

# 111 年公務人員高等考試試題

類 科：衛生技術  
科 目：生物技術學

阮籍老師

一、請敘述二代核酸定序 (next generation sequencing) 及三代核酸定序 (third generation sequencing) 技術，其各別的主要優點及缺點為何？(30 分)

**解題關鍵：**111 年度新冠肺炎病毒不再出現考題中，回歸正統的生物技術考題。第二代、第三代 DNA 定序是後基因組時代最基本的問題，多增加優缺點的考題。

**【擬答】**

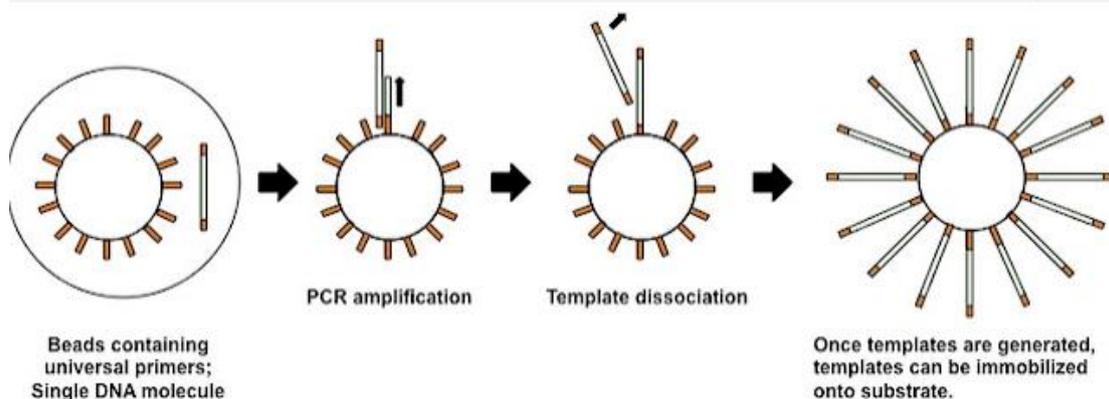
(一)二代核酸定序(next generation sequencing)技術:

第二代之 DNA 定序策略為先解讀各小片段的基因序列，再運用資訊科技協助進行片段接合，達成整個基因組定序的目標。因此，首先透過基因工程的方法，將待定序的基因序列切成小片段，並接上轉接序列 (adaptor)，可選擇加入微磁珠(micro-bead)並配合乳液聚合酶鏈鎖反應(emulsion PCR)或直接採用橋式聚合酶鏈鎖反應(bridge PCR)，以快速增幅待測基因片段。

## 1. Roche/454 定序技術

DNA 定序儀器(Roche/454 Genome Sequencer 20 System)。其運作原理如下：

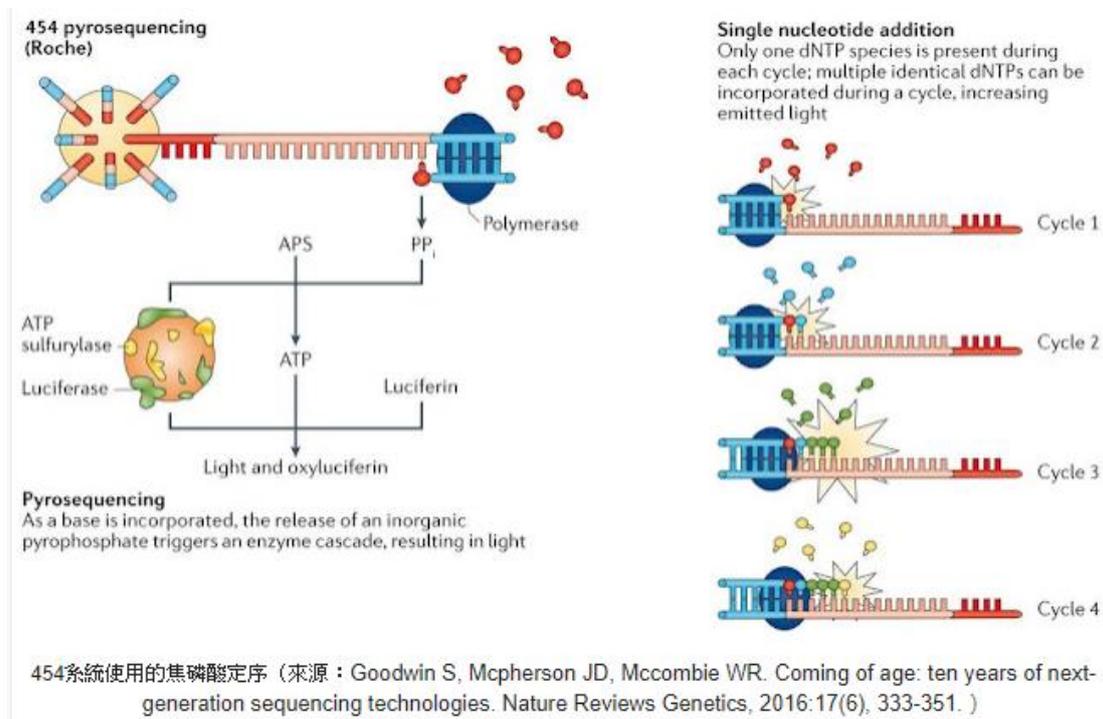
首先將待測 DNA 打斷成 300-800 bp 的小片段，並於兩端接上轉接序列。接著加入表面帶有互補轉接序列的微磁珠，此微磁珠的直徑約 28  $\mu\text{m}$ ，並以乳液聚合酶鏈鎖反應(emulsion PCR)進行增幅，預計每一個小片段將被增幅約 100 萬倍。再將此表面帶有大量 DNA 增幅產物的微磁珠，置入底部可感光偵測的微孔盤中，每一微孔的小孔直徑約 44  $\mu\text{m}$ ，僅能容納一個微磁珠。



「乳液PCR」的運作原理 (來源：Casey G, Conti D, Haile R, Duggan D. Next generation sequencing and a new era of medicine. Gut 2012; 62(6), 920-932.)

最後，進行焦磷酸定序法，此檢測流程將依序置入帶有四個不同鹼基的去氧核苷酸(dNTP)材料，利用聚合酶進行核苷酸接合時，釋放出焦磷酸根離子(pyrophosphate)，藉由 ATP 硫酸化酶(ATP sulfurylase)轉換產生 ATP，冷光酶(Luciferase)接收 ATP 提供的能量，氧化冷光素(Luciferin)而產生等比例之可見光，因此可透過光感測器測得訊號，其餘未反應的去氧核苷酸材料，再以雙磷酸酶(apyrase)分解，故透過反覆的試劑置換與偵測，快速讀取大量之定序結果，最後輔以資訊軟體系統，分析配對出完整之核酸序列。

焦磷酸定序法：



## 2. Illumina 定序技術

DNA 定序儀器(Illumina Genome Analyzer)。其運作原理簡述如下：

首先，將待測 DNA 打斷成 200-500 bp 的小片段，並於兩端接上轉接序列。將已接上轉接序列的待定序基因小片段，置入表面帶有互補轉接序列的晶片，透過橋式聚合酶鏈鎖反應進行增幅，接著置入依不同鹼基而標記特定且可移除螢光分子的去氧核苷酸材料與反應試劑，如此反覆進行螢光標記移除、試劑置換與偵測，以快速讀取大量之定序結果，最後輔以資訊軟體系統，即可分析配對出完整之 DNA 序列。

優點:解析度高、誤差小、精確度高、能進行自動化、能發現新的等位基因、可分辨純合基因型 (Homozygous) 和異基因型 (Heterozygous)

缺點:各家技術略有差異、數據量大、數據分析設備要求、軟體可能影響分型結果。每次 DNA 讀序較短。

### (二)三代核酸定序(third generation sequencing)技術:

第三代 DNA 定序策略將朝向更為簡化的方式，融合奈米科技的發展，針對單一分子進行即時定序，期望能以更低的檢測成本，快速大量直接讀取 DNA 序列，使得將來個人基因定序更為普及、應用更加廣泛。目前有許多公司正投入研發第三代 DNA 定序技術平台：Helicos 公司的 Heliscope 單分子定序儀、Pacific Biosciences 公司的 SMRT 技術和 Oxford Nanolabs Ltd.公司正在研發的奈米孔單分子定序技術。

以奈米孔技術為例：

Oxford Nanopore Technologies 公司核心技術來自於牛津大學，其定序技術亦為針對單一分子進行即時 DNA 定序的方法。目前該技術仍處於開發階段，尚未有商品化之產品，其 DNA 定序原理簡述如下，

此平台技術重點在於建立一個具有許多奈米孔(nanopore)的感測晶片，此奈米孔由經過修飾的蛋白質與人工合成的脂質雙層組成，並於此蛋白質上聯結核酸外切酶(exonuclease)，因此，待測的模板 DNA 將會經過此酵素的作用，其每一個核苷酸將依序被切下，當帶有不同鹼基的核苷酸通過此奈米孔時，會引起不同強度的電流擾動，因而達成 DNA 定序之目的，目前該公司宣稱此技術平台之準確度已接近 99.8%。

優點:

此技術之建立，提供了另一種直接針對單一分子的定序方法，不再需要使用核酸增幅、化學分子標定與精密光學量測儀器，此外，更可擴大應用於蛋白質、聚合物或其他小分子物質的辨識。

於不需要增幅的情況下，針對組成 DNA 的單一分子，同步進行高通量的直接定序，也因此更降低了錯誤率的問題。此外，目前正在研發階段的奈米孔偵測技術，更是全新的檢測架構，將以更低的檢測成本，達成基因直接定序的目標，預計開發成功後，可大幅提升基因檢測的應用潛力。

分析快速、長片段定序(通常大於 10,000 bp)，不依賴參考基因組 (Reference Genome) 避免重複序列(Repeated Sequence)及缺失片段的問題。

缺點：通量低、成本高、誤差率待改善。第三代主流技術方向尚未完全確定，使用在 HLA 分型。

二、利用單細胞 RNA 轉錄體分析 (single cell RNA sequencing) 技術可以瞭解各個單一細胞的分類及功能。

(一)請敘述單細胞 RNA 轉錄體分析技術的基本原理。(15 分)

(二)請舉例說明其優點為何?(5 分)

(三)此技術與組織轉錄體分析 (transcriptome) 技術有何主要不同之處?(10 分)

**解題關鍵：單一細胞與組織的轉錄體 RNA-seq 表達技術，方法與比較，及其優點。**

**【擬答】**

(一)單細胞 RNA 轉錄體分析技術的基本原理：

轉錄體測序(RNA-seq)廣泛被用於測定及描述各類物種基因或轉錄體的表達，但傳統的轉錄體測序技術(bulk RNA-seq)是基於群體細胞，最終反應的是基因在群體細胞中平均表達水準，掩蓋了不同細胞之表達異質性。

單細胞轉錄體測序(single-cell RNA-seq, scRNA-seq)技術的發展，使得揭示單細胞內全基因組表達情況，非常有利於研究細胞間的表達異質性。

目前單細胞轉錄體測序技術已廣泛用於各類物種尤其是人類與小鼠，不同類型組織與細胞系，包括正常和病變的細胞。

從 2009 年第一種單細胞 RNA 轉錄體分析(single cell RNA sequencing)技術: High-throughput sequencing of RNA from single cells，至今有十幾種單細胞分析技術，最近的 10X Genomics 有非常多的特點。

1. 首先，需要分離單個細胞，不同類型的單細胞 RNA 轉錄體分析技術的單細胞分離技術可能不同，目前主要分離技術有：(1)微吸管技術 micropipetting micromanipulation (2)激光捕獲顯微切割技術 Laser capture microdissection (3)流式細胞儀技術 Fluorescence activated cell sorting, FACS (4)微滴技術 Microdroplets (5)微流體技術 Microfluidics。

螢光激發的細胞分選 (FACS, flow cytometry) 之類的科技可將被選取的單一細胞從複雜的樣本中精確地分離出來，而高通量的單一細胞分割的科技可以同時執行數百或數千個單一未分選的細胞的分子分析，這對分析基因型相同的細胞群中總轉錄組 (transcriptome) 的變異特別有用，使人們可以定義以其他方法無法偵測的細胞子類型。

用精密的設備把細胞從組織中原封不動地中分離出來，然後把裡頭的 RNA 萃取出來，反轉錄為 cDNA，送去定序，可以鑑別出了細胞類型及其子型，還得透過複雜的運算把細胞在人體和組織中的分佈位置給找到。

## 公職王歷屆試題 (111 高考三級)

2. 得到單細胞後，分離純化其 mRNA，反轉錄為 cDNA。
3. 測全長的轉錄體(full-length transcript sequencing) 技術，如 Smart-seq2。優點：可測轉錄體的全長，檢測基因表達更靈敏更準確，可進行各種類型的轉錄體測序與分析。缺點：細胞通量少，價格較貴。
4. 只測定 5'端(5'-end sequencing)技術，如 STRT-seq。
5. 只測定 3'端(3'-end sequencing)技術，如 Drop-seq, Seq-Well, Chromium, DroNC-seq 等。優點：細胞通量高，價格便宜。

### (二)單細胞 RNA 轉錄體分析技術優點:

1. 因為原核與真核細胞的族群皆有異質性，所以分析單一細胞可能發現研究整個細胞族群時無法觀測的機制。
2. 可以利用質譜法來做單細胞的轉錄後蛋白質體與代謝體分析的重要分析工具。
3. 原位定序與螢光原位雜交 (FISH) 不要求分離細胞，這些技術越來越常被用來做組織的分析。
4. 可以測定全長，5'端或 3'端 RNA。
5. 10x Genomics 提供高效率的單細胞次世代定序解決方案，透過獨家專利 Next GEM 油滴微珠技術結合自動化微流體系統，針對個別細胞接上獨特的分子標籤，可以快速建置單細胞定序文庫，進行高通量的基因表現分析。
6. 高通量、準確性高。

### (三)此技術與組織轉錄體分析(transcriptome) 技術有何主要不同之處？

組織是生物學中介於細胞和完整器官之間的生物結構層級，它由許多屬於同一器官的形態相似的細胞以及細胞外基質組成，並且具有一定功能。

動物的受精卵經過細胞分裂、分化，形成了上皮組織、肌肉組織、神經組織和結締組織等基本組織。

在人體組成上，細胞→組織→器官→系統→人體。

由此可見，組織不是只有單一細胞，而是形態相似的細胞以及細胞外基質組成，並且具有一定功能。因此，單細胞 RNA 轉錄體分析技術與組織轉錄體分析(transcriptome) 技術相似，都是抽取細胞中所有 RNA，反轉錄為 cDNA，進一步定序，但組織轉錄體分析(transcriptome) 技術更具有功能性與轉錄表達性，其轉錄體分析大數據基因庫會有不同。

如上述，原位定序與螢光原位雜交 (FISH) 不要求分離細胞，這些技術越來越常被用來做組織的分析。

三、代謝體 (metabolomics) 技術為目前主要的研究生物個體、器官及細胞功能的技術之一。  
(每小題 10 分，共 20 分)

**解題關鍵：**代謝體分析技術平台，是生技研究三大領域之一，主要是一些有機／無機的小分子，分析技術包括雙向電泳、毛細電泳、質譜儀等，容易得分。

【擬答】

(一)何謂代謝體技術:

代謝體學 (Metabolomics) 是指在特定的時間點下，對生物體內(細胞，組織，生物體液)的小分子代謝物進行定性和定量。而代謝物 (metabolic) 泛指分子量小於 1500 道爾頓的物質，例如：葡萄糖，脂質，胺基酸...等。

代謝物為生物系統中的最終產物，相較於基因或蛋白，更能直接表現生物體在特定時間下的狀況，且最接近表現型 (phenotype)，且更能反應出環境變化對生物體的影響。

(二)目前有那些主要的代謝體分析技術平台:

1. HMT(人類代謝體技術) 的 CE-MS 平台結合了毛細管電泳 (CE) 和質譜 (MS)，可擴大代謝物的分析，毛細管電泳 (CE)的高辨識率非常適合分析生物體中豐富的親水性和離子代謝物。此外，它可以檢測難以用其他平台分離的代謝物。
- 2.使用專利技術將以前無法連接的高靈敏度傅氏轉換離子迴旋共振質譜儀(FTMS) 連接到毛細管電泳 (CE)，可以檢測幾乎多兩倍的代謝物質，是目前最高階的代謝體分析服務。高分辨率技術非常適合測量生物體中豐富的水溶性和離子代謝物，並且可以檢測其他技術平台難以分離的代謝物。
- 3.使用 CE-TOFMS 和 CE-QqQ MS 分析平台，可分析 116 個與能量相關的代謝產物，報告提供絕對定量服務。
- 4.利用碳 13 同位素標定追蹤特定能量代謝途徑並加以分析，可分析 54 個被同位素標定之能量相關代謝產物。
- 5.雙分析使用兩種分析平台: CE-TOFMS 與 LC-TOFMS，水溶性、脂溶性、疏水性代謝物質全包含在內。
6. Lipid Mediator Scan

## 公職王歷屆試題 (111 高考三級)

提供 400 種具調控細胞生理機能之脂質介質分析，藉由測量脂質介體，來找出涉及不同途徑的關鍵信號調節劑。

7.  $\omega$ -Scan 以 CE-FTMS 為平台進行分析，分析敏感度為所有平台中最高。最低樣本接受數量為 10 個樣本數。

8. 高通量研究技術 (High-Throughput Technology)

高通量技術是為了加速研究進程而產生的研究模式，相較於傳統方法，高通量技術能在短時間內產出大量數據，減少試誤耗費的時間。

受惠於質譜技術高效率的分析特性，高通量多組學分析模式得以實現。以蛋白質體學為例，傳統利用抗原抗體結合的研究模式需耗時數小時至數日，且一次反應僅能分析一至數個蛋白質；而藉由高端的質譜技術，數分鐘內即可解析出數以百計個蛋白質，加速醫學研究的發展進程。

9. 人工智慧大數據解析

經過 3 千萬人醫療紀錄 5 年驗證，160 種疾病風險預測模型，涵蓋人類常見重大疾病。

四、依照中華民國專利法，在生物技術相關領域中，請問：

(一)專利分為那三種？(10 分)

(二)法律主要授予發明人那些專利的權利？(5 分)

(三)就「發明」專利而言，需具備那三項專利之基本要件，才可能被核准？(5 分)

**解題關鍵：生物技術產品的專利問題，經常性出現在考題中，也是生技產業的重點。**

**【擬答】**

(一)專利分為那三種：

台灣專利有三種類型，分別為：發明專利、新型專利及設計專利。

經濟部智慧財產局係台灣智慧財產權相關事務的專責機關，申請人如欲申請台灣專利，可以自行申請或透過台灣專利代理人、專利師向經濟部智慧財產局提出相關申請。

(二)法律主要授予發明人那些專利的權力：

發明專利是指利用自然界法則之技術思想的創作，對於欲解決之問題，使用適宜的技術手段，產生其功效，達成所預期的發明目的。發明專利必須具有技術性，不具技術性之發明，例如單純的發現、科學原理、單純之美術創作等，都不符合發明的定義。發明專利有效期為申請日起 20 年。

(三)就「發明」專利而言，需具備那三項專利之基本要件，才可能被核准：

申請專利權的發明或創作，除了必須符合申請的程序要件之外，尚且必須經經濟部智慧財產局審查該發明或創作，是否符合「產業利用性」、「新穎性」以及「進步性」的三個實質要件，如經審定核准公告，始得獲得專利權。

1. 「產業利用性」之要件

是專利審查的首要要件，必須優先於「新穎性」與「進步性」二要件，而先為審查。凡提出專利權申請的發明或創作，必須具有產業上的利用價值，有利於產業之發展，國家方給予專利權之保護，如果該項發明或創作，毫無產業上利用之價值，縱然具有崇高的學術評價，亦無法通過「產業利用性」的審查。

2. 「新穎性」要件

係指申請專利權的發明或創作，必須與申請日前之限存既有技術有所不同，始得以申請專利權。凡申請專利權之發明或創作，於申請日之前，如已見於刊物、已公開使用或已為公眾所知悉者，該發明或創作原則上即不具備「新穎性」；相反地，如果申請專利權

## 公職王歷屆試題 (111 高考三級)

的發明或創作，於申請日之前，沒有發生上述「欠缺新穎性」之法定事由，該發明或創作原則上即具備「新穎性」。

### 3. 「進步性」要件

係指申請專利權之發明或創作，與申請日前之現存既有技術雖然有所不同，但該發明或創作，如係該發明或創作所屬技術領域中，具有通常知識者，依申請日前之現存既有技術，所能輕易完成者，該發明或創作便不具備進步性。換言之，其技術內容的差異，必須達到創新的層次，始符合本要件的要求，否則該發明或創作便不具備進步性。

公  
職  
王