerase 進行 AS-PCR，預期突變型對偶性引子 - THU-MYH-3 與野生型模板因錯誤配對而終止反應，而呈現 OFF 訊號；反之，當野生型對偶性引子與野生型模板完全互補而產生產物，將會呈現 ON 訊號，表【4-5】為此實驗之預期結果統整表。

表【4-5】AS-PCR 檢測 *hMYH* 基因之突變熱點 Y165C 之預期結果

對偶性引子	primer : template	AS-PCR 反應之預期結果訊號
野生型 : THU-MYH-2	T : A	ON
突變型 : THU-MYH-3	<u>C</u> : A	OFF

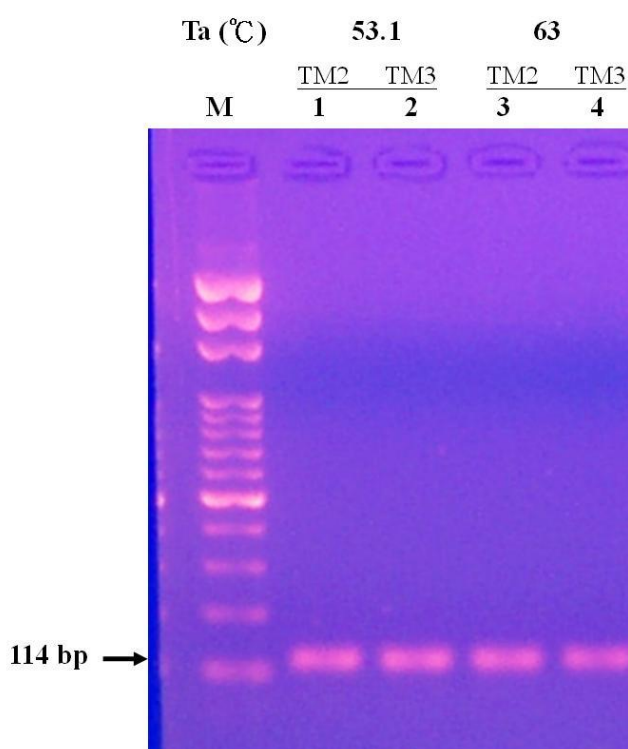
圖【4-8】為 AS-PCR 之電泳分析結果，由實驗結果可看出，在黏合溫度(Annealing temperature, Ta)為 53.1°C 時，THU-MYH-3 在反應中未如預期呈現 OFF 訊號，而是呈現 ON 訊號(Lane 2)，故將此產物定序，希望藉由定序結果進一步確認產物訊號是否為假陽性訊號。圖【4-9】為 THU-MYH-3 之產物定序結果，由其定序結果顯示，THU-MYH-3 與野生型模板之錯配位點未被修復，得知圖【4-8】之 Lane 2 訊號為假陽性訊號，故可證實反應所用之 *Taq* polymerase 確實無 3'→5' 外切酶修復功能。

排除掉 *Taq* polymerase 可能具有修復功能造成產物產生之可能性，進一步推測產物訊號可能因黏合溫度過低，加上 *Taq* polymerase 本身聚合能力很強，導致行使延伸聚合時跨越了錯配的氣泡阻礙，而產生假陽性訊號。由於 THU-MYH-3 之假陽性訊號無法與對照組 THU-MYH-2 的 ON 訊號呈現明顯區別，因此我們將進一步提高 Ta 值，企圖提升其靈敏度。

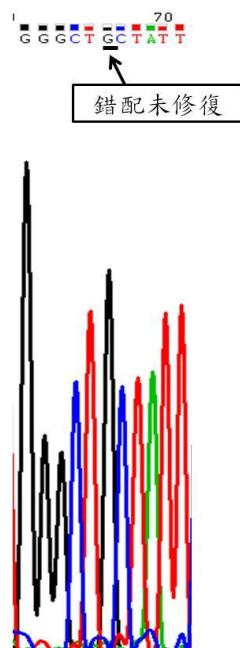
由圖【4-8】可看出，將 Ta 值提高至 63°C 仍然無法使 THU-MYH-3 在反應中呈現 OFF 訊號。由於黏合溫度過低，易導致引子與非目標之模



板區域錯誤結合；然而，過高之黏合溫度又將造成黏合反應無法順利進行，而使得引子與模板呈現持續分離的狀態，因此設定一理想的 Ta 值十分重要。一個理想的黏合溫度主要是依據其解鏈溫度(Melting temperature, Tm)而設定，解鏈溫度為 DNA 雙股螺旋開始鬆開至完全解鏈之轉換範圍內的過渡溫度(28)。通常設定黏合溫度於解鏈溫度的 $\pm 5^{\circ}\text{C}$ 內，使其不僅能順利黏合，又不會產生錯誤配對，故將進一步往上提高 Ta 值測試。



**圖【4-8】** 根據突變熱點 Y165C 所設計之對偶性引子與野生型模板之反應結果。Lane M 為 100 bp DNA ladder LC；Lane 1、3、5 之反置引子為 THU-MYH-2 (TM2)；Lane 2、4、6 之反置引子為 THU-MYH-3 (TM3)；反應條件請參見表【3-5】與表【3-7】，Ta 分別為 53.1、 $63^{\circ}\text{C}$ 。



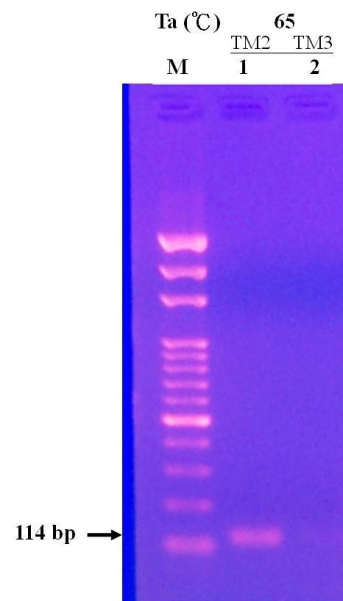
圖【4-9】THU-MYH-3 進行 AS-PCR 之反應產物定序圖。

圖【4-10】為 Ta 值提高至 65°C 進行 AS-PCR 之實驗結果，可看出 THU-MYH-3 之產物訊號相較對照組而言訊號微弱許多，與其對照組之產物訊號呈現明顯對比。由於突變型對偶性引子 - THU-MYH-3 之 Tm 值為 64°C，故其 Ta 值可提高至 69°C，企圖使其反應完全終止。

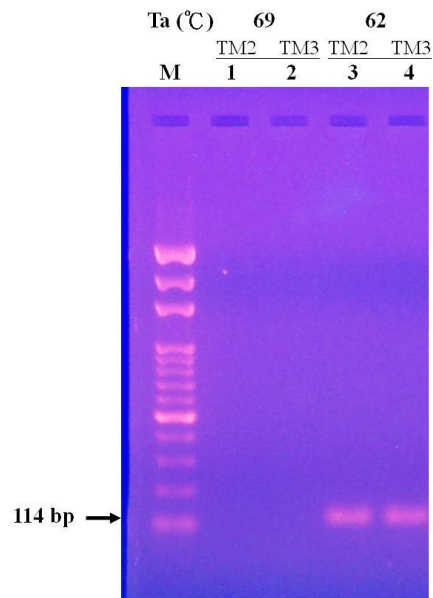
圖【4-11】為 AS-PCR 之 Ta 值提高至 69°C 的實驗電泳圖，本實驗同時以 62°C 進行反應，並將其產物訊號視為對照組。由電泳訊號顯示，當對偶性引子與野生型模板反應於 69°C 之黏合溫度時，皆無產物訊號。然而，由對照組的產物訊號可確定實驗本身之聚合反應是沒有問題的。

由於過高之黏合溫度會使得引子與模板之間無法順利黏合，導致反應無法繼續聚合而終止。由圖【4-11】之實驗結果可知，69°C 之 Ta 值對於 AS-PCR 反應而言過高，因而導致對偶性引子無法與野生型模板黏合

而未繼續聚合，故皆呈現 OFF 訊號，使得訊號之鑑別性不佳。



圖【4-10】根據突變熱點 Y165C 所設計之對偶性引子與野生型模板之反應結果。Lane M 為 100 bp DNA ladder LC；TM2：THU-MYH-2；TM3：THU-MYH-3；反應條件請參見表【3-5】與表【3-7】，Ta 為 65°C。



圖【4-11】對偶性引子與野生型模板反應於 69°C 之黏合溫度的反應結果。Lane M 為 100 bp DNA ladder LC；TM2：THU-MYH-2；TM3：THU-MYH-3；反應條件請參見表【3-5】與表【3-7】，Ta 分別為 62、69°C。

圖【4-8】、【4-10】以及【4-11】可統整出， $T_a$  值過低時，無法有效地終止反應，因而無法與對照組 - THU-MYH-2 呈現 ON/OFF 之對比訊號；然而， $T_a$  值提高至  $69^\circ\text{C}$ ，卻因引子無法黏合而終止，皆呈現 OFF 訊號，仍然無法如預期呈現 ON/OFF 訊號。唯獨  $T_a$  值為  $65^\circ\text{C}$  時，THU-MYH-3 才與對照組有較明顯之對比訊號，然而，THU-MYH-3 依舊未如預期完全終止反應，故將進一步尋找其他方法增加其靈敏度。

### 4-3 改善 AS-PCR 之靈敏度

有文獻表示，在靠近引子之 3'端位置增加額外之鹼基錯配，可增加 AS-PCR 之可信度，故本章節將利用此論點進一步設計其特異性引子，另外也將針對 DNA polymerase 進一步探討。

#### 4-3-1 藉由對偶性引子之設計提升 AS-PCR 靈敏度之探討

一開始我們先將對偶性引子之 3'端數來第二位置之鳥糞嘌呤鹼基更改為胞嘧啶鹼基，使其與野生型模板形成 C:C 之錯配模式，並各別命名為 THU-MYH-2M 與 THU-MYH-3M，同時以 THU-MYH-2 為對照組進行 AS-PCR 之實驗分析。THU-MYH-2M 為野生型對偶性引子之 3'端數來第二位置與野生型模板錯配；THU-MYH-3M 則為突變型對偶性引子本身與野生型模板的 C:A 錯配之外，其引子之 3'端數來第二位置亦與野生型模板形成 C:C 錯配，其引子序列請參考表【2-1】。

#### THU-MYH-2M 對 AS-PCR 之影響

在此部分我們將以 THU-MYH-2M 與野生型模板進行 AS-PCR，並以 THU-MYH-2 為對照組。因野生型模板與 THU-MYH-2M 有一錯配，加上使用之 *Taq* polymerase 不具有 3'→5'外切酶修復功能，故預期其結果為 OFF 訊號，而與對照組的 ON 訊號呈現明顯的區別，表【4-6】為預期結果之相關整理，其 PCR 反應資訊請參見表【3-5】與表【3-7】。

表【4-6】THU-MYH-2M 應用於 AS-PCR 之預期結果

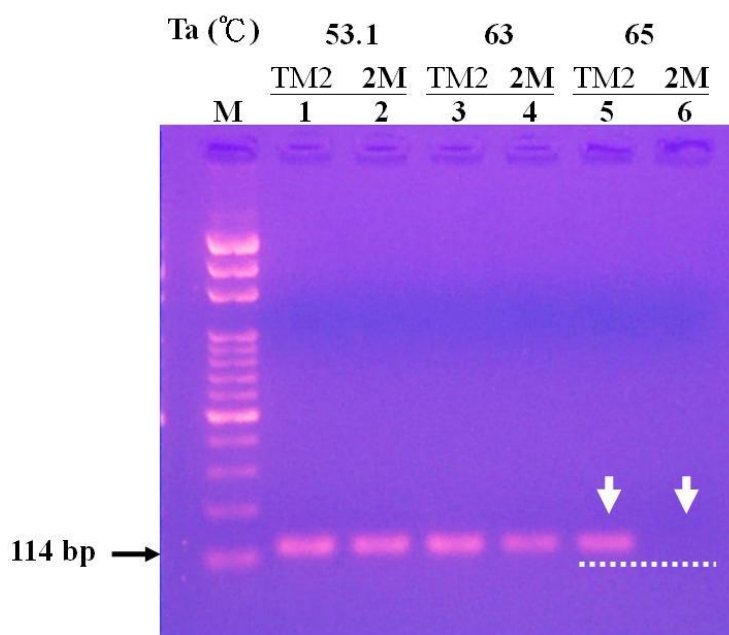
對偶性引子	primer   template (5'→3')	錯配位點之數量	預期結果訊號
對照組	G T 	0	ON
THU-MYH-2	C A		
實驗組	<u>C</u> T 	1	OFF
THU-MYH-2M	C A		

圖【4-12】為 AS-PCR 之實驗結果，由其結果可看出，當 Ta 值提高至 65°C，THU-MYH-2M 能成功終止反應(Lane 6)，而與對照組(Lane 5)呈現明顯的 OFF/ON 訊號。進一步與 4-2 節比較可發現，在 Ta 值皆為 65°C 之條件下，皆能與對照組 - THU-MYH-2 呈現明顯之 ON/OFF 訊號；然而，不同於 THU-MYH-3 依舊出現些微產物訊號，THU-MYH-2M 則為完全終止反應。

有文獻表示，DNA 之雙螺旋結構是兩條多聚核苷酸鏈螺旋交纏而成，而兩條核苷酸鏈之間的距離必須為 11Å，也就是說兩條鏈之間的鹼基配對需為嘌呤 - 嘧啶才可符合其螺旋結構(12)。由表【2-1】之序列可知，THU-MYH-2M 與野生型模板之錯配模式為胞嘧啶：胞嘧啶(C：C)，導致其螺旋結構太窄而不穩定；反之，THU-MYH-3 與野生型模板之錯配模式為胞嘧啶：腺嘌呤(C：A)，雖然其配對間無法形成正確的氫鍵，但其螺

旋結構是符合其螺旋距離。因此，當我們提高 Ta 值至 65°C 時，螺旋結構較不穩定的 THU-MYH-2M 即可完全終止反應；反之，螺旋結構較穩定的 THU-MYH-3 則跨過錯配繼續聚合而產生些許錯誤之產物訊號，呈現微弱的假陽性訊號，故使用 THU-MYH-2M 進行 AS-PCR 之靈敏度比 THU-MYH-3 好。

由此探討可知，藉由降低其螺旋結構之穩定性可提升 AS-PCR 之靈敏度，簡略來說，就是對偶性引子之設計可盡量設計其配對方式為嘌呤：嘧啶配對，或是嘧啶：嘧啶配對。另外，於 4-4-1 節以實驗結果進一步證明此理論。



圖【4-12】THU-MYH-2M 與野生型模板之 AS-PCR 反應結果。

Lane M 為 100 bp DNA ladder LC；Lane 1、3、5 之反置引子為 THU-MYH-2 (TM2)；Lane 2、4、6 之反置引子為 THU-MYH-2M (2M)；反應條件請參見表【3-5】與表【3-7】，Ta 分別為 53.1、63、65°C。

## THU-MYH-3M 對 AS-PCR 之影響

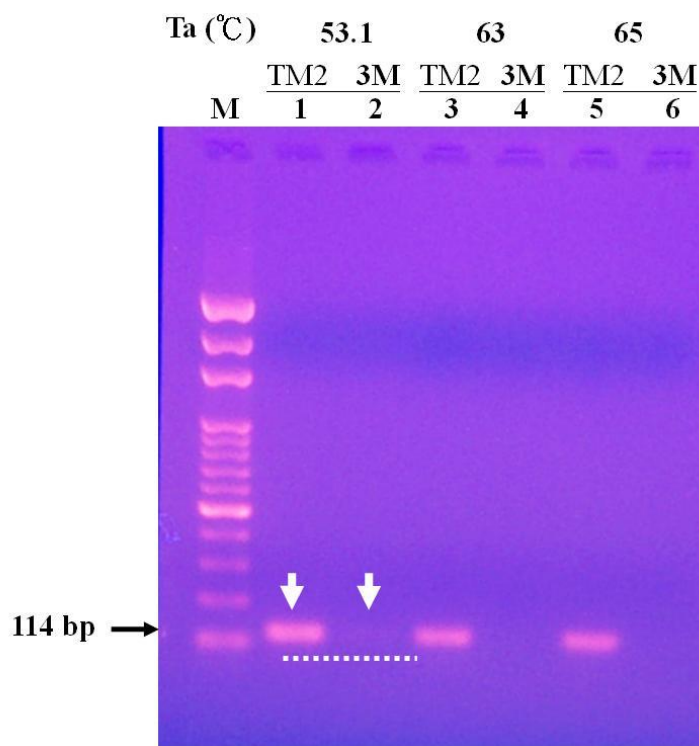
此部分我們將以 THU-MYH-3M 與野生型模板進行 AS-PCR，同樣以 THU-MYH-2 為對照組。因野生型模板與 THU-MYH-3M 有兩個錯配，加上使用之 *Taq* polymerase 不具有 3'→5' 外切酶修復功能，故預期其結果為 OFF 訊號，而與對照組的 ON 訊號呈現明顯的區別，表【4-7】為預期結果之相關整理，其 PCR 反應資訊請參見表【3-5】與表【3-7】。

表【4-7】THU-MYH-3M 應用於 AS-PCR 之預期結果

對偶性引子	primer   template (5'→3')	錯配位點之數量	預期結果訊號
對照組	G T 	0	ON
THU-MYH-2	C A		
實驗組	<u>C C</u> 	2	OFF
THU-MYH-3M	C A		

圖【4-13】為 AS-PCR 之實驗結果，由其結果可看出， $T_a$  值在 53.1 °C 時，THU-MYH-3M (Lane 2) 雖仍有些微產物訊號，但與對照組 (Lane 1) 相比，其產物訊號差異非常大，已可用來判斷 ON/OFF 訊號；進一步提高  $T_a$  值，THU-MYH-3M 即能成功終止反應 (Lane 6)，呈現我們所期望之 OFF 訊號，故使用 THU-MYH-3M 進行 AS-PCR 之靈敏度最好。





圖【4-13】 THU-MYH-3M 與野生型模板之 AS-PCR 反應結果。

Lane M 為 100 bp DNA ladder LC; Lane 1、3、5 之反置引子為 THU-MYH-2 (TM2); Lane 2、4、6 之反置引子為 THU-MYH-3M (3M); 反應條件請參見表【3-5】與表【3-7】，Ta 分別為 53.1、63、65°C。

由此結果探討可知，在突變型對偶性引子之 3'端第二位置額外增加一鹼基錯配，亦即在引子之 3'端形成一個較大的氣泡(bubble)，對於 AS-PCR 之靈敏度而言有很大的提升，故應用此設計的特異性引子於 SNPs 之分析上，其可信度相對於直接使用突變型對偶性引子來得高許多。

### 4-3-2 不同 DNA 聚合酶對於 AS-PCR 靈敏度之影響

由文獻回顧 1-5 節之敘述，知道選擇一具有修復功能之 DNA 聚合酶，能有效地針對錯誤之核苷酸進一步移除並修復。有研究指出，具備 3'→5' 外切酶修復功能之 *Pfu* polymerase 錯配率相較於 *Taq* polymerase 來得低許多(34)。故本實驗選擇了 *Pfu* polymerase 取代 *Taq* polymerase 進行反應並進一步探討其差異。

表【4-8】為利用不同 DNA polymerase 進行 AS-PCR 之實驗條件表格；另外，本實驗以 *Taq* polymerase 反應之產物訊號為實驗對照組(Lane 1-4)。

表【4-8】改變 DNA polymerase 進行 AS-PCR 之反應條件表

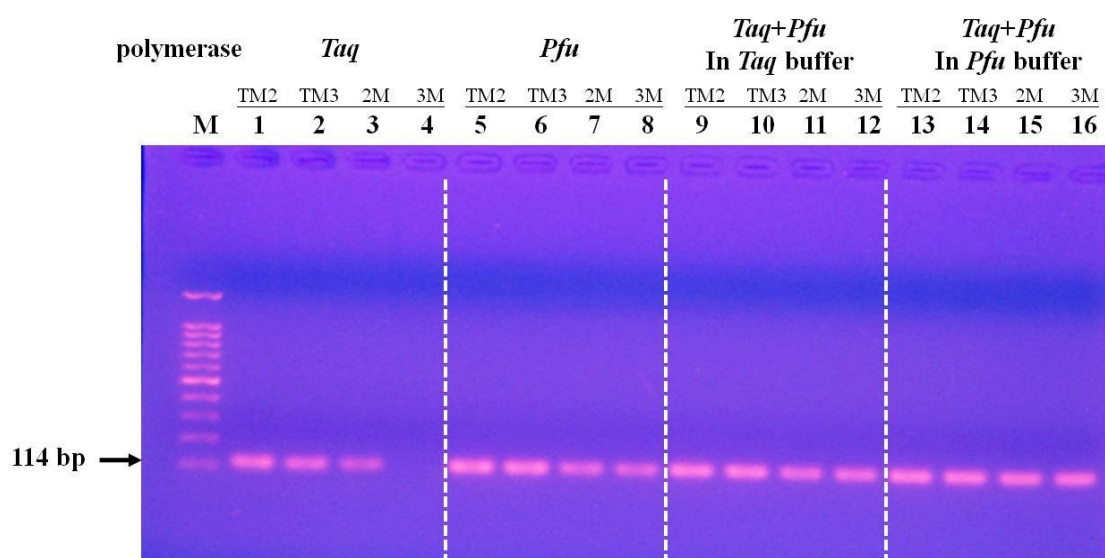
Lane	特異性引子	DNA polymerase	Reaction buffer	預期結果
1	THU-MYH-2	<i>Taq</i> polymerase	1X <i>Taq</i> buffer	ON
2	THU-MYH-3			OFF
3	THU-MYH-2M			OFF
4	THU-MYH-3M			OFF
5	THU-MYH-2	<i>Pfu</i> polymerase	1X <i>Pfu</i> buffer	ON
6	THU-MYH-3			ON
7	THU-MYH-2M			ON
8	THU-MYH-3M			ON
9	THU-MYH-2	<i>Taq</i> : <i>Pfu</i> = 1 : 1	1X <i>Taq</i> buffer	ON
10	THU-MYH-3			ON
11	THU-MYH-2M			ON
12	THU-MYH-3M			ON
13	THU-MYH-2	<i>Taq</i> : <i>Pfu</i> = 1 : 1	1X <i>Pfu</i> buffer	ON
14	THU-MYH-3			ON
15	THU-MYH-2M			ON
16	THU-MYH-3M			ON

圖【4-14】為 AS-PCR 反應於 57.4°C 之實驗結果，其實驗條件請參見表【4-8】，實驗方法請參考 3-1-6 節。由圖【4-14】可看出，無論是單純使用 *Pfu* polymerase，或是 *Taq*、*Pfu* 混合使用皆呈現 ON 訊號(Lane 5-16)，欲確定其產物是否為正確配對，故將其產物進一步送定序。定序結果為表【4-9】所示，表中(a)為 THU-MYH-2 使用 *Taq* 進行反應之產物定序結果，圖上之箭頭所表示之位點為突變點 Y165C 之鹼基與 4-3-1 節之針對 3' 端數來第二位點所設計之錯配鹼基，其詳細資訊請參見 4-2 節與 4-3-1 節之敘述。

由定序結果可知，使用 *Pfu* polymerase 進行反應之產物顯示，皆被修復成正確的鹼基，其定序結果見表【4-9】之(d)、(e)和(f)。然而，從圖【4-14】之電泳分析結果發現，使用 *Taq* polymerase 進行反應的對偶性引子 - THU-MYH-3 (Lane 2)與 THU-MYH-2M (Lane 3)皆與使用 *Pfu* polymerase 反應的 THU-MYH-3 (Lane 6)與 THU-MYH-2M (Lane 7)一樣呈現 ON 訊號。但進一步定序比對，發現使用 *Taq* polymerase 反應的 THU-MYH-3 與 THU-MYH-2M 之定序結果(表【4-9】之 b、c)是個錯誤配對的假陽性訊號；反之，使用 *Pfu* polymerase 反應的 THU-MYH-3 與 THU-MYH-2M 之定序結果(表【4-9】之 d、e)則實驗之預期結果。

簡單來說，Lane 2-4 其預期結果為 OFF；而 Lane 6-8 之預期結果為 ON，兩個不同之預期結果卻呈現相同之產物訊號，故若未進一步定序兩

者之產物，是無法直接從電泳圖進行判斷的。此實驗利用 *Pfu* polymerase 將突變型對偶性引子與野生型模板之間的錯配移除並修復，進而獲得 PCR 之產物；然而，與野生型模板正確配對之特異性引子亦獲得相同之 PCR 產物，這與最初建立的 AS-PCR 分析方法原理是不符合的。



圖【4-14】應用不同 Polymerase 於 AS-PCR 之實驗結果。

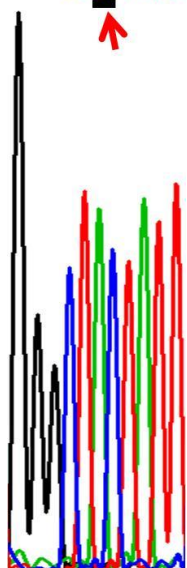
Lane M 為 100 bp-1.5 kb DNA ladder；前置引子為 THU-MYH-1，反置引子之訊息請參見表【4-8】，反應之引子序列請參見表【2-1】。Ta 值為 57.4°C。

表【4-9】應用不同 Polymerase 於 AS-PCR 之產物定序結果

使用 *Taq* 反應

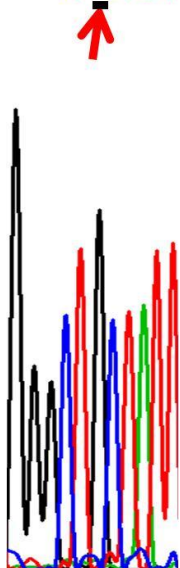
(a)THU-MYH-2

60  
G G G C T A C T A T T



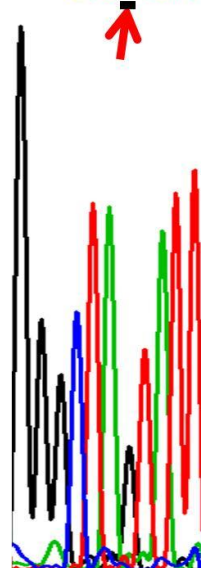
(b)THU-MYH-3

60 70  
G G G C T A C T A T T



(c)THU-MYH-2M

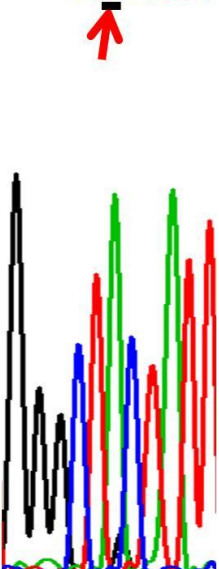
60  
G G G C T A C T A T T



使用 *Pfu* 反應

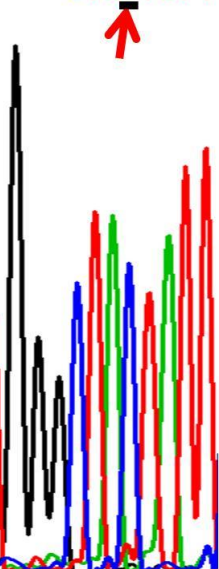
(d)THU-MYH-3

60  
G G G C T A C T A T T



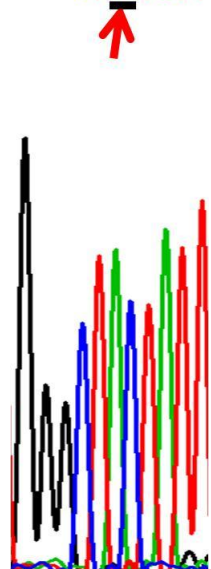
(e)THU-MYH-2M

60  
G G G C T A C T A T T



(f)THU-MYH-3M

60  
G G G C T A C T A T T



#### 4-4 其他分析方法之建立

由 4-3 節之探討，可知欲提升 AS-PCR 之靈敏度除了需具備最佳之反應條件與試劑外，對偶性引子的設計也十分重要，如 4-3-1 節之 3'端第二位置替換成一鹼基與野生型模板錯配之引子設計，其實驗結果即可直接由電泳分析圖之 ON/OFF 訊號進行分析，進而判斷出呈現 OFF 訊號者，即為與野生型模板錯配之特異性引子；反之，呈現 ON 訊號者，則為與野生型模板互補配對之野生型對偶性引子。另外，在 4-3-2 節得知 *Pfu* polymerase 是一種具有 3'→5' 外切酶修復功能的聚合酶，故將利用此特性建立新的分析方法 - ON/OFF switch assay 與 OFF/ON switch assay 使其呈現更明確之 ON/OFF 或 OFF/ON 訊號，希望能藉由新的分析方法進而提升 SNPs 檢測之可信度。

##### 4-4-1 ON/OFF switch assay 之建立

ON/OFF switch assay 之分析方法原理如 1-6 節之敘述，概略來說，就是在對偶性引子的目標位點上進行抗核酸外切酶的修飾並與 *Pfu* polymerase 搭配使用之分析技術。

當利用修飾過的突變型對偶性引子與野生型模板進行 PCR 反應時，將因 3'端之錯配促使 *Pfu* polymerase 啟動修復功能，但因修飾過的特異性引子能有效的抵抗 *Pfu* 的修復功能，故造成反應終止，使 AS-PCR 呈現 OFF 的訊號。相對的，當野生型對偶性引子與野生型模板互補配對時，

反應將不需要 *Pfu* polymerase 的修復，故不受修飾的影響，繼續聚合反應使其呈現 ON 訊號，此實驗結果即可使我們直接藉由實驗電泳圖之 ON/OFF 訊號進行判斷。本實驗所使用之抗核酸外切酶修飾主要分成兩種 - 硫代磷酸化修飾與鎖核酸修飾兩種，其修飾位點請參見表【4-10】與表【4-12】，詳細序列請參考表【2-2】。

另外，使用 *Pfu* polymerase 進行反應之前，需先調整其反應條件與試劑至最佳化。由文獻得知，當反應溶液之 pH 值在 8.5 - 9.0 之間(pH at 25 °C)，可將 PCR 之錯配率降至最低，而本實驗所使用之緩衝液(Reaction buffer) pH 值為 8.0 (at 25°C)，與文獻所建議的範圍十分接近，故不再另外調整緩衝液之 pH 值。再者，有研究表示，*Pfu* polymerase 於 2 mM 的  $Mg^{2+}$  濃度下進行 PCR，可使 PCR 之錯配率降低，而本實驗所用之緩衝液即含有 2 mM 的  $Mg^{2+}$  濃度，緩衝液之詳細成份請參見表【3-9】。確認 *Pfu* polymerase 之 PCR 條件皆為最佳條件即可往下進行實驗。

### 硫代磷酸化修飾之探討

一開始先對特異性引子進行硫代磷酸化修飾，並分別命名為 THU-MYH-2PS、THU-MYH-3PS、THU-MYH-2MPS、THU-MYH-3MPS 以及 THU-MYH-3GPS。其中，THU-MYH-2PS 與 THU-MYH-3PS 分別為 3'端位置修飾硫代磷酸化的野生型對偶性引子與突變型對偶性引子；THU-MYH-2MPS 為野生型對偶性引子 3'端數來第二位置之鳥糞嘌呤鹼

基更改為胞嘧啶鹼基，與野生型模板形成 C:C 錯配，並將錯配位點之磷酸二酯鍵修飾成硫代磷酸化；THU-MYH-3MPS 為突變型對偶性引子本身與野生型模板的 C:A 錯配之外，其引子之 3'端數來第二位置亦與野生型模板形成 C:C 錯配，並將兩錯配位點之磷酸二酯鍵修飾成硫代磷酸化；THU-MYH-3GPS 則為突變型對偶性引子 3'端的胞嘧啶鹼基替換成鳥糞嘌呤鹼基，並於同樣位點修飾硫代磷酸化。各引子之修飾位點請參見表【4-10】，詳細序列請參考表【2-2】，另外硫代磷酸修飾之化學結構請參見圖【3-4】。

接著依序加入所修飾之特異性引子與野生型模板於反應中，並以 *Pfu* polymerase 進行 PCR 反應。同使用野生型模板之預期實驗結果為突變型對偶性引子的 PCR 應呈現 OFF 訊號；反之，對照組的野生型對偶性引子的 PCR 反應則為 ON 訊號。

圖【4-15】為 PCR 之電泳分析結果，由圖可看出，使用 *Pfu* polymerase 進行反應，黏合溫度為 58°C 時，THU-MYH-3MPS 即可如預期終止 PCR 反應，呈現 OFF 訊號，並與對照組 - THU-MYH-2PS 呈現 ON/OFF 的明顯對比。由表【4-10】可知，THU-MYH-3MPS 之 3'端與野生型模板連續形成兩個錯配，故造成引子的 3'端形成一個較大的氣泡阻礙 PCR 之延伸反應，進而終止反應，呈現 OFF 訊號。此結果與 4-3-1 節之 THU-MYH-3M 應用於 AS-PCR 之結果相似，故於特異性引子之 3'端設計連續之雙錯配，



增加 PCR 之延伸阻力，對於 AS-PCR 或是 ON/OFF switch assay 之特異性皆有幫助，進而促使 SNPs 分析的可信度大幅提高。

然而，由圖【4-15】之結果顯示，THU-MYH-3PS 與 THU-MYH-2MPS 皆未如預期呈現 OFF 訊號，而無法與對照組呈現明顯之 ON/OFF 訊號，故將兩者之 PCR 產物送定序。表【4-11】為 THU-MYH-2PS、THU-MYH-3PS 及 THU-MYH-2MPS 之定序結果。將 THU-MYH-3PS 與 THU-MYH-2MPS 之定序圖譜與對照組之圖譜相比可發現，兩者之錯配位點皆未被修復，故可確認硫代磷酸化修飾能抵抗核酸外切酶之修復功能。

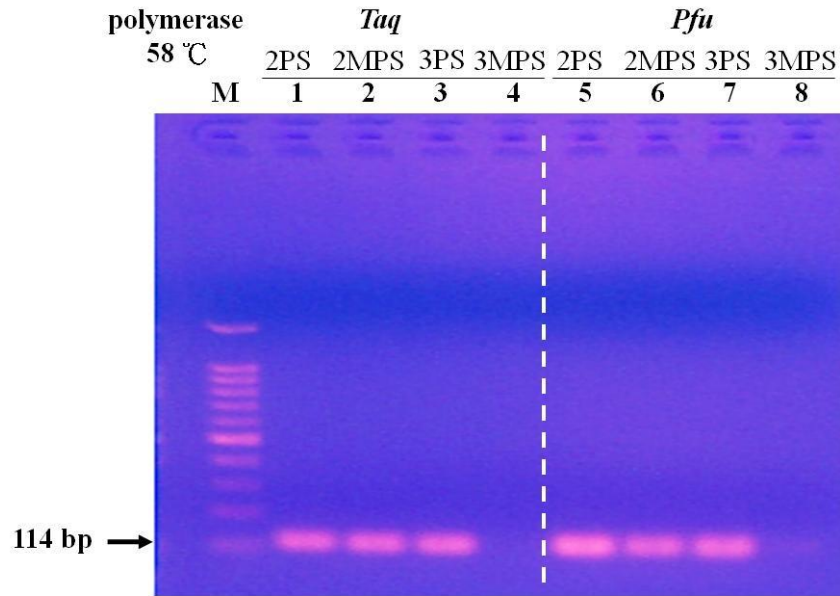
由 4-2 與 4-3-1 節之探討可知，較低的黏合溫度易使得 PCR 之特異性較差，容易增加錯配之可能性。又因 THU-MYH-2MPS 與 THU-MYH-3PS 之理論  $T_m$  值分別為  $62^{\circ}\text{C}$  及  $64^{\circ}\text{C}$ ，故企圖尋找最佳之黏合溫度使 THU-MYH-2MPS 與 THU-MYH-3PS 如預期終止反應，呈現 OFF 訊號。

表【4-10】修飾硫代磷酸之引子應用於 ON/OFF switch assay 之資料統整

Primer name	修飾位點	primer   template (5'→3')	預期結果
對照組	5'...AATAG*T-3'	G*T     C A	ON
THU-MYH-2PS	5'...AATAG*T-3'	G*T     C A	ON
THU-MYH-3PS	5'...AATAG* <u>C</u> -3'	G* <u>C</u>     C A	OFF
THU-MYH-2MPS	5'...AATA* <u>CT</u> -3'	* <u>C</u> T     C A	OFF
THU-MYH-3MPS	5'...AATA* <u>C</u> * <u>C</u> -3'	* <u>C</u> * <u>C</u>     C A	OFF
THU-MYH-3GPS	5'...AATAG* <u>G</u> -3'	G* <u>G</u>     C A	OFF

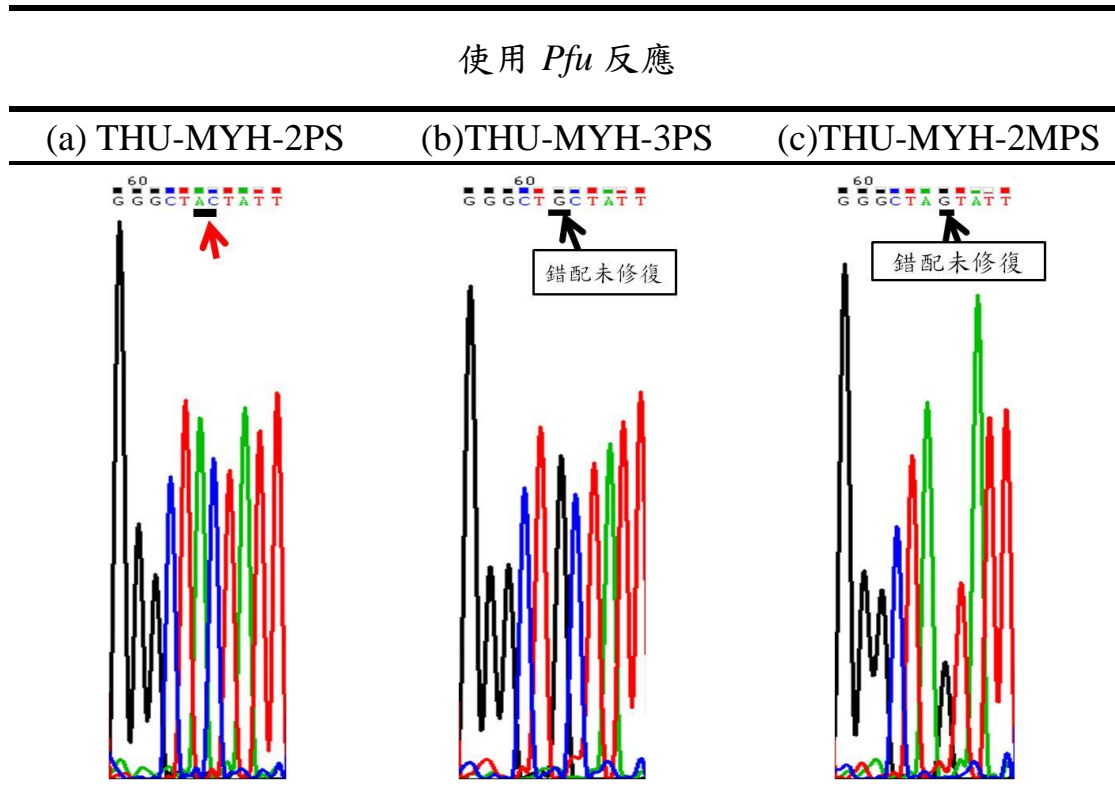
\*：表示 exonuclease resistant modified 位置

底線為錯配位點，亦即鹼基與野生型模板錯誤配對

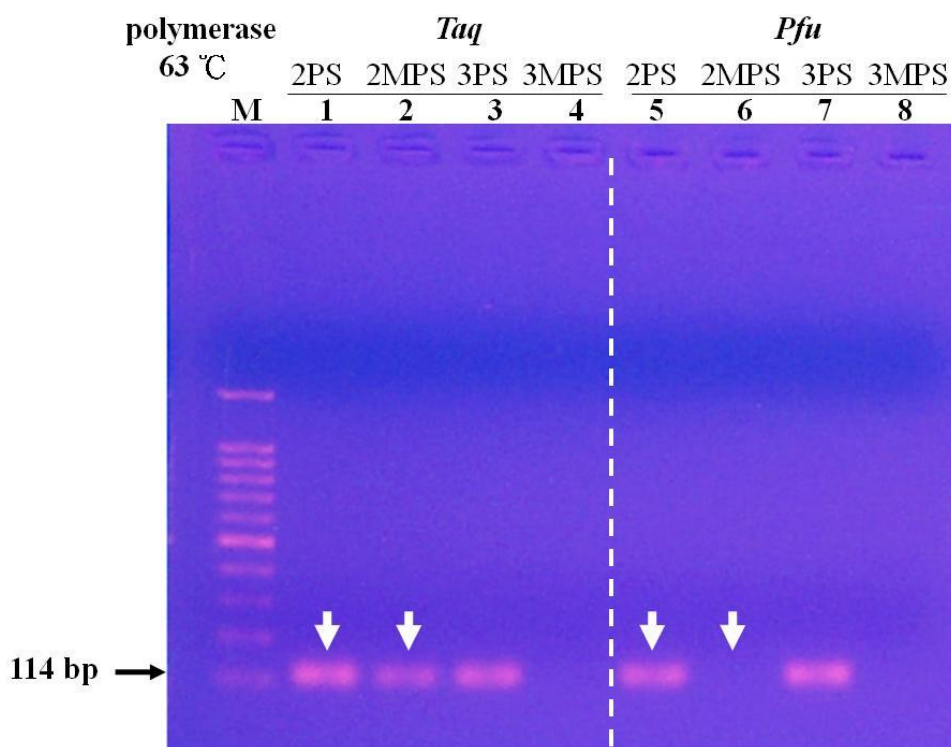


圖【4-15】硫代磷酸化修飾之特異性引子的 ON/OFF switch assay 之電泳圖。Lane M 為 100 bp DNA ladder LC；2PS 為 THU-MYH-2PS；3PS 為 THU-MYH-3PS；2MPS 為 THU-MYH-2MPS；3MPS 為 THU-MYH-3MPS；其反應條件請參見表【3-6】與表【3-7】， $T_a$  為 58°C。

表【4-11】ON/OFF switch assay 之產物定序結果



圖【4-16】為 PCR 之黏合溫度提高至 63°C 之電泳分析結果。由圖可看出，使用 *Pfu* polymerase 進行反應，且黏合溫度為 63°C 時，THU-MYH-2MPS 如預期終止 PCR 反應，呈現 OFF 訊號，並與對照組 - THU-MYH-2PS 呈現 ON/OFF 的明顯對比。然而，理論 Tm 值為 64°C 之 THU-MYH-3PS 依舊未如預期呈現 OFF 訊號，因而無法與對照組呈現明顯之 ON/OFF 訊號，故繼續往上提高 Ta 值測試。

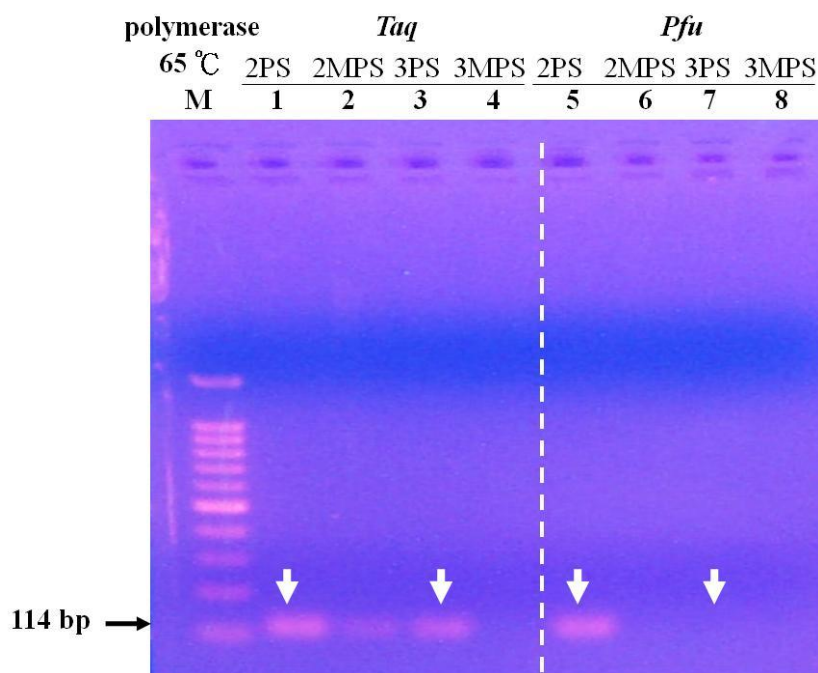


圖【4-16】硫代磷酸化修飾之特异性引子的 ON/OFF switch assay 之電泳圖。

Lane M 為 100 bp DNA ladder LC；2PS 為 THU-MYH-2PS；3PS 為 THU-MYH-3PS；2MPS 為 THU-MYH-2MPS；3MPS 為 THU-MYH-3MPS；其反應條件請參見表【3-6】與表【3-7】，Ta 為 63°C。

圖【4-17】為 PCR 之黏合溫度提高至 65°C 之實驗結果。由圖之結果可知，使用 *Pfu* polymerase 進行反應，且黏合溫度提高至 65°C，THU-MYH-3PS 如預期終止 PCR 反應，呈現 OFF 訊號，並與對照組 - THU-MYH-2PS 呈現 ON/OFF 的明顯對比。由圖【4-16】與【4-17】之實驗結果可知，僅與野生型模板形成單一錯配之特異性引子 - THU-MYH-2MPS 與 THU-MYH-3PS，如欲與 *Pfu* polymerase 一同進行 PCR，並成功終止反應，得到預期之 OFF 訊號，進而與對照組呈現 ON/OFF 訊號之對比，則 PCR 的最佳黏合溫度即為成功的關鍵。

由上述之實驗結果可發現，THU-MYH-2MPS 與 THU-MYH-3PS 皆與野生型模板形成單一錯配(詳細資訊請參照表【4-10】)，但兩者之最佳黏合溫度卻不相同。故將針對兩者不同之最佳黏合溫度，進一步設計實驗並探討。



圖【4-17】硫代磷酸化修飾之特異性引子的 ON/OFF switch assay 之電泳圖。Lane M 為 100 bp DNA ladder LC；2PS 為 THU-MYH-2PS；3PS 為 THU-MYH-3PS；2MPS 為 THU-MYH-2MPS；3MPS 為 THU-MYH-3MPS；其反應條件請參見表【3-6】與表【3-7】， $T_a$  為 65°C。

由前面敘述可知，同樣與野生型模板形成單一錯配之特異性引子 - THU-MYH-2MPS 與 THU-MYH-3PS，兩者之最佳黏合溫度不相同。故此實驗將設計一特異性引子 - THU-MYH-3GPS，與兩者一同比較，企圖尋找出影響黏合溫度之原因。THU-MYH-3GPS 為 THU-MYH-3PS 之 3' 端的胞嘧啶鹼基替換成鳥糞嘌呤鹼基之特異性引子，此引子與野生型模板形成 G:A 之錯配。表【4-12】為 THU-MYH-3GPS、THU-MYH-2MPS 以及 THU-MYH-3PS 之錯配位點訊息之統整，而修飾位點以及預期結果請參見表【4-10】，詳細序列請參考表【2-2】，另外硫代磷酸修飾之化學結構請參見圖【3-4】。

表【4-12】 THU-MYH-3GPS、THU-MYH-2MPS 以及 THU-MYH-3PS 之資料統整

Primer name	錯配模式	錯配位置	理論 Tm 值	最佳 Ta 值
THU-MYH-3PS	嘧啶：嘌呤 C：A	3' 末端	64°C	65°C
THU-MYH-2MPS	嘧啶：嘧啶 C：C	倒數第二位置	62°C	63°C
THU-MYH-3GPS	嘌呤：嘌呤 G：A	3' 末端	64°C	63°C

\*：表示 exonuclease resistant modified 位置

底線為錯配位點，亦即鹼基與野生型模板錯誤配對

圖【4-18】為 THU-MYH-3GPS 之 PCR 結果。由圖之結果可知，使用 *Pfu* polymerase 進行反應，且黏合溫度為 63°C 時，THU-MYH-3GPS 如預期終止 PCR 反應，呈現 OFF 訊號，並與對照組 - THU-MYH-2PS 呈現 ON/OFF 的明顯對比。

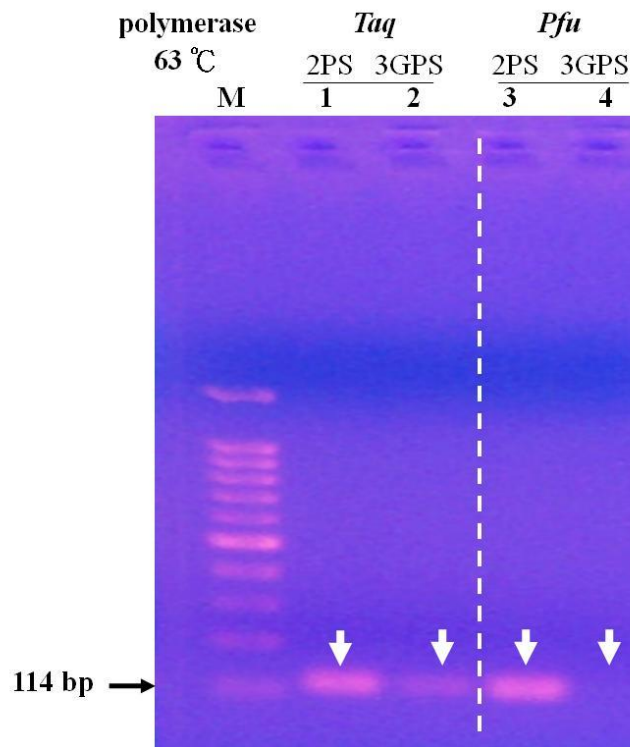
由表【4-12】可知，THU-MYH-3GPS 與 THU-MYH-3PS 兩者之錯配位置皆位於 3' 末端，且兩者之理論 Tm 值同為 64°C。由圖【4-17】與【4-18】可知，Ta 值為 65°C 時，THU-MYH-3PS 能有效終止反應，進而如預期呈現 OFF 訊號；然而，THU-MYH-3GPS 卻只需黏合溫度設定在 63°C，即可如預期呈現 OFF 訊號。故將初步排除錯配位置與 Tm 值影響

黏合溫度之可能性。

接著比較圖【4-16】與【4-18】可發現，THU-MYH-3GPS 與 THU-MYH-2MPS 兩者之最佳黏合溫度皆為 63°C。又從表【4-12】可知，THU-MYH-3GPS 與野生型模板錯配模式為嘌呤：嘌呤，而 THU-MYH-2MPS 與野生型模板錯配之模式為嘧啶：嘧啶。由 4-3-1 節之探討可知，兩條多聚核苷酸鏈間的鹼基配對模式需為嘌呤 - 嘧啶才符合雙螺旋結構。簡單來說，就是兩條核苷酸鏈之間的距離必須為 11Å，螺旋結構間太寬或太窄，皆容易導致螺旋結構之穩定性下降。故可知，THU-MYH-3GPS 與野生型模板之嘌呤：嘌呤錯配，導致核苷酸鏈間之距離太寬，進而造成雙螺旋結構之穩定性下降。同樣地，THU-MYH-2MPS 與野生型模板之嘧啶：嘧啶錯配，使得核苷酸鏈間之距離太窄，故導致雙螺旋結構之不穩定。反之，THU-MYH-3PS 與野生型模板之錯配模式為嘧啶：嘌呤，雖然其配對間無法形成正確的氫鍵，但其螺旋結構是符合雙螺旋之理想距離。

因此，當黏合溫度提高至 63°C 時，雙螺旋結構較不穩定之 THU-MYH-2MPS 與 THU-MYH-3GPS 即終止反應。反之，螺旋結構較穩定之 THU-MYH-3PS，則須將黏合溫度提高至 65°C 才可終止反應。故藉由此探討可知，設定 PCR 之最佳黏合溫度時，須考慮特異性引子與模板間之錯配模式再行調整，而此結論與 4-3-1 節之推測相符合。





圖【4-18】THU-MYH-3GPS 應用於 ON/OFF switch assay 之電泳圖。

Lane M 為 100 bp DNA ladder LC；2PS 為 THU-MYH-2PS；3GPS 為 THU-MYH-3GPS；其反應條件請參見表【3-6】與表【3-7】，Ta 為 63°C。

由圖【4-15】、【4-16】以及【4-17】之 PCR 訊號可知，3'端與野生型模板連續形成兩個錯配之特異性引子 - THU-MYH-3MPS，無論是與 *Taq* polymerase 進行 PCR，亦或是與 *Pfu* polymerase 進行反應，皆能有效地終止反應，進而如預期呈現 OFF 訊號。然而，THU-MYH-3PS 與 THU-MYH-2MPS 則不然，兩特異性引子於不同之 DNA polymerase 搭配進行 PCR，其 PCR 訊號差異頗大，表【4-13】為不同 DNA polymerase 應用於 ON/OFF switch assay 時，THU-MYH-3PS 與 THU-MYH-2MPS 之 PCR 訊號的統整。

表【4-13】THU-MYH-2MPS 與 THU-MYH-3PS 反應於不同 DNA polymerase 之 ON/OFF switch assay 的結果統整

DNA polymerase	Primer name	primer   template (5'→3')	實驗 Ta 值	預期 結果	實驗結果
<i>Pfu</i>	對照組	G*T     C A	---	ON	ON
	THU-MYH-2PS	G*C     C A	65°C	OFF	OFF
	THU-MYH-3PS	*C T     C A	63°C	OFF	OFF
	THU-MYH-2MPS	G*T     C A	---	ON	ON
<i>Taq</i>	對照組	G*T     C A	---	ON	ON
	THU-MYH-2PS	G*C     C A	65°C	OFF	ON (假陽性)
	THU-MYH-3PS	*C T     C A	63°C	OFF	ON (訊號微弱)
	THU-MYH-2MPS	G*T     C A	---	ON	ON

\*：表示 exonuclease resistant modified 位置

底線為錯配位點，亦即鹼基與野生型模板錯誤配對

由表【4-13】之結果統整可發現，使用 *Pfu* polymerase 進行 PCR 反應，並調整 Ta 值為 63°C 時，THU-MYH-2MPS 能與對照組呈現 ON/OFF 之對比訊號；然而，當反應替換成 *Taq* polymerase，Ta 值維持不變時，

THU-MYH-2MPS 卻無法完全終止反應，因而無法與對照組呈現 ON/OFF 之對比訊號，使得 ON/OFF 之訊號不易判斷。

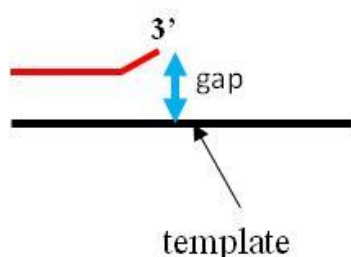
相同之現象也發生於 THU-MYH-3PS 之 PCR 訊號，當 *Pfu* polymerase 應用於 PCR 反應，並調整 Ta 值為 65°C 時，THU-MYH-3PS 能與對照組呈現 ON/OFF 之對比訊號；然而，當反應替換成 *Taq* polymerase，Ta 值維持不變時，THU-MYH-3PS 卻無法完全終止反應，導致 ON/OFF 之訊號無法判斷。

有文獻指出，*Taq* polymerase 之錯配率相較於 *Pfu* polymerase 來的高 (34)，因此，需藉由加強 PCR 之反應條件來彌補 *Taq* polymerase 的高錯配率之缺陷。故推測 ON/OFF switch assay 之 DNA polymerase 替換成 *Taq* polymerase 時，PCR 之黏合溫度需設定的比使用 *Pfu* polymerase 時的黏合溫度還要高才行。

由圖【4-17】之結果顯示，使用 *Taq* polymerase 進行反應，並將 Ta 值提高至 65°C，THU-MYH-2MPS 與 THU-MYH-3PS 依然無法終止反應。然而，使用 *Taq* polymerase 反應，引子 3' 端與野生型模板連續形成兩個錯配之 THU-MYH-3MPS，因其 3' 端形成一個較大的氣泡阻礙 PCR 之延伸反應，進而終止反應，呈現 OFF 訊號。由於 *Taq* polymerase 是個缺乏 3'→5' 端外切修復功能，但延伸聚合能力很強之聚合酶，故推測 *Taq* polymerase 對於模板與引子 3' 端間間距(gap)要求較嚴苛，其示意圖請

參考圖【4-19】。因此，對於只單純使用硫原子替換磷酸二酯鍵上之氧原子的硫代磷酸化修飾而言，THU-MYH-2MPS 與 THU-MYH-3PS 之 3'端與模板間之間距不足以阻礙 *Taq* polymerase 的延伸聚合能力，導致 *Taq* polymerase 仍用其極佳的延伸聚合能力跨過錯配位點，並繼續聚合而產生錯配之假陽性訊號。故將利用鎖核酸修飾之特異性引子，進一步驗證此推測，詳細敘述請參見鎖核酸修飾之探討。

由表【4-13】之統整可知，硫代磷酸化修飾之特異性引子搭配 *Pfu* polymerase 一同進行 PCR 反應，並調整 Ta 值至最佳化，便可得到預期之 ON/OFF 訊號。



圖【4-19】*Taq* polymerase 對於模板與引子 3'端之間距(gap)要求之示意圖

進一步將 4-2 與 4-3-1 節之 AS-PCR 結果與 ON/OFF switch assay by *Pfu* polymerase 之結果比較可發現，在 Ta 值為 63°C 時，THU-MYH-2MPS 能有效地終止反應，進而與對照組呈現 ON/OFF 之對比訊號；然而，相同序列之 THU-MYH-2M 反應於 AS-PCR 時，卻需設定 Ta 值至 65°C 才可使反應終止，呈現 OFF 訊號。相同地，在 Ta 值為 65°C 時，THU-MYH-3PS

能如預期呈現 OFF 訊號，並與對照組呈現明顯之 ON/OFF 訊號；然而，相同序列之 THU-MYH-3 應用於 AS-PCR 時，即使 Ta 值提高至 65°C，依舊無法完全終止反應，因而無法與對照組呈現明顯之對比訊號。表【4-14】為 AS-PCR 之產物訊號與 ON/OFF switch assay by *Pfu* polymerase 之實驗結果相互比較之統整。

表【4-14】ON/OFF switch assay by *Pfu* 與 AS-PCR 之結果統整

分析方法	Primer name	primer   template (5'→3')	實驗 Ta 值	預期 結果	實驗結果
ON/OFF switch assay by <i>Pfu</i>	對照組	G*T     C A	---	ON	ON
	THU-MYH-3PS	G*C     C A	65°C	OFF	OFF
	THU-MYH-2MPS	*C T     C A	63°C	OFF	OFF
AS-PCR	對照組	G T     C A	---	ON	ON
	THU-MYH-3	G C     C A	< 65°C	OFF	ON (些微訊號)
	THU-MYH-2M	C T     C A	65°C	OFF	OFF

\*：表示 exonuclease resistant modified 位置

底線為錯配位點，亦即鹼基與野生型模板錯誤配對

由圖【3-4】之結構式可知，硫代磷酸化修飾是個核苷酸與核苷酸間的磷酸二酯鍵以 S 原子替換掉一個 O 原子之修飾。有文獻指出，此修飾不單只是抵抗核酸外切酶，還會降低其 Tm 值，倘若同時換掉兩個 O 原子其 Tm 值會降更低。而此現象之原因為核酸分子的穩定性主要來自於鹼基對間的堆積作用，而鹼基對之間是疏水的。因此，當鹼基對堆積時，使得水分子被隔離在兩互補的核苷酸鏈之外，同時加強了鹼基之電荷偶極作用，這時磷酸骨架上帶負電荷的磷酸基團就成為維持螺旋結構之穩定性的重要功臣。

因此，磷酸基團的負電荷替換成 S 原子時，將導致整體之負電荷下降，使得螺旋結構之穩定性降低。故修飾硫代磷酸的特異性引子應用於 PCR 反應時，其所設定之 Ta 值相較於未修飾之特異性引子而言來得低。

## 鎖核酸修飾之探討

本實驗先針對突變型對偶性引子進行鎖核酸修飾，並命名為 THU-MYH-3LNA，其引子之 3'端與野生型模板形成 C:A 錯配；同時修飾一野生型對偶性引子 - THU-MYH-2LNA 與之對照。另外，本實驗也同時將野生型對偶性引子 3'端數來第二位置之鳥糞嘌呤鹼基更改為胞嘧啶鹼基，與野生型模板形成 C:C 錯配，並將錯配位點進行鎖核酸之修飾，命名為 THU-MYH-2MLNA；而 THU-MYH-3MLNA 為突變型對偶性引子本身與野生型模板的 C:A 錯配之外，其引子之 3'端數來第二位置亦與野生型模板形成 C:C 錯配，並將兩錯配之位點皆修飾成鎖核酸化。各引子之修飾位點請參見表【4-15】，詳細序列請參考表【2-2】，另外鎖核酸修飾之化學結構請參見圖【3-4】。

接著依序加入所修飾之特異性引子與野生型模板於反應中，並以 *Pfu* polymerase 及 *Taq* polymerase 進行 PCR 反應。同使用野生型模板之預期實驗結果為突變型對偶性引子的 PCR 應呈現 OFF 訊號；反之，對照組的野生型對偶性引子的 PCR 反應則為 ON 訊號。

表【4-15】修飾鎖核酸之引子應用於 ON/OFF switch assay 之資料統整

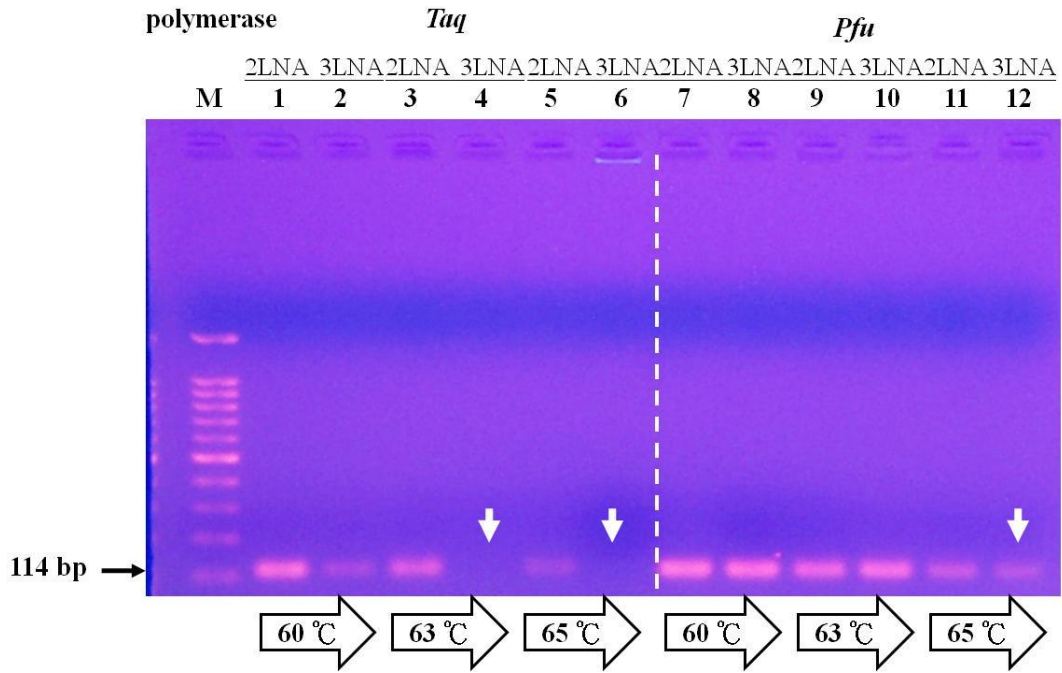
Primer name	修飾位點	預期結果
對照組	5'...AATAG*T-3'	ON
THU-MYH-2LNA		
THU-MYH-3LNA	5'...AATAG*C-3'	OFF
THU-MYH-2MLNA	5'...AATA*CT-3'	OFF
THU-MYH-3MLNA	5'...AATA*C*C-3'	OFF

\*：表示 exonuclease resistant modified 位置

底線為錯配位點，亦即鹼基與野生型模板錯誤配對

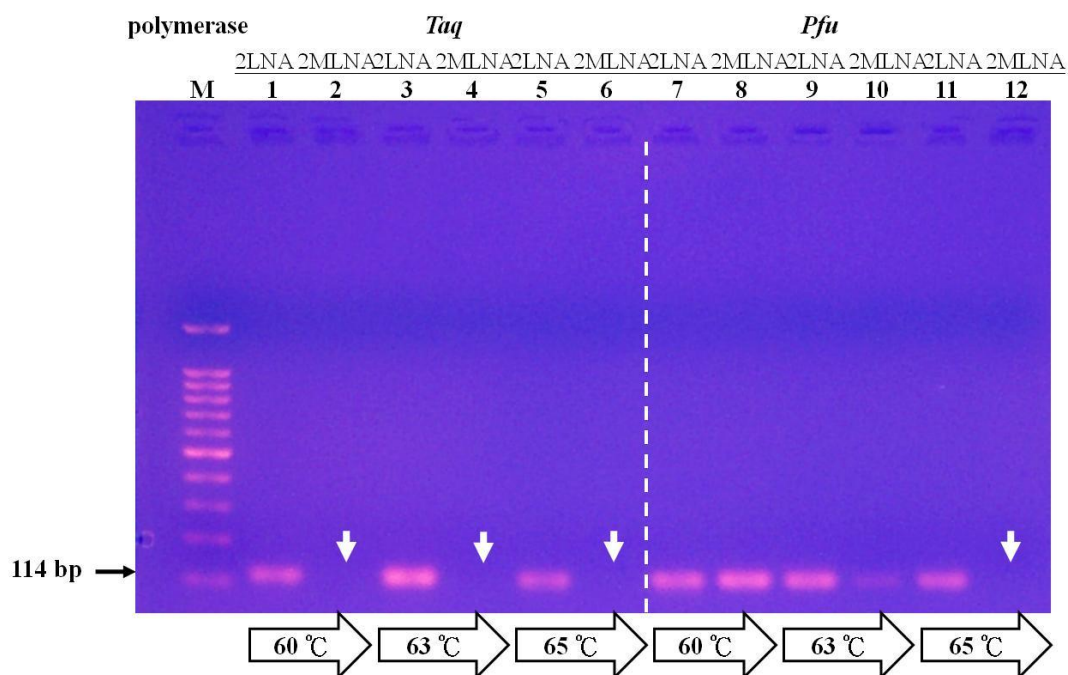
圖【4-20】為 THU-MYH-3LNA 反應於 PCR 之電泳分析結果。由圖可知，使用 *Taq* polymerase 進行反應，Ta 調整至 63°C 時，THU-MYH-3LNA 如預期結果達到 OFF 的訊號(Lane 4)，並與對照組 - THU-MYH-2LNA 呈現明顯的 ON/OFF 訊號。反之，使用 *Pfu* polymerase 進行反應，即使 Ta 調整至 65°C，THU-MYH-3LNA 依舊未如預期達到 OFF 的訊號(Lane 12)，故無法與對照組(Lane 11)呈現明顯的 ON/OFF 訊號。





圖【4-20】THU-MYH-3LNA 反應於 ON/OFF switch assay 之電泳圖。  
Lane M 為 100 bp-1.5 kb DNA ladder；其反應條件請參見表【3-6】與表【3-7】，  
Ta 分別為 60、63、65°C。

圖【4-21】為 THU-MYH-2MLNA 反應於 PCR 之電泳分析結果。由圖可知，使用 *Taq* polymerase 進行反應，並設定 Ta 值為 60°C 時，THU-MYH-2MLNA 可如預期呈現 OFF 訊號(Lane 2)，並與其對照組 - THU-MYH-2LNA 呈現 ON/OFF 之對比訊號。另外，使用 *Pfu* polymerase 進行反應，Ta 值必須提高至 65°C，才可使得 THU-MYH-2MLNA (Lane 12) 與 THU-MYH-2LNA (Lane 11) 呈現 ON/OFF 訊號。

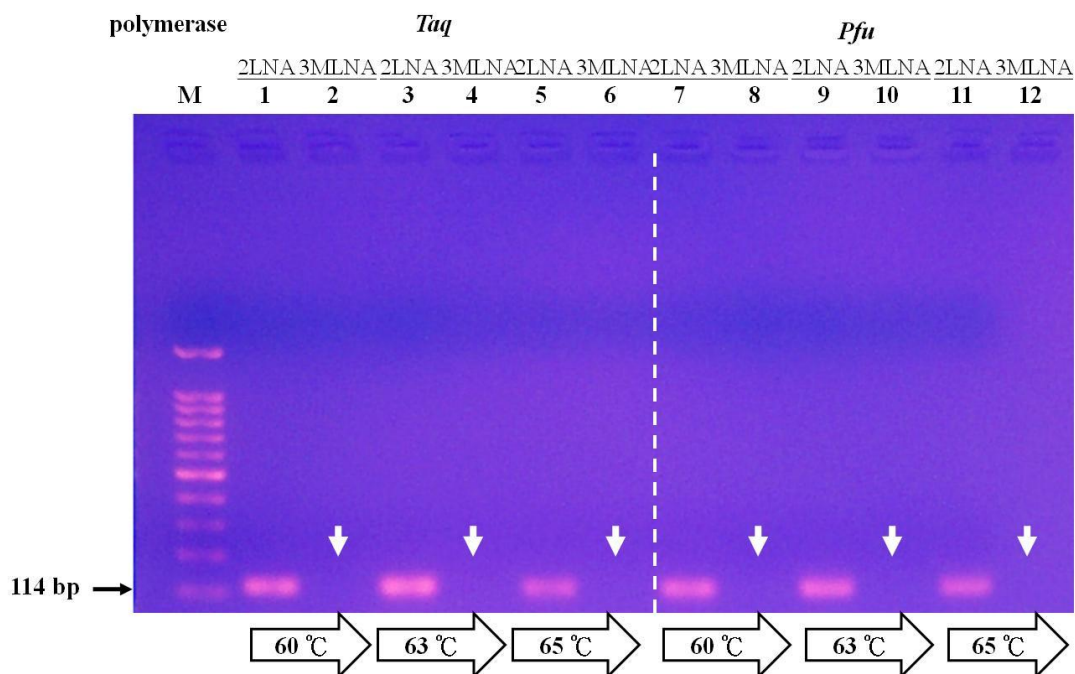


圖【4-21】THU-MYH-2MLNA 反應於 ON/OFF switch assay 之電泳圖。  
Lane M 為 100 bp-1.5 kb DNA ladder；其反應條件請參見表【3-6】與表【3-7】，  
Ta 分別為 60、63、65°C。

圖【4-22】為 THU-MYH-3MLNA 反應於 PCR 之電泳分析結果。由圖可知，黏合溫度為 60°C 時，THU-MYH-3MLNA 無論是使用 *Taq* polymerase 或是 *Pfu* polymerase 皆能與其對照組 - THU-MYH-2LNA 呈現 ON/OFF 訊號之差異。

由於 THU-MYH-3MLNA 為引子之 3'端與野生型模板連續形成兩個錯配之特異性引子，故引子之 3'端具有一個較大的氣泡，進而阻礙 PCR 之延伸反應，使得 PCR 終止反應，呈現 OFF 訊號。此結果不只與 4-3-1 節之 THU-MYH-3M 應用於 AS-PCR 之結果相似；亦與硫代磷酸化修飾之 THU-MYH-3MPS 之 PCR 結果相似。故於特異性引子之 3'端設計連續

兩個錯配，增加 PCR 之延伸阻力，對於 AS-PCR 或是 ON/OFF switch assay 之特異性皆有幫助，進而促使 SNPs 分析的可信度大幅提高。



圖【4-22】THU-MYH-3MLNA 反應於 ON/OFF switch assay 之電泳圖。  
Lane M 為 100 bp-1.5 kb DNA ladder；其反應條件請參見表【3-6】與表【3-7】，  
Ta 分別為 60、63、65°C。

表【4-16】為硫代磷酸修飾與鎖核酸修飾反應於 *Pfu* polymerase 之 ON/OFF switch assay 之結果統整；而表【4-17】為硫代磷酸修飾與鎖核酸修飾反應於 *Taq* polymerase 之 ON/OFF switch assay 之結果統整。比較表【4-16】與【4-17】發現，使用 *Pfu* polymerase 進行 PCR 反應時，選擇修飾硫代磷酸之特異性引子，搭配適當之黏合溫度，即可有效終止反應，如預期呈現 OFF 訊號，並與其對照組之 ON 訊號呈現明顯對比。

然而，使用 *Taq* polymerase 進行 PCR 反應時，則選擇鎖核酸修飾之

特異性引子進行反應，並搭配最佳之 Ta 值，即可如預期終止反應，進而呈現 OFF 訊號，並與其對照組之 ON 訊號呈現明顯對比。

由上述之探討可知，延伸聚合能力很強之 *Taq* polymerase，因缺乏 3'→5'端外切修復功能，故推測 *Taq* polymerase 對於模板與引子 3'端間間距(gap)要求相較於 *Pfu* polymerase 而言來得嚴苛。由圖【3-4】之結構式可知，鎖核酸修飾為五碳糖上之二號氧原子與四號碳原子形成一亞甲基架橋之核苷酸修飾。因此，核苷酸之結構除了五碳糖之外，還有一亞甲基架橋所形成的環，故修飾鎖核酸之核苷酸即形成一雙環之結構。

因此，修飾鎖核酸之特異性引子 - THU-MYH-3LNA 與 THU-MYH-2MLNA，因其 3'端之雙環結構特性，使得引子與模板間的錯配間距(gap)較大，並使錯配阻礙加大，進而阻礙 *Taq* polymerase 的延伸聚合能力，而終止 PCR 反應。反之，若將特異性引子改為硫代磷酸化修飾，並與 *Taq* polymerase 進行 PCR 反應。其 PCR 訊號將因硫代磷酸化修飾之引子 3'端與模板間之錯配間距不夠大，而無法有效地終止 *Taq* polymerase 的延伸聚合能力，因而無法如預期與對照組呈現明顯之 ON/OFF 訊號。

具備 3'→5'端外切修復功能之 *Pfu* polymerase，對於模板與引子 3'端間間距(gap)要求較不嚴謹，因此，PCR 之黏合溫度對於 PCR 結果就比較具有影響力。又因鎖核酸修飾之特性不同於硫代磷酸化修飾能有效降

低雙螺旋結構之穩定性，因此，*Pfu* polymerase 與鎖核酸修飾之特異性引子進行 PCR，所需的黏合溫度相較於硫代磷酸化修飾而言來得高。

表【4-16】不同修飾之特異性引子反應於 *Pfu* polymerase 之 ON/OFF switch assay 結果統整

Exonuclease resistant-modified	Primer name	primer   template (5'→3')	實驗 Ta 值	預期 結果	實驗 結果
PS-modified	對照組	G*T     C A	---	ON	ON
	THU-MYH-2PS	G*C     C A	65°C	OFF	OFF
	THU-MYH-3PS	*C T     C A	63°C	OFF	OFF
LNA-modified	對照組	G*T     C A	---	ON	ON
	THU-MYH-2LNA	G*C     C A	< 65°C	OFF	ON (假陽性)
	THU-MYH-3LNA	*C T     C A	65°C	OFF	OFF

\*：表示 exonuclease resistant modified 位置

底線為錯配位點，亦即鹼基與野生型模板錯誤配對

表【4-17】不同修飾之特異性引子反應於 *Taq* polymerase 之 ON/OFF switch assay 之統整

Exonuclease resistant-modified	Primer name	primer	實驗	預期	實驗
		template (5'→3')	Ta 值	結果	結果
PS-modified	對照組	G*T 	---	ON	ON
	THU-MYH-2PS	CA			
	THU-MYH-3PS	G*C 	65°C	OFF	ON (假陽性)
	THU-MYH-2MPS	*C T 	63°C	OFF	ON (訊號弱)
		CA			
		G*T			
LNA-modified	對照組	G*T 	---	ON	ON
	THU-MYH-2LNA	CA			
	THU-MYH-3LNA	G*C 	63°C	OFF	OFF
	THU-MYH-2MLNA	*C T 	60°C	OFF	OFF
		CA			
		G*T			

\*：表示 exonuclease resistant modified 位置

底線為錯配位點，亦即鹼基與野生型模板錯誤配對

經由表【4-16】與【4-17】之探討可知，修飾鎖核酸之特異性引子 - THU-MUY-3LNA 與 THU-MYH-2MLNA，因其 3'端具有雙環之特性，能與模板形成較大之 gap，故搭配 *Taq* polymerase 進行 PCR 反應，即可如預期與對照組 - THU-MYH-2LNA 呈現明顯地 ON/OFF 訊號。另外，硫代磷酸化修飾之特異性引子 - THU-MUY-3PS 與 THU-MYH-2MPS，因具有降低雙螺旋結構穩定性之特性，故設定適當之 Ta 值 並搭配 *Pfu* polymerase 進行 PCR 反應，可如預期終止反應，進而與對照組 - THU-MYH-2PS 呈現 ON/OFF 之對比訊號。

#### 4-4-2 改善 ON/OFF switch assay 之靈敏度的探討

由 4-4-1 節之探討可知，不同的抗核酸外切酶修飾，搭配不同 DNA 聚合酶，其 ON/OFF switch assay 之靈敏度大不相同。故本節將進一步以其他反應條件為反應變因，企圖使 ON/OFF switch assay 之靈敏度更提升。

#### 改變 dNTP 濃度改善硫代磷酸化應用於 ON/OFF switch assay 之靈敏度

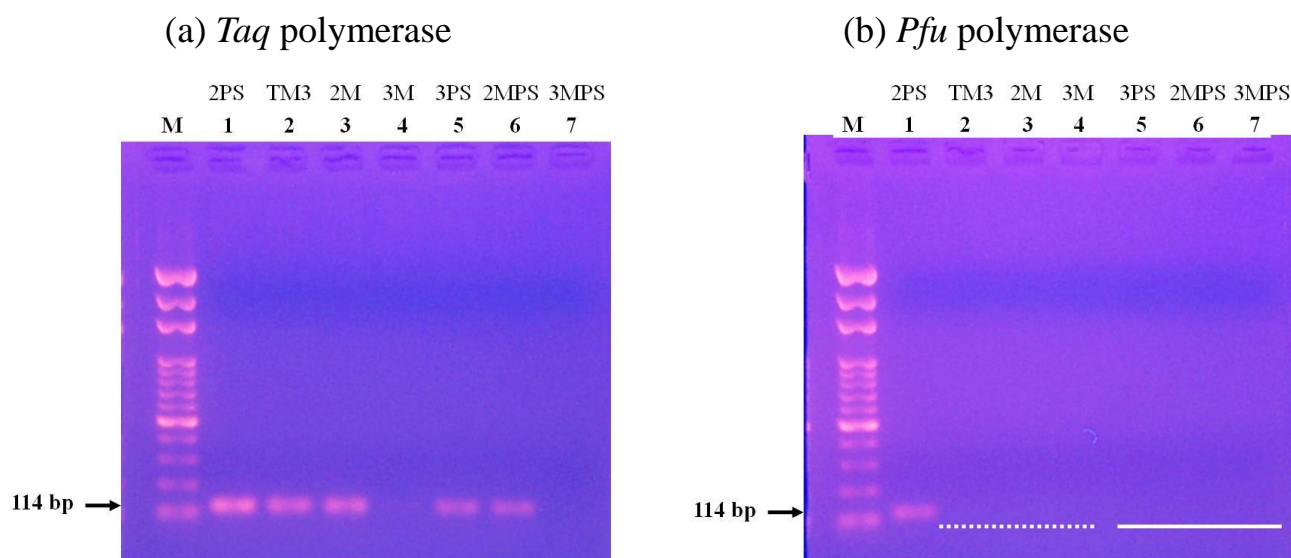
由 4-1-3 節之探討可知，改變 dNTP 之比例對於 PCR 之擴增速率有很大的影響。但換個說法，就是無論降低哪個鹼基都可能使反應聚合因缺乏某個鹼基原料，而使得整個聚合反應逐漸緩慢下來甚至是停止反應。故本實驗藉由此想法，企圖使反應於聚合階段時，因缺乏核苷酸原料，而使得反應能如預期呈現 ON/OFF 訊號。

圖【4-23】為降低 dNTP 濃度至 0.05 mM，設定 Ta 值為 60 °C，並使用硫代磷酸修飾的特異性引子進行反應之電泳圖，實驗方法詳見表【3-6】與表【3-7】。從圖【4-23】之(b)可看出，使用 *Pfu* polymerase 進行 ON/OFF switch assay，並且將 dNTP 濃度降至 0.05 mM 時，即使 Ta 值僅設定在 60 °C，THU-MYH-3PS、THU-MYH-2MPS 與 THU-MYH-3MPS 皆如預期呈現 OFF 訊號(Lane 5-7)；且與對照組 - THU-MYH-2PS (Lane 1)呈現極易分辨之 ON/OFF 訊號。

然而，由圖【4-23】之(b)的 Lane 2-4 可發現，本該被 *Pfu* polymerase



移除修復並聚合產生產物之 THU-MYH-3、THU-MYH-2M 與 THU-MYH-3M 皆未如預期呈現 ON 訊號。推測是否為 dNTP 濃度過低，導致修復移除完，欲聚合時卻因缺乏核苷酸原料或是下個單核苷酸補上的反應速度因濃度低而變緩慢，進而無法順利進行聚合，使得整個聚合反應停止。欲釐清其原因，故將稍稍提高 dNTP 濃度與拉長製程的黏合延伸時間進一步測試證實。



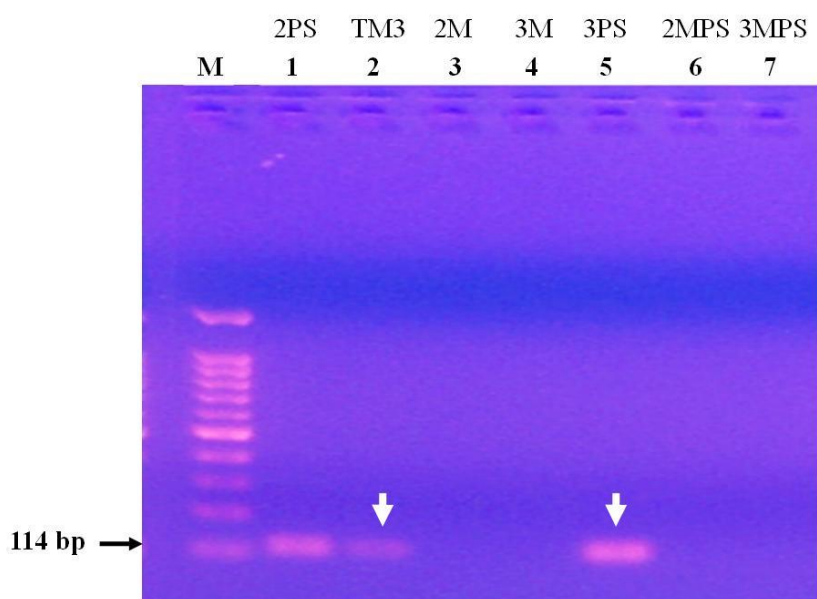
圖【4-23】改變 dNTP 濃度為 0.05 mM 進行 PCR 反應之電泳圖。

Lane M 為 100 bp DNA ladder LC；2PS 為 THU-MYH-2PS；TM3 為 THU-MYH-3；2M 為 THU-MYH-2M；3M 為 THU-MYH-3M；3PS 為 THU-MYH-3PS；2MPS 為 THU-MYH-2MPS；3MPS 為 THU-MYH-3MPS；其反應條件請參見表【3-6】與表【3-7】， $T_a$  值為  $60^{\circ}\text{C}$ ，dNTP 濃度為 0.05 mM。

圖【4-24】為拉長製程之黏合延伸時間的 PCR 結果，表【4-18】為其熱循環之參數，此實驗變因除了改變其製程時間之外，其餘條件皆未改變。由圖【4-24】可得知，當黏合延伸之時間拉長時，使得原本希望有

機會修復並遞補之單核苷酸將可能有足夠的時間可結合，進而繼續聚合呈現 ON 之產物訊號(Lane 2)。然而，從圖【4-24】可發現，將其黏合延伸製程時間拉長，同時也造成了 THU-MYH-3PS 的錯配產生。

故可知圖【4-23】之(b)圖中的 THU-MYH-3PS、THU-MYH-2MPS 與 THU-MYH-3MPS 的 PCR 訊號能如預期呈現 OFF 訊號(Lane 5-7)，其可能原因為反應之 dNTP 濃度過低，導致 *Pfu* polymerase 進行修復功能後，緊接著要進行聚合反應時，因聚合原料濃度過低，使得反應速度大大降低，而產生 OFF 訊號。



圖【4-24】改變熱循環製程時間，並使用 *Pfu* polymerase 之 PCR 反應電泳圖。Lane M 為 100 bp-1.5 kb DNA ladder；2PS 為 THU-MYH-2PS；TM3 為 THU-MYH-3；2M 為 THU-MYH-2M；3M 為 THU-MYH-3M；3PS 為 THU-MYH-3PS；2MPS 為 THU-MYH-2MPS；3MPS 為 THU-MYH-3MPS；其反應條件請參見表【3-6】與表【4-18】， $T_a$  值為 60°C，dNTP 濃度為 0.05 mM。

表【4-18】PCR 熱循環條件

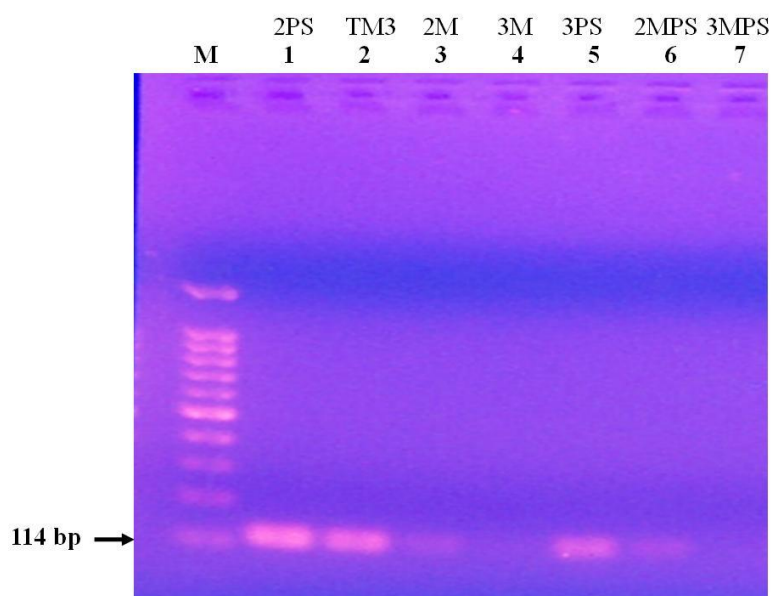
		30 cycles				
94 °C	94 °C	60 °C	72 °C	72 °C	4 °C	
5 min.	1 min.	1 min.	1.5 min.	7 min.	∞	

圖【4-25】為 0.075 mM dNTP 濃度，設定 Ta 值為 60°C，並使用 *Pfu* polymerase 進行反應之電泳圖，實驗方法詳見表【3-6】與表【3-7】。此實驗之目的主要是為了釐清 dNTP 濃度過低時，是否會導致聚合時因缺乏核苷酸原料而無法順利進行聚合。由圖【4-25】之結果可得知，dNTP 濃度稍稍提高一點，即可使 THU-MYH-3、THU-MYH-2M 與 THU-MYH-3M 陸續出現產物訊號(Lane 2-4)；然而，稍稍提高之 dNTP 濃度卻也同時造成 THU-MYH-3PS 與 THU-MYH-2MPS 之非預期訊號出現。

由圖【4-23】、【4-24】與【4-25】所得之結果探討可知，在 dNTP 濃度極低的情況下，可使得 THU-MYH-3PS、THU-MYH-2MPS 與 THU-MYH-3MPS 如預期呈現 OFF 訊號，且與 THU-MYH-2PS 呈現極易分辨之 ON/OFF 訊號。

然而，若拉長其黏合延伸之製程時間或是 PCR 溶液中的 dNTP 濃度不夠低，即無法有效地終止反應，進而與對照組呈現 ON/OFF 訊號。因此，欲藉由降低 dNTP 濃度來提高 PCR 之靈敏度，除了反應溶液中的 dNTP

濃度要夠低，還必須與 PCR 之熱循環製程相互搭配，才能使 PCR 訊號如預期呈現明顯之 ON/OFF 訊號。

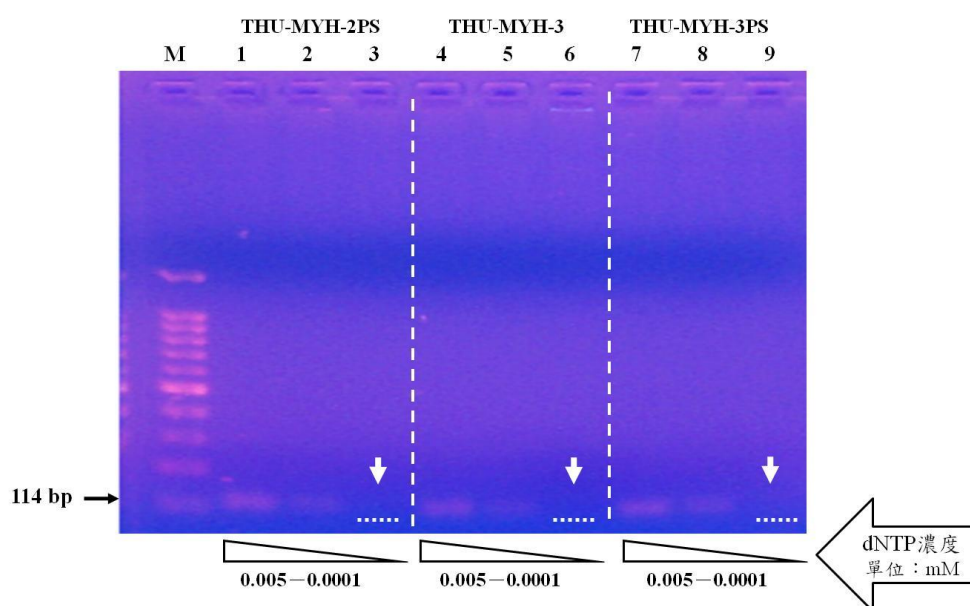


圖【4-25】使用 *Pfu* polymerase 於 0.075 mM 之 dNTP 濃度下進行 PCR 反應。Lane M 為 100 bp-1.5 kb DNA ladder；2PS 為 THU-MYH-2PS；TM3 為 THU-MYH-3；2M 為 THU-MYH-2M；3M 為 THU-MYH-3M；3PS 為 THU-MYH-3PS；2MPS 為 THU-MYH-2MPS；3MPS 為 THU-MYH-3MPS；其反應條件請參見表【3-6】與表【3-7】， $T_a$  值為 60°C，dNTP 濃度為 0.075 mM。

另外，由圖【4-23】之(a)、(b)圖可發現，THU-MYH-2PS 在同樣的 dNTP 濃度下，使用 *Taq* polymerase 進行 PCR 之產物訊號比使用 *Pfu* polymerase 的產物訊號來的亮。故推測此實驗所選定的 dNTP 濃度對於延伸聚合能力很強的 *Taq* polymerase 而言，或許仍舊不夠低，故無法使圖【4-23】之(a)圖中的 Lane 2-7 如預期呈現 OFF 訊號，因此將重新調整 dNTP 濃度作測試。

圖【4-26】為 *Taq* polymerase 於 0.005 mM 至 0.0001 mM 的 dNTP 濃

度下進行 PCR 之實驗結果，其實驗條件除了 dNTP 濃度往下調整外，其餘皆維持不變，實驗方法詳見表【3-5】與表【3-7】。由其電泳圖可發現，在 dNTP 濃度為 0.005 mM 時，THU-MYH-3 與 THU-MYH-3PS 皆呈現假陽性訊號(Lane 4 與 Lane 7)，與對照組 - THU-MYH-2PS (Lane 1)一樣呈現 ON 訊號；最後，dNTP 濃度降低至 0.0001 mM 時，其訊號皆因濃度過低而呈現 OFF 訊號，因而無法判斷其 ON/OFF 訊號。由其結果可知，欲藉由調整 dNTP 濃度來提升 *Taq* polymerase 之專一性是不可行的。



圖【4-26】使用 *Taq* polymerase 於 0.005 mM - 0.0001 mM 之 dNTP 濃度下進行 PCR 反應。

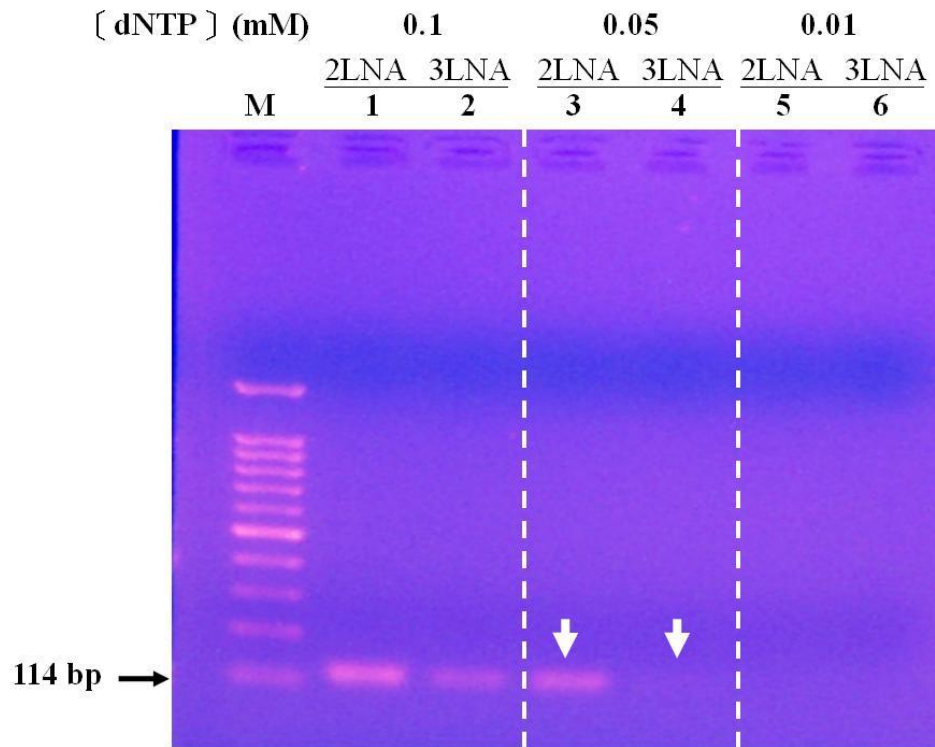
Lane M 為 100 bp-1.5 kb DNA ladder；其反應條件請參見表【3-5】與表【3-7】， $T_a$  值為 60°C，dNTP 濃度為 0.005 mM - 0.0001 mM。

## 改變 dNTP 濃度改善鎖核酸修飾應用於 ON/OFF switch assay 之靈敏度

由 4-4-1 節之鎖核酸修飾的探討可知，使用 *Taq* polymerase 在  $T_a$  為  $63^\circ\text{C}$  反應時，THU-MYH-3LNA 如預期達到 OFF 的訊號，而與對照組呈現明顯的 ON/OFF 訊號。反之，使用 *Pfu* polymerase 進行反應，即便  $T_a$  已調整至  $65^\circ\text{C}$ ，THU-MYH-3LNA 仍未如預期達到 OFF 的訊號，無法與對照組呈現明顯的 ON/OFF 訊號。由前面改善硫代磷酸化修飾之靈敏度的探討可知，調降 dNTP 濃度並搭配適當的反應條件，可使得 *Pfu* polymerase 於 PCR 反應中之專一性提高。故將藉由調整 dNTP 濃度，使得鎖核酸修飾之突變型對偶性引子能在 *Pfu* polymerase 反應中呈現如預期之 OFF 訊號，並與其對照組呈現 ON/OFF 訊號。

圖【4-27】為 dNTP 濃度由 0.1 mM 至 0.01 mM 之實驗結果，其實驗條件為  $60^\circ\text{C}$  的  $T_a$  值，並使用 *Pfu* polymerase 進行反應，實驗方法詳見表【3-6】與表【3-7】。由實驗結果可知，當 dNTP 濃度為 0.05 mM 時，THU-MYH-3LNA 如預期呈現 OFF 訊號(Lane 4)，並與對照組 - THU-MYH-2LNA (Lane 3) 呈現 ON/OFF 訊號。

由此實驗之探討可知，當 dNTP 濃度調降至臨界濃度並搭配上適當之反應條件，可有效的提高 *Pfu* polymerase 之專一性。



圖【4-27】使用 *Pfu* polymerase 於 0.1 mM - 0.01 mM 之 dNTP 濃度下進行 PCR 之反應結果。

Lane M 為 100 bp-1.5 kb DNA ladder；2LNA 為 THU-MYH-2LNA；3LNA 為 THU-MYH-3LNA；其反應條件請參見表【3-6】與表【3-7】， $T_a$  值為 60°C，dNTP 濃度為 0.1 mM - 0.01 mM。

### 4-4-3 OFF/ON switch assay 之建立

此分析方法之原理如 1-6 節所敘述，簡單來說，就是將特異性引子 3' 端上的游離羥基移除，並搭配 *Pfu* polymerase 進行反應的技術。

當修飾過去羥基的突變型對偶性引子與野生型模板進行反應時，將因 3' 端之錯配促使 *Pfu* polymerase 啟動修復功能，進而移除缺羥基之錯配核苷酸，並修復上與野生型模板互補且具有羥基之核苷酸，使得反應繼續延伸聚合，如預期呈現 ON 訊號。相對的，當野生型對偶性引子與野生型模板互補配對時，反應將不需啟動 *Pfu* polymerase 的修復功能，故缺羥基之核苷酸將因未移除而無法使聚合繼續，因而呈現 OFF 訊號。此訊號的差異即可使我們直接藉由實驗電泳圖之 ON/OFF 訊號進一步判斷，其詳細之預期結果請參見表【4-19】。本實驗所使用之去羥基修飾主要分成三種 - 磷酸修飾(Phosphate modified)、Thiol 修飾(-C3SH)與 AminoC6 修飾三種，其結構式請參見圖【3-5】。

表【4-19】OFF/ON switch assay 之預期結果

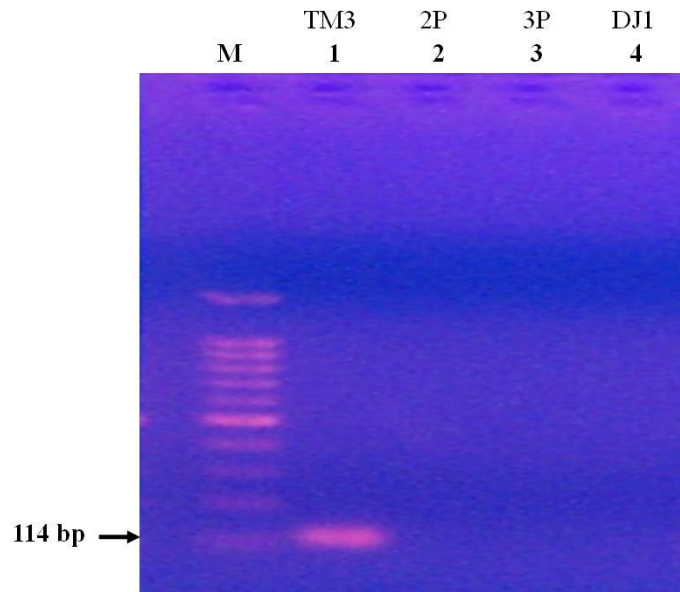
	Primer name*	3' dehydroxylation-modified	預期結果
Wild type	THU-MYH-2P	Phosphate	OFF
	THU-MYH-3P	Phosphate	ON
Mutant type	THU-MYH-3SH	Thiol	ON
	THU-MYH-DJ1	AminoC6	ON

\*：特異性引子之詳細訊息請參見表【2-3】



本實驗一開始先將 ON/OFF switch assay 之反應條件套用於 OFF/ON switch assay 上，故其實驗方法及條件皆詳見表【3-6】與【3-7】，又反應之對偶性引子之序列請詳見表【2-3】。圖【4-28】為 OFF/ON switch assay 之實驗結果，反應之特異性引子為 THU-MYH-3P 與 THU-MYH-DJ1；其對照組為 THU-MYH-2P，另外，為了確認其 *Pfu* polymerase 之修復活性，同時加入 THU-MYH-3 進行反應。

由實驗結果可發現，去羥基修飾之突變型對偶性引子 - THU-MYH-3P 與 THU-MYH-DJ1 未如預期被 *Pfu* polymerase 修復呈現產物訊號，故呈現 OFF 訊號(Lane 3、4)。而其對照組 - THU-MYH-2P 與野生型模板互補配對，故如預期呈現 OFF 訊號(Lane 2)。因而由實驗訊號(Lane 2-4)無法判斷其 OFF/ON，又由 THU-MYH-3 之產物訊號可確定 *Pfu* polymerase 之修復活性是沒問題的，故將調整其反應條件進一步測試。



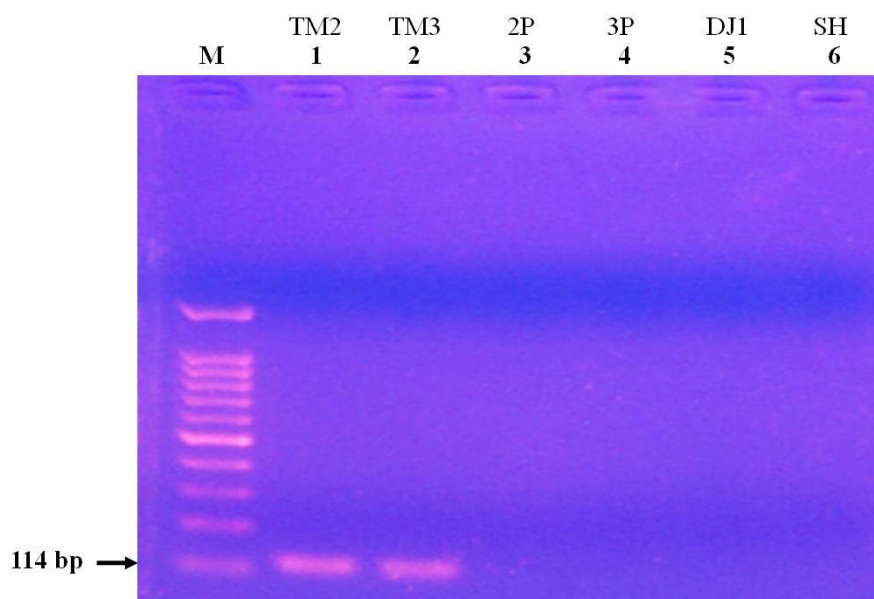
圖【4-28】去羥基修飾之對偶性引子的 OFF/ON switch assay 之電泳圖。  
 Lane M 為 100 bp-1.5 kb DNA ladder；TM3 為 THU-MYH-3；2P 為 THU-MYH-2P；3P 為 THU-MYH-3P；DJ1 為 THU-MYH-DJ1；其反應條件請參見表【3-6】與表【3-7】，Ta 值為 57.4°C。

## 延長熱循環製程時間

由於上述之實驗結果未如預期呈現 OFF/ON 之訊號，本該被 *Pfu* polymerase 修復且繼續聚合之突變型對偶性引子皆未如預期出現產物訊號。推測可能是黏合時間太短，導致 *Pfu* polymerase 來不及完成修復，而使得反應無法繼續進行。本實驗將拉長 PCR 熱循環製程之黏合延伸時間，企圖使 *Pfu* polymerase 能有足夠之反應時間對其錯配且缺羥基之核苷酸進行移除修復。

圖【4-29】為拉長 PCR 之黏合延伸製程時間的實驗結果，此實驗除了改變其製程時間，其餘皆未改變，反應試劑請參考表【3-6】，熱循環製程條件請參考表【4-20】，其對偶性引子之序列及其結構式請參見表【2-3】與圖【3-5】。由圖之實驗結果可知，去羥基修飾之突變型對偶性引子 - THU-MYH-3P、THU-MYH-DJ1 以及 THU-MYH-3SH 依舊未如預期呈現 ON 訊號(Lane 4-6)；其對照組 - THU-MYH-2P 與野生型模板互補配對，故無須修復移除而呈現 OFF 訊號(Lane 3)。進一步探討其 *Pfu* polymerase 之活性，可看出 THU-MYH-2 與 THU-MYH-3 皆如預期出現產物訊號，故可確認 *Pfu* polymerase 在此反應條件是具備聚合與修復之活性的。

由此實驗之結果可知，提高其製程時間對於 *Pfu* polymerase 切除去羥基之核苷酸是無效的，因而無法由實驗結果進一步判斷其 OFF/ON 訊號。



**圖【4-29】** 延長熱循環製程時間之 OFF/ON switch assay 反應結果。  
 Lane M 為 100 bp-1.5 kb DNA ladder；TM2 為 THU-MYH-2；TM3 為 THU-MYH-3；2P 為 THU-MYH-2P；3P 為 THU-MYH-3P；DJ1 為 THU-MYH-DJ1；SH 為 THU-MYH-3SH；其反應條件請參見表【3-6】與表【4-20】， $T_a$  值為  $57.4^{\circ}\text{C}$ 。

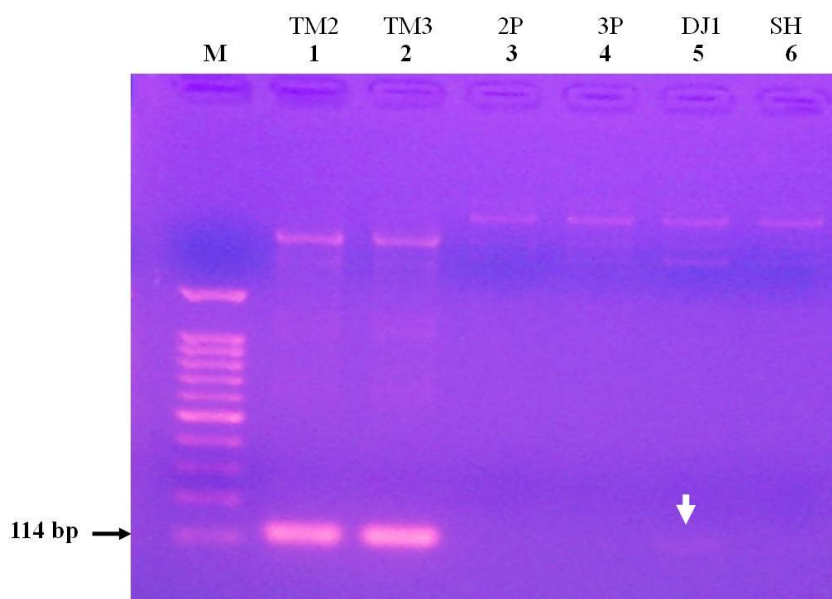
**表【4-20】** OFF/ON switch assay 之 PCR 熱循環條件

		30 cycles				
94 °C	94 °C	57.4 °C	57.4 °C	72 °C	72 °C	4 °C
5 min.	1 min.	30 sec.	5 min.	1.5 min.	7 min.	$\infty$

## 改變熱循環製程之黏合延伸溫度

因延長製程時間依舊未如預期呈現 ON 訊號，故將進一步降低其黏合溫度與延伸溫度，企圖使 *Pfu* polymerase 處於較不嚴苛之條件下進行修復聚合。另外，添加延伸聚合能力較強的 *Taq* polymerase 來幫助 *Pfu* polymerase 反應中的延伸聚合部分，企圖藉由 *Taq* polymerase 之高延伸能力來加強 PCR 反應之延伸部分，進而強化 PCR 之延伸反應，同時分擔 *Pfu* polymerase 的聚合壓力，使 *Pfu* polymerase 能更專注於切除修復之部分。

圖【4-30】為其實驗結果，實驗方法請參照表【4-21】與表【4-22】。由實驗結果之電泳圖發現，額外添加 *Taq* polymerase 及降低黏合延伸溫度會產生雜 band 現象，但由圖之 Lane 5 可發現些微產物訊號。故可知在這樣的條件下，可使得 THU-MYH-DJ1 如預期呈現 ON 訊號(Lane 5)。但由電泳圖可看出，THU-MYH-DJ1 訊號非常微弱，若欲與對照組 - THU-MYH-2P 呈現明顯之 OFF/ON 訊號非常不易。故將持續調整，使其對比訊號更明顯可見。



圖【4-30】改變熱循環製程溫度之 OFF/ON switch assay 反應結果。  
Lane M 為 100 bp-1.5 kb DNA ladder；TM2 為 THU-MYH-2；TM3 為 THU-MYH-3；2P 為 THU-MYH-2P；3P 為 THU-MYH-3P；DJ1 為 THU-MYH-DJ1；SH 為 THU-MYH-3SH；其反應條件請參見表【4-21】與表【4-22】， $T_a$  值為  $50^{\circ}\text{C}$ 。

表【4-21】添加 *Taq* polymerase 於 *Pfu* polymerase 反應中所需試劑表

試劑名稱	試劑濃度	添加量(單位： $\mu\text{l}$ )	最終濃度
ddH <sub>2</sub> O	/	20	/
10X <i>Pfu</i> reaction buffer*	/	2.5	1X
dNTPs	20 mM	0.5	0.4 mM
DNA	250 ng/ $\mu\text{l}$	0.5	5 ng/ $\mu\text{l}$
Forward primer	20 $\mu\text{M}$	0.25	0.2 $\mu\text{M}$
Reverse primer	20 $\mu\text{M}$	0.25	0.2 $\mu\text{M}$
<i>Pfu</i> polymerase	2.5 U/ $\mu\text{l}$	0.7	0.07 U/ $\mu\text{l}$
<i>Taq</i> polymerase	5 U/ $\mu\text{l}$	0.3	0.06 U/ $\mu\text{l}$
反應總體積		25	/

\*：10X *Pfu* reaction buffer 成份請參見表【3-9】

表【4- 22】 OFF/ON switch assay 之 PCR 熱循環條件

	30 cycles					
94 °C	94 °C	50 °C	50 °C	65 °C	65 °C	4 °C
5 min.	1 min.	30 sec.	5 min.	1.5 min.	7 min.	∞

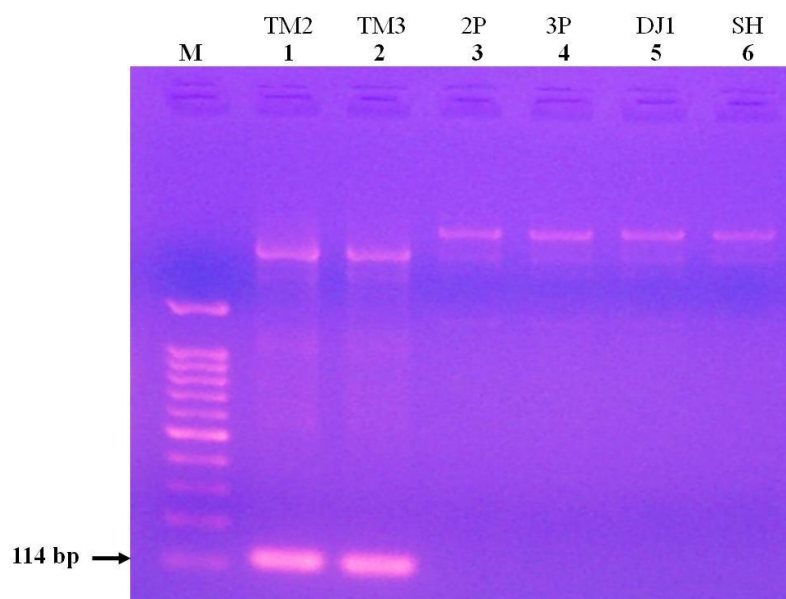
## 改變熱循環製程之溫度

由圖【4-30】之結果得到，THU-MYH-DJ1 於表【4-21】與【4-22】之條件下，可得到些微之產物訊號。故將進一步調整其熱循環製程之溫度，企圖使其產物訊號更明確。

圖【4-31】為改變熱循環製程溫度之反應結果，本實驗為進一步降低其黏合溫度，企圖使 *Pfu* polymerase 於移除修復過程中能更容易；另外，為了預防熱循環製程中突然降低的黏合溫度造成特異性引子於非目標位點黏合錯配形成雜 band，故稍稍提高延伸溫度避免雜 band 產生，實驗方法請參見表【4-21】與【4-23】。

由圖【4-31】之實驗結果發現，THU-MYH-DJ1 反應於表【4-21】與表【4-22】之條件下所產生的些微產物訊號(圖【4-30】之 Lane 5)，在反應條件調整為表【4-23】時，產物訊號皆呈現 OFF 訊號。將其結果進一步探討，推測可能因突然調降之黏合溫度導致反置引子皆於非目標位置黏合，故使得雜 band 現象更明顯，而目標產物皆未出現。故將重新設計一實驗為改變 DNA polymerase 於反應中的濃度，希望能藉由提高聚合酶濃度，使得圖【4-30】之 THU-MYH-DJ1 產物訊號更明顯，其餘之反應條件將依據表【4-21】與【4-22】。





**圖【4-31】**降低熱循環製程溫度之 OFF/ON switch assay 反應結果。  
 Lane M 為 100 bp-1.5 kb DNA ladder；TM2 為 THU-MYH-2；TM3 為 THU-MYH-3；2P 為 THU-MYH-2P；3P 為 THU-MYH-3P；DJ1 為 THU-MYH-DJ1；SH 為 THU-MYH-3SH；其反應條件請參見表【4-21】與表【4-23】。

**表【4-23】** OFF/ON switch assay 之 PCR 熱循環條件

30 cycles						
94 °C	94 °C	50 °C	45 °C	68 °C	68 °C	4 °C
5 min.	1 min.	30 sec.	5 min.	1.5 min.	7 min.	∞

## 改變 DNA 聚合酶於反應中之濃度

由上述調整熱循環製程之探討可知其效果不佳，故將藉由調整 DNA polymerase 之混合比例進一步測試。希望能藉由改變聚合酶於反應中之濃度及比例，提高圖【4-30】中的 THU-MYH-DJ1 之產物訊號量。

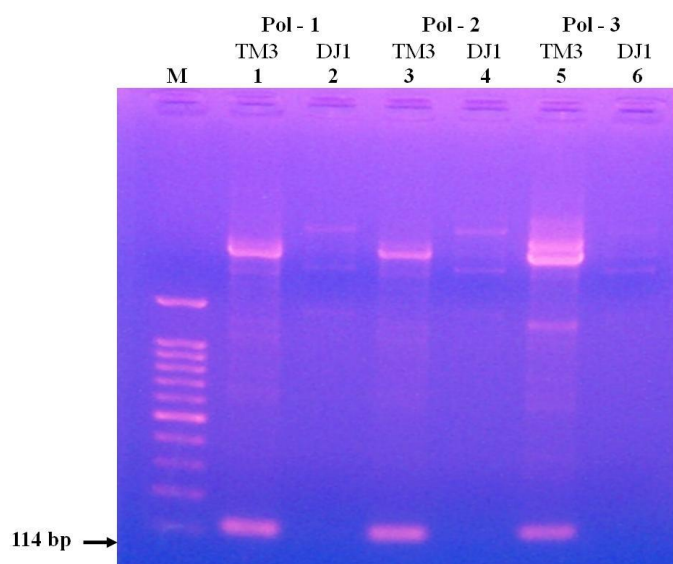
圖【4-32】為改變 DNA polymerase 混合比例之實驗結果，其反應條件請參照表【4-21】與表【4-22】，又聚合酶混合於反應溶液中之比例請詳見表【4-24】。由實驗結果可得知，無論是 *Pfu* polymerase 所佔比例高，亦或是 *Taq* polymerase 之比例高，皆無法順利修復而呈現產物訊號。

由實驗結果可發現，雖然其結果未如預期完成修復聚合呈現 ON 訊號，但可發現當黏合延伸溫度降低時會有固定大小之雜 band 現象出現。進一步針對突變型對偶性引子與野生型模板之序列進行 alignment score 之分析，其分析結果為表【4-25】所示。

由 alignment score 之分析結果可發現，突變型對偶性引子序列之某小片段是有可能與野生型模板之其他非目標位點互補黏合，因此當黏合溫度過低時，極有可能使反置引子之某序列片段黏上其他非目標位點。有文獻指出，外切核酸酶(exonuclease)若欲針對錯誤之核苷酸行使切除修復之功能，其欲切除之錯配核苷酸最好包含於 4 至 5 個單鏈形式之核苷酸片段內較容易被移除修復。故整合文獻之說法與 alignment score 之分析結果，推測當黏合溫度過低時，突變型對偶性引子可能如前段落所述，某

小片段之序列黏合上野生型模板上之非目標位點序列上；例如，引子序列 CTCGTGGC(第 7 到第 14 位點)可能黏貼在野生型模板之非目標位點(第 212 至第 205 位點)上，同時也造就了引子第 1 到第 6 位置之核苷酸形成一個單鏈之形式，因而使得 *Pfu* polymerase 發揮其外切核酸酶之活性，將其單鏈切除並修復上與模板互補之核苷酸，故產生明顯之雜 band 現象。

截至目前為止，本實驗已針對熱循環製程時間、熱循環溫度、DNA polymerase 混合比例及反應中所佔濃度之調整，以及選用不同修飾基團反覆測試，皆無法如預期達到 OFF/ON 訊號。故將改變引子序列進一步調整，詳細資訊請參見 4-4-4 節。



圖【4-32】改變 DNA 聚合酶混合比例之 OFF/ON switch assay 反應結果。

Lane M 為 100 bp-1.5 kb DNA ladder；TM3 為 THU-MYH-3；DJ1 為 THU-MYH-DJ1；其反應條件請參見表【4-21】與表【4-22】；Polymerase 之混合比例請詳見表【4-24】。

表【4-24】DNA 聚合酶混合比例之示意圖

Polymerase	<i>Pfu</i> polymerase	<i>Taq</i> polymerase
Pol-1	2 U/25 $\mu$ l	1 U/25 $\mu$ l
Pol-2	1.25 U/25 $\mu$ l	1.25 U/25 $\mu$ l
Pol-3	0.5 U/25 $\mu$ l	4 U/25 $\mu$ l

表【4-25】突變型對偶性引子與野生型模板之序列之 alignment score 分析結果

Score = 38.2 bits (19), Expect = 7e-08

Identities = 19/19 (100%), Gaps = 0/19 (0%)

Strand=Plus/Plus

**特異性引子：3'-TGATAAGAGCACCGGCCGC-5'**

Query 1 ACTATTCTCGTGGCCGCG 19 →特異性引子序列  
 ||||| →引子配對於目標位點

Sbjct 648 ACTATTCTCGTGGCCGCG 666 →野生型模板序列

Score = 16.4 bits (8), Expect = 0.26

Identities = 8/8 (100%), Gaps = 0/8 (0%)

Strand=Plus/Minus

Query 7 CTCGTGGC 14  
 ||||| →引子某片段配對於非目標位點

Sbjct 212 CTCGTGGC 205

Score = 16.4 bits (8), Expect = 0.26

Identities = 11/12 (92%), Gaps = 0/12 (0%)

Strand=Plus/Minus

Query 6 TCTCGTGGCCGG 17  
 |||| ||||| →引子某片段配對於非目標位點

Sbjct 942 TCTCCTGGCCGG 931

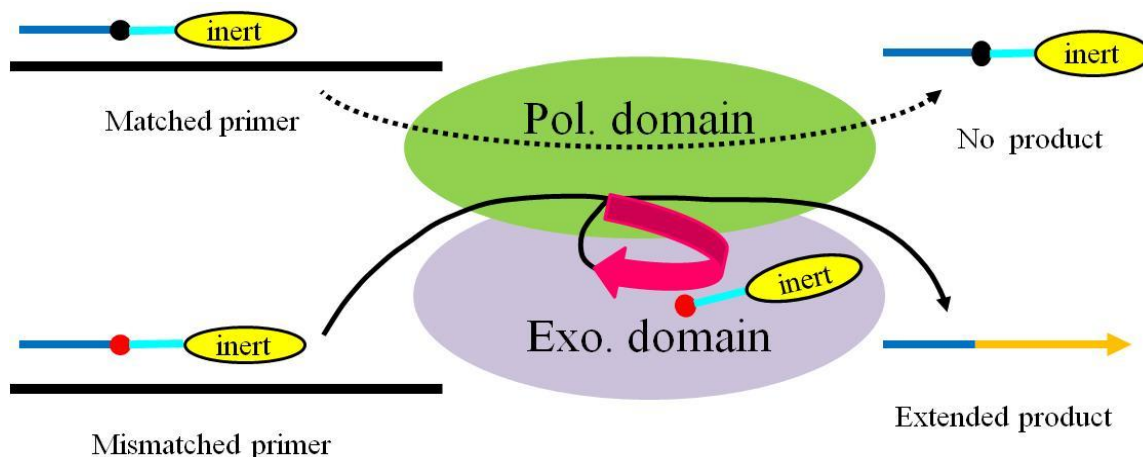
→粗體字加底線為額外註明

#### 4-4-4 改良式 OFF/ON switch assay 之建立

由 OFF/ON switch assay 之探討得知，4-4-3 節之實驗機制是非常嚴苛的，因而無法呈現其 OFF/ON 訊號。從文獻上得知，欲修復引子之 3'端必須是以單鏈或是"frayed"的形式進入外切核酸酶的活性位點，才能活化外切核酸酶的修復活性(54)。回頭檢討原本的 OFF/ON 機制來說，它只提供了一個核苷酸給 *Pfu* polymerase 進行修復，同時又在欲修復移除的核苷酸上修飾了一個相較於羥基而言較大的惰性基團，使得 *Pfu* polymerase 之修復條件非常之嚴苛，故將改變特異性引子的設計來改善其修復之條件。

已知欲使外切核酸酶發揮其修復活性，須使欲移除修復之核苷酸包含於一長度約 4 至 5 個的核苷酸單鏈內。因此，本實驗將原本 OFF/ON switch assay 所反應之突變型對偶性引子往後增加六個核苷酸，使得原先與野生型模板錯配的 3'端位點，變成在新引子之倒數第七個核苷酸位點上，而其惰性基團依舊修飾於新引子之 3'末端。如此一來，*Pfu* polymerase 辨識到新引子的倒數第七個核苷酸之錯配點，便會啟動其修復機制，將其核苷酸片段移除修復，並重新接上正確的核苷酸繼續聚合，而呈現 ON 之產物訊號。反之，當新引子之倒數第七個核苷酸位點與野生型模板為正確配對時，將因不需啟動修復機制，而使得新引子 3'端上的惰性基團無法被移除而終止反應，呈現 OFF 之產物訊號。圖【4-33】為改良式

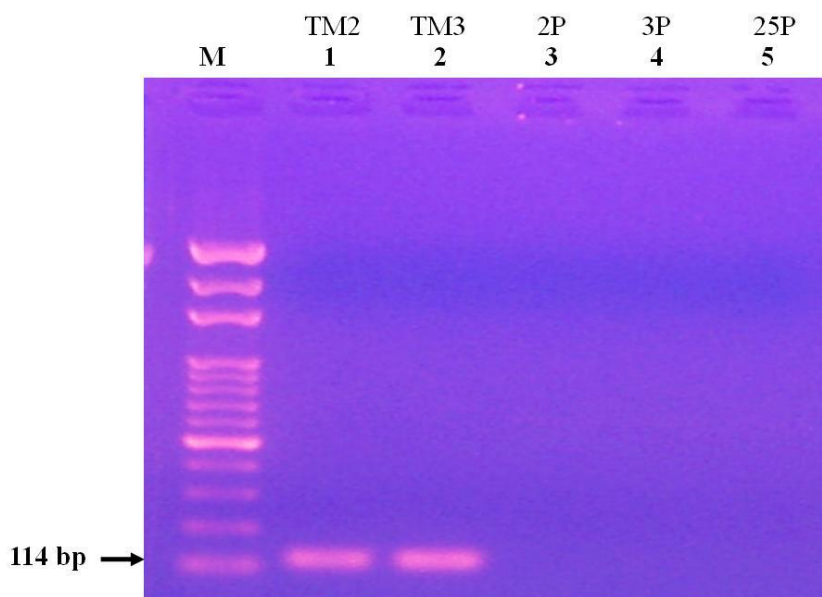
OFF/ON switch assay 之示意圖。



圖【4-33】改良式 OFF/ON switch assay 之機制示意圖。

圖【4-34】為改良式 OFF/ON switch assay 之實驗結果，實驗條件請參見表【3-6】與【4-20】，而表【4-20】中之黏合溫度更改為 60°C，又實驗之所用反置引子為 TM3-25P，其序列請參見表【4-26】。另外，為了確認 *Pfu* polymerase 於此反應條件下之活性，額外使用 THU-MYH-2 與 THU-MYH-3 分別驗證其聚合修復活性，其序列請參見表【2-1】。

由圖【4-34】之 THU-MYH-2 與 THU-MYH-3 之產物訊號(Lane 1 與 Lane 2)可知，*Pfu* polymerase 於此條件下之聚合修復活性是沒問題的。然而，圖【4-34】之 TM3-25P 之產物訊號依舊未如預期呈現 ON 訊號(Lane 5)，仍無法與 THU-MYH-2P 呈現 OFF/ON 之對比訊號。將進一步調降其黏合溫度測試，企圖藉由低黏合溫度使其 *Pfu* polymerase 之修復條件等級降低，而順利修復聚合。



圖【4-34】改良式 OFF/ON switch assay 之反應結果。

Lane M 為 100 bp DNA ladder LC；TM2 為 THU-MYH-2；TM3 為 THU-MYH-3；2P 為 THU-MYH-2P；3P 為 THU-MYH-3P；25P 為 TM3-25P；反應條件請參見表【3-6】與表【4-20】，反應引子序列請參見表【2-1】、【2-3】與【4-26】；Ta 為 60°C。

表【4-26】改良式 OFF/ON switch assay 之 Y165C 突變點對偶性引子之序列

Mutation		Primer name	Sequence(5'→3')
Y165C	Forward	<b>THU-MYH-1</b>	CTACTATACCGGATGGATGC
	WT Reverse	<b>THU-MYH-2P</b>	CGCCGGCCACGAGAATAGT(P)
	MT Reverse	<b>TM3-25P</b>	CGCCGGCCACGAGAATAG <u>C</u> AG CCCA(P)

(P)：表示為 Phosphate modified

底線為錯配位點，亦即鹼基與野生型模板錯誤配對

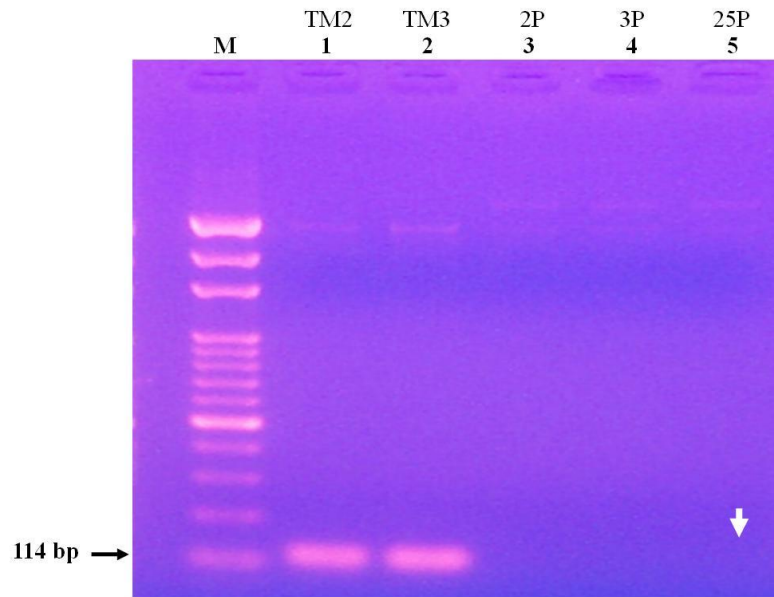
### 調降熱循環之黏合溫度為 50°C

由圖【4-34】可知，改變突變型對偶性引子之設計依舊無法使 *Pfu* polymerase 如預期修復錯配核苷酸，因而無法得到明確之 OFF/ON 訊號。故在此實驗將進一步調降其黏合溫度，企圖使 *Pfu* polymerase 更易行使修復功能。

圖【4-35】為降低黏合溫度之改良式 OFF/ON switch assay 的實驗結果，實驗條件請參見表【3-6】與【4-20】，而表【4-20】中之黏合溫度更改為 50°C，又實驗之所用反置引子為 TM3-25P，其序列請參見表【4-26】。另外，為了確認 *Pfu* polymerase 於此反應條件下之活性，本實驗額外使用 THU-MYH-2 與 THU-MYH-3 分別驗證其聚合修復活性，其序列請參見表【2-1】。同時添加 THU-MYH-2P 與 THU-MYH-3P 反應，藉以比較改良式 OFF/ON switch assay 與 OFF/ON switch assay 之差異。

由圖【4-35】之 THU-MYH-2 與 THU-MYH-3 之產物訊號(Lane 1 與 Lane 2)可知，*Pfu* polymerase 於此條件下之聚合修復活性是沒問題的。然而，圖【4-35】之 TM3-25P 之產物訊號依舊未如預期呈現 ON 訊號(Lane 5)，仍無法與 THU-MYH-2P 呈現 OFF/ON 之對比訊號。推測是否可能因修復不容易，使得 PCR 產量極少而無法顯示，將進一步調整 DNA 模板濃度，企圖增加 DNA 模板量，提高 PCR 產量測試。





圖【4-35】改良式 OFF/ON switch assay 之反應結果。

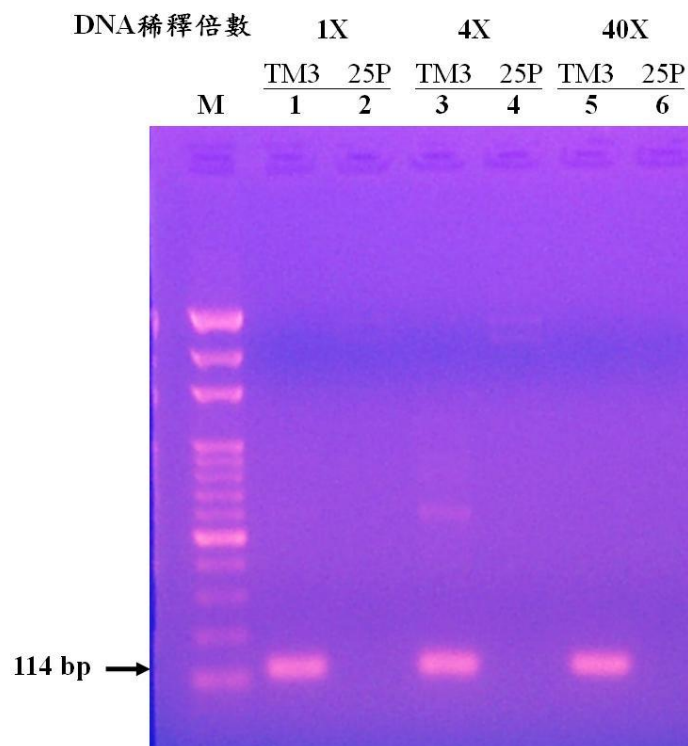
Lane M 為 100 bp DNA ladder LC；TM2 為 THU-MYH-2；TM3 為 THU-MYH-3；2P 為 THU-MYH-2P；3P 為 THU-MYH-3P；25P 為 TM3-25P；反應條件請參見表【3-6】與表【4-20】，反應引子序列請參見表【2-1】、【2-3】與【4-26】； $T_a$  為  $50^{\circ}\text{C}$ 。

## 提高 DNA 模板濃度

由圖【4-34】與【4-35】可知，改變突變型對偶性引子之設計、降低黏合溫度依舊無法使 *Pfu* polymerase 如預期修復錯配核苷酸，因而無法得到明確之 OFF/ON 訊號。故在此實驗將進一步提高 DNA 模板濃度，企圖使 *Pfu* polymerase 更易行使修復功能並使 PCR 之產量提高。

圖【4-36】為之改良式 OFF/ON switch assay 的實驗結果，實驗條件請參見表【3-6】與【4-20】，而表【4-20】中之黏合溫度更改為 55°C，又實驗之所用反置引子為 TM3-25P，其序列請參見表【4-26】。另外，為了確認 *Pfu* polymerase 於此反應條件下之活性，本實驗額外使用 THU-MYH-3 驗證 *Pfu* polymerase 的聚合修復活性，其序列請參見表【2-1】。另外，DNA 模板濃度條件列於表【4-27】。

由圖【4-36】之 THU-MYH-3 之產物訊號可知，*Pfu* polymerase 於此條件下之聚合修復活性是沒問題的。然而，圖【4-36】之 TM3-25P 之產物訊號依舊未如預期呈現 ON 訊號，仍無法與 THU-MYH-2P 呈現 OFF/ON 之對比訊號。故本實驗將進一步提高  $Mg^{2+}$  離子濃度測試，企圖使 *Pfu* polymerase 能如預期發揮其修復功能。



圖【4-36】改良式 OFF/ON switch assay 並增加 DNA 模板濃度之反應結果。

Lane M 為 100 bp DNA ladder LC；TM2 為 THU-MYH-2；TM3 為 THU-MYH-3；2P 為 THU-MYH-2P；3P 為 THU-MYH-3P；25P 為 TM3-25P；反應條件請參見表【3-6】與表【4-20】，模板濃度請參考表【4-27】，反應引子序列請參見表【2-1】、【2-3】與【4-26】； $T_a$  為  $55^\circ\text{C}$ 。

表【4-27】改良式 OFF/ON switch assay 所改變之 DNA 模板濃度條件表

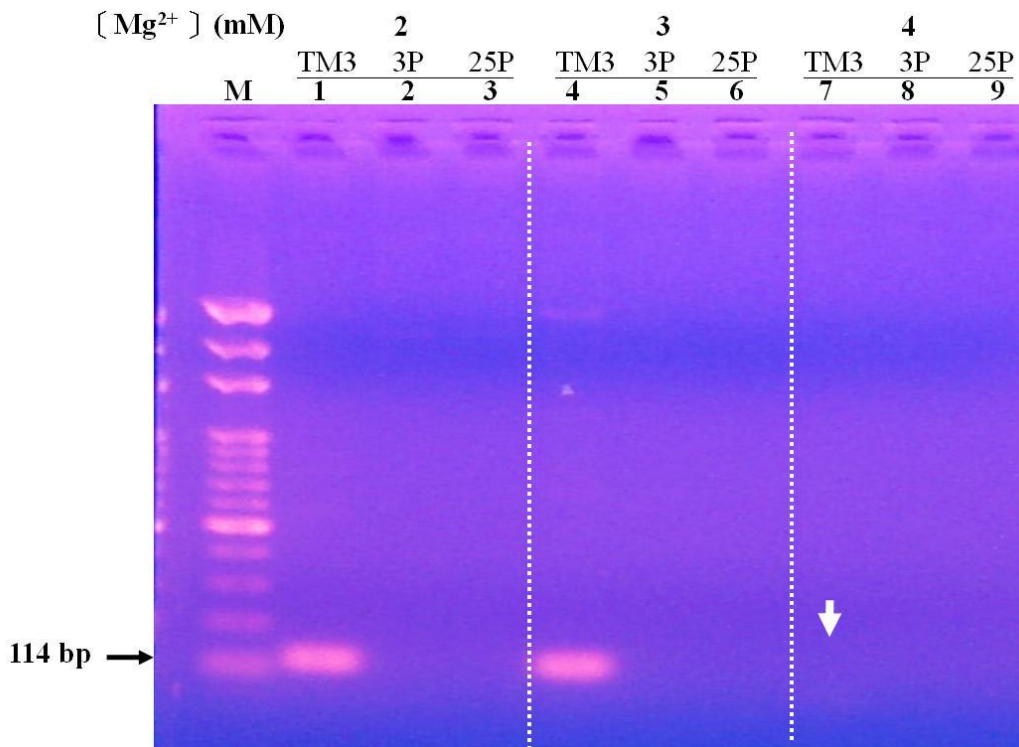
Lane	1	2	3	4	5	6
DNA 模板倍數	1X		4X		40X	
DNA 模板濃度 (ng/ $\mu\text{l}$ )	15000		3750		375	
最終濃度 (ng/ $\mu\text{l}$ )	300		75		7.5	

## 提高 Mg<sup>2+</sup> 濃度

由前面之實驗結果可知，改變突變型對偶性引子之設計、降低黏合溫度以及提高反應之 DNA 模板濃度依舊無法使 *Pfu* polymerase 如預期修復錯配核苷酸，因而無法得到明確之 OFF/ON 訊號。有文獻指出，反應溶液中之二價金屬離子為催化 3'→5' 外切酶修復活性之主要角色(54)，它們也協調著磷酸二酯鍵上的氧，使其更易被移除。故在此實驗將進一步提高 Mg<sup>2+</sup> 離子濃度，企圖使 *Pfu* polymerase 更易行使修復功能。

圖【4-37】為之改良式 OFF/ON switch assay 的實驗結果，實驗條件請參見表【3-6】與【4-20】，而表【4-20】中之黏合溫度更改為 55°C，又實驗之所用反置引子為 TM3-25P，其序列請參見表【4-26】。另外，為了確認 *Pfu* polymerase 於此反應條件下之活性，本實驗額外使用 THU-MYH-3 驗證 *Pfu* polymerase 的聚合修復活性，其序列請參見表【2-1】。另外，DNA 模板濃度為 375 ng/μl。

由圖【4-37】之 THU-MYH-3 之產物訊號可知，*Pfu* polymerase 於此條件下之聚合修復活性是沒問題的。然而，圖【4-37】之 TM3-25P 之產物訊號依舊未如預期呈現 ON 訊號。



圖【4-37】改良式 OFF/ON switch assay 並提高 Mg<sup>2+</sup> 濃度之反應結果。

Lane M 為 100 bp DNA ladder LC；TM3 為 THU-MYH-3；3P 為 THU-MYH-3P；25P 為 TM3-25P；反應條件請參見表【3-6】與表【4-20】，模板濃度為 375 ng/μl，反應引子序列請參見表【2-1】、【2-3】與【4-26】；Ta 為 55°C。

本實驗在 4-4-2 與 4-4-3 節中已分別嘗試了熱循環製程時間、熱循環溫度、DNA Polymerase 混合比例、Mg<sup>2+</sup> 離子濃度及 DNA 模板於反應中濃度之調整，以及選用不同修飾基團反覆測試，最後也針對其特異性引子之設計進行調整測試依舊無法如預期達到 OFF/ON 訊號。

由上述之實驗結果進一步探討，推測可能為突變型對偶性引子額外添加之核苷酸片段過長，進而使其 *Pfu* polymerase 無法在修復過程中快速嵌合至其位點進行移除修復，因而導致其結果不如預期。亦或是特異性引子之 3' 端之惰性基團修飾過大，導致無法如羥基那樣嵌入 *Pfu*

polymerase 之修復活性點，因而無法驅使 *Pfu* polymerase 發揮其移除修復功能。

因而，若不考慮實驗之成本，可進一步縮短突變型對偶性引子額外添加之核苷酸片段之長度進行測試；亦或，將其去羥基修飾之核苷酸更改為 ddNTP 形式之核苷酸，簡單來說，就是將其核苷酸進行脫雙氧之修飾，如此即可將惰性基團之大小降到最小，進而排除惰性基團過大導致無法與外切核酸酶修復位點嵌合之可能性。故由上述之探討顯示，此分析方法仍有待進一步測試確認。

## 第五章 結論與建議

根據文獻顯示，人類 *hMYH* 雙等位基因突變(biallelic germline mutations)對於 *hMYH* 的修復功能有很大的影響(26)；又有研究指出，位於 *hMYH* 基因 Pseudo-HhH motif 區域的突變熱點 Y165C 出現突變的頻率最高(3)，故本研究是以 AS-PCR 方法對修復基因 *hMYH* 中最常見的突變點 - Y165C 進行分析，並建立其他之分析方法檢測 SNPs，企圖提高 SNPs 檢測結果之可信度。在此章節將先針對 Allele-Specific PCR 方法之 PCR 反應條件與反應試劑之最佳化進行探討，接著再將分析方法之實驗結果歸納成兩大部分進行探討：一、利用 AS-PCR 檢測 *hMYH* 基因之突變熱點 Y165C 之探討，二、其他分析方法檢測 *hMYH* 基因之突變熱點 Y165C 之探討。

### 5-1 結論

#### 5-1-1 AS-PCR 反應條件最佳化之探討

由於利用 Allele-Specific PCR 方法檢測 SNPs 之最基本要求為 PCR 反應條件與反應試劑之最佳化，故本實驗於 4-1 節逐一調整 PCR 反應之製程條件以及反應試劑，企圖使 AS-PCR 於適當且嚴謹的條件下進行檢測。

在 4-1-1 節中，本實驗利用對質體 DNA 具專一性切割特性的限制型內切核酸酶 - *Xho* I 與 *Bam*H I 對質體 DNA 進行切割確認。由實驗結果得知，使用 *Bam*H I 對質體 DNA 切割的片段大小為 6998 bp；另外，同

時使用 *Xho* I 與 *Bam*H I 進行切割的片段大小為 1616 bp 和 5382 bp 兩片段，結果皆與預期符合，故確認質體 DNA 為 *pET21a-hMYH* 質體。接著再利用 *hMYH* 基因的定序引子 - PE1 與 PE3 進行 PCR 反應，藉以確認此質體 DNA 是否含有我們所期望之 *hMYH* 基因。由實驗結果之產物訊號顯示，其產物片段位於 1500 bp 與 2000 bp 且較靠近 1500 bp，與預期之 1.6 kb 相符，故可確定此質體 DNA 含有目標基因 - *hMYH*。

確認模板 DNA 無誤後，接著藉由改變模板 DNA 之濃度，尋找適合之反應濃度。由 4-1-2 節之結果得知，當 DNA 濃度稀釋至 375 ng/μl 與 37.5 ng/μl 之間時，訊號有非常明顯地落差。故將在 375 ng/μl 與 37.5 ng/μl 之間選擇其最佳濃度，本實驗選擇 250 ng/μl 作為實驗之模板濃度。

由於本實驗室曾利用改變 dNTP 之混合比例增加 AS-PCR 之特異，由其實驗數據顯示，突變點 Y165C 之對偶性引子在 [GC] : [AT] 比例為 9 : 1 時，能夠明顯區分對偶性引子之差異(1)，故本實驗將尋找一適當之混合比例作為 AS-PCR 之最佳反應條件。由 4-1-3 節之實驗結果得知，無論是 [GC] 比例大於 [AT]，亦或是 [AT] 比例大於 [GC]，兩者之實驗結果皆相同。故得知無論降低哪個去氧核糖核酸之鹼基都可能使反應聚合因缺乏某個去氧核糖核酸的鹼基，而使得整個聚合反應逐漸緩慢下來甚至是停止反應。故本實驗選擇 1 : 1 的比例作為 AS-PCR 反應之條件。



由文獻可知， $Mg^{2+}$  濃度對 AS-PCR 反應中之聚合酶 - *Taq* polymerase 的延伸活性有很大的影響(28)；另外， $Mg^{2+}$  離子亦會與反應溶液中帶負電的特異性引子及 dNTP 結合，故調整適當之  $Mg^{2+}$  濃度是不可或缺的(12)。由 4-1-4 節之實驗結果得知，當  $Mg^{2+}$  濃度設定為 1.5 mM 時，*Taq* polymerase 開始發揮延伸聚合之活性，使得 PCR 產物訊號出現。另外，與野生型模板錯配之突變型對偶性引子 - THU-MYH-3 雖然仍有些微產物訊號產生，但與對照組 - THU-MYH-2 之訊號相比，兩者之產物訊號如預期呈現明顯對比，故選擇 1.5 mM 之  $Mg^{2+}$  濃度為 AS-PCR 反應之最佳反應條件。

綜合以上結果，本實驗設定 AS-PCR 之反應條件為 DNA 模板濃度 250 ng/ $\mu$ l；每 25  $\mu$ l 的反應溶液中含有 dNTP 濃度為 0.4 mM，且 dNTP 混和比例為 1：1；每 25  $\mu$ l 的反應溶液中含有  $Mg^{2+}$  濃度為 1.5 mM。

### 5-1-2 利用 AS-PCR 檢測 *hMYH* 基因之突變熱點 Y165C 之探討

依據 4-1 節 AS-PCR 反應條件最佳化之探討，4-2 節將 AS-PCR 之反應條件設定為以下條件：(1) 模板 DNA 濃度為 250 ng/ $\mu$ l；(2) 每 25  $\mu$ l 的反應溶液中含有 dNTP 濃度為 0.4 mM，且 dNTP 混和比例為 1：1；(3) 每 25  $\mu$ l 的反應溶液中含有  $Mg^{2+}$  濃度為 1.5 mM。

由圖【4-8】、【4-10】以及【4-11】之實驗結果可得知，當黏合溫度為 65°C 時，THU-MYH-3 雖然無法完全地終止反應，但 THU-MYH-3 與對照組 - THU-MYH-2 有較明顯之 ON/OFF 對比訊號。

根據文獻顯示，在靠近引子之 3'端位置增加額外之鹼基錯配，可增加 AS-PCR 之可信度(55)。由圖【4-12】之實驗結果得知，THU-MYH-2M 因與野生型模板形成胞嘧啶：胞嘧啶(C：C)的錯配模式，導致其螺旋結構太窄而不穩定(12)，使得  $T_a$  值為 65°C 時，THU-MYH-2M 完全地終止反應，而與對照組呈現明顯的 ON/OFF 訊號。另外，由圖【4-13】之實驗結果可得，THU-MYH-3M 與野生型模板有兩個錯配，所以在  $T_a$  值為 53.1°C 時，THU-MYH-3M 即能成功終止反應，呈現所期望之 OFF 訊號，並與對照組 - THU-MYH-2 呈現明顯的對比訊號。

由文獻得知，選擇一具有修復功能之 DNA 聚合酶，能有效地針對錯誤之核苷酸進一步移除並修復(34)。圖【4-14】為使用不同 DNA 聚合酶並反應於 57.4°C 之實驗結果，由結果可看出，無論是單純使用 *Pfu*

polymerase，或是 *Taq*、*Pfu* 混合使用皆呈現 ON 訊號。然而，從圖【4-14】之電泳分析結果發現，發現使用 *Taq* polymerase 反應的 THU-MYH-3 與 THU-MYH-2M 之產物是個錯誤配對的假陽性訊號；反之，使用 *Pfu* polymerase 反應的 THU-MYH-3 與 THU-MYH-2M 之產物定序結果則為實驗之目標產物。由於此實驗利用 *Pfu* polymerase 將突變型對偶性引子與野生型模板之錯配移除修復，進而獲得 PCR 之產物；然而，這與野生型模板正確配對之特異性引子亦獲得相同之 PCR 產物訊號，與最初建立的 AS-PCR 分析方法原理是不符合的。

統整以上探討得知，設計對偶性引子時，將引子與模板之錯配方式設計為嘌呤：嘌呤配對，或是嘧啶：嘧啶配對，即可使其螺旋結構之穩定性降低，進而提升 AS-PCR 之靈敏度。亦或是於特異性引子之 3'端連續設計兩個錯配，使得引子之 3'端形成一個較大的氣泡(bubble)，進而提升 AS-PCR 之靈敏度。

### 5-1-3 其他分析方法檢測 *hMYH* 基因之突變熱點 Y165C 之探討

#### ON/OFF switch assay

本實驗所使用之反應條件為：(1) 模板 DNA 濃度為 250 ng/μl；(2) 每 25 μl 的反應溶液中含有 dNTP 濃度為 0.4 mM，且 dNTP 混和比例為 1:1；(3) 緩衝液(Reaction buffer) pH 值為 8.0 (at 25°C)，且含 2 mM 的 Mg<sup>2+</sup> 濃度。

圖【4-15】為黏合溫度設定為 58°C 之實驗結果，由結果得知，與野生型模板形成兩個錯配的 THU-MYH-3MPS，無論是與 *Taq* polymerase 進行 PCR，亦或是與 *Pfu* polymerase 一同進行 PCR 反應，皆如預期終止 PCR 反應，呈現 OFF 訊號，並與對照組 - THU-MYH-2PS 呈現 ON/OFF 的明顯對比。此結果與 4-3-1 節之 THU-MYH-3M 應用於 AS-PCR 之結果相似，故於特異性引子之 3' 端設計連續之雙錯配，增加 PCR 之延伸阻力，對於 AS-PCR 或是 ON/OFF switch assay 之特異性皆有幫助，進而促使 SNPs 分析的可信度大幅提高。

由圖【4-16】、【4-17】與【4-18】之實驗結果可發現，THU-MYH-2MPS、THU-MYH-3PS 與 THU-MYH-3GPS 皆與野生型模板形成單一錯配，但 THU-MYH-2MPS 與 THU-MYH-3GPS 與野生型模板錯配模式為嘧啶：嘧啶，或是嘌呤：嘌呤，使得螺旋結構間之距離不是太窄就是太寬，而導致螺旋結構之穩定性下降(12)，因此調整黏合溫度至 63°C 即可終止反應。

反之，與野生型模板形成嘧啶：嘌呤錯配的 THU-MYH-3PS，雖然其配對間無法形成正確的氫鍵，但其螺旋結構是符合雙螺旋之理想距離，因而須提高黏合溫度至 65°C 才可終止反應。故由此探討可知，設定 PCR 之最佳黏合溫度時，須考慮特異性引子與模板間之錯配模式再行調整，而此結論與 4-3-1 節之推測相符合。

由圖【4-15】、【4-16】以及【4-17】之結果統整得知，*Taq* polymerase 因缺乏 3'→5'端外切修復功能，而對於模板與引子 3'端間の間距(gap)要求較嚴苛。因此，對於硫代磷酸化修飾的 THU-MYH-2MPS 與 THU-MYH-3PS 而言，兩者之 3'端與模板間之間距不足以阻礙 *Taq* polymerase 的延伸聚合能力，導致 *Taq* polymerase 仍用極佳的延伸聚合能力跨過錯配位點，而產生錯配之假陽性訊號。

進一步將 4-2 與 4-3-1 節之 AS-PCR 結果與 ON/OFF switch assay by *Pfu* polymerase 之結果比較可發現，修飾硫代磷酸化之特異性引子，因磷酸二酯鍵以 S 原子替換掉一個 O 原子，使得整體之負電荷下降，而導致螺旋結構之穩定性降低(44,48)。因此，修飾硫代磷酸的特異性引子應用於 PCR 反應時，其所設定之 Ta 值相較於未修飾之特異性引子而言來得低。

由圖【4-20】、【4-21】與【4-22】之實驗結果得知，黏合溫度為 60°C 時，與野生型模板連續形成兩個錯配之 THU-MYH-3MLNA 無論是使

用 *Taq* polymerase 或是 *Pfu* polymerase 皆能與其對照組 - THU-MYH-2LNA 呈現 ON/OFF 訊號之差異。此結果不只與 4-3-1 節之 THU-MYH-3M 應用於 AS-PCR 之結果相似；亦與硫代磷酸化修飾之 THU-MYH-3MPS 之 PCR 結果相似。另外，THU-MYH-3LNA 與 THU-MYH-2MLNA 皆與 *Taq* polymerase 進行反應時，THU-MYH-2MLNA 的 Ta 值調整至 60°C，即可呈現 OFF 訊號。而 THU-MYH-3LNA 則須調整至 63°C 時，才如預期呈現 OFF 訊號。

統整硫代磷酸修飾與鎖核酸修飾反應於不同的 DNA polymerase 發現，修飾鎖核酸之特異性引子，因其 3'端具有雙環之特性，能與模板形成較大之 gap，故搭配 *Taq* polymerase 進行 PCR 反應，即可如預期終止反應，並與對照組 - THU-MYH-2LNA 呈現明顯地 ON/OFF 訊號，此結論與先前之推測相符合。另外，硫代磷酸化修飾之特異性引子，則因具有降低雙螺旋結構穩定性之特性，故設定適當之 Ta 值 並搭配 *Pfu* polymerase 進行 PCR 反應，即可如預期終止反應，進而與對照組 - THU-MYH-2PS 呈現 ON/OFF 之對比訊號。

在 4-4-2 節中，我們藉由改變 dNTP 濃度改善硫代磷酸化引子應用於 ON/OFF switch assay 之靈敏度。由圖【4-23- b】、【4-24】、【4-25】與【4-27】之結果可知，dNTP 濃度於極低的情況下，可使得 THU-MYH-3PS、THU-MYH-2MPS、THU-MYH-3MPS 以及 THU-MYH-3LNA 如預期呈現

OFF 訊號，且與對照組呈現極易分辨之 ON/OFF 訊號。然而，若拉長其黏合延伸之製程時間或是 PCR 溶液中的 dNTP 濃度不夠低，即無法有效地終止反應。綜合 4-4-2 節之探討可知，欲藉由降低 dNTP 濃度來提高 PCR 之靈敏度，除了反應溶液中的 dNTP 濃度需調降至臨界濃度之外，還需與 PCR 之熱循環製程相互搭配，才能使 PCR 訊號如預期呈現明顯之 ON/OFF 訊號。

另外，圖【4-26】為 *Taq* polymerase 於 0.005 mM 至 0.0001 mM 的 dNTP 濃度下進行 PCR 之實驗結果。由結果得知，dNTP 濃度為 0.005 mM 時，THU-MYH-3 與 THU-MYH-3PS 皆呈現假陽性訊號，與對照組 - THU-MYH-2PS 一樣呈現 ON 訊號；然而，dNTP 濃度降低至 0.0001 mM 時，其訊號皆因濃度過低而呈現 OFF 訊號，而無法判斷其 ON/OFF 訊號。故可知，欲藉由調整 dNTP 濃度來提升 *Taq* polymerase 之專一性成效不佳。

### **OFF/ON switch assay**

本實驗所使用之基本反應條件為：(1) 模板 DNA 濃度為 250 ng/μl；(2) 每 25 μl 的反應溶液中含有 dNTP 濃度為 0.4 mM，且 dNTP 混和比例為 1：1；(3) 緩衝液(Reaction buffer) pH 值為 8.0 (at 25°C)，且含 2 mM 的 Mg<sup>2+</sup> 濃度。

在 4-4-2 與 4-4-3 節中，我們分別嘗試了熱循環製程時間、熱循環溫度、DNA Polymerase 混合比例、Mg<sup>2+</sup> 離子濃度及 DNA 模板於反應中濃度之調整，也選用了不同修飾基團反覆測試，最後也針對其特異性引子之設計進行調整測試依舊無法如預期達到 OFF/ON 訊號。

改良式 OFF/ON switch assay 未如預期達到 OFF/ON 訊號之原因，推測可能為突變型對偶性引子額外添加之核苷酸片段過長，亦或是特異性引子之 3'端之惰性基團修飾過大，進而使其 *Pfu* polymerase 無法在修復過程中快速嵌合至其位點進行移除修復，或是無法如羥基那樣嵌入 *Pfu* polymerase 之修復活性點，導致無法驅使 *Pfu* polymerase 發揮其移除修復之功能。



## 5-2 未來建議

在 4-4-2 與 4-4-3 節中，我們嘗試了調整各種實驗條件，依舊無法如預期達到 OFF/ON 訊號，而無法利用 OFF/ON switch assay 進行檢測。倘若不考慮實驗之成本，建議未來可進一步縮短突變型對偶性引子額外添加之核苷酸片段之長度進行測試；亦或，將其去羥基修飾之核苷酸更改為 ddNTP 形式之核苷酸，使修飾上之惰性基團大小降到最小，進一步測試 OFF/ON switch assay 之可行性。

在大腸直腸癌的病例中，已發表的突變熱點有 Y165C、G382D、V232F 和 R227W 等。然而，本研究所建立之分析方法 AS-PCR、ON/OFF switch assay 以及 OFF/ON switch assay 皆只針對 *hMYH* 基因上之突變點 - Y165C 設計實驗並探討，故建議未來可對其他突變點進一步測試探討。

本研究分別利用了 AS-PCR、ON/OFF switch assay 以及 OFF/ON switch assay 對 *hMYH* 基因之 SNPs 進行檢測。由實驗結果統整出，AS-PCR 與 ON/OFF switch assay 進行檢測時，反應之對偶性引子與模板之間之錯配模式以嘌呤：嘌呤配對、嘧啶：嘧啶配對，亦或是於引子之 3'端連續設計兩個錯配為最佳。又由 QIAamp DNA blood mini kits 之使用手冊得知，200  $\mu$ l 的血液量可得 3-12  $\mu$ g 之 DNA，而本實驗使用的 DNA 模板濃度為 5  $\mu$ g/ml，如應用於檢測分析上是可行的，故建議未來可利用其他之突變熱點進一步再次確認，並實際應用於大腸直腸癌患者之檢體篩選上。

## 參考文獻

1. 方亭亭, 顧野松博士. (2008) AS-PCR 應用於大腸直腸癌之 *hMYH* 基因多態性. 東海大學化學工程研究所 碩士論文.
2. 郭志鎰, 蕭松瑞博士. (2003) 大腸直腸癌致癌機轉之探討. 中山醫學大學生物化學研究所 碩士論文.
3. Sampson, J.R., Jones, S., Dolwani, S. and Cheadle, J.P. (2005) MutYH (MYH) and colorectal cancer. *Biochem Soc Trans*, **33**, 679-683.
4. 李茂佑, 黃弘文博士. (2005) 蛋白質體學之大腸直腸癌差異性蛋白質表現分析. 中山大學生物醫學科學研究所 碩士論文.
5. 彭富山, 顧野松博士. (2003) 在大腸桿菌系統中表達人類 MutY 同源之醣基解酶修復蛋白 hMYH. 東海大學化學工程研究所 碩士論文.
6. Halliwell, B. (1989) Free radicals, reactive oxygen species and human disease: a critical evaluation with special reference to atherosclerosis. *Br J Exp Pathol*, **70**, 737-757.
7. Esterbauer, H., Eckl, P. and Ortner, A. (1990) Possible mutagens derived from lipids and lipid precursors. *Mutat Res*, **238**, 223-233.
8. Chen, L.L., Zhang, J., Peng, C.Y., Liao, D.F., Li, H.J., Gao, H.L. and Li, K. (2005) [Novel mechanism of 3' exonuclease of polymerase in maintenance of DNA replication fidelity and its application in SNP assay]. *Yi Chuan*, **27**, 279-283.
9. Michaels, M.L., Tchou, J., Grollman, A.P. and Miller, J.H. (1992) A

- repair system for 8-oxo-7,8-dihydrodeoxyguanine. *Biochemistry*, **31**, 10964-10968.
10. Shibutani, S., Takeshita, M. and Grollman, A.P. (1991) Insertion of specific bases during DNA synthesis past the oxidation-damaged base 8-oxodG. *Nature*, **349**, 431-434.
  11. Wood, M.L., Esteve, A., Morningstar, M.L., Kuziemko, G.M. and Essigmann, J.M. (1992) Genetic effects of oxidative DNA damage: comparative mutagenesis of 7,8-dihydro-8-oxoguanine and 7,8-dihydro-8-oxoadenine in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res*, **20**, 6023-6032.
  12. Campbell, M.K. and Farrell, S.O. (2006) *Biochemistry, Fifth Edition*. Thomson Brooks/Cole.
  13. Eisen, J.A. and Hanawalt, P.C. (1999) A phylogenomic study of DNA repair genes, proteins, and processes. *Mutat Res*, **435**, 171-213.
  14. Wood, M.L., Dizdaroglu, M., Gajewski, E. and Essigmann, J.M. (1990) Mechanistic studies of ionizing radiation and oxidative mutagenesis: genetic effects of a single 8-hydroxyguanine (7-hydro-8-oxoguanine) residue inserted at a unique site in a viral genome. *Biochemistry*, **29**, 7024-7032.
  15. Modrich, P. (1994) Mismatch repair, genetic stability, and cancer. *Science*, **266**, 1959-1960.
  16. Colussi, C., Parlanti, E., Degan, P., Aquilina, G., Barnes, D., Macpherson, P., Karran, P., Crescenzi, M., Dogliotti, E. and Bignami, M. (2002) The mammalian mismatch repair pathway removes DNA 8-oxodGMP incorporated from the oxidized dNTP pool. *Curr Biol*, **12**,

- 912-918.
17. Krokan, H.E., Nilsen, H., Skorpen, F., Otterlei, M. and Slupphaug, G. (2000) Base excision repair of DNA in mammalian cells. *FEBS Lett*, **476**, 73-77.
  18. Lu, A.L., Li, X., Gu, Y., Wright, P.M. and Chang, D.Y. (2001) Repair of oxidative DNA damage: mechanisms and functions. *Cell Biochem Biophys*, **35**, 141-170.
  19. Gu, Y., Parker, A., Wilson, T.M., Bai, H., Chang, D.Y. and Lu, A.L. (2002) Human MutY homolog, a DNA glycosylase involved in base excision repair, physically and functionally interacts with mismatch repair proteins human MutS homolog 2/human MutS homolog 6. *J Biol Chem*, **277**, 11135-11142.
  20. Shinmura, K., Kasai, H., Sasaki, A., Sugimura, H. and Yokota, J. (1997) 8-hydroxyguanine (7,8-dihydro-8-oxoguanine) DNA glycosylase and AP lyase activities of hOGG1 protein and their substrate specificity. *Mutat Res*, **385**, 75-82.
  21. Slupska, M.M., Baikalov, C., Luther, W.M., Chiang, J.H., Wei, Y.F. and Miller, J.H. (1996) Cloning and sequencing a human homolog (hMYH) of the Escherichia coli mutY gene whose function is required for the repair of oxidative DNA damage. *J Bacteriol*, **178**, 3885-3892.
  22. Takao, M., Aburatani, H., Kobayashi, K. and Yasui, A. (1998) Mitochondrial targeting of human DNA glycosylases for repair of oxidative DNA damage. *Nucleic Acids Res*, **26**, 2917-2922.
  23. Tsai-Wu, J.J., Su, H.T., Wu, Y.L., Hsu, S.M. and Wu, C.H. (2000) Nuclear localization of the human mutY homologue hMYH. *J Cell*

- Biochem*, **77**, 666-677.
24. Fromme, J.C., Banerjee, A., Huang, S.J. and Verdine, G.L. (2004) Structural basis for removal of adenine mispaired with 8-oxoguanine by MutY adenine DNA glycosylase. *Nature*, **427**, 652-656.
  25. Bai, H., Jones, S., Guan, X., Wilson, T.M., Sampson, J.R., Cheadle, J.P. and Lu, A.L. (2005) Functional characterization of two human MutY homolog (hMYH) missense mutations (R227W and V232F) that lie within the putative hMSH6 binding domain and are associated with hMYH polyposis. *Nucleic Acids Res*, **33**, 597-604.
  26. Tajiri, T., Maki, H. and Sekiguchi, M. (1995) Functional cooperation of MutT, MutM and MutY proteins in preventing mutations caused by spontaneous oxidation of guanine nucleotide in Escherichia coli. *Mutat Res*, **336**, 257-267.
  27. Enholm, S., Hienonen, T., Suomalainen, A., Lipton, L., Tomlinson, I., Karja, V., Eskelinen, M., Mecklin, J.P., Karhu, A., Jarvinen, H.J. *et al.* (2003) Proportion and phenotype of MYH-associated colorectal neoplasia in a population-based series of Finnish colorectal cancer patients. *Am J Pathol*, **163**, 827-832.
  28. 張建裕，張建國。(2004) *基礎PCR*. 藝軒圖書出版社，台北。
  29. Bottema, C.D. and Sommer, S.S. (1993) PCR amplification of specific alleles: rapid detection of known mutations and polymorphisms. *Mutat Res*, **288**, 93-102.
  30. Shlomai, J. and Kornberg, A. (1980) A prepriming DNA replication enzyme of Escherichia coli. II. Actions of protein n': a sequence-specific, DNA-dependent ATPase. *J Biol Chem*, **255**,

6794-6798.

31. Eckert, K.A. and Kunkel, T.A. (1991) DNA polymerase fidelity and the polymerase chain reaction. *PCR Methods Appl*, **1**, 17-24.
32. Shen, C., Yang, W., Ji, Q., Maki, H., Dong, A. and Zhang, Z. (2009) NanoPCR observation: different levels of DNA replication fidelity in nanoparticle-enhanced polymerase chain reactions. *Nanotechnology*, **20**, 455103.
33. Vu, B.V., Litvinov, D. and Willson, R.C. (2008) Gold nanoparticle effects in polymerase chain reaction: favoring of smaller products by polymerase adsorption. *Anal Chem*, **80**, 5462-5467.
34. Cline, J., Braman, J.C. and Hogrefe, H.H. (1996) PCR fidelity of pfu DNA polymerase and other thermostable DNA polymerases. *Nucleic Acids Res*, **24**, 3546-3551.
35. Zhang, J., Li, K., Pardinias, J.R., Sommer, S.S. and Yao, K.T. (2005) Proofreading genotyping assays mediated by high fidelity exo+ DNA polymerases. *Trends Biotechnol*, **23**, 92-96.
36. Bi, W. and Stambrook, P.J. (1998) Detection of known mutation by proof-reading PCR. *Nucleic Acids Res*, **26**, 3073-3075.
37. King, G.C., Di Giusto, D.A., Wlassoff, W.A., Giesebrecht, S., Flening, E. and Tyrelle, G.D. (2004) Proofreading genotyping assays and electrochemical detection of SNPs. *Hum Mutat*, **23**, 420-425.
38. Zhang, J., Chen, L.L., Guo, Z.F., Peng, C.Y., Liao, D.F. and Li, K. (2003) On/off switch mediated by Exo+ polymerases: experimental analysis for its physiological and technological implications. *J Biochem Mol Biol*, **36**, 529-532.

39. Lin-Ling, C., Zhang, J., Sommer, S.S. and Li, K. (2005) Single-base discrimination mediated by proofreading inert allele specific Primers. *J Biochem Mol Biol*, **38**, 24-27.
40. Kim, H., Kim, H.J., Chi, S.G., Lee, S.K., Joo, G.R., Dong, S.H., Kim, B.H., Chang, Y.W., Lee, J.I. and Chang, R. (2006) Absence of MutY homologue mutation in patients with multiple sporadic adenomatous polyps in Korea. *World J Gastroenterol*, **12**, 951-955.
41. Stein, C.A., Tonkinson, J.L. and Yakubov, L. (1991) Phosphorothioate oligodeoxynucleotides--anti-sense inhibitors of gene expression? *Pharmacol Ther*, **52**, 365-384.
42. Skerra, A. (1992) Phosphorothioate primers improve the amplification of DNA sequences by DNA polymerases with proofreading activity. *Nucleic Acids Res*, **20**, 3551-3554.
43. Ghosh, M.K., Ghosh, K., Dahl, O. and Cohen, J.S. (1993) Evaluation of some properties of a phosphorodithioate oligodeoxyribonucleotide for antisense application. *Nucleic Acids Res*, **21**, 5761-5766.
44. Jaroszewski, J.W., Clausen, V., Cohen, J.S. and Dahl, O. (1996) NMR investigations of duplex stability of phosphorothioate and phosphorodithioate DNA analogues modified in both strands. *Nucleic Acids Res*, **24**, 829-834.
45. Di Giusto, D. and King, G.C. (2003) Single base extension (SBE) with proofreading polymerases and phosphorothioate primers: improved fidelity in single-substrate assays. *Nucleic Acids Res*, **31**, e7.
46. Yang, H.L., Jiang, H.J., Fang, W.Y., Xu, Y.Y., Liao, D.F. and He, F.C. (2005) High fidelity PCR with an off/on switch mediated by

- proofreading polymerases combining with phosphorothioate-modified primer. *Biochem Biophys Res Commun*, **328**, 265-272.
47. Hu, Y.J., Li, Z.F. and Diamond, A.M. (2007) Enhanced discrimination of single nucleotide polymorphism in genotyping by phosphorothioate proofreading allele-specific amplification. *Anal Biochem*, **369**, 54-59.
  48. Nawrot, B., Paul, N., Rebowska, B. and Stec, W.J. (2008) Significance of stereochemistry of 3'-terminal phosphorothioate-modified primer in DNA polymerase-mediated chain extension. *Mol Biotechnol*, **40**, 119-126.
  49. Orum, H., Nielsen, P.E., Egholm, M., Berg, R.H., Buchardt, O. and Stanley, C. (1993) Single base pair mutation analysis by PNA directed PCR clamping. *Nucleic Acids Res*, **21**, 5332-5336.
  50. Christensen, U., Jacobsen, N., Rajwanshi, V.K., Wengel, J. and Koch, T. (2001) Stopped-flow kinetics of locked nucleic acid (LNA)-oligonucleotide duplex formation: studies of LNA-DNA and DNA-DNA interactions. *Biochem J*, **354**, 481-484.
  51. Latorra, D., Campbell, K., Wolter, A. and Hurley, J.M. (2003) Enhanced allele-specific PCR discrimination in SNP genotyping using 3' locked nucleic acid (LNA) primers. *Hum Mutat*, **22**, 79-85.
  52. Latorra, D., Arar, K. and Hurley, J.M. (2003) Design considerations and effects of LNA in PCR primers. *Mol Cell Probes*, **17**, 253-259.
  53. Karkare, S. and Bhatnagar, D. (2006) Promising nucleic acid analogs and mimics: characteristic features and applications of PNA, LNA, and morpholino. *Appl Microbiol Biotechnol*, **71**, 575-586.
  54. Joyce, C.M. and Steitz, T.A. (1994) Function and structure



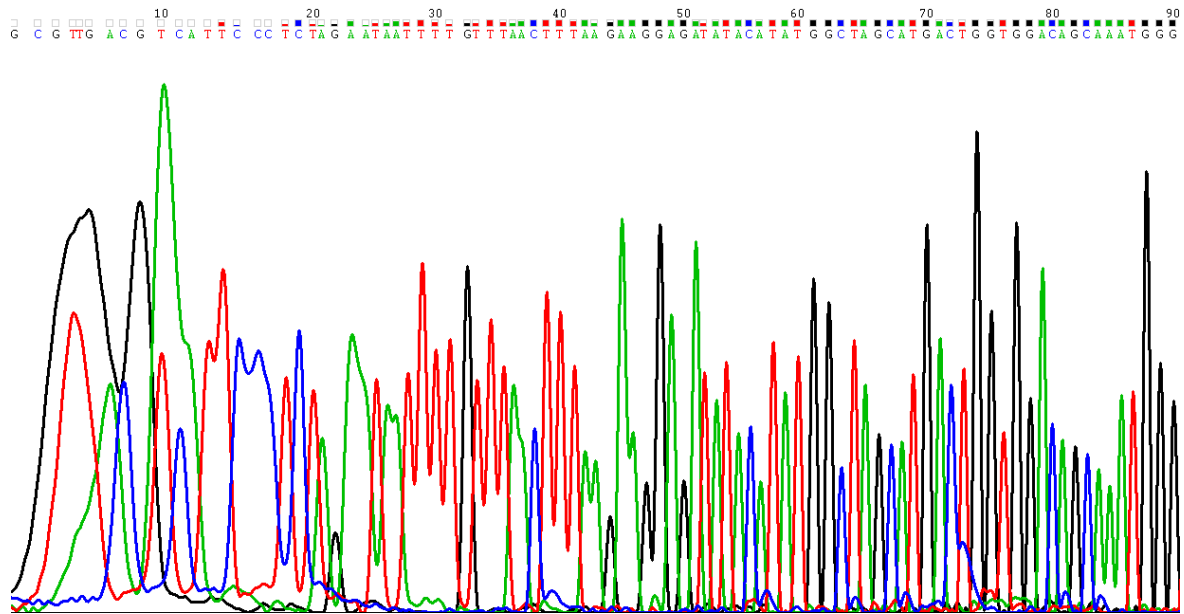
- relationships in DNA polymerases. *Annu Rev Biochem*, **63**, 777-822.
55. Newton, C.R., Graham, A., Heptinstall, L.E., Powell, S.J., Summers, C., Kalsheker, N., Smith, J.C. and Markham, A.F. (1989) Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucleic Acids Res*, **17**, 2503-2516.

【附錄一】 *hMYH* 基因之定序結果：

(a) 為使用 T7(forward primer)之定序結果

(b) 為使用 T7t(reverse primer)之定序結果

(a)



(b)

