

國立台灣大學獸醫專業學院獸醫學研究所



碩士論文

Graduate Institute of Veterinary Medicine

School of Veterinary Medicine

National Taiwan University

Master Thesis

探討基因突變、蛋白質表現及腫瘤分級在犬黑色素瘤之
相關性

The Correlation among Gene Mutations, Protein
Expression and Tumor Stage in Canine Melanoma

鄭筱瓏

Hsiao-Lung Cheng

指導教授：廖泰慶博士

Advisor: Albert Taiching Liao, D.V.M., Ph.D.

中華民國 105 年 5 月

May 2016



國立臺灣大學碩士學位論文

口試委員會審定書

探討基因突變、蛋白質表現及腫瘤分級在犬黑色素瘤之相關性

The Correlation among Gene Mutations, Protein Expression and Tumor Stage in Canine Melanoma

本論文係 鄭筱璇 君 (學號 R02629014) 在國立臺灣大學獸醫學系、所完成之碩士學位論文，於民國 104 年 09 月 21 日承下列考試委員審查通過及口試及格，特此證明

口試委員：

廖嘉慶

(指導教授)

詹昆衛

劉振軒

林長雄

系主任、所長

周芳洲

(簽名)

誌謝


從碩一對未來茫懂到碩三確立人生方向，這3年幫助很大，在310-1有許多的回憶，我會銘記在心，感謝許多人的幫助，這篇論文才可以順利完成，首先我要感謝我的指導教授廖泰慶老師，在為人處世與實驗上均給予我許多意見，讓我受益匪淺；感謝林辰栖老師針對實驗數據給予我許多意見；感謝欣蓓學姊、添富學長及均豫學長，教導我做實驗；感謝助理美仙學姊幫助我解決實驗的疑惑；感謝助理邦弘學長教我做實驗及做人，讓我成長許多；感謝許多實驗室的其他夥伴，因為你們我的研究生生活充滿許多歡笑：大學綽號叫巨馬的瑞絃學長、頭髮多變的律秉學長、總是帶來歡笑的吱吱學姊、喜歡微笑的俊廷學長、像哥哥又像朋友的凱中、從大學到研所都在一起的蒼宇、家裡火鍋超好吃的唐唐、生活豐富的小夜、可愛的臻臻、超愛 Kitty 的薇安、默默做事的庭芳，最後要特別感謝閨蜜 Steven 及我的家人給予我許多支持，還有許多人慷慨地給予幫助，雖無法一一列明，在此由衷的感謝，沒有你們我無法順利完成這篇論文。

鄭筱瓏 謹誌於

國立台灣大學獸醫學系

中華民國 105 年 5 月

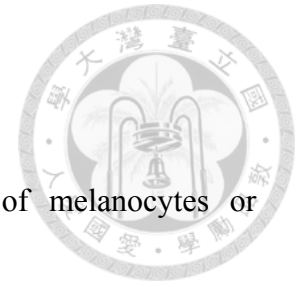
中文摘要



黑色素瘤是由黑色素細胞或黑色素母細胞異常增生所造成的。KIT 是一種受體型酪氨酸激酶 (Receptor tyrosine kinase)，對黑色素細胞之增殖、遷徙及存活扮演很重要的角色。NRAS 是一群小的三磷酸鳥苷酶 (GTPase)，與許多細胞的增殖、遷徙及存活有關。我們先前的研究分別在犬黑色素瘤細胞和組織發現 KIT L578P (T1733C) 和 NRAS Q61K (C181A) 突變，這兩個基因突變都是人黑色素瘤的病因，因此我們想探討這兩個突變與犬黑色素瘤的關係。首先我們從台大動物醫院病理資料庫收集了源自於 130 個動物的 139 個犬黑色素瘤組織蠟塊，其中的 91 個組織以組織免疫化學染色法評估蛋白質的表現，結果 KIT 蛋白質表現評估為強、中、弱及陰性的，分別有 45% (41/91)、22% (20/91)、32% (29/91) 及 1% (1/91)，而 NRAS 蛋白質表現評估為強、中、弱及陰性的，分別有 76% (69/91)、9% (8/91)、15% (14/91) 及 0% (0/91)。另外有 73 個檢體的 DNA，我們以聚合酶連鎖反應搭配限制酶片段長度多形性 (Polymerase chain reaction-restricted fragment length polymorphism, PCR-RFLP) 方法進行基因型篩檢，結果顯示分別有 16% (12/73) 及 75% (55/73) 的腫瘤帶有 KIT L578P (T1733C) 及 NRAS Q61K (C181A) 突變，我們也首次在犬黑色素瘤組織發現 NRAS Q61E (C181G) 突變；但另一項技術-高解析度熱溶解曲線分析 (High-resolution melting curve analysis, HRM) 無法成功被應用於本研究之基因型篩檢。最後我們將上述的結果分別與腫瘤類型、位置及分級進行交叉分析，結果發現發生在嘴唇的犬黑色素瘤，其 NRAS 的表現會增加 ($p < 0.05$)；另外，有 KIT L578P 突變的非口腔型黑色素瘤，其 KIT 蛋白質表現會增加 ($p < 0.05$)；其它的交叉分析就沒有關聯性。

關鍵字：犬黑色素瘤；KIT；NRAS；基因突變；免疫組織化學染色；PCR-RFLP

英文摘要



Melanoma is a tumor caused by abnormal proliferation of melanocytes or melanoblasts. KIT is a receptor tyrosine kinase and plays an important role in the proliferation, migration and survival of melanocytes. NRAS is a small GTPase and has an association with the proliferation, migration and survival of various cells. In previous studies, we found KIT L578P (T1733C) and NRAS Q61K (C181A) mutations in canine melanoma tissues and cells. Those mutations are causes of human melanoma. In this study, we investigated the association among them and canine melanoma. First, 139 formalin-fixed paraffin-embedded tissues (FFPE) from 130 patients were collected from the archives of the School of Veterinary Medicine, National Taiwan University. Protein expression in 91 tissues was evaluated by immunohistochemistry (IHC). Strong, moderate, weak and negative KIT expression was respectively found in 45% (41/91), 22% (20/91), 32% (29/91) and 1% (1/91) tissues. NRAS expression was evaluated strong (76%, 69/91), moderate (9%, 8/91), weak (15%, 14/91) and negative (0%, 0/91). Second, KIT and NRAS genotype were detected in 73 samples by polymerase chain reaction-restricted fragment length polymorphism (PCR-RFLP) and high-resolution melting curve analysis (HRM). By using PCR-RFLP, KIT L578P and NRAS Q61K

mutations were identified in 16% (12/73) and 75% (55/73) examined tissues. Another novel point mutation, NRAS Q61E (C181G) was also found in canine melanoma.

However, we couldn't success to detect genotype by HRM. Finally, we analysed the association among those results, tumor type, tumor site and tumor stage. The results indicated that KIT L578P mutation was association with KIT overexpression ($p<0.05$) and NRAS overexpression was found in lip melanoma ($p<0.05$). There was no other significant difference between other factors.

Keywords: canine melanoma; KIT; NRAS; gene mutation; IHC; PCR-RFLP



目錄

口試委員審定書	I
誌謝	II
中文摘要	III
英文摘要	IV
目錄	VI
圖目錄	IX
表目錄	X
第一章 文獻探討 (Background and literature review).....	1
1.1 犬黑色素瘤	1
1.1.1 犬黑色素瘤的治療	3
1.1.2 犬黑色素瘤的病因	3
1.2 KIT	3
1.2.1 KIT 蛋白質基本構造以及功能.....	3
1.2.2 KIT 的突變.....	5
1.2.3 探討 KIT 作為人類腫瘤治療的標靶.....	6
1.3 NRAS	7
1.3.1 NRAS 蛋白質基本構造以及功能	7
1.3.2 NRAS 的突變	8
1.3.3 探討 NRAS 作為人黑色素瘤治療的標靶	9
1.4 高解析度熱溶解曲線分析	9
1.4.1 增幅圖形	10
1.4.2 熱溶解曲線	11



1.4.3 標準化數據	11
1.4.4 差異圖形	11
1.4.5 影響的因子	11
第二章 前言 (Introduction).....	14
第三章 材料與方法 (Material and method)	15
3.1 犬黑色素瘤病歷之收集	15
3.2 免疫組織化學染色	15
3.3 基因型篩檢	17
3.3.1 染色體去氧核糖核酸萃取	17
3.3.2 限制片段長度多形性聚合酶連鎖反應	18
3.3.3 質體之建立	19
3.3.4 高解析度熱溶解曲線分析法	22
3.4 統計分析	22
第四章 結果 (Result)	24
4.1 犬黑色素病歷之收集	24
4.2 蛋白質表現	24
4.3 基因型篩檢	25
4.4 建構 HRM 進行基因型篩檢	25
4.5 統計分析	26
第五章 討論 (Discussion).....	27
5.1 犬黑色素病歷之收集	27
5.2 去黑色素條件之調整及蛋白質表現評估	27
5.3 基因型篩檢	28

5.4 統計分析	29
第六章 結論 (Conclusion)	31
參考文獻 (Reference)	32





圖目錄

圖 1-1. 各分型黑色素瘤發生的比例.....	39
圖 1-2 黑色素之生成.....	40
圖 1-3. 差異圖形.....	41
圖 2-1. 實驗設計及流程.....	42
圖 3-1. pGM-T vector 基因序列圖.....	43
圖 4-1. 蛋白質表現量評分標準.....	44
圖 4-2. 蛋白質表現強度.....	45
圖 4-3. 限制片段長度多形性聚合酶連鎖反應.....	46
圖 4-4. 檢體定序結果.....	47
圖 4-5. 菌落 PCR 結果.....	48
圖 4-6. 質體定序結果.....	49
圖 4-7. 高解析度熱溶解曲線分析結果.....	50
圖 5-1. 組織切片脫黑色素.....	51



表目錄

表 1-1. 世界衛生組織訂定的犬口腔型黑色素瘤分級系統.....	52
表 1-2. 高解析度熱溶解曲線分析建議使用之 DNA 量.....	53
表 3-1. 使用的引子對以及實驗條件.....	54
表 3-2. 本研究參考之基因序列.....	55
表 4-1. 動物病歷資料、免疫組織化學評分及基因型篩檢之結果.....	56
表 4-2. 動物性別.....	58
表 4-3. 動物品種.....	59
表 4-4. 腫瘤類型.....	60
表 4-5. 腫瘤位置.....	61
表 4-6. 腫瘤分級.....	62
表 4-7. 蛋白質表現.....	63
表 4-8. 蛋白質表現與腫瘤位置統計結果.....	64
表 4-9. 蛋白質表現與腫瘤類型統計結果.....	65
表 4-10. 蛋白質表現與腫瘤分級統計結果.....	66
表 4-11. 蛋白質表現與 KIT 基因型統計結果.....	67
表 4-12. 蛋白質表現與 NRAS 基因型統計結果.....	68
表 4-13. 基因型與腫瘤位置統計結果.....	69
表 4-14. 基因型與腫瘤分級統計結果.....	70
表 4-15. 在非口腔腫瘤的蛋白質表現與 KIT 基因型統計結果.....	71
表 4-16. 非口腔腫瘤的蛋白質表現與腫瘤位置統計結果.....	72
表 5-1. 蛋白質表現與腫瘤位置統計結果.....	73
表 5-2. 蛋白質表現與腫瘤分級統計結果.....	74



第一章 文獻探討 (Background and literature review)

1.1 犬黑色素瘤

黑色素母細胞 (Melanoblast) 源自神經外胚層 (Neuroectodermis)，逐漸移行到表皮層 (Epidermis)，而在表皮層生成黑色素 (Melanin) 的成熟黑色素母細胞就是黑色素細胞 (Melanocyte)。

黑色素瘤是由於黑色素母細胞和黑色素細胞的異常生長與分裂造成，依照腫瘤的惡性程度，可以分為良性的黑色素細胞瘤 (Melanocytoma, MC)，以及惡性的惡性黑色素瘤 (Malignant melanoma, MM) 和無黑色素性黑色素瘤 (Amelanotic melanoma, AM)，常見腫瘤轉移到肝臟、肺臟以及淋巴結 (Dressler, 2009)。世界衛生組織 (World Health Organization, WHO) 依照腫瘤的直徑大小、是否轉移到淋巴結或是其他的臟器，將犬口腔型黑色素瘤分為 I 到 IV 級 (表 1-1)。

犬黑色素瘤是很常見的腫瘤，沒有好發的性別，好發的年齡為 9 到 13 歲，常見罹患犬黑色素的品種有蘇格蘭梗犬 (Scottish Terrier)、標準型雪納瑞犬 (Standard Schnauzer)、迷你型雪納瑞犬 (Miniature Schnauzer)、黃金獵犬 (Golden Retriever)、杜賓犬 (Doberman Pinscher) 等犬種 (Meuten, 2008)。

1.1.1 犬黑色素瘤之類型

依照腫瘤發生的部位，可以將腫瘤分為口腔、嘴唇、皮膚、腳趾以及其他型，其他型包含發生在眼睛的黑色素瘤 (圖 1-1) (Raskin and Meyer, 2009)。

口腔型黑色素瘤是非常惡性的腫瘤，是犬最常見的黑色素瘤，約佔犬黑色素瘤的 56%，腫瘤生長的非常快速，侵入性以及轉移機率很高 (Raskin and Meyer, 2009)。口腔型黑色素瘤通常呈現黑色而且質地堅硬，部分無黑色素性黑色素瘤沒有黑色素沈澱，所以常被誤判為未分化的肉瘤 (Sarcoma) 或是上皮瘤 (Carcinoma)，可以使用特殊免疫組織化學染色來進行區別診斷，例如 S100 和 Melan-A (North



and Banks, 2009)。

犬嘴唇型黑色素瘤約佔犬黑色素瘤的 23%，這是一種很惡性的腫瘤，約 33% 的患犬在切除腫瘤之後的存活時間中位數少於 1 年 (Schultheiss, 2006)。

皮膚型黑色素瘤約佔犬黑色素瘤的 11% (Raskin and Meyer, 2009)，是一種常見的皮膚腫瘤，佔所有皮膚腫瘤的 5-7% (Bostock, 1986)，通常發生於被毛髮覆蓋之皮膚，依照腫瘤細胞的有絲分裂率 (Mitotic rate) 可以將腫瘤分為良性與惡性，85% 以上的犬皮膚型黑色素瘤是良性 (Bolon et al., 1990)，良性的犬皮膚型黑色素瘤邊界清楚、色素沈澱深以及直徑小於 2 公分，通常呈現圓頂狀且質地堅硬，而犬惡性皮膚型黑色素瘤通常生長快速、直徑大於 2 公分而且常伴隨著潰瘍。

發生在腳趾的腫瘤以鱗狀上皮細胞瘤最為常見，接下來依序為黑色素瘤、骨肉瘤、各種軟組織肉瘤以及肥大細胞瘤等等 (Withrow and Vail, 2007)，原發性腳趾型腫瘤約有 75% 會造成骨溶解，因此建議患犬應該接受患部放射線檢查 (Marino et al., 1995)，腳趾型黑色素瘤約佔犬黑色素瘤的 8%，有 50% 的機率是惡性，且經常出現遠端轉移到淋巴結或是肺臟 (Henry et al., 2005)，約有一半的患犬死於遠端轉移，截肢可以控制局部的復發，但是仍然有 30% 的機率腫瘤會復發 (Withrow and Vail, 2007)。

其他型黑色素瘤約佔犬黑色素瘤的 2%，常見發生位置為眼睛，例如起源於前葡萄膜、虹膜以及睫狀體，黑色素瘤是最常見之原發性眼內腫瘤，通常為良性，轉移率約 5%，但還是有局部侵犯性 (Giuliano et al., 1999)，可以依照腫瘤細胞有絲分裂率評估是否有潛在轉移風險 (Wilcock and Peiffer, 1986)。發生在結膜的黑色素瘤較惡性，術後有 50% 復發，轉移率為 16%，若是腫瘤侵犯到眼眶，建議進行眼球摘除，通常患犬的預後不佳 (North and Banks, 2009)。



1.1.2 犬黑色素瘤的治療

最主要的傳統治療是以外科手術切除腫瘤，切除腫瘤之後，如果動物沒有接受後續的輔助療法，那麼動物的存活時間中位數約為 5 到 6 個月，因此建議動物在切除腫瘤之後，應該接受化學療法、放射線療法以及免疫療法等輔助治療，然而，不論是接受化學療法還是放射線療法，腫瘤仍然有復發以及轉移的情形發生 (Dressler, 2009)，另外，免疫療法雖然無法根治犬黑色素瘤，但是卻可以將動物的存活時間延長 (Bergman and Wolchok, 2008)，小分子藥物標靶治療目前沒有應用在犬黑色素之治療 (Ito et al., 2013)。

1.1.3 犬黑色素瘤的病因

目前對於造成犬黑色素瘤的病因還不清楚。然而，人黏膜型黑色素瘤與犬口腔型黑色素瘤均相當惡性，且治療效果不好，常見轉移及復發，因此我們將參考人黑色素瘤的病因來進行研究 (Simpson et al., 2013)。人黑色素瘤的主要病因是基因突變，而紫外線照射是引起人皮膚型黑色素瘤基因突變的主要原因，BRAF、KIT 及 NRAS 為常見的突變基因 (Flaherty et al., 2012)。

人黑色素瘤分為兩類，一類發生在常照射紫外線之皮膚，另一類發生在不常照射紫外線之皮膚、肢端以及黏膜，這兩類腫瘤基因異常的型態很不一樣，人黑色素瘤主要的基因突變為 BRAF 和 NRAS，但是在黏膜型黑色素瘤，最常見的突變基因為 KIT 及 NRAS (Postow and Carvajal, 2012)。

1.2 KIT

1.2.1 KIT 蛋白質基本構造以及功能

KIT 是一種受體型酪氨酸激酶 (Receptor tyrosine kinase, RTK)，依照蛋白質的結構可以分為五個區域，包括細胞外配體結合區域 (Extracellular ligand binding domain)、跨細胞膜區域 (Transmembrane domain)、近細胞膜區域 (Juxtamembrane



domain) 以及酪氨酸激酶區域 (Tyrosine kinase domain) (Woodman and Davies, 2010)。

細胞外配體區域是由 5 個類免疫球蛋白 (Immunoglobulin-like repeat) 組成，KIT 的配體 (Ligand) 是幹細胞因子 (Stem cell factor, SCF)，它是一種糖基化跨細胞膜蛋白質 (Glycosylated transmembrane protein)，可以分為游離型和膜結合型幹細胞因子，兩者與 KIT 結合後，皆會促使 KIT 二聚體化 (Dimerization)，啟動細胞內訊息傳遞路徑，當訊息傳遞結束後，近細胞膜區域負責調控 KIT 的降解與去活性 (Miettinen and Lasota, 2005; Klinac et al., 2013)。

KIT 在某些細胞的發育過程中扮演重要的角色，例如黑色素細胞 (Melanocyte)、造血前驅細胞 (Hematopoietic progenitor)、原始生殖細胞 (Primordial germ cell)、肥大細胞 (Mast cell) 以及 Cajal 氏間質細胞 (Interstitial cells of Cajal)，這些細胞及其分化之細胞均會表現 KIT 蛋白質 (Galli et al., 1995; Miettinen and Lasota, 2005)。此外，KIT 也對黑色素的生成 (Melanogenesis) 和黑色素細胞的增生 (Proliferation)、移行 (Migration) 以及存活 (Survival) 很重要 (Spritz et al., 1992)。

黑色素之生成與體內酪氨酸酶 (Tyrosinase) 的活性有關，若是酪氨酸酶失去功能，會造成人的白化症 (Albinism) 以及動物的白斑症，酪氨酸酶與酪氨酸 (Tyrosine) 作用之後，產生多巴 (Dihydroxyphenylalanine, DOPA)，經過許多反應後，最後產生黑色素，黑色素依照構造分為真黑色素 (Eumelanin)、嗜黑色素 (Pheomelanin) 以及異黑色素 (Allomelanin)，在哺乳類和鳥類體內只有前兩種黑色素，真黑色素呈現黑色或是深棕色，嗜黑色素呈現紅色或是黃褐色，最後呈現混合型黑色素 (Mixed melanin)，黑色素形成的過程會產生許多對細胞有毒性的物質，所以只會在黑色素體 (Melanosome) 中形成黑色素 (圖 1-2) (Pawelek et al., 1980; Pawelek and Körner, 1982; Beermann and Ganls, 1995; Slominski et al., 2012; Mort et



al., 2015)。


黑色素平常貯存於細胞質的黑色素體中，經由 cytotricinia 的過程將黑色素傳到角化細胞 (keratinocyte)，黑色素體累積在角化細胞的細胞質中，可以減少紫外線照射對皮膚造成的傷害 (Levene, 1972)。在表皮層，除了黑色素細胞、角化細胞的細胞質有黑色素外，噬黑色素細胞 (Melanophage) 的細胞質也有黑色素，因為它會吞噬黑色素 (Meuten, 2008)。

1.2.2 KIT 的突變

依照基因突變的位置不同，KIT 的突變會造成 KIT 失去功能或是 KIT 持續性磷酸化。

KIT 失去功能，可能會造成色素無法生成、貧血、不孕以及無法生成肥大細胞，甚至造成胚胎在發育過程中死亡 (Nocka et al., 1989; Niwa et al., 1991)。KIT 以及其配體 SCF 因為基因突變而失去功能的話，在小鼠會造成黑鼠被毛出現白斑，在人會造成白斑症 (Piebaldism)，即毛髮或是皮膚喪失黑色素 (Chabot et al., 1988; Spritz et al., 1992)。Alexeev 等人在 2006 年的研究指出當 KIT 突變而造成 KIT 持續性磷酸化時，黑色素細胞移行的現象會比增生還要顯著 (Alexeev and Yoon, 2006)。

在許多腫瘤，KIT 已經被證實是致癌基因 (Oncogene)，例如人的腸胃道基質瘤 (Gastrointestinal stromal tumor, GIST)、黑色素瘤和犬肥大細胞瘤 (Mast cell tumor) (Alexeev and Yoon, 2006; Mcauliffe et al., 2007; Isotani et al., 2008)。在 2004 年，Went 等人先以組織晶片 (Tissue microarray) 去初步分析不同腫瘤其 KIT 蛋白質表現之程度，再將高度表現 KIT 蛋白質的檢體進行定序分析，發現一個人黑色素瘤帶有 KIT L576P 突變，這是首次在人黑色素瘤發現 KIT 突變 (Went et al., 2004)。



陸續有許多學者，開始研究 KIT 蛋白質表現與人黑色素瘤之相關性，在 2005 年，Willmore-Payne 等人收集了 100 個人黑色素瘤的病例，以免疫組織化學染色評估 KIT 蛋白質表現，再進一步定序分析，結果在 2 個轉移黑色素瘤皆發現 KIT L576P 突變，且伴隨著高 KIT 蛋白質表現，而且都不帶有人黑色素瘤常見的 BRAF 突變 (Willmore-Payne et al., 2005)。

在 2009 年，Torres-Cabala 等人特別針對人肢端型和黏膜型黑色素瘤來探討 KIT 突變與 KIT 蛋白質表現的關聯性，分別以核酸定序篩檢基因突變，並使用免疫組織化學染色評估蛋白質表現，總共分析了 173 個病例，結果發現帶有 KIT 突變的腫瘤，其 KIT 蛋白質表現量會增加 (Torres-Cabala et al., 2009)。隨後，在 2010 年，Woodman 等人提出 KIT 突變和黑色素瘤的類型有關，且 KIT 突變不會同時和 BRAF 以及 NRAS 突變存在 (Woodman and Davies, 2010)。

另外，在 2013 年 Chu 等人在犬黑色素瘤發現 KIT L578P 突變，但是，在犬黑色素瘤 KIT 是否也扮演致癌基因的角色，目前我們尚不明瞭 (Chu et al., 2013)。

1.2.3 探討 KIT 作為人類腫瘤治療的標靶

在標靶治療方面，KIT 突變可以提供酪氨酸激酶抑制劑 (Tyrosine kinase inhibitor) 標靶治療的成效因子，且已經成功被推廣至人腸胃道基質瘤之治療 (Wardelmann et al., 2007)。

KIT 突變之位置與標靶治療的效果有關，依照突變位置之不同，可以將 KIT 突變分為兩種類型，第一類型突變位於細胞外配體結合區域 (外顯子 9) 和近細胞膜區域 (外顯子 11)，第二類型位於酪氨酸激酶區域 (外顯子 13 和 17) (Lasota and Miettinen, 2008)。目前在人黑色素瘤發現的 KIT 突變位置有外顯子 11、13、17 以及 18，其中以位於外顯子 11 的 KIT L576P 突變最為常見 (Woodman and Davies,



2010)。

外顯子 11 管控的是 KIT 結構中的近細胞膜區域，為 α 螺旋結構 (α -helical conformation)，擁有自體抑制 (Auto-inhibitory) 的功能，如果氨基酸序列改變就會破壞結構，使得 KIT 不需與 SCF 結合就可以形成二聚體，且 KIT 失去自體抑制的功能而持續性磷酸化 (Debiec-Rychter et al., 2006; Hornick and Fletcher, 2007; Wardelmann et al., 2007)。

KIT 突變會影響腫瘤對藥物的感受性，目前曾有文獻報導被用於治療帶有 KIT 突變之人黑色素瘤的藥物有 Imatinib[®]、Nilotinib[®] 以及 Dasatinib[®] 這三種藥物 (Debiec-Rychter et al., 2006; Flaherty et al., 2012)，然而帶有 KIT L576P 突變的人黑色素瘤只對 Dasatinib[®] 這個藥物有感受性 (Antonescu et al., 2007)。

1.3 NRAS

1.3.1 NRAS 蛋白質基本構造以及功能

RAS 是一種 Small GTPase，可以分為 HRAS (Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog)、KRAS (Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog) 以及 NRAS (Neuroblastoma rat sarcoma viral oncogene homolog)，前兩者是由大鼠肉瘤病毒 (Rat sarcoma virus) 分離出來，而 NRAS 最早是從人神經母細胞瘤 (Neuroblastoma) 分離出來 (Harvey, 1964; Kirsten and Mayer, 1967; Barbacid, 1987; Bos, 1989)。

ras 基因的結構相似，均由四個外顯子組成，分布於全長約 30 kb 的 DNA 上，它們的編碼產物為 21 KD 的蛋白質，故稱為 P21 蛋白，此蛋白具有高度特異性和同源性，尤其在氨基酸序列的前 80 個氨基酸殘基中，生物間幾乎沒有差別，具有高度保留性 (Barletta et al., 1992)。RAS 位於細胞膜內側，它是三磷酸鳥苷 (GTP) 結合蛋白的一種，並且對於細胞生長與分化訊號之傳遞扮演重要的角色，藉由 GTP




與二磷酸鳥苷 (GDP) 的相互轉化來調節訊息的傳遞 (Magee and Marshall, 1999)。

RAS 與 GTP 和 GDP 有很強的親和性，而且有較弱的 GTPase 活性。正常情況下，RAS 和 GDP 結合沒有活性，當細胞外的生長分化因子訊號傳導到胞膜內側的 RAS 時，可增強其與 GTP 結合活性，使 RAS 和 GTP 結合後活化，訊號開始傳遞。因為 RAS 有 GTPase 活性，會使 GTP 水解成 GDP，當 RAS 和 GDP 結合會失去活性，訊號停止傳遞。正常情況下 RAS 的 GTPase 活性很弱，但是當和 GTPase 激活蛋白 (GAP) 結合後其水解速度可提高 1 萬倍而使 RAS 失去活性。RAS 和 GDP 結合會激活鳥苷酸釋放蛋白 (GNRP)，GNRP 使 RAS 釋放 GDP 而結合 GTP，因此藉由 GTP 和 GDP 的相互轉化可以調節 RAS 對訊號傳遞的開啟和關閉，完成將訊號傳入細胞內的過程 (Cox and Der, 2010; Poscha et al., 2013)。

自從 1982 年 Shih 等人於人膀胱癌細胞中發現活化的 *H-ras* 基因後 (Shih and Weinberg, 1982)，引起了學者們對 *ras* 基因在人類腫瘤扮演角色的極大關注，經過多年的研究認為 *ras* 基因調控細胞的生長、移行以及增生，並且參與許多腫瘤的形成與發展 (Fernandez-Medarde and Santos, 2011)。

1.3.2 NRAS 的突變

過度表現 RAS 會抑制抑癌因子 (Tumor suppressor)，而 RAS 突變會增加細胞分裂及生長，並且抑制細胞凋亡，RAS 突變常見發生於第 12、13 以及 61 位氨基酸密碼子 (Cox and Der, 2010; Poscha et al., 2013)，依照突變的位置，對訊號傳遞的影響機制不同，RAS 第 12 位密碼子突變會降低其 GTPase 活性，造成訊號持續傳遞，而 RAS 第 61 位密碼子突變除了會降低其 GTPase 活性還會減弱其與 GAP 結合的穩定性，造成訊號持續傳遞 (Glennon et al., 2000; Guerrero et al., 2000)。



根據統計，約有三分之一的人類腫瘤帶有 RAS 突變，其中最常見的是 KRAS 突變，但是在人黑色素瘤最常見的卻是 NRAS 突變 (Schubbert et al., 2007; Kinsler et al., 2013)。早在 1984 年，NRAS 就已經被證實為人類黑色素瘤之致癌基因 (Albino et al., 1984)，而 NRAS 的突變以 Q61R 和 Q61K 最常見 (Cox and Der, 2010)。


1.3.3 探討 NRAS 作為人黑色素瘤治療的標靶

目前仍未有對帶有 NRAS 突變之黑色素瘤有效之藥物，然而，2013 年 Poscha 等人在 NRAS 突變的黑色素瘤細胞進行標靶藥物試驗，結果顯示藥物可以有效地殺死腫瘤細胞，為治療帶有 NRAS 突變的黑色素瘤帶來新契機 (Poscha et al., 2013)。

1.4 高解析度熱溶解曲線分析

在 1997 年，Wittwer 等人首次同時應用熱溶解曲線分析 (Melting analysis) 以及即時聚合酶連鎖反應 (Real-time polymerase chain reaction, real-time PCR) 來分析聚合酶連鎖反應 (Polymerase chain reaction, PCR) 的產物，他們使用 SYBR[®] Green I 進行實驗，這個染劑在嵌入雙股去氧核糖核酸 (Double-strand deoxyribonucleic acid, dsDNA) 時會發出螢光，但是當染劑游離在溶液時卻不會發出螢光，利用這個特性可以偵測產物的即時定量，隨著溫度的升高，dsDNA 解旋為單股去氧核糖核酸 (Single-strand deoxyribonucleic acid, ssDNA)，因此可以藉由熱溶解曲線圖分析產物，這個方法被稱為低解析度熱溶解曲線分析 (Low-resolution melting curve analysis, LRM) (Wittwer et al., 1997)。熱溶解曲線圖會受產物的長度 (Length)、核苷酸序列 (Sequence)、鳥糞嘌呤與胞嘧啶含量 (GC content)、雜合性 (Heterozygosity) 等因素影響 (Mao et al., 2007)。

雖然可以藉由熱溶解溫度 (Melting temperature, T_m) 來鑑別產物的特異性與多樣性，但是卻無法區別微小的核苷酸序列差異，因此 Wittwer 等人於 2003 年又



發表了一個可以區別微小的核苷酸序列差異的方法，被稱為高解析度熱溶解曲線分析 (High-resolution melting curve analysis, HRM)。LRM 與 HRM 的原理相同，都是利用隨著溫度升高，dsDNA 會解離成 ssDNA 的特性，去偵測染劑嵌入 dsDNA 後發出的螢光量，最後再分析熱溶解曲線。這兩者之間的差異是溫度上升的幅度大小，在 LRM 溫度上升的幅度為 0.5°C，但是在 HRM 溫度上升的幅度縮小為 0.008-0.2°C，因此 HRM 比 LRM 擁有更高的靈敏性，可以偵測更細微的核苷酸序列差異 (Wittwer et al., 2003)。

HRM 是一個快速、便利、高通量檢測單核酸多樣性 (Single nucleotide polymorphism, SNP) 的方法 (Montgomery et al., 2010)。HRM 實驗分為兩個階段，第一個階段為增幅目標片段，第二個階段為熱溶解曲線分析。在第一階段，使用 PCR 的方法增幅目標片段，在配置溶液時額外添加會嵌入 dsDNA 的染劑，當染劑與 dsDNA 結合時會發出螢光，若是沒有與 dsDNA 結合時則不會發出螢光，利用這個特性，可以監控在增幅過程中產物的即時定量。在第二個階段，首先緩慢降溫至 55°C，然後再逐漸增加溫度到 95°C，隨著溫度增加 dsDNA 逐漸解旋為 ssDNA，染劑游離於溶液之中，因此偵測到的螢光值下降，最後得到熱溶解曲線圖。

HRM 與 LRM 均可以同時進行大量檢體之篩檢，但是 LRM 是藉由判別螢光值與溫度微分後的圖形來分析產物專一性，而 HRM 使用的分析方式更為複雜，但是也提供了更準確的結果，以下將介紹與 HRM 分析相關之參考圖形。

1.4.1 增幅圖形

定量即時聚合酶反應 (Quantitative real-time polymerase chain reaction, qPCR) 著重於產物的定量，但是對於 HRM 最重要的是產物的增幅，另外，產物的專一性以及確認不含模板的控制組 (No-template control, NTC) 沒有增幅產物也相當重



要。

1.4.2 熱溶解曲線

根據熱溶解狀態，可將熱溶解曲線分為熱溶解前 (Pre-melt)、熱溶解 (Melt) 及熱溶解後 (Post-melt) 三個區域，這三個區域與引子對 (Primer) 的設計有關，不同的檢體因為染色體去氧核糖核酸 (Genomic deoxyribonucleic acid, gDNA) 來源、品質或是量等因素，熱溶解曲線會有微小的誤差，因此要先將檢體熱溶解曲線標準化後，才可以更進一步分析實驗數據。

1.4.3 標準化數據

實驗數據標準化的範圍選擇相當重要，不恰當的標準化範圍選擇，會使高解析度熱溶解分析失敗，實驗數據標準化的範圍由熱溶解前到熱溶解後，若是選擇熱溶解的範圍進行分析，則會使分析失敗。


1.4.4 差異圖形

差異圖形是以原生型 (Wild type) 的標準化曲線為基準，減去其他檢體的標準化數值後得到的圖形，不同基因型的圖形很不一樣 (圖 1-3)。

1.4.5 影響的因子

HRM 是一個檢測 SNP 很靈敏的方式，但有許多因子會影響實驗結果，例如染劑、引子對、去氧核糖核酸等等，因此尋找適當的實驗條件相當重要 (Li et al., 2011)。

不同的染劑有不同的特性，例如在進行 qPCR 時，應該使用不會影響產物增幅的染劑，但是對於進行 HRM 染劑的選擇，最重要的考量點為染劑是否可以提供精細的熱溶解分析曲線，理想的染劑不應該與嘧啶 (Pyrimidine) 和嘌呤 (Purine) 結合，因為這會影響產物之增幅與 T_m 值。依照不同的特性，可以將染劑分為不飽和型 (No-saturating dye)、飽和型 (Saturating dye)、依需求釋放型




(Release-on-demand dye)。什麼是飽和呢？將飽和溶液作為例子，飽和溶液的定義為溶質無法再被溶解於溶液之中，反之則為不飽和溶液，因此將飽和的概念套用在染劑時，飽和型染劑的定義為染劑無法再嵌入 dsDNA，反之，染劑可以再嵌入 dsDNA，則為不飽和型染劑，SYBR[®] Green 為最常見的不飽和型染劑，這個染劑不適合應用於 HRM (Mao et al., 2007)，因為在低濃度時，從 dsDNA 釋放出來的 SYBR[®] Green 不會游離於溶液之中，卻會再與其它未解旋之 dsDNA 結合，因此 SYBR[®] Green 無法提供精確的 dsDNA 即時定量，而高濃度 SYBR[®] Green 會穩定 dsDNA 的結構，進而抑制產物的增幅甚至改變產物的 T_m 值，因此一般不飽和型染劑是使用低濃度 (Wittwer et al., 1997)。

隨著科技的進步，後來研發出了飽和型染劑，例如 SYTO9[®] 以及 LCGreen[®]，這些染劑克服了不飽和型染劑的缺點，在高濃度不會抑制產物的增幅或是改變產物的 T_m 值，並且可以提供更高的螢光檢驗數值。飽和型染劑可以提供更高的螢光質值且擁有較高的敏感性 (Wittwer et al., 2003)。EvaGreen[®] 為依需求釋放型染劑，它是飽和型染劑的一種，最適合應用於 HRM，當 dsDNA 解旋為 ssDNA 時，螢光值的改變比其他飽和型染劑更明顯 (Mao et al., 2007)。

引子對的設計除了與一般聚合酶連鎖反應之原理相同外，還要針對目標基因進行設計，並且要盡量避免引子對二聚體 (Primer dimer) 的形成，另外，合成引子對時，純化的等級一定要在 OPC (Oligonucleotide Purification Cartridge) 以上，才可以確保不會影響高解析度熱溶解曲線分析之進行。

不適當的純化技術以及緩衝溶液殘留是影響 DNA 品質的主要因素，鹽類殘留會影響產物增幅及熱溶解曲線的形狀 (Gundry et al., 2003)。另外，為了縮小鹽類對 HRM 的影響，建議引子對 (Primer) 的最終濃度為 0.05-0.1 μ M，雖然緩衝溶液殘留不會影響產物的 T_m 值以及熱溶解曲線的形狀，但是會造成非專一性產



物，建議檢體與標準品使用相同方法萃取 gDNA，並以低鹽溶液回溶，然後使用小體積的模板去氧核糖核酸 (Template DNA) (表 1-2)。一般來說，如果是偵測單核酸多樣性，去氧核糖核酸增幅之長度在 50-300 bp 使用高解析度熱溶解曲線分析都可以偵測到 T_m 值的差異，雖然增幅產物的片段越短越容易偵測其 T_m 值之變化，但是最後的螢光值相對來說也比較低，因此必須依照實驗設計來調整增幅產物之大小。

第二章

前言 (Introduction)



黑色素瘤是由黑色素細胞或黑色素母細胞異常增生所造成，人黑色素瘤的主要病因是基因突變，但是犬黑色素瘤的病因尚不清楚，不論是人黏膜型黑色素瘤還是犬口腔型黑色素瘤都是非常惡性的腫瘤，常見轉移及復發，因此我們將人黏膜型黑色素瘤病因作為研究犬口腔型黑色素瘤之借鏡。造成人黑色素瘤的主要原因是基因突變，常見 KIT 及 NRAS 發生基因突變。KIT 是一種受體型酪氨酸激酶 (Receptor tyrosine kinase)，對黑色素細胞之增殖、遷徙及存活扮演很重要的角色。NRAS 是一群小的三磷酸鳥苷酶 (GTPase)，與許多細胞的增殖、遷徙及存活有關。實驗室先前分別在犬黑色素細胞及組織發現 KIT L578P (T1733C) 及 NRAS Q61K (C181A) 突變，這兩個突變都是人黑色素瘤常見之致病突變，為了釐清這兩個突變在犬黑色素瘤的發生率及腫瘤生成扮演的角色，我們先收集確診為犬黑色素瘤之病歷資料及組織蠟塊，然後以免疫組織化學染色評估蛋白質表現，再從組織蠟塊萃取 DNA 後進行 KIT 及 NRAS 基因型篩檢，最後將資料進行統計分析 (圖 2-1)。

第三章 材料與方法 (Material and method)



3.1 犬黑色素瘤病歷之收集

我們從台大動物醫院外科病理資料庫收集了 1999 年到 2014 年診斷為犬黑色素瘤的 139 個組織蠟塊 (源自 130 個動物)，並且紀錄了動物的品種、年齡、腫瘤位置、腫瘤分級等相關資料。

3.2 免疫組織化學染色

1. 先將石蠟包埋之組織蠟塊，以切片機切成厚度為 3-5 μm 之組織切片後，使其貼附於 Silance coating 玻片上，再以 37°C 熱烘板烘乾，使組織切片緊密黏著於玻片上。
2. 開始脫臘前，先將貼附於玻片之組織切片靜置於 55°C 烘箱 1 小時，使組織更加貼附玻片。
3. 將組織切片浸泡於 Hemo-De[®] (Scientific Safety Solvents[®]) 脫臘兩次，每次 25 分鐘。
4. 將組織切片浸泡於一系列之梯度酒精 (100%、95%、80% 及 60%) 中，進行水合反應以及去除 Hemo-De[®]，每次各 3 分鐘，然後浸泡於水中。
5. 由於貯存於細胞質中的黑色素會影響蛋白質表現之評估，因此所有組織切片將進行脫黑色素的步驟。首先，將組織切片浸泡於 0.25% 過錳酸鉀溶液 15 分鐘後，以水浸洗兩次，每次數秒，再浸泡於 5% 草酸溶液 1 分鐘，最後置於自來水龍頭下，以流動水清洗 10 分鐘，然後以光學顯微鏡確認細胞中的黑色素已經去除完畢。
6. 接下來將組織切片放入內含 Trilogy[™] (Cell Marque[®]) 溶液的盒子中，再放入高壓鍋 (Biocare Medical[®]) 中，先以 121°C 作用 3 分鐘，再以 90°C 作用 10 秒，以



- 進行熱誘導抗原修復 (Heat-induced epitope retrieval, HIER)，然後靜置室溫10分鐘。
7. 先以 TBST 緩衝溶液 (Tris-buffered saline with Tween-20) 清洗後，畫上防水線，再以 TBST 緩衝溶液清洗數分鐘，滴上山羊血清 (Dako[®]) 靜置室溫作用30分鐘。
 8. 倒掉山羊血清後，於組織切片滴上分別以山羊血清稀釋100倍之 KIT 抗體 (Polyclonal rabbit anti-KIT CD117 antibody, Dako[®]) 以及200倍之 NRAS 抗體 (Monoclonal rabbit anti-NRAS antibody, Novus Biologicals[®]) 200 μ L，於組織切片蓋上石蠟膜後，靜置4°C作用18小時。
 9. 先倒掉液體，以 TBST 緩衝溶液清洗數分鐘後，滴上3%過氧化氫溶液作用10分鐘。
 10. 倒掉液體，以 TBST 緩衝溶液清洗數分鐘後，於組織切片滴上 Enhancer 試劑 (Super Sensitive[™] IHC Detection System, BioGenex[®]) 作用30分鐘。
 11. 倒掉液體，然後以 TBST 緩衝溶液清洗數分鐘，滴上 Poly-HRP 試劑 (Super Sensitive[™] IHC Detection System, BioGenex[®]) 作用40分鐘。
 12. 倒掉液體，再以 TBST 緩衝溶液清洗數分鐘，並滴 AEC 試劑 (Super Sensitive[™] IHC Detection System, BioGenex[®]) 於玻片上作用2分鐘。
 13. 倒掉液體，再以 TBST 緩衝溶液清洗數分鐘後，滴上蘇木紫染劑 (Gill Hematoxylin Solution II, Merck[®]) 作用1分鐘。
 14. 倒掉液體，讓玻片在自來水下流洗10分鐘。
 15. 以水溶性膠進行封片，風乾後以光學顯微鏡觀察結果。
 16. 評估蛋白質表現是將蛋白質的表現量及強度相乘，再依照乘積分為強、中、弱及陰性。先將蛋白質表現的量，分為0%、1-10%、11-50%、51-80%以及80%



以上，然後分別評分為0-4分，再將蛋白質表現的強度，分為無、弱、中及強，並且分別評分為0-3分，最後將兩個數值相乘然後依據乘積進行評估，乘積為8-12、6、2-4及0-1分別被評估為強、中、弱及陰性，本研究由兩位病理獸醫師進行蛋白質表現之評估。

3.3 基因型篩檢

3.3.1 染色體去氧核糖核酸萃取

1. 使用 Paraffin-embedded tissue genomic DNA isolation kit (GeneDirex[®]) 由組織切片萃取 genomic DNA (gDNA)，實驗步驟將在後面依序說明。
2. 先以切片機切下厚度約為 6 μm 之組織切片後，將其放入 1.5 mL 微量離心管備用，保存於 4°C。
3. 接下來進行脫蠟的步驟，在微量離心管內加入 Hemo-De[®] (Scientific Safety Solvents[®]) 1 mL，震盪混合後，靜置室溫作用 10 分鐘，期間每 3 分鐘再震盪混合 1 次，之後離心 16,000g 3 分鐘，以微量吸管 (Tip) 將上清液吸起來。
4. 加入絕對酒精 1 mL 進行水合反應，上下翻轉數次後，離心 16,000g 3 分鐘，以微量吸管將上清液吸起來，重複 1 次實驗步驟後，將微量離心管靜置乾浴槽 4°C 作用 15 分鐘移除酒精。
5. 加入 Buffer TL (GeneDirex[®]) 300 μL 以及 10 μL Proteinase K (Qiagen[®])，震盪混合後置於乾浴槽 60°C 作用 30 分鐘，每 5 分鐘上下翻轉 1 次，作用時間結束後，液體呈現澄清透明，再靜置室溫 10 分鐘，液體溫度降到室溫後，加入 Buffer TB (GeneDirex[®]) 400 μL ，震動混合後，液體呈現乳白色混濁，離心 12,000g 1 分鐘。
6. 組裝收集管，並在收集管的蓋子標上號碼，將上清液移入收集管之中，離心 14,000g 30 秒，移去液體後，先加入 Buffer W1 (GeneDirex[®]) 400 μL ，離心




14,000g 30 秒，移去液體後，再加入 Buffer W2 (GeneDirex[®]) 600 μ L，離心 14,000g 30 秒，移去液體後，再離心 14,000g 3 分鐘。

7. 移去液體後，將已預熱到 60°C 的 DEPC water (Protech[®]) 20 μ L 加到收集管的膜上，靜置 60°C 乾浴槽 3 分鐘後，離心 14,000g 3 分鐘，保存於 -20°C 備用。


3.3.2 限制片段長度多形性聚合酶連鎖反應

1. 基因序列的改變可能會造成限制酶切位改變，因此使用限制片段長度多形性聚合酶連鎖反應 (Polymerase chain reaction-restricted fragment length polymorphism, PCR-RFLP) 可以進行特定基因突變之篩檢。
2. 我們使用 Taq DNA Polymerase 2x Master Mix RED (1.5 mM MgCl₂ final concentration, Ampliqon[®]) 作為反應試劑，進行聚合酶連鎖反應，反應總體積為 50 μ L，試劑內容有 Taq 2x Master Mix (Ampliqon[®]) 25 μ L、Forward primer (P1, 10 μ M) 2.5 μ L、Reverse primer (P2, 10 μ M) 2.5 μ L 以及由組織切片純化之 gDNA 75 ng，最後以 DEPC water (Protech[®]) 將體積補到 50 μ L，反應條件以及 Primer 之序列請參考表 3-1。
3. 接下來使用 PCR Clean-Up and Gel Extraction Kit (GeneDirex[®]) 進行產物純化，先將產物 50 μ L 與 Buffer B[®] 250 μ L 混合均勻後，將液體放入收集管中，離心 14,000g 30 秒。
4. 將液體丟棄，再加入 Buffer W1[®] 400 μ L，離心 14,000g 30 秒。
5. 將液體丟棄，再加入 Buffer W2[®] 400 μ L，離心 14,000g 30 秒，將液體丟棄，再離心 14,000g 3 分鐘。
6. 將液體丟棄，將收集管移至新的微量離心管中，於收集管底部加入已預熱至 65°C 之 DEPC water 20 μ L，直立靜置 65°C 乾浴槽 3 分鐘後，離心 14,000g 3 分鐘。

- 
7. 接下來使用 New England BioLabs[®] 之套組進行限制酶切割，反應總體積為 25 μL ，試劑內容有 1x CutSmart buffer[®] 2.5 μL 、Alu I[®] 1 μL 以及純化之 PCR 產物 100 ng，最後以 DEPC water (Protech[®]) 將體積補到 25 μL ，16 $^{\circ}\text{C}$ 作用 16 小時後 85 $^{\circ}\text{C}$ 作用 20 分鐘。
 8. 配置 10% Polyacrylamide gel 後以 60 伏特進行電泳 60 分鐘，製膠試劑如後所述，試劑總體積為 12 mL，5x Tris-borate-EDTA buffer (TBE buffer) 2.4 mL、Polyacrylamide (30% W/V) 5.6 mL、10% Ammonium persulfate (APS) 200 μL 、Tetramethylethylenediamine (TEMED) 100 μL 、安全染劑 0.2 μL ，最後以 DDW 將體積補到 12 mL，靜置 1 小時後進行電泳。

3.3.3 質體之建立

1. 先以帶有突變之細胞株作為模板 (Template DNA)，使用 Taq DNA polymerase 2x master mix red (1.5 mM MgCl₂ final concentration, Ampliqon[®]) 進行聚合酶連鎖反應 (Polymerase chain reaction, PCR)，試劑內容如後面所描述，Taq 2x master mix[®] 100 μL 、Forward primer (10 μM) 10 μL 、Reverse primer (10 μM) 10 μL 、gDNA 50 ng，最後以 DEPC water (Protech[®]) 將體積補到 200 μL ，KIT 和 NRAS 使用的引子對分別為 P1/P2 和 NRG2F/NRG2R，引子對序列以及反應條件請參考表 3-1。
2. 取 10 μL 產物，使用 2% 瓊脂凝膠 (Agarose gel) 以 100 伏特進行電泳 35 分鐘，插入基因序列為 KIT 以及 NRAS 之預期產物大小分別為 190 bp 和 493 bp，接下來將產物以 PCR clean-up and gel extraction kit (GeneDirex[®]) 進行純化。
3. 先將產物 190 μL 與 Buffer B[®] 950 μL 放入 1.5 mL 微量離心管之中，震盪混合均勻，將混合液 600 μL 裝入收集管後，離心 14,000g 30 秒，倒掉液體

- 
- 後，再將剩餘之混合液 600 μL 裝入收集管後，離心 14,000g 30 秒。
4. 倒掉液體後，先於收集管內加入 Buffer W1[®] 400 μL ，離心 14,000g 30 秒，將液體倒掉後，再加入 Buffer W2[®] 600 μL ，離心 14,000g 30 秒，然後將液體倒掉，最後再離心 14,000g 3 分鐘。
 5. 取一個新的 1.5 mL 微量離心管，將收集管裝在微量離心管上，於收集管上之濾網加入已預熱到 60°C 的 DEPC water 20 μL ，靜置 60°C 乾浴槽 3 分鐘後，離心 14,000g 3 分鐘，靜置冰上備用。
 6. 接下來將進行接合反應，使用 pGM-T cloning kit (Tiagen[®]) (圖 3-1)，反應總體積為 10 μL ，試劑內容如後面所描述，10x DNA ligation buffer[®] 1 μL 、pGM-T vector (50 ng/ μL) 1 μL 、純化之產物 7 μL 及 T4 DNA ligase[®] (3U/ μL) 1 μL 。將混合液快速離心數秒後，靜置 16°C 作用 18 小時。
 7. 我們使用 TOP 10 作為勝任細胞，將勝任細胞從 -80°C 冰箱拿出來靜置冰上退冰，然後將接合反應完成之液體 5 μL 加入，以微量吸管沿著管壁繞一圈後靜置冰上 20 分鐘。
 8. 將器具拿到生物安全操作台 (Laminar flow) 照射紫外線，器具如下：定量吸管、微量吸管、微量離心管、鐵架、微量離心管架、抗酒精筆、打火機、酒精燈、塗盤器。
 9. 20 分鐘後，將微量離心管放置於 42°C 水浴槽反應 90 秒，馬上將微量離心管靜置冰上 3 分鐘。
 10. 在生物安全操作台內進行操作：於微量離心管內加入 LB 培養液 (Lysogeny broth) 800 μL 。
 11. 將微量離心管於 37°C 培養箱，震盪培養 1 小時。
 12. 在等待的時候，以體積 1:1 將已經回溫的乳糖操作子誘導物 (Isopropyl



- β -D-1-thiogalactopyranoside, IPTG, 100 mg/mL) 以及半乳糖苷類似物 (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside, X-gal, 40 mg/mL) 混合均勻後，取 100 μ L 塗在含 Ampicillin 50 μ g/mL 的 LB plate 上，塗盤的操作如下：先將浸泡於 75%酒精的塗盤器拿出，以酒精燈滅菌，靜置於鐵架至冷卻後再塗盤，放到 37°C 培養箱備用。
13. 等待 1 小時後，將放在 37°C 培養箱的菌液以及 LB plate 拿到生物安全操作台操作：在 LB plate 標上日期、操作者姓名、質體之名稱、塗盤所使用之菌液體積等相關資訊後，進行塗盤，塗盤的操作如下：先將浸泡於 75%酒精的塗盤器拿出，以酒精燈滅菌，靜置於鐵架至冷卻後再塗盤。
 14. 將 LB plate 靜置 37°C 培養箱，培養 16 小時後觀察。
 15. 觀察 LB plate 有菌落生長，於是挑選數個白色菌落，進行繼代培養 (Subculture) 及菌落 PCR (Colony PCR)，將器具放到生物安全操作台內照射紫外線 20 分鐘後進行實驗，器具包括定量吸管、微量吸管、微量離心管、鐵架、微量離心管架以及抗酒精筆。
 16. 在進行繼代培養前先取數個 200 μ L 微量離心管，並於其內加入 DEPC water (Protech[®]) 8 μ L，然後進行繼代培養，繼代培養的步驟如下：挑選單一白色菌落，以微量吸管沾菌後，畫菌於 LB plate 上，再將微量吸管沿著前述的微量離心管的管壁在水面下繞一圈，之後將於菌落 PCR 使用。最後將 LB plate 靜置 37°C 培養箱，培養 16 小時。
 17. 接下來使用 Taq DNA polymerase 2x master mix red (1.5 mM MgCl₂ final concentration, Ampliqon[®]) 進行菌落 PCR，反應總體積為 20 μ L，試劑內容如後面所描述，Taq 2x master mix[®] (Ampliqon[®]) 10 μ L、引子 (10 μ M) 各 1 μ L，以及沾菌之 DEPC water (Protech[®]) 8 μ L，使用的引子對為 T7/Sp6，



引子對之序列以及反應條件請參考表 3-1。

18. 取 10 μ L 產物進行電泳，使用 2%瓊脂凝膠，以 100 伏特進行電泳 35 分鐘，成功插入目標基因序列的檢體，其 KIT 以及 NRAS 之預期產物大小分別為 400 bp 和 700 bp。
19. 將確認有插入目標基因序列之菌落再進行繼代培養，然後送定序。
20. 將定序結果與 National center for biotechnology information (NCBI) 提供之序列 (表 3-2)，並且使用程式 Basic local alignment search tool (BLAST) 進行比對與菌落基因型之分型。

3.3.4 高解析度熱溶解曲線分析法

1. 將源自原生型以及突變型之菌落的質體去氧核糖核酸 (Plasmid DNA) 作為標準控制組，進行高解析度熱溶解曲線分析。
2. 使用 TaKaRa Ex TaqTM (TaKaRa[®]) 以及 EvaGreen (Biotium[®]) 作為反應試劑，反應總體積為 20 μ L，檢體組試劑內容如後面所描述，10x Ex Taq buffer (TaKaRa[®]) 2 μ L、dNTP mixture (TaKaRa[®]) 1.6 μ L、Forward primer (2 μ M) 1 μ L、Reverse primer (2 μ M) 1 μ L、20x EvaGreen (Biotium[®]) 1 μ L 以及由組織切片純化之 gDNA 25 ng，最後以 DEPC water (Protech[®]) 將體積補到 20 μ L，KIT 和 NRAS 使用的引子對分別為 KIT HRM F1/KIT HRM R1 和 NRAS HRM F1/NRAS HRM R1，反應條件以及引子對之序列請參考表 3-1。
3. 標準控制組除了加入已知基因表現型的 Plasmid DNA 5 pg 外，其他反應試劑均與檢體組相同。

3.4 統計分析

1. 我們將動物的品種、腫瘤類型、腫瘤位置、腫瘤分級等相關資料與蛋白質表現及基因型進行統計分析，由於口腔的腫瘤較惡性，因此將口腔及非口腔的



腫瘤另外進行分析。

2. 在本研究中使用了 Mann-Whitney test (依變數 2 個) 及 Kruskal-Wallis test (依變數 3 個以上) 進行統計分析。
3. 腫瘤類型依照惡性程度分為黑色素細胞瘤、惡性黑色素瘤及無黑色素性黑色素瘤進行統計。
4. 腫瘤位置的部分僅口腔、嘴唇、皮膚、腳趾及眼睛的腫瘤納入統計，發生於淋巴結的繼發性腫瘤無納入統計。
5. 我們根據 WHO 的規定進行腫瘤分級，依照腫瘤的直徑大小、是否轉移到淋巴結或是其他的臟器，將犬口腔型黑色素瘤分為 I 到IV級。
6. 根據蛋白質表現量及強度相乘的數值分別將蛋白質表現評估為強 (8-12)、中 (6)、弱 (2-4) 及陰性 (0-1)。



第四章 結果 (Result)

4.1 犬黑色素病歷之收集

我們從台大動物醫院外科病理資料庫收集了 1999 年到 2014 年診斷為犬黑色素瘤的 139 個組織蠟塊 (源自 130 個動物)，並且紀錄了動物的性別、品種、腫瘤類型、腫瘤位置、腫瘤分級等相關資料，結果如表 4-1 所示。

我們紀錄了 130 隻動物的資料，結果顯示動物的性別公畜有 73 隻，其中已絕育的有 23 隻，母畜有 54 隻，其中已絕育的有 33 隻，有 3 隻動物性別未知(表 4-2)。收集的動物以 Mongrel (43.85%, 56/130) 為主，品種犬有 Schnauzer (8.46%, 11/130)、Labrador Retriever (8.46%, 11/130)、Golden Retriever (7.69%, 10/130) 和 Shih-Tzu (6.15%, 8/130) 等 (表 4-3)。腫瘤類型方面以惡性黑色素瘤 (92.31%, 120/130) 為主，其他依序為無黑色素性黑色素瘤 (3.85%, 5/130) 以及黑色素細胞瘤 (3.85%, 5/130)(表 4-4)。腫瘤位置方面，以口腔型黑色素瘤 (57.55%, 80/139) 為主，其他依序為皮膚型 (21.58%, 30/139)、嘴唇型 (5.76%, 8/139)、腳趾型 (7.91%, 11/139)、眼睛 (5.76%, 8/139) 以及淋巴結 (1.44%, 2/139) (表 4-5)，淋巴結組織將不進行統計分析。腫瘤分級方面，WHO 僅將口腔腫瘤進行分級 (其他位置腫瘤無分級)，故我們將 80 個口腔組織分為 I 到 IV 級，由於病歷資料不全，故有 16 隻動物無法進行分級，本研究各分級的病例數差距不大，I 到 IV 級依序為 14 隻 (21.88%, 14/64)、12 隻 (18.75%, 12/64)、20 隻 (31.25%, 20/64) 以及 18 隻 (28.13%, 18/64) (表 4-6)。

4.2 蛋白質表現

有些組織蠟塊之檢體所含組織量稀少或是保存不良，因此無法進行免疫組織化學染色，故最終有 98 個檢體進行免疫組織化學染色，依照蛋白質表現的量及強度分別評為 0-4 及 0-3 分 (圖 4-1 及圖 4-2)，再將兩數相乘，乘積為 8-12、6、2-4



及 0-1 分別評為蛋白質表現強、中、弱及陰性。

由於有 7 個檢體在經過脫黑色素或是免疫組織化學染色的處理後，組織由切片上脫落，因此無法進行免疫組織化學評分，故最後評估 91 個檢體，KIT 蛋白質表現評估為強、中、弱及陰性分別有 45% (41/91)、22% (20/91)、32% (29/91) 及 1% (1/91)，NRAS 蛋白質表現評估為強、中、弱及陰性分別有 76% (69/91)、9% (8/91)、15% (14/91) 及 0% (0/91) (表 4-7)。

4.3 基因型篩檢

共有 98 個組織蠟塊進行 DNA 萃取，因為部分檢體取得的 DNA 品質太差，所以僅有 73 個檢體進行基因型篩檢。

KIT 基因型篩檢的部分，先以限制片段長度多形性聚合酶連鎖反應 (PCR-RFLP) 進行初步篩檢 (圖 4-3)，然後再將疑似突變之檢體送定序，有 16% (12/73) 帶有 KIT L578P (T1733C) 突變 (圖 4-4 A)，且這些檢體都同時帶有 NRAS Q61K (C181A) 突變。

NRAS 基因型篩檢的部分，進行聚合酶連鎖反應後，再純化產物，最後送定序，結果有 75% (55/73) 帶有 NRAS Q61K (C181A) 突變 (圖 4-4 B)，其中有一個組織是 NRAS Q61K (C181A) 同型合子突變 (圖 4-4 C)，另外，我們還發現一個口腔組織同時帶有 NRAS Q61K (C181A) 及 NRAS Q61E (C181G) 突變 (圖 4-4 D)。

4.4 建構 HRM 進行基因型篩檢

我們先建立帶有 KIT 和 NRAS 原生型 (Wild type) 以及突變型 (Mutated type) 之質體作為高解析度熱溶解曲線分析的標準控制組。建立質體，首先以 PCR 增幅產物，並將產物純化，接下來進行接合反應，然後將基因送入大腸桿菌表現，挑選幾個菌落進行 PCR (圖 4-5)，將疑似有表現基因之質體送定序，本實驗所使



用之質體均已送定序確認質體基因型 (圖 4-6)。

質體建立後，再以 Plasmid DNA 作為標準控制組，進行 HRM 後，原生型及突變型質體的圖形不一樣 (圖 4-7 A)，但是原生型檢體和質體的圖形不一致 (圖 4-7 B)，所以 HRM 無法應用於本研究之組織蠟塊檢體。

4.5 統計分析

我們分別將動物的品種、腫瘤類型、腫瘤位置、腫瘤分級等相關資料與蛋白質表現及基因型進行統計分析，若是將蛋白質表現評估為強、中、弱及陰性，結果顯示 KIT 及 NRAS 蛋白質表現與腫瘤位置 (表 4-8)、腫瘤類型 (表 4-9)、腫瘤分級 (表 4-10)、KIT 基因型 (表 4-11) 及 NRAS 基因型 (表 4-12) 沒有相關性 ($p>0.05$)，而 KIT 及 NRAS 基因型與腫瘤位置 (表 4-13)、腫瘤分級 (表 4-14) 也沒有相關性 ($p>0.05$)。但是在非口腔型黑色素瘤，KIT 基因型與 KIT 蛋白質表現有相關性 ($p<0.05$)，表示帶有 KIT L578P 突變的非口腔腫瘤其 KIT 蛋白質表現會增加 (表 4-15)，另外，NRAS 蛋白質表現與腫瘤位置也有相關性 ($p<0.05$)，顯示發生在嘴唇的腫瘤其 NRAS 蛋白質表現增加 (表 4-16)。



第五章 討論 (Discussion)

5.1 犬黑色素病歷之收集

根據我們的紀錄，除了 Mongrel (43%, 56/130)，台灣常見罹患犬黑色素瘤的品種為 Schnauzer (8.46%, 11/130)、Labrador Retriever (8.46%, 11/130)、Golden Retriever (7.69%, 10/130) 和 Shih-Tzu (6.15%, 8/130) 等，而美國常見罹患犬黑色素的品種有 Schnauzer、Golden Retriever、Scottish Terrier 和 Doberman Pinscher 等犬種 (Meuten, 2008)，我們發現在台灣和美國 Schnauzer 和 Golden Retriever 都是常見罹患犬黑色素瘤的品種，而 Scottish Terrier 和 Doberman Pinscher 在台灣飼養數量較少。

5.2 去黑色素條件之調整及蛋白質表現評估

一般來說，KIT 及 NRAS 會在細胞質表現，而黑色素平常亦蓄積在細胞質，因此黑色素會影響蛋白質表現的評估，所以在進行 IHC 前需要脫黑色素，我們使用過錳酸鉀以及草酸溶液進行脫黑色素，當黑色素與過錳酸鉀結合後，會形成不溶於水的深棕色物質，此物質與草酸結合後會溶於水，水洗後可以去除黑色素。

由於脫黑色素使用的溶液為強酸以及強鹼溶液，組織與這些溶液作用後會耗損，參考 Chu 等人脫黑色素的方法進行實驗後 (Chu et al., 2013)，發現犬口腔型黑色素瘤組織對於這些溶液耐受性很低，幾乎所有的組織在經過脫黑色素的過程後都會毀損，因此調整脫黑色素之條件，將脫黑色素之時間縮短為 30 分鐘，組織切片先浸泡於 0.25% 過錳酸鉀溶液 15 分鐘，然後水洗兩次，再浸泡於 5% 草酸溶液 1 分鐘，然後水洗 10 分鐘，在顯微鏡下觀察黑色素已經脫除完全 (圖 5-1)。少數黑色素較多的檢體即使水洗 10 分鐘後，仍然有部分黑色素殘留，但是在熱誘導抗原修復完成後，黑色素已經脫除完全，我們推測在進行熱誘導抗原修復時，脫黑色素亦在進行。脫黑色素後，將進行 IHC，然後分別將蛋白質表現的量及強度



評為 0-4 分及 0-3 分，再依照兩數相乘的乘積來評估蛋白質表現，乘積為 8-12、6、2-4 及 0-1 分別評為蛋白質表現強、中、弱及陰性，蛋白質表現將由兩位病理獸醫師進行評估，若是評分結果有差異，獸醫師們將進行討論。

5.3 基因型篩檢

基因序列的改變可能會造成限制酶切位改變，因此使用 PCR-RFLP 可以進行特定基因突變之篩檢。KIT L578P (T1733C) 突變會造成限制酶切位 *Alu I* 消失，因此本研究先以聚合酶連鎖反應增幅大小為 190 bp 之產物，進行純化後，再進行限制酶切割，最後進行電泳，若是 KIT wild type 則會產生 44、71 及 75 bp 之片段，而 KIT L578P (T1733C) 突變會產生 71、119 bp 之片段，由於產物片段很小，一般的瓊脂凝膠 (Agarose gel) 無法提供良好的解析度，因此我們使用 10% 聚丙烯酰胺凝膠 (Polyacrylamide gel) 進行電泳 (Maniatis et al., 1975)。

本研究是首次針對 KIT L578P 及 NRAS Q61K 這兩個基因突變在台灣犬黑色素瘤的發生率進行研究，兩者在犬黑色素瘤分別有 16% (12/73) 及 75% (55/73) 的發生率，其中有 12 個組織 (16%, 12/73) 同時帶有 KIT L578P 及 NRAS Q61K 突變，我們還發現一個口腔黑色素瘤組織為 NRAS Q61K 同型合子突變。參考人黑色素瘤的相關文獻，KIT 及 NRAS 突變各佔 3% 及 20% (Postow and Carvajal, 2012)，同時帶有兩個基因突變會影響腫瘤對藥物的感受性 (Abdel-Wahab et al., 2014)，有趣的是，根據我們的研究結果，KIT 及 NRAS 的基因突變在犬黑色素瘤的發生率 (16% 及 75%) 都遠高於人黑色素瘤 (3% 及 20%)，許多國外學者在犬黑色素瘤進行這兩個基因突變篩檢都沒有找到突變 (Watzinger et al., 2001; Murakami et al., 2011)，而在犬肥大細胞瘤有文獻發現 KIT 突變的發生率在台灣及國外相差很大 (Turrel et al., 1988; London et al., 1999; Hung, 2011)，或許 KIT 及 NRAS 基因突變的發生與區域有關，而根據本研究在台灣發現 NRAS Q61K 同型

合子突變，推測 NRAS Q61K 突變常見台灣犬黑色素瘤，但是原因不清楚。

另外，我們在一個犬口腔黑色素瘤組織同時發現 NRAS Q61K 及 NRAS Q61E 突變，組織切片在顯微鏡高倍視野下有絲分裂率高達 5。在人黑色素瘤，NRAS Q61K 及 NRAS Q61E 突變約各佔 NRAS 突變的 34%和 1% (Cox and Der, 2010)，另外，也有文獻在一位腫瘤轉移的病患發現同時帶有 NRAS Q61K 及 NRAS Q61E 突變 (Trunzer et al., 2013)。

然後我們以 HRM 進行基因型篩檢，這是一個檢測 SNP 很靈敏的方式，但許多因子會影響實驗結果，例如染劑、引子對、去氧核糖核酸等等，我們使用質體 DNA 作為標準控制組，成功建立 HRM 系統，原生型及突變型質體 DNA 的圖形不一樣，但是原生型的檢體及質體 DNA 圖形不一致，因此我們建立的系統無法應用於本實驗之檢體進行基因型篩檢，推測是質體與檢體使用的抽 gDNA 套組不同所致 (Li et al., 2011)。

5.4 統計分析

將蛋白質表現與腫瘤類型、腫瘤位置、腫瘤分級及基因型進行統計分析，依照評估蛋白質表現的方式不同，統計的結果有差異。

若是將蛋白質表現量及強度的乘積為 8-12、6、2-4 及 0-1 分別評估為蛋白質表現強、中、弱及陰性，然後進行統計分析，結果顯示在非口腔型黑色素瘤，帶有 KIT L578P 突變的腫瘤其 KIT 蛋白質表現增加，且發生在嘴唇的黑色素瘤其 NRAS 蛋白質表現比皮膚、腳趾及眼睛的腫瘤高，其他資料無顯著差異。根據文獻，帶有 KIT L578P 突變的人黑色素瘤其 KIT 蛋白質表現會增加 (Torres-Cabala et al., 2009)，並且帶有 KIT L576P 突變之人黑色素瘤只對 Dasatinib[®] 有反應 (Antonescu et al., 2007)，雖然目前尚未有小分子標靶治療藥物被應用於犬黑色素瘤之治療 (Ito et al., 2013)，不過本研究發現 16% (12/73) 犬黑色素瘤帶有 KIT L578P

突變，或許可以作為未來臨床獸醫師使用小分子標靶治療藥物的參考。

若是將蛋白質表現量及強度的乘積為 9-12、6-8、2-4 及 0-1 分別評估為蛋白質表現強、中、弱及陰性，然後進行統計分析，結果顯示口腔的腫瘤其 KIT 蛋白質表現比其他部位高（表 5-1）。

若是將蛋白質表現量及強度的乘積為 8-12、6、2-4 及 0-1 分別評估為蛋白質表現強、中、弱及陰性，然後進行統計分析，結果顯示轉移的腫瘤其 NRAS 蛋白質表現較高（表 5-2），腫瘤惡化時 NRAS 會過度表現 (Buary et al., 2011)，本研究的發現或許可以為獸醫師診斷口腔型黑色素瘤的預後提供參考，由於經濟的考量，許多患畜未接受完整的超音波及放射線檢查，因此獸醫師無法對腫瘤惡性程度作適當的評估，根據本研究之實驗結果顯示轉移腫瘤 NRAS 蛋白質表現會增加，可以為獸醫師提供臨床預後診斷之參考。

第六章

結論 (Conclusion)

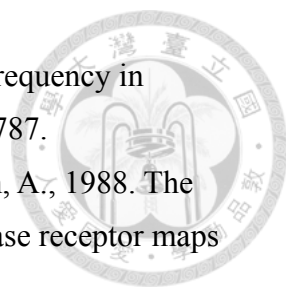
在我們研究收集了 139 個組織蠟塊（源自 130 個動物），統計結果顯示在犬非口腔型黑色素瘤，帶有 KIT L578P 突變的腫瘤其 KIT 蛋白質表現增加 ($p < 0.05$)，且嘴唇型黑色素瘤其 NRAS 蛋白質表現比發生在皮膚、腳趾及眼睛的黑色素瘤高 ($p < 0.05$)，其他統計沒有差異，另外，我們首次在犬黑色素瘤組織發現 NRAS Q61E (C181G) 突變。

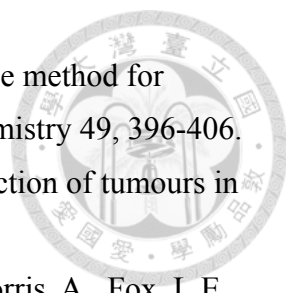


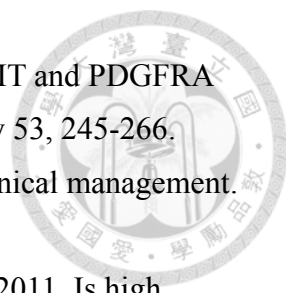


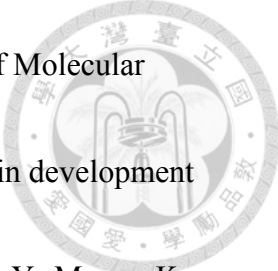
參考文獻 (Reference)

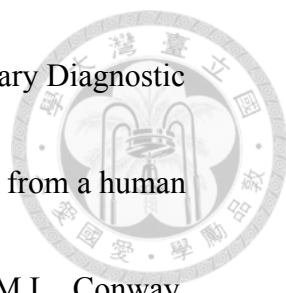
- Abdel-Wahab, O., Klimek, V.M., Gaskell, A.A., Viale, A., Cheng, D., Kim, E., Rampal, R., Bluth, M., Harding, J.J., Callahan, M.K., Merghoub, T., Berger, M.F., Solit, D.B., Rosen, N., Levine, R.L., Chapman, P.B., 2014. Efficacy of intermittent combined RAF and MEK inhibition in a patient with concurrent BRAF- and NRAS-mutant malignancies. *Cancer Discovery* 4, 538-545.
- Albino, A.P., Strange, R.L., Oliff, A.I., Farth, M.E., Old, L.J., 1984. Transforming ras genes from human melanoma: a manifestation of tumor heterogeneity. *Nature* 308, 69-72.
- Alexeev, V., Yoon, K., 2006. Distinctive role of the cKit receptor tyrosine kinase signaling in mammalian melanocytes. *Journal of Investigative Dermatology* 126, 1102-1110.
- Antonescu, C.R., Busam, K.J., Francone, T.D., Wong, G.C., Guo, T., Agaram, N.P., Besmer, P., Jungbluth, A., Gimbel, M., Chen, C.-T., Veach, D., Clarkson, B.D., Paty, P.B., Weiser, M.R., 2007. L576P KIT mutation in anal melanomas correlates with KIT protein expression and is sensitive to specific kinase inhibition. *International Journal of Cancer* 121, 257-264.
- Barbacid, M., 1987. Ras genes. *Annual Review of Biochemistry* 56, 779-827.
- Barletta, C., Scillato, F., Sega, F., Mannella, E., 1992. Genetic alteration in gastrointestinal cancer: a molecular and cytogenetic study. *Anticancer Research* 13, 2325-2329.
- Beermann, F., Ganls, R., 1995. Regulation of pigmentation during mammalian development. *Advances in Developmental Biochemistry* 3, 149-177.
- Bergman, P.J., Wolchok, J.D., 2008. Of mice and men (and dogs): development of a xenogeneic DNA vaccine for canine oral malignant melanoma. *Cancer Therapy* 6, 817-826.
- Bolon, B., Calderwooddays, M.B., Hall, B.J., 1990. Characteristics of canine melanomas and comparison of histology and DNA ploidy to their biologic behavior. *Veterinary Pathology* 27, 96-102.
- Bos, J.L., 1989. Ras oncogenes in human cancer: a review. *American Association for Cancer Research* 49, 4682-4689.
- Bostock, D.E., 1986. Neoplasms of the skin and subcutaneous tissues. *British veterinary journal* 142, 1-19.
- Buery, R.R., Siar, C.H., Katase, N., Gunduz, M., Lefevre, M., Fujii, M., Inoue, M.,

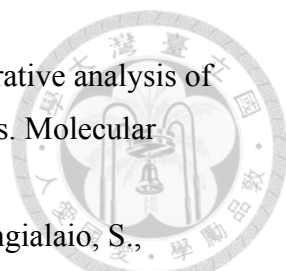
- 
- Setsu, K., Nagatsuka, H., 2011. NRAS and BRAF mutation frequency in primary oral mucosal melanoma. *Oncology Reports* 26, 783-787.
- Chabot, B., Stephenson, D.A., Chapman, V.M., Besmer, P., Bernstein, A., 1988. The proto oncogene c-kit encoding a transmembrane tyrosine kinase receptor maps to the mouse W locus. *Nature* 335, 88-89.
- Chu, P.-Y., Pan, S.-L., Liu, C.-H., Lee, J., Yeh, L.-S., Liao, A.T., 2013. KIT gene exon 11 mutations in canine malignant melanoma. *The Veterinary Journal* 196, 226-230.
- Cox, A.D., Der, C.J., 2010. Ras history: the saga continues. *Small GTPases* 1, 2-27.
- Debiec-Rychter, M., Sciot, R., Le Cesne, A., Schlemmer, M., Hohenberger, P., van Oosterom, A.T., Blay, J.-Y., Leyvraz, S., Stul, M., Casali, P.G., Zalcberg, J., Verweij, J., Van Glabbeke, M., Hagemeyer, A., Judson, I., 2006. KIT mutations and dose selection for imatinib in patients with advanced gastrointestinal stromal tumours. *European Journal of Cancer* 42, 1093-1103.
- Dressler, D., 2009. *The dog cancer survival guide beyond surgery, chemotherapy and radiation*. Maui Media, LLC.
- Fernandez-Medarde, A., Santos, E., 2011. Ras in cancer and developmental diseases. *Genes Cancer* 2, 344-358.
- Flaherty, K.T., Hodi, F.S., Fisher, D.E., 2012. From genes to drugs: targeted strategies for melanoma. *Nature Reviews Cancer* 12, 349-361.
- Galli, S.J., Tsai, M., Wershil, B.K., Tam, S.Y., Costa, J.J., 1995. Regulation of mouse and human mast cell development, survival and function by stem cell factor, the ligand for the c-kit Receptor. *International Archives of Allergy and Immunology* 107, 51-53.
- Giuliano, E.A., Chappell, R., Fischer, B., Dubielzig, R.R., 1999. A matched observational study of canine survival with primary intraocular melanocytic neoplasia. *Veterinary Ophthalmology* 2, 185-190.
- Glennon, T.M., Villa, J., Warshel, A., 2000. How does GAP catalyze the GTPase reaction of ras: a computer simulation study. *Biochemistry* 39, 9641-9651.
- Guerrero, S., Casanova, I., Farre, L., Mazo, A., Capella, G., Mangués, R., 2000. K-ras codon 12 mutation induces higher level of resistance to apoptosis and predisposition to anchorage-independent growth than codon 13 mutation or proto-oncogene overexpression. *Cancer Research* 60, 6750-6756.
- Gundry, C.N., Vandersteen, J.G., Reed, G.H., Pryor, R.J., Chen, J., Wittwer, C.T., 2003.

- 
- Amplicon melting analysis with labeled primers: a closed-tube method for differentiating homozygotes and heterozygotes. *Clinical Chemistry* 49, 396-406.
- Harvey, J., 1964. An unidentified virus which causes the rapid production of tumours in mice. *Nature* 204, 1104-1105.
- Henry, C.J., Jr, W.G.B., Whitley, E.M., Tyler, J.W., Ogilvie, G.K., Norris, A., Fox, L.E., Morrison, W.B., Hammer, A., Vail, D.M., Berg, J., 2005. Canine digital tumors: a veterinary cooperative oncology group retrospective study of 64 dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 19, 729-724.
- Hornick, J.L., Fletcher, C.D.M., 2007. The role of KIT in the management of patients with gastrointestinal stromal tumors. *Human Pathology* 38, 679-687.
- Hung, C.-L., 2011. The correlations between the expressions of c-kit and other emerging proteins in canine MCTs., Graduate Institute of Veterinary Medicine School National Taiwan University, 1-96.
- Isotani, M., Ishida, N., Tominaga, M., Tamura, K., Yagihara, H., Ochi, S., Kato, R., Kobayashi, T., Fujita, M., Fujino, Y., Setoguchi, A., Ono, K., Washizu, T., Bonkobara, M., 2008. Effect of tyrosine kinase inhibition by imatinib mesylate on mast cell tumors in dogs. *Journal of veterinary internal medicine* 22, 985-988.
- Ito, K., Kobayashi, M., Kuroki, S., Sasaki, Y., Iwata, T., Mori, K., Kuroki, T., Ozawa, Y., Tetsuka, M., Nakagawa, T., Hiroi, T., Yamamoto, H., Ono, K., Washizu, T., Bonkobara, M., 2013. The proteasome inhibitor bortezomib inhibits the growth of canine malignant melanoma cells in vitro and in vivo. *The Veterinary Journal* 198, 577-582.
- Kinsler, V.A., Thomas, A.C., Ishida, M., Bulstrode, N.W., Loughlin, S., Hing, S., Chalker, J., McKenzie, K., Abu-Amero, S., Slater, O., Chanudet, E., Palmer, R., Morrogh, D., Stanier, P., Healy, E., Sebire, N.J., Moore, G.E., 2013. Multiple congenital melanocytic nevi and neurocutaneous melanosis are caused by postzygotic mutations in codon 61 of NRAS. *Journal of Investigative Dermatology* 133, 2229-2236.
- Kirsten, W., Mayer, L.A., 1967. Morphologic responses to a murine erythroblastosis virus. *Journal of the National Cancer Institute* 39, 311-335.
- Klinac, D., Gray, E.S., Millward, M., Ziman, M., 2013. Advances in personalized targeted treatment of metastatic melanoma and non-invasive tumor monitoring. *Front Oncology* 3, 54.

- 
- Lasota, J., Miettinen, M., 2008. Clinical significance of oncogenic KIT and PDGFRA mutations in gastrointestinal stromal tumours. *Histopathology* 53, 245-266.
- Levene, A., 1972. Moles and melanoma: the pathological basis of clinical management. *Journal of the Royal Society of Medicine* 65, 137-140.
- Li, B.-S., Wang, X.-Y., Ma, F.-L., Jiang, B., Song, X.-X., Xu, A.-G., 2011. Is high resolution melting analysis (HRMA) accurate for detection of human disease-associated mutations? A meta analysis. *PLoS One* 6, e28078.
- London, C.A., Galli, S.J., Yuuki, T., Hu, Z.-Q., Helfand, S.C., Geissler, E.N., 1999. Spontaneous canine mast cell tumors express tandem duplications in the proto-oncogene c-kit. *Experimental Hematology* 27, 689-697.
- Magee, T., Marshall, C., 1999. New Insights into the Interaction of Ras with the Plasma Membrane. *Cell* 98, 9-12.
- Maniatis, T., Jeffrey, A., Sandet, H., 1975. Chain length determination of small double- and single-stranded DNA molecules by polyacrylamide gel electrophoresis. *Biochemistry* 14, 3787-3793.
- Mao, F., Leung, W.-Y., Xin, X., 2007. Characterization of EvaGreen and the implication of its physicochemical properties for qPCR applications. *BMC Biotechnology* 7, 76.
- Marchant, J., Mange, A., Larrieux, M., Costes, V.r., Solassol, J.r.m., 2014. Comparative evaluation of the new FDA approved THxIDTM-BRAF test with high resolution melting and sanger sequencing. *BMC Cancer* 14, 519.
- Marino, D.J., Matthiesen, D.T., Stefanacci, J.D., Moroff, S.D., 1995. Evaluation of dogs with digit masses: 117 cases (1981-1991). *Journal of the American Veterinary Medical Association* 207, 726-728.
- Mcauliffe, J.C., Lazar, A.J., Yang, D., Steinert, D.M., Qiao, W., Thall, P.F., Raymond, A.K., Benjamin, R.S., Trent, J.C., 2007. Association of intratumoral vascular endothelial growth factor expression and clinical outcome for patients with gastrointestinal stromal tumors treated with imatinib mesylate. *Clinical Cancer Research* 13, 6727-6734.
- Meuten, D.J., 2008. *Tumors in domestic animals*. Wiley.
- Miettinen, M., Lasota, J., 2005. KIT (CD117): a review on expression in normal and neoplastic tissues, and mutations and their clinicopathologic correlation. *Applied Immunohistochemistry and Molecular Morphology* 13, 205-220.
- Montgomery, J.L., Sanford, L.N., Wittwer, C.T., 2010. High-resolution DNA melting

- 
- analysis in clinical research and diagnostics. *Expert Review of Molecular Diagnostics* 10, 219-240.
- Mort, R.L., Jackson, I.J., Patton, E.E., 2015. The melanocyte lineage in development and disease. *Development* 142, 620-632.
- Murakami, A., Mori, T., Sakai, H., Murakami, M., Yanai, T., Hoshino, Y., Maruo, K., 2011. Analysis of KIT expression and KIT exon 11 mutations in canine oral malignant melanomas. *Veterinary and Comparative Oncology* 9, 219-224.
- Niwa, Y., Kasugai, T., Ohno, K., Morimoto, M., Yamazaki, M., Dohmae, K., Nishimune, Y., Kondo, K., Kitamura, Y., 1991. Anemia and mast cell depletion in mutant rats that are homozygous at white spotting (*Ws*) locus. *Blood* 78, 1936-1941.
- Nocka, K., Majumder, S., Chabot, B., Ray, P., Cervone, M., Bernstein, A., Besmer, P., 1989. Expression of c-kit gene products in known cellular targets of *W* mutations in normal and *W* mutant mice: evidence for an impaired c-kit kinase in mutant mice. *Genes and Development* 3, 816-826.
- North, S.M., Banks, T.A., 2009. *Small Animal Oncology: An Introduction*. Elsevier Health Sciences UK.
- Pawelek, J., Körner, A., Bergstrom, A., Bologna, J., 1980. New regulators of melanin biosynthesis and the autodestruction of melanoma cells. *Nature* 286, 617-619.
- Pawelek, J.M., Körner, A.M., 1982. The biosynthesis of mammalian melanin. *American Scientist* 70, 136-145.
- Poscha, C., Moslehi, H., Feeney, L., Green, G.A., Ebaee, A., Feichtenschlager, V., Chong, K., Peng, L., Dimon, M.T., Phillips, T., Daud, A.I., McCalmont, T.H., LeBoit, P.E., Ortiz-Urda, S., 2013. Combined targeting of MEK and PI3K/mTOR effector pathways is necessary to effectively inhibit NRAS mutant melanoma in vitro and in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110, 4015-4020.
- Postow, M.A., Carvajal, R.D., 2012. Therapeutic implications of KIT in melanoma. *The Cancer Journal* 18, 137-141.
- Raskin, R.E., Meyer, D.J., 2009. *Raskin: canine and feline cytology, pageburst, access code: a color atlas and interpretation guide*. Elsevier Science Health Science Division.
- Schubbert, S., Shannon, K., Bollag, G., 2007. Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer. *Nature Reviews Cancer* 7, 295-308.
- Schultheiss, P.C., 2006. Histologic features and clinical outcomes of melanomas of lip,

- 
- haired skin, and nail bed locations of dogs. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 18, 422-425.
- Shih, C., Weinberg, R.A., 1982. Isolation of a transforming sequence from a human bladder carcinoma cell line. *Cell* 29, 161-169.
- Simpson, R.M., Bastian, B.C., Michael, H.T., Webster, J.D., Prasad, M.L., Conway, C.M., Prieto, V.M., Gary, J.M., Goldschmidt, M.H., Esplin, D.G., Smedley, R.C., Piris, A., Meuten, D.J., Kiupel, M., Lee, C.-C.R., Ward, J.M., Dwyer, J.E., Davis, B.J., Anver, M.R., Molinolo, A.A., Hoover, S.B., Rodriguez-Canales, J., Hewitt, S.M., 2013. Sporadic naturally occurring melanoma in dogs as a preclinical model for human melanoma. *Pigment Cell and Melanoma Research* 27, 37-47.
- Slominski, A., Zmijewski, M.A., Pawelek, J., 2012. L-tyrosine and L-dihydroxyphenylalanine as hormone-like regulators of melanocyte functions. *Pigment Cell and Melanoma Research* 25, 14-27.
- Spritz, R.A., Giebel, L.B., Holmes, S.A., 1992. Dominant negative and loss of function mutations of the c-kit (mast: stem cell growth factor receptor) proto-oncogene in human piebaldism. *American Journal of Human Genetics* 50, 261-269.
- Torres-Cabala, C.A., Wang, W.-L., Trent, J., Yang, D., Chen, S., Galbincea, J., Kim, K.B., Woodman, S., Davies, M., Plaza, J.A., Nash, J.W., Prieto, V.G., Lazar, A.J., Ivan, D., 2009. Correlation between KIT expression and KIT mutation in melanoma: a study of 173 cases with emphasis on the acral-lentiginous/mucosal type. *Modern pathology* 22, 1446-1456.
- Trunzer, K., Pavlick, A.C., Schuchter, L., Gonzalez, R., McArthur, G.A., Hutson, T.E., Moschos, S.J., Flaherty, K.T., Kim, K.B., Weber, J.S., Hersey, P., Long, G.V., Lawrence, D., Ott, P.A., Amaravadi, R.K., Lewis, K.D., Puzanov, I., Lo, R.S., Koehler, A., Kockx, M., Spleiss, O., Schell-Steven, A., Gilbert, H.N., Cockey, L., Bollag, G., Lee, R.J., Joe, A.K., Sosman, J.A., Ribas, A., 2013. Pharmacodynamic effects and mechanisms of resistance to vemurafenib in patients with metastatic melanoma. *Journal of Clinical Oncology* 31, 1767-1774.
- Turrel, J.M., Kitchell, B.E., Miller, L.M., Theon, A., 1988. Prognostic factors for radiation treatment of mast cell tumor in 85 dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 193, 936-940 %@ 0003-1488.
- Wardelmann, E., Buttner, R., Merkelbach-Bruse, S., Schildhaus, H.-U., 2007. Mutation analysis of gastrointestinal stromal tumors: increasing significance for risk assessment and effective targeted therapy. *Virchows Archiv* 451, 743-749.

- 
- Watzinger, F., Mayr, B., Gamerith, R., Vetter, Lion, T., 2001. Comparative analysis of ras proto-oncogene mutations in selected mammalian tumours. *Molecular Carcinogenesis* 30, 190-198.
- Went, P.T., Dirnhofer, S., Bundi, M., Mirlacher, M., Schraml, P., Mangialaio, S., Dimitrijevic, S., Kononen, J., Lugli, A., Simon, R., Sauter, G., 2004. Prevalence of KIT expression in human tumors. *Journal of Clinical Oncology* 22, 4514-4522.
- Wilcock, B., Peiffer, R., 1986. Morphology and behavior of primary ocular melanomas in 91 dogs. *Veterinary Pathology* 23, 418-424.
- Willmore-Payne, C., Holden, J.A., Tripp, S., Layfield, L.J., 2005. Human malignant melanoma: detection of BRAF- and c-kit-activating mutations by high-resolution amplicon melting analysis. *Human Pathology* 36, 486-493.
- Withrow, S.J., Vail, D.M., 2007. *Withrow and MacEwen's small animal clinical oncology*. Saunders Elsevier.
- Wittwer, C.T., Herrmann, M.G., Moss, A.A., Rasmussen, R.P., 1997. Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *BioTechniques* 22, 130-138.
- Wittwer, C.T., Reed, G.H., Gundry, C.N., Vandersteen, J.G., Pryor, R.J., 2003. High-resolution genotyping by amplicon melting analysis using LCGreen. *Clinical Chemistry* 49, 853-860.
- Woodman, S.E., Davies, M.A., 2010. Targeting KIT in melanoma: a paradigm of molecular medicine and targeted therapeutics. *Biochemical Pharmacology* 80, 568-574.

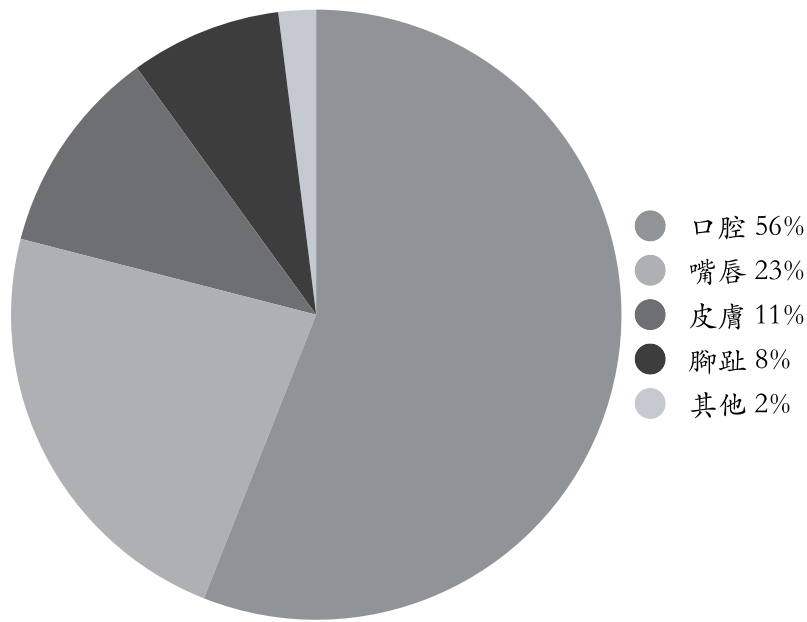
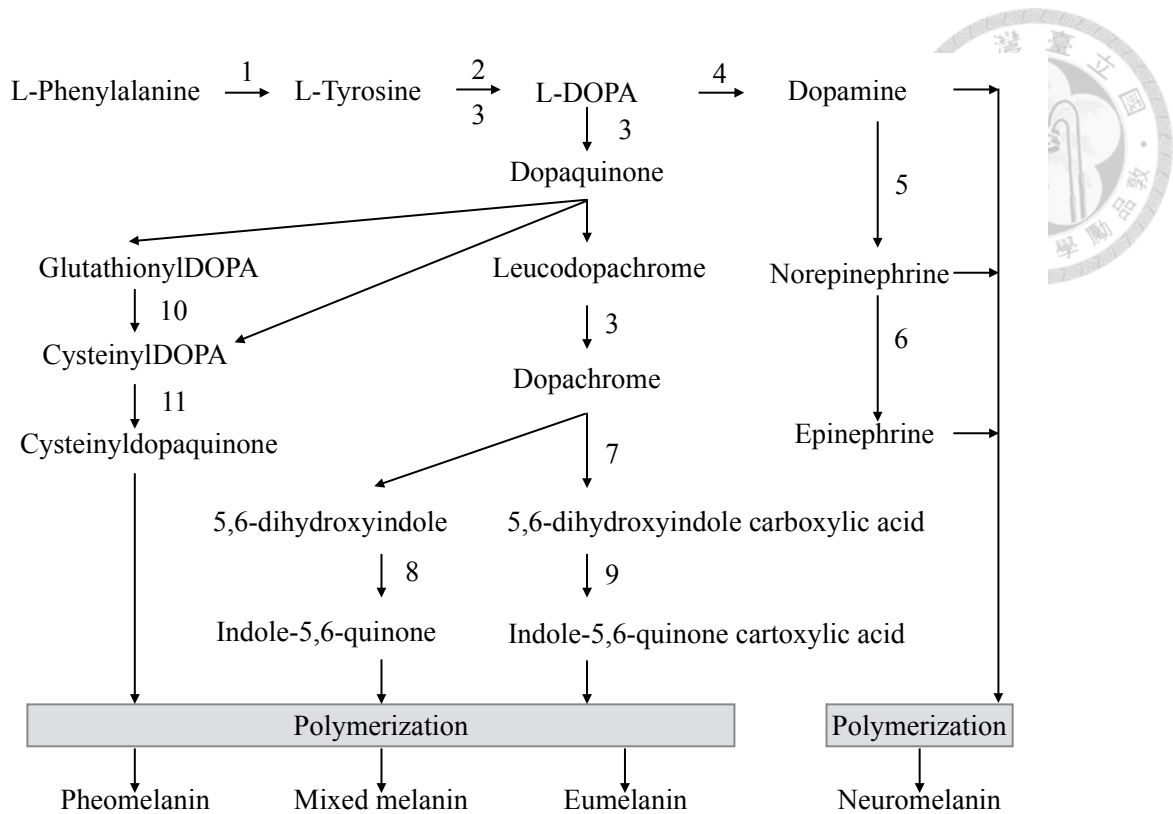


圖1-1. 各分型黑色素瘤發生的比例

依照腫瘤發生的部位，可以將腫瘤分為口腔、嘴唇、皮膚、腳趾以及其他型，其他型包含發生在眼睛的黑色素瘤。以下分別為不同分型黑色素瘤發生的比例：口腔型為 56%、嘴唇型為 23%、皮膚型為 11%、腳趾型為 8%以及其他型為 2%，其中以口腔型黑色素瘤最常見 (Raskin and Meyer, 2009)。



1. L-Phenylalanine hydroxylase
2. Tyrosine hydroxylase
3. Tyrosinase
4. L-amino acid decarboxylase
5. Dopamine β -monooxygenase
6. Phenylethanolamine N-methyltransferase
7. DCT/Tyrp2
8. Tyrosinase or peroxidase
9. Tyrp1 or peroxidase
10. γ -glutamyltranspeptidase
11. Peroxidase

圖1-2 黑色素之生成

酪氨酸酶與酪氨酸作用之後，產生多巴 (Dihydroxyphenylalanine, DOPA)，經過許多反應後，最後產生真黑色素 (Eumelanin) 以及嗜黑色素 (Pheomelanin)，前者呈現黑或是深棕色，後者呈現紅或是黃褐色，兩者最後呈現混合型黑色素 (Mixed melanin) (Pawelek et al., 1980; Pawelek and Körner, 1982; Beermann and Ganls, 1995; Slominski et al., 2012; Mort et al., 2015)。

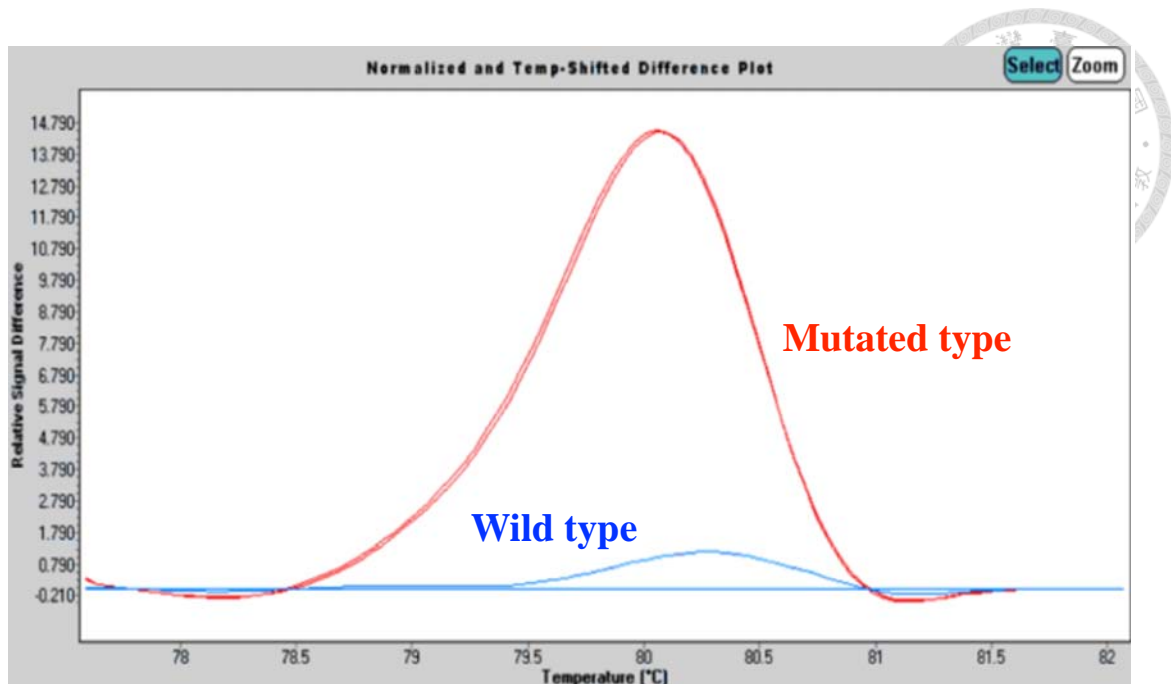


圖1-3. 差異圖形

差異圖形是以 Wild type 作為基準得到的曲線，經過電腦判讀可以辨別不同之基因型，紅色和藍色分別為 Wild type 及 Mutated type，顯示不同基因型的圖形不一樣 (Marchant et al., 2014)。

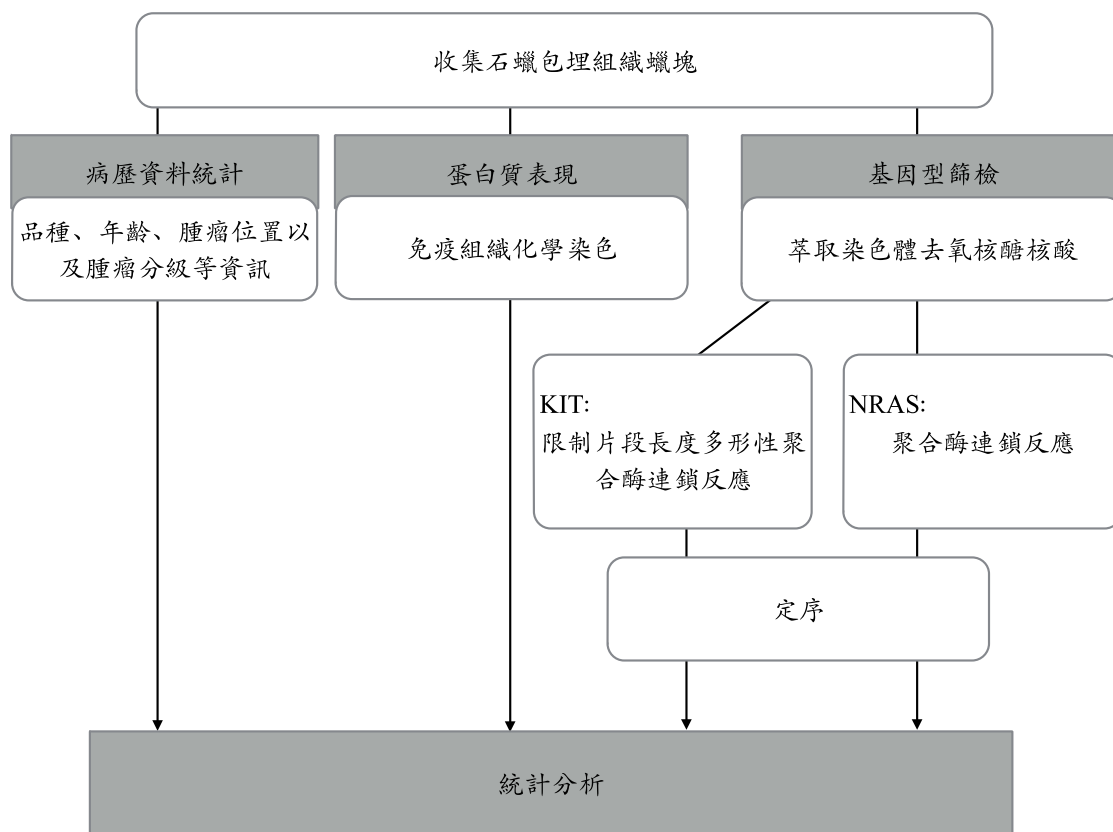


圖2-1. 實驗設計及流程

先收集經台大動物醫院病理獸醫師診斷為犬黑色素瘤的病歷，然後統計動物的品種、年齡、腫瘤位置、腫瘤分級等相關資料，再分別進行蛋白質表現以及基因型篩檢，最後進行統計分析。蛋白質表現方面，先進行免疫組織化學染色，蛋白質表現。基因型篩檢方面，先從組織蠟塊萃取 gDNA，KIT 的部分先以限制片段長度多形性聚合酶連鎖反應進行初步篩檢，疑似突變之檢體會送定序，NRAS 的部分則進行聚合酶連鎖反應後，送定序。

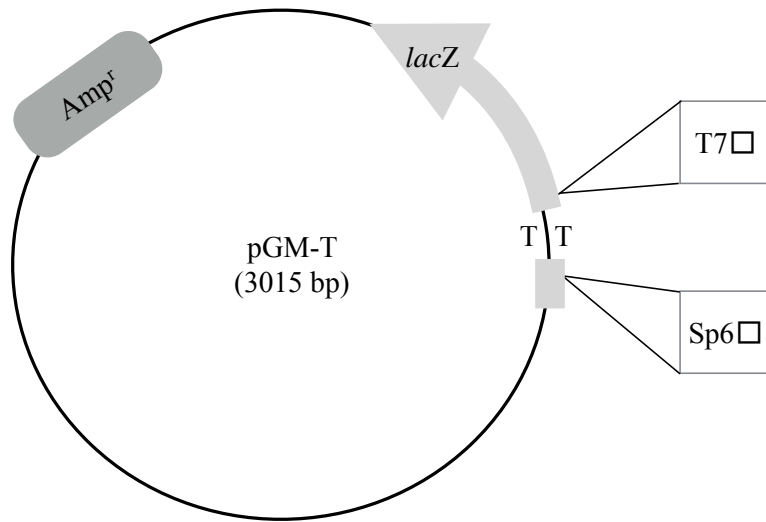
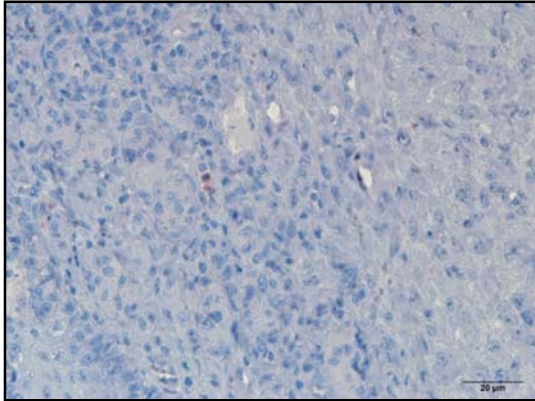


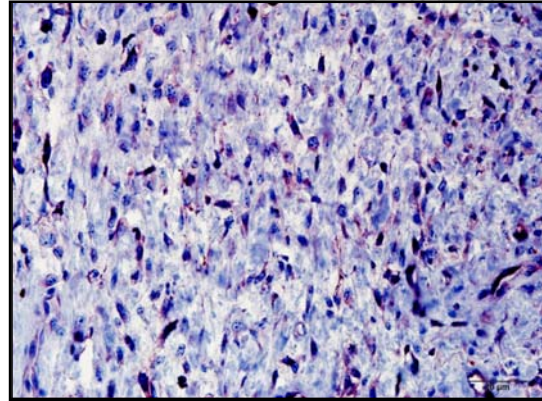
圖3-1. pGM-T vector 基因序列圖

我們使用 pGM-T (Tiagen[®]) 作為目標基因表現之載體，並以 Ampicillin 及藍白篩進行菌落之篩選，挑選呈現白色之菌落。藍白篩的原理：*lacZ* 是乳糖操作子的基因，會轉錄為 β -半乳糖苷酶， β -半乳糖苷酶會與半乳糖苷類似物 (X-gal) 作用，產生藍色的化合物，所以菌落呈現藍色，反之，若是目標基因插入 *lacZ* 序列內，則無法轉錄出有活性之 β -半乳糖苷酶，因此菌落呈現白色。T7 及 Sp6 的基因序列分別位於目標基因插入區域的兩端，可以作為菌落 PCR 使用之引子對。

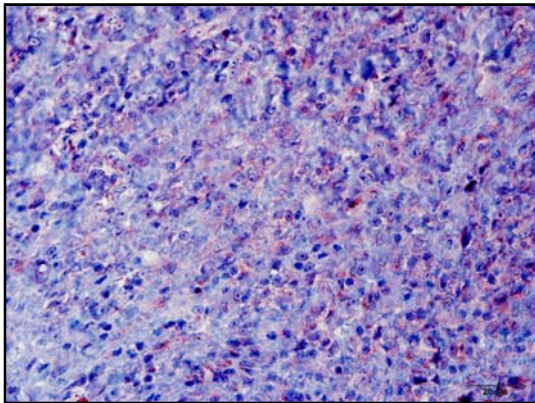
A



B



C



D

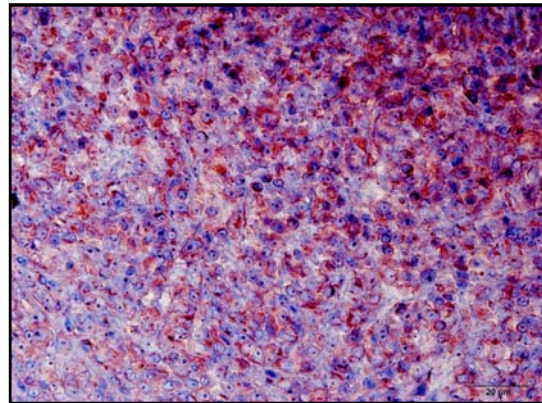
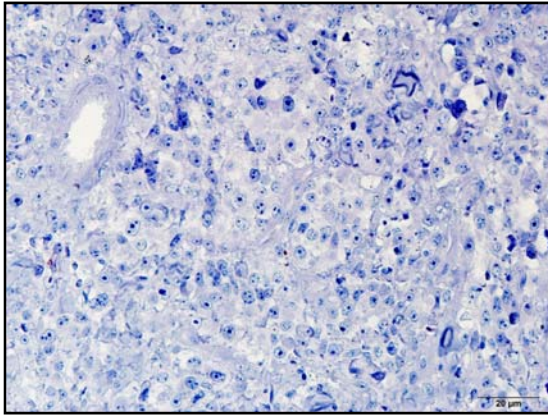


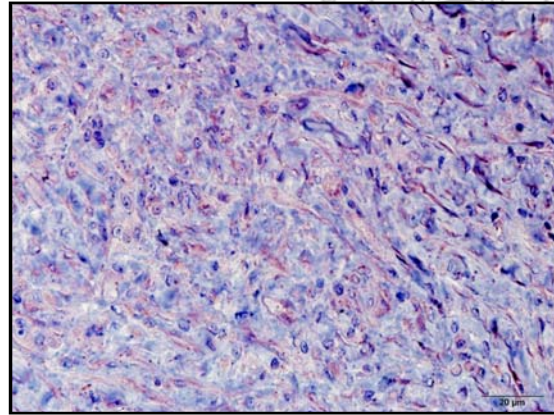
圖4-1. 蛋白質表現量評分標準

蛋白質表現的量，依照顯微鏡高倍視野下（放大 400 倍）腫瘤細胞表現蛋白質的比例分為 0%、1-10%、11-50%、51-80%以及 80%以上，然後分別評分為 0-4 分。評估圖 A 到 D 的蛋白質表現量為 1%、35%、60%以及 90%，評分為 1-4 分，之後將依此作為評估蛋白質表現量之評分標準。

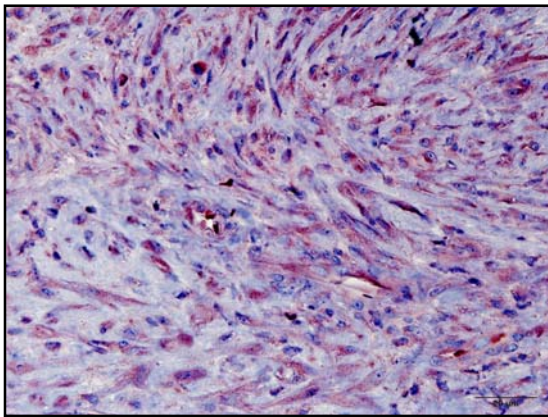
A



B



C



D

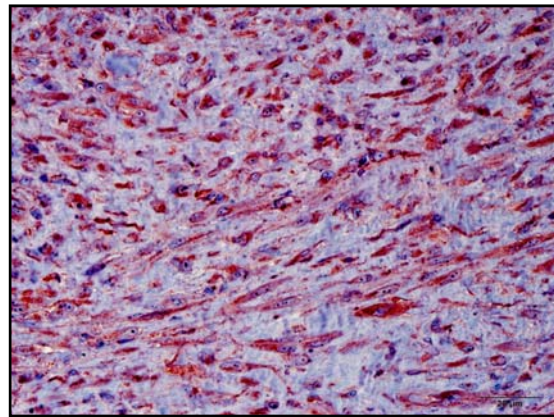


圖4-2. 蛋白質表現強度

依照呈色之深淺，將蛋白質表現的強度分為無、弱、中及強，並且分別評分為 0-3 分。評估圖 A 到 D 蛋白質表現強度分別評為 0-3 分，之後將依此作為評估蛋白質表現強度之評分標準。

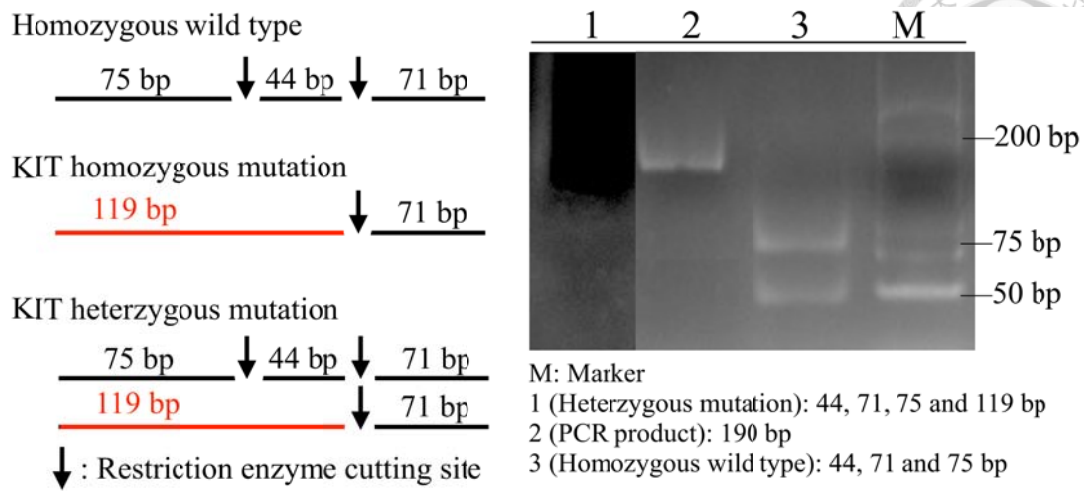


圖4-3. 限制片段長度多形性聚合酶連鎖反應

Lane 1 為 KIT heterozygous mutation，產物大小為 44、71、75 及 119 bp。Lane 2 為 PCR product，產物大小為 190 bp。Lane 3 為 Homozygous KIT wild type，產物大小為 44、71 及 75 bp。

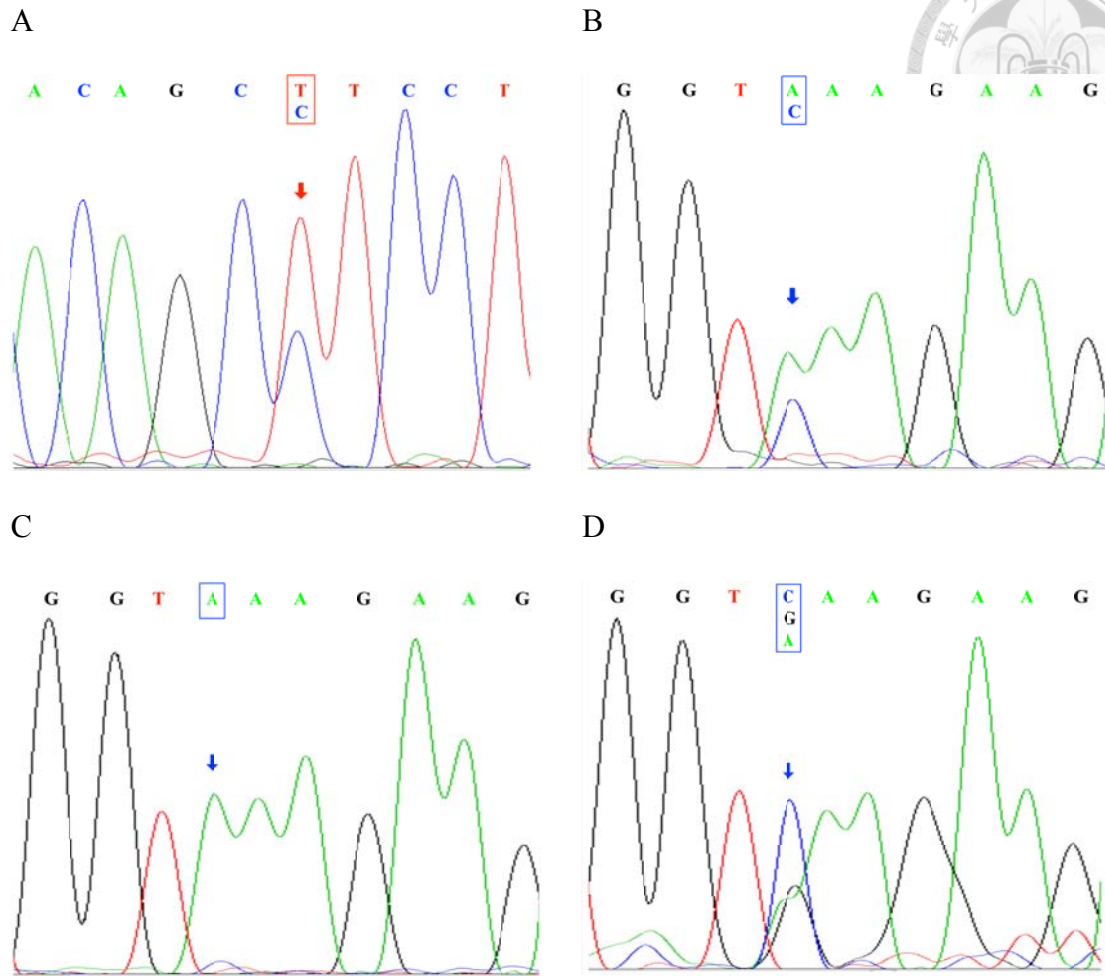
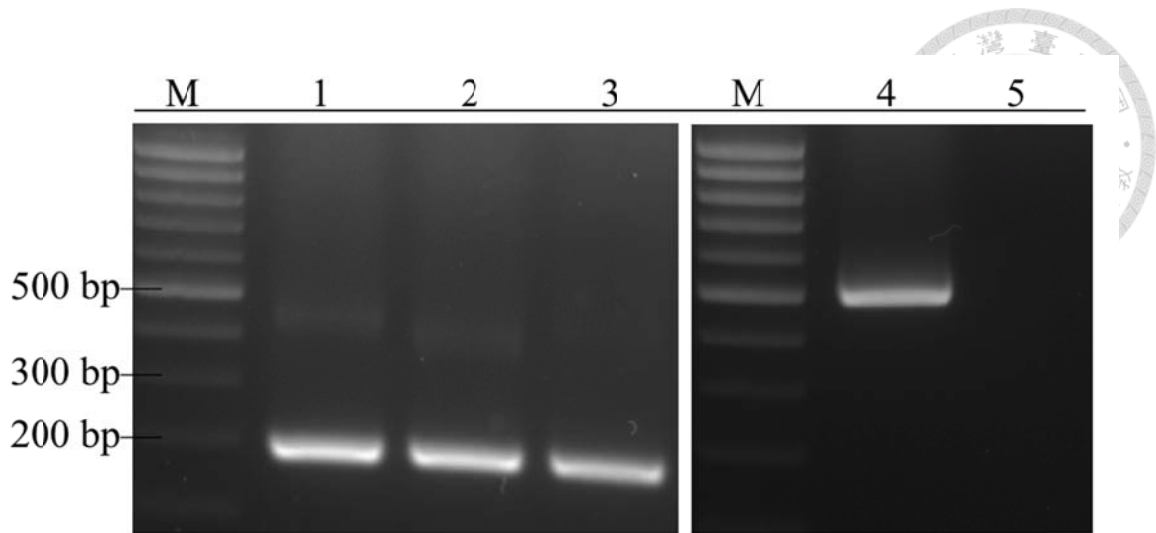


圖4-4. 檢體定序結果

圖 4-3 A：為 KIT L578P (T1733C) 突變的定序結果。圖 4-3 B：為帶有 NRAS Q61K (C181A) 突變的定序結果。圖 4-3 C：為帶有 NRAS Q61K (C181A) 同型合子突變的定序結果。圖 4-3 D：為同時帶有 NRAS Q61K (C181A) 及 NRAS Q61E (C181G) 突變的定序結果。紅色及藍色箭頭分別為 KIT 及 NRAS 基因。



M: Marker
1-3: KIT colony
KIT product: 190 bp
4-5: NRAS colony
NRAS product: 493 bp

圖4-5. 菌落 PCR 結果

圖 4-5 分別為 KIT 及 NRAS 菌落 PCR 結果。1-3 為插入 KIT 片段之 菌落 PCR 結果，預期產物為 190 bp，4-5 為插入 NRAS 片段之 菌落 PCR 結果，預期產物為 493 bp。

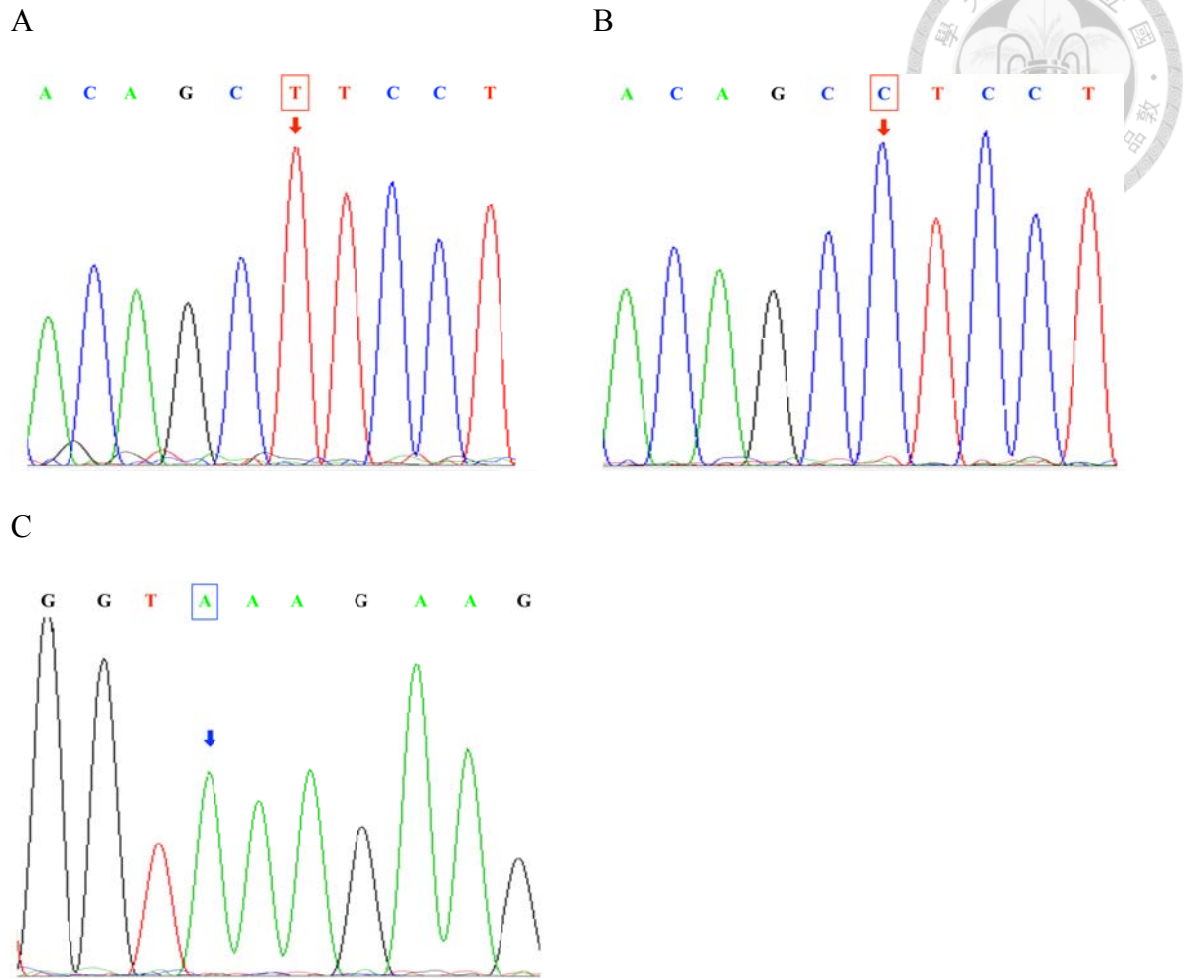
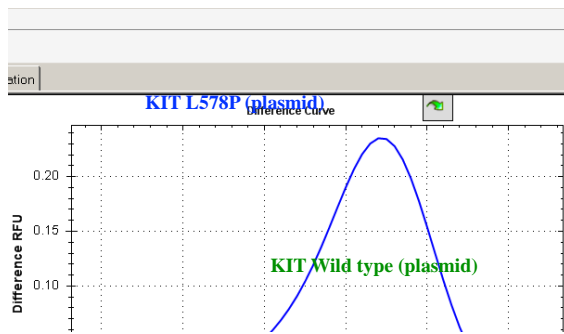


圖4-6. 質體定序結果

圖 A 為 KIT wild type 菌落定序結果。圖 B 為 KIT L578P (T1733C) 突變的菌落定序結果。圖 C 為 NRAS Q61K (C181A) 突變的菌落定序結果。紅色及藍色箭頭分別為 KIT 及 NRAS 基因。

A



B

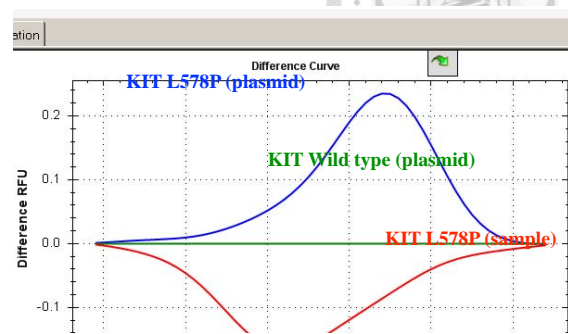
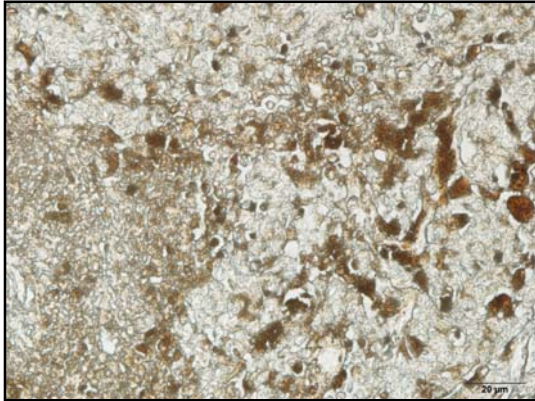


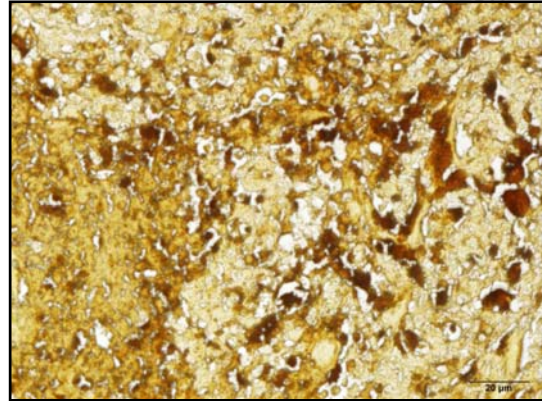
圖4-7. 高解析度熱溶解曲線分析結果

差異圖形是以 Wild type 作為基準得到的曲線，經過電腦判讀可以辨別不同之基因型。圖 A：綠色和藍色所使用的 DNA 分別為 KIT wild type 及 KIT L578P mutation 之 Plasmid DNA，顯示不同基因型的圖形不一樣。圖 B：紅色為萃取自組織蠟塊之 KIT wild type DNA，綠色和藍色分別為 KIT wild type 及 KIT L578P mutation 之 Plasmid DNA，KIT wild type 的質體（綠色）及檢體（紅色）圖形不一致，故由 Plasmid DNA 建立之系統無法被應用於組織蠟塊 DNA 基因型檢測。

A



B



C



圖5-1. 組織切片脫黑色素

由圖 A 到圖 C 顯示已完成脫黑色素。圖 A 為經過脫蠟以及回水處理之組織切片。圖 B 為經過 0.25% 過錳酸鉀溶液浸泡 15 分鐘後水洗兩次之組織切片。圖 C 為圖 B 經過 5% 草酸溶液浸泡 1 分鐘後水洗 10 分鐘之組織切片。



表 1-1. 世界衛生組織訂定的犬口腔型黑色素瘤分級系統

腫瘤分級	腫瘤直徑 (公分)	轉移到淋巴結	轉移到其他臟器
I	< 2	-	-
II	2-4	-	-
III	> 4	+	-
IV	> 4	+	+

-：沒有轉移。

+：轉移。

參考 WHO TNM classification of tumors in domestic animals。



表 1-2. 高解析度熱溶解曲線分析建議使用之 DNA 量

DNA 類型	高解析度熱溶解曲線分析建議使用 DNA 量
gDNA	100 pg-100 ng
Plasmid DNA (1-10 kb)	10 fg-1 ng
Amplification DNA	1 fg-10 pg

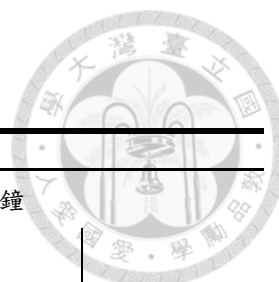


表 3-1. 使用的引子對以及實驗條件

引子對 (5'-3')	預期產物 (bp)	實驗條件	
P1 CCCATGTATGAAGTACAGTGGAAG	190	95°C 10 分鐘	重複 35 次
P2 GTTCCTAAAGTCATTGTTACACG		95°C 30 秒	
		59°C 30 秒	
		72°C 1 分鐘	
KIT HRM F1 TGAGGAGATCAATGGAAACAATTATGT	75	72°C 10 分鐘	重複 39 次
KIT HRM R1 GGAAACTCCCATTTGTGATCGT		95°C 2 分鐘	
		95°C 10 秒	
		60°C 30 秒	
		72°C 30 秒	
		95°C 30 秒	
NRG 2F ATTCCTGTTCCCCCACAA	493	60°C 1 分鐘	重複 35 次
NRG 2R CAGAATGGCCACATTTTCCT		95°C 10 分鐘	
		95°C 30 秒	
		60°C 30 秒	
NRAS HRM F1 TGGTCTCTCATGGCACTGTA	61	72°C 1 分鐘	重複 39 次
NRAS HRM R1 CCTGTCTGTTGGATATACTGGATAC		72°C 10 分鐘	
		95°C 2 分鐘	
		95°C 10 秒	
		60°C 30 秒	
		72°C 30 秒	
T7 TAATACGACTCACTATAGGG		95°C 30 秒	重複 35 次
Sp6 ATTTAGGTGACACTATAGA		47°C 30 秒	
		72°C 1 分鐘	
		72°C 10 分鐘	



表 3-2. 本研究參考之基因序列

基因	Accession number
KIT	NC_006599.3
	AF099030.1
NRAS	NC_006599.3
	NM_001287065.1

參考 NCBI。



表 4-1. 動物病歷資料、免疫組織化學評分及基因型篩檢之結果

品種	性別	腫瘤位置	KIT L578P	NRAS Q61K	腫瘤類型	腫瘤分級	蛋白質表現	
							KIT	NRAS
1	Mongrel	公畜	皮膚	未檢測	未檢測	無黑色素性黑色素瘤	弱	強
2	Mongrel	公畜	淋巴結	無	有	無黑色素性黑色素瘤	強	強
3	Mongrel	絕育母畜	口腔	無	有	惡性黑色素瘤	未知	
4	Miniature Pinscher	母畜	口腔	無	有	惡性黑色素瘤	未知	中弱
5	Mongrel	公畜	口腔	未檢測	未檢測	惡性黑色素瘤	3	
6	Cocker spaniel	公畜	口腔	無	有	惡性黑色素瘤	4	弱弱
7	Cocker spaniel	絕育公畜	口腔	未檢測	未檢測	惡性黑色素瘤	3	弱弱
8	Pomeranian	未知	口腔	無	有	惡性黑色素瘤	未知	中弱
9	Mongrel	公畜	口腔	未檢測	未檢測	惡性黑色素瘤	3	弱強
10	German Shepherd Dog	絕育公畜	腳趾	無	無	惡性黑色素瘤	未知	弱弱
11	Mongrel	公畜	口腔	未檢測	未檢測	惡性黑色素瘤	3	強強
12	Mongrel	公畜	眼睛	未檢測	未檢測	惡性黑色素瘤	未知	未知
13	Cocker spaniel	公畜	嘴唇	無	有	惡性黑色素瘤	弱	強
14	Schnauzer	公畜	皮膚	未檢測	未檢測	惡性黑色素瘤	陰性	弱
15	Mongrel	母畜	口腔	無	有	惡性黑色素瘤	2	強弱
16	Mongrel	母畜	皮膚	無	無	惡性黑色素瘤	中	強
17	Mongrel	絕育母畜	皮膚	有	有	惡性黑色素瘤	強	強
18	Mongrel	母畜	口腔	未檢測	未檢測	惡性黑色素瘤	4	中強
19	Mongrel	絕育母畜	皮膚	未檢測	未檢測	惡性黑色素瘤	未知	弱強
20	Maltese	絕育公畜	口腔	未檢測	未檢測	惡性黑色素瘤	未知	弱強
21	Mongrel	母畜	眼睛	無	有	惡性黑色素瘤	未知	弱弱
22	Mongrel	公畜	口腔	未檢測	未檢測	惡性黑色素瘤	3	弱強
23	Mongrel	絕育母畜	口腔	無	有	惡性黑色素瘤	3	中弱
24	Schnauzer	公畜	口腔	未檢測	未檢測	惡性黑色素瘤	3	強強
25	Mongrel	絕育母畜	口腔	未檢測	未檢測	惡性黑色素瘤	4	強強
26	Shih-Tzu	絕育母畜	口腔	未檢測	未檢測	惡性黑色素瘤	3	中強
27	Pomeranian	絕育母畜	口腔	無	無	惡性黑色素瘤	2	中強
28	Poodle	絕育公畜	口腔	無	有	惡性黑色素瘤	3	弱弱
29	Mongrel	絕育公畜	口腔	未檢測	未檢測	惡性黑色素瘤	4	強強
30	Golden Retriever	絕育母畜	皮膚	未檢測	未檢測	黑色素細胞瘤	弱	中
31	Mongrel	母畜	口腔	未檢測	未檢測	無黑色素性黑色素瘤	3	強弱
32	Beagle	絕育母畜	嘴唇	無	有	惡性黑色素瘤	弱	強
33	Schnauzer	絕育母畜	皮膚	無	無	惡性黑色素瘤	未知	未知
34	Mongrel	公畜	口腔	未檢測	未檢測	惡性黑色素瘤	4	未知未知
35	Labrador Retriever	公畜	口腔	無	有	無黑色素性黑色素瘤	1	強強
36	Golden Retriever	絕育公畜	口腔	無	有	惡性黑色素瘤	未知	強中
37	Golden Retriever	絕育公畜	口腔	無	有	惡性黑色素瘤	未知	弱強
38	Golden Retriever	絕育公畜	口腔	未檢測	未檢測	惡性黑色素瘤	未知	中強
39	Shih-Tzu	母畜	口腔	有	有	惡性黑色素瘤	4	弱強
40	Golden Retriever	絕育公畜	口腔	無	有	惡性黑色素瘤	1	弱中
41	Labrador Retriever	公畜	口腔	無	有	惡性黑色素瘤	1	中強
42	Mongrel	母畜	口腔	未檢測	未檢測	惡性黑色素瘤	4	弱強
43	Mongrel	母畜	口腔	無	無	惡性黑色素瘤	4	弱中
44	Mongrel	絕育母畜	眼睛	無	有	惡性黑色素瘤	未知	未知
45	Mongrel	絕育母畜	眼睛	有	有	惡性黑色素瘤	未知	未知
46	Schnauzer	公畜	腳趾	無	有	惡性黑色素瘤	弱	弱
47	Schnauzer	公畜	腳趾	有	有	惡性黑色素瘤	強	弱
48	Golden Retriever	絕育母畜	淋巴結	無	無	惡性黑色素瘤	弱	強
49	Mongrel	母畜	口腔	未檢測	未檢測	惡性黑色素瘤	4	強強
50	Mongrel	公畜	口腔	無	無	惡性黑色素瘤	4	中強
51	Schnauzer	絕育母畜	口腔	無	有	惡性黑色素瘤	1	強強
52	Pomeranian	公畜	口腔	無	有	惡性黑色素瘤	2	強強
53	Golden Retriever	母畜	口腔	有	有	惡性黑色素瘤	4	強強
54	Labrador Retriever	絕育母畜	口腔	無	有	惡性黑色素瘤	1	強強
55	Dachshund	絕育母畜	口腔	未檢測	未檢測	惡性黑色素瘤	4	強強
56	Mongrel	絕育公畜	口腔	無	有	惡性黑色素瘤	4	未知未知
57	Dachshund	公畜	口腔	未檢測	未檢測	惡性黑色素瘤	1	中強
58	Labrador Retriever	絕育母畜	口腔	無	無	無黑色素性黑色素瘤	未知	強強
59	Labrador Retriever	絕育母畜	口腔	無	有	無黑色素性黑色素瘤	未知	中強
60	Beagle	公畜	皮膚	無	有	惡性黑色素瘤	中	強強
61	Shih-Tzu	絕育公畜	嘴唇	無	無	惡性黑色素瘤	強	強
62	Mongrel	絕育公畜	皮膚	無	有	惡性黑色素瘤	強	強
63	Golden Retriever	絕育公畜	口腔	未檢測	未檢測	惡性黑色素瘤	未知	中強
64	Jack Russel	公畜	口腔	有	有	惡性黑色素瘤	3	強強
65	Shih-Tzu	絕育公畜	嘴唇	無	有	惡性黑色素瘤	中	強強
66	未知	絕育母畜	口腔	無	有	惡性黑色素瘤	2	強強
67	Labrador Retriever	絕育公畜	腳趾	無	有	惡性黑色素瘤	強	強
68	Labrador Retriever	絕育公畜	腳趾	無	無	惡性黑色素瘤	弱	強
69	Golden Retriever	公畜	皮膚	無	有	惡性黑色素瘤	強	強
70	Mongrel	絕育公畜	口腔	無	有	惡性黑色素瘤	1	中強



71	Pomeranian	絕育母畜	口腔	無	有	惡性黑色素瘤	2	強	強
72	Mongrel	未知	口腔	未檢測	未檢測	惡性黑色素瘤	2	強	強
73	Pomeranian	絕育母畜	口腔	無	有	惡性黑色素瘤	1	強	強
74	Schnauzer	絕育母畜	皮膚	無	有	惡性黑色素瘤	1	弱	強
75	Yorkshire	絕育公畜	口腔	無	有	惡性黑色素瘤	1	中	中
76	Mongrel	絕育母畜	口腔	無	無	惡性黑色素瘤	1	強	強
77	Mongrel	絕育母畜	皮膚	有	有	惡性黑色素瘤	1	強	強
78	Weimaraner	公畜	皮膚	有	有	惡性黑色素瘤	1	強	強
79	Siberian Husky	公畜	皮膚	有	有	惡性黑色素瘤	1	弱	強
80	Mongrel	絕育母畜	皮膚	有	有	惡性黑色素瘤	1	強	強
81	Chihuahua	公畜	皮膚	有	有	惡性黑色素瘤	1	強	強
82	Poodle	絕育公畜	皮膚	無	有	惡性黑色素瘤	1	強	強
83	Dachshund	母畜	皮膚	無	有	惡性黑色素瘤	1	強	強
84	Labrador Retriever	公畜	嘴唇	無	無	惡性黑色素瘤	1	弱	強
85	ChowChow	公畜	口腔	無	無	惡性黑色素瘤	3	強	強
86	Schnauzer	絕育公畜	嘴唇	無	無	惡性黑色素瘤	3	弱	強
87	Mongrel	公畜	口腔	無	有	惡性黑色素瘤	3	強	強
88	Mongrel	絕育母畜	皮膚	無	有	惡性黑色素瘤	3	中	中
89	German Shepherd Dog	公畜	皮膚	無	有	惡性黑色素瘤	3	強	強
90	Dachshund	公畜	腳趾	未檢測	未檢測	惡性黑色素瘤	3	強	強
91	Labrador Retriever	公畜	腳趾	無	有	惡性黑色素瘤	3	弱	強
92	Labrador Retriever	公畜	腳趾	未檢測	未檢測	惡性黑色素瘤	3	未知	未知
93	Labrador Retriever	公畜	口腔	無	無	惡性黑色素瘤	4	強	強
94	Labrador Retriever	公畜	口腔	無	無	惡性黑色素瘤	4	強	強
95	Schnauzer	絕育公畜	口腔	無	有	惡性黑色素瘤	2	強	強
96	Golden Retriever	公畜	口腔	無	有	惡性黑色素瘤	未知	弱	強
97	Dachshund	母畜	口腔	無	有	惡性黑色素瘤	2	強	強
98	Mongrel	母畜	口腔	未檢測	未檢測	惡性黑色素瘤	2	未檢測	未檢測
99	Mongrel	公畜	口腔	未檢測	未檢測	惡性黑色素瘤	3	未檢測	未檢測
100	Mongrel	絕育母畜	皮膚	未檢測	未檢測	惡性黑色素瘤	3	未檢測	未檢測
101	Mongrel	絕育母畜	眼睛	未檢測	未檢測	惡性黑色素瘤	3	未檢測	未檢測
102	Mongrel	公畜	口腔	未檢測	未檢測	惡性黑色素瘤	4	未檢測	未檢測
103	Mongrel	母畜	腳趾	無	無	惡性黑色素瘤	4	未檢測	未檢測
104	Mongrel	公畜	口腔	未檢測	未檢測	惡性黑色素瘤	4	未檢測	未檢測
105	Beagle	公畜	皮膚	未檢測	未檢測	惡性黑色素瘤	4	未檢測	未檢測
106	Mongrel	公畜	口腔	未檢測	未檢測	惡性黑色素瘤	3	未檢測	未檢測
107	Mongrel	母畜	口腔	未檢測	未檢測	惡性黑色素瘤	未知	未檢測	未檢測
108	Mongrel	絕育公畜	皮膚	無	無	惡性黑色素瘤	未知	未檢測	未檢測
109	Shih-Tzu	絕育母畜	口腔	未檢測	未檢測	黑色素細胞瘤	未知	未檢測	未檢測
110	Labrador Retriever	公畜	口腔	未檢測	未檢測	惡性黑色素瘤	3	未檢測	未檢測
111	Schnauzer	母畜	口腔	未檢測	未檢測	惡性黑色素瘤	4	未檢測	未檢測
112	Mongrel	公畜	口腔	未檢測	未檢測	惡性黑色素瘤	3	未檢測	未檢測
113	Pug	公畜	皮膚	未檢測	未檢測	黑色素細胞瘤	3	未檢測	未檢測
114	Cocker spaniel	公畜	嘴唇	未檢測	未檢測	惡性黑色素瘤	3	未檢測	未檢測
115	Mongrel	未知	眼睛	未檢測	未檢測	惡性黑色素瘤	3	未檢測	未檢測
116	Mongrel	公畜	眼睛	未檢測	未檢測	惡性黑色素瘤	3	未檢測	未檢測
117	Mongrel	公畜	皮膚	未檢測	未檢測	惡性黑色素瘤	3	未檢測	未檢測
118	Pekingese	母畜	口腔	未檢測	未檢測	惡性黑色素瘤	1	未檢測	未檢測
119	Shih-Tzu	絕育母畜	口腔	未檢測	未檢測	惡性黑色素瘤	2	未檢測	未檢測
120	Schnauzer	母畜	口腔	未檢測	未檢測	惡性黑色素瘤	2	未檢測	未檢測
121	Mongrel	母畜	口腔	未檢測	未檢測	惡性黑色素瘤	3	未檢測	未檢測
122	Mongrel	絕育母畜	口腔	未檢測	未檢測	惡性黑色素瘤	未知	未檢測	未檢測
123	Mongrel	公畜	嘴唇	未檢測	未檢測	惡性黑色素瘤	未知	未檢測	未檢測
124	Shih-Tzu	公畜	口腔	未檢測	未檢測	惡性黑色素瘤	未知	未檢測	未檢測
125	Mongrel	絕育母畜	口腔	未檢測	未檢測	惡性黑色素瘤	3	未檢測	未檢測
126	Mongrel	絕育母畜	口腔	未檢測	未檢測	惡性黑色素瘤	2	未檢測	未檢測
127	Golden Retriever	公畜	眼睛	未檢測	未檢測	惡性黑色素瘤	2	未檢測	未檢測
128	Poodle	絕育公畜	腳趾	未檢測	未檢測	惡性黑色素瘤	2	未檢測	未檢測
129	Golden Retriever	母畜	皮膚	未檢測	未檢測	惡性黑色素瘤	2	未檢測	未檢測
130	Shih-Tzu	絕育公畜	皮膚	未檢測	未檢測	無黑色素性黑色素瘤	2	未檢測	未檢測
131	Mongrel	公畜	皮膚	未檢測	未檢測	惡性黑色素瘤	2	未檢測	未檢測
132	Mongrel	公畜	口腔	未檢測	未檢測	惡性黑色素瘤	1	未檢測	未檢測
133	Labrador Retriever	絕育母畜	腳趾	未檢測	未檢測	黑色素細胞瘤	1	未檢測	未檢測
134	Mongrel	絕育公畜	口腔	未檢測	未檢測	惡性黑色素瘤	1	未檢測	未檢測
135	Mongrel	絕育母畜	皮膚	未檢測	未檢測	惡性黑色素瘤	1	未檢測	未檢測
136	Schnauzer	絕育公畜	皮膚	未檢測	未檢測	黑色素細胞瘤	1	未檢測	未檢測
137	Poodle	公畜	皮膚	未檢測	未檢測	惡性黑色素瘤	1	未檢測	未檢測
138	Dachshund	公畜	口腔	未檢測	未檢測	惡性黑色素瘤	未知	未檢測	未檢測
139	Mongrel	公畜	口腔	無	有	惡性黑色素瘤	3	中	強

-: 無。
+: 有。



表 4-2. 動物性別

	公畜	絕育公畜	母畜	絕育母畜
數量 (%) (N=127)	50 (39.37)	23 (18.11)	21 (16.54)	33 (25.98)

表 4-3. 動物品種

	數量 (%) (N=130)
Mongrel	56 (43.85)
Schnauzer	11 (8.46)
Labrador Retriever	11 (8.46)
Golden Retriever	10 (7.69)
Shih-Tzu	8 (6.15)
Dachshund	5 (3.85)
Pomeranian	5 (3.85)
Cocker spaniel	4 (3.08)
Poodle	4 (3.08)
Beagle	3 (2.31)
German Shepherd Dog	2 (1.54)
Chihuahua	1 (0.77)
ChowChow	1 (0.77)
Jack Russel	1 (0.77)
Maltese	1 (0.77)
Miniature Pinscher	1 (0.77)
Pekingese	1 (0.77)
Pug	1 (0.77)

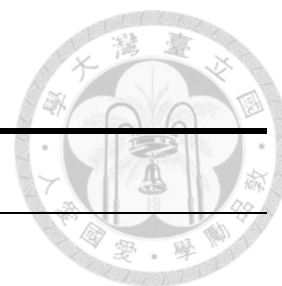




表 4-4. 腫瘤類型

	黑色素細胞瘤	惡性黑色素瘤	無黑色素性黑色素瘤
數量 (%) (N=130)	5 (3.85)	120 (92.31)	5 (3.85)

表 4-5. 腫瘤位置

	口腔	嘴唇	皮膚	腳趾	眼睛	淋巴結
數量 (%) (N=139)	80 (57.55)	8 (5.76)	30 (21.58)	11 (7.91)	8 (5.76)	2 (1.44)

表 4-6. 腫瘤分級

	I	II	III	IV
數量 (%) (N=64)	14 (21.88)	12 (18.75)	20 (31.25)	18 (28.13)

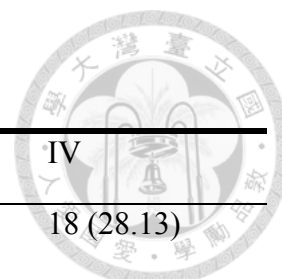




表 4-7. 蛋白質表現

	強	中	弱	陰性
KIT 蛋白質表現數量 (%) (N=91)	41 (45.05)	20 (21.98)	29 (31.87)	1 (1.10)
NRAS 蛋白質表現數量 (%) (N=91)	69 (75.82)	8 (8.79)	14 (15.38)	0 (0)

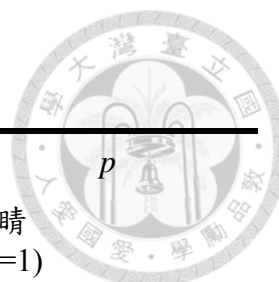


表 4-8. 蛋白質表現與腫瘤位置統計結果

蛋白質表現		腫瘤位置 (N=89)					p
		口腔 (N=57)	嘴唇 (N=6)	皮膚 (N=18)	腳趾 (N=7)	眼睛 (N=1)	
KIT	陰性	0	0	1	0	0	0.239 ^a
	弱	15	4	4	4	1	
	中	15	1	4	0	0	
	強	27	1	9	3	0	
NRAS	陰性	0	0	0	0	0	0.083 ^a
	弱	9	0	1	3	1	
	中	6	0	2	0	0	
	強	42	6	15	4	0	

a: Kruskal-Wallis test

p 均>0.05

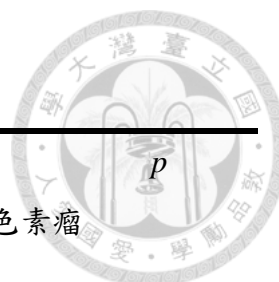


表 4-9. 蛋白質表現與腫瘤類型統計結果

蛋白質表現	腫瘤類型 (N=91)			<i>p</i>
	黑色素細胞瘤 (N=1)	惡性黑色素瘤 (N=84)	無黑色素性黑色素瘤 (N=6)	
KIT	陰性	0	1	0.264 ^a
	弱	1	27	
	中	0	19	
	強	0	37	
NRAS	陰性	0	0	0.330 ^a
	弱	0	13	
	中	1	6	
	強	0	65	

a: Mann-Whitney test
p 均>0.05

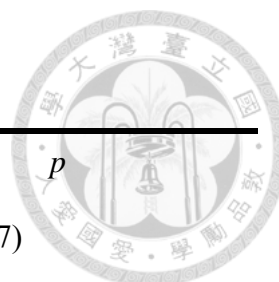


表 4-10. 蛋白質表現與腫瘤分級統計結果

蛋白質表現		腫瘤分級 (N=46)		<i>p</i>
		I and II (N=19)	III and IV (N=27)	
KIT	陰性	0	0	0.167 ^a
	弱	2	9	
	中	5	5	
	強	12	13	
NRAS	陰性	0	0	0.328 ^a
	弱	1	6	
	中	2	1	
	強	16	20	

a: Kruskal-Wallis test
p 均>0.05

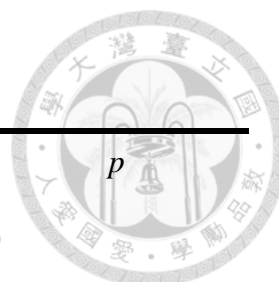


表 4-11. 蛋白質表現與 KIT 基因型統計結果

蛋白質表現		KIT 基因型 (N=67)		<i>p</i>
		Wild type (N=56)	L578P mutation (N=11)	
KIT	陰性	0	0	0.245 ^a
	弱	18	2	
	中	13	2	
	強	25	7	
NRAS	陰性	0	0	0.534 ^a
	弱	9	1	
	中	6	1	
	強	41	9	

a: Mann-Whitney test
p 均>0.05

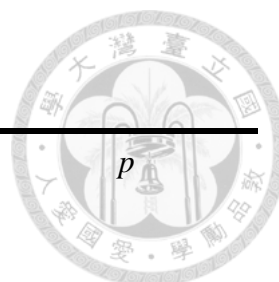


表 4-12. 蛋白質表現與 NRAS 基因型統計結果

蛋白質表現		NRAS 基因型 (N=67)		<i>p</i>
		Wild type (N=15)	Q61K mutation (N=52)	
KIT	陰性	0	0	0.379 ^a
	弱	6	14	
	中	3	12	
	強	6	26	
NRAS	陰性	0	0	0.221 ^a
	弱	1	9	
	中	1	6	
	強	13	37	

a: Mann-Whitney test
p 均>0.05

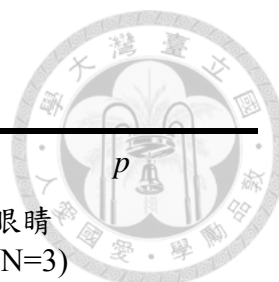


表 4-13. 基因型與腫瘤位置統計結果

基因型		腫瘤位置 (N=59)					<i>p</i>
		口腔 (N=39)	嘴唇 (N=6)	皮膚 (N=16)	腳趾 (N=7)	眼睛 (N=3)	
KIT	Wild type	34	6	11	6	2	0.334 ^a
	L578P	5	0	5	1	1	
NRAS	Wild type	8	3	3	3	0	0.290 ^a
	Q61K	31	3	13	4	3	

a: Kruskal-Wallis test
p 均>0.05

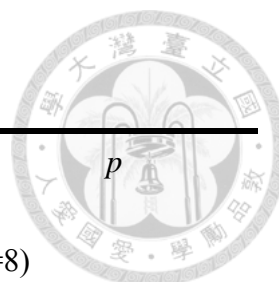


表 4-14. 基因型與腫瘤分級統計結果

基因型		腫瘤分級 (N=24)				<i>p</i>
		I (N=10)	II (N=7)	III (N=6)	IV (N=8)	
KIT	Wild type	8	7	5	6	0.602 ^a
	L578P	2	0	1	2	
NRAS	Wild type	1	1	1	4	0.205 ^a
	Q61K	9	6	5	4	

a: Kruskal-Wallis test

p 均>0.05

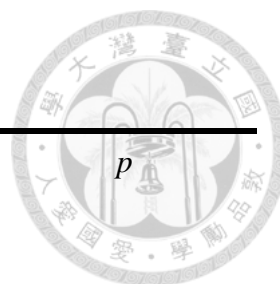


表 4-15. 在非口腔腫瘤的蛋白質表現與 KIT 基因型統計結果

蛋白質表現		KIT 基因型 (N=27)		<i>p</i>
		Wild type (N=21)	L578P mutation (N=6)	
KIT	陰性	0	0	0.036 ^a
	弱	10	0	
	中	4	1	
	強	7	5	
NRAS	陰性	0	0	1.000 ^a
	弱	3	1	
	中	1	0	
	強	17	5	

a: Mann-Whitney test

非口腔腫瘤的 KIT 蛋白質表現與 KIT 基因型: $p < 0.05$

非口腔腫瘤的 NRAS 蛋白質表現與 KIT 基因型: $p > 0.05$

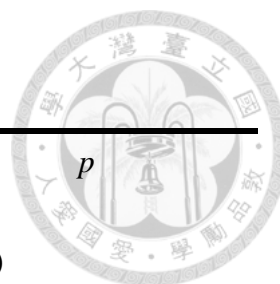


表 4-16. 非口腔腫瘤的蛋白質表現與腫瘤位置統計結果

蛋白質表現		腫瘤位置 (N=32)				<i>p</i>
		嘴唇 (N=6)	皮膚 (N=18)	腳趾 (N=7)	眼睛 (N=1)	
KIT	陰性	0	1	0	0	0.344 ^a
	弱	4	4	4	1	
	中	1	4	0	0	
	強	1	9	3	0	
NRAS	陰性	0	0	0	0	0.042 ^a
	弱	0	1	3	1	
	中	0	2	0	0	
	強	6	15	4	0	

a: Kruskal-Wallis test

非口腔腫瘤的 KIT 蛋白質表現與腫瘤位置: $p > 0.05$

非口腔腫瘤的 NRAS 蛋白質表現與腫瘤位置: $p < 0.05$

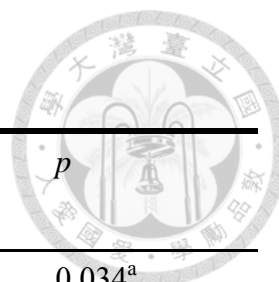


表 5-1. 蛋白質表現與腫瘤位置統計結果

蛋白質表現		腫瘤位置 (N=89)		<i>p</i>
		口腔 (N=57)	非口腔 (N=32)	
KIT	陰性	0	1	0.034 ^a
	弱	15	13	
	中	23	13	
	強	19	5	
NRAS	陰性	0	0	0.491 ^a
	弱	9	5	
	中	12	4	
	強	36	23	

a: Kruskal-Wallis test

KIT 蛋白質表現與腫瘤位置: $p < 0.05$

NRAS 蛋白質表現與腫瘤位置: $p > 0.05$

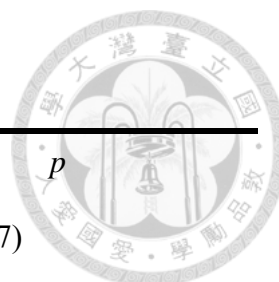


表 5-2. 蛋白質表現與腫瘤分級統計結果

蛋白質表現		腫瘤分級 (N=46)		<i>p</i>
		I and II (N=19)	III and IV (N=27)	
KIT	陰性	0	0	0.126 ^a
	弱	2	9	
	中	13	14	
	強	4	4	
NRAS	陰性	0	0	0.046 ^a
	弱	1	6	
	中	5	10	
	強	13	11	

a: Kruskal-Wallis test

KIT 蛋白質表現與腫瘤分級: $p > 0.05$

NRAS 蛋白質表現與腫瘤分級: $p < 0.05$