

## 第二章 實驗材料及裝置

### 2-1 DNA 來源

#### 1、質體DNA(plasmid DNA)

選擇兩種已重組的*pET21ahMYH*質體，一種含野生型*hMYH*基因，另一種含點突變的*hMYH*基因突變(6A→C)，並將其分別轉型入BL-21 Gold strain的宿主細胞中〔彭富山, 2003〕，圖2-1為*pET21ahMYH*質體之示意圖。將此細胞經由大量培養後，以Qiagen mini-preparation kit分別萃取質體DNA，將此兩種質體DNA分別命名為野生型質體DNA(含野生型*hMYH*基因)與突變型質體DNA(含點突變的*hMYH*基因突變)。並且以限制酶切割及DNA定序分析以確認質體DNA。圖2-2為此兩種質體DNA定序分析，其中紅色箭頭指出兩種DNA在該位置核苷酸的差異。而本實驗將使用該兩種質體DNA探討改善AS-PCR方法的可信度。

#### 2、檢體DNA

本研究所使用之檢體DNA全部由台中榮民總醫院檢體中心提供。其分別從已被診斷患有不同程度之大腸直腸癌的病人身上按標準程序取下腫瘤組織，另外再取距離癌組織約十公分處之正常組織作為對照組，最後組織再以分離純化genomic DNA，本實驗室從檢體中心取回30對組織之genomic DNA，並且儲存於-20 °C的環境下。表2-1為

30位大腸直腸癌患者之統計分析。

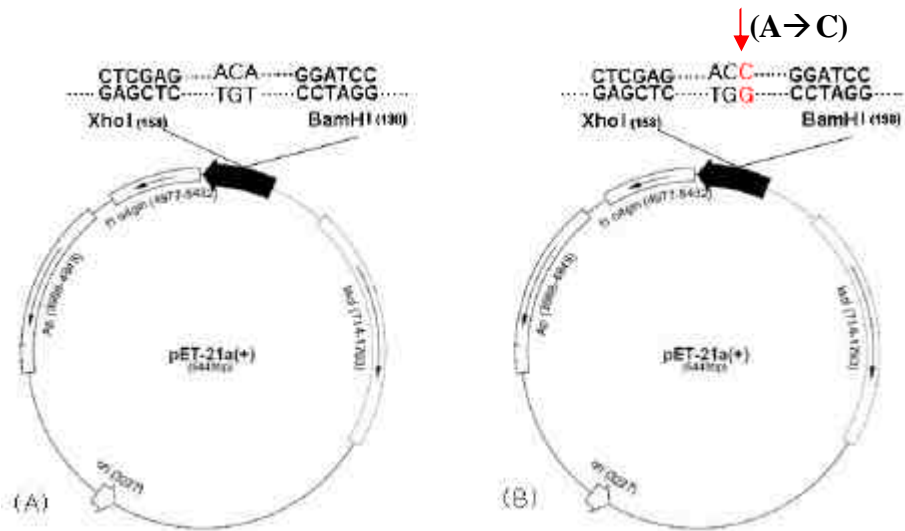


圖2-1 質體pET21ahMYH示意圖。含*hMYH*基因之野生型(A)及含*hMYH*基因突變之突變型質體DNA(B)，箭頭指出質體DNA點突變處。

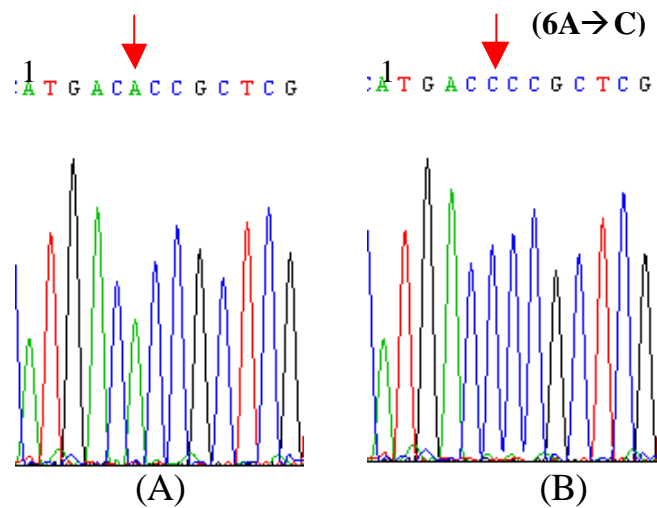


圖2-2 含野生型(A)及突變型之*hMYH*質體的定序分析。圖(B)箭頭指出突變型質體DNA核? 酸點突變處(6A→C)。

表2-1 30位大腸直腸癌患者之統計分析

Characteristics	Number	( % )
性別		
男	14	( 46.7 % )
女	16	( 53.3 % )
年齡(歲)	Mean : 67.7 , Range( 32 ~ 86 )	
<50 歲	3	( 10.0 % )
50-60 歲	5	( 16.7 % )
60-70 歲	8	( 26.7 % )
70-80 歲	7	( 23.3 % )
>80 歲	7	( 23.3 % )

## 2-2 引子的選擇與設計

本研究所用之引子主要是依據 *hMYH* 基因序列與不同突變熱點位置所設計。表 2-2 為 AS-PCR 偵測 G382D、Y165C、V232F 與 R227W 突變點所設計的引子，引子的 3'端為突變點的位置；表 2-3 為各突變點定序引子；表 2-4 為針對 Y165C 突變點所設計的引子，引子的 3'端有不同的設計，其目的為增加引子與模板的延伸阻力，詳細原理請參見 3-3.2 節。本實驗使用的引子除了 3'末端有特殊修飾之引子是委託由伯森生物科技有限公司合成之外，其餘皆由明欣生物科技有限公司合成。

表 2-2 AS-PCR 之引子序列

Mutation		Primer name	Primer sequence 5'→3'
G382D	Forward	THU-MYH-5	5'-CCAACACTGGACAGTGCCACCT-3'
	WT Reverse	THU-MYH-6	5'-ACAGTCCTGCCAGCAGAC-3'
	MT Reverse	THU-MYH-7	5'-ACAGTCCTGCCAGCAGAT <u>T</u> -3'
Y165C	Forward	THU-MYH-1	5'-CTACTATACCGGATGGATGC-3'
	WT Reverse	THU-MYH-2	5'-CGCCGGCCACGAGAATAGT-3'
	MT Reverse	THU-MYH-3	5'-CGCCGGCCACGAGAATAG <u>C</u> -3'
V232F	Forward	THU-MYH-1	5'-CTACTATACCGGATGGATGC-3'
	WT Reverse	THU-MYH-12	5'-TCAGCACCAATGGCTCGGAC-3'
	MT Reverse	THU-MYH-13	5'-TCAGCACCAATGGCTCGGA <u>A</u> -3'
R227W	Forward	THU-MYH-1	5'-CTACTATACCGGATGGATGC-3'
	WT Reverse	THU-MYH-10	5'-CTCGGACACGGCACAGCACCCG-3'
	MT Reverse	THU-MYH-11	5'-CTCGGACACGGCACAGCACCC <u>A</u> -3'
質體 DNA 點突變處	WT Forward	Primer 1	5'-GTCGCGGATCCATGACA-3'
	MT Forward	Primer 2	5'-GTCGCGGATCCATGACC-3'
	WT reverse	THU-MYH-2	5'-CGCCGGCCACGAGAATAGT-3'

”WT”表示為 wild type specific，野生型特異性引子；”MT”表示 mutant specific，突變型特異性引子。

表 2-3 定序引子序列

Mutation		Primer name	Primer sequence 5'→3'
G382D	Forward	THU-MYH-5	5'-CCAACACTGGACAGTGCCACCT-3'
	Reverse	THU-MYH-8	5'-CCTTGCTGGGCTACTATTCT-3'
Y165C	Forward	THU-MYH-53	5'-AAGTGGCCTACACTGCAGGA-3'
	Reverse	THU-MYH-54	5'-CGCTGTGGGGTACACACTGT-3'
V232F	Forward	THU-MYH-53	5'-AAGTGGCCTACACTGCAGGA-3'
	Reverse	THU-MYH-54	5'-CGCTGTGGGGTACACACTGT-3'

表 2-4 為 Y165C 突變點設計之引子序列

Mutation		Primer name	Primer sequence 5'→3'
Y165C	Forward	THU-MYH-1	5'-CTACTATACCGGATGGATGC-3'
	WT Reverse	THU-MYH-2	5'-CGCCGGCCACGAGAATAGT-3'
	MT Reverse	THU-MYH-3	5'-CGCCGGCCACGAGAATAG <u>C</u> -3'
	Reverse	THU-MYH-2M	5'-CGCCGGCCACGAGAATA <u>CT</u> -3'
	Reverse	THU-MYH-3M	5'-CGCCGGCCACGAGAATA <u>CC</u> -3'
	Reverse	THU-MYH-2P	5'-CGCCGGCCACGAGAATAGT( <u>P</u> )-3'
	Reverse	THU-MYH-3P	5'-CGCCGGCCACGAGAATAG <u>C(P)</u> -3'
	Reverse	THU-MYH-DJ1	5'-CGCCGGCCACGAGAATAG <u>C(aa)</u> -3'

”WT”表示為 wild type specific，野生型特異性引子；”MT”表示 mutant specific，突變型特異性引子。”(P)”表示磷酸化修飾，”(aa)”表示 AminoC6 修飾。

## 2-3 實驗藥品

本論文所使用的實驗藥品相關資訊如下表 2-5 所示。

表 2-5 本論文使用藥品一覽表

藥品名稱	廠商	產品序號
Agar	USB (Cleveland, OH, USA)	US10906
Agarose	USB (Cleveland, OH, USA)	32803
Ampicillin	Sigma (St. Louis, MO, USA)	A-0166
Ethidium bromide	USB (Cleveland, OH, USA)	US32813
Ethyl alcohol	Showa (Tokyo, Japan)	0502-3160

Glycerol	NIHON SHIYAKU (Osaka, Japan)	170292
Hydrochloric acid	Merck (Darmstadt, Germany)	1.00317.2000
QIAprep® spin Miniprep Kit	Qiagen (Hilden, Germany)	27106
Sodium chloride	Merck (Darmstadt, Germany)	1.06404.1000
TAE buffer 50X	Merck (Darmstadt, Germany)	444125D
Tryptone	USB (Cleveland, OH,USA)	US12855
Yeast extract	USB (Cleveland, OH,USA)	US23547

## 2-4 實驗生化試劑

本論文所使用的實驗生化試劑相關資訊如下表 2-6 所示，圖 2-3 為 DNA Marker 圖譜。

表 2-6 本論文使用生化試劑一覽表

藥品名稱	廠商	產品序號
100 bp ET marker	Blossom (Taipei, Taiwan)	GPM04
100 Base Pair DNA ladder	MDBio (Taipei, Taiwan)	WSDL100
dATP	New England Biolabs (Ipswich, Australia)	N0446S
dTTP	New England Biolabs (Ipswich, Australia)	N04466S
dCTP	New England Biolabs (Ipswich, Australia)	N04466S
dGTP	New England Biolabs (Ipswich, Australia)	N04466S
Taq DNA polymerase	MDBio (Taipei, Taiwan)	101-9012-90-2
Pfx	Stratagene (La Jolla, USA)	600380
Vent	New England Biolabs (Ipswich, Australia)	M0254S

Restriction enzyme <i>Bam</i> HI	New England Biolabs (Ipswich, Australia)	R0136S
Restriction enzyme <i>Xho</i> I	New England Biolabs (Ipswich, Australia)	R0146S
Restriction enzyme <i>Bgl</i> II	New England Biolabs (Ipswich, Australia)	R0144S

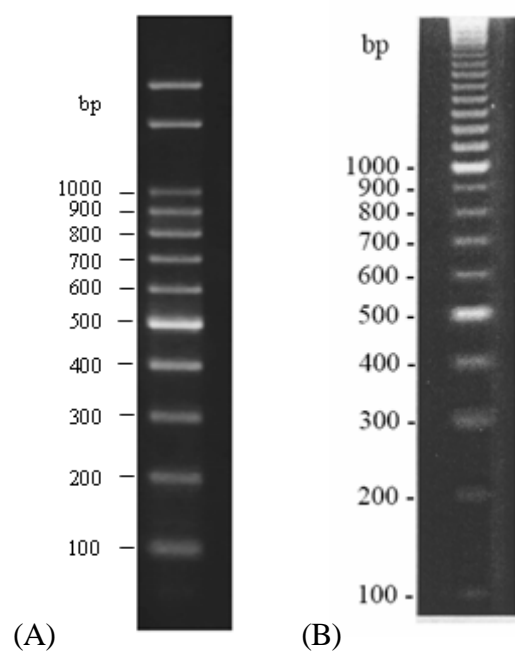


圖 2-3 DNA Marker圖譜 (A)與(B)分別為 100 bp ET marker (Blossom)與 100 Base Pair DNA ladder(MDBio)圖譜。



## 2-5 實驗儀器設備

本論文所使用的儀器設備如下表 2-7 所示：

表 2-7 本論文使用儀器設備一覽表

儀器名稱	製造商名稱	型號
微量移液吸取器 (micro-pipette)	Eppendorf (Hamburg, Germany)	Research 1000/200/100/20/2.5
紫外線及可見光光譜儀 (UV/visible Spectrophotometer)	Spectronic instruments (New York, USA)	Genesys2
滅菌釜 (Autoclaver)	Trident (California, USA)	EA-635
微量電子天秤 (micro-Electronic Balance Meter)	OHAUS (New Jersey, USA)	AR1530
一般冰箱( 4°C) (refrigerator)	TECO (Taipei, Taiwan)	RE7222
低溫冰箱( -20°C) (Low temperature refrigerator)	Fisher&Paykel (Queensland, Australia)	Standard H160
超低溫冰箱( -80°C) (Ultra-low temperature Freezer)	Thermo (Waltham, USA)	Forma-86 ULT Freezer
電源供應器 (power supply)	Bio-Rad (Hercules, USA)	Power Pac Basic
DNA 膠體電泳槽 (DNA electrophoresis cell)	Amersham Bioscience (Buckinghamshire, UK)	Hofer HE33
DNA/蛋白質影像系統 (DNA/protein Imaging system)	Kodak (Taipei, Taiwan)	DC290

DNA/蛋白質影像分析系統 (DNA/protein Imaging analysis system)	Kodak (Taipei, Taiwan)	1D Image Analysis
聚合? 連鎖反應儀 (PCR instrument)	Applied Biosystems (Foster, USA)	Gene Amp PCR System9700
離心機 (centrifuge)	Eppendorf (Hamburg, Germany)	5415D
水? 級超純水機 (Diamond Ultrapure Water system)	Barnstead (Dubuque, Iowa, USA)	NANO pure Dlamond™
2/3D 震盪器 (2/3D Waver)	MAJOR SCIENCE (Taipei, Taiwan)	MW-23
試管震盪器 (Vortex-Mixer)	Scientific Industries (New York, USA)	VORTEX-2 GENIE