

## 109 年公務人員高等考試試題

類 科：衛生技術

科 目：生物技術學

一、短干擾 RNA (short interfering RNA, siRNA)、短髮夾 RNA (short hairpin RNA, shRNA) 與抗體 (antibody) 是常用於專一性抑制特定蛋白質的表現 或活性之生物技術方法。試從分子結構、抑制原理與實驗步驟流程之角度，說明比較上述 3 種分子。(20 分)

【擬答】志聖阮籍生物技術學 A01, p.160-163, p.165-166, p. 76-82

(一)短干擾 RNA (short interfering RNA, siRNA)

RNA 干擾簡稱 RNAi (RNA interference)，是一種細胞內 RNA 干擾現象或系統，能夠干擾標的細胞內特定 mRNA，直接降解或抑制進一步的轉譯，因此可以控制基因轉錄後的蛋白質表達，稱為 RNA 干擾。能夠干擾、控制基因轉錄後的蛋白質表達的小分子 RNA，則稱為 siRNA 或 miRNA 或人工合成的 shRNA 等。

在發育生物學上，常用於線蟲(*C. elegans*)、果蠅或酵母菌的基因研究，RNA 干擾有效的"沈默"特定基因，可以抑制 HIV 病毒的感染與複製上。

RNA 干擾現象在 1998 年首度於線蟲中發現，利用雙股的 RNA(dsRNA)並將其送到細胞中後，dsRNA 會被一種名為 Dicer 的酵素分解成許多小片斷。這些小片斷的 RNA(Short interfering RNA，簡稱 siRNAs)結合到特定序列之 RNA 上，引發 RNA 序列的降解，使 mRNA 無法轉譯蛋白質，造成該特定基因"沈默 (gene silencing)"，失去功能。

RNAi 作用原理與機轉:

RNA 病毒或合成的特異基因 dsRNA，經由感染或其他方法送入標的細胞內，此種 dsRNA 會誘導細胞內一種稱為 Dicer 的酵素 (RNase III endonuclease) 的表現，Dicer 利用其 dsRNA 特異內切酶活性將 dsRNA 切成 21-23 nt 的小 RNA 片段，這些小 RNA 片段被稱為 siRNAs (small interfering RNAs)，siRNA 的 3'端有 2 個核苷酸的凸出，這些 siRNA 本身可以大量複製。

Dicer 結合於 siRNA，利用本身的 helicase 活性將 siRNA 解開為單股，此時單股的 siRNA 再結合另一種稱為金羊毛 (Argonaute)的 dsRNA 特異內切酶，在 GTP/Mg<sup>2+</sup>存在下，siRNA/Dicer/Argonaute/ ATP/Mg<sup>2+</sup>形成 RNA 誘導的沉默複合物 (RISC, RNA-induced silencing complex)，RISC 會利用它的 siRNA 片段結合到細胞內轉錄的 mRNA 互補區，隨後，RISC 利用 Argonaute RNase III 活性，水解細胞內 mRNA，

使得特異性基因無法進一步被轉譯。此一過程稱為 RNA 干擾現象，其結果是:

特定基因被沉默(gene silenced)或被剔除(gene knock-outed)。

(二)短髮夾 RNA (short hairpin RNA, shRNA)

短髮夾 shRNA(Short hairpin RNA)是 2002 年 Brummelkamp 首次使用，在小老鼠 U6 啟動子之後構建 shRNA 表現載體 pSUPER。含 shRNA 構建的表現載體 pSUPER 經送入寄主細胞並表達該載體，證明此種 shRNA 特異性的踢除哺乳類動物細胞內標的基因，為利用 RNAi 於特定基因治療研究訂定了基礎。

U6 RNA 由 RNA 聚合酶 III 轉錄，伴隨其後端的構築 shRNA 被 RNA 聚合酶 III 所轉錄，因為設計成 sense 與 antisense 的相互配對，二者中間則非互補配對序列，因此轉錄出一緊密的髮夾形狀 shRNA。

shRNA 與 RNAi/miRNA 一樣，都可以誘導標的 mRNA 的降解，但是 shRNA 可以經由人為意志，利用基因工程技術，構築強力啟動子表現載體，因此，在應用功能上遠比 miRNA 要

強。

建構 shRNA 表現載體時，合成 dsDNA 片段(含 sense-loop-antisense)受控於啟動子，轉錄出 25-29 nt 的髮夾形 shRNA。shRNA 是一種形成急轉彎型(hairpin turn)結構的 RNA 序列，可以經由 RNA 干擾現象使特異基因沉默化。

shRNA 可利用載體導入細胞當中，如果是接在 U6 啟動子後，則寄主細胞內的 RNA 聚合酶 III 可以確保 shRNA 的轉錄。

shRNA 在細胞質內經由 Dicer 剪切成 21-23 鹼基的 siRNA，與 siRNA、miRNA 相同的原理，最後以 RISC 結合降解標的 mRNA。

### (三)抗體 (antibody)

抗體 (antibody)，又稱免疫球蛋白 (immunoglobulin，簡稱 Ig)，是一種主要由漿細胞分泌，被免疫系統用來鑑別與中和外來物質如細菌、病毒等病原體的大型 Y 形蛋白質，僅被發現存在於脊椎動物的血液等體液中，及其 B 細胞的細胞膜表面。抗體能通過其可變區唯一識別特定外來物的一個獨特特徵，該外來目標被稱為抗原。蛋白上 Y 形的其中兩個分叉頂端都有一被稱為互補位 (抗原結合位) 的鎖狀結構，該結構僅針對一種特定的抗原表位。這就像一把鑰匙只能開一把鎖一般，使得一種抗體僅能和其中一種抗原相結合。抗體和抗原的結合完全依靠非共價鍵的相互作用，這些非共價鍵的相互作用包括氫鍵、凡得瓦力、電荷作用和疏水作用。這些相互作用可以發生在側鏈或者多肽主幹之間。正因這種特异性的結合機制，抗體可以「標記」外來微生物以及受感染的細胞，以誘導其他免疫機制對其進行攻擊，又或直接中和其目標，例如通過與入侵和生存至關重要的部分相結合而阻斷微生物的感染能力等，就像通緝犯上了手銬和腳鐐一樣。針對不同的抗原，抗體的結合可能阻斷致病的生化過程，或者召喚巨噬細胞消滅外來物質。而抗體能夠與免疫系統的其它部分交互的能力，是通過其 Fc 區底部所保留的一個糖基化座實現的。體液免疫系統的主要功能便是製造抗體。抗體也可以與血清中的補體一起直接破壞外來目標。

二、完成人類基因體計畫 (Human Genome Project) 後，生物醫學相關研究與 科技蓬勃發展，越來越多的高通量 (high throughput) 生物技術與儀器問世，更全面且深入地進行基因研究定序；並透過生物資訊工程分析比對，應用於疾病檢測、預防醫學以及個人化醫療領域。試說明 RNA-seq、Riboseq 和全基因體定序 (whole genome sequencing, WGS) 之技術原理與應用上的優缺點。(20 分)

【擬答】志聖阮籍生物技術學 A01, p.205-206, p. 106-112

#### (一) RNA-seq

核糖核酸測序，簡稱 RNA 測序 (RNA Sequencing, RNA-Seq)，也被稱為全轉錄物組散彈槍法測序 Whole Transcriptome Shotgun Sequencing，簡稱 WTSS) 是基於第二代測序技術的轉錄組學研究方法。RNA 測序是使用第二代測序的能力，在給定時刻從一個基因組中，揭示 RNA 的存在和數量的一個快照的技術。

首先提取生物樣品的全部轉錄的 RNA，然後反轉錄為 cDNA 後，進行的二代高通量測序，在此基礎上進行片段的重疊組裝，從而可得到一個個的轉錄本。

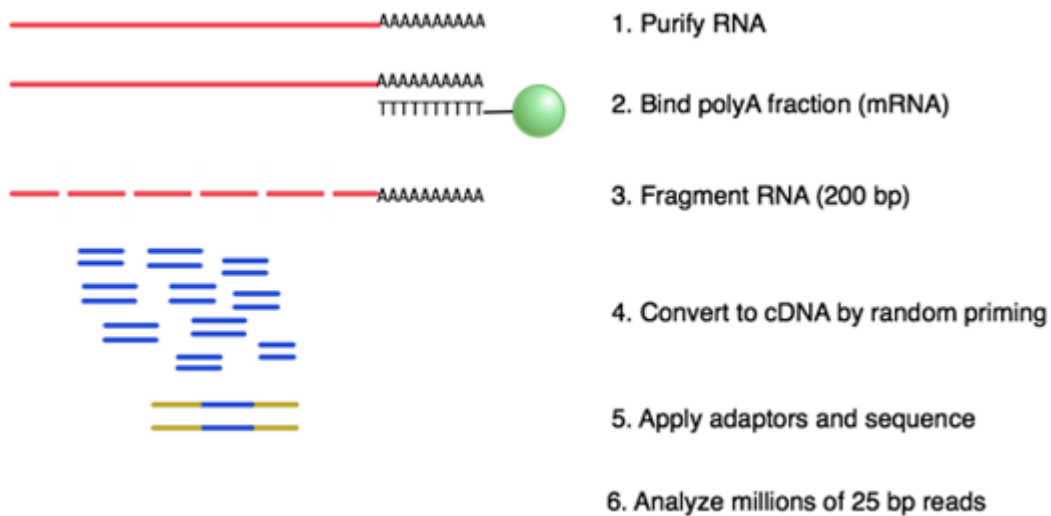
RNA-seq 即轉錄體測序技術，就是把 mRNA、small RNA 或非編碼 RNA 等，利用高通量定序技術把它們的序列定出來，測知 RNA 含量。RNA-seq 又稱全轉錄體散彈定序 (WTSS, Whole Transcriptome Shotgun Sequencing)，被視為轉錄體學上革命性的研究工具，是利用高通量定序法 (high-throughput sequencing) 將 RNAs 反轉錄的 cDNAs 定序的技術，用於研究細胞內所有 RNA 研究的新工具。

RNA-seq 定序的第一個步驟是分離純化 RNA。

## 公職王歷屆試題 (109 高考)

以 mRNA 為例，因為它們的 3'-端有 poly (A)，因此利用 oligo d(T)樹酯抓所有 mRNA，隨即將 mRNA 以特定 RNA 水解酶逢機剪切，選定特定大小的片段 (~200 bases)，加入 random primer 反轉錄為 cDNA，cDNA 合成 ds cDNA 後接合 adaptorDNA 序列，進行 cDNA 定序 (約 25 bases 即可)，所有 cDNA 片段 (約有百萬組)組合，定出各種轉錄體 RNA 序列。

製備 RNA-seq shotgun 基因庫的步驟如下：

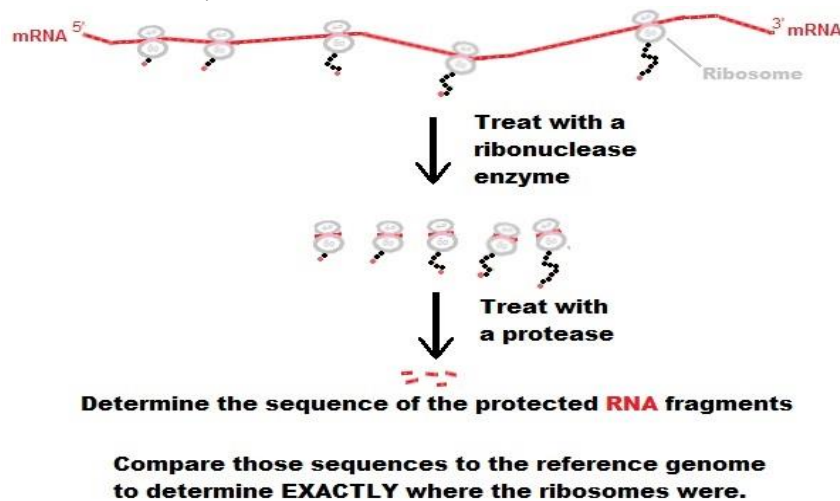


相較於傳統的晶片與 Sanger 法，轉錄體的定序不需要預先針對已知序列設計探針，即可對任意物種的整體轉錄活動進行檢測，提供更精確的數字化信號，更高的檢測通量以及更廣泛的檢測範圍，是目前深入研究轉錄體複雜性的強大工具。基因在各種組織或是不同的刺激之下，會經由 RNA 選擇性剪接 (RNA alternative splicing) 產生不同的亞型 (isoform)，或是經由 RNA editing 機制造成基因序列有所改變。此時 RNA-seq 不僅可以偵測基因表現量且還精準的讀取每一個序列。

RNA-seq 應用領域：轉錄體結構研究 (包括基因 exon/intron 界限鑑定、可變剪切研究等)，轉錄體變異研究 (如基因融合、編碼區 SNP 研究)，非編碼區域功能研究 (non-coding RNA 研究、microRNA 前驅體研究)，基因表達量的研究以及全新轉錄體的發現等。

### (二) Ribo-seq

核糖體圖譜 (Ribo-seq) 或稱 Ribosome profiling 或 ribosome footprinting，由 Ingolia 等人 2009 年 Science 上首次發表。從另一個角度研究翻譯，用低濃度的核糖核酸酶 (RNase) 處理細胞裂解物，使 mRNA 降解，但核糖體保護的 RNA 片段除外。然後，用下一代測序 (NGS) 分析 22-35 nt 的 mRNA 片段 (即核糖體足跡，RFPs)，相當於核糖體保護片段 (RPFs)，以揭示核糖體的位置和密度。因為 mRNA 表現量並無法很好的解釋蛋白質表現量的差異，美國的 Nick Ingolia 和 Jonathan Weissman 便在 RNA-seq 的基礎上發展出了 Ribo-seq，差別是後者在處理樣本的過程中，加入了 ribonuclease，將沒有核糖體保護的 RNA 分解，只分析有核糖體結合、當下正在進行轉譯的 RNA 片段 (ribosome-protected RNA fragments, RPFs)，能讓大家進一步了解轉譯調控 (translational regulation) 的作用。



(三)全基因體定序(whole genome sequencing, WGS)

全基因組定序 (Whole genome sequencing, WGS) 為對單一生物體基因組做完整 DNA 序列的過程，其中包含了生物體的染色體 DNA、粒線體 DNA 及植物葉綠體 DNA 等，目前全基因組定序被廣泛地用作研究工具，並且在未來也會應用在個人化醫療作為診斷的依據。

基因定序為研究基因的最初始關鍵，而根據定序的目標包含：全基因、外顯子及特定目標基因，又可細分成 Whole genome sequencing、Whole Exome Sequencing、Targeted Sequencing。

全基因體定序是針對特定模式物種的完整基因體定序。目前已完成全基因體定序的物種包括人類以及數種模式動物。許多影響人類健康和生活的物種，比如細菌和真菌也有許多全基因體定序的案例。此項研究適用於特定物種基因體的深度分析，例如人類疾病相關的基因研究。

三、自 2019 年底由新型冠狀病毒 SARS-CoV-2 (severe acute respiratory syndrome Coronavirus 2) 感染所引起之新冠肺炎 COVID-19 (Coronavirus Disease 2019) 迅速傳播蔓延。快速及準確取得疑似感染者之毒測檢體、進而檢測診斷並將確診患者適當隔離治療，是預防與控制 COVID-19 疫情 擴散蔓延的重要關鍵。試回答與檢測 SARS-CoV-2 感染有關之下列問題：

(一)檢測 SARS-CoV-2 感染應採取受檢者之何種檢體？(5 分)

(二)常用方法之原理、檢測技術流程以及檢測優缺點。(15 分)

【擬答】志聖阮籍生物技術學 1W, p.141-164

(一)檢測 SARS-CoV-2 感染之受檢檢體

1. 以無菌病毒拭子之棉棒擦拭咽喉或鼻咽，插入病毒保存輸送管。
2. 以鼻咽檢體，準確度較高。

(二)檢測 SARS-CoV-2 方法

實驗室診斷方法與原理:

1. 在 P2 & P3 實驗室培養分離 SARS-CoV-2 病毒

實驗室分為 P1 到 P4 四種不同安全等級，「P」為 "Physical containment level" (物理收容等級) 之意，其中 P1 實驗室適用於處理對個人及社區具低度危害性之微生物；P2 實驗室適用於處理對個人具有中度危害性，而對社區之危害有限之微生物；P3 實驗室適用於對個人具有高度危害性，而對社區具有中度危害性之微生物；P4 實驗室則適用於處理對個人及社區同樣具有高度危害性之微生物。SARS 或這次 COVID-19 的研究，一般操作在 P2 實驗室，但病毒培養及分離純化則需要在 P3 實驗室裡操作。

SARS-CoV 2 病毒培養依據疾病管制署公告「醫學實驗室處理嚴重特殊傳染性肺炎檢體



之實驗室生物安全指引」指出，有關進行涉及病原體在體外或體內增殖之診斷試驗，須於 BSL-3 (P3)實驗室下進行，以提高生物安全防護。因此國內實驗室需具備生物安全第三等級實驗室才有資格進行 SARS-CoV 2 的病毒培養，有鑑於病毒的分離對於研發有效疫苗、抗病毒藥物篩選及發展快速而精準的檢測試劑非常重要且必需。因此許多國家在疫情發生時，均成功分離出病毒株，包含臺灣。

## 2. Nucleic acid hybridization

利用具特殊專一性之探針 (probe)，結合上放射性  $^{32}\text{P}$  或者螢光染料，將檢體中的病毒核酸 RNA，以篩選檢體是否含有病毒。

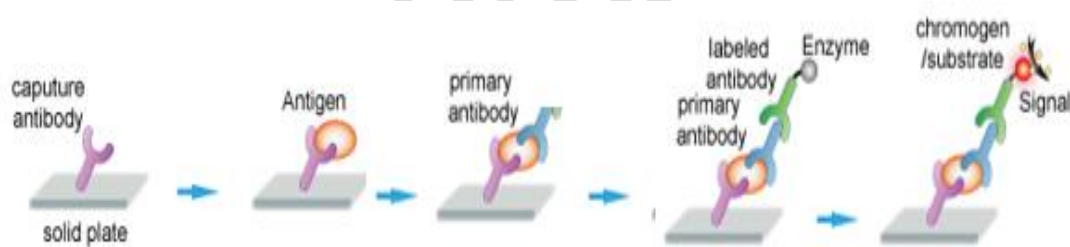
## 3. Real time RT-PCR

萃取病毒 RNA，利用反轉錄酶及 dNTPs 將 RNA 反轉錄為 cDNA，再利用具特殊專一性之引子 (primers)，將檢體中的病毒核酸 DNA/RNA 經由螢光 (CYBR Green) 定量聚合酶連鎖反應 (real-time PCR) 或一步法反轉錄螢光定量聚合酶連鎖反應 (One-step RT real-time PCR)，增幅出 DNA 片段，以篩選檢體是否含有病毒。所用之引子是根據病毒序列設計。此法需搭配螢光定量聚合酶連鎖反應儀器，平均耗時 2-4 小時。

## 4. Enzyme-linked Immunosorbant Assay (ELISA)

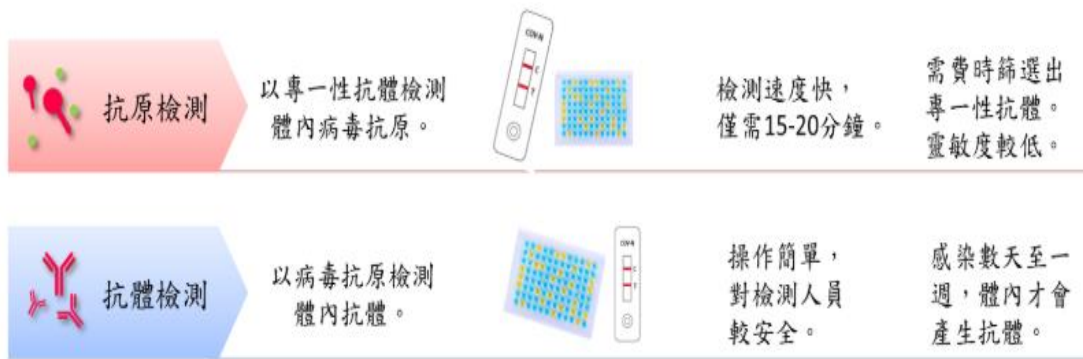
酶聯免疫吸附試驗的常見做法為，將特异性抗體 (一抗) 覆蓋到 96 孔盤中，藉以捕捉檢體中相對應的抗原，然後加入第二個特异性抗體，目標抗原會被夾在兩個特异性抗體中間，接著再使用酶標記二抗與受質反應，反應後的顏色深淺程度直接反映檢體的病毒量，對難以分離培養、形態特殊或病毒量較多的檢體，ELISA 檢測可以提供快速有效的病毒鑑定方法。

### Sandwich ELISA



## 5. 快速試紙檢測法

新冠病毒快篩試劑內含的試紙可依序分成 4 個部件：檢體層、膠體金抗體層、硝化纖維膜與吸收層。當含有受檢者呼吸道分泌物的檢體加到檢體層時，因各層纖維中的毛細作用將檢體內液體分子帶向最後方吸收層。檢體中含有新冠病毒蛋白抗原流經膠體金抗體層時，可以識別新冠病毒抗原的單株抗體會認出而與其結合在一起，而此處的單株抗體是已經結合了奈米等級膠體金的特製化抗體，也是快篩試劑能夠形成暗紅線條的原因。接著，抗原-膠體金抗體結合物流經有二道線硝化纖維膜，第一道是測試線，含有能抓住新冠病毒蛋白抗原的抗體，而第二道線則是控制線，有能抓住膠體金抗體分子的抗體。當受檢者體內有新冠病毒時，經硝化纖維膜則會呈現雙線，代表陽性結果。反之，受檢者體內沒有新冠病毒時，只呈現單線結果，代表陰性。



#### 6. 電子顯微鏡與冷凍電鏡法

##### (1) 電子顯微鏡(一般貴重實驗室可以執行)

用於病毒型態和結構的觀察，可將病毒懸浮液經過高濃縮和純化後，以磷鎢酸負染與電子顯微鏡直接觀察病毒之大小、形態，可初步判斷此病毒屬於哪一科。此作法繁瑣，臨床上多已被免疫或分子生物的檢測方法所取代。

##### (2) 冷凍電鏡法 (只有少數實驗室可進行，如中央研究院)

把生物檢體溶液滴在銅網上，並且把多餘的樣品移除。通過零下-196°C 液態乙烷，高速投入銅網後，會在生物分子周遭溶液形成玻化水，並且在觀測樣本期間都維持低溫，當溫度高於攝氏 135 度則玻化水會形成冰晶。透過網眼間的薄區玻化水觀測生物分子。

四、某生技公司以酵母菌為宿主細胞，利用重組基因工程技術製造並純化由 1.5 kb cDNA 所製造的人類蛋白質 A，並以西方墨點法 (Western blotting) 利用可專一性辨識蛋白質 A 的抗體 B 檢測純化之蛋白質 A。試回答下列問題：

(一)請估算蛋白質 A 的分子量。(5 分)

(二)檢測純化蛋白質 A 之西方墨點法結果顯示，除了預估分子量位置處的條帶 C (band C) 之外，在條帶 C 之上方約+2 kDa 與下方約-7 kDa 處各有一條額外之條帶出現，試分別說明造成上述額外條帶結果的可能原因。(10 分)

#### 【擬答】

(一)蛋白質 A 預估分子量

1.5 kb cDNA 如果全部表達蛋白質，則  $1500/3 = 500$  胺基酸，一胺基酸平均分子量為 110 daltons，因此，蛋白質 A 預估分子量為  $110 \times 500 = 55$  kDa。

(二) 55 kDa 外加二條 bands: +2 kDa (~57 kDa) 及 -7 kDa (~48 kDa) 原因:

因為 1.5 kb cDNA 來自於 mRNA 反轉錄，不含起動子。此 1.5 kb cDNA 是插入表現載體，基因工程剪接後在酵母菌內表達，起動子—核糖體結合部位—ATG—1.5kb cDNA—TAA 等。酵母菌會進行轉譯後修飾，因此比 55 kDa 較大的區域會有 band。表現載體也有可能 IRS (內側核糖體進入部位)，或者經過蛋白質裁減 (protein splicing)，所以比 55 kDa 較小的區域會有另外一條 band。

五、某生物技術公司計畫以蛋白質 A 為標的分子，製造專一性抗體 (anti-A antibody) 開發具特异性之抗移植排斥藥物。為生產具有優良功效的抗體，該公司先從細胞中選殖 (clone) 蛋白質 A 的基因，利用重組基因工程技術生產、大量製造並純化蛋白質 A，作為製造蛋白質 A 單株抗體 (monoclonal antibody) 的抗原。試回答下列問題：

(一)說明選殖蛋白質 A 所需之完整模板基因序列 (template DNA) 的重要步驟。(5 分)

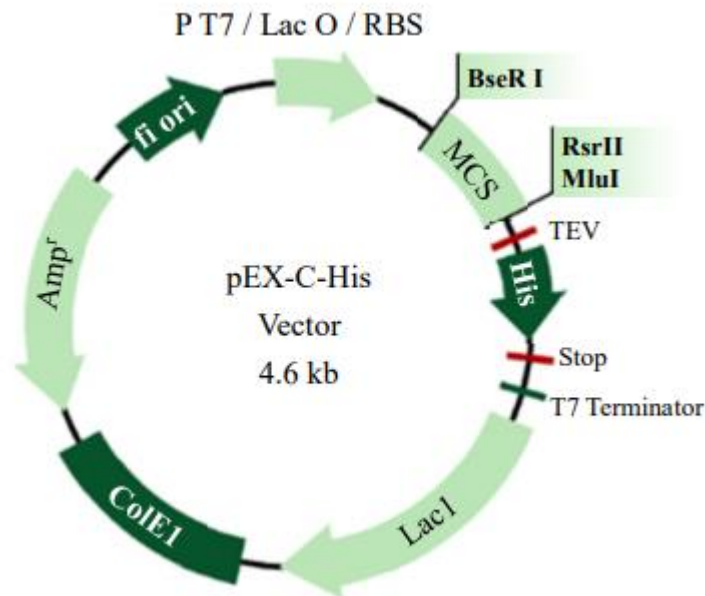
(二)該公司預計將所選殖的模板基因剪接到下圖所示載體 (vector)，大量表現並純化蛋白質 A。

公職王歷屆試題 (109 高考)

請問應將所選殖的模板基因剪接插入載體的那一區段？並說明在設計操作此基因重組剪接過程中，欲成功表現大量蛋白質 A 所必須考慮的重要因素。(5 分)

(三)該公司在常見的蛋白質純化方法中，應選擇那一種蛋白質純化技術原理，方能最簡便且有效分離純化到高純度的蛋白質 A？並試述該技術之原理、關鍵材料與步驟流程。(10 分)

(四)該公司另外將構築完成已攜帶蛋白質 A 完整基因序列的上述載體殖入大腸桿菌，嘗試利用大腸桿菌表現蛋白質 A。假設蛋白質 A 可在大腸桿菌表現，也可經蛋白質純化過程獲得足量的蛋白質 A，但卻發現純化的蛋白質 A 喪失其應有的功能。試述利用大腸桿菌所製造純化之蛋白質 A 喪失其功能的可能原因。(5 分)



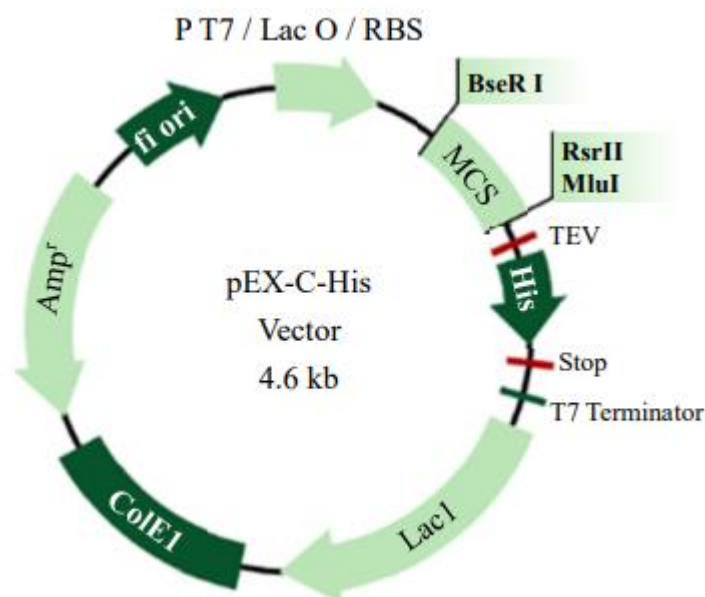
【擬答】志聖阮籍生物技術學 A01, p.293-298

(一)選殖蛋白質 A 完整模板基因序列 (template DNA)

完整模板基因序列: Promoter –Ribosome binding site (RBS)—ATG—Protein A Gene –TAA stop codon。本題是將蛋白質 A 完整模板基因序列插入表現載體 pEX-C-His vector 的多重限制酶選殖區域 MCS 內，此載體已經具備 Promoter –Ribosome binding site (RBS)，及後端的 stop codon，因此基因本身 Promoter –Ribosome binding site (RBS)可以省略。

(二)選殖的模板基因剪接插入載體的區段:

1. 插入載體 pEX-C-His vector 多重限制酶選殖區域(MCS, multiple cloning site)中。



2. 成功表現大量蛋白質 A 需要考慮因素:

- (1) 強力 DNA 複製起始區，能夠大量複製蛋白質 A。
- (2) 有 LacI 區域，需要加入乳糖抑制 LacI repressor 誘導基因表達。
- (3) 加入 ampicilin 篩選抗藥質體表達。
- (4) 強力 T7 起動子及 RBS，使後端序列包括蛋白質 A 基因轉錄與轉譯。

(三) 最簡便有效的分離純化方法:

由於基因重組技術的進步，越來越多研究者試圖將特定基因選殖至表現載體，並大量表現重組蛋白；但是不論以何種宿主細胞內除了重組蛋白質以外，仍有上千種以上細胞使用的蛋白質，因此在收集粗蛋白後的首要工作，就是面對將重組蛋白由粗蛋白中純化出來的問題。一般純化蛋白值的方式包括了鹽溶鹽析、膠體過濾、離子交換、親和層析等方法，而親和層析法正是廣泛應用於一般實驗室甚至工業級純化常用的蛋白質純化方法。

最好選擇蛋白質 A-Tag 技術，表達蛋白質後以親合性管柱層析法分離純化。

在蛋白質 A 基因後端接上(CAC)<sub>6</sub>，表達出蛋白質 A—(His)<sub>6</sub>，稱為蛋白質 A-(His)<sub>6</sub> Tag 技術，進一步利用 Resin-Ni affinity column 去分離純化。

Histidine-Tag 純化原理與流程:

Polyhistidine (His)-Tag 純化是屬於金屬親和層析法 (immobilized metal-ion affinity chromatography, IMAC) 的一種，主要是利用蛋白質的組織胺酸 (histidine) 的氮原子作為路易斯鹼 (Lewis base)，與金屬離子作為具有空價軌域的路易斯酸 (Lewis acid) 形成配位鍵結。當 His-Tag 融合蛋白質通過 Ni-resin，鎳離子空出的配位鍵與 His-Tag 結合使融合蛋白質留在 resin 上；經過淋洗步驟後，再以高濃度的 imidazole 與 His-Tag 競爭配位鍵並使融合蛋白質(本題指蛋白質 A)脫離完成蛋白質純化。

(四) 利用大腸桿菌表達製造的蛋白質 A 喪失功能原因:

1. 由題意知，載體 pEX-C-His vector 中插入的蛋白質 A 基因在大腸桿菌內可以表現，因此，起動子與核糖體結合仍有作用。
2. 蛋白質 A 基因在大腸桿菌內可以表現後，可能沒有作出正確摺疊，因此沒有功能。
3. 蛋白質 A 可能是糖蛋白質，在大腸桿菌內可以表現後，沒有糖基化，因此沒有功能。
4. 蛋白質 A 基因在大腸桿菌內可以表現後，可能沒有作出正確修飾作用，因此沒有功能。
5. 蛋白質 A 基因在大腸桿菌內可以表現後，形成 inclusion body，無法分離純化，因此沒有功能