

# 目錄

	頁次
誌謝 .....	I
摘要 .....	II
目錄 .....	III
圖目錄 .....	XIII
表目錄 .....	XI
第一章 緒論 .....	1
第一節 研究目的 .....	1
第二節 研究背景 .....	1
第三節 研究架構 .....	5
第四節 整體引子群與探針設計模型 .....	7
第二章 即時反錄擴增 .....	8
第一節 概述 .....	8
第二節 核糖核酸擴增方法 .....	9
一、轉錄酶鏈反應 .....	9
二、反轉錄酶鏈反應 .....	9
三、即時轉錄酶鏈反應 .....	8
第三節 實驗材料檢體製備 .....	10
一、實驗檢體材料 .....	10
二、材料核糖核酸製備方法 .....	11
(一) 檢體核糖核酸萃取與純化 .....	11
(二) 腫瘤標誌基因質體 DNA 小量製備 .....	13

(三) 質體去氧核糖核酸酵素切割 .....	14
(四) 膠體萃洗 .....	16
(五) 檢體製備所需材料藥劑 .....	17
三、檢體製備結果 .....	17
(一) A549 細胞株 total RNA 萃取與純化 .....	17
(二) 腫瘤標誌基因質體DNA小量製備 .....	19
(三) 質體去氧核糖核酸酵素切割與膠體萃洗 .....	19
(四) 胃癌腫瘤標誌基因純系插入序列定序結果 .....	20
第四節 反錄擴增與平台確效 .....	22
一、實驗方法 .....	22
二、反錄擴增引子序列 .....	24
(一) 固相存檔磁珠序列設計 .....	24
(二) 擴增任務引子群 .....	25
三、反轉錄引子確效 .....	26
(一) 以MB-SPHB針對A549 RNA以RT PCR確效 .....	27
(二) 以MB-PCPR1針對植物病毒以RT PCR確效 .....	27
(三) 以biotin-SPR針對A549 RNA以RT PCR確效 .....	28
(四) 以T7RP驗證反轉錄引子延伸之cDNA模板 .....	29
(五) 磁珠上植物病毒第一股模板延伸確效 .....	29
(六) 引子靈敏度條件測試 .....	31

(七) 磁珠重複性測試 .....	31
(八) 逢機引子擴增 .....	31
四、擴增確效結果 .....	33
(一) 以MB-SPHB針對A549 RNA以RT PCR確效 .....	33
(二) 以 MB-PCPR1 針對植物病毒以 RT PCR 確效 .....	33
(三) 以 biotin-SPR 針對 A549 RNA 以 RT PCR 確效 .....	34
(四) 以 T7RP 驗證 a549 反轉錄引子延伸之 cDNA 模板 ..	34
(五) 磁珠上第一股模板延伸確效 .....	35
(六) 引子靈敏度條件測試 .....	36
(七) 磁珠重複性測試 .....	37
(八) 逢機引子擴增 .....	38
第四節 即時反轉錄擴增 .....	39
一、概述 .....	39
二、方法 .....	42
三、Van-Algorithm .....	42
四、胃癌檢體即時反轉錄擴增結果 .....	43
第五節 結論 .....	46
第三章 雙向型轉錄擴增 .....	47
第一節 概述 .....	47

第二節 方法比較 .....	48
第三節 方法確效 .....	50
一、生物素與streptavidin結合，分離出第一股模板 .....	50
二、連接子磷酸化 .....	51
三、連接子與第一股cDNA模板連接反應與確效 .....	51
四、第二股cDNA模板延伸與確校 .....	52
五、雙向RNA擴增 .....	52
六、RAP & TCR 比較 .....	53
第四節 結果 .....	53
第五節 討論 .....	56
第四章 探針陣列雜合檢測 .....	57
第一節 概述 .....	57
第二節 探針陣列雜合方法 .....	58
一、DIG labeled 探針陣列雜合 .....	58
二、cy3/cy5 labeled 探針陣列雜合 .....	59
第三節、探針陣列雜合結果 .....	62
一、DIG labeled 探針陣列雜合 .....	62
二、cy3/cy5 labeled 探針陣列雜合 .....	63
第四節 結論 .....	65

第五章 結語 .....	66
參考文獻 .....	68
附件 1 .....	72



## 圖目錄

	頁次
圖 1-1 整體引子群與探針設計模型 .....	7
圖 2-1 pGEM-T Easy vector 示意圖 .....	15
圖 2-2 A549 細胞株 RNA 電泳膠圖 .....	18
圖 2-3 經酵素切割與未切割質體 DNA 電泳分析 .....	19
圖 2-4 膠體萃洗 .....	20
圖 2-5 磁珠與生物索引子示意圖 .....	22
圖 2-6 SDP PCR 示意圖 .....	23
圖 2-7 人類 RNA SDP PCR cycle .....	27
圖 2-8 植物病毒 RNA SDP PCR cycle .....	28
圖 2-9 隨機引子擴增條件 .....	32
圖 2-10 A549 total RNA 確效膠圖 .....	33
圖 2-11 植物病毒確效膠圖 .....	33
圖 2-12 Biotin-SPR 引子確效電泳圖 .....	34
圖 2-13 A549 模板 T7RP 確效圖 .....	35
圖 2-14 磁珠上第一股模板延伸確效 .....	35
圖 2-15 QT T7 引子確效。 .....	36

圖 2-16 引子靈敏度條件測試	37
圖 2-17 A549 序列稀釋電泳圖	37
圖 2-18 磁珠重複性測試	38
圖 2-19 逢機引子擴增圖	39
圖 2-20 單步與雙步驟 RT-PCR	40
圖 2-21 bio-rad IQ5與taqman probe原理	41
圖 2-22 real-time PCR 定量	41
圖2-23 單步驟即時反錄溫度循環	42
圖2-24 Biotin-SPR RFU plot	44
圖2-25 Oligo-dT RFU plot	44
圖2-26 RFU plot: 序列稀釋與回復	45
圖3-1 固相模板生成示意圖	47
圖 3-3 SOP 比較	54
圖 3-4 固相支撐物與轉錄 RNA 的品質的比較	55
圖4-1 基因陣列示意圖	60
圖 4-2 單步反應逢機螢光標定 PCR 條件	61
圖 4-3 DIG labeled 探針陣列雜合	63
圖 4-4 ZaMV/ZaMMV 探針陣列雜合	63
圖 4-5 A549 random primed 基因表現晶片圖	64





## 表目錄

表2-1 酵素切割所需添加之溶液。 .....	16
表2-2 A549 P2細胞株人類total RNA 濃度 .....	19
表2-3 胃癌腫瘤標誌基因純系質體DNA OD值 .....	19
表 2-4 NCBI 胃癌腫瘤標誌基因 blast 結果 .....	21
表 2-5 針對 9 種植物類症病原群病毒所設計之最 .....	23
小群共用引子	
表 2-6 反轉錄引子序列 .....	25
表 2-7 擴增任務引子群 .....	26
表 2-8 T7RP 在反轉錄引子上的序列位置 .....	30
表 5-1 雙檢測系統 .....	66