



臨床診斷的新利器

DNA探針

指導老師：王正怡

執筆：黃緯元

插畫：林政宏

近年來由於DNA重組技術(Recombinant DNA Techniques)的蓬勃發展，已由過去的基礎研究，逐漸應用到臨床醫學的領域中。利用此項技術，可以大量繁殖出一小段基因序列做為探針(Probe)來幫助我們診斷一些遺傳性疾病以及傳染病，及對致癌基因(Oncogene)或者病毒在惡性腫瘤(Neoplastic Disease)的病原性(Pathogenesis)上所扮演的角色，有更深一層的認識。

理。將某段欲偵測的雙股DNA從細胞中分離出來，經由特殊處理使變性(Denature)成為單股DNA，再使之與其氮鹼序列(Base Sequences)互補(Complementary)的DNA探針結合，且此探針在製備過程中已經由放射性同位素標記過。如果此段欲探測的DNA確實存在，便會使X光片感光出現一條明顯的黑帶(Band)。

一、原理——配對接合(Hybridization)

簡單地說，就是利用DNA可與互補DNA或RNA配對接合(DNA Hybridization)的原

二、DNA探針的製備

1. 基因無性繁殖法(Gene Cloning)

先將一段 DNA Probe 它所轉錄 (Transcription) 出來的 mRNA 從細胞中分離出來，將此段 mRNA 經過反向轉錄酶 (Reverse Transcriptase) 處理後，得到一條單股的 cDNA (The DNA Copy of RNA Molecules)，而後再經過 DNA 聚合酶 (DNA Polymerase) 的作用使成雙股 cDNA，此雙股 cDNA 與一載體 (Vector 可為 Plasmid 或是 Bacteriophage) 同時經過相同的限制酶 (Restriction Endonuclease) 處理後，二者彼此接合植入細菌體中繁殖 (圖一)。如此一來可大量繁殖出我們想要的 DNA 探針。至於如何從細胞中分離出 mRNA 以及製備過程中的細節不在本文討論範圍內，在此不擬詳述。

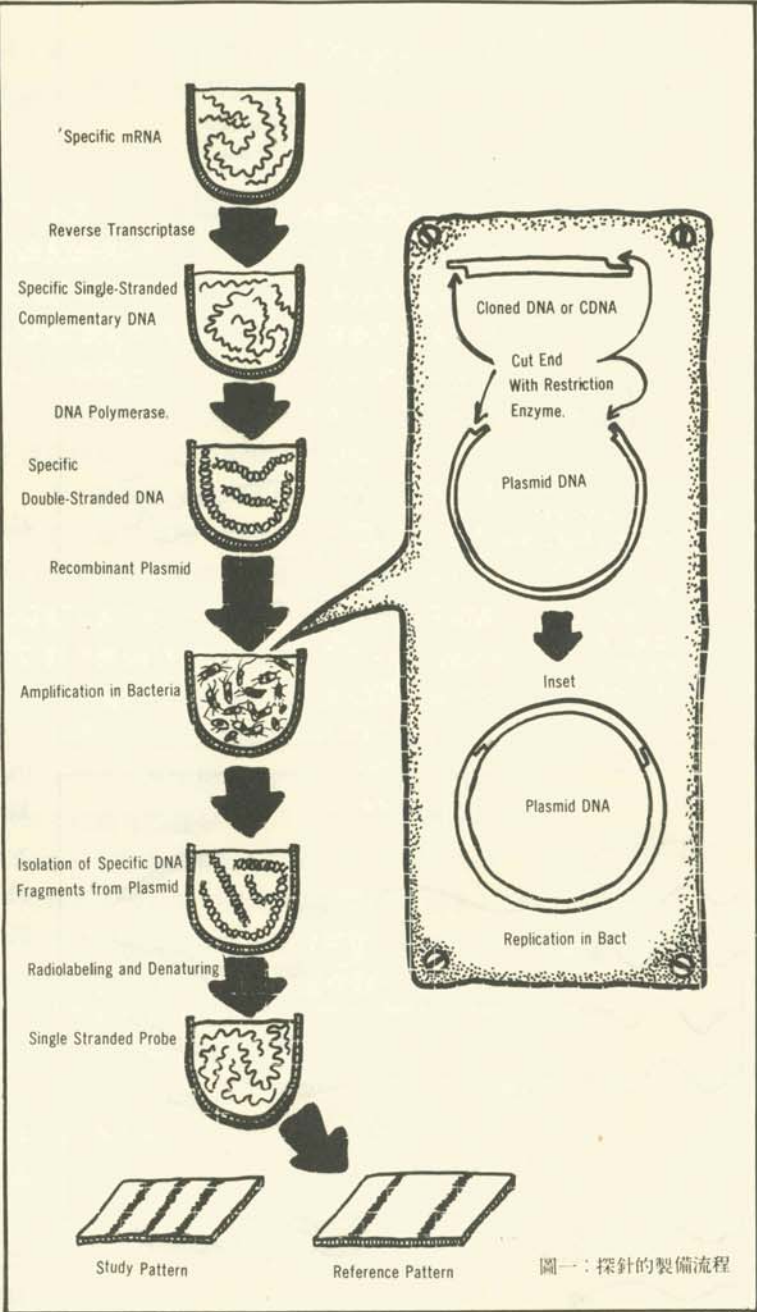
2. 寡核苷酸的合成 (Synthesis of Oligonucleotides)

我們依據一條多性鏈 (Polypeptide) 的胺酸順序，利用三聯體密碼 (Triple Code) 的原理，反推出此多性鏈的基因密碼，再利用生化方法合成一段基因即寡核苷酸 (Oligonucleotides) 當做 DNA 探針。一般探針之長度要大於 18 個核苷酸才可以使用。

三、應用 DNA 探針的方法

1. Southern 氏轉移法 (Southern Transfer)

此法乃 E.M. Southern 在 1975 年所設計。如果我們欲偵測某一段基因是否存在於某一長條 DNA 裡，首先將此 DNA 經限制酶處理切成數段 (如圖二)，再經由膠電泳法 (Gel electrophoresis)，將各不同分子量的 DNA 片段分開。此時仍為雙股 DNA，再經由變性處理而成單股。由於時間一久，這些單股 DNA 又會自動復合成雙股，所以當變性成為單股 DNA 時，就要再經過一道轉移 (Transfer) 的手續，將其移轉至一種叫 Nitrocellulose Paper 的紙片上，在此種紙片上，單股 DNA 是不能移動的 (Immobilized)，也就是說無法再自動復合成雙股 DNA。然後再加入用以偵測此段基因且經同位素標記好的 DNA 探針，如果此段基因確實存在，便會與探針行配對接

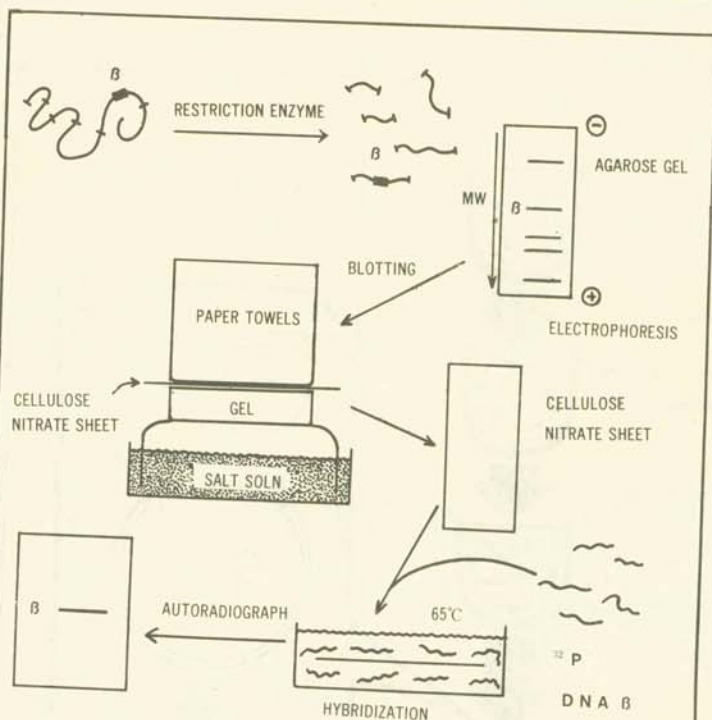


圖一：探針的製備流程

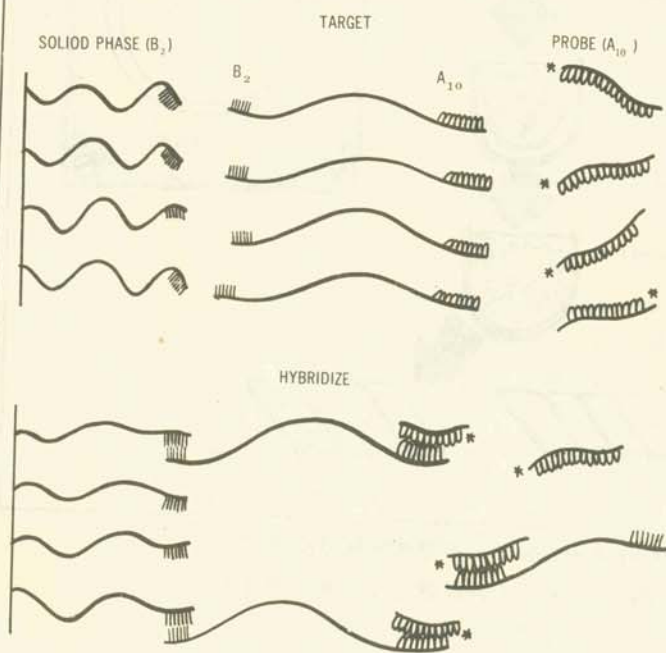
合 (Hybridization)，不會被清洗掉而留在 Nitrocellulose 上，再經過感光處理便會在 X 光片上出現一條明顯的黑帶 (如圖二)。

2. 點狀塗抹法 (Dot Blotting)

此法應用的原理與過程均同於前者，所不同在於 DNA 或 RNA 從細胞取出後，不需經過限制酶的處理切成數段，直接就將其點灑在 Nitrocellulose 上，再與探針行配對接合，如果此段基因確實存在，感光後便會有黑點出現。



圖二：Southern Transfer



圖三：Sandwich DNA Hybridization

此法另可用於定量分析，由黑點出現的大小，可判斷某一檢體 (Sample) 中，所含此段 DNA 的濃度。

3. 原位處配對接合法 (In Situ Hybridization)

原理與前兩者相同。其優點在於可以直接從病理組織切片或是細胞抹片 (Cell Smear) 上，找出某段基因存在的位置，例如可以確知此段基因到底位於那條染色體上或是找出一組織切片中病毒遺傳基因存在的位置。

4. 三明治DNA配對接合 (Sandwich DNA Hybridization)

此法是使用 DNA 探針的未來發展方向，此法結合了 DNA 配對接合與放射免疫檢定法 (RIA) 和酶免疫分析法 (EIA) 的原理，以期 DNA 探針在臨床診斷上成為例行而且簡便的工作。在放射免疫檢定法中，是先在固相 (Solid Phase) 上安裝抗體，再加上檢體內含有待測定的抗原，最後加入與原先固相上的抗體相同且經放射線同位素標定過的另一抗體，成為抗體—抗原—抗體，類似三明治的結構。同理，也是先在固相上安裝一小段的探針後，再加入檢體與另一段已標定好的探針，如果此檢體內所含欲測定的某段 DNA 則標定探針可附著於固相面上，而使之具放射性。

以檢定沙門氏菌 (Salmonella) 的 DNA 為例 (圖三)。我們從沙門氏菌中分離出一段特殊的 DNA，有 4900 個鹼對 (Base Pairs) 的長度。它可被限制酶切割成三段，分別是 B_2 (800 bp)， A_{10} (1600 bp)， A_9 (2500 bp)。取 A_{10} 與 B_2 分別植入 Plasmid 中，利用 DNA 重組技術製出更多的 B_2 與 A_{10} 來當做探針。使用時先將 B_2 安裝在固相上，若一檢體含有沙門氏菌的 DNA，就會藉其與 B_2 相互補的一小部份 DNA 而吸附在固相上，同時藉由 A_{10} 的部份，與經由放射線同位素標定的 A_{10} 探針配對接合，而被我們偵測出來。同理可推廣應用到 B 型肝炎或是 HTLVIII 病毒的 DNA 的檢定。

四、DNA 探針的標定

傳統上多以 ^{32}P 、 ^{35}S 、 ^{125}I 來標定探針。使用這些放射性同位素在操作過程中諸多不便，而且一

且探針標定好後，必須在短時間內立刻使用，因為這些同位素的半衰期短，容易衰變而無效，無法保存較長的時間。於是現今發展的趨向是非放射性標定法（Non-radioactive Labeling）（圖四）

五、臨床應用

前已述及，DNA 探針在臨床上主用於遺傳疾病與傳染病的診斷。對於惡性腫瘤，在目前雖然還沒臨床上實質的運用。不過，其勢之必行在未來是可預見的。底下分別討論之。

1. 遺傳疾病

DNA 探針適於做產前檢查（Prenatal Diagnosis），是實施優先保健法不可或缺的利器。一般因疾病的不同，在使用探針時也有方法上的差別。

(a)直接測定(Direct Detection)

如果一遺傳疾病，它的基因突變是屬於點突變（Point Mutation），而且在突變的位置剛好增加或是減少一個限制酶切的位置，那麼用 Southern transfer 方法即可測出。

以鐮刀狀溶血性貧血（Sickle Cell Anemia）為例說明（圖五）。鐮刀狀貧血是位於第11號染色體上的β球蛋白基因發生點突變，造成血紅素的β鏈的第六個位置由正常的 glutamine 轉換為 Valine。以分子基因層次來看，正常的β球蛋白基因當以限制酶 Mst II 處理時，在β基因第六個密碼上有一個切口，可是一旦突變成鐮刀狀貧血的β基因，切口也跟著佚失，所以正常的β基因經 Mst II 處理後被切成兩段，與 DNA 探針配對結合後是出現兩條黑帶，而鐮刀狀貧血則只有一條。請參看圖五。

另一種的基因突變是屬於基因脫失（Deletion）。以β海洋性貧血（β-thalassemia）為例。有一種情形是β球蛋白基因在3'一端有619個鹼對（Base Pair）脫失掉，以限制酶 Pst I 所切的DNA片段大小與正常的不同，所以 Southern transfer 方法所得之結果也不相

同（圖六）。以探針直接與所欲測定的基因配對結合，是謂直接測定法。

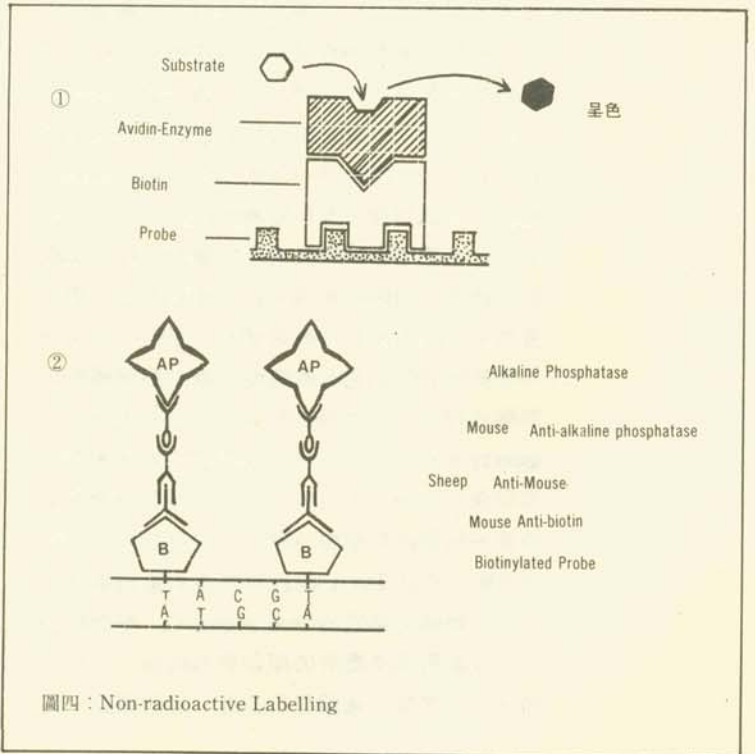
(b)間接測定(Indirect Detection)

可是，就點突變而言，恰好多出或少掉一個限制酶切口的情形，僅佔 5% 至 10%；而基因脫失的情形亦佔少數，大多數的狀況是內子發生點突變，這些突變並沒有改變限制酶的切口位置或數目；再者，還有更多的遺傳疾病，對於它們基因的改變所知甚少。那麼，對於上述這些情形，則須用間接測定法。

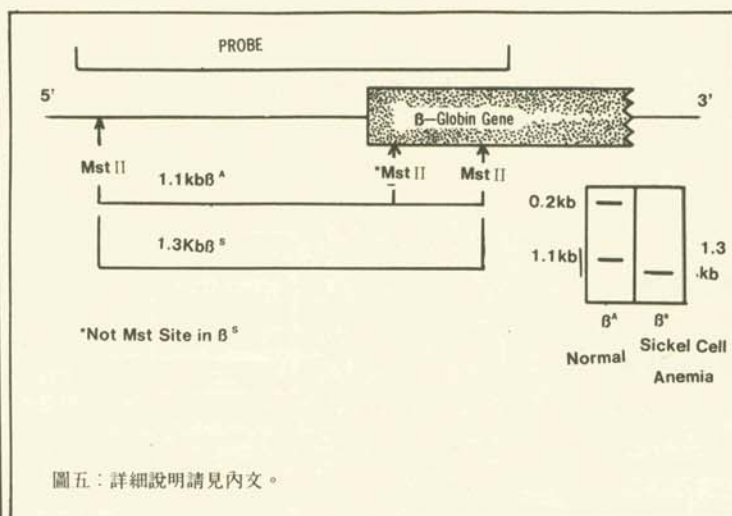
大多數基因所傳譯出來的產物，在正常情況下都一樣，每個人的β球蛋白基因所傳譯出的β鏈具有相同之胺基酸順序，可是事實上不同個體間其β基因之 base sequence 不盡相同，此稱之為DNA多樣性(DNA Polymorphism)。此乃由於無聲突變（Silent Mutation）之故，而無聲突變並不引起胺基酸的改變。很幸運地，這些無聲突變往往改變了限制酶的辨認切口，而讓我們獲知。以β基因簇（β Gene Cluster）為例（圖七）它是由γ、β、δ三種不同球蛋基因組成，共同位於11號染色體上。經研究發現，至目前為止總共可有 18 種不同限制酶的辨認切口，正如前述的 DNA 多樣性

①Biotin是一種生物素與抗生物素(Avidin)有很強的結合力。所以先將探針與Biotin接合(標定)，一旦遇到已帶有酵素的Avidin，立刻可與之結合，再加入酵素的受酶質(Substrate)立即分解而呈色。

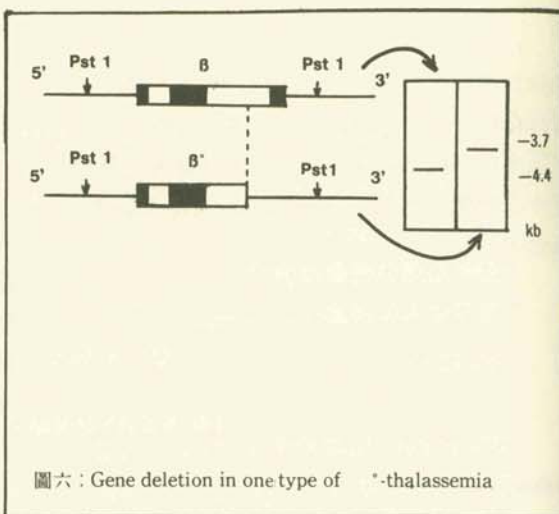
②此法類似EIA即經由Anti-Mouse Ab當橋樑連接Anti-biotin Ab與Ahti-alkaline Phosphatase Ab. 加入受酶質後，即可呈色，而讓我們測知。



圖四：Non-radioactive Labelling



圖五：詳細說明請見內文。

圖六：Gene deletion in one type of β -thalassemia

，並不是人人同時具備這 18 種的辨認切口，最多只保有其中的數種，而且每個切口的有或無均是遺傳自父母。但即使同一雙親，每一個體仍具有不同之限制酶切口分佈。

1978 年 Kan 與 Doay 發現，限制酶 Hpa I 切口的有無與鐮刀狀貧血的有無，有密切的關連性，且此限制酶的切口並不在 β 基因裡；也就是說，我們即使不知道基因在何處發生突變，也同樣可經由限制酶處理後，在電泳分析上所呈現的樣式 (Pattern) 而診斷出此疾病。

再以 β 海洋性貧血為例 (圖八)。現在，假如有一對夫妻，他們的表型 (Phenotype) 均正常，可是卻生出一個患有 β 海洋性貧血的小孩，基於此病是隱性遺傳，由孟德爾定律，很容易推出父母二人均屬於異基因合子 (Heterozygosity) 也就是說第 11 號成對的同源染色體，有一條正常，另一條則不正常。當以限制酶 Ava II 處理後，父與母均出現兩條黑帶，正常的一條的 DNA 因具有限制酶的切口被切成較小段落，而跑得較遠，以 “+” 表示；不正常的另一條 DNA，不具切口，以 “—” 表示。至於他們那個患有此病的小孩，經同樣的限制酶處理，因為是屬於同基因合子 (Homozygosity)，很明顯地只會在 “—” 處，出現一條很深的黑帶。有了這些資料，假如母親再度懷孕，只要比對前面的樣式，很快就可獲知正確診斷。在此 DNA 探針可能是與基因本身也可能是與基因鄰近的 base sequence 配對接合，所以能供選擇應用的探針更加的多。以前例而言，可選擇 β 基因探針或是 r 基因探針，甚

至是一段不知其功能的探針 (Anonymous probe)，只要此段探針能與 β 基因族任一段落行配對接合即可。當然，選擇熟悉且知其功能的探針，準確率要比較高。

還有兩點要注意：第一，不能只拿一個人的染色體來分析，必須整個家庭的配合才行。因為正如前面所述的 DNA 多樣性，有或沒有某一限制酶切口，絕不能代表此疾病的有或無。所以它是間接的測定，而非直接。第二，利用此種限制酶切口的有或無，只是恰巧符合疾病的有或無，至於為什麼會有這種現象則不得而知。以 Johns Hopkins Hospital 的實驗為例，準確率曾高達 99.4%。

利用 DNA 探針除了診斷前述的鐮刀狀貧血與 β 海洋性貧血外，還可應用於苯酮尿症 (Phenylketonuria)， α 海洋性貧血，癩血因子 VIII IX IV 等疾病。

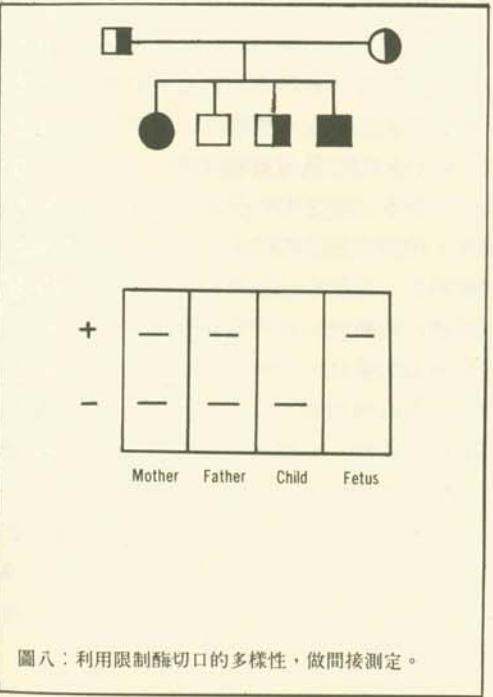
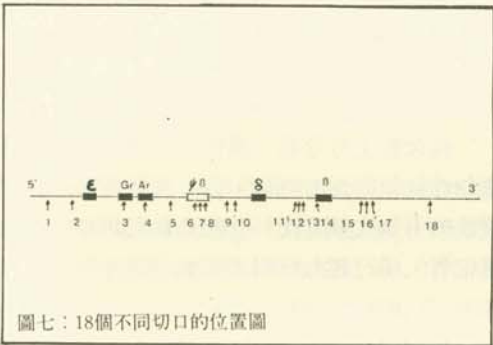
2. 傳染疾病

只要我們能夠取出病毒一部分的基因，製成 DNA 探針，便可對此病毒加以診斷。目前有用於檢查 B 型肝炎、巨細胞病毒 (Cytomegalovirus)、HTLV-III 病毒，以及國人常罹患的鼻咽癌有很大關係的 Epstein-Barr 病毒等。DNA 探針與傳統血清學檢驗法比較，有如下的優點：

(a) 病毒為了逃避被宿主抗體消滅的命運，常常改變它們表面抗原蛋白的構造，流行性感

查就會常常發生困難，但是病毒的 DNA 絕大部份是永遠不會變的，所以若用流行性感冒的 DNA 做為探針來檢查就不會有這類的困擾。

(b)抗體與抗原的存在常常與實際感染的關係不是絕對的，也就是說，有時病毒早已在病人體內消失，可是抗體或抗原仍呈陽性反應。另一方面，由於 DNA 檢查的靈敏度遠超過抗體的檢查，所以偶而也會有病人在得到病毒的感染後，DNA 探針已可以檢查確定病毒的存在，可是抗原及抗體仍呈陰性反應的情形發生，這類病人是有十足的能力將病毒傳染給他人；如果只用傳統檢驗抗體或抗原的方法，得到錯誤的判斷，將是最令人擔心的。



3. 惡性腫瘤

臨床上，目前 DNA 探針尚未應用到惡性腫瘤的診斷。不過對於瞭解癌症的發生與病原性有很大的貢獻。對於致癌基因 (Oncogenes) 的瞭解，便是最好的例子。至於致癌基因，有興趣者可翻閱綠杏 37 期或是參考 "Scientific American Medicine"，1985，9 月的一份有關致癌基因致病機轉的報告。

六、展望

DNA 探針對產前檢查的診斷極為有用，在國外其臨床價值已被肯定。國內才剛起步，尚在研究階段，仍有待學者專家共同參考努力。至於以 DNA 探針來診斷疾病的感染，目前僅長庚醫院在做，對披衣菌 (Chl amydiae) 及 B 型肝炎的檢驗有相當滿意的結果。雖然目前應用仍不夠普遍，個將來必可逐步克服。今後這幾年隨著 DNA 重組技術的突飛猛進，在臨床診斷上將與傳統的方式相輔相成，它的潛能是絕不容忽視的。

※ References

1. CLIN. CHEM 31/6 804-811 (1985).
2. CLIN. CHEM 31/9 1509-1513 (1985).
3. CLIN. CHEM 31/9 1438-1443 (1985).
4. The American Journal of the Medical Sciences, 289, Number 3, March 1985.
5. The New England Journal of Medicine Vol 308. May. 1983.
6. Proc. Natl. Acad. Sci USA Vol 77. 6851 ~ 6855. 1980.
7. 長庚醫訊 第六卷 第八期 包家駒教授
8. 綠杏 40 期秋季號 P. 58 ~ 72
9. 711 病毒筆記 P. 144 ~ 154.