112 年公務人員高等考試三級考試試題

類　科：衛生技術
科　目：生物技術學

阮籍老師

一、、人類的胚胎、臍帶血、骨髓與周邊血液等多種組織器官都含有幹細胞（stem cells），可使用於研發細胞治療。請回答下列問題：

㈠說明幹細胞的定義與特性。（5 分）

㈡說明胚胎幹細胞、成體幹細胞與誘導式多功能性幹細胞（induced pluripotent stem cell, iPS 細胞）的特性。（10 分）

㈢說明幹細胞之分離技術。（5 分）

㈣說明細胞治療的定義。（5 分）

解題關鍵：

1.《考題難易》：幹細胞研究是再生醫學重要一環，此題純粹是送分，屬於簡單易寫的問題。此題容易拿下 15-20 分，甚至滿分 25 分。

2.《破題關鍵》：誠如上課一再提醒，解釋名詞一定要詳細了解。抗體抗原特異性是細胞分離與免疫分析的關鍵，特異性抗體的親和性管柱與流式細胞分類儀(flow cytometry mrthod)加以分離純化，即可得分。最後是衛福部的細胞治療特管法。

【擬答】

㈠幹細胞的定義與特性。

幹細胞(stem cells)是生物體最原始未分化的細胞，它具有再生與分化的能力，可以增殖成為原來相同的細胞也可以分化成為其他細胞如肝細胞，肌肉細胞，血球細胞等，以及其他具有特定功能的細胞。簡言之，幹細胞係指一群尚未分化、但具有自我更新的能力、以及增殖分化成各類成熟組織能力的原始細胞。

幹細胞因具有以上這些特性，所以可用來修補受損的組織或器官，甚至還可以建構出完整的器官。幹細胞被稱為“源母全功能細胞”，因為它們具有形成特定的組織分化及或器官發育的能力。

㈡胚胎幹細胞、成體幹細胞與誘導式多功能性幹細胞

1. 胚胎幹細胞特性：

胚胎幹細胞（embryonic stem cell）存在於胚胎發育早期，受精卵分裂五天後囊胚中，可發育為不同的細胞，是所有細胞最初期的形態，能分化出成體的所有組織和器官，包括生殖細胞等。

2. 成體幹細胞特性：

成體幹細胞（adult stem cell）也稱成人幹細胞，存在於已成熟的個體的成體組織中，典型的代表包括骨髓幹細胞、脂肪幹細胞、造血幹細胞與間質幹細胞等，這些幹細胞並不是全能幹細胞，被稱之為多功能幹細胞。成體幹細胞的最佳例子是造血幹細胞。骨髓移植，幹細胞移植，或血液移植，被移植的細胞是造血幹細胞。這種細胞是主要存在於成人骨髓中。

3. 誘導式多功能性幹細胞特性：

誘導性多能幹細胞（Induced pluripotent stem cell），又稱人工誘導多功能幹細胞，簡稱爲 iPS 細胞（iPSC），是一種由哺乳動物成體細胞經轉入特異分化轉錄因子等手段，可逆

性分化形成的多功能幹細胞，最早由日本學者山中伸彌的研究團隊於 2006 年發現。山中伸彌團隊在發表 iPS 誘導技術時使用實驗材料爲小鼠成體細胞。2007 年，研究人員又證明 iPS 誘導技術可以應用於人體細胞。最初由山中伸彌團隊發現的誘導方法是透過慢病毒載體將 Oct4、Sox2、Klf4、c-Myc 四種轉錄因子(OSKM 被稱為山中因子)基因轉入成體細胞將其轉化爲類似於胚胎幹細胞的多能幹細胞。

人類的 iPSC 可以分化成為多種不同的胎兒細胞類型。iPS 細胞在疾病發展和治療藥物的研究很有價值，並且它們可以具有在移植醫學未來用途上。

㈢幹細胞之分離技術：

不同的幹細胞有不同的特異性表面抗原或分化標誌，因此，可用特異性抗體的親和性管柱(affinity column) 與流式細胞分類儀(flow cytometer)加以分離純化。

以血液幹細胞的純化為例：它是利用一種新的血液幹細胞分離技術，來達到血液幹細胞純化的目的。CD34 是血液幹細胞的一種細胞分化標誌的表面抗原，絕大多數的血液惡性腫瘤細胞都不含此種抗原，因此，臨床上我們便可以透過利用此種表面抗原的細胞篩選技術來純化血液幹細胞。

CD34 血液幹細胞分離系統，目前臨床市面上常使用細胞純化機。此種臨床細胞分離系統（Clini MACS）是一種由永久磁鐵，一個蠕動推進幫浦及一組控制閥門所組成，由電腦控制的全自動操作機器，利用磁性分離細胞篩選技術的系統，在臨床上可以利用此分離技術作為 CD34 陽性細胞的分離並提供良好的細胞純度及活性。在篩選過程中，乃是利用鼠抗人類 CD34 抗體與鐵菌葡萄聚糖分子共價結合的免疫磁珠，經過磁性標記後，系統自動將 CD34 陽性細胞留存於含有磁性的分離柱上，之後將磁力移除可使分離柱上脫離出被留存的細胞，再經過清洗即可完成 CD34 陽性細胞收集。完整的細胞分離只須要 3 小時即可完成。

㈣細胞治療的定義：

根據衛生福利部食品藥物管理署所定義的細胞治療：「使用取自病患同種自體、同種異體或異種異體或其他經中央主管機關核准之體細胞或幹細胞，並經體外培養後所衍生的細胞，以達到疾病治療、診斷或預防目的之醫療技術。」

二、請回答下列有關以 RNA 抑制基因表現方式的問題：

㈠何謂 RNA interference（RNAi）？（10 分）

㈡試說明使用 siRNA、shRNA 與 microRNA（miR）抑制基因表現方式在原理、技術方法的差異與抑制基因表現的優缺點。（15 分）

解題關鍵：

1.《考題難易》：此題上課及生物技術學講義中都有詳細說明與圖解，屬於簡單易寫的考題，同學至少可以拿到 20 分，甚至於滿分 25 分。

2.《破題關鍵》：iRNA、shRNA 與 microRNA 三者都是干擾 RNA，由上課中灌施的圖解影像，就很容易敘述其原理、技術差異與優缺點，也因此可以取得高分，甚至滿分。

【擬答】

㈠ RNA interference（RNAi）

RNA interference（RNAi）指的是 RNA 干擾，是 RNA 研究的聖杯。

RNAi 為 RNA interference 的簡稱，是一種可造成 RNA 降解（RNA degradation）進而導致該 RNA 分子失去功能的一種作用，此作用係透過小片段之 RNA 分子（約 21 - 23 核苷酸，稱為 small interfering RNA，簡稱 siRNA）結合到與其序列互補之 RNA 上，形成雙股 RNA，引發連串雙股 RNA 分解與合成放大作用，造成該特定基因失去功能。RNAi 亦可稱為轉錄

後基因沉默作用（post transcriptional gene silencing, PTGS），係因 RNAi 作用於基因轉錄為 mRNA 後，透過降解作用，使得 mRNA 無法轉譯成蛋白質，而產生該基因靜默現象。

㈡ siRNA、shRNA 與 microRNA（miR）抑制基因表現方式在原理、技術方法的差異與抑制基因表現的優缺點。

1. siRNA (small interfering RNA)：

siRNA (small interfering RNA)是小片段干擾 RNA 現象，合成 35 nt 左右與標的基因互補的外源 dsRNA 送入細胞質內，或 RNA 病毒感染或干擾素作用，在細胞質內誘導 RNAase III-like specific dsRNA endonuclease Dicer，Dicer 將 dsRNA 切成 21-23 nt 長度的雙股 RNA (稱為小干擾 RNA)，Dicer 具有 helicase 功能，將 dsRNA 鬆開為 ssRNA，單股 siRNA 結合 GTP/Mg^{2+}/ Dicer/Argonaute 形成 RISC 複合物(RNA induced silence complex)，進一步結合到細胞質內標的轉錄 RNA 分子，利用 Argonaute 的 dsRNA specific endonuclease 作用，水解標的 mRNA，使得該基因無法轉譯出蛋白質，同時，siRNA 也可以大量複製，使得此種 RNA 干擾效力更大，引發的廣泛存在於生物體內的序列特異性基因轉錄後的基因沉默過程，這是 siRNA 干擾轉錄 RNA 的分子機制。

優點：⑴針對標的基因合成外源性互補 dsRNA 或者利用誘導 dsRNA 的干擾素或者 RNA 病毒感染。⑵ RNAi 作用的專一性極高，因此僅能對於 RNA 序列相似度極高的病毒具有效力，而對於同一屬卻不同種的病毒通常是無效的。

缺點：⑴ siRNA 在細胞質內穩定度差，容易被降解。⑵ RNAi 並不一定有效，且其效能通常與 siRNA 的表現量息息相關，在早期的研究中，經常發現僅有不到 1%的轉殖成功，可表現出基因靜默現象。⑶ siRNAs 可能在细胞质中降解，導致脱靶效應。

2. shRNA (short hairpin RNA)：

小髮夾 RNA（short hairpin RNA，縮寫 shRNA）是一種形成急轉彎（hairpin turn）結構的 RNA 序列，可以經由 RNA 干擾（RNAi）使基因表現沉默化。shRNA 可利用人工合成的載體(U6 promoter-----sense ---loop---antisense)導入細胞當中，sense 25-29 nt, 不配對的 loop 4-23 nt, antisense 25-29 nt,並藉由細胞質內 U6 啟動子(RNA polymerase III 起動)來確保 shRNA 的表現。另外，shRNA 在細胞質內可經由 Dicer 切割轉變成為 21-23 nt 的 siRNA。shRNA 為一種有髮夾狀結構的 RNA 序列，可利用載體導入細胞中，並藉由 U6 或 H1 啟動子來確保 shRNA 的持續表現，shRNA 可切割產生 siRNA，並經由 RNA 干擾（RNAi）使基因沉默化。

優點：⑴可以利用人為意志合成質體 DNA (U6 promoter-----sense ---loop---antisense)，由細胞質內 RNA Pol III 負責轉錄 shRNA。(2) shRNA 操作簡便。 (3) 基因 knockout 基因很高，功能遠高於 siRNA/miRNA。 (4) 基因特異性，用於基因治療、控制病原菌、病毒、疾病與腫瘤。

缺點：⑴由於 shRNA 是以質體的形式存在，所以對於難轉染的细胞來進行，難度就大大提高，基本上無法形成穩定干擾的細胞系。

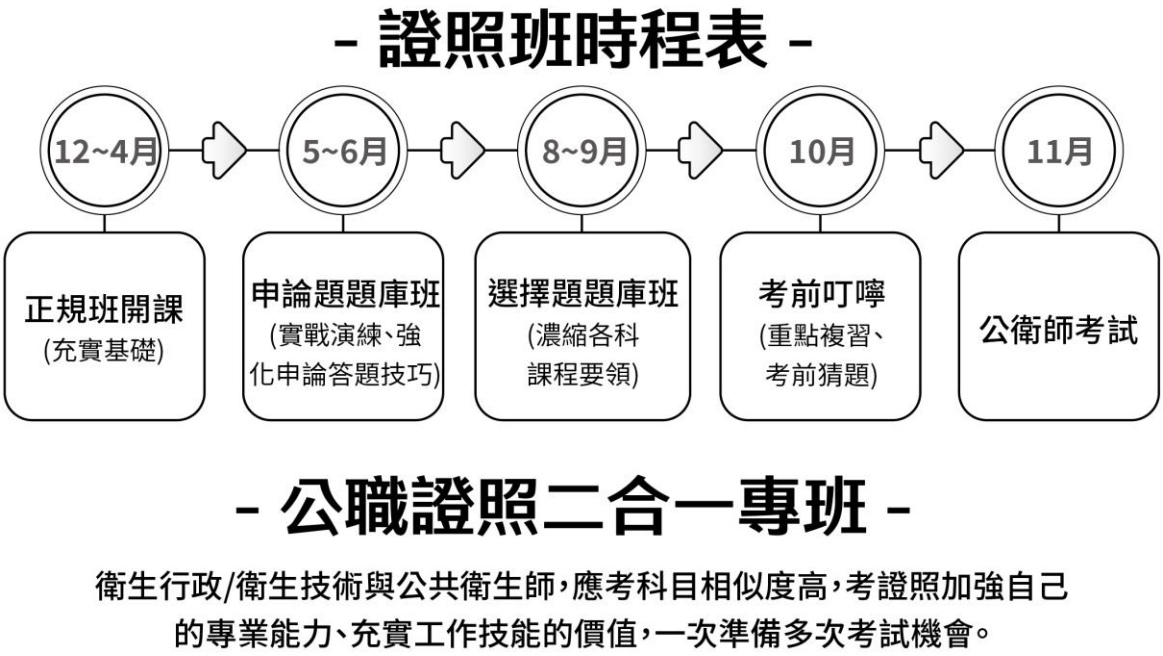
3. microRNA (miR)：

小分子核糖核酸（microRNA, miRNA），又稱微 RNA（微核糖核酸），是真核生物中廣泛存在的一種長約 21 到 23 個核苷酸的 RNA 分子，可調節其他基因的表達。miRNA 來自一些從 DNA 轉錄而來，但無法進一步轉譯成蛋白質的 RNA（屬於非編碼 RNA）。miRNA 通過與目標 mRNA 結合，進而抑制轉錄後的基因表達。

細胞核內基因 3'端非轉譯區轉錄 pri-miRNA 長度大約為 500~3000 個鹼基，pri-miRNA 經過 Dosa/Pasha 一次加工後，成為 70-90 nt pre-miRNA(即 microRNA 前體)，帶有髮夾結構；pre-miRNA 再經 Exportin/Ran 送入細胞質，經過 Dicer 酶酶切後，成為長約 21 – 22 nt 的成熟 miRNA。在細胞質內與 siRNA 同樣的經 GTP/Mg^{2+}/ Dicer/Argonaute 形成 RISC 複合物，最後由 Argonaute 將標的轉錄 mRNA3'端非轉譯區降解，而無法轉譯出蛋白質，造成基因沉默化。實際研究中，pre-miRNA 應用最早，也最廣泛。

優點：⑴在大多數生物體中，miRNA 相對於 mRNA 與蛋白質來說數量較少，然而一個 miRNA 可能調控多達數百個 mRNA，影響重大基因表現網路。⑵由於 miRNAs 在調節基因表達中有重要作用，所以異常的 miRNAs 表達可以作為多種疾病的生物標題物，如神經退化性疾病、糖尿病、心血管疾病，甚至是免疫性疾病。⑶miRNA 是內源性的，由非編碼的 pri-mRNA 經過剪切加工而成，是生物體長期進化過程中自己形成的一套調控系統，在生物體內的表達具有時間性、保守性與組織特異性。

缺點：⑴屬於內源性基因，無法人為控制。



三、免疫缺陷純品系小鼠是常用於研發抗癌藥物療效的實驗動物模式。請回答下列有關實驗動物模式的問題：

㈠何謂 human orthotopic xenograft models？（5 分）

㈡何謂 SPF 實驗動物？（5 分）

㈢試列舉 2 種在生物醫學研究領域常用之免疫缺陷純品系小鼠，並說明其特性。（15 分）

解題關鍵：

1.《考題難易》：考題難易度中等，是生物技術中動物模式的考題，歷年也考過。上課中都特

別強調，也提供詳細的補充資料，對志聖的同時只是一個中等到簡易的問題。至少可以拿下 20 分，甚至於滿分。

2.《破題關鍵》：看過研讀過就會寫。上課絕對是重要的。

【擬答】

㈠ human orthotopic xenograft models：

此為人類原位異種移植（xenograft model）。

原位模式(Orthotopic model)是指癌細胞移植到動物體內的位置，就是原來癌症發生的位置。例如血癌就是在血液中產生癌症，肺癌就是在肺中產生腫瘤，口腔癌就是在口腔中產生腫瘤。利用原位移植的模式，其優點是發生癌化部位接近人類發生部位，可觀察其癌症發生的進程與相關基因的表現。而缺點在於建立此模式選擇的部位有限，技術也需較好。

異種移植(Xenograft Model)是指所移植到動物體內的癌細胞，不是同種動物所產生的，例如將人類的骨癌細胞株 U2-OS 細胞，以皮下注射方式注入 BALB/c $^{nu/nu}$ 裸小鼠中，便能成功地誘導 BALB/c$^{nu/nu}$ 裸小鼠皮下產生腫瘤。利用異種移植的模式，其優點是人類的癌細胞可在免疫功能缺乏的小鼠中，產生腫瘤，不用侷限在某些癌細胞。

㈡ SPF 實驗動物：

實驗動物根據對於微生物的控制狀況，一般分為四個等級：第一級是無菌動物（Germ Free Animal），第二級為特定病原動物（Gnotobiotes），第三級即為無特定病原（SPF）動物，第四級實驗動物稱為一般動物（Conventional Animal）。

無特定病原（Specific Pathogen Free, SPF）動物屬於第三級，是指實驗動物沒有附存特定微生物或寄生蟲的動物，由前述無菌動物或特定病原動物而來，飼養於隔離系統中，使特定病原隔離於外，但允許常態微生物自然定著，生產成本亦相當高。

㈢二種在生物醫學研究領域常用之免疫缺陷純品系小鼠，及其特性。

科學家利用免疫缺陷小鼠（immunodeficient mice）的特性，植入人類幹細胞於小鼠體內，建構模擬人類免疫系統的擬人化小鼠（humanized mice），促成生物醫學相關領域的研究蓬勃發展。免疫缺陷小鼠的發展，起源於遺傳性基因突變的發現，早期較廣為應用的有裸鼠(nude mice)和 SCID (severe combined immunodeficiency)小鼠。

1. 裸鼠(nude mice)

裸鼠是目前癌症研究領域中，不可缺少的動物模型。在腫瘤學、免疫學、藥理學與生物製劑的安全性評估與活性篩選實驗，具有特殊的價值。無毛小鼠沒有胸腺，缺乏 T 細胞，是第 11 對染色體上 nu 基因突變產生，裸鼠大量地被使用於異種移植（xenograft model）的研究，成為癌症研究領域中不可或缺的動物模式。但裸鼠的免疫系統仍保有 B 細胞、NK 細胞和巨噬細胞，並非所有實驗材料都能移植成功。

2. SCID (severe combined immunodeficiency)小鼠

重症聯合免疫缺陷小鼠(SCID)包括 CB-17/SCID 小鼠，攜帶有一遺傳性染色體隱性突變的基因(scid)，為重症聯合免疫缺陷小鼠，其特性包含 T 細胞及 B 細胞皆有缺陷，因此可接受外來移植的細胞，較不會有免疫排斥現象，適合於異種移植(Xenograft Model)，但須在無菌條件下飼養。但 SCID 小鼠體內的先天性免疫系統仍保有高度活性，限制人類細胞植入後的增殖。

四、某生技公司研發基因編輯技術，使用 CRISPR/Cas9 基因編輯技術剪除人類 CCR5（C-C chemokine receptor type 5）基因，進而產生號稱缺乏 CCR5 而不會被愛滋病毒感染的新生兒。請回答下列問題：

㈠說明缺乏 CCR5 則可能免於 HIV 感染的原因。（5 分）

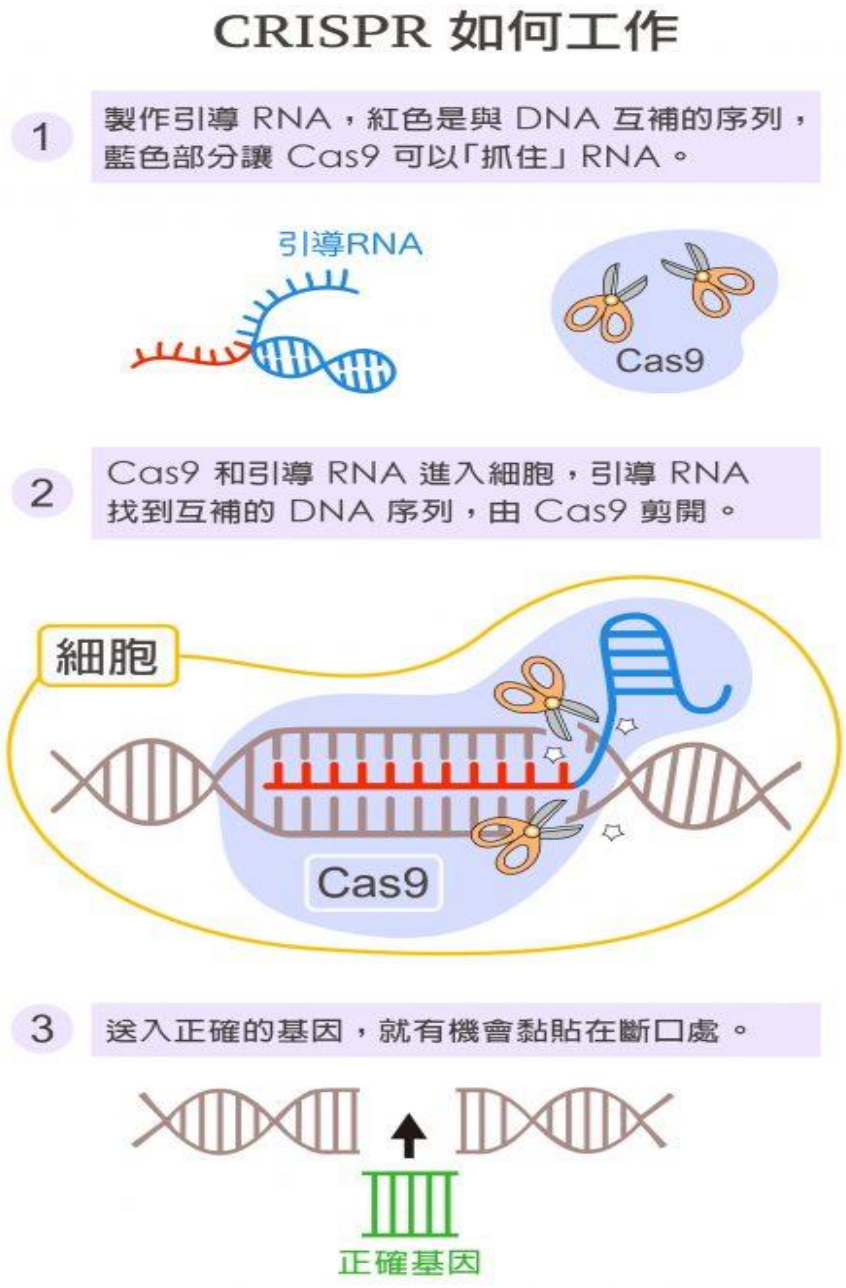
㈡說明 CRISPR/Cas9 基因編輯技術的原理。（5 分）

㈢試述針對該項研究的倫理問題、衝擊與爭議。（15 分）

解題關鍵：

1.《考題難易》：此題難易度中等，2020 年基因剪刀手 CRISPR/Cas9 編輯技術獲得諾貝爾化屬獎，過程簡單，容易描述。可以取得高分 20-25 分。

2.《破題關鍵》：由圖示影像，很容易敘述。



【擬答】

㈠缺乏 CCR5 則可能免於 HIV 感染的原因。

CCR5（C-C chemokine receptor type 5）為趨化因子受體 5，也稱為 CD195，CCR5 是一種 G 蛋白偶聯受體，屬於整合型膜蛋白的 β 趨化因子受體家族成員。

CCR5 是白血球表面的一種蛋白質，因此也稱為 CCR5 蛋白質。CCR5 主要在 T4 細胞、巨噬細胞、樹突細胞、嗜酸性球、小膠質細胞和乳腺癌或前列腺癌的細胞亞群中表現。

1983 年科學家篤定 HIV 是造成後天免疫缺乏症候群的罪魁禍首之前，就有許多研究人員發現 HIV 特別偏愛免疫系統裡的 CD4 T 細胞。HIV 病毒藉由本身表面的 gp120 與 gp41 兩種

醣蛋白而得以入侵 T 細胞。HIV 病毒先靠 gp120 醣蛋白和 T 細胞的 CD4 接觸，兩相結合之後，會造成 gp120 構型上的改變，使其上頭的 V3 可變環區（variable 3 loop）能和另一個 T 細胞表面蛋白質（CCR5 或是 CXCR4）結合，CCR5 做為 Co-receptor，進而使得 HIV 表面的 gp41 醣蛋白得以接觸到 T 細胞細胞膜，在其上打洞，好讓 HIV 把自己的遺傳物質感染到 T 細胞內。因此，HIV 病毒要感染 T 細胞，必須湊足 T 細胞有表達 CD4、與 CCR5（或是 CXCR4）的條件。

愛滋病 HIV 要進入並感染宿主細胞的過程需要藉助 CCR5 蛋白質，控制 CCR5 蛋白質的基因稱為 CCR5 基因，該基因在人體內的基因座是 3p21.31。某些人群的基因組中含有此基因的一個突變型，稱為 CCR5-Δ32，與普通 CCR5 基因相比，有一段長為 32 鹼基對的缺失，其表現產物無法被 HIV 識別和結合，因此可對 R5 型 HIV 引起的愛滋病免疫。

㈡ CRISPR/Cas9 基因編輯技術的原理。

CRISPR/Cas9 的全名為「常間回文重複序列叢集關聯蛋白」（Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat/ CRISPR associated protein 9），CRISPR 是 1987 年日本科學家在大腸桿菌中發現。後來發現，許多細菌都有 CRISPR，它是細菌免疫系統的一種機制，可以記憶曾經來犯的病毒。

CRISPR/Cas9 整個系統需要三大要件：

1. 欲編輯剪切的標的 DNA 已知序列
2. 與標的 DNA 已知序列互補的引導 guide RNA (gRNA)
3. 特異性分子剪刀手 Cas9 endonuclease。

以 DNA 片段（Spacer）當模板，打造一條互補的引導 gRNA，透過一個來自於化膿性鏈球菌(Streptococcus pyogenes)的 Cas9 蛋白與一個 gRNA 形成一個複合體，該複合體會與互補的 DNA 進行辨識。辨識 DNA 序列最主要的是透過 gRNA 前端(5 端)的 20 nt 長度的序列，稱之為 Protospacer。緊接在後的三個核苷酸序列(NGG) 則稱之為 Protospacer adjacent motif (PAM)，主要是讓 Cas9 辨識並且切割 DNA。目前發現在細胞實驗中，野生型 Cas9 存在較高的脫靶可能性，主要原因是當 Protospacer 的 5 端序列約 5-7 bps 的核苷酸產生變異時，野生型的 Cas9 蛋白仍然可以對 DNA 進行辨識與切割。

㈢ CRISPR/Cas9 基因編輯技術的的倫理問題、衝擊與爭議。

基因編輯自帶雙刃劍屬性，問世後爭議從未間斷。改變遺傳信息，等於修改了「天命」、「天條」，尤其在人類基因編輯領域，倫理問題尤其突出。

正因為這把剪刀之鋒利，其安全性、有效性尚難確定，用在胚胎基因編輯上，實驗室操作尚可控制而安全性和穩定性仍未過關，如果允許用於臨床，則可能引發一系列安全風險和倫理問題。

專家擔心，改變胚胎的基因組可能會造成意想不到的傷害，比如意外改變了其他重要基因，或無意中引發癌症，不僅對個體有傷害，而且被改變的 DNA 代際相傳，對繼承這些基因遺傳的子孫後代都會造成傷害。科學家們警告說，修改人類基因的研究可能會對未來的世代產生未知的影響。

2018 年，中國科學家賀建奎宣佈首例免疫艾滋病的基因編輯嬰兒成功誕生的消息，利用 CRISPR/Cas9 編輯技術，將 HIV 感染 T 細胞上 CCR5 coreceptor 剪切，其震撼強度之大至今餘波蕩漾。