

# 108 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、請分別說明何謂凝集反應(Agglutination)及凝集聚合酶連鎖反應(Agglutination-PCR)，並請說明兩者之反應條件為何？另請說明其在臨床之應用。(20分)

## 【擬答】

### (一)凝集反應(Agglutination)

凝集反應是一種血清學反應。顆粒性抗原(完整的病原微生物或紅血球細胞等)與相應抗體結合，在有電解質存在的條件下，經過一定時間，出現肉眼可見的凝集小塊。參與凝集反應的抗原稱為凝集原，抗體稱為凝集素。可分為直接凝集反應和間接凝集反應兩類。玻片法是一種定性試驗方法：可用已知抗體來檢測未知抗原。若鑑定新分離的菌種時，可取已知抗體滴加在玻片上，將待檢菌液一滴與其混勻，以鑑定菌種。除鑑定菌種外，尚可用於菌種分型、測定人類紅血球細胞的 ABO 血型等。

### (二)凝集聚合酶連鎖反應(Agglutination-PCR)

凝集聚合酶連鎖反應用來放大偵測參與凝集之抗體。

(a)欲分析之抗體與已知抗原結合，此抗原與特定序列 DNA 鍵結一起(antigen-DNA conjugates)。特定 DNA 有特定 5 端與 3 端的寡核苷酸。

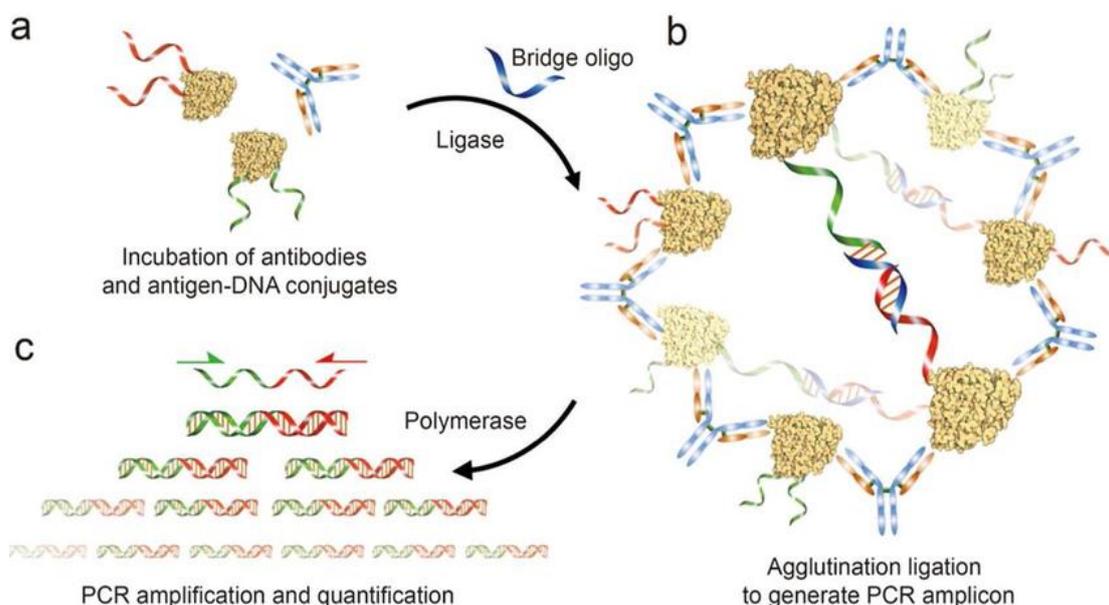
(b)凝集反應時，抗原結合的 DNA 之 5 端與 3 端的寡核苷酸以 DNA ligase 連接。

(c)新結合的 DNA 序列，以 5 端與 3 端的寡核苷酸序列為 primers，進行 real-time PCR (外加 SYBR Green 染料為即時定量 qPCR)。抗體以多株抗體較適合，因為 IgG 有二個抗原結合區，IgM 有十個抗原結合區。

反應條件依序為：

(1)抗體與抗原-DNA conjugates 進行凝集反應。

(2)將 DNA conjugates 進行 DNA ligase 催化接合，與 DNA 的即時 PCR 反應。



在臨床之應用：

#### 1. 凝集反應(Agglutination)

## 公職王歷屆試題 (108 地方特考)

- (1) 可用已知抗體來檢測未知抗原。
  - (2) 利用血清型鑑定菌種與菌種分型。
  - (3) 測定人類紅血球細胞的 ABO 血型等。
2. 凝集聚合酶連鎖反應(Agglutination-PCR)
- (1) 利用 real time PCR 快速放大抗原結合 DNA。
  - (2) 在臨床檢驗上，增加靈敏度。

二、請說明分批發酵法(Batch Fermentation)、饋料批式發酵法(Fed-Batch Fermentation)及連續發酵法(Continuous Fermentation)，並說明三者之差異。(20 分)

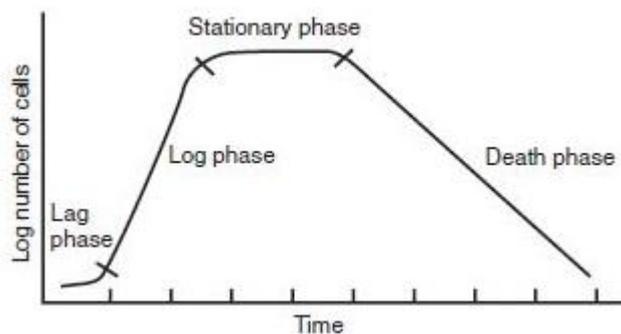
### 【擬答】

#### (一) 分批發酵法(Batch Fermentation)

分批發酵法是最為簡單的發酵過程，培養基中接入菌種以後，沒有物料的加入和取出，除了空氣的通入和排氣。整個過程中菌的濃度、營養成分的濃度和產物濃度等參數都隨時間變化。分批培養法，其開始培養基之營養條件是被限制之閉鎖系的培養法。

當定量液體培養接種菌株後，細菌生長可以分以下階段：

1. Lag phase (延滯期): 接種後生務須適應，其培養基內菌數, 密度維持不變
2. Exponential phase or Log phase (指數期): 菌株進入穩定生長階段，細菌以 2 的 n 次方的方式快速生長，微生物或細菌族群數目或生物質量加倍所需的時間稱為(generation time)世代時間。
3. Stationary phase (停滯期): 養分逐漸耗盡，代謝廢物影響生長，此時生長速度=0
4. Death phase (死亡期): 細胞呈現幾何級數遞減。



#### (二) 饋料批式發酵法(Fed-Batch Fermentation)

饋料批式發酵法（又稱“半連續發酵”或者“流加發酵”）是指在微生物分批發酵過程中，以某種方式向發酵系統中補加一定物料，但並不連續地向外放出發酵液的發酵技術，是介於分批發酵和連續發酵之間的一種發酵技術。

#### (三) 連續發酵法(Continuous Fermentation)

連續發酵法是指在一個非封閉培養系統中接種微生物菌種，並在培養過程中不斷補充新鮮營養液，解除抑制因子，優化生長環境，並不斷收集培養產物的培養方式。由於連續培養是在深入研究分批培養中微生物生長曲線的基礎上制定和實施的培養方式，因此具有顯著的特點和優勢。在分批培養中的對數增殖期，在發酵槽中給予添加新的培養基時則可以延長其對數增殖期。假如，培養中沒有抑制物質之速率，而可以設定培養基中之一種成分，使成為速率之基質速率的培養條件時，在對數增殖期應該會使被添加的營養成分繼續使完全消耗掉。如此的話，此種培養基之添加可以反覆的進行到發酵槽的液體裝滿為止。但是，在添加新培養基之同時，若能從發酵槽中取出等量的培養液時，發酵就可以連續的進行。假如能把培養基以適當的速度連續的流加(feed)到培養系中使形成定常狀態的話，被取出到

外部之菌體量就會與新增殖的菌體量平衡相等的意思。

分批發酵法、饋料批式發酵法及連續發酵法三者之差異：

1. 分批發酵操作相對簡單，因此目前對代謝物的生產的研究絕大部分是在分批發酵的基礎上進行的。由於分批發酵過程中營養物質不斷消耗，產生大量的代謝副產物，生存環境也越來越惡劣，這幾個因素互相交織在一起，限制了菌體的生長和目標代謝產物的合成，因此生產效率不高，而且分批發酵是一次投料，一次發酵，再次發酵又要重新滅菌、接種、發酵、發酵設備的利用率低。

分批培養的操作簡單，周期短，染菌機會少，生產過程和產品質量容易掌握；然而產率低，不適用於測定動力學數據。

2. 饋料批式發酵法是在微生物分批發酵過程中，以某種方式向發酵系統中補加某種營養物質或者全培養基，但並不連續地向外放出發酵液的發酵技術。饋料批式發酵是先在營養物質濃度比較低的情況下進行發酵，隨後不斷補加新鮮營養物質，使得菌體正常生長並不斷積累代謝產物，從而可以避免分批發酵中一次性投料過多而引起的底物抑制效應，目前應用範圍非常廣泛，幾乎遍及整個發酵行業。

3. 發酵過程中一邊補入新鮮料液一邊放出等量的發酵液，使發酵罐內的體積維持恆定。達到穩態後，整個過程中菌的濃度，產物濃度，限制性基質濃度都是恆定的。

在連續培養中控制稀釋速率可以使發酵過程最優化。發酵周期長，可以得到高的產量。然而假如菌種不穩定的話，長期連續培養會引起菌種退化，降低產量。長時間補料染菌機會也大增。所以這樣發酵方式在實際生產中並不常用。

連續發酵比分批法的生產性要高，在運作操作上要容易標準化，以及容易自動化等方面較優良，但較容易受雜菌污染為其缺點。

三、請分別說明基因晶片(Gene-Chip; 或稱為 DNA Microarray)及蛋白質晶片(Protein-Chip)的原理及應用。(20分)

【擬答】

(一)基因晶片(Gene-Chip)

基因晶片又稱為 DNA 晶片或者 DNA 微陣巨排列，DNA 是負責生物體內遺傳訊息的傳遞，由四種核苷酸 A、T、C、G 所組成的。其原理乃將單股 DNA 探針利用機械手背，固定在表面經化學處理的尼龍膜或玻璃等固態載體上，也可以用光刻合成技術，將核苷酸逐一加入到晶片上。利用 DNA 雙股螺旋結構專一互補結合的特性(A 與 T、G 與 C 配對)，能與溶液中的單股 DNA 標的(Target)，如 cDNA 進行雜合反應(Hybridization)，繼而偵測結合於晶片上之雙股核酸所呈現的訊號，可測得檢體內與晶片上基因探針有反應之生物標記的含量。DNA 晶片也可使用特殊生物墨水噴射技術，將所需之 DNA 直接“印”在晶片上，長度約為 25~60mers。其優點為設計彈性大、且製造速度快，但缺點是過於昂貴。

基因晶片應用：

1. 晶片上可植入多重基因標記探針，因此可於單次同時檢測數種、數十種甚至數百種之基因標記，且經特殊軟體分析後，可提供所有標記之整體實驗結果評估，大大提高臨床應用之準確性。基於上述許多特點與優勢，基因晶片深具廣泛運用之潛力，在研究應用上，包含了生物醫學、新藥開發、預測基因功能等，例如：當細胞接受新研發的藥物作用之後，利用基因晶片，針對細胞對藥物的敏感性進行基因表現分析；在臨床檢驗應用方面，包含了疾病檢測、血液篩檢、病原物種檢測、預測診斷疾病等等，例如：檢測循環血液中癌細胞 CEA、CK19、CK20 等基因標記的表現量，可作為大腸直腸癌患者早期診斷癌

細胞微轉移的有效工具；

2. 在非醫學應用領域方面，包含了食品檢測、環境檢驗、刑事鑑定等。由此可知，基因晶片的發展與應用，確實給生物研究、醫療診斷、新藥物開發等帶來革命性的改變。

## (二)蛋白質晶片(Protein-Chip)

將蛋白質或抗原等一些非核酸物質按微陣列方式固定在微型載體上獲得。晶片上的探針構成為蛋白質或晶片作用對象為蛋白質者統稱為蛋白質晶片。進行抗原-抗體免疫反應，用以檢測蛋白質的技術。

蛋白質晶片的原理與免疫轉印相同：(1)應用蛋白質與分子間的專一性結合。

- (2)通常把蛋白質固定在玻片或尼龍薄膜。
- (3)以微小化增加測試數目達到高產能。
- (4)靈敏而方便的檢測系統是關鍵。
- (5)可以應用在微生物菌種的血清型分析。
- (6)細胞內直觀地檢測蛋白質及其相互作用。
- (7)應用在蛋白質體學的研究。
- (8)生物醫藥品的開發。

## 四、何謂 DNA 疫苗？請說明 DNA 疫苗的優缺點。(20 分)

### 【擬答】

DNA 疫苗又稱核酸疫苗或基因疫苗，是指將編碼某種蛋白質抗原的重組真核表達載體直接注射到動物體內，使外源基因在活體內表達，產生的抗原激活機體的免疫系統，進而誘導特異性的體液免疫和細胞免疫反應。

DNA 疫苗是利用致病原的核酸來製造疫苗，且不需要任何化學載體，因而稱為裸疫苗 (naked DNA vaccine)。其核酸來源可能是 DNA 病毒的 DNA，或是由 RNA 病毒的 RNA 進行反轉錄而成的 cDNA，透過細菌的質體 DNA 進行攜帶，再混合生理食鹽水後製成疫苗。

DNA 疫苗具有許多優點：

1. DNA 接種載體 (如質粒) 的結構簡單，抽取純化質粒 DNA 的方法簡便，因而生產成本較低，且適於大批量生產；
2. DNA 分子選殖比較容易，使得 DNA 疫苗能根據需要隨時進行更新；
3. DNA 分子很穩定，可製成 DNA 疫苗凍乾苗，使用時在鹽溶液中可恢復原有活性，因而便於運輸和保存；
4. 比傳統疫苗安全，雖然 DNA 疫苗具有與弱毒疫苗相當的免疫原性，能激活細胞毒性 T 淋巴細胞而誘導細胞免疫，但由於 DNA 序列編碼的僅是單一的一段病毒基因，基本沒有毒性逆轉的可能，因此不存在減毒疫苗毒力回升的危險，而且由於機體免疫系統中 DNA 疫苗的抗原相關表位(epitope)比較穩定，因此 DNA 疫苗也不像弱毒疫苗或亞單位疫苗那樣，會出現表位丟失；
5. 質粒本身可作為佐劑，因此使用 DNA 疫苗不用加佐劑，既降低成本又方便使用；
6. 將多種質粒 DNA 簡單混合，就可將生化特性類似的抗原 (如來源於相同病原菌的不同菌株) 或 1 種病原體的多種不同抗原結合在一起，組成多價疫苗，從而使 1 種 DNA 疫苗能夠誘導產生針對多個抗原表位的免疫保護作用，使 DNA 疫苗生產的靈活性大大增加。

DNA 疫苗缺點：

1. 注射進入細胞的質體 DNA 可能會整合到宿主細胞的染色體上而造成基因產生突變，甚至會有活化致癌基因的疑慮。
2. 有人懷疑質體 DNA 可能會誘發自體免疫反應，儘管許多實驗顯示質體 DNA 誘發自體免疫反應的可能性是較低的。
3. 若是新生動物的免疫系統尚未成熟，注射 DNA 疫苗後，是否可能將外源抗原認為是自

## 公職王歷屆試題 (108 地方特考)

體的成分而形成耐受性，也是另一個具有爭議的地方。

4. 對於免疫不全的人，例如愛滋病患者，DNA 疫苗可能會有危險而不適用

5. 有些病原體包含各種不同的血清型，則可能會引起各種不同的疾病，因此所研發的疫苗不一定完全適用於所有民眾。

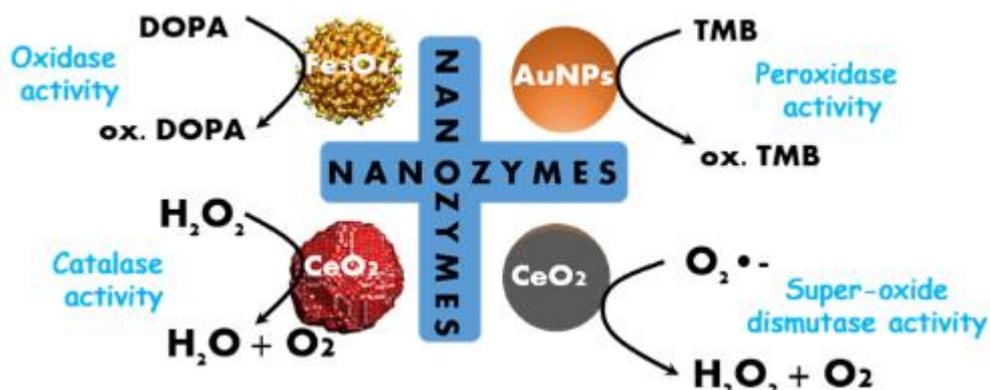
五、請說明何謂奈米酵素(Nanozyme)及其在生物醫學上的應用。(20 分)

【擬答】

奈米酵素(Nanozyme)是奈米尺寸(1-100 nm)而表現出酵素活性的物質，它們將奈米材質連結到生物系統。許多奈米酵素模仿天然酵素諸如催化酶(catalase)與過氧化酶(oxidase)。

奈米酵素除了具有催化特定反應，它還擁有獨特特性如具有大表面積可以進一步的修飾辨識分子等。

超過 99.9% 酵素(或稱酶)是由蛋白質構成的生物催化劑，只要在不使酵素失活的環境條件下，酵素不論在生物體內或外，皆能將特定受質催化成產物，完成化學反應。自然界酵素具有快速且有專一性的用來催化物質的反應，但其容易被環境中的因子例如 pH 值、溫度、高離子強度(ionic strength)影響而失去活性。因此，利用奈米材質如  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ 、Au-NPs、Ag-NPs、 $\text{CeO}_2$  等，進行仿生物活性酵素 oxidase, peroxidase, catalase, superoxide dismutase 催化作用。將不同的金屬離子(銀離子  $\text{Ag}^+$ ；鉍離子  $\text{Bi}^{3+}$ ；鉛離子  $\text{Pb}^{2+}$ ；鉑離子  $\text{Pt}^{4+}$ ；汞離子  $\text{Hg}^{2+}$ ) 沉積於 Au NPs，使其具有不同的酵素活性，如過氧化酶(oxidase)、氧化酶(oxidase)和過氧化氫酶(catalase)等。



DOPA 多巴；TMB 在生物醫學上的應用：

1. 奈米材料，如金奈米粒子，因其與特定重金屬離子結合後具仿生物酵素活性，而得以偵測  $\text{H}_2\text{O}_2$ 。因為金有良好的生物相容性，而且奈米化的金表面具有特殊效應，容易與硫基結合，所以奈米金常用於生物醫學上的檢測、疾病診斷及基因偵測。

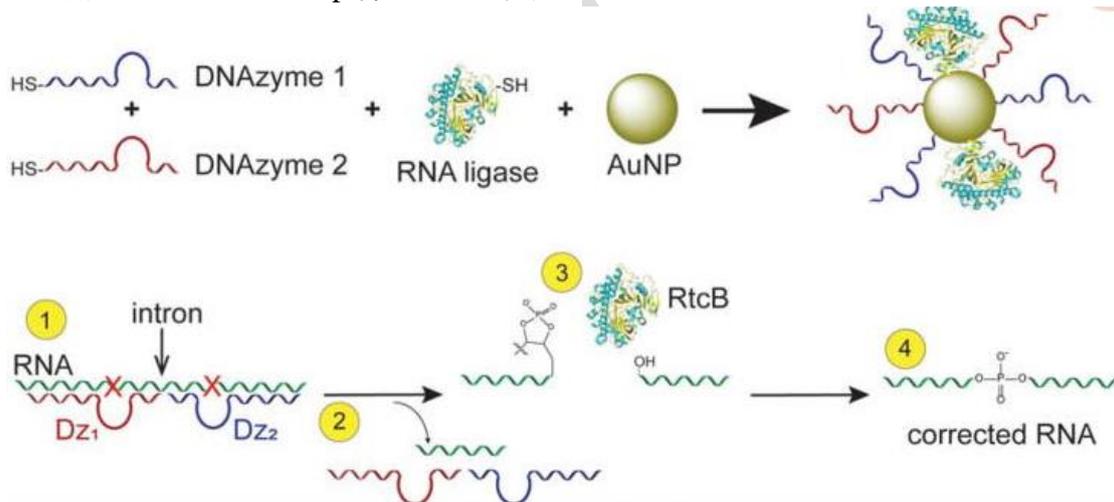
(1) 奈米金可與 DNA 輕易結合，若先在奈米金表面接上單股的 DNA 做成試劑，當待測樣品中含有另一互補的 DNA 鏈段時，因為鹼基的配對，會使得含有 DNA 鏈段的奈米金聚集在一起，形成較大的團聚物，這時奈米金的顏色會由原本的紅寶石色變成藍色。利用這個現象，便可用奈米金製作能檢測許多遺傳疾病的 DNA 晶片。只要取一滴血滴在晶片上，送入電腦做分析，不一會兒便可知道基因可能帶有哪些潛在的遺傳疾病，有助於遺傳疾病的預防與治療。

(2) 利用 Au NPs 和  $\text{Pb}^{2+}$  或  $\text{Hg}^{2+}$  在不同 pH 值所誘導出的過氧化物酶(oxidase)活性程度上的不同，以催化過氧化氫( $\text{H}_2\text{O}_2$ )和 Amplex<sup>®</sup> UltraRed (AUR) 反應，生成具有螢光之 AUR product，當 peroxidase 活性越高則螢光強度越高，故可分用以偵測  $\text{Pb}^{2+}$  或  $\text{Hg}^{2+}$  濃度。

(3) 利用寡核苷酸(Oligonucleotide)修飾 Au NPs (T30695-Au NPs)後，藉由  $\text{Pb}^{2+}$  形成金鉛合

金和 Oligonucleotide-Pb<sup>2+</sup>的複合物使 peroxidase 活性增高，使偵測 Pb<sup>2+</sup>的 LOD 達 50 pM，亦可利用於偵測血液中 Pb<sup>2+</sup>。

- (4) 利用鉍離子(Bi<sup>3+</sup>)和 Au NPs 進行親金作用(aurophilic interaction)後，產生很強的 peroxidase 活性(催化 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 和沒有螢光的 Amplex<sup>®</sup>Red (AR)反應，生成具有螢光的試鹵靈(resorufin))，可用於偵測 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 含量。
- (5) 血液凝固因子 Fibrinogen 受 thrombin 催化會形成網狀結構的 fibrin，因此將 Fib 修飾在 Bi-Au NPs 表面(Fib-Bi-Au NPs)，thrombin 會誘導 Au NPs 表面形成 fibrin，導致 Bi-Au NPs 的 peroxidase 活性降低，故可用於偵測 thrombin 並可應用於抗凝血藥的篩選。
- (6) 一種 Au NPs 的奈米酵素，具有二種核酸水解酶功能的 DNA 鏈以及一 RNA 接合酶，能催化 RNA stem-loop 剪切的核酵素。



2. 銀離子具有抑菌功能，而被廣泛應用於抗菌材料之中，利用不同金屬離子沉積於銀奈米粒子表面，使誘導出不同的仿生物酵素活性，得到更廣泛的應用。

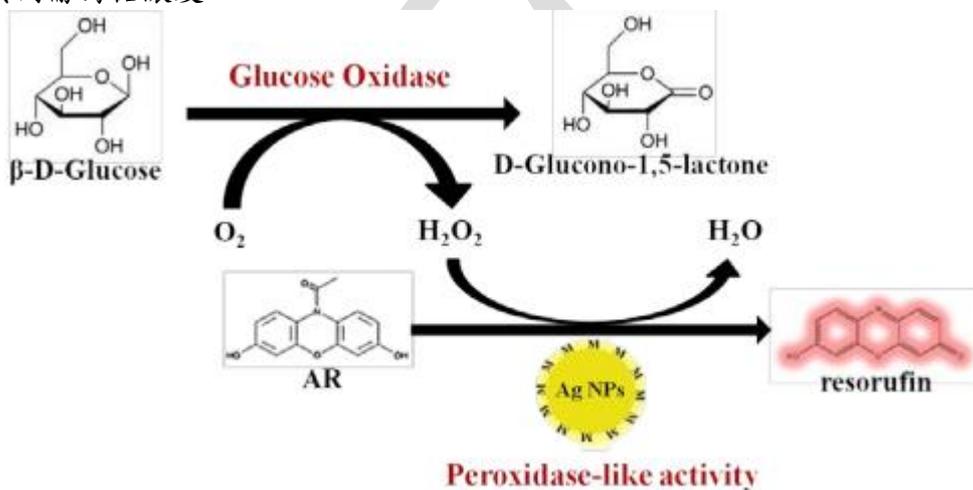
奈米銀的抗菌應用已經充斥在我們的周遭，舉凡日常生活用品、紡織衣物、化妝品的抗菌，到冷氣機、洗衣機等家電的抗菌功能，都可見到奈米銀的身影。

在醫療上也開發出多種奈米銀的應用，例如在床單被套、止血紗布或導管中添加奈米銀，可防止細菌的滋生及疾病的傳染，也可降低病人在手術時被病菌感染的機率。另外，把奈米銀混入人工皮膚敷料中，使用在需要長期利用敷料保護傷口的燒燙傷病患身上，可有效地避免細菌感染的問題。

透過不同金屬離子的修飾，分別調控而誘導出具備過氧化酶 (peroxidase-like activity) 及氧化酶活性 (oxidase-like activity) 之銀奈米粒子。其中具過氧化酶活性之銀奈米粒子能催化 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 與試劑 Amplex Red (AR)，形成具有螢光的物質試鹵靈 (resorufin) 藉由此特性，搭配經葡萄糖氧化酶作為模型酶催化反應出的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>，可偵測葡萄糖濃度，而將得以應用於血糖偵測上；AR 和 O<sub>2</sub> 經由具氧化酶活性的銀奈米粒子的催化形成 resorufin，其在反應過程中產生氫氧自由基 (·OH)、超氧化物 (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) 等物質，將能增加細胞的氧化壓力，得以擴展至抑菌等方面的應用。銀奈米粒子展現氧化酶/過氧化酶活性：



首先利用葡萄糖氧化酶催化葡萄糖形成 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>，再利用過氧化酶活性最強的銀奈米粒子催化 AR 以及由葡萄糖產生的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 形成 resorufin，利用盤式螢光儀測定其螢光值，即可偵測葡萄糖濃度。



王