

東海大學化學研究所

碩士論文

Department of Chemistry

Tunghai University

Master Thesis

分子邏輯閘式 A 型流感病毒基因分析方法之研究
Molecular Logic Gate-Based Analytical Method for Viral
Genes of Influenza A Virus

The seal of Tunghai University is a circular emblem with a scalloped outer edge. It features a central cross, a horizontal line, and three interlocking rings. The text 'TUNG HAI UNIVERSITY' is written around the inner circle, and '1955' is at the bottom. The name '東海大學' is written in Chinese characters at the top.

李俊慶

Chun-Ching Lee

指導教授：莊旻傑 博士

Advisor: Min-Chieh Chuang, Ph.D.

中華民國 104 年 6 月

June, 2015

謝誌

首先要感謝家人的支持與支援，在我遇到挫折時給予鼓勵，讓我無後顧之憂地完成碩士班學位，期許在畢業後能給予家人一絲回饋。

在學期間感謝指導教授莊旻傑老師付諸細心、用心、耐心和苦口婆心的指導，讓我學習到如何具有邏輯性的思考以及準確性的判斷，在我遇到困難時不厭其煩的給予意見。從老師身上學到不屈不撓的研究精神以及追根究底的尋找問題所在，老師經常勉勵我們，人需要脫離舒適圈才能突破自我，而我秉持這樣的精神於求學的兩年間努力，讓我順利解決許多困難並完成碩士論文。感謝台灣大學的陳林祈老師和中山大學的曾韋龍老師擔任口試委員，給予論文上寶貴的建議、疏漏的指證以及改善之處，讓我的碩士論文更加完整。

在 LEB 實驗室的日子裡，非常感謝雨萱學姊指導我如何操作 DNA 實驗，以及耐心的花時間教導我生物上的知識，並在我遇到困難時常常給予幫助。感謝心慈和佩嫻一同度過碩一的高壓時期，大家互相幫忙晚上挑燈夜戰讀書幫助我很快能抓到重點。感謝詩穎和國誠在我碩二忙碌期間給予實驗上的幫助。感謝許員豪老師實驗室的苑芯和韋維，指導我實驗儀器的操作以及實驗上的幫助。感謝許多一同相處過卻未提及的朋友們，謝謝你們為我留下豐富美好的研究生回憶。

中文摘要

由於 A 型流感病毒經由動物和人類之間交互感染因而產生高致病性的病毒株，進而嚴重危害人體健康，因此於臨床診斷高致病性流感病毒的工具為目前急需的方法，於本研究中發展了具專一性且靈敏地同時偵測血球凝集素(hemagglutinin, HA)和神經氨酸酶(neuraminidase, NA)特定基因片段的方法，利用具莖環結構(stem-loop structure)的核酸分子探針(molecular beacon) 及布林 AND 邏輯閘機制運算輸出訊號，以降低人為誤判的機會及達到同時偵測雙重基因片段。為了更深入了解同時由雙重基因片段引發分子探針二級結構的變化，本研究使用光學檢測方法針對多個重要因素進行探討，包括序列組成及雜交位置(雜交於分子探針莖部區域的核酸數目)對分子探針構型的影響；參與輔助鏈(assistant strand)幫助霍利迪交叉構型(Holliday junction)的形成；調控霍利迪結構交叉處未配對核酸(unpaired nucleotides)數目造成的影響；以及特定基因片段的選擇。實驗結果顯示，本研究所發展的分針探針能夠專一性的同時偵測流感病毒亞型的雙重基因片段，在 H5 與 N2 基因片段同時存在時呈現明顯的陽性結果，且只有同時存在 H5 和 N2 基因片段的情況下相較於其他組合(不存在 H5 和 N2 基因片段、只有 H5 基因片段和只有 N2 基因片段)，得到顯著的螢光訊號。此外，本研究同時探討於雙重基因片段存在之下分子探針解折疊(unfolding)的熱力學和動力學行為，我們發現於不同的溫度和不同未配對核酸數目會影響分子探針解折疊的速率以及熵和焓的變化，且此效應與分子探針熱力學穩定程度及霍利迪結構交叉處鬆緊程度相關。為了達成提高靈敏度的目標，我們進一步利用 DNA 聚合酶(polymerase)進行鏈取代反應(strand displacement)及產生螢光共振能量轉移效應(Fluorescence Resonance Energy Transfer, FRET)達到訊號擴增的效果，進而提升感測靈敏度，結果顯示此感測機制對於三種陰性組合不易產生偽陽性結果，此感測系統對於同時存在 H5 和 N2 基因片段的偵測極限為 7 pM。此外，結果顯示此分析方法對於未經純化的聚合酶鏈式反應(polymerase chain reaction, PCR)產物具有良好的感測能力，在 H5 和 N2 的 PCR 產物同時存在下相較於其他三種陰性組合有明顯的訊號區別。此分

析技術具有高度應用性，亦開啟以分子探針為核心之雙重目標物分析方法於分子診斷之應用。



英文摘要

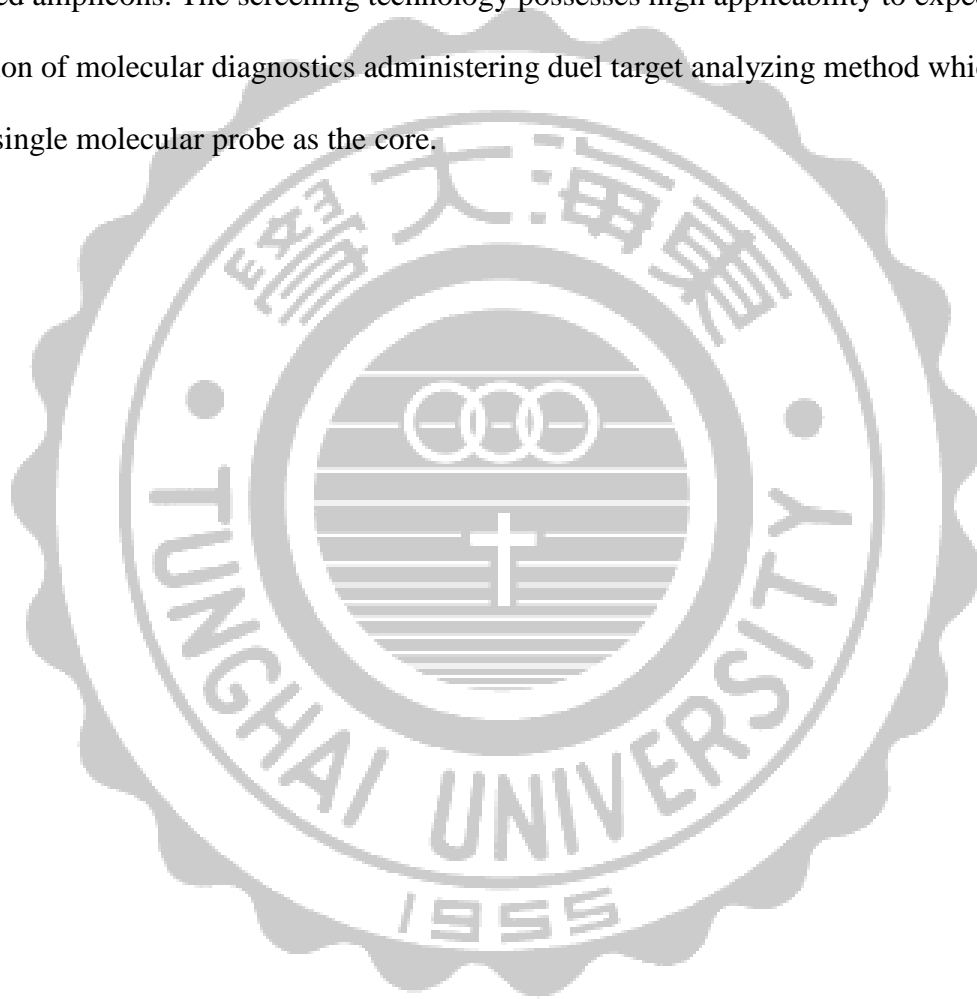
Influenza A viruses, pathogens that continuously circulate and mutate among bird, pig, and human hosts, have caused substantial morbidity and mortality globally since the Middle Ages. The emergence of novel virus strains that are capable of causing epidemics or pandemics is even posing tremendous treats to human health. Prior investigation has indicated that the continuous and complex mutation of viruses and concurrent gene expressions of multi-genes were the crucial causes leading to influenza virus pathogenesis. This underlines the significance of simultaneous diagnostics of multiple genes and necessitates an accurate and rapid subtyping assay to satisfy the urgent need in the clinical diagnosis and disease control of influenza.

Motivated by the demand in analysis of multiple sequences, we developed an intelligent strategy based on molecular beacons (MBs), in cooperation with an assistant strand, to logically process dual input genes of hemagglutinin (HA) and neuraminidase (NA) in a **AND** gate format. Notably, the prerequisite for opening the designed MB in our study was different from conventional configurations reported in “1 input- 1 output fashion”, enabling this strategy suitable for high-fidelity dual-input determination. Systematic insights on the thermodynamic and kinetic parameters were provided to facilitate appropriate designs of MB and the assistant strand. The results concluded a **AND** gate-most preferable combination of unpaired nucleotide (1,2), in which the greatest output dynamic difference between the simultaneous presence of dual-input and any other scenarios was given, in connection to a MB unzipping rate at $33,235 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ and entropy change (ΔS_{12}) at $647 \text{ Jmol}^{-1}\text{K}^{-1}$.

In addition, the study investigated thermodynamics and kinetics of MB unfolding as functions of unpaired nucleotides and temperature which altered the formation and stability of the Holliday junction. To approach a further lower limit of detection, we utilized polymerase

to undergo strand displacement and Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET), attaining signal amplification and sensitivity increase. The signal was low at the three negative combinations in connection to the limit of detection at 7 pM for the simultaneous presence of H5 and N2 genetic fragments.

Eventually high-fidelity subtyping of influenza virus was implemented in sample of unpurified amplicons. The screening technology possesses high applicability to expedite the application of molecular diagnostics administering dual target analyzing method which utilizes single molecular probe as the core.



目錄

謝誌.....	I
中文摘要.....	II
英文摘要.....	IV
目錄.....	VI
圖目錄.....	VIII
表目錄.....	X
第一章 緒論(Introduction)	1
1.1 去氧核糖核酸(DNA)及分析技術的發展.....	1
1.2 無參與酶反應的核酸分析方法.....	2
1.3 參與酶反應的核酸分析方法.....	4
1.4 動機.....	9
第二章 實驗材料與方法.....	12
2.1 藥品與試劑.....	12
2.2 儀器.....	14
2.3 去氧核糖核酸(DNA)序列.....	16
2.4 符號說明.....	18
2.5 分子探針的熱變性曲線分析.....	19
2.6 平衡常數分析.....	19
2.7 熱力學分析.....	21
2.8 動力學分析.....	22
2.9 聚丙烯酰胺凝膠電泳(polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE).....	24
2.10 雙重目標分析物偵測極限分析.....	24
2.11 非對稱式聚合酶鏈鎖反應.....	25
2.12 非對稱式聚合酶連鎖反應產物分析.....	25

2.13 螢光共振能量轉移效應偵測.....	26
2.14 使用 DNA 聚合酶於擴增系統的最佳化偵測.....	26
2.15 使用目標物 H 和 N 於擴增系統的最佳化偵測.....	27
2.16 訊號擴增系統的偵測極限分析.....	27
2.17 訊號擴增機制偵測雙重目標物的分析.....	27
第三章 結果與討論.....	29
3.1 分子探針與單條目標物之間狀態轉變的分析.....	29
3.2 利用分子探針同時偵測雙重目標物的探討.....	31
3.3 加入輔助鏈形成霍利迪交叉結構.....	34
3.4 輔助鏈與未配對核苷酸之影響.....	35
3.5 熱力學參數的測定.....	37
3.6 分子探針解折疊動力學探討.....	41
3.7 動力學參數的測定.....	42
3.8 設計檢測病毒序列的方案.....	42
3.9 藉由分子探針 2 解折疊行為檢測病毒序列.....	47
3.10 非對稱式聚合酶鏈式反應(aPCR)產物的分析.....	49
3.11 同時偵測雙重目標物並達到訊號擴增的偵測機制.....	51
3.12 FRET 效應的探討.....	52
3.13 偵測系統最佳化.....	53
3.14 系統的偵測極限.....	56
3.15 利用訊號擴增機制偵測雙重目標物的探討.....	57
第四章 結論.....	59
第五章 未來展望與建議.....	60
第六章 參考文獻.....	61

圖目錄

圖 1.1 利用生物聚合物分子探針偵測的示意圖.....	2
圖 1.2 利用生物聚合物雙重探針偵測的示意圖.....	3
圖 1.3 使用雙重探針藉由螢光共振能量轉移效應偵測的示意圖.....	4
圖 1.4 基於雜交反應偵測核酸的技術分類.....	4
圖 1.5 使用切口酶(nicking enzyme)訊號擴增的作用原理示意圖.....	6
圖 1.6 使用 DNA 聚合酶訊號擴增的作用原理示意圖.....	6
圖 1.7 使用四級結構參與切口酶和 DNA 聚合酶訊號擴增的作用示意圖.....	7
圖 1.8 使用分子探針參與切口酶和 DNA 聚合酶訊號擴增的作用示意圖.....	8
圖 2.1 分子探針與目標物不同相態下的示意圖.....	20
圖 3.1 分子探針與目標物間三種狀態的示意圖.....	28
圖 3.2 分子探針 1 熱變性和動力學曲線圖.....	29
圖 3.3 目標物序列互補於分子探針 1 莖部區域數目的示意圖.....	30
圖 3.4 互補於分子探針 1 莖部區域不同核酸數目的熱變性曲線圖.....	31
圖 3.5 形成霍利迪交叉結構未配對核酸數目示意圖.....	32
圖 3.6 加入輔助鏈與雙重目標物和分子探針 1 的熱變性曲線圖.....	33
圖 3.7 不同未配對核酸組合的熱變性曲線圖.....	35
圖 3.8 輔助鏈與雙重目標物聚丙烯酰胺凝膠電泳圖.....	36
圖 3.9 不同未配對核酸組合 $Rln(T_0-0.5MB_0)$ 與熔解溫度倒數關係圖.....	37
圖 3.10 分子探針 1 於不同未配對核酸數目解折疊的動力學曲線圖.....	39
圖 3.11 設計檢測 H5N2 病毒序列(方案 1)示意圖.....	41
圖 3.12 分子探針與 H5 片段雜交的示意圖.....	42
圖 3.13 N2 片段形成二聚體的示意圖.....	43
圖 3.14 設計檢測 H5N2 病毒序列(方案 2)示意圖.....	44

圖 3.15 加入輔助鏈與雙重目標物和分子探針2的熱變性曲線圖.....	45
圖 3.16 輔助鏈與雙重目標物對分子探針2解折疊的動力學曲線圖.....	46
圖 3.17 分子探針2的感測靈敏度.....	47
圖 3.18 非對稱式PCR產物聚丙烯酰胺凝膠電泳圖.....	48
圖 3.19 非對稱式PCR產物偵測結果.....	48
圖 3.20 訊號擴增的偵測機制示意圖.....	50
圖 3.21 產生 FRET 效應的結果.....	51
圖 3.22 使用聚合酶最佳化訊號擴增系統.....	54
圖 3.23 使用目標物H和N最佳化訊號擴增系統.....	55
圖 3.24 擴增系統的感測靈敏度.....	56
圖 3.25 擴增系統中偵測H5N2.....	57



表目錄

表 2.1 藥品名稱及廠牌.....	13
表 2.2 儀器名稱及廠牌.....	14
表 2.3 實驗用核酸序列表.....	16
表 2.4 符號說明表.....	18
表 3.1 雙重目標物與分子探針之間的平衡常數和分子探針解折疊的速率常數.....	38
表 3.2 雙重目標物與分子探針1之間的熱熔解溫度以及熵變化和焓變化.....	38



第一章 緒論(Introduction)

1.1 去氧核糖核酸(DNA)及分析技術的發展

DNA 雙股結構經由鹼基配對的模式可組成遺傳訊息，其中主要的功能為資訊儲存、引導生物發育與生命機能運作¹，DNA 的巨分子結構以核苷酸為單位所構成的長鏈聚合物，而核苷酸由於五碳糖上的鹼基差異區分為 4 種，分別為腺嘌呤(adenine, A)、胞嘧啶(cytosine, C)、鳥糞嘌呤(guanine, G)和胸腺嘧啶(thymine, T)，由 4 種核苷酸的排列可組成遺傳訊息，經由轉錄成(transcription)訊息 RNA(messageRNA, mRNA)再轉譯為蛋白質，而不同的 DNA 鹼基排列會產生不同的蛋白質，也因此具有不同的功能。而雙股 DNA 之間主要為氫鍵力以 A 配 T 和 C 配 G 的形式形成雙股，雙股之間特異性配對的穩定性主要取決於熱力學的影響^{2,3}。

為了更深入了解 DNA 中的遺傳訊息，1984 年於美國猶他州推動人類基因組計畫，此計畫的宗旨為測定人類染色體組成中所包含的 30 億個鹼基對組成的核苷酸序列，伴隨著此計畫因而吸引了巨大的利益和投資於 DNA 的分析。隨著技術日新月異人們從大量的資訊中發現特定的 DNA 序列於臨床診斷、疾病監測、癌症治療和食品安全至關重要，也因為如此在近幾年發展出許多 DNA 的檢測技術⁴⁻⁶。在眾多 DNA 檢測技術中聚合酶鏈式反應廣泛的被使用，此方法藉由 DNA 聚合酶的活性達到複製特定的片段提升檢測方便性，因而提供了實驗室檢測 DNA 的方便性^{7,8}。然而利用相同原理進一步發展出即時定量螢光檢測並已有商業化試劑便於實驗室使用^{9,10}，儘管此方法具有高靈敏度但操作過程複雜且花費的成本高，無法滿足在當下就可以進行醫學診斷的方法，意思為在任何地方包括門診、家裡或救護車上都可以執行，例如:血糖檢測和懷孕檢測等^{11,12}，因此，許多科學家朝著簡便且高靈敏度的 DNA 檢測平台發展。

1.2 無參與酶反應的核酸分析方法

DNA 的偵測方法藉由雜交的方式進行感測，最常使用的方法為結合光學訊號的產生，通常使用光學產生訊號須具備兩個重要的特性，首先要能辨認出所要偵測的特定核酸目標物序列，當辨認到目標物後訊號會以轉導(transfer)作用便可進行觀察，然而使用 DNA 的光學感測器辨認目標分析物的方法，是利用 DNA 探針與目標物之間特異性的雜交和使用具備光學轉換性質的材料，像是材料本身具有特定的吸收光和發射光波長範圍。至今許多的感測機制為通過與探針雜交反應產生螢光或化學發光來辨認是否偵測到目標物，像是分子探針(molecular beacons)¹³⁻¹⁵、雙重探針(binary probes)¹⁶⁻¹⁸和其多變化的探針¹⁹⁻²¹，然而這些探針的光學性能和化學穩定性廣泛用於生物學分析。

生物聚合物分子探針，由 DNA 序列折疊成莖環結構分別在 DNA 兩端修飾螢光團(fluorophore)和淬滅體(quencher)^{15,22}，根據所要偵測的目標物序列設計出髮夾結構(hairpin)，當不存在目標物時會穩定的形成莖環結構，拉近螢光團和淬滅體的距離因而導致螢光淬滅。當存在目標物時會與分子探針進行雜交反應，此時髮夾結構莖部區域產生解折疊的行為使螢光團和淬滅體強制分離因而產生螢光(如圖 1.1)，由於分子探針的結構和熱力學性質提供了良好的靈敏度和特異性可以明顯判別 DNA 序列的單核苷酸多型性^{23,24}，經由上述的特性使得分子探針成為強而有力的分析工具進而被廣泛應用於 DNA 的分析檢測，包括監測細胞內的基因表達和 DNA 與蛋白質之間的交互作用²⁵⁻²⁷。

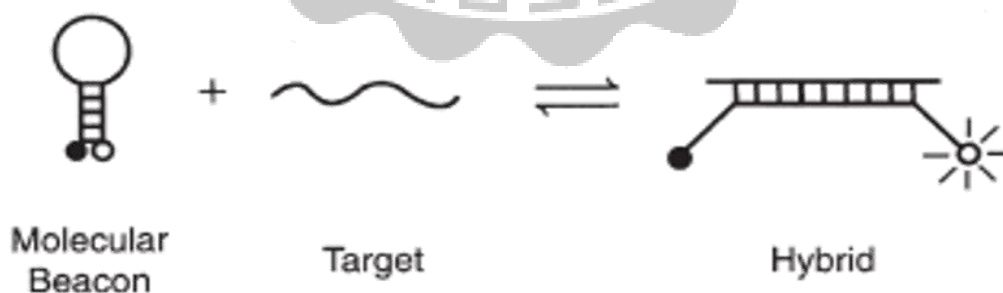


圖 1.1 利用生物聚合物分子探針偵測的示意圖²²。

使用生物聚合物雙重探針(binary probes)辨認目標物序列的方法如圖 1.2，雙重探針會以獨立或半獨立的狀態下存在，意思為雙重探針需同時辨認到目標分析物才會產生螢光輸出或螢光共振能量轉移效應達到偵測核酸或蛋白質的目的，通常雙重探針用於辨認 DNA、RNA 或胜肽核酸片段，如圖 1.2 所示兩條核酸序列設計與目標物序列在相鄰的位置形成互補，然而探針的一端分別以共價鍵的方式修飾上官能基(即為圖中的黃色和藍色)，當雙重探針同時雜交於分析物上時會產生可檢測的訊號(綠色圓圈)，此方法有希望用於監測細胞內的 RNA 但在設計上較為複雜¹⁷。

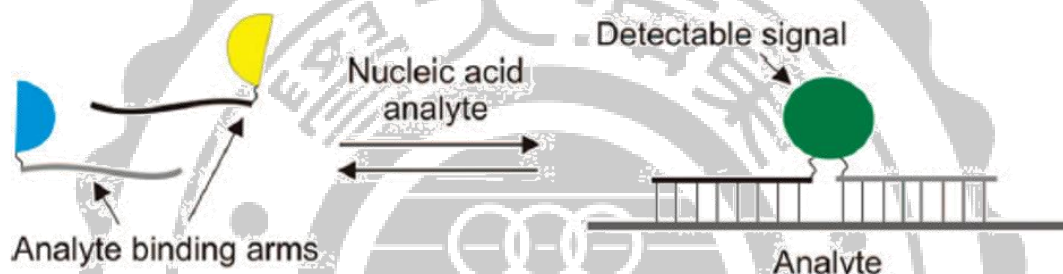


圖 1.2 利用生物聚合物雙重探針偵測的示意圖¹⁸。

由上述概念於 1988 首次提出雙重探針經由螢光共振能量轉移達到偵測的目的¹⁶(如圖 1.3)，螢光能量共振轉移是藉由兩個螢光分子間產生能量轉移現象，當予體螢光分子的發射光譜與受體螢光分子的吸收光譜重疊且兩個分子的距離接近時，就會發生一種非放射性的能量轉移即為螢光共振能量轉移現象，如圖 1.3(左)當不存在目標分析物時雙重探針的濃度需低於 10^{-6} M，防止雙重探針經由隨機擴散導致螢光共振能量轉移的效應，當存在目標分析物時雙重探針會同時雜交於分析物上拉近兩螢光團之間的距離，因而產生螢光共振能量轉移效應，當激發予體時可以觀察到予體的螢光強度降低，並於受體的發射波長下偵測到螢光強度¹⁶，然而此類型的探針已被證實可以用於生物體外轉錄的監測²⁸和活細胞中特定 mRNA 的過度表達²⁹。

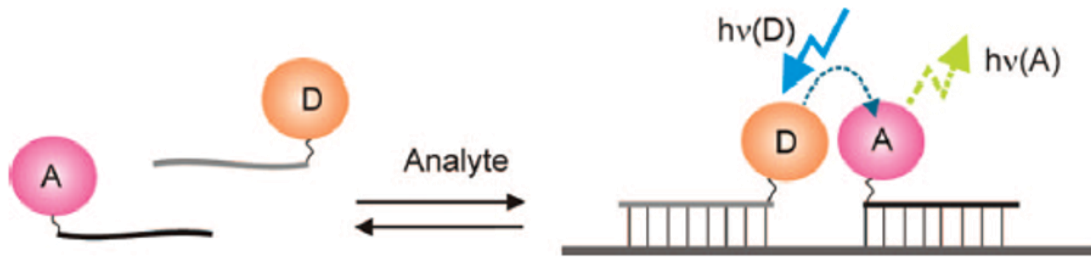


圖 1.3 使用雙重探針藉由螢光共振能量轉移效應偵測的示意圖¹⁸。

1.3 參與酶反應的核酸分析方法

使用雜交探針檢測目標物通常以 1:1 的化學劑量進行反應並產生訊號，然而使用非放射性能量讀出(readout)的方式不適用於檢測低濃度的樣品，為了改善雜交探針分析方法的不足進一步結合酶作用進行目標物擴增(target amplification)、探針擴增(probe amplification)或訊號擴增(signal amplification)達到偵測目的(如圖 1.4)³⁰。

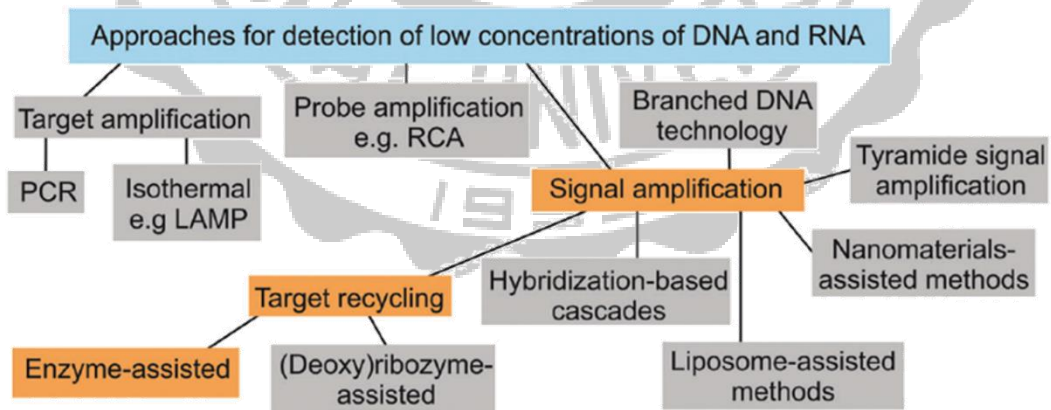


圖 1.4 基於雜交反應偵測核酸的技術分類³⁰。

使用目標物擴增方法可以複製出約 $10^8 - 10^9$ 倍的 DNA 片段，當目標物濃度增高便可用於常規的方法進行檢測(例如:凝膠電泳或螢光探針)，最典型的目標物擴增方法即為聚合酶鏈式反應³¹⁻³⁴，此方法實現了檢測低濃度的 DNA，然而熱循環的檢測過程對於生物醫學上的應用有其限制性存在，因此近年來發展出許多等溫下進行目標物擴增的方法來取代聚合酶鏈式反應³⁵⁻³⁸。

訊號擴增的方法為提高目標物感測靈敏度的另一種技術，當目標物存在下觸發訊號產生並藉由化學方法針對產生的訊號進行擴增，如圖 1.4 可以看到訊號擴增的方法又分成數種技術，其中一項為目標物再循環(target recycling)，此方法是利用目標物循環再利用的方式克服了雜交探針化學劑量的限制，當目標物與探針進行雜交反應產生訊號後經由酶特定的功能如:裂解(cleaved)探針³⁹ 或鏈取代反應⁴⁰ 產生訊號擴增。如圖 1.5 使用切口內切酶(nicking endonuclease)不須經由高溫作用，在等溫下切口酶會辨認特定位點裂解探針釋放出目標物，釋出的目標物再與探針進行雜交使得酶持續作用達到訊號擴增的效果³⁹。圖 1.6 使用等溫下作用的 DNA 聚合酶，當存在目標物時會與探針進行雜交反應，使得分子探針的莖部區域產生解折疊的行為，此時單股狀態的莖部區域成為引子(primer)的雜交位點，當引子成功雜交於莖部區域時 DNA 聚合酶開始作用合成出雙股 DNA，當 DNA 聚合酶在合成雙股的過程中會將雜交於探針上的目標物進行鏈取代反應，因而釋放出目標物再與分子探針進行雜交反應使得 DNA 聚合酶持續作用達到訊號放大的效果⁴⁰

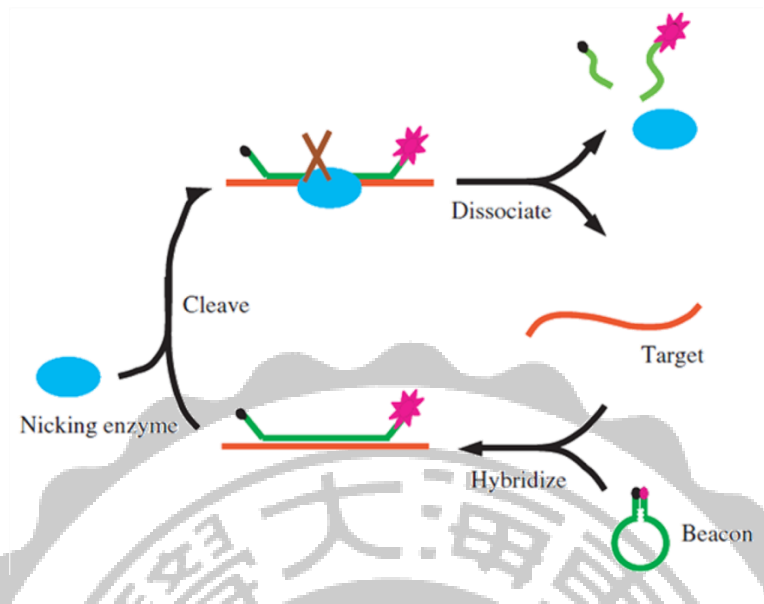


圖 1.5 使用切口酶訊號擴增的作用原理示意圖³⁹。

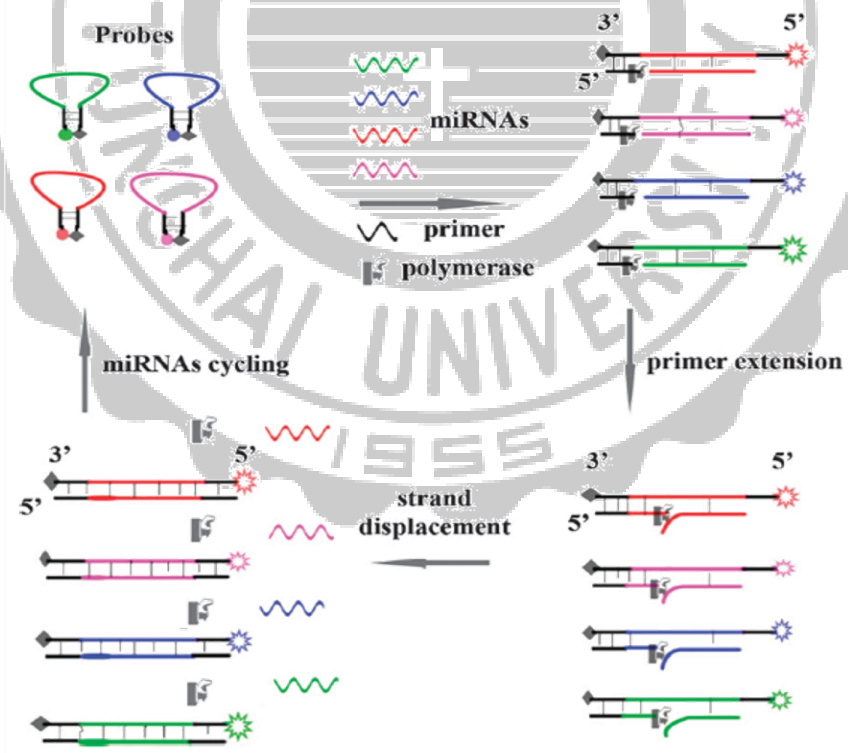


圖 1.6 使用 DNA 聚合酶訊號擴增的作用原理示意圖⁴⁰。

使用切口內切酶和 DNA 聚合酶能有效使目標物再循環，然而目標物經由再循環過程中濃度並沒有跟著改變，而是目標物循環過程中產生訊號擴增，此方法受限於低濃度的目標分析物使得感測靈敏度有一定的限度，因而近年來發展出許多使用切口酶結合 DNA 聚合酶的方法，在目標物循環的過程中同時達到目標物擴增和訊號擴增且在等溫的環境下，進而提升感測靈敏度。如圖 1.7 使用線性的模板與目標物進行雜交反應(線性模板的區域 I 和區域 II 為相同序列)，經由 DNA 聚合酶作用合成出雙股後產生兩個切口內切酶的辨認位點，當切口內切酶裂解後會產生切口，此時 DNA 聚合酶會從切口處繼續進行合成作用因而釋放出兩條 DNA 片段分別為目標物片段和產生訊號來源的片段，訊號來源的片段會自行折疊成四級結構(G-quadruplex)與血紅素(Hemin)作用，藉由還原 H_2O_2 使 $ABTS^{2-}$ 被氧化形成 $ABTS^{\cdot-}$ 產生可觀測的顏色變化，此方法經由切口內切酶和 DNA 聚合酶持續作用，可以同時達到目標物擴增和訊號擴增的效果⁴¹。

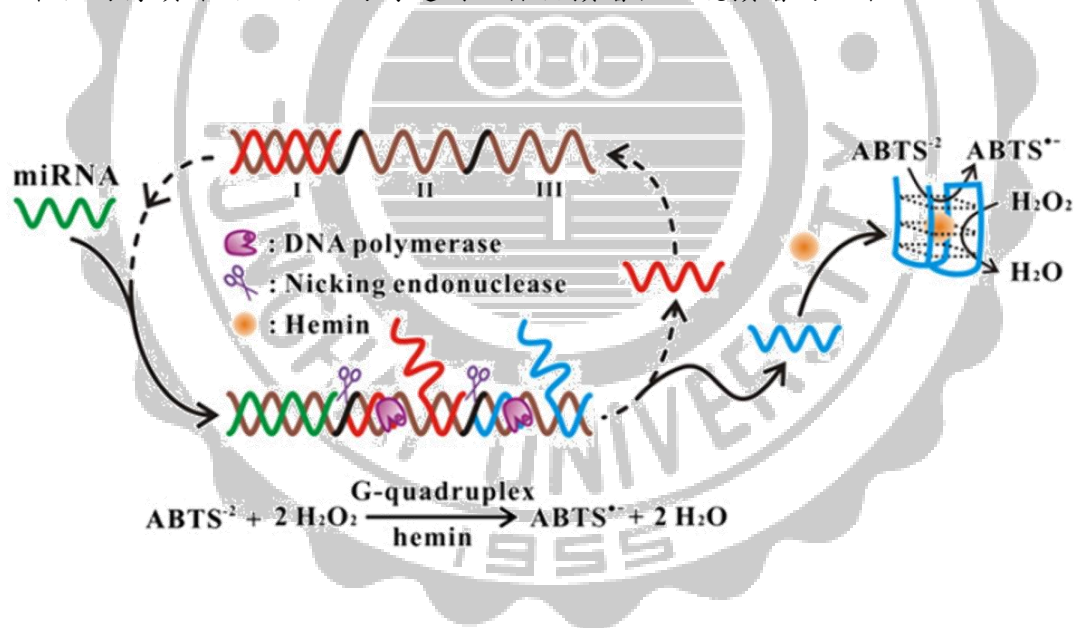


圖 1.7 使用四級結構參與切口酶和 DNA 聚合酶訊號擴增的作用示意圖⁴¹。

使用生物聚合物分子探針參與切口內切酶和 DNA 聚合酶的方法也被開發⁴²⁻⁴⁴，在切口內切酶和 DNA 聚合酶的反應過程中同時達到目標物循環和目標物擴增，此方法可以使訊號產生的速度增快以達到快速檢測的目的，如圖 1.8 目標物與探針雜交後使得分

子探針的莖部區域產生解折疊的行為，此時單股狀態的莖部區域成為引子的雜交位點，當引子成功雜交於莖部區域時 DNA 聚合酶開始作用合成出雙股 DNA，當 DNA 聚合酶在合成雙股的過程中會將雜交於探針上的目標物進行鏈取代反應，因而釋放出目標物達到目標物循環，而經由 DNA 聚合酶作用合成的雙股 DNA 會產生切口內切酶的辨認位點，此時 DNA 聚合酶會從切口處繼續進行聚合反應釋放出 DNA 觸發物(DNA trigger)，DNA 觸發物包含目標物序列因此有目標物擴增的效果且與分子探針之間有更良好親和性，然而此類型的方法已經證實在短時間內就能達到檢測的目的且成功用於檢測生物樣品⁴²。

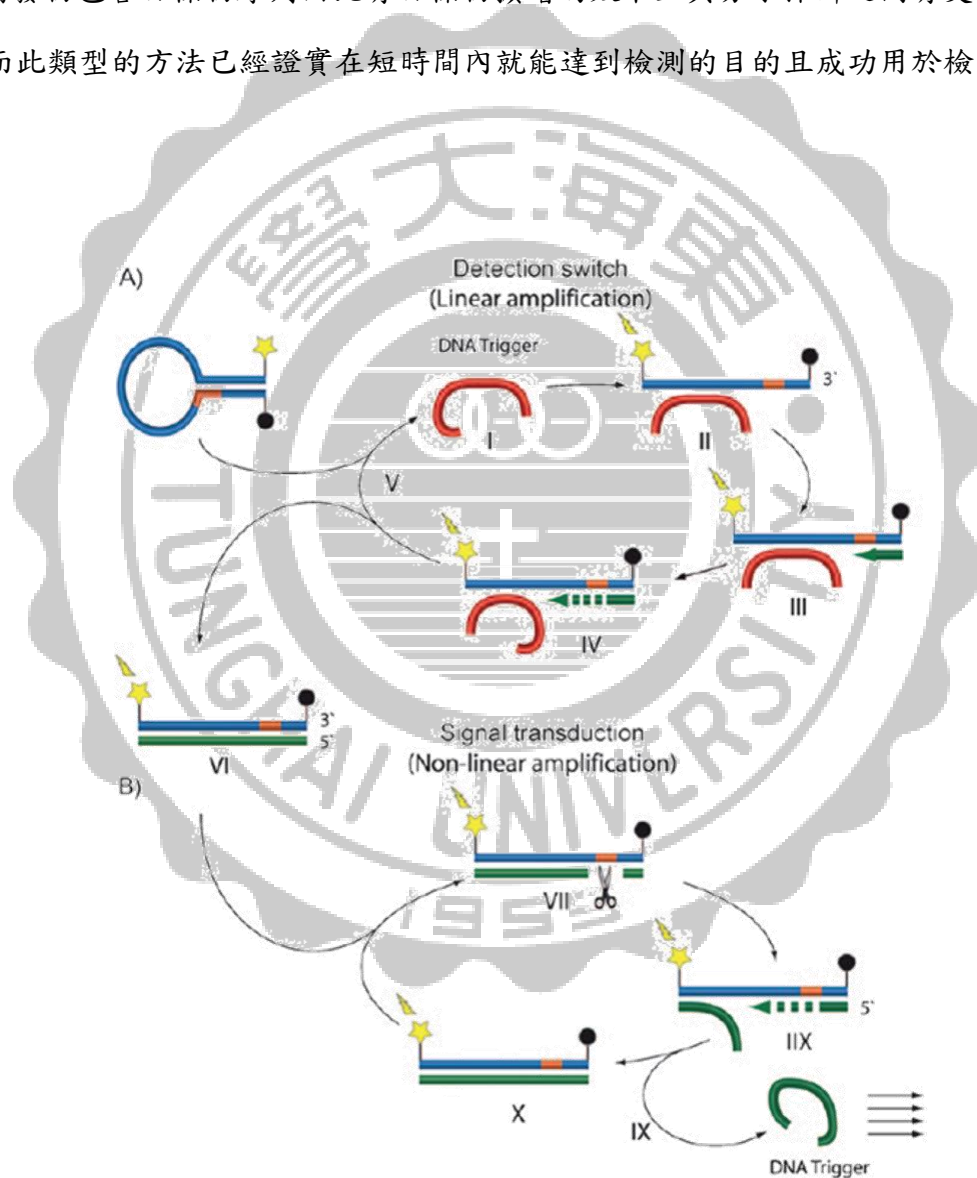


圖 1.8 使用分子探針參與切口酶和 DNA 聚合酶訊號增的作用示意圖⁴²。

1.4 動機

核酸是生物體中重要的遺傳物質，科學家已針對核酸序列持續研究，希望可以更加了解遺傳物質所要表達的訊息及功能，近來研究發現同時考慮多個遺傳片段的組合所提供的訊息對於醫療上相當有幫助，可應用於病原體分類、疾病檢測、和醫療診斷藥方。其中微核糖核酸(microRNA, miRNA)即為例子之一，研究指出 miRNA 對於細胞分化、生物學功能和癌症發展有深遠的影響⁴⁵，主要以組合方式進行運作，換句話說，多個 miRNA 的調節和行為會同時影響於一個基因的表達上和癌症特性的演變⁴⁶⁻⁴⁸。因此，檢測單一 miRNA 序列是不足以提供診斷所需的資訊，具備多重基因檢測的技術成為不可或缺的技术。臨床診斷上另一個實例為高致病性的流感病毒，其中血球凝集素和神經胺酸酶分別有 16 個和 9 個亞型可以進行組合⁴⁹，在感染期間藉由病毒粒子膜上的 HA 抗原與宿主細胞的受體結合因而進入細胞中，而 NA 抗原與酶有相似的功能為催化病毒粒子從細胞中釋出，研究指出病毒的致病性和毒性與此兩種表面蛋白之間的功能相關⁵⁰⁻⁵²，因此須具備同時診斷 HA 和 NA 基因片段的偵測分析方法，才能有效判別是否為高致病性流感病毒。

為滿足同時偵測多個核酸序列的需求，已有相關的研究報導多重序列的分析方法，其中大部分使用即時聚合酶鏈式反應(Real-time PCR)，此檢測方法設計為平行進行檢測並分別提供訊號以達到多重序列檢測目的^{26,53-55}，然而多重訊號輸出面臨螢光基團間的相互干擾、需專業人員進行判斷且不可避免人為誤判的現象、多重訊號輸出方法涉及複雜的最佳化過程、多餘的步驟和高成本花費皆是另人詬病的缺點⁵⁶。

及時聚合酶鏈式反應分析方法廣泛使用分子探針作為訊號輸出，分子探針為 DNA 莖環結構並分別在核酸尾端修飾螢光基團及淬滅基團⁵⁷，當目標物不存在時，分子探針摺疊成髮夾結構使得螢光基團與淬滅基團間距離拉進產生螢光淬滅的現象，當目標物與莖環結構環上區域進行雜交反應，此時莖部的雙股結構會產生解折疊現象使得螢光放出。因此，藉由分子探針折疊-解折疊行為用於感測系統，在多重序列的分析時需要數個分子探針且需挑選不同螢光基團，然而這種方式是有缺點的，受限於螢光基團有限的選擇、

螢光光譜重疊性高、和需使用多通道訊號輸出的昂貴機台進行感測。分子邏輯閘機制運算的概念已成為解決分析多重基因序列的有效方案之一，訊號輸出為**0**或**1**的數位方式，直接表示出陰性或陽性，可以大幅度降低人為的誤判並同時改善上述缺點，目前已有相關研究應用此概念，以分子邏輯閘機制運算多重基因序列的分析並應用於生物醫學診斷^{56,58,59}。

為了提高核酸感測靈敏度，目前用於偵測低濃度目標物使用的技術可分為三大類，分別是目標物擴增、探針擴增、和訊號擴增，而典型的目標物擴增技術類似及時聚合酶鏈式反應，然而，及時聚合酶鏈式反應需準確控制熱循環過程溫度以利引子和分子探針有效的進行雜交反應，需使用特定升降溫儀器，以及引子的設計常面臨非特異性吸附等缺點。探針擴增的技術以滾環式擴增(Rolling Circle Amplification, RCA)為例子，此技術使用環狀的 DNA 探針並將環狀探針作為模板，藉由引子與環狀探針雜交使 DNA 聚合酶沿著環狀模板進行合成並使用雙股染劑(如:SYBR Green)進行訊號偵測，然而雙股染劑不具特定序列的選擇能力，因此導致背景訊號升高且造成誤判訊號的現象。因此許多技術朝向訊號擴增發展，像是分支 DNA 技術⁶⁰(branched DNA, bDNA)、雜交鏈式反應⁶¹(hybridization chain reaction, HCR)、酪胺訊號擴增⁶²(tyramide signal amplification, TSA)、脂質體輔助方法⁶³(liposome-assisted)和奈米材料輔助方法⁶⁴(nanomaterial-assisted)皆已於文獻中被廣泛地探討。

近年來研究指出，訊號擴增的技術藉由 DNA 聚合酶參與內切酶(endonuclease)或外切酶(exonuclease)可於等溫下進行偵測並同時達到訊號擴增⁴²，但同時使用兩種酶存在某些缺點，常見如不同的酶需要特定緩衝溶液環境或特定溫度下才具最佳催化活性，使用單一溶液組成及條件將使部份酶活性受到抑制，進而影響分析方法的表現^{43,44,56,65}。另一方面，目前只有少數研究成功運用分子邏輯閘運算概念證實在恆溫下偵測多重基因片段⁶⁶。

因此，我們設計一個新穎感測機制，同時具特異性且靈敏地辨認多重基因片段，由於高致病性的流感病毒株已嚴重威脅人類健康，需同時辨認血球凝集素和神經氨酸酶才

能準確診斷高致病性亞型，所以，此研究使用 A 型流感病毒株 [A/duck/Taiwan/DV30-2/2005 (H5N2)] 為例進行雙重目標序列分析方法之開發。我們提出藉由輔助鏈與雙重目標物進行雜交反應(hybridization)，隨後再與分子探針作用形成霍利迪交叉結構，此外，霍利迪交叉處存在未配對的核酸可增加交叉處的可饒性以助於霍利迪交叉結構形成，並依據布林 AND 邏輯閘機制運算且輸出訊號，我們進一步利用 DNA 聚合酶進行鏈取代反應及產生螢光共振能量轉移效應達到訊號擴增的效果，進而提升感測靈敏度。



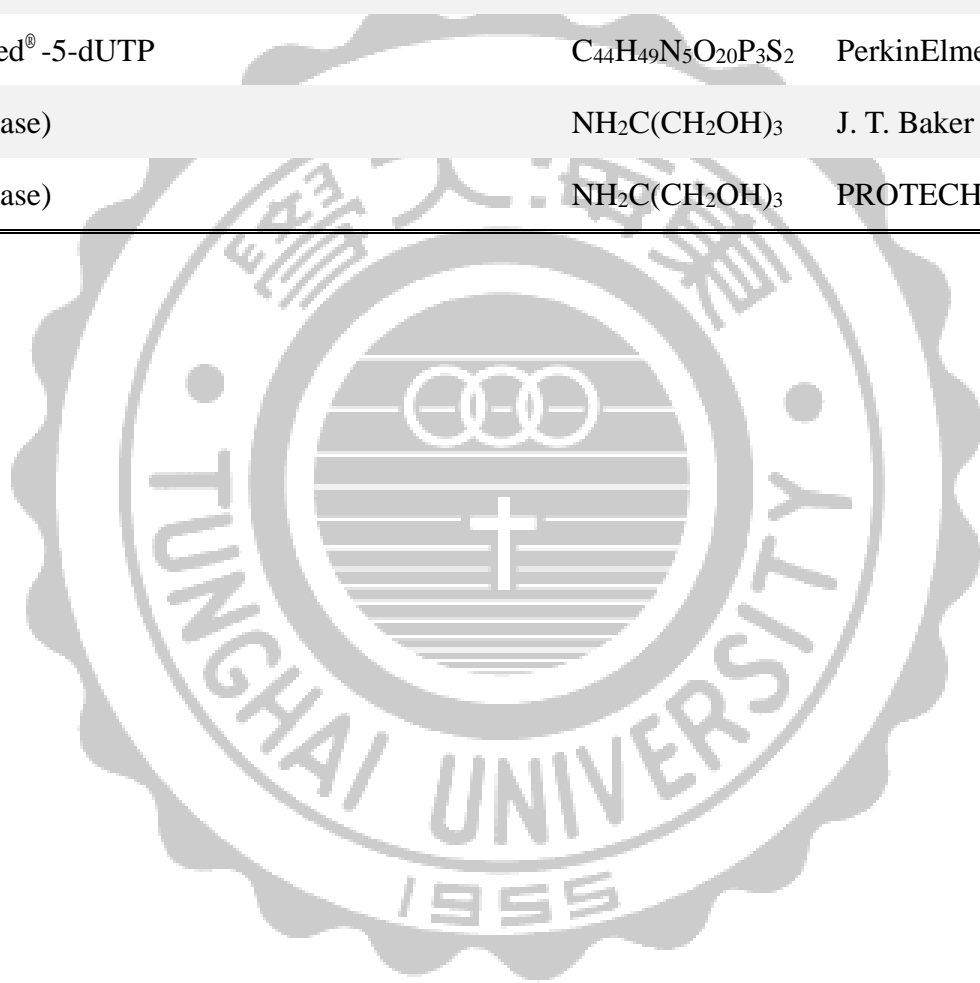
第二章 實驗材料與方法

2.1 藥品與試劑

表 2.1 藥品名稱及廠牌

藥品名稱	化學式/縮寫	廠牌
2'-Deoxyadenosine-5'-Triphosphate,Sodium Salt	dATP	MDBio, Inc.
2'-Deoxythymidine-5'-Triphosphate,Sodium Salt	dTTP	MDBio, Inc.
2'-Deoxycytidine-5'-Triphosphate,Sodium Salt	dCTP	MDBio, Inc.
2'-Deoxyguanosine-5'-Triphosphate,Sodium Salt	dGTP	MDBio, Inc.
40% Acrylamide/Bis Solution,19:1		Bio-Rad
6X DNA Loading Dye		Thermo Scientific
6X DNA Loading Dye		PROTECH
Ammonium Persulfate	APS	Bio-Rad
Bio-25bp TM DNA Ladder		PROTECH
Boric acid	B(OH) ₃	PROTECH
Deoxynucleotide Mix	dNTP	GeneDirex
Dimethyl sulfoxide	DMSO	Thermo Scientific
Dithiothreitol	DTT	NEB
Ethylenediaminetetraacetic acid	EDTA	PROTECH
EvaGreen [®] Dye, 20X in water		Biotium
GeneRuler Low Range DNA Ladder		Thermo Scientific
Hydrochloric acid	HCl	Sigma-Aldrich2
Klenow Fragment (3'→5' exo-)		NEB
Magnesium chloride	MgCl ₂	NEB
Magnesium chloride hexahydrate	MgCl ₂ · 6H ₂ O	Sigma-Aldrich

Magnesium chloride solution	MgCl ₂	Thermo Scientific
N,N,N',N'-tetramethylethylene-diamine	TEMED	Bio-Rad
Phusion High-Fidelity DNA Polymerase		Thermo Scientific
Phusion Hot Start II High-Fidelity DNA Polymerase		Thermo Scientific
Sodium Chloride	NaCl	Sigma-Aldrich
Texas Red [®] -5-dUTP	C ₄₄ H ₄₉ N ₅ O ₂₀ P ₃ S ₂	PerkinElmer
TRIS (Base)	NH ₂ C(CH ₂ OH) ₃	J. T. Baker
TRIS (Base)	NH ₂ C(CH ₂ OH) ₃	PROTECH



2.2 儀器

表 2.2 儀器名稱及廠牌

儀器/材料名稱	型號	廠牌
Centrifuge 離心機	C1801	Labnet
Compact Image System with 0.4 megapixels CCD camera and built-in 312nm UV Transilluminator 40 萬像素 CCD 凝膠成像儀	UVCI-01-312	Major Science
Mini-Protean Tetra Cell 迷你垂直式電泳槽	165-8001	Bio-Rad
Mixing Block 恆溫乾浴反應槽	MB-101	BIOER TECHNOLOGY
MS Orbital Shaker MS 迴轉式振盪器	MS-NOR	Major Science
Multimode Microplate Spectroscopy 多功能微量盤分析儀	SpectraMax M2 ^e	Molecular Devices
Multimode Microplate Spectroscopy 多功能微量盤分析儀	FlexStation® 3	Molecular Devices
PowerPac Basic Power Supply 基本型電源供應器	164-5050	Bio-Rad
Real-Time PCR 即時偵測同步定量聚合酶連鎖反應儀	MiniOpticon	Bio-Rad
SpectraDrop Micro-Volume Starter Kit, 24-Well Microplate 24 孔微量盤套件	0200-6262	Molecular Devices
Table Top Refrigerated Centrifuge 高速低溫離心機	Z 326K	HERMLE LABORTECHNIK

Thermal Cycler	MJ Mini	Bio-Rad
聚合酶鏈鎖反應儀		
Vortex 振盪器	G-560	Scientific Industries
冷凍乾燥機	FD2-6P	KINGMECH



2.3 去氧核糖核酸(DNA)序列

表 2.3 實驗用核酸序列表

Name	Sequence and modification (5'→3')	Description
A2	CAT CAT CAC TAC AGA GGA GCT ATC ATG ATT	Assistant strand for (1,1)
A3	ATC ATC ACT ACA GAT GAG CTA TCA TGA TTC	Assistant strand for (2,0)
A4	CAT CAT CAC TAC AGA GAG CTA TCA TGA TTC	Assistant strand for (2,1)
A7	CCA TCA GGC CAT GAC ATG ATT GCC AGT GC	Assistant strand for H5- and N2-specific sequences
A8	ATC ATC ACT ACA GAT TGG AGC TAT CAT GAT	Assistant strand for (0,0)
A9	CCA TCA TCA CTA CAG GGA GCT ATC ATG ATT	Assistant strand for (1,2)
A10	CCA TCA GGC CAT GAC ATG ATT GCC AGT AC	Assistant strand for H5- and N2-aPCR product
FL	TAC TAT TTG GGT AAC GAT CAA TCA T	Full loop for MB1
H	GCA CTG GCA ATC ATG ATA GCT GGT CTA TCT TTT TGG TGA AGC	The target bearing H5-specific sequence
H5F	GCA GCG AGT TCC CTA GTA CTG	Forward primer for H5
H5R	TGA CCC ATT GGA ACA CAT CCA G	Reverse primer for H5
HP3	CCA CAG GGT AAA GAT AGA CCA GCT GCC TGT TCC ATA CCC TGT GG	Template for amplification mechanism
MB1	FAM-CCG GCA ATG ATT GAT CGT TAC	Molecular beacon 1

	CCA AAT AGT ATG CCG G-Dabcyl	
MB2	FAM-CCA CAG GGT AAA GAT AGA CCA GCT GCC TGT TCC ATA CCC TGT GG-Dabcyl	Molecular beacon 2
N	TAT GGA ACA GGC TCA TGG CCT GAT GGG GCG A	The target bearing N2-specific sequence
N2F	TTG TGG CAC TTC AGG TAC TTA TG	Forward primer for N2
N2R	ATA GGC ATG AAG TTG ATA TTC GCC C	Reverse primer for N2
Primer	TTT CAC AGG G	Primer for amplification mechanism
TE	ACT CAA ACG ATC AAT CAT TGC	Target sequence E
TF	GCA TAC TAT TTG GGT CTA TC	Target sequence F
TG	AAT GAA TCA TGA TAG CTC CAA ACG ATC AAT CAT T	Target sequence G
TI	ATA CTA TTT GGG TAT CTG TAG TGA TGA TGG GGC	Target sequence I
TK	AAT GAA TCA TGA TAG CTC CAA ACG ATC AAT CAT	Target sequence K
TL	TAC TAT TTG GGT ATC TGT AGT GAT GAT GGG GC	Target sequence L

2.4 符號說明

表 2.4 符號說明表

符號	說明
α	狀態 1 時分子探針與目標物雜合的螢光強度(如圖 2.1)
β	狀態 2 時分子探針與目標物分離此時分子探針為折疊狀態下的螢光強度(如圖 2.1)
γ	狀態 3 時只存在分子探針為解折疊狀態下的螢光強度(如圖 2.1)
γ'	狀態 3 時分子探針與目標物分離此時分子探針為解折疊狀態下的螢光強度(如圖 2.1)
θ	探討溫度下只存在分子探針的螢光強度(如圖 2.1)
F	探討溫度下 3 個狀態的總螢光強度(如圖 2.1)
MB_0	分子探針的總濃度(單位為 M)
T_0	目標物的總濃度(單位為 M)
T_m	熱熔解溫度(單位為 $^{\circ}\text{C}$)

2.5 分子探針的熱變性曲線分析

分子探針 1 (MB1)和分子探針 2 (MB2)的熱變性曲線，即為螢光訊號的變化對溫度作圖，使用即時偵測同步定量聚合酶連鎖反應儀進行偵測，激發波長固定為 470-500 nm，用來量測的放射波長為 523-543 nm，首先將 TG、TI、分子探針(MB1)和輔助鏈(A2)皆用含有 10 mM Tris (Base)、50 mM NaCl 和 5 mM MgCl₂ 的緩衝溶液進行回溶，最終混合濃度為分子探針 1 (0.2 μM)、TG (1.2 μM)、TI (1.2 μM)和輔助鏈 A9 (1.2 μM)，其中探討不同組合 MB1、MB1/A9/TG/TI、MB1/A9/TG、MB1/A9/TI、MB1/TG/TI、MB1/TG 和 MB1/TI 進行雜合和雜交，分子探針(MB2)、H、N 和輔助鏈(A7)皆用含有 10 mM Tris (Base)、50 mM NaCl 和 5 mM MgCl₂ 的緩衝溶液進行回溶，最終混合濃度為分子探針 2 (0.2 μM)、H (1.2 μM)、N (1.2 μM)和輔助鏈 A7 (1.2 μM)，其中探討不同組合 MB2、MB2/A7/H/N、MB2/A7/H、MB2/A7/N、MB2/H/N、MB2/H 和 MB2/N 進行雜合和雜交，熱變性曲線的分析首先將溫度升到 95 °C 維持 5 分鐘，隨後將溫度降回 15 °C 維持 5 分鐘，螢光訊號的偵測在 15-85 °C 的範圍每升 1 °C 維持 5 分鐘進行偵測。

2.6 平衡常數分析

分子探針與目標物之間的雜交在溶液中因為溫度的不同主要分成 3 個相態(如圖 2.1)，相態 1 為分子探針與目標物進行雜交形成互補的狀態(表示為 MB·T)，相態 2 為分子探針與目標物分離而此時分子探針為莖環結構的狀態(表示為 MB_{closed}+T)，相態 3 為分子探針與目標物分離而此時分子探針為無規則捲曲的狀態(表示為 MB_{open}+T)，而用於描述不同相態之間的平衡常數分析方法由 Bonnet 等人²³和 Tsourkas 等人²⁴這 2 組團隊所提出，3 個相態的反應可以被表示為：



螢光值 F 分別來自於 3 個相態所放射出來的螢光總和，α、β和γ分別定義為每個相態中所放射的螢光強度，分子探針的總濃度表示為 MB₀，不同相態分別除以總濃度 MB₀ 再乘以每個相態所假設的螢光強度加總後即為總螢光值 F，其表示方法如下：

$$F = \alpha \frac{[MBT]}{MB_0} + \beta \frac{[MB_{closed}]}{MB_0} + \gamma \frac{[MB_{open}]}{MB_0} \quad (2)$$

總濃度 MB_0 為溶液裡不同相態組成的總和，即為 $[MBT] + [MB_{closed}] + [MB_{open}]$ 相對應的 K_{12} 和 K_{23} 如下：

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

$$K_{12} = \frac{[MB_{closed}][T]}{[MBT]} \quad (4)$$

目標物的總濃度表示為 T_0 ，要使得方程式成立的先決條件是 T_0 濃度需遠大於 MB_0 濃度，因此 $[MBT]$ 所消耗掉的 T_0 濃度相當微量，所以即可把 $[T]$ 表示為 T_0 ，將方程式(3)和(4)帶入 $MB_0 = [MBT] + [MB_{closed}] + [MB_{open}]$ 表示成方程式(1)在不同相態的螢光強度，並乘以 α 、 β 和 γ 即可得到下列方程式：

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

將方程式 5 移向後可得：

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

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

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

利用方程式(6)和(7)分別可以計算出不同溫度下的 K_{12} 和 K_{23} ，而 K_{12} 方程式中的參數 F 可以從熱變性曲線圖中得到，即選取所要探討溫度下分子探針含有目標物存在時的螢光強度，參數 α 為分子探針與目標物鍵結所得到螢光強度的最大值，參數 β 是分子探針

為莖環結構時的螢光強度，通常會選取 15 °C 時的螢光強度²³，參數 γ' 是在含有目標物的情況下分子探針為無規則捲曲狀態下的螢光強度，通常會選取 85 °C 時的螢光強度，而 K_{23} 方程式中的參數 θ 可以從熱變性曲線圖中得到，需為目標物不存在的情況，即選取所要探討溫度下分子探針的螢光強度，參數 β 與上述相同，參數 γ 為目標物不存在的情況，分子探針呈現無規則捲曲狀態下的螢光強度，通常會選取 80 °C 時的螢光強度²³。

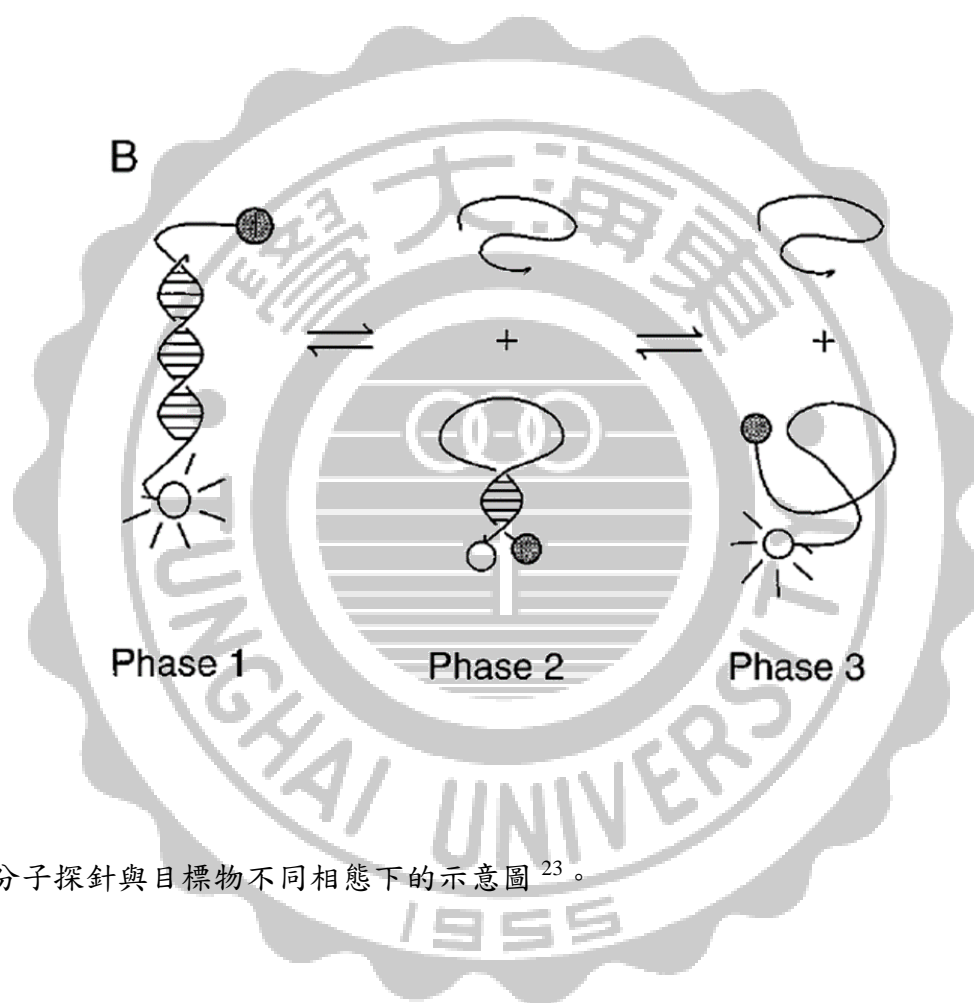


圖 2.1 分子探針與目標物不同相態下的示意圖²³。

2.7 熱力學分析

熱力學參數為 ΔH 和 ΔS ，此狀態是在描述分子探針與目標物進行雜交，通過一個溫度範圍的升溫過程，分子探針與目標物從雜交到分離的狀態，在升溫過程中當分子探針在特定溫度下達到 $[MBT]=MB_{\text{closed}}$ 時，此溫度稱為目標物與分子探針雜交的熔解溫度(即 T_m 值)，此時帶入方程式(4)可以推導出熔解溫度下的 K_{12} :

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

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

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

雜合 0.2 μM 分子探針與 1.2 μM 、1.8 μM 、3 μM 、4.8 μM 和 7.2 μM 目標物並存在相對應濃度的輔助鏈，可以進行熱熔解曲線的分析，由 $\Delta G = \Delta H - T\Delta S = -RT\ln(K_{12})$ 可以推導出下列方程式：

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

由不同目標物濃度計算出理論值 K_{12} 並對照熱變性曲線計算出來的實驗值 K'_{12} ，取接近理論值 K_{12} 對應下 K'_{12} 的溫度，即為熔解溫度 T_m ，5 個目標物濃度可以用 $R\ln(T_0 - 0.5MB_0)$ 對 $1/T_m$ 作圖，即可得到線性曲線圖，每條線性的斜率和截距即為 ΔH 和 ΔS 。

2.8 動力學分析

動力學曲線的分析使用多功能微量盤分析儀(FlexStation® 3)具有自動加樣的功能進行偵測，偵測分子探針與目標物之間的作用，使分子探針從閉合狀態到開啟狀態這個過程的數率，簡言之即為分子探針解折疊的速率常數，儀器設定使用 495 nm 的激發波長進行激發，收光的放射波長設定 525 nm，且使用濾光片切割 515 nm 前收到的光以降低雜訊的影響，在偵測之前需先在 32 °C 雜合 0.33 μM 總體積 60 μL 的分子探針在 96 孔盤裡，以每 2 秒讀取一點螢光值並維持 5 分鐘，確保分子探針在 32 °C 時已穩定的形成莖環結構，使用儀器自動加樣的功能前需先使用聚合酵素連鎖反應儀將 TG、TI 和輔助鏈進行雜合，雜合過程為升溫到 95 °C 維持 3 分鐘再降回 32 °C 雜合 30 分鐘，以利形成 A/TG/TI 的 3 級構型，3 者濃度皆為 3 μM 總體積為 105 μL ，取 100 μL 加入準備進樣的

96 孔盤裡，儀器設定為 5 分鐘後開始進行自動加樣，吸取含有 100 μL 於 96 孔盤裡的液體 40 μL 加入含有分子探針 60 μL 的 96 孔盤裡並吸放 3 次以利混合均勻，最終 MB 濃度為 0.2 μM ，TG、TI 和輔助鏈皆為 1.2 μM ，藉由每 2 秒偵測一點可以得出目標物與分子探針作用的動力曲線圖，而 Tsourkas 等人²⁴ 已經提出如何將動力學曲線進行定量，將目標物與分子探針之間的作用表示如下：



將方程式(11)用時間對 $[\text{MB}\cdot\text{T}]$ 進行微分可以得到下式：

$$\frac{d[\text{MB}\cdot\text{T}]}{dt} = k_1[\text{MB}][\text{T}] - k_2[\text{MB}\cdot\text{T}] \quad (12)$$

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

$$\frac{[\text{MB}\cdot\text{T}]_t}{[\text{MB}\cdot\text{T}]_{eq}} = \frac{F(t) - F_0}{F_{eq} - F_0} = F_n \quad (13)$$

F_0 為起始的螢光強度， $F(t)$ 代表目標物與分子探針開始作用過程時不同時間下的螢光強度， F_{eq} 為螢光值達平衡後的螢光強度，意旨 t 為無限大時螢光值不會隨著時間繼續變化，經由一連串複雜的方程式推倒最後可以得出下列方程式：

$$\frac{1 - F_n}{1 - \rho F_n} = e^{-\omega k_1 t} \quad (14)$$

其中參數的計算如下 $\rho = ([\text{MB}\cdot\text{T}]_{eq})^2 / \text{MB}_0 \text{T}_0$ 、 $[\text{MB}\cdot\text{T}]_{eq} = (\text{MB}_0 + \text{T}_0 + K_{12} - \omega) / 2$ 、
 $\omega = \sqrt{(\text{MB}_0 + \text{T}_0 + K_{12})^2 - 4\text{MB}_0 \text{T}_0}$

將方程式(14)取自然對數後可以得到下列線性方程式，其方程式的斜率即為分子探針解折疊的速率常數 k_1 ：

$$\frac{1}{\omega} \ln \left(\frac{1-F_n}{1-\rho F_n} \right) = -k_1 t \quad (15)$$

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

為了確定輔助鏈與兩條目標分析物有成功的進行雜交，因而使用聚丙烯酰胺凝膠電泳進行分析，其裝置為迷你垂直式電泳槽，首先將輔助鏈和兩條目標分析物利用含有 10 mM Tris (Base), 50 mM NaCl, 5 mM MgCl₂ 的緩衝溶液進行回溶，最終混合濃度皆為 0.2 μM，充分混合後升溫到 95 °C 維持 3 分鐘，之後降回 32 °C 雜合 30 分鐘，將雜合完的產物混合 6X DNA Loading dye 注入聚丙烯酰胺凝膠裝置。須事前製備 12 % 聚丙烯酰胺凝膠，其組成為 40 % Acrylamide/Bis Solution, 19:1、APS、TEMED 和 TBE 緩衝溶液總體積為 6 μL，充分混合後注入凝膠裝置在室溫下凝膠 40 分鐘，除了注入樣品還要配製 DNA Ladder 作為片段大小的對照。使用迷你垂直式電泳槽條件設定為 14 V/cm，反應時間為 90 分鐘，反應結束後將膠片取出浸泡於 1X SYBR Gold 溶液中進行染色，染色的過程須放置迴轉式振盪器搖晃 30 分鐘其轉速為 60 rpm，使用 40 萬像素 CCD 凝膠成像儀觀測，以紫外光激發加上 312 nm 的濾光片成像後進行拍照，並可對聚丙烯酰胺凝膠進行分析。

2.10 雙重目標分析物偵測極限分析

使用即時偵測同步定量聚合酶連鎖反應儀進行偵測，激發波長固定為 470-500 nm，用來量測的放射波長為 523-543 nm，首先將合成的 H5、N2、分子探針 2 (MB2) 和輔助鏈(A7)皆用含有 10 mM Tris (Base)、50 mM NaCl 和 5 mM MgCl₂ 的緩衝溶液進行回溶，隨後將分子探針和輔助鏈與不同濃度的目標分析物充分混合，最終混合濃度為分子探針 (0.2 μM)、輔助鏈(1.2 μM)、目標分析物濃度分別為 0.12 nM、1.2 nM、24 nM、120 nM 和 240 nM。偵測條件首先升溫到 95 °C 維持 3 分鐘，隨後降回 40 °C，螢光訊號的偵測從 40-50 °C 的範圍每升 1 °C 維持 5 分鐘進行偵測。最後選定 45 °C 為螢光輸出值。

2.11 非對稱式聚合酶鏈鎖反應

非對稱式聚合酶鏈鎖反應所要擴增的片段為 H5 和 N2 單股基因序列，而病毒序列的模板來自於 A/duck/Taiwan/DV30-2/2005 (H5N2)，首先須設計兩對引子，利用 NCBI primer-BLAST 網頁軟體挑選出適當的引子，挑選的條件藉由熔解溫度計算，兩條引子間的熔解溫度不能大於 5 °C，其序列於表 2.3(H5R/H5F、N2F/N2R)。H5 的非對稱式聚合酶鏈鎖反應其條件組成如下，組成包含 1X Phusion HF Buffer、200 μM dNTP、1 μM H5F、0.1 μM H5R、1 μg 病毒基因組(cDNA)和 0.5 U Phusion High-Fidelity DNA polymerase 總體積為 25 μL。使用聚合酶鏈鎖反應儀進行擴增其條件如下，總共分成三大步驟，第一步升溫到 98 °C 維持 30 秒，第二步先 98 °C 維持 10 秒再降回 62.2 °C 維持 20 秒，最後再升到 72 °C 維持 15 秒，此步驟會進行 50 圈的循環，第三步降溫到 4 °C 維持 30 秒即完成 H5 片段的擴增。N2 的非對稱式聚合酶鏈鎖反應其條件組成如下，組成包含 1X Phusion HF Buffer、200 μM dNTP、1 μM N2F、0.2 μM N2R、1 μg 病毒基因組(cDNA)和 0.5 U Phusion High-Fidelity DNA polymerase 總體積為 25 μL。使用聚合酶鏈鎖反應儀進行擴增其條件如下，總共分成三大步驟，第一步升溫到 98 °C 維持 30 秒，第二步先 98 °C 維持 10 秒再降回 60.7 °C 維持 20 秒，最後再升到 72 °C 維持 15 秒，此步驟會進行 50 圈的循環，第三步降溫到 4 °C 維持 30 秒即完成 N2 片段的擴增。最終非對稱式聚合酶鏈鎖反應的產物可以藉由聚丙烯酰胺凝膠電泳進行確認。

2.12 非對稱式聚合酶連鎖反應產物分析

使用即時偵測同步定量聚合酶連鎖反應儀進行偵測，激發波長固定為 470-500 nm，用來量測的放射波長為 523-543 nm，首先將分子探針(MB1)和輔助鏈(A7)皆用含有 10 mM Tris (Base)、50 mM NaCl 和 5 mM MgCl₂ 的緩衝溶液進行回溶，隨後將非對稱式聚合酶連鎖反應的產物 H5 和 N2 各取 8 μL 與分子探針和輔助鏈充分混合，最終混合濃度為分子探針(0.2 μM)、輔助鏈(1.2 μM)總體積為 20 μL。在各別偵測只有 H5 或 N2 的組合中體積不足 20 μL 皆用緩衝溶液補充，偵測條件首先升溫到 95 °C 維持 3 分鐘，隨後

降回 50 °C，螢光訊號的偵測從 50-55 °C 的範圍每升 1 °C 維持 5 分鐘進行偵測。最後選定 55 °C 為螢光輸出值。

2.13 螢光共振能量轉移效應偵測

使用多功能微量盤分析儀(M2^o)進行偵測，首先將輔助鏈(A7)、H 和 N 皆用 1X NEBuffer 回溶為 1 μM、0.2 μM 和 0.2 μM 總體積 12 μL 於 37 °C 雜合 30 分鐘，另外配置兩管，第一管組成 HP3 (1 μM)、primer (3 μM)、eva green (1X)、dATP 50 μM、dCTP (50 μM)、dGTP (50 μM)、dTTP (20 μM)、klenow fragment (0.05 U/μL)和 Texas Red-dUTP (30 μM)，第二管組成為 HP3 (1 μM)、primer (3 μM)、eva green (1X)、dATP (50 μM)、dCTP (50 μM)、dGTP (50 μM)、dTTP (50 μM)和 klenow fragment (0.05 U/μL)，隨後將雜合完的 A7/H/N 取 4 μL 分別加入兩管中(最終體積為 20 μL)於 37 °C 雜合 2 小時，反應完於兩管中分別吸取 4 μL 滴至 24 孔微量盤套件上，在 37 °C 的環境以 500 nm 的激發光偵測 520-700 nm 發射光波長範圍，每增加 2 nm 偵測螢光。

2.14 使用 DNA 聚合酶於擴增系統的最佳化偵測

使用多功能微量盤分析儀(M2^o)進行偵測，將輔助鏈 A7 (0.2 μM)、H (0.04 μM)、N (0.04 μM)、primer (0.6 μM)、eva green (1X)分別加入不同濃度 dATP (30、40、45、50 和 60 μM)、dCTP (30、40、45、50 和 60 μM)、dGTP (30、40、45、50 和 60 μM)和 dTTP (30、40、45、50 和 60 μM)、HP3 (0.2、0.6、1、1.5 和 2 μM)、klenow(0.01 U/μL、0.05 U/μL 和 0.2 U/μL)和 Texas Red-dUTP/dTTP (10/40、15/35、20/30、30/20 和 40/10 μM)，最終體積為 20 μL，於 37 °C 下雜合兩小時，隨後吸取 4 μL 滴至 24 孔微量盤套件上，在 37 °C 的環境以 500 nm 的激發光偵測 520-650 nm 發射光波長範圍，每增加 2 nm 偵測螢光。

2.15 使用目標物 H 和 N 於擴增系統的最佳化偵測

使用多功能微量盤分析儀(M2^o)進行偵測，將輔助鏈 A7 (0.2 μ M)、H (0.04 μ M)、N (0.04 μ M)、primer (0.6 μ M)分別加入不同濃度 dATP (30、40、45、50 和 60 μ M)、dCTP (30、40、45、50 和 60 μ M)、dGTP (30、40、45、50 和 60 μ M)和 dTTP (30、40、45、50 和 60 μ M)、klenow(0.01 U/ μ L、0.05 U/ μ L 和 0.2 U/ μ L)和 MB2 (0.2、1 和 2 μ M)，最終體積為 20 μ L，於 37 $^{\circ}$ C 下雜合兩小時，隨後吸取 4 μ L 滴至 24 孔微量盤套件上，在 37 $^{\circ}$ C 的環境以 495 nm 的激發光偵測 518-650 nm 發射光波長範圍，每增加 2 nm 偵測螢光。

2.16 訊號擴增系統的偵測極限分析

使用多功能微量盤分析儀(M2^o)進行偵測，首先將合成的輔助鏈(A7)、H 和 N 皆用含有 1X NEBuffer 進行回溶，A/H/N 濃度組合為 1 μ M/0.01 nM/0.01 nM、1 μ M/0.02 nM/0.02 nM、1 μ M/0.06 nM/0.06 nM、1 μ M/0.1 nM/0.1 nM、1 μ M/0.2 nM/0.2 nM、1 μ M/2 nM/2 nM、1 μ M/10 nM/10 nM 和 1 μ M/20 nM/20 nM 於 37 $^{\circ}$ C 雜合 1 小時，另外每組各配置兩管，第一管組成 HP3 (1 μ M)、primer (3 μ M)、eva green (1X)、dATP (50 μ M)、dCTP (50 μ M)、dGTP (50 μ M)、dTTP (20 μ M)、klenow fragment (0.05 U/ μ L)和 Texas Red-dUTP (30 μ M)，第二管組成為 HP3 (1 μ M)、primer (3 μ M)、eva green (1X)、dATP (50 μ M)、dCTP (50 μ M)、dGTP (50 μ M)、dTTP (50 μ M)和 klenow fragment (0.05 U/ μ L)，隨後將雜合完的 A7/H/N 取 4 μ L 分別加入兩管中(最終體積為 20 μ L)於 37 $^{\circ}$ C 雜合 2 小時，8 組反應完於兩管中分別吸取 4 μ L 滴至 24 孔微量盤套件上，在 37 $^{\circ}$ C 的環境以 500 nm 的激發光偵測 520-650 nm 發射光波長範圍，每增加 2 nm 偵測螢光並取不同濃度組合 618 nm 得到的螢光訊號作圖。

2.17 訊號擴增機制偵測雙重目標物的分析

使用多功能微量盤分析儀(M2^o)進行偵測，首先將合成的輔助鏈(A7)、H 和 N 皆用含有 1X NEBuffer 進行回溶，以不同的組合在 37 $^{\circ}$ C 雜合 1 小時，分別為 A7 (1 μ M)、

A7/H (1 μM /0.2 μM)、A7/N (1 μM /0.2 μM)和 A7/H/N (1 μM /0.2 μM /0.2 μM)，隨後各取 4 μL 加入含有 HP3 (1 μM)、primer (3 μM)、eva green (1X)、dATP (50 μM)、dCTP (50 μM)、dGTP (50 μM)、dTTP (20 μM)、klenow fragment (0.05 U/ μL)和 Texas Red-dUTP (30 μM) 最終總體積為 20 μL ，充分混合後別吸取 4 μL 滴至 24 孔微量盤套件上，在 37 $^{\circ}\text{C}$ 的環境以 500 nm 的激發光偵測 618 nm 發射光波長，以每 2 秒進行偵測持續 1000 秒。



第三章 結果與討論

3.1 分子探針與單條目標物之間狀態轉變的分析

用來辨認目標分析物的方法其中一項即為使用分子探針，傳統的方法通常會以莖環結構的環上區域為辨認序列的位點，莖部序列與目標分析物無關而形成互補的狀態(圖 3.1 (A))。在先前的研究中，已經有人指出藉由核苷酸去探討分子探針解折疊的熱力學和動力學行為並經由計算而知。通常普遍認為分子探針的結構會有三種不同狀態，狀態 1 為分子探針與目標分析物進行雜交形成雙股的狀態，狀態 2 的分子探針為莖環結構，狀態 3 的分子探針為無規則捲曲狀。

根據以上的系統模擬出相似的實驗進行研究，合成的分子探針 1 (MB1)與環上區域完全互補的目標序列(FL)於表 2.3。圖 3.2 (A)為分子探針 1 的熱變性曲線圖，圖中所示黑色曲線為不存在 FL，分子探針 1 在 10-50 °C 為折疊狀態，因此螢光值沒有顯著的變化；而溫度高於 50 °C 螢光訊號強度逐漸增大，因為加熱使得莖部互補的氫鍵被破壞，導致螢光基團(FAM)和淬滅基團(Dabcyl)間螢光共振能量轉移的效率下降因而有螢光訊號產生，最終螢光強度達最高值時溫度為 80 °C。藉由網頁軟體 Mfold 預測出分子探針 1 的熔解溫度約為 65 °C，其熔解溫度的理論值計算結果與實驗值相符合。圖中所示的紅色曲線為存在 FL，此時 FL 與分子探針 1 環上區域完全互補，所以螢光強度隨著溫度的上升而逐漸增大，最終在約 50 °C 有最強的螢光訊號，而溫度在 55-70 °C 間螢光訊號的下降是因為 FL 與分子探針 1 分離並摺疊回莖環結構，經由 Mfold 軟體預測得知，FL 與分子探針 1 間的熔解溫度約 64 °C 與實驗值相符，而 70 °C 之後分子探針 1 為無規則捲曲狀相似於黑色曲線。

將圖 3.2 (A)對照圖 3.1 (A)可以說明分子探針 1 的結構會有三種不同狀態是受溫度的影響，因而有解折疊的行為產生。圖 3.2 (A)中值得關注的是低於 30 °C 時為低的螢光訊號，推測在低溫時分子探針 1 因為熱力學的關係較偏向形成莖環結構，而導致 FL 無法有效的與分子探針 1 進行雜交反應，隨後因為溫度升高使得分子探針 1 變得不穩定，所

以螢光強度才會逐漸明顯增強。

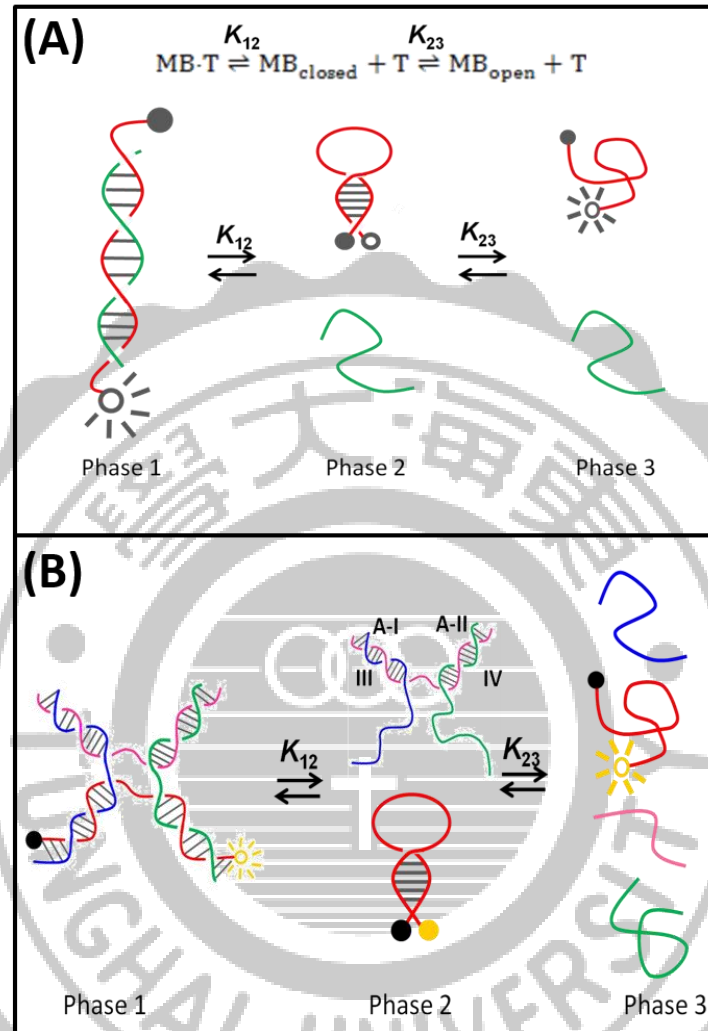


圖 3.1 分子探針與目標物間三種狀態的示意圖。(A)單條目標物(綠色)與分子探針(紅色)間的作用，狀態 1 為目標物與分子探針形成雙股的狀態，狀態 2 為分子探針自行折疊成莖環結構而目標物為自由捲曲狀，狀態 3 分子探針與目標物為自由捲曲狀。(B)輔助鏈(粉色)和雙重目標物(藍色和綠色)與分子探針(紅色)間的作用，狀態 1 為四條核酸序列形成霍利迪交叉結構，狀態 2 分子探針與雙重目標物分離折疊回莖環結構，狀態 3 四條核酸為自由捲曲狀。

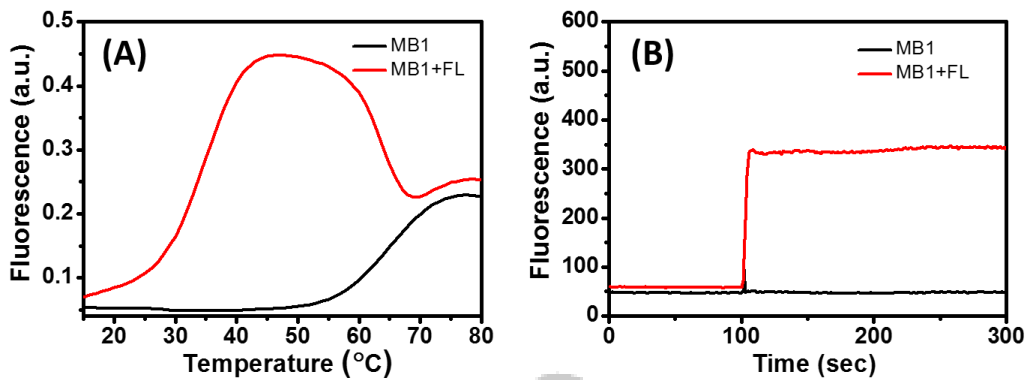


圖 3.2 分子探針 1 熱變性和動力學曲線圖(A)黑色曲線只存在分子探針 1，紅色曲線為加入與環上區域完全互補的目標物(FL)與分子探針 1 進行雜合。(B)黑色曲線只存在分子探針 1，紅色曲線於 100 秒加入 FL 進行雜合。

圖 3.2 (B)為探討 32 °C 下分子探針 1 與 FL 之間的動力學關係圖，圖中可以看到分子探針 1 在前 100 秒螢光訊號為平穩的狀態，可以說明分子探針 1 在 32 °C 下有穩定的形成莖環結構，當加入 FL 與分子探針 1 進行雜交反應，螢光訊號有增顯的效果且快速達到平衡，可以說明分子探針 1 與 FL 間的雜交有良好的反應速率。

3.2 利用分子探針同時偵測雙重目標物的探討

為了實現單一分子探針偵測多重基因片段，利用分子探針 1 參與兩條目標分析物進行研究。藉由圖 3.2 可知分子探針 1 與 FL 間有良好的雜交反應，因此設計出兩條含有 FL 序列的核苷酸，分別為目標物 K (TK)和目標物 L (TL)(其序列於表 2.3)進行熱變性曲線探討，此兩條序列為不連續性的片段與分子探針 1 環上區域進行雜交(如圖 3.3 (A))。結果於圖 3.4 (b)觀察到 15-50 °C 間所測得的螢光強度與背景訊號相似，相較於圖 3.2(A)的紅色曲線其結果明顯不同，由於得到低的螢光強度可以說明不連續性的片段無法有效的破壞莖環結構，因此使用不連續性的片段與環上區域雜交是有其困難性存在。

通常目標物序列與分子探針間雜交的位置為環上區域，而當目標物與分子探針雜交的位置包含莖部序列時，預期會提高目標物對分子探針的影響。藉由此想法將目標物 K

和目標物 L 延伸一個互補於莖部的核苷酸即為目標物 G (TG)和目標物 I (TI)(如圖 3.3 (B))。結果於圖 3.4 (c)觀察到螢光訊號沒有顯著的增加，只有在 41 °C 時產生些許的螢光強度。然而延伸一個核苷酸的螢光強度太低無法作為辨識，因此再進一步的延伸核苷酸進行探討(如圖 3.3 (C))，延伸三個核苷酸後的目標物序列即為目標物 E (TE)和目標物 F(TF)，結果於圖 3.4(d)觀察到 15-50 °C 間的螢光強度相較於目標物 K/目標物 L 和目標物 G/目標物 I 的組合高於約 5 倍螢光強度，此結果可以說明雜交於分子探針 1 莖部區域的核苷酸數目相當重要，同時也是對於雙重目標物偵測的關鍵。

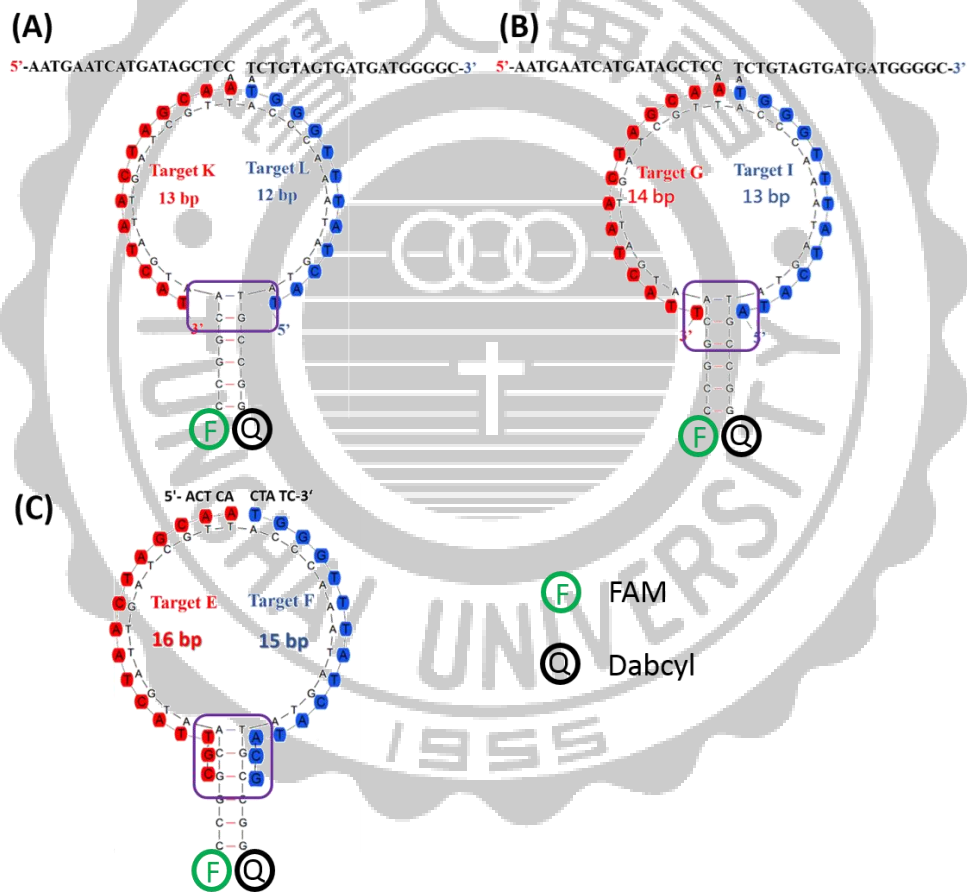


圖 3.3 目標物序列互補於分子探針 1 莖部區域數目的示意圖。(A)目標物 K/目標物 L 沒有與莖部區域互補。(B)目標物 G/目標物 I 與莖部區域一個核酸互補。(C)目標物 E/目標物 F 與莖部區域三個核酸互補。

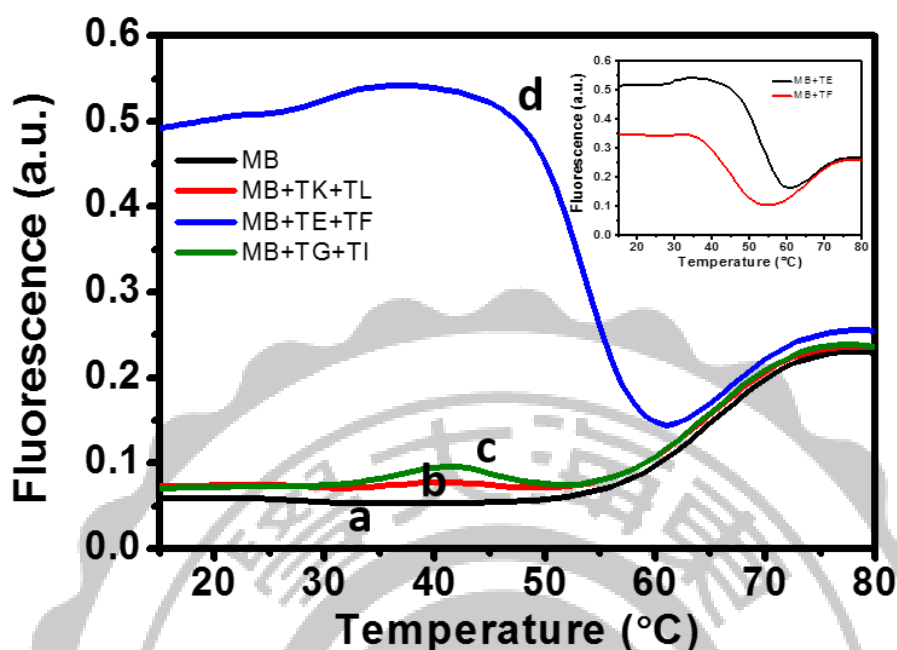


圖 3.4 互補於分子探針 1 莖部區域不同核酸數目的熱變性曲線圖。(a)只存在分子探針 1，(b)存在目標物 K/目標物 L 沒有與分子探針 1 莖部區域互補，(c)存在目標物 G/目標物 I 與分子探針 1 莖部區域一個核酸互補，(d)存在目標物 E/目標物 F 與分子探針 1 莖部區域三個核酸互補。插圖為單獨存在目標物 E(黑色曲線)和目標物 F(紅色曲線)與分子探針 1 作用。

然而為了實現邏輯閘 AND 訊號輸出的分析方法需要做進一步的確認，當只存在任一條目標物時不能有螢光訊號輸出，從圖 3.4 的插圖中觀察到任一條目標物 E 或目標物 F 都展現出顯著的螢光強度，因此不符合邏輯閘 AND 的分析方法，所以為了達到雙重目標物邏輯閘 AND 的分析方法除了莖部區域延伸核苷酸數目的因素以外還存在一些未知的因素，因而需要進一步的探討。

3.3 加入輔助鏈形成霍利迪交叉結構

為了實現分子邏輯閘 AND 的分析方法，在單個目標物存在時不希望有足夠的能力使分子探針產生解折疊，並只有在確定兩個目標物同時存在時能使分子探針構型產生巨大的變化因而產生螢光訊號輸出。除此之外，對於目標物需謹慎的挑選，因為非特異性的黏合可能會影響分子探針莖部雙股的穩定性。基於以上的原則為環上區域能同時辨認兩個目標物，然而雙重目標物組合邏輯閘 AND 的方法能有效的產生螢光訊號。在此我們提出加入一條輔助鏈的方法來實現邏輯閘 AND 的分析，而輔助鏈的片段包含與兩個目標物互補的序列。如圖 3.1 (B)，輔助鏈的 A-I 和 A-II 區域分別會與 TG (III)和 TI (IV) 進行雜交，而形成 TG 和 TI 有懸掛的片段，而懸掛的片段再與分子探針形成霍利迪交叉結構，如圖 3.1 (B) phase 1 所示。為了使交叉處有足夠的可繞性以利形成霍利迪交叉結構，因此存在未配對的核苷酸，然而以數字代表兩邊未配對核苷酸的數目如圖 3.5。

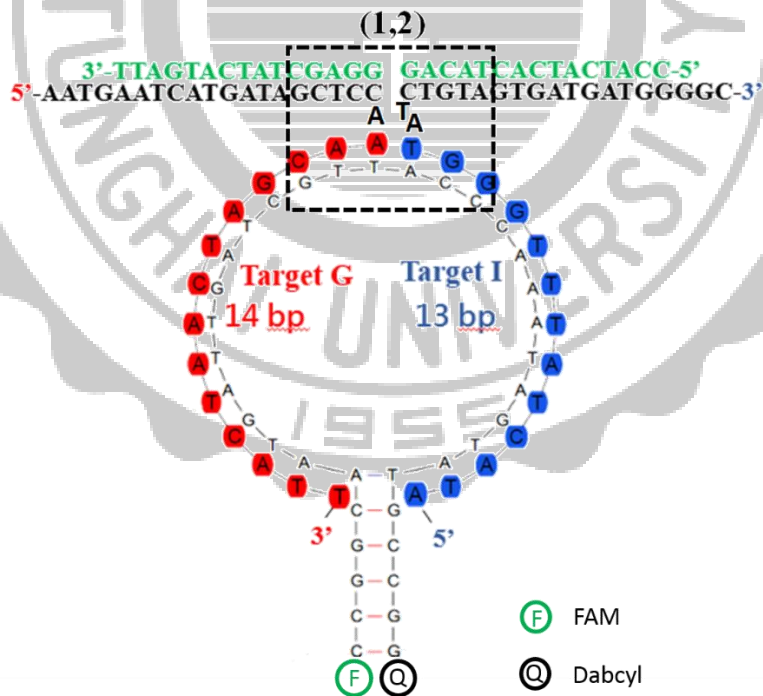


圖 3.5 形成霍利迪交叉結構未配對核酸數目示意圖。(1,2)表示為未配對核酸數目於虛線方框中。

3.4 輔助鏈與未配對核苷酸之影響

由於輔助鏈的加入能有效形成霍利迪交叉結構(1,2)從圖 3.6 可以觀察到，在 47 °C 同時存在目標物 G 和目標物 I 時分子探針 1 展現顯著的螢光強度(紅色曲線)，然而從圖 3.6 可以觀察到，當同時存在目標物 G 和目標物 I 且溫度低於 30 °C 時螢光訊號為緩慢的上升，推測在低溫時分子探針 1 因為熱力學的關係較偏向形成莖環結構，而導致目標物 G 和目標物 I 無法有效的與分子探針 1 進行雜交，而 30-50 °C 由於分子探針 1 逐漸變得不穩定使得目標物 G 和目標物 I 與分子探針 1 之間的雜交能力提升，因此螢光訊號產生急劇的上升，而溫度在 47-56 °C 間螢光訊號的下降是因為目標物 G 和目標物 I 與分子探針 1 分離，經由 Mfold 軟體預測得知，目標物 G 和目標物 I 與分子探針 1 之間的熔解溫度分別為 47 °C 和 43 °C 其結果與實驗值相符，而溫度高於 60 °C 由於分子探針 1 莖環結構的熱熔解溫度為 64 °C，因此溫度升高會使莖環結構產生解折疊，而形成無規則捲曲狀相似於黑色曲線。其餘組合皆符合邏輯閘 AND 的分析，在任一目標物存在下不會有顯著的螢光訊號輸出。

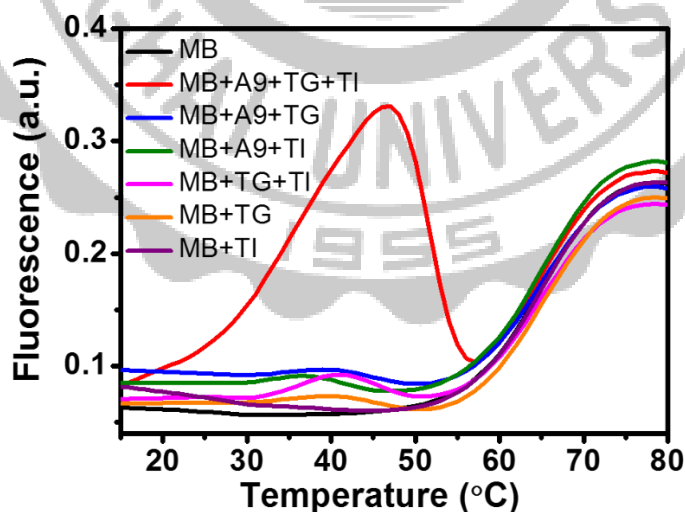


圖 3.6 加入輔助鏈與雙重目標物和分子探針 1 的熱變性曲線圖。使用輔助鏈(A9)和雙重目標物(TG 和 TI)不同組合進行雜合。

然而在霍利迪交叉結構中沒有未配對的核苷酸時(0,0)，結構太緊密不利於形成霍利迪交叉結構，因此只有少數的分子探針 1 產生解折疊，隨著溫度的增加使得分子探針 1 變不穩定，最終在 51 °C 有最高的螢光強度輸出如圖 3.7 (A)，相較於(1,2)在 47 °C 時的螢光強度可以說明，未配對核苷酸的存在對於形成霍利迪交叉結構的重要性，因而進一步探討不同組合的未配對核苷酸，如圖 3.7 (B)未配對核苷酸組合為(1,1)時，同時存在目標物 G 和目標物 I (紅色曲線)有顯著的螢光強度與(1,2)相似，可以說明未配對核苷酸的存在可以降低目標物 I 對分子探針 1 的影響，如圖 3.7 (C)未配對核苷酸的組合為(2,0)時，同時存在目標物 G 和目標物 I (紅色曲線)顯著的螢光強度與(1,2)幾乎相同，但因為輔助鏈與目標物 I 本身產生些許的螢光強度所以才使得(2,0)訊號值增高，因此推斷目標物 I 不存在未配對核苷酸時會對分子探針 1 造成影響，如圖 3.7 (D)將目標物 I 增加 1 個未配對核苷酸即為(2,1)，可以觀察到相較於(2,0)紅色曲線與綠色曲線的螢光強度分別下降約 12.9 % 和 19.4 %，因此更加確定(2,0)的螢光強度是因為輔助鏈與目標物 I 所造成。以上探討的結果強調目標物 I 需要足夠的未配對核苷酸來緩衝對分子探針造成的影響，達到在任一條目標物存在時不能有螢光訊號輸出，並在輔助鏈與雙目標物存在下能產生顯著的螢光強度，基於以上原則，最終(1,2)為最佳選擇。

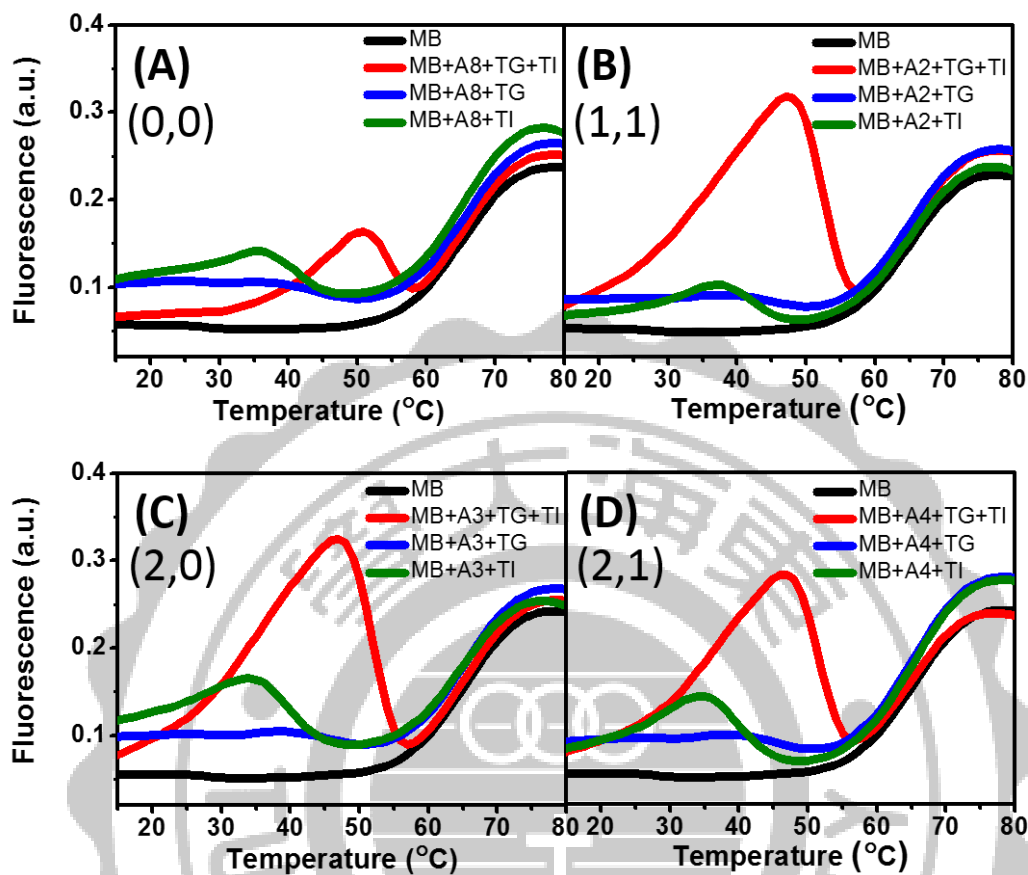


圖 3.7 不同未配對核酸組合的熱變性曲線圖。(A)未配對核酸為(0,0)，使用輔助鏈(A8)和目標物(TG 和 TI)不同組合進行雜合。(B)未配對核酸為(1,1)，使用輔助鏈(A2)和目標物(TG 和 TI)不同組合進行雜合。(C)未配對核酸為(2,0)，使用輔助鏈(A3)和目標物(TG 和 TI)不同組合進行雜合。(D)未配對核酸為(2,1)，使用輔助鏈(A8)和目標物(TG 和 TI)不同組合進行雜合。

3.5 熱力學參數的測定

藉由輔助鏈、目標物 G 和目標物 I 的加入使分子探針產生解折疊的行為，並針對分子探針解折疊的動力學和熱力學參數進行定量，然而每個組合之間的平衡常數即為 K_{12} (狀態 1 與狀態 2 之間)和 K_{23} (狀態 2 與狀態 3 之間)。藉由實驗材料與方法中推倒的公式

計算平衡常數，然而要使公式成立需為單一目標物與分子探針之間的雜交反應，所以我們利用聚丙烯酰胺凝膠電泳初步證實輔助鏈、目標物 G 和目標物 I 有成功形成三股結構(如圖 3.8)並將其三股結構似為單一目標物。

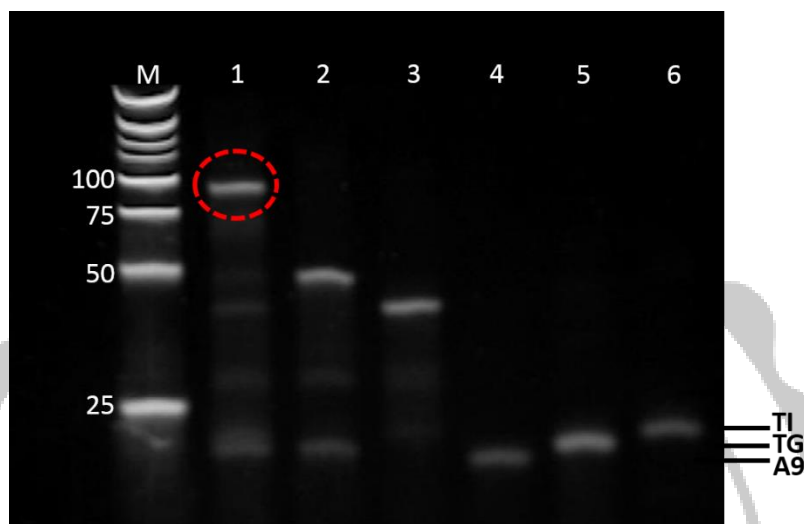


圖 3.8 輔助鏈與雙重目標物聚丙烯酰胺凝膠電泳圖。泳道 M 微分子標記(單位為核酸鹼基對)，泳道 1 為雜合輔助鏈(A9)與雙重目標物(TG 和 TI)，泳道 2 為雜合輔助鏈(A9)與目標物(TG)，泳道 3 為雜合輔助鏈(A9)與目標物(TI)，泳道 4 只存在輔助鏈(A9)，泳道 5 只存在目標物(TG)泳道 6 只存在目標物(TI)。

其熱力學的计算結果於表 3.1 中，即 K_{23} 說明分子探針 1 本身具有的特性其值為 $5.41 (\pm 0.43) \times 10^{-4}$ ，而目標物參與 K_{12} 反應的平衡過程，從表中結果觀察到 K_{12} 最小值為(2,0)的 1.37×10^{-6} ，最大值為(0,0)的 4.45×10^{-6} ， K_{12} 值越小代表霍利迪交叉結構形成的數目較多所以螢光訊號會較大，分別對照圖 3.7 (A)和(C)偵測到的螢光強度與計算值相符合，然而其他組合的 K_{12} 分別為 1.43×10^{-6} 到 1.56×10^{-6} 之間，相較於圖 3.2 (A)單個目標物的 K_{12} (1.84×10^{-6})解折疊的程度較佳。 K_{12} 為兩相狀態的平衡常數其大小可以代表狀態偏向程度，例如(0,0)顯示出 K_{12} 的最大值，代表不易形成霍利迪交叉結構，進而說明交叉處沒有未配對核苷酸會阻礙霍利迪結構的形成。進一步探討熵的變化(ΔS)如表 3.2，利

用不同濃度雙重目標物 1.2、1.8、3.0、4.8 和 7.2 μM 和相對應濃度輔助鏈與 0.2 μM 分子探針進行反應，並用熱變性曲線圖得到不同濃度下的螢光強度，藉由 $R\ln([T_0]-0.5[MB_0])$ 與熔解溫度倒數作圖可的一線性曲線(圖 3.9)，假設(1,1)、(2,1)、(2,0)和(1,2)所有組合在狀態 2 時輔助鏈與目標物形成的狀態一致所以將 S_2 視為定值，然而 ΔS 即為 S_2-S_1 的結果，如表所示(1,1)、(2,1)、(2,0)和(1,2)的 ΔS 分別為 647、607、643 和 696 $\text{J/mole}\cdot\text{K}$ ，當 S_1 值越小亂度越小所得到的 ΔS 會越大，亂度越小代表溶液組成中其結構較為穩定且有序，可以預期 ΔS 越小代表 S_1 越大其亂度較大，由於有序的結構(霍利迪交叉結構)形成可以使亂度變小，因而對照圖 3.7 可以說明 ΔS 越大螢光強度會較顯著。

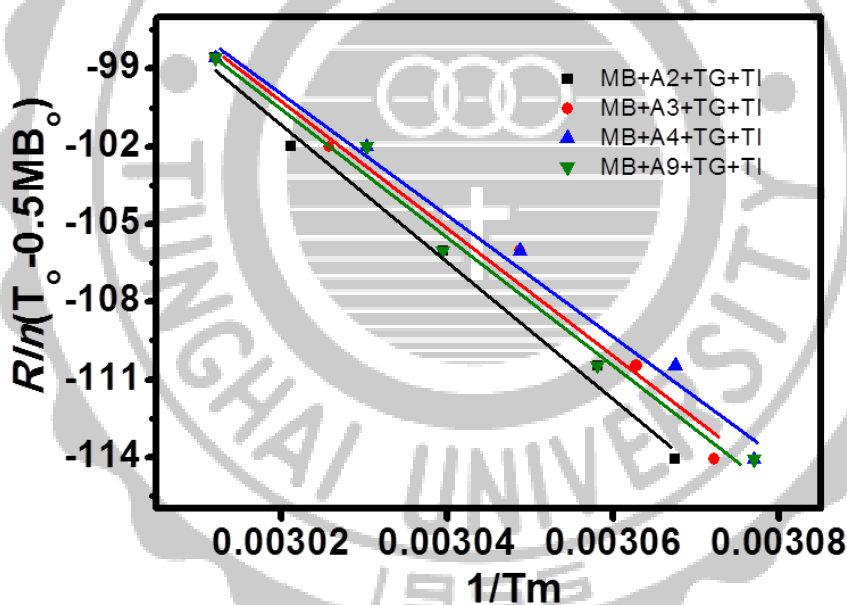


圖 3.9 不同未配對核酸組合 $R\ln(T_0-0.5MB_0)$ 與熔解溫度倒數關係圖。分子探針 1 濃度 0.2 μM ，輔助鏈與雙重目標物濃度分別為 1.2, 1.8, 3.0, 4.8, 7.2 μM 下得到的熔解溫度倒數值，黑色方框使用輔助鏈(A2)未配對核酸為(1,1)，紅色圓框使用輔助鏈(A3)未配對核酸為(2,0)，藍色三角形使用輔助鏈(A4)未配對核酸為(2,1)，綠色倒三角形使用輔助鏈(A9)未配對核酸為(1,2)。

表 3.1 存在輔助鏈與雙重目標物與分子探針之間的平衡常數和分子探針解折疊的速率常數。

	K_{23}	K_{12}	k_{30} ($M^{-1}s^{-1}$)	k_{300} ($M^{-1}s^{-1}$)
A2/TG/TI (1,1)	$5.41 (\pm 0.43) \times 10^{-4}$	1.43×10^{-6}	29433	1774
A4/TG/TI (2,1)	$5.41 (\pm 0.43) \times 10^{-4}$	1.56×10^{-6}	35913	3011
A3/TG/TI (2,0)	$5.41 (\pm 0.43) \times 10^{-4}$	1.37×10^{-6}	28687	1853
A8/TG/TI (0,0)	$5.41 (\pm 0.43) \times 10^{-4}$	4.45×10^{-6}	—	—
A9/TG/TI (1,2)	$5.41 (\pm 0.43) \times 10^{-4}$	1.49×10^{-6}	33235	661
A7/H/N (2,0) ^a	4.94×10^{-4}	1.71×10^{-6}	—	—
A7/H/N (2,0) ^b	6.96×10^{-3}	8.84×10^{-7}	29466	4223
A7/H/N (2,0) ^c	1.86×10^{-2}	1.77×10^{-7}	32016	5968

a:使用分子探針 2 在 32 °C 計算值，b:使用分子探針 2 在 37 °C 計算值，c:使用分子探針 2 在 45 °C 計算值，其餘皆使用分子探針 1 在 32 °C 計算值。

表 3.2 存在輔助鏈與雙重目標物與分子探針 1 之間的熱熔解溫度以及熵變化和焓變化。

	Measured θ_m	ΔH_{12} (kJ/mol)	ΔS_{12} (J/mol·K)
A2/TG/TI (1,1)	52	264	647
A4/TG/TI (2,1)	51	234	607
A3/TG/TI (2,0)	52	246	643
A9/TG/TI (1,2)	52	248	696

3.6 分子探針解折疊動力學探討

將輔助鏈與雙重目標物形成的構型和分子探針 1 進行雜交反應，在 32 °C 反應環境下藉由螢光訊號探討分子探針解折疊的動力學研究。首先將分子探針 1 雜合一段時間確保穩定形成莖環結構，如圖 3.10 所示，可以觀察到在雜合的過程螢光值維持穩定的狀態可以說明此時分子探針穩定的形成莖環結構，隨後加入由輔助鏈與雙重目標物形成的構型(箭頭處)，隨著時間的變化觀察螢光值的變化，並藉由材料與方法中動力學公式可以計算出解折疊的速率常數如表 3.1。圖 3.10 所示，首先分子探針 1 穩定 10 秒隨後加入輔助鏈與雙重目標物形成的構型(箭頭處)分別為(1,1) (紅色曲線)、(2,0) (藍色曲線)、(2,1) (綠色曲線)和(0,0) (粉色曲線)，觀察到螢光訊號在前 30 秒有顯著的上升且(2,1)相較於(1,1)和(2,0)有較大的斜率，代表(2,1)的組合使分子探針 1 產生解折疊的速率較快，而(0,0)組合的螢光強度較低代表(0,0)組合使分子探針 1 產生解折疊的效果不佳。

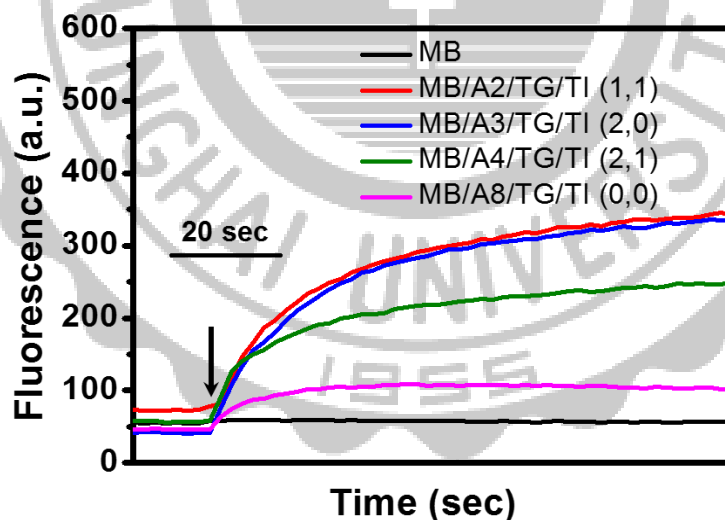


圖 3.10 分子探針 1 於不同未配對核酸數目解折疊的動力學曲線圖。黑線只存在分子探針 1，紅線、藍線、綠線和粉線分別為不同未配對核酸組合(1,1)、(2,0)、(2,1)和(0,0)。

3.7 動力學參數的測定

藉由定量分子探針 1 解折疊動力學曲線可以計算出分子探針 1 解折疊的速率常數，藉由輔助鏈與雙重目標物形成的構型加入後 30 秒產生顯著的螢光強度變化即為 k_{30} 和螢光值達平衡前 300 秒即為 k_{300} ，分別計算出不同組合下的速率常數如表 3.1，可以觀察到 (1,1)和(2,0)的 k_{30} 分別為 $29433 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 和 $28687 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 相較於(2,1)和(1,2)的 k_{30} 分別為 $35913 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 和 $33235 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 值較小，因為(1,1)和(2,0)形成霍利迪交叉結構由於交叉處未配對核苷酸數目較少會阻礙霍利迪交叉結構產生因而有較低的速率常數，當未配對核苷酸數目增加為(2,1)和(1,2)有利於形成霍利迪交叉結構所以使分子探針 1 解折疊的速率較快，此外所有組合的 k_{300} 皆小於 k_{30} ，特別是(1,2)下降的幅度約 98 %，由於 k_{300} 為接近平衡狀態時的速率常數所以螢光值不會有顯著的變化產生因而得到較低的速率常數，其餘組合的 k_{300} 速率常數範圍皆為 k_{30} 的 6-8 %。

3.8 設計檢測病毒序列的方案

使用單個分子探針進行雙重目標物序列感測的探討將進一步應用於生物醫學感測，在此研究中選用高致病性 A 型流感的病毒株[A/duck/Taiwan/DV30-2/2005 (H5N2)]作為雙重目標物序列的探討。根據上述實驗已知分子探針經由雙重目標物產生解折疊的行為並以 AND 邏輯閘機制運算輸出訊號的影響因子分別有，互補於分子探針莖部區域的核苷酸數目、需藉由輔助鏈的協助和未配對核苷酸的數目，經由已知的影響因子設計流感病毒序列檢測所需的分子探針和輔助鏈。首先需選定所要偵測 H5N2 的基因序列片段如表 3.3，從 H5 和 N2 基因編碼中分別選出兩個和四個具有特異性片段，需進一步探討如何選擇所要使用的片段。為了符合霍利迪交叉結構的形成雙重目標物序列皆需包含與兩個片段穩定的形成互補，分別為輔助鏈和分子探針環上區域，然而具特異性 H5 的 18 個核酸序列在第 8 個和第 9 個核苷酸分別為 T 和 G，可以說明此病毒株 [A/duck/Taiwan/DV30-2/2005 (H5N2)] 為特殊的病毒株，意思為此片段與其他一般高致病性 H5N2 中的 H5 基因編碼不同，因此不選用此片段，經由上述考量後 H5 的片段確定

選用 16 個核苷酸片段，經由上述實驗探討得知目標物序列與輔助鏈能穩定的形成互補可以提升此方案的成功率，因此 N2 選用最長的 26 個核苷酸片段，將 H5 片段 3'端 8 個核苷酸序列和 N2 片段 5'端 9 個核苷酸序列設計與環上區域互補，其餘沒有互補的 H5 和 N2 片段分別為 8 個和 16 個核苷酸將設計與輔助鏈形成互補如圖 3.11，最終無法以 AND 邏輯閘運算機制輸出訊號(未顯示數據)，由於 H5 與輔助鏈只有 8 個鹼基對形成互補不利於霍利迪交叉結構形成。

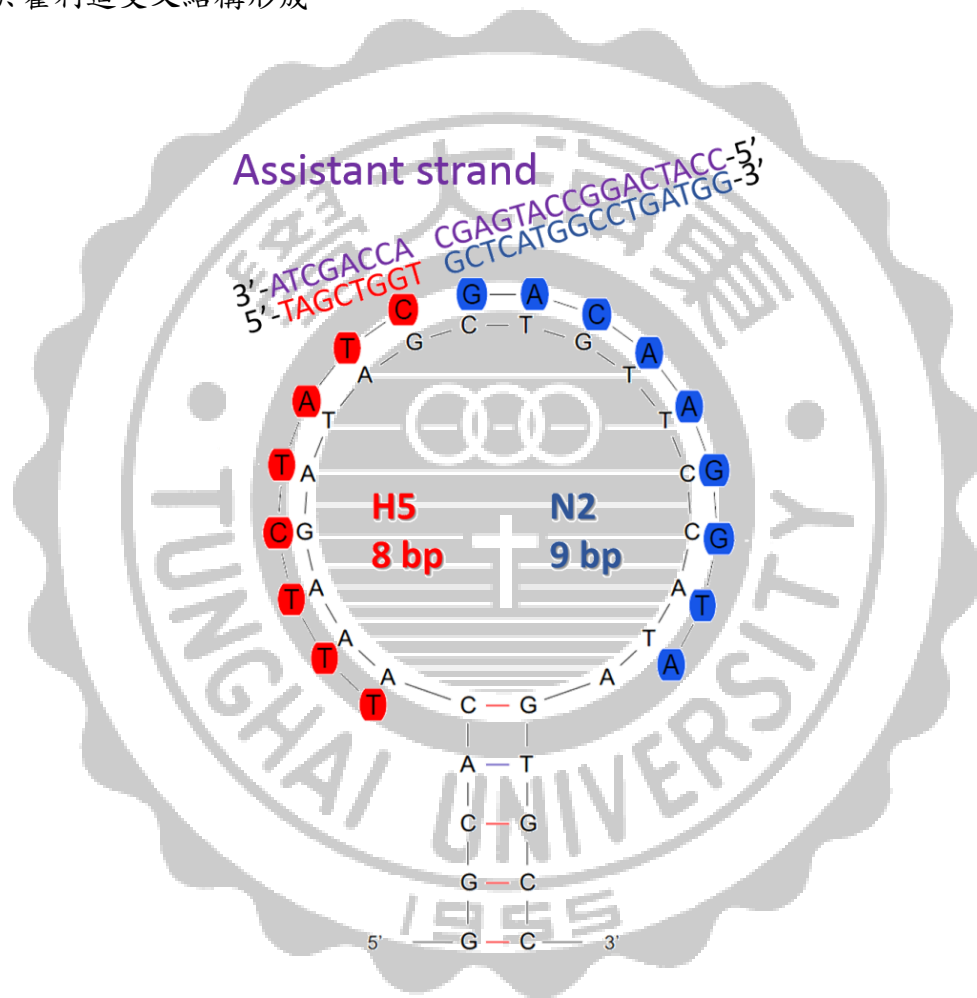


圖 3.11 設計檢測 H5N2 病毒序列(方案 1)示意圖。紫色為此方案所使用的輔助鏈，與 H5 片段有 8 個鹼基對互補，與 N2 片段有 16 個鹼基對互補，H5 (紅色)和 N2 (藍色) 片段皆使用具備特異性的片段。

因此將 H5 具特異性的 16 個核苷酸片段設計與分子探針環上區域互補，並採用相鄰的 H5 基因片段(即為 conserved 區域)與輔助鏈形成互補，此設計可以確保 H5 兩端有足夠的長度可以與輔助鏈和分子探針環上區域形成穩定的互補，而在交叉處設計未配對核苷酸存在為了有利於形成霍利迪交叉結構，然而我們發現 H5 序列上從 5'端算第 17 個核苷酸經由 Mfold 軟體預測得知不會與環上區域形成互補(如圖 3.12)，若分子探針環上區域沒有與目標物完全互補，會大幅度降低分子探針解折疊的行為。為了排除第 17 個核苷酸與分子探針環上區域不形成互補的可能性，因而將第 17 個核苷酸作為霍利迪結構交叉處未配對的核苷酸，最終 H5 具特异性序列有 15 個核苷酸與分子探針環上區域互補。



圖 3.12 分子探針與 H5 片段雜交的示意圖。

N2 序列一樣選用 26 個核苷酸片段，為了使分子探針環上區域雙重目標物互補數目接近，因而分配 N2 從 5' 端 15 個核苷酸設計與分子探針環上區域互補，其餘 11 個核苷酸設計與輔助鏈互補，而在這情況下經由 Mfold 軟體預測得知，具有特異性的 26 個核苷酸片段由於序列的關係本身容易形成二聚體(如圖 3.13)，由於熱力學關係 N2 序列較偏向形成二聚體，因而無法與輔助鏈形成互補，因此無法有效的形成霍利迪交叉結構，受於上述的限制將 N2 與輔助鏈互補區域 11 個鹼基對延伸為 14 個鹼基對以確保 N2 與輔助鏈穩定形成，經由以上調整使 N2 與分子探針環上區域從 15 個鹼基對縮減為 12 個鹼基對，由於 N2 與分子探針環上區域互補數目減少，因而沒有多餘的核苷酸可以當作霍利迪結構交叉處的未配對核苷酸。

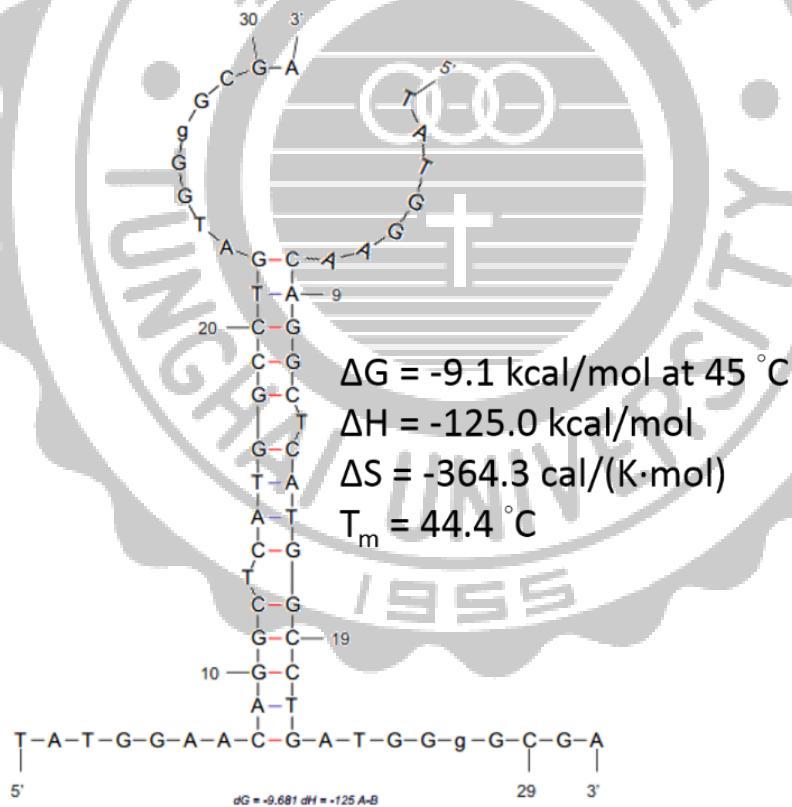


圖 3.13 N2 片段形成二聚體的示意圖。

經由以上的考量最終設計出用於感測 H5N2 病毒序列的分子探針命名為分子探針 2，環上區域有 24 個核苷酸莖部區域有 10 個鹼基對互補(如圖 3.14)，由 Mfold 軟體預測得知分子探針 2 的自由能為-5.17 kcal/mol 溶解溫度為 68.2 °C。

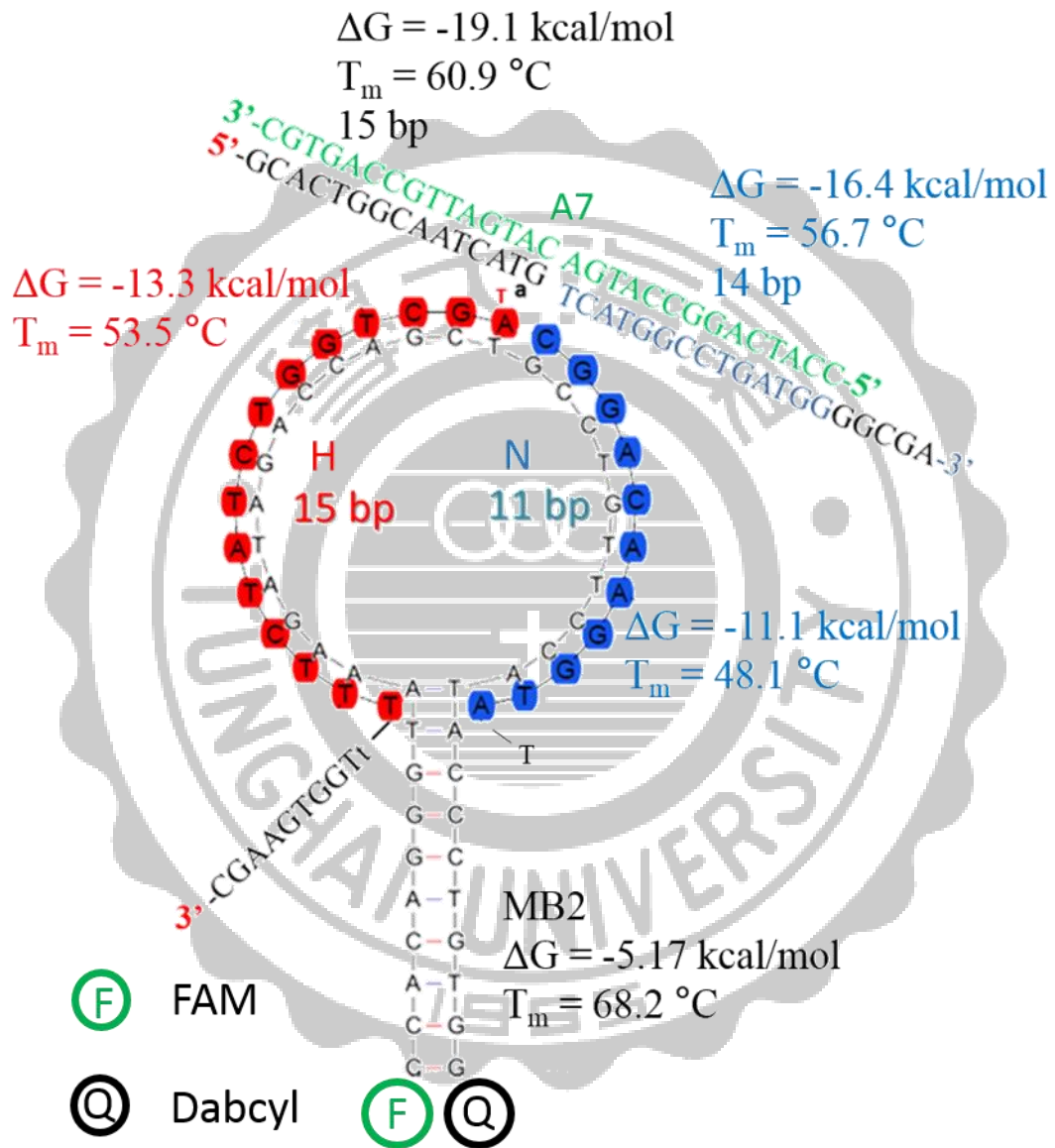


圖 3.14 設計檢測 H5N2 病毒序列(方案 2)示意圖。

3.9 藉由分子探針 2 解折疊行為檢測病毒序列

將分子探針 2 和輔助鏈以及雙重目標物使用不同組合雜合進行熱變性曲線分析，結果與圖 3.6 相似，圖 3.15 黑色曲線為分子探針 2 的熱變性曲線，而只有在輔助鏈與雙重目標物 H 和 N 同時存在下有顯著的螢光訊號產生(紅色曲線)，螢光強度約為 50 °C 時有顯著的差異相較於其他組合缺少輔助鏈、H 和 N 其中任一個或任兩個。從 Mfold 預測的結果分子探針 2 在 32 °C 時 $\Delta G = -8.08$ kcal/mol，而分子探針 1 在 32 °C 時 $\Delta G = -4.53$ kcal/mol，可以說明分子探針 2 最高螢光訊號時的溫度增加 3-4 °C 是因為莖環結構較為穩定，也可以由黑色曲線說明，當溫度高於 60 °C 時分子探針 2 產生解折疊的行為使得螢光訊號逐漸增加相較於分子探針 1 解折疊的行為發生在 56 °C。根據 Mfold 預測 N 和分子探針 2 環上區域之間形成雙股的熱熔解溫度為 48.1 °C 相較於分子探針 1 和目標物 I 之間形成雙股的熱熔解溫度為 43 °C，可以說明分子探針 2 與 N 在較高溫時才會分離，驅使霍利迪交叉結構產生瓦解因而螢光值下降。

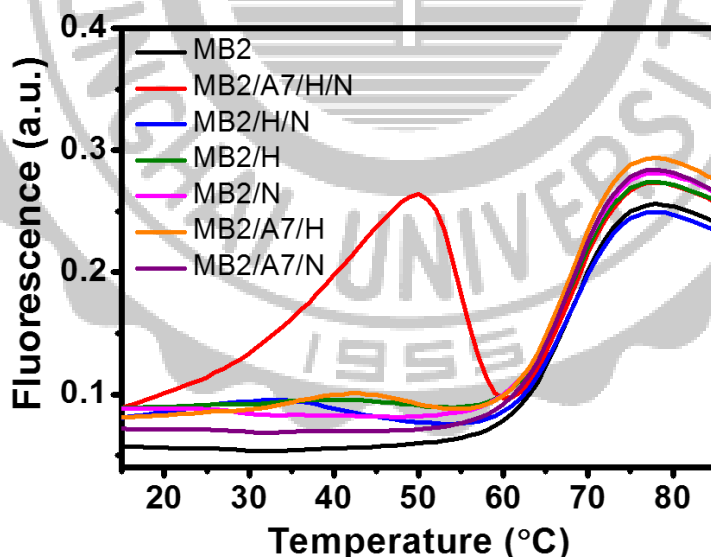


圖 3.15 加入輔助鏈與雙重目標物和分子探針 2 的熱變性曲線圖。使用輔助鏈 A7 和雙重目標物 H 和 N 不同組合進行雜合。

從圖 3.15 觀察到輔助鏈/H 和 H/N 這 2 個組合分別在 42 °C 和 35 °C 有些許的螢光訊號增加，但並沒有影響邏輯閘式 AND 訊號輸出，因此，我們證實分子探針 2，輔助鏈(A7)和未配對核苷酸(2,0)的設計有效用於辨認 H5N2 基因序列。

藉由上述實驗結果分子探針 2 能有效的辨認 H5N2 序列，並進一步探討 H5N2 序列使分子探針 2 解折疊的動力學如圖 3.16，其熱力學和動力學參數於表 3.1 中，從圖 3.16 觀察到在 45 °C 反應環境下分子探針 2 偵測雙重目標物產生良好的解折疊行為，且反應溫度從 37 °C 增加到 45 °C 會增快反應速率(如表 3.1)。當同時存在輔助鏈、H 和 N (紅色曲線)時相較於輔助鏈/H(綠色曲線)和 H/N(藍色曲線)的組合到達 1200 秒時產生約 4 倍的螢光強度差異。然而希望在短時間內能有效達到螢光訊號輸出，從加入輔助鏈、H 和 N 經過 5 分鐘後輸出的螢光訊號高於其他組合 2.2 倍之多。

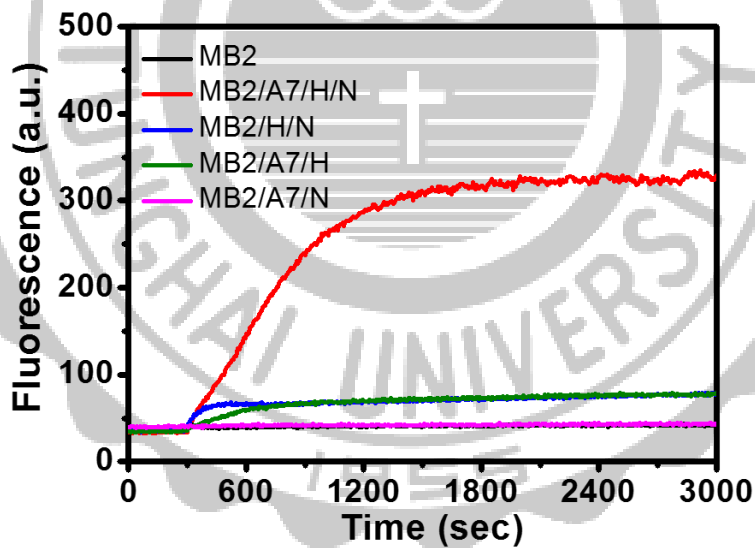


圖 3.16 輔助鏈與雙重目標物對分子探針 2 解折疊的動力學曲線圖。所有組合皆含有分子探針 2，黑色曲線只存在分子探針 2，紅色曲線包含輔助鏈(A7)和雙重目標物(H 和 N)，藍色曲線包含雙重目標物(H 和 N)，綠色曲線包含輔助鏈(A7)與目標物(H)，粉色曲線包含輔助鏈(A7)與目標物(N)。

在此我們探討該檢測方法的靈敏度，使用 0.2 μM 分子探針 2 加入不同 H5N2 合成的序列濃度分別為 0.12 nM、1.2 nM、24 nM、120 nM 和 240 nM，藉由背景螢光訊號強度的 3 倍標準偏差值得到該檢測方法的偵測極限為 120 pM(如圖 3.17)。

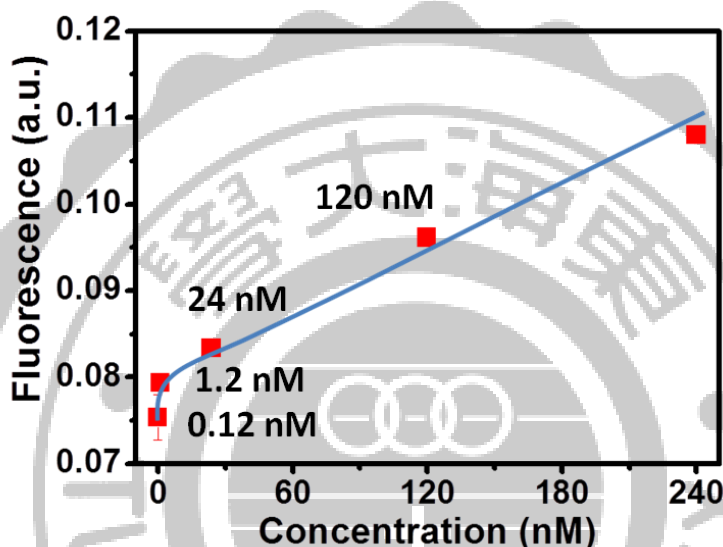


圖 3.17 分子探針 2 的感測靈敏度。使用 0.2 μM 分子探針 2 分別加入 0.12、1.2、24、120 和 240 nM 的雙重目標物。

3.10 非對稱式聚合酶鏈式反應(aPCR)產物的分析

上述實驗中我們證實分子探針 2，輔助鏈(A7)和未配對核苷酸(2,0)的設計有效用於辨認合成的 H5N2 基因序列，考慮到實際的應用我們進一步使用真實樣品的病毒株 (A/duck/Taiwan/DV30-2/2005 (H5N2)) 進行感測，首先將病毒 RNA 基因組反轉錄成 cDNA，隨後進行非對稱式聚合酶鏈式反應(aPCR)以產生 H5 和 N2 的單股產物(步驟於實驗材料與方法中)，將 aPCR 產物通過聚丙烯酰胺凝膠電泳可以觀察到有成功的擴增出 H5 和 N2 的單股片段(如圖 3.18)。

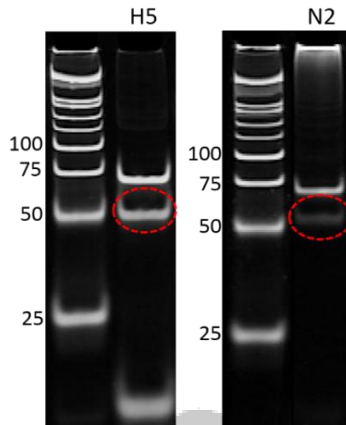


圖 3.18 非對稱式 PCR 產物聚丙烯酰胺凝膠電泳圖。紅色虛線圓框分別為 H5 (左)和 N2 (右)單股產物。

將分子探針 2 和輔助鏈與未經純化的 aPCR 產物進行反應，節省純化的步驟以加快分析，並於圖 3.19 插圖中(a、b、c 和 d 分別為 A、A/H5、A/N2 和 A/H5/N2)50 °C 時所偵測的螢光訊號以直方圖呈現(如圖 3.19)，從圖 3.19 可以觀察到 A/H5/N2 有顯著的螢光訊號產生(0.26)，相較於其他組合 A、A/H5 和 A/N2 有明顯的螢光訊號差異。

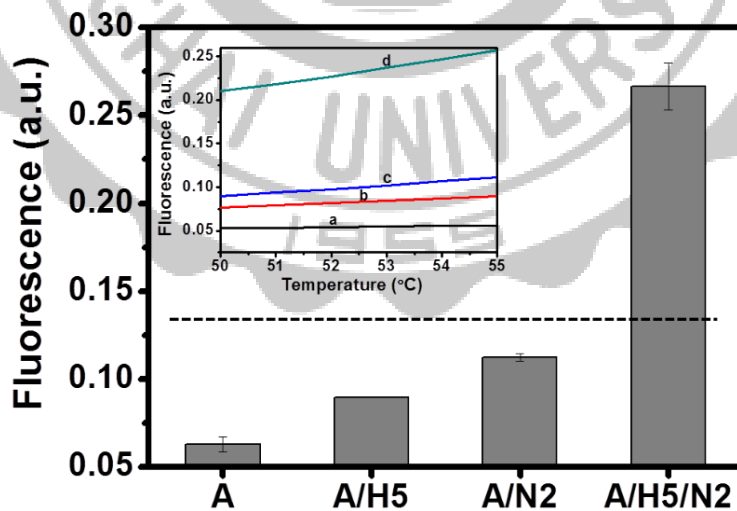


圖 3.19 非對稱式 PCR 產物偵測結果。插圖 a、b、c 和 d 分別為輔助鏈、輔助鏈和 H5 產物、輔助鏈和 N2 產物以及輔助鏈和雙重目標物產物(H5 和 N2)。

A/H5 和 A/N2 的螢光強度分別為 0.9 和 0.11，然而要能明顯的判別與 A/H5/N2 的差異需建立判定門檻值即為圖 3.19 的虛線，結果說明此實驗方法用於偵測雙重目標物螢光訊號輸出的評估有明顯的判別能力。因此，這樣的觀念也可以擴展至其他流感病毒的快速篩檢甚至是需要同時偵測雙重目標物藉由邏輯閘式 AND 的評估，此方法減少分子探針的需求和複雜化的訊號輸出方式且非專業人員也能清楚判別。

3.11 同時偵測雙重目標物並達到訊號擴增的偵測機制

用於偵測低濃度目標物的方法其中一項為訊號擴增，目前許多方法使用 DNA 聚合酶參與內切酶或外切酶達到目標物循環和訊號擴增，然而為了實現只用 DNA 聚合酶達到同時偵測雙重目標物並使訊號擴增，因此提出如圖 3.20 所示機制，藉由上述 3.9 小節使用分子探針 2 偵測流感病毒所設計的輔助鏈 A 辨認目標物 H5 和 N2 序列，並確認同時存在 H5 和 N2 時才會使分子探針 2 解折疊，在此 HP3 為具莖環結構的 DNA，其序列與分子探針 2 相同，差別於 DNA 兩端沒有修飾螢光團和淬滅團，當輔助鏈辨認到 H5 和 N2 之後再與 HP3 莖環結構形成霍利迪交叉結構，而 HP3 由莖環結構解折疊形成線性狀態，此時引子與呈線性的 HP3 進行雜交反應，隨後 DNA 聚合酶以 HP3 為模板進行合成作用，會將原本雜交在 HP3 上的 H5 和 N2 序列進行鏈取代反應而合成出雙股 DNA，此時被釋出的 A/H5/N2 將會進行下一循環反應持續產生雙股 DNA，當合成反應中的核苷酸包含 Texas Red-dUTP 時，Texas Red-dUTP 和 dTTP 競爭被修飾於雙股上，最終感測訊號來自雙股染劑 Eva Green 嵌入(intercalate)雙股中和臨近 Texas Red-dUTP 間發生螢光共振能量轉移效應，藉由激發 Eva Green 並偵測 Texas Red-dUTP 發射光強度以得到訊號，當雙股數目隨著循環次數的增加螢光訊號也會增加，因而達到訊號擴增的效果。

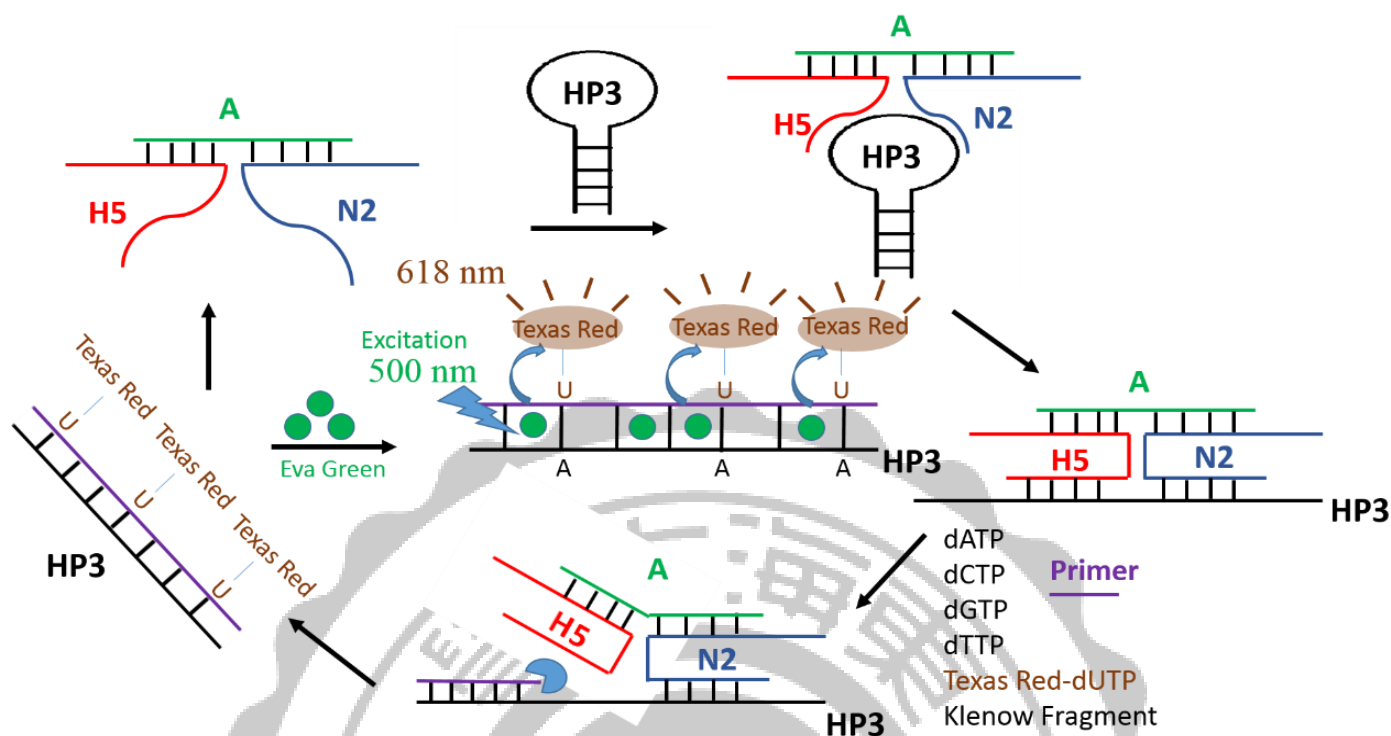


圖 3.20 訊號擴增的偵測機制示意圖。

3.12 FRET 效應的探討

為了實現只使用 DNA 聚合酶便能同時偵測雙重目標物且達到訊號擴增的效果，我們探討藉由 Texas Red-dUTP 的加入是否能有效的達到螢光共振能量轉移效應，如圖 3.21(A)指出相較於加入 50 μ M 的 dTTP (黑色曲線)，加入 20/30 μ M (dTTP / Texas Red-dUTP)比例(紅色曲線)於 618 nm 產生顯著的螢光增長，另外於 530 nm 波長範圍下螢光強度亦減弱，當 DNA 聚合酶作用合成出雙股，DNA 雙股染劑 Eva Green 便會嵌入其中，並在 530 nm 波長範圍下放出螢光訊號，此螢光訊號(530 nm)可因螢光共振能量轉移的效應而將此發射光能量用於激發已合成入雙股中的 Texas Red-dUTP，因此造成 530 nm 螢光強度的減弱及 618 nm 波長下螢光的增長，這證實 FRET 機制已成功操作。

圖 3.21 (B)為圖 3.21 (A)中進行反應後產物所表達聚丙烯酰胺凝膠電泳圖，泳道 1

為加入 50 μM 的 dTTP，泳道 2 為 20/30 μM 比例的 dTTP 與 Texas Red-dUTP，泳道 M 為 DNA 分子標記(單位為雙股鹼基對數目)，如圖 3.21 (B)，可以觀察到於 25 鹼基對位置為 HP3(即為模板)，依照模板長度可以推測 DNA 聚合酶所合成出雙股位於 50 鹼基對附近，所以推測紅色虛線方框為合成後雙股產物，從明亮程度觀察到所合成出雙股數量並無明顯差異，藉由聚丙烯酰胺凝膠電泳圖亦指出 DNA 聚合酶成功把 Texas Red-dUTP 合成於 DNA 雙股上，並證實合成的效率差異不大。

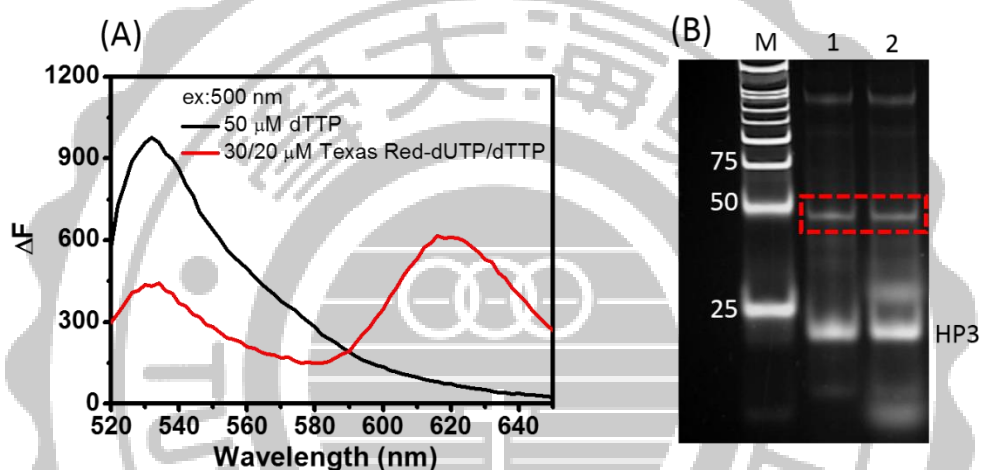


圖 3.21 產生 FRET 效應的結果。(A)黑色曲線為存在 50 μM 的 dTTP，紅色曲線為存在 20/30 μM 比例的 dTTP/Texas Red-dUTP。(B)泳道 M 為分子標誌(單位為核酸鹼基對)，泳道 1 為(A)圖黑色曲線電泳圖，泳道 2 為圖(A)紅色曲線電泳圖。

3.13 偵測系統最佳化

偵測系統中各主要成份濃度皆會影響最終訊號輸出的結果。於圖 3.20 的訊號擴增機制中，我們主要探討是否有成功地進行擴增反應，而擴增反應的關鍵是來自於 DNA 聚合酶的合成作用，因此，藉由是否存在 DNA 聚合酶探討擴增反應。此外我們也針對一般最佳化方式使用是否存在目標物進行探討。圖 3.22 為是否存在 DNA 聚合酶最佳化的

結果。圖 3.22(A)藉由偵測 Eva Green 發射光波長(530 nm)觀察雙股形成的數目(ΔF 即為 $F-F_0$, F_0 為不參與 DNA 聚合酶反應所得到的螢光強度), 探討 3 個 DNA 聚合酶濃度分別為 0.01 U/ μ L (黑色曲線)、0.05 U/ μ L (紅色曲線)和 0.2 U/ μ L (藍色曲線), 以及不同 HP3 濃度, 分別為 0.2 μ M、0.6 μ M、1 μ M、1.5 μ M 和 2 μ M, 從圖中觀察到隨著 HP3 濃度增加 ΔF 趨勢分為兩部分, 由於螢光染劑 Eva Green 嵌入 DNA 雙股, 所以當 HP3 濃度增加時 F_0 的螢光訊號會逐漸上升, 當經由 DNA 聚合酶作用產生的螢光訊號 F 在 HP3 濃度為 1 μ M 之後合成的效果趨近一致, 因此 HP3 濃度為 1 μ M 之後螢光訊號值隨濃度變小。當 DNA 聚合酶濃度太低時(0.01 U/ μ L)合成的效果不佳使得 ΔF 值較小, 然而當 DNA 聚合酶高於 0.05 U/ μ L 時已經達到飽和的狀態, 因此 ΔF 沒有顯著的提升。

圖 3.22 (B)藉由偵測 Eva Green 發射光波長(530 nm)觀察雙股形成的數目, 在此探討 5 個 dNTP 濃度分別為 120、160、180、200 和 240 μ M, 從圖中觀察到隨著 dNTP 濃度增加 ΔF 值逐漸上升, 表示 dNTP 的量越多被合成出的雙股數量較多, dNTP 濃度為 240 μ M 時 ΔF 值下降, 當 dNTP 濃度增加會增加 DNA 聚合酶的合成速率而導致錯配的機率提高, 因此沒有形成完整的雙股使得 ΔF 值下降。

圖 3.22 (C)藉由激發 Eva Green 觀察 Texas Red-dUTP 的發射光波長(618 nm)探討 Texas Red-dUTP/dTTP 之間比例的影響, 在此分別探討 5 個不同 Texas Red-dUTP/dTTP 比例的組成分別為 10/40、15/35、20/30、30/20 和 40/10 μ M, 從圖中觀察到隨著 Texas Red-dUTP 濃度增加 ΔF ($F-F_0$) 趨勢分為三部分, 當 Texas Red-dUTP 為低濃度(10 μ M)時, 在 500 nm 激發光下只有產生些許的背景訊號而使 F 與 F_0 相扣得到 ΔF 值偏高, 而 Texas Red-dUTP 濃度過高(40 μ M)時在 500 nm 激發光下會產生高的背景訊號加上沒被合成的 Texas Red-dUTP 非特異性黏合於 DNA 上產生些許的 FRET 訊號, 因此 F 與 F_0 相扣得到 ΔF 值偏低, Texas Red-dUTP 濃度從 15-30 μ M 隨著濃度的增加被合成到雙股上的 Texas Red-dUTP 增加, 所以較多數量的 Texas Red-dUTP 與嵌入到雙股中的 Eva Green 產生 FRET 的效應, 因此 F 與 F_0 相扣得到 ΔF 值漸漸提升, 最終 Texas Red-dUTP 在 30 μ M 時有最高 ΔF 值。

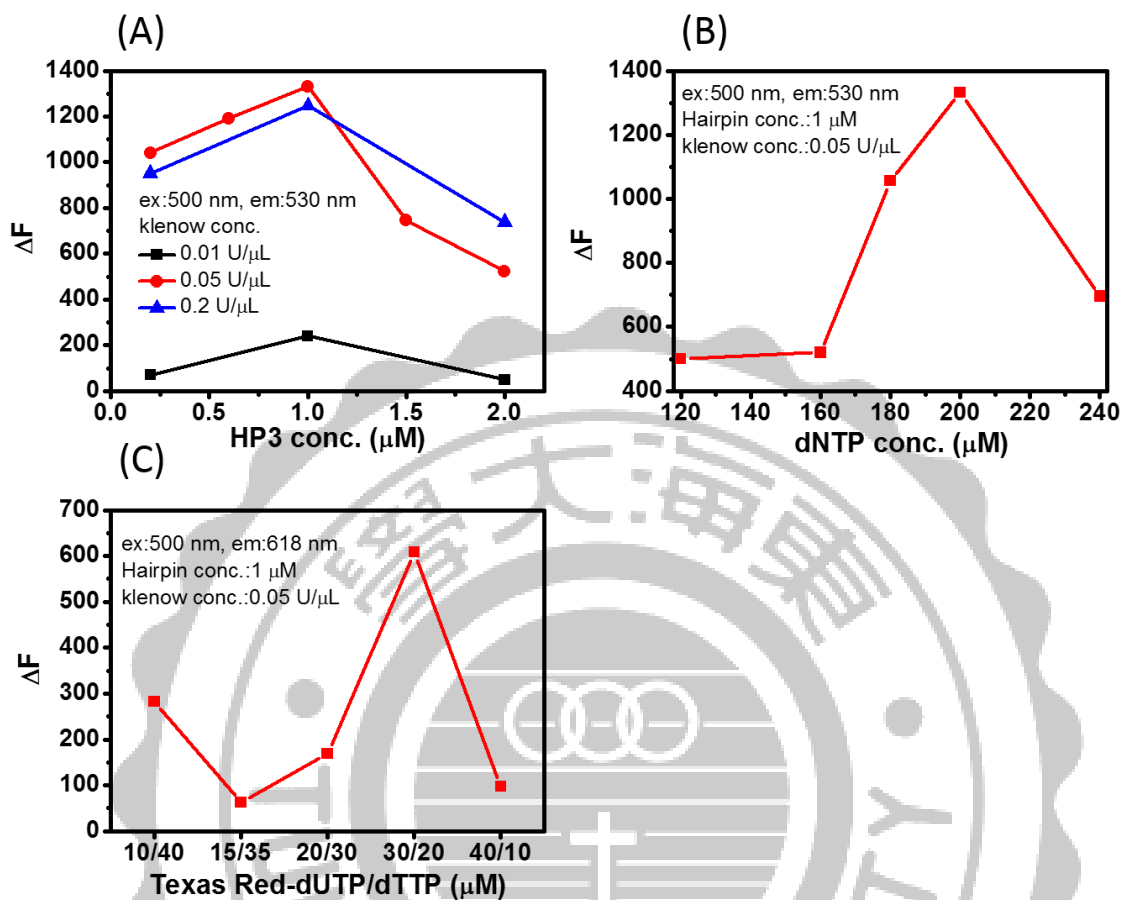


圖 3.22 使用聚合酶最佳化訊號擴增系統。(A)探討不同 HP3 濃度分別為 0.2 μM 、0.6 μM 、1 μM 、1.5 μM 和 2 μM 和不同 DNA 聚合酶濃度分別為 0.01 U/ μL 、0.05 U/ μL 和 0.2 U/ μL 。(B)探討不同 dNTP 濃度分別為 120、160、180、200 和 240 μM 。(C)探討不同 Texas Red-dUTP/dTTP 比例組成 10/40、15/35、20/30、30/20 和 40/10 μM 。

圖 3.23 為是否存在目標物最佳化的結果。藉由是否存在目標物觀察分子探針 2(MB2) 解折疊的性質(ΔF 即為 $F-F_0$, F_0 為不存在目標物時的螢光強度)。圖 3.23(A)探討 3 個 DNA 聚合酶濃度分別為 0.01 U/ μL (黑色曲線)、0.05 U/ μL (紅色曲線)和 0.2 U/ μL (藍色曲線)，以及不同 MB2 濃度，分別為 0.2 μM 、1 μM 和 2 μM 。從圖中觀察到隨著 MB2 濃度增加

在 1 μM 之後達到飽和狀態。當 DNA 聚合酶濃度太低時(0.01 U/ μL)合成的效果不佳使得 ΔF 值較小，然而當 DNA 聚合酶高於 0.05 U/ μL 時已經達到飽和的狀態，因此 ΔF 沒有顯著的提升。圖 3.23 (B)藉由 MB2 解折疊的性質探討 5 個 dNTP 濃度分別為 120、160、180、200 和 240 μM ，從圖中觀察到 dNTP 濃度為 160 μM 後沒有顯著的變化。

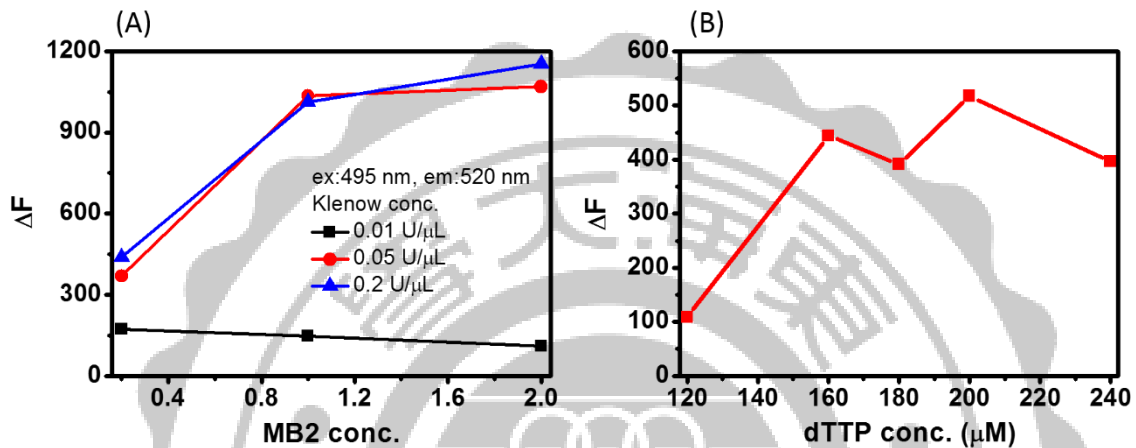


圖 3.23 使用目標物 H 和 N 最佳化訊號擴增系統。(A) 探討不同 MB2 濃度分別為 0.2 μM 、1 μM 和 2 μM 以及不同 DNA 聚合酶濃度分別為 0.01 U/ μL 、0.05 U/ μL 和 0.2 U/ μL 。(B) 探討不同 dNTP 濃度分別為 120、160、180、200 和 240 μM 。以上皆使用 495 nm 的激發光觀察 520 nm 得到的螢光強度。

3.14 系統的偵測極限

本篇研究提出同時偵測雙重目標物並達到訊號擴增的偵測機制，並進一步檢測此機制的感測靈敏度，經由上述 3.13 小節最佳化後的條件探討目標物序列(H5 和 N2)感測靈敏度，濃度分別為 2 pM、4 pM、12 pM、20 pM、40 pM、400 pM、2 nM 和 4 nM，如圖 3.24(A)所示，正如預期藉由增加目標物濃度從 2 pM - 20 pM 我們觀察到有無 DNA 聚合酶存在下螢光強度都逐漸增高，目標物濃度增加使得較多霍利迪交叉結構形成，在 DNA 聚合酶存在下，有較多的模板(HP3)供 DNA 聚合酶進行合成反應，將 Texas Red-dUTP 合成到雙股上產生 FRET 效應，因此訊號逐漸上升，不存在 DNA 聚合酶下因

為目標物濃度增加使得溶液中 Texas Red-dUTP 非特异性黏合於雙股 DNA 上，而產生些許的 FRET 效應，因此訊號亦隨目標物濃度些微上升。圖 3.24(B)為有無 DNA 聚合酶存在下不同目標物濃度在放射光 618 nm 的波長下所得到螢光強度與目標物濃度之間的關係圖，如圖所示，我們觀察到目標物濃度從 2 pM - 4 nM 分成兩段線性，將低濃度範圍 2 pM - 20 pM 放大為圖 3.24(B)的插圖觀察到在低濃度呈現良好的線性關係，以目標物濃度為 0 pM 時所得訊號加上 3 倍標準偏差其所對應之濃度約為 7 pM，亦可視為此機制偵測極限。

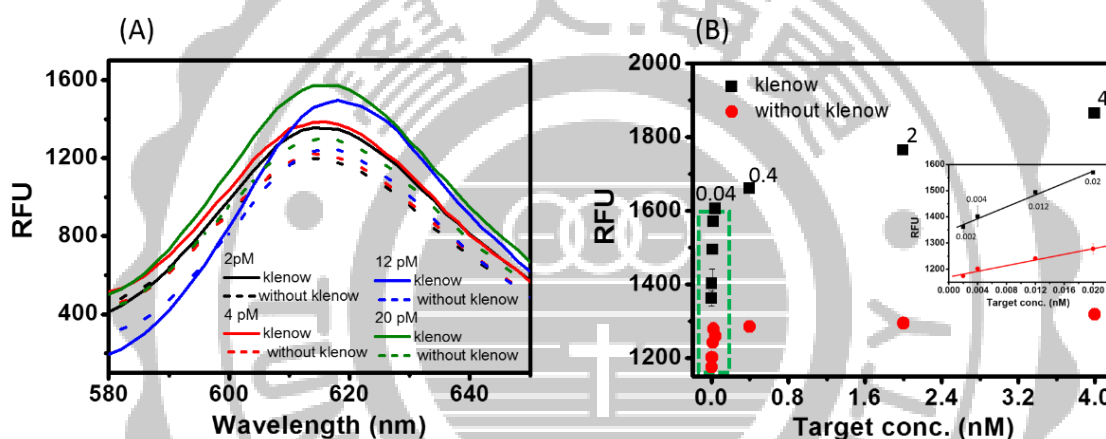


圖 3.24 擴增系統的感測靈敏度。(A)螢光發射光譜圖(500 nm 激發光)存在聚合酶為實線不存在聚合酶為虛線，存在不同雙重目標物濃度分別為 2 pM(黑色曲線)、4 pM(紅色曲線)、12 pM(藍線)和 20 pM(綠色曲線)。(B) 618 nm 波長下螢光值與雙重目標物濃度之間關係圖，插圖為綠色虛線方框放大圖。

3.15 利用訊號擴增機制偵測雙重目標物的探討

為了證實能同時偵測兩條 DNA 片段並以 AND 邏輯閘的原理呈現訊號，我們比較不同待測 DNA 片段存在下所得訊號，圖 3.25 (A)指出，黑色曲線為不存在任何 H5 或 N2 的 DNA 片段，所以螢光值隨著時間沒有顯著的變化，紅色和藍色曲線分別只存在任

一條 H5 或 N2 (註:以我們的需求是要同時偵測到 H5 和 N2)，所以在這 2 個狀況下未有顯著螢光產生，從結果看到此兩條曲線只些許高於背景訊號，綠色曲線為 H5 和 N2 同時存在下，從圖中觀察到螢光訊號隨著時間顯著增加，上述實驗所得於 1000 秒訊號值表示於 3.25 (A)的插圖，此結果表示我們的機制於兩條 DNA 同時存在時其螢光訊號明顯大於其它三種情況，由此證實同時偵測兩條 DNA 片段並以邏輯閘 AND 機制運作是可行的。圖 3.25 (B)為圖 3.235(A)中進行感測反應後所得產物的聚丙烯酰胺凝膠電泳圖，電泳圖上泳道 M 為 DNA 分子標記(單位為雙股鹼基對數目)，可以觀察到於 25 鹼基對位置為 HP3(即為模板)，依照模板長度可以推測 DNA 聚合酶合成出來的雙股位於 50 鹼基對附近，所以紅色虛線方框為產物的量，其結果與螢光曲線圖相符合，只有同時存在 H5 和 N2 狀況下(泳道 d)有較多的產物產生。

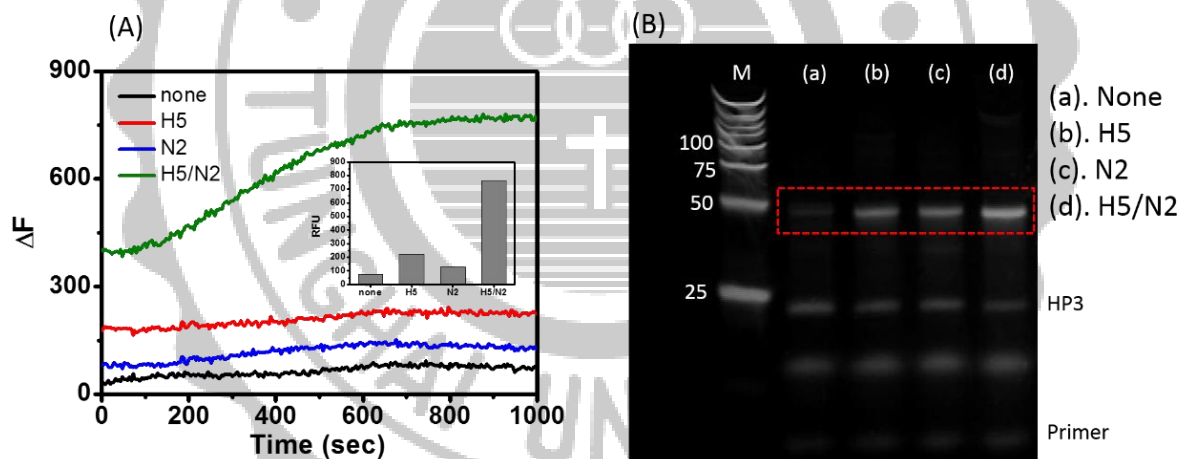


圖 3.25 擴增系統中偵測 H5N2。(A)隨時間偵測不同 H5 和 N2 組合的螢光值變化，插圖為 1000 秒螢光值以直方圖顯示。(B)聚丙烯酰胺凝膠電泳圖。

第四章 結論

本研究成功地利用以分子探針為基礎的感測器進行感測，結果顯示能同時偵測雙重基因片段的優點以及有良好的感測效力，於本研究中探討分子探針的穩定性和多功能性，用於識別雙重基因片段訊號輸出的結果藉由螢光共振能量轉移的效應，以訊號輸出 0 或 1 的數位方式直接表示出陰性或陽性。伴隨輔助鏈的加入已證實能有效地與雙重基因片段雜交便會與分子探針形成霍利迪交叉結構，於霍利迪結構交叉處的未配對核酸數目已證實會影響分子探針折疊-解折疊(即為訊號 0 或 1)的行為，因此我們進一步探討不同未配對核酸數目的組合與分子探針之間的平衡常數、解折疊的速率和評估熵的變化，最終我們以 H5 和 N2 基因片段設計出專屬的分子探針 2，其分子探針於莖部有 10 個鹼基配對；環上區域有 24 個核苷酸，且最終形成霍利迪結構交叉處的未配對核酸數目為(2,0)，結果顯示，分子探針 2 能有效的同時偵測 H5 和 N2 基因片段且於 37 °C 下測得解折疊的速率為 $29466 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 及平衡常數為 8.84×10^{-7} ，於實際應用觀點上，經過 5 分鐘反應後輸出的螢光訊號能達到高於其他陰性組合(不存在 H5 和 N2 基因片段、只有 H5 基因片段和只有 N2 基因片段)2.2 倍之多，此感測系統對於同時存在 H5 和 N2 基因片段的偵測極限為 120 pM，此外我們也成功的用於檢測未經純化的 PCR 產物。我們進一步利用酵素聚合酶進行鏈取代反應及產生螢光共振能量轉移效應達到訊號擴增的效果，進而提升感測靈敏度，結果顯示我們成功地進行 FRET 的操作，且此感測機制對於三種陰性組合不易產生偽陽性結果也同時達到靈敏度的提升，最終經由 FRET 感測機制的系統對於同時存在 H5 和 N2 基因片段的偵測極限為 7 pM。

第五章 未來展望與建議

實驗結果證實我們成功感測流感病毒 H5N2 核酸序列並利用分子邏輯閘 AND 的想法，藉由核酸分子序列的專一性，結合邏輯閘的運算機制，最終可以直接得到樣品分析結果”YES/NO”的單一結果訊息，提升樣品檢測的準確性以及簡易的判別結果。

未來還需努力改善的是，如何降低檢測極限並達到不須經由聚合酶鏈式反應(PCR)，便能進行感測。此外也可嘗試針對不同流感病毒的型態進行選擇性的測試，使檢測結果的準確性大大提升。然而使用分子探針的熱熔解曲線圖(melting curve)觀察 3 個狀態之間的轉換，日後也可使用圓二色光譜儀觀察構型的轉變。以及在設計偵測目標物相對應的分子探針時，也可使用圓二色光譜儀確認霍利迪交叉結構的形成，可以減少成本的花費以及提高準確性，且靈敏度相較於電泳膠片圖較佳。期許更多有利的驗證結果可以開啟以分子探針為核心之雙重目標物分析方法於分子診斷之應用。

第六章 參考文獻

- (1) Watson, J. D.; Crick, F. H. *Nature* **1953**, *171*, 737-738.
- (2) Yakovchuk, P.; Protozanova, E.; Frank-Kamenetskii, M. D. *Nucleic Acids Res* **2006**, *34*, 564-574.
- (3) Kool, E. T. *Annu Rev Bioph Biom* **2001**, *30*, 1-22.
- (4) Debouck, C.; Goodfellow, P. N. *Nat Genet* **1999**, *21*, 48-50.
- (5) Cheng, M. M. C.; Cuda, G.; Bunimovich, Y. L.; Gaspari, M.; Heath, J. R.; Hill, H. D.; Mirkin, C. A.; Nijdam, A. J.; Terracciano, R.; Thundat, T.; Ferrari, M. *Curr Opin Chem Biol* **2006**, *10*, 11-19.
- (6) Vercoutere, W.; Akeson, M. *Curr Opin Chem Biol* **2002**, *6*, 816-822.
- (7) Mocharla, H.; Mocharla, R.; Hodes, M. E. *Gene* **1990**, *93*, 271-275.
- (8) Fouchier, R. A.; Bestebroer, T. M.; Herfst, S.; Van Der Kemp, L.; Rimmelzwaan, G. F.; Osterhaus, A. D. *Journal of clinical microbiology* **2000**, *38*, 4096-4101.
- (9) Heid, C. A.; Stevens, J.; Livak, K. J.; Williams, P. M. *Genome research* **1996**, *6*, 986-994.
- (10) Watkins-Riedel, T.; Woegerbauer, M.; Hollemann, D.; Hufnagl, P. *Diagn Micr Infec Dis* **2002**, *42*, 99-105.
- (11) Yang, Y.; Zhao, L. X. *Trac-Trend Anal Chem* **2010**, *29*, 980-1003.
- (12) Liu, A. L.; Wang, K.; Weng, S. H.; Lei, Y.; Lin, L. Q.; Chen, W.; Lin, X. H.; Chen, Y. Z. *Trac-Trend Anal Chem* **2012**, *37*, 101-111.
- (13) Tyagi, S.; Kramer, F. R. *Nat Biotechnol* **1996**, *14*, 303-308.
- (14) Kolpashchikov, D. M. *Scientifica* **2012**, *2012*, 928783.
- (15) Tan, W. H.; Wang, K. M.; Drake, T. J. *Curr Opin Chem Biol* **2004**, *8*, 547-553.
- (16) Cardullo, R. A.; Agrawal, S.; Flores, C.; Zamecnik, P. C.; Wolf, D. E. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1988**, *85*, 8790-8794.
- (17) Ebata, K.; Masuko, M.; Ohtani, H.; Kashiwasake-Jibu, M. *Photochemistry and photobiology* **1995**, *62*, 836-839.

- (18) Kolpashchikov, D. M. *Chemical reviews* **2010**, *110*, 4709-4723.
- (19) Wang, Q.; Chen, L.; Long, Y.; Tian, H.; Wu, J. *Theranostics* **2013**, *3*, 395-408.
- (20) Blanco, A. M.; Artero, R. *Methods* **2010**, *52*, 343-351.
- (21) Juskowiak, B. *Analytical and bioanalytical chemistry* **2011**, *399*, 3157-3176.
- (22) Tyagi, S.; Bratu, D. P.; Kramer, F. R. *Nat Biotechnol* **1998**, *16*, 49-53.
- (23) Bonnet, G.; Tyagi, S.; Libchaber, A.; Kramer, F. R. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1999**, *96*, 6171-6176.
- (24) Tsourkas, A.; Behlke, M. A.; Rose, S. D.; Bao, G. *Nucleic Acids Res* **2003**, *31*, 1319-1330.
- (25) Peng, X. H.; Cao, Z. H.; Xia, J. T.; Carlson, G. W.; Lewis, M. M.; Wood, W. C.; Yang, L. *Cancer Res* **2005**, *65*, 1909-1917.
- (26) Piatek, A. S.; Tyagi, S.; Pol, A. C.; Telenti, A.; Miller, L. P.; Kramer, F. R.; Alland, D. *Nature biotechnology* **1998**, *16*, 359-363.
- (27) Li, J. W. J.; Fang, X. H.; Schuster, S. M.; Tan, W. H. *Angew Chem Int Edit* **2000**, *39*, 1049-+.
- (28) Sei-lida, Y.; Koshimoto, H.; Kondo, S.; Tsuji, A. *Nucleic Acids Res* **2000**, *28*, E59.
- (29) Tsuji, A.; Koshimoto, H.; Sato, Y.; Hirano, M.; Sei-lida, Y.; Kondo, S.; Ishibashi, K. *Biophysical journal* **2000**, *78*, 3260-3274.
- (30) Gerasimova, Y. V.; Kolpashchikov, D. M. *Chemical Society reviews* **2014**, *43*, 6405-6438.
- (31) Schochetman, G.; Ou, C. Y.; Jones, W. K. *The Journal of infectious diseases* **1988**, *158*, 1154-1157.
- (32) Botes, M.; de Kwaadsteniet, M.; Cloete, T. E. *Analytical and bioanalytical chemistry* **2013**, *405*, 91-108.
- (33) Kristensen, L. S.; Hansen, L. L. *Clinical chemistry* **2009**, *55*, 1471-1483.
- (34) Medrano, R. F.; de Oliveira, C. A. *Molecular biotechnology* **2014**, *56*, 599-608.
- (35) Kim, J.; Easley, C. J. *Bioanalysis* **2011**, *3*, 227-239.
- (36) Craw, P.; Balachandran, W. *Lab on a chip* **2012**, *12*, 2469-2486.

- (37) Gill, P.; Ghaemi, A. *Nucleosides, nucleotides & nucleic acids* **2008**, *27*, 224-243.
- (38) Fakruddin, M.; Mannan, K. S.; Chowdhury, A.; Mazumdar, R. M.; Hossain, M. N.; Islam, S.; Chowdhury, M. A. *Journal of pharmacy & bioallied sciences* **2013**, *5*, 245-252.
- (39) Li, J. J.; Chu, Y.; Lee, B. Y.; Xie, X. S. *Nucleic Acids Res* **2008**, *36*, e36.
- (40) Tian, T.; Xiao, H.; Zhang, X.; Peng, S.; Zhang, X.; Guo, S.; Wang, S.; Liu, S.; Zhou, X.; Meyers, C.; Zhou, X. *Chemical communications* **2013**, *49*, 75-77.
- (41) Wang, X. P.; Yin, B. C.; Wang, P.; Ye, B. C. *Biosensors & bioelectronics* **2013**, *42*, 131-135.
- (42) Connolly, A. R.; Trau, M. *Nature protocols* **2011**, *6*, 772-778.
- (43) Ma, C.; Liu, S.; Shi, C. *Biosensors & bioelectronics* **2014**, *58*, 57-60.
- (44) Yin, B. C.; Liu, Y. Q.; Ye, B. C. *Analytical chemistry* **2013**, *85*, 11487-11493.
- (45) Nelson, K. M.; Weiss, G. J. *Molecular cancer therapeutics* **2008**, *7*, 3655-3660.
- (46) He, L.; Hannon, G. J. *Nature reviews. Genetics* **2004**, *5*, 522-531.
- (47) Hobert, O. *Trends in biochemical sciences* **2004**, *29*, 462-468.
- (48) Peter, M. E. *Oncogene* **2010**, *29*, 2161-2164.
- (49) Tumpey, T. M.; Belser, J. A. *Annu Rev Microbiol* **2009**, *63*, 79-98.
- (50) Wagner, R.; Matrosovich, M.; Klenk, H. D. *Rev Med Virol* **2002**, *12*, 159-166.
- (51) Mitnaul, L. J.; Matrosovich, M. N.; Castrucci, M. R.; Tuzikov, A. B.; Bovin, N. V.; Kobasa, D.; Kawaoka, Y. *J Virol* **2000**, *74*, 6015-6020.
- (52) Yen, H. L.; Liang, C. H.; Wu, C. Y.; Forrest, H. L.; Ferguson, A.; Choy, K. T.; Jones, J.; Wong, D. D. Y.; Cheung, P. P. H.; Hsu, C. H.; Li, O. T.; Yuen, K. M.; Chan, R. W. Y.; Poon, L. L. M.; Chan, M. C. W.; Nicholls, J. M.; Krauss, S.; Wong, C. H.; Guan, Y.; Webster, R. G.; Webby, R. J.; Peiris, M. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2011**, *108*, 14264-14269.
- (53) Marras, S. A.; Tyagi, S.; Kramer, F. R. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* **2006**, *363*, 48-60.

- (54) Mackay, I. M.; Arden, K. E.; Nitsche, A. *Nucleic Acids Res* **2002**, *30*, 1292-1305.
- (55) Bell, A. S.; Ranford-Cartwright, L. C. *Trends Parasitol* **2002**, *18*, 337-342.
- (56) Cornett, E. M.; Campbell, E. A.; Gulenay, G.; Peterson, E.; Bhaskar, N.; Kolpashchikov, D. M. *Angewandte Chemie* **2012**, *51*, 9075-9077.
- (57) Huang, J.; Yang, X.; He, X.; Wang, K.; Liu, J.; Shi, H.; Wang, Q.; Guo, Q.; He, D. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2014**, *53*, 11-20.
- (58) Lai, Y.-H.; Sun, S.-C.; Chuang, M.-C. *Biosensors* **2014**, *4*, 273-300.
- (59) Lai, Y. H.; Liao, Y. C.; Mu, J. J.; Kuo, T. M.; Hsu, Y. H.; Chuang, M. C. *Chemical communications* **2014**, *50*, 12018-12021.
- (60) Collins, M. L.; Irvine, B.; Tyner, D.; Fine, E.; Zayati, C.; Chang, C. A.; Horn, T.; Ahle, D.; Detmer, J.; Shen, L. P.; Kolberg, J.; Bushnell, S.; Urdea, M. S.; Ho, D. D. *Nucleic Acids Res* **1997**, *25*, 2979-2984.
- (61) Dirks, R. M.; Pierce, N. A. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2004**, *101*, 15275-15278.
- (62) Speel, E. J.; Hopman, A. H.; Komminoth, P. *Methods in molecular biology* **2006**, *326*, 33-60.
- (63) Liu, Q. T.; Boyd, B. J. *Analyst* **2013**, *138*, 391-409.
- (64) Xu, J.; Jiang, B. Y.; Su, J.; Xiang, Y.; Yuan, R.; Chai, Y. Q. *Chemical communications* **2012**, *48*, 3309-3311.
- (65) Connolly, A. R.; Trau, M. *Angewandte Chemie* **2010**, *49*, 2720-2723.
- (66) Chen, Y.; Song, Y.; Wu, F.; Liu, W.; Fu, B.; Feng, B.; Zhou, X. *Chemical communications* **2015**, *51*, 6980-6983.