

110 年公務人員特種考試身心障礙人員考試

等 別：四等考試

類 科：衛生技術

科 目：生物技術學概要

一、請解釋下面幾種點墨法的原理及設計？並分別介紹這些方法的應用。(20 分)

(一)西方點墨法 (Western Blotting)

(二)南方點墨法 (Southern Blotting)

(三)北方點墨法 (Northern Blotting)

【擬答】

(一)西方點墨法 (Western Blotting)

西方墨點法 (Western blotting) 或稱「蛋白質轉漬法」，是一種偵測蛋白質的實驗方法。利用特定抗體能夠專一結合其抗原蛋白質的原理來對樣品進行著色，分析著色的位置和著色深度獲得特定蛋白質在所分析的細胞或組織中的表現情況的資訊，來分析檢測特定蛋白質的生物學檢測技術。西方墨點法採用的是聚丙烯醯胺凝膠電泳(PAGE)，被檢測物是蛋白質，「探針」是抗體，「顯色」用標記的二抗。經過 PAGE 後樣品中蛋白質依分子量大小而分離，利用通電轉移到固相載體(NC 或 PVDF)上，固相載體以非共價鍵形式吸附蛋白質，且能保持電泳分離的多胜肽及其生物學活性不變。以固相載體上的蛋白質或多胜肽作為抗原，與對應的抗體專一性結合，再與酶或同位素標記的第二抗體結合，加入受質後顯色或放射顯影以檢測電泳分離的特異性目的基因表現的蛋白成分。

(二)南方點墨法 (Southern Blotting)

南方點墨法 (Southern Blotting) 是一種偵測 DNA 的實驗方法。

先利用洋菜膠體 (agarose gel) 電泳，分離樣本中各種不同大小的 DNA 分子。接著，這些 DNA 分子可以利用毛細作用或通電，轉染到一個 NC 薄膜上，經由 DNA 變性使它們的雙股分開。然後將上述薄膜暴露在雜交探針 (probe) 裡，讓探針和 DNA 雜交 (hybridize)。探針是會產生放射線、或可以放出顏色或螢光的物質標記的單股 DNA、RNA 或寡核苷酸片段；最後是觀察結果。薄膜上可以偵測到放射性或者螢光訊號的位置，就是含有可以與探針核酸序列進行偶合的 DNA 位置。

(三)北方點墨法 (Northern Blotting)

北方點墨法 (Northern Blotting) 是一種偵測 RNA 的實驗方法。

先利用變性洋菜膠(denature agarose gel) 電泳，分離樣本中各種不同大小的 RNA 分子。接著，這些 RNA 分子可以利用毛細作用或通電，轉染到一個 NC 薄膜上，變性洋菜膠電泳時 RNA 分子是變性展開的。然後將上述 NC 薄膜暴露在雜交探針 (probe) 裡，讓探針和 RNA 雜交 (hybridize)。探針是會產生放射線、或可以放出顏色或螢光的物質標記的單股 DNA、cDNA、RNA 或寡核苷酸片段；最後是觀察結果。NC 薄膜上可以偵測到放射性或者螢光訊號的位置，就是含有可以與探針核酸序列進行偶合的 RNA 位置。

二、生物技術的不斷發展，直接提升人類的生活品質。其中最值得一提的成果，就是在單株抗體 (Monoclonal Antibody) 技術出現以後，針對懷孕婦女的檢查 (妊娠試驗) 的發明，有著革命性的進步。特別是目前一般市售的懷孕試驗試紙 (hCG pregnancy strip test) 的出現，對於懷孕、甚至一些相關疾病的檢測，均能在最短時間，提供最方便準確的結果。請說明這種以懷孕婦女尿液為偵測方法的懷孕試驗試紙，其理論基礎為何？並請說明目前一般市售的懷孕

試驗試紙的設計原理為何？(25 分)

【擬答】

(一) hCG 試驗 (hCG pregnancy strip test) 是利用檢驗人絨毛膜促性腺激素的方式，判斷是否有懷孕的試驗 (妊娠試驗)。

驗孕快檢試紙是利用特異性抗原選擇性高敏感的偵測尿液中 25 mIU/ml 以上 hCG 含量，作為判斷懷孕的參考。human chorionic gonadotropin (hCG) 是一種在懷孕過程中由胎盤產生的醣蛋白荷爾蒙。由於在母體尿液濃度會快速增加而成為懷孕試驗所偵測的對象，在懷孕第 8-11 週時濃度到達最高峰 50,000 mIU/ml。

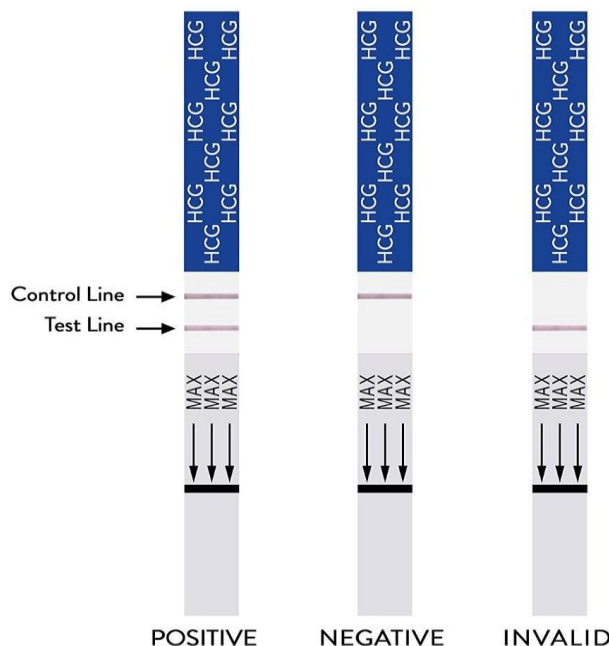
(二) 目前一般市售的懷孕試驗試紙的設計原理

一般市售的懷孕試驗試紙為快速檢驗的單一步驟懷孕快速檢驗試紙 One Step hCG Pregnancy Rapid Test Strip。測試方式是將快速檢驗試紙特定一端置於尿液中，或是將三滴尿液滴在特定的部位，約二到三分鐘就可以看到結果。

測試原理：將尿液檢體滴在試紙特定端，檢體會移經結合區並與結合劑區上膠體金-抗 hCG 單抗抗體 (colloid gold-mouse anti-hCG Ab) 結合，此結合液藉著毛細作用繼續移動，並和檢測 T (Test) 區上的 hCG 抗體反應。如果 hCG 含量大於 25 mIU 時，則檢測線 T 會顯現膠體金的紅色色帶；反之則不會呈色。結合液繼續移到管控 C (Control) 區時，其上被覆有會和金膠體抗體結合的 goat anti-mIgG 二抗抗體，結合後會出現紅色色帶，表示此試驗是有效的。

下圖懷孕快速檢驗試紙，由下 (MAX 區) 向上毛細擴散。收集尿液後將試驗孕片的吸尿棉浸入尿液中，注意浸泡時不要超 MAX 標示線。靜待 2-3 分鐘後判讀顯示結果。

1. 陰性反應 (Negative)：結果區只有一條 C 色帶出現，表示檢體 hCG 含量不足以測出或者無 hCG，呈陰性。
2. 陽性反應 (Positive)：結果區出現兩條紅色帶 (T & C) 表示檢體中含的 hCG 量足夠被測出而成陽性。
3. 無效結果 (Invalid)：若在品管 C 帶沒有任何色帶出現，則本試驗是無效的，建議用另一新的試劑重做檢驗。



三、請說明什麼是藥物基因體學 (Pharmacogenomics) ? 為什麼會興起藥物基因體學? 並請預期藥物基因體學的應用? (25 分)

【擬答】

(一)藥物基因體學 (Pharmacogenomics)

藥物基因體學 (Pharmacogenomics) 是研究人類基因組在藥物反應過程中的作用。藥物基因體學分析個體的 DNA 遺傳構成如何影響人們對藥物的反應。將基因表達或單一核苷酸多樣化(SNP)與藥物代謝動力學 (藥物的吸收、分布、代謝、消除) 和藥物效應動力學以及藥物受體結合效應相關聯, 處理後天獲得性的與先天性的遺傳變異對藥物反應的影響。藥物基因體學主要的目標就是探討基因序列變異如何影響病患對藥物治療的反應, 以找出最適合的藥物和劑量進行治療。這些資訊將可減少傳統「試藥」的風險, 也能有效避免無法挽回的悲劇。因此, 藥物基因體學根據患者的基因型來保證最大療效的同時將不良反應降到最低, 用於探索合理的方法來優化藥物治療方案。

(二)藥物基因體學的興起

2003 全人類基因組計畫, 人類基因組定序完成, 開始進入基因解碼後基因組世代。在美國總統歐巴馬提出的「精準醫療計畫」中, 基因的篩檢與解讀扮演關鍵角色。基因密碼暗藏獨特的用藥指南, 人類的基因體序列約有 3×10^9 個鹼基對, 估計可製造出 20,000 - 25,000 種蛋白質。但人與人之間的基因序列不盡相同, 有時候只是一個鹼基對的差別, 就可能影響基因所表達酵素的活性、運輸蛋白的效率、或是代謝作用的速度, 而這些對於藥物停留在人體的時間、在血液能達到效果的濃度、和藥效的強弱等具有決定性的影響。

因此, 解開隱藏的致命訊息, 除了找到病人最適合使用的特定藥物之外, 藥物基因體學另一項重要的工作是減少藥物副作用。每個人對藥物的反應不一, 需要的劑量也可能不同, 而藥物基因體學可透過 DNA 遺傳資訊判斷患者比較適合使用的藥物劑量。例如患者的基因顯示藥物代謝速率比較快, 可能就需要比較高的劑量以確保療效; 而如果患者的代謝速率較慢, 那就會需要降低劑量以避免血中藥物濃度過高或藥物在體內停留過久而引起副作用。

相同疾病, 不同病人, 因為基因組成的些微差異, 對藥物的反應不同, 藥物基因體學因而興起, 客制化的個人化精準療法的藥物基因體學因此誕生。

(三)藥物基因體學的應用

藥物基因體學是研究藥物反應和個體間基因差異關係的一門學科, 其研究主要可分成三個部分: (1)與藥效有關的基因研究; (2)與藥物不良反應有關的基因研究; (3)與藥物代謝速度有關的基因研究。

因此應用於下列三方向:

1. 藥物基因體學應用在個人化精準醫療: 提供各種基因與藥物交互作用資訊, 協助臨床醫師與醫護人員改善醫療用藥。也讓患者可獲得更安全、有效的治療方式。
2. 新藥研發: 藥物基因體學主要的目標就是探討基因序列變異如何影響病患對藥物治療的反應, 以找出最適合的藥物和劑量進行治療。
3. 客制化醫療的建立。

四、請依「食品安全衛生管理法」第三條之定義，說明何謂「基因改造」？(5 分)何謂「基因改造食品」？(5 分)市面上一般「基因改造食品」呈現的方式有那三種？(10 分)並請說明如何檢驗上述三種呈現的「基因改造食品」？(10 分)

【擬答】

(一)基因改造定義：

「食品安全衛生管理法」第三條之定義中，基因改造：指使用基因工程或分子生物技術，將遺傳物質轉移或轉殖入活細胞或生物體，產生基因重組現象，使表現具外源基因特性或使自身特定基因無法表現之相關技術。但不包括傳統育種、同科物種之細胞及原生質體融合、雜交、誘變、體外受精、體細胞變異及染色體倍增等技術。

(二)基因改造食品定義：

基因改造食品(Genetically modified food, GMF)，又稱轉基因食品、基改食品，就是利用現代分子生物技術，將某些生物的基因轉移到其他物種中去，改造生物的遺傳物質，產生遺傳修飾生物體(genetically modified organism, GMO，又稱基改生物)，此生物體包括可食用微生物、動物、植物，使其在形狀、營養品質、消費品質等方面，偏向人們所需要的目標轉變，進而形成可以直接食用，或者作為加工原料生產的食品。

(三)市面上一般「基因改造食品」呈現的三種方式：

1. 植物性基改食品

(1)基因轉殖食品生活中常見的有原料是使用來自進口的黃豆、玉米、油菜等的相關產品，多數都是經過高度加工的產物，而非直接以原植株狀態供食用。

(2)抗蟲作物：生長容易受鱗翅目昆蟲威脅，為了抵禦病蟲害，科學家轉入一種來自於蘇力桿菌的 Bt 基因，它僅能導致鱗翅目昆蟲死亡，因為只有鱗翅目昆蟲有這種基因編碼的蛋白質的特異受體，而人類及其他的動物、昆蟲均沒有這樣的受體，以此方式培育出的抗蟲作物對人無毒害作用，但僅能抗鱗翅目昆蟲。

(3)抗除草劑，例如抗嘉磷塞除草劑的大豆(RoundUp Soybean)。

2. 動物性基改食品

美國食品及藥物管理局 2015 年 11 月批准美國水產生技公司培育的基因改造鮭魚生產且上市，是第一個動物基改食品的案例。其他未通過的案例，如在牛體內轉入某些具有特定功能的人的基因，就可以利用牛乳生產基因工程藥物，用於人類疾病的治療。

3. 微生物性基改食品

微生物是基因轉殖最常用的轉化材料，故基因轉殖微生物比較容易培育，應用也最廣泛。例如，生產奶酪的凝乳酶，以往只能從殺死的小牛的胃中才能取出，現在利用基因轉殖微生物已能夠使凝乳酶在體外大量產生，避免了小牛的無辜死亡，也降低了生產成本。

(四)檢驗三種呈現的「基因改造食品」：

目前食品業界常用的基因改造檢驗方法有可分為：

1. 定性，「定性檢驗」又稱為「鑑別試驗」，就是要檢驗出食品中是否含有某種基因改造食品的成分，定性檢驗通常是以 PCR、ELISA 或 Rapid Test (快篩試劑)的方法進行。

2. 定量，「定量檢驗」是要檢測某一食品中基因改造成分的含量有多少，定量檢驗使用之方法為 Real-time PCR，我國基改食品標示規範中，基因改造食品的成分含量超過 3%時，就必須標示為「基因改造食品」。

檢驗方法多以下列方式進行：

(1)快篩檢驗試劑 Rapid test

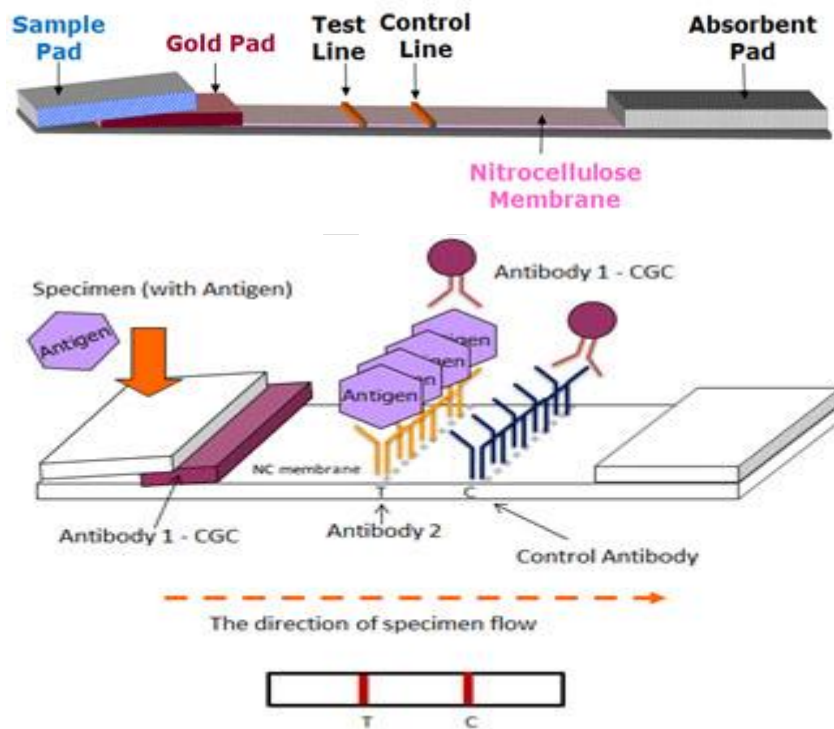
基改食品殖入基因以蛋白質方式表達，因此，可以利用此種表達的蛋白質作為抗原，

公職王歷屆試題 (110 特種考試)

以抗原快篩檢驗加以確認，常用抗原快篩檢驗試紙。

原理：檢體層含有檢體萃取液 → 膠體金—抗體層 → 毛細擴散經硝化纖維膜 (nitrocellulose filter, NC) → Test 檢測線被覆抗原的單株—抗體 → Control 對照線被覆一般抗體 control antibody ----

結果：T & C 線呈紅色為基改食品陽性 (+)。



(2) PCR 與即時 real time PCR 檢測

① 聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR)

目前應用的聚合酶連鎖反應需要幾個基本組成：

- ① 檢體 DNA 模板 (template)，含有需要擴增的 DNA 片段。
- ② 2 個特異性引物 (primer)，決定了需要擴增的起始和終止位置。
- ③ 耐高溫 DNA 聚合酶例如 Taq DNA polymerase，複製需要擴增的區域。
- ④ 四種去氧核苷酸 (dNTPs, dATP+dGTP+dTTP+dCTP)，用於複製新的互補鏈。
- ⑤ 含有鎂離子的緩衝溶液，提供適合聚合酶行使功能的化學環境。
- ⑥ PCR buffer
- ⑦ 聚合酶鍊式反應在熱循環設備 Thermocycler 中進行。

PCR 儀可以將反應管加熱或冷卻到每步反應所需的精確的溫度。

一般的聚合酶鍊式反應由 20 到 35 個循環組成，每個循環包括以下 3 個步驟：

- ① 變性 (denature)：利用高溫 (93-98°C) 使雙鏈 DNA 分離。高溫將連接兩條 DNA 鏈氫鍵打斷，時間 1-2 分鐘，接下來機器就控制溫度進入循環階段。
- ② 退火或稱復性接合 (anneal)：在 DNA 雙鏈分離後，降低溫度至 42-52°C 使得引物可以結合於單鏈 DNA 上，時間 1 分。
- ③ 延伸 (extension)：DNA 聚合酶由降溫時結合上的引子開始沿著 DNA 鏈合成互補鏈。此階段的溫度依賴於 DNA 聚合酶。傳統的 Taq 估計合成 1000 bp 大概需要 1 分鐘，有修正功能的則會比較慢。

為防止反應體系中液體產生蒸氣，通常在反應管上加蓋加熱的蓋子 (比加熱板溫度來的高)，或者在反應體系表面加入一層石蠟油。

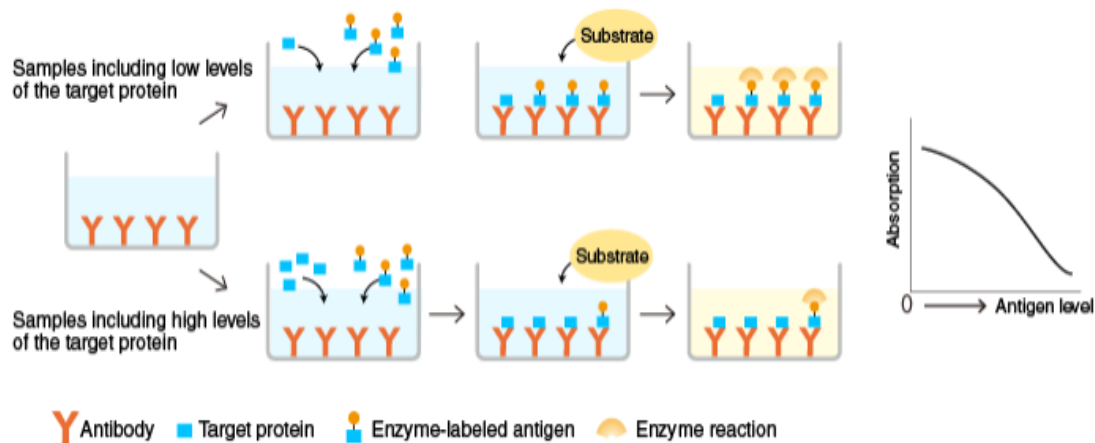
② Real-time PCR 跟傳統 PCR 不同之處在於前者可經由光學系統去監測反應中產物量

(螢光物質)的變化而反應在電腦上，後者則必須等反應結束後再進行洋菜膠體電泳分析。Real-time PCR 的配備主要有 PCR 機器、光學系統及電腦。隨著技術的改良進步，Real-time PCR 在精確度及敏感度都優於傳統 PCR。目前 Real-time PCR 螢光系統可大致分為「非探針型」及「探針型」。

在 PCR 過程中，原始的樣本會先受熱形成單股的 DNA，接著引子進行專一性的結合成雙股 DNA，此時 SYBR Green 會與雙股 DNA 進行結合，然後釋放螢光，進而被螢光系統偵測。螢光的訊號則是在每個循環中的 annealing 或 elongation 階段被偵測；藉由偵測到的螢光強度回推樣本的含量。

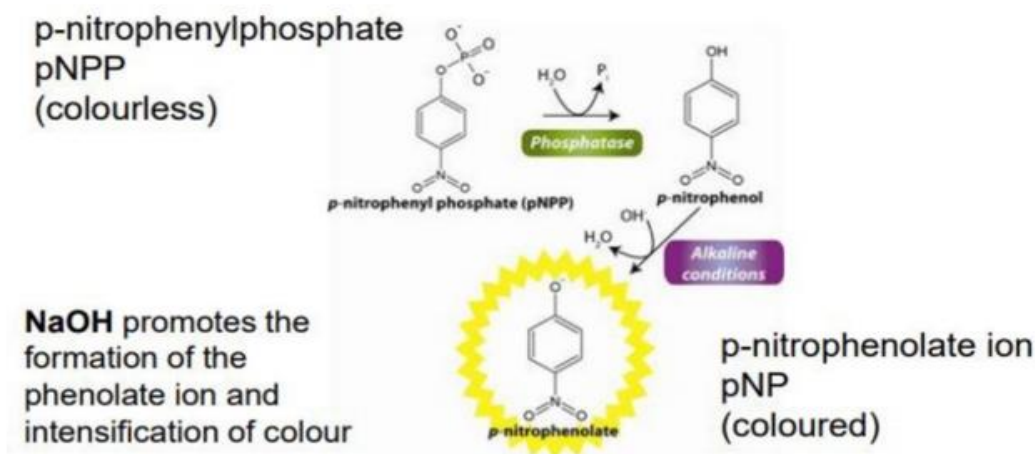
(3) 酵素連鎖免疫吸附分析法 ELISA

酵素連結免疫吸附法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)之原理乃依據放射源(radio immunoassay, RIA)方法發展而來，其原理為抗原-抗體免疫鍵結反應，將酵素連接到抗體分子上來偵測對應的抗原，最後加上酵素的受質，依其呈色強弱以評估檢體中待測物存在的濃度。



Y Antibody ■ Target protein ■ Enzyme-labeled antigen ● Enzyme reaction

ELISA 呈色：以 Ab—alkaline phosphatase 為例。Alkaline phosphatase 將受質 pNPP 的磷酸根切除，生成 pNP 在 A₄₀₅ 有吸光呈黃色。



www.gbiosciences.com

pNP absorbs light at 405 nm, $\epsilon^{1M} = 18000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$