

## 第四章 實驗結果與討論

### 4-1 探討 DNA 模板濃度對 AS-PCR 的影響

本章節是以質體DNA為模板，在不同變因下判斷AS-PCR的可行性。在本節是以野生型質體DNA為模板，探討在不同模板濃度下，不同突變點其對偶性引子的特異性。

另外， $Mg^{2+}$ 濃度會影響酵素的活性，因此本實驗一開始有嘗試不同 $Mg^{2+}$ 濃度，如0、0.5、1及1.5 mM，發現在本實驗條件下， $Mg^{2+}$ 濃度為1.5 mM時，Taq酵素反應活性最佳。

野生型質體DNA原始濃度為60 ng/  $\mu$ l，預先將野生型質體DNA以滅過菌之去離子水稀釋至濃度分別有30、15、1.5、0.15、0.015及0.0015 ng/  $\mu$ l。各突變點之對偶性引子、PCR反應之熱循環條件以及溶液配方如表2-2、表4-1 和表4-2 所示。

表 4-1 探討 DNA 模板濃度影響之各突變點的 PCR 熱循環條件

30 cycles					
94	94	Ta	72	72	4
5 min	1 min	0.5 min	1 min	7 min	

註：G382D、Y165C、V232F 及 R227W 突變熱點之引子接合溫度(Ta)分別為 62、62 和 60、60.2、64 。

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

反應材料	濃度	體積(μl)
ddH <sub>2</sub> O	\	38.25
10X reaction buffer	\	5
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	3
dNTPs	20 mM	1
DNA	\	1
Forward primer	20 μM	0.5
Reverse primer	20 μM	0.5
Taq (MDBio)	5 U/ μl	0.75
反應總體積		50

#### 4-1.1 針對突變點 G382D 探討 DNA 模板濃度的影響

PCR 產物經由電泳分析結果如圖 4-1 所示。從中可看出，當 DNA 模板濃度過高(60 ng/50 μl 以上)時，野生型與突變型對偶性引子之 PCR 產物訊號都很強；濃度過低(0.15 ng/50 μl)時，兩者訊號都太弱(訊號的強弱表示 PCR 產物量的多寡)；因此模板濃度太高或太低導致無法很明顯的判別對偶性引子的特異性。但是在適當之 DNA 模板濃度範圍(1.5~30 ng/50 μl)則會有隨著濃度遞減而有特異性遞增的情況。

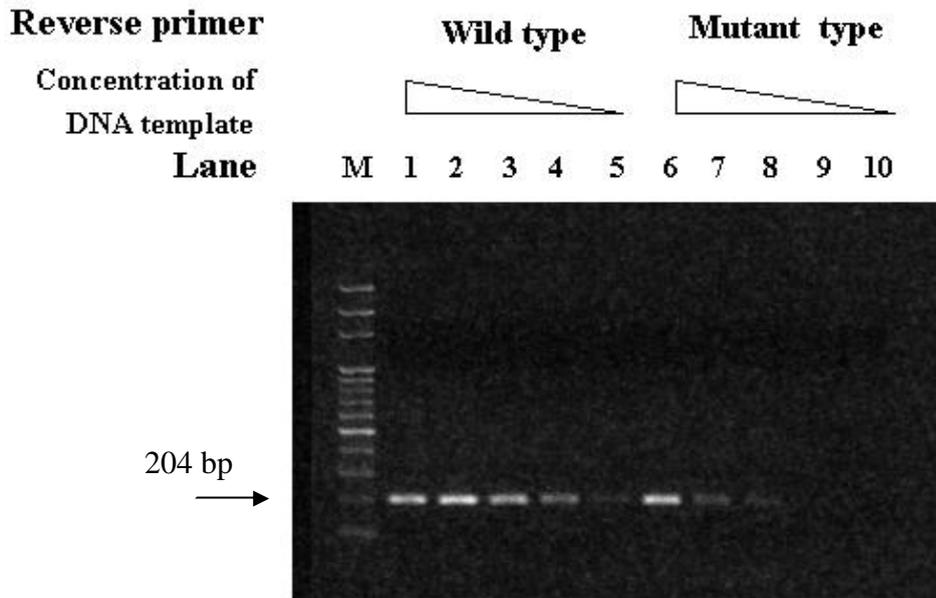


圖 4-1 DNA 模板濃度對 AS-PCR 偵測突變點 G382D 的影響。Lane M 為 DNA marker。前置引子為 THU-MYH-5；Lanes 1~5 反置引子為野生型對偶性引子，THU-MYH-6；lanes 6~10 反置引子為突變型對偶性引子，THU-MYH-7；Lanes 1 和 6、2 和 7、3 和 8、4 和 9、5 和 10 野生型質體 DNA 模板濃度分別為 60、30、15、1.5 與 0.15 ng/50 $\mu$ l；引子接合溫度為 62 。

#### 4-1.2 針對突變點 Y165C 探討 DNA 模板濃度的影響

PCR 產物經由電泳分析結果如圖 4-2 之(A)。從圖中可看出，當引子接合溫度為 62 時，不管是野生型或突變型對偶性引子的 PCR 產物訊號都不強(產量低)，因此這個引子接合溫度不甚理想，可能是由於引子接合溫度過高所導致。但可從圖 4-2 看出，在 DNA 模板濃度為 1.5 與 0.15 ng/50  $\mu$ l 時，依此溫度進行實驗仍可區分出對偶性引子的特異性。因此，若再進一步調降引子接合溫度應可進一步提高 PCR 產物量。

我們將引子接合溫度降低為 60 ，PCR 產物經由電泳分析結果如

圖 4-2 之(B)。從中可看出，當引子接合溫度為 60 時，PCR 產物量有較 62 時產量增加，但是引子的特異性卻降低，即在 60 時較無法區分野生型與突變型對偶性引子。

因此對 Y165C 所設計的對偶性引子，當引子接合溫度為 62 時，在低 DNA 模板濃度(1.5 與 0.15 ng/50  $\mu$ l)時，可顯現引子的特異性，但 PCR 產量卻不高；當引子接合溫度調降為 60 時，雖有助於提升 PCR 產物產量，但不管在哪種濃度下(60 30 15 1.5 與 0.15 ng/50  $\mu$ l)，均看不出引子的特異性。因此在這 DNA 模板濃度範圍，以此對偶性引子來偵測 Y165C 突變點，若要顯現出引子的特異性，則在引子接合溫度為 62 時較為適合。

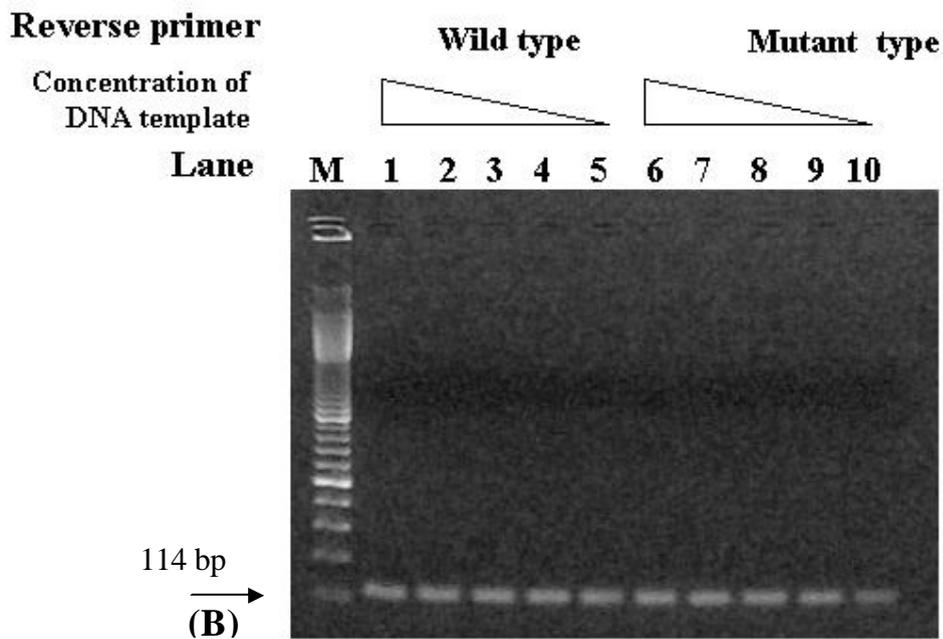
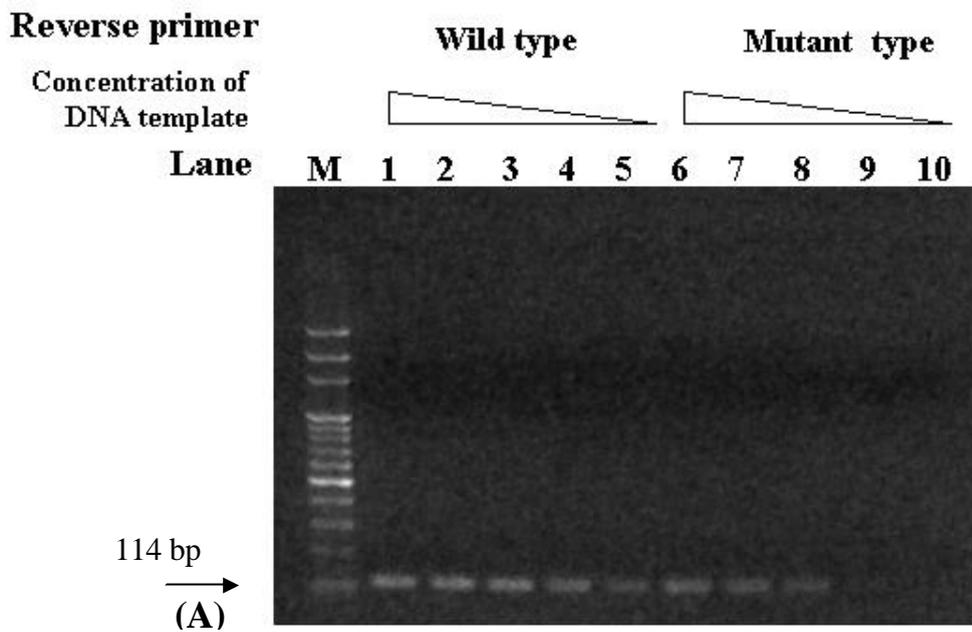


圖 4-2 DNA 模板濃度對 AS-PCR 偵測突變點 Y165C 的影響。Lane M 為 DNA marker。前置引子為 THU-MYH-1；lanes 1~5 反置引子為野生型對偶性引子，THU-MYH-2；lanes 6~10 反置引子為突變型對偶性引子，THU-MYH-3；lanes 1 和 6、2 和 7、3 和 8、4 和 9、5 和 10 野生型質體 DNA 模板濃度分別為 60、30、15、1.5 與 0.15 ng/50  $\mu$ l。(A)與(B)引子接合溫度分別為 62 及 60 。

### 4-1.3 針對突變點 V232F 探討 DNA 模板濃度的影響

PCR 產物經由電泳分析結果如圖 4-3 所示。從圖中可得知，在引子接合溫度為 60.2 時，當 DNA 模板濃度範圍為 60~0.015 ng/50  $\mu$ l 時，對偶性引子的特異性高；但當 DNA 模板濃度太低(低於 0.015ng/50  $\mu$ l)時，會沒有 PCR 產物。

與 4-1.2 與 4-1.3 章節比較，此分析條件引子特異性，在偵測突變點 V232F 比 G382D 與 Y165C 佳；換句話說，在突變點 V232F 的部份，即在較高濃度下也可區別出野生型與突變型對偶性引子的不同。

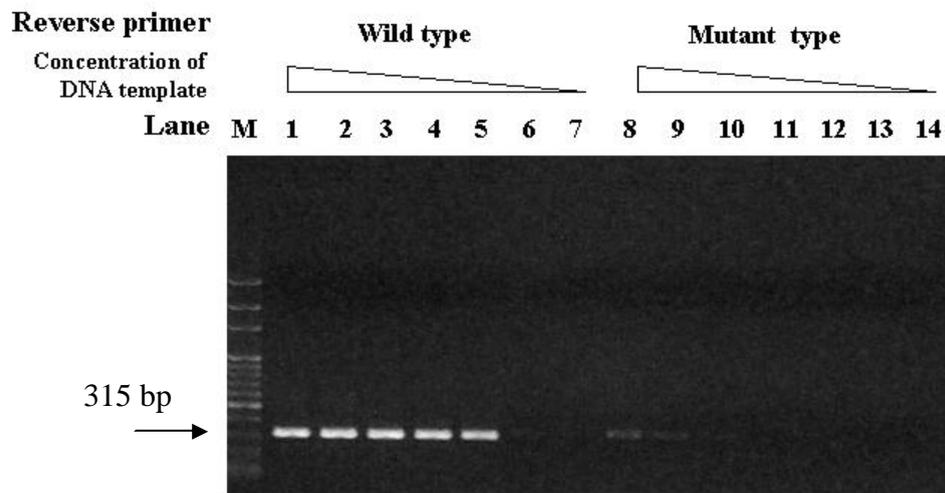


圖 4-3 DNA 模板濃度對 AS-PCR 偵測突變點 V232F 的影響。Lane M 為 DNA marker。前置引子為 THU-MYH-1；lanes 1~7 反置引子為野生型對偶性引子，THU-MYH-12；lanes 8~14 反置引子為突變型對偶性引子，THU-MYH-13；lanes 1 和 8、2 和 9、3 和 10、4 和 11、5 和 12、6 和 13、7 和 14 野生型質體 DNA 模板濃度分別為 60、30、15、1.5、0.15、0.015 與 0.0015 ng/50  $\mu$ l。引子接合溫度為 60.2 。

#### 4-1.4 針對突變點 R227W 探討 DNA 模板濃度的影響

PCR 產物經由電泳分析結果如圖 4-4 所示。從中得知，在引子接合溫度為 64 時，DNA 模板濃度過高(60 ng/50  $\mu$ l 以上)時，野生型與突變型對偶性引子之 PCR 產物訊號都很強；濃度過低(0.015 ng/50  $\mu$ l)時，兩者訊號都太弱；因此模板濃度太高或太低則不能明顯的區別兩者。但是當 DNA 模板濃度在 1.5 與 0.15 ng/50  $\mu$ l 時，即可清楚的判別對偶性引子的特異性。

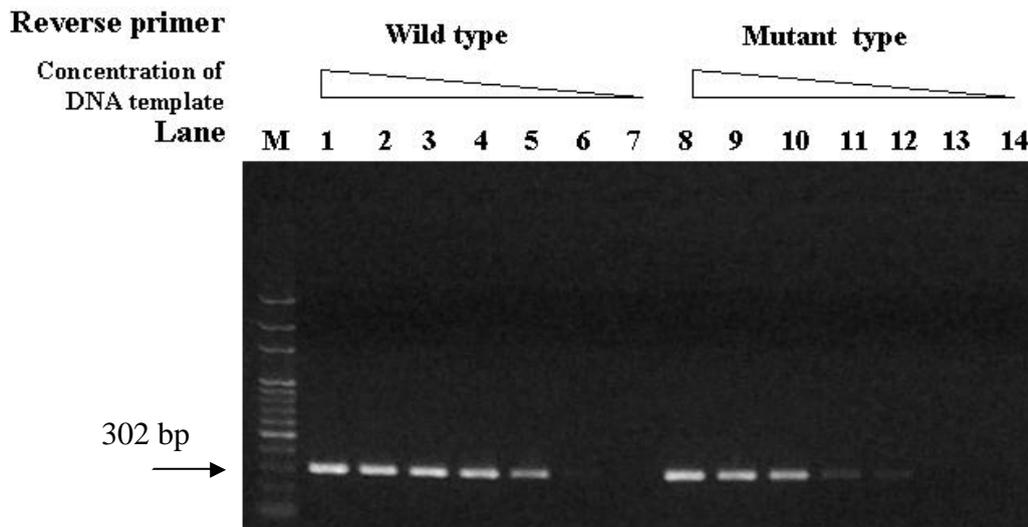


圖 4-4 DNA 模板濃度對 AS-PCR 偵測突變點 R227W 的影響。Lane M 為 DNA marker。前置引子為 THU-MYH-1；lanes 1~7 反置引子為野生型對偶性引子，THU-MYH-10；lanes 8~14 反置引子為突變型對偶性引子，THU-MYH-11；lanes 1 和 8、2 和 9、3 和 10、4 和 11、5 和 12、6 和 13、7 和 14 野生型質體 DNA 模板濃度分別為 60、30、15、1.5、0.15、0.015 與 0.0015 ng/50  $\mu$ l。引子接合溫度為 64 。

總括來說，從圖 4-1、4-2、4-3 與 4-4 之結果顯示，採用同樣的方法檢測不同的突變點，特異性皆不相同。其中以突變點 V232F 的特異性最高，接下來依序是突變點 G382D 與突變點 R227W，最不理想的則是突變點 Y165C。

因為我們所使用的 DNA 模板為野生型，模板鹼基與各突變點 (G382D、Y165C、V232F 及 R227W) 所設計的對偶性引子其 3' 端鹼基的錯配分別為 G/T、A/C、G/A 與 C/A，在使用 Taq DNA 聚合酶 (不具 3' → 5' 外切修復功能) 情況下，這四種錯配，其延伸的程度不同：A/C > C/A > G/T > G/A。因此在這四種錯配情況下，引子特異性以 G/A 最好，接著依序為 G/T、C/A 與 A/C。

## 4-2 探討 DNA 模板稀釋倍數與引子接合溫度對 AS-PCR 的影響

本章節在維持相同總DNA模板濃度下，將野生型與突變型質體DNA以不同比例混合，且將混合的DNA稀釋不同的倍數，藉此探討在不同的模板濃度與引子接合溫度下，對AS-PCR引子特異性的影響。

我們在突變型DNA點突變的位置(見圖2-1)設計了對偶性引子，分別為野生型與突變型對偶性前置引子，primer 1及primer 2；反置引子皆為THU-MYH-2，引子詳細序列請見表2-2。突變型與野生型質體DNA原始濃度皆為50 ng/  $\mu$ l，將其以不同比例混合，而突變型質體DNA佔總DNA之比例分別為0、30、60及100% (v/v)，並將混合過的DNA體積分別稀釋10、100、1000與10000倍。

在 4-2.1 章節將引子接合溫度固定在 60.1 下，探討模板濃度對 AS-PCR 靈敏度與引子特異性之影響。在 4-2.2 章節將上述各種比例混合的 DNA 稀釋 1000 倍，且選擇不同的引子接合溫度(63 與 66 )，以探討其對 AS-PCR 引子特異性之影響 PCR 熱循環條件與反應溶液配方如表 4-3 與表 4-4 所示。

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

反應材料	濃度	體積(μl)
ddH <sub>2</sub> O	\	38.25
10X reaction buffer	\	5
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	3
dNTPs	20 mM	1
DNA	\	1
Forward primer	20 μM	0.5
Reverse primer	20 μM	0.5
Taq	5 U/μl	0.75
總反應體積	\	50

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

30 cycles					
94	94	Ta	72	72	4
5 min	1 min	0.5 min	1 min	7 min	

註：引子接合溫度(Ta)為 60.1、63 和 66 。

#### 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

圖 4-5 所示,我們可以發現當突變型質體 DNA 佔總 DNA 比例增加時,以突變型對偶性引子所得之 PCR 產物量會隨之增加,而以野生型對偶性引子所得之 PCR 產物量會隨之遞減;相同地,當突變型質體 DNA 佔總 DNA 比例減少(即野生型質體 DNA 佔總 DNA 比例增

加)時，以突變型對偶性引子所得之 PCR 產物量會隨其遞減，而以野生型對偶性引子所得之 PCR 產物量則會隨之遞增。從這結果可看出對偶性引子對模板的專一性。

從圖 4-5 我們也可發現當 DNA 模板濃度稀釋倍數愈多時(即 DNA 模板濃度愈小時)，愈能區別出對偶性引子的特異性，此結果與 4-1 章節所得之結果相符，因此適當地稀釋 DNA 模板濃度將有助於提升 AS-PCR 引子的特異性。

另外，我們也可發現在 100 % 為突變型質體 DNA 時，若選用引子接合溫度為 60.1 °C，以野生型對偶性引子進行 PCR 反應，即使 DNA 模板濃度稀釋至 10000 倍，仍有微弱的 PCR 產物訊號；同樣地，在無突變型質體 DNA(即 100 % 為野生型質體 DNA)，以突變型對偶性引子，也有微弱的 PCR 產物訊號。這可能是引子接合溫度太低，導致 PCR 選擇性降低。因此在 4-2.2 我們試著將引子接合溫度從 60.1

提升至 63 °C 與 66 °C，探討在不同引子結合溫度時，該 DNA 混合比例與稀釋倍數對 AS-PCR 引子特異性之影響。

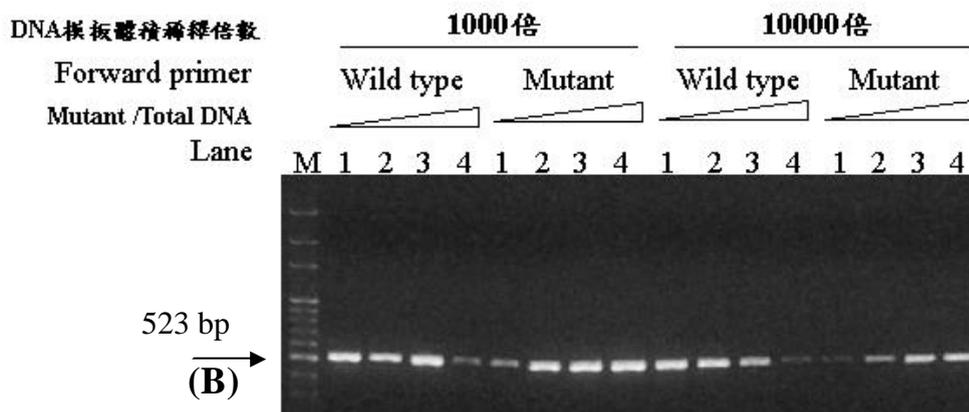
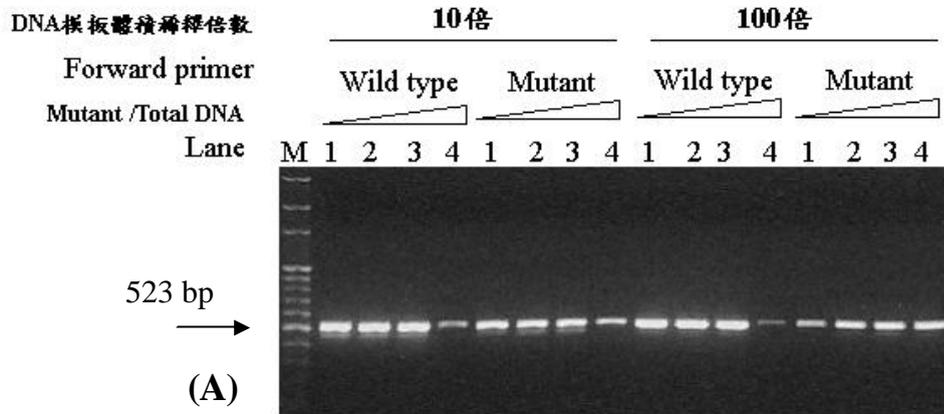


圖 4-5 DNA 模板濃度對 AS-PCR 的影響。Lane M 為 DNA marker；野生型對偶性引子、突變型對偶性引子及前置引子分別為 primer 1、primer 2 與 THU-MYH-2；lanes 1、2、3 與 4 DNA 混合比例(Mutant/Total %)分別為 0、30、60 與 100 %；引子接合溫度為 60.1。 (A)與(B) DNA 模板體積稀釋倍數分別為 10 和 100、1000 和 10000 倍。

#### 4-2.2 探討引子接合溫度對 AS-PCR 引子特異性之影響

比較圖 4-5 之(B)與圖 4-6，DNA 總濃度為 50 ng/  $\mu$ l 稀釋倍數皆為 1000 倍，其引子接合溫度則分別為 60.1、63 與 66。從圖可以發現隨著引子接合溫度的上升，對偶性引子的專一性也隨之增加，尤其是在 100% 突變型質體 DNA 與 0% 突變型質體 DNA 下，分別以野生型對偶性引子與突變型對偶性引子之 PCR 產物，會隨著引子接合溫度增加而 PCR 產物訊息變弱，這結果突顯了引子接合溫度對對偶性引子特異性的影響。

另外，在 100% 為突變型 DNA 與 0% 突變型 DNA 下，分別以野生型與突變型對偶性引子之 PCR 產物訊號的強弱並不相等；導致其結果可能的原因，除了在 DNA 定量與稀釋時所產生的人為誤差，也有可能是由於 DNA 模板與特別引子之鹼基錯配不同所造成的。我們可以發現本研究所設計的 DNA 模板與對偶性引子有兩種錯配即 G/A(突變型質體 DNA 鹼基/野生型對偶性引子 3' 末端鹼基)與 T/C(野生型質體 DNA 鹼基/突變型對偶性引子 3' 末端鹼基)。

從文獻 [ Hung *et al.*, 1992 ; Latorra *et al.*, 2003 ] 得知，不一樣的錯配對 PCR 反應引子延伸的程度有影響；如模板鹼基與引子 3' 末端鹼基的錯配分別為 C/C、G/G、A/G、G/A 時其引子的延伸程度很差

(poor extension) , 而 T/C 錯配其引子延伸程度很好(rapid extension) ; 因此 G/A 比 T/C 錯配的擴增特異性(specific amplification)好 , 而這部份論點與我們的實驗結果符合 ; 故推論此因素可能是造成在 100 % 突變型質體 DNA 與 0 % 突變型質體 DNA 下 , 分別以野生型對偶性引子與突變型對偶性引子之 PCR 產物訊號的強弱並不相等的可能原因。

總括來說 , 在 4-2.1 章節中 , 可看出 AS-PCR 方法對 DNA 濃度的靈敏度至少可達到  $5 \times 10^{-3}$  ng/  $\mu$ l。綜合 4-1 與 4-2 章節的實驗結果顯示 , 稀釋 DNA 模板濃度與提昇引子接合溫度有助於提昇 AS-PCR 的分辨率 , 即可提高對偶性引子與 DNA 模板接合的專一性 , 因而更能顯示對偶性引子的特異性。

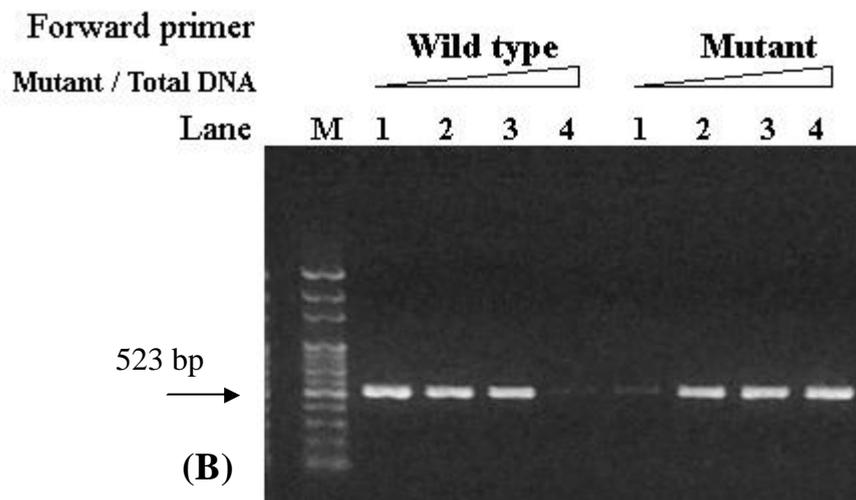
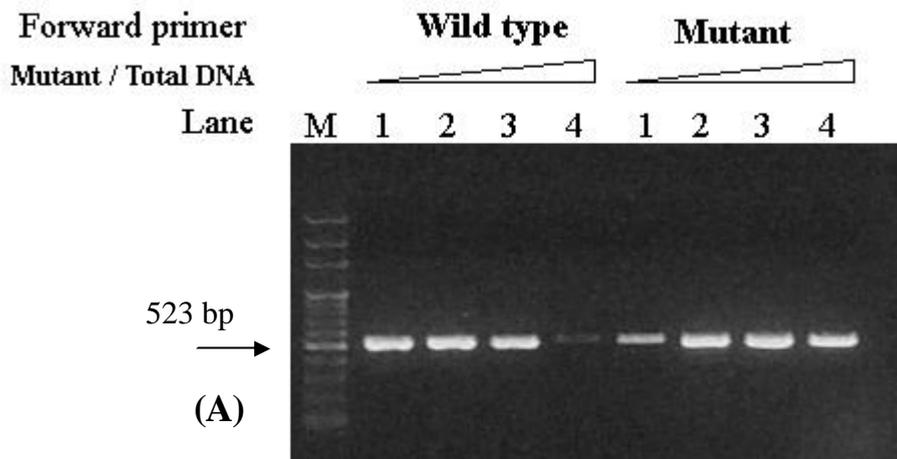


圖 4-6 引子接合溫度對 AS-PCR 特異性之影響。Lane M 為 DNA marker。野生型對偶性引子、突變型對偶性引子及前置引子分別為 primer 1、primer 2 與 THU-MYH-2；lanes 1、2、3 與 4 DNA 混合比例(Mutant/Total %)分別為 0、30、60 與 100 %。DNA 模板體積稀釋倍數為 1000 倍。(A)與(B)引子接合溫度分別為 63、66 。

### 4-3 檢體 DNA 之特定突變點篩選結果與討論

將從台中榮總醫院檢體庫取得之30對組織的genomic DNA，將其定量結果整理成表4-5。表中之編號是指？位大腸直腸癌病人之檢體在台中榮總醫院檢體庫的編號，而每一編號均有兩種genomic DNA其分別取自腫瘤與正常組織。為了降低組織的genomic DNA使用量，PCR總反應體積由50  $\mu$ l調整為25  $\mu$ l，並將genomic DNA模板調整約為150 ng/25 $\mu$ l時，在確定AS-PCR的靈敏度可達到此模板濃度後，將PCR反應溶液所用之genomic DNA模板固定約為150 ng/25  $\mu$ l，並依照所測得之檢體 genomic DNA濃度，調整反應時所加入之genomic DNA的體積，並整理於表4-5 中。

我們將對30個腫瘤組織之 genomic DNA與30個正常組織之 genomic DNA分別篩選G382D、 Y165C及V232F三個突變熱點，並且隨機挑選腫瘤組織之genomic DNA以定序引子所獲得的PCR產物，委託明欣生物科技有限公司定序，加以驗證本研究之實驗結果。篩選各突變點所需要的引子、PCR反應溶液配方及熱循環操作條件請見表2-2、表4-6 和表4-7。

表 4-5 檢體 DNA 定量表

Tissue genomic DNA(Tumour)		編號	Tissue genomic DNA(Normal)	
Conc.(ng/ml)	Template Volume (ml)		Conc.(ng/ml)	Template Volume (ml)
325	0.5	CRC 038	320	0.5
230	0.67	CRC 039	310	0.5
210	0.74	CRC 040	310	0.5
290	0.52	CRC 051	285	0.52
240	0.625	CRC 052	300	0.5
260	0.58	CRC 056	255	0.58
420	0.36	CRC 068	290	0.52
285	0.53	CRC 069	450	0.33
410	0.37	CRC 070	425	0.37
420	0.36	CRC 071	320	0.47
325	0.48	CRC 074	315	0.48
365	0.41	CRC 075	410	0.37
350	0.45	CRC 076	330	0.45
350	0.43	CRC 077	410	0.37
430	0.35	CRC 078	430	0.35
325	0.48	CRC 079	340	0.48
315	0.48	CRC 080	335	0.48
310	0.48	CRC 084	290	0.52
275	0.55	CRC 090	215	0.70
400	0.38	CRC 091	270	0.56
275	0.55	CRC 092	145	1.03
400	0.375	CRC 094	380	0.39
325	0.46	CRC 095	630	0.24
405	0.37	CRC 097	615	0.24
890	0.17	CRC 098	850	0.18
585	0.26	CRC 099	420	0.36
385	0.39	CRC 101	275	0.55
270	0.56	CRC 102	1350	0.11
155	0.97	CRC 103	1000	0.15
665	0.23	CRC 104	260	0.57

“Template Volume”為了將 PCR 反應溶液配方之 DNA 模板固定約為 150 ng/25  $\mu$ l，依照所測得之檢體 DNA 濃度，調整反應時所需之 DNA 模板體積。

表 4-6 檢體 DNA 突變點篩選之 PCR 反應溶液配方

反應材料	濃度	體積(μl)
ddH <sub>2</sub> O	\	V <sub>2</sub> <sup>*</sup>
10X reaction buffer	\	2.5
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	1.5
dNTPs	20 mM	0.5
DNA	\	V <sub>1</sub> <sup>*</sup>
Forward primer	20 μM	0.25
Reverse primer	20 μM	0.25
Taq (MDBio)	5 U/ μl	0.375
Total	\	25

“V<sub>1</sub>”表示固定 DNA 模板約為 150 ng/25 μl 時，不同濃度之檢體 DNA 所需的模板體積。“V<sub>2</sub>”表示 ddH<sub>2</sub>O 反應體積(即總體積扣除其他材料反應體積，所剩餘的體積。)

表 4-7 檢體 DNA 突變點篩選之 PCR 熱循環條件

30 cycles					
94	94	Ta	72	72	4
5 min	1 min	0.5 min	1 min	7 min	

G382D、Y165C 及 V232F 突變熱點之引子接合溫度(Ta)分別為 62、62 和 60、60.2 ; 定序引子之 Ta 為 56 。

### 4-3.1 AS-PCR 檢測結果

從 30 對檢體之 genomic DNA 利用 AS-PCR 方法，擴增包含突變點 G382D、Y165C 與 V232F 之 *hMYH* 片段，並利用電泳分析 PCR 產物。G382D、Y165C 與 V232F 的實驗結果分別以檢體 CRC 38 與 39，

CRC 98, CRC 102, 103 與 104 為例, 說明檢體 genomic DNA 其 *hMYH* 基因是否存在 G382D、Y165C 與 V232F 突變點。

圖 4-7 中 CRC 38N 與 39N 皆為正常組織之 genomic DNA, CRC 38T 與 39T 為腫瘤檢體之 genomic DNA。在利用野生型對偶性引子進行 PCR 反應後, 所有兩對檢體 DNA 皆可得到目標產物, 而在突變型對偶性引子情況下, 兩對檢體 DNA 則完全無 PCR 產物訊息, 因此表明此兩種腫瘤檢體之 genomic DNA 其 *hMYH* 基因均無 G382D 突變。

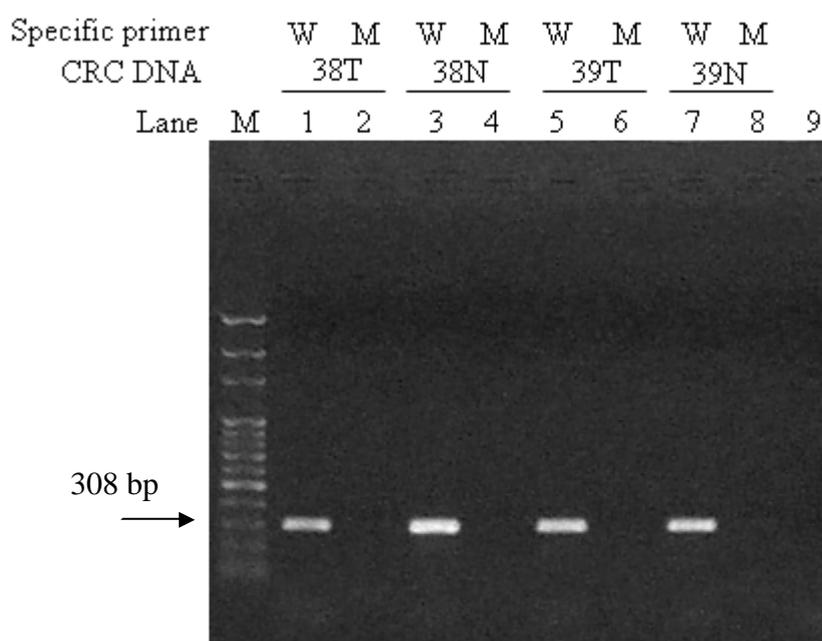


圖 4-7 檢測檢體 DNA(CRC 38 與 CRC39)之 *hMYH* 突變點 G382D 之電泳圖。

Lane M 為 DNA Marker; lanes 1~4 與 5~8 檢體 DNA 分別為 CRC 38 與 CRC 39, 其中 T 與 N 分別表示為腫瘤組織與正常組織之 genomic DNA; lane 9 為 negative control(即在無模板 DNA, 進行 PCR 反應); W 與 M 分別表示為野生型及突變型對偶性引子。引子接合溫度為 62 。

檢體編號 CRC 98 之 PCR 產物的電泳圖如圖 4-8 之(A)所示，其中 CRC 98N 為正常組織之 genomic DNA 作為對照組，CRC 98T 為腫瘤檢體 DNA。從圖 4-8 之(A)我們發現，在引子接合溫度為 62 時，可能由於溫度過高而導致 CRC 98N 與 CRC 98T 樣品皆無 PCR 產物。若將引子接合溫度調整為 60 ，其 PCR 產物電泳圖如圖 4-8 之(B)所示；檢體 CRC 98T 在以野生型對偶性引子進行 PCR 反應後，可得到目標產物，而在突變型對偶性引子情況下，完全無 PCR 產物，故此腫瘤檢體之 genomic DNA 也檢測不出 *hMYH* 有 Y165C 突變點。

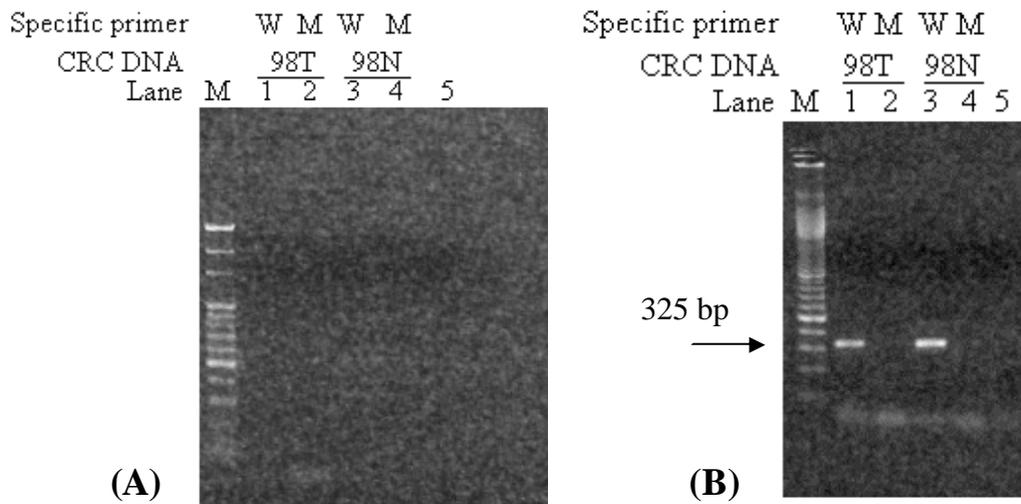


圖 4-8 檢測檢體 DNA(CRC 98)之 *hMYH* 突變點 Y165C 的電泳圖。Lane M 為 DNA Marker；lanes 1~4 為檢體 DNA CRC 98，其中 T 與 N 分別表示為腫瘤組織與正常組織之 genomic DNA；lane 5 為 negative control；W 與 M 分別表示為野生型及突變型對偶性引子。(A)與(B)引子接合溫度分別為 62 及 60 。

圖 4-9 中以正常組織之 genomic DNA : CRC 102N、103N 與 104N 做為對照組 ; CRC 102T、103T 與 104T 為腫瘤檢體 DNA , 其篩選結果皆成陰性反應 , 即在以野生型對偶性引子的情況下 , 可得到目標產物 , 在突變型對偶性引子情況下無 PCR 產物訊息 , 因此用此方法篩選不到檢體 DNA 之 *hMYH* 的 V232F 突變點。

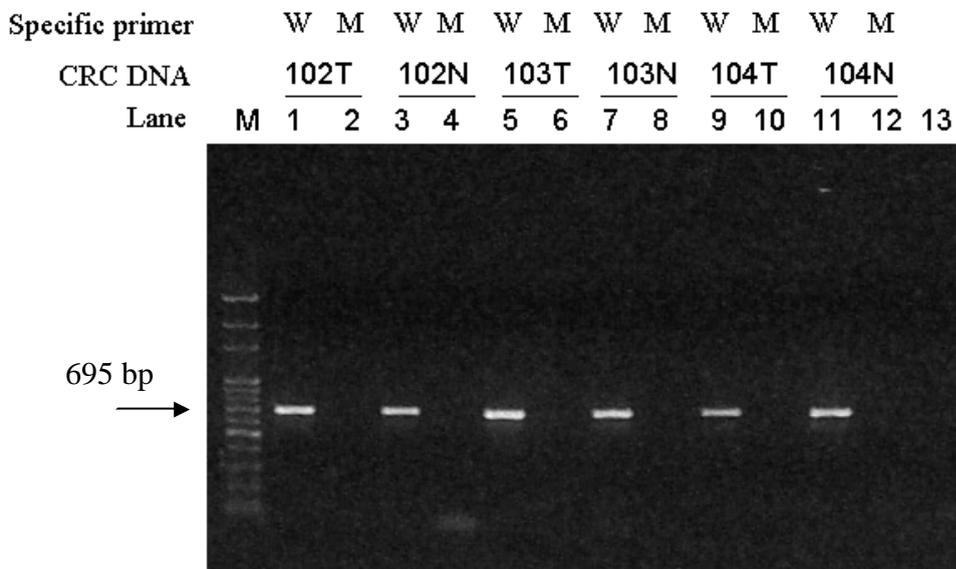


圖 4-9 檢測檢體 DNA(CRC 102、CRC 103 與 CRC 104)之 *hMYH* 突變點 V232F 的電泳圖。Lane M 為 DNA Marker ; lanes 1~4 為檢體 DNA CRC 102 , lanes 5~8 為檢體 DNA CRC 103 , lanes 9~12 為檢體 DNA CRC 104 , 其中 T 與 N 分別表示為腫瘤組織與正常組織之 genomic DNA ; lane 13 為 negative control ; W 與 M 分別表示為野生型及突變型對偶性引子。引子接合溫度為 60.2 。

從 AS-PCR 之電泳分析圖顯示 , 這 30 對檢體對突變點 G382D、Y165C 與 V232F 皆陰性結果 , 即由此分析方法篩選的結果 , 這 30 對檢體皆無這三個突變點。

### 4-3.2 定序分析

由於實驗結果顯示這 30 對檢體 DNA 對突變點 G382D、Y165C 與 V232F 篩選結果皆成陰性；因此對於各突變點隨機挑選腫瘤檢體 DNA，使用定序之引子進行 PCR 反應後，接著將產物經由電泳分析，確認為 single band 後(如圖 4-10 與圖 4-11)，再將此 PCR 產物委託由明欣科技公司定序(定序之引子序列、PCR 反應溶液配方請見表 2-2、與表 4-6。)

對於突變點 G382D，我們選擇 10 個腫瘤檢體 DNA(CRC 90T、91T、92T、94T、95T、97T、98T、102T、103T 與 104T)，將其 PCR 產物委託明欣科技公司定序，圖 4-10 為其使用定序引子之 PCR 產物電泳圖。另外 Y165C 突變點所用的定序引子與 V232F 相同，即以這對引子對所得到的 PCR 產物會包含此兩個突變點所在位置；同樣地，隨機挑選 3 個腫瘤檢體 DNA：CRC 95T、97T 與 104T，其分別以定序之引子進行 PCR 反應後，產物電泳分析圖如圖 4-11 所示。

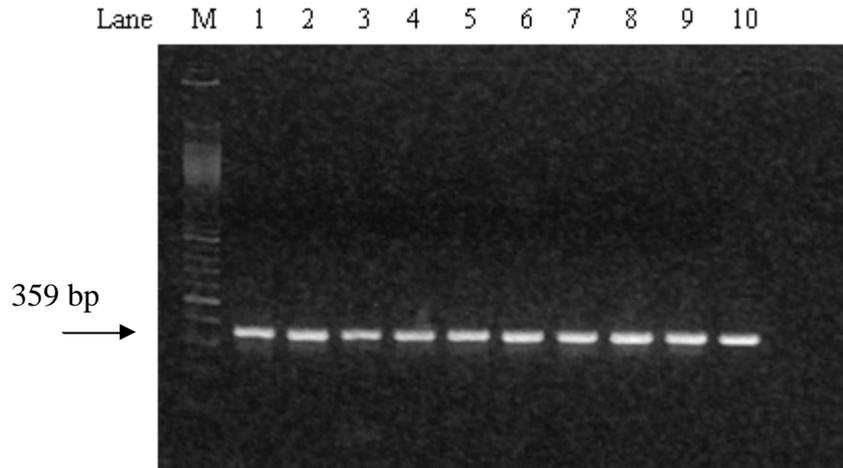


圖 4-10 PCR 擴增包含 G382 之電泳圖。Lane M 為 DNA Marker；lanes 1~10 檢體 DNA 分別為 CRC 90T、91T、92T、94T、95T、97T、102T、103T、104T 與 98T，其中 T 表示為腫瘤組織之 genomic DNA；前置與反置引子分別為 THU-MYH-5 與 THU-MYH-8；引子接合溫度為 56 。

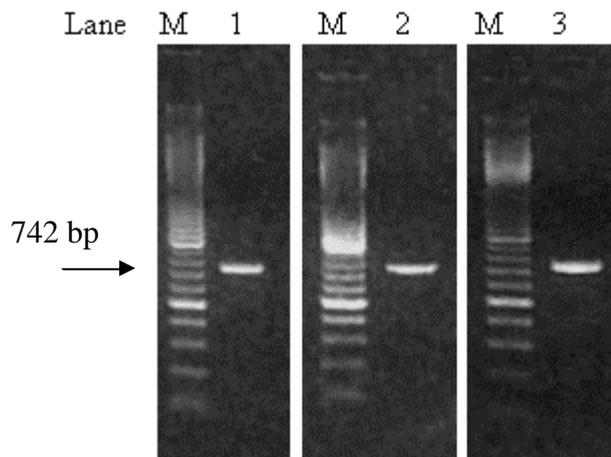


圖 4-11 PCR 擴增包含突變點 Y165 與 V232 之電泳圖。Lane M 為 DNA Marker；lanes 1~3 檢體 DNA 分別為 CRC 95T、97T 與 104T)，，其中 T 表示為腫瘤組織之 genomic DNA；前置與反置引子分別為 THU-MYH-53 與 THU-MYH-54；引子接合溫度為 56 。

將以上使用定序引子所擴增之 PCR 產物委託由欣科技公司定序，從定序圖顯示，這些送去定序之腫瘤檢體 genomic DNA 之 PCR 產物皆無突變點 G382D、Y165C 與 V232F，在此亦驗證了用本實驗室之 AS-PCR 方法檢測各突變點，所得到的結果無誤。我們分別以檢體 CRC 90T 與 CRC 104T 之定序分析結果為列如圖 4-12 所示。

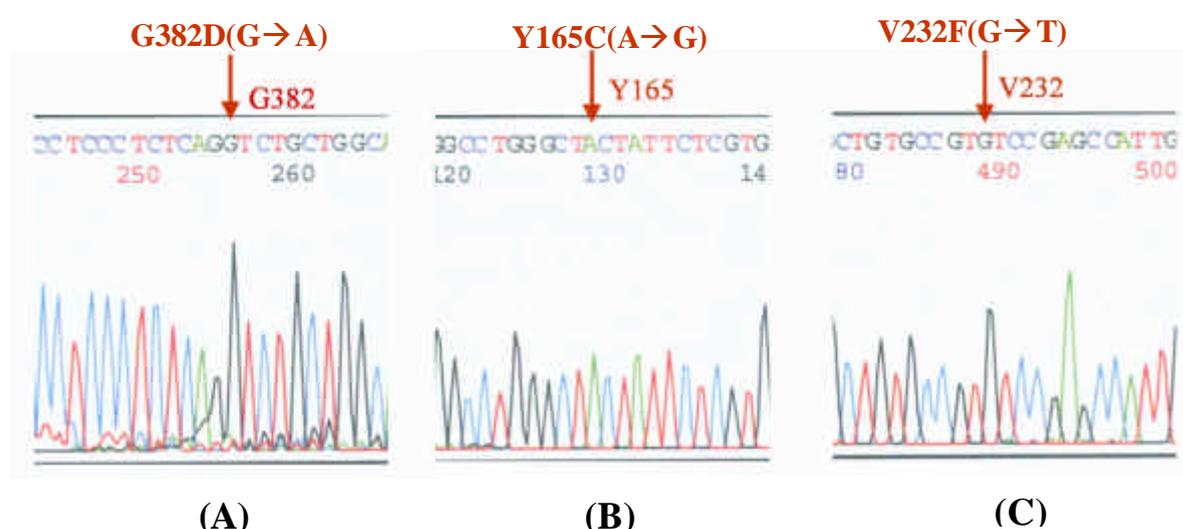


圖 4-12 定序分析腫瘤檢體 genomic DNA 之 PCR 產物 (A)檢體 CRC 90T之 PCR 產物定序分析，(B)與(C)為檢體 CRC 104T 之 PCR 產物定序。箭頭位置指出無該突變點存在。

總括來說，這 30 對檢體 genomic DNA 以 AS-PCR 方法檢測其 *hMYH* 基因，其結果皆無突變點 G382D、Y165C 與 V232F 存在。腫瘤檢體 genomic DNA 之 PCR 產物定序結果也沒有發現有突變點存在，因此也驗證了用 AS-PCR 篩選檢體 genomic DNA 之 *hMYH* 突變點的結果。將檢體 DNA 對各突變點之篩選結果整理如表 4-8 所示。

表 4-8 大腸直腸癌患者的組織其常見的 *hMYH* 基因突變點之篩選結果總彙

突變點	利用 AS-PCR 檢測突變點之樣品數量		PCR 產物定序樣品數量
	腫瘤組織之	正常組織之	腫瘤組織之
	genomic DNA	genomic DNA	genomic DNA
G382D	30(0)	30(0)	10(0)
Y165C	30(0)	30(0)	3(0)
V232F	30(0)	30(0)	3(0)

A(B)表示有 A 數量的樣品經過篩選，其中有 B 個樣品有突變點存在。

#### 4-4 探討 dNTP 混合比例對 AS-PCR 引子特異性之影響

在 4-1~4-3 章節中我們可以發現 AS-PCR 引子特異性會受到 DNA 模板濃度與引子接合溫度影響。而 dNTP 的濃度對 PCR 擴增效率有密切的關係，因此在本章節裡，會在固定 DNA 模板濃度下，選用不同的 [GC]/[AT] 混合比例條件，針對不同的突變位置，探討 dNTP 混合比例對 PCR 反應偵測 SNP 引子特異性的影響，並將實驗結果與 4-1 章節中改變模板濃度之實驗結果進行比較。

本實驗選用野生型質體 DNA 為模板，其濃度為 60 ng/  $\mu$ l，[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，詳細配法請見 3-3 章節。各突變點之對偶性引子、PCR 熱循環條件以及反應溶液配方請見表 2-2、表 4-9 及表 4-10。

**表 4-9 探討 dNTP 混合比例之各突變點的 PCR 熱循環條件**

30 cycles					
94	94	Ta	72	72	4
5 min	1 min	0.5 min	1 min	7 min	

G382D、Y165C、V232F 及 R227W 突變熱點之引子接合溫度(Ta)分別為 62、62、60.2、64 。

**表 4-10 探討 dNTP 混合比例之 PCR 反應溶液配方**

反應材料	濃度	體積(μl)
ddH <sub>2</sub> O	\	38.25
10X reaction buffer	\	5
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	3
dNTPs	20 mM	1
DNA	60 ng/μl	1
Forward primer	20 μM	0.5
Reverse primer	20 μM	0.5
Taq (MDBio)	5 U/μl	0.75
反應總體積		50

#### 4-4.1 對突變點 G382D 探討 dNTP 混合比例的影響

從圖 4-13 我們可以發現，當[GC]/[AT]的比例相差愈大，對偶性引子的特異性會隨著遞增。當[GC]/[AT]莫耳數比為 4 : 1、9 : 1、1 : 4 和 9 : 1 時，更能區別專一性與突變特殊引子的差異，尤其是當莫耳數比為 9 : 1 與 1 : 9 時，特異性最佳。因此當[GC]或[AT]有一方濃度偏低時，有助於特異性增加，但相對的擴增效率也會下降，主要表

現在 PCR 產量。

將 4-1.2 章節中對突變點 G382D 以稀釋模板濃度對 AS-PCR 的影響所得之結果，與本節改變 dNTP 混合比例對 AS-PCR 的影響所得結果做比較。可以發現 DNA 模板濃度只有在稀釋至低於 30 ng 時才可清楚的區別對偶性引子的差異性，且在 DNA 模板濃度範圍在 1.5~30 ng/50  $\mu$ l 時，PCR 反應會隨著模板濃度遞減而特異性遞增。而在本實驗條件下，透過改變[GC]/[AT]的混合比即使在偏高的 DNA 模板濃度 (60 ng/50  $\mu$ l) 時，使用 9 : 1 或 1 : 9 的[GC]/[AT]莫耳數比，亦可明顯表現出 AS-PCR 的特異性。

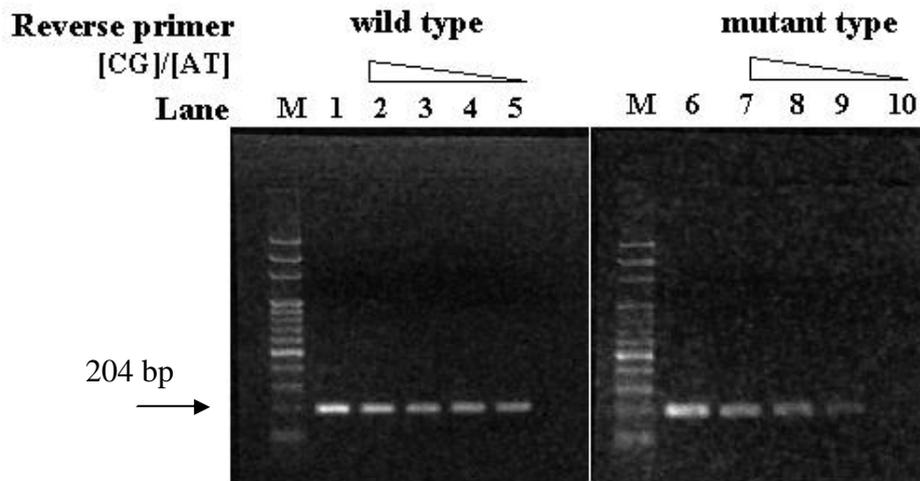
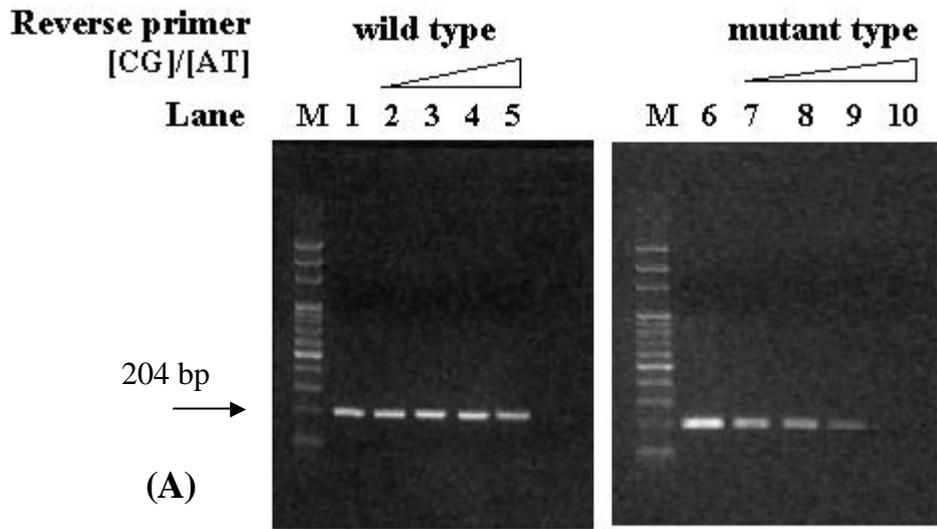


圖 4-13 針對 G382D 探討 dNTP 混合比例對於 PCR 反應特異性的影響。Lane M 為 DNA marker；前置引子為 THU-MYH-5；lanes 1~5 為野生型對偶性反置引子，THU-MYH-6；lanes 6~10 為突變型對偶性反置引子，THU-MYH-7；引子接合溫度為 62<sup>o</sup>。 (A) Lanes 1 和 6、2 和 7、3 和 8、4 和 9、5 和 10 的 [GC]/[AT] 莫耳數比分別為 1 : 1、3 : 2、7 : 3、4 : 1 和 9 : 1。Lanes 1 和 6 的 dNTP 總濃度為 80 mM，Lanes 2~5 和 7~10 的總濃度為 100 mM。 (B) Lanes 1 和 6、2 和 7、3 和 8、4 和 9、5 和 10 的 [GC]/[AT] 莫耳數比分別為 1 : 1、2 : 3、3 : 7、1 : 4 和 1 : 9。Lanes 1 和 6 的 dNTP 總濃度為 80 mM，Lanes 2~5 和 7~10 的總濃度為 100 mM。

將上述所得之 PCR 產物，利用限制？ *Bgl* II 切割，結果如圖 4-14。已知限制？ *Bgl* II 的切割點剛好在突變點 G382D 的位置，如圖 4-15 所示。野生型與突變型對偶性引子其皆產生 204 bp 片段的 PCR 產物，但是若 PCR 產物含有 G382D 突變點，則可被限制？ *Bgl* II 切割成 186 bp 和 18 bp。由圖 4-14 可看出以突變型對偶性引子所得到的 PCR 產物，皆可被限制？ *Bgl* II 切割，表明以突變型對偶性引子得到的 PCR 產物含有 G382D 突變點；我們即使使用不具有 3'→5' 外切修復錯配的功能的 Taq DNA 聚合？，當引子 3'端與 DNA 模板有一鹼基錯配時，仍有機會繼續延長作用，而使得得到之 PCR 產物則含有 G382D 的突變。

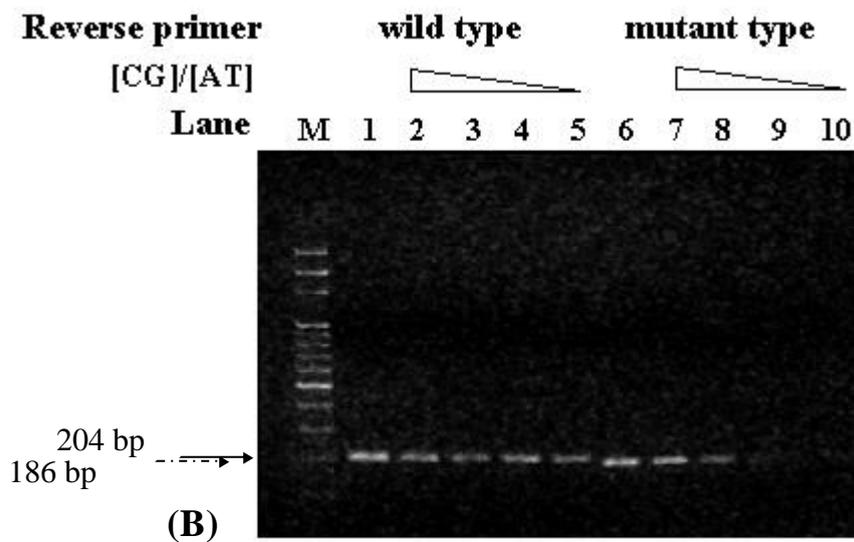
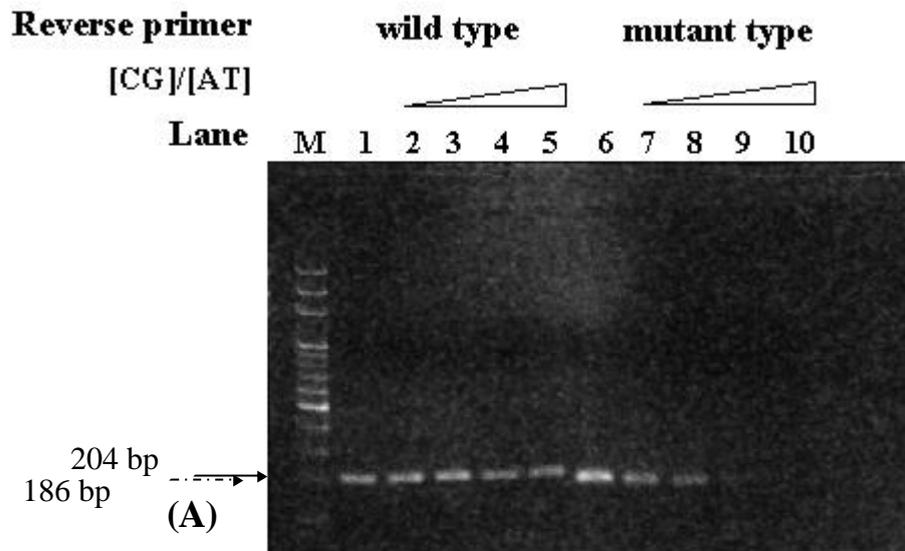


圖 4-14 PCR 產物經限制? *Bgl* II 切割後之電泳圖。Lane M 為 DNA marker。 ; lanes 1~5 為野生型對偶性反置引子, THU-MYH-6 ; lanes 6~10 為突變型對偶性反置引子, THU-MYH-7 ; (A) Lanes 1 和 6、2 和 7、3 和 8、4 和 9、5 和 10 的 [GC]/[AT] 莫耳數比分別為 1 : 1、3 : 2、7 : 3、4 : 1 和 9 : 1。Lanes 1 和 6 的 dNTP 總濃度為 80 mM, Lanes 2~5 和 7~10 的總濃度為 100 mM。 (B) Lanes 1 和 6、2 和 7、3 和 8、4 和 9、5 和 10 的 [GC]/[AT] 莫耳數比分別為 1 : 1、2 : 3、3 : 7、1 : 4 和 1 : 9。Lanes 1 和 6 的 dNTP 總濃度為 80 mM, Lanes 2~5 和 7~10 的總濃度為 100 mM。

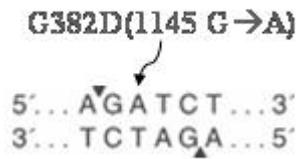


圖 4-15 限制？ *Bgl* II 剪切 DNA 的示意圖。

為了進一步驗證以突變型對偶性引子得到的 PCR 產物含有 G382D 突變點，我們將 [GC]/[AT] 莫耳比為 2：3 的 PCR 產物進行定序。其定序分析結果(如圖 4-16 之(A)所示)證實了，雖 Taq 聚合酶不具有錯配修復能力，但突變特殊引子仍有機會繼續延長作用，而且最後得到的 PCR 產物則是含有突變點的 DNA。

先前已有文獻指出 dNTP 的不平衡 (imbalance) 可能會在 DNA 聚合反應時導致核糖酸錯誤摻入 (nucleotide misincorporation) [Inns *et al.*, 1988; Mertz and Rashtchian, 1994]。因此我們將以 [GC]/[AT] 莫耳比為 1：9 且為野生型對偶性引子所獲得之 PCR 產物，委託明欣生物科技有限公司定序，定序分析如圖 4-16 之(B)所示，將 [GC]/[AT] 莫耳比為 1：9 之定序結果與 *hMYH* 基因 (Gene bank GI：1458227) 比對，確定進行 DNA 聚合反應時並無核糖酸錯誤摻入的情況。

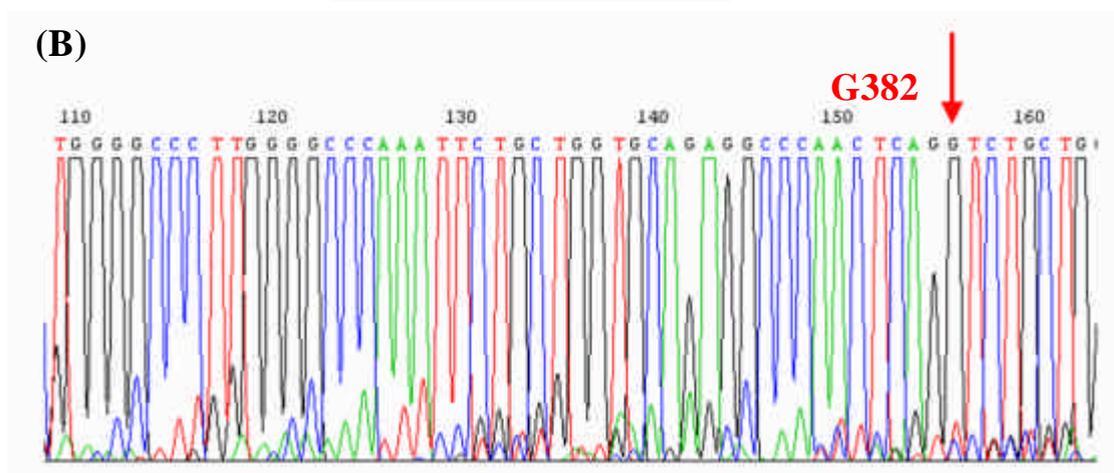
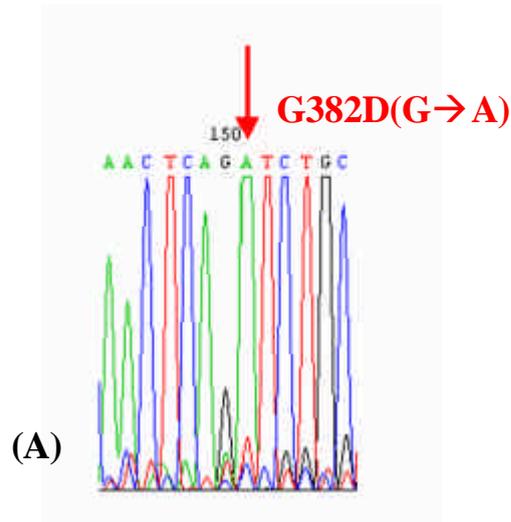


圖 4-16 不平衡的 dNTP 混合比例之 PCR 產物定序分析。(A)以突變型對偶性引子且[GC]/[AT]莫耳比為 2 : 3 所獲得的 PCR 產物；(B)以野生型對偶性引子且 [GC]/[AT]莫耳比為 1 : 9 所獲得的 PCR 產物，定序結果與 *hMYH* 基因(Gene bank GI : 1458227)比對，確定無核? 酸錯誤摻入的情況。箭頭位置指出無 G382D 突變點存在。

#### 4-4.2 對突變點 Y165C 探討 dNTP 混合比例的影響

從圖 4-17 我們可以發現，在[GC]/[AT]莫耳數比為 9 : 1 時，能夠明顯區分對偶性引子的差別，而其它[GC]/[AT]的混合比例其 PCR 產物訊號則看不出明顯的差異，特异性並沒有隨著[GC]/[AT]的比例相

差愈大而遞增。

但 4-1.2 章節對突變點 Y165C 以稀釋模板濃度對 AS-PCR 的影響所得之結果，表明 DNA 模板濃度須在低濃度(1.5 與 0.15 ng/50  $\mu$ l)時才能區分對偶性引子的差異。而在本章節中若將[GC]/[AT]莫耳數比調整為 9 : 1，即使在較高的 DNA 模板濃度(60 ng/50  $\mu$ l)下，也能看出對偶性引子的特異性。

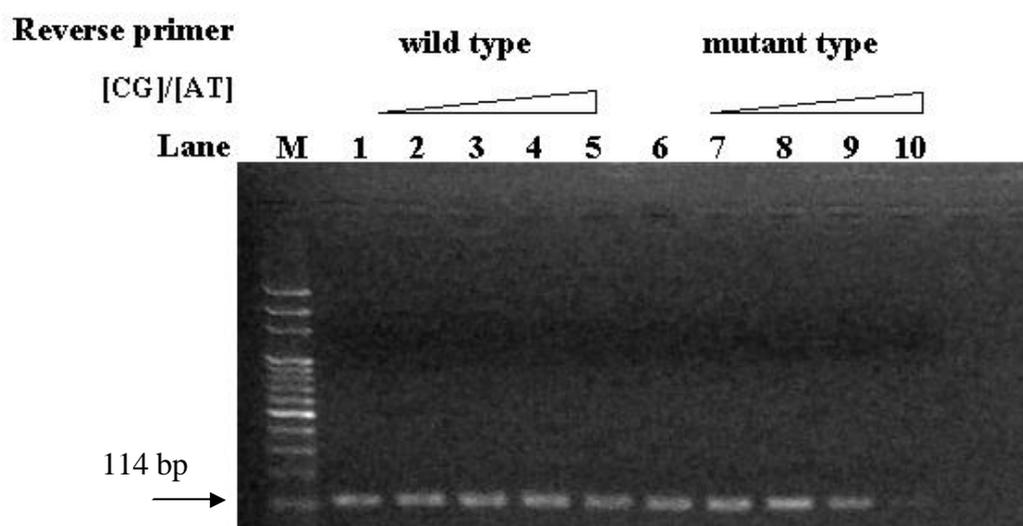


圖 4-17 針對 Y165C 探討不同 dNTP 混合比例對於 PCR 反應特異性的影響 Lane M 為 DNA marker。前置引子為 THU-MYH-1；lanes 1~5 為野生型對偶性反置引子，THU-MYH-2；lanes 6~10 為突變型對偶性反置引子，THU-MYH-3；引子接合溫度為 62 $^{\circ}$ C；Lanes 1 和 6、2 和 7、3 和 8、4 和 9、5 和 10 的[GC]/[AT]莫耳數比分別為 1 : 1、3 : 2、7 : 3、4 : 1 和 9 : 1。Lanes 1 和 6 的 dNTP 總濃度為 80 mM，Lanes 2~5 和 7~10 的總濃度為 100 mM。

#### 4-4.3 對突變點 V232F 探討 dNTP 混合比例的影響

從圖 4-18 我們可以發現，在各種[GC]/[AT]混合比例，以野生型

引子皆可看到很強的 PCR 產物訊息，但以突變型對偶性引子卻幾乎都沒有產物訊息，顯示此對偶性引子特異性很高。與 4-1.4 節中對突變點 V232F 以稀釋模板濃度對 AS-PCR 的影響所得之結果比較，我們發現不管是稀釋 DNA 模板濃度或是改變 dNTP 混合比例，對 V232F 突變點所設計之對偶性引子特異性非常高。此原因在 4.1 章節中已有討論過，主要是因為所設計之突變型對偶性引子其 3' 端與正常 DNA 模板鹼基之錯配比較強；因此與不具修復能力之 Taq 聚合酶反應時，較能有效的阻止正常 DNA 與突變型對偶性引子的延伸，故無法產生或產生極少的 PCR 產物，而表示此對偶性引子的特異性很高。

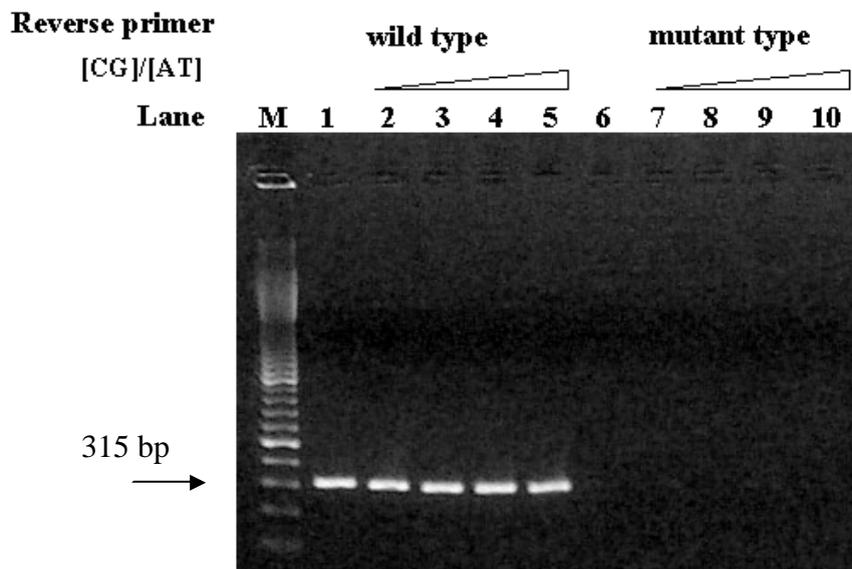


圖 4-18 針對 V232F 探討不同 dNTP 混合比例對於 PCR 反應特異性的影響 Lane M 為 DNA marker。前置引子為 THU-MYH-1；lanes 1~5 為野生型對偶性反置引子，THU-MYH-12；lanes 6~10 為突變型對偶性反置引子，THU-MYH-13；引子接合溫度為 60.2 °C。Lanes 1 和 6、2 和 7、3 和 8、4 和 9、5 和 10 的 [GC]/[AT] 莫耳數比分別為 1 : 1、3 : 2、7 : 3、4 : 1 和 9 : 1。Lanes 1 和 6 的 dNTP 總濃度為 80 mM，Lanes 2~5 和 7~10 的總濃度為 100 mM。

#### 4-4.4 對突變點 R227W 探討 dNTP 混合比例的影響

由實驗結果圖 4-19 我們可以發現，改變不同的 [GC]/[AT] 莫耳數比，並沒有明顯的幫助區別野生型與突變型對偶性引子的差異，只有在 [GC]/[AT] 莫耳數比為 1：9 才有較大的差異性。

將此結果與 4-1.5 章節對突變點 R227W 以稀釋模板濃度對 AS-PCR 的影響所得之結果比較。在 4-1.5 章節中我們發現只有當 DNA 模板濃度在 1.5 與 0.15 ng/50  $\mu$ l 時，才可清楚的區分對偶性引子的差別。但在本章節我們可以發現即使在高 DNA 模板濃度(60 ng/  $\mu$ l)下，在 [GC]/[AT] 莫耳數比為 1：9 時，可以分辨野生型與突變型對偶性引子之差別，故調整 [GC]/[AT] 莫耳數比為 1：9 時，有助於提昇 PCR 反應的特異性。

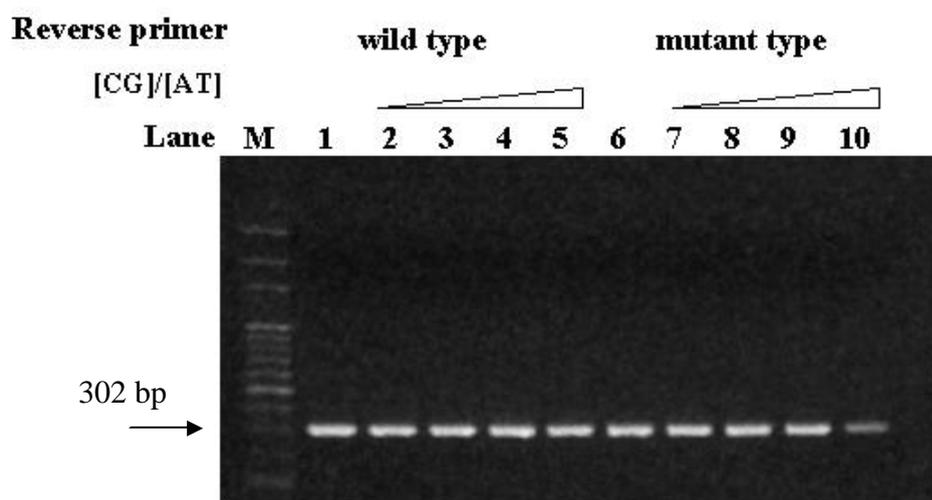


圖 4-19 針對 R227W 探討 dNTP 混合比例對於 PCR 反應特異性的影響 Lane M 為 DNA marker。前置引子為 THU-MYH-1；lanes 1~5 為野生型對偶性反置引子，THU-MYH-10；lanes 6~10 為突變型對偶性反置引子，THU-MYH-11；引子接合溫度為 64  $^{\circ}$ C。；Lanes 1 和 6、2 和 7、3 和 8、4 和 9、5 和 10 的 [GC]/[AT] 莫耳數比分別為 1：1、3：2、7：3、4：1 和 9：1。Lanes 1 和 6 的 dNTP 總濃度為 80 mM，Lanes 2~5 和 7~10 的總濃度為 100 mM。

總括言之，在 4-1 章節中我們討論了 DNA 模板濃度對 PCR 反應特異性的影響，實驗結果顯示當 DNA 模板在高濃度時，以野生型與突變型對偶性引子所得之 PCR 產量都很高，但無法明顯的區別這兩種個引子的差異性。唯有當 DNA 模板稀釋低濃度時，才可辨別兩種引子的差別，因此 AS-PCR 引子的特異性受到 DNA 模板濃度的影響

在 4-4 章節中，我們在較高的 DNA 模板濃度(60 ng/50  $\mu$ l)下，適當改變[GC]/[AT]莫耳數比，可以提高 AS-PCR 的特異性，而當[GC]/[AT]莫耳數比為 1：9 時，特異性最佳。

#### 4-5 不同對偶性引子設計

由文獻指出在靠近引子的 3'端增加額外鹼基錯配，或在引子的 3'端給予特殊修飾，可增加 AS-PCR 之可信度[Newton *et al.*, 1989; Liao *et al.*, 2005]。因此本章節將選擇以 Y165C 突變點為例設計野生型與突變型對偶性引子，進一步探討對 AS-PCR 方法的改善。在 4-5.1~4-5.3 章節將分別探討在引子 3'端倒數第二位置增加一個鹼基錯配 或以磷酸化修飾及 AminoC6 修飾對 AS-PCR 的影響。

將野生型對偶性引子(THU-MYH-2)與突變型對偶性引子(THU-MYH-3)引子的 3'端倒數第二位置增加一錯配，引子名稱分別為

THU-MYH-2M 與 THU-MYH-3M；在 THU-MYH-2 與 THU-MYH-3 引子 3'端以磷酸修飾，磷酸修飾後之引子名稱分別為 THU-MYH-2P 與 THU-MYH-3P；將 THU-MYH-3 引子 3'端 AminoC6 修飾，並將修飾後引子稱作 THU-MYH-DJ1，詳細引子序列請見表 2-2。本階段所使用的質體 DNA 為野生型質體 DNA，其濃度為 135 ng/  $\mu$ l。另外檢體 DNA 同 3-2 章節同樣由台中榮民總醫院提供。

#### **4-5.1 在引子 3'端倒數第二位置增加一鹼基錯配對 AS-PCR 的影響**

在此以野生型質體 DNA 為模板，前置引子為 THU-MYH-1，反置引子分別為 THU-MYH-2、-3、-2M 與 -3M，因此野生型質體 DNA 模板與引子 THU-MYH-3 末端有一鹼基錯配，與引子 THU-MYH-3M 末端有兩個鹼基錯配。而 DNA 聚合酶選用不具有 3'→5'外切修復能力的 Taq 酵素。引子接合溫度為 57.4。詳細的 PCR 反應溶液配方請見表 4-11。

表 4-11 反置引子增加鹼基錯配之 PCR 反應溶液配方

反應材料	濃度	體積(μl)
ddH <sub>2</sub> O	\	19.125
10X reaction buffer	\	2.5
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	1.5
dNTPs	20 mM	0.5
DNA	135 ng/ μl	0.5
Forward primer	20 μM	0.25
Reverse primer	20 μM	0.25
Taq (MDBio)	5 U/ μl	0.375
Total	\	25

圖 4-20 為 PCR 產物電泳分析圖，其中 lane 1 到 lane 4 反置引子分別為 THU-MYH-2M、-3M、-2 與 -3；其中反置引子為 TMU-MYH-2 與 THU-MYH-3 都有 PCR 產物訊息差不多，因此在質體 DNA 濃度 135 ng/ μl，引子接合溫度為 57.4 時，無法看出這兩種引子的特異性。但是反置引子為 THU-MYH-2M 與 THU-MYH-3M 時，前者有 PCR 產物後者則無，由此可看出這兩個引子的特異性比 THU-MYH-2 和 THU-MYH-3 好。故在 SNP 分析可信度上，突變型對偶性引子末端與野生型質體 DNA 有兩個鹼基錯配(THU-MYH-3M)比一個錯配(THU-MYH-3)的設計良好。

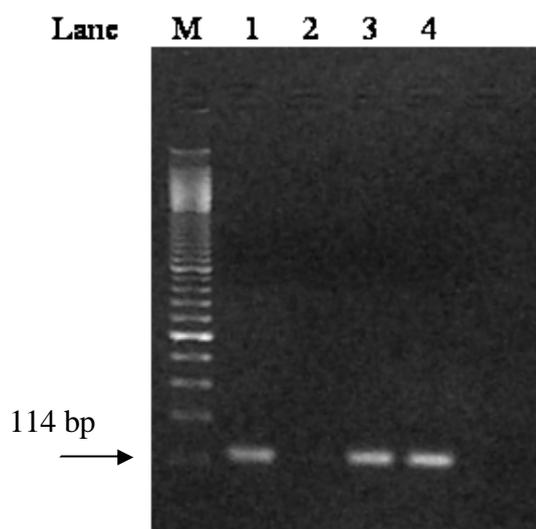


圖 4-20 反置引子增加鹼基錯配之 PCR 產物之電泳圖。Lane M 為 DNA marker；前置引子皆為 THU-MYH- 1；lanes 1 到 4 反置引子分別為 THU-MYH-2M、THU-MYH-3M、THU-MYH-2、THU-MYH-3；引子接合溫度為 57.4 。

在確定兩個錯配有增加 AS-PCR 之引子特異性後，我們選擇檢體 DNA(CRC 95 與 104)，以同樣的引子進行 PCR 反應。圖 4-21 為檢體 DNA(CRC 95 與 104)PCR 產物之電泳圖，其中腫瘤 DNA(CRC 95T 與 CRC 104T)在以 THU-MYH-3M 為引子時皆無 PCR 產訊息，而在以 THU-MYH-2M 為引子時皆有 PCR 產物訊息，因此判定此兩種腫瘤檢體之 genomic DNA 其 *hMYH* 基因無 Y165C 突變點存在，而此結果與 4-3 章節檢體突變點篩選結果相同。

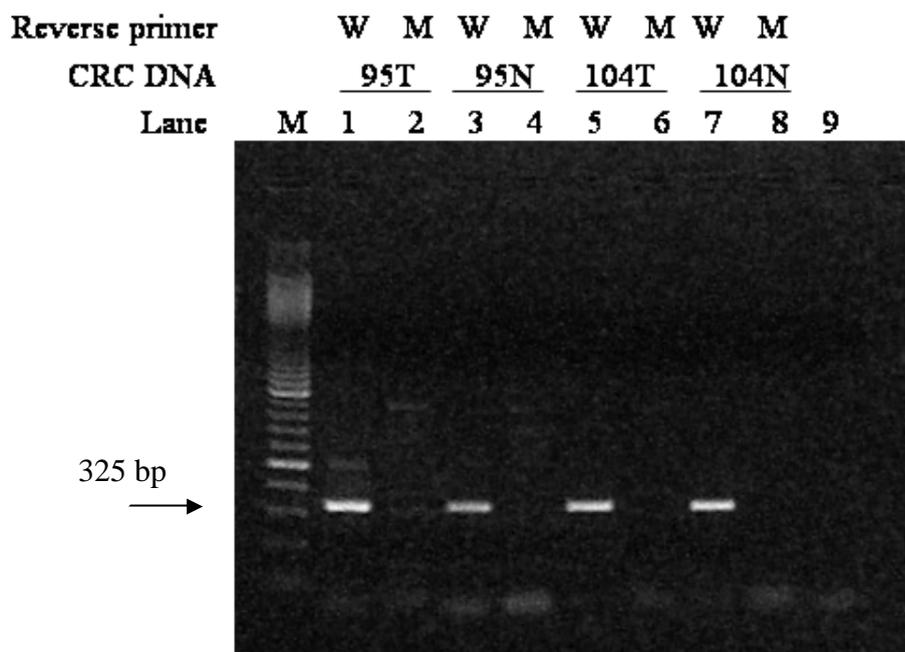


圖 4-21 檢體 DNA(CRC 95 與 104)PCR 產物之電泳圖。Lane M 為 DNA marker; lane 9 為 negative control; 引子接合溫度為 57.4 ; 前置引子皆為 THU-MYH-1; W 為 THU-MYH-2M 反置引子; M 為 THU-MYH-3M 反置引子。

#### 4-5.2 引子 3'端磷酸化修飾

在引子 3'端以磷酸修飾的目的是想藉此提高引子與模板延伸的阻力,並且希望在使用具有 3'→5'外切修復能力的聚合酶 (Pfu 與 Vent) 的情況下,可修復 THU-MYH-3P 引子 3'端與模板間錯配的鹼基,使之可繼續延伸擴增 PCR 產物;而 THU-MYH-2P 引子 3'端與模板無鹼基錯配,酵素則不發揮修復作用,因而無法擴增 PCR 產物。

在此以野生型質體 DNA 為模板,前置引子為 THU-MYH-1,反置引子分別是 3'端具有磷酸修飾之引子 THU-MYH-2P 與-3P,並且使用具有修復功能的聚合酶, Pfu 與 Vent, 進行 PCR 反應,最後藉由訊

息的強弱，判斷引子的特異性。引子接合溫度為 52.4 。詳細的 PCR 反應溶液配方與請見表 4-12 、表 4-13 。

表 4-12 使用 Pfu 酵素且磷酸修飾引子之 PCR 反應溶液配方

反應材料	濃度	體積(μl)
ddH <sub>2</sub> O	\	20
10X reaction buffer	\	2.5
dNTPs	20 mM	0.5
DNA	135 ng/μl	0.5
Forward primer	20 μM	0.25
Reverse primer	20 μM	0.25
Pfu	2.5 U/μl	1
Total	\	25

表 4-13 使用 Vent 酵素且磷酸修飾引子之 PCR 反應溶液配方

反應材料	濃度	體積(μl)
ddH <sub>2</sub> O	\	19.8
10X reaction buffer	\	2.5
MgSO <sub>4</sub>	100 mM	1
dNTPs	20 mM	0.5
DNA	135 ng/μl	0.5
Forward primer	20 μM	0.25
Reverse primer	20 μM	0.25
Vent	2 U/μl	0.2

PCR 產物電泳如圖 4-22 與圖 4-23 所示。圖 4-22 中使用的 DNA 聚合酶為 Pfu, lane 1 到 3 的反置引子分別是 THU-MYH- 2P、 3P 與 2, 其中 lane 3 為陽性對照組(positive control); 我們可以發現有被磷酸修飾之引子, 皆無 PCR 產物訊息。所以 Pfu 並無法將引子 3'端有磷酸化修飾之錯配修復。

因此我們嚐試另一種具有 3'→5'外切修復功能的 DNA 聚合酶, Vent; 圖 4-23 為使用 Vent DNA 聚合酶之 PCR 產物電泳圖, 其中 lanes 1 到 4 的反置引子分別是 THU-MYH-2P、 -3P、 -2 與 -3, 其中 lanes 3 為陽性對照組(positive control); 同樣地, 以磷酸化修飾引子, 皆無 PCR 產物訊息。故以 Pfu 和 Vent 皆無法將引子 3'端有磷酸化修飾之錯配修復。

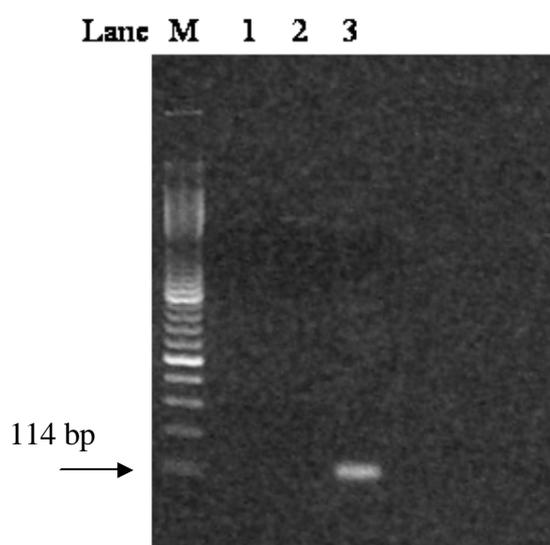


圖 4-22 引子磷酸修飾且使用 Pfu 酵素之 PCR 產物電泳圖。Lane M 為 DNA marker; lane 3 為 positive control; 前置引子皆為 THU-MYH- 1; lanes 1 到 3 反置引子分別為 THU-MYH-2P、 THU-MYH-3P 與 THU-MYH- 2; 引子接合溫度為 52.4 ; DNA 聚合酶為 Pfu。

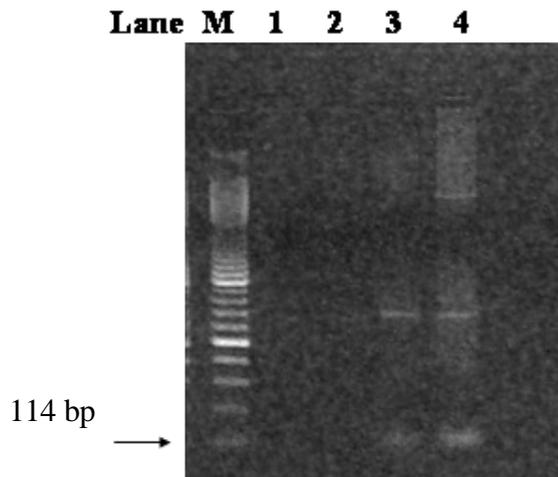


圖 4-23 引子磷酸修飾且使用 Vent 酵素之 PCR 產物電泳圖。Lane M 為 DNA marker；lane 3 為 positive control；前置引子皆為 THU-MYH-1；lanes 1 到 3 反置引子分別為 THU-MYH-2P、THU-MYH-3P、THU-MYH-2 與 THU-MYH-3；引子接合溫度為 52.4 ；DNA 聚合? 為 Vent。

### 4-5.3 引子 3'端 AminoC6 修飾

在 4-5.2 章節發現以 Pfu 和 Vent 皆無法將引子 3'端有磷酸化修飾之錯配修復，因此我們嘗試其他不同的修飾，AminoC6 修飾。將 THU-MYH-3 引子 3'端 AminoC6 修飾，並命名為 THU-MYH-DJ1；同樣選擇具有修復能力的 DNA 聚合?，Pfu 與 Vent，希望 THU-MYH-DJ1 引子 3'端與模板的錯配可被具有修復能力的 DNA 聚合? 修復，使得引子與模板可繼續延伸作用而有 PCR 產物。模板為野生型質體 DNA，前置引子為 THU-MYH-1；反置引子為 THU-MYH-DJ1，引子接合溫度為 52.4 。詳細的 PCR 反應溶液配方與請見表 4-14 。

PCR 產物電泳如圖 4-24 所示。圖中 lanes 1 到 3 的反置引子分別是 THU-MYH-DJ1、-DJ1 與 -2; DNA 聚合酶分別為 Pfu、Vent 與 Vent; 其中 lane 3 為陽性對照組; 從圖可以發現引子 3' 端有被 AminoC6 修飾, 其皆無 PCR 產物訊息。因此以 Pfu 與 Vent 都無法將引子 3' 端有 AminoC6 修飾之錯配修復, 使引子無法與模板延伸, 所以沒有 PCR 產物。

表 4-14 使用引子 AminoC6 修飾之 PCR 反應溶液配方

反應材料	濃度	DNA polymerase	
		Pfu(2.5U/μl)	Vent(2U/μl)
		體積(μl)	體積(μl)
ddH <sub>2</sub> O	\	20.5	19
10X rxn buffer	\	2.5	2.5
MgSO <sub>4</sub>	100 mM	0	1.5
dNTPs	20 mM	0.5	0.5
DNA	\	0.5	0.5
Forward primer	20 μM	0.25	0.25
Reverse primer	20 μM	0.25	0.25
DNA polymerase	\	0.5	0.5
Total	\	25	25

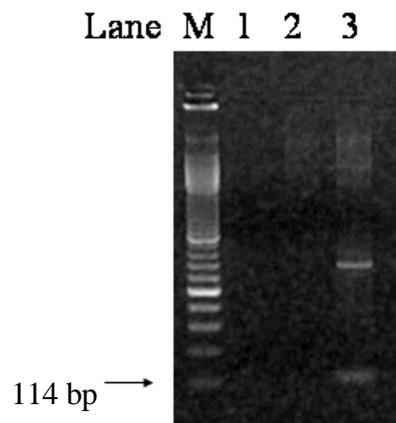


圖 4-24 AminoC6 修飾之引子 PCR 產物之電泳圖。Lane M 為 DNA marker；前置引子皆為 THU-MYH-1；lanes 1~3 反置引子為 THU-MYH-DJ1(AminoC6 修飾)、THU-MYH-DJ1 與 THU-MYH-2(positive control)；lanes 1~3 的 DNA 聚合酶分別為 Pfu、Vent 與 Vent；引子接合溫度為 52.4℃。

總括言之，在 4-5 章節我們分別嘗試了在引子的 3'端增加鹼基錯配、磷酸化修飾、AminoC6 修飾；在引子 3'端使用磷酸修飾並且使用具有外切修復功能的 DNA 聚合酶 (Pfu 與 Vent)，此方法材料(有修飾引子、Pfu 與 Vent)價格較為昂貴。若不考慮價格，由實驗顯示此方法的可行性，有待進一步確認；由目前結果顯示，在我們的實驗條件下此兩種 DNA 聚合酶均無法有效的修復引子(此引子為 3'端有磷酸化修飾與 AminoC6 修飾)與模板的錯配。因此這三種方法以第一者在引子 3'增加鹼基錯配效果最顯著。在引子 3'端增加鹼基錯配的方法對提升 AS-PCR 引子特異性有很大的幫助，並且引子設計比較簡單，引子價格與 Taq DNA 聚合酶相較於有修飾的引子與聚合酶 (Pfu 與 Vent)也比較便宜。