

東海大學理學院化學研究所

碩士論文

Graduate Institute of Chemistry

College of Science

Tunghai University

Master Thesis

以螢光原位雜合法結合 HILO 螢光顯微鏡相對定量肝癌細胞
中 hsa-miR-10b 及以毛細管電泳暨雷射誘發螢光分離染色體

Relative quantification of hsa-miR-10b from hepatocellular
carcinoma cells by fluorescence in situ hybridization combined
with highly inclined and laminated optical sheet microscopy, and
separation of chromosomes by capillary electrophoresis with
laser-induced fluorescence

林瑋諭

Wei-Yu Lin

指導教授：張柏齡 博士

Advisor : Dr. Po-Ling Chang

中華民國 105 年 7 月

東海大學理學院化學研究所

碩士論文

Graduate Institute of Chemistry

College of Science

Tunghai University

Master Thesis

以螢光原位雜合法結合 HILO 螢光顯微鏡相對定量肝癌細胞
中 hsa-miR-10b 及以毛細管電泳暨雷射誘發螢光分離染色體

Relative quantification of hsa-miR-10b from hepatocellular
carcinoma cells by fluorescence in situ hybridization combined
with highly inclined and laminated optical sheet microscopy, and
separation of chromosomes by capillary electrophoresis with
laser-induced fluorescence

林瑋諭

Wei-Yu Lin

指導教授：張柏齡 博士

Advisor : Dr. Po-Ling Chang

中華民國 105 年 7 月

東海大學碩士班研究生
論文指導教授推薦書

化學系 碩士班 林瑋諭 君所提之論文

以螢光原位雜合法結合 HILO 螢光顯微鏡相對
定量肝癌細胞中 hsa-miR-10b 及以毛細管電泳
暨雷射誘發螢光分離染色體

Relative quantification of hsa-miR-10b from
hepatocellular carcinoma cells by fluorescence in
situ hybridization combined with highly inclined
and laminated optical sheet microscopy, and
separation of chromosomes by capillary
electrophoresis with laser-induced
fluorescence

係由本人指導撰述，同意提付審查。

指導教授 張福壽 (簽章)

105 年 7 月 2 日

東海大學碩士班研究生
論文口試委員審定書

化學系 碩士班 林瑋諭 君所提之論文

以螢光原位雜合法結合 HILO 螢光顯微鏡相對
定量肝癌細胞中 hsa-miR-10b 及以毛細管電泳
暨雷射誘發螢光分離染色體

Relative quantification of hsa-miR-10b from
hepatocellular carcinoma cells by fluorescence in
situ hybridization combined with highly inclined
and laminated optical sheet microscopy, and
separation of chromosomes by capillary
electrophoresis with laser-induced
fluorescence

論文口試委員會 召集人 莊曼傑 (簽章)

委員 張相勳
林浹蔚

中華民國 105 年 7 月 2 日

謝誌

隨著碩士論文的完成，代表兩年碩士生涯將告一段落，我也即將與伴隨我六年的東海大學告別。從昔日的懵懂無知，至今多了幾分成熟與自信，往後的日子我會時常懷念於東海的點點滴滴。

於兩年的碩士生涯中，最為感謝的就是指導教授張柏齡老師，感謝張老師總在我們實驗最需要協助的情況下，提供許多寶貴的意見及指導，並教導學生於研究方面應保有精益求精的處事態度，日後邁入職場，我也會持續實踐老師這些日子的諄諄教誨。還要感謝兩位口試委員莊旻傑教授及林泱蔚教授，於百忙之中前來替學生口試，以及在論文撰寫及實驗上給予最專業的建議與指正。

此外，我要感謝宜蓁學姊於我剛進實驗室時的細心教導，如果沒有學姊在實驗細節上的要求及叮囑，這兩年的研究就無法如此順利。亦感謝實驗室的成員們，包括也唐、涵鈺、珮綺、芋蓁、心媛、蔚青、雅琳與肇宣在實驗與內務上提供協助及指教，其中最感謝同窗的也唐與涵鈺，感謝他們日常的陪伴，因為有他們這兩年我並不孤單。另外非常感謝化學系系辦藍姐於平常的幫忙及協助處理許多繁雜的公文。

最後僅將此獻給我摯愛的父母及家人，因為你們無條件地支持與幫助，使我能安心順利的完成學業，願以此成果及喜悅與你們分享。最後盼望未來於實驗室的各位能繼續努力，實驗也能非常順利。

中文摘要

本實驗利用 Molecular beacon 與細胞中 microRNA hsa-miR-10b 進行雜合反應，及利用 HILO 螢光顯微鏡系統提高靈敏度，藉由影像圖直接區分 hsa-miR-10b 於不同肝癌細胞中的表現量，結果與反轉錄即時定量聚合酶連鎖反應 (RT-qPCR) 之實驗結果相符，甚至克服 RT-qPCR 於低濃度下 (< 100 fM) 可能造成誤判的問題。最後透過兩段不同的 Molecular beacon 同時標記 hsa-miR-10b 與 U6 snRNA，並以多光源同時偵測，成功以螢光原位雜合法結合 HILO 螢光顯微鏡相對定量肝癌細胞中 microRNA hsa-miR-10b。此方法不須透過任何萃取步驟及序列複製放大，可藉由影像分析 microRNA 的表現量，能將其應用於癌症檢測及分期上。論文第二部分為發展以毛細管電泳暨雷射誘發螢光分離染色體之方法。利用秋水仙素 (Colcemid) 使大部分的細胞停留於分裂中期 (Metaphase)，於顯微鏡下觀察並以虹吸進樣的方式將單細胞引入毛細管內，利用 Lysis Buffer 消化細胞膜並分離染色體。透過酸性甲醇固定細胞，並以超音波震盪於影像圖中可清楚觀察到單條染色體，也成功利用螢光探針標記一號染色體。期望未來能夠將染色體與核碎片分離，使我們透過電泳準確的分離特定染色體。

Abstract

In this study, using the molecular beacon for microRNA hsa-miR-10b hybridization in cells, and improving the sensitivity by Highly inclined and laminated optical sheet (HILO) microscopy. We could distinguish the expression of hsa-miR-10b from different images of hepatocellular carcinoma cells. These results are in agreement with the reverse transcription real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR), overcoming the problems from miscarriage of low concentrations (< 100 fM). Finally, we simultaneously detect hsa-miR-10b and U6 snRNA by two different molecular beacon and multiple sources. We are able to relative quantification of hsa-miR-10b from hepatocellular carcinoma cells by fluorescence in situ hybridization combined with HILO microscopy. The method does not need any extraction step and sequence replication. It could be applied to detect and stage of cancer by analyzing expression of microRNA from different images. The second part is focus on the separation of chromosomes by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence. We are able to make the cells remain in metaphase by treating colcemid. Observing on the microscope and injecting a single-cell into the capillary by siphon injector way. Then, using Lysis Buffer digest the cell membrane and separate chromosomes. We could clearly observe a single chromosome on image by ultrasonic vibration the cells of fixing in methanol with acetic acid. We are able to labeled chromosome 1 by fluorescent probe. We hope that we could separate chromosomes and nuclear debris in the future, so that we can accurately analyze specific chromosome by electrophoresis.

總目錄

論文摘要.....	I
總目錄.....	III
圖目錄.....	VII
表目錄.....	X
參與會議.....	133

第一章 微小核糖核酸及單分子螢光顯微鏡簡介

1.1 微小核糖核酸 (microRNA, miRNA)	1
1.1.1 緒論	1
1.1.2 miRNA 的生物功能	3
1.1.2.1 miRNA 之發現.....	3
1.1.2.2 miRNA 之生物合成途徑.....	4
1.1.2.3 miRNA 與癌症病理相關性.....	6
1.1.3 檢測 miRNA	11
1.1.3.1 傳統檢測 miRNA 之方法與問題.....	11
1.1.3.2 細胞內 miRNA 的原位偵測.....	14
1.1.3.3 分子信標 (Molecular beacon)	15

1.2 螢光顯微鏡 (Fluorescence Microscopy)	18
1.2.1 緒論	18
1.2.2 螢光物理原理	19
1.2.3 光學系統	21
1.2.4 單分子顯微技術及漸逝波	24
1.3 參考文獻	29
第二章 以螢光原位雜合法結合HILO螢光顯微鏡相對定量肝癌細胞 中hsa-miR-10b	
2.1 研究動機	39
2.2 實驗材料及方法	41
2.2.1 試藥	41
2.2.2 儀器設備及系統架構	42
2.2.3 實驗方法流程	48
2.2.3.1 細胞培養	48
2.2.3.2 萃取總核糖核酸	49
2.2.3.3 反轉錄即時定量聚合酶連鎖反應	50
2.2.3.4 細胞實驗流程	53

2.3 結果與討論	61
2.3.1 利用反轉錄聚合酶連鎖反應即時定量 hsa-miR-10b	61
2.3.2 螢光顯微鏡系統	65
2.3.3 結合螢光原位雜合法觀測細胞樣品中 miRNA	69
2.3.4 觀測肝癌細胞中 hsa-miR-10b	71
2.3.5 透過雙波長觀測相對定量 hsa-miR-10b	78
2.4 結論	83
2.5 參考文獻	84

第三章 以毛細管電泳暨雷射誘發螢光分離染色體

3.1 緒論	86
3.1.1 毛細管電泳	86
3.1.1.1 毛細管電泳基本原理	87
3.1.1.2 毛細管電泳進樣及偵測方法	93
3.1.1.3 毛細管電泳之生物分析應用	95
3.1.2 染色體	96
3.1.2.1 細胞週期 (Cell cycle)	97
3.1.2.2 真核染色體之結構	99

3.1.2.3 基因與疾病	102
3.2 研究動機	104
3.3 實驗材料及方法	105
3.3.1 試藥	105
3.3.2 儀器設備及系統架構	106
3.3.3 實驗方法	109
3.3.3.1 細胞培養及秋水仙素處理	109
3.3.3.2 消化細胞膜及獲取染色體	109
3.3.3.3 全染色體觀測及標記一號染色體	110
3.3.3.4 毛細管電泳暨雷射誘發螢光	112
3.3.3.5 實驗流程	113
3.4 結果與討論	114
3.4.1 分離單細胞之染色體	114
3.4.2 消化細胞膜及獲取染色體	117
3.4.3 維持染色體完整性	121
3.4.4 全染色體觀測及標記一號染色體	124
3.5 結論與未來展望	127
3.6 參考文獻	128

圖目錄

圖 1-1 miRNA 生物合成途徑	5
圖 1-2 molecular beacon 雜合示意圖.....	16
圖 1-3 Jablonski 模型	20
圖 1-4 三種螢光顯微鏡系統.....	22
圖 1-5 電場示意圖	27
圖 2-1 HILO 螢光顯微系統之裝置圖	45
圖 2-2 60 倍油鏡下之微米尺.....	47
圖 2-3 萃取總核糖核酸之流程圖	51
圖 2-4 總核糖核酸之電泳圖	52
圖 2-5 hsa-miR-10b stem loop RT-qPCR product 之電泳圖	54
圖 2-6 利用 EDC 反應固定 miRNA 機制圖	55
圖 2-7 細胞實驗流程圖	57
圖 2-8 Molecular beacon 與互補序列熔點曲線圖	59
圖 2-9 以水稀釋 hsa-miR-10b RNA 樣品之檢量曲線圖	62
圖 2-10 以 yeast RNA 稀釋 hsa-miR-10b RNA 樣品之檢量曲線圖....	63
圖 2-11 於螢光顯微系統觀測 DNA 單分子螢光訊號	66

圖 2-12 於螢光顯微系統觀測細胞中螢光訊號.....	68
圖 2-13 於 HILO 螢光顯微系統觀測細胞背景螢光訊號及利用 EDC 反應固定 miRNA 之影像圖.....	70
圖 2-14 於 HILO 螢光顯微系統觀測兩種肝癌細胞中 hsa-miR-10b ..	72
圖 2-15 兩種肝癌細胞中的 hsa-miR-10b 平均螢光強度與 Threshold Cycle 柱狀比較圖.....	74
圖 2-16 觀測 Huh7 肝癌細胞中 hsa-miR-10b 之表現量.....	75
圖 2-17 觀測 Hep3B 肝癌細胞中 hsa-miR-10b 之表現量.....	76
圖 2-18 透過藥物調控的肝癌細胞中 hsa-miR-10b 平均螢光強度與 Threshold Cycle 柱狀比較圖.....	77
圖 2-19 同時觀測 Huh7 肝癌細胞中 hsa-miR-10b 及 U6 snRNA	79
圖 2-20 同時觀測 Hep3B 肝癌細胞中 hsa-miR-10b 及 U6 snRNA.....	80
圖 2-21 透過藥物調控的肝癌細胞中 hsa-miR-10b 及 U6 snRNA 之平均螢光強度柱狀比較圖.....	82
圖 3-1 電雙層的結構及 ζ 電位.....	90
圖 3-2 電滲流及層流圖.....	92
圖 3-3 細胞週期示意圖.....	98

圖 3-4 真核染色體結構模型示意圖	100
圖 3-5 儀器裝置示意圖	107
圖 3-6 多細胞與單細胞電泳圖	115
圖 3-7 分離單細胞之全染色體	116
圖 3-8 以不同濃度之介面活性劑消化細胞膜	118
圖 3-9 配合超音波消化細胞膜	119
圖 3-10 以超音波破壞懸浮細胞	120
圖 3-11 以超音波破壞酸性甲醇固定之細胞	122
圖 3-12 染色體分離電泳圖	123
圖 3-13 觀察全染色體分散程度	125
圖 3-14 以螢光探針標記一號染色體	126

表目錄

表 1-1 研究指出與癌症相關之 miRNA	9
表 1-2 檢測 miRNA 之方法比較	13
表 2-1 實驗所使用核苷酸序列	43
表 2-2 以 stem loop RT-qPCR 定量肝癌細胞中 hsa-miR-10b	64

第一章 微小核糖核酸及單分子螢光顯微鏡簡介

1.1 微小核糖核酸 (microRNA, miRNA)

1.1.1 緒論

成熟的 miRNA 為一段單股短序列的 RNA，大約由 19~23 個核苷酸組成，是一段不會轉譯合成蛋白質的 RNA，但具有調控基因表達的特性^[1, 2]。隨著全基因組定序技術進步，改變生物學及分子偵測之研究，陸續發現短片段 RNA (small RNA, sRNA) 之疾病特異性生物指標。一般基因表達過程為去氧核糖核酸 (DNA) 轉錄為訊息核糖核酸 (messenger RNA, mRNA)，再經由 mRNA 轉譯合成蛋白質 (protein)，而隨著分子生物技術的發展，研究發現 DNA 轉錄成 RNA，其中卻包含不會轉譯合成蛋白質的 RNA 序列，將此序列統稱為非轉譯核糖核酸 (noncoding RNA)，其中包括 miRNA、小片段干擾核糖核酸 (small interference RNA, siRNA)、小核仁核糖核酸 (small nucleolar RNA, snoRNA)、反譯核糖核酸 (antisense RNA) 及 piwi 核糖核酸 (piwi-interacting RNA, piRNA)，此序列可以調控 mRNA 達到細胞的分化、增生、死亡、腫瘤形成及致死基因之表達，總稱為 RNA 干擾 (RNA interference)。迄今為止，已於人類中鑑定出超過 1500 種的 miRNA，其中超過 30% 的 miRNA 可以在人類基因中定位^[3]，重要的是多種 miRNA 可同時調控單一基因，且單一 miRNA 可能同時具有一個以上

的目標，因此 miRNA 調控基因的表達與許多疾病產生了關聯性，其表達特徵對於疾病之診斷、發展、風險及分類有很大的幫助，所以精確偵測 miRNA 逐漸成為重要的研究。

而近年來分析檢測 miRNA 的發展非常迅速，但由於 miRNA 本身的特性，包括短序列、含量低及同家族內的序列相似性，這些都成為分析檢測上的問題來源。首先，大多數使用聚合酶連鎖反應(PCR)或雜合測定 miRNA 都需要設計一段與 miRNA 長度類似的引子，但這也意味著設計分析所需要的引子，會因為長度過短而影響熔點溫度及 PCR 的效率^[4]。其次，miRNA 於總核糖核酸中只佔一小部分(約 0.01%)，於單一細胞中的濃度極低^[5]，所以需要高靈敏度的測定方法，在加上 miRNA 家族內的序列具有高度相似性，所以特異性檢測則更加困難。最後，因為單一基因可能同時受到多個 miRNA 調控，所以所使用檢測方法需要可同時檢測多個 miRNA。現今北方墨點法(Northern Blotting)被廣泛應用於測定 miRNA，被作為分析 miRNA 的標準方法；微陣列技術則被應用於同時檢測多種的 miRNA，具有高通量的特性；反轉錄即時定量聚合酶連鎖反應(qRT - PCR)透過引子的設計，具有高度特異性，使得此分析方法成為現階段檢測 miRNA 最為成功的方法。但現階段所遇到挑戰為於細胞內 miRNA 的原位測定，需要一個能夠直接於細胞內區分未成熟及成熟的 miRNA，

並且可以透過這樣的分析方法直接說明 miRNA 於細胞內的功能及表達模式，所以需要一個具高靈敏度及選擇性的分析方法，例如結合新的分子生物學技術、奈米技術和修飾的核酸探針來檢測 miRNA，這類的分析方法包括原位雜合用於活細胞內、血液中的 miRNA 的分子影像監測及組織分析都能幫助說明體內 miRNA 的生物功能，文中亦比較與傳統方法的差異性。

1.1.2 miRNA 的生物功能

1.1.2.1 miRNA 之發現

最早被發現的兩個 miRNAs 為於秀麗隱桿線蟲（*Caenorhabditis elegans*）中的 *lin-4* 和 *let-7*^[6, 7]。1993 年 Lee 等人發現了長度只有約 22 核苷酸長的短片段 RNA，並將此 RNA 命名為 microRNA，簡稱 miRNA，其研究於秀麗隱桿線蟲研究中，發現 *lin-4* 基因會影響 *lin-14* 基因的功能，造成 LIN-14 蛋白質的量會被 *lin-4* 基因調節。*lin-4* 基因為 22 個核苷酸長的成熟非編碼 miRNA，是由 61 個核苷酸長的 miRNA 前驅物轉變而成，而這段 miRNA 序列與 *lin-14* mRNA 的 3 端非編碼區之序列有互補，當 miRNA 互補在 *lin-14* mRNA 上時便會影響 *lin-14* mRNA 的轉譯，導致合成 LIN-14 蛋白質時受到影響。後續於 2000 年，Reinhart 等人在秀麗隱桿線蟲上研究發現 miRNA *let-7* 成為第二個被發現的 miRNA。

miRNAs 的發現開始促進許多尋找更多 miRNA 之研究，其中不乏對於植物及動物 miRNA 的研究，如擬南芥、野生稻、線蟲、果蠅、老鼠及人類。目前已發現的 miRNA 有 700 多個，其中超過 600 餘個 miRNA 於哺乳類動物中被發現^[8]，於其他生物則以線蟲的 88 個 miRNA 為最多，其次為擬南芥有 16 個 miRNA，因此 miRNA 之多樣性已漸漸地受到研究重視。也於脊椎動物中發現不同的 miRNA，包含調控神經系統發育、影響心血管組織、心臟發育及血液等不同的 miRNA，而 2008 年於血清中發現穩定表達之 miRNA^[9]，相關研究也於其他生物體液發現 miRNA，包括尿液、唾液、淚液、腦脊液、母乳及羊水中，學者亦成功的於各種臨床樣本中分離出 miRNA，如使用福馬林固定之石蠟包埋切片^[10]。

1.1.2.2 miRNA 之生物合成途徑

miRNA 要達到調節基因之功能，必須先經過一連串之生化合成途徑，如圖 1-1 所示，miRNA 先透過人類基因進行轉錄而成，完成基因體轉錄後成為 pri-miRNA (primary miRNA)，約由數千個鹼基所構成^[11]。於細胞核內之 pri-miRNA 會被屬於 RNase III 之 Drosha 切割成 3 端羥基有兩個核苷酸突起的莖環 (stem-loop) pre-miRNA (precursor miRNA)，此時長度大約為 70 個核苷酸^[12, 13]。隨後經由細胞內 RNAGTP-dependent transporter exportin 5 辨識莖環結構，再傳送至細

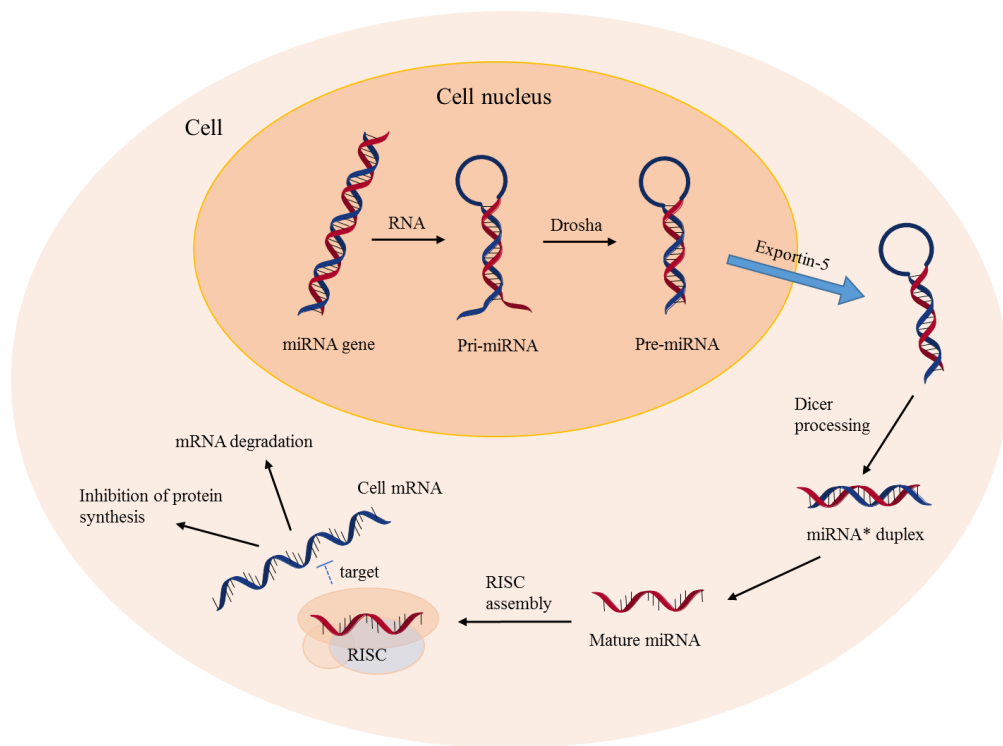


圖 1-1 miRNA 生物合成途徑

胞質^[14]。於細胞質中 Dicer 能將 pre-miRNA 切割成雙股的 miRNA：
miRNA* duplex^[15]，當 miRNA* duplex 會與 RNA 誘導沉默複合體
(RNA-induced silencing complex, RISC) 蛋白結合後，miRNA* duplex
之雙股部分會被解開為成熟的單股 miRNA (mature miRNA)，其長度
約為 19 至 25 個核苷酸，將此複合體稱為 miRISC。miRISC 所夾帶的
miRNA 會與互補目標 mRNA 進行配對，當兩者序列完全結合時，會
誘導裂解 mRNA 之機制啟動，導致 mRNA 斷裂，進而抑制蛋白質之
生成，若兩者序列為不完全互補狀態，亦會阻礙 mRNA 轉譯合成蛋
白質，因此 miRNA 利用此機制調控基因表達^[16-18]。過去亦有研究指
出少數的 miRNA 藉由與目標 mRNA 之互相結合，以活化目標 mRNA
之轉譯作用 (translation activation) ^[1]。

1.1.2.3 miRNA 與癌症病理相關性

近年來，有研究發現數百個 mRNA 可能透過相同 miRNA 進行調
控，而 miRNA 除了透過與 mRNA 結合決定其主要作用外，與蛋白質
間的交互作用亦存在相當的重要性，因此 miRNA 可能存在於許多不
同的生物途徑中^[19]。於過去研究中，miRNA 被證實與腫瘤的形成及
抑制有關，當目標基因為致癌基因 (oncogene) 時，miRNA 會啟動抑
制腫瘤之功能，被抑制的致癌基因無法產生腫瘤細胞生長所需的蛋白，
導致腫瘤無法生成，而相反地當目標基因為腫瘤抑制基因時，腫瘤細

胞增殖少了負調控因子，則會使得癌症惡化。因此檢測 miRNA 對於了解細胞生化途徑與預防疾病皆有相當大的幫助，現今已經發現許多疾病與 miRNA 表達有關^[20]，以癌症為常見，包括乳腺癌、前列腺癌、肺癌、肝癌、胃癌、胰腺癌及白血病等，其次為心血管疾病、也被發現於病毒性疾病以及肌肉疾病中。陸續還有研究發現 miRNA 於腦部疾病中也扮演著重要的角色，miRNA 也能夠調控神經之發育，如樹突型態及軸突生長。

對於研究 miRNA 之設計，學者通常選擇癌症組織與癌症週圍組織進行 miRNA 之調節差異篩選，而進一步之研究則可選擇存在於流體基質的個別 miRNA^[21, 22]，學者常於血清或血漿中進行 miRNA 之研究，亦不乏於其他生物體液中之研究，如唾液之 miRNA 與口腔癌相關^[23]，而痰液之 miRNA 與肺癌相關^[24]，腦脊液之 miRNA 則與淋巴瘤相關^[25]。研究顯示，miRNA 之含量與癌症類型或疾病狀態密切相關，miRNA 可作為具特異性之癌症生物指標，具有預測癌症分期及分類之能力。Asaga 等人之研究顯示罹患晚期乳腺癌之患者，相較於早期乳腺癌之病患的 miR-21 有過度表達之現象^[21]。於血漿及尿液樣本中發現多種 miRNA，且被證實與腎臟疾病相關，包括 miR-210 及 miR-18a 等^[26, 27]，可作為急性及慢性末期腎臟疾病之生物指標；於人類之研究中顯示血漿之 miRNA 與肝功能損害相關，如非酒精性脂

肪肝疾病及慢性 C 型肝炎^[28]，亦於肝臟中發現大量之 miR-122 及 miR-192，研究證實可用於藥物管理及化合物篩選毒性之監測^[29]。診斷心血管疾病之 miRNA 生物指標，miR-1 及 miR-499 已被證實可用於急性心肌梗塞之生物指標，且被廣泛適用於其他心臟疾病，如高血壓、冠狀動脈疾病及心臟衰竭^[30]；Cheng 等人於大鼠研究中發現血清之 miR-1 於 6 小時增加最多，且與心肌梗塞大小密切相關，於人類血清中則發現 miR-1 與傳統之血清肌酸激酶-MB 相關^[31]。Zampetaki 等人從糖尿病患者及健康個體之研究中發現五種 miRNA 的濃度有所不同，並使用 200 個樣本進行確認是否為糖尿病患者，最後評估 miR-126 能夠進一步使用至 822 個不同的樣本^[32]；過去也有學者發現 miR-133 與糖尿病有關^[33]。另外更有其他新穎且非侵入性之疾病生物指標，包括多發性硬化症^[34]及愛滋病病毒腦炎^[35]，也有一些研究指出 miRNA 與中樞神經系統疾病有關，如阿茲海默症與帕金森氏症^[36]。

有關 miRNA 的研究於近二十年來被普遍的研究，除了上述所提及的疾病，文中也整理現階段研究指出與癌症相關之 miRNA，如表 1-1，列舉現代較為常見的癌症，可以得知很多 miRNA 不僅調控單一基因，也會導致不同的癌症產生。為了更清楚的了解 miRNA 所透露的訊息，學者們除了針對 miRNA 的序列建立了資料庫 miRBase，可由此資料庫進 miRNA 的搜索^[3]，另外有學者於 2013 年建立一個

疾病名稱	相關 miRNA	參考文獻
大腸癌 (colorectal cancer)	miR-143 and miR-145	[37, 38]
	miR-21	[39, 40]
	miR-18, miR-106a, miR-31, miR-181b, miR-183, miR-135a/b, miR-200a/b/c, miR-203, and miR-224	[40]
乳腺癌 (breast cancer)	miR-200 family and miR-205	[41]
	miR-103/107	[42]
	miR-22	[43]
胰腺癌 (pancreatic cancer)	miR-217	[44]
	miR-96	[45]
	miR-210, miR-155, miR-203, and miR-222	[46, 47]
	miR-141, miR-143, miR-145, miR-146a, miR-148a/b, and miR-150	[48]
	miR-21, miR-212, miR-221, miR-222, miR-301, and miR-376a	[49]
肝癌 (hepatocellular carcinoma)	miR-18, miR-125, miR-199, miR-200, and miR-224	[50]
	miR-122, miR-130a, miR-150, and miR-221	[51]
	miR-21, miR-222, miR-224	[52]

表 1-1 研究指出與癌症相關之 miRNA。

疾病名稱	相關 miRNA	參考文獻
肺癌 (Lung cancer)	miR-34 family miR-200 miR-21 miR-17-92 cluster miR-221 and miR-222	[53] [54] [55] [56] [57]
食道癌 (esophageal cancer)	miR-27b, miR-203, miR-205, let-7c, miR-342, miR-100, miR-21, and miR125b miR-19b miR-143, miR-145, miR-194, miR-203, miR-205 and miR-215 miR-223 and miR-192	[58] [59] [60] [61]
膀胱癌 (bladder cancer)	miR-195 and miR-497 miR-1, miR-133a, miR-143 and miR-145 miR-133b and miR-206 miR-99a	[62] [63, 64] [65] [66]
鼻咽癌 (nasopharyngeal carcinoma)	miR-141 miR-200a miR-100	[67] [68] [69]

表 1-1 研究指出與癌症相關之 miRNA。

microRNA-cancer 的資料庫^[70]，其中整理了超過 26000 篇有關 miRNA 的研究文獻，連結 236 種 miRNA 與 79 種人類癌症的關係。在過去研究的努力下，使我們能於各種資料庫中了解 miRNA 與癌症病理相關性。

1.1.3 檢測 miRNA

1.1.3.1 傳統檢測 miRNA 之方法與問題

分析 miRNA 表達有助於探討與 mRNA 間的關係與調控基因表達之生化過程，且能診斷 miRNA 與癌症疾病間的關係，但首先檢測 miRNA 一般會遇到的問題，於總核糖核酸中只佔一小部分(約 0.01%)^[71]，單一細胞中的濃度極低，所以萃取完整 miRNA 也是問題之一，而目前檢測 miRNA 之傳統方法包括北方墨點法 (Northern Blotting)^[72]、微陣列技術 (Microarrays)^[73,74]及反轉錄即時定量聚合酶連鎖反應 (reverse transcription - quantitative polymerase chain reaction , RT - qPCR)^[75,76]，但每個系統方法都有它的優缺點，所以必須根據研究本身需求進行選擇及設計。生物醫學研究經常使用北方墨點法對 miRNA 進行分析鑑定，以凝膠電泳為基礎操作簡單，但需要大量的總核糖核酸無法檢測低含量的 miRNA，定量準確度不佳且無法自動化；微陣列技術具有高通量之特性，能夠同時偵測多種 miRNA^[77]，但實驗再現性及精確性不佳，所以通常只能作為篩選工具，較無法作

為定量工具；反轉錄即時定量聚合酶連鎖反應為現今偵測 miRNA 最靈敏的方法之一，本文也利用此方法進行比較，RT-qPCR 是唯一能夠準確定量 miRNA 的方法，但由於反應試劑昂貴且無法同時大量檢測 miRNA，成為無法用於臨床檢測的最大阻礙^[78]。因此持續開發一套高靈敏度、具選擇性且不用透過酵素放大即可精準分析 miRNA 的方法成為重要的研究目標。

分析 miRNA 的方法個有優缺點，需要依研究目標選擇及設計調整，表 1-2 為檢測 miRNA 之方法比較。而過去的研究中科學家也不斷提出改善分析 miRNA 的方法，本實驗室亦發展一套以毛細管電泳暨雷射誘發螢光為基礎，能同時偵測多種 miRNAs 之系統，使用夾板式結合反應（splinted ligation）及橋樑 DNA（bridge DNA）^[79]，成功於單一毛細管中偵測多種長度相似的 miRNA，此技術有良好的線性範圍及偵測極限，為了增加毛細管電泳之實用性及改善靈敏度，後續發展毛細管電泳暨雙波長雷射誘發螢光之技術^[80]，成功利用兩種螢光探針同時偵測複雜的 miRNA 樣品，對標準及未知樣品進行比較，進而了解其中之生物訊息，並於樣品前處理進行濃縮與純化，改善 10 倍之線性範圍及有效地降低偵測極限。

方法	反應機制	偵測方式	特點
北方墨點法 (Northern blotting)	hybridization PAGE-base	放射性偵測	優點: 操作簡單為標準方法。 缺點: 樣品需求量大、耗時、靈敏度低及具放射性危害。
微陣列技術 (Microarray)	hybridization labelled	電化學、螢光、化學放光、及量子點偵測	優點: 樣品需求量大具高通量。 缺點: 操作複雜、再現性及靈敏度不佳。
反轉錄聚合酶連鎖反應 (RT-PCR)	hybridization amplification	螢光偵測	優點: 樣品需求小具高靈敏度。 缺點: 無法同時檢測多種樣品及單位成本高。
滾環式擴增 (RCA)	hybridization and ligation amplification	螢光偵測	優點: 操作簡單及靈敏度高。 缺點: 反應效率低及特异性不佳。
原位雜合 (ISH)	hybridization fluorescence labelled	螢光偵測	優點: 屬於直接檢測，可用於細胞組織。 缺點: miRNA 容易於實驗過程中流失，造成靈敏度不佳。
毛細管電泳 (CE)	hybridization and ligation fluorescence labelled	螢光偵測	優點: 樣品需求小、快速及靈敏度高。 缺點: 無法同時檢測多種樣品及再現性不佳。

表 1-2 檢測 miRNA 之方法比較。

1.1.3.2 細胞內 miRNA 的原位偵測

一般而言，對於檢測 miRNA 於細胞中的表現量通常都是透過間接測定，先將細胞裂解，萃取總核糖核酸，再利用 RT-qPCR、北方墨點法或是微陣列技術針對 miRNA 進行序列的放大偵測，但觀察 miRNA 的生化功能及表達是需要以單細胞為基礎下進行探討，所以利用原位雜合(in situ hybridization, ISH)作為觀察單細胞中基因表達，是一種非常有效的方法。1989 年, DeLong 等人於為生物學之研究上，利用與 RNA 互補之特定序列探針，對不同細菌進行專一性雜合反應，再使用螢光顯微鏡觀察探針上標記的螢光分子^[81]；螢光原位雜合 (fluorescence in situ hybridization, FISH) 可以利用標記螢光分子之 DNA 序列與目標序列雜合，也可以透過酵素催化螢光反應^[82-84]，此技術以經逐漸被應用於觀測及定位細胞與組織中的 RNA^[85, 86]。

而 FISH 會受到以下因素影響，包含探針之序列設計、探針之專一性、樣品之前處理、雜合反應、螢光分子之選擇及螢光顯微鏡之操作與軟體之分析。若探針欲與目標序列進行雜合反應時，須將溫度控制於其熔點溫度，即為探針與目標序列結合一半之溫度，而影響雜合反應之主要因素可分為三種，包含溫度、甲醯胺及鹽類濃度。其中溫度受制於序列，因此若要控制探針結合或不結合則要控制甲醯胺及鹽類之濃度，甲醯胺能夠幫助雙股核苷酸序列分開，因此增加甲醯胺之

濃度能降低 T_m 值，而增加鹽類之濃度能增加 T_m 值。

1.1.3.3 分子信標 (Molecular beacon)

而本實驗所使用之分子信標 (Molecular beacon) 為一段特異性核酸序列探針^[87]，透過雜合獲得螢光，PCR 定量的發展過程中，Molecular beacon 逐漸成為理想的特異性螢光序列，已被應用於合酸的擴增分析上，甚至是體內雜合分析 (In Vivo hybridization)^[88]。Molecular beacon 的螢光特異性來至於它的結構，如圖 1-2 所示，其長度不超過 30 個核苷酸，由一段夾板序列 (Stem Sequence) 及環狀序列 (Loop Sequence) 所構成，於 5' 端修飾上一個螢光基團 (Fluorophore)，3' 端修飾一個消光基團 (Quencher)；正常狀態下因為獨特的髮夾結構，螢光與消光基團是靠在一起，受到光激發所放出來的光會被吸收，無法得到訊號，但如果透過溫度的調控使得夾板序列打開，再於 T_m 下與目標序列進行雜合反應，此時螢光與消光基團不會緊密相連，即可獲得螢光訊號。

Molecular beacon 能夠隨實驗設計改變而改變，除了能更換修飾的螢光與消光基團，所使用的序列可以選擇 DNA、RNA 及 LNA 來改變 Molecular beacon 的穩定性，達到實驗條件的最佳化。近年 Molecular beacon 已經被廣泛應用，包括應用於檢測 miRNA，例如 miRNA 與 Molecular beacon 於晶片電泳中進行雜合及分離^[89]，或是

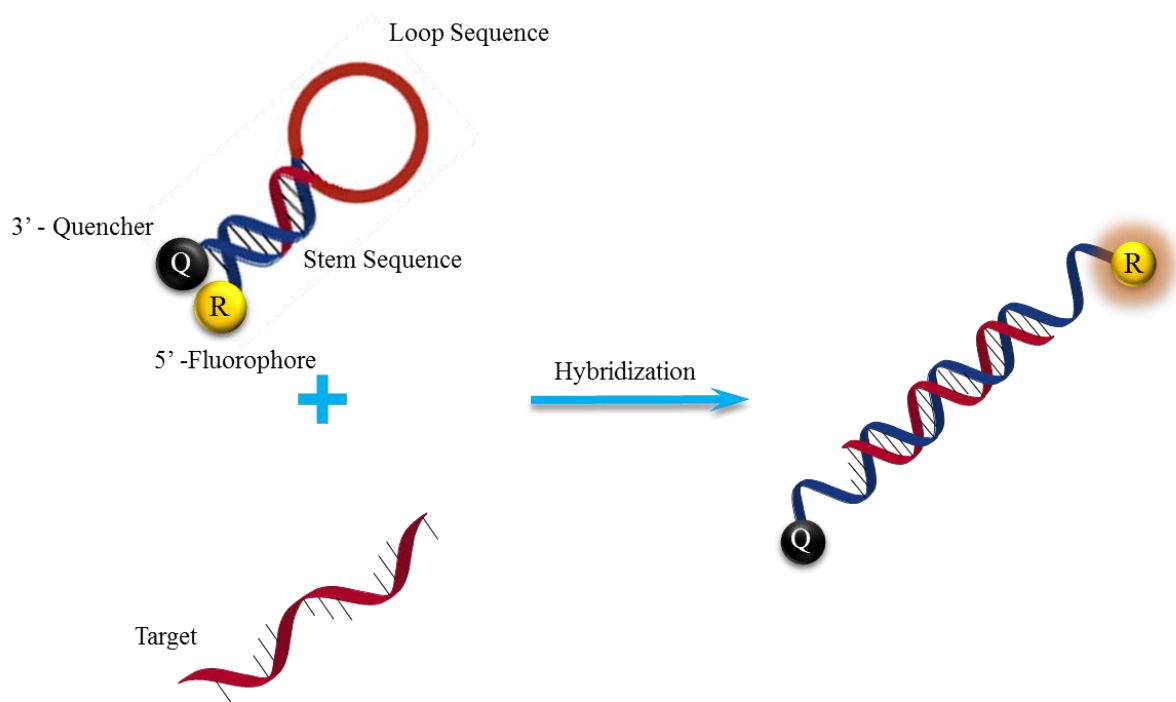


圖 1-2 Molecular beacon 的結構及發光機制圖。

利用 Molecular beacon 於總核醣核酸中定量 miRNA^[90]等。所以本實驗亦選擇利用 Molecular beacon 來進行螢光原位雜合實驗來分析 miRNA。

1.2 螢光顯微鏡 (Fluorescence Microscopy)

1.2.1 緒論

隨著科學技術的進步，近年來，生物分析的相關實驗已經不再侷限於巨觀的研究，顯微鏡也成為研究生物學必備的工具之一。透過顯微鏡可以更清楚觀察到生物體內的細節，但對生物體的觀察已經進入到分子層級，因為光的波長只有到數百個奈米 (nm)，所以利用一般光學顯微鏡無法直接觀察分子的種類與型態。雖然可以利用電子顯微鏡或是偏光顯微鏡都能獲得分子排列的訊息，不過操作難度高，研究人員也難輕易使用，但如果能以較為簡單的光學方式直接觀察及確定不同種類的分子存在與否，就能使很多重要的生物資訊被研究發現。

而螢光顯微鏡就是目前在研究上用的最為廣泛與最重要的技巧之一，傳統光學顯微鏡利用光的吸收與反射來觀測物體，偏光顯微鏡則是利用光的偏振特性，而螢光顯微鏡就是利用光在波長方面的特性的來觀測分子。原理是特定種類的螢光基團 (fluorophore) 在吸收短波長的光之後可以放出長波長的光，觀測時將激發光濾掉，只剩下放射之後長波長的光被看到，這樣一來即可斷定特定的螢光分子是否存在。這樣的概念看似簡單，卻能帶來分子種類的解析性，例如可於特定蛋白加上螢光蛋白，將這類蛋白做為於細胞內的追蹤分子，或是於抗體上加載螢光基團，透過抗體抗原反應來辨識特定生物分子，在過

去有著數不完的相關研究，從生化檢測、基因定序、臨床研究等，都是靠著螢光顯微鏡才能實現。

1.2.2 螢光物理原理

無論選擇何種光學系統去激發螢光來進行偵測，其螢光基本物理原理，為原先處於基態能階（ground state）之螢光分子吸收短波長的能量，使其電子被激發至具有較高能量的激發態（excited state）後，隨即以光的形式衰退回激發態，而所釋放出波長較長且能量降低的光，即為所謂的螢光（fluorescence）或磷光（phosphorescence），文中使用 Jablonski 模型詳細描述發光機制，如圖 1-3 所示，穩定分子多數都具有偶數電子，其電子成對且自旋方向相反，此為單重基態（singlet ground state, S_0 ），此時分子吸收外界輻射能，使處於基態之電子被激發至較高能階之激發態，而電子從單重激發態（singlet excited state, S_1 ）衰退返回基態的方式包含振動衰減、螢光放射及磷光放射。

分子吸收能量，而電子由基態躍遷至激發態之過程為吸收（absorption），此時具有螢光特性之分子，所位於 S_1 的電子極易以輻射方式返回基態 S_0 的任一振動能階而放出螢光，其生命期大約為 $10^{-5} \sim 10^{-8}$ 秒，但螢光分子亦可能藉由吸收光能被激發到較高能量之電子態 S_2 ，透過內轉換（internal conversion）釋放能量至 S_1 ，此釋放大約為 10^{-12} 秒，最後一樣由螢光放射模式從激發態 S_1 回到基態 S_0 。除了

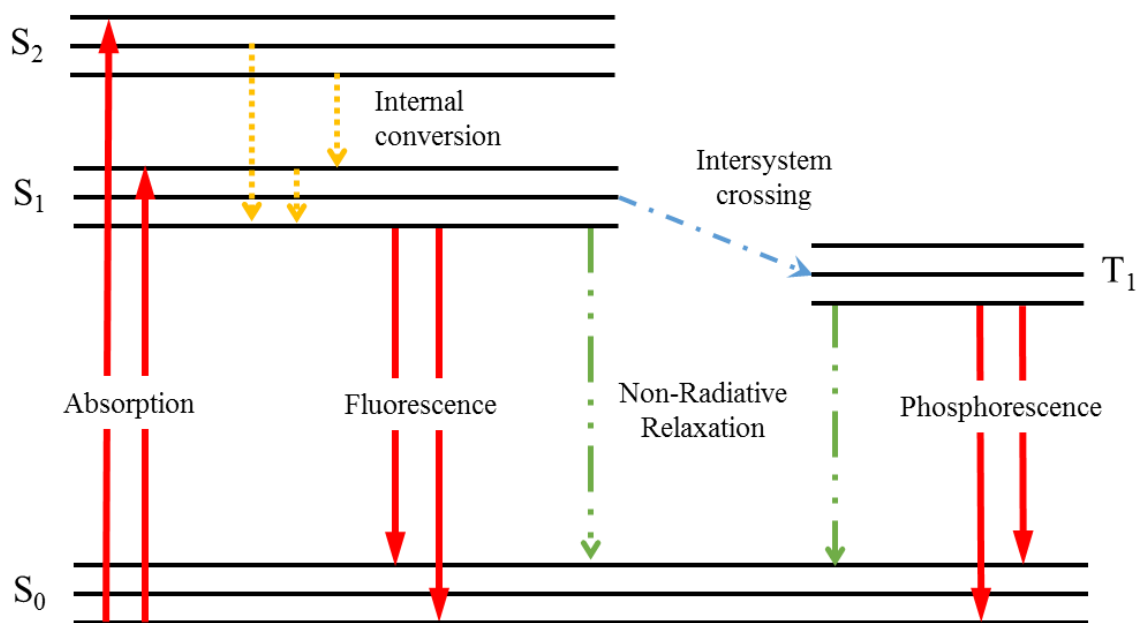


圖 1-3 Jablonski 模型圖。

螢光釋能的方式外，經由分子間相互碰撞後，將較高的振動能轉換為動能或傳遞給其他分子，最後回到基態 S_0 ，此稱為振動衰減，或是透過非放光的非輻射緩解（non-radiative relaxation）回到基態 S_0 ；另外具有重金屬效應之分子，當激發態電子透過內轉換停留於至 S_1 時，因為位於 S_1 的最低振動能階與 T_1 的最高振動能階有重合現象，此時電子可能透過系統間穿越（intersystem crossing）改變自旋方向進入三重態（triplet state, T_1 ），而位於 T_1 的電子再將能量以磷光放射的形式返回基態 S_0 ，其生命期較長，約為 $10^{-6} \sim 10^2$ 秒。

1.2.3 光學系統

螢光顯微技術所使用的光學系統大致分為三個部分，除了傳統螢光顯微鏡所使用的 Epi-fluorescence 光學系統^[91]及單分子研究中較多人使用的全內反射螢光顯微鏡（total internal reflection fluorescence microscopy, TIRFM）^[92,93]，另外還包括了本文所使用的 HILO 螢光顯微鏡（highly inclined and laminated optical sheet, HILO）^[94]。如圖 1-5 所示，Epi-fluorescence 之入射光會完全穿透玻片，也因為如此背景訊號較高，而單一的螢光訊號非常微弱，使得無法解析出來；近年來許多偵測單分子的研究，為了降低背景訊號採用了全內反射螢光顯微鏡，TIRFM 主要是利用光學中的全反射原理，使得雷射光於蓋玻片與樣本介質的介面產生全反射現象，此時於反射面會產生漸逝波會激發表

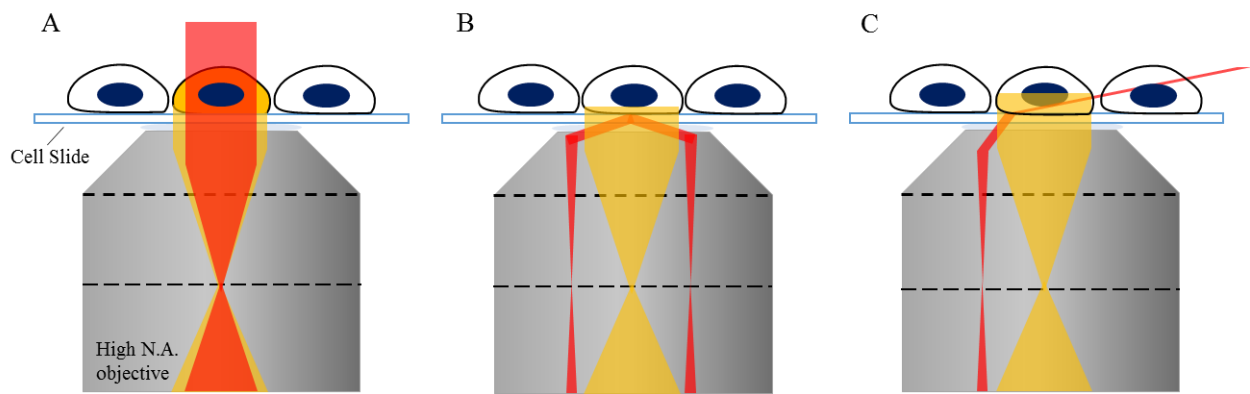


圖 1-4 三種螢光顯微鏡系統。(A)為 Epi-fluorescence；(B)為 TIRF；
(C)為 HILO。

面的螢光分子，受激發的範圍減少，降低了背景訊號，增加訊號雜訊比，使得此技術可以用於觀測單一螢光分子；但當科學家開始對具有厚度的生物樣品開始感興趣，由於 TIRFM 僅限於表面偵測，即無法觀測深層的訊號，因此 HILO 之光學系統藉由改變入射光角度，使得部分入射光穿過樣品，激發較深層的螢光分子，使得可以於具有厚度之生物樣品中觀測到單分子的螢光訊號，且還是能有效的提高訊號雜訊比，於 2008 年，HILO 螢光顯微鏡系統被應用於觀測細胞中的單分子訊號，被證實可清楚的看到不同平面的單分子螢光訊號^[94]，使用 HILO 螢光顯微鏡能有效提高我們的靈敏度，相較於 TIRFM 不僅能獲得表面之螢光訊號，能更準確的觀察到螢光訊號的表現量。

訊號雜訊比在單分子的觀測上是決定成敗的關鍵因素，單分子訊號相當微弱，些許的雜訊都會使微弱的訊號被忽略，所以螢光顯微系統可搭配 EMCCD (electron-multiplying CCD) 將訊號放大，接收訊號的頻率可以達到 10 MHz，由於 EMCCD 內含 TE-Cooler 可將溫度降至 -75°C，來降低熱電子效應，並降低雜訊，對觀測單分子訊號有極大的幫助；相較之下，一般掃描式顯微鏡，如共軛焦顯微鏡接收頻率大約只能達到 0.1~5MHz。綜觀不同的顯微鏡系統，雖然共軛焦顯微鏡可以輕易對具有厚度的生物樣品進行 3D 影像掃描，但一般螢光顯微鏡較容易與其他光學技術配合，但也為了克服 TIRFM 僅能觀測表面

螢光分子的特性，所以本文選擇使用 HILO 螢光顯微鏡系統搭配 EMCCD，針對具有厚度的生物樣品進行觀測。

1.2.4 單分子顯微技術及漸逝波

隨著科學技術的進步，近年來，生物分析的相關實驗已經不再侷限於巨觀的研究，對生物體的觀察已經進步到分子層級，而單分子顯微技術 (single molecule microscopy, SMM) 成為近年來的熱門研究課題，希望透過奈米尺度的操作來觀察生物分子獲得更多資訊。單分子技術之研究有它的困難度，因為受到光學繞射極限 (diffraction limit) 的影響，使得利用傳統光學方法是無法直接觀測到奈米等級的生物分子，所以可結合螢光分子標記在有興趣的生物分子上，藉由螢光間接觀測。於 1989 年，Moerner 等人於低溫環境下，成功地對單一螢光分子進行光學觀測^[95]；次年，Orrit 等人經由螢光光譜得到訊號雜訊比更高的單分子訊號^[96]；直至 1993 年，Betzig 等人才開始於室溫下進行單分子之研究^[97]。雖然利用螢光標記之方法可以使訊號對比增加，一般螢光顯微鏡也曾經被使用來觀測單分子訊號，但如果螢光分子相當靠近的時後，一樣會受到繞射極限的影響，將無法清楚分辨，且單一螢光訊號非常微弱，加上生命期 (life time) 短，約為 10^{-8} 秒，及粒子碰撞等原因導致能量損失，使得量子產率無法達到百分之百，所以如何降低背景雜訊，使得螢光訊號能夠更清楚的被解析出來，成為重要

的課題。

目前利用共軛焦顯微鏡 (confocal microscopy) 及全內反射螢光顯微鏡 (total internal reflection fluorescence microscopy, TIRFM) [98] 觀察微弱的螢光訊號都有相當不錯的效果。而共軛焦顯微鏡的工作原理是在共軛焦點處增加一個針孔 (pinhole)，降低焦點外的背景雜訊，但缺點是焦點處的雜訊還是無法去除，所以大部分的單分子研究都採用全內反射螢光顯微鏡 (TIRFM)，此方法將光源以超過臨界角的角度入射，而產生漸逝波，其強度會隨著深度增加而減弱，僅能激發深度約 200 nm 以內的螢光分子，而激發光源因為全反射緣故，將所產生的散射光降至最少，即可大幅增加訊號雜訊比。

當光從不同介質穿透時，由於不同介質折射率不同導致穿透光偏離法線，且於介面會產生一種隨著指數衰減的波，稱為漸逝波 (Evanescent wave)，根據斯涅爾 (Snell's Law)，當光進入不同介質的介面時會產生折射及反射的現象，入射光、折射光與介面法線之夾角滿足下列關係式：

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

n_1 及 n_2 為兩種不同介質的折射率， θ_1 及 θ_2 分別為入射光及折射光與界面法線之夾角，分別稱為入射角與反射角。

光由 c 光密介質 (折射率大) 進入光疏介質 (折射率小) 時，若

入射角 θ_1 與臨界角 θ_c 相等時，折射光會沿著折射界面的切線進行，即折射角 θ_2 為 90 度，此時 $\sin\theta_2 = 1$ ，可得 $\sin\theta_c = \sin\theta_2 = n_2/n_1$ 。但若入射角 θ_1 大於臨界角 θ_c 時， $\sin\theta_1 > n_2/n_1$ ，因此 $\sin\theta_2 > 1$ ，此式於數學上是沒有意義的，此時折射光不存在，只存在反射光，亦即有全內反射之發生，使全內反射發生之最小入射角 θ_c 則取決於兩種介質折射率之比值，可用下列關係式表示：

$$\theta_c = \sin^{-1} (n_2 / n_1) \quad (1-2)$$

從幾何光學之觀點而言，若有全反射之發生，光完全不會傳遞至折射面，但以電磁場的觀點來看，將入射光以電場形式表示，描述入射電場 (E_i) 可分為兩個分量，包括平行入射平面的電場 $E_{i\parallel}$ (P 波) 及垂直入射平面的電場 $E_{i\perp}$ (S 波)。入射角小於臨界角時會產生反射電場 (E_r) 與穿透電場 (E_t)，亦可分為 P 波及 S 波兩個分量，如圖 1-4 所示，其中 θ_i 為入射角， θ_r 為反射角， θ_t 為穿透角。

而當入射角大於臨界角 θ_c 時，因入射光及反射光之交互作用，而於介面產生一駐波，稱為漸逝波，其波形複雜，但電場強度會隨著與介面 z 軸方向距離之改變而呈現指數衰減，可用下列關係式表示：

$$I(z) = I_0 e^{-z/d(\theta)} \quad (1-3)$$

其中 I_0 為 $z = 0$ 之漸逝波電場強度， $I(z)$ 為縱軸距離之穿透電場強度， z 為縱軸距離， λ 為波長， d 為穿透深度 (penetration depth)。而漸逝

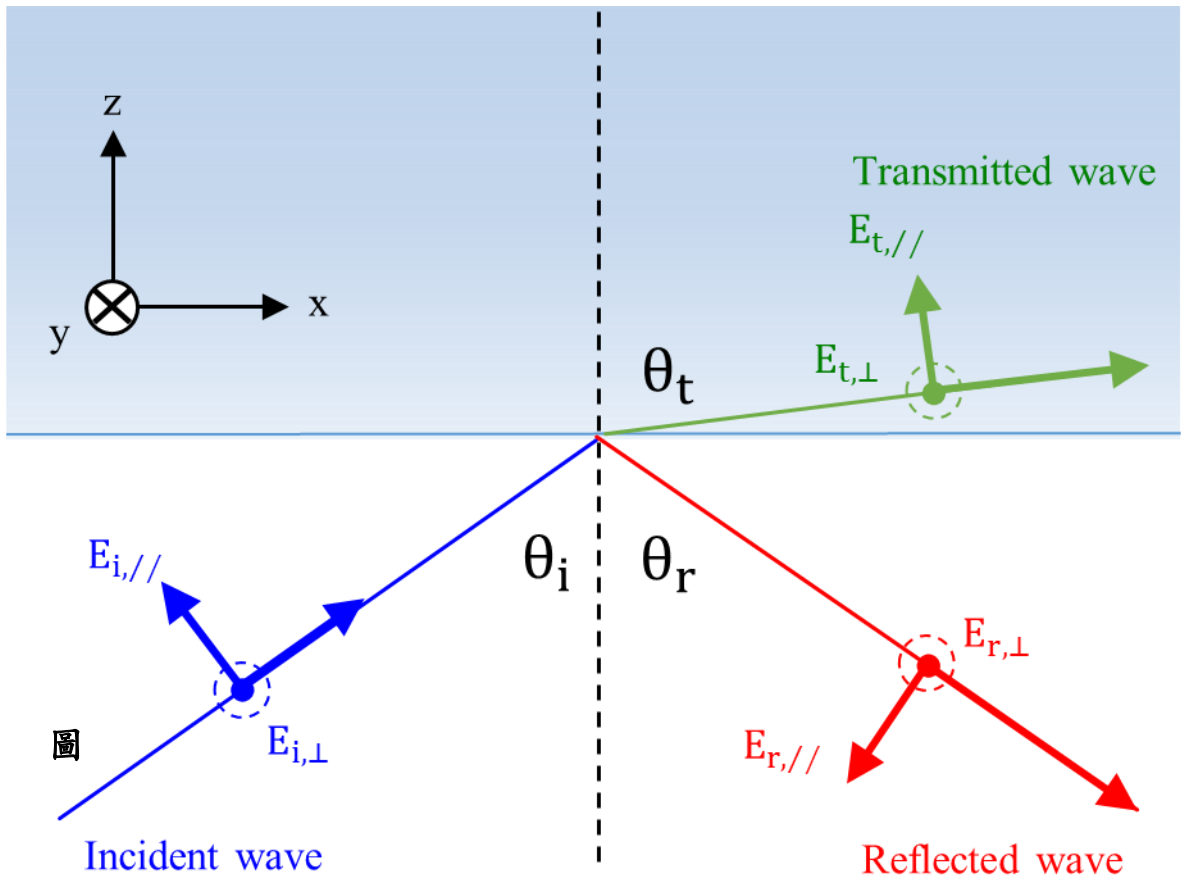


圖 1-5 電場示意圖。

波之穿透深度，則以下列關係式表示：

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

當入射角大於臨界角且越接近臨界角時，漸逝波之穿透深度越大，入射光之強度衰減越慢，藉由調整光強度及入射角度，使螢光分子存在於全反射介面之範圍內，仍可被漸逝波產生的能量激發而產生螢光。

目前螢光顯微鏡以被廣泛應用於生化檢測、基因定序、臨床研究及醫療診斷上，包括全內反射螢光顯微鏡 (total internal reflection fluorescence microscopy, TIRFM) 或共軛焦顯微鏡 (confocal microscopy) 於觀測微弱的螢光訊號都有相當不錯的效果，針對單分子的研究，包括蛋白的運動行為，於肌凝蛋白 (myosin) 發現個別的 ATP^[99]、探討葡聚糖與葡糖基轉移的交互作用^[100] 及蛋白質結構的動態觀察^[101]，亦有學者常使用半導體量子點之螢光奈米粒子進行生物影像之研究，相較於其他有機染料或螢光蛋白，其具有明亮及光穩定之特性；還有研究針對 RNA 聚合酶於 DNA 分子上的運動進行觀察^[102]，以及於總核醣核酸中測定 miRNA^[90, 103]；所以想要了解生物分子的機制，螢光顯微鏡及單分子偵測是一套很好的技術。而本文希望保留 TIRFM 可觀測到單分子螢光訊號之優點，修正僅能觀察樣品表面之缺點，所以透過 HILO 螢光顯微鏡系統提高於觀測生物樣品中螢光訊號之靈敏度，準確判斷螢光訊號的表現量。

1.3 參考文獻

1. Bartel DP: **MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function.** *Cell* 2004, **116**(2):281-297.
2. He L, Hannon GJ: **MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation.** *Nature reviews Genetics* 2004, **5**(7):522-531.
3. Kozomara A, Griffiths-Jones S: **miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data.** *Nucleic acids research* 2011, **39**(Database issue):D152-157.
4. Qavi AJ, Kindt JT, Bailey RC: **Sizing up the future of microRNA analysis.** *Analytical and bioanalytical chemistry* 2010, **398**(6):2535-2549.
5. Lim LP, Lau NC, Weinstein EG, Abdelhakim A, Yekta S, Rhoades MW, Burge CB, Bartel DP: **The microRNAs of *Caenorhabditis elegans*.** *Genes & development* 2003, **17**(8):991-1008.
6. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V: **The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*.** *Cell* 1993, **75**(5):843-854.
7. Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, Horvitz HR, Ruvkun G: **The 21-nucleotide *let-7* RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*.** *Nature* 2000, **403**(6772):901-906.
8. Bentwich I, Avniel A, Karov Y, Aharonov R, Gilad S, Barad O, Barzilai A, Einat P, Einav U, Meiri E *et al*: **Identification of hundreds of conserved and nonconserved human microRNAs.** *Nature genetics* 2005, **37**(7):766-770.
9. Lawrie CH, Gal S, Dunlop HM, Pushkaran B, Liggins AP, Pulford K, Banham AH, Pezzella F, Boulton J, Wainscoat JS *et al*: **Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma.** *British journal of haematology* 2008, **141**(5):672-675.
10. Siebolts U, Varnholt H, Drebber U, Dienes HP, Wickenhauser C, Odenthal M: **Tissues from routine pathology archives are suitable for microRNA analyses by quantitative PCR.** *J Clin Pathol* 2009, **62**(1):84-88.
11. Lee Y, Kim M, Han J, Yeom KH, Lee S, Baek SH, Kim VN: **MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II.** *EMBO J* 2004, **23**(20):4051-4060.

12. Gregory RI, Yan KP, Amuthan G, Chendrimada T, Doratotaj B, Cooch N, Shiekhattar R: **The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs.** *Nature* 2004, **432**(7014):235-240.
13. Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, Lee J, Provost P, Radmark O, Kim S *et al*: **The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing.** *Nature* 2003, **425**(6956):415-419.
14. Bohnsack MT, Czaplinski K, Gorlich D: **Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs.** *RNA* 2004, **10**(2):185-191.
15. Hammond SM, Bernstein E, Beach D, Hannon GJ: **An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells.** *Nature* 2000, **404**(6775):293-296.
16. Bartel DP: **MicroRNAs: target recognition and regulatory functions.** *Cell* 2009, **136**(2):215-233.
17. Engels BM, Hutvagner G: **Principles and effects of microRNA-mediated post-transcriptional gene regulation.** *Oncogene* 2006, **25**(46):6163-6169.
18. Suzuki HI, Miyazono K: **Emerging complexity of microRNA generation cascades.** *J Biochem* 2011, **149**(1):15-25.
19. Sun W, Julie Li YS, Huang HD, Shyy JY, Chien S: **microRNA: a master regulator of cellular processes for bioengineering systems.** *Annu Rev Biomed Eng* 2010, **12**:1-27.
20. Esquela-Kerscher A, Slack FJ: **Oncomirs - microRNAs with a role in cancer.** *Nat Rev Cancer* 2006, **6**(4):259-269.
21. Asaga S, Kuo C, Nguyen T, Terpenning M, Giuliano AE, Hoon DS: **Direct serum assay for microRNA-21 concentrations in early and advanced breast cancer.** *Clin Chem* 2011, **57**(1):84-91.
22. Liu XG, Zhu WY, Huang YY, Ma LN, Zhou SQ, Wang YK, Zeng F, Zhou JH, Zhang YK: **High expression of serum miR-21 and tumor miR-200c associated with poor prognosis in patients with lung cancer.** *Med Oncol* 2012, **29**(2):618-626.
23. Park NJ, Zhou H, Elashoff D, Henson BS, Kastratovic DA, Abemayor E, Wong DT: **Salivary microRNA: discovery, characterization, and clinical utility for oral cancer detection.** *Clin Cancer Res* 2009, **15**(17):5473-5477.
24. Xing L, Todd NW, Yu L, Fang H, Jiang F: **Early detection of squamous cell lung cancer in sputum by a panel of microRNA markers.** *Mod Pathol* 2010, **23**(8):1157-1164.

25. Teplyuk NM, Mollenhauer B, Gabriely G, Giese A, Kim E, Smolsky M, Kim RY, Saria MG, Pastorino S, Kesari S *et al*: **MicroRNAs in cerebrospinal fluid identify glioblastoma and metastatic brain cancers and reflect disease activity.** *Neuro Oncol* 2012, **14**(6):689-700.
26. Lorenzen JM, Kielstein JT, Hafer C, Gupta SK, Kumpers P, Faulhaber-Walter R, Haller H, Fliser D, Thum T: **Circulating miR-210 predicts survival in critically ill patients with acute kidney injury.** *Clin J Am Soc Nephrol* 2011, **6**(7):1540-1546.
27. Saikumar J, Hoffmann D, Kim TM, Gonzalez VR, Zhang Q, Goering PL, Brown RP, Bijol V, Park PJ, Waikar SS *et al*: **Expression, circulation, and excretion profile of microRNA-21, -155, and -18a following acute kidney injury.** *Toxicol Sci* 2012, **129**(2):256-267.
28. Cermelli S, Ruggieri A, Marrero JA, Ioannou GN, Beretta L: **Circulating microRNAs in patients with chronic hepatitis C and non-alcoholic fatty liver disease.** *PLoS One* 2011, **6**(8):e23937.
29. Wang K, Zhang S, Marzolf B, Troisch P, Brightman A, Hu Z, Hood LE, Galas DJ: **Circulating microRNAs, potential biomarkers for drug-induced liver injury.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009, **106**(11):4402-4407.
30. Creemers EE, Tijssen AJ, Pinto YM: **Circulating microRNAs: novel biomarkers and extracellular communicators in cardiovascular disease?** *Circ Res* 2012, **110**(3):483-495.
31. Cheng Y, Wang X, Yang J, Duan X, Yao Y, Shi X, Chen Z, Fan Z, Liu X, Qin S *et al*: **A translational study of urine miRNAs in acute myocardial infarction.** *J Mol Cell Cardiol* 2012, **53**(5):668-676.
32. Zampetaki A, Kiechl S, Drozdov I, Willeit P, Mayr U, Prokopi M, Mayr A, Weger S, Oberhollenzer F, Bonora E *et al*: **Plasma microRNA profiling reveals loss of endothelial miR-126 and other microRNAs in type 2 diabetes.** *Circ Res* 2010, **107**(6):810-817.
33. Xiao J, Luo X, Lin H, Zhang Y, Lu Y, Wang N, Zhang Y, Yang B, Wang Z: **MicroRNA miR-133 represses HERG K⁺ channel expression contributing to QT prolongation in diabetic hearts.** *J Biol Chem* 2007, **282**(17):12363-12367.
34. Haghikia A, Haghikia A, Hellwig K, Baraniskin A, Holzmann A, Decard BF, Thum T, Gold R: **Regulated microRNAs in the CSF of**

- patients with multiple sclerosis: a case-control study. *Neurology* 2012, **79**(22):2166-2170.
35. Pacifici M, Delbue S, Ferrante P, Jeansonne D, Kadri F, Nelson S, Velasco-Gonzalez C, Zabaleta J, Peruzzi F: **Cerebrospinal fluid miRNA profile in HIV-encephalitis.** *J Cell Physiol* 2013, **228**(5):1070-1075.
 36. Fiore R, Siegel G, Schratt G: **MicroRNA function in neuronal development, plasticity and disease.** *Biochim Biophys Acta* 2008, **1779**(8):471-478.
 37. Michael MZ, SM OC, van Holst Pellekaan NG, Young GP, James RJ: **Reduced accumulation of specific microRNAs in colorectal neoplasia.** *Mol Cancer Res* 2003, **1**(12):882-891.
 38. Akao Y, Nakagawa Y, Hirata I, Iio A, Itoh T, Kojima K, Nakashima R, Kitade Y, Naoe T: **Role of anti-oncomirs miR-143 and -145 in human colorectal tumors.** *Cancer Gene Ther* 2010, **17**(6):398-408.
 39. Volinia S, Calin GA, Liu CG, Ambs S, Cimmino A, Petrocca F, Visone R, Iorio M, Roldo C, Ferracin M *et al*: **A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006, **103**(7):2257-2261.
 40. Luo X, Burwinkel B, Tao S, Brenner H: **MicroRNA signatures: novel biomarker for colorectal cancer?** *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2011, **20**(7):1272-1286.
 41. Gregory PA, Bert AG, Paterson EL, Barry SC, Tsykin A, Farshid G, Vadas MA, Khew-Goodall Y, Goodall GJ: **The miR-200 family and miR-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1.** *Nat Cell Biol* 2008, **10**(5):593-601.
 42. Martello G, Rosato A, Ferrari F, Manfrin A, Cordenonsi M, Dupont S, Enzo E, Guzzardo V, Rondina M, Spruce T *et al*: **A MicroRNA targeting dicer for metastasis control.** *Cell* 2010, **141**(7):1195-1207.
 43. Song SJ, Poliseno L, Song MS, Ala U, Webster K, Ng C, Beringer G, Brikbak NJ, Yuan X, Cantley LC *et al*: **MicroRNA-antagonism regulates breast cancer stemness and metastasis via TET-family-dependent chromatin remodeling.** *Cell* 2013, **154**(2):311-324.
 44. Zhao WG, Yu SN, Lu ZH, Ma YH, Gu YM, Chen J: **The miR-217 microRNA functions as a potential tumor suppressor in pancreatic ductal adenocarcinoma by targeting KRAS.** *Carcinogenesis* 2010, **31**(10):1726-1733.

45. Yu S, Lu Z, Liu C, Meng Y, Ma Y, Zhao W, Liu J, Yu J, Chen J: **miRNA-96 suppresses KRAS and functions as a tumor suppressor gene in pancreatic cancer.** *Cancer Res* 2010, **70**(14):6015-6025.
46. Kulshreshtha R, Ferracin M, Wojcik SE, Garzon R, Alder H, Agosto-Perez FJ, Davuluri R, Liu CG, Croce CM, Negrini M *et al*: **A microRNA signature of hypoxia.** *Mol Cell Biol* 2007, **27**(5):1859-1867.
47. Greither T, Grochola LF, Udelnow A, Lautenschlager C, Wurl P, Taubert H: **Elevated expression of microRNAs 155, 203, 210 and 222 in pancreatic tumors is associated with poorer survival.** *Int J Cancer* 2010, **126**(1):73-80.
48. Szafranska AE, Davison TS, John J, Cannon T, Sipos B, Maghnouj A, Labourier E, Hahn SA: **MicroRNA expression alterations are linked to tumorigenesis and non-neoplastic processes in pancreatic ductal adenocarcinoma.** *Oncogene* 2007, **26**(30):4442-4452.
49. Lee EJ, Gusev Y, Jiang J, Nuovo GJ, Lerner MR, Frankel WL, Morgan DL, Postier RG, Brackett DJ, Schmittgen TD: **Expression profiling identifies microRNA signature in pancreatic cancer.** *Int J Cancer* 2007, **120**(5):1046-1054.
50. Murakami Y, Yasuda T, Saigo K, Urashima T, Toyoda H, Okanoue T, Shimotohno K: **Comprehensive analysis of microRNA expression patterns in hepatocellular carcinoma and non-tumorous tissues.** *Oncogene* 2006, **25**(17):2537-2545.
51. Gramantieri L, Ferracin M, Fornari F, Veronese A, Sabbioni S, Liu CG, Calin GA, Giovannini C, Ferrazzi E, Grazi GL *et al*: **Cyclin G1 is a target of miR-122a, a microRNA frequently down-regulated in human hepatocellular carcinoma.** *Cancer Res* 2007, **67**(13):6092-6099.
52. Ladeiro Y, Couchy G, Balabaud C, Bioulac-Sage P, Pelletier L, Rebouissou S, Zucman-Rossi J: **MicroRNA profiling in hepatocellular tumors is associated with clinical features and oncogene/tumor suppressor gene mutations.** *Hepatology* 2008, **47**(6):1955-1963.
53. Garofalo M, Jeon YJ, Nuovo GJ, Middleton J, Secchiero P, Joshi P, Alder H, Nazaryan N, Di Leva G, Romano G *et al*: **MiR-34a/c-Dependent PDGFR-alpha/beta Downregulation Inhibits**

- Tumorigenesis and Enhances TRAIL-Induced Apoptosis in Lung Cancer.** *PLoS One* 2013, **8**(6):e67581.
54. Ceppi P, Mudduluru G, Kumarswamy R, Rapa I, Scagliotti GV, Papotti M, Allgayer H: **Loss of miR-200c expression induces an aggressive, invasive, and chemoresistant phenotype in non-small cell lung cancer.** *Mol Cancer Res* 2010, **8**(9):1207-1216.
 55. Zhu S, Wu H, Wu F, Nie D, Sheng S, Mo YY: **MicroRNA-21 targets tumor suppressor genes in invasion and metastasis.** *Cell Res* 2008, **18**(3):350-359.
 56. Hayashita Y, Osada H, Tatematsu Y, Yamada H, Yanagisawa K, Tomida S, Yatabe Y, Kawahara K, Sekido Y, Takahashi T: **A polycistronic microRNA cluster, miR-17-92, is overexpressed in human lung cancers and enhances cell proliferation.** *Cancer Res* 2005, **65**(21):9628-9632.
 57. Garofalo M, Di Leva G, Romano G, Nuovo G, Suh SS, Ngankea A, Taccioli C, Pichiorri F, Alder H, Secchiero P *et al*: **miR-221&222 regulate TRAIL resistance and enhance tumorigenicity through PTEN and TIMP3 downregulation.** *Cancer Cell* 2009, **16**(6):498-509.
 58. Feber A, Xi L, Luketich JD, Pennathur A, Landreneau RJ, Wu M, Swanson SJ, Godfrey TE, Litle VR: **MicroRNA expression profiles of esophageal cancer.** *J Thorac Cardiovasc Surg* 2008, **135**(2):255-260; discussion 260.
 59. Kan T, Sato F, Ito T, Matsumura N, David S, Cheng Y, Agarwal R, Paun BC, Jin Z, Oлару AV *et al*: **The miR-106b-25 polycistron, activated by genomic amplification, functions as an oncogene by suppressing p21 and Bim.** *Gastroenterology* 2009, **136**(5):1689-1700.
 60. Wijnhoven BP, Hussey DJ, Watson DI, Tsykin A, Smith CM, Michael MZ, South Australian Oesophageal Research G: **MicroRNA profiling of Barrett's oesophagus and oesophageal adenocarcinoma.** *Br J Surg* 2010, **97**(6):853-861.
 61. Mathe EA, Nguyen GH, Bowman ED, Zhao Y, Budhu A, Schetter AJ, Braun R, Reimers M, Kumamoto K, Hughes D *et al*: **MicroRNA expression in squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the esophagus: associations with survival.** *Clin Cancer Res* 2009, **15**(19):6192-6200.
 62. Lin Y, Wu J, Chen H, Mao Y, Liu Y, Mao Q, Yang K, Zheng X, Xie

- L: Cyclin-dependent kinase 4 is a novel target in microRNA-195-mediated cell cycle arrest in bladder cancer cells.** *FEBS Lett* 2012, **586**(4):442-447.
63. Yamasaki T, Yoshino H, Enokida H, Hidaka H, Chiyomaru T, Nohata N, Kinoshita T, Fuse M, Seki N, Nakagawa M: **Novel molecular targets regulated by tumor suppressors microRNA-1 and microRNA-133a in bladder cancer.** *Int J Oncol* 2012, **40**(6):1821-1830.
 64. Chiyomaru T, Enokida H, Tatarano S, Kawahara K, Uchida Y, Nishiyama K, Fujimura L, Kikkawa N, Seki N, Nakagawa M: **miR-145 and miR-133a function as tumour suppressors and directly regulate FSCN1 expression in bladder cancer.** *Br J Cancer* 2010, **102**(5):883-891.
 65. Zhou Y, Wu D, Tao J, Qu P, Zhou Z, Hou J: **MicroRNA-133 inhibits cell proliferation, migration and invasion by targeting epidermal growth factor receptor and its downstream effector proteins in bladder cancer.** *Scand J Urol* 2013, **47**(5):423-432.
 66. Catto JW, Miah S, Owen HC, Bryant H, Myers K, Dudzic E, Larre S, Milo M, Rehman I, Rosario DJ *et al*: **Distinct microRNA alterations characterize high- and low-grade bladder cancer.** *Cancer Res* 2009, **69**(21):8472-8481.
 67. Zhang L, Deng T, Li X, Liu H, Zhou H, Ma J, Wu M, Zhou M, Shen S, Li X *et al*: **microRNA-141 is involved in a nasopharyngeal carcinoma-related genes network.** *Carcinogenesis* 2010, **31**(4):559-566.
 68. Xia H, Ng SS, Jiang S, Cheung WK, Sze J, Bian XW, Kung HF, Lin MC: **miR-200a-mediated downregulation of ZEB2 and CTNNB1 differentially inhibits nasopharyngeal carcinoma cell growth, migration and invasion.** *Biochem Biophys Res Commun* 2010, **391**(1):535-541.
 69. Shi W, Alajez NM, Bastianutto C, Hui AB, Mocanu JD, Ito E, Busson P, Lo KW, Ng R, Waldron J *et al*: **Significance of Plk1 regulation by miR-100 in human nasopharyngeal cancer.** *Int J Cancer* 2010, **126**(9):2036-2048.
 70. Xie B, Ding Q, Han H, Wu D: **miRCancer: a microRNA-cancer association database constructed by text mining on literature.** *Bioinformatics* 2013, **29**(5):638-644.
 71. Liang Y, Ridzon D, Wong L, Chen C: **Characterization of**

- microRNA expression profiles in normal human tissues.** *BMC Genomics* 2007, **8**:166.
72. Lee EJ, Baek M, Gusev Y, Brackett DJ, Nuovo GJ, Schmittgen TD: **Systematic evaluation of microRNA processing patterns in tissues, cell lines, and tumors.** *RNA* 2008, **14**(1):35-42.
73. Castoldi M, Schmidt S, Benes V, Hentze MW, Muckenthaler MU: **miChip: an array-based method for microRNA expression profiling using locked nucleic acid capture probes.** *Nat Protoc* 2008, **3**(2):321-329.
74. Ranade AR, Weiss GJ: **Methods for microRNA microarray profiling.** *Methods Mol Biol* 2011, **700**:145-152.
75. Varkonyi-Gasic E, Hellens RP: **qRT-PCR of Small RNAs.** *Methods Mol Biol* 2010, **631**:109-122.
76. Hurley J, Roberts D, Bond A, Keys D, Chen C: **Stem-loop RT-qPCR for microRNA expression profiling.** *Methods Mol Biol* 2012, **822**:33-52.
77. Yin JQ, Zhao RC, Morris KV: **Profiling microRNA expression with microarrays.** *Trends Biotechnol* 2008, **26**(2):70-76.
78. Chapin SC, Appleyard DC, Pregibon DC, Doyle PS: **Rapid microRNA profiling on encoded gel microparticles.** *Angew Chem Int Ed Engl* 2011, **50**(10):2289-2293.
79. Jiang RM, Chang YS, Chen SJ, Chen JH, Chen HC, Chang PL: **Multiplexed microRNA detection by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence.** *J Chromatogr A* 2011, **1218**(18):2604-2610.
80. Yang TH, Ou DL, Hsu C, Huang SH, Chang PL: **Comparative microRNA detection from precursor-microRNA-transfected hepatocellular carcinoma cells by capillary electrophoresis with dual-color laser-induced fluorescence.** *Electrophoresis* 2012, **33**(17):2769-2776.
81. DeLong EF, Wickham GS, Pace NR: **Phylogenetic stains: ribosomal RNA-based probes for the identification of single cells.** *Science* 1989, **243**(4896):1360-1363.
82. Darnell DK, Stanislaw S, Kaur S, Antin PB: **Whole mount in situ hybridization detection of mRNAs using short LNA containing DNA oligonucleotide probes.** *RNA* 2010, **16**(3):632-637.
83. Raap AK, van de Corput MP, Vervenne RA, van Gijlswijk RP, Tanke HJ, Wiegant J: **Ultra-sensitive FISH using peroxidase-mediated**

- deposition of biotin- or fluorochrome tyramides.** *Hum Mol Genet* 1995, **4**(4):529-534.
84. Raj A, Peskin CS, Tranchina D, Vargas DY, Tyagi S: **Stochastic mRNA synthesis in mammalian cells.** *PLoS Biol* 2006, **4**(10):e309.
85. Thompson RC, Deo M, Turner DL: **Analysis of microRNA expression by in situ hybridization with RNA oligonucleotide probes.** *Methods* 2007, **43**(2):153-161.
86. Levsky JM, Shenoy SM, Pezo RC, Singer RH: **Single-cell gene expression profiling.** *Science* 2002, **297**(5582):836-840.
87. Tyagi S, Kramer FR: **Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization.** *Nat Biotechnol* 1996, **14**(3):303-308.
88. Santangelo PJ, Nix B, Tsourkas A, Bao G: **Dual FRET molecular beacons for mRNA detection in living cells.** *Nucleic acids research* 2004, **32**(6):e57.
89. Persat A, Santiago JG: **MicroRNA profiling by simultaneous selective isotachopheresis and hybridization with molecular beacons.** *Anal Chem* 2011, **83**(6):2310-2316.
90. Ho SL, Chan HM, Ha AW, Wong RN, Li HW: **Direct quantification of circulating miRNAs in different stages of nasopharyngeal cancerous serum samples in single molecule level with total internal reflection fluorescence microscopy.** *Anal Chem* 2014, **86**(19):9880-9886.
91. Webb DJ, Brown CM: **Epi-fluorescence microscopy.** *Methods Mol Biol* 2013, **931**:29-59.
92. Roy R, Hohng S, Ha T: **A practical guide to single-molecule FRET.** *Nat Methods* 2008, **5**(6):507-516.
93. Qu X, Wu D, Mets L, Scherer NF: **Nanometer-localized multiple single-molecule fluorescence microscopy.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004, **101**(31):11298-11303.
94. Tokunaga M, Imamoto N, Sakata-Sogawa K: **Highly inclined thin illumination enables clear single-molecule imaging in cells.** *Nat Methods* 2008, **5**(2):159-161.
95. Moerner WE, Kador L: **Optical detection and spectroscopy of single molecules in a solid.** *Phys Rev Lett* 1989, **62**(21):2535-2538.
96. Orrit M, Bernard J: **Single pentacene molecules detected by fluorescence excitation in a p-terphenyl crystal.** *Phys Rev Lett* 1990, **65**(21):2716-2719.
97. Betzig E, Chichester RJ: **Single molecules observed by near-field**

- scanning optical microscopy.** *Science* 1993, **262**(5138):1422-1425.
98. Ambrose WP, Goodwin PM, Nolan JP: **Single-molecule detection with total internal reflection excitation: comparing signal-to-background and total signals in different geometries.** *Cytometry* 1999, **36**(3):224-231.
99. Funatsu T, Harada Y, Tokunaga M, Saito K, Yanagida T: **Imaging of single fluorescent molecules and individual ATP turnovers by single myosin molecules in aqueous solution.** *Nature* 1995, **374**(6522):555-559.
100. Kaseda K, Yokota H, Ishii Y, Yanagida T, Inoue T, Fukui K, Kodama T: **Single-molecule imaging of interaction between dextran and glucosyltransferase from *Streptococcus sobrinus*.** *J Bacteriol* 2000, **182**(4):1162-1166.
101. Wazawa T, Ishii Y, Funatsu T, Yanagida T: **Spectral fluctuation of a single fluorophore conjugated to a protein molecule.** *Biophys J* 2000, **78**(3):1561-1569.
102. Harada Y, Funatsu T, Murakami K, Nonoyama Y, Ishihama A, Yanagida T: **Single-molecule imaging of RNA polymerase-DNA interactions in real time.** *Biophys J* 1999, **76**(2):709-715.
103. Chan HM, Chan LS, Wong RN, Li HW: **Direct quantification of single-molecules of microRNA by total internal reflection fluorescence microscopy.** *Anal Chem* 2010, **82**(16):6911-6918.

第二章 以螢光原位雜合法結合HILO螢光顯微鏡相對定量肝癌細胞中hsa-miR-10b

2.1 研究動機

近年來，隨著許多研究確認miRNA之生物功能，miRNA具有調控基因表達特性，發現與疾病癌症發展有關，如何精確地偵測miRNA就成為重要的研究。過往檢測miRNA的表現量通常都是透過間接測定，先經過萃取再針對特定序列進行複製放大偵測，而RT-qPCR^[1]為目前偵測miRNA最靈敏的方法之一，但此方法也是針對特定序列放大，於低濃度的狀態下，還是存在著定量準確度不佳。而且觀察miRNA的生化功能及表達是需要以單細胞為基礎下進行探討，所以設計一種不需經由酵素放大即可精確定量miRNA之分析方法是目前需要深入研究的目標。

本實驗利用Molecular beacon結合螢光原位雜合法，透過螢光單分子影像分析miRNA之表現量。而過往全內反射螢光顯微鏡已被廣泛運用於單分子的觀測上^[2]，亦被應用於檢測總核糖核酸中的miRNA，利用DNA探針或Molecular beacon與目標miRNA雜合後進行觀測定量^[3, 4]。但為了克服全內反射螢光顯微鏡僅能觀測表面螢光分子，較無法觀測具有厚度之生物樣品之特性，本實驗選擇利用HILO螢光顯微鏡^[5]，藉由改變入射光角度，使得部分入射光穿過樣品，激發較深層

的螢光分子，希望藉此提高靈敏度使我們可以更精準判別miRNA於細胞中的表現量。本實驗室過去成功利用HILO螢光顯微鏡觀測到最低單一螢光分子之濃度為10 fM，及可清楚聚焦於深度達2 μm 之單一螢光分子。

肝癌屬於全球最常見的癌症之一，尤其於亞太地區，有高度的致死率及復發率^[6]，現階段肝癌治療效果依然僅於癌症初期較為顯著，於肝癌晚期所獲得之醫療效果則較為勉強，因此發展一套用於癌症分期與治療的新方法顯為重要。過往研究也於肝癌中發現與miRNA的關聯性，透過分析肝癌細胞中miRNA的生物途徑，使我們能更了解癌症的發展。miR-21及miR-122已被廣泛研究於肝癌細胞中，兩者的表現量都有明顯的增加^[7, 8]，進而調節基因表達過程導致癌症發展，其他與肝癌相關的miRNA研究還包含let-7 family、miR-222^[9]、miR-221^[9, 10]及miR-10b^[11]等。而miR-10b是於近年來才被發現於肝癌細胞中有高度的表達，於肝癌中的生物功能則較少人探討，所以希望透過本實驗探討miR-10b與肝癌細胞的關係，發展一套不須透過任何萃取步驟，也不須透過序列複製放大，且具有高靈敏度及專一性之方法，可直接利用影像觀測及相對定量肝癌細胞中miR-10b的表現量，透過此方法探討miR-10b的生物功能，並應用於癌症檢測及分期。

2.2 實驗材料及方法

2.2.1 試藥

細胞培養使用試藥，培養基 (DMEM)、胎牛血清 (FBS) 及 0.5% Trypsin-EDTA 向 Gibco 公司購買，三合一抗生素 (Pen-Strep Ampho. Solution) 及丙酮酸鈉 (sodium pyruvate) 向 Biological Industries 公司購買，氯化鈉 (sodium chloride) 向美國 Sigma-Aldrich 公司購買，氯化鉀 (potassium chloride)、亞磷酸鈉 (disodium hydrogenphosphate) 及磷酸鉀 (potassium dihydrogenphosphate) 向日本 SHOWA 公司購買，乙二胺四乙酸 (EDTA) 向美國 J. T. Baker 公司購買。

萃取總核糖核酸使用試藥，TRIzol Reagent 及氯仿 (chloroform) 向美國 Ambion 公司購買，異丙醇 (Isopropanol) 向美國 J. T. Baker 公司購買，乙醇 (Ethanol) 向台灣景明公司購買，DEPC Treated Water 向美國 Invitrogen 公司購買。反轉錄即時定量聚合酶連鎖反應使用試藥，SuperScript III Reverse transcriptase 向美國 Invitrogen 公司購買，dNTP Mix 向瑞士 Roche 公司購買，SYBR Green PCR Master Mix 向英國 Applied Biosystems 公司購買。

細胞樣品前處理及螢光顯微鏡實驗使用試藥，三羥甲基氨基甲烷 (Tris)、甘胺酸 (glycine) 及甲醛 (formaldehyde) 向美國 J. T. Baker 公司購買，檸檬酸鈉 (Sodium Citrate) 及 1-甲基咪唑 (1-methylimidazole)

向美國 Sigma-Aldrich 公司購買，EDC (1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride) 及 APTES (3-Aminopropyl)triethoxysilane) 向美國 Alfa Aesar 公司購買，牛血清蛋白 (Bovine serum albumin) 向 UniRegion 美國公司購買，Proteinase K 及 10× PCR Buffer 向瑞士 Roche 公司購買，Trolox 向美國 Acros Organics 購買，甲醯胺 (formamide) 向德國 Merck 公司購買，Fluoro-Gel with DABCO (1,4-diazobicyclo-(2.2.2)-octane) 向美國 Electron Microscopy Sciences 公司購買，DAPI(4',6-diamidino-2-phenylindole) 向美國 Life technologies 公司購買。

實驗所需之 HPLC 等級寡核苷酸是由美國 Integrated DNA Technologies 公司及美國 Sigma-Aldrich 公司生產合成，如表 2-1。

2.2.2 儀器設備及系統架構

細胞培養所使用之安全操作平台為台灣 yakos65 公司製造之 SAFZONE Class II A2 BSC，培養箱為日本 Panasonic 公司製造之 MCO-170 AIC；萃取總核糖核酸所使用低溫離心機為日本 KUBOTA 公司製造 3740，微量光譜儀為美國 DeNovix 公司製造生產之 DS-11；反轉錄聚合酶連鎖即時偵測使用由德國 QIAGEN 公司製造之 Rotor-Gene Q Real-Time PCR System。

本實驗使用高靈敏度螢光顯微系統如圖 2-1 所示，三道功率可調

Table.		
名稱	長度	序列 (5' – 3')
hsa-miR-10b-3p (RNA)	22	ACAGAUUCGAUUCUAGGGGAAU
hsa-miR-10b Molecular Beacon	28	5'-Cy5-GCACATTCCCCTAGAATCGAATCTGTGC-Iowa Black RQ -SP-3'
U6 Molecular Beacon	28	5'- 6-FAM-GTCTACCATGCTAATCTTCTCTGTAGAC -BHQ1- 3'
hsa-miR-10b RT primer	44	CTCAACTGGTGTCGTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGATTCCCCT
hsa-miR-10b GS primer	22	CGGCGGACAGATTTCGATTCTAG
Reverse primer	24	CTGGTGTCGTGGAGTCGGCAATTC

表 2-1 實驗所使用核苷酸序列。

式雷射光源，一為 405 nm 的固態雷射，最大輸出功率為 200 mW，用於激發 DAPI 螢光分子，並確定觀測細胞的位置；二為搭配激發 Alexa Fluor 647 及 Cy5 螢光分子之 640 nm 的固態雷射，最大輸出功率為 200 mW；另外搭配激發 6-FAM 螢光分子之氬離子雷射，得以進行單一螢光分子及細胞中 miRNA 之偵測。並於光源前方放置美國 Semrock 公司製造之 400 nm、488 nm 及 640 nm interference filter，以利純化雷射光源，能夠有效減少散射光源，再利用美國 Semrock 公司製造之 dichroic beamsplitters LM01-427-25 及 LM01-503-25 將三道雷射匯聚成單一光束，接著通過美國 Thorlabs 公司製造之光閘，控制雷射通過與否，再經由 10× beam expander 放大光束後，使用透鏡將光束聚焦至顯微鏡中物鏡之焦點上，亦可透過調整此透鏡之三維方向，控制不同角度之光束及調控光束聚焦於位置。

本實驗使用之倒立式螢光顯微鏡型號為 IX71，由美國 Olympus 公司生產製造，上方搭載二維移動平台，藉由控制平台之 X 軸及 Y 軸至欲觀測之樣品玻片位置。顯微鏡使用物鏡型號為 APON 60× OTIRF 之油鏡，由美國 Olympus 公司生產製造，其 N.A. 為 1.49，油鏡所使用浸油為 Electron Microscopy Sciences 所生產的 Immersiom Oil Type LDF。螢光顯微鏡內部之濾鏡盒 (filter cube) 包含可反射激發光源與可使螢光穿透之 dichroic beamsplitters，型號為 FF409-Di03-25×36、

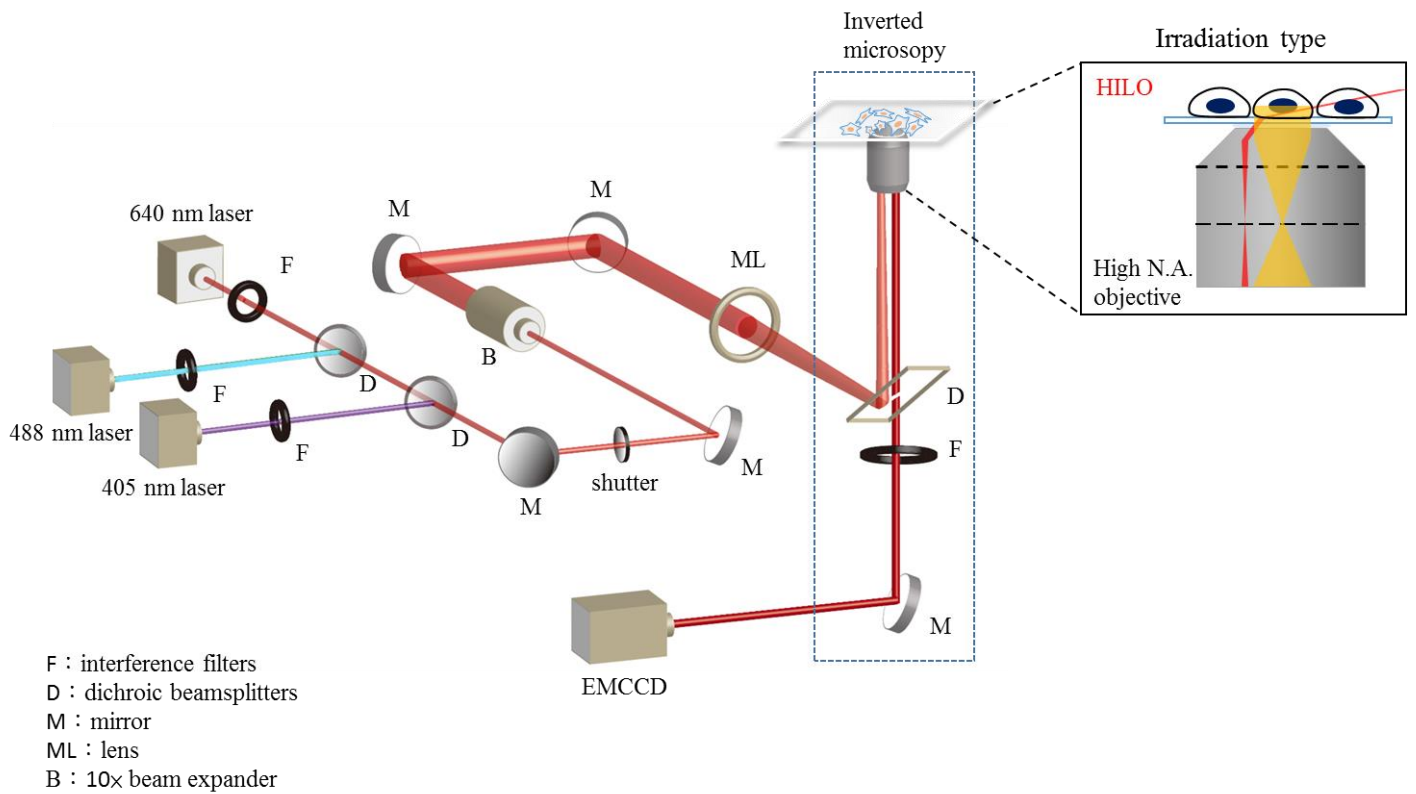


圖 2-1 HILO 螢光顯微系統之裝置圖。其中代號 F 表示為 interference filters ; D 表示為 dichroic beamsplitters ; M 為 mirror ; ML 表示為 lens ; B 表示為 10× beam expander 。

FF511-Di01-25×36 及 FF650-Di01-25×36 均由美國 Semrock 公司製造，加上可過濾螢光訊號之 interference filter，型號為 FF01-447/60-25、FF01-525/26-25 及 FF01-680/30-25 亦由美國 Semrock 公司製造。

因為單分子之螢光訊號非常微弱，故需要使用較靈敏的 EMCCD 收集螢光影像，所使用之電子倍增電荷耦合裝置 (electron multiplying charge coupled device, EMCCD) 型號為 ProEM:512B，由美國 Princeton Instruments 公司生產製造，此型號為 512×512 個像素。本實驗使用 CCD 之設定參數包括觀測 DAPI 標記細胞核位置，所使用 Low Noise 模式 ADC 速率為 5 赫茲 (Hz)；而觀測單分子及細胞中 miRNA 使用 Multiplication Gain 模式 ADC 速率為 10 赫茲 (Hz)，其餘設定包含，曝光時間為 33 毫秒 (msec.) 及 Gain 值為 200，並經由 WinView-32 軟體儲存影像，最後使用 ImageJ 軟體計算每個像素之細胞平均螢光訊號，亦使用微米尺進行畫面實際尺寸之量測，如圖 2-2 所示，計算得 1 個像素於成像後代表 256 nm 之距離。

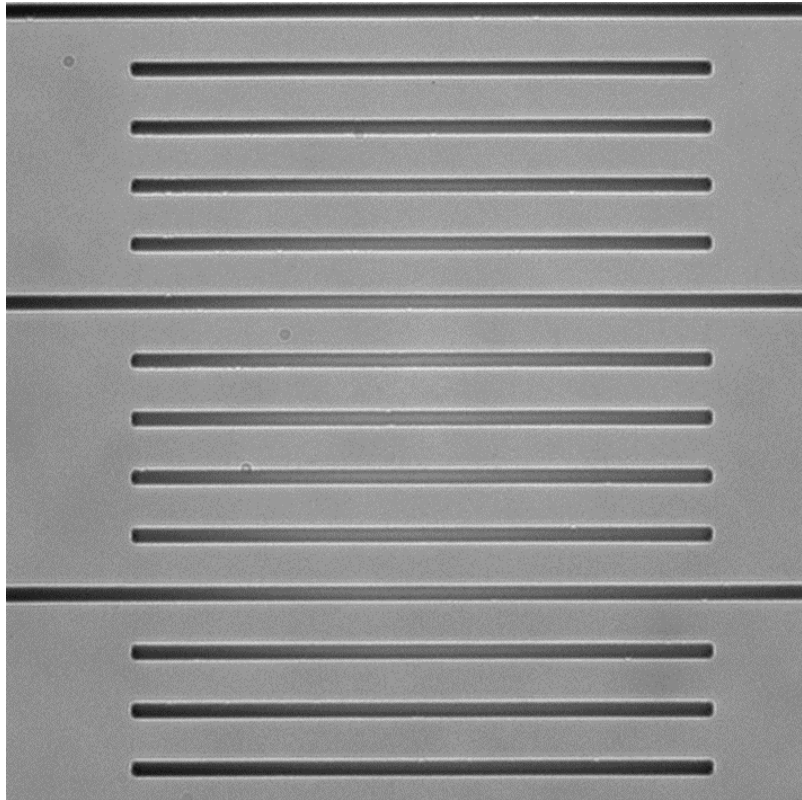


圖 2-2 60 倍油鏡下之微米尺。一小格 = 0.01 mm，整個畫面約 13 小格，邊長約為 0.13 mm， $0.25 \mu\text{m} / \text{pixel}$ 。

2.2.3 實驗方法及流程

2.2.3.1 細胞培養

將肝癌細胞 Huh7 及 Hep3B 培養於 6 cm 的培養皿內，加入 3 mL 培養液，其中包含 10% FBS，0.01×PSA 及 1 mM 丙酮酸鈉之 DMEM 培養液，細胞培養於 37 °C，5% CO₂ 的環境下，2 至 3 天滿盤後，先吸棄培養液，先以含有 1 mM EDTA 之 PBS 清洗，再加入 2 mL 1× trypsin / EDTA in PBS，於 37 °C 反應 3 分鐘，使細胞離開培養皿表面，以等量培養液終止反應後，收集細胞並以 400 ×g 離心 5 分鐘，吸棄上清液，以 3 mL 培養液沖散細胞後，持續繼代培養。本實驗亦將 5000-8000 個細胞置於 0.2×培養液中，將細胞滴在經處理及高壓滅菌之玻片上，放置一段時間使細胞貼平於玻片，最後使用顯微鏡檢查是否為均勻分布之單顆細胞，再利用 4% 甲醛固定細胞 10 分鐘，最後再利用 PBS 清洗，即完成細胞培養，玻片之細胞樣品可保存於 -20 °C。本實驗肝癌細胞株及藥物調控之細胞樣品由台灣大學基因體中心腫瘤醫學研究所歐大諒教授提供。

本實驗所使用之玻片（High Precision Cover Glass）型號為 NO. 1.5H，由德國 Paul Marienfeld 公司生產製造，為硼矽酸玻璃材質，玻片厚度為 170 μm ± 5 μm。玻片使用前皆須於二次水中加入清潔劑以超音波震盪 30 分鐘，震盪後以二次水沖洗乾淨，再於二次水中使用

超音波震盪 30 分鐘一次，震盪後以 95% 乙醇潤洗，再浸泡以 95% 乙醇配製之 5% APTES 溶液 1 小時，最後於 95% 乙醇中使用超音波震盪 5 分鐘兩次，以去除多餘未反應之 APTES，將玻片表面修飾成帶正電荷之胺基，以利於生物樣品吸附於玻片表面，再以高壓滅菌即為乾淨玻片。

2.2.3.2 萃取總核糖核酸

萃取總核糖核酸是以特定溶劑破壞細胞並以離心方式分離細胞內之蛋白質、DNA 及 RNA，再將 RNA 沉澱下來，流程如圖 2-3 所示。首先細胞培養 2 至 3 天滿盤後，以 3 mL 1 mM EDTA 之 PBS 清洗，吸棄後加入 3 mL TRIzol Reagent 吸吐使細胞完全脫離培養皿表面，達到均質化的效果，收集含有細胞 TRIzol 溶液，其溶液可以保存於 $-60^{\circ}\text{C} \sim -70^{\circ}\text{C}$ 一個月；取出 1 mL TRIzol 細胞溶液置於室溫 5 分鐘，加入 0.2 mL 氯仿，以 Vortex 劇烈震盪 30 秒，再靜置於室溫 3 分鐘，隨後於 4°C 下以 $12000\times g$ 離心 15 分鐘，使溶液分三層，將於最上層的 RNA 溶液取出於新的離心管內，為降低後續實驗處理上的困擾，須避免吸取到下層蛋白質、DNA 之有機溶液；獲取包含 RNA 的溶液後，加入 0.5 mL 100% 異丙醇並震盪混合均勻，再放置於室溫 10 分鐘，隨後於 4°C 下以 $12000\times g$ 離心 20 分鐘，使 RNA 沉澱；將上清液吸棄後再以 1 mL 冰的 75% 酒精以小旋渦震盪清洗，隨後於 4

°C 下以 7500×g 離心 10 分鐘；最後將將上清液吸棄，以真空抽乾 3 至 5 分鐘後，以 60 °C DEPC Treated Water 回溶 RNA，即取得總核糖核酸 (Total RNA)，其樣品可保存於 -20 °C。

為確定取得總核糖核酸樣品是否完整，會利用毛細管電泳分析確認 18S、28S、5.8S、5S 及 tRNA 之訊號高度^[12]，如圖 2-4 所示，確認完整性後再利用吸收儀定量其濃度，而理想 260nm 與 280nm 的吸收值 (A₂₆₀ / A₂₈₀) 必須落於 1.9 ~ 2.1 之間，若 A₂₆₀ / A₂₈₀ 低於 1.9，代表萃取出來的總核糖核酸中殘留了過多的蛋白質。

2.2.3.3 反轉錄即時定量聚合酶連鎖反應

針對 hsa-miR-10b 進行反轉錄即時定量聚合酶連鎖反應，首先為第一次反轉錄反應 (Reverse transcriptase reaction) 分別加入 1 µl miR-10b RNA 標準品或 500 ng 之總核糖核酸，與加入反應試劑 0.5 µl dNTP (10 mM)、1 µl RT primer (0.5 µM)、2 µl 5X First-Strand buffer、0.1 µl SuperScript III Reverse transcriptase (200 U/µl) 及 0.5 µl DTT (0.1M)，最後補水至總體積 10 µl。反應條件為 65 °C 5 分鐘，加入反轉錄酵素及試劑後，於 25 °C 10 分鐘，25 °C 至 55 °C 梯度升溫一小時，55 °C 30 分鐘，進行反轉錄，於 85 °C 5 分鐘終止反應。

第二階段為即時偵測聚合酶連鎖反應 (Real time PCR)，先將反轉錄之 DNA 產物稀釋 20 倍，再分別加入 2 µl Reverse primer (1µM)、

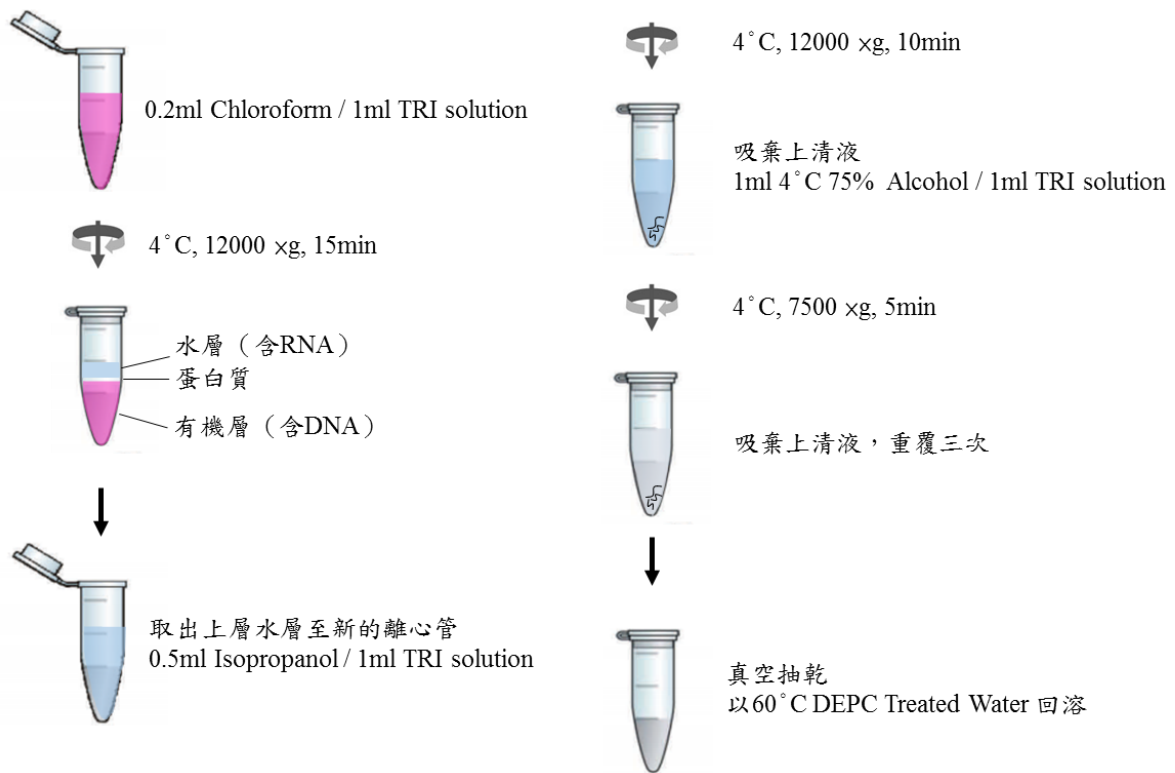


圖 2-3 萃取總核糖核酸之流程圖。

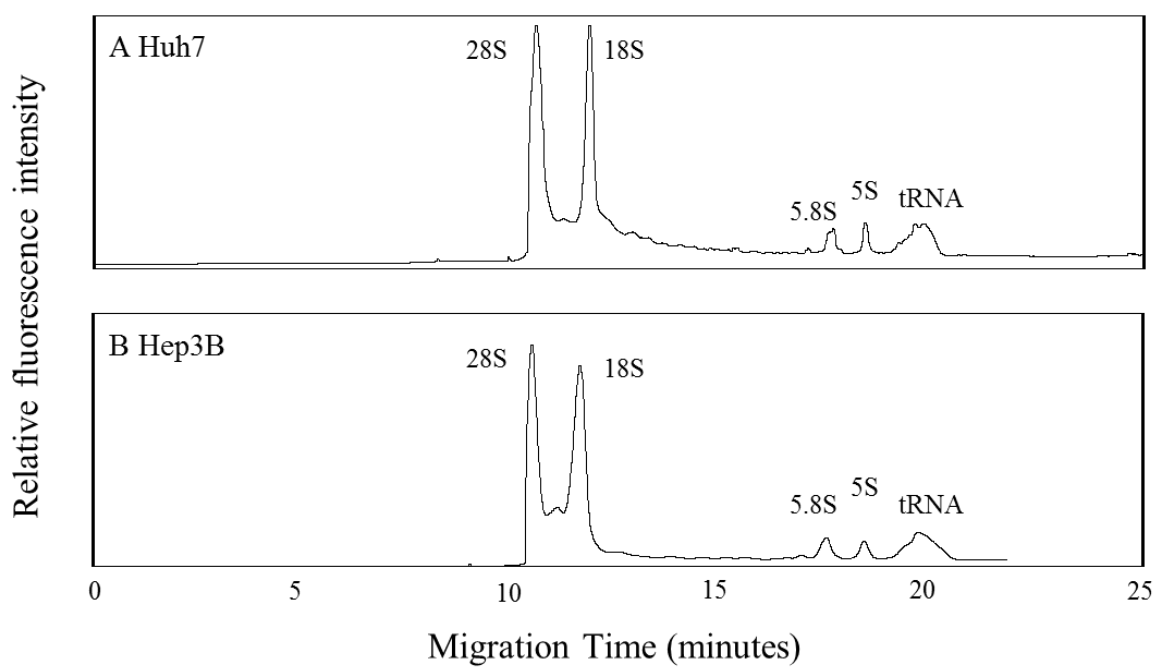


圖 2-4 總核糖核酸之電泳圖。(A)為 Huh7 肝癌細胞所萃取的 Total RNA，(B)為 Hep3B 肝癌細胞所萃取的 Total RNA。

2 μ l GS primer (1 μ M) 及 5 μ l SYBR Green Mix。反應條件為 95 $^{\circ}$ C 4 分鐘；接著 95 $^{\circ}$ C 15 秒，45 $^{\circ}$ C 30 秒，63 $^{\circ}$ C 30 秒，兩次循環；接續 95 $^{\circ}$ C 15 秒，63 $^{\circ}$ C 30 秒，五十次循環；最後 63 $^{\circ}$ C 30 秒，25 $^{\circ}$ C 30 秒。為確定所得到最終產物複製結果是否成功，利用 10 bp marker 與 hsa-miR-10b stem loop RT-qPCR 產物混合後，以毛細管電泳分析判斷此 DNA 產物長度是否正確，如圖 2-5 所示。

2.2.3.4 細胞實驗流程

將保存於 -20 $^{\circ}$ C 之細胞樣品回復至室溫，使用去離子水清洗後，以 20 μ g/ml Proteinase K 溶液覆蓋細胞表面，於 37 $^{\circ}$ C 反應 5 分鐘將細胞膜上之蛋白質切掉少許，幫助後續加入的反應試劑都能進入細胞，使用 TBS 緩衝溶液清洗三次，以終止 Proteinase K 之反應，接著浸泡 4% Formaldehyde 溶液反應 15 分鐘，及浸泡 glycine 溶液 5 分鐘，再以 TBS 緩衝溶液清洗二次，再浸泡 0.13 M 1-methylimidazole 溶液反應 10 分鐘，重複二次反應以加速 EDC 反應速度，使用 EDC 溶液反應 1 小時，加入 EDC 溶液進行 miRNA 固定反應，將 miRNA 固定於細胞內之蛋白質上^[13]，其反應機制如圖 2-6，隨後浸泡 glycine 溶液 5 分鐘，再以 TBS 緩衝溶液清洗二次，最後將細胞回溶於 0.3 \times SSC 雜合溶液，並加入 5% BSA 及 1 μ M 之隨機短序列 DNA，將 BSA 及 DNA 吸附於玻片表面，以防止標記螢光分子的 Molecular beacon 直接

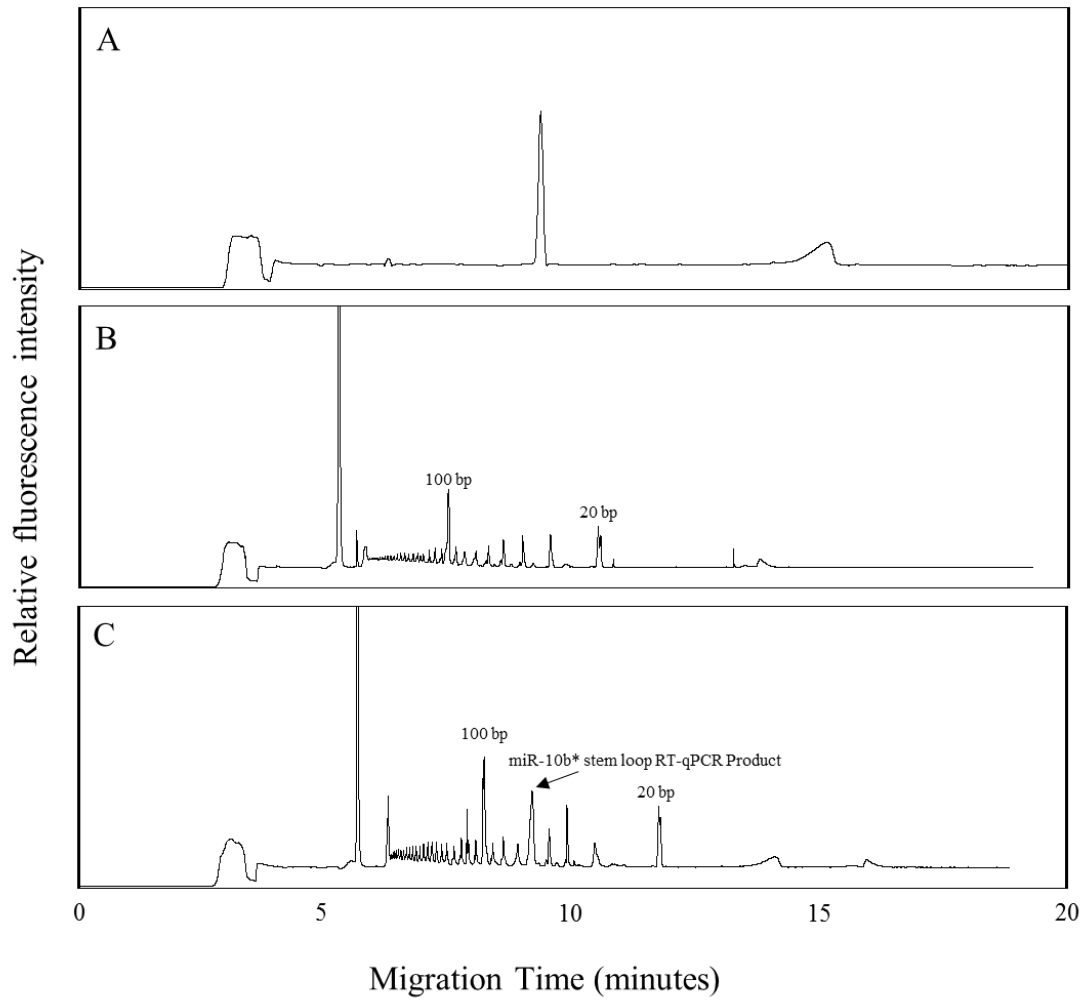


圖 2-5 hsa-miR-10b stem loop RT-qPCR product 電泳圖。(A)為 500ng Huh7 Total RNA 之 hsa-miR-10b stem loop RT-qPCR product，(B)為 10 bp marker 之電泳圖，(C)為兩者混合標示電泳圖。

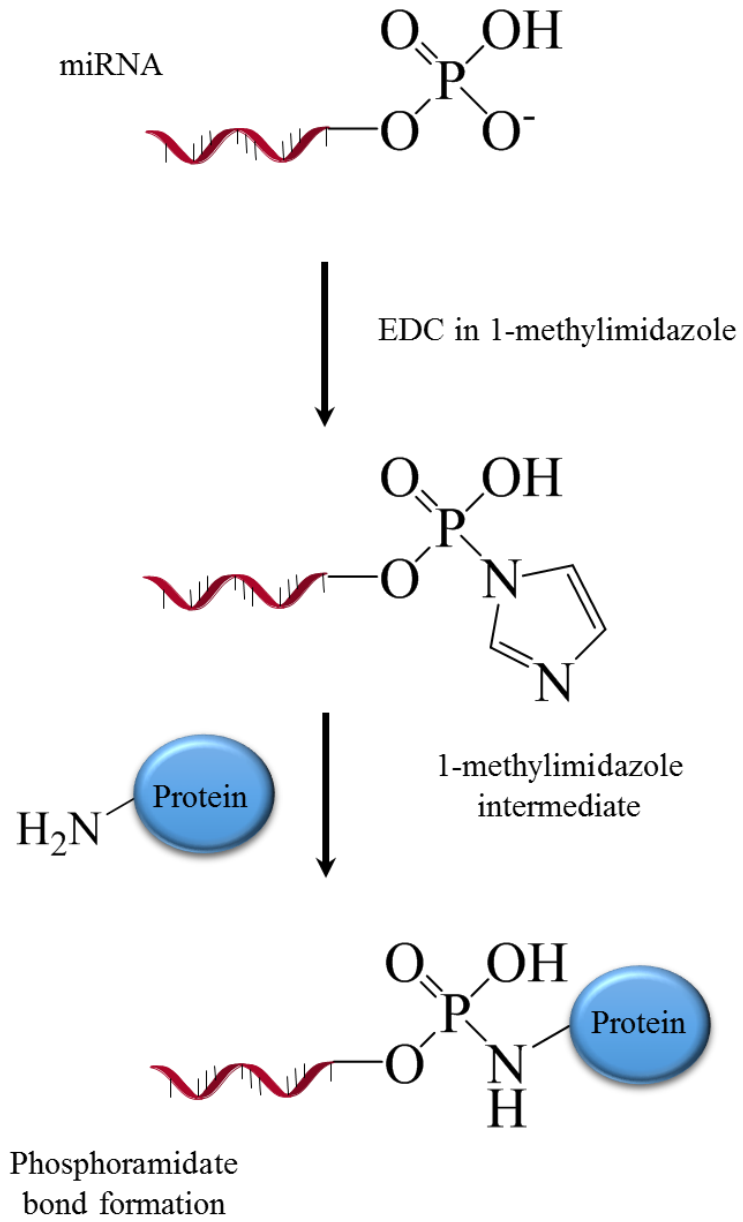


圖 2-6 利用 EDC 反應固定 miRNA 機制圖。

吸附於玻片表面。而為了避免細胞本身的自體螢光之背景干擾，使用紅色及綠色 LED 燈泡照射一個晚上，使細胞背景螢光降低，以利螢光分子的觀測。

照光後以去離子水及 TBS 緩衝溶液清洗，於 $0.3\times$ SSC 雜合溶液中加入 5% BSA 及 $0.1\ \mu\text{M}$ 螢光探針 (Molecular beacon) 於 T_m 值 ($50\ ^\circ\text{C}$) 進行雜合反應，使用遠超過 miRNA 含量的螢光探針，避免與細胞中 miRNA 雜合程度不同導致螢光表現量之差異，反應一小時，使螢光探針與目標 miRNA hsa-miR-10b 完全連接。完成雜合反應後須使用 50% formamide 的 $2\times$ SSC 溶液、50% formamide 的 $1\times$ SSC 及 $0.3\times$ SSC 溶液於 T_m 值 ($50\ ^\circ\text{C}$) 將未鍵結的 Molecular beacon 清洗乾淨，接著以 $1\times$ SSC 緩衝溶液於室溫清洗，再於樣品區域滴上適量之 Fluoro-Gel with DABCO 與 DAPI 混合溶液，進行細胞核染色，最後蓋上蓋玻片及使用指甲油將邊緣密封，以避免內部溶液乾掉，即完成樣品製備，實驗流程如圖 2-7 所示。

本實驗之目標 miRNA hsa-miR-10b 之序列為 5'-ACA GAU UCG AUU CUA GGG GAA U-3'，其 Molecular beacon 之序列為 5'-Cy5-GCA CAT TCC CCT AGA ATC GAA TCT GTG C-Iowa Black RQ-Sp-3'，Molecular beacon 序列之五端標記 Cy5 螢光分子與三端為 Iowa Black RQ-Sp 消光分子，此序列設計透過 Oligo 7 軟體預估計算 Molecular

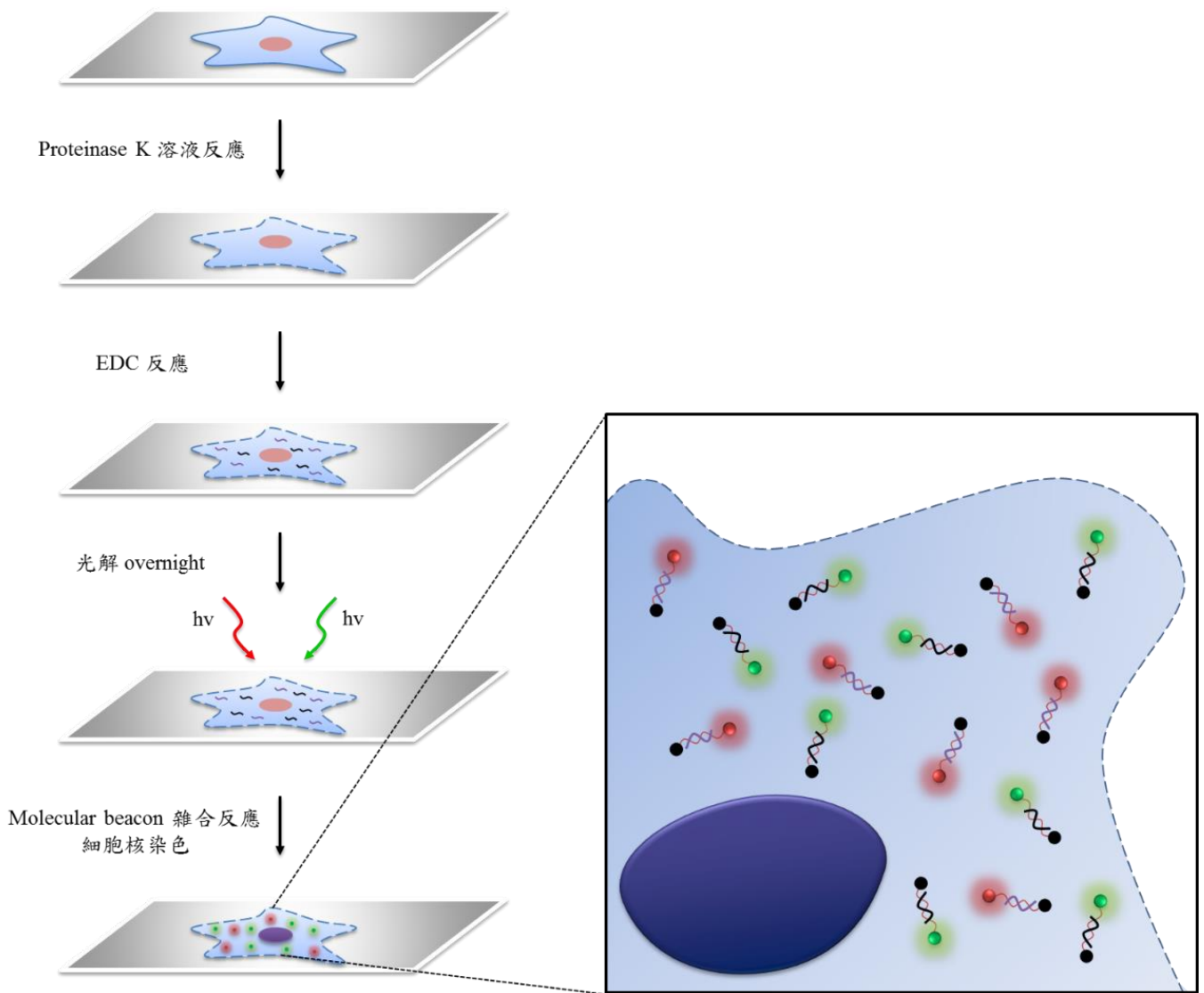


圖 2-7 細胞實驗流程圖。

beacon Hairpin 結構之黏合溫度為 36.7 °C，所設計 Molecular beacon 之環狀序列會於目標 miRNA 完全互補配對時，而將其氫鍵部分打開，使 Cy5 螢光分子不受 Iowa Black RQ-Sp 消光分子影響而放出螢光，若為不完全互補配對時，會維持其氫鍵部分，使 Cy5 螢光分子受 Iowa Black RQ-Sp 消光分子影響而無法放出螢光，Cy5 螢光分子最大激發波長為 647nm，最大放射波長為 665nm，所以選擇以 647nm 之固態雷射作為激發光源，此序列是由美國 Integrated DNA Technologies 公司生產合成。本實驗亦使用 Rotor-Gene Q Real-Time PCR System 測得兩段互補序列之熔點曲線圖 (Melting curve)，如圖 2-8 所示，設定溫度為 80 至 25 °C，每次減少 0.5 °C，由圖可以看到加入目標 miRNA hsa-miR-10b 會與 Molecular beacon 之序列完全互補配對，隨著溫度降低其螢光強度增加，而只有 Molecular beacon 則會隨著溫度降低，而黏合成 Molecular beacon 之環狀結構，使得螢光強度降低。另外設計一段 Molecular beacon 標記細胞中 U6 snRNA 來進行相對定量，其序列為 5'- 6-FAM-GTCTACCATGCTAATCTTCTCTGTAGAC - BHQ1- 3'，此 Molecular beacon 序列之五端標記 6-FAM 螢光分子與三端為 BHQ1 消光分子，此序列設計透過 Oligo 7 軟體預估計算 Molecular beacon Hairpin 結構之黏合溫度為 36.5 °C，其 6-FAM 螢光分子最大激發波長為 494nm，最大放射波長為 519nm，所以選擇以

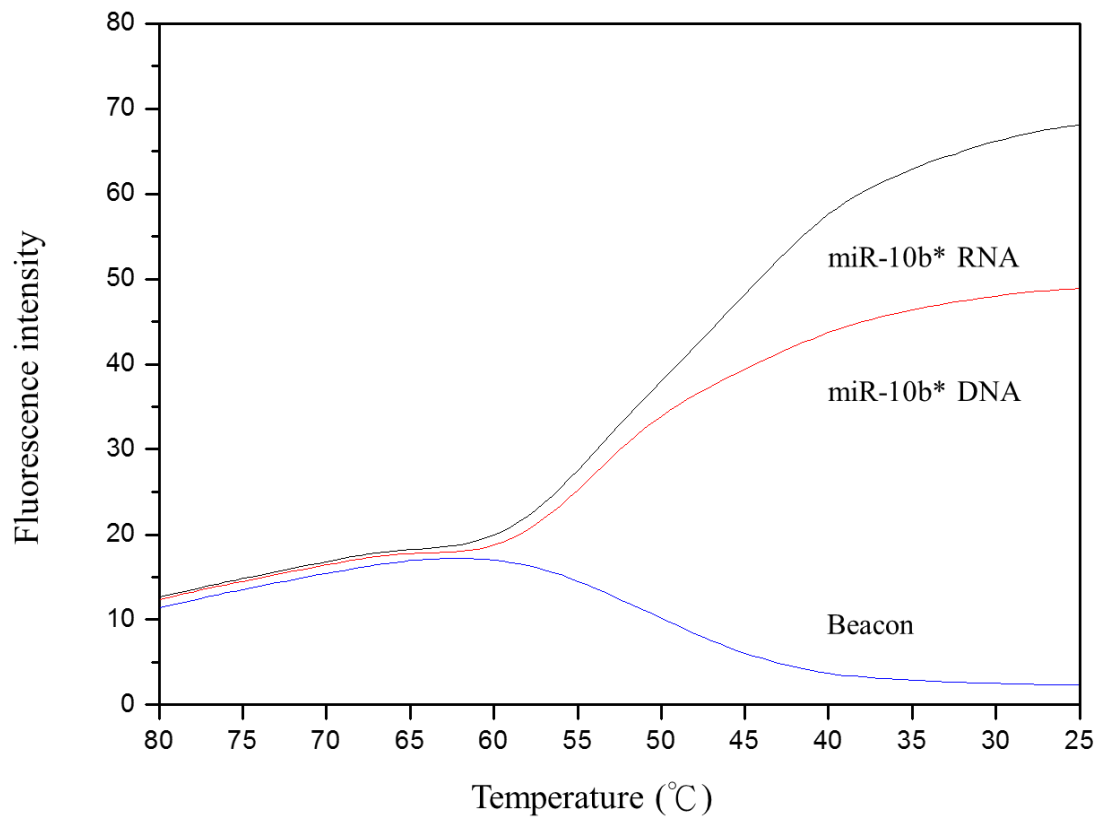


圖 2-8 Molecular Beacon 與互補序列之熔點曲線圖。

488nm 之氬離子雷射作為激發光源，此序列是由美國 Sigma-Aldrich 公司生產合成。

2.3 結果與討論

2.3.1 利用反轉錄聚合酶連鎖反應即時定量 hsa-miR-10b

反轉錄即時定量聚合酶連鎖反應是現今用於檢測 miRNA 最靈敏的方法之一，本實驗首先利用此方法針對 hsa-miR-10b 進行定量。利用購買之 hsa-miR-10b-3p RNA 標準品作出檢量曲線，由圖 2-9 發現一般用水稀釋的 RNA 樣品於 10 pM 開始，實驗誤差不斷增加，導致無法準確定量。為了克服再現性不佳的問題，實驗改用 10 ng/ μ l yeast RNA 之 DEPC Treated Water 進行樣品稀釋，防止 RNA 樣品吸附於 0.2 ml PCR tube 管壁上，以利增加實驗的準確性，得到 hsa-miR-10b 之檢量曲線，如圖 2-10 所示，所得檢量線方程式 $y = -3.542x - 16.774$ ，R 值為 0.998。條件最佳化後，確實有效降低實驗誤差及提高靈敏度，但 RNA 樣品濃度如果落在 100 fM ~ 1 fM 之區間，實驗再現性依然不好，於 100 fM hsa-miR-10b RNA 樣品之 Threshold Cycle 為 28.90 ± 1.080 ，而 1 fM hsa-miR-10b RNA 樣品之 Threshold Cycle 為 35.58 ± 2.526 ，此狀況依然會造成於低濃度樣品之定量結果失去真實性。

利用上述方法所得檢量曲線針對 Huh7 及 Hep 3B 之兩種肝癌細胞中 hsa-miR-10b 進行定量，發現兩種肝癌細胞定量結果皆落於 100 fM ~ 1 fM 此區間。如表 2-2 所示定量結果，Huh7 之 Threshold Cycle

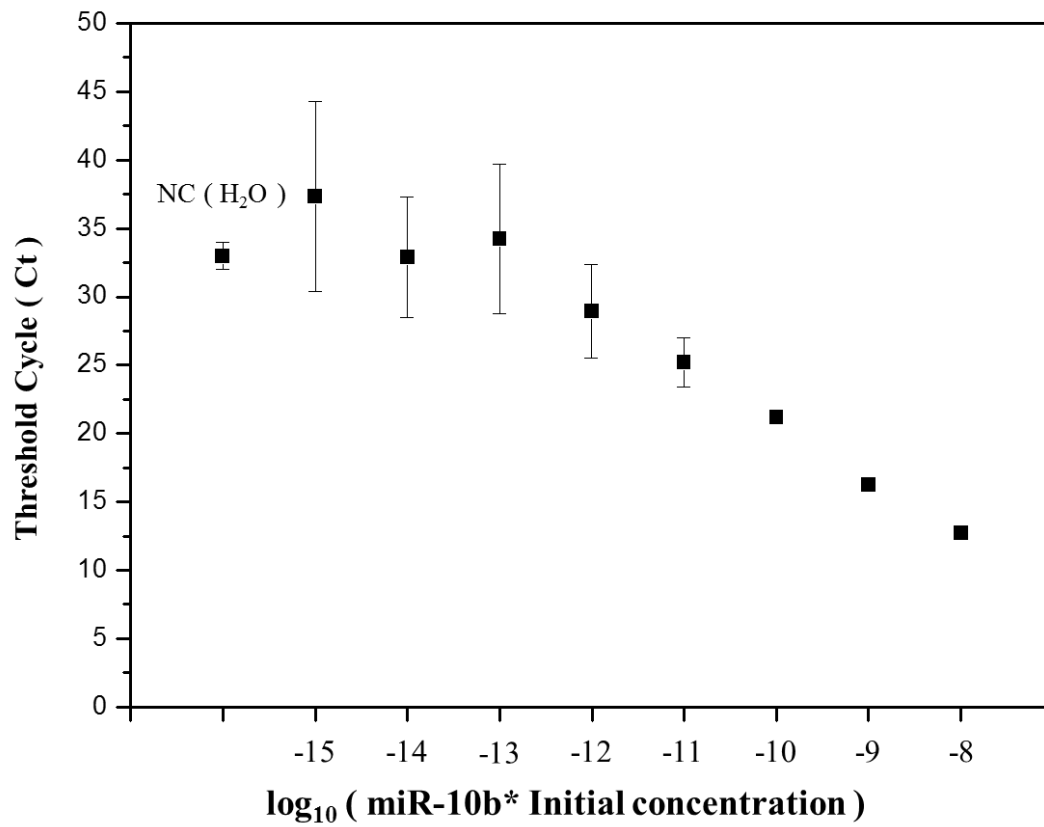


圖 2-9 以水稀釋 hsa-miR-10b RNA 樣品之檢量曲線圖。

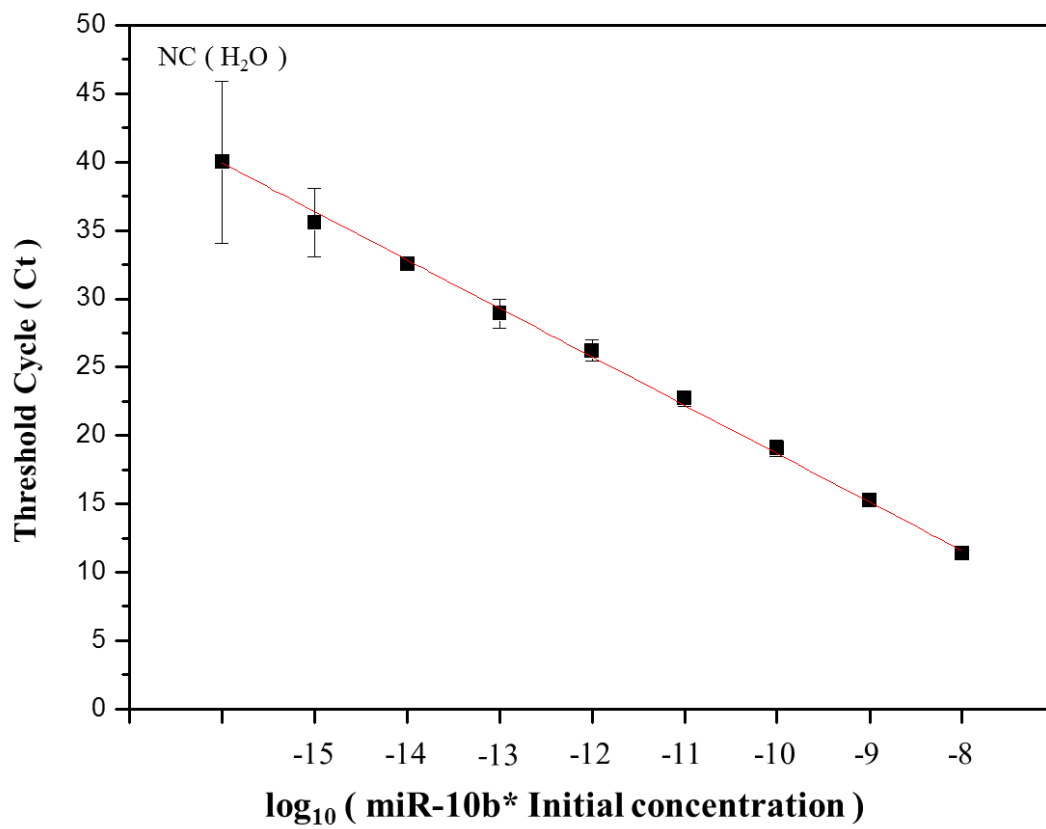


圖 2-10 以 yeast RNA 稀釋 hsa-miR-10b RNA 樣品之檢量曲線圖。

Table.

Name (500 ng/μl Total RNA)	Ct	SD	Conc.
Huh7 (Native)	29.51	0.421	8.59×10^{-14} M
Huh7 (Pre-10b*)	28.49	0.221	1.66×10^{-13} M
Huh7 (Anti-10b*)	33.16	4.798	7.99×10^{-15} M
Hep3B (Native)	35.60	1.155	1.64×10^{-15} M
Hep3B (Pre-10b*)	29.23	1.107	1.03×10^{-13} M
Hep3B (Anti-10b*)	36.58	3.155	8.69×10^{-16} M
NC (H ₂ O)	39.98	5.940	-

(N = 3)

表 2-2 以 stem-loop RT-qPCR 定量肝癌細胞中的 hsa-miR-10b。

為 29.51 ± 0.421 ，而 Hep 3B 之 Threshold Cycle 為 35.60 ± 1.155 ，兩者依然能透過此方法準確定量區分，但透過藥物抑制 hsa-miR-10b 表現量之細胞則無法利用此方法準確定量，Huh7 (Anti-10b*) 之 Threshold Cycle 為 33.16 ± 4.798 ，而 Hep 3B (Anti-10b*) 之 Threshold Cycle 為 36.58 ± 3.155 ，由於實驗誤差導致無法準確區分，使定量結果失去真實性，所以將此方法應用於臨床上極有可能會導致誤判，甚至出現無法判別的情況。

2.3.2 螢光顯微鏡系統

由於 miRNA 於細胞中的含量都非常微量，所以過去傳統檢測方法都需透過實驗設計將其序列進行複製放大，較無法直接進行觀測。而現今最靈敏之一的反轉錄聚合酶連鎖反應也是針對特定序列複製放大再進行檢測，但於 miRNA 表現量極低的狀況就無法準確的測定，所以本實驗室於過去極力開發一套高靈敏度之螢光顯微鏡系統，並將其應用於觀測細胞樣品中的 miRNA 上。

首先實驗先分別使用三種不同的螢光顯微鏡系統觀測單一螢光分子，使用修飾上單一螢光分子 Alexa Flour 647 之 DNA 序列進行測試，由圖 2-11 可以看到 Epi-fluorescence 顯微鏡系統，因為背景干擾過大則無法清楚觀測到單分子訊號；再者 TIRF 螢光顯微系統，即能觀測到單分子訊號，但全反射所產生的漸逝波，其穿透深度只能達到

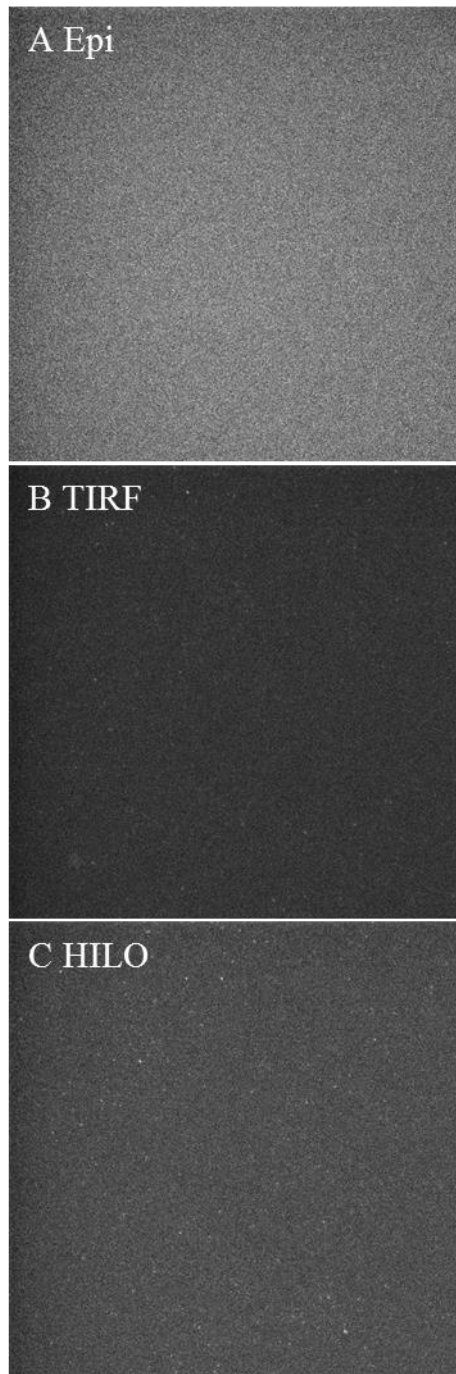


圖 2-11 於螢光顯微系統觀測 DNA 單分子螢光訊號。(A)為 Epi 螢光顯微系統，(B)為 TIRF 螢光顯微系統，(C)為 HILO 螢光顯微系統。

玻片表面，僅能觀測到玻片表面之單分子，若於非焦面之單一螢光分子則無法聚焦，所以學生認為此系統不利於有厚度的生物樣品觀測；而學生所使用的 HILO 螢光顯微鏡不僅能夠觀察到表面單分子，且可以清楚聚焦於深度達 2 μm 之單一 DNA 螢光分子，亦能夠清楚觀測到未吸附於玻片表面之單一 DNA 螢光分子的布朗運動，因此學生認為此系統能有利於觀測具有厚度之生物樣品，且能更準確的觀測到螢光訊號的表現量。

為了確定能於螢光顯微鏡下觀測到細胞樣品中的螢光訊號，實驗以 Molecular beacon 與細胞中的 miRNA 雜合，於三種螢光顯微鏡系統下比較螢光訊號表現量，圖 2-12 是於三種螢光顯微鏡系統下觀測細胞中的螢光訊號，Epi-fluorescence 顯微鏡系統所得影像，因為背景干擾過大則無法清楚觀測到細胞中的螢光訊號，而 TIRF 顯微系統僅能觀測到玻片表面之訊號，再次證明 TIRF 顯微系統漸逝波之穿透深度只能達到玻片表面，不利於有厚度的生物樣品觀測，而 HILO 螢光顯微系統能夠於細胞中得到較明顯的螢光訊號，所以學生認為選擇 HILO 螢光顯微系統進行細胞實驗得到的螢光訊號較能準確反應出細胞中 miRNA 的表現量，以下實驗皆使用 HILO 螢光顯微系統。

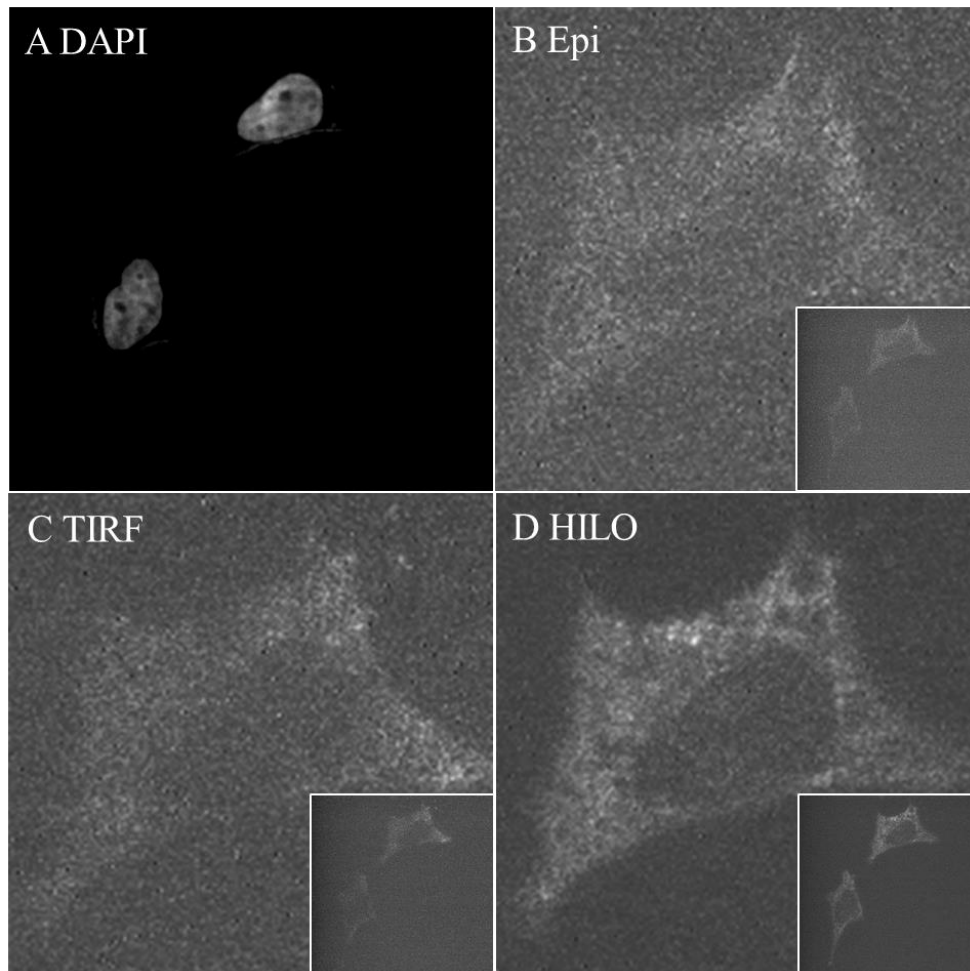


圖 2-12 於螢光顯微系統觀測細胞中螢光訊號。(A)為 DAPI 標示細胞位置，(B)為 Epi 螢光顯微系統，(C)為 TIRF 螢光顯微系統，(D)為 HILO 螢光顯微系統。

2.3.3 結合螢光原位雜合法觀測細胞樣品中 miRNA

本實驗利用 Molecular beacon 以螢光原位雜合法標記細胞樣品內的 miRNA，所使用之 Molecular beacon 於 5'端修飾上 Cy5 螢光分子於 3'端修飾上 Iowa Black RQ-Sp 消光分子，先前由 Melting Curve 可以觀察到加入目標 miRNA hsa-miR-10b 會與 Molecular beacon 之序列完全互補配對，因此 Cy5 螢光分子不會受到 Iowa Black RQ-Sp 消光分子之影響，有強的螢光訊號產生，只有 Molecular beacon 則會維持其環狀結構，使 Cy5 螢光分子受 Iowa Black RQ-Sp 消光分子之影響，只能產生微弱的螢光訊號。可以確定若細胞中有目標 hsa-miR-10b 之 miRNA，會與本實驗設計 Molecular beacon 之序列完全互補配對，而有螢光訊號產生，如果沒有目標 hsa-miR-10b 之 miRNA 存在，Molecular beacon 會維持其環狀結構，只能得到低的螢光訊號。

本實驗利用 HILO 螢光顯微系統觀測肝癌細胞於此系統下之背景訊號，由圖 2-13 A 與 B 顯示細胞樣品本身具有背景螢光訊號，為了降低偵測干擾，利用光照降低細胞本身背景螢光，計算未照光之背景螢光訊號為 $800.23 \pm 14.88 / \text{pixel}$ ，而照光之背景螢光訊號為 $753.26 \pm 19.12 / \text{pixel}$ 。並觀測 EDC 反應是否能有效地將 miRNA 固定於細胞質中，再透過 Molecular beacon 與細胞中 miRNA 雜合，並使用 640 nm 雷射激發 Cy5 螢光分子進行觀測。由圖 2-13 C 與 D 可以看到肝

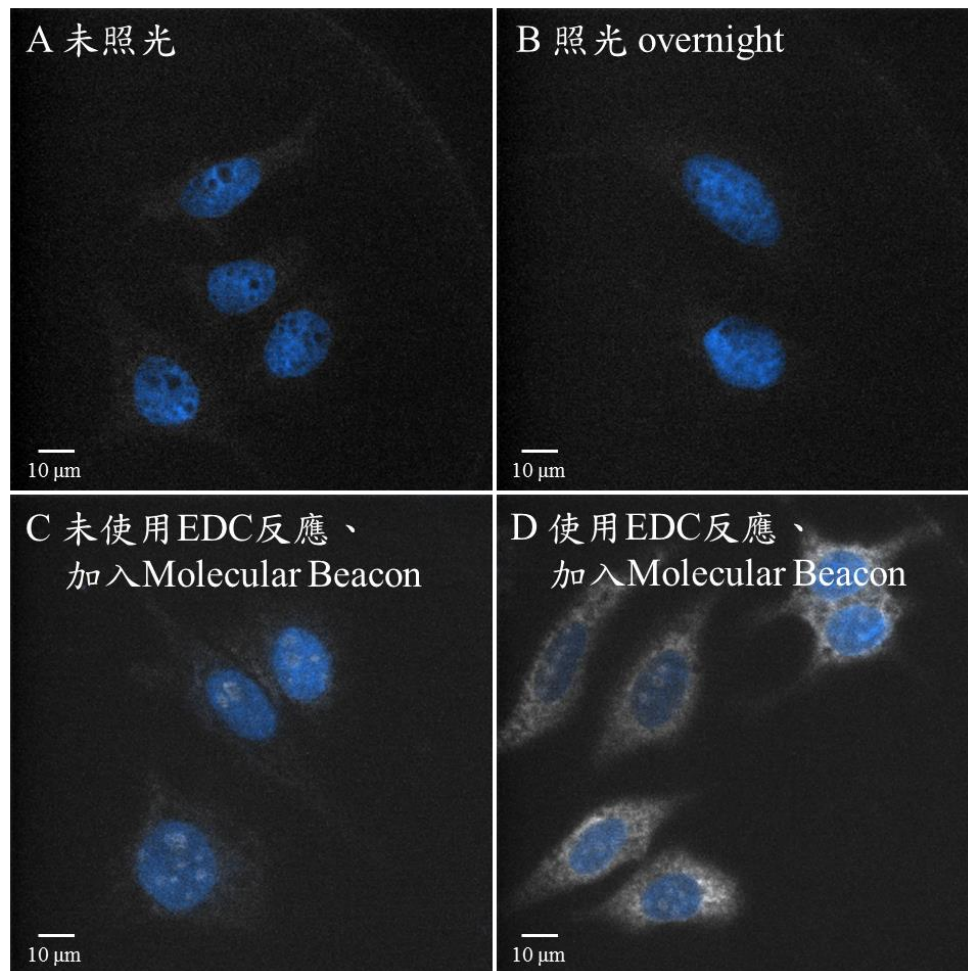


圖 2-13 於 HILO 螢光顯微系統觀測細胞背景螢光訊號及利用 EDC 反應固定 miRNA。(A) 未照光之細胞背景，(B) 照光之細胞背景，(C) 未使用 EDC 固定 miRNA，(D) 使用 EDC 固定 miRNA。藍色為 DAPI 標誌訊號，白色為 Cy5 螢光分子標誌訊號。

癌細胞未使用 EDC 反應加入 Molecular beacon，經過一連串地清洗步驟後，其螢光訊號較低，計算平均螢光訊號為 $733 \pm 18 / \text{pixel}$ ，而使用 EDC 反應加入 Molecular beacon，其螢光訊號較高，計算平均螢光訊號為 $1050 \pm 91 / \text{pixel}$ ，因此證明 EDC 反應能有效地將 miRNA 固定於其原本的位置上，且因為 miRNA 存在於細胞質中，因此螢光訊號會均勻分布於細胞質中。

2.3.4 觀測肝癌細胞中 hsa-miR-10b

本實驗接著針對兩種不同肝癌細胞 Huh7 及 Hep3B 進行觀測，利用光照降低細胞背景，以 EDC 反應將 miRNA 固定於細胞質後，Molecular beacon 透過螢光原位雜合標記細胞中 miRNA，最後經過一連串的清洗步驟將未雜合上的 Molecular beacon 移除。圖 2-14 可以觀察到細胞背景與加入 Molecular beacon 雜合後的差異，且 Huh7 肝癌細胞有較高螢光訊號，Hep3B 肝癌細胞較低螢光訊號，所以表示於 Huh7 肝癌細胞中 hsa-miR-10b 有較高的表現量。將所得影像利用 Image J 軟體計算量化，分別選取 49 顆及 51 顆未加入 Molecular beacon 反應之 Huh7 肝癌細胞及 Hep3B 肝癌細胞，計算單顆細胞的背景平均為 $766.82 \pm 29.21 / \text{pixel}$ 及 $753.26 \pm 19.12 / \text{pixel}$ 。另外選取與 Molecular beacon 雜合反應之 52 顆 Huh7 肝癌細胞及 43 顆 Hep3B 肝癌細胞，計算單顆細胞平均螢光訊號為 $1036.33 \pm 141.65 / \text{pixel}$ 及 838.13 ± 44

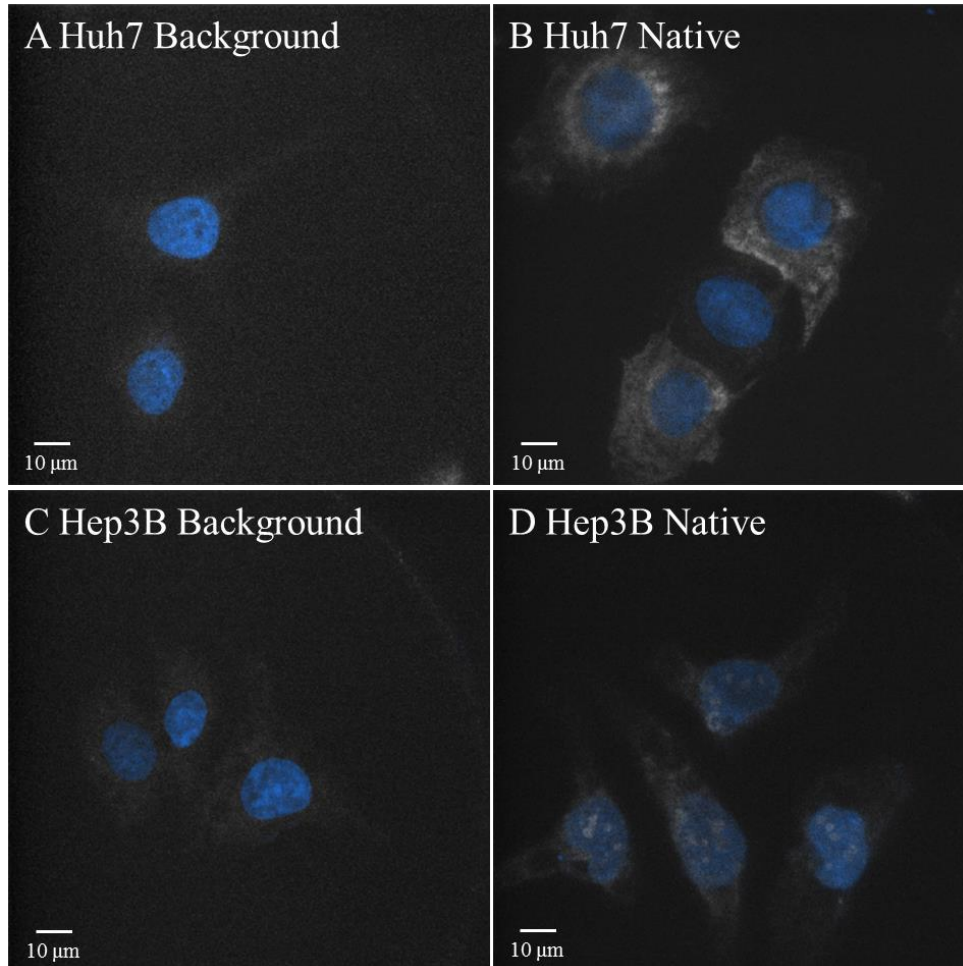


圖 2-14 於 HILO 螢光顯微系統觀測兩種肝癌細胞中 hsa-miR-10b。
(A) Huh7 肝癌細胞之背景，(B) Huh7 肝癌細胞雜合 Molecular beacon，
(C) Hep3B 肝癌細胞之背景，(D) Hep3B 肝癌細胞雜合 Molecular
beacon。藍色為 DAPI 標誌訊號，白色為 Cy5 螢光分子標誌訊號。

/ pixel，將所得結果與反轉錄聚合酶連鎖反應進行比較，結果表現一致，由圖 2-15 所示，證明此方法可以直接觀測細胞中 hsa-miR-10b，且能直接分辨不同肝癌細胞中 hsa-miR-10b 之表現量。

為了確定所設計 Molecular beacon 與實驗設計能透過影像直接分辨肝癌細胞中 hsa-miR-10b 之表現量，分別利用藥物調控 Huh7 及 Hep3B 兩種不同肝癌細胞中 hsa-miR-10b 之表現量，由圖 2-16 所示，可以直接由影像分辨出 Huh7 之肝癌細胞透過藥物處理後的差異，hsa-miR-10b Precursor 細胞之螢光訊號有明顯增加，hsa-miR-10b inhibitor 細胞之螢光訊號有明顯下降，而 Hep 3B 之肝癌細胞透過藥物處理後的差異，由圖 2-17 顯示也有相同的結果。亦將所得影像利用 Image J 軟體計算量化，如圖 2-18 所表示，分別選取 40 顆 Huh7 hsa-miR-10b Precursor、53 顆 Huh7 hsa-miR-10b inhibitor、51 顆 Hep3B hsa-miR-10b Precursor 及 45 顆 Hep3B hsa-miR-10b inhibitor 之肝癌細胞影像，計算單顆細胞 Huh7 hsa-miR-10b Precursor 之肝癌細胞平均螢光訊號為 1304.77 ± 189.78 / pixel，Huh7 hsa-miR-10b inhibitor 之肝癌細胞計算單顆細胞平均螢光訊號為 772.29 ± 17.54 / pixel，而 Hep3B hsa-miR-10b Precursor 之肝癌細胞計算單顆細胞平均螢光訊號為 1365.52 ± 217.78 / pixel，Hep3B hsa-miR-10b inhibitor 之肝癌細胞計算單顆細胞平均螢光訊號為 790.81 ± 25.48 / pixel，且與傳統反轉錄聚合酶連鎖

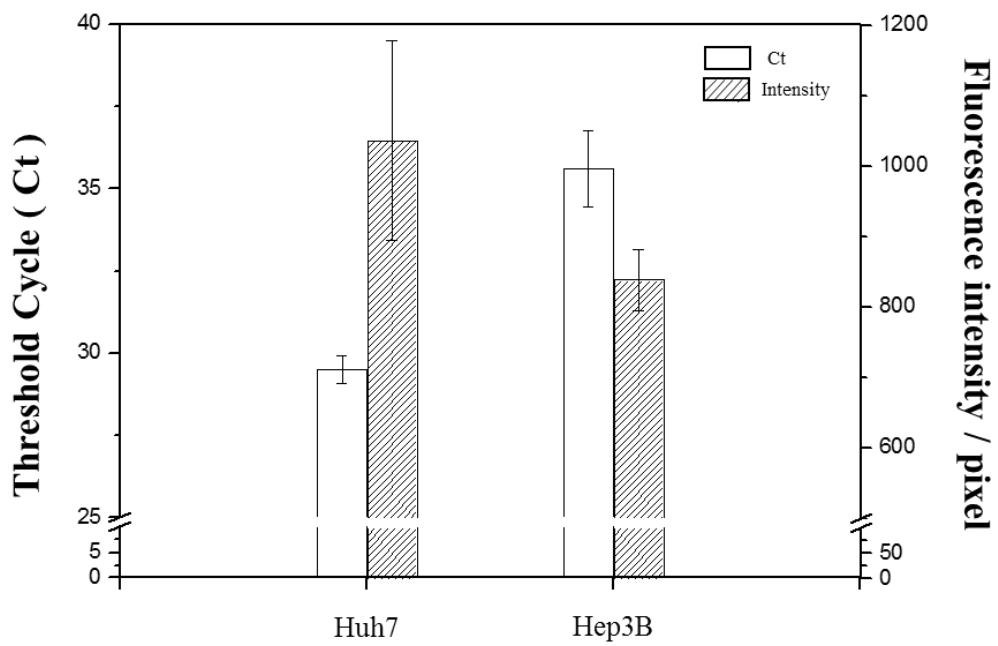
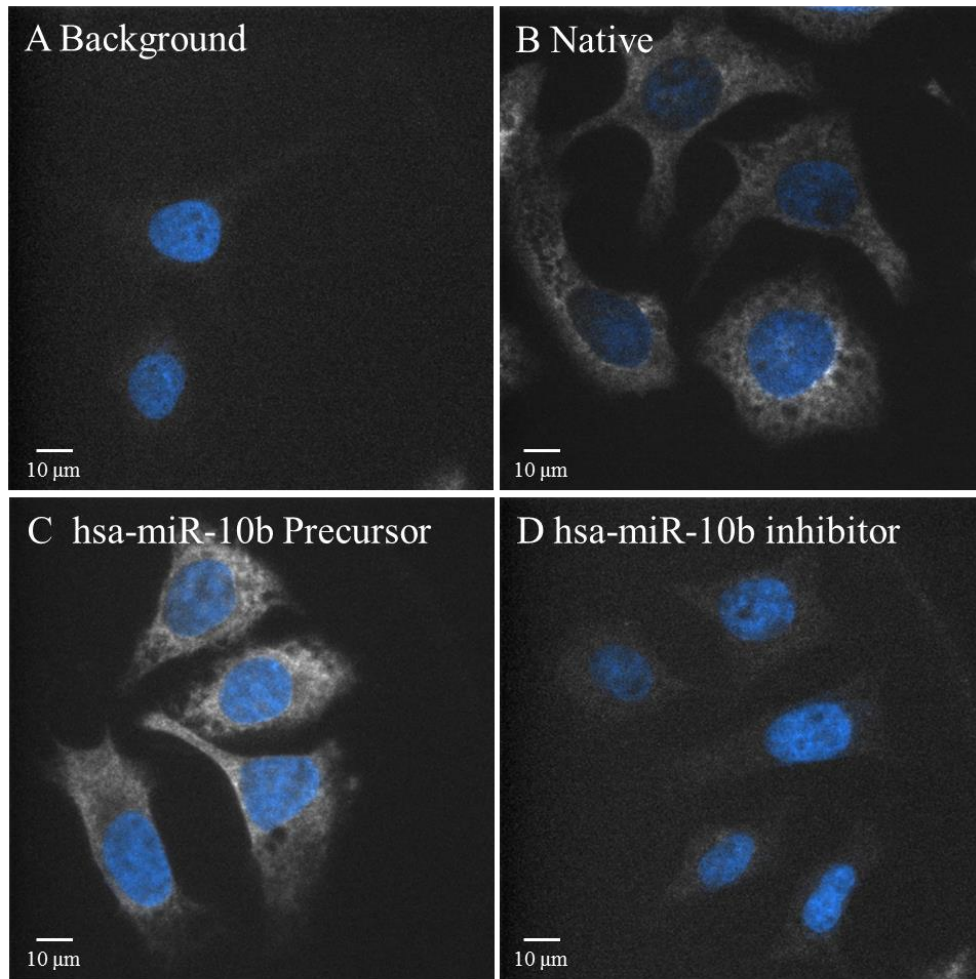


圖 2-15 兩種肝癌細胞中的 hsa-miR-10b 平均螢光強度與 Threshold Cycle 柱狀比較圖。Threshold Cycle 以白色表示，平均螢光強度以斜線表示。



Huh7

圖 2-16 觀測 Huh7 肝癌細胞中 hsa-miR-10b 之表現量。(A) Huh7 肝癌細胞之背景，(B) 無藥物調控之 Huh7 肝癌細胞，(C) Huh7 增顯 hsa-miR-10b，(D) Huh7 抑制 hsa-miR-10b。藍色為 DAPI 標誌訊號，白色為 Cy5 螢光分子標誌訊號。

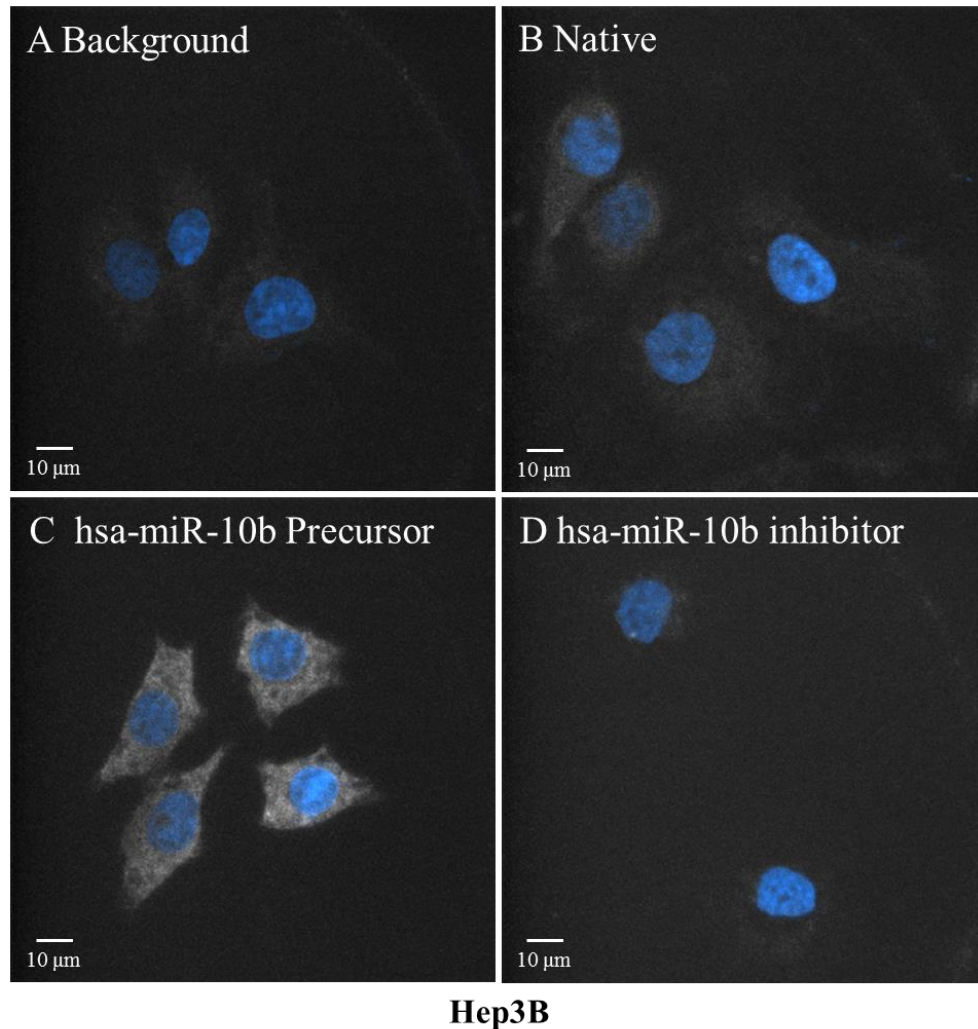


圖 2-17 觀測 Hep3B 肝癌細胞中 hsa-miR-10b 之表現量。(A) Hep3B 肝癌細胞之背景，(B) 無藥物調控之 Hep3B 肝癌細胞，(C) Hep3B 增顯 hsa-miR-10b，(D) Hep3B 抑制 hsa-miR-10b。藍色為 DAPI 標誌訊號，白色為 Cy5 螢光分子標誌訊號。

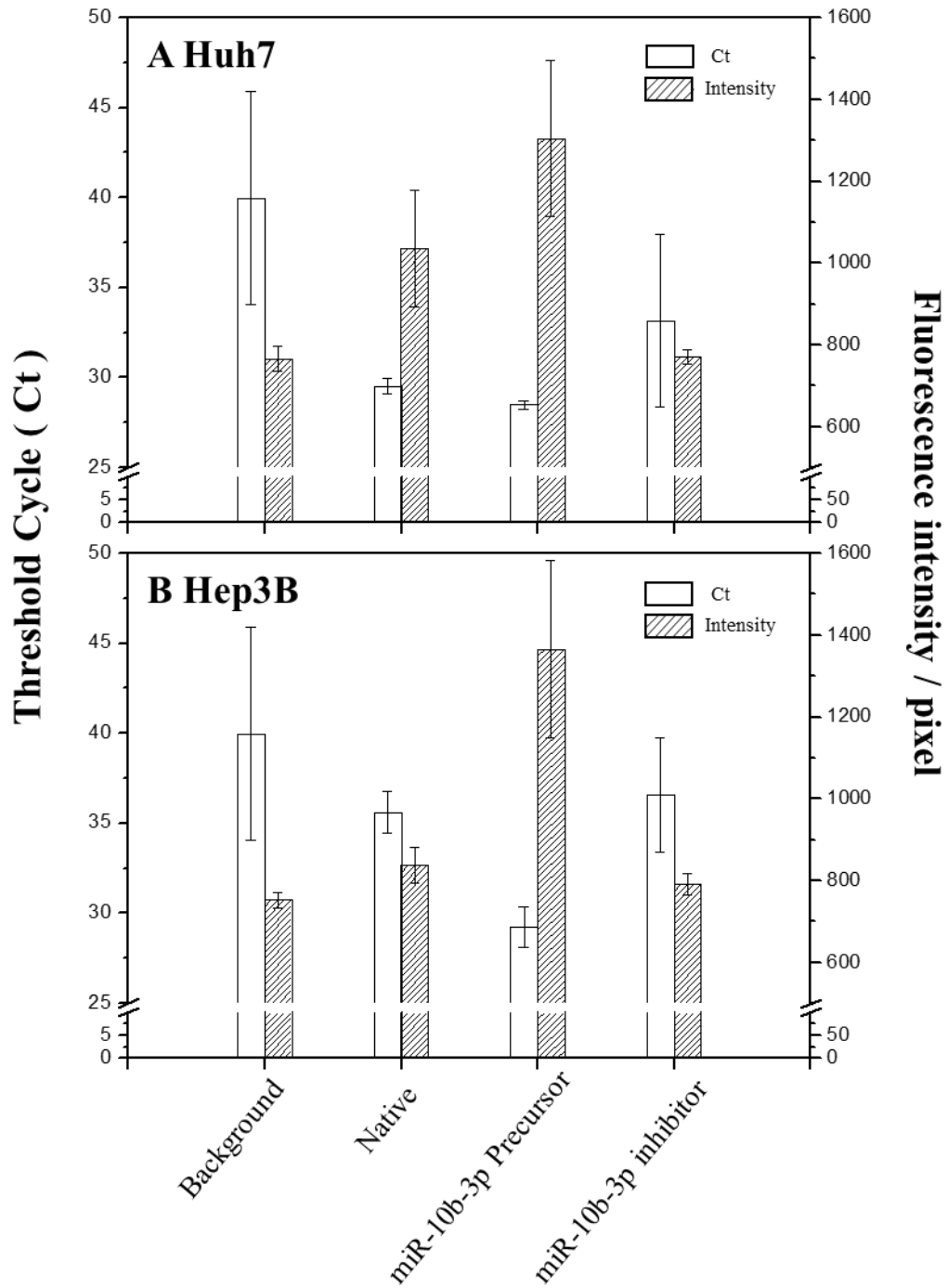


圖 2-18 透過藥物調控之肝癌細胞中 hsa-miR-10b 平均螢光強度與 Threshold Cycle 柱狀比較圖。(A)為 Huh7 肝癌細胞，(B)為 Hep3B 肝癌細胞。Threshold Cycle 以白色表示，平均螢光強度以斜線表示。

反應進行比較，結果相當一致，且克服了在低濃度下無法區分表現量的問題。更加確定本實驗所使用之系統及設計方法，能經由 Molecular beacon 以原位雜合方式與 hsa-miR-10b 鍵結後，能直接透過 HILO 螢光顯微系統得到影像後進行判別肝癌細胞中 hsa-miR-10b 之表現量，無須透過序列複製放大的過程。

2.3.5 透過雙波長觀測相對定量 hsa-miR-10b

本實驗為了確定所設計 Molecular beacon 的專一性，只會與目標序列 hsa-miR-10b 作雜合，且透過藥物調控的對照組也是針對 hsa-miR-10b 不會影響細胞中其他序列，然而於不同癌症細胞中所含的 U6 snRNA 表現量不會因為細胞不同而改變，所以本實驗也針對 U6 snRNA 設計可以標記此序列的 Molecular beacon，於 5'端修飾上 6-FAM 螢光分子於 3'端修飾上 BHQ-1 消光分子。將兩種分別標記 hsa-miR-10b 及 U6 snRNA 之 Molecular beacon 同時作原位雜合反應，再透過 647 nm 及 488 nm 激發兩種不同的 Molecular beacon，由 HILO 螢光顯微系統得到影像後進行比較，由圖 2-19 所示於 Huh7 之肝癌細胞中之 U6 snRNA 不會隨著藥物調控而改變，且觀測 hsa-miR-10b 之結果與上述單獨針對 hsa-miR-10b 進行雜合的結果相同，而由圖 2-20 可以觀察到 Hep3B 之肝癌細胞也具有相同結果。

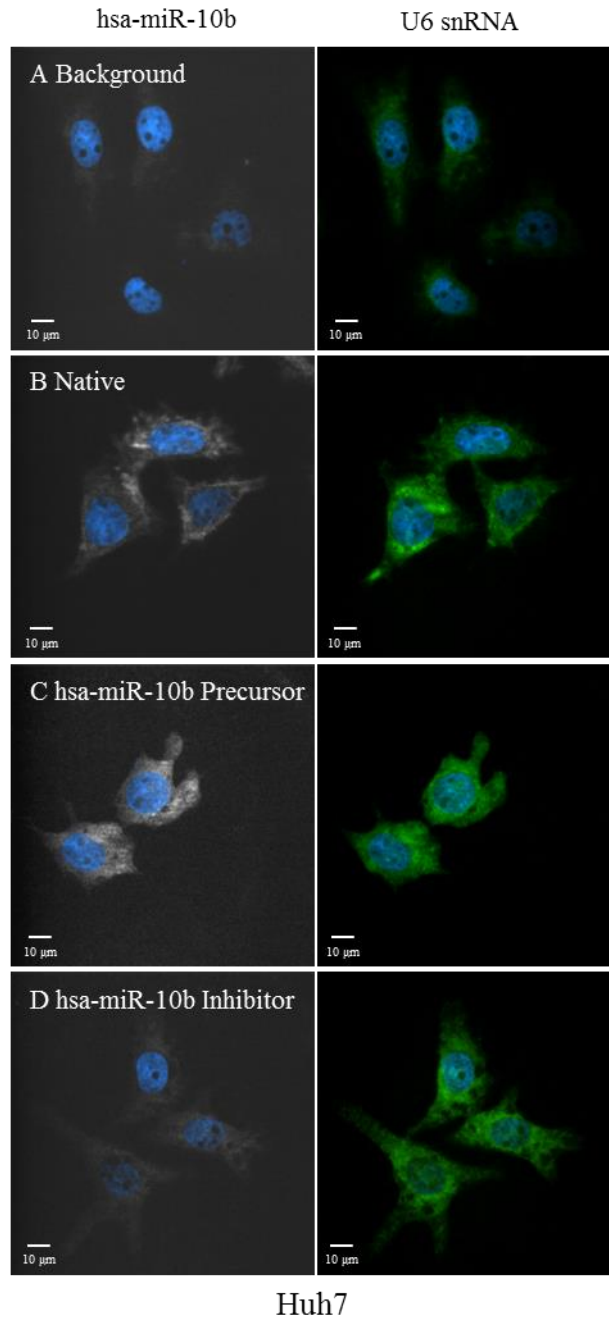


圖 2-19 同時觀測 Huh7 肝癌細胞中 hsa-miR-10b 及 U6 snRNA。(A) Huh7 肝癌細胞之背景，(B) 無藥物調控之 Huh7 肝癌細胞，(C) Huh7 增顯 hsa-miR-10b，(D) Huh7 抑制 hsa-miR-10b。藍色為 DAPI 標誌訊號，白色為 Cy5 螢光分子標誌訊號，綠色為 6-FAM 螢光分子標誌訊號。

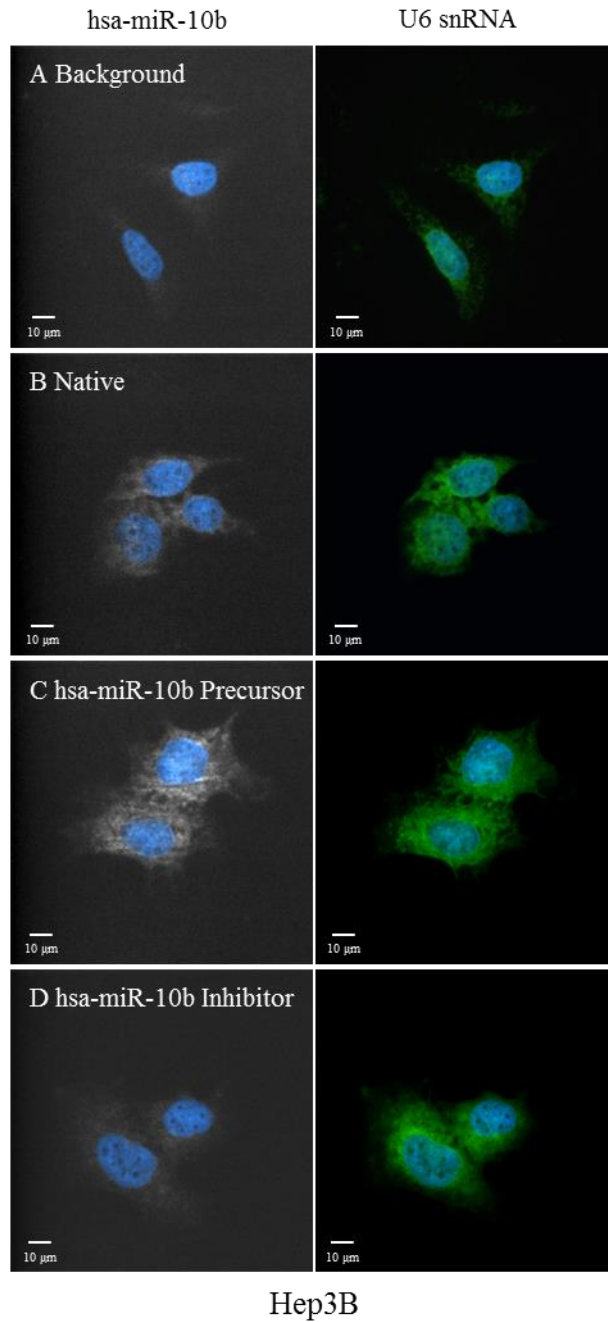


圖 2-20 同時觀測 Hep3B 肝癌細胞中 hsa-miR-10b 及 U6 snRNA。(A) Hep3B 肝癌細胞之背景，(B) 無藥物調控之 Hep3B 肝癌細胞，(C) Hep3B 增顯 hsa-miR-10b，(D) Hep3B 抑制 hsa-miR-10b。藍色為 DAPI 標誌訊號，白色為 Cy5 螢光分子標誌訊號，綠色為 6-FAM 螢光分子標誌訊號。

最後個別針對 60 個細胞影像進行量化，如圖 2-21 所示，Huh7 於 647 nm 及 488 nm 下的背景訊號分別為 $652.73 \pm 23.64 / \text{pixel}$ 與 $908.71 \pm 62.85 / \text{pixel}$ ，而 Hep3B 的背景訊號分別為 $646.61 \pm 21.00 / \text{pixel}$ 與 $919.69 \pm 57.81 / \text{pixel}$ ，於 488 nm 激發波長下所造成的散射光較強，所以導致背景較高。hsa-miR-10b 之螢光訊號計算，Huh7 Native 之肝癌細胞平均螢光訊號為 $998.03 \pm 94.19 / \text{pixel}$ ，Huh7 hsa-miR-10b Precursor 之肝癌細胞平均螢光訊號為 $1291.79 \pm 250.71 / \text{pixel}$ ，Huh7 hsa-miR-10b inhibitor 之肝癌細胞平均螢光訊號為 $738.38 \pm 21.96 / \text{pixel}$ ，另外 Hep3B Native 之肝癌細胞平均螢光訊號為 $803.40 \pm 75.69 / \text{pixel}$ ，Hep3B hsa-miR-10b Precursor 之肝癌細胞平均螢光訊號為 $1207.79 \pm 213.07 / \text{pixel}$ ，Hep3B hsa-miR-10b inhibitor 之肝癌細胞平均螢光訊號為 $722.23 \pm 34.85 / \text{pixel}$ ，數據顯示，不會因為同時加入不同的 Molecular beacon 導致實驗結果不同。U6 snRNA 於不同癌症細胞中的表現量大致相同，且不會受到藥物調控影響，平均螢光訊號計算得結果都落於 $1570 \pm 250 / \text{pixel}$ 左右，將 U6 snRNA 所得螢光訊號最為依據，能相對定量出 hsa-miR-10b 於細胞中的表現量。實驗與計算結果直接顯示此方法具有相當優異的專一性，可透過設計不同的 Molecular beacon 與不同激發波長之光源直接觀測具有興趣的序列，且不用透過序列複製放大的過程，即可區分於細胞中的表現量。

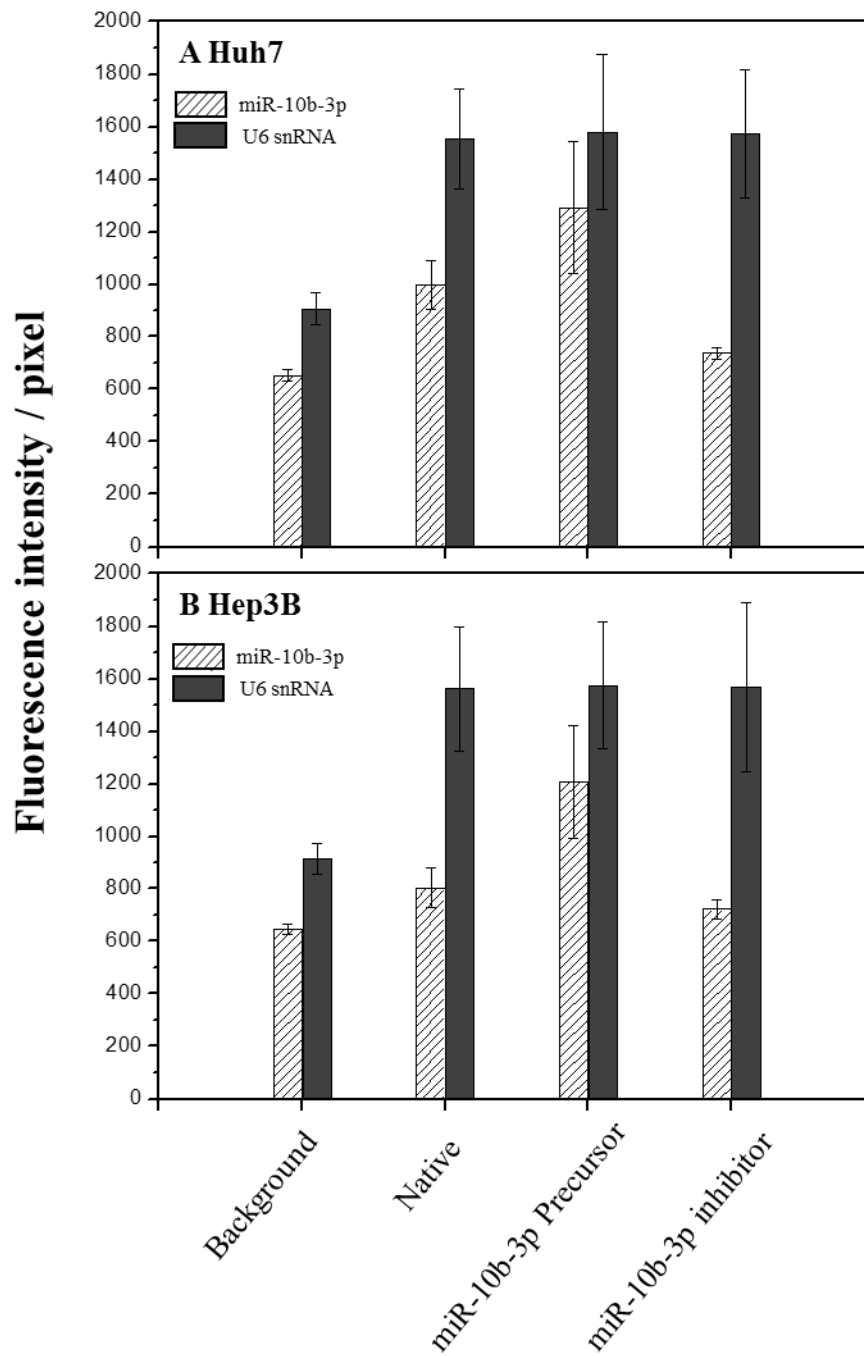


圖 2-21 透過藥物調控之肝癌細胞中 hsa-miR-10b 及 U6 snRNA 之平均螢光強度柱狀比較圖。hsa-miR-10b 以斜線表示，U6 snRNA 以黑色表示。

2.4 結論

本實驗利用 HILO 螢光顯微系統於具有厚度的細胞樣品中觀測螢光單分子訊號，提高觀測螢光訊號的靈敏度，克服 TIRF 螢光顯微系統僅能觀測表面單分子螢光訊號的問題。透過 LED 燈泡照射細胞樣品，有效降低細胞自體螢光的背景干擾，亦利用 EDC 反應將 miRNA 有效的固定於細胞直上，使透過螢光訊號觀測 miRNA 的表現量更為精準。本實驗利用 Molecular beacon 與細胞中的 miRNA 進行螢光原位雜合，於 HILO 螢光顯微系統進行觀察，比較不同肝癌細胞中的 hsa-miR-10b 表現量，成功利用所得螢光訊號強度直接區分 miRNA hsa-miR-10b 之表現量，結果與反轉錄即時定量聚合酶連鎖反應相當一致，甚至直接克服 RT-qPCR 於低濃度下，再現性不佳導致判斷不準確的缺點。也針對不同藥物調控的肝癌細胞進行實驗，以及透過兩段不同的 Molecular beacon，同時標記 U6 snRNA 與 hsa-miR-10b 進行比較，所得結果直接證明此方法的專一性，且可以利用多光源同時針測不同的目標序列，相對定量出 hsa-miR-10b 於細胞中的表現量。此實驗方法不須透過任何萃取步驟，亦不須透過序列複製放大，即可直接利用 HILO 螢光顯微系統觀測 miRNA 的表現量，是一個具有高靈敏度及專一性之方法。此系統具有分析癌症細胞樣品的能力，期望未來能應用於臨床研究及癌症分期診斷上。

2.5 參考文獻

1. Hurley J, Roberts D, Bond A, Keys D, Chen C: **Stem-loop RT-qPCR for microRNA expression profiling.** *Methods Mol Biol* 2012, **822**:33-52.
2. Ambrose WP, Goodwin PM, Nolan JP: **Single-molecule detection with total internal reflection excitation: comparing signal-to-background and total signals in different geometries.** *Cytometry* 1999, **36**(3):224-231.
3. Chan HM, Chan LS, Wong RN, Li HW: **Direct quantification of single-molecules of microRNA by total internal reflection fluorescence microscopy.** *Anal Chem* 2010, **82**(16):6911-6918.
4. Ho SL, Chan HM, Ha AW, Wong RN, Li HW: **Direct quantification of circulating miRNAs in different stages of nasopharyngeal cancerous serum samples in single molecule level with total internal reflection fluorescence microscopy.** *Anal Chem* 2014, **86**(19):9880-9886.
5. Tokunaga M, Imamoto N, Sakata-Sogawa K: **Highly inclined thin illumination enables clear single-molecule imaging in cells.** *Nat Methods* 2008, **5**(2):159-161.
6. Yuen MF, Hou JL, Chutaputti A, Asia Pacific Working Party on Prevention of Hepatocellular C: **Hepatocellular carcinoma in the Asia pacific region.** *J Gastroenterol Hepatol* 2009, **24**(3):346-353.
7. Xu J, Wu C, Che X, Wang L, Yu D, Zhang T, Huang L, Li H, Tan W, Wang C *et al*: **Circulating microRNAs, miR-21, miR-122, and miR-223, in patients with hepatocellular carcinoma or chronic hepatitis.** *Mol Carcinog* 2011, **50**(2):136-142.
8. Karakatsanis A, Papaconstantinou I, Gazouli M, Lyberopoulou A, Polymeneas G, Voros D: **Expression of microRNAs, miR-21, miR-31, miR-122, miR-145, miR-146a, miR-200c, miR-221, miR-222, and miR-223 in patients with hepatocellular carcinoma or intrahepatic cholangiocarcinoma and its prognostic significance.** *Mol Carcinog* 2013, **52**(4):297-303.
9. Saito Y, Suzuki H, Matsuura M, Sato A, Kasai Y, Yamada K, Saito H, Hibi T: **MicroRNAs in Hepatobiliary and Pancreatic Cancers.** *Front Genet* 2011, **2**:66.
10. Rong M, Chen G, Dang Y: **Increased miR-221 expression in hepatocellular carcinoma tissues and its role in enhancing cell**

- growth and inhibiting apoptosis in vitro.** *BMC Cancer* 2013, **13**:21.
11. Liao CG, Kong LM, Zhou P, Yang XL, Huang JG, Zhang HL, Lu N: **miR-10b is overexpressed in hepatocellular carcinoma and promotes cell proliferation, migration and invasion through RhoC, uPAR and MMPs.** *J Transl Med* 2014, **12**:234.
 12. Shih YC, Liao CR, Chung IC, Chang YS, Chang PL: **Simultaneous separation of five major ribonucleic acids by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence in the presence of electroosmotic flow: application to the rapid screening of 5S rRNA from ovarian cancer cells.** *Anal Chim Acta* 2014, **847**:73-79.
 13. Pena JT, Sohn-Lee C, Rouhanifard SH, Ludwig J, Hafner M, Mihailovic A, Lim C, Holoch D, Berninger P, Zavolan M *et al*: **miRNA in situ hybridization in formaldehyde and EDC-fixed tissues.** *Nat Methods* 2009, **6**(2):139-141.

第三章 以毛細管電泳暨雷射誘發螢光分離染色體

3.1 緒論

3.1.1 毛細管電泳

電泳(electrophoresis)的技術發展至今已有一百多年歷史，最先於1909年由Michaelis提出^[1]，於具有電荷粒子的溶液中施加電場作用，使得溶液中的帶電粒子產生遷移，此為庫倫靜電力所造成的結果，可稱為電泳。透過電泳原理，可以使不同荷質比(z/m)的帶電粒子產生不同遷移速度進而達到分離效果，於1937年，Tiselius成功利用電泳技術分離血清蛋白中的 α 、 β 、 γ 三大球蛋白及白蛋白^[2]，開啟了電泳技術的發展，而Tiselius也因此於1948年獲得諾貝爾化學獎之殊榮。

過去生化分析使用之電泳方法是以平板式的電泳為主^[3-5]，將樣品添加至電泳槽上，再透過通電進行分離，分離結束後將整片凝膠進行染色進行樣品觀察。但平板電泳的缺點包含製備耗時，且再現性不佳，而通電過程中會產生嚴重的焦耳熱，造成解析度不佳^[6]，以至於在進行平板電泳時，只能夠以低電壓的方式來進行分離，且平板電泳需要大量的樣品，使得較無使用於微量樣品的分析。因為上述缺點，所以後續的發展皆針對這些缺點加以改進，於1981年，Jorgenson和Lukacs成功利用內徑75 μm 的毛細管柱來分離胺基酸之衍生物^[7, 8]，因

為內徑變得更小，使得散熱效果變得更好，因此可以使用較高電場來進行分離，且分離時間大幅減少許多，這為毛細管區帶電泳法（capillary zone electrophoresis, CZE）奠定基礎^[9]。

隨著科技的進步，毛細管電泳技術也逐漸成熟，以前所面臨的問題也逐漸地被克服，甚至到現在毛細管電泳被發展具有多樣性之設計以及自動化的優點^[10,11]，而近年來毛細管電泳技術大致可分為六大類：除了細管區帶電泳法，還有分離中性不帶電粒子的微胞電動力層析法（micellar electrokinetic chromatography, MEKC）^[12]，及毛細管等電聚焦法（capillary isoelectric focusing, CIEF）^[13]、毛細管凝膠電泳法（capillary gel electrophoresis, CGE）^[14]、毛細管電層析（capillary electrochromatography, CEC）^[15]與毛細管等速電泳法（capillary isotachopheresis, CITP）^[16]，對於現今分析眾多生物資訊上有相當大的幫助，且毛細管電泳已成為分離生化樣品之重要工具，不論在胺基酸（amino acid）^[17,18]、DNA^[19]、RNA^[20]及蛋白質（protein）^[21]等生物分子，皆能使用毛細管電泳技術得到良好的分離效果。

3.1.1.1 毛細管電泳基本原理

毛細管電泳基本原理是依據樣品在電場中所呈現不同的淌度來達到分離效果。電泳淌度（mobility），可簡單定義為單位電場下帶電粒子遷移的速度，在毛細管電泳中，不同的帶電粒子受到施加電場影

響，產生不同的遷移速率，因此使得不同離子能在毛細管中被分離。

帶電粒子在一個電場下會以一個速率 (v_{ep}) 前進，而此速率會與電場

(E) 的強度成正比形式，其關係式為：

$$v_{ep} = \mu_{ep} E \quad (1-1)$$

此 μ_{ep} 及為電泳淌度 (mobility)，當施加一個外加電場時，帶電粒子因

受庫倫作用力 (F) 影響，而加速移動，且此庫倫作用力會與有效電

荷 (q) 及電場強度 (E) 成正比之形式，其關係式為：

$$F = q E \quad (1-2)$$

帶電粒子在運動的過程中，會與其他介質之摩擦，而造成移動速度下

降，但帶電粒子受到電場加速到某個程度的同時，庫倫作用力會與摩

擦力達到一個平衡值，此時帶電粒子，將不會再繼續加速，而形成等

速運動。在 Stokes 定律中，帶電粒子假設為剛性球體，受到摩擦力時，

其關係式為：

$$f = f v = 6 \pi \eta r v_{ep} \quad (1-3)$$

此 f 為剛性球體的動摩擦係數， η 為緩衝溶液之黏度，而最後 r 為剛

性球體半徑。若當帶電粒子因庫倫作用力與摩擦力相等時，此時帶電

粒子會進行等速運動，其關係式為：

$$F = q E = 6 \pi \eta r v_{ep} \quad (1-4)$$

上述公式可寫成：

$$v_{ep} = qE / 6 \pi \eta r \quad (1-5)$$

若將方程式 (1-5) 帶入方程式 (1-1) 將得到：

$$\mu_{ep} = v_{ep} / E = q / 6 \pi \eta r \quad (1-6)$$

由 1-6 公式亦可得知帶電粒子之電荷與淌度成正比關係，而淌度與帶電粒子的大小成反比，其帶電粒子的大小及電荷都將影響其電泳淌度之大小。

除了物質本身的遷移速率外，還有一個控制毛細管內液體流動的重要參數是電滲流 (electroosmotic flow, EOF)。其原理是在電解質溶液 pH 值大於 3 的情況下，毛細管內壁表面的矽醇基 (SiOH) 會解離成矽醇陰離子 (SiO⁻)，使毛細管內壁帶負電，此時溶液中若有陽離子通過毛細管，就會受到 SiO⁻ 吸引，便會在毛細管內壁上形成電雙層 (electrical double layer)，如圖 3-1 所示。當施加一高電場，在電雙層中的陽離子被吸引至負極，此作用力會帶動溶液中的整體溶液 (bulk solution) 一起往負極移動而產生電滲流，而從電荷在毛細管中擴散層與固定層分布之不平均情形，將使得體相溶液與電雙層之間有一電位差產生，而此電位差稱之為 ζ 電位 (zeta potential) [22]。其方程式為：

$$\zeta = 4 \pi \delta e / \varepsilon \quad (1-7)$$

此 ε 為緩衝溶液的介電常數， δ 為電雙層的厚度， e 為單位面積之總電荷。 ζ 電位與電滲流關係式表示為：

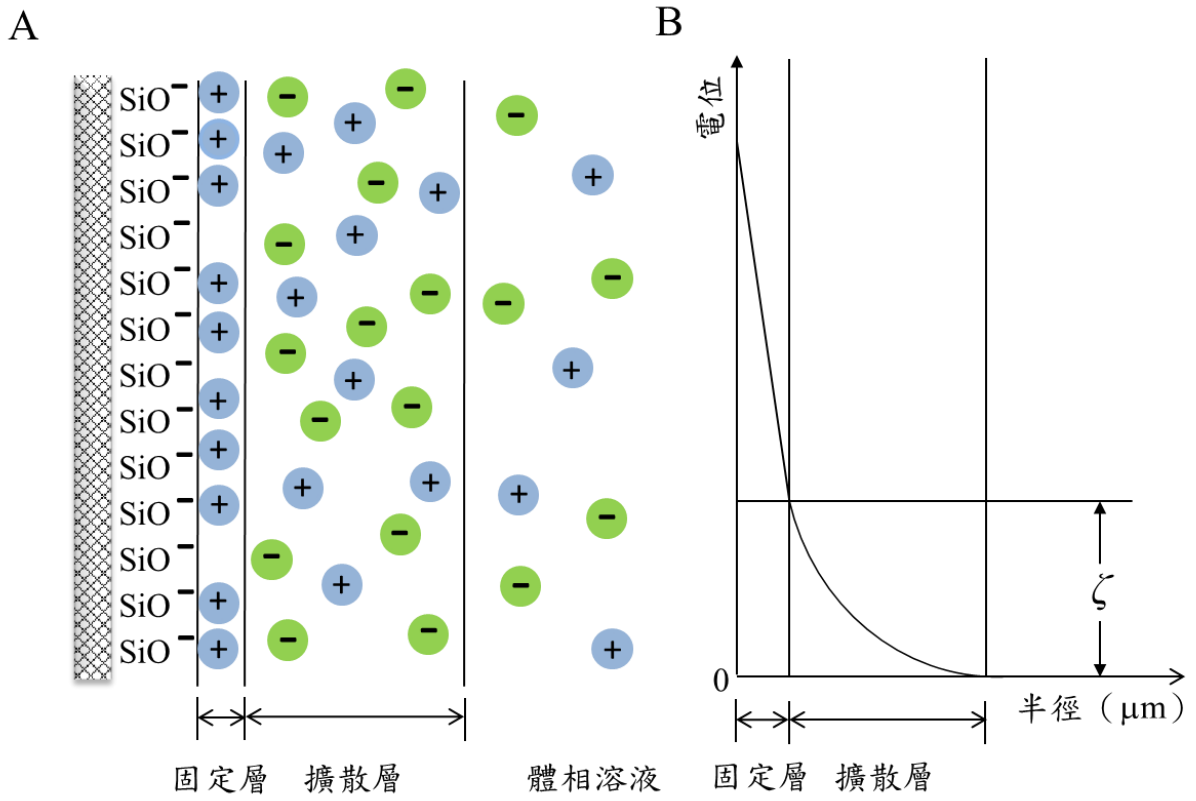


圖 3-1 (A)為電雙層結構；(B)為 ζ 電位

$$\mu_{eo} = \varepsilon \zeta / \eta \quad (1-8)$$

而淌度 μ_{eo} 表示電滲流之遷移速率大小，它正比於溶液的介電常數 (ε) 與 ζ 電位， η 為緩衝溶液之黏度，而電滲流遷移速率與緩衝溶液之黏度成反比形式。在毛細管內壁矽醇基解離程度會與 ζ 電位的大小有關，因此假設毛細管內層表面矽醇基解離越多，就會與更多正離子吸引，所形成的電雙層厚度也越厚， ζ 電位也隨之變大，使得電滲流遷移速率增快。電滲流的大小並非在任何 pH 值下為同一個定值，緩衝溶液之 pH 值大於 3.0 時，電滲流值會明顯增加，之後電滲流隨著 pH 值的增大會逐漸變大，直到 pH 值大於 8.0 時，電滲流才會趨近一個定值。而除了 pH 值影響外，電滲流速率主要與毛細管壁表面電荷及緩衝溶液有著密切的關係，包括緩衝溶液之離子強度及添加物之種類等皆會影響電滲流大小。由於電滲流是由擴散層中離子受電場的影響程度，而產生遷移現象，所以不需要在毛細管壁施加任何壓力，以至於理論上毛細管內壁的每一個位置流速幾乎相同，這也使得毛細管內壁溶液以切面觀察趨近於一平面，如圖 3-2 所示。若其他管柱層析法，驅動力是以壓力之方式，這使得管柱中液體會與毛細管壁產生摩擦力和剪切力，此時產生層流 (laminar flow)，若將管柱以橫切面觀察，會發現溶液以拋物線的形式前進。層流在管柱中會使樣品前進時區帶變寬，造成解析度下降。而使用具有電滲流之毛細管，因為切面幾乎

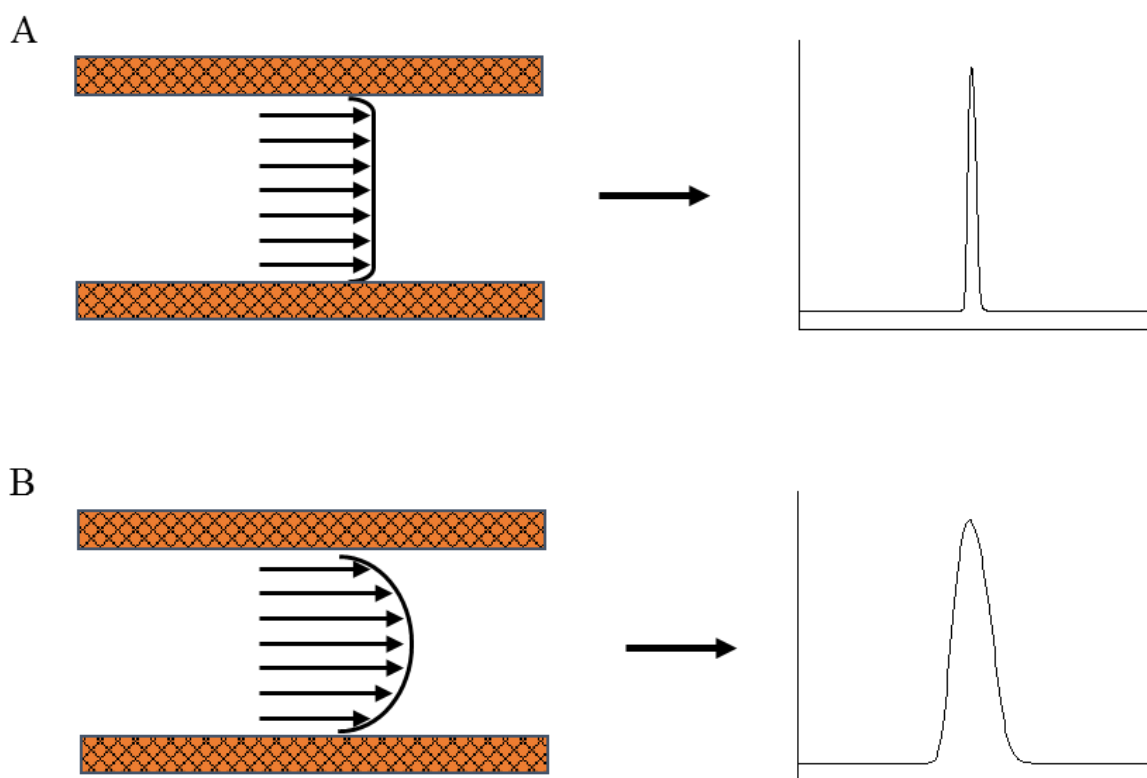


圖 3-2 (A)為電滲流，(B)為層流。

成一直線，使得樣品區帶不會因此變寬，故解析度會比層流的方式來得好，理論平板數也能提昇到數百萬以上。

3.1.1.2 毛細管電泳進樣及偵測方法

進樣的方法分為三種：虹吸進樣（siphoning）、電動進樣（electrokinetically）及壓力進樣（hydrostatically），此三種方法皆用於不同的實驗需求。虹吸進樣是將待測樣品放至一定高度，利用前端與末端的重力差，將樣品導入毛細管前端，再進行分離，此方式優點在於簡便以及不受樣品內離子所干擾而影響進樣的總量程度；電動進樣是利用電驅動的方式將樣品送入毛細管，首先須將末端毛細管放入裝有緩衝溶液的溶液中，且溶液中也需放有電極，而樣品端是先將另一個電極插入此樣品容器中，再放入另一端的電極，並施予電場，此時可使樣品引入毛細管中，再進行分離，此方法優點為注入樣品體積會相對較多，注射體積約為5至50 nL，若要偵測更微量之樣品會是一個不錯的方法；壓力進樣是在樣品的進樣端施予壓力以此壓力樣品導入毛細管內，或是在毛細管的出口端裝置真空幫補（pump），以此方法將樣品從入口端吸入毛細管，此方法雖能成功將樣品導入毛細管內，且也能使用在具有高離子強度的樣品，但需要額外的儀器，所以需依儀器設備而調整。

偵測系統分為許多種類，如螢光（fluorescence）放射法、^[23]質譜

儀 (mass spectroscopy, MS) [24] 以及紫外光-可見光吸收 (ultraviolet-visible absorption) [25]。而螢光放射法分為雷射誘發螢光 (laser-induced fluorescence, LIF) 及傳統光源之激發螢光，就靈敏度的高低來看，雷射誘發螢光之方法具有很高的偵測靈敏度，因雷射本身光束能很容易聚焦到微米 (micrometer) 級大小的直徑，使得單位面積的功率密度提升，大幅減低偵測訊號譜帶變寬的問題，已有文獻指出利用雷射誘發螢光之技術能偵測到 50 yoctomoles ($1 \text{ yoctomole} = 1 \times 10^{-24} \text{ M}$) [26]，並且此系統也能應用到偵測單細胞或單分子上，而選擇雷射會依據所需之激發波長，包含氬離子雷射 (argon ion laser)、氦氖雷射 (He-Ne laser) 及固態雷射 (solid-state laser) 等，這些雷射通常被拿來當作毛細管電泳中的激發光源。近年也用利用發光二極體來當作激發光源，大幅降低實驗的成本 [27]。透過特定波長的光源激發，使得接有螢光分子的樣品會被此激發波長激發而放出螢光訊號，但大部分的待測分析物不具有螢光結構，因此為了使分析物能夠被順利偵測，可以在進行毛細管電泳時，加入嵌合螢光染料，透過嵌入待測樣品之方式進行偵測，或是使用共價鍵結衍生化方式與高親和力之方法來對特定的分析物進行標記。

3.1.1.3 毛細管電泳之生物分析應用

毛細管電泳技術至今發展的相當成熟，近年常被使用於分析DNA或複雜生物樣品，而在分析生物樣品時，可調整實驗參數包含：電場強度、溫度、毛細管內壁修飾、凝膠介質、進樣方式以及偵測系統等，例如毛細管壁的解離，會使得在分析蛋白質或DNA樣品時，常會有吸附的現象發生，因此若進行此方面之實驗時，可以先將毛細管內壁塗覆一層聚合物，來降低吸附現象^[28]。

毛細管電泳技術已有許多不同的分析方式，此方法具有高靈敏、高解析度、分離時間短、樣品需求量少、高通量以及能自動化等優點，以至於毛細管電泳在現今許多領域中，扮演著不可或缺的角色，而它所能分析的範圍相當廣泛，如生物化學及分析化學等，已被使用於分析基因突變^[29]、DNA定序^[30]、偵測定量聚合酶連鎖反應（polymerase chain reaction, PCR）之產物^[31]及短序列重複（short tandem repeats, STRs）分析^[32, 33]，另外也可應用於分析植物及病毒DNA基因突變^[34]、粒線體DNA定序和Y染色體^[35]、細胞種群^[36]。而在生物體之DNA序列中，經常發現不同的DNA序列只差在單個鹼基不同，稱此為單核苷酸之多型性（single nucleotide polymorphisms, SNPs），SNPs有可會與疾病的表現有密切關連性，也可以透過毛細管電泳進行分析^[37, 38]。

3.1.2 染色體

二十世紀初對於遺傳的認知仍停留在生物遺傳的特性是由某些分離的因子所控制且可在有機體傳遞到下一代，漸漸的遺傳學家發現此遺傳基因存在於染色體中，它是由DNA所組成的大分子而能使生物表現出非常特殊的性質及生理機能。基因（Gene）為一特殊片斷DNA，其用來作為保存及傳達遺傳訊息之單位，其主要作用為製造具有特殊生物功能的蛋白質與RNA產物，含有組成裝配細胞結構之藍圖，以主導細胞活動之運作。

1903年，Walter Sutton在其發表的論文直接指出染色體即為數十年前Mendel所發現的遺傳因子之物質攜帶者。遺傳學的進展是緩慢的，當生物學家以顯微鏡觀察生物的受孕、細胞分裂及減數分裂的過程，研究學者才開始明白有機體的生物特性是源自於染色體所含基因之調控及表現，有機體在日常活動當中，其組成細胞為持續性及具有一定分化功能，且其從這一代到下一代^[39]。Sutton提出遺傳學之染色體理論主張Mendel之遺傳因子即是存在於各細胞核內之染色體上面，其對於遺傳學之研究進展和突破為一巨大之里程碑。於1934年，Morgan以果蠅為對象證實生物特徵可連結到染色體上之一特定基因位，也開起日後科學家探討基因之化學特性。

3.1.2.1 細胞週期 (Cell cycle)

隨著細胞分裂步驟的進行，染色體會進一步的產生折疊縮合，使染色體能更精準及正確地分離和複製，可從細胞週期的流程得知染色體縮合程度與細胞分裂週期息息相關。細胞週期^[40]意指一個細胞經由增殖及細胞分裂後產生兩個子細胞，所經歷的整體過程，如圖3-3所示，在此週期，細胞會產生複製的步驟，將遺傳物質複製並且平分至兩個子細胞中。其中細胞週期主要區分為分裂間期 (Interphase) 和分裂期 (M phase)，於分裂間期之細胞主要完成DNA及相關蛋白複製，再於分裂期進行後續細胞分裂之步驟。於下文簡述細胞週期各期間之特性：

(一) 分裂間期 (Interphase)

分裂間期區分為 DNA 合成前期 (G_1 , gap 1)、DNA 合成期 (S, synthesis) 和 DNA 合成後期 (G_2 , gap 2)。 G_1 期：細胞開始進行相關蛋白合成，複製胞器並增加細胞質體積，若細胞不繼續進行分裂則將會停留至此階段。S 期：為 DNA 合成期，DNA 經由半保留複製 (Semiconservative replication)，並一同複製中心粒，此步驟為細胞週期關鍵時期。 G_2 期：此時期胞器停止成長，並準備進入分裂期。通常間期為細胞週期中最久之階段，大約佔細胞分裂 90% 的時間，所以大多數真核細胞都處於在間期，並準備進行後續步驟。

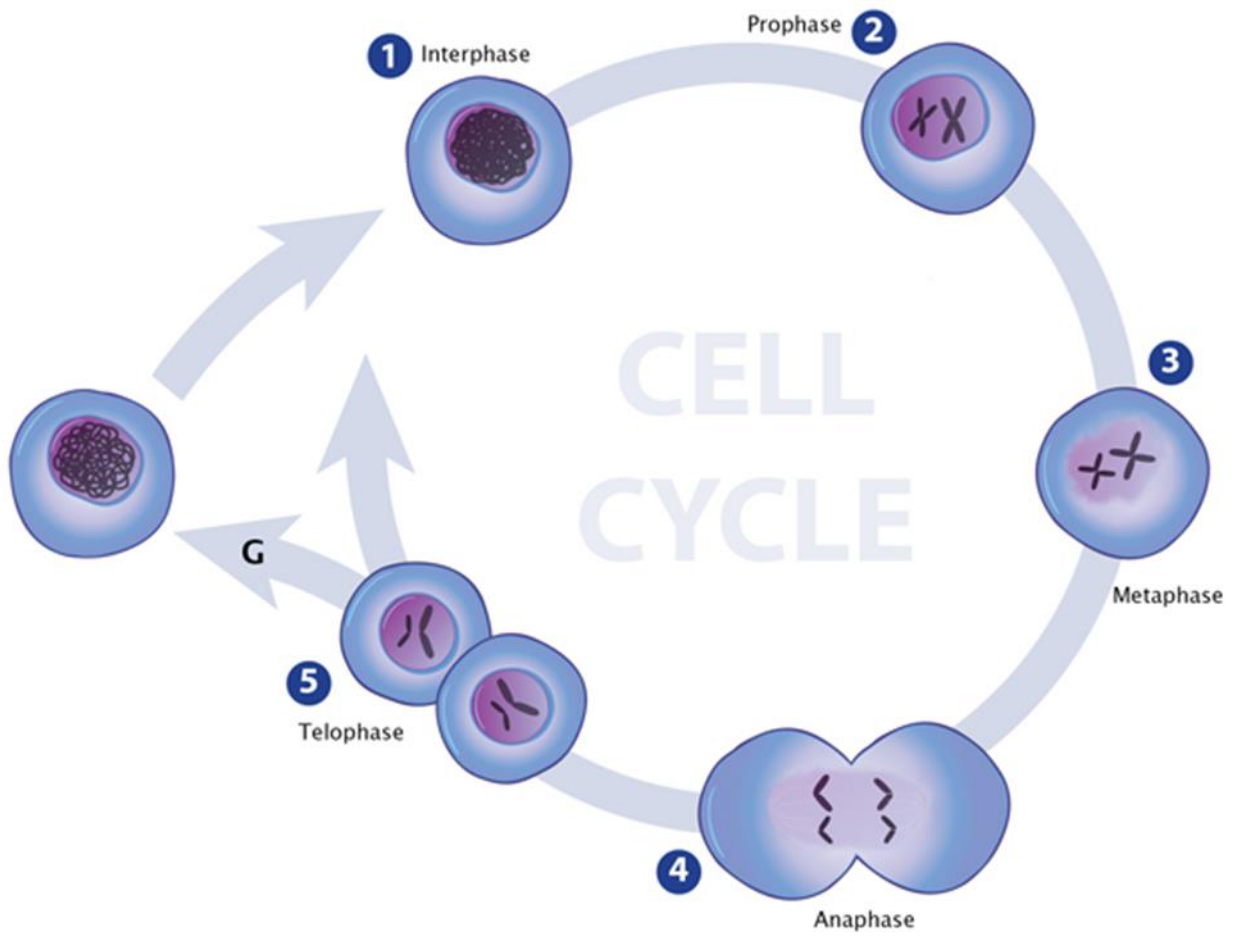


圖 3-3 細胞週期示意圖。摘錄於 2013 Nature Education。

(二) 分裂期

分裂期主要分為前、中、後、末四階段，並在此階段細胞內的物質平均分配，產生兩個子細胞。前期 (Prophase)：染色質在核中縮合 (condensation)，形成可見的染色體 (chromosome)，此時期染色體已完成複製，兩中心粒往兩端移動，並開始產生紡錘體，而核膜、核仁逐漸消失。中期 (Metaphase)：核膜、核仁在此時期消失，紡錘體微管 (microtubules) 與染色體的著絲點連接，染色體已排列至細胞赤道板上，微管產生拉力將染色體平均分配，藉由微管向兩端移動。後期 (Anaphase)：此時姊妹染色單體 (sister chromatids)，在此階段已被明顯分離為姊妹染色體，微管明顯縮短讓姊妹染色體分開並向各自中心粒移動，分為兩組子染色體。末期 (telophase)：染色單體產生解螺旋，重新回復至染色質絲並產生核仁，細胞赤道板縮合使細胞完全分裂為兩個子細胞。

3.1.2.2 真核染色體之結構

已知細胞 DNA 總長度，約為十萬倍的細胞直徑長，所以細胞對 DNA 包覆性極為重要，其可以保護長的 DNA 分子，在細胞分裂時讓細胞精準地分裂成子細胞，而不造成打結或纏繞現象^[41, 42]。如圖 3-4 所示，在細胞週期中，在組蛋白與相關蛋白的幫助下，DNA 可縮合及組成染色體，其中組蛋白、非組蛋白及 DNA 複合物可構成染色質

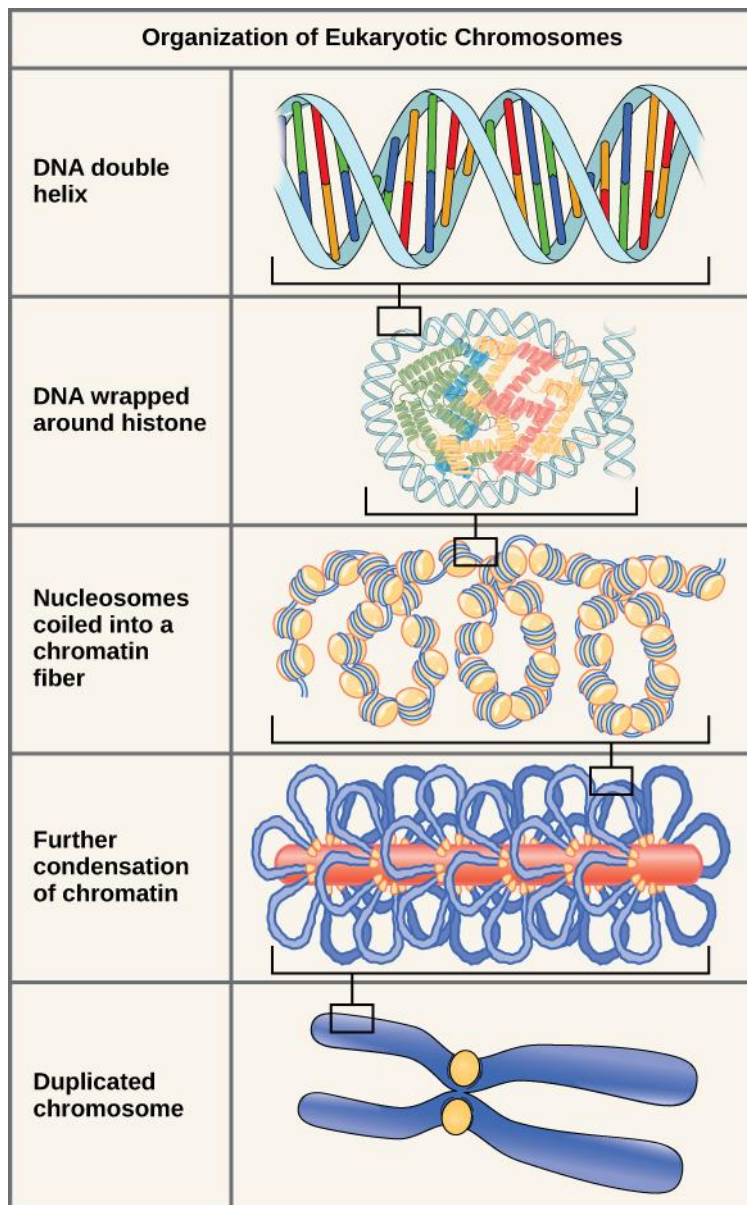


圖 3-4 真核染色體結構模型示意圖。

(chromatin)，並存在著不同程度的折疊和縮合，讓染色體由一開始的絲狀結構，慢慢折疊縮合為 30 奈米染色質纖維結構，在前期時會折疊成 130 奈米的染色絲(chromonema)，染色絲纖維繼續折疊為 250 奈米的中間前期染色體 (middle prophase chromatid)，最後在中期折疊成一般實驗染色所觀察到直徑為 500 至 750 奈米的染色單體結構。雖然每一條真核染色體含數百萬個蛋白質分子，但只含一條極長的線性 DNA 分子，且在人體中最長 DNA 分子為 2.8×10^8 bp，約為 10 公分，染色體的組成結構，使得極長 DNA 可被縮合限制在一個細胞核內，幫助 DNA 分子在轉錄、複製、修復及重組過程中更容易取得特定的 DNA 序列。

保留蛋白質與 DNA 交互作用力的方法，將真核細胞中的 DNA 分離出，發現核蛋白複合物與 DNA 有等質量性，其中在染色質含量最多的蛋白為組蛋白，真核生物中組蛋白種類主要分為五種，有 H1、H2A、H2B、H3 及 H4，它們含有大量帶正電胺基酸會與 DNA 上帶負電的磷酸基團作用，在此擴展型態下，是由連接 DNA(linker DNA) 連結形成珠狀並稱此結構為核小體 (nucleosomes)，包含組蛋白及 DNA 組成，其直徑約為 10 公分且為染色質主要之結構單元。核小體是由蛋白質作為核心讓 DNA 纏繞至表面如線圈般，而核心為八聚體是由兩份組蛋白形成，每份組蛋白含有 H2A、H2B、H3 及 H4，且在

真核生物中 DNA 又以 147 bp 的長度纏繞三分之二圈至核小體上，另外連接 DNA 在不同物種甚至在同一生物體不同細胞之間長度也有不同，範圍約從 10 至 90 bp。細胞複製期間，在複製又過程後不久 DNA 會組合成核小體，在此過程依賴於特異性的分子伴侶 (chaperone) 結合組蛋白，並與新複製的 DNA 轉入至核小體上。

3.1.2.3 基因與疾病

人類對於癌症基因之研究，最早是從觀察癌細胞染色體變化開始，而在慢性骨髓性白血病中所發現的費城染色體 (Philadelphia chromosome)^[43]，為最早被發現的異常染色體，進而了解費城染色體造成兩個基因的重組，即為造成慢性骨髓性白血病的致癌基因。而於大腸癌研究中也發現最早期大腸黏膜細胞會出現基因的突變，陸續造成其他基因及染色體的變化，進而發展成大腸癌。

過去幾年人類基因體學快速發展，解釋出表基因體學修飾的各種作用與疾病結合的相關研究，在過去研究中發現，基因的表現與癌症和遺傳疾病有關聯性。基因的表現分為兩種：遺傳學 (Genetics) 與表基因體學 (Epigenetics)。在遺傳學上，基因的表現異常和去氧核糖核酸 (DNA) 的序列改變有關，如同下列現象皆會造成 DNA 序列的改變：突變 (Mutation)、插入 (Insertion)、基因缺失 (Deletion)、染色體重組 (Rearrangement)、染色體位移 (chromosomal translocation)

等。而在表基因體學中有說明表基因體的修飾，包含組蛋白^[44]或 DNA 的甲基化 (Methylation)^[45]和乙醯化 (Acetylation)，是在 DNA 的序列不做改變的情況下，使基因表現有所變化。

3.2 研究動機

毛細管電泳暨雷射誘發螢光 (capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence, CE-LIF) 具有高分離效率、高靈敏度及消耗樣品少等優點，因為CE-LIF能夠分離去氧核糖核酸 (DNA)、核糖核酸 (RNA)、蛋白質 (Protein)、胺基酸及醣類等生物樣品^[46]，已成為現今生物分析上重要的分析工具^[47-49]，但到目前為止，卻沒有研究利用毛細管電泳分離染色體。過去本實驗室也極力發展以毛細管電泳分析探討不同的生物樣品，包括微小核糖核酸 (miRNA)^[50,51]、總核糖核酸 (Total RNA) 之完整性^[52]、DNA甲基化^[53] 及胺基酸^[18]等，希望藉由過去的經驗，成功發展一套以毛細管電泳暨雷射誘發螢光分離染色體的方法。另外在表基因體學的發展下，本實驗室也成功透過抗體免疫染色觀察全染色體之甲基化程度，也希望發展不同的分析方法來分析染色體，並且能與此系統下探討染色體中DNA與組蛋白上的修飾。

3.3 實驗材料及方法

3.3.1 試藥

細胞培養使用試藥，與 2.2.1 節所述相同，染色體相關實驗使用試藥，脫羧秋水仙素(Colcemid solution (demecolcine solution 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)) 與 DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) 向美國 Life technologies 公司購買，氯化鈉 (sodium chloride)、檸檬酸鈉 (sodium citrate) 及醋酸 (Acetic Acid) 皆向美國 Sigma-Aldrich 公司購買，4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES, Free Acid) 與 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid, sodium salt (HEPES, Sodium Salt) 向美國 J. T. Baker 公司購買，氯化鉀 (potassium chloride)、氯化鎂 (magnesium chloride) 及蔗糖 (sucrose) 皆向日本 SHOWA 公司購買，甲醯胺 (formamide) 與甲醇 (Methanol) 向德國 Merck 公司購買，牛血清蛋白 (Bovine serum albumin) 與十二烷基硫酸鈉 (sodium dodecyl sulfate, SDS) 向美國 UniRegion Bio-Tech 公司購買，Tween 20 與 Triton X-100 向英國 Alfa Aesar 公司購買，溴化乙錠 (ethidium bromide, EtBr) 向美國 Invitrogen 購買。

毛細管電泳實驗試藥，氫氧化鈉 (sodium hydroxide)、硼酸 (boric acid) 及聚乙二醇 (polyethylene glycol, M_{ave} 8,000,000 g/mol) 皆向美國 Sigma-Aldrich 公司購買，三羥甲基氨基甲烷 (Tris) 向美國 J. T.

Baker 公司購買。

3.3.2 儀器設備及系統架構

本實驗為了分離單細胞中的染色體，將倒立式螢光顯微鏡與毛細管電泳系統進行結合，裝置圖如圖 3-5。使用之倒立式螢光顯微鏡型號為 TS100，由日本 Nikon 公司所製造，上方搭載二維移動平台 T1-SM，藉由控制平台之 X 軸及 Y 軸至欲觀測之樣品玻片位置。顯微鏡使用物鏡為 100×油鏡，由台灣冠昕公司提供，其 N.A. 為 1.25，所使用浸油為 Electron Microscopy Sciences 所生產的 Immersiom Oil Type LDF。螢光顯微鏡內部之濾鏡盒 (filter cube) 包含可反射激發光源與可使螢光穿透之 dichroic beamsplitters，型號為 89100bs 由美國 CHROMA 製造，加上可過濾螢光訊號之 interference filter，型號為 FF01-559/34-25 由美國 Semrock 公司製造。所搭配的激發光源為 4 Channel LED 光源，激發波長包含 405 nm、470 nm、530 nm 及 625nm，由美國 THORLABS 公司所製造，搭配 E5400 相機，由日本 NIKON 公司製造，用於觀測影像。

所搭配的毛細管電泳裝置為自行組裝。高電壓供應器由 Gamma High Voltage Research 公司 (Ormond, FL, USA) 購買，用來驅動電泳，高壓電的電極輸出端會穿過自製的 plexiglass box 防止觸電。所採用的激發光源係由唐裕有限公司所購買之固態雷射，其激發波長為 532

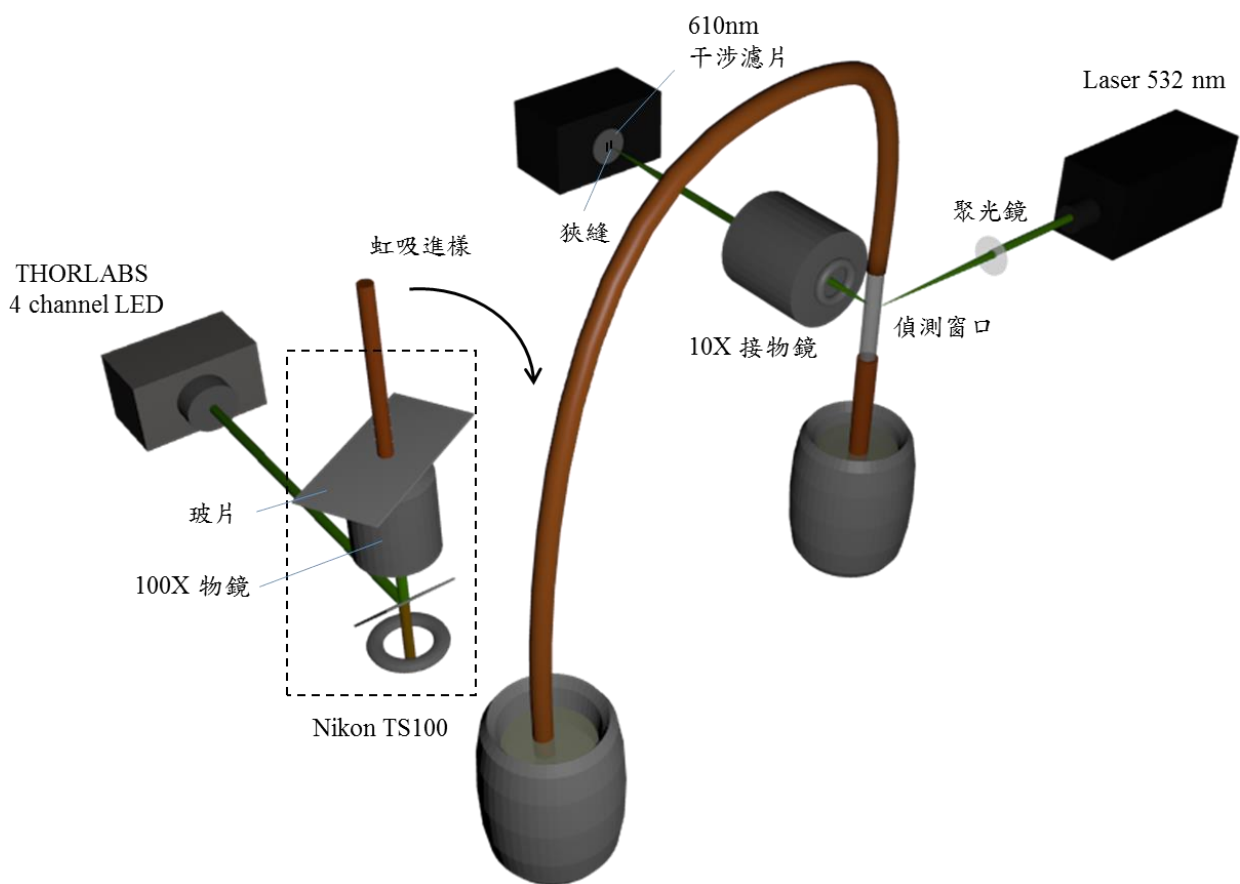


圖 3-5 儀器裝置示意圖。

nm，功率為 10 mW。首先將雷射光平行置於桌面再由凸透鏡將雷射光聚焦於毛細管，當有染料嵌合於細胞或染色體上並通過偵測視窗時，染料就會被雷射激發而產生特定波長之螢光，螢光在 90° 方向利用 10× 接物鏡 (numerical aperture = 0.25) 收集之後，藉由 610 nm 的干涉濾片 (interference filter) 過濾光源干擾及不需要的散射光，最後再使用光電倍增管 (R3896, Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japan) 偵測螢光訊號。訊號經光電倍增管放大後，經由 10 Ω 的電阻將產生的電流訊號轉換成電壓訊號，並由 24-bit 數位類比轉換器 (A/D converter, JMBS Development) 以 10 Hz 的頻率擷取訊號並轉換成數位資料儲存於電腦中。最後運用層析軟體 Clarity (DataApex, Prague, Czech Republic) 將訊號轉換成電泳圖。本實驗是在一密閉的黑箱裡進行以避免環境光源的干擾。

本實驗所使用之超音波細胞粉碎機，型號為 LUC-150P 由台灣克硬公司所製造，搭配間歇裝置，探針大小為 3 mm。本實驗亦有使用於 2.2.2 節所提到的螢光顯微鏡系統，用於觀測染色體構形。

3.3.3 實驗方法

3.3.3.1 細胞培養及秋水仙素處理

本實驗選擇肝癌細胞 Huh7 做為樣品，細胞培養步驟如 2.2.3.1 節所述。細胞培養 2 至 3 天滿盤後，更換含有 $0.1 \mu\text{g/ml}$ Colcemid ($2.69 \times 10^{-7} \text{ M}$) 之培養基，反應 16 小時，使細胞停留於細胞分裂中期 (Metaphase)，再利用 $1 \times \text{trypsin / EDTA}$ 使細胞離開培養皿表面，以等量培養液終止反應後，並以 $400 \times g$ 離心 5 分鐘收集細胞做為後續實驗樣品。本實驗也有將細胞培養於經處理及高壓滅菌之玻片上，所使用之玻片前處理如 2.2.3.1 節所述，細胞培養一天後，亦更換含有 $0.1 \mu\text{g/ml}$ Colcemid ($2.69 \times 10^{-7} \text{ M}$) 之培養基，反應 16 小時，以 PBS 清洗三次，再利用 $10 \mu\text{g/ml}$ EtBr 染色，接續實驗觀察。

3.3.3.2 消化細胞膜及獲取染色體

本實驗的研究樣品為染色體，製備及收集染色體為首要目標。秋水仙素會使部分細胞停留於細胞分裂中期 (Metaphase)，核膜、核仁在此時期消失，但從螢光顯微鏡下觀察還是可以發現染色體縮合在一起，且依然被細胞膜限制於細胞內。為了有效消化細胞膜，配置含有介面活性劑之低張溶液 (Lysis Buffer)，其中包含 0.25 M 蔗糖、 3 mM 氯化鎂、 20 mM HEPS pH 7.5 及 0.5% Triton X-100，也有將介面活性劑更換為不同濃度之 SDS。以 PDMS (A 劑 : B 劑 = 10 : 1) 所製作

之水槽將玻片上細胞限制於特定範圍內，再加入 Lysis Buffer 與結合超音波消化細胞膜，並於螢光顯微鏡下進行觀察。除了針對培養於玻片上的細胞進行實驗外，也有於懸浮細胞溶液中進行反應，反應後再將懸浮溶液點於玻片上，烘乾染色後觀察。

後續為了保持染色體結構完整性，利用了酸性甲醇固定秋水仙素所處理之細胞。首先收集細胞，將細胞回溶於 5 mL 低張溶液（0.075 M 氯化鉀及 0.035 M 檸檬酸鈉以 1:1 混合），靜置於 37°C 恆溫水槽中 10 分鐘，目的使細胞膨脹，再以 400 ×g 離心 5 分鐘，丟棄上清液，回溶於 5 mL 4°C 酸性甲醇（甲醇及乙酸以 3:1 混合），靜置於 4°C 冰箱中 1 小時，取出放置室溫 10 分鐘，以 400 ×g 離心 5 分鐘，丟棄上清液，回溶於 5 mL 4°C 酸性甲醇，靜置於 4°C 冰箱中 12 小時，使細胞固定，最後再以 400 ×g 離心 5 分鐘，丟棄上清液，加入 1 mL 4°C 酸性甲醇清洗細胞兩次，即可將細胞點至玻片上，烘乾玻片，以 1 μg/ml DAPI 封片染色，於顯微鏡下觀察細胞濃度及其分佈情形。為了使染色體分散，不受限於細胞膜，利用超音波震盪破壞細胞，再將溶液點於玻片上，烘乾染色後觀察。

3.3.3.3 全染色體觀測及標記一號染色體

取出 10 μL 溶於酸性甲醇中的細胞樣品，以 1000 ×g 離心 5 分鐘，吸棄上清液去除殘留的細胞碎片，再回溶於甲醇，並將細胞於 40

公分的高度點至冰的玻片上，手持玻片於酒精燈的火焰上來回兩三次，使玻片上的甲醇瞬間揮發乾燥，接著放置 50°C 的烘箱烘乾，使細胞及染色體確實固定至玻片上，再使用二次水沖洗玻片，以 1 µg/ml DAPI 封片染色，即可使用顯微鏡觀察，判斷染色體 spreading 狀態。

標記一號染色體，按造上述步驟將細胞及染色體確實固定至玻片後，以 0.1% Triton X-100 於 37°C 下反應 30 分鐘，去除多餘的細胞碎片，並幫助切除細胞膜上少許的蛋白質，再使用二次水沖洗玻片，繼續使用內含 5% BSA 及 1 µM Primer 的 2× SSC pH 7.0 溶液作為 blocking 溶液，在 37°C 下反應 1 小時，以防止後續雜合之螢光探針吸附至玻片表面，再以二次水清洗。接著以 Hybridization Buffer 稀釋之 10 µL 0.1× XCP Green 1 覆蓋樣品，於 75°C 下反應 2 分鐘使之變性，隨後移至 37°C 雜合一個晚上，隔日以 0.4x SSC pH 7.0 於 72°C 下清洗 2 分鐘，再以含 0.05% Tween 20 之 2x SSC pH 7.0 於室溫下清洗 30 秒，最後以二次水沖洗玻片於 37°C 的烘箱烘乾，以 1 µg/ml DAPI 封片染色，即可使用顯微鏡觀察，確認是否標記上一號染色體。由於市售螢光探針價格過高與使用次數有限，本實驗以 Hybridization Buffer 稀釋後在進行雜合，藉此提高使用次數降低成本，Hybridization Buffer 為內含 1 µM Primer、50 mM Phosphate buffer 及 50% formamide 之 2× SSC pH 7.0 溶液。

3.3.3.4 毛細管電泳暨雷射誘發螢光

本實驗所使用的毛細管材質為熔融矽 (fused silica)，購自於美國 PolymicroTechnologies 公司，毛細管內徑為 75 μm ，外徑為 365 μm ，毛細管外部塗覆了一層聚亞烯胺 (polyimide)，每根新的熔融矽毛細管先以石英片切割成總長度為 60 公分，並於末端 7 公分處燒出約 1 公分的偵測視窗，接著注入去離子水稍做清洗，再以 0.5 M 的 NaOH 溶液浸泡十二小時以上，使毛細管內壁矽醇基完全解離，隔日以 1.5 M TB (Tris-Borate) pH 10.0 緩衝溶液推出 NaOH，即可使用此毛細管進行實驗。實驗結束後，以 1.5 M TB pH 10.0 緩衝溶液清洗及保存毛細管，而於下次實驗前，一樣於毛細管內通入 0.5 M 的 NaOH 溶液，以 1 kV 電壓清洗毛細管壁 15 分鐘，使得毛細管內壁矽醇基再度解離以利進行下次實驗。

而實驗選用 100 mM TB pH 9.0 緩衝溶液與其配置而成之聚合物溶液，於其中加入 EtBr 染料，EtBr 可嵌入雙股 DNA 或單股 RNA 的螺旋體結構中而緊密結合，每 2.5 個鹼基對可嵌入約 1 個 Ethidium 分子，且 EtBr 與 DNA 嵌合後的螢光強度比未嵌合時增加了 10 倍^[54]，緩衝溶液中 EtBr 最終濃度為 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，攪拌後使染料均勻分布於緩衝溶液之中，將配置好的緩衝溶液倒入乾淨的 50 mL 離心管中，再利用鋁箔紙包覆離心管避光，並存放於 4°C 冰箱中，使用前取出於 1.5 mL

之 PCR tube 中，以 10000 ×g 離心 10 分鐘去除氣泡。

3.3.3.5 實驗流程

本實驗目標為利用毛細管電泳暨雷射誘發螢光分離染色體。首先細胞培養 2 至 3 天滿盤後，收集細胞，再利用 PBS 將細胞總量稀釋 10~100 倍，將細胞溶液置於玻片上，於顯微鏡下觀察，利用虹吸的方式將單細胞引入通有 Lysis Buffer 之毛細管中，接著將毛細管兩端擺放在緩衝溶液中，在毛細管兩端插入白金電極，並施加 15 kV 電壓進行電泳分離，利用 Lysis Buffer 於線上消化細胞膜使染色體游離，進而分離染色體，在毛細管入口處 53 公分以 CE-LIF 方法作偵測。為了確認染色體於電泳中的訊號，先將細胞培養於玻片上，以 EtBr 染色觀察於螢光顯微鏡下確認細胞停於 Metaphase，利用 Lysis Buffer 及超音波破壞細胞膜，使染色體游離，再利用虹吸的方式將單細胞染色體引入毛細管中，進行電泳分析。也利用 Lysis Buffer 及超音波破壞懸浮的細胞，收集染色體，再進行電泳分析，而為了確認溶液中是否含有完整的單條染色體，先將破碎的細胞溶液滴於玻片上後烘乾，再以 DAPI 染色於螢光顯微鏡下觀察，另外為了維持染色體的完整性，利用酸性甲醇固定後的細胞進行實驗。

3.4 結果與討論

3.4.1 分離單細胞之染色體

本實驗的目標為利用毛細管電泳分離單細胞中的全染色體，希望以毛細管引入單細胞，透過Lysis Buffer於線上消化細胞膜，使染色體游離，進而分離染色體。再分離染色體之前，先利用虹吸進樣含有大量細胞之PBS溶液，並施加15 kV電壓進行電泳分離，確認多細胞於電泳圖上的位置，接著先以PBS將細胞總量稀釋，於顯微鏡下確認利用虹吸的方式將單細胞引入毛細管中，進行電泳分析，如圖3-6所示，進樣較多的細胞可獲得較多的螢光訊號，而進樣單顆細胞的訊號也落於相同的位置，所以確定可利用毛細管電泳進行單細胞分析。

成功利用毛細管引入單細胞後，為了使染色體分散於毛細管內，先以虹吸注入60秒的Lysis Buffer，再進樣細胞樣品，並施加15 kV電壓進行電泳分離，藉由Lysis Buffer於線上消化細胞膜使染色體游離，進而分離染色體，如圖3-7所示，可以發現Lysis Buffer確實能有效於毛細管內破壞細胞，電泳圖中會出現許多微小的訊號。另外先於顯微鏡下找到單顆細胞，於細胞上加入Lysis Buffer，再以毛細管引入此細胞，並施加15 kV電壓進行電泳分離，從圖中一樣出現許多微小的訊號，但無法從電泳圖中直接確認出這些訊號為染色體訊號，亦有可能為細胞碎片或胞器所產生之訊號。

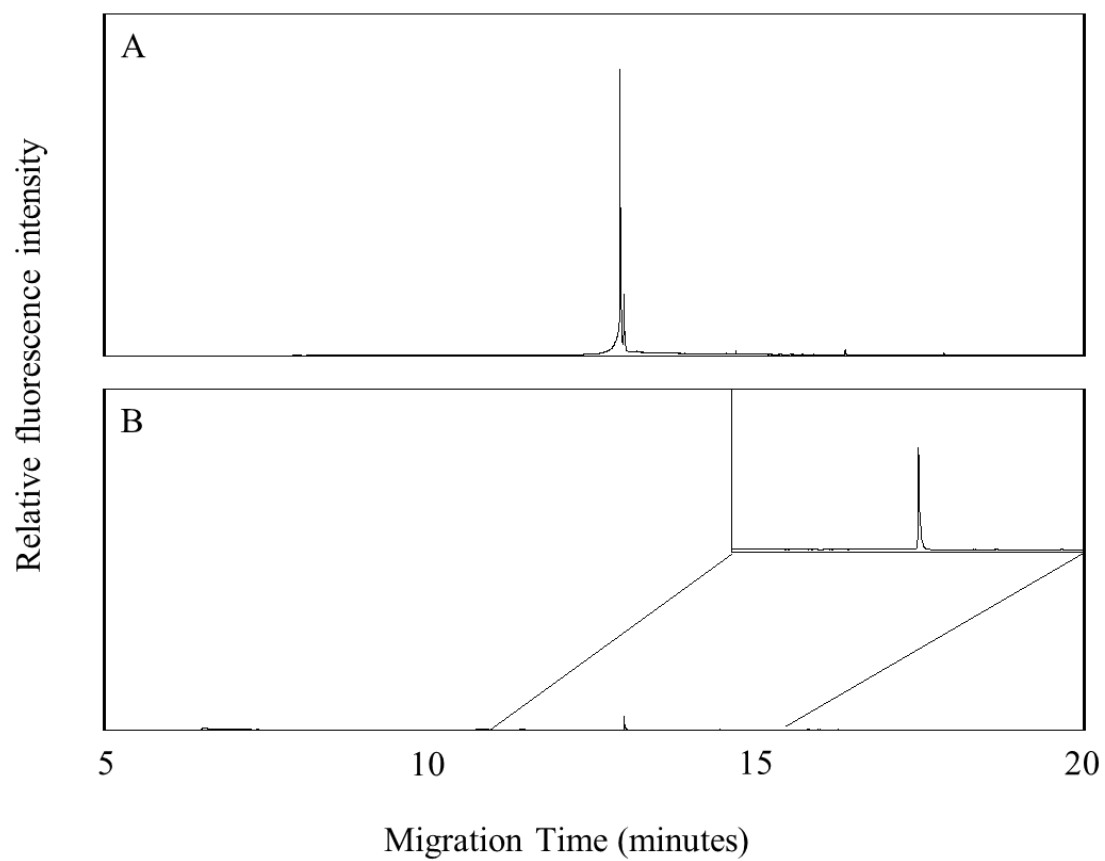


圖3-6 多細胞與單細胞電泳圖。(A)為進樣60秒的細胞樣品，(B)為進樣單細胞。實驗條件為虹吸進樣，分離電壓為15 kV。

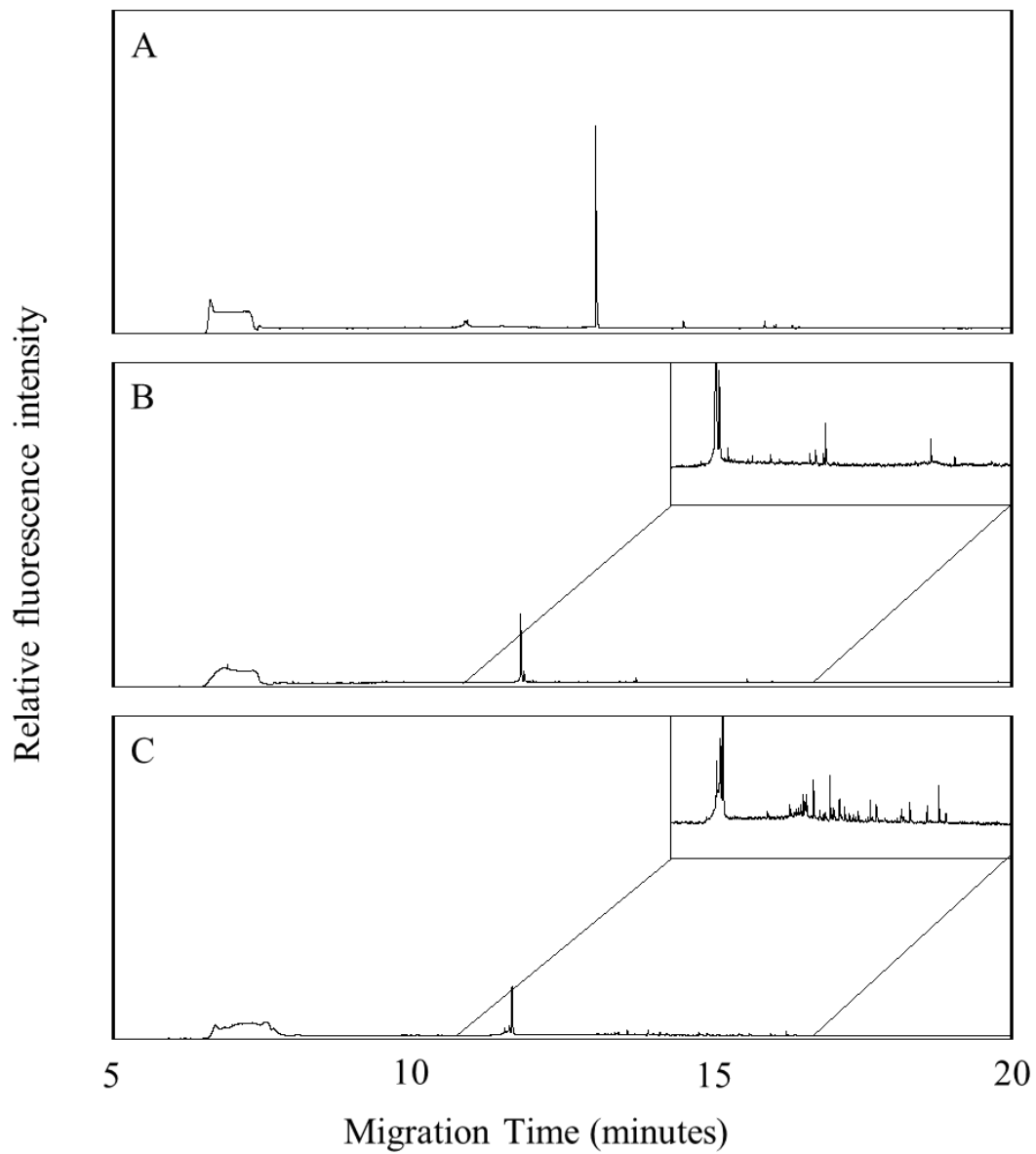


圖3-7 分離單細胞之全染色體。(A)為進樣單細胞，(B)為先於毛細管內注入Lysis Buffer後，再進樣單細胞，(C)為先以Lysis Buffer稍為破壞細胞後，再進樣此細胞。實驗條件為虹吸進樣，分離電壓為15 kV。

3.4.2 消化細胞膜及獲取染色體

由於透過Lysis Buffer破壞細胞後，無法從電泳圖中直接確認出染色體訊號位置，為了確認染色體於電泳中的訊號，先將細胞培養於玻片上，以EtBr染色觀察於螢光顯微鏡下確認細胞停於Metaphase，利用Lysis Buffer及超音波破壞細胞膜，使染色體游離，再利用虹吸的方式將單細胞染色體引入毛細管中，進行電泳分析。但於螢光顯微鏡下觀察，發現Lysis Buffer確實能消化細胞膜，但無法直接使染色體游離出細胞外，如圖3-8所示。所以另外更換Lysis Buffer中的介面活性劑來消化細胞膜，將原先含有0.5% Triton X-100更換成不同濃度的SDS進行比較，於螢光顯微鏡下發現SDS會完全破壞細胞中的蛋白質及DNA，導致無法找到游離的染色體。更換介面活性劑後依然無法使染色體游離出細胞外，所以依舊選擇較溫和的0.5% Triton X-100 Lysis Buffer，另外利用超音波震盪破壞細胞，如圖3-9所示，持續以強度15 W之超音波震盪300秒，發現依然無法完全破壞細胞膜，使染色體游離出細胞外，甚至震盪過程中會使細胞離開玻片表面，而無法持續觀察。嘗試以不同方式破壞細胞膜，皆無法於螢光顯微鏡下發現游離之染色體，固然無法使用毛細管進樣進行電泳分析。

培養於玻片上之細胞無法透過上述方法使染色體游離，所以學生選擇不將細胞培養於玻片上，直接以超音波破壞懸浮細胞，如圖3-10

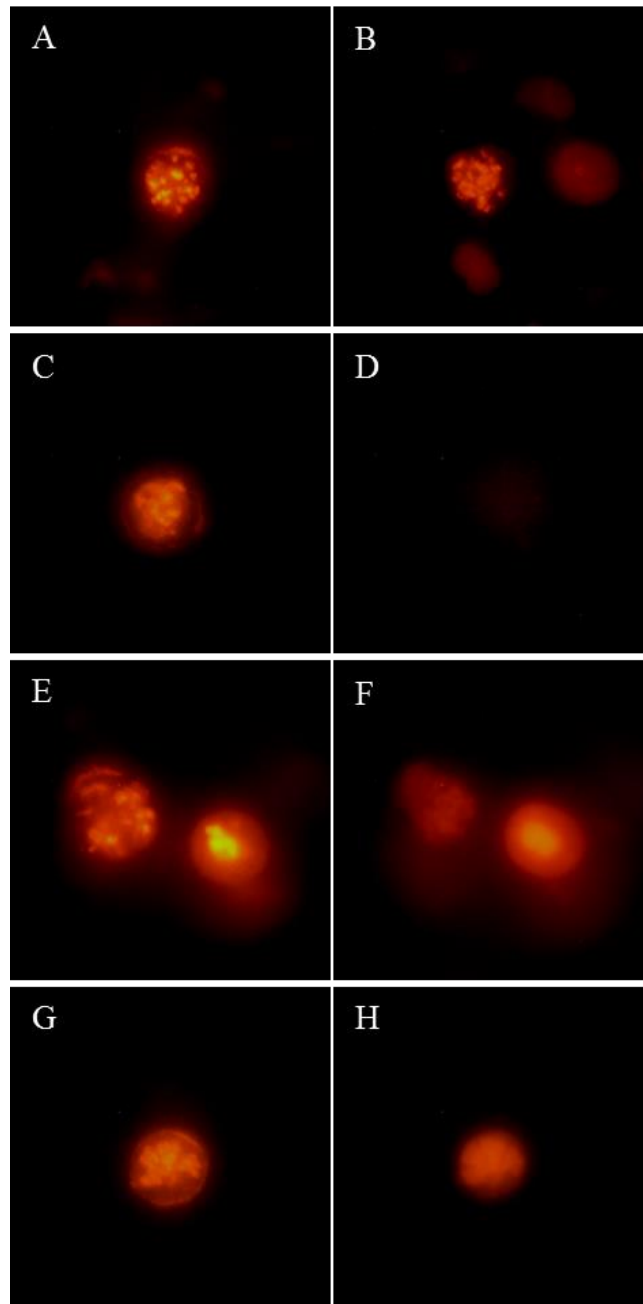


圖3-8 以不同濃度之介面活性劑消化細胞膜。(A) (B)為Lysis Buffer (0.5% Triton X-100) 反應10 min前後，(C) (D)為Lysis Buffer (5 mM SDS) 反應10 min前後，(E) (F)為Lysis Buffer (1 mM SDS) 反應10 min前後；(G) (H)為Lysis Buffer (0.1 mM SDS) 反應10 min前後。

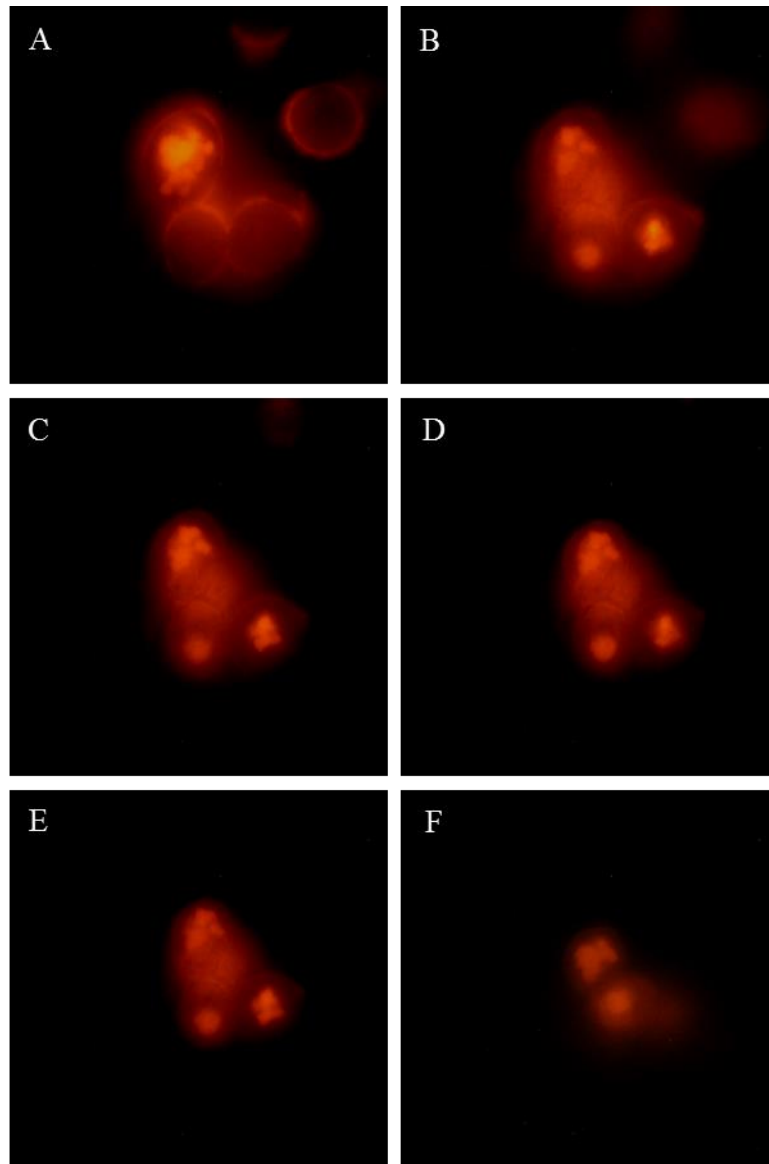


圖3-9 配合超音波消化細胞膜。(A)為保存於PBS之細胞，(B)為加入 Lysis Buffer，(C)為超音波震盪10sec後，(D)為超音波震盪30sec後，(E)為超音波震盪60sec後，(F)為超音波震盪300sec後。

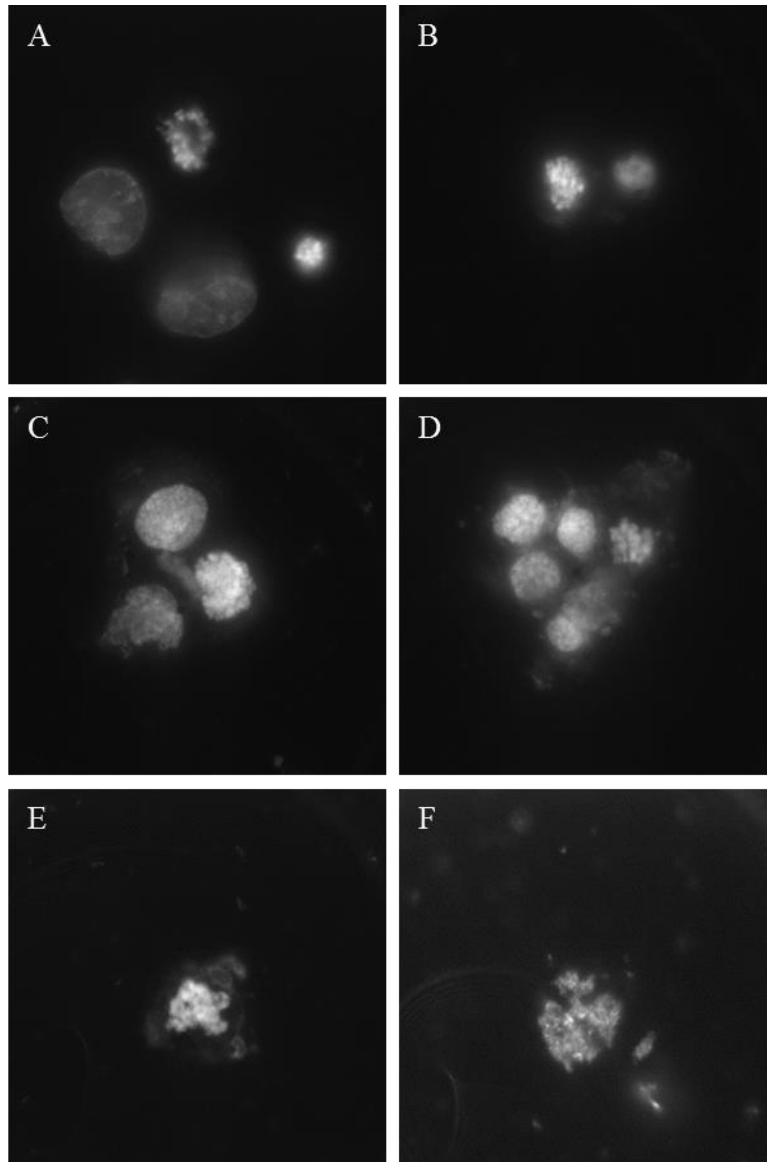


圖3-10 以超音波破壞懸浮細胞。(A)為保存於PBS之細胞，(B)為加入 Lysis Buffer，(C)為超音波震盪10sec後，(D)為超音波震盪20sec後，(E)為超音波震盪30sec後，(F)為超音波震盪60sec後。

所示，實驗結果發現懸浮之細胞以超音波破壞後，無法使染色體游離，且會破壞染色體之結構，無法準確判斷懸浮溶液中是否含有完整之染色體，所以也無法使用毛細管進樣進行電泳分析。

3.4.3 維持染色體完整性

直接以超音波破壞懸浮之細胞，不僅會破壞細胞膜，也會破壞染色體結構，導致無法準確判斷懸浮溶液中是否含有完整的染色體，所以學生利用酸性甲醇固定細胞後，再利用超音波破壞細胞。如圖3-11所示，於螢光顯微鏡下觀察結果發現，以酸性甲醇固定之細胞，可清楚辨別停留於Metaphase之細胞，但染色體因為細胞本身結構完整性而緊密靠在一起，所以學生藉由超音波震盪使染色體彼此分散，才可以由電泳進行分離。從影像圖中發現以強度15 W之超音波破壞後，可使染色體分散，且構形依然保持完整，但震盪20秒及30秒後，未停留於Metaphase之細胞核也會被震碎，為了減少核碎片影響後續的分離，學生選擇以強度15 W之超音波震盪10秒作為後續實驗條件。

利用酸性甲醇固定細胞後再以強度15 W之超音波震盪10秒使染色體分散後，且能夠維持染色體的完整性，所以透過虹吸進樣10秒，並施加15 kV電壓進行電泳分離，分別以100 mM TB pH 9.0緩衝溶液、0.1% 8M PEO及0.5% 8M PEO分離酸性甲醇固定之細胞及超音波震盪後之染色體溶液，如圖3-12所示，發現超音波破壞後之細胞溶液會出

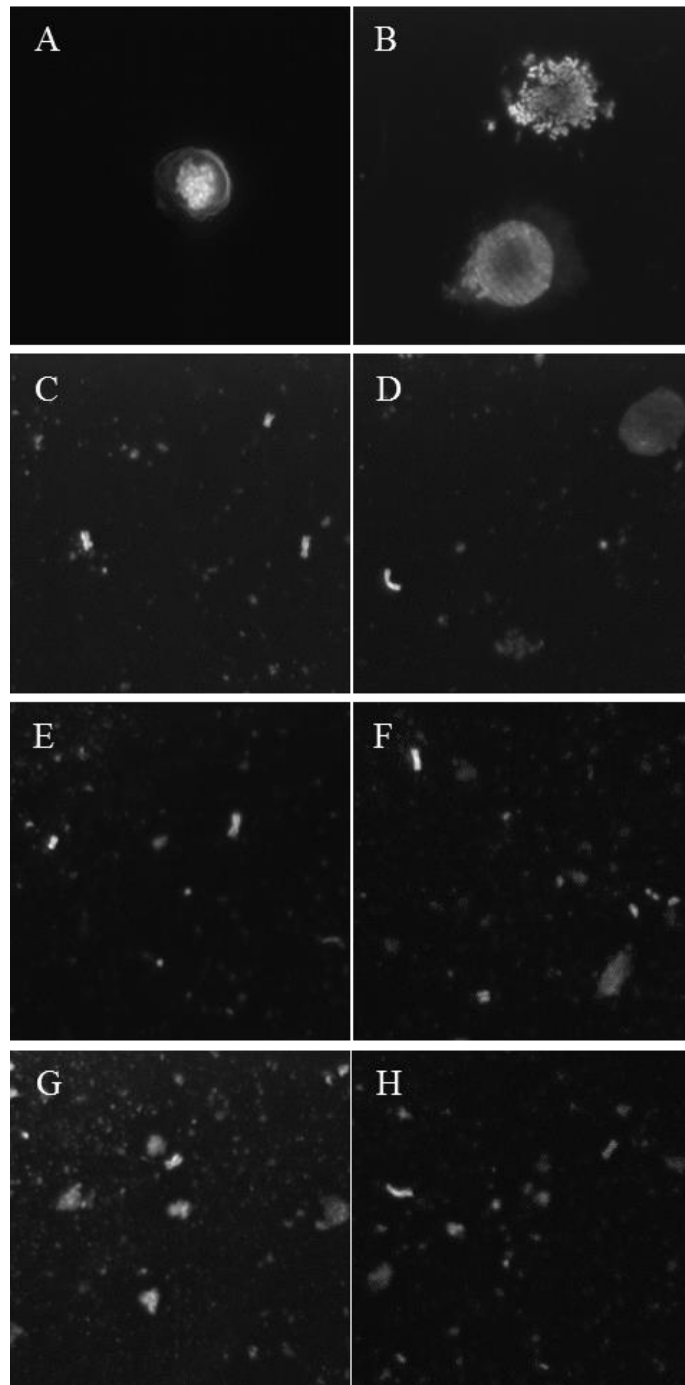


圖3-11 以超音波破壞酸性甲醇固定之細胞。(A) (B)為酸性甲醇固定之細胞，(C) (D)為以超音波破壞10sec，(E) (F)為以超音波破壞20sec；(G) (H)為以超音波破壞30sec。

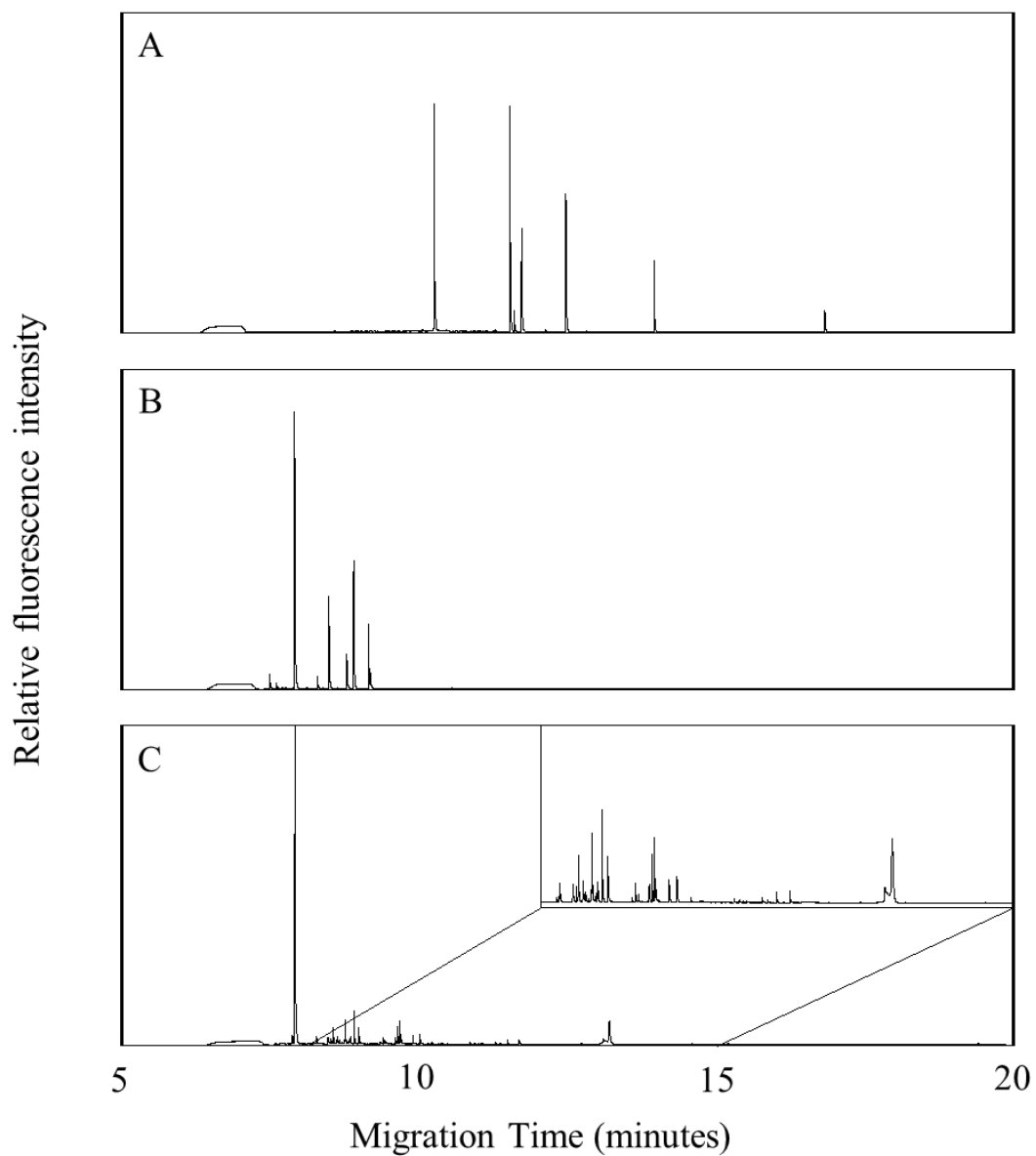


圖3-12 染色體分離電泳圖。(A)為100 mM TB pH 9.0緩衝溶液，(B)為0.1% 8M PEO，(C)0.5% 8M PEO。實驗條件為虹吸進樣10秒，分離電壓為15 kV。

現較微小之訊號，透過增加聚合物濃度，提高分離效率，希望藉此將細胞核與染色體分離，但由於染色體溶液中也存在需多微小的核碎片，所以依然無法明確指出何者為染色體訊號，需要進一步將核碎片與染色體區分開，或是找到適當的螢光染料用於標記染色體，才可精準判斷染色體訊號位置。

3.4.4 全染色體觀測及標記一號染色體

本實驗希望利用一般市售螢光探針標記特定染色體，並應用於電泳中。在結合電泳實驗前，先於螢光顯微鏡下確認螢光探針標是否能標記上特定的染色體，首先於40公分處將酸性甲醇固定之細胞點於玻片上，觀察染色體spreading狀態，藉此使單一細胞的染色體不再重疊在一起，如圖3-13所示，如此即可輕鬆於螢光顯微鏡下觀察全染色體。接續利用0.1× XCP Green 1標記上一號染色體，如圖3-14所示，於不同激發波長下進行觀測，從疊圖上可清楚觀察到，成功以0.1× XCP Green 1標記上一號染色體。另外癌症細胞會形成多倍體，細胞中可能存在不僅一對的一號染色體，亦可從影像圖中觀察發現。於螢光顯微鏡下可以明顯觀察到透過雜合標記的特定染色體，未來順利移除核碎片並純化出染色體後，希望透過螢光雜合結合毛細管電泳暨雷射誘發螢光來分析特定的染色體。

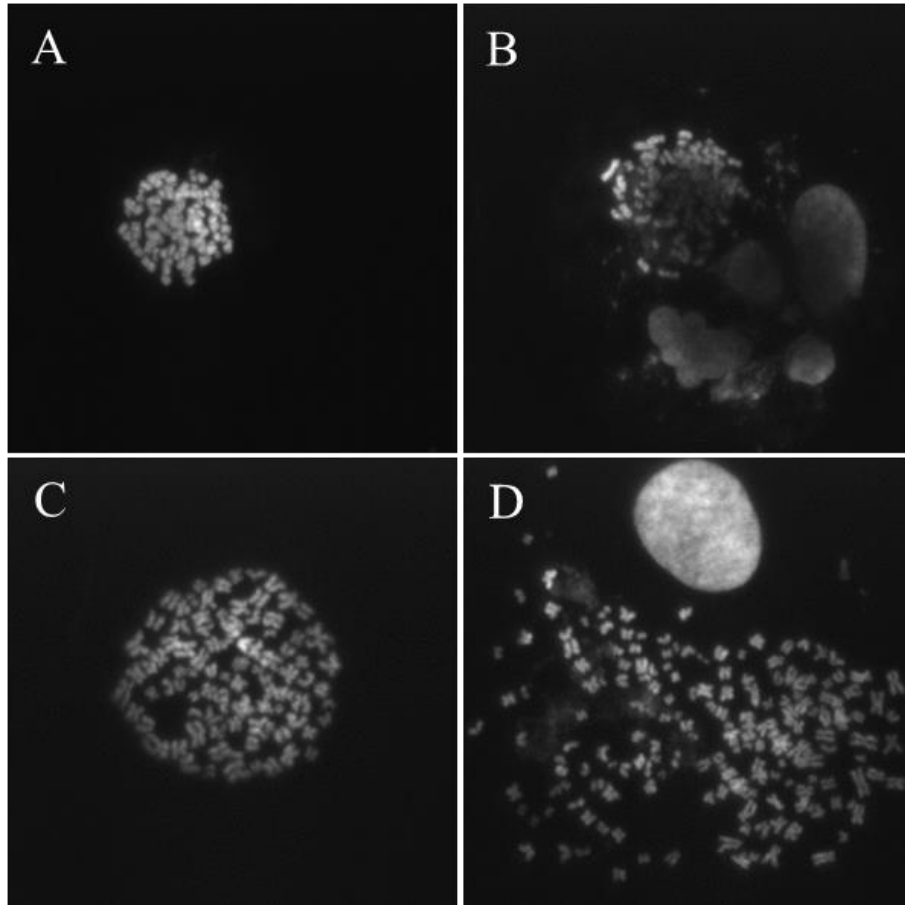


圖3-13 觀察全染色體分散程度。(A)(B)於5公分處點片，(C)(D)於40公分處點片。

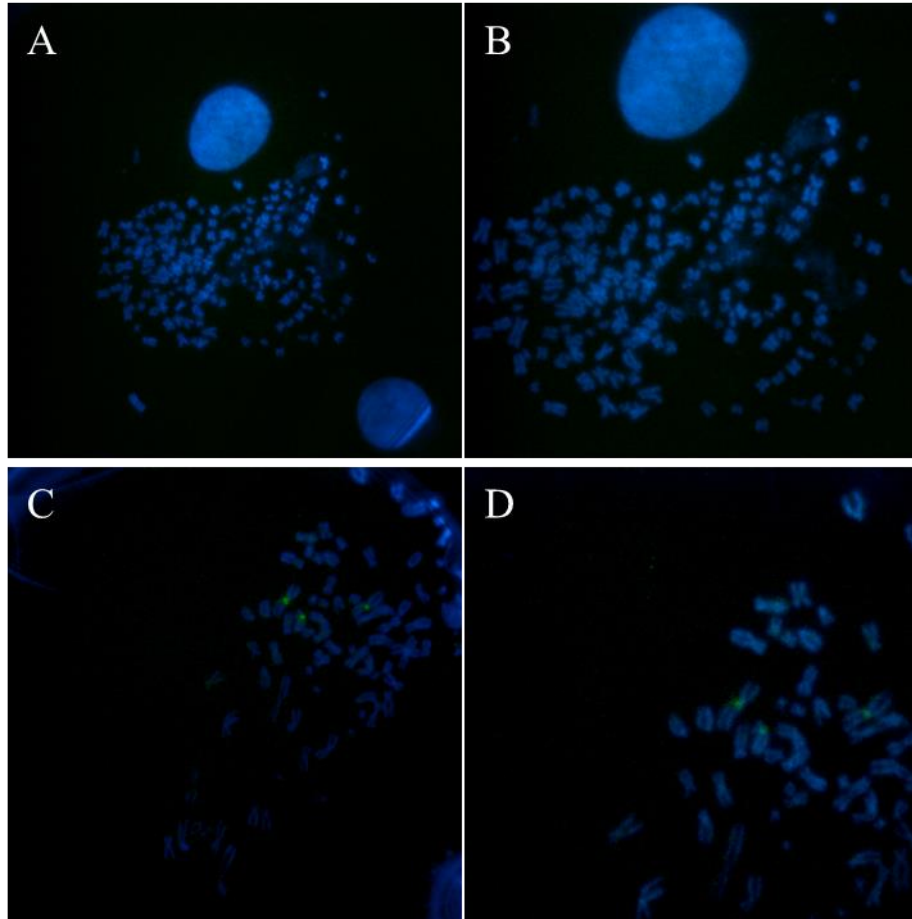


圖3-14 以螢光探針標記一號染色體。(A)為未標記一號染色體，(C)為標記一號染色體。(B)(D)為放大1.6×螢光影像圖。藍色為DAPI標記全染色體，綠色為0.1× XCP Green 1標記一號染色體。

3.5 結論與未來展望

本實驗使用秋水仙素使細胞停留於Metaphase，成功利用毛細管引入單細胞，並於電泳中觀察到單細胞訊號，接續以Lysis Buffer於線上消化細胞膜，使染色體游離於毛細管內，並透過毛細管電泳暨雷射誘發螢光分離染色體。由於無法直接於電泳圖中確定染色體訊號位置，實驗改由萃取得到染色體後在進行電泳分離，嘗試以含有不同介面活性劑的Lysis Buffer及超音波震盪使染色體游離到細胞外，發現以SDS消化細胞膜會導致蛋白質及DNA完全裂解，所以選擇含有0.5% Triton X-100之Lysis Buffer配合超音波震盪來消化細胞膜，但結果發現不管將細胞養於玻片或是懸浮細胞溶液，都無法獲得完整的游離染色體，固無法進行電泳分離。為了改善所遇到的問題，透過酸性甲醇固定秋水仙素處理過之細胞，再以超音波震盪使染色體分散，成功的於影像圖中觀察到分散的單條染色體。進一步以電泳分離，從電泳圖中發現以超音波破壞後之細胞溶液都會出現較微小的訊號，但依然無法明確指出何者為染色體訊號，需要將核碎片與染色體區分開，或是找到適當的螢光染料標記染色體，才可精準判斷染色體的訊號位置。實驗中也利用螢光探針標記一號染色體，成功於影像中觀察，未來順利移除核碎片並純化出染色體後，希望能透過螢光雜合結合毛細管電泳暨雷射誘發螢光來分離特定的染色體，甚至分析染色體上表基因體的修飾。

3.6 參考文獻

1. Michaelis L: **Electric transport of enzymes, malt distaste and pepsin.** *Biochemische Zeitschrift* 1909, **17**:231.
2. Tiselius A: **Electrophoresis of serum globulin: Electrophoretic analysis of normal and immune sera.** *Biochem J* 1937, **31**(9):1464-1477.
3. Hayashi K: **PCR-SSCP: a method for detection of mutations.** *Genetic analysis, techniques and applications* 1992, **9**(3):73-79.
4. Smooker PM, Cotton RG: **The use of chemical reagents in the detection of DNA mutations.** *Mutation research* 1993, **288**(1):65-77.
5. Viridi AS, Loughlin JA, Irven CM, Goodship J, Sykes BC: **Mutation screening by a combination of biotin-SSCP and direct sequencing.** *Human genetics* 1994, **93**(3):287-290.
6. Knox JH: **Thermal effects and band spreading in capillary electro-separation.** *Chromatographia* 1988, **26**:329-337.
7. Jorgenson JW, Lukacs KD: **Zone electrophoresis in open-tubular glass-capillaries.** *Analytical Chemistry* 1981, **53**(8):1298-1302.
8. Jorgenson JW, Lukacs KD: **Capillary zone electrophoresis.** *Science* 1983, **222**(4621):266-272.
9. Tran AD, Park S, Lisi PJ, Huynh OT, Ryall RR, Lane PA: **Separation of carbohydrate-mediated microheterogeneity of recombinant human erythropoietin by free solution capillary electrophoresis. Effects of pH, buffer type and organic additives.** *Journal of Chromatography* 1991, **542**(2):459-471.
10. Xu XH, Yeung ES: **Direct measurement of single-molecule diffusion and photodecomposition in free solution.** *Science* 1997, **275**(5303):1106-1109.
11. Xu XH, Yeung ES: **Long-range electrostatic trapping of single-protein molecules at a liquid-solid interface.** *Science* 1998, **281**(5383):1650-1653.
12. Nishi H, Tsumagari N, Kakimoto T, Terabe S: **Separation of water-soluble vitamins by micellar electrokinetic chromatography.** *J Chromatogr* 1989, **465**(2):331-343.
13. Rodriguez-Diaz R, Wehr T, Zhu M: **Capillary isoelectric focusing.** *Electrophoresis* 1997, **18**(12-13):2134-2144.
14. Cohen AS, Karger BL: **High-performance sodium dodecyl sulfate**

- polyacrylamide gel capillary electrophoresis of peptides and proteins.** *J Chromatogr* 1987, **397**:409-417.
15. Grant IH: **Capillary electrochromatography.** *Methods Mol Biol* 1996, **52**:197-209.
 16. Smith RD, Fields SM, Loo JA, Barinaga CJ, Udseth HR, Edmonds CG: **Capillary isotachopheresis with UV and tandem mass spectrometric detection for peptides and proteins.** *Electrophoresis* 1990, **11**(9):709-717.
 17. Chang PL, Lee KH, Hu CC, Chang HT: **CE with sequential light-emitting diode-induced fluorescence and electrochemiluminescence detections for the determination of amino acids and alkaloids.** *Electrophoresis* 2007, **28**(7):1092-1099.
 18. Chen YC, Chang PL: **Baseline separation of amino acid biomarkers of hepatocellular carcinoma by polyvinylpyrrolidone-filled capillary electrophoresis with light-emitting diode-induced fluorescence in the presence of mixed micelles.** *Analyst* 2015, **140**(3):847-853.
 19. Heller C: **Principles of DNA separation with capillary electrophoresis.** *Electrophoresis* 2001, **22**(4):629-643.
 20. Skeidsvoll J, Ueland PM: **Analysis of RNA by capillary electrophoresis.** *Electrophoresis* 1996, **17**(9):1512-1517.
 21. Loo JA, Udseth HR, Smith RD: **Peptide and protein analysis by electrospray ionization-mass spectrometry and capillary electrophoresis-mass spectrometry.** *Analytical biochemistry* 1989, **179**(2):404-412.
 22. Kuhn R, Hoffstetter-Kuhn S: **Capillary electrophoresis: Principles and Practice, Springer-Verlag, New York.** 1993.
 23. Zhang T, Fang Q, Wang SL, Qin LF, Wang P, Wu ZY, Fang ZL: **Enhancement of signal-to-noise level by synchronized dual wavelength modulation for light emitting diode fluorimetry in a liquid-core-waveguide microfluidic capillary electrophoresis system.** *Talanta* 2005, **68**(1):19-24.
 24. Heitmeier S, Blaschke G: **Direct assay of nonopioid analgesics and their metabolites in human urine by capillary electrophoresis and capillary electrophoresis-mass spectrometry.** *Journal of chromatography B, Biomedical sciences and applications* 1999, **721**(1):109-125.
 25. Caslavaska J, Gassmann E, Thormann W: **Modification of a tunable**

- UV-visible capillary electrophoresis detector for simultaneous absorbance and fluorescence detection: profiling of body fluids for drugs and endogenous compounds.** *Journal of chromatography A* 1995, **709**(1):147-156.
26. Chen DY, Dovichi NJ: **Yoctomole detection limit by laser-induced fluorescence in capillary electrophoresis.** *Journal of chromatography B, Biomedical applications* 1994, **657**(2):265-269.
 27. Yang TH, Chang PL: **Determination of RNA degradation by capillary electrophoresis with cyan light-emitted diode-induced fluorescence.** *Journal of chromatography A* 2012, **1239**:78-84.
 28. Liao JL, Abramson J, Hjerten S: **A Highly Stable Methyl Cellulose Coating for Capillary Electrophoresis.** *J Capillary Electrop* 1995, **2**(4):191-196.
 29. Siles BA, O'Neil KA, Tung DL, Bazar L, Collier GB, Lovelace CI: **The use of dynamic size-sieving capillary electrophoresis and mismatch repair enzymes for mutant DNA analysis.** *J Capillary Electrop* 1998, **5**(1-2):51-58.
 30. Chen DY, Swerdlow HP, Harke HR, Zhang JZ, Dovichi NJ: **Low-cost, high-sensitivity laser-induced fluorescence detection for DNA sequencing by capillary gel electrophoresis.** *J Chromatogr* 1991, **559**(1-2):237-246.
 31. Lee MK, Kim HR: **[Comparison between Real-Time PCR and Agarose Gel Electrophoresis for DNA Quantification.]** *Korean J Lab Med* 2006, **26**(3):217-222.
 32. Miscicka-Sliwka D, Grzybowski T, Wozniak M: **Optimization of a hexaplex DNA amplification from short tandem repeat and amelogenin loci.** *Electrophoresis* 1997, **18**(9):1627-1632.
 33. Marino MA, Devaney JM, Davis PA, Girard JE: **Optimization of intercalation dye concentration for short tandem repeat allele genotyping using capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection.** *Journal of chromatography B, Biomedical sciences and applications* 1999, **732**(2):365-374.
 34. Day IN, Spanakis E, Chen X, O'Dell SD: **Microplate array diagonal gel electrophoresis for mutation research in DNA banks.** *Electrophoresis* 1999, **20**(6):1250-1257.
 35. Ranade SS, Chung CB, Zon G, Boyd VL: **Preparation of genome-wide DNA fragment libraries using bisulfite in polyacrylamide gel electrophoresis slices with formamide denaturation and**

- quality control for massively parallel sequencing by oligonucleotide ligation and detection. *Analytical biochemistry* 2009, **390**(2):126-135.
36. Liu GH, Nakamura T, Amemiya T, Rajendran N, Itoh K: **Analysis of Bacterial Populations in the Environment Using Two-dimensional Gel Electrophoresis of Genomic DNA and Complementary DNA.** *Microbes Environ* 2011.
 37. Collins FS, Guyer MS, Charkravarti A: **Variations on a theme: cataloging human DNA sequence variation.** *Science* 1997, **278**(5343):1580-1581.
 38. Taillon-Miller P, Piernot EE, Kwok PY: **Efficient approach to unique single-nucleotide polymorphism discovery.** *Genome Res* 1999, **9**(5):499-505.
 39. Crow EW, Crow JF: **100 years ago: Walter Sutton and the chromosome theory of heredity.** *Genetics* 2002, **160**(1):1-4.
 40. Schafer KA: **The cell cycle: a review.** *Veterinary pathology* 1998, **35**(6):461-478.
 41. Lodish H, Berk A, Kaiser CA, Krieger M, Scott MP, Bretscher A, Ploegh H, Matsudaira P: **Molecular Cell Biology.** *Sixth Edition copyright 2007* 2007.
 42. Nelson DL, Cox MM: **Lehninger Principles of Biochemistry.** *Fifth Edition copyright 2008* 2008.
 43. Rowley JD: **Letter: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining.** *Nature* 1973, **243**(5405):290-293.
 44. Berger SL: **Histone modifications in transcriptional regulation.** *Current opinion in genetics & development* 2002, **12**(2):142-148.
 45. Nakao M: **Epigenetics: interaction of DNA methylation and chromatin.** *Gene* 2001, **278**(1-2):25-31.
 46. Hu S, Dovichi NJ: **Capillary electrophoresis for the analysis of biopolymers.** *Analytical chemistry* 2002, **74**(12):2833-2850.
 47. Kennedy RT: **Bioanalytical applications of fast capillary electrophoresis.** *Anal Chim Acta* 1999, **400**:163-180.
 48. Issaq HJ: **A decade of capillary electrophoresis.** *Electrophoresis* 2000, **21**(10):1921-1939.
 49. Paez X, Hernandez L: **Biomedical applications of capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection.**

- Biopharm Drug Dispos* 2001, **22**(7-8):273-289.
50. Jiang RM, Chang YS, Chen SJ, Chen JH, Chen HC, Chang PL: **Multiplexed microRNA detection by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence.** *Journal of chromatography A* 2011, **1218**(18):2604-2610.
 51. Chang PL, Chang YS, Chen JH, Chen SJ, Chen HC: **Analysis of BART7 microRNA from Epstein-Barr virus-infected nasopharyngeal carcinoma cells by capillary electrophoresis.** *Analytical chemistry* 2008, **80**(22):8554-8560.
 52. Shih YC, Liao CR, Chung IC, Chang YS, Chang PL: **Simultaneous separation of five major ribonucleic acids by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence in the presence of electroosmotic flow: application to the rapid screening of 5S rRNA from ovarian cancer cells.** *Anal Chim Acta* 2014, **847**:73-79.
 53. Yu MH, Huang YC, Chang PL: **Rapid screening of the heterogeneity of DNA methylation by single-strand conformation polymorphism and CE-LIF in the presence of electro-osmotic flow.** *Electrophoresis* 2014, **35**(16):2378-2385.
 54. Mucic RC, Storhoff JJ, Mirkin CA, Letsinger RL: **DNA-Directed Synthesis of Binary Nanoparticle Network Materials.** *J Am Chem Soc* 1998, **120**:12674.

參與學術會議

1. 2015 APCE 第 15 屆 亞太地區微分離及分析研討會
2. 2014 年中國化學年會
3. 2015 年中國化學年會
4. 第二十屆分析化學技術交流研討會
5. 第二十二屆分析化學技術交流研討會
6. 2016 分析化學小組春季研討會