

## 第五章 結論與建議

本研究是以 Allele-Specific PCR 方法對 *hMYH* 基因中常見的突變點，如 G382D、Y165C 與 V232F 進行分析。在確認了 AS-PCR 方法的可信度後，對大腸直腸癌檢體 genomic DNA 進行 *hMYH* 突變點篩選，最後亦對 AS-PCR 對偶性引子的特異性作進一步的改善。就本研究之實驗結果可歸納出下列結論。

### 5-1 結論

- (1) 在 4-1 章節我們發現當 DNA 模板濃度在 0.15~60 ng/50  $\mu$ l 的範圍時，對於不同突變點，如 G382D、Y165C、V232F 與 R227W，選擇合適的引子接合溫度，各對偶性引子的特異性均會隨著模板濃度降低而增加。
- (2) 在 4-2 章節中，我們將含野生型與突變型 *hMYH* 的質體 DNA 以不同比例混合，探討在不同 DNA 模板濃度及不同引子接合溫度，對 AS-PCR 方法靈敏度與對偶性引子特異性的影響。結果發現適當地提高引子接合溫度有利於增加引子的特異性。
- (3) 在 4-4 節中我們發現即使 DNA 模板濃度較高時，如 60 ng/50  $\mu$ l，將 [GC]/[AT] 莫耳數比調整為 1:9 或 9:1 的時，亦能提高對偶性引子的特異性。

- (4) 另外引子 3' 末端鹼基與模板錯配的模式對於 AS-PCR 方法的可信度很重要，由以上實驗結果發現引子 3' 端鹼基錯配對其特異性的提高以 G/A(模板/引子)最好，接著依續為 G/T、C/A 與 A/C，而此結果與文獻 [ Hung *et al.*, 1992 ; Latorra *et al.*, 2003 ] 的論點符合。
- (5) 綜合以上結果，AS-PCR 會受到 DNA 模板濃度、引子接合溫度、dNTP 混合比例及對偶基因特異性引子 3' 端與模板鹼基配對的情況影響，選擇適當的 PCR 反應條件以 AS-PCR 來進行 *hMYH* 基因中的 SNP(G382D、Y165C、V232F 及 R227W)分析是可行的！
- (6) 從實驗結果圖 4-22、4-23 及 4-24 發現，在本研究的實驗條件下，DNA 聚合酶 Pfu 與 Vent 雖然具有 3'→5' 外切修復功能但不能有效地修復磷酸化及 AminoC6 修飾之引子 3' 端的錯配鹼基，因此無法作為 SNP 的分析方法。
- (7) 由實驗結果圖 4-20 所示，相較於引子 3' 端與模板間只有單一鹼基錯配，兩個錯配的引子可以提高 AS-PCR 的可信度並且明顯增加引子的特異性，因此可作為未來檢測 SNP 的新方法。
- (8) 在 4-3 章節中，本研究總共對 30 位已被台中榮民總醫院診斷患有大腸直腸癌的患者，篩選其 *hMYH* 基因上的突變熱點 G382D、

Y165C 及 V232E。雖然所有患者的 *hMYH* 基因沒有被檢測出有突變熱點存在，但此實驗結果與先前由韓國科學家所報導的結果〔Kim *et al.*, 2006〕相似。在大腸直腸癌病理學上，本實驗結果暗示 *hMYH* 突變的發生率會隨著種族的差異而有所不同。

## 5-2 建議

- (1) 在本實驗條件下，將[GC]/[AT]莫耳數比調整為 1:9 或 9:1 的時，能提高對偶性引子的特異性；這也有可能是 dNTP 的濃度低所造成的，未來可嘗試將 dNTP 濃度調整為[GC]/[AT]為 1:1，且 [dGTP]、[dCTP]、[dATP]與[dTTP]濃度皆為 5 mM，以進一步釐清改變 dNTP 混合比是否會導致引子特異性的提高。
- (2) 本研究分別探討了 DNA 模板濃度、引子接合溫度與 dNTP 混合比例對 AS-PCR 的影響，建議未來可對其他 PCR 影響因素，如引子濃度等，探究對 AS-PCR 的影響。
- (3) 文獻指出 FAP 且含有 APC 基因突變的病人有高比例的 *hMYH* 基因突變〔Venesio *et al.*, 2004〕。然而本研究之 30 位病人只有一個病人是 FAP 且不確定是否有 APC 基因突變，因此未來建議可針對 FAP 且具有 APC 基因突變之病人進行 *hMYH* 基因突變的研究
- (4) 本研究總共對 30 位大腸直腸癌的患者篩選突變熱點，沒有患者

的 *hMYH* 基因被檢測出有突變熱點存在;這可能是因為突變 DNA 佔總 DNA 比例很小,而本實驗方法的靈敏度不足以檢測出突變,或是本實驗之 PCR 條件不是最佳反應條件,未來可再進一步確認篩選結果是否有誤。

- (5) 確認篩選結果的方法可以是,建構含有欲篩選突變點的質體 DNA,將檢體 genomic DNA 加入含突變點的質體 DNA,此 DNA 分別與野生型及突變型對偶性引子進行 PCR 反應;以突變型對偶性引子預測可能會有模板分別為 genomic DNA 與質體 DNA 之兩種 PCR 產物;若有模板為含突變點質體 DNA 之 PCR 產物,而沒有模板為檢體 genomic DNA 之 PCR 產物,表示此檢體 genomic DNA 無此突變點存在。
- (6) 另外本研究在檢測 SNP 的方法也有收穫,建議未來在篩選已知突變點時,可在對偶性引子 3' 末端倒數第二位置增加鹼基錯配,因為此方法的可信度比原先的 AS-PCR 高。