

目錄

中文摘要.....	III
英文摘要.....	IV
誌謝.....	V
目錄.....	VI
表目錄.....	X
圖目錄.....	XI
第一章 文獻回顧.....	1
1-1 DNA 氧化損傷與 DNA 鹼基之切除修復.....	1
1-2 hMYH 在 DNA 氧化損傷修復機制中所扮演的角色...	3
1-3 何謂單核? 酸多態性.....	5
1-4 大腸直腸癌的介紹.....	6
1-5 hMYH 單核? 酸多態性與大腸直腸癌的相互關係. . . .	7
1-6 Allele-Specific PCR 的介紹.....	9
1-7 研究動機.....	11
第二章 實驗材料及裝置.....	13

2-1	DNA 來源.....	13
2-2	引子的選擇與設計.....	15
2-3	實驗藥品.....	17
2-4	實驗生化試劑.....	19
2-5	實驗儀器設備.....	21
第三章 實驗方法.....		23
3-1	確認分析方法的可行性.....	23
3-2	大腸直腸癌的組織 genomic DNA 之 <i>hMYH</i> 突變熱點篩選.....	24
3-3	改善 AS-PCR 引子之特異性.....	26
3-3.1	改變 dNTP 混合比例.....	26
3-3.2	不同對偶性引子設計.....	27
第四章 實驗結果與討論.....		40
4-1	探討 DNA 模板濃度對 AS-PCR 的影響.....	40
4-1.1	針對突變點 G382D 探討 DNA 模板濃度的影響	41
4-1.2	針對突變點 Y165C 探討 DNA 模板濃度的影響	42

4-1.3	針對突變點 V232F 探討 DNA 模板濃度的影響	45
4-1.4	針對突變點 R227W 探討 DNA 模板濃度的影響	46
4-2	探討 DNA 模板稀釋倍數與引子接合溫度對 AS-PCR 的影響.....	48
4-2.1	探討 DNA 模板濃度對 AS-PCR 靈敏度與引子特異性之影響.....	49
4-2.2	探討引子接合溫度對 AS-PCR 引子特異性之影響	52
4-3	檢體 DNA 之特定突變點篩選結果與討論.....	55
4-3.1	AS-PCR 檢測結果.....	57
4-3.2	定序分析.....	61
4-4	探討 dNTP 混合比例對 AS-PCR 引子特異性之影響...	64
4-4.1	對突變點 G382D 探討 dNTP 混合比例的影響..	65
4-4.2	對突變點 Y165C 探討 dNTP 混合比例的影響..	71
4-4.3	對突變點 V232F 探討 dNTP 混合比例的影響..	72

4-4.4	對突變點 R227W 探討 dNTP 混合比例的影響 .	74
4-5	不同對偶性引子設計.....	75
4-5.1	在引子 3' 端倒數第二位置增加一鹼基錯配 AS-PCR 的影響.....	76
4-5.2	引子 3' 端磷酸化修飾.....	79
4-5.3	引子 3' 端 AminoC6 修飾.....	82
第五章	結論與建議.....	85
5-1	結論.....	85
5-2	建議.....	87
第六章	參考文獻.....	89
附錄一	98
附錄二	99
簡歷	104

表目錄

表 1	最常見的 <i>hMYH</i> 突變點處核? 酸改變及其相應氨基酸 改變的情形.....	8
表 2-1	30 位大腸直腸癌患者之統計分析.....	15
表 2-2	AS-PCR 之引子序列.....	16
表 2-3	定序引子序列.....	16
表 2-4	為 Y165C 突變點設計之引子序列.....	17
表 2-5	本論文使用藥品一覽表.....	17
表 2-6	本論文使用生化試劑一覽表.....	19
表 2-7	本論文使用儀器設備一覽表.....	21
表 3-1	檢體突變點篩選, 預計所有可能結果.....	25
表 4-1	探討 DNA 模板濃度影響之各突變點的 PCR 熱循環條件	40
表 4-2	探討 DNA 模板濃度影響之各突變點的 PCR 反應溶液配方	41
表 4-3	探討 DNA 模板稀釋倍數與引子接合溫度影響之 PCR 反 應溶液配方.....	49
表 4-4	探討 DNA 模板稀釋倍數與引子接合溫度影響之 PCR 熱 循環條件.....	49
表 4-5	檢體 DNA 定量表.....	56
表 4-6	檢體 DNA 突變點篩選之 PCR 反應溶液配方.....	57

圖目錄

圖 1-1	人類細胞中 DNA 鹼基氧化損傷修復機制.....	5
圖 1-2	在大腸直腸癌病例中, 目前已被發現的 <i>hMYH</i> 突變點..	9
圖 1-3	Allele-Specific PCR 原理.....	11
圖 2-1	質體 <i>pET21ahMYH</i> 示意圖.....	14
圖 2-2	含野生型(A)及突變型(B)之 <i>hMYH</i> 質體的定序分析...	14
圖 2-3	DNA Marker 圖譜.....	20
圖 3-1	不同引子修飾之分子結構圖.....	29
圖 3-2	限制? 酵素切割 DNA 的示意圖.....	33
圖 3-3	聚合? 連鎖反應示意圖.....	38
圖 3-4	DNA 定序示意圖.....	39
圖 4-1	DNA 模板濃度對 AS-PCR 偵測突變點 G382D 的影響..	42
圖 4-2	DNA 模板濃度對 AS-PCR 偵測突變點 Y165C 的影響..	44
圖 4-3	DNA 模板濃度對 AS-PCR 偵測突變點 V232F 的影響..	45
圖 4-4	DNA 模板濃度對 AS-PCR 偵測突變點 R227W 的影響..	46
圖 4-5	DNA 模板濃度對 AS-PCR 的影響.....	51
圖 4-6	引子接合溫度對 AS-PCR 特異性之影響.....	54

圖 4-7	檢測檢體 DNA(CRC 38 與 CRC39)之 <i>hMYH</i> 突變點 G382D 之電泳圖.....	58
圖 4-8	檢測檢體 DNA(CRC 98)之 <i>hMYH</i> 突變點 Y165C 的電泳圖.....	59
圖 4-9	檢測檢體 DNA(CRC 102, CRC 103 與 CRC 104)之 <i>hMYH</i> 突變點 V232F 的電泳圖.....	60
圖 4-10	PCR 擴增包含 G382 之電泳圖.....	62
圖 4-11	PCR 擴增包含突變點 Y165 與 V232 之電泳圖.....	62
圖 4-12	定序分析腫瘤檢體 genomic DNA 之 PCR 產物.....	63
圖 4-13	針對 G382D 探討 dNTP 混合比例對於 PCR 反應特異性的影響.....	67
圖 4-14	PCR 產物經限制? <i>Bgl</i> II 切割後之電泳圖.....	69
圖 4-15	限制? <i>Bgl</i> II 剪切 DNA 的示意圖.....	70
圖 4-16	不平衡的 dNTP 混合比例之 PCR 產物定序分析.....	71
圖 4-17	針對 Y165C 探討不同 dNTP 混合比例對於 PCR 反應特異性的影響.....	72
圖 4-18	針對 V232F 探討不同 dNTP 混合比例對於 PCR 反應特異性的影響.....	72

圖 4-19	針對 R227W 探討 dNTP 混合比例對於 PCR 反應特異性的影響.....	74
圖 4-20	反置引子增加鹼基錯配之 PCR 產物之電泳圖.....	78
圖 4-21	檢體 DNA(CRC 95 與 104)PCR 產物之電泳圖.....	79
圖 4-22	引子磷酸修飾且使用 Pfu 酵素之 PCR 產物電泳圖.....	81
圖 4-23	引子磷酸修飾且使用 Vent 酵素之 PCR 產物電泳圖.....	82
圖 4-24	AminoC6 修飾之引子 PCR 產物之電泳圖.....	84