

## 110 年特種考試地方政府公務人員考試試題

等 別：四等考試

類 科：衛生技術

科 目：生物技術學概要

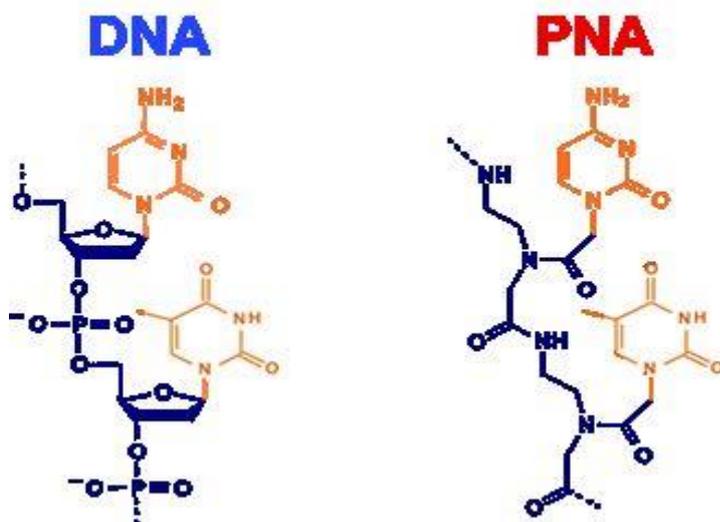
一、請說明肽鏈核酸 PCR (peptide nucleic acid PCR, PNA-PCR) 技術原理。(25 分)

解題關鍵：肽鏈核酸-PCR 是突變基因的微量檢測分析技術，此一考題從未出現過，但肽鏈核酸特性了解後，配合 PCR 螢光分析，即可完整作答。

### 【擬答】

肽核酸 (Peptide nucleic acid, PNA) 是一種與 DNA 和 RNA 相似的化學物質，可經由人工合成製造，用來作為生物學研究或是醫學治療。

PNA 的骨架是由重複排列的 N-2-(胺乙基)-甘胺酸 (N-(2-aminoethyl)-glycine) 單位，經由肽鍵所組合而成，且鹼基與骨架之間是以亞甲羰鍵相連。與多肽鏈相似的是 PNA 也有 N 端 (氮端) 與 C 端 (碳端) 的差別。



由於 PNA 沒有如 DNA 或 RNA 上的磷酸基團，因此 PNA 與 DNA 之間缺乏電性相斥的現象，使兩者之間的結合強度大於 DNA 與 DNA。肽核酸基團構象不同於普通核酸，不易被蛋白酶或者核酸酶水解，且鹼基配對特异性極強，PNA 可以通過 Watson-Crick 鹼基配對的形式識別並結合 DNA 或 RNA 序列，形成穩定的雙螺旋結構，熱穩定性高。

肽核酸鎖核酸 PCR (peptide nucleic acid-locked nucleic acid PCR, PNA-LNA PCR)：肽核酸 (peptide nucleic acid, PNA) 為一特殊設計的類 DNA 片段，其醯胺鍵 (amide bond) 取代了 DNA 原有的去氧核糖磷酸的骨架，它可準確結合到野生型 DNA 序列上，但結合力比 DNA-DNA 的結合力還要強，因此 DNA 聚合酶無法解開此鍵結。目前突變檢驗是臨床醫學新興的檢驗項目，檢測原理是利用螢光的原理而設計的突變分析法：此方法是利用螢光共振能量轉移 (fluorescence resonance energy transfer; FRET) 的原理。其檢測流程為設計一個與突變型 DNA 序列互補的鎖核酸 (locked nucleic acid, LNA) 探針和一個與野生型 DNA 互補的 PNA 片段，此兩段互補的序列皆須包含欲檢測之突變位置。結合螢光共振能量轉移的原理，在 LNA 探針的 5' 端和 3' 端分別接上螢光劑及螢光消除劑，當 PCR 進行時，PNA 會結合到野生型 DNA，當 DNA 聚合酶進行到 PNA 的位置時，會因為無法解開 PNA 和 DNA 的雙股結構而使得 PCR 反應停止，於是野生型 DNA 無法

## 公職王歷屆試題 (110 地方特考)

被擴增；另一方面 LNA 探針會結合上突變型 DNA，但是遇到 DNA 聚合酶時，會被其 5'端外切酶的活性分解掉，基因擴增因此可繼續進行，螢光劑也因為遠離螢光消除劑，可受激發而發出螢光。隨著野生型基因被抑制擴增，突變型基因持續的放大，可提高檢測的靈敏度至 0.2-1%。

二、單株抗體已用於臨床治療疾病，例如治療乳癌之 Trastuzumab (Herceptin,赫賽汀) 人源化單株抗體，請說明赫賽汀單株抗體之製造和特性。(25 分)

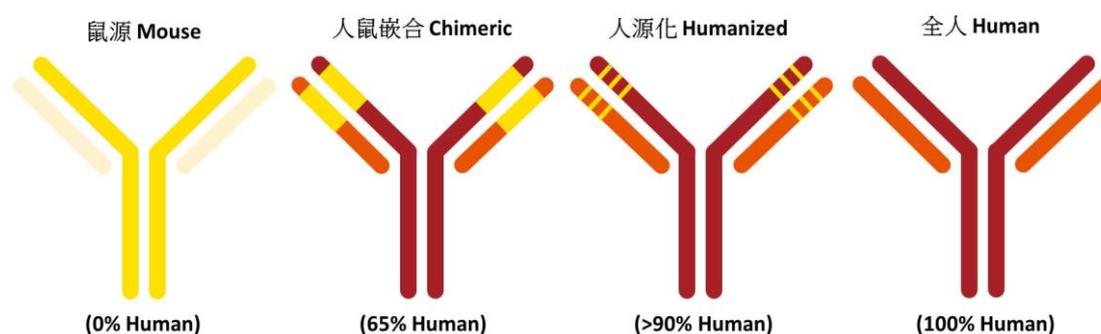
解題關鍵：此種單株抗體治療乳癌的考題，抗體的製備，需要標準化解析，否則學生沒實驗基礎，無法作答。在歷年考題中出現多次，屬於醫學生物技術產業考題。

### 【擬答】

治療乳癌之 Trastuzumab (Herceptin, 赫賽汀)人源化單株抗體可藉由與乳癌細胞表面的 HER2 接受體結合後，啟動人體免疫機轉(antibody dependent cell-mediated cytotoxicity)，經由巨噬細胞及殺手細胞將乳癌細胞消滅。

目前針對此 HER-2 蛋白標靶治療的最主要方法為單株抗體，Herceptin®即是此類分子靶向治療藥物的代表。它的活性成分為 Trastuzumab，是一種人源化人鼠嵌合型(humanized)單株抗體，可選擇性地作用於HER-2 蛋白的細胞外結合部位，抑制細胞表面的 HER-2 蛋白及其與 EGFR 家族其他成員形成異質雙體，因而減弱細胞生長信號的傳遞，亦藉抗體抗原結合後，誘使自然殺手細胞將腫瘤細胞消滅(antibody-dependent cellular cytotoxicity, ADCC)等的機制來抑制腫瘤生長。根據臨床實驗及多數文獻顯示，Herceptin®臨床效益佳，副作用小，大多數病人對藥物耐受性良好，對於腫瘤細胞有過度 HER-2 表現之轉移性乳癌病人，有良好的反應率，能夠明顯改善生活品質。

#### (一)赫賽汀單株抗體之製造：



#### (二)常用二方法製備赫賽汀人源化單株抗體

1. 傳統融合瘤技術，製備 anti-HER2 單株抗體，分離純化單株抗體後，在重鏈及輕鏈的三個高變異互補決定區 (3CDRs, complementarity-determining region) 用特異性酵素剪裁，並插入人類抗體 3CDRs，製備出含 90-95% mouse Ab 及 5-10% 人類抗體 3CDRs 區域，當作抗體藥物在病患體內，可以避開 T 細胞主導的免疫排斥作用。
2. 噬菌體表達技術 (phage display)，利用老鼠單株抗體基因庫，選出 anti-HER2 單株抗體基因，在重鏈及輕鏈的三個高變異互補決定區 (3CDRs, complementarity -determining region) 插入人類抗體 3CDRs 基因，此重組基因插入噬菌體 M13 結構基因 3 之後，製備出含 90-95% mouse Ab 及 5-10% 人類抗體 3CDRs 區域，並表達於基因 3 鞘蛋白質外側，以酵素切出純化 humanized anti-HER2 monoclonal Ab (Herceptin)，當作抗體藥物用在病患體內時，可避開 T 細胞主導的免疫排斥作用。

#### (三)赫賽汀單株抗體之特性：

HER-2 是細胞膜上的一種接受器，與人類表皮生長因子 EGF 有高度專一性。當 EGF 與 HER-2 結合後，會造成 HER-2 的雙聚體化(dimerization)，進而引發自體磷酸化而傳遞細胞內訊息

## 公職王歷屆試題 (110 地方特考)

傳遞，最後維持正常的細胞生長與分裂。當 HER-2 過度表現，細胞會因過度刺激而造成不正常的快速生長，最終造成癌症發生。

赫賽汀單株抗體為人源化的單株抗體，能以高專一性與 HER-2 接受器結合，阻止 EGF 與 HER-2 再結合，進而延緩癌細胞生長。研究指出，赫賽汀單株抗體也能降低癌細胞表面 HER-2 的表現。同時，也有抑制腫瘤血管新生的作用。

單株抗體能誘發體內免疫作用，包括抗體依賴型細胞毒殺作用與補體毒殺作用，進而造成被單株抗體辨識的目標細胞死亡。

三、藥物基因體學臨床應用尤其在藥物不良反應之個人化醫療非常重要，其中史蒂文生強森症候群已證明與人類白血球抗原 (human leukocyte antigen, HLA) 關係密切，請說明 HLA 分型 (HLA typing) 之血清學分型和核酸分子檢測原理。(25 分)

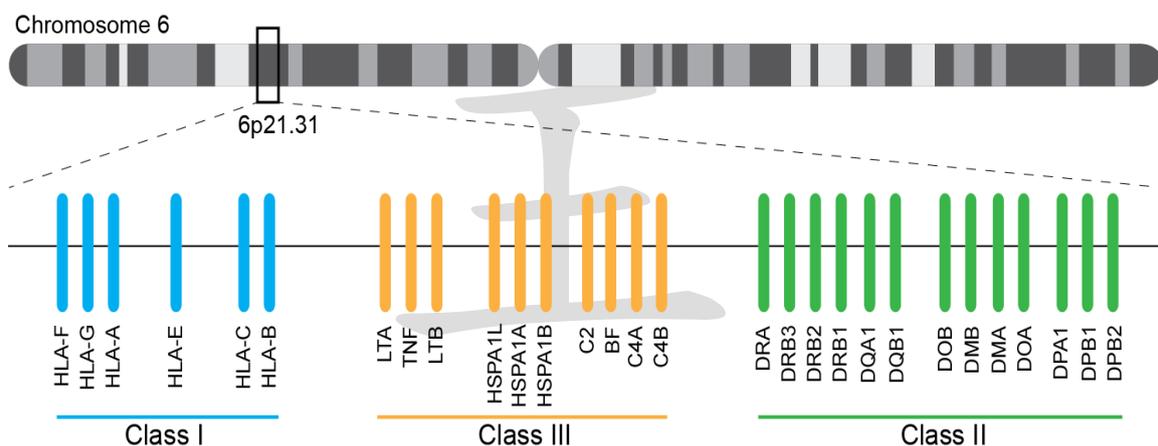
解題關鍵：個人化醫療與個人基因表達及免疫排斥 HLA 分型，HLA 血清分型與核酸分子檢測，基本上屬於免疫分析，需要下功夫才能得分。

### 【擬答】

HLA 分型技術主要組織相容性複合體(MHC)是脊椎動物體內最複雜且具有高度多態性的基因群。1984 年 George Snell 首次發現小鼠 MHC 即 H-2，1958 年 Dausset 發現了人的 MHC 即 HLA(人類白血球抗原)基因。

人類的主要組織相容性複合體(MHC)位於白血球細胞上，稱為人類白血球細胞抗原(Human Leukocyte Antigen, HLA)。其基因所在位置為人類第 6 號染色體短臂 6p21.31 上，通常稱為 HLA 基因或 HLA 複合體。

在 60 年代開發的補體依賴性細胞毒性測試 (Complement-Dependent Cytotoxicity, CDC) 可用於 HLA 分型。由於其簡單性和低成本，血清學是許多只需要低分辨率 HLA-A 和 HLA-B 分型實驗室的首選方法 (僅鑑別相關等位基因組)。相比之下，分子分型幾乎完全取代了 CDC 的血清學不夠精確的其他 HLA-基因座 (HLA-C, DR 和 DQ)。



(一)血清學分型藉助的是微量淋巴細胞毒試驗(microlymphocytotoxicitytest)或稱補體依賴的細胞毒試驗(complement dependent cytotoxicity test, CDC)。取已知 HLA 抗血清加入待測外周血淋巴細胞，作用後加入兔補體，充分作用後加入染料，著染的細胞為死亡細胞，依據特异性抗體介導的補體系統對靶細胞溶解的原理，待檢淋巴細胞表面具有已知抗血清所針對的抗原。

血清學分型存在諸多缺點：

1. 標準分型抗體親和力較弱、效價較低、易產生交叉反應
2. 缺少某些單價抗血清

## 公職王歷屆試題 (110 地方特考)

3. 某些病理過程可能導致外周血淋巴細胞表面抗原性質發生改變，而干擾抗原-抗體反應
4. 國內供 HLA-I 類抗原分型的血清來源困難、品質欠佳。上述因素均嚴重影響了 HLA 分型結果的可靠性及該技術的推廣應用。

(二) DNA 分型方法主要分為兩種:基於核酸序列識別的方法和基於序列分子構型的方法:

### 1. 基於核酸序列識別的方法

基於核酸序列識別的方法主要有:PCR-RFLP, PCR-SSO, PCR-SSP 和 PCR-SBT。

- (1) PCR-RFLP: 其原理是將目的基因片段 PCR 擴增後，利用多種限制性內切酶對擴增產物進行酶切，不同的基因序列會產生不同的酶切產物，從而產生不同的電泳圖譜。它以其簡單、敏感、準確，無需同位素等優點成為目前較常用的 HLA 基因分型技術之一，但是無法分辨雜合子，且只能區分有限的多態性。
- (2) PCR-SSO(sequence specific oligonucleotide):也稱 PCR-ASO(allele specific oligonucleotide)。用以同位素或非放射性標記的探針與 PCR 擴增的目標片斷產物雜交，根據陽性斑點判斷個體基因型。由於 HLA 等位基因非常多，就需要很多的探針對每個 DNA 樣品要進行多次雜交(甚至十幾次)才能完成定型分析操作也十分繁瑣。
- (3) PCR/SSP 方法用乃設計出一整套等位基因組特異性引物(sequence specific primer,SSP)，藉助 PCR 技術獲得 HLA 型別特異的擴增產物，可通過電泳直接分析帶型決定 HLA 型別，從而大大簡化了實驗步驟。優點是簡單易行，解析度可從低到高，成本低。缺點是不易自動化；不能檢測新的等位基因，試劑盒需不斷升級。
- (4) PCR-SBT: 以 PCR 擴增所要分析的基因片斷，然後對 DNA 序列進行分析，可以直接得到基因型。解析度高，可大規模進行，精確度高，能直接發現新的等位基因。但是由於雜合子的存在，無法分辨單元型。

### 2. 基於序列分子構型的方法

基於序列分子構型的分型方法在理論上就避開了雜合子這個難題。SSCP(PCR 單鏈構象多態性分析, PCR-single strand conformational polymorphism)是最常用的根據構型的分型方法。擴增的目標產物變形後形成單鏈，不同的序列，甚至僅有一個鹼基的差異，就會形成不同的莖環結構，從而電泳速率不同。但此方法僅限於分辨僅限於 200-300bp，且即使是同一單鏈 DNA 在相同情況下也會形成不同的構型，使得電泳條帶很難分析;也有可能會出現當某些位置的點突變對單鏈 DNA 分子立體構象的改變不起作用或作用很小的情況，使聚丙烯醯胺凝膠電泳無法分辨造成漏檢。

四、衛生福利部 2021 年修正發布「特定醫療技術檢查檢驗醫療儀器施行或使用管理辦法」(簡稱特管法)，開放 6 項自體細胞治療技術及 7 項實驗室開發檢測 (Laboratory Developed Tests, LDTs)，請說明此 6 項自體細胞治療技術適用對象和 7 項實驗室開發檢測項目。(25 分)

解題關鍵：衛福部特管法之細胞療法與自體免疫細胞療法，一直是生技產業與免疫領域的重點。實驗室重點是第一次出題。

### 【擬答】

依據特定醫療技術檢查檢驗醫療儀器施行或使用管理辦法 110.02.09

6 項自體細胞治療技術適用對象(表四):

(一)自體 CD34+ selection 周邊血幹細胞治療。

適用對象: 1. 慢性缺血性腦中風。2. 嚴重下肢缺血症。

(二)自體免疫細胞治療 (包括 CIK、NK、DC、DCCIK、TIL、gammadelta T 之 adoptive T 細胞輸入療法。

## 公職王歷屆試題 (110 地方特考)

適用對象：1. 血液惡性腫瘤 (hematological malignancies) 經標準治療無效。2. 第一期至第三期實體癌 (solid tumor)，經標準治療無效。3. 實體癌第四期

### (三) 自體脂肪幹細胞

適用對象：1. 慢性或滿六週未癒合之困難傷口。2. 占總體表面積百分之二十以上之大面積燒傷或皮膚創傷受損。3. 皮下及軟組織缺損。4. 退化性關節炎及膝關節軟骨缺損。

### (四) 自體纖維母細胞治療

適用對象：皮膚缺陷：皺紋、凹洞及疤痕之填補及修護。

### (五) 自體骨髓間質幹細胞 (bone marrow mesenchymal stem cell) 治療

適用對象：1. 退化性關節炎及膝關節軟骨缺損。2. 脊髓損傷。

### (六) 自體軟骨細胞

適用對象：膝關節軟骨缺。

## 7 項實驗室開發檢測項目(表三)：

第七條第一項實驗室開發檢測項目，規定如下。

項目名稱

- 一、抗癌藥物之伴隨檢測
- 二、癌症篩檢、診斷、治療及預後之基因檢測
- 三、產前及新生兒染色體與基因變異檢測
- 四、藥物不良反應或藥物代謝之基因檢測
- 五、遺傳代謝與罕見疾病之基因檢測
- 六、病原體鑑定、毒力及抗藥性基因檢測
- 七、其他藥物伴隨基因檢測 (於藥物仿單中，明載於用藥前應執行檢測)