

第一章 緒論

第一節 研究目的

新興傳染病如禽流感與重症急性呼吸症候群等持續爆發；因此，重症病原案例檢出與類症病原案例檢除，成為新興傳染病原案例類症傳染病原群之鑑別檢測與應變決策關鍵。然而，症狀相關類症傳染病原群屬類複雜，鑑別檢測項目繁多，高度消耗人力物力與應變時間。防疫機關既有編制之有限組織人力不敷支應，未來恐將遭遇延遲應變決策之施政效率困境。因之，本計畫擬由技術平台建置實測，以因應本項重大需求。

針對血管生成相關腫瘤生物標記，亦即學界科專第二期基因微陣數據分析演算所得之腫瘤生物標記基因，建置準定量型基因陣列的實際檢測應用產品，以完成一應用於疾病診斷與腫瘤基因表現的平台套組。

第二節 研究背景

傳統上檢測的方法很繁瑣與複雜，通常從患者血清或組織能取得

的檢體量很少，所以就必須大量的培養細胞來增加取得的RNA量。但是，細胞培養所耗的時間相當的久，不能有效達到傳染類疾病快速鑑別檢測的目標。因此，關鍵點在於如何有效省時地擴增檢體訊號來進行檢測。擴增檢體訊號的方法有三：一為訊號增幅反應(Signal amplification)；二為核糖核酸增幅反應(RNA amplification)；三為互補去氧核糖核酸增幅反應(cDNA amplification)。

1. 訊號增幅反應(Signal amplification)：

CARD (Catalyzed reporter deposition) 的訊號增幅方法，將探針建置在薄膜上，並與檢體進行雜交反應。薄膜以酪蛋白(Casein)溶液處理，再將Streptavidin-HRP加入反應中，Streptavidin與標記有Biotin 的檢體核酸結合；另提供過氧化氫來與訊號增幅受質Biotin-tyramine 反應。此反應使帶有自由基的Biotin-tyramine與雜交核酸附近之酪蛋白上的酚基鍵結，提供了大量的Biotin 分子供後續呈色偵測或螢光偵測之用，可於基因訊號微弱時應用於呈色或螢光偵測過程。

2. 核糖核酸增幅反應(RNA amplification)

TCR, Transcription Chain Reaction主要是利用轉錄作用來擴增RNA，經由特殊設計過後的引子，此引子帶有一段T7啟動子的序列與一段Oligo-dT的寡核苷酸序列，能夠與檢體中的

訊息核糖核酸(mRNA)進行雜合，合成出第一股cDNA，再加入一段連接子(adaptor)來促使第二股cDNA的合成。分別加入T7與T3 RNA 聚合酶就能合成出雙向的RNA。

3. 互補去氧核糖核酸增幅反應(cDNA amplification)

PCR，Polymerase chain reaction，首先利用反轉錄酶將訊息核糖核酸反轉錄為互補去氧核糖核酸，再利用所設計之引子組來擴增出大量的cDNA片段。

利用以上的方法能有效增加檢體的含量，但是重點在於如何快速準確的檢測出患者所感染的疾病為何。單單只是擴增出檢體含量是不夠，必須有配套的實驗來達到快速鑑別檢測的目標。Juang et al. (2004)提到將RT-PCR的技術與基因晶片(gene chip)作結合，來偵測重症呼吸道感染症狀冠狀病毒(severe acute respiratory syndrome-coronavirus)，此篇文獻中，針對SARS冠狀病毒基因序列設計了三個探針與三組引子，搭配Multiplex RT PCR技術同時擴增，並將探針建置在玻璃晶片上，達到靈敏準確的檢測。另Hsu et al. (2005)針對植物病毒potyviruses鑑別檢測，則是利用RT-PCR與 reverse dot plot 的結合，來有效達到鑑別目標。Hsu學者等人針對potyviruses的NIB與CP基因序列設計出退化性引子(degenerate primer)，來從受感染的植物檢體中抓取potyviruses群的mRNA，再利用設計之引子組擴增出病毒cDNA片段。

並將種專一性探針(species-specific probe)建置在尼龍薄膜上，進行 reverse dot blot，將擴增出的cDNA片段點在尼龍膜上進行雜合，發現在種對應的位置有訊號產生，證明此方法能有效達到植物病毒的鑑別檢測。但類症病原群所包含的屬類非常的多，不同種不同屬其基因序列差異性較大，要如何設計引子探針來快速靈敏準確地達到目標是核心問題所在。

Huang *et al.* (2005)等人提出了解決方案，針對類症病原群的序列，利用生物資訊的方式以隨機的四個核苷酸來做比對記分，找尋保守序列與特異性的區域來設計出最小群多用途引子(minimum set multiple use primers)與特異性探針(unique probe)。最小群多用途引子與傳統引子設計比較，能收斂所使用的引子數目，節省成本花費。利用最小群多用途引子進行multiplex PCR擴增cDNA來與探針進行雜合。來解決類症病原群屬類繁雜的問題。此篇文獻中以來自4種屬的9種植物病毒來驗證，設計出11個最小群多用途引子，而傳統設計需要18個引子，並將擴增產物與在尼龍膜上的特異性探針進行雜合，成功的達到鑑別檢測的目標。

因此本論文研究，在於建立一創新的技術平台來鑑別檢測類症病原群。將RT-PCR技術與陣列檢測進行整合，並根據Huang *et al.*提出的引子探針設計理論(primer/probe design algorithm, PDA)，針對類症

病原群來設計引子探針。並將擴增產物以可見光或螢光的方式標定來進行陣列雜合以完成鑑別的目的。

針對血管生成相關腫瘤生物標記基因，Chen *et al.* (2005)提到CD36、PIM-1、SLAM、TFAP、IGF-1、TIM-4等基因表現具有潛力來預測胃癌病患存活情形。Chang *et al.*(2006)提出CTGF(Connective Tissue Growth Factor)與腫瘤血管新生有關。因此本論文研究針對以上基因進行平台條件測試。並將PCR與陣列技術整合，使本研究套組能應用在基因陣列領域。

第三節 研究架構

本研究之論文架構主要分為三大部分所組成：

1. 單步反應型即時反錄擴增
2. 雙向轉錄擴增
3. 陣列雜合檢測

第一部份.單步反應型即時反轉錄聚合酶鏈反應：

利用固相 (solid phase) 支撐物上所設計之寡核苷酸 (oligo-nucleotide)來抓取目標核糖核酸物質，進行反轉錄反應形成單股反意互補核酸模板(single strand anti-sense cDNA template)，並根據PDA 引子探針設計理論，設計出最小群引子進行雙階段(touch down

phase & steady state phase)的擴增反應得到重複擴增產物。

第二部份. 雙向轉錄型反意正意核糖核酸擴增：

使用磁鐵將進行完第一區塊擴增反應之固相模板吸出，固相支撐物上為單股反意互補核酸模板，在其後端加上環頭莖柄連接子(stem-loop linker)，使其延伸出另一股互補核酸模板，形成雙股存檔模板。雙股存檔模板加入 T7 & T3 polymerase 轉錄出正意與反意核醣核酸物質。

第三部份. 探針陣列檢測

探針陣列雜合檢測的可見光處理方法參考Hsu *et al.*,(2005),利用DIG標定核酸物質並將其點至尼龍膜上進行雜合反應來進行鑑別檢測。螢光分析則是利用Cy3/Cy5來標定擴增的核酸物質，並將其點在陣列上進行雜合，利用共軛焦雷射掃描器進行螢光強度與點位置分析。

第四節 整體引子群與探針設計模型

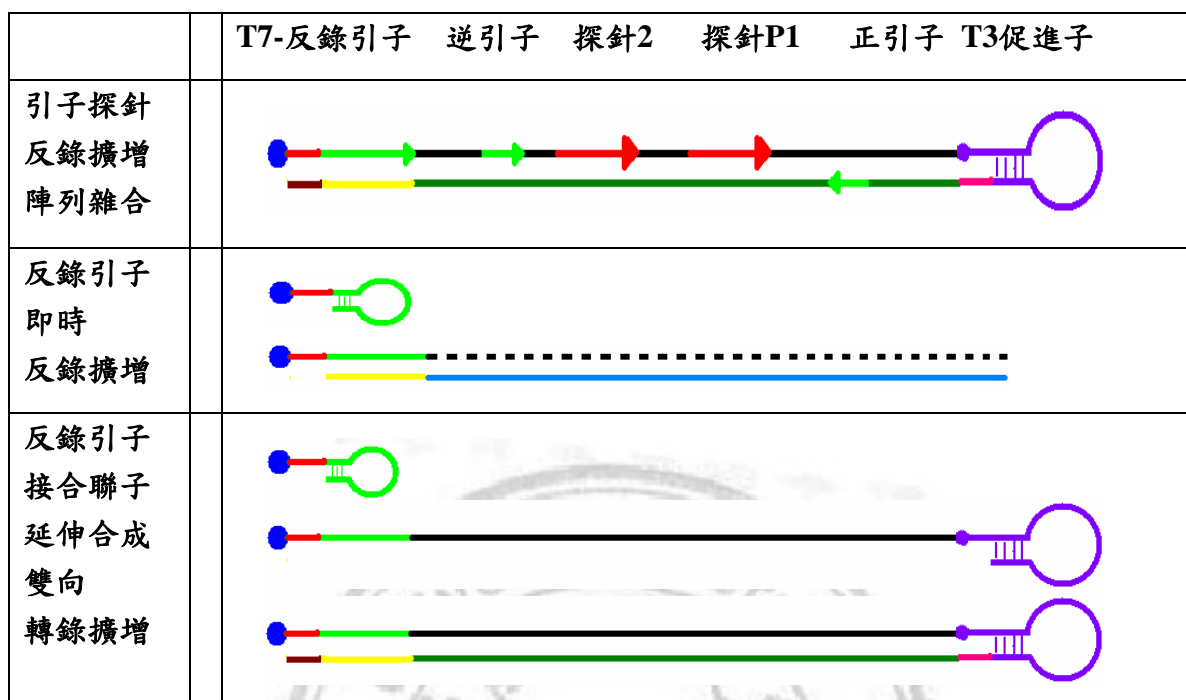


圖1-1 整體引子群與探針設計模型

本研究論文整體流程存檔模板設計如圖 1-1，包含了一固相存檔功能磁珠，磁珠上鍵結反轉錄引子，藉由反轉錄聚合酶鏈反應來製造出第一股模板。第一股模板製備完成後，利用連接酶將連接子(linker)接上第一股模板，形成一回圈結構(loop structure)，在藉由 DNA 聚合酶以第一股當模板延伸出第二股 DNA，完成雙向固相檢體存檔。整體雙向模板依序包含 T7 promoter 序列、PCR 擴增逆向引子序列、及時反轉錄鏈反應(Realtime RT PCR)螢光標探針序列、陣列雜合探針序列、PCR 擴增正向引子序列、和 T3 promoter 序列。