

第三章 實驗方法

文獻顯示*hMYH*的G382D、Y165C、V232F和R227W突變熱點對*hMYH*的修復功能有一定的影響 [Sampson *et al.*, 2005]。本研究主要是利用AS-PCR方法來檢測修復基因*hMYH*中的SNPs。實驗分為三個階段：一、確認分析方法的可行性，二、大腸直腸癌的組織genomic DNA之*hMYH*突變熱點篩選，三、改善AS-PCR引子之特異性。

3-1 確認分析方法的可行性

在文獻回顧中提到利用AS-PCR技術正確地檢測SNP，除了要有適當的PCR反應條件與反應試劑外，恰當的引子設計也很重要。本研究在各突變熱點分別設計其對偶基因特異性引子對(allele specific primers)，詳細引子序列請見表2-2；在檢測檢體genomic DNA是否含各突變熱點前，先以含*hMYH*基因的質體DNA為模板，在不同變因下判斷AS-PCR的可行性。本階段又可分成兩個部分：

(1)以野生型質體DNA為模板，在不同模板濃度下，探討DNA模板濃度，不同突變點其對偶基因特異性引子的特異性（實驗結果請見4-1章節）。

(2)將野生型與突變型質體DNA，分別在相同濃度下以不同比例混合，且將混合的DNA稀釋不同的倍數，在不同稀釋倍數DNA模板濃

度與引子接合溫度下，探討對AS-PCR之靈敏度與引子特異性(實驗結果請見4-2章節)。

3-2 大腸直腸癌的組織genomic DNA之*hMYH*突變熱點篩選

在利用3-1章節實驗方法確定對偶基因特異性引子的特異性與AS-PCR之可行性後，緊接著是對檢體DNA突變點的篩選。

每一個大腸直腸癌病人都有分別萃取自正常組織與腫瘤組織的genomic DNA樣品。在突變點篩選之前，我們會先以正常組織的genomic DNA做為模板(對照組)，並分別以野生型對偶性引子與突變型對偶性引子進行PCR反應，藉此找尋最佳的PCR反應溶液配方與PCR熱循環之條件。我們預計結果可能會有三種情況，如表3-1 所示：

第一種是以腫瘤檢體之DNA為模板並以野生型特異性引子進行PCR反應後，可得到目標產物，而使用突變型特異性引子時，則完全無PCR產物訊息。這樣的結果表示該腫瘤檢體之DNA無此突變點，可將其判定為陰性結果。

第二種結果是以腫瘤檢體之DNA為模板並以野生型特異性引子進行PCR反應後，沒有PCR產物訊息，而使用突變型特異性引子時，則有PCR產物訊息。這樣的結果表示此腫瘤檢體之DNA含有此突變點，此即為陽性結果。

第三種結果是以腫瘤檢體之DNA為模板並以野生型特異性引子與突變型特異性引子進行PCR反應後，皆有PCR產物訊息，這表示此腫瘤檢體之DNA在這DNA片段中，同時含有正常與突變DNA，因此在這腫瘤檢體DNA中，部分DNA含有此突變點，因此亦同樣判定為陽性結果。

此外，當所有檢體DNA經此分析方法篩選後，我們會隨機挑選檢體DNA，且使用定序之引子(為各突變點所設計之定序引子，如表2-2所示)進行PCR反應後，接著將PCR產物委託明欣科技公司執行定序。最後將藉定序分析方法得到的結果與實驗結果進行比對，以進一步驗證本研究之實驗結果(實驗結果請見在4-3章節)。

表3-1 檢體突變點篩選，預計所有可能結果

檢體DNA \ Primer	Wild type specific primer			Mutant specific primer		
	1	2	3	1	2	3
-	✓			x		
++		x			✓	
+			✓			✓

“✓”表示有PCR產物；“x”表示沒有PCR產物。

“-”表示為陰性結果；“+”表示為陽性結果。

3-3 改善AS-PCR引子之特異性

3-3.1 改變dNTP混合比例

4-1~4-2 章節之實驗結果顯示，AS-PCR 的可信度會受到 DNA 模板濃度與引子接合溫度的影響。而 PCR 擴增效率與 dNTP 的總濃度有密切的關係，過量的 dNTP 會抑制 Taq DNA 聚合酶的活性因而增加聚合反應的錯誤率；而降低 dNTP 濃度則減少 PCR 產量，但卻能提高 DNA 聚合酶的連鎖反應的忠實性，因而降低引子錯配，增加 PCR 之特異性與靈敏度〔張建裕與張建國, 2004〕。

此外，dNTP 的不平衡可能會導致基因突變，而這或許也是造成 *hMYH* 基因突變的原因。因此在 4-4 章節是以野生型質體 DNA 為模板，在固定 DNA 模板濃度，改變 $[GC]/[AT]$ ($[dGTP+dCTP]/[dATP+dTTP]$) 混合比例，針對不同的突變位置，探討 dNTP 的不平衡對 PCR 產物的影響即對 AS-PCR 反應特異性的影響。以下為不同 dNTPs 濃度的配法的詳細介紹。

dNTP 的濃度設計是以不同 $[GC]/[AT]$ 比例混合而成， $[GC]/[AT]$ 混合比例有 1:1、3:2、7:3、4:1、9:1 或 2:3、3:7、1:4、1:9。例如，當 $[GC]/[AT]$ 為 1:1 時，其 $[dGTP]$ 、 $[dCTP]$ 、 $[dATP]$ 與 $[dTTP]$ 濃度皆為 20 mM，故總濃度為 80 mM。當 $[GC]/[AT]$ 為 3:2 時，

其[dGTP] [dCTP] [dATP]與[dTTP]濃度分別為 30 30 20 與 20 mM；當[G]/[A]為 2：3 時，其[dGTP]、 [dCTP]、 [dATP]與[dTTP]個別濃度分別為 20、 20、 30 與 30 mM，其總濃度為 100 mM。而其它[G]與[A]混合比例分別為 3：7、 7：3、 4：1、 1：4、 9：1 與 1：9，其配法同上，總濃度皆為 100 mM。

3-3.2 不同對偶性引子設計

(1)在引子 3'端倒數第二的位置增加錯配

文獻中指出在靠近引子的 3'端增加額外鹼基錯配可增加 AS-PCR 之可信度 [Newton *et al.*, 1989]。因此本章節將選擇以 Y165C 突變點所設計對偶基因特異性引子為例加以改善。分別將野生型特異性引子 (THU-MYH-2)與突變型特異性引子(THU-MYH-3) 3'末端倒數第二個鹼基設計一錯配，並將其分別命名為 THU-MYH-2M 與 THU-MYH-3M(詳細引子序列請見表 2-3)。

以野生型質體 DNA 為模板，分別以 THU-MYH-2M 與 THU-MYH-3M 為反置引子；當 DNA 模板與 THU-MYH-2M 結合時雖會形成一個 bubble，但由於 3'端的配對在有 Taq 聚合酶催化反應時，此引子仍可與 DNA 模板延伸，故會有 PCR 產物。而 DNA 模板與 THU-MYH-3M 時，引子末端與 DNA 模板有兩個鹼基錯配，在經

Taq 聚合? 催化反應時, 產生引子與 DNA 模板的延伸阻力, 導致降低 PCR 產物量或無產物產生。

確定此種引子設計方法可提高引子之特異性後, 接著隨機挑選檢體 genomic DNA, 希望藉此再次驗證 4-3 章節檢體篩選之結果。

(2)採用有修飾之引子(modified-primer)

文獻中提到 AS-PCR 在偵測 SNP 可藉由引子的 3' 端的特殊修飾, 增加引子延伸的阻力 [Liao *et al.*, 2005]。當引子與模板形成錯配, 引子 3' 端的修飾和錯配的核? 酸就會被具有修復功能的聚合? (Pfu 與 Vent)修復移除阻礙, 因此引子就會繼續延伸, 則會得到 PCR 產物; 反之如果引子與模板正常配對, 就無法被有修復功能的聚合? 辨識與移除, 引子因阻礙而無法延伸, 則無法獲得 PCR 產物。

增加引子之特異性的引子修飾常見的包括鎖核酸(Locked Nucleic Acid, 簡稱 LNA)修飾 [Latorra *et al.*, 2003]、硫基磷酸化修飾 (phosphorothioate- modified; 簡稱 PS-modified) [Liao *et al.*, 2005]。圖 3-1 中(B)與(C)分別是在引子上作鎖核酸與硫基磷酸化修飾之分子結構圖 [Latorra *et al.*, 2003; King *et al.*, 2004]; 鎖核酸與硫基磷酸化的修飾鎖住了五碳糖 3 號(C3')位置, 因此增加了下一個核? 酸延伸的阻力。

同上述概念，本實驗是以野生型質體 DNA 為模板且使用具有 3' → 5' 修復功能的 DNA 聚合酶 (Pfu 與 Vent)，並且針對 Y165C 突變點所設計之野生型特異性引子 (THU-MYH-2) 與突變型特異性引子 (THU-MYH-3)，分別在引子的 3' 端設計了磷酸修飾 (phosphate-modified)，並分別命名為 THU-MYH-2P 與 THU-MYH-3P。另外亦將 THU-MYH-3 引子的 3' 端以 aminoC6 修飾，引子名稱為 THU-MYH-DJ1，詳細引子序列請見表 2-2。圖 3-6 中 (D) 與 (E) 分別為引子 3' 端磷酸修飾與 aminoC6 修飾的結構圖。

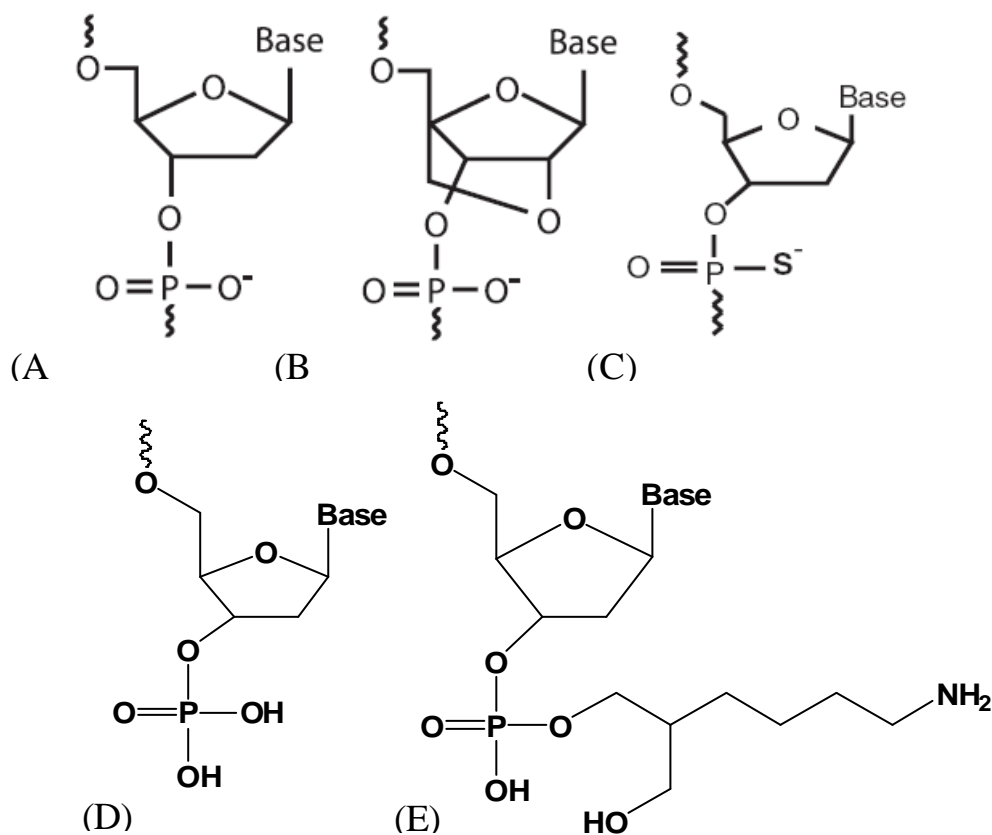


圖 3-1 不同引子修飾之分子結構圖。A 為 DNA 分子結構；B、C、D 與 E 為引子分別被、鎖核酸、硫基磷酸、磷酸與 aminoC6 修飾之分子結構圖。

以下分別對於本研究會使用到之實驗方法：(1)細菌培養、(2)製備質體 DNA、(3)DNA 限制？切割反應、(4)DNA 濃度的測定、(5)瓊脂凝膠(Agarose gel)的製備與 DNA 電泳法(Agarose gel electrophoresis)、(6)聚合？連鎖反應(Polymerase Chain Reaction ; PCR)、及(7)DNA 定序 (Sequencing) 做更詳細的介紹。

(1)細菌培養

1. 從液態氮中取出帶有質體的大腸桿菌，於 37 °C 水浴退冰後，接種在含有抗生素 ampicillin 的 LB 培養基上，並且倒置培養皿在 37 °C 培養箱中。
2. 從培養基中挑選單一菌落接種至含有 ampicillin 之 5 ml LB 培養液的試管，以 37°C 轉速 150 rpm 下進行隔夜培養。
3. 隔天從試管中取出 2 mL 菌液，移入含有 100 ml LB 新鮮培養液(含 ampicillin)的錐形瓶中，以 37°C 轉速 150 rpm 下震盪搖晃，培養 2 小時。

【 Ampicillin (50 mg / ml)溶液製備 】

秤取 0.5 g 的 ampicillin 並加 ddH₂O(滅過菌之去離子水)至 10 ml，保存於-20 °C 冰箱。

【LB (Luria-Bertani)培養液(含 AMP)製備】

分別秤取 8 g 的 Tryptone、4 g 的 Yeast extract 和 8 g 的 NaCl 使其完全溶解於去離子水，並調整溶液體積為 800 ml，待滅菌完畢後，冷卻至室溫再加入 800 μ l 的 ampicillin(50 mg / ml)，混合均勻後保存於 4 冰箱。

(2)製備質體 DNA：Qiagen mini-preparation

1. 收集細菌細胞,將菌液批次倒入 1.5 ml 微量離心管中以轉速 6000xg 進行離心，在室溫下離心 5 分鐘後，隨即將上清液完全地移去，保留沉澱之細菌。
2. 將沈澱的細菌加入 250 μ l 的緩衝溶液 P1 使其重新懸浮，並將其液體轉移到 1.5 ml 微量離心管。
3. 再加入 250 μ l 的緩衝溶液 P2, 蓋上蓋子並且立即以上下翻轉 5~10 次的方式使液體混合完全。
4. 再加入 350 μ l 的緩衝溶液 N3, 蓋上蓋子並且立即以上下翻轉 5~10 次的方式混合該液體。
5. 用桌上型微量離心機以最高速離心 10 分鐘即可得白色沈澱物。
該沈澱物含有蛋白質與細菌基因組 DNA。

6. 將上澄清轉移至(Qiaprep)離心管柱(Spin column)。(註: 不要吸到任何白色沈澱物。)
7. 用桌上型微量離心機以最高速離心 30 秒, 將通過管柱之液體移除。
8. 加入 750 μ l 的緩衝溶液 PE 來洗滌管柱, 同步驟 6 將通過管柱之液體移除。
9. 將管柱換至微量離心管, 並且於最高速離心一分鐘使管柱物質乾燥 (此步可移除殘留的酒精。酒精是緩衝溶液 PE 的成份之一。酒精會干擾之後的 DNA 操作)。
10. 將管柱置於一個乾淨的 1.5 ml 微量離心管。將離心管標上記號。加入 20 μ l 去離子水於管柱物質的中心 (但是不要碰到白色管柱物質) 來洗提出 DNA。靜置至少一分鐘使 DNA 溶解於水, 接著再以最高速離心一分鐘。
11. 最後將所得 DNA 保存於-20 。

(3)DNA 濃度的測定

1. 取 5 μ l 的 DNA 溶液與 495 μ l 的去離子水混合均勻(DNA 體積稀釋 100 倍)。

2. 空白組為去離子水，以去離子水來校正紫外線分光光度計(使用波長為 260 nm)。
3. 校正完畢後將去離子水換成已稀釋樣品並且讀取樣品數值。
4. 在測定 DNA 樣品溶液時，由於每一 A_{260} 單位相當於 50 ng / μ l 的 DNA 濃度，最後經由換算便可得原 DNA 濃度。
(註：DNA 濃度(ng/ μ l) = 讀取的 A_{260} 值 \times 稀釋倍數 \times 50)
5. 量測完畢後將石英比色槽分別以石英比色槽清洗用液與去離子水沖洗乾淨後，乾燥完畢保存於防潮箱。

【石英比色槽清洗用液】分別量取 150 ml 的 HCl (0.1 M)與 300 ml 的酒精 (95%)置入 500 ml 洗滌瓶)。

(4)DNA 限制? 切割反應(DNA Restriction Digest)

核酸限制內切? (或稱限制?)是遺傳工程技術中所使用的切割工具。依據其作用模式的不同，限制? 可被區分為三類，然而在基因選殖上以第二類限制? 最為重要。它的特色是每一種酵素都只能辨識特定的 DNA 序列，並且只會切在此序列上。經由第二類的限制? 剪切過的切口主要使 DNA 片段的 5'和 3'端形成兩種型式，一為平端 (blunt end) 型式，如圖 3-2 所示為 *Alu* I 切割方式；另一種型式為

黏滯端 (sticky end), 圖 3-2 所示為 *Xho* I 和 *Bam*HI 的切割方式。經由限制? 剪切開的 DNA 片段可藉由瓊脂凝膠體電泳, 根據不同大小之 DNA 片段的泳動速度不同來分離純化並加予檢定。進行限制? 切割反應時, 所需材料有: DNA、限制?、反應緩衝液及其他成份。反應溫度通常為 37 , 反應時間為 30~90 分鐘不等。

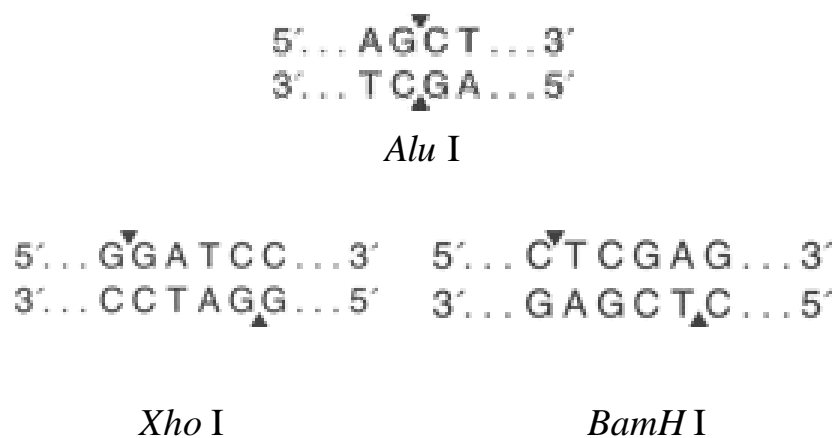


圖 3-2 限制? 酵素切割 DNA 的示意圖 [www.neb.com]。

(5)瓊脂凝膠(Agarose gel)的製備與瓊脂凝膠體電泳(Agarose gel electrophoresis)

瓊脂凝膠體電泳主要是由於核酸帶負電荷, 因此在電泳膠體中的核酸於電場作用下會穿過瓊脂膠體的孔隙並朝向正極移動。藉由不同分子量的核酸在膠體孔洞中泳動的速度不同, 可將不同大小的核酸分開。核酸位置的觀察主要是藉由在製作膠體時, 先行將 ethidium bromide (EtBr) 加入膠體內, 所加入的 EtBr 會嵌入核酸鹼基中, 如此一來, 當使用適當波長之紫外光照射核酸時, 便可觀察核酸的位置。

1.5% Agarose gel之製備

1. 秤取1.2 g的Agarose與80 ml的1X TAE buffer置於一錐形瓶。
2. 放入微波爐加熱至完全溶解。
3. 取出Agarose溶液並降溫至60 左右，加入20 μ l的0.2% 溴以錠 (Ethidium bromide ; EtBr)，輕輕搖晃錐形瓶使EtBr混合均勻後。
4. 倒入製膠模型中(若有氣泡，則可用吸管尖端將其移除)，之後架上齒梳(Comb)。待其冷卻成凝膠後，輕輕將齒梳向上拉開，便可將瓊脂凝膠從製膠模型取出，用保鮮膜封存至於4 冰箱中備用(一週內均可使用)。

【1X TAE buffer製備】取16 ml的50X TAE buffer置入一1L血清瓶中，並加去離子水至800 ml，滅菌後備用。

【Ethidium bromide (EtBr)溶液製備】

2% (w/v)的 EtBr：秤取 0.2 g 的 Ethidium bromide 置入 15 ml 的離心管 (將錫箔紙包覆在離心管外，避免光線直接照射 EtBr)，並加去離子水至溶液總體積為 10 ml。

0.2% (w/v)的 EtBr：取 1 ml 的 2% EtBr 置入一 15 ml 離心管(將錫箔紙包覆在離心管外，避免光線直接照射 EtBr)，並加入 9 ml 的去離子

水，使之均勻混合後保存於室溫。

瓊脂凝膠體電泳(Agarose gel electrophoresis)

1. 將配好的瓊脂凝膠放入電泳槽中(電泳液為1X TAE buffer，瓊脂凝膠的放置位子應將孔洞朝負電極處)。
2. 將DNA marker置入第一個孔洞，做為DNA分子量與濃度的比較。
3. 再分別將DNA與6X DNA loading dye混合均勻後(混合比例，DNA：6X DNA loading dye = 5：1(v/v))加入其餘孔洞中。
4. 以80伏特的電壓進行電泳分析(此時帶負電的DNA分子會在瓊脂凝膠中由負極向正極移動)，待50分鐘後，停止電泳並取出膠體。
5. 放在UV透射光源板上，將電泳結果拍照存檔。

(註：EtBr為致癌劑。)

(6)聚合？連鎖反應(Polymerase Chain Reaction；PCR)

聚合？連鎖反應(PCR)的原理幾乎仿效自然界中DNA合成的機制。它可以在很短的時間內且在極少量的DNA情況下，於體外或試管內(*in vitro*)，放大特定基因或DNA序列的量。

PCR反應的合成步驟如圖3-3 所示，先要在要擴增的雙股DNA片段上，個別設計前置引子(forward primer)及反置引子(reverse primer)；

藉由提高溫度使雙股DNA變性成單股(稱為變性作用, denaturation); 接著將上述引子對與已經變性的單股DNA作配對結合(稱為引子接合作用, annealing); 接著利用DNA聚合酶分別以兩股DNA做為模板, 引子接合處為起點, 合成新的DNA股(稱為延長作用, extension); 重複變性、引子結合與延長作用, 每經過一個週期, 雙股DNA即以倍數成長, 在30個週期後, 即可獲得足夠我們利用的DNA片段。

進行PCR反應時, 所需材料有: 模板DNA(genomic DNA或tissue genomic DNA)、10X reaction buffer、 $MgCl_2$ 、dNTPs (內含dATP、dTTP、dCTP、dGTP)、前置引子、反置引子、DNA聚合酶 (DNA polymerase) 與滅菌過之去離子水。

將所有材料依實驗需求, 以一定的量與濃度加至滅菌過的0.2 ml 微量離心管, 接著放入聚合酶連鎖反應器, 再根據實驗需求設定熱循環操作條件(循環溫度、時間及循環回數), 進行變性作用、引子接合作用和延長作用, 反應結束後, 取出微量離心管, 進一步以瓊脂凝膠電泳分析產物。

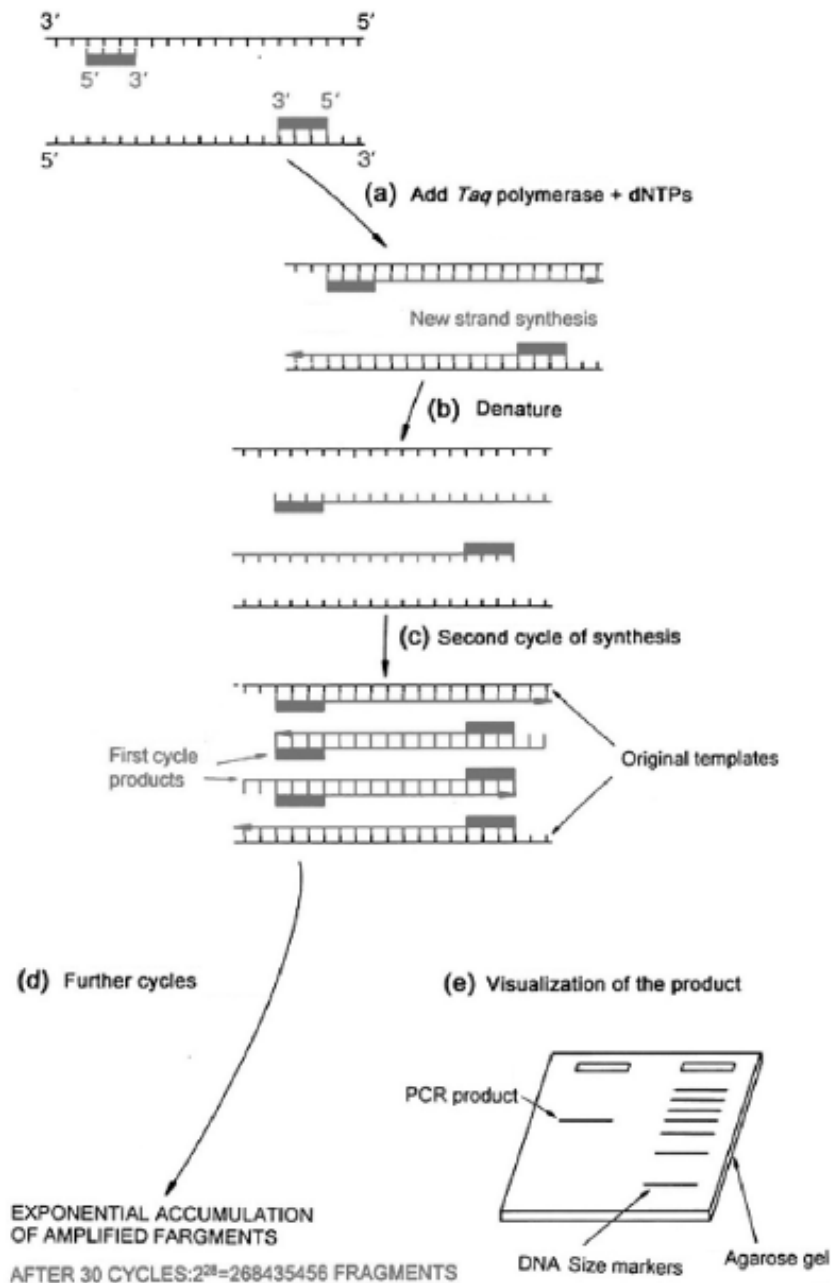


圖3-3 聚合？連鎖反應示意圖 [Brown, 2001]。

(7)DNA 定序 (Sequencing)

本實驗之定序工作是委由明欣科技公司以自動定序儀 (ABI PRISM Model 3730) 執行。此 DNA 定序儀是採用 Sanger Method (Dideoxynucleotide chain termination)方法。原理是以 DNA 為模板，加入適當比例的 dNTPs、聚合？和四種不同螢光標示的核？酸的類似

物 ddNTPs (ddATP、ddTTP、ddCTP、ddGTP), 進行 PCR 反應。由於這些核? 酸類似物缺少 3'-hydroxyl group, 故無法與下一個核? 酸的 5'-phosphate group 形成 phosphodiester bond, 使得 DNA 合成反應會終止在這些類似核? 酸的位置上, 因而造成各種長短不一的 DNA 片段。接著再以毛細管電泳技術將這些長短不一的 DNA 片段分離, 最後透過雷射光激發, 並利用 CCD (Charge Couple Device) 偵測每一片段不同螢光的組合來判讀 DNA 序列, 如圖 3-4 所示。

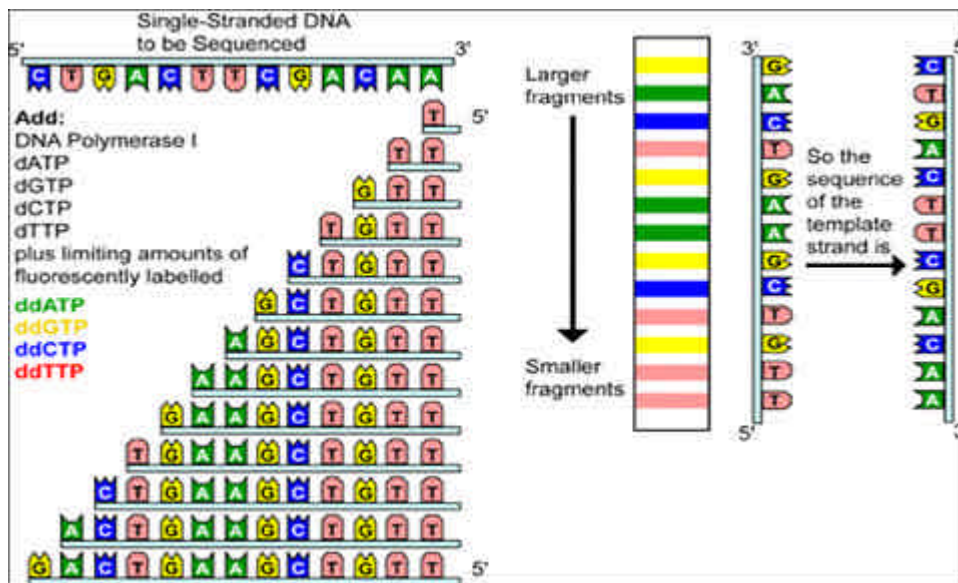


圖 3-4 DNA 定序示意圖。

[http://www.clinical-virology.org/pages/cvn/vir_all/cvn_gp_how.html]