

108 年特種考試地方政府公務人員考試試題

等 別：三等考試

類 科：衛生技術

科 目：生物技術學

一、請說明何謂定位點突變 (Site-Directed Mutagenesis) 技術？並列舉兩種常用的定位點突變方法。另說明定位點突變技術在生物技術上之應用。(20 分)

【擬答】

(一) 定位點突變 (Site-Directed Mutagenesis) 技術

定點突變 (Site-directed mutagenesis)，經由設計好的寡核苷酸引子，在這個引子片段上進行隨意或設計好的突變，也就是說，這種突變是預先設定好的，所以也有人將它稱為「反遺傳法」。定點突變由加拿大生物學家麥可·史密斯發明，他與 PCR 發明者凱利·穆利斯在 1993 年共同獲得諾貝爾化學獎。

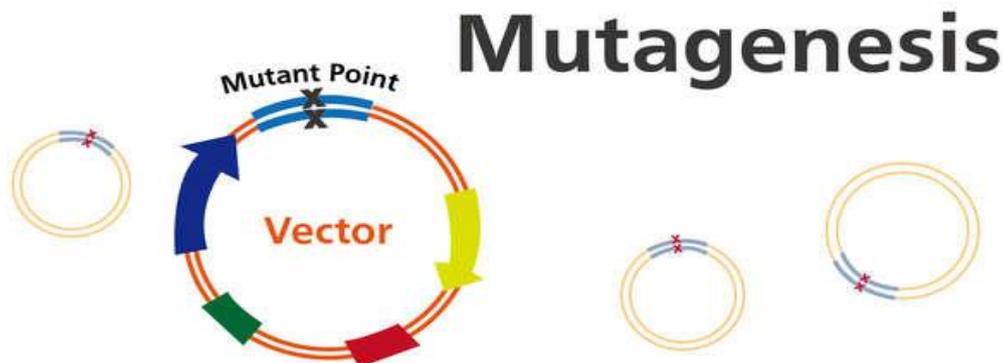
定點突變的基本流程需要合成一個短的 DNA 引子。其包含了目標突變，並且與突變位點附近的模板 DNA 互補以與目的基因的 DNA 可以雜合。突變可以是一個鹼基的改變 (點突變)，多個鹼基的改變，增加或者刪除。這個引子接著被一個 DNA 聚合酶延展，拷貝剩下的基因。拷貝後的基因包含了突變位點，並以載體的形式引入宿主細胞，並被複製。最後，突變將通過 DNA 測序以確保包含了目標突變。

設計完全互補的一對 primer，其中把想要突變的位點盡量放於 primer 中間，primer 長度約 25-45 bases， T_m 控制在 75 度以上，primer 兩端最好有 G 或 C 加強和 DNA 模板的結合能力。

(二) 兩種常用的定位點突變方法

1. 方法一：一步法定點突變 (直接以質粒 plasmid 為模板)

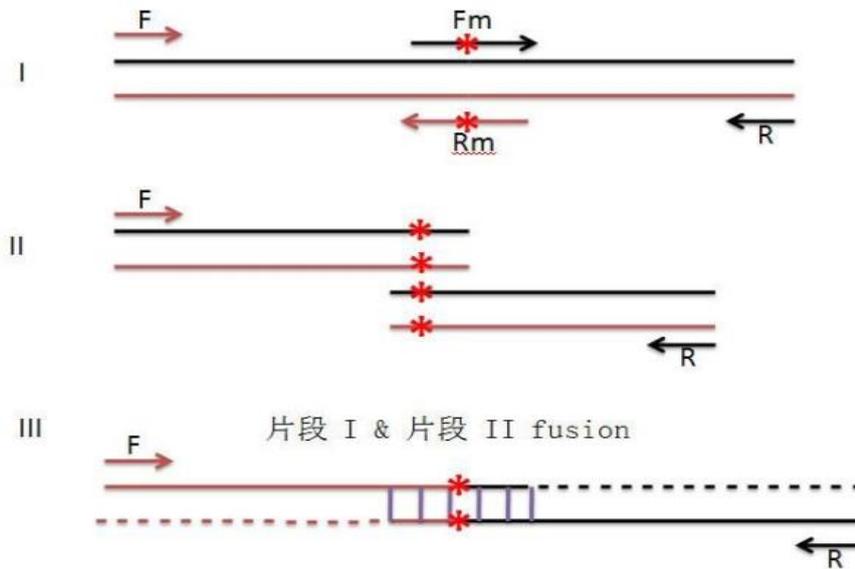
這種方法主要是用質粒為模板，所以為了擴增的效率，我們將正向引物和反向引子分開擴增，避免二聚體的產生。



2. 方法二：搭橋法 (線性 DNA 的定點突變)

這種也是比較常用的做基因定點突變的方法，主要原理是通過四對引物擴增出有重疊的序列，然後通過重疊延伸得到完整的序列。

擴增的序列儘量不要太長，否則成功率不高。



(三)定位點突變技術在生物技術上之應用

利用分子選殖的方法，可以改變基因上的特定鹼基，送入載體之後，可在宿主中表現。亦可知道特定胺基酸的改變對蛋白質和酵素的影響。

二、何謂噬菌體治療 (Phage therapy)？並說明噬菌體治療之優缺點及目前的進展。(20 分)

【擬答】

1. 噬菌體療法 (bacteriophage therapy, 簡稱 phage therapy) 創新方法來治療具有抗生素抗藥性 (antibiotic resistant) 細菌所造成的傳染病。此種療法是以病毒作為武器，來對抗許多難以根治的傳染病。
噬菌體是一種無所不在的病毒 (它們的數量比世上任何有機體都要多)，得以用來對抗細菌。它們會在細菌的細胞內引入自己的 DNA，隨後便會迅速地複製分裂，最終導致細菌本體脹大破裂而死亡。
選用適當的「噬菌體」(Bacteriophage 即 Bacteria-eater, 簡稱 Phage)，把感染的「超級細菌」殲滅掉，使病人恢復健康。這種治療方法稱為「噬菌體療法」(Phage therapy)。
2. 噬菌體治療優點：
在大多數的情況下，每一種噬菌體都有其專門攻擊的特定細菌種類。因此，假如能夠正確無誤地使用噬菌體，它們將會比「廣效性抗生素」(broad-spectrum antibiotics 指抗菌範圍廣泛的抗生素，甚至會傷害好的菌株) 要好，以更貼近患者症狀的方法來對抗抗藥性傳染病。
3. 噬菌體治療缺點：
 - (1) 特定細菌需要特殊的噬菌體吞噬，需要結合基因定序及人工智慧技術，精確找出所需的噬菌體。
 - (2) 目前美國 FDA 還沒准許這種療法的使用，只能在特別情況下，以「緊急研究用的新藥」(Emergency investigational new drug) 為名，特別申請、批准後，(可說是在「生死關頭」、「束手無策」的情況下)，才能使用。
4. 目前的進展：
超級細菌簡單來講就是用盡所有抗生素都無法殺死的細菌，這一類細菌幾乎對所有抗生素都有抗藥性 (carbapenem-resistant Enterobacteriaceae, CRE)，甚至是多重抗藥性 (multidrug-resistant)。科學家可能找到對抗抗藥性細菌的新戰將了——噬菌體 (bacteriophage)。

加州大學聖地牙哥醫學院是首批重新重視噬菌體療法前景的機構之一。這一切開始於 2015 年。當時加州大學聖地牙哥分校全球衛生科學院副院長史黛芬妮·史特絲蒂 (Steffanie Strathdee) 與丈夫湯姆·派特森 (Tom Patterson) 正在埃及旅遊，不料湯姆卻染上超級病菌造成的致命傳染病，差點奪走他的性命。在研究治療丈夫疾病的最後手段的過程中，史特絲蒂偶然看見關於噬菌體應用的研究。由於當前噬菌體療法在美國並非受到核可的療法，因此想要使用此種療法的患者需要得到美國食品和藥物管理局 (Food and Drug Administration, FDA) 關於「緊急用途」的批准。派特森於 2016 年 3 月接受治療，而且結果相當成功。

直至目前為止，噬菌體療法仍是一種實驗性治療。但加州大學聖地牙哥醫學院和它們的夥伴，希望後續的研究能證明噬菌體療法是有效的，並期待能得到政府的核准。史特絲蒂說道，「我們認為噬菌體療法，值得我們以嚴謹的臨床實驗更進一步地探索。」

現在科學家開始結合基因定序及人工智慧技術，精確找出所需的噬菌體。

三、請說明下列各種幹細胞的來源極可能用途：(每小題 5 分，共 20 分)

(一) 胚胎幹細胞 (Embryonic Stem Cells; ESCs)

(二) 成體幹細胞 (Adult Stem Cells; ASCs)

(三) 誘導性多功能幹細胞 (Induced Pluripotent Stem Cells; iPSCs)

(四) 治療性細胞株培植 (Therapeutic Cloning or Somatic Cell Nuclear Transfer)

【擬答】

(一) 胚胎幹細胞 (Embryonic Stem Cells; ESCs)

來源：胚胎幹細胞的來源為胚胎內之細胞團塊，其珍貴之處在於具有能力發展成一個完整生命個體所需之各式各樣不同的細胞組織。胚胎幹細胞是一類具有多能性的幹細胞。在卵細胞受精後，受精卵經過桑葚胚(morous)階段，進入囊胚階段。囊胚中的細胞可以歸入兩個大類：滋養層 (trophoblast, TE) 和內細胞群 (inner cell mass, ICM)。滋養層的細胞會分化為胚胎外的組織 (胎盤等)，內細胞群的細胞則會分化成胚胎的其餘結構。分離內細胞群細胞並進行體外 (in vitro) 培養，即可取得胚胎幹細胞。胚胎幹細胞擁有分化為三個胚層的細胞的潛能，或者說在一般情況下能分化形成除了胎盤之外的所有胚胎結構，此為胚胎幹細胞多能性的具體體現。

用途：胚胎幹細胞被認為在再生醫學、組織工程、藥物實驗等領域擁有廣闊的應用前景，胚胎幹細胞對發育生物學的基礎研究也有很大助益。

(二) 成體幹細胞 (Adult Stem Cells; ASCs)

來源：成體幹細胞是存留於胎兒和成人組織器官中，仍保有生長並分化成其他種類細胞能力的細胞。

成體幹細胞有很多種類，其中造血幹細胞(HSC, hematopoietic stem cells) 以及間質幹細胞 (MSC, mesenchymal stem cell) 已有多年研究的成果。

用途：造血幹細胞的主要功能為分化成不同的血球：包含紅血球、血小板跟各種白血球等，當造血幹細胞分化為血液細胞後，是屬於全身性的分佈與循環，因此利用造血幹細胞做為基因治療的標的細胞，也勝於其他種類的幹細胞之優點，因此當前許多基因治療的計畫，都是以造血幹細胞為主要的研究對象。

間質幹細胞主要功能為分化成血球以外的細胞，如骨頭、脂肪、肌肉、神經等。

(三) 誘導性多功能幹細胞 (Induced Pluripotent Stem Cells; iPSCs)

來源：把 Oct3/4, Sox2、c-Myc 和 Klf4 這四種轉錄因子基因克隆入病毒載體，然後引入小鼠

公職王歷屆試題 (108 地方特考)

成纖維細胞，發現可誘導其發生轉化，產生的 iPS 細胞在形態、基因和蛋白表達、表觀遺傳修飾狀態、細胞倍增能力、類胚體和畸形瘤生成能力、分化能力等方面都與胚胎幹細胞相似，稱為誘導性多功能幹細胞。

用途：iPSCs 在細胞替代性治療以及發病機理的研究、新藥篩選以及神經系統疾病、心血管等疾病等臨床疾病治療等方面具有巨大的潛在價值。

(四)治療性細胞株培植 (Therapeutic Cloning or Somatic Cell Nuclear Transfer)

來源：「治療性複製」(Therapeutic cloning) 或稱作「體細胞細胞核轉植」(somatic-cell nuclear transfer, SCNT) 就和 1996 年複製桃莉羊的方法一樣：捐贈的體細胞—像是皮膚細胞的細胞核，植入已經去除細胞核的未受精卵中；等到這顆帶有外來細胞核的卵發育到了囊胚 (blastocyst) 時期，就培養成穩定的細胞株。這支細胞株的遺傳組成和捐贈者相同，而且可以分化成任何種類的人類體細胞。

體細胞核移植是一種使用體細胞和卵細胞培育胚胎的常用技術手段。該技術提取去核卵母細胞，並把供體體細胞核移入卵母細胞中。

簡言之，細胞核移植技術，就是將供體細胞核移入除去核的卵母細胞中，使後者不經過精子穿透等有性過程即無性繁殖即可被激活、分裂並發育成新個體，使得核供體的基因得到完全複製。

用途：體細胞核移植技術被應用於臨床治療及克隆技術中。

種類	來源	取得方式	缺點及風險分析
胚胎幹細胞	胚胎內細胞團 (異體)	取受精卵中的內細胞團來培養	- 獲取來源少 - 有細胞變異及致癌性等風險 - 道德爭議大
iPS 誘導型幹細胞	表皮細胞反向誘導 (自體)	由遺傳基因導入皮膚成體細胞中製造而成	- 誘導成功困難度高 - 有細胞變異及致癌性等風險
牙髓幹細胞	乳牙、牙齦、牙周韌帶、 智齒 (自體)	自然脫落 (乳牙) 或人工取得 (牙齦、牙周韌帶、智齒)	- 單一細胞，其應用性較為侷限 - 細胞數量過低，需要使用時仍須經過擴增
骨髓幹細胞	脊椎中的骨髓 (自體、異體)	以骨髓穿刺取得	- 骨髓穿刺手術需全身麻醉，侵入性高風險較大 - 傷口易感染，需住院觀察，恢復時間較長 - 細胞數量及穿刺次數有限
脂肪幹細胞	脂肪 (自體)	透過抽脂手術後取得	- 單一細胞，其應用性較為侷限 - 分化能力較差 - 細胞數量過低，需要使用時仍須經過擴增 - 傷口易感染 - 術後恢復時間較長
自體周邊血骨髓幹細胞	周邊血 (自體)	透過血液分離機取得，可多次收集	- 個體差異，例如對 G-CSF 的反應、身體狀況等會直接影響幹細胞的數量

四、基因治療最重要的一環是將治療基因帶入病人細胞中。請說明理想的基因運送方式應具備那些條件？並請說明基因運送的方法有那些？(20 分)

【擬答】

基因治療就是把一個新的基因放到病人的細胞中，藉此替換缺失或功能異常的基因。研究人員一般是利用病毒來攜帶這些遺傳物質進入細胞，因為病毒就是演化成做這件事的，將自己的基因插入宿主的基因組中。

基因療法的設計原理，是將遺傳物質帶入細胞中，用以補償損壞的基因或是產生有益的蛋白

公職王歷屆試題 (108 地方特考)

質。如果因為基因突變，導致重要的蛋白質缺陷或缺失，此時給予能產生具有完整功能蛋白質的基因，就可以恢復蛋白質的功能。但是有時候，缺陷基因產生的蛋白質，會執行錯誤的功能或影響其他蛋白質的作用，這時候就必須去除這些功能不正常的蛋白質，才能讓生物運作恢復正常。成功的基因治療可以防止蛋白質產生的傷害，比如透過基因療法恢復蛋白質的正常功能、提供蛋白質的新功能，或增強蛋白質的現有功能來達到療效。

(一)理想的基因運送方式應具備條件：

1. 病毒載體不能自己複製、散播—病毒載體不會自行散佈；
2. 病毒載體不能進入染色體中—不會影響接受者本身的遺傳結構；
3. 病毒載體不能進入生殖細胞中—病毒載體不會傳到下一代；
4. 要將病毒載體上的致病基因去除，所以基因治療基本上是安全的治療方法。
5. 在利用病毒時，通常是把某個病毒基因拿掉，然後以治療基因取代而製備出具有感染力的病毒。但在設計任何一種病毒載體時，最重要的便是將病毒本身會致病的基因剔除，同時也須避免病毒發生突變而產生有傳染力且會致病的病毒。

(二)基因運送的方法

目前基因治療面臨的首要頭痛問題是如何有效地將基因送入細胞，並且維持一定時間的基因表現，因此有各種不同的載體開發出來：

1. 病毒載體

病毒可自然感染細胞，它本身就有一套機制可將基因送入細胞核表現，因此為一高效率的基因傳送系統。在利用病毒時，通常是把某個病毒基因拿掉，然後以治療基因取代而製備出具有感染力的病毒。但在設計任何一種病毒載體時，最重要的便是將病毒本身會致病的基因剔除，同時也須避免病毒發生突變而產生有傳染力且會致病的病毒。

目前常用的病毒有反轉錄病毒、腺病毒、腺相關病毒與簡單病疹病毒等。

- (1)反轉錄病毒 (retroviruses)，是最早使用也是最普遍的載體，它可將目標基因嵌入細胞染色體，因此可長期表現所需的蛋白質，但反轉錄病毒只能將基因送入會分裂的細胞，對於體內許多不會分裂的細胞，如腦、神經細胞，則無法成功。同時，若目標基因被嵌入染色體內調控細胞生長的基因位置，而將其截斷，則可能引發癌症。
- (2)腺病毒 (adenovirus)，則可感染不分裂細胞，同時也已用來作為預防呼吸道感染的疫苗，因此也可作為基因治療載體，不過臨床實驗中發現會產生強烈副作用，此乃因腺病毒本身基因也會在細胞內表現，而誘發強烈的免疫反應，因此新開發的載體已作改良將病毒本身基因去除。腺病毒 (adenovirus) 則會將他們的 DNA 送入細胞的細胞核中，但送入的 DNA 並不會安插到人類細胞的染色體上。這些被送入的新基因片段，能夠被人體系統辨識，利用細胞中原有的轉錄及轉譯機制，製作出此基因的蛋白質，在人體中執行正常功能，進而治癒基因缺陷或突變而造成的疾病。
- (3)腺相關病毒 (adeno-associated virus, AAV)，則是另一種可將基因嵌入染色體的病毒，此病毒本身並不會造成病症，因此相對安全，但在製造此病毒時，須要利用腺病毒提供必要的蛋白質，因此在製造腺相關病毒後，須確保裡面並不含有腺病毒才不會造成不必要的副作用；此外，腺相關病毒本身非常小，因此所能攜帶的目標基因大小只能到 3.5~4 千個鹼基對，因而限制了它的用途。
- (4)簡單病疹病毒 (HSV, Herpes simplex virus)，則可感染神經細胞，因此適合用於治療神經退化性疾病，如帕金森氏症、艾茲海默症等。

2. 非病毒載體

- (1)裸露 DNA

直接將帶有目標基因的質粒 DNA 以注射或點滴送入體內，這方法非常簡便，但往往 DNA 送入細胞的效率不高；即使 DNA 進入細胞，裸露 DNA 也容易被細胞內的酵素分解，而無法進入細胞核內表現，或者表現時間短暫而須重複施打基因。但此法主要優點在副作用及潛在毒性較小。

(2) 脂球體(liposome)

磷脂質是同時帶有親水與疏水性質的分子，當磷脂質濃度夠高時其疏水端會自發性聚集而形成微脂粒。若與 DNA 混合，則其疏水端可將 DNA 包覆起來，而將親水端暴露在外。由於細胞膜主要成分亦是磷脂質，因此磷脂質與細胞膜接觸時可利用融合現象將 DNA 送入細胞。這方法已廣泛使用於 DNA 轉染入細胞，因此也用於基因治療，但一般而言，微脂粒傳送效率並不高。

(3) DNA 複合物

原理與微脂粒類似，但磷脂質由一設計的複合物取代，此複合物一般由兩部分組成－聚陽離子與配體。聚陽離子常用聚離胺酸，因其所帶正電可吸引 DNA 上的負電，並進而將它包覆起來；而配體則負責與細胞上受體結合並進入細胞。視所結合受體不同，配體可為醣蛋白、抗體、醣類或其他生物分子，DNA 在進入細胞內後，可形成內核體而逃避酵素分解 DNA，並將 DNA 送入細胞核。

五、近年來腸道菌叢 (Gut Microbiota) 與疾病相關的研究逐漸受到重視。但由於腸道菌叢不容易培養，必須採用其他非培養的方法來分析，請說明可採用之方法有那些？(20 分)

【擬答】

腸道菌叢(Gut Microbiota)主要指棲息在人體腸道內的龐大數目之細菌族群。正常情形下，預估超過 10^{14} 的菌群居住於腸胃道，因此其對於人體的各種生理及病理現象影響相當明顯且重要。

人類微生物群是生活在人體表面和體內的全部微生物集合體，其對人體生理學、免疫系統發展、消化和解毒反應非常重要。存在於腸道中的微生物，參與了與宿主健康有關的重要蛋白之編碼，如水解不易消化的膳食化合物所需的酶以及維生素的合成。人體中有兩個基因組，一個來自父母遺傳，另一個則是來是微生物群，這兩基因組織間的區別在於遺傳基因組在生命中幾乎保持穩定，但微生物群則是非常動態的，並且可能受到多種因素的影響如：年齡、飲食、激素週期、旅行、治療和疾病。

因此，當我們更了解健康各體中微生物的組成和功能，以及人類腸道微生物菌群改變對疾病發展的影響，就可利用微生物體 (microbiome) 作為診斷和治療應用的新標的。

使用次世代定序 (NGS) 技術可以對特定的微生物組表徵進行深入定性和定量，而不會受到與培養方法相關的選擇偏差和限制。這些技術也被用於人類微生物組計劃，其目的是獲得生活在人體各個地區微生物的完整目錄並確定其功能。以下為利用 NGS 分析總體基因體學 (Metagenomics) 之研究策略：

