

109 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、新型冠狀病毒 SARS-CoV-2 (severe acute respiratory syndrome Coronavirus 2) 感染引起之肺炎 COVID-19 (Coronavirus Disease 2019) 造成全球性感染。衛生福利部每天均舉辦記者會向社會大眾說明最新之確診人數與相關訊息。試說明下列問題：

(一)應採取受檢者之何種檢體檢測 SARS-CoV-2，並說明檢體之前處理流程？(5 分)

(二)完成採檢後，試述 2 種目前最常用於檢測 SARS-CoV-2 病毒感染的實驗室診斷方法、原理與實驗技術流程，並比較兩種方法的優缺點。(20 分)

第一題，《時事病毒難易中等★★》，課堂都有提供完整資料及補充。題型較大，從檢體取得、前處理、實驗室診斷、原理流程、優缺點，這一題 25 分。與今年高考三級第三題類似，新冠肺炎病毒取樣、分析與檢測，今年度大家耳熟能詳考題。因為 SARS-CoV-2 引起上呼吸道肺部疾病，因此鼻咽取樣遠優於口腔取樣。上過阮籍老師的生技課，只要針對題意小心書寫，均可以拿近滿級分。

【擬答】

(一)檢測 SARS-COV-2 檢體及檢體之前處理流程

1. 檢測 SARS-COV-2 檢體

- (1)無症狀者早期診斷建議首選為採集上呼吸道檢體與鼻咽拭子，也可以使用以下檢體替代：包括口咽拭子、中鼻甲拭子、鼻腔拭子、鼻咽沖洗液、鼻咽抽取液以及鼻腔抽取液。
- (2)針對具有下呼吸道症狀(例如咳嗽)的病患，則建議收集下呼吸道檢體如痰液，鼓勵病患自咳痰但不建議引痰。
- (3)採血取得血清：以無菌試管收集至少 3 mL 血清，做為病毒及抗體檢測。
咽喉擦拭液以無菌病毒拭子之棉棒擦拭咽喉，插入病毒保存輸送管。
痰液採集應以清水漱口後，採集深部咳痰。
咽拭子應在咽峽深部(懸雍垂及扁桃腺兩側)，利用合成纖維拭子反覆刮取。
鼻拭子應於鼻腔深部使用合成纖維拭子反覆刮取。

2. 檢體之前處理流程

- (1)若是同時採集鼻咽拭子與口咽拭子，則可收集到同一罐含有病毒保存液之容器送檢，以提高測試敏感度。咽喉擦拭液、痰液：病毒培養及病毒 RNA 檢測
- (2)檢體操作：(i)生物安全第 2 等級 (BSL-2) 實驗室可進行之工作：(a)血清及血液等檢體之常規檢驗(包括血液學和臨床生化學等)。(b)將檢體依規定進行三層包裝，外送其他實驗室進行檢驗。(ii)於 BSL-2 實驗室且提升人員安全防護及操作要求後，可進行之工作：(a)分裝及/或稀釋檢體。(b)進行接種細菌或真菌培養基。(c)進行不涉及未知病原體在體外或體內增殖之診斷試驗。(d)涉及未經處理之檢體核酸萃取步驟。(e)製備及以化學法或熱固定抹片進行鏡檢。
- (3)病毒培養需在 BSL-3 生物安全等級實驗室操作，用於分離 SARS CoV-2 病毒的細胞為 Vero E6 及人類肺細胞 Huh7 細胞株 7，將帶病毒之檢體接種於含 16 μ g/ml trypsin DMEM 的 Vero E6 細胞，於 37°C 溫箱進行培養，每日觀察其細胞病變情形，於 3 天

後可明顯觀察到細胞變圓及聚集的細胞病變，其培養上清液與細胞分別以 RT-PCR 及使用 SARS-CoV Rp3 NP antibody 進行免疫螢光染色確認病毒，對於後續的研究，分離 SARS-CoV 2 是站穩成功的第一步。

(4) 核酸檢驗(Real-time RT-PCR)為確認個案是否感染 SARS-CoV-2 的黃金標準(Gold Standard)。

(二) 2 種目前最常用於檢測 SARS-COV-2 病毒感染的實驗室診斷方法、原理與實驗技術流程及其優缺點

COVID-19 的致病原是冠狀病毒 SARS-CoV-2，檢測方式主要有四種方式：病毒培養、病毒核酸檢測、病毒抗原檢測、病毒抗體檢測。目前最常用於檢測 SARS-COV-2 病毒感染的實驗室診斷方法為病毒核酸檢測與病毒抗原檢測。

1. 病毒核酸檢測 (Nucleic acid test)：以 real time RT-PCR 最快速靈敏。

偵測受測者體內是否帶有病毒基因片段。檢測陽性代表受測者體內帶病毒基因，可能正受到感染或在發病前後。這個檢測方法的敏感度高，只要體內有少量病毒即可測出。

由於冠狀病毒不容易用培養的方式分離，因此現在的檢驗方式以即時反轉錄聚合酶鏈鎖反應 (real time RT-PCR) 檢驗為主，簡單來說是在體外短時間的大量增加特定的基因片段做檢測，以此就可以用少量的檢體來做病毒檢測。

採樣與檢驗的流程簡要流程大約如下：

Step 1：由醫護團隊採樣，樣本可能是痰液、咽喉拭子、血清等，後送至專門的檢驗室，萃取 RNA 基因。

Step 2：以選定的三個新型冠狀病毒 (SARS-CoV-2) 蛋白質的特異性核酸引子(primer)、CYBR Green I 與正控制組的人體內原有特定蛋白質 RNA，進行即時 RT-PCR 檢測，CYBR Green I 插入複製後的雙股 DNA 內，螢光與複製量成正比。

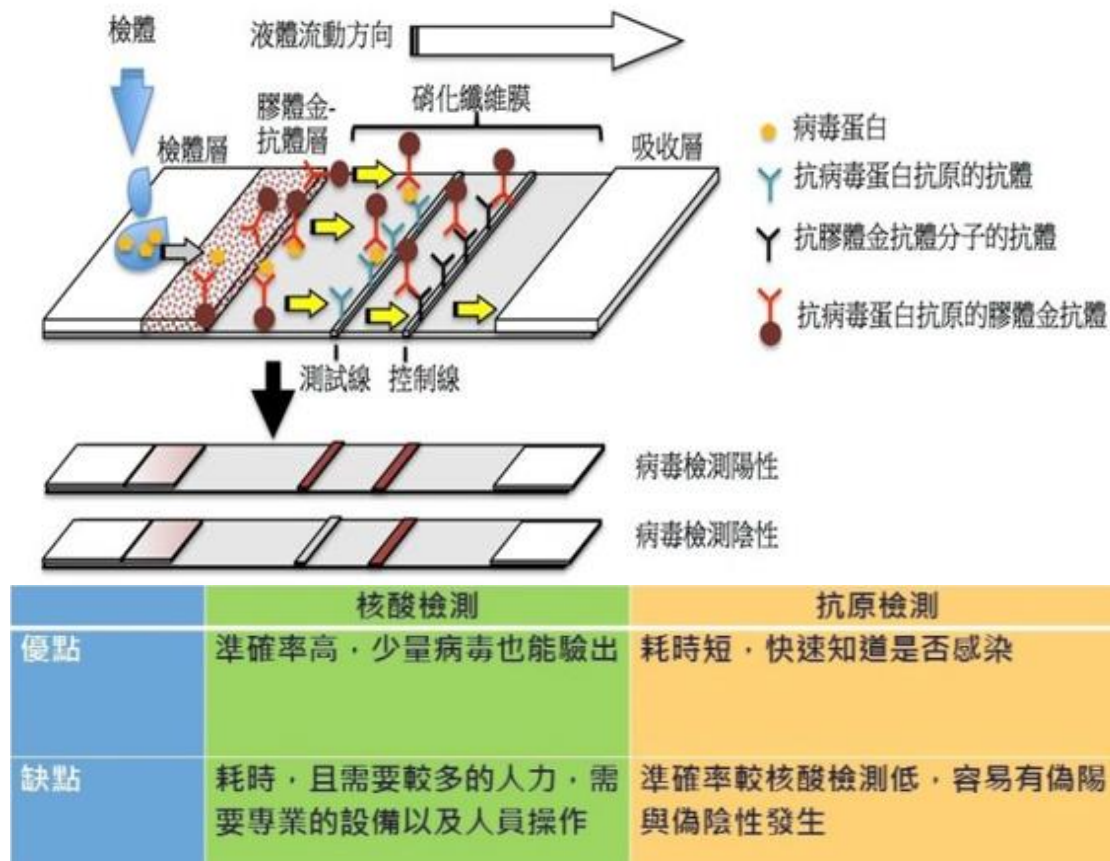
Step 3：根據檢測結果的 Ct (threshold cycle) 值作出判定，結果可為陽性、陰性或無法判定。

Real-time RT-PCR 是目前體外診斷試劑中，常用於檢測病毒的技術之一，優點是有著非常好的穩定性，以及高靈敏、檢測快速等特性，缺點是需要專業技術人員及較高的費用。

2. 病毒抗原檢測 (Antigen test)：包括試紙抗原快篩及 ELISA 技術

以特定抗原的單株抗體來偵測檢體是否帶有病毒抗原。檢測陽性表示正在感染，但其敏感度比病毒核酸檢測低，少量病毒會有測不到的風險。如何提高抗原快速篩檢產品的敏感度及特異性，對於國家整體的防疫措施非常有助益，且可加速患者的分流，並緩和擴大檢驗範圍所造成之檢驗負荷。

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的硝化纖維膜，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。



二、新型冠狀病毒 SARS-CoV-2 感染所引起之肺炎 COVID-19 迅速傳播蔓延，疫苗研發成為控制 COVID-19 疫情的急迫需求。目前全球有 163 個研發中的疫苗項目，其中進入人體臨床試驗階段項目包括核酸疫苗 (nucleic acid vaccine)、重組病毒 (recombinant virus) 及類病毒 (viral-like particle) 疫苗、不活化病毒 (inactivated virus) 疫苗與次單位疫苗 (subunit vaccine)。今某 A 生物科技公司希望利用阻滯 SARS-CoV-2 病毒進入人體後感染呼吸道細胞的策略，研發備製疫苗。試回答下列問題：

- (一) 試說明 SARS-CoV-2 病毒進入人體後，如何感染並進入呼吸道細胞複製繁殖。(5 分)
- (二) 承上，A 生物科技公司應以何種蛋白質為標靶分子，始能有效阻滯進入人體之 SARS-CoV-2 病毒進入呼吸道細胞？(5 分)
- (三) 試列表說明核酸疫苗、重組病毒及類病毒疫苗、不活化病毒疫苗與次單位疫苗等 4 種策略備置 SARS-CoV-2 病毒疫苗之原理、主要差異與優缺點？(15 分)

第二題，《時事病毒難易中等★★》，新冠肺炎病毒 SARS-CoV-2 整個感染路徑，標靶位置，繁殖複製與如何阻斷病毒進入呼吸道？再來解釋疫苗製作原理與優缺點，這一題 25 分。上過阮籍老師的生技課，均可以拿近滿級分。

【擬答】

(一) SARS-COV-2 病毒感染與複製的途徑

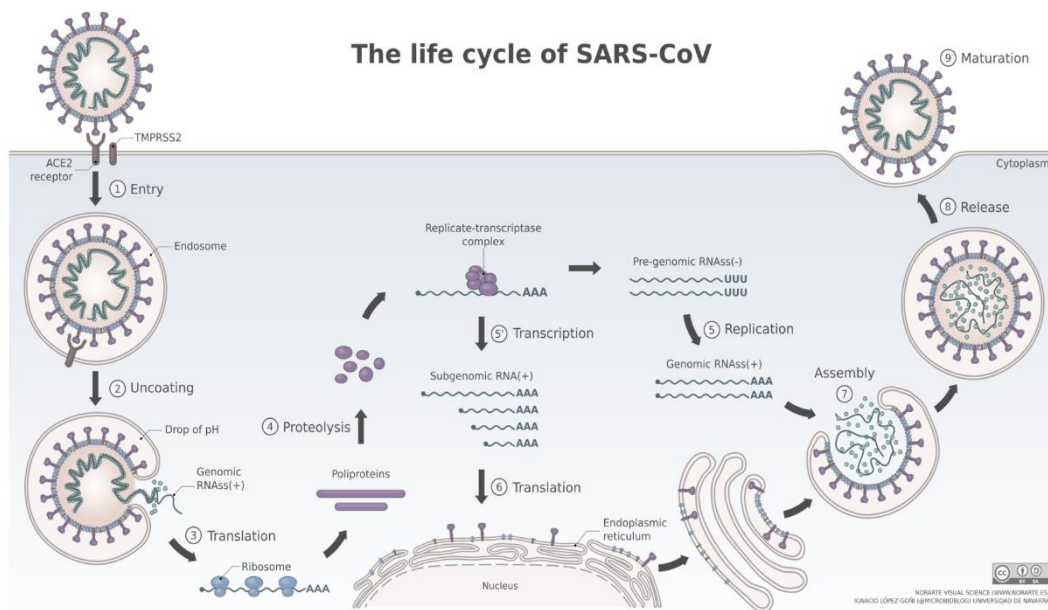
SARS-CoV-2 是一種具有包膜的正鏈單股 RNA 病毒，屬於冠狀病毒科 β 型冠狀病毒屬嚴重急性呼吸道症候群相關冠狀病毒種。新型冠狀病毒雖然被證明和 SARS-CoV 的基因只有 79% 的相似度，但它也可以藉由 hACE2(血管緊張素轉換酶 2)作為受體結合，通過呼吸道上皮細胞進入肺部進行複製過程為主，但腸上皮細胞也較為易感。其主要作用對象被發現也是與 SARS 相同的 T 淋巴細胞。在 SARS-CoV-2 感染宿主時，hACE2 的表達被認為主要局限於第 II 型肺細胞、吸收性腸上皮細胞和鼻黏膜分泌細胞。而人類結膜及角膜組織中也被發現有較高表達的 hACE2 和 TMPRSS2 (Transmembrane protease serine 2 穿膜絲胺酸蛋白

公職王歷屆試題 (109 地方特考)

酶 2)，是除呼吸道外的病毒主要感染門戶。SARS 的 S 蛋白與其受體 hACE2 結合是靠細胞絲胺酸蛋白酶 TMPRSS2 來引發的。

SARS-COV-2 由鼻腔或口腔進入上呼吸道或腸上皮細胞後在接觸宿主細胞時，病毒表面的突刺 S 蛋白(spike protein)會經由特定的立體結構變化，使 RBD(受體結合區域)暴露後與 hACE2 相結合，接著通過促進 S2 蛋白介導與細胞的膜融合完成感染的全過程。TMPRSS2 和 TMPRSS4 都可以增強其膜融合活性。SARS-CoV-2 在 S1 上的 RBD 與寄主細胞中的 hACE2 結合後，S2 中的七肽重複域 HR1 和 HR2 會互相作用，形成一個 6-HB 核心，促進病毒的膜融合。

冠狀病毒普遍被認為在細胞質進行複製和轉錄，其中只有它的 RdRp (RNA 依賴性 RNA 聚合酶)是完全保守的。大量 RNA 基因組複製後，進行病毒組裝，最後經膜融合後，大量病毒釋出到肺細胞或者腸上皮細胞內，完成感染與複製。



(二)蛋白質標靶分子

由上述感染與複製途徑得知，A 生物科技公司應以 Spike S 蛋白質、hACE II、TMPRSS2 為標靶分子，利用對抗的抗體或藥物，始能有效阻滯進入人體之 SARS-COV-2 病毒進入呼吸道細胞。

(三)核酸疫苗、重組病毒及類病毒、不活化病毒疫苗與次單元疫苗等 4 種策略備製 SARS-COV-2 病毒疫苗之原理、主要差異與優缺點。

1. 核酸疫苗

核酸疫苗(nucleic acid vaccine)也稱基因疫苗(genetic vaccine)，是指將含有編碼的蛋白基因序列的質粒載體(plasmid vector)，經肌肉注射或基因鎗等方法導入宿主體內，在宿主細胞內表達抗原蛋白，誘導宿主細胞產生對該抗原蛋白的免疫反應，以達到預防和治療疾病的目的。

核酸疫苗是利用現代生物技術免疫學、生物化學、分子生物學等技術研製成的，分為 DNA 疫苗和 RNA 疫苗兩種。但目前對核酸疫苗的研究以 DNA 疫苗為主。DNA 疫苗又稱為裸疫苗，因其不需要任何化學載體而得此名。DNA 疫苗導入宿主體內後，被細胞（組織細胞、抗原遞呈細胞或其他發炎性細胞）攝取，並在細胞內表達病原體的蛋白質抗原，通過一系列的反應刺激機體產生細胞免疫和體液免疫。目前最有名的輝瑞與莫德納 SARS-COV-2 病毒疫苗，應用突刺 S 蛋白的 mRNA 經脂球體包覆後，送入細胞質內直接轉譯出 S 蛋白，誘發毒殺 T 細胞免疫與抗體免疫。

DNA 和 RNA 疫苗容易設計與量產，也不需要處理感染性物質。SARS-COV-2 病毒疫苗中首次用於人體 DNA 或 RNA 疫苗。DNA 疫苗可能會有致突變性，而 RNA 疫苗則沒有此風險。

病毒載體疫苗透過良性病毒攜帶遺傳物質到人體細胞，則存在一些病毒載體的免疫性的風險，因為任何免疫性都可能削弱疫苗的效用。

核酸疫苗具有如下優點：(1)免疫保護力增強 (2)製備簡單，省時省力 (3)同種異株交叉保護 (4)應用較安全 (5)產生持久免疫反應 (6)貯存、運輸方便 (7)可用於防治腫瘤例如黑色素瘤。

缺點：(1)質粒 DNA 可能誘導自身免疫反應 (2)持續表達外源抗原可能產生一些不良後果 (3)肌肉注射質粒後，僅有很少部分被肌細胞所攝取 (4)外來裸露 DNA 需要送入細胞核內才能轉錄，mRNA 在細胞質容易被降解。

2. 重組病毒及類病毒

(1) 重組病毒 (recombinant virus vaccine)

利用重組腺病毒(adenovirus)作為載體將目標蛋白之 DNA 序列帶入體內，除了沒有傳統疫苗危險性之外，經實驗證明可同時引發先天性免疫(innate immunity)以及特異性免疫(adaptive immunity)反應，達到全面性的保護效果。

腺病毒載體型疫苗的最大優勢在於具有製作簡單、安全、有效的特性，並能夠對使用者產生長期的保護效果，除了注射劑型之外，同時開發的鼻噴劑型將大大降低此種疫苗使用時的不適感且提升方便性。缺點是重組病毒 DNA 本身可能誘導自身免疫反應。

(2) 類病毒疫苗 (virus-like particles, VLPs)

類病毒顆粒疫苗是將病毒的蛋白抗原裝配成高度結構化的蛋白質顆粒，直徑大小介於 20-150 nm，保持了病毒抗原蛋白的天然立體結構，因而具備激發宿主先天和適應性免疫反應功能，如：人類乳突病毒 (HPV) 疫苗。此類疫苗類似空包彈，只有病毒空殼以及有病毒的蛋白質顆粒。優點是不具病毒遺傳物質，在人體內無法複製，安全性高。缺點是只能誘發體液性免疫，而無法引發 T 細胞免疫反應。

3. 不活化病毒疫苗(inactivated vaccine)

以高溫或化學物質殺死病毒後打入人體中，病毒的殘骸仍會產生免疫反應，如：小兒麻痺沙克 (Salk) 疫苗、A 型肝炎疫苗、狂犬病疫苗。優點是不活化疫苗的製造相對容易，使用整個病毒有較多蛋白質可做為免疫標的，不會引起感染，較少副作用。但其引起的免疫反應較弱，只能誘發抗體來中和，無法引起更強的 T 細胞毒殺，且常常需要施打多次，追加劑量。

製造有效安全疫苗的過程中，維持 SARS-COV-2 棘狀 S 蛋白的完整性非常重要。

4. 次單元疫苗(subunit vaccines)

次單位疫苗只傳遞目標抗原(棘蛋白)而非整個病原體到宿主的免疫細胞，進而激發免疫性。S protein 是 SARS-COV-2 疫苗最主要的標的。次單位疫苗的優點是不具傳染性，相對安全，避開病原體不必要的毒素與妨礙有效性的物質。缺點是要對病原體有較全面性瞭解，知道何種成分較有抗原性，而且未必能產生正確的免疫記憶，次單位疫苗抗原的免疫原性較差，需要佐劑輔助才能誘發足夠免疫性，全球疫苗的產能可能會因此受限。

三、試說明下列問題：

(一)何謂萊克多巴胺？經動物攝入體內後之藥理作用為何？(5分)

(二)今某生物科技機構想建立檢測豬肉中萊克多巴胺含量的液相層析串聯質譜儀 (liquid

chromatography-tandem mass spectrometry, LCMS/MS) 技術標準流程。請說明該公司如何處理上機前之樣品備置流程。(5分)

(三)承上，請說明 LC-MS/MS 定量萊克多巴胺含量的檢測技術原理。(5分)

(四) LC-MS/MS 定量偵測極限可至 ppb 等級，因此成為最常用於檢測萊克多巴胺之技術方法，試說明 ppb 的定義。(2分)

(五)假設 B 國法規所制定食品中萊克多巴胺最高殘留量 (recommended maximum residues limits) 是 40 ppb，該最高殘留量標準 40 ppb 可換算成多少 $\mu\text{g}/\text{kg}$? (3分)

第三題，《時事萊豬難易中等★★》，此題 20 分，萊克多巴胺是瘦肉精的一種。經由 beta-受體活化二級信息傳遞，刺激交感神經，刺激肌肉細胞而增進瘦肉蛋白質合成，減少脂肪生成。對人體健康一直在爭議中，本來台灣政府是規定零檢出的，現在改為豬肉 10 ppb，此題較難的部分是 LC/MS/MS 的定量檢測技術原理，其他都非常容易，上過阮籍老師的生技課，均可以拿近滿級分。

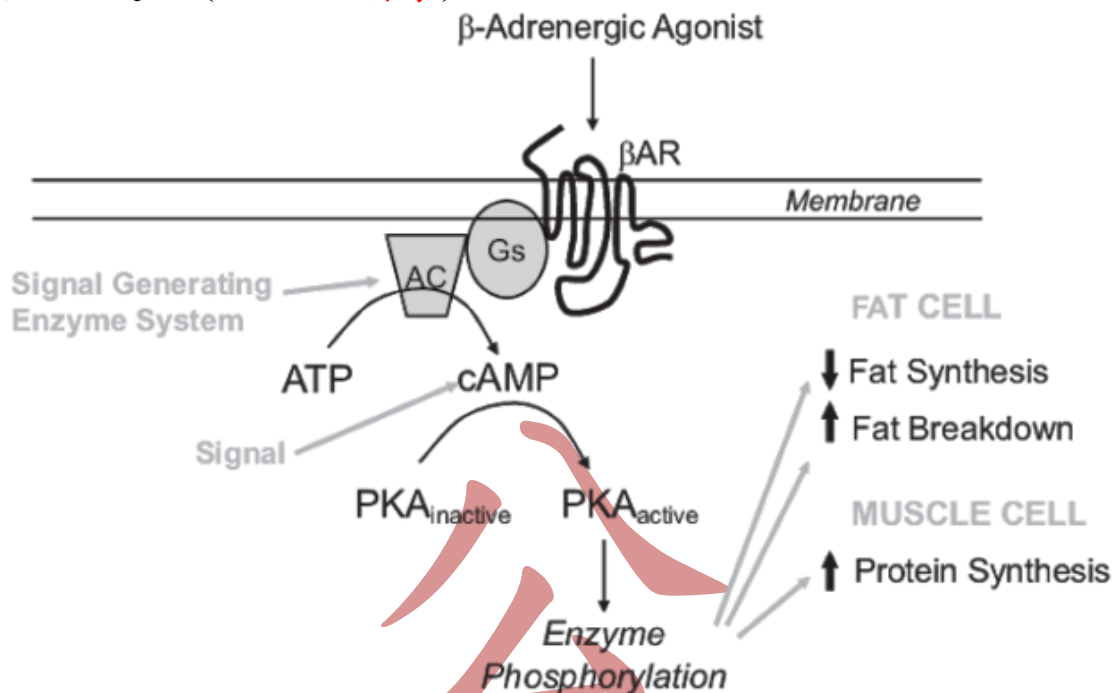
【擬答】

(一)萊克多巴胺 (Ractopamine) 及其藥理作用

萊克多巴胺 (Ractopamine) 是「瘦肉精」的一種，分子式 $\text{C}_{18}\text{H}_{23}\text{NO}_3$ ，分子量 302，是腎上腺 β 型受體促進劑 (beta-adrenergic agonist)，瘦肉精實際上是幾種不同成分的藥物統稱，屬於類交感神經興奮劑，原先研發用於治療人類呼吸道疾病 (如氣喘)，但沒通過臨床試驗。後來發現瘦肉精添加在禽畜動物的飼料中可以提高瘦肉的比例、降低脂肪比例及加快生長速度，優點包括減少飼養成本、增加利潤、提高糧食自給率及降低排泄物對環境的污染等，所以被轉作為飼養禽畜動物的飼料添加物。萊克多巴胺是瘦肉精中一種代謝較快、毒性較低的類型，禽畜動物 (如牛、羊、豬及火雞等) 使用萊克多巴胺後，可以活化 β_1 和 β_2 的交感神經受器，進而刺激肌肉細胞，增加 5~10% 的蛋白質合成，並減少脂肪合成，達到增加瘦肉的效果。

美國稱在其測定的容許殘留量下 (肉類 10 ppb) 合法使用，將不會對人類造成中毒或短期危害。但目前的實驗數據無法確定其是否會對人體產生其他副作用，人體長期攝取殘留的萊克多巴胺是否會造成健康問題也尚不清楚，但其受試臨床表現較多為心跳過速，面頸、四肢肌肉顫抖，頭暈、頭疼、噁心、嘔吐，特別是患有高血壓、心臟病的病人，可能會加重病情導致意外，且因瘦肉精相關成份多為禁藥組成故國際體育賽事上被禁用。

萊克多巴胺在動物體內與 β 受體結合，進行二級信息傳遞，經活化 G-protein 及腺核苷酸環化酶 (AC, adenylate cyclase)，使 ATP 環化為 cAMP，活化蛋白質激活酶 A (PKA, protein kinase A)，接著進行一連串蛋白質磷酸化，使交感神經興奮，刺激肌肉細胞，增加 5~10% 的蛋白質合成，並減少脂肪合成，達到增加瘦肉的效果，如下。



(二) LC-MS/MS 技術，上機前之樣品備製流程

依據行政院衛福部 100 年 4 月 7 日食品中動物用藥殘留量檢驗方法—乙型受體素類多重殘留分析。

檢體之前處理：萃取、淨化、過濾。

1. 萃取：將檢體細切，以均質機均質後，取檢體約 5 g，精確稱定，置於離心管中，加入 0.2 M 醋酸鈉緩衝溶液 15 mL，震盪 10 分鐘，再加入內部標準溶液及 β -葡萄糖醛酸苷酶溶液各 100 μ L，混合均勻，置於 37°C 水浴中水解 1 小時。隨後以 4000 rpm 離心 10 分鐘，收集上清液，離心管中之沈澱物再加入 0.2 M 醋酸鈉緩衝溶液 15 mL，振盪萃取 10 分鐘，於 4000 rpm 離心 10 分鐘。合併上清液，以 1 N 氫氧化鈉溶液調整 pH 值為 7.0，再於 4000 rpm 離心 10 分鐘，取上清液供淨化用。

2. 淨化：取萃取後供淨化用之溶液，注入預先以甲醇 3 mL 及去離子水 3 mL 潤洗之固相萃取匣，以去離子水 4 mL 清洗固相萃取匣，棄流出液。以甲醇 4 mL 沖提，收集沖提液，於 65°C 以氮氣吹乾，殘留物加甲醇:7 mM 醋酸銨 (8:2, v/v) 溶液 1 mL，以旋渦混合器振盪溶解，經 0.2 μ m 濾膜過濾後，供作檢液。

(三) LC-MS/MS 定量萊克多巴胺含量的檢測技術原理

LC-MS/MS 定量萊克多巴胺含量係以液相層析串聯質譜儀 (LC/MS-MS) 執行對 Ractopamine (萊克多巴胺) 等多種乙型受體素類之檢驗，當檢出含有乙型受體素時，則進一步執行三級離子質譜掃描功能 (MS)，掃描特定的二級碎片離子，獲得 MS 質譜圖進行比對，並以 MRM 模式定量，藉以提高檢驗結果之可信度及準確度。

1. 檢體及其前處理，已於上述。

2. 已知濃度的標準品及其內部標準品。

3. 儀器分析：液相層析串聯質譜儀：AB SCIEX 5500 Q TRAP LC/MS/MS System。

(1) LC：液相層析分離純化萊克多巴胺

(2) MS/MS：串聯質譜儀，LC 後萊克多巴胺再經二次質譜分析，確定分子量。

4. 使用之 LC-MS/MS 儀器之型號為 AB SCIEX 5500 Q TRAP LC-MS/MS System 三段四極桿/線性離子噴灑質譜儀，備有 ElectroSpray Ionization (ESI) 及 Atmospheric Pressure Chemical Ionization (APCI) 兩種離子源，並搭配 DIONEX series HPLC。

(1) 高效能液相層析儀 (HPLC) 條件

公職王歷屆試題 (109 地方特考)

分析管柱：Agilent ZORBAX SB-C18，5 μ m，4.6 \times 150 mm。

分析管柱溫度：35 $^{\circ}$ C

移動相流速：1.0mL/min

樣品注射量：10 μ L

移動相：5mM 醋酸銨/水 (A 液)；5mM 醋酸銨/甲醇 (B 液)

移動相梯度：

(2) 串聯式質譜儀 (MS/MS) 條件

離子源：電灑法 (ESI)

氣簾氣體：20

碰撞氣體：High

電灑電壓：5500

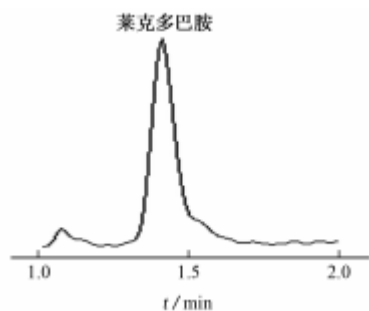
加熱溫度：650

霧化氣體：65

加熱氣體：65

偵測模式：多重反應偵測 (multiple reaction monitoring, MRM) 離子對 (MRM)、真空介面板電壓 (DP)、碰撞能量電壓 (CE)、入口電壓 (EP)、碰撞室初端電壓 (CXP)：

分析物：萊克多巴胺，離子對：302/164 & 302/107



母離子 (m/z=302)，子離子 (m/z=164, 107)

5. 定量

以 MRM (Multiple Reaction Monitoring) 模式做為定量，就檢液與對應標準溶液所得波峰之滯留時間及相對離子強度比 (Ion Ratio) 鑑別之；當檢出含乙型受體素時，則進一步執行三級離子質譜掃描功能 (MS³)，掃描特定的二級碎片離子，獲得 MS³ 質譜圖進行比對，並以 MRM³ 模式定量，依下列計算式求出檢體中各乙型受體素之含量 (ppb)：

檢體中各乙型受體素之含量 (ppb) = $C \times V / M$

C：由標準曲線求得檢液中各乙型受體素之濃度 (ng/mL)

V：檢體最後定容之體積 (mL)

M：取樣分析檢體之重量 (g)

(四) ppb 的定義

ppb 是 part per billion，十億分之一。1/10⁹。

(五) 若萊克多巴胺最高殘留量是 40 ppb，該最高殘留量標準 40 ppb 可換算成多少 ug/kg?

1 kg = 10³ g = 10⁶ mg = 10⁹ ug，所以 1ppb = 1 ug/kg，40 ppb = 40 ug/kg。

四、傳統之細菌鑑定流程是選用培養基將細菌從臨床或環境檢體中分離出來，利用分析該分離菌株之生化反應為鑑定依據。近代因分子生物技術快速發展，利用 PCR 以特定引子放大細菌之 16S 核糖核酸 (16S ribosomal RNA, 16S rRNA) 區段為基本原理之技術，成為分析與鑑定細

公職王歷屆試題 (109 地方特考)

菌之重要分子生物技術工具，試說明 16S rRNA 可用於微生物分析鑑定指標序列的原因與技術原理。(10 分)

第四題，《簡單易寫★》，此題 10 分，16S RNA 在同屬菌種中，是高度保存性的，因此可以做為菌種的分析與鑑定，只需抽取菌種 16S RNA 以螢光即時反轉錄聚合酶連鎖反應(SYBR Green II real time -RT-PCR)即可做菌種鑑定，關鍵點在於特定引子(primer)的選定，上過阮籍老師的生技課，均可以拿近滿級分。

【擬答】

16S 核糖體 RNA (16S ribosomal RNA, 16S rRNA)，是原核生物的核糖體中 30S 次單元的組成部分，16S rRNA 的長度約為 1,542nt。以細菌與古細菌來說 16S rRNA 在演化過程中，改變的程度相當的低，大多數 16S rRNA 其中有 V1~V9 共 9 個高度變異區域 (High Variable Regions, HVRs)，透過選擇其中高變區的序列，進行 PCR 專一性增幅放大，經過定序，將序列作為分類與鑑定環境或生物體內微生物之種類與群落。隨著次世代定序的科技發展，與生物資訊分析的演進，重新給予 16S rRNA 一個新定義，除快速與大量的提供既有的種類分類研究，更進入全新物種或未被成功培養物種的研究新手段。

16S rRNA 定序的前 500 個鹼基序列，對於鑑定到「種(species)的等級」是很有用的數據，但對於更相似的種(species)或株(strains)鑑定上，使用限制酶的分析方式較適合，可有效地展示菌株間(strain-strain)的不同。

由於相同菌種具有高度保存性的 16S rRNA 基因 (16S rDNA)，16S rDNA 常被用於對各種生物進行的系統發生學方面的研究。在獲得能提供系統發育學信息的 16S rRNA 分子時需要利用通用 PCR primer 對 16S rRNA 分子進行擴增。16S rRNA 序列的對比分析需要在這類「通用引物」的 DNA 分子的輔助下完成，這類分子具有如下序列：

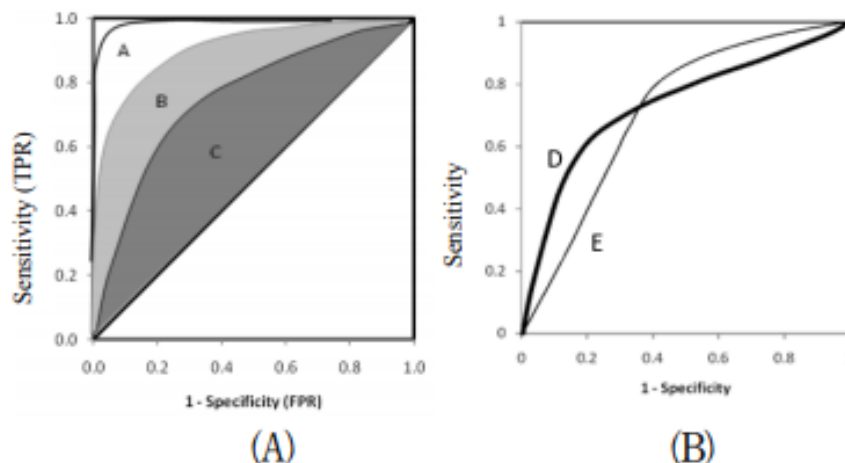
(一) 8UA 正向：5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3'

(二) 519B 反向：5'-GTA TTA CCG CGG CKG CTG-3'

(三) 反向：ACG GCT ACC TTG TTA CGA CTT

利用細菌的 16S RNA 基因序列，只要能取得目標微生物的 DNA，經過簡單的聚合酶連鎖反應(PCR)及定序反應就能獲得菌種的 16S rRNA 基因序列，再利用生物大數據資料庫，即可鑑定菌種。

五、某生醫機構自行研發新型血糖檢測技術方法 B 有成，並利用 receiver operating characteristics curve (簡稱 ROC 曲線) 評估方法 B 與臨床常規使用之方法 A 與方法 C 的血糖檢測效能，所獲結果如下圖(A)所示。請據以回答下列問題：



(一)試說明(A)圖中 x-軸單位 1-specificity (FPR) 與 y-軸單位 sensitivity (TPR) 的意義。(6 分)

公職王歷屆試題 (109 地方特考)

(二)試說明 ROC 曲線下面積 (area under curve, AUC) 所代表的意義。(5 分)

(三)根據(A)圖，試比較並說明 3 種技術方法的血糖檢測效能。(3 分)

(四)(B)圖是比較分析另外 2 種血糖檢測方法 D 與 E 檢測效能的 ROC 曲線結果。兩條 ROC 曲線相交於一點，AUC 值幾乎相等。試問 D 與 E 兩種血糖檢測方法何者較適用於初步篩檢檢驗，何者較適用於糖尿病確診檢驗，並說明原因。(6 分)

第五題，《難易中等★★》，此題 20 分是血糖檢測技術的分析，Y 軸是真陽性 TPR (sensitivity)，X 軸是偽陽性 FPR(1-specificity)分析考題，屬於生物統計的考題，本來不應該出在生物技術內，生技課不會上到生物統計，還好考生應該都有學過生物統計，生物統計是衛技與衛行必考科目。受測者工作特徵曲現 ROC 是真陽性與偽陽性的函數關係，用以評估血糖檢測技術 ABCDE 的檢測效能。題目不難，但需學會生物統計分析。

【擬答】

受試者工作特徵曲線 (receiver operating characteristic curve, ROC curve) 表示一個特定的診斷方法對區別特定的患者組與非患者組樣本的檢測性能。表示不同診斷水平的真陽性率對偽陽性率的函數關係。ROC 曲線是以試驗的靈敏度(真陽性)為縱坐標 (y 軸)、以偽陽性率 (1-特異度) 為橫坐標 (x 軸)，橫軸與縱軸長度相等，形成正方形，由不同決策界值產生靈敏度和特異度在坐標上都成為圖中一個點，將這些點連接成線，即為 ROC 曲線，用於 1. 選擇最佳的信號偵測模型、捨棄次佳的模型。2. 在同一模型中設定最佳閾值。

ROC 空間將偽陽性率 (FPR) 定義為 X 軸，真陽性率 (TPR) 定義為 Y 軸。

(一) X-軸單位 1-specificity (FPR)與 Y-軸單位 sensitivity (TPR)的意義。

1. X-軸單位 1-specificity (FPR)：

圖形橫軸(x-axis)為偽陽性率(false-positive rate, FPR)，以 1 - 特異度(specificity)表示，特異度係將結果正確判斷為負向或陰性的機率。FPR 在所有實際為陰性的樣本中，被錯誤地判斷為陽性之比率。

2. Y-軸單位 sensitivity (TPR)：

圖形的縱軸(y-axis)為真陽性率(true positive rate, TPR)，又稱為敏感度(sensitivity)；而敏感度為將結果正確判斷為陽性的機率。TPR 在所有實際為陽性的樣本中，被正確地判斷為陽性之比率。

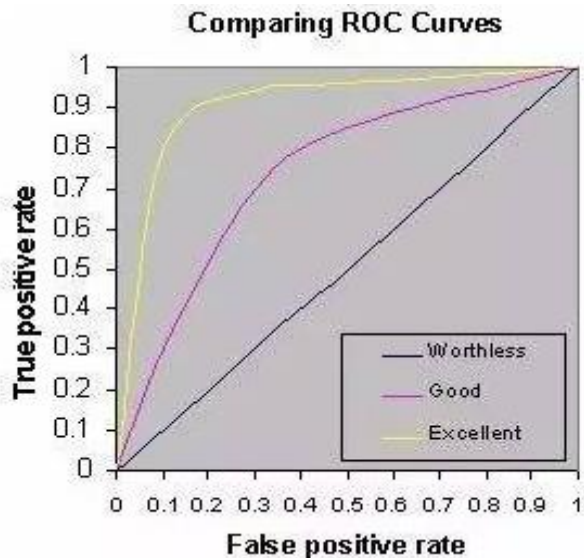
當指定一個分界點(cut-point)來區分檢驗的陽性與陰性時，這個分界點會影響到診斷工具的敏感度(sensitivity)及特異度(specificity)。在醫學上，敏感度表示有病者被判為陽性的機率，而特異度表示無病者被判為陰性的機率。在曲線上的任何一個點都會對應到一組敏感度與 1-特異度，而敏感度與特異度會受到分界點移動的影響。

(二) ROC 分析會提供 ROC 曲線下面積 (area under the ROC curve, AUC)，其功能在於告訴我們這個新量表具備多準確的篩檢能力，ROC 曲線下面積越大，表示新量表篩檢的準確度越高，以下表格為詳細的判斷標準依據。

ROC 曲線下面積的判斷標準：

ROC 曲線下面積 AUC	判斷結果
0.9 以上	準確性較高
0.7 - 0.9	準確性中等
0.5 - 0.7	準確性較低
0.5 以下	準確性不良

(三)根據(A)圖，A 法 AUC 值最大，效果大於 B 與 C。



根據圖(A): $A > B > C$

(四)根據(B)圖，D & E 檢測法的 AUC 值幾乎一樣，當需要高 Sensitivity(TPR)時，E 法比 D 法好，當需要高 Specificity(FPR)時，D 法比 E 法好。

志光系列 **志聖衛生行政.衛生技術**
 面授+線上學習 高效彈性雙學習(1+1>2)
 公衛名師學員一致推薦

謝○盈 | 高考衛生行政全國第五名
 流行病學及生物統計非常推薦王瑋老師，本來我最擔心的這2科，竟成為我上榜的助力。

黃○芬 | 地特三等衛生行政狀元 (桃園區)
 對於護理系的我來說完全沒有基礎，經過志聖老師的循序漸進授課方式後，讓我對生統不在畏懼。

田○立 | 高.普考衛生行政雙料金榜
 生統是可以明確拿分的科目，老師編排的一本式講義就已經包含了高普考會出的全部內容。

生物統計  **公共衛生** 
 名師試聽 名師試聽

加入志聖 致勝關鍵

www.easywin.com.tw 一家報名.全國服務

● 台北志聖 02-23755999

● 台南志聖 06-2281111

● 台中志聖 04-22200985

● 高雄志聖 07-2851919