

國立臺灣大學生命科學院生化科技學系

碩士論文

Department of Biochemical Science and Technology

College of Life Science

National Taiwan University

Master Thesis



使用磁珠分離及鏈置換增擴放大法開發子宮內膜樣腺

癌偵檢策略

The Strategy of Using Magnetic Beads and
Strand-Displacement Amplification to Develop the
Detection Platform of Endometrioid Endometrial
Carcinoma Diagnosis.

陳育成

Yu-Cheng Chen

指導教授：蕭寧馨 博士

共同指導教授：何佳安 博士

Advisor: Ning-Sing Shaw, Ph.D. Ja-an Annie Ho, Ph.D.

中華民國 108 年 7 月

July, 2019

謝誌



首先我要特別感謝我的指導老師蕭寧馨老師及何佳安老師，感謝兩位老師在碩士班的這兩年期間指導以及指正我各種學習態度及研究方向，給予我許多在專業領域上或學術領域上的指導，從實驗的設計到過程中遇到的瓶頸及困難，老師都很樂意給予協助，以及用不同的角度來看同一個實驗結果，讓我能更清楚的看見一件事情的全貌。

在研究所的學習過程中，我還要感謝 Hotliposome 這個大家庭的所有實驗室成員的陪伴以及協助。感謝 Amily 學姊從一開始什麼實驗都不會的我，開始一一修正我的實驗操作，檢視我的實驗結果呈現，鞭策我實驗的進度，並且給予我實驗設計上的各種方向及修正建議，有學姊的幫助，是讓我在追趕實驗進度上能夠更加快腳步的重大推手。感謝英風學長對於我基礎實驗手法的建議及實驗修正的方向，以及生活上的種種鼓勵，讓我在實驗遇到瓶頸與挫折時更有動力去執行。還要感謝佩穎及沛慈學姊，從一開始就手把手的帶我做很多基礎的實驗，從基本的溶液配置到後續實驗的結果分析，都給我很多意見及方向，讓我慢慢地上手，並且讓我可以有能力去執行老師及學長姐提供的改進方向。感謝實驗室的各位學長姐，在我遇到一些瓶頸及挫折，不管是實驗上或生活上都給予相當多的幫助。感謝我的同學：昱清、敬婷，雖然我們這屆的人數不多，但也因為如此，大家有事都會互相商量，並給予我實驗及課業上的幫助及交流，有時實驗做得比較晚，看到有同學的陪伴，就覺得更有動力把事情做好。也感謝學弟妹：毓凌、老馮、宜萱、家仰、紹瑋、祐寧在實驗室生活中的各種調劑與陪伴。

最後感謝我的家人，在我求學的過程中做我永遠的後盾，當實驗有瓶頸時，爸媽跟我說，學業的事情你要靠自己，其他的事情我們會幫你到底，讓我覺得心裡很暖，也更有動力去解決問題。還要謝謝我的女友，謝謝在我趕實驗進度同時還要搬宿舍的時候，陪我一起把事情一件一件整理好，還有低潮時的陪伴。最後感謝所有曾經給予我幫助的人，有你們的存在，我才能更有能力與動力把一切打理好。

摘要



子宮內膜癌是目前世界上女性第四常見的癌症，其中子宮內膜樣腺癌佔了病例之九成，其發病率更在近年來大幅上升，因此早期診斷子宮內膜樣腺癌的分析平台有其迫切需求。據先前研究指出，microRNA-205 之表現水平與子宮內膜樣腺癌具有高度相關性，可作為子宮內膜樣腺癌之生物標誌分子。本篇研究首先藉由鏈結合素及生物素之間的親和作用，將核酸探針修飾到磁珠上，再以強力磁鐵進行磁吸分離並將目標核酸 microRNA-205 進行分離純化。接著加入核酸聚合酶及核酸限制酶，於磁珠上進行鏈置換增擴放大反應以產生核酸產物。反應後再次磁吸分離並蒐集產物之上清液後，加入與產物序列互補之產物核酸探針，並形成富含腺苷酸及胸苷酸之雙股核酸分子，產物探針之利用可做為第二道檢測專一性之檢查點。而本篇研究著重於磁珠對於鏈置換增擴放大反應的使用策略，在確立酵素反應之最佳化反應時間為六十分鐘後，核酸聚合酶與核酸限制酶可於修飾於磁珠上的探針附近持續進行反應，並發現可對於產物之產率產生影響：於相同反應時間內，相較於未使用磁珠的組別，使用磁珠的組別之產率明顯較高，並且保持在無目標核酸出現時的良好反應專一性，不會有偽陽性之結果發生。而修飾於磁珠上的探針選擇性，與未修飾於磁珠上的探針相同，對於非目標序列之真實存在 microRNA 序列具有良好的選擇性。經本篇研究確立：磁珠之使用，於使用鏈置換增擴放大反應作為放大訊號的方式，具有良好的產率增加之效果；磁吸分離之方式亦可簡化子宮內膜樣腺癌之偵檢流程，於疾病檢測上更為便利。

ABSTRACT



Endometrioid Endometrial Carcinoma (EEC) is the fourth most common cancer among women in the world, and the incidence of EEC has increased sharply in recent years. Therefore, it is urgent to develop an EEC diagnostic platform for early detection of EEC. MicroRNA-205 was previously reported as a potential biomarker for EEC, which motivated us to develop an ultrasensitive sensing platform to further confirm its correlation to EEC. Strand displacement amplification (SDA) reaction is an isothermal technique to amplify nucleic acid target, relying on a polymerase and a restriction enzyme. We herein utilized the concept of SDA, and designed a new isothermal amplification method for the detection of EEC-related miR-205. We first conjugated DNA probe on magnetic beads via streptavidin-biotin interaction, it was followed by the enrichment of miR-205 present in the sample through magnetic separation. DNA polymerase ($3' \rightarrow 5' \text{ exo}^-$) and nicking enzyme were added afterwards to induce the synthesis of the product DNA. After SDA reaction time optimization as 60 min, we found that applying magnetic beads to SDA amplification reaction can increase the yield of product DNA, compared with the magnetic bead- free group. In specificity, probes conjugated on magnetic beads can distinguish microRNA-205 from others non-target microRNA. Magnetic separation can also simplify the process of diagnosis of Endometrioid Endometrial Carcinoma.

目錄



第一章 緒論.....	1
1.1. 精準醫療概念結合生醫感測器領域的興起.....	1
1.1.1. 精準醫療.....	1
1.1.2. 生醫感測器.....	1
1.1.3. 核酸增擴放大技術.....	2
1.1.4. 恒溫核酸增擴放大技術.....	2
1.1.4.1 鏈置換增擴放大法 (Strand displacement amplification, SDA).....	3
1.1.4.2 滾環式增擴放大法 (Rolling circle amplification, RCA).....	4
1.1.4.3 指數增擴放大法 (Exponential amplification, EXPAR).....	5
1.1.4.4 解旋酶增擴放大法 (Helicase dependent amplification, HAD).....	6
1.1.5. 磁珠之應用	8
1.2. 微型核醣核酸(MicroRNA).....	9
1.2.1. miRNA 之生合成路徑與作用機制.....	9
1.2.2. miRNA 偵測方法.....	11
1.2.3. miRNA 與癌症.....	14
1.3. 子宮內膜樣腺癌.....	16
1.3.1. 子宮內膜樣腺癌之診斷.....	17
1.3.2. miRNA 作為子宮內膜樣腺癌診斷之生物標記分子	18
第二章 實驗材料與方法.....	21
2.1. 核酸序列.....	21
2.2. 實驗試劑與材料.....	22
2.3. 實驗儀器.....	24
2.4. 實驗方法.....	26
2.4.1. 聚丙烯醯胺膠體電泳 (Polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE).....	26
2.4.2. 核酸探針之最佳化.....	26
2.4.3. 核酸探針(P3)之選擇性.....	26
2.4.4. 磁珠-探針(P3b@MB)之製備.....	27
2.4.5. 磁珠上探針之鑑定及定量	28

2.4.6. 磁珠-探針(P3b@MB)之抓取效率鑑定.....	29
2.4.7. P3b@MB 之 SDA 增擴反應時間最佳化.....	29
2.4.8. P3b@MB 之 SDA 增擴反應情況探討.....	30
2.4.9. 動態光散射儀確認 P3b@MB 進行 SDA 反應之各階段磁珠.....	32
2.4.10. P3b@MB 之選擇性探討.....	32
2.4.11. P3b@MB 與 miR-205 之 SDA 反應探討.....	34
2.4.12. SDA 產物與產物探針(product probe)之結合.....	34
第三章 實驗結果與討論.....	35
3.1. 實驗設計.....	35
3.2. 核酸探針之最佳化.....	37
3.3. 磁珠-探針之鑑定及定量.....	41
3.3.1. DLS 磁珠修飾前後之鑑定.....	41
3.3.2. SYBR gold 之螢光定量.....	46
3.4. 磁珠-探針(p3b@MB)之抓取效率鑑定.....	49
3.5. SDA 增擴反應時間最佳化.....	55
3.6. P3b@MB 進行 SDA 增擴反應之情況.....	60
3.7. 動態光散射儀確認 SDA 反應各階段磁珠之粒徑大小及 zeta potential.....	64
3.8. Free form P3b 及 P3b@MB 之選擇性探討.....	67
3.9. P3b@MB 與 miR-205 之 SDA 反應.....	81
3.10. SDA 產物與產物探針(product probe)之結合.....	81
第四章 結論.....	84
參考文獻.....	85

第一章 緒論

1.1. 精準醫療概念結合生醫感測器領域的興起

1.1.1 精準醫療 (Precision Medicine)

精準醫療 (Precision Medicine) 屬於近幾年來在生醫分析領域積極投入的項目。這個名詞首先由是美國國家研究委員會提出¹，因為實行上可配合受檢者個別的基礎資料，因此概念上又等同於個人式的醫療方法：在進行疾病或癌症診斷的過程，首先蒐集受檢者的個人相關資訊來診斷。而傳統醫療常常以病患對於發病徵狀的自述，再加上目前可用的診斷疾病手段，確認疾病的種類以及進程，而這其中也需要有相當程度資歷的檢驗技術人力來參與過程，以便提高準確性；一般會使用的偵檢方式不外乎是蒐集受檢者的血液來做病理檢定，或者是利用放射性的檢驗手段確認，精準醫療則再利用各種新型生醫檢驗的手段如基因層級的檢驗與蛋白質層級的檢驗等等，而後再依照如病患之性別、病患之年齡、病患之種族，包含病患的家人是否有罹患相關疾病，還有鑑定基因層級的表現情況等等，再以持續蒐集取得的資料所建立的資料庫來一一確認，選擇並設計受診斷者最恰當的治療策略，因而使得標靶藥物概念的發展受到重視²。精準醫療概念之所以會成為時興的檢測核心理念，其目的在於希望對於患者可以達到盡早發現、盡早治療，而且可以精確地判定出是否有罹患特定疾病，然後評估情況揀選最得當的治療方式，預期在採取這樣的治療方式在效果可以有最佳表現、最低程度的非預期結果。精準醫療在實際運作機制上，需要藉由檢測臨牀上會表現在某些相關疾病或癌症的生物標記分子(biomarker)來獲得結果，而有相關研究領域的學者發現到，核酸層級及蛋白質層級都出現可當作相關疾病或癌症的 biomarker^{3,4,5,6}。而可用於偵檢各種生物層級 biomarker 的平台，就形成生醫感測器領域崛起的原動力。

1.1.2 生醫感測器 (biosensor)

生醫感測器係指可測量生物性或化學性之待分析物並進行定量或是定性判定並且輸出相應訊號的平台系統⁷，發展出的應用領域極其廣闊：包含了針對特定疾病藥物的開發⁸、環境中汙染物性質或數量的相關監測⁹、具致病性的微生物如流感病毒等偵檢¹⁰、疾病的快速篩檢檢測¹¹、生物體內的分子的檢視與監測¹²及癌症



biomarker 之偵測¹³ 等。生醫感測器領域近年來的發展最早可追溯到 1962 年由 Leland C. Clark 團隊首先提出的葡萄糖偵測器離形¹⁴，而生醫感測器的組成元件主要可分為三部分：可感測待測物的生物性接受體(bioreceptor)、生物訊號與輸出訊號之間的轉換傳感器(transducer)及最終輸出訊號的訊號加工處理器(signal processor)¹⁵。拜生醫感測器的興起，精準醫療的概念現今適用於疾病及癌症的檢測，而檢測癌症相關之 biomarker 時，需依據待分析物之特性、含量及何種採樣樣品中可發現此待分析物，並且進行嚴謹的設計：如果待分析物為蛋白質層級，在 bioreceptor 的設計上就需要根據其含量及特性設計可抓取目標分子之抗體或適體；如果待分析物屬於核酸，就需要斟酌在取樣樣品中所含有的核酸序列及核酸含量多寡，而一般 biomarker 目標分子屬於核酸的實驗設計，由於目標於樣品中含量極少，因此實驗設計多會採取核酸增擴放大的相關策略。

1.1.3 核酸增擴放大技術

核酸增擴放大技術發展的淵源可從 Kary Mullis 團隊於 1983 年發表的聚合酶連鎖反應 (Polymerase Chain Reaction, PCR) 開始算起¹⁶，PCR 技術的應用能夠把少量的核酸分子進行增擴反應，在較短的反應時間，就可以達到偵測系統能夠檢測到的範圍內。在現今，生物基礎研究以及臨床相關的醫學診斷領域普遍利用此技術來進行研究。於臨床診斷領域的應用實例，PCR 技術也可應用在癌症以及遺傳相關疾病的確診¹⁷、鑑定臨床蒐集各式樣品中的致病病原體。PCR 機制是如何運作的，依照溫度的不同以及對應之目的分成了三個部分，包含 95 °C 高溫使核酸雙股變性分開 (Denaturation)、50 °C 使引子 (Primer) 和變性分開後所形成的單股核酸依照序列互補的關係產生黏合 (Annealing)，60 °C 使核酸聚合酶可以在最佳酵素作用溫度來延長序列 (Extension)。雖然此技術確實可以達到目的，但在過程中需要進行升降溫循環 (Thermal Cycle)，而且，活體細胞內的核酸檢測並無法利用此技術來達到放大，這些缺點侷限 PCR 技術在實際上的運用，生醫分析相關領域為

因應此技術需變溫的限制，近年來已有許多研究團隊發表文獻提出各式各樣的恆溫核酸增擴放大策略 (Nucleic acid isothermal amplification)。



1.1.4 恒溫核酸增擴放大技術(Nucleic acid isothermal amplification)

現行恒溫核酸增擴放大技術的策略發展快速、日新月異，其中較廣為人知的技術，包含 SDA (Strand displacement amplification)、RCA (Rolling circle amplification)、EXPAR (Exponential amplification reaction)、HDA (Helicase-dependent amplification) 等，如表 1-1 所示。

表 1-1. 恒溫核酸增擴放大策略的優缺比較。

策略	參與酵素	需要時間	策略增擴效率	文獻
SDA	DNA polymerase Nicking enzyme	1-2 h	10^7 fold	18-20
RCA	DNA polymerase Ligase	1-2 h	10^9 fold	21-26
EXPAR	DNA polymerase Nicking enzyme	< 0.5 h	10^6 - 10^8 fold	27-30
HDA	DNA polymerase Helicase	2 h	10^7 fold	31-32

1.1.4.1 鏈置換增擴放大法 (Strand displacement amplification, SDA)

鏈置換增擴放大法的策略在 1992 年被提出，GT. Walker 的研究團隊所發表，此放大策略會使用到兩種酵素，一種為具有高度專一性可辨認剪切位序列活性而且可進行剪切功能的核酸限制內切酶 (Restriction endonuclease)，另一使用酵素為具有鏈置換(strand-displacement)活性的 DNA 核酸聚合酶 (DNA polymerase)¹⁸。此技術運作機制如圖 1-1 所示，首先設計一段可以和目標核酸的序列完美互補並且具有核酸限制內切酶可專一性辨認的剪切序列和作為產物序列互補模板的核酸。當想要進行增擴放大的目標核酸出現，目標核酸因為序列與模板互補的關係，模板序列進行鹼基的互補雜合，接著 DNA 核酸聚合酶可以接合到目標核酸的 3' 端，並依照模板之序列進行酵素延長反應，而核酸限制內切酶就可以利用其專一性辨認剪切位序列的活性來進行剪切，DNA 核酸聚合酶就可再次作用於限制內切酶產生的切口處繼續進行酵素延長反應形成新的核酸產物，原有被延長的核酸因為酵素所有的鏈置換活性，從模板離開。隨著此機制的持續進行，最後會得到相當數量的預期核酸產物。而此技術在現今研究的運用十分普遍，也可利用在癌症的診斷，例如：可作為胃癌 biomarker 的核酸, miR-16-5p 和 miR-19b-3p¹⁹。

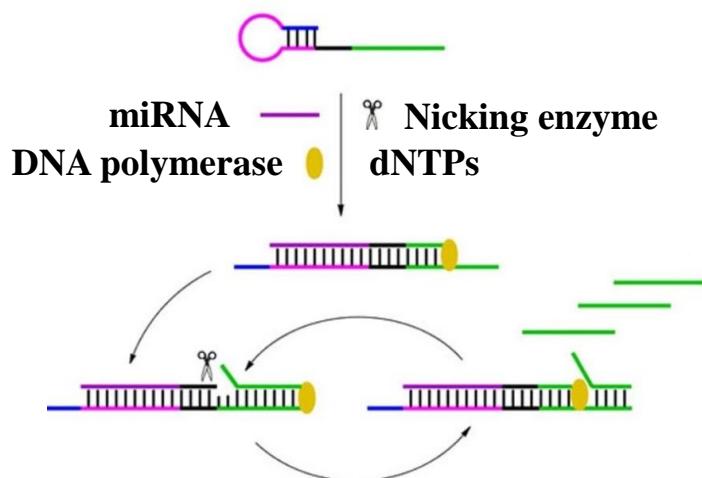


圖 1-1. SDA 技術運作機制²⁰。(參考 reference 20 另製圖)

1.1.4.2 滾環式增擴法 (Rolling circle amplification, RCA)

滾環式增擴法機制是借鏡於噬菌體本身所獨具的基因組複製機制，Andrew Fire 就參考此機制發表了 RCA 技術的原型²¹，此技術作用原理如圖 1-2 所示，需
要被放大的目標分子在序列上與核酸探針具有互補的區域，可以依鹼基互相雜
合，其中探針被設計成掛鎖型(Padlock probe)。DNA 連接酶 (ligase)可於此時進行
反應，接合未閉合的探針，形成頭尾封閉的環形 DNA 模板 (Circular DNA template)。模板完成接合之後，具有鏈置換活性的 DNA 核酸聚合酶加入，並以環
形 DNA 作為核酸模板進行酵素延長作用，當聚合酶持續作用並且回到酵素延長反
應的起始點，延長後的產物會因為鏈置換活性而被置換取代出，並且產生一條含
有重複序列的長鏈 DNA 核酸產物²²。RCA 技術提出以來備受重視，有團隊提出可
使用在醫診層面，如：早期前列腺癌的偵測診斷平台²³、miRNA 單核苷酸多型態
的鑑定²⁴ 以及病毒的篩驗平台²⁵。

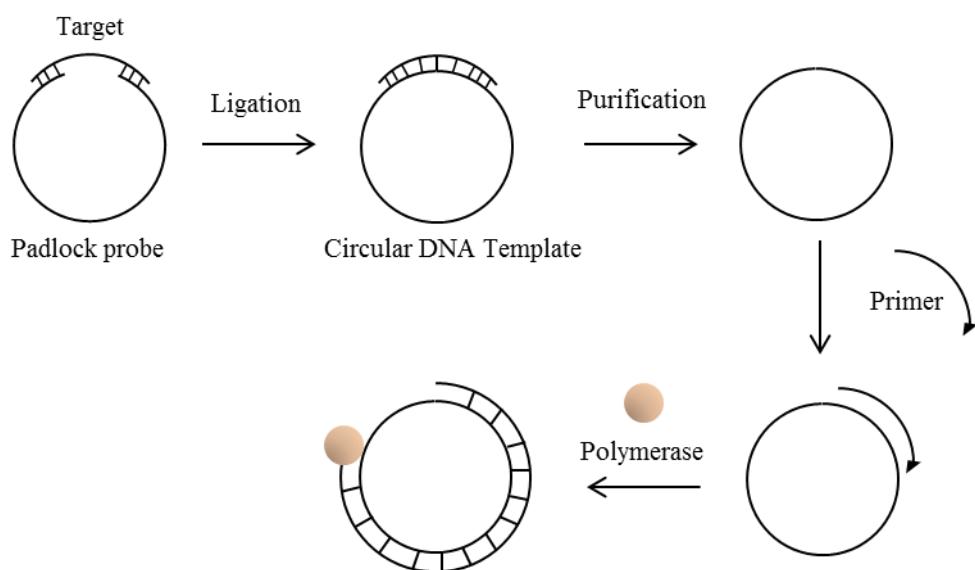


圖 1-2. RCA 核酸增擴放大技術的作用原理²⁶。 (參考 reference 26 另製)

1.1.4.3 指數增擴放大法 (Exponential amplification reaction, EXPAR)

EXPAR 的技術由 Jeffrey 以及他的研究團隊在 2003 年發表了一個完整的實驗設計²⁷。基礎運作的原理如圖 1-3 所示，酵素方面使用到 DNA 核酸聚合酶還有核酸限制內切酶，在實驗設計中設計了一段可以和目標核酸序列完美互補雜合並含有核酸限制內切酶可以專一性辨認的剪切位還有與預期產物序列互補的模板探針，與 SDA 技術相比，兩者相異的地方在於，模板在產物互補區的序列和要放大的核酸序列也是相同的。等到核酸和模板成功互補，DNA 核酸聚合酶的加入，可以在核酸的末端開始以酵素活性延長，核酸限制內切酶則可以進行專一性剪切作用，新的合成股利用其鏈置換的活性可以置換出舊的合成股，而新合成股的序列因為和目標核酸相同，可以被其他的探針雜合開始新一輪的反應，兩種酵素可更快地持續反應，達到指數層級的增擴放大效果²⁸。該技術的反應速度是其亮點，有研究團隊以此技術為基底，提出 H7N9 的新型檢測平台。²⁹

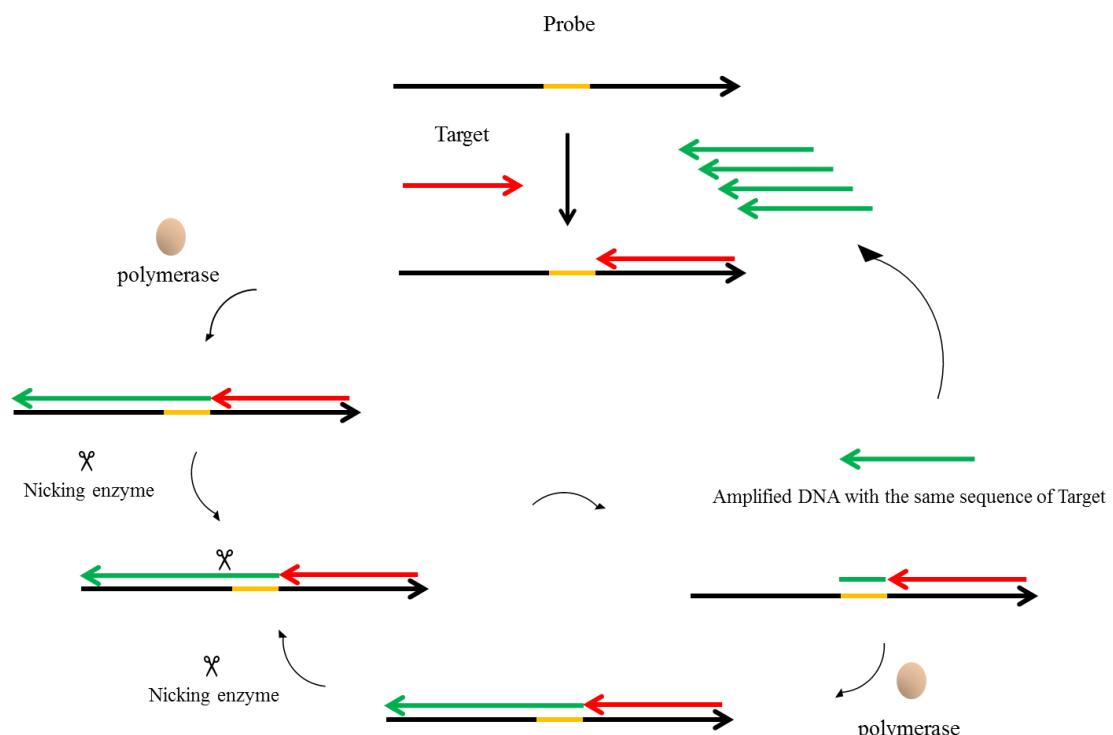


圖 1-3. EXPAR 技術作用機制圖³⁰。(參考 reference 30 另製圖)

1.1.4.4 解旋酶增擴放大技術 (Helicase dependent amplification, HDA)

2004 年期間，M. Vincent 和所屬的研究團隊報導了 HDA 這項技術³¹，HDA 技術的基本機制原理如圖 1-4 所示。核酸解旋酶(helicase)的活性是可以將雙股 DNA 核酸進行解旋作用形成兩個單股結構的 DNA，單股去氫核糖核酸結合蛋白 (Single-stranded DNA-binding protein, SSB) 的利用，和新形成的單股 DNA 進行交互作用結合。因此而穩定的單股結構於其中可以當作是一個引子序列來和模板結合，聚合酶就此引子開始反應出新的互補股核酸。而解旋酶此時就可以再次利用其酵素活性把合成出的雙股螺旋解開兩個單股的結構，形成了循環，再隨著時間持續得到放大後的結果。

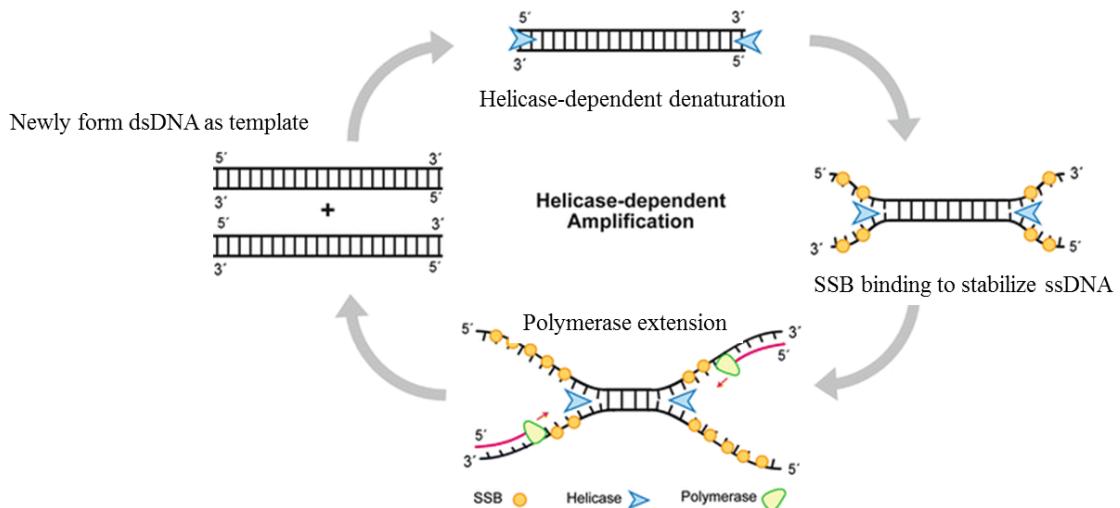


圖 1-4. HDA 核酸增擴放大技術之原理。(參考 reference 32 重新繪製)

以上提及的技術都屬於將生物分子訊號的來源進行放大的技術，對於進行各式疾病及癌症的偵檢及確診的生醫偵檢平台系統，無異為一大助力。因為採樣樣品中可以蒐集到的量極少，如果平台設計上使用到核酸增擴放大相關技術作為策略，在實行上，能再預先分離純化出想偵測到的目標分子，偵測平台的偵測極限範圍就能夠因此而提高，偽陽性或者是偽陰性等不希望出現的情況也能夠因此被改善。



1.1.5 磁珠之應用

磁珠的使用在目前常見的生醫分析策略中，採樣樣品的樣品前處理或是分離純化目標分子中常常會使用到磁珠³³。一般的磁珠利用與設計，首先會利用化學官能基的結合或是親和性作用將分子修飾到磁珠，修飾完成後，此結構物就具有辨認特定分子的特性，利用之，來把樣品中可以和磁珠上修飾分子進行專一特異結合的目標分子。接著，憑藉磁珠對於外在磁場的靈敏反應，藉由外加強力磁場分離磁珠，將上清液去除，接著利用適合目標分子存在環境的緩衝液進行沖洗然後回溶，實現把目標分子從採樣樣品中簡易地分離純化出來的目的。磁珠常見的運用方式則如圖 1-5 所示。磁珠在目前生醫檢測領域研究中，有團隊的報導顯示，可以用於基質金屬蛋白酵素數量偵測，僅需採樣病患的血漿樣品³⁴，利用磁珠作為分離採樣樣品中目標分子的純化策略，如果能在欲檢測的目標分子為 DNA 核酸或是 RNA 核酸為生醫檢測平台系統實驗設計上運用，同樣可以作為一個相當有利的辦法。

Add magnetic bead Specific binding Removal of supernatant Wash and elute

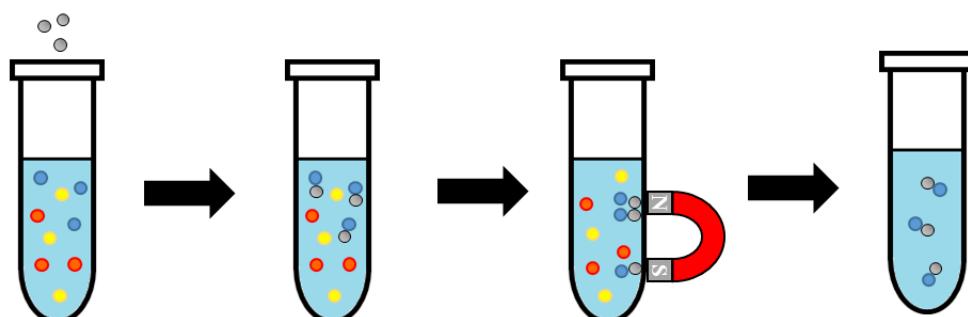


圖 1-5. 磁珠在分離純化的應用示意圖。



1.2. 微型核糖核酸 (MicroRNA)

微型核糖核酸(MicroRNA)，名稱可簡短為 miRNA。其發現可以參考 Lee 的研究團隊所提出的報導，根據其在 1993 年的研究結果顯示，由 lin-4 編碼基因而產生的 RNA 片段，可以調控 LIN-14 蛋白，造成表現不同，可影響線蟲 (*Caenorhabditis elegans*) 發育的進程，這篇文章確立了 miRNA 有基因調節功能的定位，因此相關研究大為興起³⁵。定義上，通常是指一段長度大概 22 個核苷酸 (Nucleotide)的單股非編碼核糖核酸 (non-coding RNA)，由 RNA 核酸聚合酶根據編碼基因轉錄 (Transcription) 得到，而在下游並無法透過轉譯作用 (Translation) 得到蛋白質³⁶。miRNA 具有的功能包含了轉錄後 (Post-transcriptional) 層級調控基因表現，並且會參與細胞週期的階段調控 (Cell cycle)³⁷、細胞的增生現象³⁸ 以及細胞的凋亡現象 (Apoptosis)^{39,40}。除此之外，RNA 干擾作用 (RNA interference) 也屬於相關的現象，其基本機制是 miRNA 可以和一些特定的基因之間進行兩者的交互作用導致影響下游轉譯蛋白質層級，也就是與 miRNA 有相關的基因沉默⁴¹。

1.2.1 miRNA 之生合成路徑與作用機制

MiRNA 在生物體內的生合成機制依據其長度與結構可以分為三個較主要的階段，首先為轉錄階段、再到核加工階段以及最後的核輸出階段。由研究文獻得到，在動物細胞所屬的細胞核中，RNA 核酸聚合酶會連接到轉錄基因附近的啟動子序列^{42,43} (promotor)，並且經過 RNA 核酸聚合酶酵素反應的轉錄作用，生長一段包含 5' 端帽子 (5' cap) 以及多聚腺苷酸尾 (poly-A tail) 的初級轉錄核酸產物，這時候稱之為 primary miRNA (Pri-miRNA)，而這時候核酸的長度可達數百個核苷酸，是為轉錄階段。接著，具有可辨認 pri-miRNA 功能的 Pasha 蛋白，此時就會辨認之，並且結合另一個蛋白，Drosha 蛋白⁴⁴，進而構成一個稱為微型加工複合體 (Microprocessor complex)的結構，此結構具有核糖核酸酶的活性⁴⁵。而這個複合體所具有的酵素活性是可以辨認出在 pri-miRNA 髮夾區 (hairpin)中的特定 11 個核苷酸進行剪切，經剪切反應後所得到的產物，結構上在末端多出二個核苷酸，在這個加工階段後所得到的核酸產物稱為 miRNA 前體 (pre-miRNA)，此階段稱核加工階段⁴⁶。經核加工後，具有核質間物質交換活性的核細胞穿梭蛋白 Exportin-5 此時接近，藉由辨識 pre-miRNA 在髮夾區 3' 端的 2 個核苷酸所產生的凸出結構，從

細胞核中的 pre-miRNA 運送到細胞核外的細胞質中，利用主動運輸的機制⁴⁷，到此是核輸出之階段。而存在於細胞質中的 RNase III 核酸內切酶，可以利用其酵素活性，對運送到細胞質中的 pre-miRNA 的雙股部分進行剪切，生成長度大概 22 個核苷酸的雙股 miRNA，經過解螺旋的反應把雙股打開，就產生出成熟的 miRNA (Mature miRNA)^{48,49}。具有和不同類型的 RNA 結合蛋白結合的能力，並構成稱為 RNA 誘導沉默複合體 (RNA-induced silencing complex, RISC)的結構⁵⁰，其功能是可以影響基因表現。同時也有研究團隊發現，miRNA 也可以當作引導 RNA (guide RNA)，和 mRNA 序列進行結合，RISC 就具有把該 mRNA 降解的能力，在後段的表現部分也因應而變⁵¹。

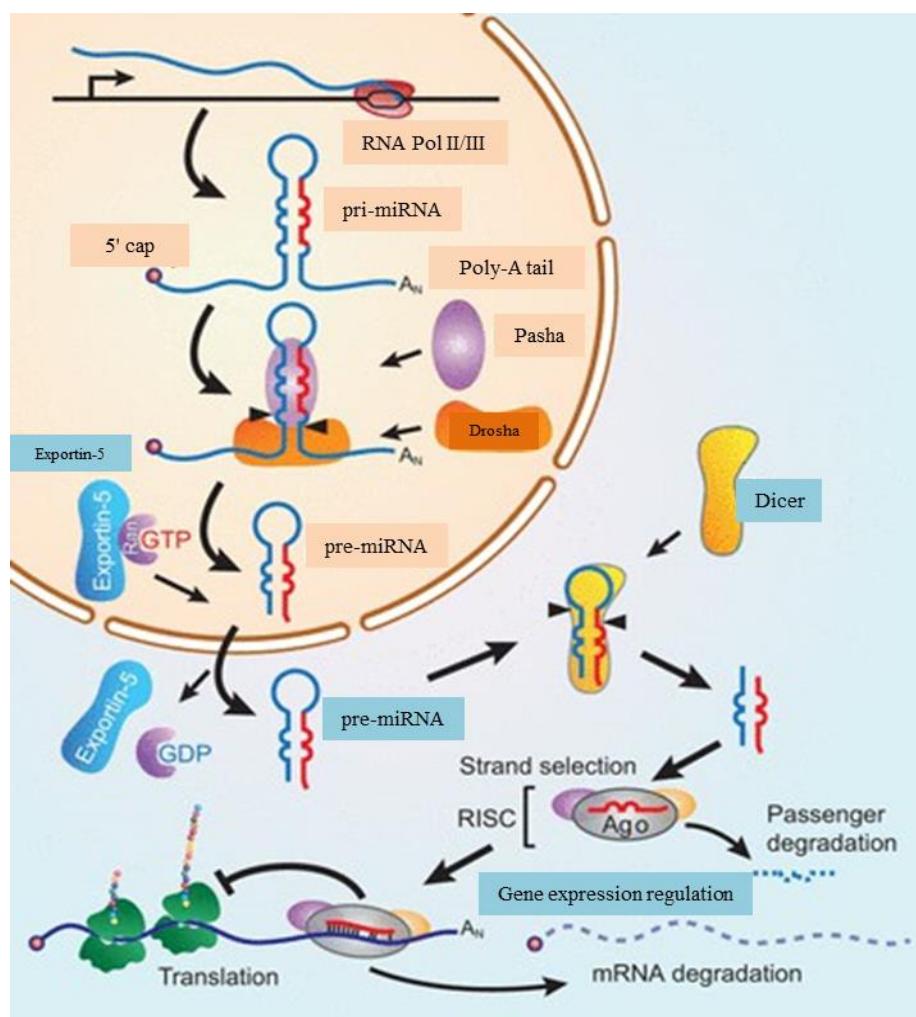


圖 1-6. MiRNA 體內生合成路徑及調節基因表現之機制。(參考 reference 52 重繪)



1.2.2 miRNA 偵測方法

生物標記分子檢測平台的首要目的，就是必須在目標細胞、組織或體液中精準地檢測 miRNA 於其中的存在數量。因為結構上的限制，包含了本身 5' 端缺乏 cap 以及 3' 端缺少的 poly-A tail，成熟 miRNA 使得 miRNA 在特定的選擇分離純化核酸技術無法有效被分離出來。miRNA 之平均長度約為 22 個核苷酸，因此一般常使用的反轉錄聚合酶連鎖反應(RT-PCR)經序列設計後的引子(Primer)，則因為長度上的限制，無法和作為模板核酸(Template)的 miRNA 進行高效結合。另外，檢測 miRNA 在實際執行中還有含量的問題，miRNA 一般樣品中的量少之又少，只有樣品中全部 RNA 數量的 0.01%，而此含量通常低於一般生醫相關檢測平台系統可以偵測到的最低偵測極限，此外，一些 miRNA 還包含有同源家族，之間的差異僅有幾個核苷酸鹼基，miRNA 的檢測方法到底精不精準常受到大家的重視⁵³。一般用在檢測核酸的方法有北方墨點法 (Northern blotting)、微陣列晶片技術 (Microarray) 還有即時定量反轉錄聚合酶連鎖反應技術 (Real-time qRT-PCR)。其中北方墨點法的基本檢測機制如圖 1-7 所示，首先利用膠體電泳讓分子量大小不同的 miRNA 可以被區隔出來，再將分離出後 miRNA 片段轉印於尼龍膜上，此時再加入與目標序列互補且具有放射性或非放射性之標記探針，與目標序列雜合以偵測 miRNA⁵⁴。微陣列之檢測原理如圖 1-8 所示，首先將探針修飾於晶片上後，把先前從採樣樣品中經萃取手段取出的 miRNA 進行反轉錄反應反轉錄成 cDNA，再利用具有不同放射波長的螢光分子進行個別標記，使用上可於同一時間進行多種 miRNA 的檢測，優點就是高通量 (High throughput)⁵⁵。即時定量反轉錄 PCR 技術在現行的方法中，發展出兩個類別的分析試劑，：第一種類的原理如圖 1-9 所示，利用 miRNA 互補的髮夾結構核酸當作模板，與 miRNA 互補後可藉由反轉錄酶活性沿模板生成相對的 cDNA 序列，再以化學修飾有特定放射波長螢光分子的核酸探針來定量 miRNA^{56,57}；第二種分析試劑則如圖 1-10 所示，首先利用 poly A polymerase 之固有活性，在 miRNA 的 3' 端部分進行延長反應並且生成一段長度約為二百個到三百個核苷酸長度的 poly-A tail，接著是引子的部分，可以藉末端具 oligo dT 序列且其中有可以和 miRNA 的 3' 端序列雜合的序列區的核酸探針，先使 oligo dT 序列跟 poly-A 的部分配對，開啟反轉錄並且合成 cDNA^{58,59}。以上提及技術大部分原理利用 miRNA 的序列與核酸探針的序列個別以一對一的比例進行雜合實現檢測目的，

但是因為 miRNA 存在在檢體中的量非常少，如果研究及改良目標是增強檢測平台的偵測極限(Limit of detection, LOD)，強大且穩定的核酸放大技術會有相當程度的助益。

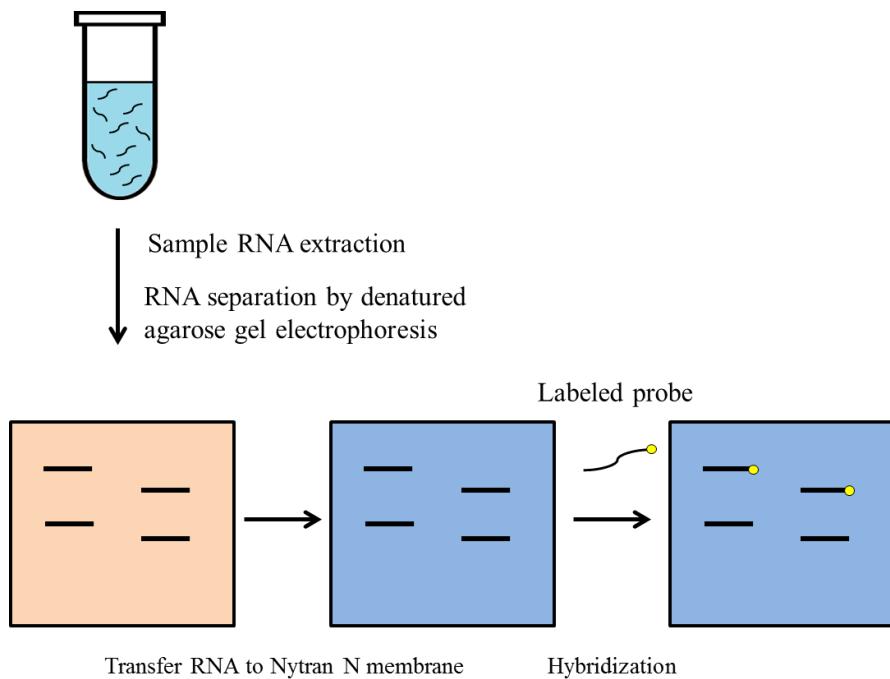


圖 1-7. 北方墨點法示意圖。(參考 reference 54 作圖)

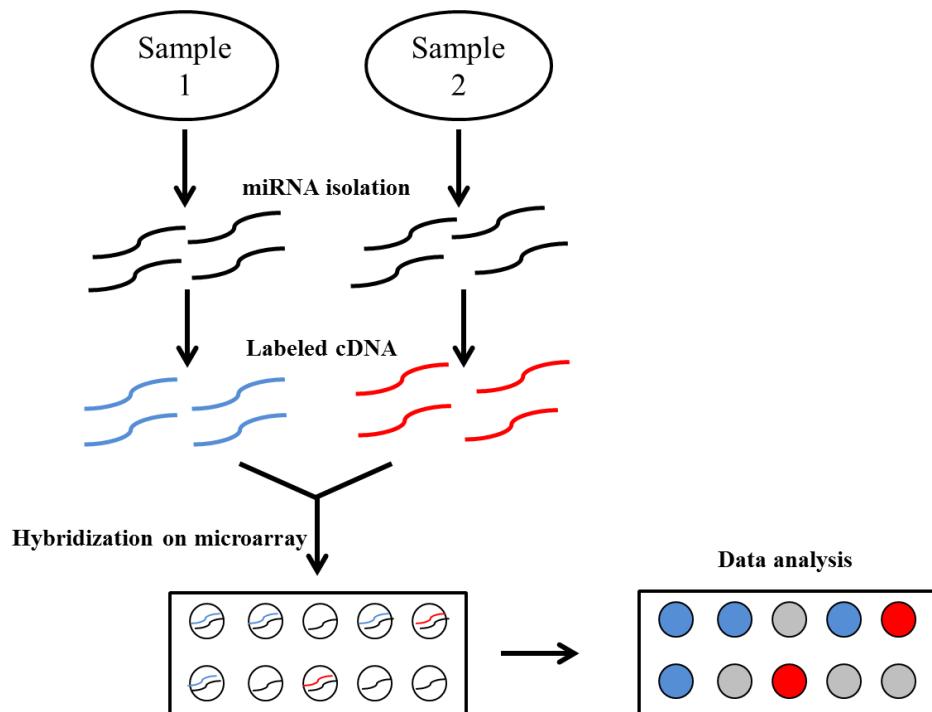


圖 1-8. 微陣列示意圖。(參考 reference 56 作圖)

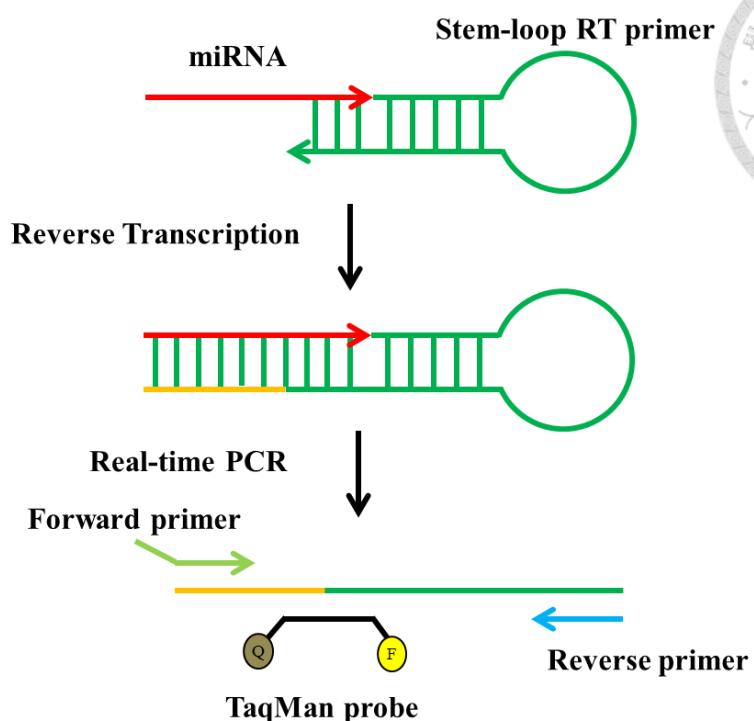


圖 1-9. 即時定量反轉錄聚合酶連鎖反應應用在 miRNA 偵測技術之示意圖。(參考 reference 57 另繪)

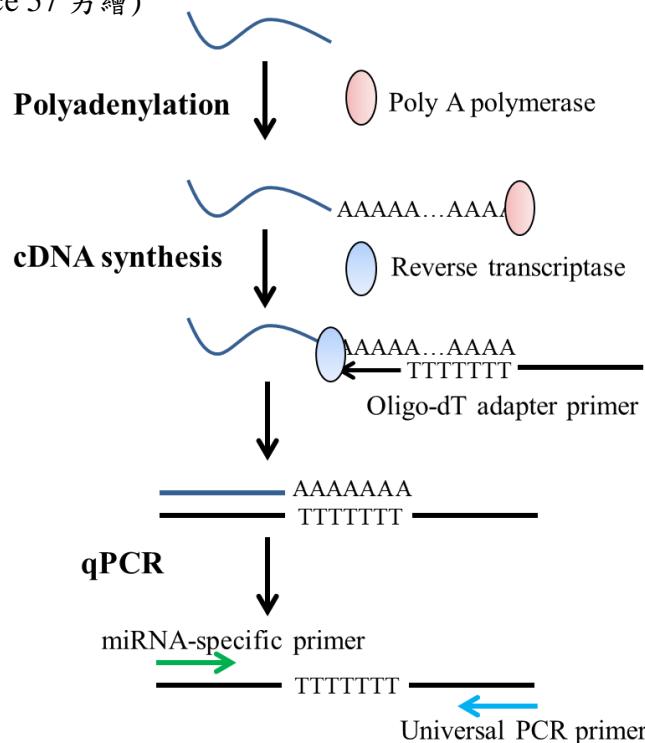


圖 1-10. 即時定量反轉錄聚合酶連鎖反應應用在 miRNA 偵測示意圖二。
(參考 reference 59 繪之)



1.2.3 miRNA 與癌症

自從發現了 miRNA 在生理機制的角色，癌症的產生與對應發現的 miRNA 表現改變都在不同學者的研究中被報導⁶⁰，這方面的研究也方興未艾，更是造成生醫感測器的概念不斷地推陳出新。miRNA 研究欣欣向榮，以存在於特定病患的表現不同，可將 miRNA 進行區分：某些 miRNA 根據研究發現會在癌組織中扮演致癌性或抑癌性的角色，若特定 miRNA 在癌細胞中，其表現和正常細胞相比相對上調，就屬於致癌性 miRNA (Oncogenic miRNA)⁶¹；如果特定 miRNA 在癌細胞中的表現水平和一般正常細胞相比是相對降低，則屬於抑癌性 miRNA (Tumor suppressor miRNA)。前者在基因的調節功能上，多數會具有促進細胞增生作用或是抑制細胞凋亡的作用，從而造成腫瘤會有增生現象和擴大現象；抑癌性 miRNA 則相對於致癌性 miRNA，於基因調控上會抑制細胞的增生現象或是分裂作用或是加劇細胞凋亡的作用⁶²。到現在，研究文獻指出了很多被認為是致癌性或抑癌性的 miRNA，如表 1-2 整理所示。有研究團隊發現到 miR-21 在大腸癌作為致癌性 miRNA 的角色，藉由下調抑癌基因 PDCD4 在轉錄後的表現水平，刺激大腸癌細胞侵犯和癌細胞轉移發生⁶³，另一團隊則報導乳癌細胞中發現到 miR-21 可以造成抑癌基因 PDCD4 下調的機制⁶⁴；還有文獻指出 miR-4534 對於攝護腺癌是作為致癌性 miRNA，本身具過表現的情況，會造成抑癌基因 PTEN 在訊號傳遞路徑上的轉錄後層級表現降低，而且伴隨著腫瘤增生的現象⁶⁵；miR-223 有報導確認在胃癌中會讓抑癌基因 EPB41L3 表現水平減低，因此有侵犯和遷移的現象⁶⁶；另外，miR-221 則有研究團隊發現，在非小細胞型肺癌造成了抑癌基因 PTEN 的表現低下，使癌細胞遷移現象加劇⁶⁷；miR-182 有學者的報導顯示於子宮頸癌中抑制了抑癌基因 FOXO1 的表現水平⁶⁸；miR-205-5p 的相關研究說明子宮內膜癌的患者中，除了對抑癌基因 PTEN 轉錄出的 mRNA 有降解現象，更刺激子宮內膜癌細胞的細胞增生現象⁶⁹。抑癌性 miRNA 也有眾多的報導，甲狀腺癌患者出現的 let-7a，透過對 AKT2 基因的表現抑制，進而抑制其生長⁷⁰；在攝護腺癌中，相關文獻則確立 miR-204-5p 抑癌的性質，可影響抗細胞凋亡基因 BCL2 表現⁷¹；於肝細胞癌中出現的 miR-1285-3p 抑制基因 JUN，癌細胞的進程受阻⁷²；胃癌患者體內的 miR-488 被報導為抑癌，抑制 PAX6 基因，癌細胞的發展受限⁷³；在另一研究報導中，miR-193b-3p 可以在 T 細胞急性白血病病患中有抑癌的功能，致癌基因 MYB 被抑制⁷⁴；miR-34a

它的存在導致卵巢癌患者 HDAC1 量降低，更使卵巢癌細胞進程被限制和化學抗性低落⁷⁵；miR-204-5p 於乳癌細胞內的表現水平是被減低的，也因為此調控了 PIK3CB 基因，導致乳癌細胞對此基因所設計的抑制劑或是抗癌藥物敏感性有明顯不同，miR-204-5p 的高程度表現也會顯著降低乳癌細胞之生長速率⁷⁶。

表 1-2.miRNA 與相關癌症

微核糖核酸	功能	目標基因	相關癌症	參考文獻
miR-21	Onco-miR	PDCD4	colorectal cancer; Breast cancer	63, 64
miR-4534	Onco-miR	PTEN	prostate cancer	65
miR-223	Onco-miR	EPB41L3	Gastric cancer	66
miR-221	Onco-miR	PTEN	Non-small cell lung cancer	67
miR-182	Onco-miR	FOXO1	Cervical cancer	68
miR-205-5p	Onco-miR	PTEN	Endometrial cancer	69
Let-7a	Tumor suppressor-miR	AKT2	thyroid cancer	70
miR-204-5p	Tumor suppressor-miR	BCL2	prostate cancer	71
miR-1285-3p	Tumor suppressor-miR	JUN	Hepatocellular carcinoma	72
miR-488	Tumor suppressor-miR	PAX6	Gastric cancer	73
miR-193b-3p	Tumor suppressor-miR	MYB	T-cell acute lymphoblastic leukemia	74
miR-34a	Tumor suppressor-miR	HDAC1	Ovarian cancer	75
miR-204-5p	Tumor suppressor-miR	PIK3CB	Breast cancer	76

1.3. 子宮內膜樣腺癌 (Endometrioid endometrial carcinoma, EEC)

有統計資料報導顯示子宮內膜癌在被診斷出女性生殖道癌症患者數量排名第一⁷⁷，也是女性常見罹患癌症的第四位⁷⁸。由隸屬美國的國家癌症研究中心所蒐集並統計的資料發現，子宮內膜癌的易發病族群為 50 歲後的高齡女性或是已停經女性，另外，醫療技術快速發展導致人類平均存活年齡提高，子宮內膜癌的發病機率大為提升^{79,80,81}。子宮內膜癌在臨床所觀察到的發病症狀包括女性經期的紊亂、月經以外的子宮不正常出血或陰道不正常的出血等⁸²。此外，身體質量指數超過一定範圍⁸³、肥胖^{84,85}、罹患糖尿病⁸⁶、具高血壓症狀⁸⁷、雌激素過量⁸⁸、女性不曾產子⁸⁹、年事高都是可能造成發病的原因。此癌症以病理定義有二類別：子宮內膜樣腺癌 (Endometrioid endometrial carcinoma, EEC, Type I) 及非子宮內膜樣腺癌 (Non-endometrioid endometrial carcinoma, NEEC, Type II)，最常發現的是前者，比例佔八成。此外，不屬於前者的，例如：鱗狀上皮類型等等都歸類在後者⁹⁰。而如以腫瘤存在及涉及的部位來劃分，則可分成四個主要期，分期階段如表 1-3 所示：第一期腫瘤的位置主要會僅存在於子宮體內，如再以侵入子宮肌肉層的程度則可再將其分成 IA、IB 期；第二期腫瘤的位置以是否侵入子宮頸的間質組織來界定，而腫瘤位置無擴散到子宮外部；第三期為腫瘤開始出現區域性的擴張：這期可分 A、B、C1、C2 期，依侵入狀況，A 期的判定是擴散至子宮的漿膜層以及旁邊的附屬部分，B 期則以陰道、子宮頸旁的組織是否有擴散來判定，C 期開始有遷移現象，需確認骨盆區域的淋巴結是否有轉移，其中可以再細分 1 期、2 期；第四期屬於癌症的轉移，4A 期的界定是擴散到黏膜層，4B 期則在腹腔中有淋巴的異常遷移現象⁹¹。

表 1-3. 子宮內膜癌之分期⁹¹。

Stage I	Tumor confined to the corpus uteri.
IA	No or less than half myometrial invasion.
IB	Invasion equal to or more than half of the myometrium.
Stage II	Tumor invades cervical stroma, but does not extend beyond the uterus.
Stage III	Local and/or regional spread of the tumor.
IIIA	Tumor invades the serosa of the corpus uteri and/or adnexae.
IIIB	Vaginal and/or parametrial involvement.
IIIC	Metastases to pelvic and/or para-aortic lymph nodes.
IIIC1	Positive pelvic nodes.
IIIC2	Positive para-aortic lymph nodes with or without positive pelvic lymph Nodes.
Stage IV	Tumor invades bladder and/or bowel mucosa, and/or distant metastases.
IVA	Tumor invasion of bladder and/or bowel mucosa.
IVB	Distant metastases, including intra-abdominal metastases and/or inguinal lymph nodes.

1.3.1 子宮內膜樣腺癌之診斷

今日有許多醫學方法用於子宮內膜癌的鑑定，施行手段大致分為侵入式還有非侵入式兩種方式。於今醫學上普遍使用的侵入性診斷方式有：子宮內視鏡(hysteroscopy)、子宮內膜擴張搔刮術(curettage)。當有子宮內膜癌常見發病病狀出現時，例如子宮不正常出血或是腹部下方有疼痛感，首先醫療人員利用內視鏡，從子宮頸穿入直達子宮來對子宮腔內部進行觀察及檢視，檢查有無可見的病灶並確認病灶尺寸以及生長情況還有型態⁹²。子宮內膜擴張搔刮術的施行較為繁複，需要事先將患者全身性麻醉，再以物理器械撐開子宮頸口，然後使用長刮勺進到腔內來刮取內壁，再把取得的組織進行相關醫療鑑定⁹³。醫院多採取較直接的侵入性手段進行癌症確診的工作，再加上病患自述的病理相關症狀，輔以醫療人員長期以來的檢診經驗，常具有相當的準確性，但需要一段時間的持續監測，而會需要確認自身是否有子宮內膜癌的族群大部分屬於 50 歲後高齡女性，如果一律以侵入式的診斷手法，在檢查過程導致的傷口還有不適會讓受診者有相當程度的不舒服。隨醫療技術的發達，醫學領域將非侵入性診斷作為一個研究的主要方向。現

在可見非侵入性診斷方式如抽血檢驗子宮內膜癌中高度表現的生物標記分子，常使用的指標為醣蛋白抗原 125 (Carbohydrate antigen 125, CA125)⁹⁴，以及利用造影方式，例如：進行電腦斷層掃描造影技術(Computed Tomography, CT)、磁共振造影成像技術 (Magnetic resonance imaging, MRI)。於醫學領域中，現在也有大量研究報導鑑定 CA 125 的平台設計⁹⁵，在 2019 年，B. Szymańska 以及他的研究團隊就曾發表一則以表面電漿共振為基礎發展出血液循環 CA125 偵測的生醫感測器研究⁹⁶，研究方向以蛋白質當作目標分子來進行檢測的研究文獻時有所聞。但在這幾年的研究文獻也有許多證實 miRNA 確實可當作生物標記分子來鑑別子宮內膜癌，由這些研究內容可以瞭解到，除了蛋白質當作生物標記分子，疾病診斷平台的設計策略中，也可以思考把 miRNA 視為子宮內膜癌的一個檢測對象。截至現今，專門為了確診子宮內膜樣腺癌且以 miRNA 為主要偵測目標的檢測平台的報導相對較少。

1.3.2 miRNA 作為子宮內膜樣腺癌診斷之生物標記分子

miR-205 量的改變普遍在子宮內膜樣腺癌的相關研究中可發現到，如表 1-4 整理所示，2014 年的 Ozora Tsukamoto 以及其研究團隊所發表的文章內容顯示，miR-205 在患者血液的表現水平與一般健康的人不同，具有高度表現的現象，不僅如此，患者將子宮摘除以後，miR-205 水平出現了下調的趨勢，因此可以確認 miR-205 表現量因為子宮內膜樣腺癌發病有上升的現象。在這篇文獻中的 ROC curve 有如圖 1-11 所示，作者蒐集而得資料顯示 miR-205 在曲線下的面積為 1.0，統計意義上顯示以此當作確診子宮內膜樣腺癌的生物標記分子是具有高度準確性的，可以將正常人與子宮內膜樣腺癌病患進行區隔⁹⁷。另外，還有更多研究團隊的結果支持 miR-205 與子宮內膜樣腺癌的巨大關聯性：在 2014 年，Guixu Zhang 團隊發表的文章證實，miR-205 在子宮內膜癌的水平上調，造成 PTEN 基因轉錄能力的下調，導致細胞凋亡的現象減弱⁹⁸；Ning Su 的團隊則在 2013 報導 miR-205 在於此癌症有高度表現，ESRPG 基因因而下調，導致癌細胞的侵入情況加劇⁹⁹；2015 年，Chenyu Jin 及所屬團隊亦證明了 miR-205 在此癌症病患中水平上調的情況，調控 AKT 基因，影響了其增生現象和侵入性，當加入 miR-205 inhibitor 時，增生現象被減低，侵入性也有相當程度的削弱，再次突出 miR-205 與子宮內膜癌的進程

存在相聯¹⁰⁰。這些報導都闡述了 miR-205 與子宮內膜癌的巨大關聯，且 miR-205 可於血漿樣品中被偵測到，因此本篇研究希望針對此核酸分子，發展一個子宮內膜樣腺癌的檢診平台。



表 1-4. microRNA 於子宮內膜樣腺癌之表現水平⁹⁷。

Circulating levels of EEC-associated miRNAs in plasma samples from patients without carcinoma (NE plasma) and patients with EEC (EEC plasma) before and after surgery.

miRNA	A		B		C		P value	
	NE plasma (n = 12)		EEC plasma before operation (n = 12)		EEC plasma after operation (n = 11)			
miR-135b	1.0 (0.57-3.40)		5.13 (0.49-15.13)		0.0062 (0-0.96)		<0.001	
miR-205	1.0 (0.06-4.07)		2.34 (0.0-6.19)		0.56 (0.34-0.94)		<0.001	
miR-30a-3p	1.0 (0.54-2.04)		0.53 (0.096-2.25)		0.062 (0-0.12)		0.003	
miR-21	1.0 (0.39-2.76)		0.64 (0.27-1.22)		0.59 (0.023-3.11)		0.033	
miR-10b	1.0 (0.34-2.49)		0.745 (0.05-1.55)		-		NS	
miR-30a-5p	1.0 (0.21-2.74)		0.48 (0.05-1.3)		-		NS	
miR-195	1.0 (0.24-2.1)		0.615 (0.05-1.73)		-		NS	
miR-499	ND		ND		-		-	

Expression levels are described as MoM values [median (minimum – maximum)]. Significant differences between control and EEC plasma before surgery were analyzed by Mann-Whitney U test, and significant differences between EEC plasma before and after operation were analyzed by Wilcoxon signed-rank test. $P < 0.05$ was considered significant. -, not analyzed; ND, not detected; NS, not significant.

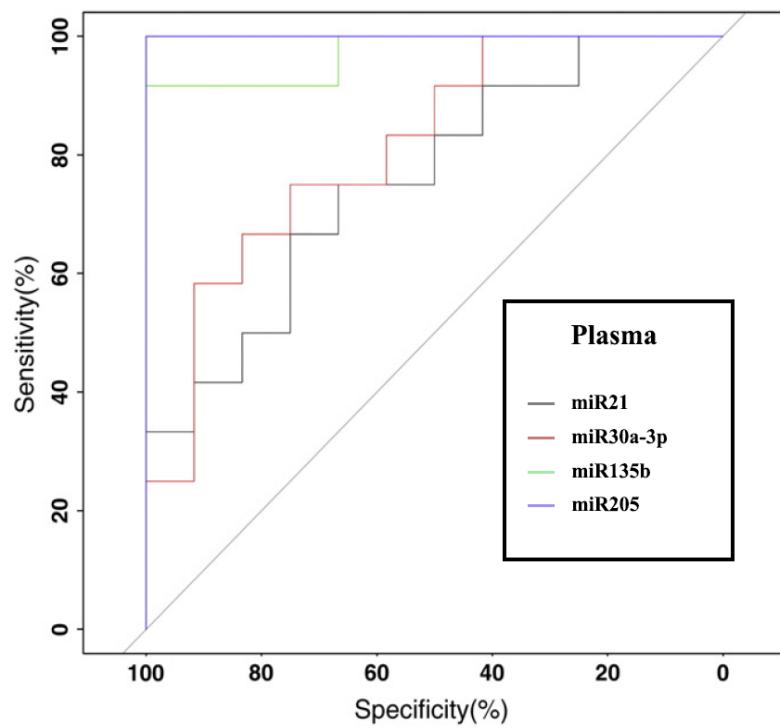


圖 1-11. miRNA 於子宮內膜樣腺癌患者中 Plasma 之 ROC curve。

(參考 reference 97 重新標示)

第二章 實驗材料與方法

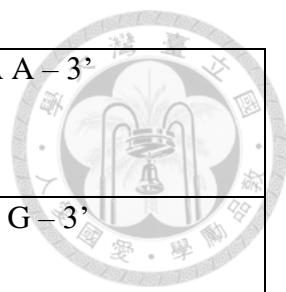
2.1 核酸序列

本篇研究所使用之核酸及序列如表 2-1 所示。



表 2-1. 核酸序列

Name	Sequence
DNA-Target (miR-205) 22bp	5'- TCCTTCATTCCACCGGAGTCTG - 3'
Probe1 49bp	5'- ATATATATATA ACCTCA /GCCAGACTCCGGTGGAATGAAGGAGTCT GTTTT -3'
Probe2 48bp	5'- ATATATATATA ACCTCA /GCCAGACTCCGGTGGAATGAAGGAGTCT TTTT -3'
Probe3 50bp	5'- ATATATATATA ACCTCA /GCCAGACTCCGGTGGAATGAAGGACTGG CTTTTT -3'
Biotin- Probe3 50bp	5'- ATATATATATA ACCTCA /GCCAGACTCCGGTGGAATGAAGGACTGG CTTTTT-biotin-3'
Target-5m 22bp	5' – AAA TTC ATT CCA CCG GAG TCT G – 3'



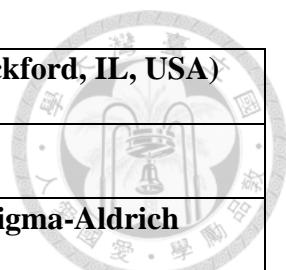
Target-3m 22bp	5' – TCC TTC ATT CCA CCG GAG TAA A – 3'
Target-mm 22bp	5' – TCC TTC ATT CAT ACG GAG TCT G – 3'
Product 16bp	5' – TGA GGT ATA TAT ATA T – 3'
CP1 16bp	5' – ATA TAT ATA TAC CTC A – 3'
CP2 21bp	5' – TGA GGA TAT ATA TAT ACC TCA – 3'

2.2 實驗試劑與材料

本篇研究所使用之實驗試劑與材料如表 2-2、表 2-3 所示。

表 2-2. 實驗試劑與材料

藥品名稱	化學式/縮寫	來源廠商
Acrylamide/Bis-acrylamide, 29:1		MDBio Inc. (Taipei, Taiwan)
Ammonium persulfate	APS	MDBio Inc. (Taipei, Taiwan)
Boric acid	H₃BO₃	Riedel-de-Haen (St. Louis, MO, USA)
Cutsmart buffer (10 ×)		New England Biolabs (Beverly, MA, USA)
Deoxynucleotide Triphosphate	dNTP	Thermo Scientific



		(Rockford, IL, USA)
DNA Gel Loading Dye (6 ×)		
Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dehydrate	EDTA-Na₂	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
GeneRuler Ultra Low Range DNA Ladder		Thermo Scientific (Rockford, IL, USA)
Klenow fragment(3'→5' exo) polymerase		New England Biolabs (Beverly, MA, USA)
Nb. BbvCI nicking enzyme		New England Biolabs (Beverly, MA, USA)
Potassium chloride	KCl	J.T. Baker (Philipsburg, NJ, USA)
Potassium phosphate monobasic	K₂HPO₄	J.T. Baker (Philipsburg, NJ, USA)
Sodium chloride	NaCl	Riedel-de-Haen (St. Louis, MO, USA)
Sodium phosphate dibasic	Na₂HPO₄	Riedel-de-Haen (St. Louis, MO, USA)
SYBR Gold Nucleic Acid Gel Stain		Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Super Mag Streptavidin Beads, 100 nm		Ocean NanoTech (San Diego, CA)
Tetramethylethylenediamine	TEMED	MDBio Inc. (Taipei, Taiwan)

Tris(hydroxymethyl)aminomethane	Tris-base	J.T. Baker (Philipsburg, NJ, USA)
---------------------------------	-----------	--------------------------------------

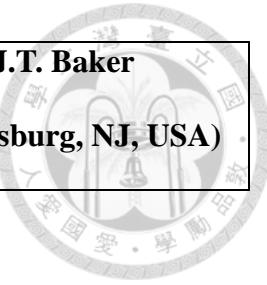


表 2-3. 緩衝溶液

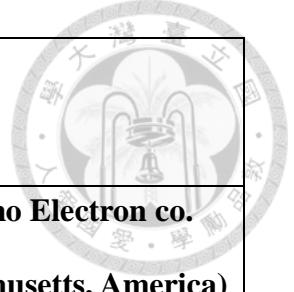
緩衝溶液(buffer)	成分組成
5× TBE buffer	500 mM Boric acid, 10 mM EDTA, 500 mM Tris-Base,
1× Cutsmart buffer	50 mM Potassium Acetate, 20 mM Tris-acetate, 10 mM Magnesium Acetate, 100 µg/mL BSA, pH 7.9
10 mM PBS buffer	137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na ₂ HPO ₄ , 2 mM K ₂ HPO ₄ , pH 7.4

2.3 實驗儀器

本篇研究所使用之實驗儀器如表 2-4 所示。

表 2-4. 實驗儀器

儀器	型號	來源廠商
酸鹼度計 pH meter	PB-10	Sartorius AG (Göttingen, Germany)
核酸增擴儀 Thermal cycler	C1000 TM	Bio-RAD (Hercules, California, USA)
Varioskan LUX 多功能微量盤式分析儀 Varioskan LUX	VLBLATD2	Thermos Scientific (Vantaa, Finland)



multi-mode microplate reader		
冷凍乾燥機 lyophilizer	Modulyod-1115	Thermo Electron co. (Massachusetts, America)
電源供應器 Power supply	PowerPac TM	Bio-RAD (Hercules, California, USA)
迴旋式震盪培養箱 Orbital incubator	S300S	Firstek (New Taipei City, Taiwan)
離心機 Centrifuge	Z36HK	Hermle (Baden württemberg, Germany)
ChemiDoc TM Touch 影像系統	1708370	Bio-RAD (Hercules, California, USA)
ChemiDoc TM Touch Imaging system		
垂直式電泳系統 Mini-PROTEAN tetra cell		Bio-RAD (Hercules, California, USA)
動態光散射粒徑分析儀 及界面電位分析儀 Zetasizer Nano ZS	Zetasizer Nano ZS	Malvern Panalytical

旋轉試管混合器	Intelli-Mixer RM-2	ELMI Ltd.
---------	--------------------	-----------



2.4. 實驗方法

2.4.1. 聚丙烯醯胺膠體電泳 (Polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE)

本實驗以 15% 之聚丙烯醯胺膠體 (Polyacrylamide gel) 鑑定核酸序列之雜合情況及酵素延長、剪切之情況。15% 之聚丙烯醯胺膠體成分：Acrylamide/Bisacrylamide = 29:1、1×TBE Buffer、1% APS、0.1% TEMED。電泳緩衝液為 0.5×TBE Buffer。施加 70 V 之電壓跑 90-120 分鐘，結束後將膠體以 1×SYBR Gold 漫染 15 分鐘後，以 ChemiDocTM Touch 影像系統照膠成像，並將圖像以 image J 軟體做定量分析。

2.4.2. 核酸探針之最佳化

以濃度 100 nM 不同序列之三種核酸探針 Probe1(P1)、Probe2(P2) 及 Probe3(P3) 分別與 100 nM、50 nM、25 nM 之目標核酸 (Target) 進行雜合，實驗之條件為反應體積 10 μL，反應溫度 37 °C，反應時間 60 分鐘，並以 15 % PAGE 進行分析，從而選擇與目標核酸分子雜合能力最好者。Stock 濃度：P1, P2 and P3 500 nM 2 μL/ Target 250 nM 4 μL。

2.4.3. 核酸探針(P3)之選擇性

(1) 位點不互補 (mismatch site) 之雜合探討：以濃度 100 nM 發生於 Target3 端 (T_{3m})、5 端 (T_{5m})、及中央 (T_{mm}) 之三個核苷酸之差異的三種核酸及 Target 與 P3 進行雜合，實驗之條件為反應體積 10 μL，反應溫度 37 °C，反應時間 60 分鐘，並以 15 % PAGE 進行分析，從而觀察核酸探針之正確辨認 Target 之能力。Stock 濃度：P3 500 nM 2 μL/ Target, T_{3m}, T_{5m} and T_{mm} 500 nM 2 μL。



(2).非目標核酸模擬真實 microRNA 序列之核酸雜合探討：以根據真實存在之 microRNA 序列所合成的 DNA 序列與濃度為 100 nM 之 P3 雜合。濃度為 100 nM 之 Target/DNA-21/DNA-155/DNA-182-5p/DNA-223/DNA-885，實驗之條件為反應體積 15 μ L、反應溫度 37 $^{\circ}$ C、反應時間 60 分鐘進行雜合反應。磁吸分離後抽取上清液以 15 %PAGE 進行選擇性之探討。Stock 濃度：P3 500 nM 3 μ L/ Target, DNA-21, DNA-155, DNA-182-5p, DNA-223 and DNA-885 500 nM 3 μ L。

2.4.4. 磁珠-探針(P3b@MB)之製備

- (1) 取出 10 μ L 之直徑 100 nm 磁珠，先以鉤鐵硼強力磁鐵磁吸 10 分鐘抽去儲存液，並補入等體積之 1 \times PBS buffer 沖洗。
- (2) 利用強力磁鐵磁吸 10 分鐘後抽去上清，再補入 10 μ L 1 \times PBS buffer 沖洗，重複此步驟三次。
- (3) 將磁珠重新懸浮於等體積 1 \times PBS buffer，並加入 2 μ L 之 10 \times PBS buffer、2 μ L 1.25 μ M p3-biotin 探針、16 μ L ddw，使探針之反應濃度為 125 nM，混合均勻後以 mixer b1 mode RPM10 於室溫下旋轉反應 1 小時。
- (4) 利用強力磁鐵磁吸分離 10 分鐘，抽去上清，再加入 1 \times PBS buffer 沖洗，重複此步驟三次
- (5) 回溶於 10 μ L 1 \times PBS buffer，待實驗備用。

2.4.5. 磁珠上探針之鑑定及定量

利用磁珠上的鏈親和素(Streptavidin)以及 5'端修飾有生物素(biotin)的核酸探針(P3b)，藉由鏈親和素-生物素之親和作用，將核酸探針修飾於磁珠上。為確認核酸探針確實修飾於磁珠表面之事實，以下列方法鑑定及進行定量：

(1). 以動態光散射粒徑分析儀及界面電位分析儀對修飾探針前後的磁珠進行粒徑大小(Particle size)及界面電位(Zeta potential)之鑑定。以 5 μ L 修飾後磁珠加入 995 μ L 1× PBS buffer 稀釋 200 倍，進行粒徑大小及 Zeta 電位之測量。

(2). 收集相同濃度之核酸探針原液及用於修飾磁珠後之上清液，以 1× SYBR Gold 浸染 15 分鐘後，觀察螢光強度之變化。在定量之前以反應濃度為 0、20、40、60、80、100、120、140 nM 之 P3b 以 1× SYBR Gold 浸染 15 分鐘並偵測螢光強度，建立探針之檢量線。

(3). 配置 125 nM 及 62.5 nM 之 P3b 加入 1× SYBR gold 並以 384-well plate 測量螢光讀值，並蒐集反應濃度為 125 nM 及 62.5 nM P3b 修飾磁珠後之磁吸分離上清液，視為修飾後 P3b 之剩餘量，加入 1× SYBR gold 以 384-well plate 測量螢光讀值，兩者差值視為修飾上磁珠之 P3b 量，作為每個磁珠修飾上多少條 P3b 探針之定量分析。其計算方式如下：

Biotin-P3 amounts per magnetic beads

$$\begin{aligned} & \text{① } \Delta \text{Intensity} \div \text{calibration curve coefficient} \\ & = \frac{\text{② } \times \text{384 Plate well volume}}{\text{③ } \times \text{Avogadro constant}} \\ & \hline & \text{④ } \text{total MB amounts} \end{aligned}$$



- ① 將螢光讀值之差值帶回螢光檢量線之方程式，換算成 P3b 之濃度。
- ② 偵測螢光讀值使用 384-well plate，而每個 well 之體積為 $20 \mu\text{L}$ ，將 P3b 濃度乘以體積轉換成 P3b 之總莫耳數。
- ③ 乘以亞佛加厥數，將 P3b 總莫耳數換算為 P3b 總條數。
- ④ 根據磁珠廠商提供之 datasheet，每 μL 之磁珠原液含有 1.3×10^8 個磁珠，將 P3b 總條數除以磁珠總數，可視為每個磁珠上應有多少條 P3b 探針。

2.4.6. 磁珠-探針(P3b@MB)之抓取效率鑑定

- (1). 以 $10 \mu\text{L}$ P3b@MB，先磁吸分離 10 分鐘後抽去上清液並加入反應濃度為 25 nM 、 50 nM 、 100 nM 之 Target 於 37°C 中雜合 60 分鐘，再度磁吸分離 10 分鐘後抽取上清液以 15% PAGE 分析。
- (2). 反應後磁珠以 95°C 、10 分鐘破壞 streptavidin-biotin 之結合，並磁吸分離 10 分鐘後抽取上清液以 15% PAGE 分析。
- (3). 以 $10 \mu\text{L}$ P3b@MB，先磁吸分離 10 分鐘後抽去上清液並加入反應濃度為 100 nM 之 Target 於 37°C 中雜合 60 分鐘；反應後磁珠以反應後磁珠以 95°C 、10 分鐘破壞 streptavidin-biotin 之結合，並磁吸分離 10 分鐘後抽取上清液；另外準備 $1 \mu\text{L}$ 、 $2 \mu\text{L}$ 、 $4 \mu\text{L}$ 之 P3b@MB 加入與不加入 100 nM Target，不進行磁吸分離直接 loading，以 15% PAGE 分析。

2.4.7 .P3b@MB 之 SDA 增擴反應時間最佳化

以 $10 \mu\text{L}$ P3b@MB 先磁吸分離抽去上清液，加入 100 nM Target 雜合並於反應條件為 $0.05 \text{ U}/\mu\text{L}$ Klenow fragment polymerase(KF)、 $0.2 \text{ U}/\mu\text{L}$ Nb. BbvCI nicking

enzyme(NE)、500 μ M dNTP 及 1 \times Cutsmart buffer，反應體積為 15 μ L、反應條件為 37 $^{\circ}$ C 的情況進行 SDA 反應，反應時間取 45 分鐘、60 分鐘、75 分鐘、90 分鐘，以 15 % PAGE 分析比較。Stock 濃度: Target 500 nM 3 μ L/ 0.5 U/ μ L Klenow fragment polymerase(KF) 1.5 μ L/ 2 U/ μ L Nb. BbvCI nicking enzyme(NE) 1.5 μ L/ 5 mM dNTP 1.5 μ L/ 10 \times Cutsmart buffer 1.5 μ L。

2.4.8. P3b@MB 之 SDA 增擴反應情況探討

(1). Free form 組別之 SDA :

加入反應濃度為 100 nM P3b 探針、100 nM Target、0.05 U/ μ L Klenow fragment polymerase(KF) 及 0.2 U/ μ L Nb. BbvCI nicking enzyme(NE)、500 μ M dNTP 及 1 \times Cutsmart buffer，反應體積為 15 μ L，反應條件為 37 $^{\circ}$ C、60 分鐘進行 SDA 增擴反應。Stock 濃度：P3b 500 nM 3 μ L / Target 500 nM 3 μ L/ 0.5 U/ μ L Klenow fragment polymerase(KF) 1.5 μ L/ 2 U/ μ L Nb. BbvCI nicking enzyme(NE) 1.5 μ L/ 5 mM dNTP 1.5 μ L/ 10 \times Cutsmart buffer 1.5 μ L。

(2).p3b@MB 組別之 SDA :

取 10 μ L P3b@MB 先磁吸分離 10 分鐘抽去上清液，再加入反應濃度為 100 nM/10 nM Target、0.05 U/ μ L Klenow fragment polymerase(KF) 及 0.2 U/ μ L Nb. BbvCI nicking enzyme(NE)、500 μ M dNTP、1 \times Cutsmart buffer，反應體積為 15 μ L、反應條件為 37 $^{\circ}$ C、60 分鐘進行 SDA 增擴反應。Stock 濃度： Target 500 nM 3 μ L/ 0.5 U/ μ L Klenow fragment polymerase(KF) 1.5 μ L/ 2 U/ μ L Nb. BbvCI nicking enzyme(NE) 1.5 μ L/ 5 mM dNTP 1.5 μ L/ 10 \times Cutsmart buffer 1.5 μ L。



(3).P3b@MB 加入 KF 及 dNTP :

取 10 μL P3b@MB 先磁吸分離 10 分鐘抽去上清液，再加入反應濃度為 0.05U/ μL Klenow fragment polymerase(KF)、500 μM dNTP、1 \times Cutsmart buffer，反應體積為 15 μL 、反應條件為 37 $^{\circ}\text{C}$ 、60 分鐘進行反應。Stock 濃度：0.5 U/ μL Klenow fragment polymerase(KF) 1.5 μL / 5 mM dNTP 1.5 μL / 10 \times Cutsmart buffer 1.5 μL 。

(4).P3b@MB 加入 NE :

取 10 μL P3b@MB 先磁吸分離 10 分鐘抽去上清液，再加入反應濃度為 0.2 U/ μL Nb. BbvCI nicking enzyme(NE)、1 \times Cutsmart buffer，反應體積為 15 μL 、反應條件為 37 $^{\circ}\text{C}$ 、60 分鐘進行反應。Stock 濃度：2 U/ μL Nb. BbvCI nicking enzyme(NE) 1.5 μL / 10 \times Cutsmart buffer 1.5 μL 。

(5). P3b@MB 加入 Target、KF、dNTP :

取 10 μL P3b@MB 先磁吸分離 10 分鐘抽去上清液，再加入反應濃度為 100 nM Target、0.05 U/ μL Klenow fragment polymerase(KF)、500 μM dNTP、1 \times Cutsmart buffer，反應體積為 15 μL 、反應條件為 37 $^{\circ}\text{C}$ 、60 分鐘進行反應。Stock 濃度：Target 500 nM 3 μL / 0.5 U/ μL Klenow fragment polymerase(KF) 1.5 μL / 5 mM dNTP 1.5 μL / 10 \times Cutsmart buffer 1.5 μL 。

(6). P3b@MB 加入 Target、NE :

取 10 μL P3b@MB 先磁吸分離 10 分鐘抽去上清液，再加入反應濃度為 100 nM

Target、0.2 U/ μ L Nb. BbvCI nicking enzyme(NE)、1 \times Cutsmart buffer，反應體積為 15 μ L、反應條件為 37 °C、60 分鐘進行反應。Stock 濃度：Target 500 nM 3 μ L/ 2 U/ μ L·Nb. BbvCI nicking enzyme(NE) 1.5 μ L / 10 \times Cutsmart buffer 1.5 μ L。



2.4.9. 動態光散射儀確認 P3b@MB 進行 SDA 反應之各階段磁珠

分別取 5 μ L 磁珠原液、P3b@MB、P3b@MB 與 Target 雜合後之磁珠、P3b@MB 進行 SDA 反應後之磁珠，並加入 995 μ L 1 \times PBS buffer 稀釋 200 倍，測量各階段磁珠之粒徑大小及 zeta 電位。

2.4.10. P3b@MB 之選擇性探討

本實驗對 P3b@MB 之選擇性探討實驗包含：

(1).位點不互補(mismatch site)之雜合探討：

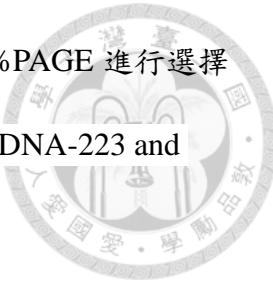
以發生於 Target3 端(T_{3m})、5 端(T_{5m})、及中央(T_{mm})之三個核苷酸之差異的三種核酸與 P3b@MB 雜合。取 10 μ L P3b@MB 先磁吸分離 10 分鐘抽去上清液，再加入反應濃度為 100 nM Target/ T_{3m} / T_{5m} / T_{mm} ，反應體積為 15 μ L、反應條件為 37 °C、60 分鐘進行雜合反應。磁吸分離後抽取上清液以 15 %PAGE 進行選擇性之探討。

Stock 濃度：Target, T_{3m} , T_{5m} and T_{mm} 500 nM 3 μ L。

(2).非目標核酸模擬真實 microRNA 序列之核酸雜合探討：

以根據真實存在之 microRNA 序列所合成的 DNA 序列與 P3b@MB 雜合。取 10 μ L p3b@MB 先磁吸分離 10 分鐘抽去上清液，再加入反應濃度為 100 nM DNA-21/DNA-155/DNA-182-5p/DNA-223/DNA-885，反應體積為 15 μ L、反應條件

為 37 °C 、60 分鐘進行雜合反應。磁吸分離後抽取上清液以 15 %PAGE 進行選擇性之探討。Stock 濃度：Target, DNA-21, DNA-155, DNA-182-5p, DNA-223 and DNA-885 500 nM 3 μ L 。



(3). 位點不互補(mismatch site)之 SDA 反應探討：以發生於 Target3 端(T_{3m})、5 端(T_{5m})、及中央(T_{mm})之三個核苷酸之差異的三種核酸與 P3b@MB 進行 SDA 反應。取 10 μ L p3b@MB 先磁吸分離 10 分鐘抽去上清液，再加入反應濃度為 100 nM Target/ T_{3m} / T_{5m} / T_{mm} 、0.05 U/ μ L Klenow fragment polymerase(KF) 及 0.2 U/ μ L Nb. BbvCI nicking enzyme(NE) 、500 μ M dNTP 、1 \times Cutsmart buffer，反應體積為 15 μ L 、反應條件為 37 °C 、60 分鐘進行 SDA 增擴反應。磁吸分離後抽取上清液以 15 %PAGE 進行選擇性之探討。Stock 濃度：Target, T_{3m} , T_{5m} and T_{mm} 500 nM 3 μ L/ 0.5 U/ μ L Klenow fragment polymerase(KF) 1.5 μ L/ 2 U/ μ L Nb. BbvCI nicking enzyme(NE) 1.5 μ L/ 5 mM dNTP 1.5 μ L/ 10 \times Cutsmart buffer 1.5 μ L 。

(4). 非目標核酸模擬真實 microRNA 序列之核酸 SDA 反應探討：以根據真實存在之 microRNA 序列所合成的 DNA 序列與 P3b@MB 雜合。取 10 μ L P3b@MB 先磁吸分離 10 分鐘抽去上清液，再加入反應濃度為 100 nM DNA-21/DNA-155/DNA-182-5p/DNA-223/DNA-885 、0.05 U/ μ L Klenow fragment polymerase(KF) 及 0.2 U/ μ L Nb. BbvCI nicking enzyme(NE) 、5 mM dNTP 、1 \times Cutsmart buffer，反應體積為 15 μ L 、反應條件為 37 °C 、60 分鐘進行雜合反應。磁吸分離後抽取上清液以 15 %PAGE 進行選擇性之探討。Stock 濃度：Target, DNA-21, DNA-155, DNA-182-5p, DNA-223 and DNA-885 500 nM 3 μ L/ 0.5 U/ μ L Klenow fragment polymerase(KF) 1.5

$\mu\text{L}/2\text{ U}/\mu\text{L}$ Nb. BbvCI nicking enzyme(NE) $1.5\ \mu\text{L}/5\text{ mM}$ dNTP $1.5\ \mu\text{L}/10\times$ Cutsmart buffer $1.5\ \mu\text{L}$ 。



2.4.11. P3b@MB 與 miR-205 之 SDA 反應探討

利用 miR-205 序列與 P3b@MB 進行 SDA 反應。取 $10\ \mu\text{L}$ P3b@MB 先磁吸分離 10 分鐘抽去上清液，再加入反應濃度為 100 nM miR-205、 $0.05\ (1\times)/0.03125\ (0.625\times)/0.0625\ (1.25\times)/0.0375\ (0.75\times)/0.075\ (1.5\times)\ \text{U}/\mu\text{L}$ Klenow fragment polymerase(KF) 及 $0.2\ (1\times)/0.2\ (1\times)/0.2\ (1\times)/0.3(1.5\times)/0.4\ (2\times)\ \text{U}/\mu\text{L}$ Nb. BbvCI nicking enzyme(NE)、 $500\ \mu\text{M}$ dNTP、 $1\times$ Cutsmart buffer，反應體積為 $15\ \mu\text{L}$ 、反應條件為 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、 150 分鐘/ 210 分鐘進行雜合反應。Stock 濃度：miR-205 500 nM $3\ \mu\text{L}/0.5\ \text{U}/\mu\text{L}$ Klenow fragment polymerase(KF) $0.625/1.25/0.75/1.5\ \mu\text{L}/2\ \text{U}/\mu\text{L}$ Nb. BbvCI nicking enzyme(NE) $1/1/1.5/2\ \mu\text{L}/5\text{ mM}$ dNTP $1.5\ \mu\text{L}/10\times$ Cutsmart buffer $1.5\ \mu\text{L}$ 。

2.4.12. SDA 產物與產物探針(product probe)之結合

利用 100 nM product 與兩條序列設計有可與 product 互補之序列(CP1、CP2)分別以反應濃度為 100 nM CP1/CP2，即濃度 $1:1/1:2/1:5$ 之比例，反應體積為 $10\mu\text{L}$ 進行 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、 60 分鐘之雜合反應。Stock 濃度： 500 nM product $2\mu\text{L}/1\mu\text{M}$ CP1 $1/2/5\ \mu\text{L}/1\ \mu\text{M}$ CP2 $1/2/5\mu\text{L}$

第三章 實驗結果與討論



3.1. 實驗設計

本實驗欲開發並建立一個可偵測子宮內膜樣腺癌(EEC)之生物標記微型核糖核酸分子(microRNA)之平台，用於 EEC 之早期診斷，於此，本實驗設計了一個結合鏈置換增擴反應(Strand Displacement Amplification, SDA)與磁珠分離及產物探針之生醫感測器偵檢策略(圖 3-1)，其主要可分為數個部分：

一、從血清樣品中抓取目標核酸 miR-205，利用強力磁鐵進行磁吸分離，將 miR-205 分離出來。

(Target enrichment)

二、加入 Klenow Fragment 及 Nb. BbvCI nicking enzyme 進行 SDA 延長反應。

(SDA reaction)

三、利用溶液中的產物探針結合產物核酸進行後續之訊號輸出。

(Signal Output)

第一部分利用磁珠表面之鏈親合素(streptavidin)與 3 端修飾有生物素(biotin)且可與目標 miR-205-5p 互補之 DNA 探針進行親和性結合形成磁珠-探針，將磁珠-探針加入到 Sample 中，以核酸序列互補的方式抓取 miR-205-5p，再利用強力磁鐵進行磁吸分離將磁珠吸取下來，抽去上清並補入 1× PBS buffer 進行清洗，重複此步驟兩次，完成萃取分離之步驟。

第二部分則將第一部分清洗後之磁珠加入 0.05 U/ μ L Klenow fragment polymerase 及 0.2U/ μ L Nb. BbvCI nicking enzyme 及 500 μ M dNTP，以抓取到的 miR-205-5p 作為引子進行 SDA 之反應。經序列設計的探針，於其上有 Nb. BbvCI 可辨認之切位及產物模板序列，可不斷延長並切出所要之產物序列，其溫度控制

在 37 度 C，反應 60 分鐘。再以強力磁鐵進行磁吸分離將磁珠吸取下來，抽取上清產物溶液備用。

第三部分將第二部分之上清產物溶液加入產物探針。此探針為髮夾莖環結構，與產物有互補序列，可作為一檢查點。當產物出現時可打開產物探針，並且互補雜合形成經序列設計後的富含腺昔酸及胸昔酸之雙股核酸(AT-rich duplex)。

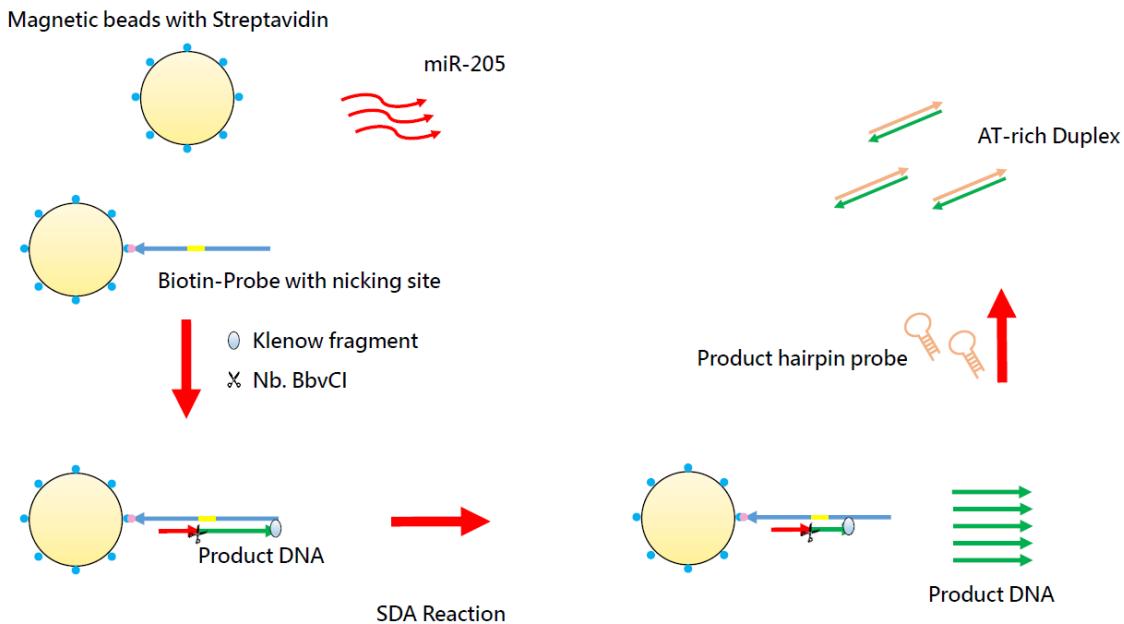


圖 3-1. 結合 SDA 增擴反應和磁珠分離及產物探針之生醫感測器偵檢策略，可用於子宮內膜樣腺癌之早期診斷。

3.2. 核酸探針(Probe)序列之最佳化

為了能有效率地從樣品中抓取目標核酸分子(Target)，以三種不同序列 probe 與不同濃度之 Target DNA-205-5p 進行雜合並確認何者雜合效率最高。序列設計如表 3-1、圖 3-2 所示，Probe1(P1)形成莖環結構之自由能為-7.36 kcal/mol，Probe2(P2)形成莖環結構之自由能為-5.70 kcal/mol，Probe3(P3)形成莖環結構之自由能為-5.54 kcal/mol，前二者形成之構型較穩定，預期 Probe3 可與 Target 有較佳雜合效率。

結果如圖 3-3 所示，可發現 lane11 到 lane 13 的 P3 雜合 band 較 P1、P2 組別明亮，證明 P3 與 Target 雜合效率較佳，以 Image J 進行雜合 band 之螢光定量分析後結果如圖 3-4 所示，可發現 P3 與 Target 雜合效率較佳。因此在後續實驗中，本實驗選擇 P3 作為偵測目標核酸之最佳探針。

表 3-1. 核酸探針序列，藍字者為 nicking enzyme 辨認之切位，畫底線者為形成莖環結構之雙股區域，綠字者為 Target 互補序列區域。



Probe1(49bp)	5'- ATA TAT ATA TAC C CTC A/GC <u>CAG ACT CCG GTG GAA</u> <u>TGA AGG A</u> <u>GT CTG</u> TTT T-3'
Probe2 (48bp)	5'- ATA TAT ATA TAC CTC AGC <u>CAG ACT CCG GTG GAA TGA</u> <u>AGG AGT CTT</u> TTT – 3'
Probe3 (50bp)	5'- ATA TAT ATA TAC CTC <u>AGC</u> <u>CAG ACT CCG GTG GAA</u> TGA <u>AGG ACT GGC</u> <u>TTT TT</u> T-3'

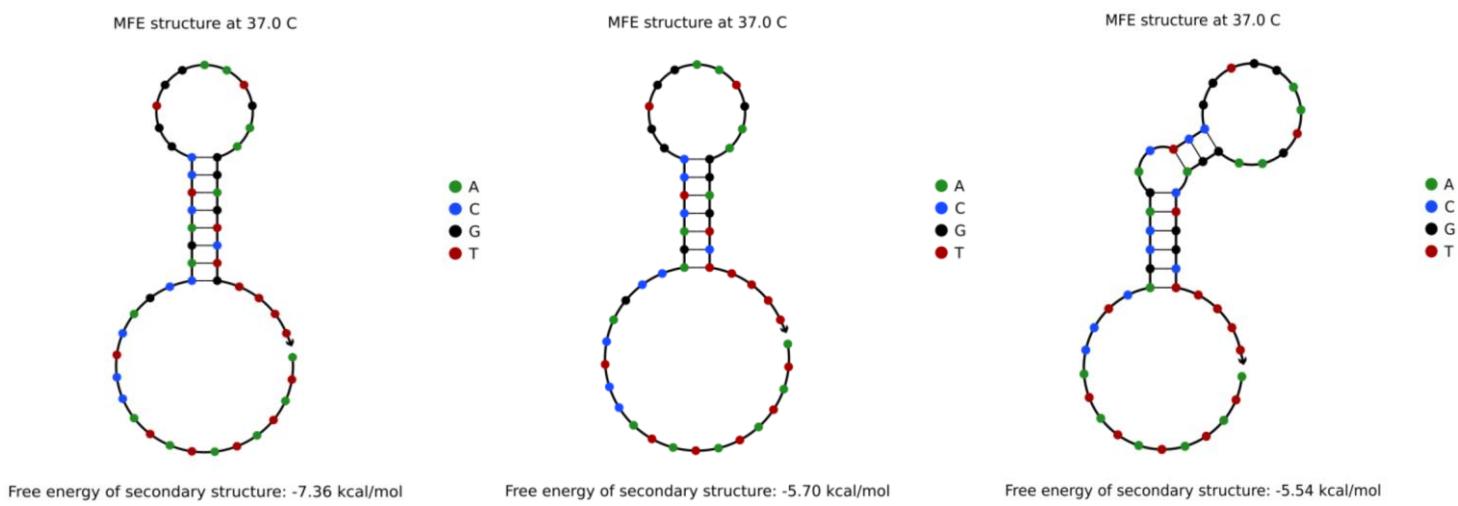


圖 3-2. 以 NU PACK 分析 Probe 序列形成之結構及自由能。

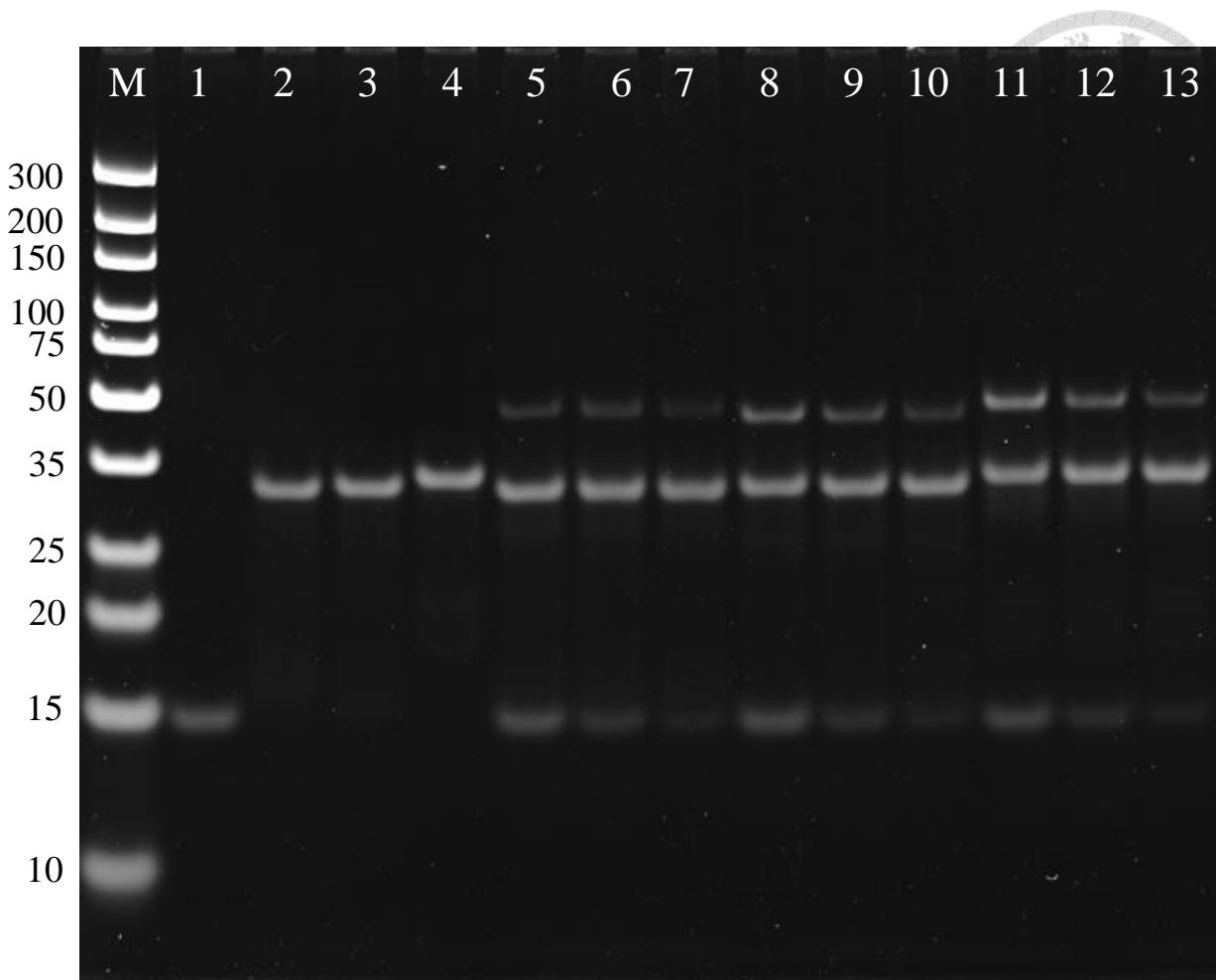


圖 3-3. 不同探針與不同濃度之目標分子(DNA-205-5p)雜合情況之條帶對應圖。

以 15% PAGE 於 70V 電壓下進行電泳分析 120 分鐘。Ultra low range DNA ladder。(1)100 nM Target；(2)100 nM P1；(3)100 nM P2；(4)100 nM P3；(5)100 nM P1 與 100 nM Target 之雜合；(6)100 nM P1 與 50 nM Target 之雜合；(7) 100 nM P1 與 25 nM Target 之雜合；(8) 100 nM P2 與 100 nM Target 之雜合；(9) 100 nM P2 與 50 nM Target 之雜合；(10) 100 nM P2 與 25 nM Target 之雜合；(11) 100 nM P3 與 100 nM Target 之雜合；(12) 100 nM P3 與 50 nM Target 之雜合；(13) 100 nM P3 與 25 nM Target 之雜合。

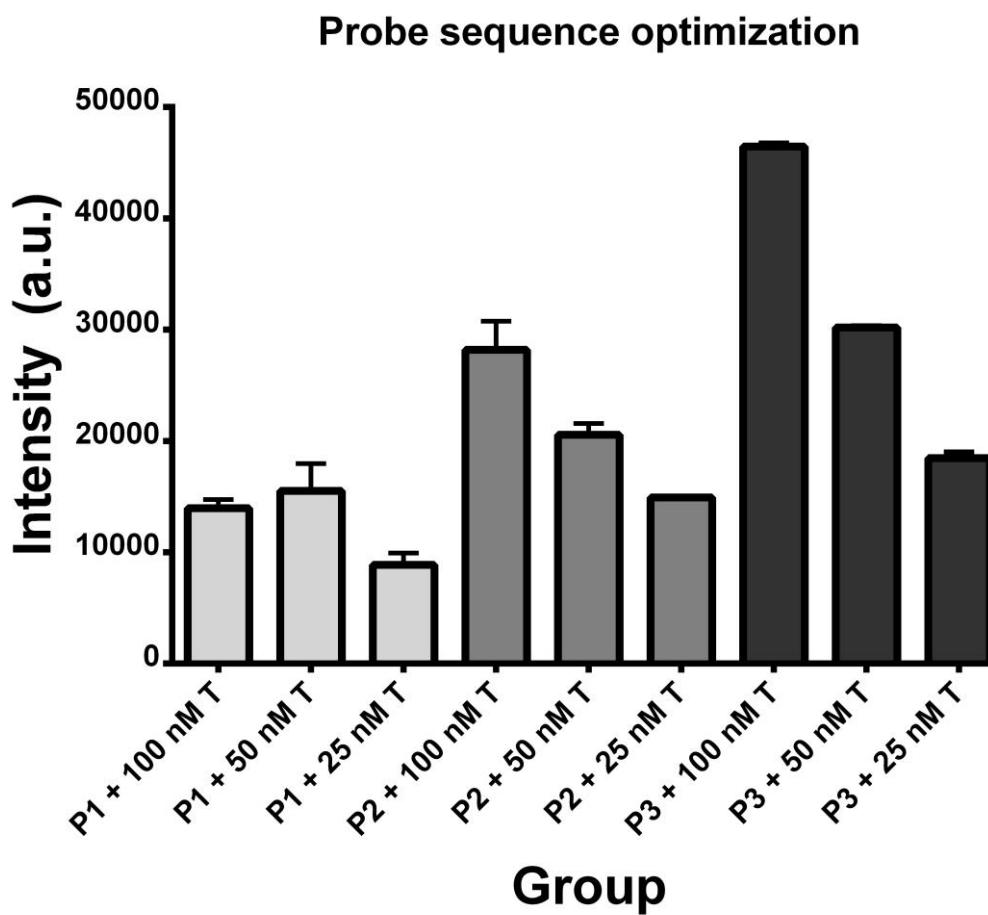


圖 3-4. P1、P2、P3 與不同濃度 Target 雜合情況之螢光定量結果。

3.3. 磁珠探針之鑑定及定量

利用核酸 3 端修飾有生物素之 P3(p3-biotin, P3b)與表面修飾鏈親合素之直徑 100 奈米之磁珠(streptavidin-MB)，藉由 biotin 與 streptavidin 之親和力，將 P3b 修飾於磁珠上。並以動態光散射粒徑及 zeta 電位分析儀(Dynamic Light Scattering/zeta Potential Analyzer)及 SYBR gold 之螢光讀值進行鑑定及定量。

3.3.1. DLS 之磁珠修飾前後之鑑定

(1). 鑑定磁珠修飾前後之粒徑大小：

若 DNA 核酸探針確實有修飾上磁珠表面，則修飾後磁珠之粒徑大小相較於修飾前磁珠之粒徑，應會增加。本實驗共重複三次，結果如圖 3-3、圖 3-4、圖 3-5、圖 3-6、圖 3-7、圖 3-8 所示，修飾前之磁珠平均粒徑大小分別約為 159/164/168 nm，而修飾上 P3b 核酸探針後，測得平均粒徑大小分別為 180/201/197 nm，證明磁珠表面確實有修飾上 P3b 核酸探針。

(2). 鑑定磁珠修飾前後之 zeta potential 大小，DNA 核酸探針具有磷酸骨架，而磷酸根帶有負電，若是核酸探針確實有修飾上磁珠表面，則修飾後磁珠之 zeta potential 應會趨向負值更大。結果如表 3-1 所示，磁珠修飾前平均 zeta potential 分別為-13.53 /-11.03/-13.53 mV，而修飾後磁珠 zeta potential 為-20.03/-19.90/-21.77 mV，表示因為修飾上 DNA 核酸探針而趨向負值更大的 zeta potential，證明磁珠表面確實有修飾上 p3b 核酸探針。

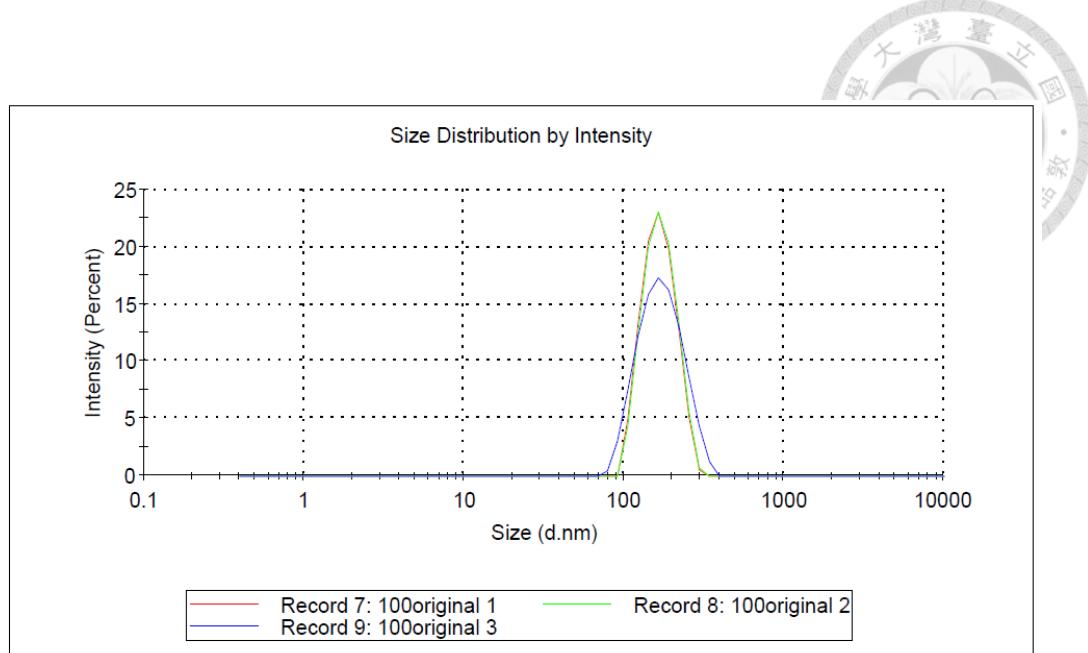


圖 3-3. 以 DLS 粒徑分析儀偵測磁珠修飾前之粒徑大小，其 Z-average 約為 159 nm。

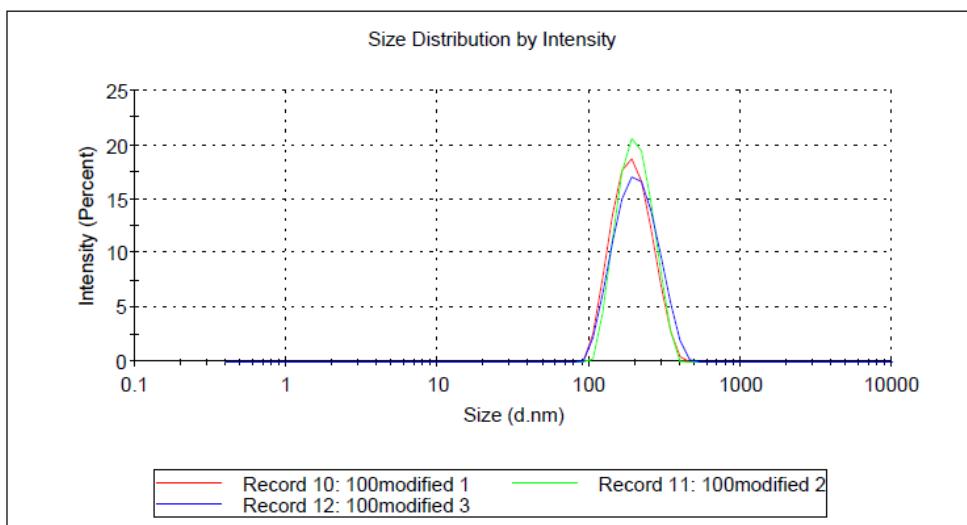


圖 3-4. 以 DLS 粒徑分析儀偵測磁珠修飾後之粒徑大小，其 Z-average 約為 180 nm。

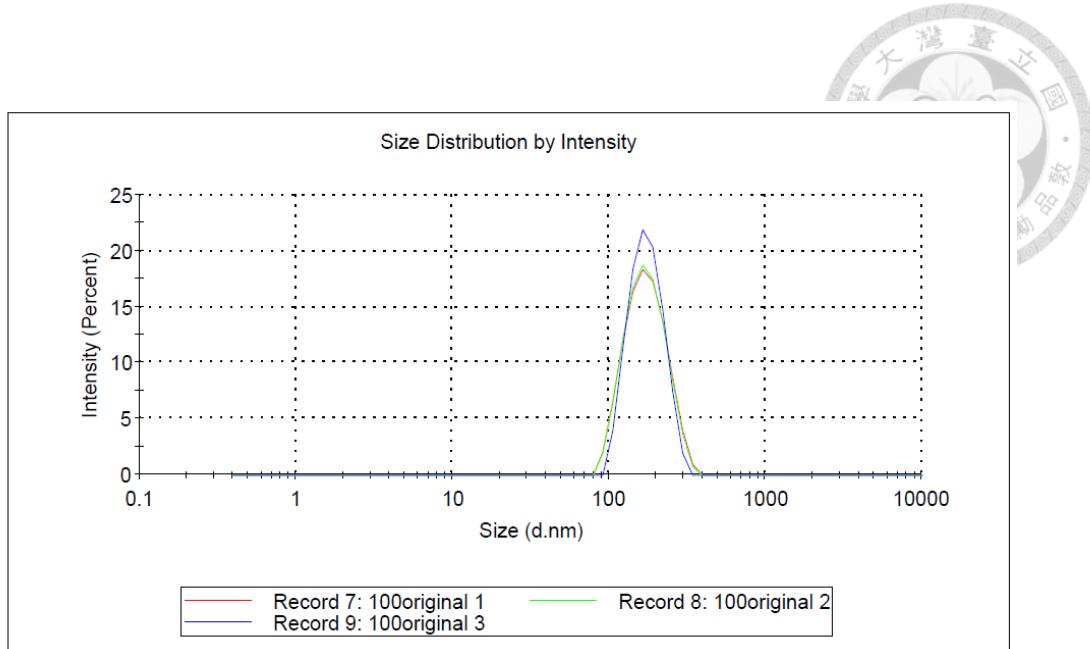


圖 3-5. 以 DLS 粒徑分析儀偵測磁珠修飾前之粒徑大小，其 Z-average 約為 164 nm。

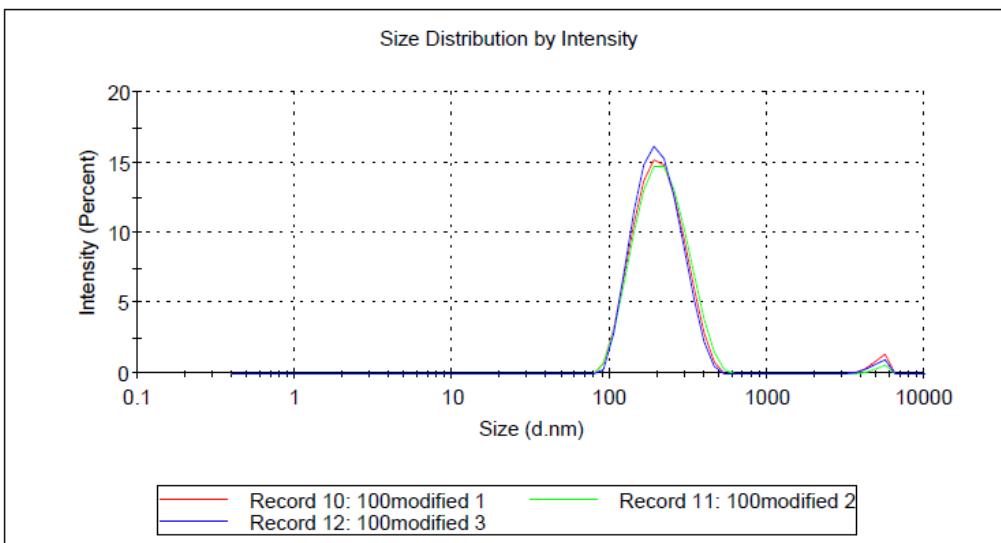


圖 3-6. 以 DLS 粒徑分析儀偵測磁珠修飾後之粒徑大小，其 Z-average 約為 201 nm。

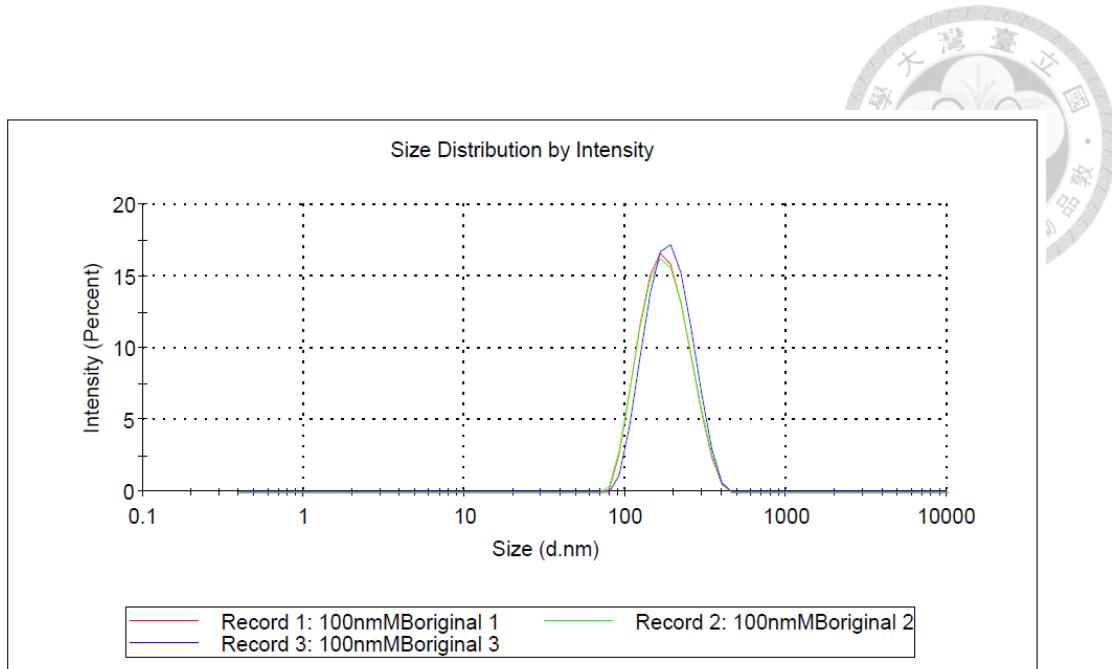


圖 3-7. 以 DLS 粒徑分析儀偵測磁珠修飾前之粒徑大小，其 Z-average 約為 168 nm。

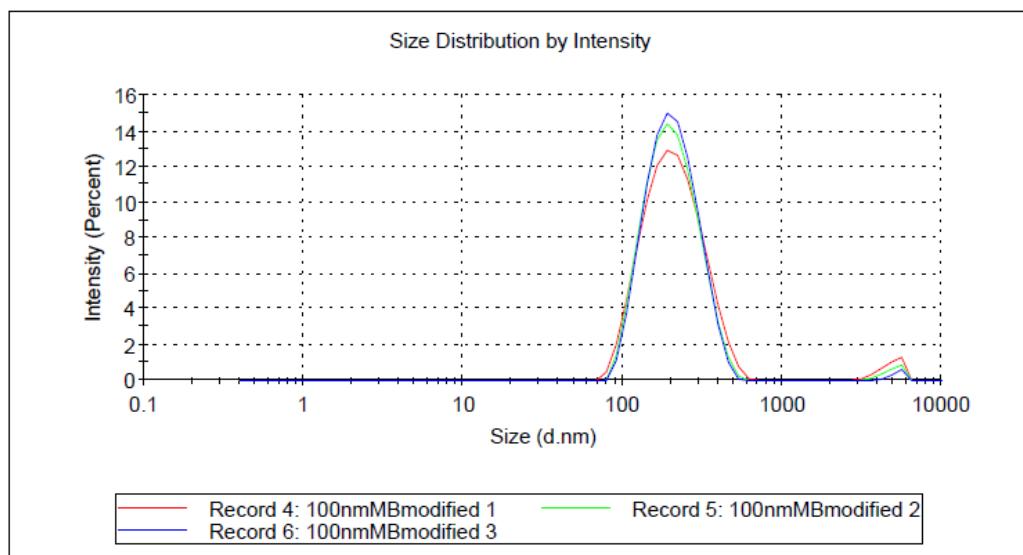
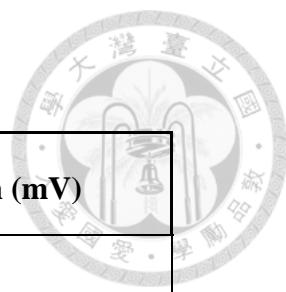


圖 3-8. 以 DLS 粒徑分析儀偵測磁珠修飾後之粒徑大小，其 Z-average 約為 197 nm。

表 3-1. 磁珠修飾前後之 Zeta potential 偵測結果



	Zeta Potential (mV)	Mean (mV)
100 nmMB	-10.2	-11.2 ± 1.32
	-10.7	
	-12.7	
	-10.0	-11.03 ± 1.31
	-10.6	
	-12.5	
	-10.6	-13.53 ± 2.70
	-14.1	
	-15.9	
100 nm P3b@MB	-18.7	-20.03 ± 1.30
	-20.1	
	-21.3	
	-17.7	-19.90 ± 1.95
	-20.6	
	-21.4	
	-19.9	-21.77 ± 1.63
	-22.5	
	-22.9	

3.3.2. SYBR gold 之螢光定量



- (1). 以 0、20、40、80、100、120、140 nM 濃度之 P3b 加入 1× SYBR gold 建立螢光檢量線。結果如圖 3-9 所示。
- (2). 配置 125 nM 及 62.5 nM 之 P3b 加入 1× SYBR gold 並以 384 well plate 測量螢光讀值，並蒐集反應濃度為 125 nM 及 62.5 nM P3b 修飾磁珠後之磁吸分上清液，視為修飾後 P3b 之剩餘量，加入 1× SYBR gold 以 384 well plate 測量螢光讀值，兩者差值視為修飾上磁珠之 P3b 量，作為每個磁珠修飾上多少條 P3b 探針之定量分析。其計算方式如下：

P3b amounts per magnetic beads

$$= \frac{\Delta \text{Intensity} \div \text{calibration curve coefficient} \times 384 \text{ Plate well volume} \times \text{Avogadro constant}}{\text{total MB amounts}}$$

- ① 將螢光讀值之差值帶回螢光檢量線之方程式，換算成 P3b 之濃度。
- ② 偵測螢光讀值使用 384well plate，而每個 well 之體積為 20 μL ，將 P3b 濃度乘以體積轉換成 P3b 之總莫耳數。
- ③ 乘以亞佛加厥數，將 P3b 總莫耳數換算為 P3b 總條數。
- ④ 根據磁珠廠商提供之 Datasheet，每 μL 之磁珠原液含有 1.3×10^8 個磁珠，

本實驗使用 $20 \mu\text{L}$ 磁珠原液。將 P3b 總條數除以磁珠總數，可視為每個磁珠上應有多少條 P3b 探針。結果如圖 3-10 所示，經計算後， 125 nM P3b 探針修飾組別，每個磁珠上應有 427 條 P3b 探針，而 62.5 nM P3b 探針修飾組別，每個磁珠上應有 144 條 P3b 探針，也證實 P3b 探針確實是因為修飾於磁珠表面導致修飾組別之螢光強度下降。SYBR gold staining 之放射光譜圖如圖 3-11 所示。

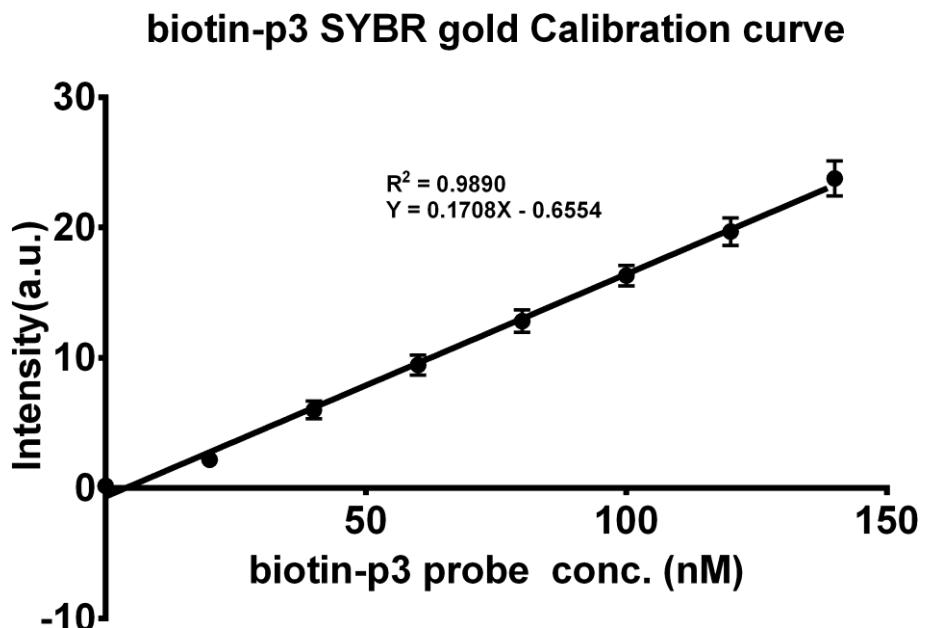


圖 3-9. 由不同濃度 P3b 加入 $1\times$ SYBR gold 之螢光檢量線。

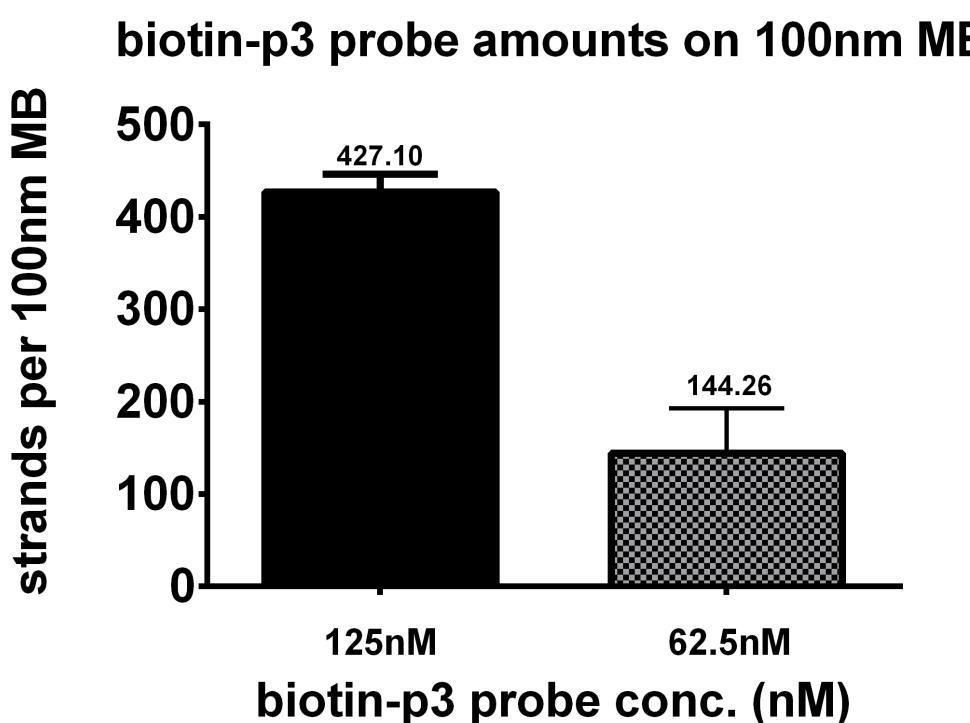


圖 3-10. 磁珠上 P3b 探針之定量分析結果。

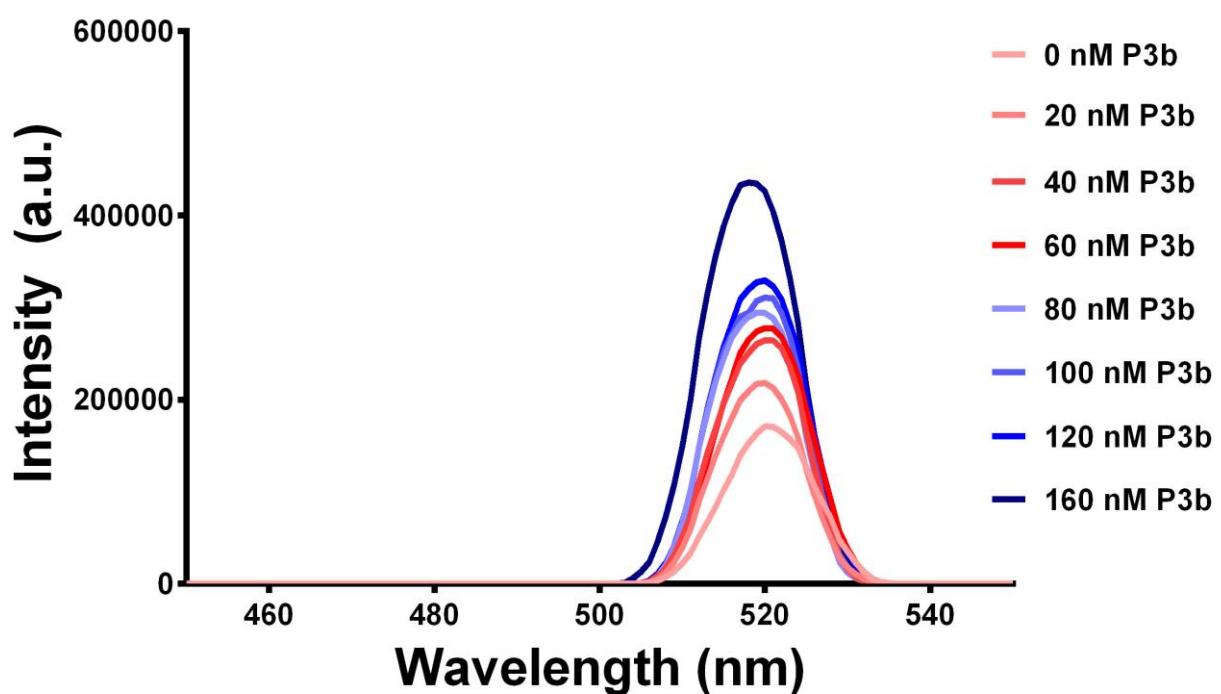


圖 3-11.P3b 與 SYBR 結合之放射光譜。



3.4. 磁珠-探針(P3b@MB)之抓取效率鑑定

為確認修飾上磁珠之探針具有抓取目標核酸分子之能力，以磁珠-探針與不同濃度目標核酸分子進行雜合，並以 15 % PAGE 進行分析。結果如圖 3-12 所示，在 Target 濃度為 100 nM、50 nM、25 nM，P3b@MB 均可將 Target 完全抓取。

為了確認 P3b@MB 確實有抓住 Target，將此實驗之磁珠以強力磁鐵磁吸分離 10 分鐘，抽去上清液並補入等體積之 DDW，以 95 °C, 10 分鐘之反應條件，使磁珠與 P3b 間的 streptavidin-biotin 親和性結合斷開，並磁吸分離 10 分鐘抽取上清液以 15 % PAGE 進行分析，預期看到掉落之 P3b 以及所抓取的 Target。結果如圖 3-13 所示，lane5 為僅有磁珠-探針之組別，加熱後掉落可看到 P3b 位置有明顯之 band，證明 P3b 探針確實有接上磁珠；lane6、7 為磁珠探針與 25 nM Target 雜合後加熱掉落之組別，可看見除了掉落之 P3b 探針，在 Target 位置有 band 的出現；lane8、9 為磁珠探針與 50 nM Target 雜合後加熱掉落之組別，可看見在 Target 位置有較明亮之 band；lane10、11 為磁珠探針與 100 nM Target 雜合後加熱掉落之組別，在 Target 位置有更明亮的 band 產生。經 Image J 定量之結果如圖 3-14、3-15 所示，P3b 之掉落情況均勻，而 Target 掉落之情況與當時加入 Target 之濃度有正相關性，證明磁珠-探針確實可抓住 Target 之情況。

另外為了確認 P3b@MB 是否會隨電泳進入膠體產生特定之 band，以不同體積之 P3b@MB 以及雜合 100 nM Target 之 P3b@MB 不經磁吸分離直接進行電泳，結果如圖 3-16 所示，lane5、6、7 分別為 1 μL、2 μL、4 μL P3b@MB 無磁吸分離之結果，可發現沒有特定之 band，lane8、9、10 分別為 1 μL、2 μL、4 μL P3b@MB 與 100 nM Target 雜合後無磁吸分離之結果，可發現沒有特定之 band。於圖 3-17 可發現磁珠積留於 well 底部。

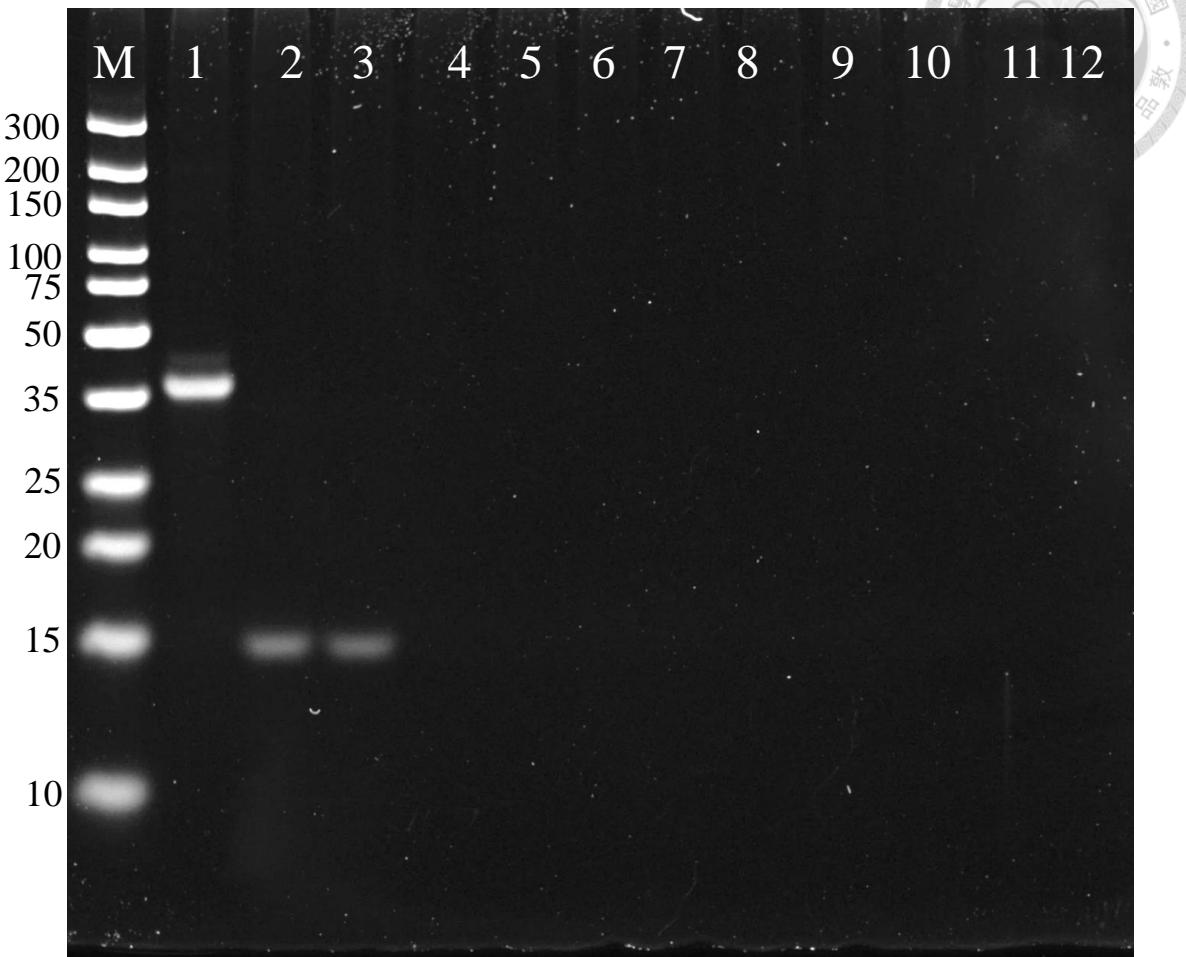


圖 3-12. P3b@MB 抓取目標核酸分子之情況條帶對應圖。

以 15 % PAGE 於 70 V 電壓下進行電泳分析 120 分鐘。Ultra low range DNA ladder。(1)100 nM P3b；(2)100 nM Target；(3)未修飾之磁珠與 100 nM Target 之雜合；(4)P3b@MB 與 100 nM Target 之雜合；(5) P3b@MB 與 50 nM Target 之雜合；(6) P3b@MB 與 25 nM Target 之雜合；(7) P3b@MB 與 100 nM Target 之雜合；(8) P3b@MB 與 50 nM Target 之雜合；(9) P3b@MB 與 25 nM Target 之雜合；(10) P3b@MB 與 100 nM Target 之雜合；(11) P3b@MB 與 50 nM Target 之雜合；(12) P3b@MB 與 25 nM Target 之雜合。

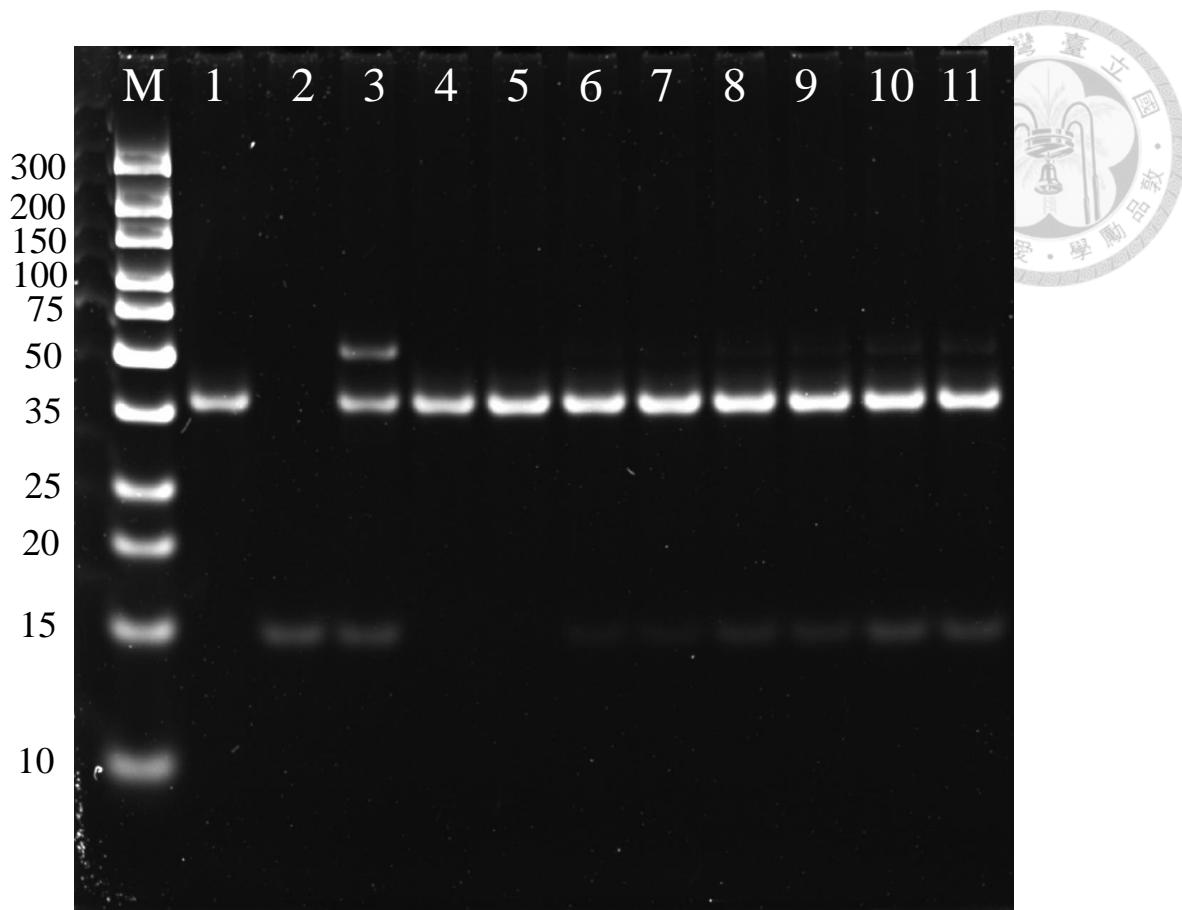


圖 3-13. P3b@MB 雜合 Target 後加熱掉落之條帶對應圖。

以 15 % PAGE 於 70 V 電壓下進行電泳分析 120 分鐘。Ultra low range DNA ladder。(1) 100 nM P3b；(2) 100 nM Target；(3) 100 nM P3b 與 100 nM Target 之雜合情況；(4)100 nM P3b；(5)P3b@MB 加熱掉落之情況；(6)(7) P3b@MB 與 25 nM Target 雜合後加熱掉落之情況；(8)(9) P3b@MB 與 50 nM Target 雜合後加熱掉落之情況；(10)(11) P3b@MB 與 100 nM Target 雜合後加熱掉落之情況。

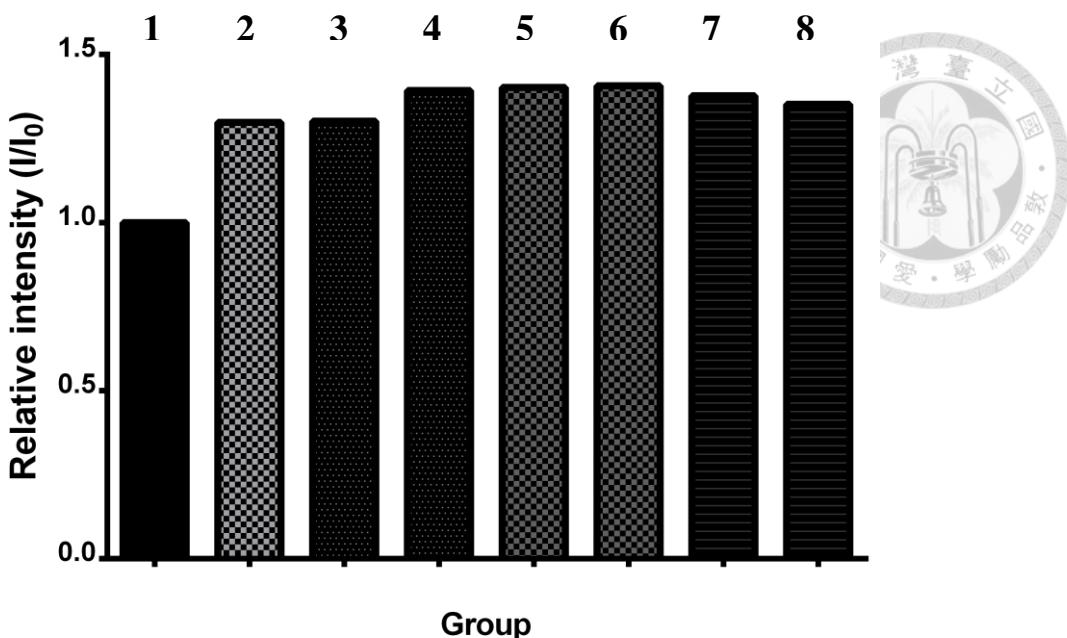


圖 3-14. 以 100 nM P3b 為相對定量之基準，各組別 P3b 作相對定量之結果。

Group1 為 100 nM P3b；Group2 為 P3b@MB only 組別；Group3、4 為 P3b@MB 與 25 nM Target 雜合後加熱掉落之組別；Group5、6 為 P3b@MB 與 50 nM Target 雜合後加熱掉落之組別；Group7、8 為 P3b@MB 與 100 nM Target 雜合後加熱掉落之組別。

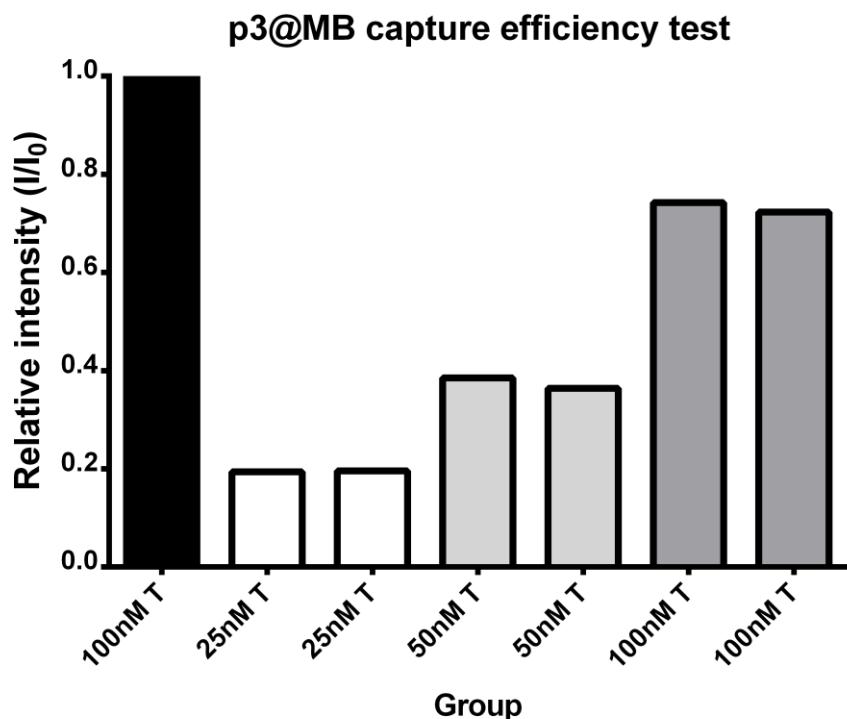


圖 3-15. 以 100 nM Target 為相對定量之基準，各組別 Target 掉落量作相對定量之結果。

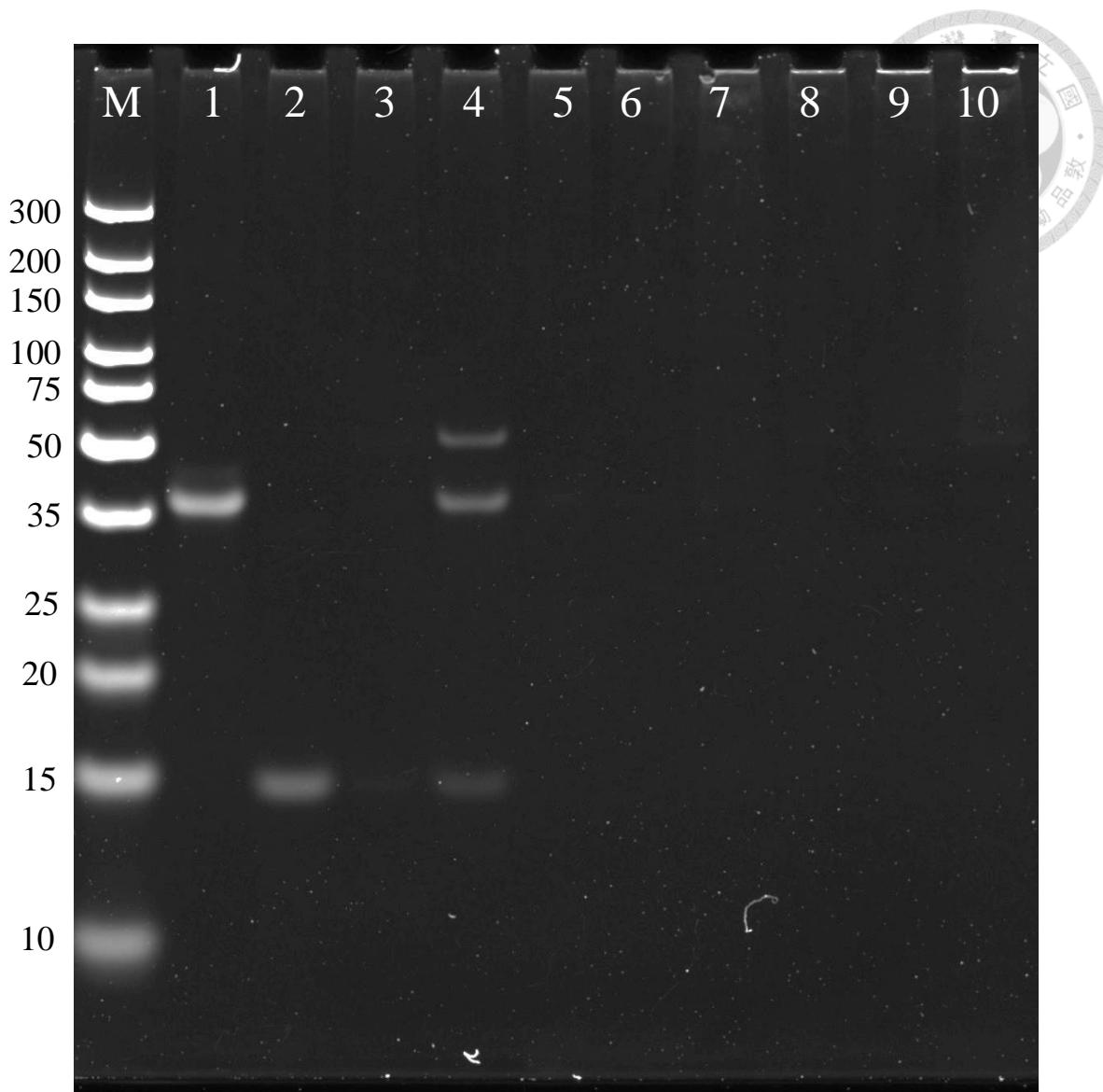


圖 3-16 P3b@MB 雜合 Target 後加熱掉落之條帶對應圖。

以 15 % PAGE 於 70 V 電壓下進行電泳分析 120 分鐘。Ultra low range DNA ladder。(1) 100 nM P3b；(2) 100 nM Target；(3) P3b@MB 與 100 nM Target 之雜合情況；(4)P3b@MB 與 100 nM Target 雜合後加熱掉落之情況；(5)1 μ L P3b@MB 無磁吸分離直接電泳之情況；(6) 2 μ L P3b@MB 無磁吸分離直接電泳之情況；(7) 4 μ L P3b@MB 無磁吸分離直接電泳之情況；(8) 1 μ L P3b@MB 與 100 nM Target 無磁吸分離直接電泳之情況；(9) 2 μ L P3b@MB 與 100 nM Target 無磁吸分離直接電泳之情況；(10) 4 μ L P3b@MB 與 100 nM Target 無磁吸分離直接電泳之情況。

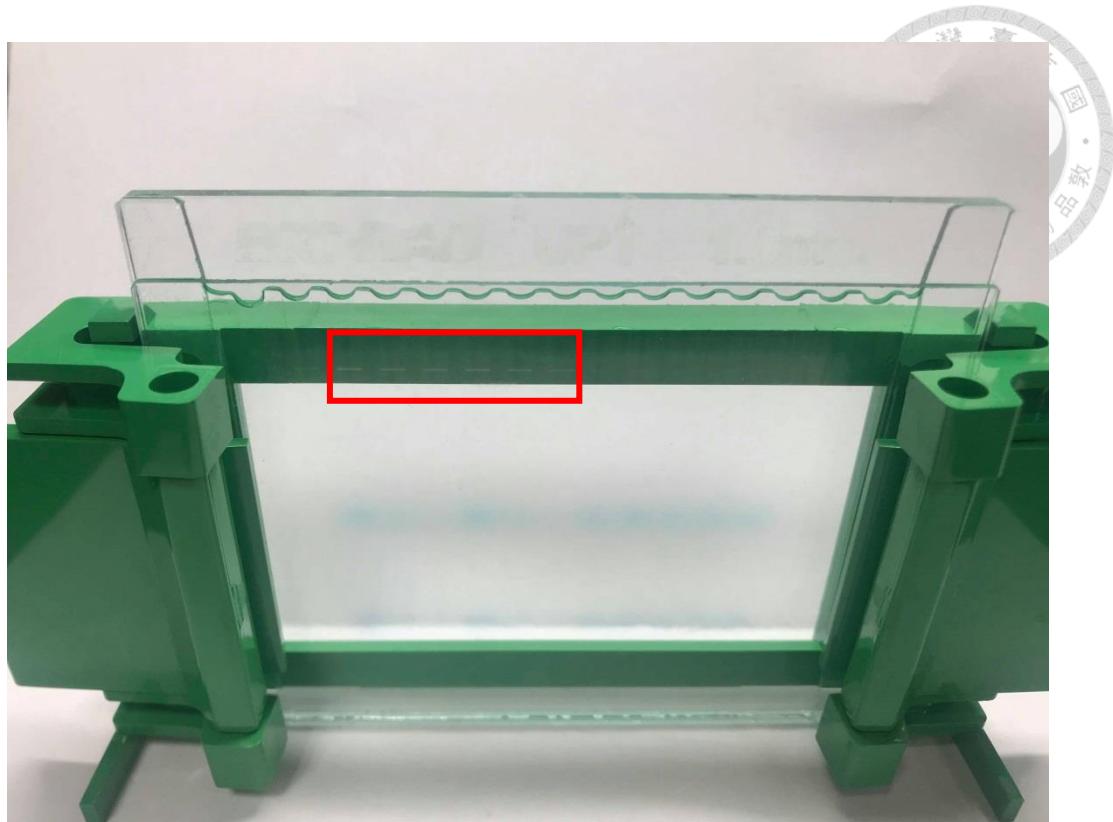


圖 3-17. 磁珠殘留於膠體 well 中。

3.5. SDA 增擴反應時間最佳化

以 P3b@MB 加入 100 nM Target 雜合並於反應條件為 0.05 U/ μ L Klenow fragment polymerase (KF)、0.2 U/ μ L Nb. BbvCI nicking enzyme (NE)、5 mM dNTP 及 1 \times Cutsmart buffer 的情況進行 SDA 反應，反應時間取 45 分鐘、60 分鐘、75 分鐘、90 分鐘進行比較。結果如圖 3-18、3-20 所示，圖 3-18 之 lane 6、7、8 為 P3b@MB 與 100 nM Target 進行 SDA 反應 45 分鐘後之結果，與 lane5 的 free form P3b 與 100 nM Target 進行 SDA 反應 45 分鐘後之結果相比，產生物產率較高，而 lane11、12、13 為 P3b@MB 與 100 nM Target 進行 SDA 反應 60 分鐘後之結果，與 lane10 的 free form P3b 與 100 nM Target 進行 SDA 反應 60 分鐘後之結果，產生物產率較高。將同反應時間組之 P3b@MB SDA 組別之產物亮度除以 free form p3b SDA 組別之產物亮度做相對定量之結果如圖 3-19，反應時間 45 分鐘組別之比例為 1.68，反應時間 60 分鐘組別之比例為 2.01。圖 3-20 之 lane6、7、8 為 P3b@MB 與 100 nM Target 進行 SDA 反應 75 分鐘後之結果，與 lane5 的 free form p3b 與 100 nM Target 進行 SDA 反應 75 分鐘後之結果相比，產生物產率較高，而 lane11、12、13 為 P3b@MB 與 100 nM Target 進行 SDA 反應 90 分鐘後之結果，與 lane10 的 free form P3b 與 100 nM Target 進行 SDA 反應 90 分鐘後之結果，產生物產率較高。將同反應時間組之 P3b@MB SDA 組別之產物亮度除以 free form P3b SDA 組別之產物亮度做相對定量之結果如圖 3-21，反應時間 75 分鐘組別之比例為 1.53，反應時間 90 分鐘組別之比例為 1.28，可發現反應時間 60 分鐘之產率最佳，且於 0nM Target 反應 60 分鐘後並未發現有非專一產物之產生，因此最後以反應時間 60 分鐘作為 SDA 反應的最佳反應時間。

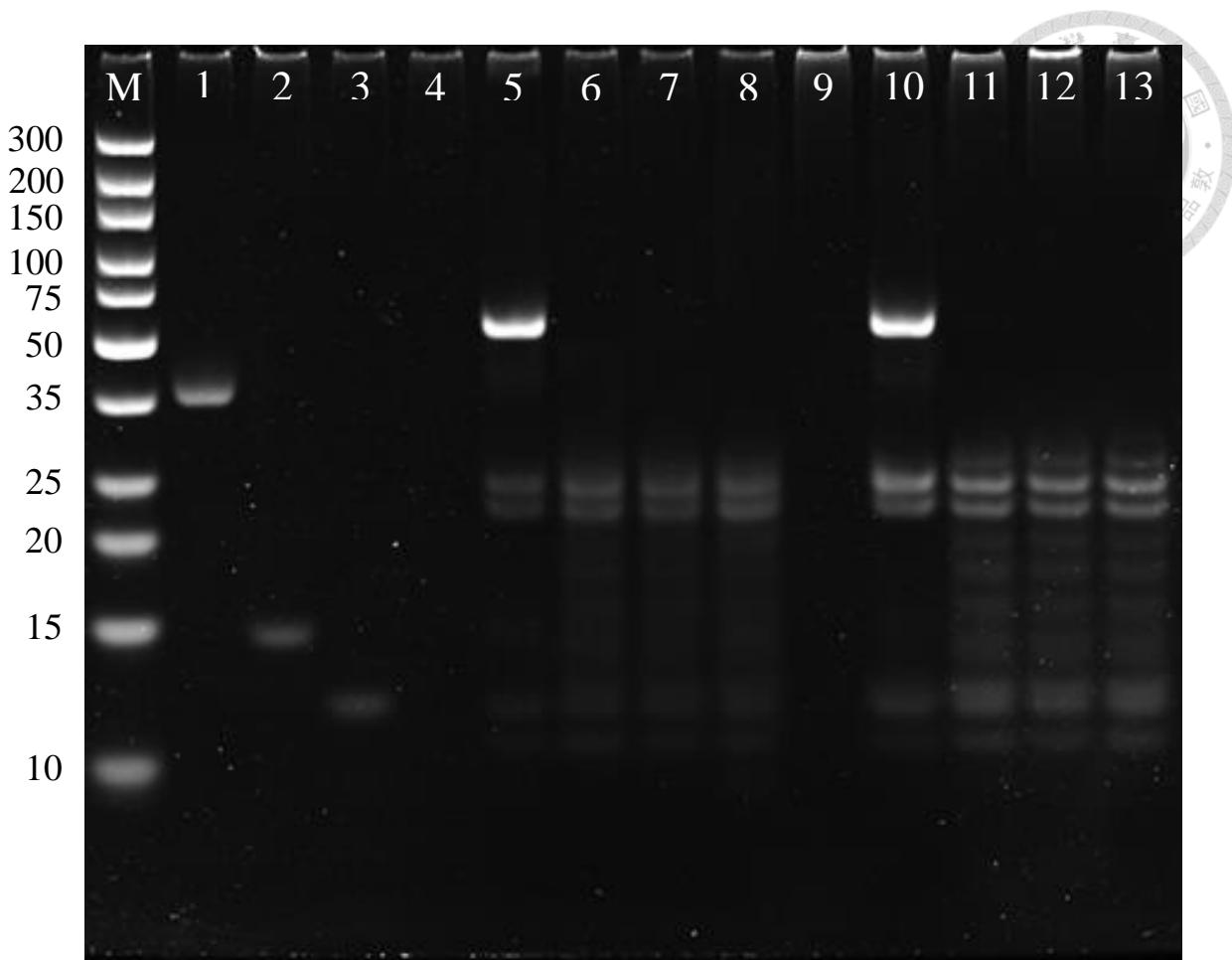


圖 3-18.以 P3b@MB 加入 100 nM Target 進行 SDA 反應之結果條帶對應圖。

以 15 % PAGE 於 70 V 電壓下進行電泳分析 120 分鐘。Ultra low range DNA ladder。(1) 100 nM P3b ; (2) 100 nM Target ; (3) 100 nM Product ; (4) P3b@MB without Target SDA 45 min ; (5) 100 nM P3b with 100 nM Target SDA 45 min ; (6) (7) (8) P3b @MB with 100 nM Target SDA 45 min ; (9) P3b@MB without Target SDA 60 min ; (10) 100 nM P3b with 100 nM Target SDA 60 min ; (11)(12)(13) P3b @MB with 100 nM Target SDA 60 min 。

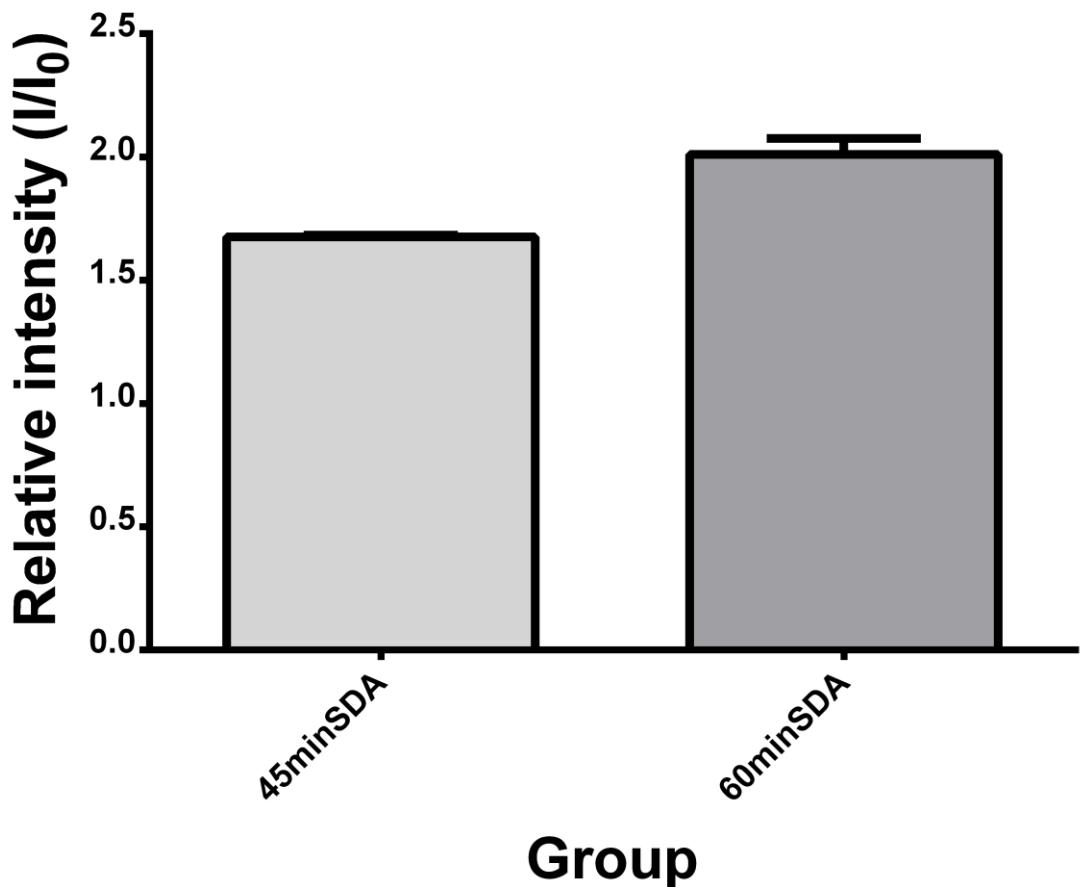


圖 3-19.以同反應時間組之 P3b@MB SDA 組別之產物亮度除以 free form P3b SDA 組別之產物亮度做相對定量之結果。SDA 反應時間 45 分鐘組別之產率為 1.68, SDA 反應 60 分鐘組別之產率為 2.01。

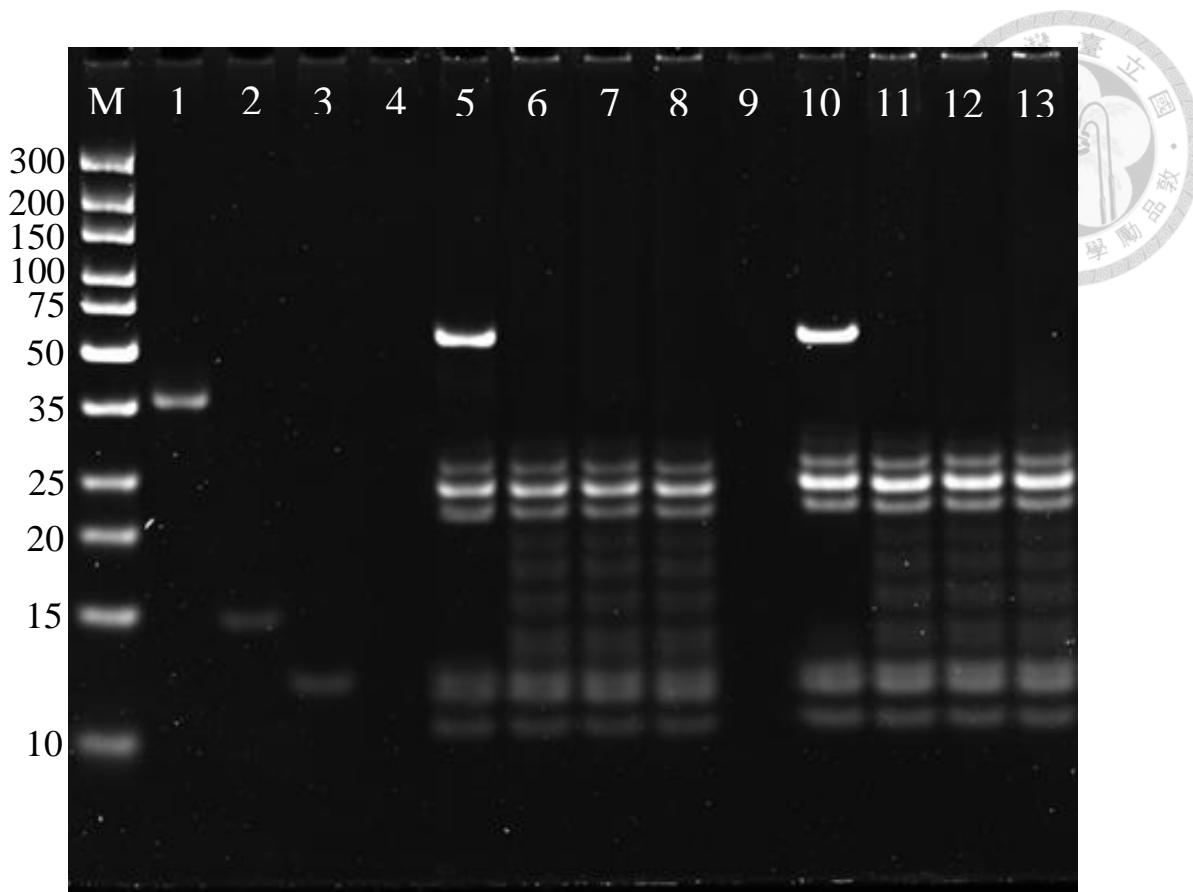


圖 3-20.以 P3b@MB 加入 100 nM Target 進行 SDA 反應之結果條帶對應圖。

以 15 % PAGE 於 70 V 電壓下進行電泳分析 120 分鐘。Ultra low range DNA ladder。

(1) 100 nM P3b ; (2) 100 nM Target ; (3) 100 nM Product ; (4) P3b@MB without Target SDA 75 min ; (5) 100 nM P3b with 100 nM Target SDA 75 min ; (6) (7) (8) P3b @MB with 100 nM Target SDA 75 min ; (9) P3b@MB without Target SDA 90 min ; (10) 100 nM P3b with 100 nM Target SDA 90 min ; (11)(12)(13) P3b @MB with 100 nM Target SDA 90 min 。

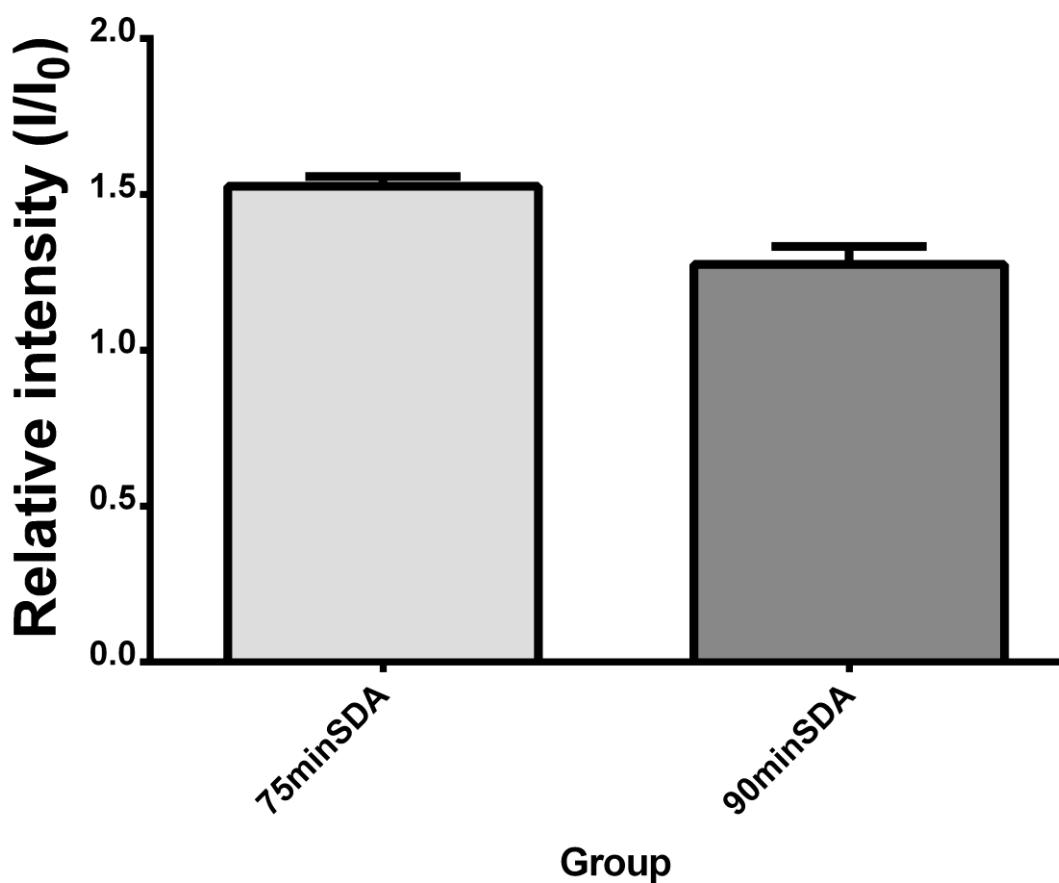


圖 3-21. 以同反應時間組之 p3b@MB SDA 組別之產物亮度除以 free form p3b SDA 組別之產物亮度做相對定量之結果。SDA 反應時間 75 分鐘組別之產率為 1.53, SDA 反應 90 分鐘組別之產率為 1.28。

3.6. P3b@MB 進行 SDA 增擴反應之情況

以未修飾上磁珠之 P3b 探針與修飾上磁珠之 P3b 探針，分別進行 SDA 增擴反應，反應條件為 37°C、60 分鐘，並比較分別加入 0.05 U/μL Klenow fragment polymerase(KF) 及 0.2 U/μL Nb. BbvCI nicking enzyme(NE)、100 nM Target 之情況，進行平台可行性之檢視。

結果如圖 3-22 所示，lane3 P3b 加入 100 nM Target、0.05 U/μL 之 KF 及 5 mM dNTP 之組別，可發現 P3b 確實有與 Target 雜合，而 KF 可將雜合產物延長為完全互補之雙股。Lane4 為 p3b 加入 100 nM Target、KF、NE、dNTP 之組別，可見 SDA 反應確實有進行，並產生產物。Lane5 為 P3b@MB 加入 0 nM Target、KF、NE、dNTP 進行 SDA 增擴反應之情況，於上清液中未發現任何 band 之出現，足見 P3b@MB 並無明顯 leakage 之情況發生。Lane6 為 P3b@MB 加入 10 nM Target、KF、NE、dNTP 進行 SDA 增擴反應之組別，Lane7 為 P3b 加入 100 nM Target、KF、NE、dNTP 進行 SDA 增擴反應之組別，條帶顯示兩者均會產生 SDA 增擴反應之產物，且依濃度不同而反映在其產物 band 之亮度上。Lane8、9、10、11、12 作為 P3b@MB 之可行性之測試，Lane8 為 P3b@MB 之組別，於上清液中未發現任何 band 之出現；lane9 為 P3b@MB 加入 KF 及 dNTP 之組別，未發現 KF 有作用並產生任何非專一產物；lane10 為 P3b@MB 加入 NE 之組別，並無發現 NE 進行非專一剪切而導致上清液有任何產物之出現；lane11 為 P3b@MB 加入 Target 進行雜合並加入 KF 及 dNTP 之組別，由於 P3b 探針修飾於磁珠上，經酵素反應後形成完全互補雙股亦會在磁珠之上，所以未發現任何 Band 之出現；lane12 為 P3b@MB 加入 Target 進行雜合並加入 NE 反應之組別，並未發現 NE 會與接上 Target 之 P3b@MB 反應剪切而有非專一之產物。

為確認 lane8-12 之組別磁珠上之情況，將反應後磁珠以 95 °C、10 分鐘之反應條件使磁珠上之核酸脫落並以 15 %PAGE 進行分析。結果如圖 3-23 所示，lane4 為 P3b@MB 之組別，可看到加熱掉落後之 P3b；lane5 為 P3b@MB 與 KF、dNTP 之組別，可看到加熱掉落後仍只有 P3b 的 band 出現，也間接證明 P3b@MB 與 KF 反應並無 leakage 情況之發生；lane6 為 P3b@MB 與 NE 之組別，經加熱後掉落可看見 P3b 的 band 出現，且無其他 band 的出現，證明 NE 並不會對 P3b@MB 有剪切之情況發生；lane7 為 P3b@MB 與 100 nM Target、KF、dNTP 反應之組別，經加熱掉落後，可發現 P3b 與 Target 雜合後經 KF 反應形成完全互補雙股之產物；lane8 為 P3b@MB 與 100 nM Target、NE 反應後之組別，經加熱掉落後，可發現掉落之 P3b 及 Target，並無發現其他 band 的產生，證明 NE 並不會對 P3b@MB 與 Target 雜合後之產物有非專一的剪切。

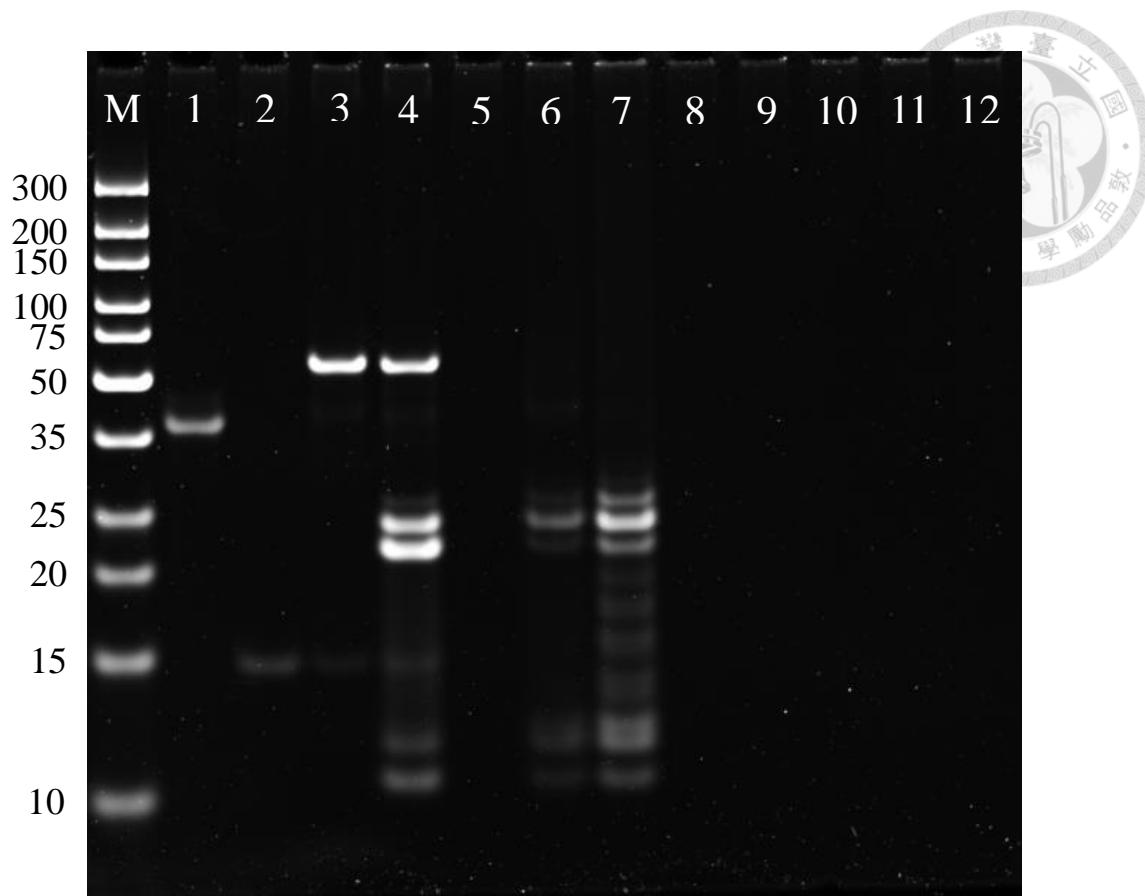


圖 3-22.以未修飾上磁珠之 P3b 進行 SDA 反應與 P3b@MB 進行 SDA 反應做比較，反應條件為 37 °C、60 分鐘，並分別加入 KF、NE、Target 觀察反應後之結果條帶對應圖。以 15 % PAGE 於 70 V 電壓下進行電泳分析 120 分鐘。Ultra low range DNA ladder。(1) 100 nM P3b；(2) 100 nM Target；(3) 100 nM P3b + 100 nM Target；(4) 100 nM P3b + 100 nM Target SDA；(5) 100 nM P3b SDA without Target；(6) P3b@MB + 10 nM Target SDA；(7) P3b@MB + 100 nM Target SDA；(8) P3b @MB；(9) P3b@MB with KF and dNTP；(10) P3b@MB with NE；(11) P3b@MB + 100 nM Target + KF + dNTP；(12) P3b@MB + 100 nM Target + NE。

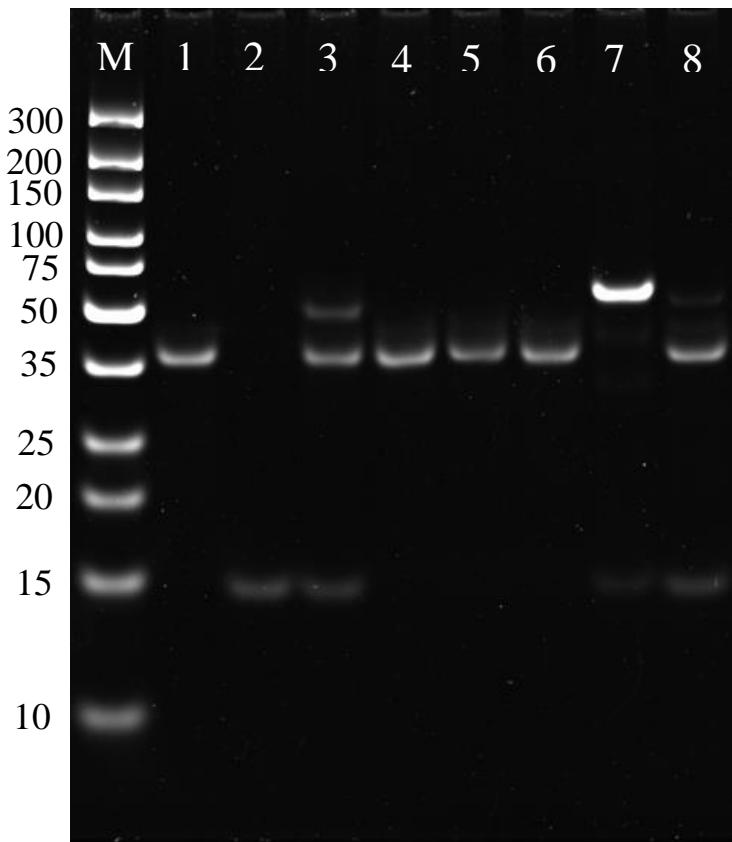


圖 3-23. 將可行性實驗反應後磁珠加熱後掉落產物之結果條帶對應圖。以 15 % PAGE 於 70 V 電壓下進行電泳分析 120 分鐘。Ultra low range DNA ladder。(1) 100 nM P3b；(2) 100 nM Target；(3) 100 nM P3b + 100 nM Target；(4) P3b @MB；(5) P3b@MB with KF and dNTP；(6) P3b@MB with NE；(7) P3b@MB + 100 nM Target + KF + dNTP (8) P3b@MB + 100 nM Target + NE。

3.7. 動態光散射儀確認 SDA 反應各階段磁珠之粒徑大小及 zeta potential

利用動態光散射儀分別確認 SDA 反應各階段之粒徑大小以及 zeta potential 之改變。結果如圖 3-24、3-25、3-26、3-27 所示，未修飾之磁珠測得粒徑大小為 153.3 nm、P3b@MB 粒徑大小為 163.6 nm、P3b@MB 與 Target 雜合之粒徑大小為 165.6 nm、P3b@MB 進行 SDA 反應後粒徑大小為 171.5 nm，與預期結果相同，粒徑大小有增大之傾向；於 zeta potential 方面如表 3-2 所示，未修飾之磁珠測得之 zeta potential 為 -3.39 mV、P3b@MB 之 zeta potential 為 -12.8 mV、P3b@MB 與 Target 雜合之 zeta potential 為 -13.43 mV、P3b@MB 進行 SDA 反應後之 zeta potential 為 -20.40 mV，當預期磁珠上之核酸量越多時，測得之 zeta potential 確實有更趨向負電，確認 SDA 反應之磁珠各階段與實驗設計階段相符。

	Size (d.nm...)	% Intensity:	St Dev (d.n...
Z-Average (d.nm): 153.3	Peak 1: 167.6	100.0	51.53
Pdi: 0.076	Peak 2: 0.000	0.0	0.000
Intercept: 0.923	Peak 3: 0.000	0.0	0.000
Result quality Good			

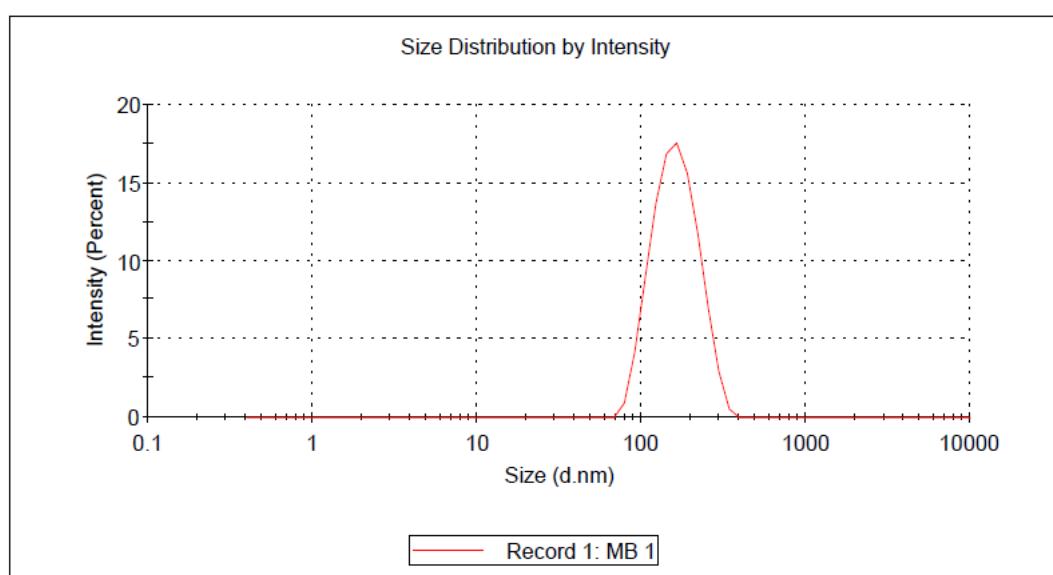


圖 3-24. 以 DLS 粒徑分析儀偵測磁珠修飾前之粒徑大小，其 Z-average 約為 153.3 nm。

Results

	Size (d.nm...)	% Intensity:	St Dev (d.n...
Z-Average (d.nm): 163.6	Peak 1: 187.7	100.0	72.09
Pdl: 0.121	Peak 2: 0.000	0.0	0.000
Intercept: 0.925	Peak 3: 0.000	0.0	0.000
Result quality Good			

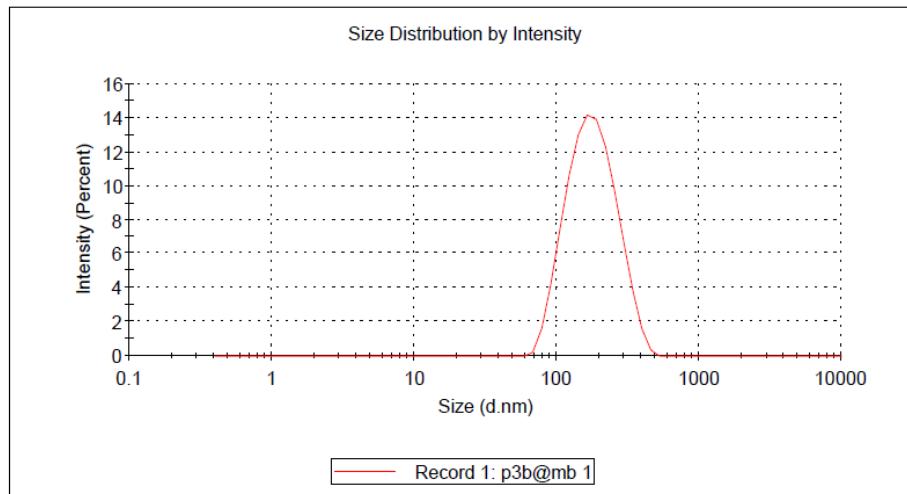


圖 3-25. 以 DLS 粒徑分析儀偵測 P3b@MB 之粒徑大小，其 Z-average 約為 165.6 nm。

Results

	Size (d.nm...)	% Intensity:	St Dev (d.n...
Z-Average (d.nm): 165.6	Peak 1: 184.0	100.0	60.61
Pdl: 0.093	Peak 2: 0.000	0.0	0.000
Intercept: 0.905	Peak 3: 0.000	0.0	0.000
Result quality Good			

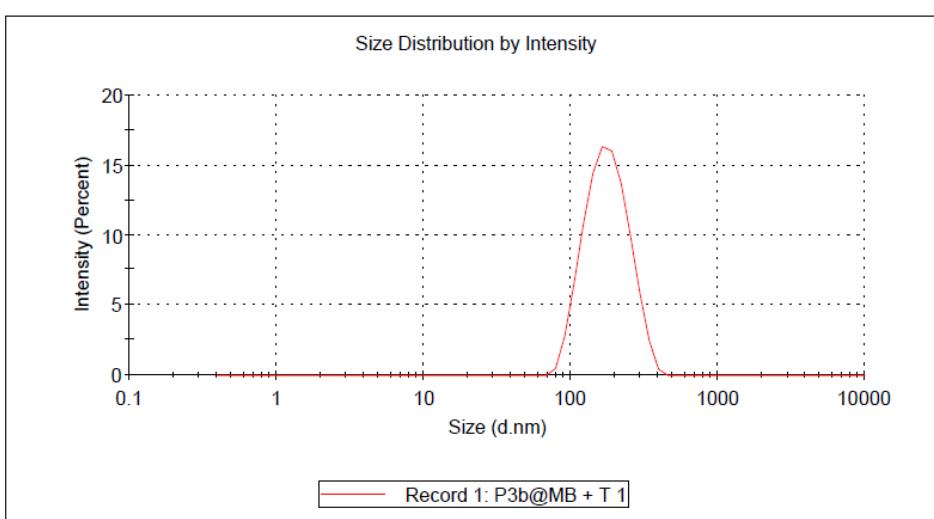


圖 3-26. 以 DLS 粒徑分析儀偵測 P3b@MB 與 Target 雜合之粒徑大小，其 Z-average 約為 165.6 nm。

Results

		Size (d.nm...)	% Intensity:	St Dev (d.nm...)
Z-Average (d.nm):	171.5	Peak 1:	209.6	100.0 89.14
Pdl:	0.177	Peak 2:	0.000	0.0 0.000
Intercept:	0.909	Peak 3:	0.000	0.0 0.000
Result quality	Good			

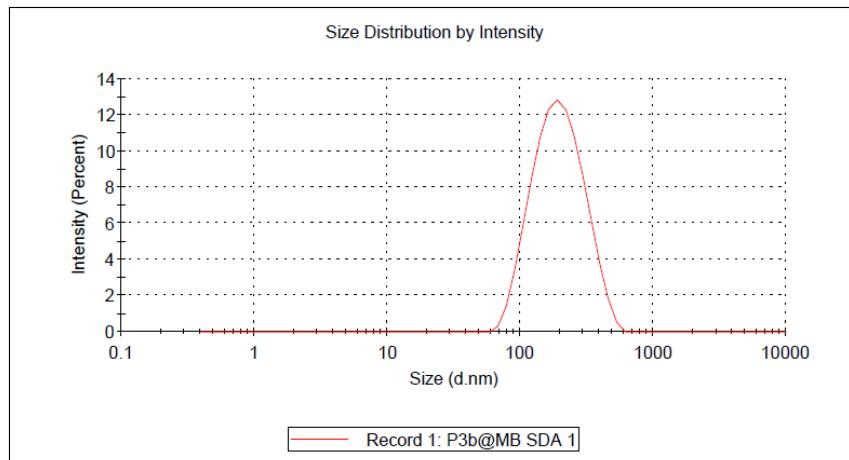


圖 3-27. 以 DLS 粒徑分析儀偵測 P3b@MB 與 Target 進行 SDA 反應後之粒徑大小，其 Z-average 約為 171.5 nm。

表 3-2. 進行 SDA 各階段磁珠之 zeta potential 測量結果。

	Zeta Potential (mV)	Mean
MB	-2.67	-3.39 ± 0.62
	-3.72	
	-3.78	
P3b@MB	-12.10	-12.8 ± 0.75
	-12.70	
	-13.60	
P3b@MB + Target	-13.20	-13.43 ± 0.68
	-14.20	
	-12.90	
P3b@MB SDA	-20.5	-20.4 ± 0.1
	-20.4	
	-20.3	

3.8. Free form P3b 及 P3b@MB 之選擇性探討

本實驗對 free form P3b 及 P3b@MB 之選擇性探討實驗包含：

(1) 位點不互補(mismatch site)之雜合探討：以發生於 Target 3 端(T_{3m})、5 端(T_{5m})、及中央(T_{mm})之三個核苷酸之差異的三種核酸及 Target 分別與 free form P3b 及 P3b@MB 雜合並以 15 %PAGE 進行選擇性之探討。Free form P3b 之結果如圖 3-28 所示，於圖中可發現 Target 組別與 mismatch Target 皆有較明顯之雜合情況。雜合 band 之定量結果如圖 3-29 所示。P3b@MB 之結果如圖 3-30 所示，於結果圖可發現各組均有掉落之 P3b 探針，定量之結果如圖 3-31；而 P3b@MB 抓取到 Target 的結果如 lane6、7，相較於 T_{3m} (lane8-9)、 T_{5m} (lane10-11)、 T_{mm} (lane12-13)之組別，其剩餘 band 的量較高，剩餘量 band 之定量圖如 3-32 所示。

(2) 非目標核酸模擬真實 microRNA 序列之核酸雜合探討：以根據真實存在之 microRNA 序列所合成的 DNA 序列及 Target 分別與 free form P3b 及 P3b@MB 雜合，磁吸分離後收集其上清液並以 15 %PAGE 分析，進行選擇性之探討。Free form P3b 之結果如圖 3-33 所示，可看到 Target 組別有較明顯之雜合 Band，而 DNA-155 剩餘 Band 較暗，但並未發現與 P3b 雜合之 band，可能為 DNA-155 自己形成其他非專一構型。經 Image J 定量之結果如圖 3-35 所示。P3b@MB 之結果如圖 3-34 所示，可以發現，僅有在 Target 雜合組別，Target 之剩餘 band 亮度有明顯下降，其餘 band 以 imageJ 進行相對定量後之結果如圖 3-36，可發現除了 Target 剩餘量明顯下降，其餘序列均無明顯減少之情況，證明 P3b@MB 對於非 Target 序列良好的選擇性。



圖 3-28. 以與 Target 有不同位點 mismatch 之序列與 free form P3b 雜合之結果條帶

對應圖。以 15 % PAGE 於 70 V 電壓下進行電泳分析 120 分鐘。Ultra low range DNA ladder。(1) 100 nM P3b；(2) 100 nM Target；(3) 100 nM T_{3m} ；(4) 100 nM T_{5m} ；(5) 100 nM T_{mm} ；(6)(7) 100 nM P3b + 100 nM Target；(8)(9) 100 nM P3b + 100 nM T_{3m} ；(10)(11) 100 nM P3b + 100 nM T_{5m} ；(12)(13) 100 nM P3b + 100 nM T_{mm} 。

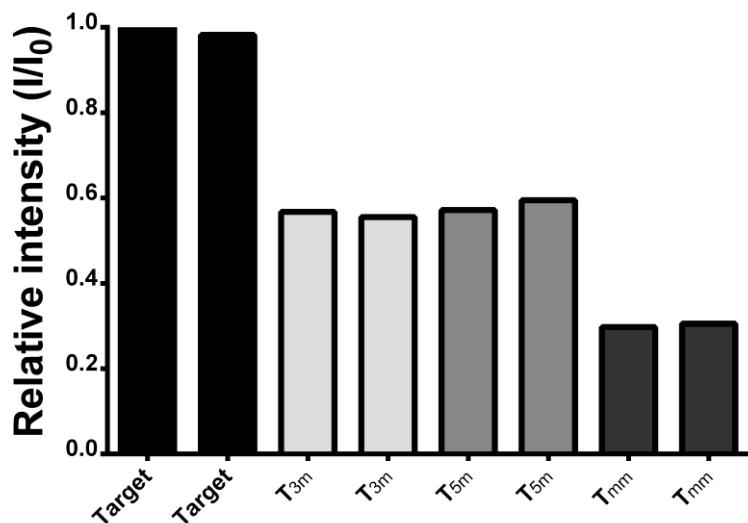


圖 3-29. Free form P3b 與 Target 及 mismatch Target 雜合之相對定量結果。

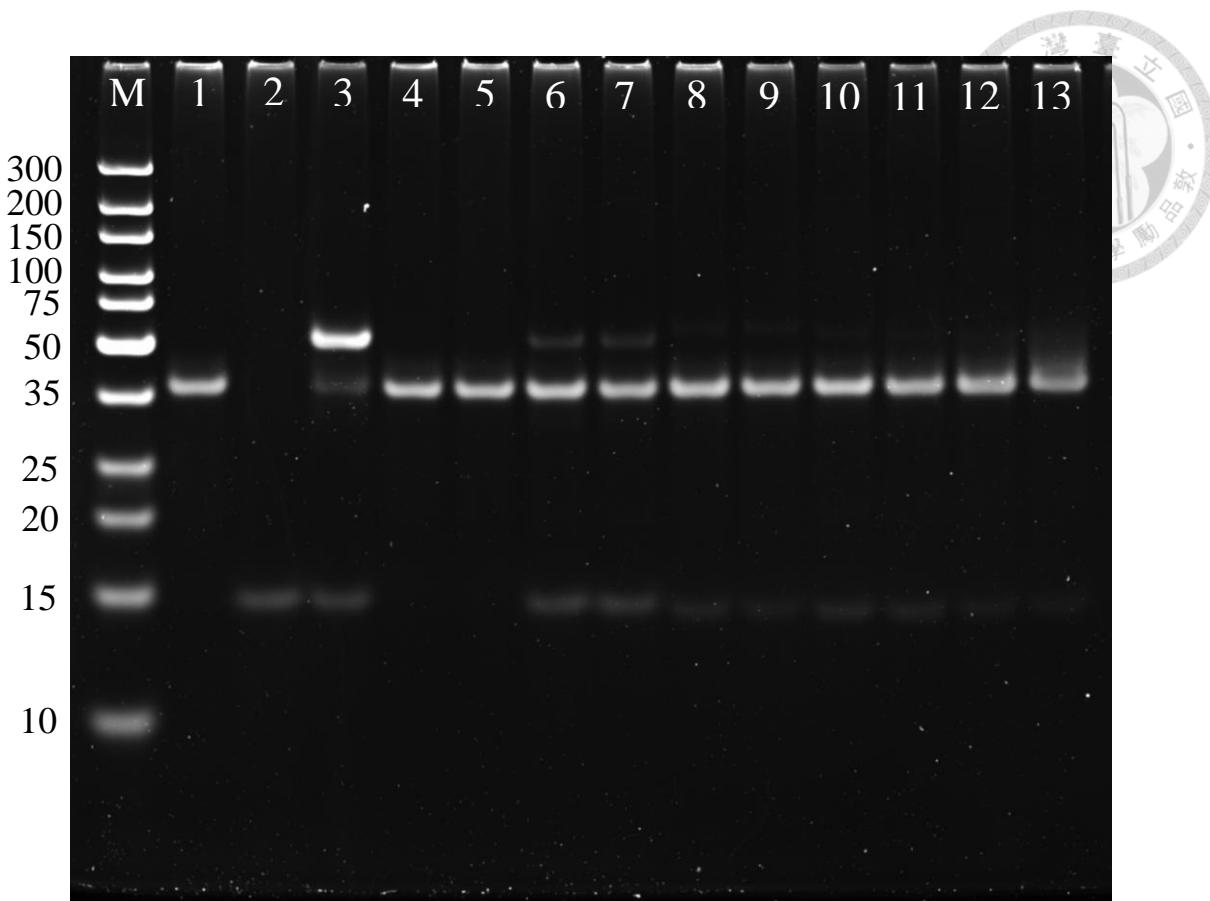


圖 3-30. 以與 Target 有不同位點 mismatch 之序列與 P3b@MB 雜合後以高溫加熱磁珠後掉落產物之結果條帶對應圖。以 15 % PAGE 於 70 V 電壓下進行電泳分析 120 分鐘。Ultra low range DNA ladder。(1) 100 nM P3b；(2) 100 nM Target；(3) 100 nM P3b + 100 nM Target；(4) 100 nM P3b；(5) P3b@MB；(6)(7) P3b@MB + 100 nM Target；(8)(9) P3b@MB + 100 nM T_{3m}；(10)(11) P3b@MB + 100 nM T_{5m}；(12)(13) P3b@MB + 100 nM T_{mm}。

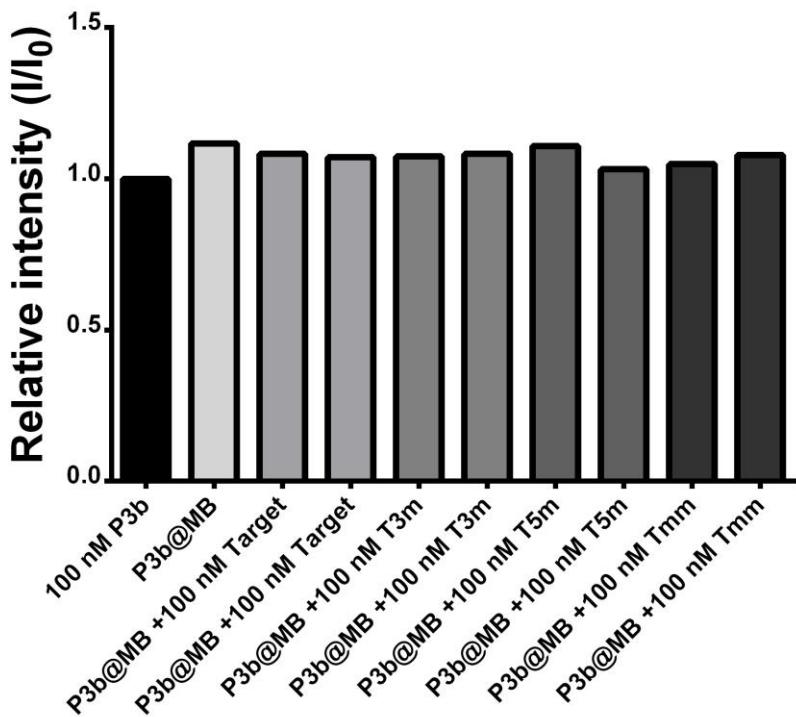


圖 3-31. 以 100 nM P3b 為相對定量之基準，加熱後掉落各組別 P3b 之相對定量結果。

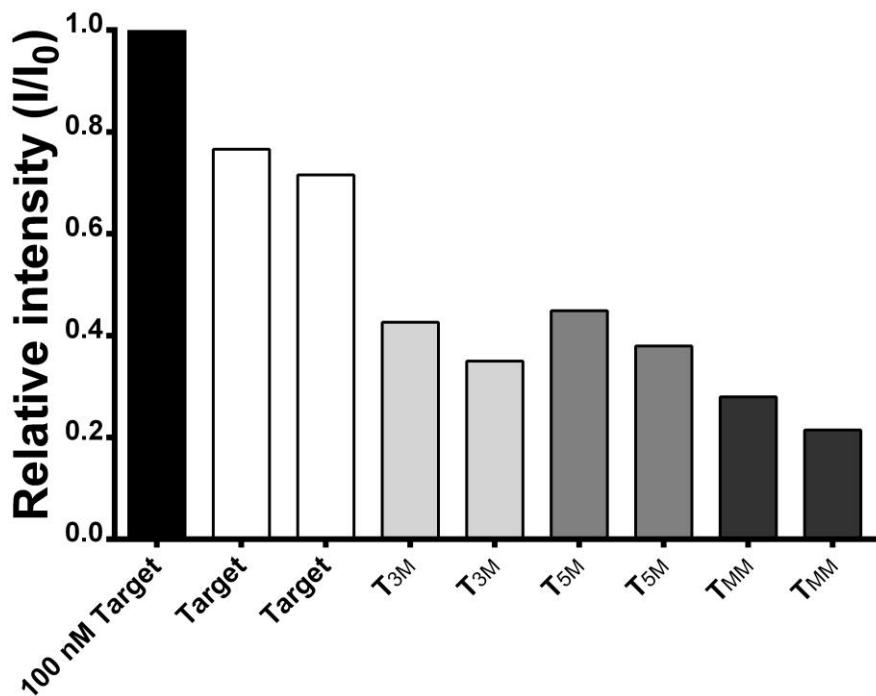


圖 3-32. 以 100 nM Target 為相對定量之基準，加熱後掉落之各組別所雜合之 target 及 mismatch target 之相對定量結果。

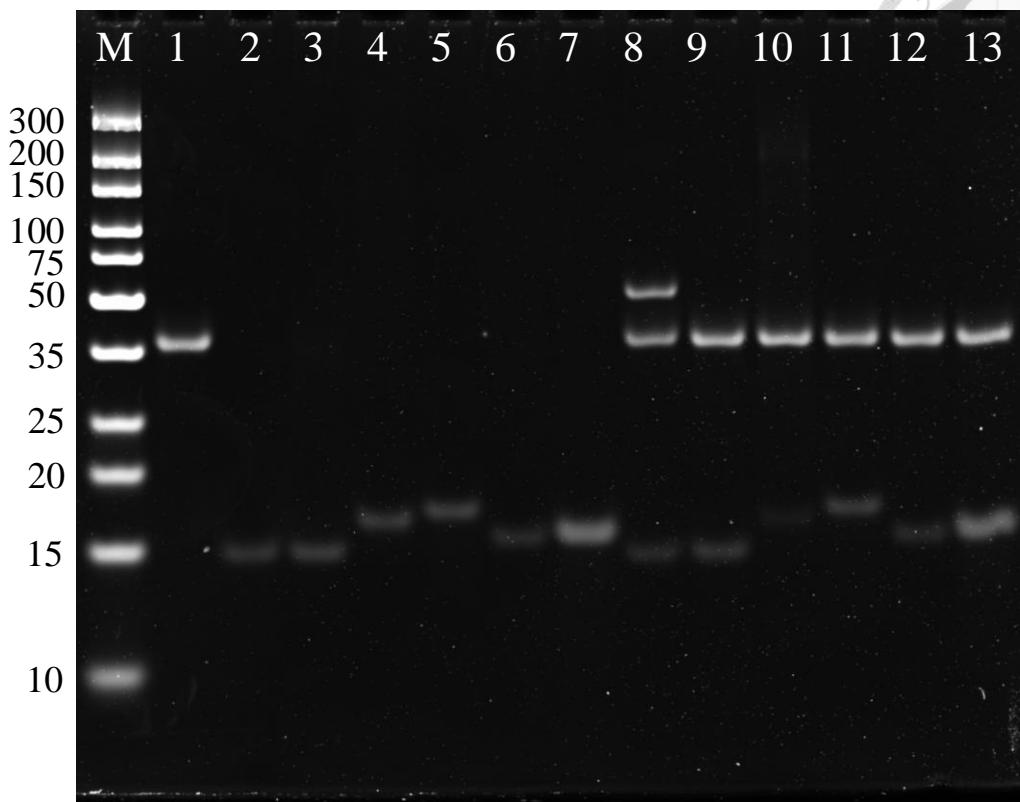


圖 3-33.以不同序列模擬 microRNA 之 DNA 序列與 free form P3b 進行雜合之結果

條帶對應圖。以 15 % PAGE 於 70 V 電壓下進行電泳分析 120 分鐘。Ultra low range DNA ladder。(1) 100 nM P3b；(2) 100 nM Target；(3) 100 nM DNA-21；(4) 100 nM DNA-155；(5) 100 nM DNA-182；(6) 100 nM DNA-223 (7) 200 nM DNA-885；(8) 100 nM P3b + 100 nM Target (9) 100 nM P3b + 100 nM DNA-21；(10) 100 nM P3b + 100 nM DNA-155 (11) 100 nM P3b + 100 nM DNA-182；(12) 100 nM P3b + 100 nM DNA-223 (13) 100 nM P3b + 200 nM DNA-885。

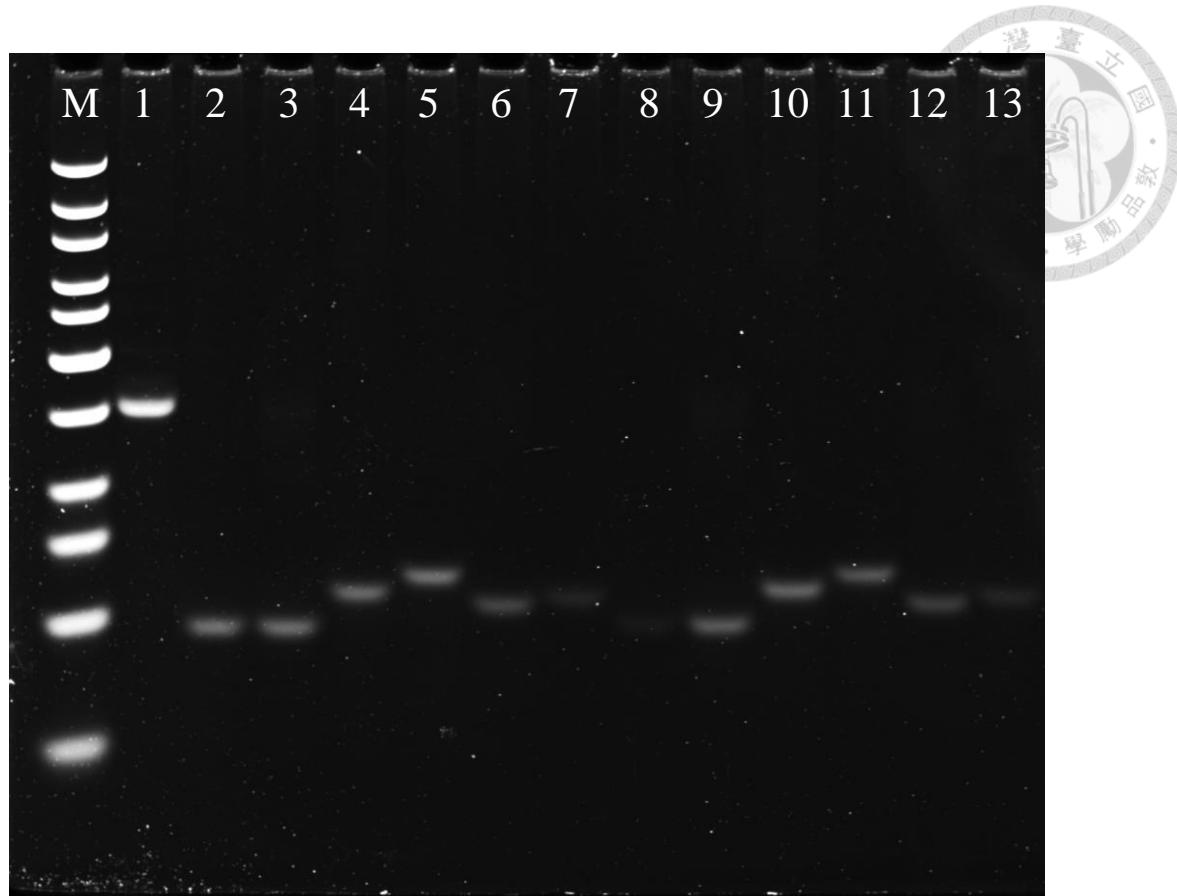


圖 3-34. 以不同序列模擬 microRNA 之 DNA 序列與 P3b@MB 進行雜合之結果

條帶對應圖。以 15 % PAGE 於 70 V 電壓下進行電泳分析 120 分鐘。Ultra low range DNA ladder。(1) 100 nM P3b；(2) 100 nM Target；(3) 100 nM DNA-21；(4) 100 nM DNA-155；(5) 100 nM DNA-182；(6) 100 nM DNA-223 (7) 100 nM DNA-885；(8) P3b@MB + 100 nM Target (9) P3b@MB + 100 nM DNA-21；(10) P3b@MB + 100 nM DNA-155 (11) P3b@MB + 100 nM DNA-182；(12) P3b@MB + 100 nM DNA-223 (13) P3b@MB + 100 nM DNA-885。

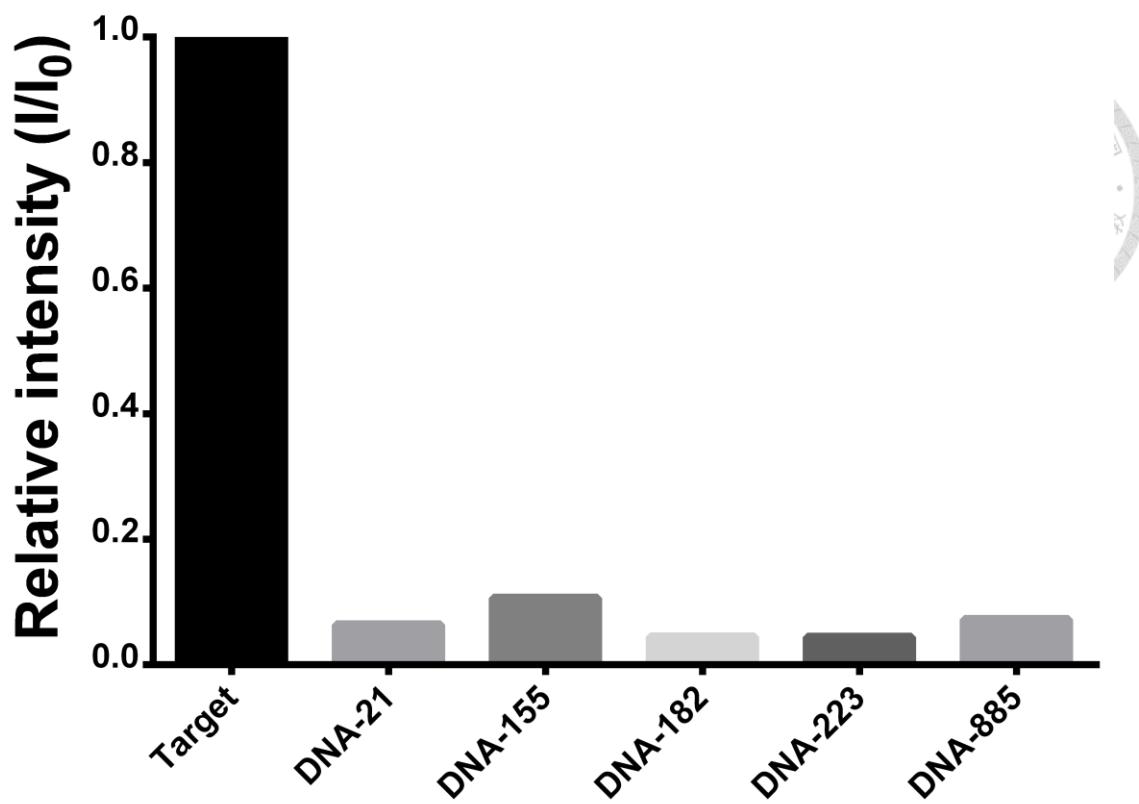


圖 3-35. 以不同序列模擬 microRNA 之 DNA 序列與 free form P3b 雜合之 band 相對定量結果。

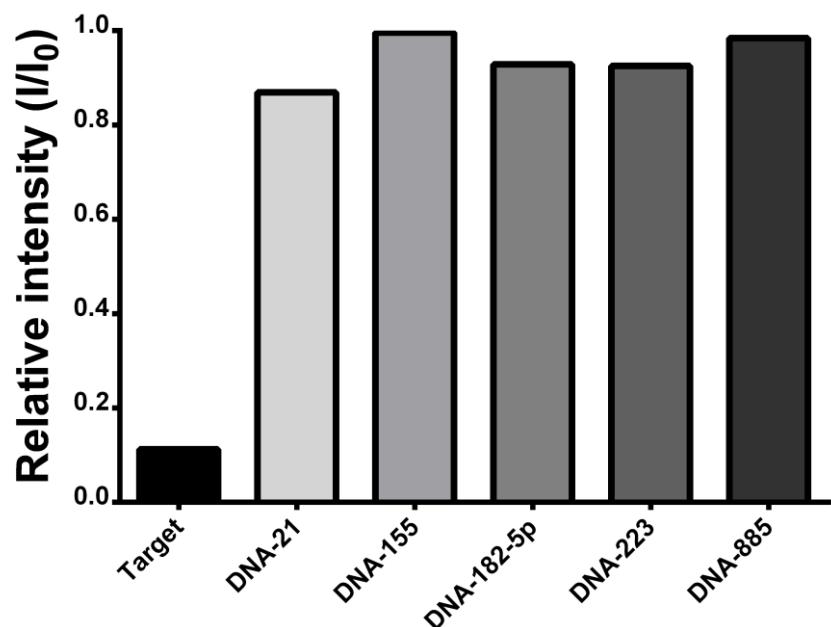


圖 3-36. 以不同序列模擬 microRNA 之 DNA 序列與 P3b@MB 進行雜合後各序列剩餘量相對定量圖。以各序列之 100 nM band 為相對定量之基準，剩餘量 band 作相對定量。

(3) 位點不互補(mismatch site)之 SDA 增擴反應探討：以發生於 Target3 端(T_{3m})、5

端(T_{5m})、及中央(T_{mm})之三個核苷酸之差異的三種核酸分別與 free form P3b 及

P3b@MB 進行 37°C、60 分鐘 SDA 反應後磁吸分離抽取上清液，Free form P3b

之結果如圖 3-37 所示，於圖中可發現 Target (lane6-7)組別與 T_{5m} (lane10-11)、

T_{mm} (lane12-13)皆有 SDA 產物生成，產物之相對定量結果如圖 3-39 所示。

P3b@MB 之結果如圖 3-38 所示，與 free form P3b SDA 有相似的結果，

T_{5m} (lane10-11)、 T_{mm} (lane12-13)之組別仍有 SDA 產物之生成，由此可知磁珠的

使用於 SDA 的選擇性上並無明顯之增益。產物之相對定量結果如圖 3-40 所示。

(4) 非目標核酸模擬真實 microRNA 序列之核酸 SDA 增擴反應探討：以根據真實

存在之 microRNA 序列所合成的 DNA 序列分別與 free form P3b 及 P3b@MB 進

行 37°C、60 分鐘 SDA 反應後磁吸分離抽取上清液，最後以 15%PAGE 進行分

析確認是否有產物之生成。Free form P3b 之結果如圖 3-41 所示，可發現僅有在

lane4、5 的 Target SDA 反應組別才有明顯之產物生成，其餘之組別則無明顯之

產物生成，產物之相對定量結果如圖 3-43 所示；P3b@MB 結果如圖 3-42 所示，

與 free form P3b SDA 組別相同，僅在 Target SDA 反應組別才有明顯之產物生

成，產物之相對定量結果如圖 3-44 所示。由此確認，P3b@MB 對於非目標核

酸之 microRNA 有辨認之能力。

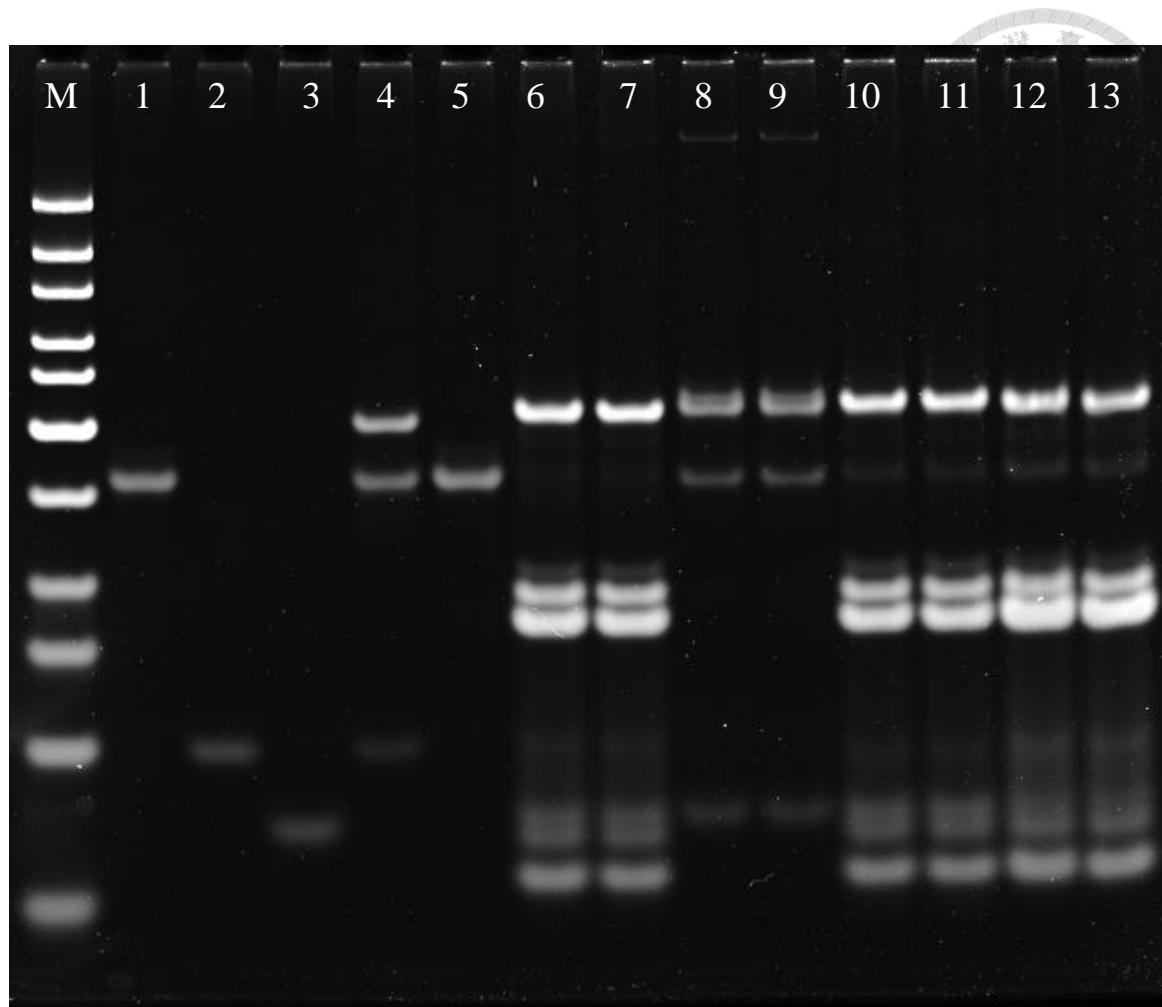


圖 3-37. 以與 Target 有不同位點 mismatch 之序列與 free form P3b 進行 37 °C 、 60 分鐘 SDA 反應後之條帶對應圖。以 15 % PAGE 於 70 V 電壓下進行電泳分析 120 分鐘。Ultra low range DNA ladder。(1) 100 nM P3b；(2) 100 nM Target；(3) 100 nM Product；(4) 100 nM P3b + 100 nM Target；(5) 100 nM P3b without Target SDA；(6) (7) 100 nM P3b + 100 nM Target SDA；(8)(9) 100 nM P3b + 100 nM T_{3M} SDA；(10) (11) 100 nM P3b + 100 nM T_{5M} SDA；(12) (13) 100 nM P3b + 100 nM T_{MM} SDA。

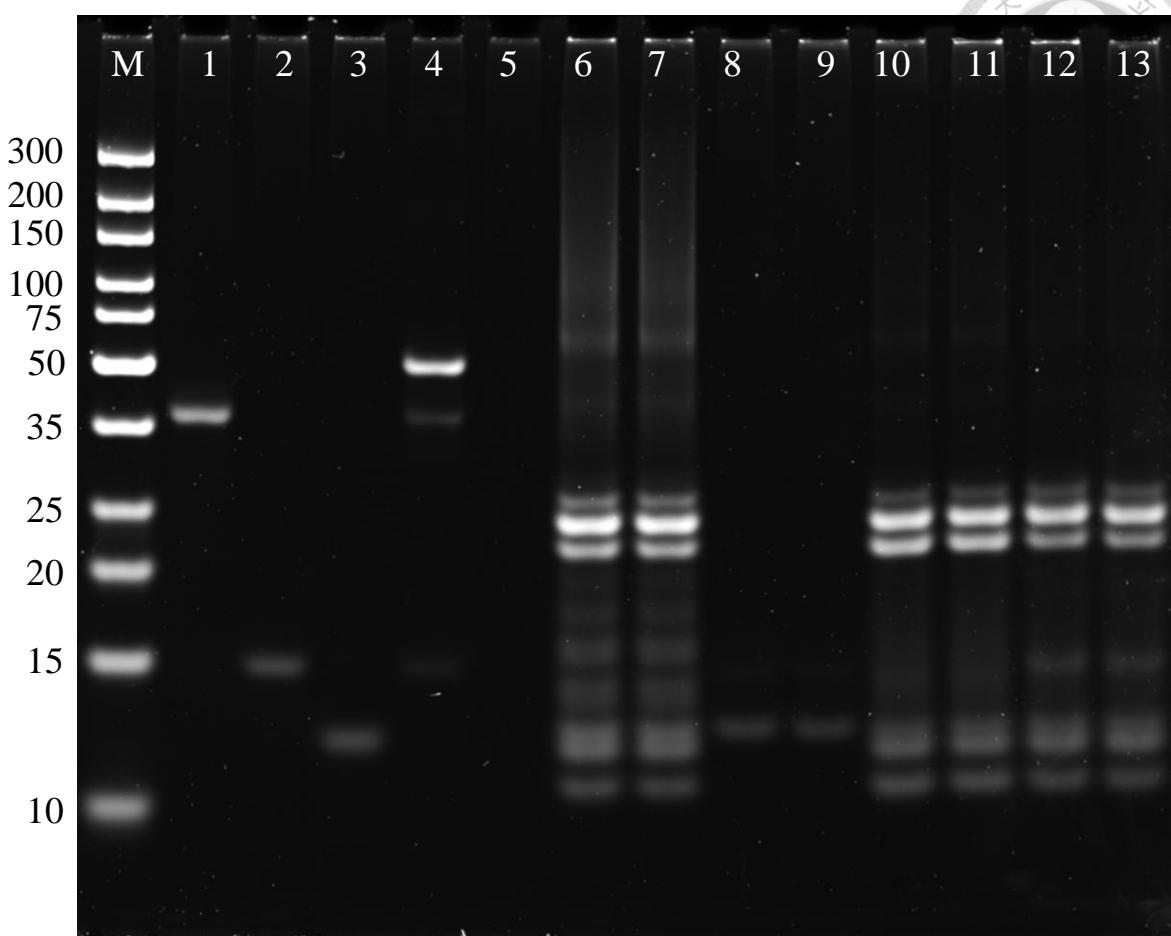


圖 3-38. 以與 Target 有不同位點 mismatch 之序列與 P3b@MB 進行 37 °C 、60 分鐘 SDA 反應後之條帶對應圖。以 15 % PAGE 於 70 V 電壓下進行電泳分析 120 分鐘。Ultra low range DNA ladder。(1) 100 nM P3b；(2) 100 nM Target；(3) 100 nM Product；(4) 100 nM P3b + 100 nM Target；(5) P3b@MB without Target SDA；(6) (7) P3b@MB + 100 nM Target SDA；(8)(9) P3b@MB + 100 nM T_{3M} SDA；(10) (11) P3b@MB + 100 nM T_{5M} SDA；(12) (13) P3b@MB + 100 nM T_{MM} SDA。

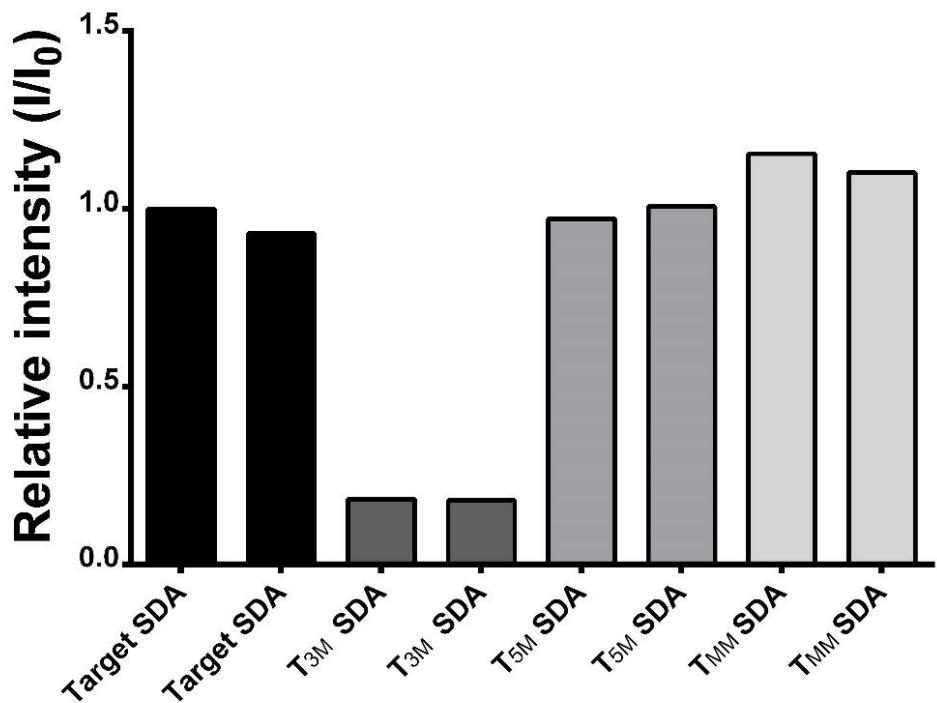


圖 3-39. Free form P3b SDA 反應位點選擇性之產物相對定量圖。

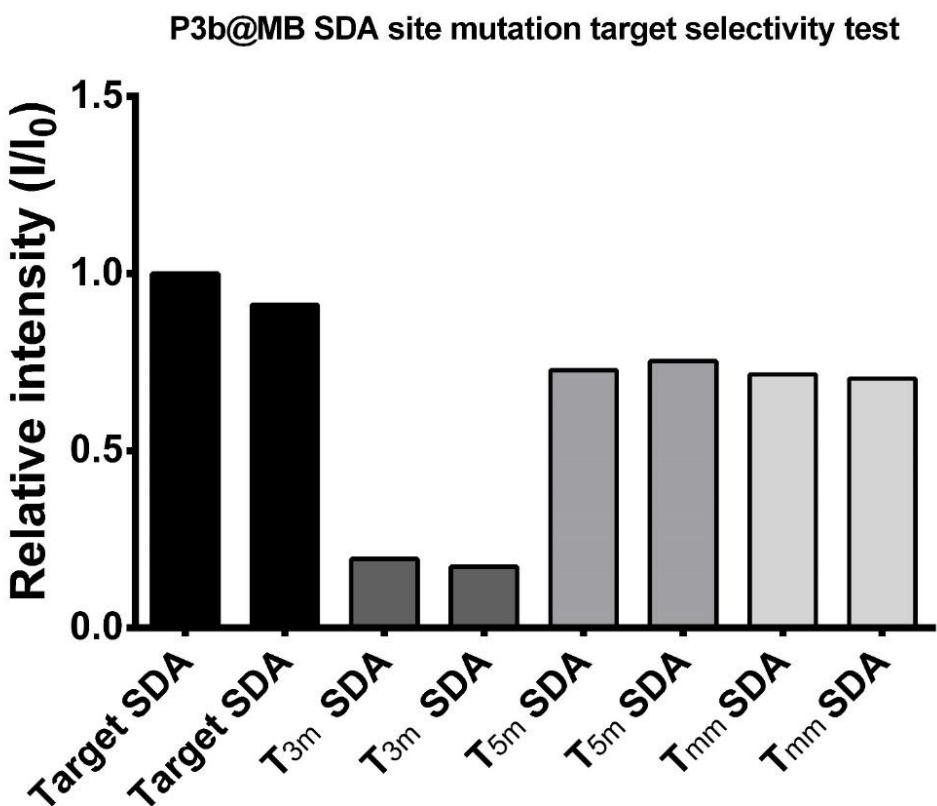


圖 3-40. P3b@MB SDA 反應位點選擇性之產物相對定量圖。

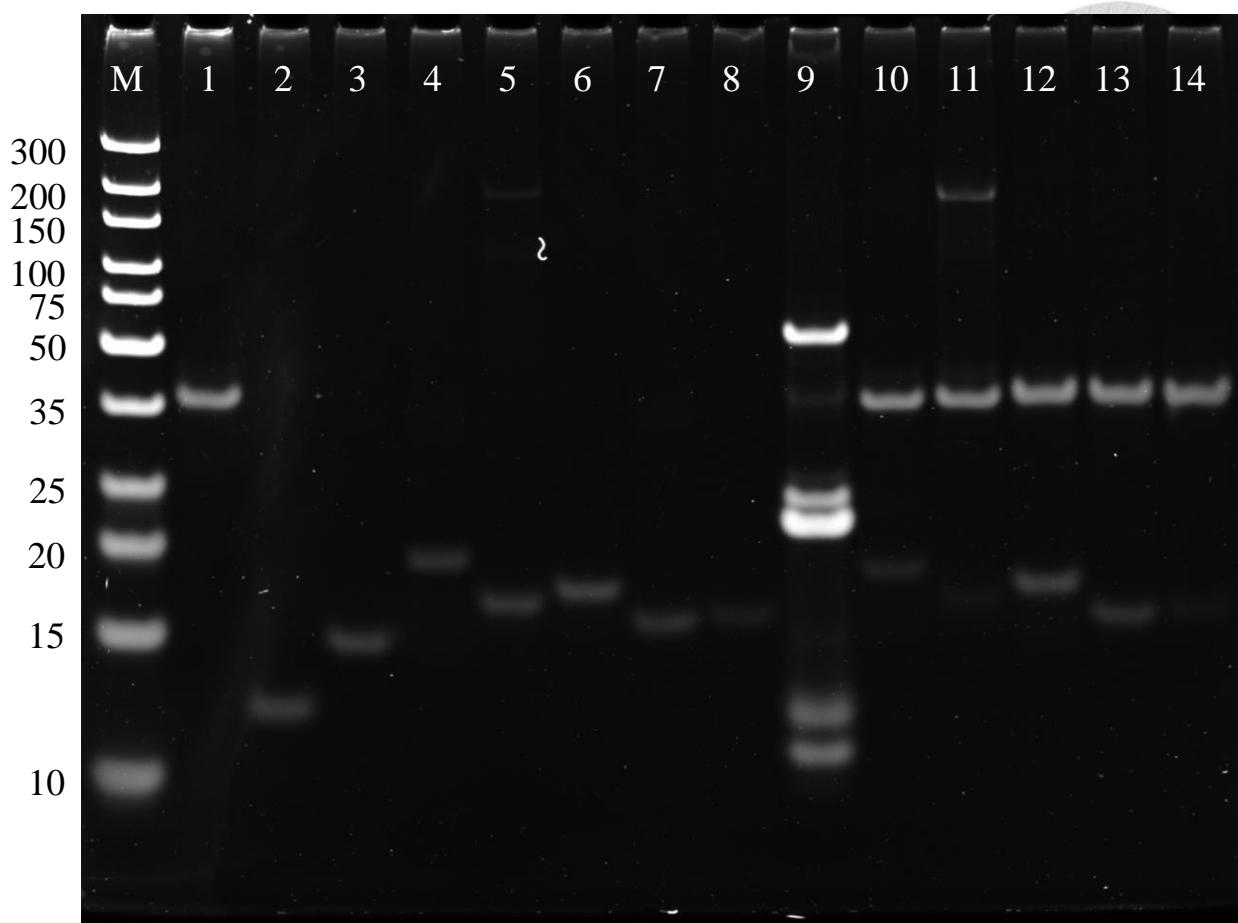


圖 3-41. 以不同序列模擬 microRNA 之 DNA 序列與 100 nM P3b 進行 37 °C 、60 分鐘 SDA 反應後之條帶對應圖。以 15 % PAGE 於 70 V 電壓下進行電泳分析 120 分鐘。Ultra low range DNA ladder。(1) 100 nM P3b ; (2) 100 nM Product ; (3) 100 nM Target ; (4) 100 nM DNA-21 ; (5) 100 nM DNA-155 ; (6) 100 nM DNA-182 ; (7) 100 nM DNA-223 ; (8) 100 nM DNA-885 ; (9) 100 nM P3b + 100 nM Target SDA ; (10) 100 nM P3b + 100 nM DNA-21 SDA ; (11) 100 nM P3b + 100 nM DNA-155 SDA ; (12) 100 nM P3b + 100 nM DNA-182 SDA ; (13) 100 nM P3b + 100 nM DNA-223 SDA ; (14) 100 nM P3b + 100 nM DNA-885 SDA 。

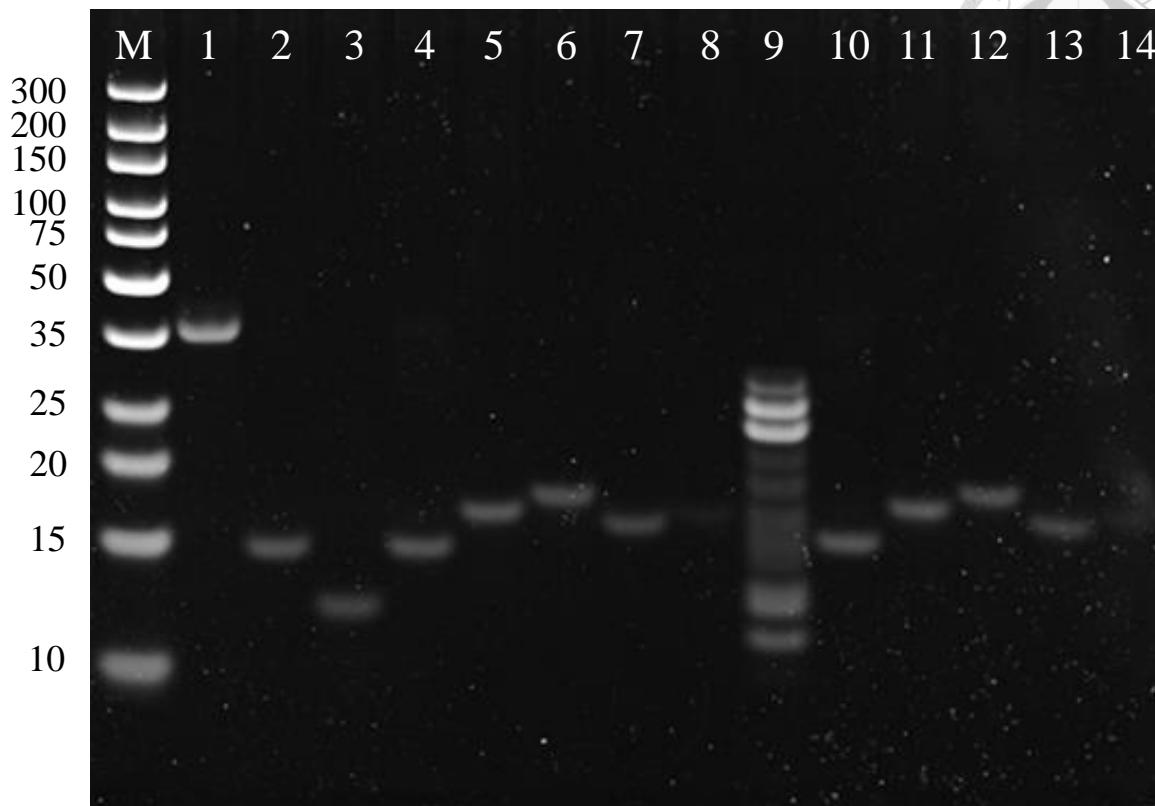


圖 3-42. 以不同序列模擬 microRNA 之 DNA 序列與 P3b@MB 進行 37 °C、60 分鐘 SDA 反應後之條帶對應圖。以 15 % PAGE 於 70 V 電壓下進行電泳分析 120 分鐘。Ultra low range DNA ladder。(1) 100 nM P3b；(2) 100 nM Target；(3) 100 nM DNA-21；(4) 100 nM DNA-155；(5) 100 nM DNA-182；(6) 100 nM DNA-223 (7) 100 nM DNA-885；(8) P3b@MB + 100 nM Target SDA；(9) P3b@MB + 100 nM DNA-21 SDA；(10) P3b@MB + 100 nM DNA-155 SDA；(11) P3b@MB + 100 nM DNA-182 SDA；(12) P3b@MB + 100 nM DNA-223 SDA；(13) P3b@MB + 100 nM DNA-885 SDA。

Free form p3b SDA with miRNA

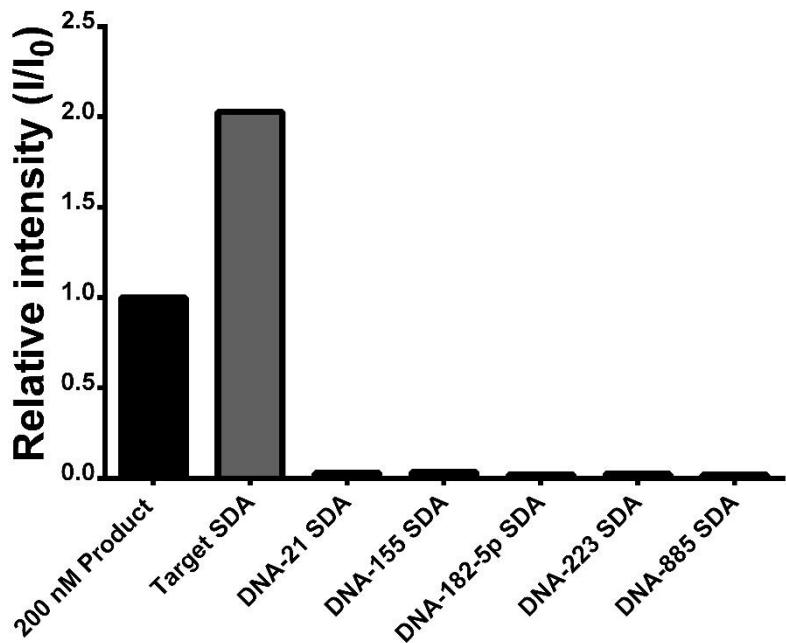


圖 3-43 以不同序列模擬 microRNA 之 DNA 序列與 100 nM P3b 進行 37 °C 、 60 分鐘 SDA 反應後產物之相對定量圖。

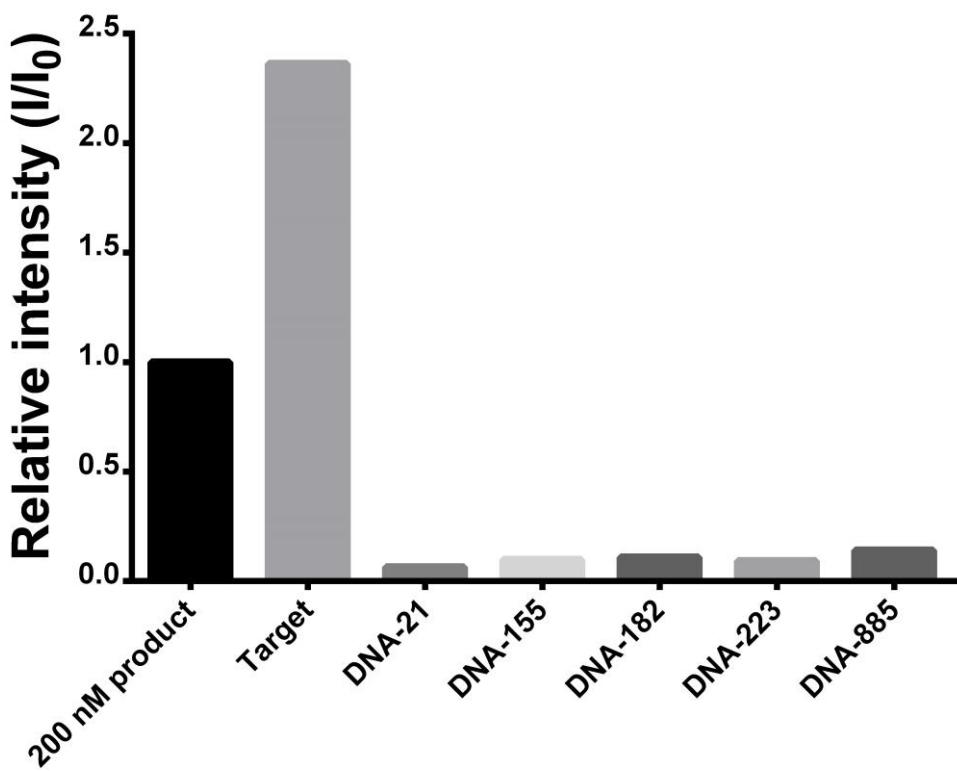


圖 3-44 以不同序列模擬 microRNA 之 DNA 序列與 P3b@MB 進行 37 °C 、 60 分鐘 SDA 反應後產物之相對定量圖。



3.9. P3b@MB 與 miR-205 之 SDA 反應

以 P3b@MB 與 100 nM miR-205 進行 SDA 反應，並於不同酵素之比例進行比較，結果如圖 3-45 分別於 150 分鐘及 210 分鐘，於 Lane7、9 之 KF 濃度提升為 1.25× 之組別，可看見較明顯之產物，與 DNA 組別相比，產物較少。

3.9. SDA 產物與產物探針(product probe)之結合

利用兩種序列設計之 product probe(CP1、CP2)與 100 nM product 進行雜合，結果如圖 3-46 所示，兩者並無明顯之結合 band 產生，在 lane9 的 product probe2 與 product 以 5:1 之比例較有結合之情況發生。

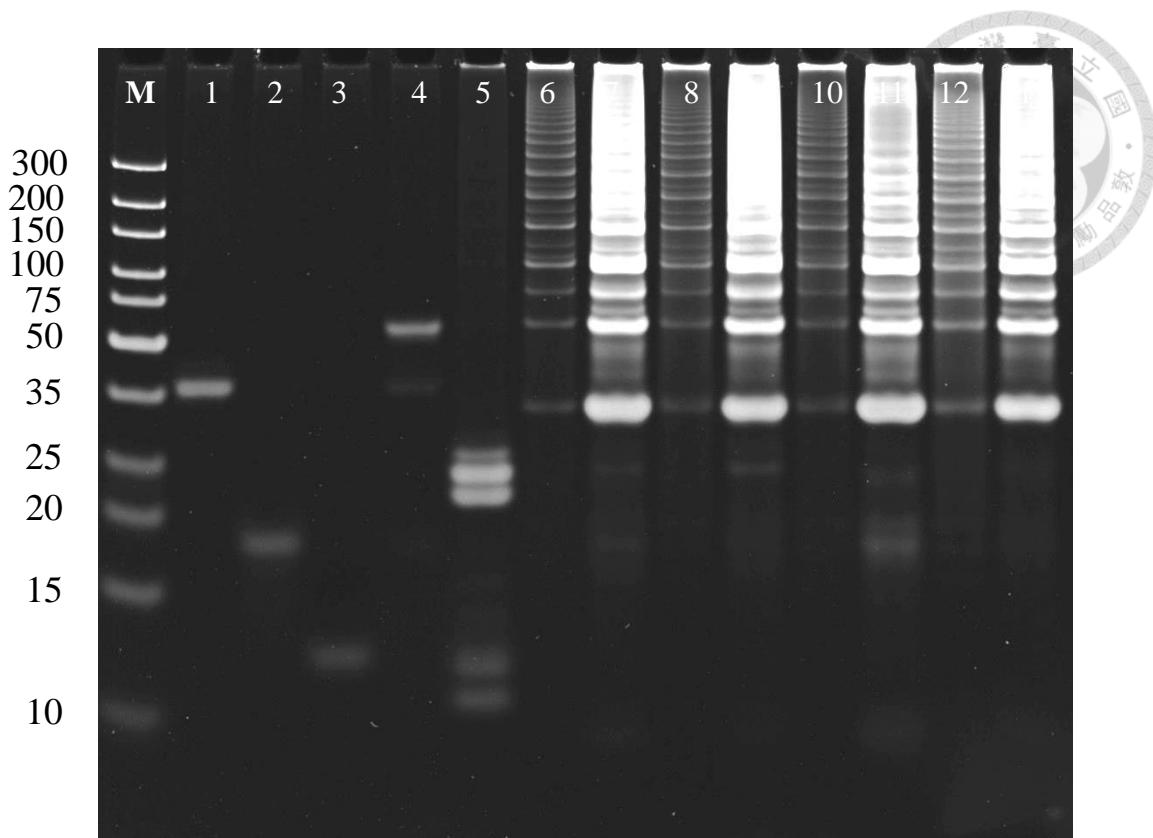


圖 3-45. 以 miR-205 與 P3b@MB 進行 37 °C、150 分鐘/ 210 分鐘 SDA 反應後之條帶對應圖。以 15 % PAGE 於 70 V 電壓下進行電泳分析 120 分鐘。Ultra low range DNA ladder。(1) 100 nM P3b；(2) 200 nM Target；(3) 200 nM Product；(4) 100 nM P3b + 100 nM Target；(5) P3b@MB + 100 nM T_{DNA} SDA 60 分鐘(KF: 1×/ NE: 1×)；(6) P3b@MB + 100 nM T_{DNA} SDA 150 分鐘(KF: 0.625× /NE: 1×)；(7) P3b@MB + 100 nM T_{DNA} SDA 150 分鐘(KF: 1.25× /NE: 1×)；(8) P3b@MB + 100 nM T_{DNA} SDA 150 分鐘(KF: 0.75× /NE: 1.5×)；(9) P3b@MB + 100 nM T_{DNA} SDA 150 分鐘(KF: 1.5× /NE: 2×)；(10) P3b@MB + 100 nM T_{DNA} SDA 210 分鐘(KF: 0.625× /NE: 1×)；(11) P3b@MB + 100 nM T_{DNA} SDA 210 分鐘(KF: 1.25× /NE: 1×)；(12) P3b@MB + 100 nM T_{DNA} SDA 210 分鐘(KF: 0.75× /NE: 1.5×)；(13) P3b@MB + 100 nM T_{DNA} SDA 210 分鐘(KF: 1.5× /NE: 2×)。

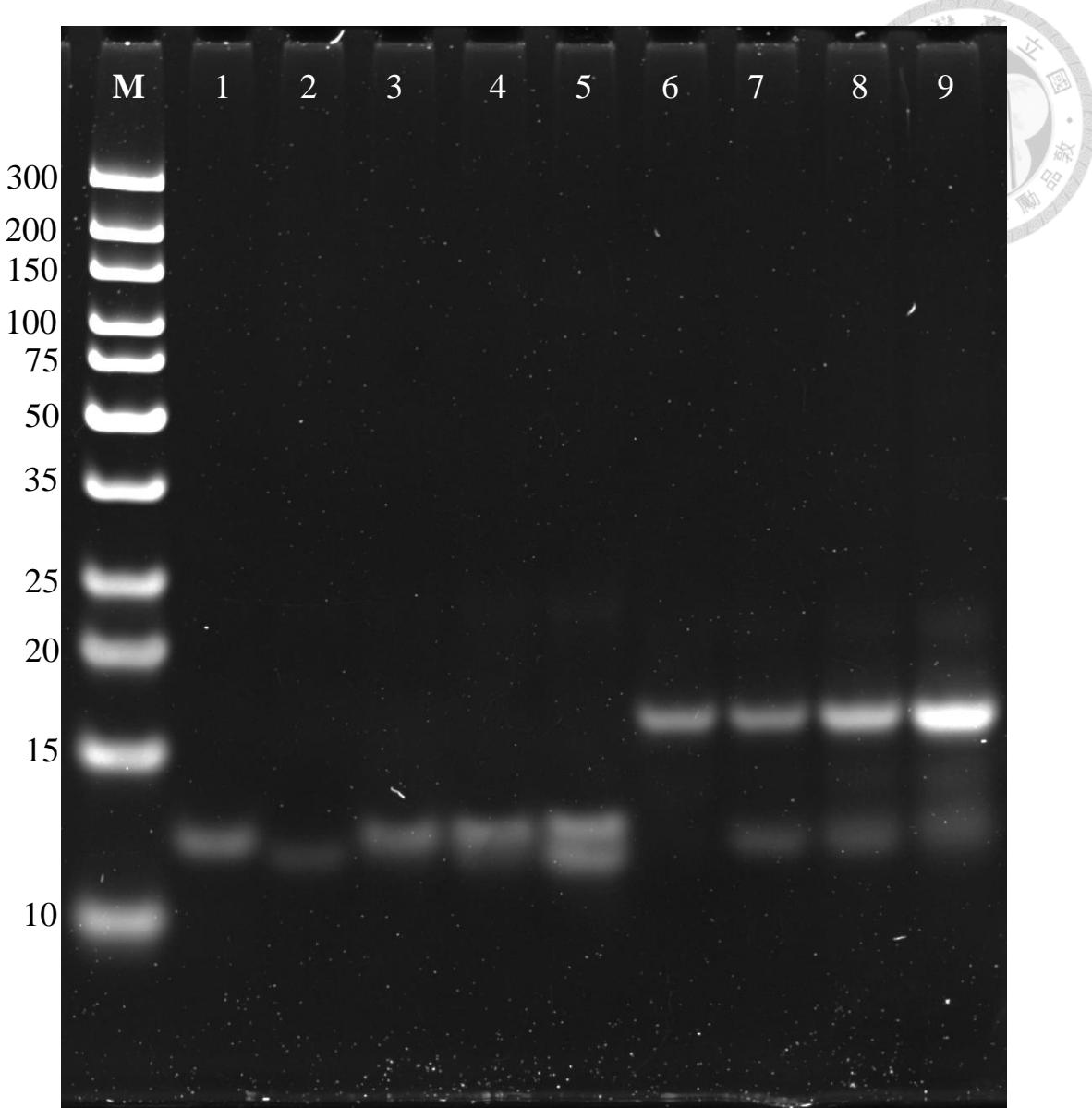


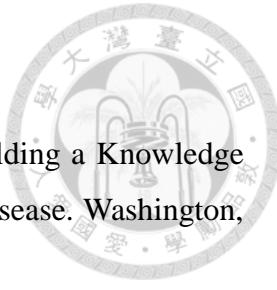
圖 3-46. 以兩種序列設計之 product probe(CP1、CP2)，並分別以 1:1/1:2/1:5 之比例與 100 nM product 進行 37 °C、60 分鐘雜合反應之條帶對應圖。以 15 % PAGE 於 70 V 電壓下進行電泳分析 120 分鐘。Ultra low range DNA ladder。(1) 100 nM CP1；(2) 100 nM product；(3) 100 nM product 與 100 nM CP1 雜合；(4) 100 nM product 與 200 nM CP1 雜合；(5) 100 nM product 與 500 nM CP1 雜合；(6) 100 nM CP2 雜合；(7) 100 nM product 與 100 nM CP2 雜合；(8) 100 nM product 與 200 nM CP2 雜合；(9) 100 nM product 與 500 nM CP2 雜合；

第四章 結論



本篇研究欲利用磁珠並結合鏈置換增擴放大法，開發可診斷子宮內膜樣腺癌之偵檢策略。首先透過序列設計進行探針序列最佳化，並以動態光散射進行磁珠修飾前後大小及界面電位之檢測，確認磁珠上修飾核酸探針，再以磁珠探針進行鏈置換增擴放大法，並確認了最佳反應時間，於產率方面也發現，在磁珠表面進行鏈置換增擴放大法與未修飾之核酸探針相比，由於核酸聚合酶及核酸限制酶可在磁珠上之探針持續反應，產率有明顯之提升，並藉此進行相對定量，確認了磁珠探針進行反應之最佳時間，而產率的增加對於核酸訊號放大策略具有明顯的助益。可行性測試中，確認核酸聚合酶及核酸限制酶分別具有作用且同時存在後才可產生預期之產物，也同時確認在目標核酸未出現時，並不會啟動增擴反應。再以動態光散射確認 SDA 反應各階段之磁珠粒徑大小與界面電位，確認磁珠於各階段確實有對應的粒徑大小及界面電位改變。於磁珠上之選擇性，於雜合、增擴反應階段中，並未看到有如產率之明顯提升。輸出產物並結合產物探針的策略，亦可與雙股 AT-rich 專一性結合之有機分子結合，建立另一檢查點並構成訊號輸出源。

參考文獻



- [1] National Research Council. Toward Precision Medicine: Building a Knowledge Network for Biomedical Research and a New Taxonomy of Disease. Washington, DC: The National Academies Press. **2011**.
- [2] Inke R. König, Oliver Fuchs, Gesine Hansen, Erika von Mutius, Matthias V. Kopp., What is precision medicine? *European Respiratory Journal* **2017**, 50 1700391
- [3] Ziegler, A., Koch, A., Krockenberger, K. et al., Personalized medicine using DNA biomarkers: a review. *Hum Genet* **2012**, 131(10), 1627-38
- [4] Zhang Z, Yang T, Xiao J. Circular RNAs: Promising Biomarkers for Human Diseases. *EBioMedicine*. **2018**, 34, 267–274.
- [5] Boschetti, Egisto; D'Amato, Alfonsina; Candiano, Giovanni; Righetti, Pier Giorgio., Protein biomarkers for early detection of diseases: The decisive contribution of combinatorial peptide ligand libraries. *Journal of Proteomics*, **2018**, 188, 1-14
- [6] Srivastava A, Creek DJ., Discovery and Validation of Clinical Biomarkers of Cancer: A Review Combining Metabolomics and Proteomics. *Proteomics*. **2019**, 19(10), 1700448
- [7] Bhalla N, Jolly P, Formisano N, Estrela P., Introduction to biosensors. *Essays Biochem.* **2016**, 60(1), 1–8.
- [8] Michael Keusgen., Biosensors: new approaches in drug discovery. *Naturwissenschaften* **2002**, 89(10), 433–444.
- [9] Celine I. L. Justino, Armando C. Duarte, Teresa A. P. Rocha-Santos., Recent Progress in Biosensors for Environmental Monitoring: A Review. *Sensors* **2017**, 17, 2918
- [10] Paul Leonard, Stephen Hearty, Joanne Brennan, Lynsey Dunnea, John Quinn, Trinad Chakraborty, RichardO'Kennedy., Advances in biosensors for detection of pathogens in food and water. *Enzyme and Microbial Technology*. **2003**, 32(1), 3–13
- [11] Liu J, Jasim I, Shen Z, et al. A microfluidic based biosensor for rapid detection of *Salmonella* in food products. *PLoS One*. **2019**, 14(5):e0216873.
- [12] Slaughter, G.; Kulkarni, T. Detection of Human Plasma Glucose Using a

Self-Powered Glucose Biosensor. *Energies* **2019**, *12*, 825.

- [13] V.S.P.K. Sankara, Aditya Jayanthi, Asim Bikas Das, Urmila Saxena., Recent advances in biosensor development for the detection of cancer biomarkers. *Biosensors and Bioelectronics* **2017**, *91*(15), 15-23.
- [14] Danielle Bruen, Colm Delaney, Larisa Florea, Dermot Diamond., Glucose Sensing for Diabetes Monitoring: Recent Developments. *Sensors* **2017**, *17*, 1866.
- [15] Nikhil Bhalla, Pawan Jolly, Nello Formisano, Pedro Estrela., Introduction to biosensors. *Essays in Biochemistry* **2016**, *60*, 1–8.
- [16] Mullis K, Falloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H., Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* **1986**, *51* Pt 1, 263-73.
- [17] Yan Li, Qiupeng Zheng, Chunyang Bao, Shuyi Li, Weijie Guo, Jiang Zhao, Di Chen, Jianren Gu, Xianghuo He, Shenglin Huang., Circular RNA is enriched and stable in exosomes: a promising biomarker for cancer diagnosis. *Cell Research* **2015**, *25*, 981-984
- [18] G T Walker, M S Fraiser, J L Schram, M C Little, J G Nadeau, D P Malinowski., Strand displacement amplification--an isothermal, in vitro DNA amplification technique. *Nucleic Acids Res.* **1992**, *20*(7), 1691–1696.
- [19] Jingpu Zhang, Chao Li, Xiao Zhi, Gabriel Alfranca Ramon, Yanlei Liu, Chunlei Zhang, Fei Pan, Daxiang Cu. Hairpin DNA-Templated Silver Nanoclusters as Novel Beacons in Strand Displacement Amplification for MicroRNA Detection. *Anal. Chem.* **2016**, *88*(2), 1294-1302
- [20] Ou, S., Xu, T., Liu, X., Yu, X., Li, R., Deng, J., Chen, Y.. Rapid and ultrasensitive detection of microRNA based on strand displacement amplification-mediated entropy-driven circuit reaction. *Sensors and Actuators B: Chemical*, **2018**, *255*, 3057–3063.
- [21] Andrew Fire, Si-Qun Xu. Rolling replication of short DNA circles. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **1995**, *92*(10), 4641-4645
- [22] Tian Tian, Jiaqi Wang, Xiang Zhou., A review: microRNA detection methods. *Org. Biomol. Chem.*, **2015**, *13*, 2226-2238
- [23] Ye Zhu, Huijuan Wang, Lin Wang, Jing Zhu, Wei Jiang., Cascade Signal Amplification Based on Copper Nanoparticle-Reported Rolling Circle Amplification for Ultrasensitive Electrochemical Detection of the Prostate Cancer

- Biomarker. *ACS Appl. Mater. Interfaces.* **2016**, 8(4), 2573-2581
- [24] Xiaoli Zhu, Yalan Shen, Jiepei Cao, Li Yin, Fangfang Ban, Yongqian Shu, Genxi Li., Detection of microRNA SNPs with ultrahigh specificity by using reduced graphene oxide-assisted rolling circle amplification., *Chem. Commun.* **2015**, 51, 10002-10005.
- [25] Jing Ma, Long Wu, Zhonghua Li, Zhicheng Lu, Wenmin Yin, Axiu Nie, Fan Ding, Biru Wang, Heyou Han., Versatile Electrochemiluminescence Assays for PEDV Antibody Based on Rolling Circle Amplification and Ru-DNA Nanotags. *Anal. Chem.* **2018**, 90(12), 7415-7421.
- [26] Yan L, Zhou J, Zheng Y, Gamson AS, Roembke BT, Nakayama S, Sintim HO. Isothermal amplified detection of DNA and RNA. *Mol Biosyst.* **2014**, 10(5), 970-1003
- [27] Jeffrey Van Ness, Lori K. Van Ness, David J. Galas. Isothermal reactions for the amplification of oligonucleotides. *PNAS*, **2003**, 100 (8) 4504-4509.
- [28] Jifeng Qian, Tanya M. Ferguson, Deepali N. Shinde, Alissa J. Rami rez-Borrero, Arend Hintze, Christoph Adami, Angelika Niemz. Sequence dependence of isothermal DNA amplification via EXPAR. *Nucleic Acids Res.* **2012**, 40(11), e87
- [29] Yanyan Yu, Zuanguang Chen, Wensi Jian, Duiping Sun, Beibei Zhang, Xinchun Li, Meicun Yao. Ultrasensitive electrochemical detection of avian influenza A (H7N9) virus DNA based on isothermal exponential amplification coupled with hybridization chain reaction of DNAzyme nanowires. *Biosensors and Bioelectronics*, **2015**, 64 (15), 566-571.
- [30] Kaixiang Zhang, Dong-Ku Kang, M. Monsur Ali, Linan Liu, Louai Labanieh, Mengrou Lu, Hamidreza Riazifar, Thi N. Nguyen, Jason A. Zell, Michelle A. Digman, Enrico Gratton, Jinghong Li, Weian Zhao. Digital quantification of miRNA directly in plasma using integrated comprehensive droplet digital detection. *Lab on a Chip*. **2015**, 15(21), 4217-4226.
- [31] Myriam Vincent, Yan Xu, Huimin Kong. Helicase-dependent isothermal DNA amplification. *EMBO Rep.* **2004**, 5(8), 795–800.
- [32] Jeong, YJ., Park, K. & Kim, DE. Isothermal DNA amplification in vitro: the helicase-dependent amplification system. *Cell. Mol. Life Sci.* **2009**, 66, 3325.
- [33] Bjørn-Ivar Haukanes, Catrine Kvam. Application of Magnetic Beads in Bioassays. *Bio/Technology*. **1993**, 11, 60–63.

- [34] Manel Ben Ismail, Erica de la Serna, Gisela Ruiz-Vega, Teresa García-Berrocoso, Joan Montaner, Mohammed Zourob, Ali Othmane, Eva Baldrich., Using magnetic beads and signal amplifiers to produce short and simple immunoassays: Application to MMP-9 detection in plasma samples. *Analytica Chimica Acta*. **2018**, 999, 144-154.
- [35] Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. *Cell*. **1993**, 75(5), 843-54.
- [36] Lee Y, Kim M, Han J, Yeom KH, Lee S, Baek SH, Kim VN., MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J*, **2004**, 23, 4051-4060.
- [37] Gregory PA, Bracken CP, Bert AG, Goodall GJ., MicroRNAs as regulators of epithelial–mesenchymal transition. *Cell Cycle*, **2008**, 7, 3112-3118.
- [38] H-W Hwang, J T Mendell., MicroRNAs in cell proliferation, cell death, and tumorigenesis. *British Journal of Cancer*. **2006**, 94, 776–780.
- [39] Brennecke J, Hipfner DR, Stark A, Russell RB, Cohen SM., Bantam encodes a developmentally regulated microRNA that controls cell proliferation and regulates the proapoptotic gene hid in *Drosophila*. *Cell*, **2003**, 113, 25–36.
- [40] Xu P, Vernooy SY, Guo M, Hay BA., The *Drosophila* microRNA miR-14 suppresses cell death and is required for normal fat metabolism. *Curr Biol*, **2003**, 13, 790–795.
- [41] Wilson RC, Doudna JA. Molecular mechanisms of RNA interference. *Annu Rev Biophys*. **2013**, 42, 217-39.
- [42] Lee Y, Kim M, Han J, et al., MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J*. **2004**; 23(20):4051–4060.
- [43] Borchert GM, Lanier W, Davidson BL., RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nat Struct Mol Biol*. **2006**, 13(12), 1097-101.
- [44] Yeom KH, Lee Y, Han J, Suh MR, Kim VN. Characterization of DGCR8/Pasha, the essential cofactor for Drosha in primary miRNA processing. *Nucleic Acids Res*. **2006**, 34(16), 4622–4629.
- [45] Faller M, Guo F. MicroRNA biogenesis: there's more than one way to skin a cat. *Biochim Biophys Acta*. **2008**, 1779(11), 663–667
- [46] Han J, Lee Y, Yeom KH, Kim YK, Jin H, Kim VN. The Drosha-DGCR8 complex

- in primary microRNA processing. *Genes Dev.* **2004**, *18*(24), 3016–3027.
- [47] Murchison EP, Hannon GJ; Hannon. miRNAs on the move: miRNA biogenesis and the RNAi machinery. *Current Opinion in Cell Biology.* **2004**, *16*(3), 223–9.
- [48] Lund E, Dahlberg JE, Dahlberg. Substrate selectivity of exportin 5 and Dicer in the biogenesis of microRNAs. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **2006**, *71*, 59–66.
- [49] Ha M, Kim VN. Regulation of microRNA biogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **2014**, *15*, 509–24.
- [50] Richard I., GregoryThimmaiah P. Chendrimada, Neil Cooch, Ramin Shiekhattar., Human RISC Couples MicroRNA Biogenesis and Posttranscriptional Gene Silencing. *Cell*, **2005**, *123*(4), 631-640.
- [51] Thimmaiah P. Chendrimada, Kenneth J. Finn, Xinjun Ji, David Baillat, Richard I. Gregory, Stephen A. Liebhaber, Amy E. Pasquinelli, Ramin Shiekhattar. MicroRNA silencing through RISC recruitment of eIF6. *Nature*, **2007**, *447*, 823–828.
- [52] Ashlee M. Strubberg, Blair B. Madison., MicroRNAs in the etiology of colorectal cancer: pathways and clinical implications. *Disease Models & Mechanisms.* **2017**, *10*, 197-214.
- [53] Pritchard, C. C., Cheng, H. H., & Tewari, M. (2012). MicroRNA profiling: approaches and considerations. *Nature reviews. Genetics*, *13*(5), 358–369.
- [54] Varallyay, E.; Burgyan, J.; Havelda, Z., MicroRNA detection by northern blotting using locked nucleic acid probes. *Nat Protoc* **2008**, *3*(2), 190-16
- [55] Liu, C. G., Calin, G. A., Meloon, B., Gamliel, N., Sevignani, C., Ferracin, M., ... Croce, C. M. An oligonucleotide microchip for genome-wide microRNA profiling in human and mouse tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **2004**, *101*(26), 9740–9744.
- [56] Afzal M, Manzoor I, Kuipers OP. A Fast and Reliable Pipeline for Bacterial Transcriptome Analysis Case study: Serine-dependent Gene Regulation in *Streptococcus pneumoniae*. *J Vis Exp.* **2015**, *25*(98).
- [57] Erika Varkonyi-Gasic, Rongmei Wu, Marion Wood, Eric F Walton, Roger P

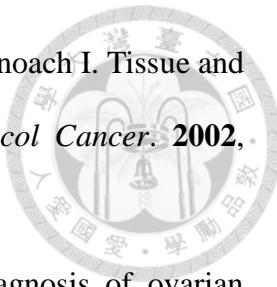
- Hellens. A highly sensitive RT-PCR method for detection and quantification of microRNAs. *Plant Methods*. **2007**, 3(1), 12.
- [58] Shi, R.; Chiang, V.L., Facile means for quantifying microRNA expression by real-time PCR. *Biotechniques*, **2005**, 39(4), 519-25
- [59] Hong-Duc Phan, Junan Li, Ming Poi, Kotaro Nakanishi. Quantification of miRNAs Co-Immunoprecipitated with Argonaute Proteins Using SYBR Green-Based qRT-PCR. *Argonaute Proteins*. **2017**, 1680, 29-40.
- [60] Volinia S1, Calin GA, Liu CG, Ambs S, Cimmino A, Petrocca F, Visone R, Iorio M, Roldo C, Ferracin M, Prueitt RL, Yanaihara N, Lanza G, Scarpa A, Vecchione A, Negrini M, Harris CC, Croce CM. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **2006**, 103(7), 2257-61.
- [61] Tania Frix, Sara Donzelli, Giovanni Blandino., Oncogenic MicroRNAs: Key Players in Malignant Transformation. *Cancers (Basel)*. **2015**, 7(4), 2466–2485.
- [62] Baohong Zhang, Xiaoping Pan, George P. Cobb, Todd A. Anderson. microRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *Developmental Biology*. **2007**, 302(1), 1-12.
- [63] IA Asangani, SAK Rasheed, DA Nikolova, JH Leupold, NH Colburn, S Post and H Allgayer. MicroRNA-21 (miR-21) post-transcriptionally downregulates tumor suppressor Pdcd4 and stimulates invasion, intravasation and metastasis in colorectal cancer. *Oncogene*. **2008**, 27, 2128–2136.
- [64] Lisa B. Frankel, Nanna R. Christoffersen, Anders Jacobsen, Morten Lindow, Anders Krogh, Anders H. Lund. Programmed Cell Death 4 (PDCD4) Is an Important Functional Target of the MicroRNA miR-21 in Breast Cancer Cells. *The Journal of Biological Chemistry*. **2007**, 283, 1026-1033.
- [65] Nip, H., Dar, A. A., Saini, S., Colden, M., Varahram, S., Chowdhary, H., Majid, S., Oncogenic microRNA-4534 regulates PTEN pathway in prostate cancer. *Oncotarget*. **2016**, 7(42), 68371–68384.
- [66] Xiaohua Li, Ying Zhang, Hongwei Zhang, Xiaonan Liu, Taiqian Gong, Mengbin

Li, Li Sun, Gang Ji, Yongquan Shi, Zheyi Han, Shuang Han, Yongzhang Nie, Xiong Chen, Qinchuan Zhao, Jie Ding, Kaichun Wu, Fan Daiming. miRNA-223 Promotes Gastric Cancer Invasion and Metastasis by Targeting Tumor Suppressor EPB41L3. *Mol Cancer Res.* **2011**, 9(7), 824-833.

- [67] Garofalo, M., Di Leva, G., Romano, G., Nuovo, G., Suh, S.-S., Ngankeu, A., Secchiero, P. MiR - 221&222 regulate TRAIL resistance and enhance tumorigenicity through PTEN and TIMP3 downregulation. *Cancer Cell.* **2009**, 16, 498–509.
- [68] Tao Tang, Hoi KinWong, Wenyi Guc, Mei-yung Yu, Ka-Fai To, Chi Chiu Wang, Yick Fu Wong, Tak Hong Cheung, Tony Kwok Hung Chung, Kwong Wai Choy. MicroRNA-182 plays an onco-miRNA role in cervical cancer. *Gynecologic Oncology.* **2013**, 129(1), 199-208.
- [69] Xin, W., Liu, X., Ding, J., Zhao, J., Zhou, Y., Wu, Q., & Hua, K. Long non-coding RNA derived miR-205-5p modulates human endometrial cancer by targeting PTEN. *American journal of translational research.* **2015**, 7(11), 2433–2441.
- [70] Zhou, B., Shan, H., Su, Y., Xia, K., Zou, R., & Shao, Q. Let-7a inhibits migration, invasion and tumor growth by targeting AKT2 in papillary thyroid carcinoma. *Oncotarget.* **2017**, 8(41), 69746–69755
- [71] Yi-Chia Lin, Ji-Fan Lin, Te-Fu Tsai, Kuang-Yu Chou, Hung-En Chen, Thomas I-Sheng Hwang., Tumor suppressor miRNA-204-5p promotes apoptosis by targeting BCL2 in prostatecancer cells. *Asian Journal of Surgery,* **2017**, 40, 396-406.
- [72] Liu, J., Yan, J., Zhou, C., Ma, Q., Jin, Q., & Yang, Z., miR-1285-3p acts as a potential tumor suppressor miRNA via downregulating JUN expression in hepatocellular carcinoma. *Tumor Biology,* **2014**, 36(1), 219–225.

- [73] Zhao, Y., Lu, G., Ke, X., Lu, X., Wang, X., Li, H., ... He, S., miR-488 acts as a tumor suppressor gene in gastric cancer. *Tumor Biology*, **2016**, 37(7), 8691–8698.
- [74] E Mets, J Van der Meulen, G Van Peer, M Boice, P Mestdagh, I Van de Walle, T Lammens, S Goossens, B De Moerloose, Y Benoit, N Van Roy, E Clappier, B Poppe, J Vandesompele, H-G Wendel, T Taghon, P Rondou, J Soulier, P Van Vlierberghe, F Speleman., MicroRNA-193b-3p acts as a tumor suppressor by targeting the MYB oncogene in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. **2015**, 29, 798–806.
- [75] Teng Lv, Kejuan Song, Lili Zhang, Weihua Li, Yulong Chen, Yuchao Diao, Qin Yao, Peishu Liu. miRNA-34a decreases ovarian cancer cell proliferation and chemoresistance by targeting HDAC1. *Biochemistry and Cell Biology*, **2018**, 96(5), 663-671.
- [76] Hong, B. S., Ryu, H. S., Kim, N., Kim, J., Lee, E., Moon, H., ... Moon, H. G., Tumor suppressor miRNA-204-5p regulates growth, metastasis, and immune microenvironment remodeling in breast cancer. *Cancer Research*, **2019**, 79(7), 1520-1534.
- [77] William M. Burke, James Orr, Mario Leitao, Emery Salom, Paola Gehrig, Alexander B. Olawaiye, Molly Brewer, Dave Boruta, Jeannine Villella, Tom Herzog, Fadi Abu Shahin., Endometrial cancer: A review and current management strategies: Part I. *Gynecologic Oncology* **2014**, 134 (3), 385–392.
- [78] Choi, S., & Hsu, I.-C. J., Endometrial Cancer. *Handbook of Evidence-Based Radiation Oncology*. **2018**, 645–669.
- [79] Akhmedkhanov A, Zeleniuch-Jacquotte A, Toniolo P., Role of exogenous and endogenous hormones in endometrial cancer: review of the evidence and research perspectives. *Ann N Y Acad Sci.* **2001**, 943(1), 296-315.
- [80] D. Aune, D. A. Navarro Rosenblatt, D. S. M. Chan, S. Vingeliene, L. Abar, A. R. Vieira, D. C. Greenwood, E. V. Bandera, T. Norat. Anthropometric factors and endometrial cancer risk: a systematic review and dose–response meta-analysis of prospective studies. *Annals of Oncology*, **2015**, 26(8), 1635-1648.

- [81] Myong Cheol Lim, Young-Joo Won, Mun Jung Ko, Miseon Kim, Seung-Hyuk Shim, Dong Hoon Suh, Jae-Weon Kim. Incidence of cervical, endometrial, and ovarian cancer in Korea during 1999–2015. *J Gynecol Oncol.* **2019**, *30*(1), e38.
- [82] Pietro Litta, Federica Merlin, Carlo Saccardi, Chiara Pozzan, Giuseppe Sacco, Mara Fracas, Giampiero Capobianco, Salvatore Dessole. Role of hysteroscopy with endometrial biopsy to rule out endometrial cancer in postmenopausal women with abnormal uterine bleeding. *Maturitas*, **2005**, *50*, 117–123.
- [83] Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int. J. Cancer.* 2015;136:E359–86.
- [84] Franca Bianchini, Rudolf Kaaks, Harri Vainio. Overweight, obesity, and cancer risk. *Lancet Oncol.* **2002**, *3*(9), 565-74.
- [85] Gangemi, M., G. Meneghetti, O. Predebon, et al., Obesity as a risk factor for endometrial cancer. *Clin. Exp. Obstet. Gynecol.* **1987** (14), 119–122.
- [86] J Luo, S Beresford, C Chen, R Chlebowski, L Garcia, L Kuller, M Regier, J Wactawski-Wende, K L Margolis. Association between diabetes, diabetes treatment and risk of developing endometrial cancer. *British Journal of Cancer.* **2014**, *111*, 1432–1439.
- [87] Dagfinn Aune, Abhijit Sen, Lars J. Vatten. Hypertension and the risk of endometrial cancer: a systematic review and meta-analysis of case-control and cohort studies. *Sci Rep.* **2017**, *7*, 44808.
- [88] Philippe Morice, Alexandra Leary, Carien Creutzberg, Nadeem Abu-Rustum, Emile Darai. Endometrial cancer. *The lancet.* **2016**, *387*, 1094-1108.
- [89] MM Braun, EA Overbeek-Wager Diagnosis and Management of Endometrial Cancer. *American Family Physician.* **2016**, *93*, 6.
- [90] Dakubo G.D. Endometrial Cancer Biomarkers in Circulation. In: Cancer Biomarkers in Body Fluids. *Springer, Cham.* **2017**, 417-433.
- [91] Pecorelli S. Revised FIGO staging for carcinoma of the vulva, cervix, and endometrium. *Int J Gynaecol Obstet.* **2009**, *105*(2), 103-4.
- [92] Sorosky JI. Endometrial cancer. *Obstet Gynecol.* **2012**, *120*, 383–397.
- [93] Elsandabesee D, et al. The performance of Pipelle endometrial sampling in a dedicated postmenopausal bleeding clinic. *J Obstet Gynaecol.* **2005**, *25*(1), 32–34.



- [94] Ginath S, Menczer J, Fintsi Y, Ben-Shem E, Glezerman M, Avinoach I. Tissue and serum CA125 expression in endometrial cancer. *Int J Gynecol Cancer*. **2002**, *12*(4), 372-5.
- [95] Razmi, N., & Hasanzadeh, M., Current advancement on diagnosis of ovarian cancer using biosensing of CA 125 biomarker: Analytical approaches. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. **2018**, *108*, 1-12.
- [96] B.Szymańska, Z.Lukaszewski, K.Hermanowicz-Szamatowicz, E.Gorodkiewicz. A biosensor for determination of the circulating biomarker CA125/MUC16 by Surface Plasmon Resonance Imaging. *Talanta*. **2020**, *206*, 120187.
- [97] Tsukamoto, Ozora et al., Identification of endometrioid endometrial carcinoma-associated microRNAs in tissue and plasma. *Gynecologic Oncology*, **2014**, *132*(3), 715 – 721.
- [98] Guiyu Zhang, Xinxin Hou, Yue Li, Meng Zhao., MiR-205 inhibits cell apoptosis by targeting phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten in endometrial cancer ishikawa cells. *BMC Cancer*. **2014**, *14*, 440.
- [99] Ning Su, Haifeng Qiu, Yifei Chen, Tingting Yang, Qin Yan, Xiaoping Wan. miR-205 promotes tumor proliferation and invasion through targeting ESRRG in endometrial carcinoma. *Oncology reports*. **2013**, *29*(6), 2297-2302.
- [100] Chenyu Jin, Ruojia Liang., miR-205 promotes epithelial–mesenchymal transition by targeting AKT signaling in endometrial cancer cells. *J. Obstet. Gynaecol. Res.* **2015**, *41*(10), 1653–1660.
- [101] Cramer, D.W., S.J. Cutler & B. Christine., Trends in the incidence of endometrial cancer in the United States. *Gynecol. Oncol.* **1974**, *(2)*, 130–143.
- [102] Surveillance, Epidemiology, and End Results Program Public- Use Data (1973–1999), National Cancer Institute, DCCPS, Surveillance Research Program,