



國立臺灣大學生命科學院分子與細胞生物學研究所

碩士論文

Institute of Molecular and Cellular Biology

College of Life Science

National Taiwan University

Master's Thesis

以單分子螢光共振能量轉移技術探討 G₄C₂ RNA 重複
序列的分子內與分子間的交互作用

Study of intra- and intermolecular interactions of G₄C₂
RNA tandem repeats by Single-Molecule FRET

曹恩慈

En-Cih Cao

指導教授：溫進德 博士

Advisor : Jin-Der Wen, Ph.D.

中華民國 114 年 7 月

July, 2025

口試委員審定書



國立臺灣大學碩士學位論文

口試委員會審定書

MASTER'S THESIS ACCEPTANCE CERTIFICATE
NATIONAL TAIWAN UNIVERSITY

以單分子螢光共振能量轉移技術探討 G₄C₂ RNA 重複序列的分子內與分子間的
交互作用

Study of intra- and intermolecular interactions of G₄C₂ RNA tandem repeats by
Single-Molecule FRET

本論文係曹恩慈 (R12B43010) 在國立臺灣大學生命學院分子與細胞生物學研究所完成之碩士學位論文，於民國 114 年 07 月 21 日承下列考試委員審查通過及口試及格，特此證明。

The undersigned, appointed by the Institute of Molecular and Cellular Biology on July 21th, 2025 have examined a Master's Thesis entitled above presented by En-Cih Cao(R12B43010) candidate and hereby certify that it is worthy of acceptance.

口試委員 Oral examination committee:

溫進傳 張力生 余建沂

(指導教授 Advisor)

系（所、學位學程）主管 Director: 董桂香

謝辭



首先，謝謝我的指導教授溫進德老師的教導，當我數據不理想、研究大卡關而陷入迷惘的時候，老師總能一針見血地指出問題核心，耐心引導我找出方向，使我能克服重重難關，順利完成本論文。同時，感謝擔任口試委員的張功耀老師與余建泓老師，在口試時所提出寶貴的建議，使我能對論文的論述更為嚴謹周全，並開拓新的見解。

在這段旅程中，感謝實驗室的夥伴們的幫忙與包容，感謝學長姐們帶領我一步步跨越初學的門檻，從儀器操作到數據分析，讓我的研究得以順利推進。也謝謝一同奮鬥的同學們與學弟妹，彼此的加油打氣與無私協助，讓我對研究心灰意冷的時候得以重拾動力，是我在面對壓力時最好的安定劑。

最後，感謝我的家人與朋友們的支持與陪伴，讓我在專心地完成學業，無後顧之憂，永遠是我前進的最大動力與強而有力的後盾。

兩年的碩士生涯，是個充實的時光。在此，向所有師長、親友與家人獻上我最深的感謝，期許自己能帶著這份歷練與祝福，勇敢地迎接未來的挑戰。



摘要

肌萎縮側索硬化症（Amyotrophic Lateral Sclerosis, ALS）與額顳葉失智症（Frontotemporal Dementia, FTD）為嚴重的神經退化性疾病，其主要的致病原因與 *C9orf72* 基因中六核苷酸（G₄C₂）序列的異常擴增密切相關。該序列轉錄生成的 G₄C₂ RNA 聚集現象，被認為是引發神經毒性的主要因素，然而其具體的致病機制仍有待釐清。因此，本研究利用螢光共振能量轉移（FRET）技術，探討 G₄C₂ RNA 重複序列的結構特性與其分子間的交互作用。

首先，為了探究不同鹽類與重複次數對 G₄C₂ RNA 結構穩定性的影響，我們設計了多種能與 G₄C₂ RNA 重複序列互補的反義寡核苷酸，藉由與 r(G₄C₂)₂ 的結合效率測定，顯示 dC₂G₂C₄ 為較合適的 DNA 探針。在此偵測系統中，就鹽類效應而言，r(G₄C₂)₂ 的結構穩定度依序遞減：100 mM NaCl, 100 mM KCl, 100 mM NH₄Cl ≫ 10 mM MgCl₂。就重複次數 ($n = 2 \sim 5$) 而言，結果顯示在 10 mM MgCl₂ 和 100 mM KCl 的條件下，G₄C₂ RNA 可能摺疊成不同結構，並且在 100 mM KCl 中，G₄C₂ RNA 的結構穩定性呈現出重複次數依賴性。接著，利用凝膠電泳定量與螢光漂白實驗，結果顯示分別在 10 mM MgCl₂ 和 100 mM KCl 條件下製備的 r(G₄C₂)₂ 複合物，傾向形成 RNA 雙鏈（Duplex）或二聚體（dimer）結構，且在 100 mM KCl 的條件下更為穩定。最後，團簇模擬實驗顯示在 10 mM MgCl₂ 條件下，r(G₄C₂)₂₅ 可以形成分子間相互作用。

本篇研究藉由評估反義寡核苷酸與 G₄C₂ RNA 的結合效率，顯示 G₄C₂ RNA 結構穩定性受重複次數與離子環境共同調控，且在較長重複序列中觀察到分子間相互作用，進而為在神經細胞內 RNA 團簇形成的起始機制提供線索。

關鍵字：*C9orf72* 基因、RNA 聚集體、液-液相分離、反義寡核酸、單分子技術

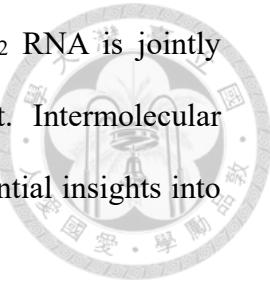
Abstract

Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) and Frontotemporal Dementia (FTD) are severe neurodegenerative diseases, with their primary pathogenic cause closely linked to abnormal expansions of the hexanucleotide (G₄C₂) repeat sequence in the C9orf72 gene. The aggregation of G₄C₂ RNA transcribed from this sequence is considered a key factor triggering neurotoxicity; however, the precise pathogenic mechanisms remain to be clarified. Therefore, this study employs Förster Resonance Energy Transfer (FRET) technology to investigate the structural characteristics of the G₄C₂ RNA repeat sequence and its intermolecular interactions.

Initially, to examine the influence of different salts and repeat numbers on the structural stability of G₄C₂ RNA, we designed various antisense oligonucleotides complementary to the G₄C₂ RNA repeat sequences. Binding efficiency assays conducted with r(G₄C₂)₂ identified dC₂G₂C₄ as the most suitable DNA probe. In the detection system, regarding the effect of salts, the structural stability of r(G₄C₂)₂ follows the order: 100 mM NaCl, 100 mM KCl, 100 mM NH₄Cl ≫ 10 mM MgCl₂. In terms of repeat number (n = 2 – 5), the results indicate that under conditions of 10 mM MgCl₂ and 100 mM KCl, G₄C₂ RNA may fold into distinct conformations, with a more pronounced positive correlation between repeat numbers and structural stability observed in 100 mM KCl. Subsequently, using gel electrophoresis quantification and fluorescence bleaching assays, the results show that r(G₄C₂)₂ complexes formed under 10 mM MgCl₂ and 100 mM KCl conditions predominantly assemble into RNA duplexes or dimeric structures, with greater stability under 100 mM KCl. Finally, cluster simulation experiments demonstrate that r(G₄C₂)₂₅ can form intermolecular interactions under 10 mM MgCl₂ conditions.

This study evaluates the binding efficiency between antisense oligonucleotides

and G₄C₂ RNA, demonstrating that the structural stability of G₄C₂ RNA is jointly regulated by the number of repeats and the ionic environment. Intermolecular interactions were observed in longer repeat sequences, offering potential insights into the initiation mechanism of RNA cluster formation in neuronal cells.



Keywords: *C9orf72*, RNA foci, LLPS, ASO, Single molecule technology

目次

口試委員審定書	ii
謝辭	iii
摘要	iii
Abstract	iv
目次	vi
圖次	viii
表次	ix
第一章 緒論	1
1.1 短串聯重複序列	1
1.2 <i>C9orf72</i> 相關疾病	2
1.3 <i>C9orf72</i> 致病假說	3
1.4 G ₄ C ₂ RNA：從結構多態性到相分離	4
1.5 單分子技術：螢光共振能量轉移	6
1.6 研究動機與目的	7
第二章 材料與方法	8
2.1 pT7SP6 系列質體的建立	8
2.2 RNA 的合成	12
2.3 RNA 的螢光與生物素標定	14
2.4 r(G ₄ C ₂) ₂ 複合物的製備	16
2.5 RNA 團簇的製備	17
2.6 單分子螢光共振能量轉移實驗	17



2.6.1 實驗玻片之製備.....	17
2.6.2 樣本固定與數據擷取.....	19
2.6.3 反義寡核苷酸實驗.....	20
第三章 結果	22
3.1 RNA 樣本製備	22
3.2 利用反義寡核苷酸探測 G ₄ C ₂ RNA 的結構穩定性	23
3.2.1 測定不同長度的反義寡核苷酸與 r(G ₄ C ₂) ₂ 的結合效率	24
3.2.2 測定鹽類對於 r(G ₄ C ₂) ₂ 結構穩定性的影響	25
3.2.3 測定重複次數對於 G ₄ C ₂ RNA 結構穩定性的影響	25
3.3 利用反義寡核苷酸探測 r(G ₄ C ₂) ₂ 複合物的結構穩定性	26
3.3.1 利用膠體電泳檢測 r(G ₄ C ₂) ₂ 複合物的組裝效率	26
3.3.2 利用螢光漂白實驗測定 r(G ₄ C ₂) ₂ 複合物的分子組成	28
3.3.3 測定鹽類對於 r(G ₄ C ₂) ₂ 複合物結構穩定性的影響	28
3.4 檢測 G ₄ C ₂ RNA 的分子間交互作用	29
3.4.1 在不同鹽類環境中測定 r(G ₄ C ₂) ₂₅ 的結構特性	29
3.4.2 由多個分子的 r(G ₄ C ₂) ₂₅ 組裝成 RNA 團簇.....	30
3.4.3 在團簇模擬環境中探測 r(G ₄ C ₂) ₂₅ 分子間的交互作用	30
第四章 討論	32
參考文獻	36

圖次

圖 1. pT7SP6-nX 系列質體序列與 G ₄ C ₂ RNA 樣本示意圖。	39
圖 2. 檢測 smFRET handle 與 G ₄ C ₂ RNA 的黏合效率。	42
圖 3. 以 EMSA 測定 G ₄ C ₂ RNA 的生物素標記效率。	44
圖 4. 利用反義寡核苷酸探測 G ₄ C ₂ RNA 結構的單分子 FRET 實驗示意圖。	45
圖 5. 在 10 mM MgCl ₂ 中，測定不同長度的寡核苷酸與 r(G ₄ C ₂) ₂ 的結合效率。 .	48
圖 6. 在 100 mM KCl 中，測定不同長度的寡核苷酸與 r(G ₄ C ₂) ₂ 的結合效率。 ...	51
圖 7. 在不同鹽類環境中，以 dC ₂ G ₂ C ₄ 測定 r(G ₄ C ₂) ₂ 的結構穩定性。	54
圖 8. 在 10 mM MgCl ₂ 中，以 dC ₂ G ₂ C ₄ 測定 r(G ₄ C ₂) ₂ 的結構穩定性。	57
圖 9. 在 100 mM KCl 中，以 dC ₂ G ₂ C ₄ 測定 r(G ₄ C ₂) _n 的結構穩定性。	60
圖 10. 利用膠體電泳檢測 r(G ₄ C ₂) ₂ 複合物的組裝效率。	63
圖 11. 利用反義寡核苷酸探測 r(G ₄ C ₂) ₂ 複合物結構穩定性之實驗示意圖。	65
圖 12. 在 100 mM KCl 中，以 dC ₂ G ₂ C ₄ 測定 r(G ₄ C ₂) ₂ 複合物的結構穩定性。	69
圖 13. 在 10 mM MgCl ₂ 中，以 dC ₂ G ₂ C ₄ 測定 r(G ₄ C ₂) ₂ 複合物的結構穩定性。 .	72
圖 14. 在不同鹽類中測定 r(G ₄ C ₂) ₂₅ 的構形特性。	73
圖 15. 在 10 mM MgCl ₂ 中，由多個分子的 r(G ₄ C ₂) ₂₅ 組裝成 RNA 團簇。	75
圖 16. 在 10 mM MgCl ₂ 中，於 RNA 簇模擬環境中檢測 r(G ₄ C ₂) ₂₅ 分子之間的交互作用。	77
圖 17. 在 10 mM MgCl ₂ 中，檢測 r(G ₄ C ₂) ₂₅ 分子之間的交互作用。	78



表次

表 1.引子設計序列。.....	79
表 2.在 10 mM MgCl ₂ 中，不同長度的寡核苷酸作用於 r(G ₄ C ₂) ₂ -2H 摺疊形態倖存比例。(參照圖 5)	80
表 3.在 100 mM KCl 中，不同長度的寡核苷酸作用於 r(G ₄ C ₂) ₂ -2H 摺疊形態倖存比例。(參照圖 6)	81
表 4.在不同鹽類中，以 dC ₂ G ₂ C ₄ 作用於 r(G ₄ C ₂) ₂ -2H 摺疊形態倖存比例。(參照圖 7)	82
表 5.在 10 mM MgCl ₂ 中，以 dC ₂ G ₂ C ₄ 作用於不同重複次數的 r(G ₄ C ₂) _n -2H 摺疊形態倖存比例。(參照圖 8)	83
表 6.在 100 mM KCl 中，以 dC ₂ G ₂ C ₄ 與不同重複次數的 r(G ₄ C ₂) _n -2H 摺疊形態倖存比例。(參照圖 9)	84



第一章 緒論

1.1 短串聯重複序列

短串聯重複序列（Short Tandem Repeats, STRs），也稱為「微衛星（Microsatellites）」，由1到6個核苷酸所構成的重複單元，在DNA中以連續重複的方式排列而成。在人類基因組中，含有超過一百萬個的STR位點，於整體序列的比例約為3%，其中STR大多數分布於非編碼區（Non-coding regions），而僅有約8%位在編碼區（Coding regions）(Ellegren, 2000; Lander et al., 2001)。

在DNA複製的過程中，雙螺旋會先被解開成兩條單股，而DNA聚合酶則會沿著模板股合成出一條新的互補股。然而，由於STR序列的高度重複特性，使其容易在單股DNA的狀態下形成穩定的二級結構，進而造成DNA聚合酶停滯或者解離。此外，在新生股重新與模板股配對時，可能發生滑動鏈錯誤配對（Slipped-strand mispairing）。在正常情況下，細胞內的DNA修復機制能有效地校正此類錯誤，但其功能受損或失效時，若單股環（Loop-out）形成於新生股上且未被移除的話，將會導致重複序列的擴增；反之，若其形成於模板股，則會引起重複序列的縮短。一旦這些錯誤被保留於基因組中，並且重複序列的次數超過特定疾病的致病閾值時，便可能導致疾病的發生。目前已證實STR的擴增與多種遺傳性神經系統疾病密切相關，其嚴重程度會與重複次數的多寡有關，此類疾病統稱為「重複擴增疾病（Repeat expansion diseases, REDs）」(Miller & Usdin, 2022; Rajan-Babu et al., 2024)。

在人類基因組中，不同序列區域的突變率存在明顯的差異。大多數的非重複序列（Unique sequence）能維持高度的遺傳穩定性，通常為單一鹼基替換的點突變（Point mutations），在每一代每個核苷酸的突變率僅約為 10^{-8} (Campbell & Eichler, 2013)。相較之下，STR的突變主要表現為重複單元數量的變化，其每個位點在每一代的突變率可達 10^{-5} 至 10^{-6} ，相當於非重複序列的百倍至千倍，因而成為基因組中的突變熱點 (Porubsky et al., 2025)。



STR 的高變異性主要受重複次數、基序的結構與該序列特性所影響，使 STR 具有高度的多態性，成為個體間獨特的遺傳識別標記。在 1997 年，聯邦調查局(FBI) 將 13 個 STR 基因位點納入至「美國國家 DNA 索引系統中 (U.S. Combined DNA Index System, CODIS)」，作為司法鑑識使用 (Butler, 2006)。此外，STR 在臨床疾病檢測、親子鑑定與族群基因組研究中也具有重要的應用價值。

1.2 *C9orf72* 相關疾病

肌萎縮側索硬化症 (Amyotrophic lateral sclerosis, ALS)，又稱為「漸凍人」，是一種由上、下運動神經元退化所致的疾病，造成患者肌肉漸進性萎縮，最終多因呼吸衰竭死亡。另外，額顳葉失智症 (Frontotemporal dementia, FTD) 則是因大腦額葉和顳葉退化所引起的早發性失智症，患者通常會表現出社交行為的改變與認知功能障礙。在臨病症狀及病理特徵的層面上，ALS 與 FTD 展現出高度的共通性，因而被視為一個連續性的疾病光譜。

在 2011 年，透過全基因組關聯分析 (Genome-wide association study, GWAS) 證實，在 *C9orf72* 基因（全名為「9 號染色體 72 號開放閱讀框」）第一個內含子中一段六核苷酸序列「GGGCC (G₄C₂)」的異常擴增，正是導致 ALS 和 FTD 的主要致病成因，這些疾病統稱為「C9-ALS/FTD」(DeJesus-Hernandez et al., 2011; Renton et al., 2011)。此外，該重複序列在世代傳遞過程中，隨著重複序列長度的增加，基因的穩定性也隨之降低，導致後代發病年齡提前且症狀加劇。在 *C9orf72* 基因中，健康群體的 G₄C₂ 重複次數通常少於 25 次，而對於 ALS 與 FTD 的患者則可能出現數百甚至上千次的重複擴增次數 (Rajan-Babu et al., 2024)。

C9orf72 基因所編碼的蛋白質主要參與在神經元中的囊泡運輸 (Vesicle trafficking) 與自噬作用 (Autophagy) 等重要細胞功能 (Farg et al., 2014)。然而，G₄C₂ 序列的異常擴增如何干擾上述功能並引發疾病，成為了神經科學領域的重要研究議題之一。



1.3 *C9orf72* 致病假說

目前推測 G₄C₂ 序列的異常擴增並非透過單一途徑發生，而是可能經由三種致病機制共同作用以誘發神經退化性病變，其機制涉及了「基因的功能喪失 (Loss-of-function, LOF)」與「毒性的功能獲得 (Gain-of-function, GOF)」(Schmitz et al., 2021)。

第一種機制為「*C9orf72* 的功能喪失」。在 *C9orf72* 基因上第一個內含子中所擴增的 G₄C₂ DNA 重複序列，導致其附近的 CpG 位點發生異常的超甲基化。另外，這段序列也可能自我摺疊成 G-四鏈體 (G-quadruplex, G4)、髮夾 (Hairpin) 等特殊結構，其可以共存於同一分子上，並促進 DNA–RNA 雜合體 (R-loop) 的生成。上述現象共同阻礙轉錄因子和 RNA 聚合酶II 的結合，最終造成 *C9orf72* mRNA 與蛋白質表現量下降。由於 *C9orf72* 蛋白在維持神經元自噬功能中扮演關鍵角色，其功能喪失將導致細胞廢物無法清除能力受損，進而引發蛋白質堆積與細胞壓力，從而促進神經退化的發生 (Shi et al., 2019)。

第二種機制為「RNA 毒性的功能獲得」。G₄C₂ DNA 擴增序列經由雙向轉錄，分別產生正股 (+) 的 G₄C₂RNA 與反股 (-) 的 G₂C₄RNA。這些 RNA 能摺疊成穩定的結構，並在細胞核內形成對神經元具毒性的 RNA 聚集物 (RNA foci)，進而招募並隔離多種的 RNA 結合蛋白 (RNA binding proteins, RBPs)，導致這些蛋白無法正常發揮其細胞功能。RNA foci 的存在，正是 C9-ALS/FTD 的關鍵共同病徵 (Lee et al., 2013)。

第三種機制則為「蛋白質的毒性功能獲得」。當 G₄C₂ RNA 與 G₂C₄ RNA 被運輸至細胞質後，透過「重複相關非 ATG 轉譯機制 (Repeat-associated non-ATG translation mechanism, RAN)」，即不依賴於 ATG 起始密碼子進行轉譯，產生五種不同的二肽重複蛋白 (Dipeptide repeat proteins, DRPs)。這些異常的蛋白質容易聚集，並且對神經元產生毒性作用，最終導致細胞死亡 (Balendra & Isaacs, 2018)。



1.4 G₄C₂ RNA：從結構多態性到相分離

G₄C₂ RNA 能形成多種結構

G₄C₂ RNA 因其富含鳥嘌呤 (Guanine-rich) 的序列特性，能夠採取不同的鍵結方式形成二級或更高階結構。在單鏈狀態下，它不僅能透過傳統的 Watson–Crick 鹼基配對摺疊成 Hairpin 結構，也能形成一種非典型的結構，稱為「G4」，由四個鳥嘌呤透過 Hoogsteen 氢鍵相互連接，形成一個帶負電荷的平面結構，稱為「G-四聯體 (G-quartet)」，並以垂直方向多層堆疊，其穩定性高度依賴於層間中央嵌入的單價陽離子，例如：鉀離子 (K⁺) 或鈉離子 (Na⁺)。

G4 結構展現出多樣性，主要可從組成鏈的「數量」與「方向」兩個面向加以區分。就組成鏈的數量而言，可分為由單鏈自我摺疊形成「分子內 (Intramolecular)」，或是由二至四條鏈相互作用組裝而成「分子間 (Intermolecular)」形態。在組成鏈的方向上，則可區分為由相同方向鏈所組成的「平行 (Parallel)」、由相反方向鏈所組成的「反平行 (Antiparallel)」，以及兩者共存的「混合型 (Hybrid)」拓撲結構。

值得注意的是，G4-RNA 與 G4-DNA 在穩定性與結構偏好方面存在明顯差異，主要源自於 RNA 核糖特有的 2'-羥基 (2'-OH)。該羥基不僅能透過額外的氫鍵作用提升 G4-RNA 的熱穩定性 (Zhang et al., 2010)，同時也限制了相鄰糖苷鍵之間的角度，使其較偏好採用 C3'-endo 的構形，進而促使 G4-RNA 傾向形成平行構形，並降低其結構的多態性 (Fay et al., 2017)。

影響 G₄C₂ RNA 結構形成的關鍵因素

在先前的研究中，透過生物物理學技術探討了 G₄C₂ RNA 的結構特性。在 100 mM KCl 的條件下，利用圓二色光譜 (Circular Dichroism, CD) 分析顯示 G₄C₂ RNA 呈現出典型的平行 G4 結構光譜特徵，即在 260 nm 處出現明顯的正向訊號且在 240 nm 處則為負向訊號，其中顯示出 G4 的形成與重複序列的長度具有依賴關係，隨著重複次數增加 (n = 6 和 n = 8)，G4 結構更傾向形成多分子形態 (Reddy et al.,



2013)。此外，利用 RNase T1 對 G₄C₂ RNA 中鳥嘌呤的 3'端磷酸基團進行水解，結果指出 r(G₄C₂)₄ 可透過單鏈摺疊形成分子內三層式平行 G4 拓撲結構 (Haeusler et al., 2014)。再者，光學熔點測定顯示，單一個 r(G₄C₂)₈ 可同時存在 Hairpin 和 G4 結構 (Su et al., 2014)。

然而，G₄C₂ RNA 在結構摺疊的偏好上受離子種類與序列特異性所影響。透過電泳遷移率分析 (EMSA) 實驗發現，在鈉離子 (Na⁺) 存在的條件下，雖然仍可促進多分子 G4 結構的形成，但其形成效率與穩定性普遍低於鉀離子環境。以 CD 分析結果顯示，於 100 mM LiCl 的溶液中，r(G₄C₂)₄ 無法形成 G4 結構，其光譜特徵轉變為 Hairpin 結構。特別的是，即使在最有利於 G4 結構形成的鉀離子環境下，反股 (-) 的 r(G₂C₄)₄ 仍主要傾向於 Hairpin 結構 (Reddy et al., 2013)。

在近期的晶體結構分析，揭示了 r(G₄C₂)₂ 透過階層式組裝過程，形成一種多分子的平行 G4 結構 (Geng et al., 2024)。結果顯示，於含有 70 mM KCl 與 20 mM potassium phosphate (pH 7) 的條件下，兩條 r(G₄C₂)₂ 鏈會先行組裝成一個較小的四層二聚體 G4。隨後，兩個此類二聚體 G4 會再經由 5' 端對 5' 端的堆疊方式相互結合，最終形成一個具有八層結構的平行 G4 構形。

G₄C₂ RNA 的相分離與結構基礎

當 G₄C₂ RNA 的重複次數達到特定閾值時，即使在沒有蛋白質存在的條件下，也能透過多價分子間鹼基配對，在體外自發地形成「液-液相分離 (Liquid-liquid phase separation, LLPS)」。隨著重複次數的增加，原本相對可溶的 G₄C₂ RNA 凝聚物因多重鹼基間相互作用力的增強，逐漸轉變為更穩定的類固態，此過程即為「液-固相轉換 (Liquid-to-Solid Transition, LST)」。此外，陽離子的價數在 G₄C₂ RNA 凝聚物的形成過程中扮演了關鍵的調控角色，二價陽離子 (Mg²⁺) 能有效地促進相分離的發生；相反地，單價陽離子 (例如：Na⁺ 或 NH₄⁺) 則會抑制該過程 (Jain & Vale, 2017)。

近期研究指出，在相同的重複次數條件下，與 G₄C₂ DNA 相比，G₄C₂ RNA 能



在較低的濃度下形成凝聚物。另外，透過「NMM 光氧化法 (NMM photo-oxidation)」，利用螢光染料特異性地結合於 G4 結構中的鳥嘌呤，隨後以高強度的雷射光照射破壞 G₄C₂ RNA 凝聚物中的 G4 結構，促使其迅速瓦解。該結果揭示 G₄C₂ RNA 相分離的關鍵機制，即其所形成的多分子 G4 結構 (Raguseo et al., 2023)。

然而，另一項研究針對 G₄C₂ RNA 神經毒性的致病機制提供了嶄新的見解。由 G₄C₂ RNA 長鏈組裝而成的多分子 G4 結構，其暴露的單股區域容易成為細胞內核糖核酸酶 (RNases) 的攻擊目標而被降解。此降解過程中會產生大量 G₄C₂ RNA 短鏈片段，該片段仍能摺疊成穩定的 G4 結構，並且更有效地促進相分離的發生，與 RBPs 共定位，進而導致細胞衰亡 (Wang & Xu, 2024)。

綜合這些發現，無論 G4 結構是以長鏈形式作為凝聚體的結構支架，還是以被降解後的短鏈形式充當觸發因子，都共同凸顯了其作為 C9-ALS/FTD 潛在治療標靶的重要性。

1.5 單分子技術：螢光共振能量轉移

在傳統上，核酸與蛋白質結構的研究多採用整體性 (Ensemble) 的生物物理學方法，像是：CD 光譜及膠體電泳等技術，這些方法能提供分子群體的平均資訊，卻無法區分個別分子的差異。單分子技術的出現克服了此一限制，使得研究者能夠直接觀測並追蹤單一分子的結構與動態變化。

在 1948 年，德國科學家 Theodor Förster 提出了結合量子力學與光學原理的螢光共振能量轉移 (Förster resonance energy transfer, FRET) 理論 (Förster, 1948)。該理論指出，當供體螢光團 (Donor) 受到特定能量激發並躍遷至激發態時，其能量可經由偶極-偶極間相互作用，以非輻射形式轉移給受體螢光團 (Acceptor)。受體螢光團在接收能量後，其會躍遷至激發態，隨後釋放螢光，返回基態。

然而，能量轉移的發生須滿足以下條件：首先，供體螢光團的發射光譜與受體螢光團的吸收光譜需有足夠的重疊。其次，兩者螢光團的偶極方向不能相互垂直。



而最核心的條件則在於供體和受體螢光團之間的距離，供體 - 受體間的能量轉移效率 E_{FRET} 與兩者螢光團之間的距離 r 的關係式（1）為：

$$E_{FRET} = \frac{1}{1 + (r / R_0)^6} \quad (1)$$

在此公式中， R_0 (Förster 半徑) 是指能量轉移效率為 50 % 時的兩螢光團之間距離。由於 E_{FRET} 對距離的變化極為敏感，因此，在生物分子上標記的螢光位點，其間距應控制在 1 – 10 nm 的有效偵測範圍內。當兩者距離較近時， E_{FRET} 值較高；反之，當兩者距離較遠時， E_{FRET} 值則降低 (Roy et al., 2008)。

此外，「單分子螢光共振能量轉移 (smFRET)」量測需遵循兩項要點：首先，為確保在觀測視野中僅存在單一目標分子，樣品濃度必須嚴格地控制在極低的莫耳濃度範圍內。其次，目標分子應保持較小的觀測體積，以有效降低背景雜訊。(Sasmal et al., 2016)。

smFRET 能夠將螢光分子間微小的距離變化轉換為可量化的光學訊號，因而成為解析核酸與蛋白質結構特性與動力學行為的重要工具。

1.6 研究動機與目的

ALS 與 FTD 為兩種漸進性且不可逆的神經退化性疾病，其主要的遺傳病因是 *C9orf72* 基因 G4C₂ 重複序列的異常擴增。於先前研究推論，這些重複序列轉錄生成的 G4C₂ RNA 會在細胞核內自發性聚集形成 RNA foci，並且藉由招募與隔離多種的 RBPs 而擾亂細胞恆定，進而引發神經毒性。然而，G4C₂ RNA 是如何透過其結構多態性驅動多價交互作用與相分離，其根本的分子作用機制仍不清楚。

本篇研究將運用單分子螢光共振能量轉移技術 (smFRET)，探討 G4C₂ RNA 的結構特性與分子間的交互作用。具體目標分為以下兩個部分：首先，探討 G4C₂ RNA 的分子內結構穩定性如何受到離子環境與重複次數的調控。其次，探討較長的 G4C₂ RNA 結構特性與其所形成 RNA 團簇的物理性質，並且進一步了解多價分子間相互作用的形成機制。



第二章 材料與方法

2.1 pT7SP6 系列質體的建立

製備載體

利用 EcoRI 和 BsrGI 限制酶切開 pT7SP6Vec，此質體為許鈺婕學姐所建構（許鈺婕, 2023）。使用 FastAP 去除 DNA 片段於 5'端的磷酸基團，防止線性化的載體自我連接（Self-ligation），根據下表配置反應，放置水浴槽於 37°C作用 4 小時。

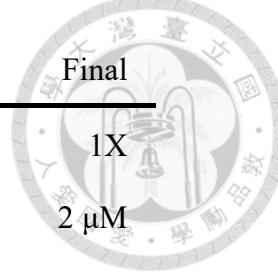
Reagent	Final
rCutSmart™ buffer	1X
pT7SP6Vec	0.03 ug/μl
EcoRI (NEB. #R3101)	0.4 U/μl
BsrGI (NEB, #R3575)	0.4 U/μl
FastAP (Thermo fisher, #EF0651)	0.02 U/μl
Total volume	100 μl

完成限制酶反應後，經由 QIAquick PCR & Gel Cleanup Kit (QIAGEN,#28506) 純化雙股DNA片段，即可得到載體。

製備目標基因

建立 pT7SP6-2X 的目標基因：

利用 T4 Polynucleotide Kinase (NEB, #M0201S) 對兩段寡核苷酸的 5'端進行磷酸化處理。根據下表所示配方配置反應，在 37°C作用 30 分鐘，接續，將反應液加熱至 80°C，保持 5 分鐘以使 T4 PNK 失去活性後，緩慢降溫至室溫，以促進雙股DNA的黏合反應完成。



Reagent	Final
T4 DNA Ligase Reaction Buffer	1X
T7SP6-2X-F	2 μM
T7SP6-2X-R	2 μM
T4 PNK	0.2 U/μl
Total volume	100 μl

建立 pT7SP6-25X (TA/A) 的目標基因：

利用聚合酶連鎖反應 (Polymerase chain reaction, PCR) 合成目標基因 EcoRI-G₄C₂-BsrGI，長度為 193 bp。以 BsrGI-C₄G₂-EcoRI 作為 DNA 模板，並採用 25R-EcoRI-F 作為引子。

由於多次熱循環可能導致 G₄C₂ 重複序列的縮短，所以本反應僅設定單一循環。根據下表所示配方進行反應，其 PCR 程序如下：以 98°C 使熱循環儀預熱 1 分鐘，接著進行 1 個循環：於 98°C 進行 30 秒 DNA 變性反應，於 55°C 進行 2 分鐘引子黏合反應，於 72°C 進行 5 分鐘引子延長反應，最後於 72°C 作用 2 分鐘，以確保合成反應作用完全。

Reagent	Final
Q5 Reaction Buffer	1X
dNTPs	200 μM
25R-EcoRI-F	0.5 μM
BsrGI-(C ₄ G ₂) ₂₅ -EcoRI	0.3 μM
Q5 High GC Enhancer	1X
Q5 High-Fidelity DNA Polymerase	0.02 U/μl
Total volume	50 μl



完成 PCR 反應後，經由 QIAquick PCR & Gel Cleanup Kit 進行純化，隨後，利用 EcoRI 和 BsrGI 對 EcoRI-G₄C₂-BsrGI 片段進行限制酶處理。根據下表所示配方配置反應，放置水浴槽於 37°C 作用 4 小時。

Reagent	Final
rCutSmart™ buffer	1X
EcoRI-G ₄ C ₂ -BsrGI fragment	0.03 ug/μl
EcoRI	0.4 U/μl
BsrGI	0.4 U/μl
Total volume	100 μl

完成限制酶反應後，經由 QIAquick PCR & Gel Cleanup Kit 純化，即可得到目標基因片段。

DNA 接合反應

將所製備的載體與目標基因以適當比例混合，並加入 2X ligation mix，根據下表配置反應，置於熱循環儀中於 25 °C 反應 5 分鐘。同時，設計一組負向控制組，不添加目標基因，其餘條件與實驗組相同，以確認載體是否會自行重新接合。

質體的轉型

pT7SP6-2X 的質體轉型：

將 XL-10 勝任細胞 (Stratagene, #200315) 於冰上解凍，待完全融化後輕輕地混勻。取出 100 μl 的勝任細胞至 1.5ml 微量離心管中，加入 2 μl 的 Ligation product，並在冰上靜置 5 分鐘。隨後，取 5 μl 轉化後的細胞至 45 μl 的 S.O.C 培養基 (Thermo Fisher, #15544034) 中，並將其混合均勻。將轉型細胞培養液塗佈於含 100 μg/ml Ampicillin 的 LB-agar plate 上，置於 37°C 培養箱 16 小時，待單一菌落形成後進行挑選。



pT7SP6-25X (TA/A) 的質體轉型：

將 NEB Stable 勝任細胞 (NEB, #C3040) 於冰上解凍至完全融化後輕輕混勻。取出 100 μ l 的勝任細胞至 1.5ml 微量離心管中，加入 1.5 μ l 的 Ligation product，在冰上靜置 25 分鐘。隨後，將混合物置於 42°C 乾浴槽進行熱休克 (Heat shock) 作用 1 分鐘。接著，在冰上靜置 2 分鐘。取 50 μ l 轉化後細胞至 950 μ l 不含抗生素的 TB 培養液，放置於 30°C 下恢復培養 1 小時，以 220 rpm 震盪培養。取 50~100 μ l 的轉型細胞培養液均勻地塗佈於 LB-agar plate 上，置於 30°C 培養箱 24 小時後，即可挑選出單一菌落。

質體的萃取與定序

挑選單一菌落至含有 100 μ g/ml Ampicillin 的 TB 培養液中，於 37°C、220 rpm 條件下震盪培養 16 小時。取 3 ml 隔夜細胞培養液至微量離心管中，於室溫以 14,000 至 16,000 $\times g$ 離心 1 分鐘，以獲得沉澱菌體 (Cell pellet)，並去除上清液。隨後，依據 PrestoTM Mini Plasmid Kit (Geneaid, #PD100) 操作流程進行質體萃取。以超微量分光光度計檢測質體的濃度和純度，利用超微量分光光度計測定質體濃度與純度，並取適量質體樣本進行定序，以確認重組質體構建之成功。

質體存放位置：

名稱	存放位置	用途
pT7SP6-25X (TA/A)	Bank(6), B2	smFRET
pT7SP6-2X	Bank(6), D4	smFRET

菌株存放位置：

名稱	存放位置	Host cell
pT7SP6-25X (TA/A)	Box7 (cloning), H2, I6, I7	NEB Stable
pT7SP6-2X	Box8(cloning),B1	XL-10



2.2 RNA 的合成

首先，根據實驗需求，選擇性地採用 BsrGI 或 BamHI 對 pT7SP6 系列質體（以下稱為 pT7SP6-nX）進行限制酶作用。註：pT7SP6-3X 為楊世綸學長所建構，而 pT7SP6-4X 與 pT7SP6-5X 則為王渝暄學姊所建構（王渝暄, 2024）。

依據下表所示之反應條件，將反應混合液置於 37°C 水浴中孵育 4 小時。限制酶反應結束後，利用由 QIAquick PCR & Gel Cleanup Kit 純化，即可得到線性化質體。

Reagent	Final
rCutSmart™ buffer	1X
pT7SP6-nX (n = 2, 3, 4, 5, 25)	0.03 ug/μl
EcoRI or BsrGI	0.4 U/μl
Total volume	100 μl

► r(G₄C₂)_n with ssDNA handle sequences

利用 HiScribe T7 Quick High Yield RNA Synthesis Kit (NEB, # E2050) 合成具有 DNA 手柄序列的 G₄C₂ RNA。以 BamHI 處理的 pT7SP6-nX 作為 DNA 模板，根據下表配置反應，於 37°C 條件下反應 4 至 16 小時。

Reagent	Final
NTP Buffer Mix	10 mM
pT7SP6-nX cleaved by BamHI	1 ug
DTT	5 mM
T7 RNA polymerase mix	5 U/μl
Total volume	20 μl

完成體外轉錄反應後，加入 30 μ l 的 ddH₂O 與 2 μ l 的 DNase I (NEB, #M0303)，於 37°C 孵育 15 分鐘以去除 DNA 模板。隨後，藉由柱層析 (Column Purification) 與膠體純化 (Gel Purification) 進行樣品純化，即可得到目標 RNA。

► r(G₄C₂)_n without ssDNA handle sequences

利用 HiScribe SP6 RNA Synthesis Kit (NEB, # E2070) 合成不具有 DNA 手柄序列的 G₄C₂ RNA。以 BsrGI 處理的 pT7SP6-nX 作為 DNA 模板，根據下表配置反應，並於 37°C 條件下反應 4 至 16 小時。

Reagent	Final
SP6 Reaction Buffer	1X
ATP	5 mM
GTP	5 mM
CTP	5 mM
UTP	5 mM
pT7SP6-nX cleaved by BsrGI	1 ug
SP6 RNA polymerase mix	2 U/ μ l
Total volume	25 μ l

完成體外轉錄反應後，加入 25 μ l 的 ddH₂O 與 2 μ l 的 DNase I，於 37°C 作用 15 分鐘以去除 DNA 模板股。隨後，經由 MEGAclear™ Transcription Clean-Up Kit 進行純化，即可得到目標 RNA。



2.3 RNA 的螢光與生物素標定

► r(G₄C₂)_n-2H

將含有 DNA 手柄序列的 G₄C₂ RNA 與兩條單股 DNA 手柄進行黏合，以標記螢光及生物素分子(Cy3-, Cy5-, Bio-)，命名為「r(G₄C₂)_n-2H」。

依據下列表所示之反應配置，在 20 mM Tris-HCl (pH 8.0) 和 200 mM NH₄Cl 的條件下，於 70°C 進行 1 分鐘 RNA 變性反應，隨後立即靜置於冰上 5 分鐘，接著於 45°C 反應 10 分鐘，以確保引子完全結合。

Reagent	Final
r(G ₄ C ₂) _n with ssDNA handle sequences	1 μM
5'h-T7SP6-5'Cy3	1 μM
pGAA_3'handle_Cy5_biotin	0.5 μM

► r(G₄C₂)_n-2H_w/o bio

將含有 DNA 手柄序列的 G₄C₂ RNA 與兩條單股 DNA 手柄進行黏合，以標記螢光分子(Cy3-, Cy5-)，命名為「r(G₄C₂)_n-2H_w/o bio」。

在 20 mM Tris-HCl (pH 8.0) 和 200 mM NH₄Cl 的條件下，於 70°C 進行 1 分鐘 RNA 變性反應，隨後立即靜置於冰上 5 分鐘，接著於 45°C 反應 10 分鐘，以確保引子完全結合。

Reagent	Final
r(G ₄ C ₂) _n with ssDNA handle sequences	1 μM
5'h-T7SP6-5'Cy3	1 μM
pGAA_3'handle_Cy5	1 μM



► Bio-r(G₄C₂)_n-NH

以 BsrGI 處理的 pT7SP6-nX 作為 DNA 模板，採用 HiScribe SP6 RNA Synthesis Kit 進行體外轉錄，於合成過程中即時嵌入 Biotin-UTP (Lumiprobe, # 2716)，藉此製備出含有生物素標記且不具單股 DNA 手柄序列的 G₄C₂ RNA，命名為「Bio-r(G₄C₂)_n-NH」。

根據下表配置反應，於 37°C 作用 4~16 小時。

Reagent	Final
SP6 Reaction Buffer	1X
ATP	5 mM
GTP	5 mM
CTP	5 mM
UTP	4 mM
Modified UTP	1 mM
pT7SP6-nX cleaved by BsrGI	1 ug
SP6 RNA polymerase mix	2 U/ μ l
Total volume	25 μ l

完成體外轉錄反應後，加入 25 μ l 的 ddH₂O 與 2 μ l 的 DNase I，於 37°C 作用 15 分鐘以去除 DNA 模板股。隨後，藉由管柱層析法對樣品進行純化，即可得到目標 RNA。



2.4 r(G₄C₂)₂ 複合物的製備

製備 d2U-3'h

首先，為建構 r2U-3'h 的 DNA 模板（即「d2U-3'h」），將兩段不同長度的寡核苷酸進行 DNA 黏合，分別為含有 T7 啟動子序列的 T7 引子，以及 d(G₂C₄)₂-T7 引子。在 20 mM Tris-HCl (pH 8.0) 和 200 mM NH₄Cl 的條件下進行反應，於 80 °C 加熱 5 分鐘進行變性，接著以每分鐘 1 °C 的速率緩慢降溫至 20 °C，並於該溫度終止 DNA 黏合反應。

製備 r2U-3'h 與 r2U-3'Cy5

接續，採用 T7 RNA 聚合酶進行體外轉錄，合成帶有可結合單股 DNA 融光標記手柄的 r(G₄C₂)₂ 序列，命名為「r2U-3'h」，其長度為 35 nt。透過管柱及膠體純化程序，以提升 RNA 樣品的純度。

另外，設計一段 3' 端含有 Cy5 修飾的 r(G₄C₂)₂ 序列，命名為「r2U-3'Cy5」，其完整序列为 5'-GGGGCCGGGGCCU (Cy5) -3'，並經由基龍米克斯廠商合成與純化。

r(G₄C₂)₂ 複合物的組裝

最後，參考前人文獻所述之製備方法(Geng et al., 2024)，於不同離子條件下，將過量的 r2U-3'Cy5 與少量的 r2U-3'h 及 Bio-3'h-Cy3 進行黏合，組裝成 r(G₄C₂)₂ 複合物，其簡稱為「r2 complex」。同時，為確認 r2 complex 的組裝情形，設計多項對照組，其中將 r2U-3'h 與 Bio-3'h-Cy3 黏合產物稱為「r2U-3'Cy3bio」。該反應於 90 °C 下進行 3 分鐘變性處理，隨後以每分鐘降低 1 °C 的速率冷卻至 25 °C，並於隔日收取樣品。

後續，使用 10% Native PAGE Gel 進行電泳分離，並利用 UV-PAGE 影像分析系統偵測膠體中的螢光訊號。隨後，運用 ImageJ 軟體對膠體中 Cy3 融光訊號進行定量分析，以評估 r2 complex 的組裝效率。



2.5 RNA 團簇的製備

參考前人文獻所述之製備方法 (Jain & Vale, 2017)，將多種的 r(G₄C₂)₂₅ 序列與標記螢光分子 (Cy3、Cy5) 及生物素 (Bio) 的單股 DNA 手柄進行黏合反應，以組裝形成 RNA 團簇。

根據下表所示配方，在 20 mM Tris-HCl (pH 8.0) 和 10 mM MgCl₂ 的條件之下，於 70°C 進行 1 分鐘 RNA 變性反應，隨後以每分鐘降低 1°C 的速率冷卻至 37°C，並於該溫度停止 RNA 黏合反應。

Reagent	Final
r(G ₄ C ₂) ₂₅ with ssDNA handle sequences	0.2 μM
r(G ₄ C ₂) ₂₅ without ssDNA handle sequences	2 μM
5'h-T7SP6-5'Cy3	0.2 μM
pGAA_3'handle_Cy5_biotin	0.1 μM

2.6 單分子螢光共振能量轉移實驗

2.6.1 實驗玻片之製備

1. 容器清潔

將 1 M KOH (Honeywell, #30603) 倒入用於放置玻片的玻璃染色壺中 (Glass jar)。另外，將 MeOH (Macron, #3016-68) 加入至玻璃錐形瓶。兩者以超音波震盪清洗 20 分鐘，隨後以 ddH₂O 潤洗玻璃染色壺，裝有甲醇的玻璃錐形瓶則置於 4°C 冷藏保存，待隔日使用。

2. 玻片清潔與鑽孔

利用鑽石刀於載玻片 (尺寸為 26 * 76 * 1 mm) 上鑽取八個小孔，作為樣品注入口。隨後，將鑽孔後的載玻片及未鑽孔的蓋玻片分別以丙酮 (Sigma, #32201) 清



洗，以去除玻片表面髒汙。將玻片置於已清潔之玻璃染色壺中，加入甲醇，並以超音波震盪清洗 10 分鐘。接著以 ddH₂O 潤洗，隨後再以丙酮進行 20 分鐘的超音波震盪清洗。完成上述程序後，將玻片置於 4°C 保存，待隔日使用。

3. 以聚乙二醇修飾玻片 (PEGylated slides)

適用於 10 組玻片：

01. 當日，將盛放玻片的玻璃染色壺更換為新鮮的丙酮，並進行超音波震盪清洗 20 分鐘，隨後以 ddH₂O 潤洗，接著再以 ddH₂O 進行 20 分鐘的超音波震盪清洗。
02. 以 1 M KOH 進行超音波震盪清洗，持續 25 分鐘。隨後，立即去除該溶液，並以 ddH₂O 進行五次潤洗。
03. 從玻璃染色壺中取出玻片，將每個玻片直接以 ddH₂O 沖洗雙面，隨後以氮氣吹乾。
04. 將玻片置於高溫火焰中，雙面均勻加熱燒烤十次，待其冷卻後，置於玻璃染色壺中保存。
05. 於前日清洗的玻璃錐形瓶中，加入 300 ml 的甲醇、15 ml 的 HOAc (Sigma, #33209) 和 3 ml 的 Aminosilane (Sigma, #104884)，充分混合均勻後，將混合液倒入盛有玻片之玻璃染色壺中。
06. 置於暗處靜置 10 分鐘，隨後進行 1 分鐘的超音波震盪，然後再次於暗處靜置 10 分鐘。
07. 使用甲醇進行三次潤洗，隨後以 ddH₂O 潤洗五次，接著將每片玻片雙面以 ddH₂O 沖洗，最後以氮氣吹乾。
08. 將 800 μl 的 100 mM H₃BO₃-KOH, pH 8.4 (H₃BO₃ : MDBio, #116089) 加入 200 mg mPEG (Laysan Bio, #mPEG-SVA-5000-5g) 及 4 mg Biotin-PEG (Laysan Bio, #Bioyin-PEG-SVA-5000-100mg)，充分震盪混合至粉末完全溶解，隨後於室溫下以 10,000 xg 離心 30 秒。



09. 將 75 μl PEG 上清液置於載玻片中央區域，隨後覆蓋蓋玻片，過程中須避免氣泡產生，並於暗室中靜置反應三小時。
10. 反應結束後，將每片玻片以 ddH₂O 雙面徹底沖洗至潔淨，其表面會具疏水性，隨後以氮氣吹乾至完全乾燥。
11. 蓋玻片及載玻片各一片為一組，存放於 50 mL 避光離心管，隨後以氮氣充填該離心管，經真空包裝後，置於 -80°C 保存。

2.6.2 樣本固定與數據擷取

本研究採用物鏡型全內反射螢光顯微鏡（Total Internal Reflection Fluorescence, TIRF）進行單分子 FRET 訊號的偵測。當雷射光以大於臨界角的角度穿過兩種不同折射率的介質（如：玻片與樣本溶液）時，會產生全內反射。待測分子所發出的螢光訊號，會經由二向色鏡分離供體與受體訊號，隨後兩者經反射鏡引導後，同時聚焦於 EMCCD 相機的兩個獨立區域（綠光與紅光通道）。

此外，為了盡可能降低光漂白效應(Photobleaching)，所有實驗皆由 PCA / PCD 所建立的氧氣清除系統 (Oxygen-Scavenging System, OSS) 下進行 (Aitken et al., 2008)。

以下為實驗步驟：

01. 經 Biotin-PEG 及 PEG 修飾處理之玻片，於 37°C 下解凍至少 30 分鐘，，並利用雙面膠將玻片分隔成四個獨立的 chamber。
02. 使用 200 μl 1X TEB 緩衝液 (20 mM Tris-HCl, pH 8.0 以及 3.6 mM β -巯基乙醇) 對 chamber 進行兩次滲漏測試。
03. 將 70 μl 的 NeutrAvidin (0.2 mg/mL) 注入 chamber，並於暗處靜置五分鐘，以促使 NeutrAvidin 與玻片表面之 Biotin 分子充分結合。
04. 使用 200 μl 的 1X TEB 緩衝液對 chamber 進行兩次沖洗，以去除未與 Biotin 結合的 NeutrAvidin。



05. 將 70 μl 的待測分子注入至 chamber，使分子上的 Biotin 與 NeutrAvidin 發生結合，從而將分子固定於玻片表面。
06. 使用 200 μl 的 1X TEB 緩衝液對 chamber 進行兩次沖洗，以去除未與 NeutrAvidin 結合的待測分子。
07. 將 70 μl 的 OSS imaging buffer 注入 chamber 中，並於暗處靜置五分鐘，即可進行影像錄製。

若於上機錄製後發現分子數量不足，可重複加入適當濃度的待測分子（步驟 5 至步驟 7），直至影像中分子密度達到預期標準。

透過 IDL 所編寫的軟體將實驗錄製影像的綠光與紅光通道進行校準，在扣除背景訊號後，以 7×7 pixels 區域搜尋螢光強度最高的區域，並以亮點的中心處自動標定影像中分子的位置，進而提取螢光強度軌跡。接續，使用 MATLAB 所編寫的軟體進行篩選有效的數據（張凱鈞, 2018）。

2.6.3 反義寡核苷酸實驗

將經螢光與生物素標記的 $r(\text{G}_4\text{C}_2)_n\text{-}2\text{H}$ ，透過 NeutrAvidin-Biotin 作用固定於已鈍化處理的玻片表面（參照章節 2.6.2），此為 RNA 初始摺疊狀態樣本，即「 $r(\text{G}_4\text{C}_2)_n\text{-}2\text{H only}$ 」。接著，分別將 100 nM 與 1 μM 的反義寡核苷酸（Antisense Oligonucleotide, ASO）與固定的 RNA 作用 3 分鐘後進行影像錄製。最後，為了測試 ASO 與 RNA 結合的穩定性，在觀測完結合反應後，使用相同的鹽離子緩衝液對 chamber 進行洗滌，以去除游離與弱結合的 ASO，並持續觀測 FRET 訊號的後續變化。

雷射條件設定為持續以 532 nm 綠光激發 Cy3 螢光分子，並同步偵測 Cy3 與 Cy5 的螢光強度。在每個螢光軌跡的最後一秒，開啟 638 nm 紅光直接激發 Cy5，以確認其訊號的穩定性與存在。



為了量化 G₄C₂RNA 結構的展開程度，於不同實驗條件下計算其摺疊構形的倖存比例，可表示為公式（2）：

$$\text{Survival Probability (Folded)} = \frac{\text{Folded \% with ASO}}{\text{Folded \% in RNA only}} \quad (2)$$

此外，為評估 ASO-RNA 鍵結的穩定性，將鹽離子緩衝液洗滌前後 G₄C₂RNA 摺疊構型的倖存比例加以計算，如公式（3）所示：

$$\text{RNA Folding Recovery} = \frac{\text{Folded \% after wash}}{\text{Folded \% with } 1 \mu\text{M ASO}} \quad (3)$$



第三章 結果

3.1 RNA 樣本製備

以 pT7SP6-nX 系列質體（圖 1）作為 DNA 模板，其中 n 表示為重複次數。依據實驗設計，參考章節 2.3 所述之流程，針對 G₄C₂RNA 進行螢光與生物素的標定。

r(G₄C₂)_n-2H

首先，在非變性電泳分析中，我們觀察到重複次數為 2 至 5 (n = 2 - 5) 的 r(G₄C₂)_n 皆呈現至少兩種主要條帶，且此現象不受熱處理與慢速降溫處理的影響，我們推測這些條帶分別為單體(Monomer)、二聚體(Dimer)或者更高階的結構(圖 2A, lane 2-3, 5-6, 8-9, 11-12)。相較之下，當 r(G₄C₂)_n 與兩段帶有螢光／生物素標記的單股 DNA 手柄進行黏合時，顯示整體條帶的凝膠遷移率降低(條帶往上位移)，其中一個條帶上同時帶有 Cy3 與 Cy5 訊號，顯示為單一的構形，說明透過慢速降溫方式能成功標定短鏈 G₄C₂RNA (圖 2A, lane 4, 7, 10, 13，以黃色箭頭標示)。

然而，當 G₄C₂RNA 重複次數增加至 25 (n = 25) 時，其結構變得更為複雜，r(G₄C₂)₂₅ 呈現至少三種主要條帶，且經由熱處理與不同速率降溫處理後能改變其構形分布。值得注意的是，相較於短鏈 G₄C₂RNA，r(G₄C₂)₂₅ 會明顯滯留在樣品槽(well)中，這表明其可能形成了尺寸過大的高階聚集體而未能進入膠體進行分離(圖 2B, lane 1, 2, 4)。當 r(G₄C₂)₂₅ 與兩段帶有螢光／生物素標記的單股 DNA 手柄進行黏合後，可見更複雜的結構條帶，而非像 G₄C₂RNA 那樣形成單一構形，儘管反應產物不均一，但成功製備 r(G₄C₂)₂₅-2H，在此現象不受慢速或快速降溫的影響(圖 2B, lane 3 和 5，以黃色箭頭標示)。

r(G₄C₂)₂₅-2H_w/o bio

經由 r(G₄C₂)₂₅-2H 的結果，得知降溫速率對最終產物分布影響不大，為求實驗高效，本實驗採用快速降溫法進行製備。首先，作為對照組，未黏合手柄的 r(G₄C₂)₂₅ 在電泳後呈現出與先前一致的多重條帶(圖 2B, lane 1 和 4；圖 2C, lane 2 和 3)。



而 r(G₄C₂)₂₅ 與兩段帶有螢光標記的單股 DNA 手柄進行黏合後，同樣產生更多的結構，經由 UVP 偵測呈現僅有一個條帶上同時帶有 Cy3 與 Cy5 訊號，顯示為單一的構形（圖 2B, lane 3 和 5；圖 2C, lane 4，以黃色箭頭標示）。

Bio-r(G₄C₂)₂₅-NH

電泳遷移率變動分析 (EMSA) 的結果顯示，相較於對照組（圖 3, lane 2 和 3），當 Bio-r(G₄C₂)₂₅-NH 與 NeutrAvidin (NA) 反應後，其在膠體中的遷移率降低了，出現了明顯的條帶位移 (shift) 現象，此結果證明了 Bio-r(G₄C₂)₂₅-NH 與 RNA 之間發生了特異性結合，也說明了 Biotin-UTP 已在 Sp6 聚合酶的體外轉錄過程中成功嵌入 RNA 鏈，代表我們成功製備出 Bio-r(G₄C₂)₂₅-NH（圖 3, lane 4，以藍色箭頭標示）。

3.2 利用反義寡核苷酸探測 G₄C₂ RNA 的結構穩定性

根據先前文獻所述，G₄C₂ RNA 能夠摺疊成複雜的二級與三級結構，例如：髮夾 (hairpin)、假結 (pseudoknot) 或者 G-四股螺旋 (G-quadruplex) 等構形。在這些結構中，有些區域的核苷酸會暴露在外，而有些則會被包埋在結構內部。

為了解析 G₄C₂ RNA 的結構特性及其穩定性，我們建立一套基於單分子 FRET 的結構探測方法（圖 4）。該方法的核心是，利用一段短鏈且自身不易形成二級結構的反義寡核苷酸 (ASO) 作為結構探針。依據 Watson-Crick 鹼基配對原理，此 ASO 探針能特異性地結合至 G₄C₂ RNA 上結構較鬆散或動態暴露的單股區域。

我們的核心假說是，ASO 的結合將會競爭並破壞 G₄C₂ RNA 原有的分子內結構，促使展開 G₄C₂ RNA 結構。此結構變化可透過預先標記在 G₄C₂ 區域兩端的 FRET 螢光對進行即時監測：結構的展開將拉開螢光對之間的距離，進而導致 FRET 效率 (E_{FRET}) 降低。因此，ASO 的結合事件及其引發的 E_{FRET} 訊號變化，成為評估 G₄C₂ RNA 結構穩定性的重要指標。



3.2.1 測定不同長度的反義寡核苷酸與 r(G₄C₂)₂ 的結合效率

為了篩選出合適的結構探針，我們首先以 r(G₄C₂)₂ 作為一個簡化的模型系統，由於其序列較短，不易形成過於穩固或複雜的結構（經 UNAfold 軟體預測為單一髮夾結構），因此，該模型系統是篩選 ASO 結合效率的有效工具。

在 10 mM MgCl₂ 和 100 mM KCl 的兩種鹽類條件下，測試四種不同的 ASO (d(G₂C₄)₂、dC₄G₂C₄、dC₂G₂C₄ 與 dG₂C₄) 對 r(G₄C₂)₂ 的結構影響，以找到最適合的探針，用於後續更長重複序列的結構穩定性研究（圖 5A, 圖 6A）。

在兩種鹽類條件下，所有測試的 ASO 皆能與 r(G₄C₂)₂ 結合並展開其結構。當如圖 5B 和圖 6B 所示，r(G₄C₂)₂ 單獨存在時，可見為單個且較為集中的波峰 ($E_{FRET} \approx 0.94 - 0.95$)，顯示 G₄C₂ 區域兩側所黏合的單股 DNA 螢光分子彼此非常靠近，說明 r(G₄C₂)₂ 處於緊密的摺疊狀態。當加入 ASO 後，原先 High FRET population 比例隨著 ASO 濃度增加而降低，並在 $E_{FRET} \approx 0.6 - 0.7$ 附近出現一個分布較廣的波峰，顯示 ASO 的結合能有效打開 r(G₄C₂)₂ 的結構，而較廣的分布則可能反映了多種不同的結合模式。

若將每個實驗程序下 r(G₄C₂)₂ 的摺疊狀態比例計算成倖存率，以量化不同 ASO 的結合效率（圖 5C, 圖 6C）。結果顯示，相較於 100 mM KCl，在 10 mM MgCl₂ 的鹽類條件下較容易展開 r(G₄C₂)₂ 的結構，並且共同顯示出 d(G₂C₄)₂ 與 r(G₄C₂)₂ 結合效果最差。經 UNAfold 軟體結構預測顯示 d(G₂C₄)₂ 本身易於形成穩定的髮夾結構，這很可能阻礙了它與目標 RNA 的有效結合。

為了評估 ASO 與 RNA 的結合穩定性，我們進行了緩衝液洗滌實驗（圖 5D, 圖 6D）。在洗去游離或弱結合的 ASO 後，dG₂C₄ 的組別 FRET 訊號最為明顯的回升，表明 dG₂C₄ 與 r(G₄C₂)₂ 的結合最不穩定，這可能歸因於其長度最短，而能形成的鹼基配對數目有限。

綜合以上對結合效率與穩定性的評估，以 dC₂G₂C₄ 最為合適作結構探針。



$d(G_2C_4)_2$ 因自身結構而效率不佳， $dC_4G_2C_4$ 雖有效但長度較長，而 dG_2C_4 則不夠穩定。 $dC_2G_2C_4$ 是同時具有長度相對較短且能有效與 $r(G_4C_2)_2$ 結合的特性，適合作後續的結構研究。

3.2.2 測定鹽類對於 $r(G_4C_2)_2$ 結構穩定性的影響

先前文獻表明，不同鹽類條件會影響 G_4C_2 RNA 的多態性結構。我們同樣以 $r(G_4C_2)_2$ 作為模型，利用前一章節篩選出的探針 $dC_2G_2C_4$ 測定了四種不同鹽類條件 ($10\text{ mM MgCl}_2, 100\text{ mM KCl}, 100\text{ mM NH}_4\text{Cl}, 100\text{ mM NaCl}$, 皆為 pH 8) 對 $r(G_4C_2)_2$ 結構穩定性的影響 (圖 7A)。

在所有測試的鹽類條件下，如圖 7B 所示，當 $r(G_4C_2)_2$ 單獨存在時，可見為單個較為集中的波峰 ($E_{FRET} \approx 0.94 - 0.95$)，表明其處於摺疊狀態。而加入 $dC_2G_2C_4$ 與其結合後，所有條件下會在 $E_{FRET} \approx 0.6 - 0.7$ 附近出現一個分布較廣的波峰。

透過倖存比例的量化分析 (圖 7C)，結果顯示 $r(G_4C_2)_2$ 的結構穩定度會依序遞減： $100\text{ mM NaCl}, 100\text{ mM KCl}, 100\text{ mM NH}_4\text{Cl} >> 10\text{ mM MgCl}_2$ 。

最後，為了進一步探究鹽離子是否也影響 $dC_2G_2C_4$ 與 RNA 的結合穩定性，我們進行了緩衝液洗滌實驗 (圖 7D)。結果顯示，在緩衝液洗滌後，四種鹽類條件下的 FRET 訊號並無顯著差異，表明一旦 $dC_2G_2C_4$ 與 $r(G_4C_2)_2$ 成功結合，其形成的 DNA-RNA 複合物具有相似的穩定度，不易受離子種類所影響。

3.2.3 測定重複次數對於 G_4C_2 RNA 結構穩定性的影響

為了探討重複次數 (n) 對 G_4C_2 RNA 結構穩定性的影響，利用 $dC_2G_2C_4$ 作為探針，分別在 10 mM MgCl_2 和 100 mM KCl 的鹽類條件下測定 $r(G_4C_2)_n$ ($n = 2 - 5$) 的結構變化 (圖 8A, 圖 9A)。在上述的鹽類條件下，如圖 8B 和圖 9B 所示， G_4C_2 RNA 單獨存在時，為單個狹窄明顯的波峰 ($E_{FRET} \approx 0.96 - 0.97$)。

在 10 mM MgCl_2 條件下， G_4C_2 RNA 的結構穩定性並未如預期般隨重複次數增加而提升。結果顯示， $dC_2G_2C_4$ 能有效展開所有長度的 RNA。隨著重複次數增



加，RNA 被展開後的 FRET 值會隨之降低，且當 $n \geq 4$ 時，出現多個波峰，暗示著更複雜的結合模式或展開構象（圖 8B）。倖存比例分析更直接地證實，RNA 的穩定性與重複次數 (n) 之間沒有明顯的正相關性（圖 8C）。另外，結合穩定性測試表明， $dC_2G_2C_4$ 與 $r(G_4C_2)_5$ 的結合最不穩定（圖 8D）。

相較之下，在 100 mM KCl 條件下， G_4C_2 RNA 的結構穩定性則呈現出預期中的趨勢。隨著重複次數增加，RNA 變得越來越難被 $dC_2G_2C_4$ 展開。對於 $r(G_4C_2)_4$ ，其結構展開幅度降低且主要波峰 E_{FRET} 顯示在 0.92~0.94，與初始摺疊狀態的 E_{FRET} Peak 落在 0.98 相近；而 $r(G_4C_2)_5$ 則幾乎完全無法被 $dC_2G_2C_4$ 展開，僅略微降低摺疊狀態的族群比例，始終維持在 $E_{FRET} \approx 0.97$ 的高點（圖 9B）。倖存比例分析清晰地顯示，RNA 的結構穩定性與重複次數 (n) 呈現相關性（圖 9C）。在結合穩定性方面， $dC_2G_2C_4$ 與 $r(G_4C_2)_4$ 的結合最不穩定（圖 9D）。

綜合以上結果，推論 G_4C_2 RNA 似乎在 10 mM MgCl₂ 和 100 mM KCl 的條件下可能摺疊成不同的結構。

3.3 利用反義寡核苷酸探測 $r(G_4C_2)_2$ 複合物的結構穩定性

先前研究提出，在 70 mM KCl 與 20 mM potassium phosphate (pH 7.0) 的緩衝液中， $r(G_4C_2)_2$ 可以先由兩個分子組裝成具有四層結構的 G4，再將兩個二聚體的 G4 經由 5'-5' 堆疊組成八層結構的平行 G4 (Geng et al., 2024)。因此，我們希望透過前述所建立的結構測定系統，探討 $r(G_4C_2)_2$ 在所使用的實驗條件下（例如：100 mM KCl 或 10 mM MgCl₂）是否同樣也會形成此 G4 結構，並藉此解析其結構的穩定性。

3.3.1 利用膠體電泳檢測 $r(G_4C_2)_2$ 複合物的組裝效率

依據章節 2.4 所製備 $r(G_4C_2)_2$ 複合物 (r2 complex)，經由非變性膠體電泳檢測其組裝情形，並對其結構形態進行初步的定性分析。

為確立 r2 complex 的最佳組裝條件，我們首先在 100 mM KCl (pH 7) 的條件



下，將定量的 r2U-3'h 及 Bio-3'h -Cy3 與不同濃度的 r2U-3'Cy5 進行組裝反應。電泳結果顯示，r2U-3'Cy5、r2U-3'h 與 r2U-3'Cy3bio 主要以單體 (monomer) 和 RNA 雙鏈 (Duplex)/ 二聚體 (dimer) 形式存在 (圖 10 A, lane 6-8)。成功組裝的 r2 complex 因同時含有 Cy3 與 Cy5，在膠體上呈現為遷移率較低的黃色條帶，傾向為 RNA 雙鏈 (Duplex)/ 二聚體 (dimer)。膠體螢光定量結果表明，隨著 r2U-3'Cy5 的濃度增加，r2 complex 的生成比例也隨之提升 (圖 10 A, lane 1-4；圖 10B)。由於條件 #2 已能達到接近飽和的生成比例，且相較於條件 #1 更具經濟效益，因此我們選定條件 #2 的組裝比例用於後續所有比較實驗。

接著，我們進一步探討了不同離子環境對 r2 complex 組裝效率的影響。我們選用前述最佳化的 #2 組裝比例，分別對 10 mM MgCl₂ 與 100 mM KCl 兩種條件進行比較 (緩衝液 pH 值均為 8)。在此實驗中，所有樣品均經過慢速降溫處理以促進黏合。

首先，我們觀察到不同離子環境對於用來組裝 r2 complex 的各獨立 RNA 鏈，其自身的結構有明顯影響。根據膠體電泳結果顯示，僅在 10 mM MgCl₂ 條件下，r2U-3'Cy5 以慢速降溫後會生成多條條帶，表示除了單體與二聚體之外，也形成四聚體 (Tetramer) 或更高階的聚集體，尤其於較高的 RNA 濃度與離子促進其生成 (圖 10 C, lane 9)。r2U-3'Cy3bio 則是在 100 mM KCl 條件下表現出更強的二聚化趨勢 (圖 10 C, lane 2)。

最後，r2 complex 在兩種離子環境下以 RNA 雙鏈 (Duplex)/ 二聚體 (dimer) 為主。然而，透過針對 Cy3 訊號的膠體定量分析，在 100 mM KCl 條件下，r2 complex 的生成產率高於 10 mM MgCl₂ 條件 (圖 10 C, lane 1 和 6；圖 10D)。

需注意的是在不同日期的重複實驗中 (分別使用 15 孔與 10 孔凝膠)，觀察到雖然產率的相對趨勢 (KCl > MgCl₂) 保持一致，但絕對定量數值存在批次間的差異。此落差可能源於凝膠孔數對條帶解析度的影響而干擾螢光定量，或是由於每次並非固定組成效率。



總結而言，本節我們確立了 r2 complex 的最佳組裝比例，其主要結構形態為雙鏈 / 二聚體。另外，我們發現陽離子種類是影響其組裝產率的關鍵因素，其中以 100 mM KCl 條件下的產率最高，這為後續的單分子實驗提供了穩定且高效的樣本製備方案。

3.3.2 利用螢光漂白實驗測定 $r(G_4C_2)_2$ 複合物的分子組成

首先，為確立在單分子實驗於每個視野下所能觀察到的 r2 complex 反應液的分子組成占比，我們使用了 Cy5 光漂白實驗 (Cy5 Photobleaching)。此方法的原理是，透過持續的紅光雷射照射使複合物中 Cy5 螢光分子隨機逐一發生光漂白，藉由計數單個複合物上發生光漂白的次數（步階），即可得知其所含的 Cy5 標記鏈的數目（圖 11）。

我們選定條件 #2 的配置比例組裝 r2 complex，分別在 10 mM MgCl₂ 和 100 mM KCl 的條件下，將其固定於玻片上進行 Cy5 光漂白實驗。分析結果顯示，在兩種鹽類條件下，如圖 12 D 和圖 13 D 所示，當樣品單獨存在時 ($[dC_2G_2C_4] = 0 \mu M$)，所觀測到的螢光點主要表現出「一個 Cy3 訊號」與「一個 Cy5 光漂白步階」的特徵，推論傾向 Duplex / dimer 的結構形態。

在兩種鹽類條件下的光漂白計數分析均顯示，成功組裝的複合物主要為 1 : 1 的化學計量。與先前在膠體電泳上觀察到的表觀分子量完全吻合，從單分子與群體 (bulk) 兩個層面確立了樣本的均一性。

3.3.3 測定鹽類對於 $r(G_4C_2)_2$ 複合物結構穩定性的影響

為了探測 r2 complex 的結構穩定性，我們利用前述所建立反義寡核甘酸的結構測定系統。首先，將 dC₂G₂C₄ 與預先組裝並固定於玻片上的 r2 complex 反應 5 分鐘，隨後用相同鹽類緩衝液洗滌以中止反應，以去除未結合或弱結合的 dC₂G₂C₄。

在此設計下，若 dC₂G₂C₄ 能成功結合並破壞 r2 complex 的結構，將導致帶有 Cy5 標記的 RNA 鏈在反應過程中解離，從而使我們觀測到的 Cy5 分子總數比例下



降。因此，「洗滌後的 Cy5 分子比例」可作為衡量 r2 complex 結構穩定性的直接指標。

在 100 mM KCl 條件下，r2 complex 表現出極高的結構穩定性，能抵抗 dC₂G₂C₄ 的破壞。首先，實驗對照顯示，此條件下每個視野所能收錄的 r2 complex 分子數量穩定，不受光漂白影響（圖 12 A）。根據 Frame #3 至 #12 繪製 FRET 族群分布圖，即使加入高達 1 μM 的 dC₂G₂C₄ 作用後，r2 complex 的 FRET 族群分布比例（主要分佈於 $E_{FRET} \approx 0.3$ 與 0.6）無明顯變化（圖 12 B）。最關鍵的是，經過 dC₂G₂C₄ 反應與洗滌後，帶有 Cy5 訊號的分子比例並未下降，進一步以光漂白實驗測定其結構組成，主要顯示為單個 Cy3 與單個 Cy5 信號（圖 12 C 和 D）。這些結果一致表明，在鉀離子環境中，r2 complex 結構非常穩固，不易被 dC₂G₂C₄ 結合或破壞。

相較之下，在 10 mM MgCl₂ 條件下，r2 complex 的結構則顯著不穩定，易受 dC₂G₂C₄ 攻擊。雖然在此條件下，加入 dC₂G₂C₄ 同樣未引起 FRET 族群分布比例的變化（圖 13 B）。經過 dC₂G₂C₄ 反應與洗滌後，帶有 Cy5 訊號的分子比例隨 dC₂G₂C₄ 濃度增加而顯著下降，進一步以光漂白實驗測定其結構組成，主要顯示為單個 Cy3 與單個 Cy5 信號，其中在 1 μM dC₂G₂C₄ 處理後損失了約 90% 的 Cy5 訊號（圖 13 C 和 D）。此結果證明，在鎂離子環境中，dC₂G₂C₄ 能夠有效結合並破壞 r2 complex，導致其結構解離。此外，r2 complex 樣本的分子總數在光漂白前後有輕微下降，也暗示了其基礎穩定性弱於 KCl 條件（圖 13 A）。

綜合來看，dC₂G₂C₄ 反應與洗滌後的 Cy5 螢光漂白實驗分子計數結果，作為結構穩定性的「終點」分析，明確地揭示了 r2 complex 在鎂離子環境中更為脆弱、易被 dC₂G₂C₄ 破壞的特性。

3.4 檢測 G₄C₂ RNA 的分子間交互作用

3.4.1 在不同鹽類環境中測定 r(G₄C₂)₂₅ 的結構特性

首先，為了確立較長重複次數的 r(G₄C₂)₂₅-2H 在不同鹽離子條件的構形特性：



我們使用快速降溫處理的 $r(G_4C_2)_{25}-2H$ ，透過 FRET 的變化來了解其構形是否發生改變（圖 14 A）。從第一秒綠光圈點的 FRET 分布圖顯示，無論在哪種離子環境中， $r(G_4C_2)_{25}-2H$ 的主要族群均呈現一個集中的較高 FRET ($E_{FRET} \approx 0.9$)（圖 14 B）。分析其個別分子的螢光軌跡(trace)，也發現絕大多數分子都穩定地維持在 High FRET 狀態，並無明顯的動態變化（圖 14 C）。

3.4.2 由多個分子的 $r(G_4C_2)_{25}$ 組裝成 RNA 團簇

接著，為了確認 smFRET 的系統條件下，長鏈的 $r(G_4C_2)_{25}-2H$ 是否具備形成高階結構 RNA 團簇（RNA clusters）的能力，此現象被認為與 C9-ALS/FTD 的致病機理密切相關。參考先前文獻建立的方法(Jain & Vale, 2017)，依據章節 2.5，在 10 mM MgCl₂ 條件下組裝 RNA 團簇（圖 15A）。

如圖 15 B 所示，透過 TIRF 顯微鏡，我們確實觀測到了大小不一、呈現圓球形的螢光團簇固定於玻片表面。這些團簇的形態與文獻中報導的液相分離(LLPS)結構特徵相符。在觀測期間，大多數 RNA 團簇的位置相對固定，以 Cy3 融光通道訊號衡量，其尺寸也未出現明顯變化（圖 15 B）。然而，我們也捕捉到少數團簇發生了移動，並且在大型團簇的周圍，可以觀察到高密度的單一 RNA 分子。

值得注意的是，由於 TIRF 顯微鏡的隱逝波僅能穿透距離表面約 100~200 nm 的深度，因此我們所觀測到的應為這些三維 RNA 團簇貼近表面的「底層」，其實際尺寸可能遠大於成像所見。

3.4.3 在團簇模擬環境中探測 $r(G_4C_2)_{25}$ 分子間的交互作用

由於傳統方法難以直接觀測在擁擠的三維 RNA 團簇環境中單個 $r(G_4C_2)_{25}$ 分子的構象特性，所以我們設計了一套創新的二維平面模擬系統（圖 16A）。此系統的核心是在玻片表面高密度地固定帶有生物素的 Bio- $r(G_4C_2)_{25}-NH$ ，以形成一個模擬 RNA 團簇內部的二維「分子草坪（molecular lawn）」。

接著，我們加入不帶生物素但帶有 FRET 融光對的 $r(G_4C_2)_{25}-2H_wo\ Bio$ 作



為「報導分子 (reporter molecule)」。由於報導分子無法直接固定於玻片，它只有在與表面的「分子草坪」發生分子間交互作用時，才能被 TIRF 顯微鏡觀測到。因此，報導分子的 FRET 訊號便能反映其在模擬擁擠環境下的構象。

實驗結果顯示， $r(G_4C_2)_{25}$ 存在分子之間交互作用（圖 16 B）。我們觀察到，隨著 $r(G_4C_2)_{25}-2H_wo$ Biotin 分子濃度的增加，停留在表面的螢光點數目也隨之上升，表明報導分子成功地與「分子草坪」發生了結合。有趣的是，這些結合在「分子草坪」上的報導分子，其 FRET 訊號主要呈現為一個 High FRET，與它們單獨存在時的摺疊構象相似（圖 16 C）。此 High FRET 結果表明， $r(G_4C_2)_{25}$ 分子間的交互作用，可能主要發生在不影響其兩端手柄相對距離的區域（例如：GC 區域），因此未導致其整體結構的展開。

為了驗證這個假設，我們進行了反向對照實驗（圖 17 A）。首先，將帶生物素與螢光對的 $r(G_4C_2)_{25}-2H$ 固定於玻片上，並使用高濃度的 Bio- $r(G_4C_2)_{25}-NH$ 與其作用以模擬 RNA 團簇的環境，測定 $r(G_4C_2)_{25}$ 之間結合情形。 $r(G_4C_2)_{25}-2H$ 與 $r(G_4C_2)_{25}-2H_wo$ bio 的結果相似（圖 17 B）。

再來，使用長度較短的 $r(G_4C_2)_5-2H$ 作為報導分子，並加入三倍量的 Bio- $r(G_4C_2)_{25}-NH$ ，第一秒綠光圈點的 FERT 分布圖，EFRET peak 在 0.9 附近，表示 G_4C_2 兩端黏合單股 DNA 序列處彼此仍非常靠近（圖 17 C）。

經由這兩個實驗相互驗證，可得知藉由 smFRET 系統捕捉到 $r(G_4C_2)_n$ 可以發生 RNA-RNA 分子間的相互作用（RNA - RNA interaction）的現象，但就實驗設計本身實際上無從偵測 G_4C_2 區域是否有發生構形變化。



第四章 討論

探針長度是影響結合效率與模式的「雙面刀」

在本實驗中初步觀察到的趨勢為 ASO 探針的長度從 6-mer 增加到 10-mer 時，誘導 $r(G_4C_2)_2$ 結構展開的效率也隨之提升（圖 5 和圖 6）。這符合熱力學預期，因為較長的序列能形成更多的鹼基配對，從而產生更穩定的 DNA-RNA 複合物。此外，發現 ASO 過長會導致效率下降，長度最長的 12-mer ASO，其結合效率反而顯著下降，這可能是由於 12-mer 探針自身具有形成穩定二級結構（如髮夾）的傾向。當探針自身摺疊的分子內作用力，強於其與目標 RNA 結合的分子間作用力時，將會極大地阻礙其作為探針的功能。再來，也發現特定長度的 ASO 可能產生中間體，10-mer ASO 雖然能有效作用，但其產生的 FRET 效率值，卻顯著高於由 6-mer 和 8-mer ASO 所誘導的狀態。這可能不是一個完全展開的構象，推測 10-mer ASO 或許與 $r(G_4C_2)_2$ 經由髮夾環之間發生了部分鹼基配對的 kissing hairpin（一個部分結合、部分展開的中間體），導致螢光分子距離並未拉到最遠。

G_4C_2 RNA 在不同離子環境下採用不同的「結構策略」

在 100 mM KCl 環境中， G_4C_2 RNA 表現出長度依賴性的穩定性（圖 9）。隨著重複次數（n）的增加，RNA 結構越來越難被 ASO 探針展開，這符合預期中「重複單元越多，分子內鍵結越穩固」的原理。我們推論， K^+ 傾向於誘導 G_4C_2 RNA 形成一個連續的、典型的髮夾結構，其穩定性與總長度成正比。

然而，在 10 mM MgCl₂ 環境中，這一規則完全失效（圖 8）。 G_4C_2 RNA 的結構穩定性並未隨重複次數增加而提升。我們提出的模型是，Mg²⁺ 可能誘導 RNA 摺疊成多個各自獨立的「較小結構單元」（例如： $r(G_4C_2)_4$ 可能是一個最小的穩定單元）。在此模型下，一條長鏈 RNA 的穩定性不再由其總長度決定，而是由這些模組化單元中最脆弱的一環所決定。這種摺疊方式反而可能在單元之間暴露出更



多的未配對序列，從而解釋了為何 $r(G_4C_2)_5$ 甚至比短鏈更容易與 ASO 結合。

在詮釋這些結果時，我們必須考慮到離子效應的內在複雜性。鹽類不僅影響 RNA 的分子內作用力，也同時調控著 DNA 探針的自身構形，以及兩者之間的分子間作用力。我們初步觀察到 10 mM 的 Mg^{2+} 在促進 RNA 展開上的效力遠超 100 mM 的一價陽離子，但要完全解構不同離子的精確角色，還需要更為嚴謹的實驗設計來進行驗證。未來的研究可包含：(1) 比較同濃度的不同價數離子（例如：10 mM Mg^{2+} vs. 10 mM K^+ ）的效應；(2) 系統性地探討單一離子的濃度梯度效應。這些後續實驗將有助於更客觀、更定量地闡明陽離子調控 G_4C_2 RNA 結構的詳細機制。

評估 $r(G_4C_2)_2$ 複合物的結構模型：Duplex vs. Dimer

我們的實驗條件下， $r(G_4C_2)_2$ 複合物的主要穩定結構並非文獻中報導的八層的平行 G4 結構 (Geng et al., 2024)，經由膠體電泳（圖 10 B 和 D）與單分子光漂白計數實驗結果（圖 12 D；圖 13 D），均指向了一個更為基礎的 RNA 雙鏈 (Duplex) 或二聚體 (Dimer) 結構，這表明 $r(G_4C_2)_2$ 的高階組裝行為對實驗條件（如：RNA 濃度、緩衝液成分或退火速率）極度敏感。在我們的單分子觀測體系中，更為簡單的 RNA 雙鏈 (Duplex) 或二聚體 (Dimer) 可能是其熱力學上的優勢構形。未來須建構一個具有 RNA 雙鏈樣品作為參照，以區分 FRET 族群所對應的 Duplex 與 Dimer 結構。

另外，我們的分析還發現了 FRET 技術本身可能忽略的「隱藏」群體，進一步證實了樣本的複雜性。在 FRET 觀測（僅綠光激發 Cy3）結束後，我們額外使用紅光直接激發 Cy5 染料（圖 12 E；圖 13 E）。結果在視野中出現了許多在 Cy3/Cy5 通道中未能被選取到的螢光亮點（即未能被黃色圓圈標註的分子），這些很可能是更高階結構與聚集體，以非單分子形態。這一觀察提醒我們，僅依賴 FRET 訊號可能會低估樣本中存在的非典型或高階聚集物的真實比例。

從單分子到集體行為：長鏈 G₄C₂ RNA 的高階組裝與病理學關聯

當重複序列增加至致病相關的長度 ($n = 25$) 時，G₄C₂ RNA 會傾向從分子內摺疊轉變為分子間聚集體現象。我們的實驗觀察到，相較於短鏈的 G₄C₂ RNA (圖 2A)，長鏈 r(G₄C₂)₂₅ 更容易在電泳過程中滯留在上樣孔 (圖 2B 和 C)。此外，還能在體外形成大小不一的球形 RNA 團簇 (圖 15)，以上皆顯示長鏈 r(G₄C₂)₂₅ 的聚集傾向。這些團簇的形態與液相分離 (LLPS) 的特徵吻合。

為了探究這些團簇內部單個分子的構象，我們設計了二維模擬系統 (圖 16)。結果顯示，在模擬的擁擠環境中，顯示 r(G₄C₂)₂₅ 分子間存在交互作用，但這些相互作用並未導致其整體結構 (由 G₄C₂ 兩端 FRET 探針所衡量) 發生巨大變化，分子依然維持在摺疊的 High FRET 狀態。這提出了一個的假說：G₄C₂ RNA 團簇的形成，可能不依賴於單個分子的大規模解鏈，而是透過已摺疊單元之間的表面交互作用 (例如 GC 區域的 kissing-loop 作用) 來實現的。這為理解 RNA 如何在不喪失自身結構的同時，啟動高階組裝提供了新的分子視角。

研究方法的考量、侷限性與未來展望

然而，我們目前的實驗方法也有其侷限性，主要體現在以下幾點：

FRET 探針的「盲點」問題：這是本研究最主要的技術限制。我們將 FRET 螢光對標記在 G₄C₂ 重複序列兩端上。此設計雖然能呈現分子兩端的整體距離變化，但對於 G₄C₂ 核心區域內部的細微構象變化不夠敏感，例如：從一種髮夾變為另一種或者 G₄ 內部的滑動。這也解釋了為何在某些實驗中，即使我們推斷發生了交互作用，但 FRET 訊號卻沒有顯著變化。後續，可嘗試將螢光標記的標定位置往 G₄C₂ RNA 的兩側端點移動，或是在 G₄C₂ 重複序列的兩側增加 poly U 與 poly A 以提高 smFRET 偵測敏銳度，同時減低螢光標記手柄對其結構形成的干擾。此外，也可以透過化學修飾將螢光對直接標記在 G₄C₂ 核心序列的內部特定位置，以更精準地捕捉其局部的構象變化。



合成與組裝效率的挑戰：實驗中觀察到 Bio-r(G₄C₂)₂₅-NH 的生物素標記效率似乎不高，並且 r2 complex 的組裝效率存在批次間的波動。這些因素雖不影響核心的科學結論，但對實驗的通量與定量準確性構成了挑戰。

結合互補的技術：若單分子數據能與其他結構生物學技術（例如：NMR 或 Cryo-EM）等相結合，將有助於更完整地解析 G₄C₂ RNA 在不同條件下的精確三維結構。

體外系統的簡化性：我們的實驗是在相對單純的體外系統中進行的。真實的細胞環境遠為複雜，充滿了各類 RNA 結合蛋白、分子伴侶與擁擠劑，這些因素都可能極大地影響 G₄C₂ RNA 的摺疊路徑與最終構象。

本研究利用單分子 FRET 技術，不僅系統性地揭示了 G₄C₂ RNA 的結構多態性，闡明了離子環境與重複次數的調控作用，也觀察到長重複序列具有形成分子間聚集的傾向，為理解神經細胞內 RNA 團簇的形成提供了分子層級的線索。



參考文獻

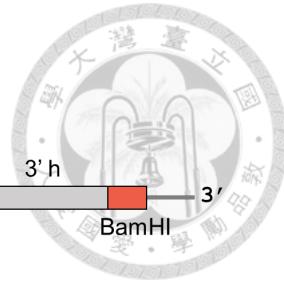
- Aitken, C. E., et al. (2008). An oxygen scavenging system for improvement of dye stability in single-molecule fluorescence experiments. *Biophysical journal*, 94(5), 1826-1835.
- Balendra, R., et al. (2018). C9orf72-mediated ALS and FTD: multiple pathways to disease. *Nature Reviews Neurology*, 14(9), 544-558.
- Butler, J. M. (2006). Genetics and genomics of core short tandem repeat loci used in human identity testing. *J Forensic Sci*, 51(2), 253-265.
- Campbell, C. D., et al. (2013). Properties and rates of germline mutations in humans. *Trends Genet*, 29(10), 575-584.
- DeJesus-Hernandez, M., et al. (2011). Expanded GGGGCC Hexanucleotide Repeat in Noncoding Region of C9ORF72 Causes Chromosome 9p-Linked FTD and ALS. *Neuron*, 72(2), 245-256.
- Ellegren, H. (2000). Heterogeneous mutation processes in human microsatellite DNA sequences. *Nat Genet*, 24(4), 400-402.
- Farg, M. A., et al. (2014). C9ORF72, implicated in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia, regulates endosomal trafficking. *Hum Mol Genet*, 23(13), 3579-3595.
- Förster, T. (1948). Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Annalen der Physik*, 437(1-2), 55-75.
- Geng, Y., et al. (2024). Crystal structure of a tetrameric RNA G-quadruplex formed by hexanucleotide repeat expansions of C9orf72 in ALS/FTD. *Nucleic Acids Res*, 52(13), 7961-7970.
- Jain, A., et al. (2017). RNA phase transitions in repeat expansion disorders. *Nature*, 546(7657), 243-247.
- Lander, E. S., et al. (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, 409(6822), 860-921.
- Lee, Y. B., et al. (2013). Hexanucleotide repeats in ALS/FTD form length-dependent RNA foci, sequester RNA binding proteins, and are neurotoxic. *Cell Rep*, 5(5), 1178-1186.



- Miller, C. J., et al. (2022). Mismatch repair is a double-edged sword in the battle against microsatellite instability. *Expert Rev Mol Med*, 24, e32.
- Porubsky, D., et al. (2025). Human de novo mutation rates from a four-generation pedigree reference. *Nature*, 643(8071), 427-436.
- Raguseo, F., et al. (2023). The ALS/FTD-related C9orf72 hexanucleotide repeat expansion forms RNA condensates through multimolecular G-quadruplexes. *Nat Commun*, 14(1), 8272.
- Rajan-Babu, I. S., et al. (2024). Sequence composition changes in short tandem repeats: heterogeneity, detection, mechanisms and clinical implications. *Nat Rev Genet*.
- Reddy, K., et al. (2013). The disease-associated r(GGGGCC)n repeat from the C9orf72 gene forms tract length-dependent uni- and multimolecular RNA G-quadruplex structures. *J Biol Chem*, 288(14), 9860-9866.
- Renton, A. E., et al. (2011). A hexanucleotide repeat expansion in C9ORF72 is the cause of chromosome 9p21-linked ALS-FTD. *Neuron*, 72(2), 257-268.
- Roy, R., et al. (2008). A practical guide to single-molecule FRET. *Nature Methods*, 5(6), 507-516.
- Sasmal, D. K., et al. (2016). Single-molecule fluorescence resonance energy transfer in molecular biology. *Nanoscale*, 8(48), 19928-19944.
- Schmitz, A., et al. (2021). Emerging Perspectives on Dipeptide Repeat Proteins in C9ORF72 ALS/FTD. *Front Cell Neurosci*, 15, 637548.
- Shi, Y., et al. (2019). Identification and therapeutic rescue of autophagosome and glutamate receptor defects in C9ORF72 and sporadic ALS neurons. *JCI Insight*, 5(15).
- Su, Z., et al. (2014). Discovery of a biomarker and lead small molecules to target r(GGGGCC)-associated defects in c9FTD/ALS. *Neuron*, 83(5), 1043-1050.
- Wang, S., et al. (2024). RNA structure promotes liquid-to-solid phase transition of short RNAs in neuronal dysfunction. *Commun Biol*, 7(1), 137.
- 王渝暄. (2024). 以單分子螢光共振能量轉移技術檢測 r(G₄C₂) 重複序列之構形變化. 國立臺灣大學分子與細胞生物學研究所碩士論文.
- 張凱鈞. (2018). 以單分子技術與理論計算研究由信使核糖核酸結構引導之轉譯再編碼. 國立臺灣大學分子與細胞生物學研究所博士論文

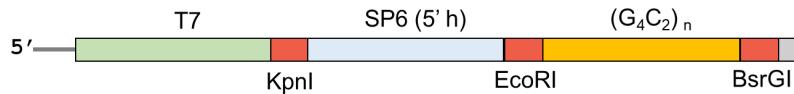
許鈺婕. (2023). 以單分子螢光共振能量轉移觀測 mRNA 的長度對反義寡核苷酸以及 30S 核糖體次單元的交互作用影響. 國立臺灣大學分子與細胞生物學研究所碩士論文.





A.

- pT7SP6 - nX:



if $n = 2 - 5$

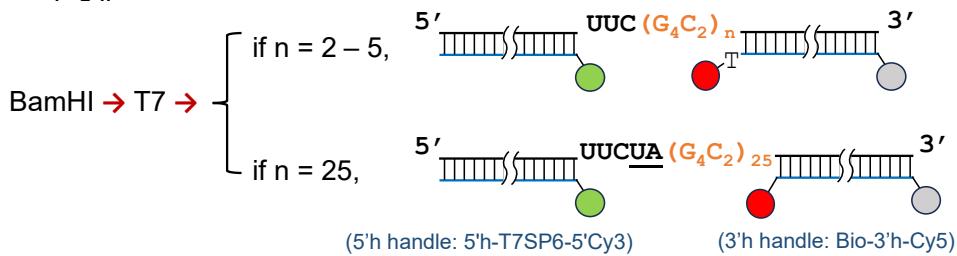
TAATACTGACTCACTATAGGGCGAATTG**GGTACC****ATTTAGGTGACACTATAGAATTC**
(GGGGCC)_n**TGTACA**CACCACGCGACCCG

if $n = 25$

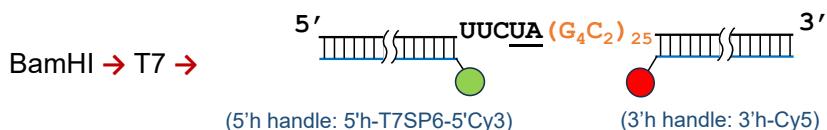
TAATACTGACTCACTATAGGGCGAATTG**GGTACC****ATTTAGGTGACACTATAGAATTC**
TA(GGGGCC)₂₅**ATGTACA**CACCACGCGACCCG

B.

- r(G₄C₂)_n - 2H :



- r(G₄C₂)₂₅ - 2H w/o bio :

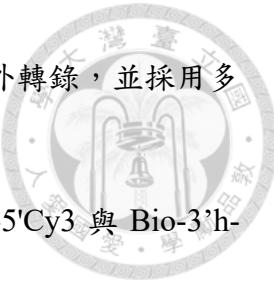


- Bio - r(G₄C₂)₂₅ - NH :



圖 1. pT7SP6-nX 系列質體序列與 G₄C₂ RNA 樣本示意圖。

- A. pT7SP6-nX 載體含有 T7 和 SP6 啟動子序列，並設計 EcoRI 和 BsrGI 限制酶切位點，以利後續實驗應用。
以綠色標示為 T7 啟動子序列，藍色代表 SP6 啟動子序列，橘色為 G₄C₂ 重複序列，底線則標示酵素切位。另外，pT7SP6-25X (TA / A) 質體因先前所使用的 Insert 引子序列設計，導致其 G₄C₂ 重複序列兩端多三個鹼基，該部分以粉紅色標記以示區別。

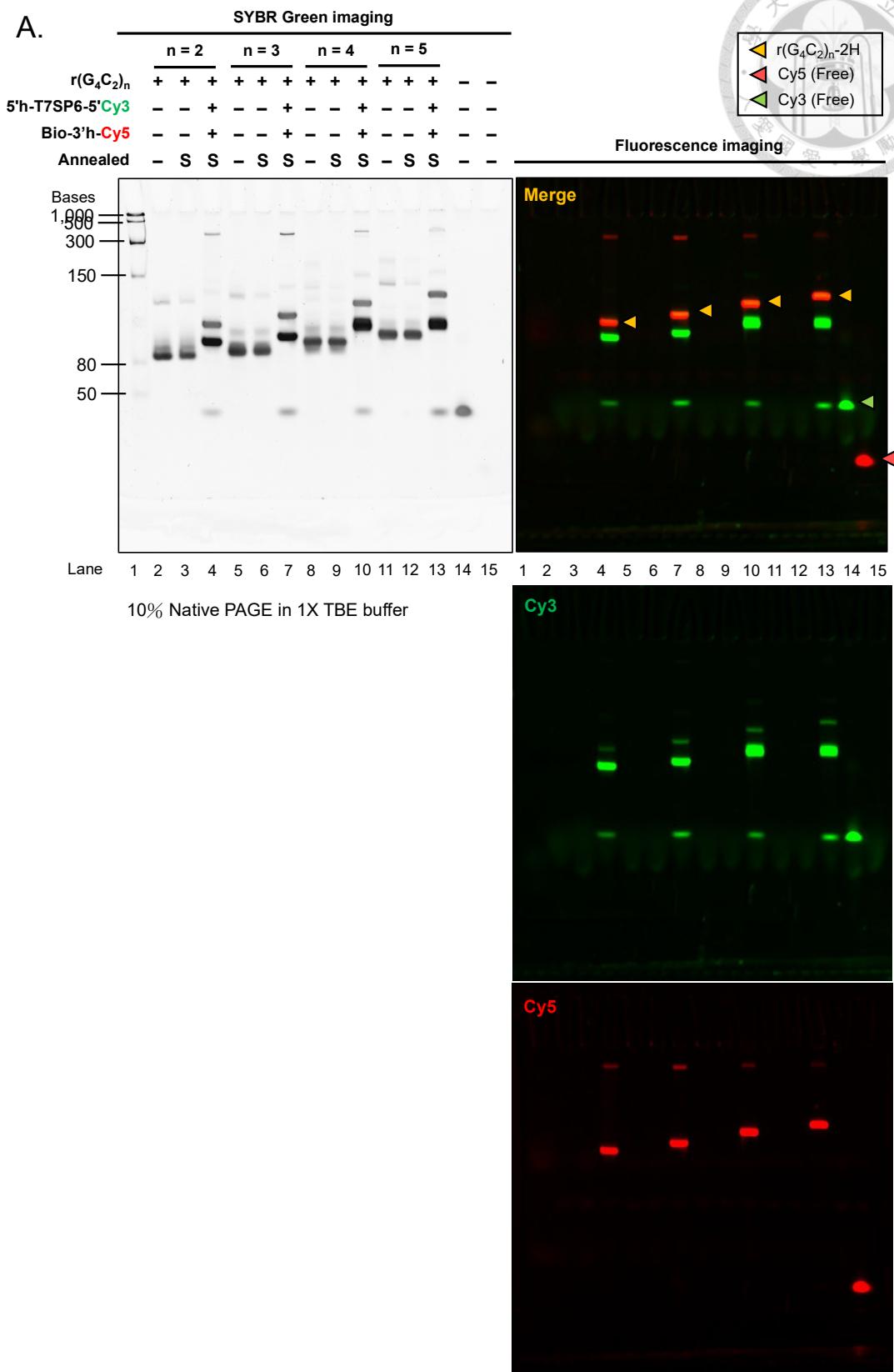
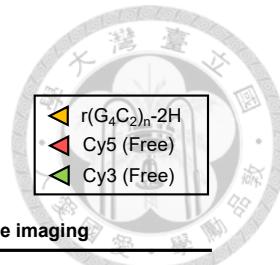


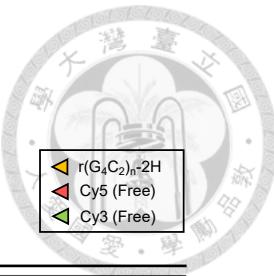
- B. 依據實驗需求，將 pT7SP6-nX 質體進行限制酶作用與體外轉錄，並採用多種方法對 G₄C₂ RNA 進行螢光或生物素標記。

r(G₄C₂)_n-2H 為在 G₄C₂ 重複序列兩端分別黏合 5'h-T7SP6-5'Cy3 與 Bio-3'h-Cy5。

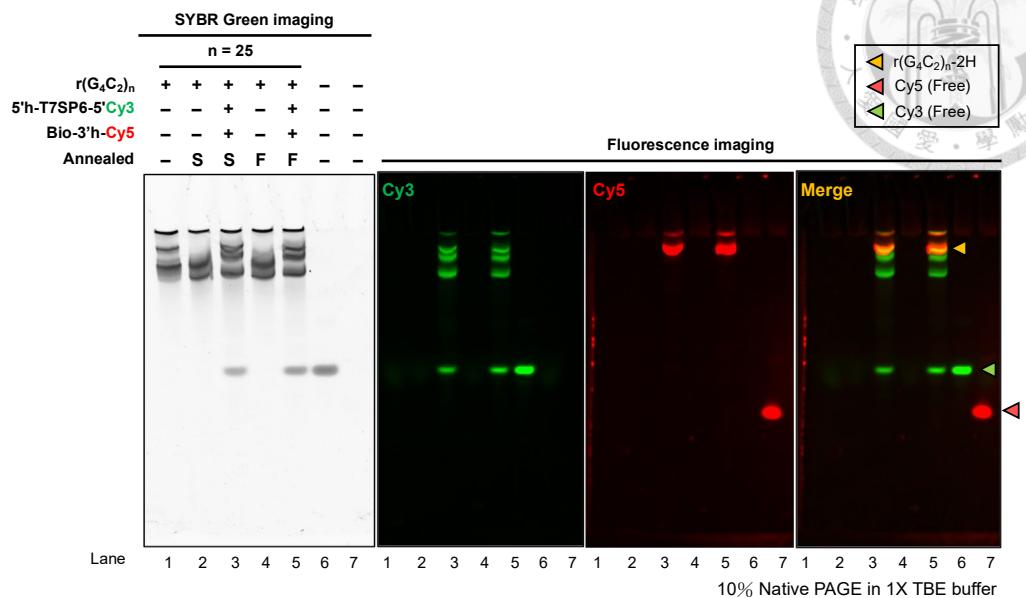
r(G₄C₂)₂₅-2H_w/o bio 則是指含有 25 次 G₄C₂ 重複序列的 RNA，其兩端分別黏合 5'h-T7SP6-5'Cy3 與 3'h-Cy5，但不含生物素標記。

Bio-r(G₄C₂)₂₅-NH 為 Sp6 聚合酶轉錄過程中即時且隨機嵌入 Biotin-UTP，以製備出含有生物素標記且不具單股 DNA 手柄序列的 G₄C₂ RNA。





B.



C.

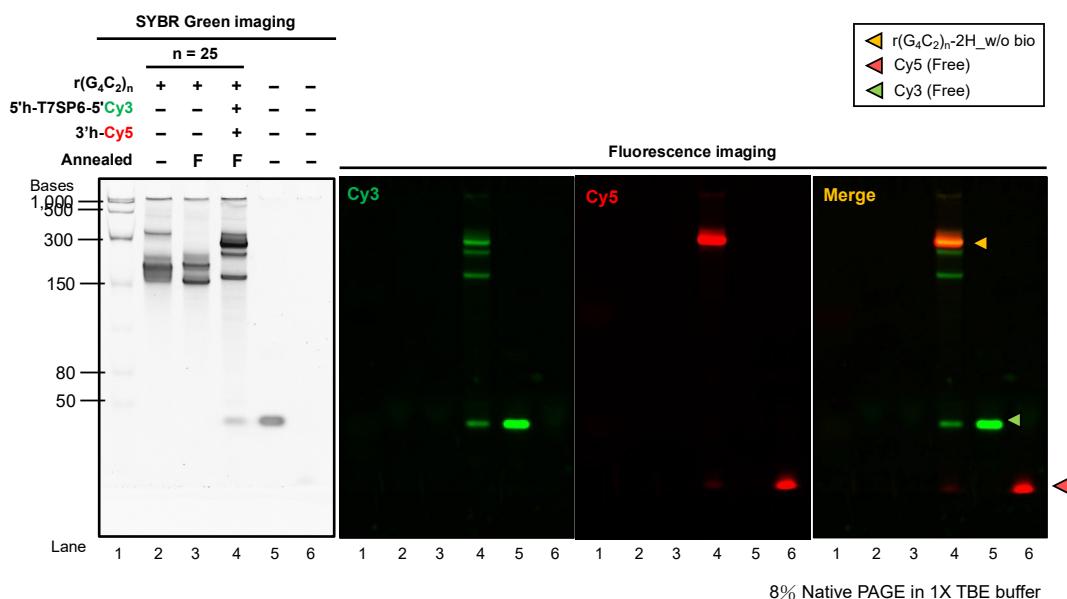


圖 2. 檢測 smFRET handle 與 G_4C_2 RNA 的黏合效率。

在 20 mM Tris-HCl (pH 8.0) 和 200 mM NH₄Cl 的緩衝液中，以不同溫度程序於 G_4C_2 重複序列兩端黏合帶有螢光與生物素標記的單股 DNA 手柄。F 為快速降溫處理，將 RNA 於 70°C 進行 1 分鐘的 RNA 變性反應，隨後立即置於冰上靜置 5 分鐘，接著於 45°C 反應 10 分鐘，以確保引子完全黏合；S 為慢速降溫處理，將



RNA 於 70°C 下進行 1 分鐘的變性反應，隨後以每分鐘降低 1°C 的速率逐步降溫，直至溫度達到 25°C 時停止黏合反應；一為靜置於冰上，待其他樣品跑膠。後續，利用 UVP 影像分析系統偵測 Native PAGE 膠體中的螢光訊號。當 Cy3 與 Cy5 的螢光訊號重疊時，會呈現黃色條帶，顯示 G₄C₂ RNA 已成功完成螢光標定。

- A. r(G₄C₂)_n-2H (n = 2, 3, 4, 5) 的螢光與生物素標記檢測結果。RNA 全長分別為 75、81、87、93 nt (每增加一個重複 + 6 nt)。
- B. r(G₄C₂)₂₅-2H 的螢光與生物素標記檢測結果。RNA 全長分別為 216 nt。
- C. r(G₄C₂)₂₅-2H_w/o bio 的螢光標記檢測結果。RNA 全長分別為 216 nt。

A 與 C 圖中 Lane 1 為 Low Range ssRNA Ladder (NEB, #N0364)。

註：smFRET handle 序列可參考表 1。

Data from 2023/09/27, 2025/03/05, 2025/07/28

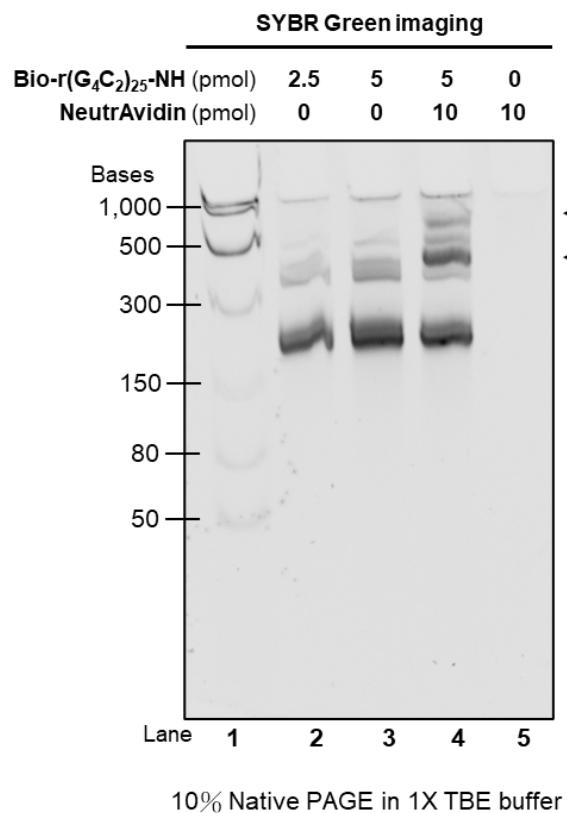


圖 3.以 EMSA 測定 G₄C₂ RNA 的生物素標記效率。

此為 Bio-r(G₄C₂)₂₅-NH 與 NeutrAvidin 的結合分析，將各樣品於室溫避光反應 30 分鐘後，以凝膠電泳分析。

Lane 1：Low Range ssRNA Ladder (NEB, #N0364)。

Lane 2 和 3；分別 2.5 和 5 pmol 的 Bio-r(G₄C₂)₂₅-NH，長度為 166 nt，作為對照組。

Lane 4：5 pmol Bio-r(G₄C₂)₂₅-NH 與 10 pmol NeutrAvidin 的反應物，藍色箭頭所標示的條帶出現位移 (shift)，說明 Bio-r(G₄C₂)₂₅-NH 與 NA 之間發生了結合。

Lane 5：10 pmol NeutrAvidin (NA)，作為對照組。

Data from 2024/03/12

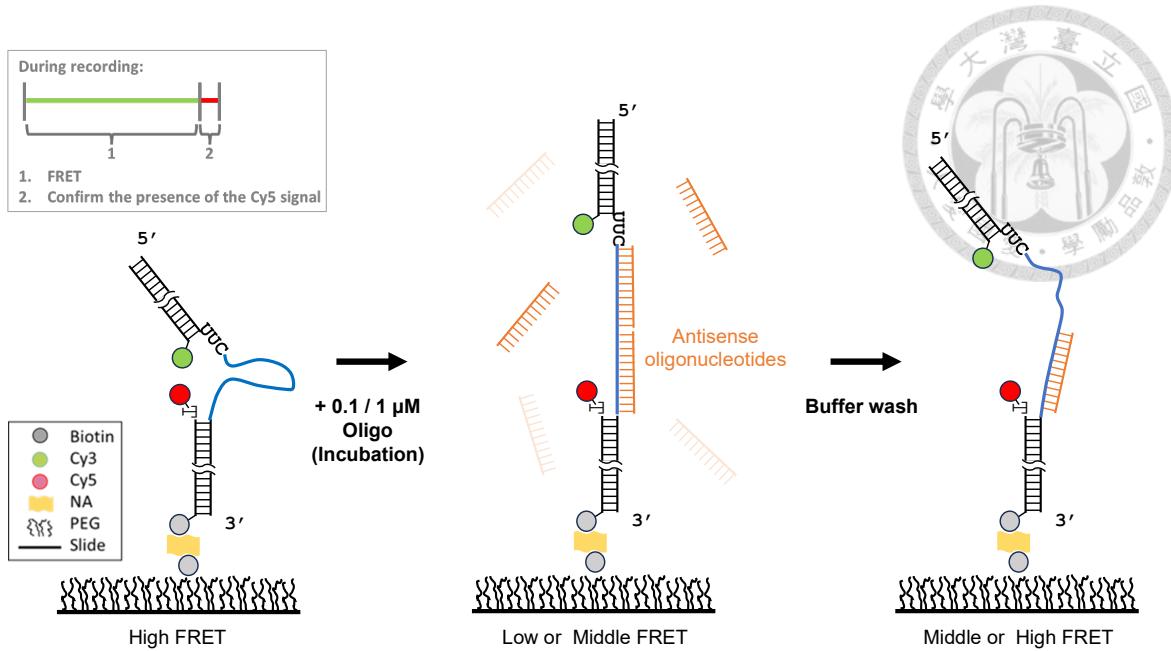


圖 4. 利用反義寡核苷酸探測 G₄C₂ RNA 結構的單分子 FRET 實驗示意圖。

本實驗設計目的在觀測 G₄C₂ RNA (藍色線條) 與反義寡核苷酸交互作用下的結構變化。

(左圖) G₄C₂ RNA 的初始狀態：

首先，將 r(G₄C₂)n-2H 樣本 (簡稱為 rn-2H) 固定於玻片表面。在其自身的摺疊狀態下，FRET 螢光對 (Cy3/Cy5) 可能距離較近，呈現較高的 FRET，此狀態作為比較的基準線，為 RNA only 組別。

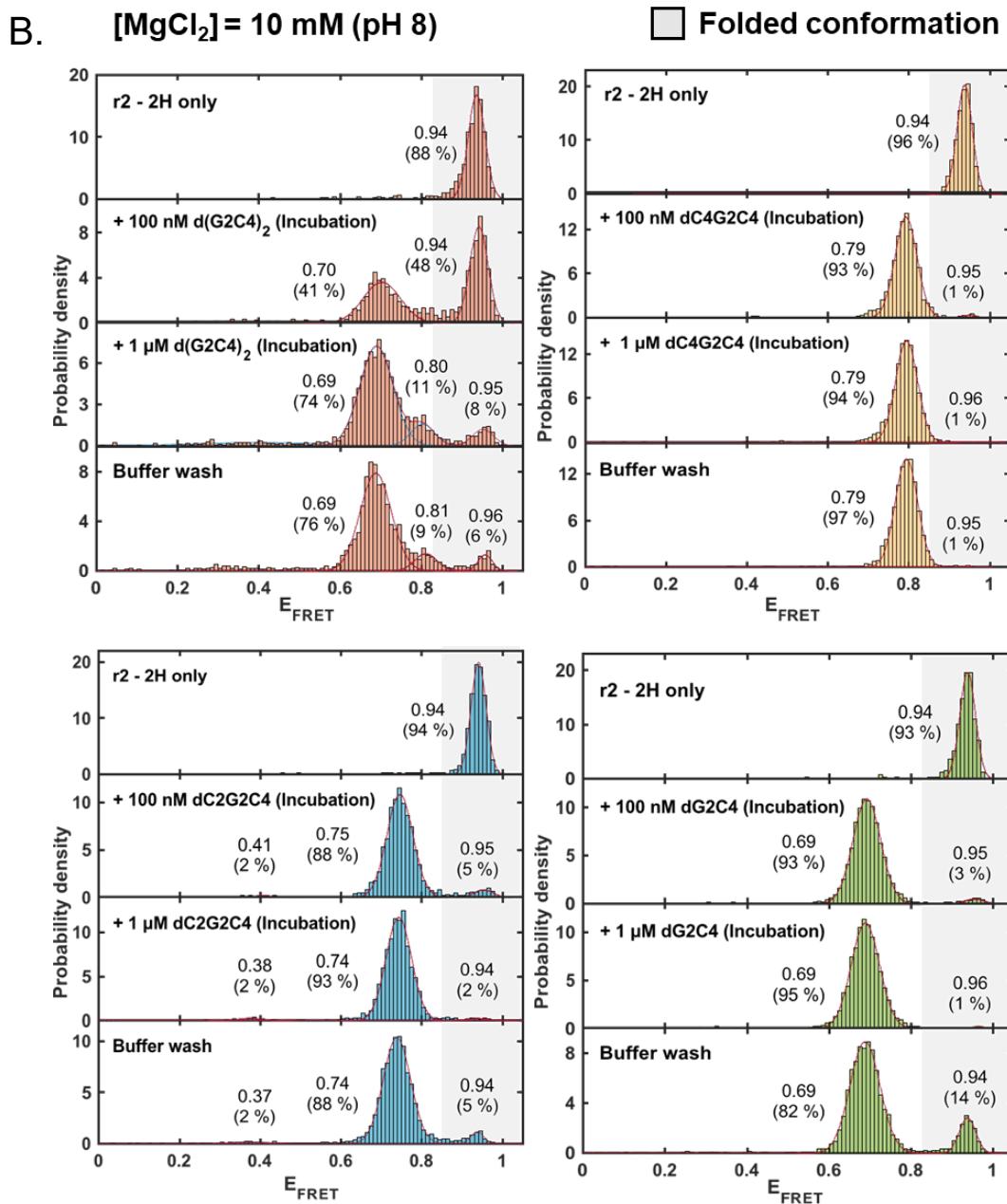
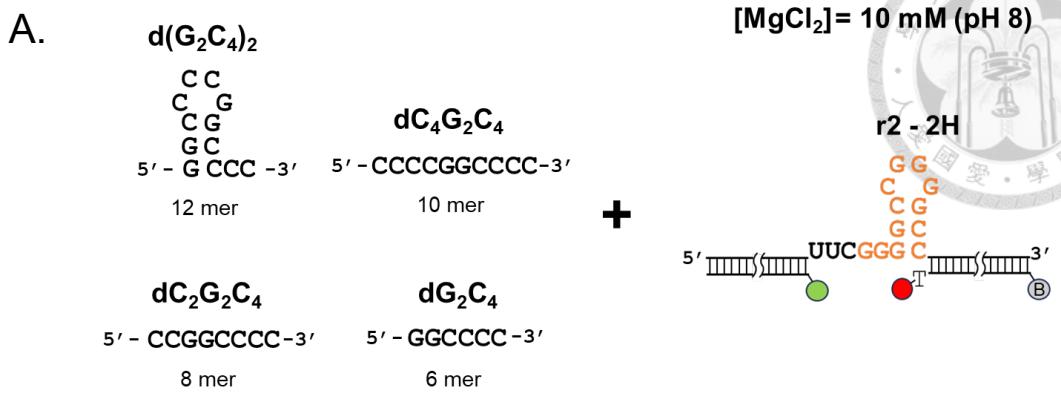
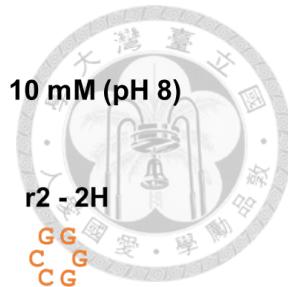
(中圖) ASO 結合與 G₄C₂ RNA 結構展開：

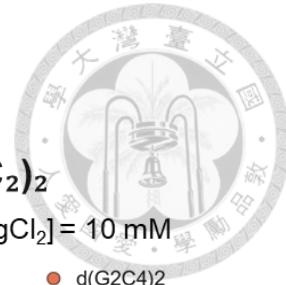
接著，加入反義寡核苷酸 (ASO) 作為結構探針，若 ASO 成功結合至 G₄C₂ RNA 的目標區域，誘導其結構展開而拉遠螢光對的距離，將導致 FRET 效率降低。

(右圖) 洗滌與解離測試：

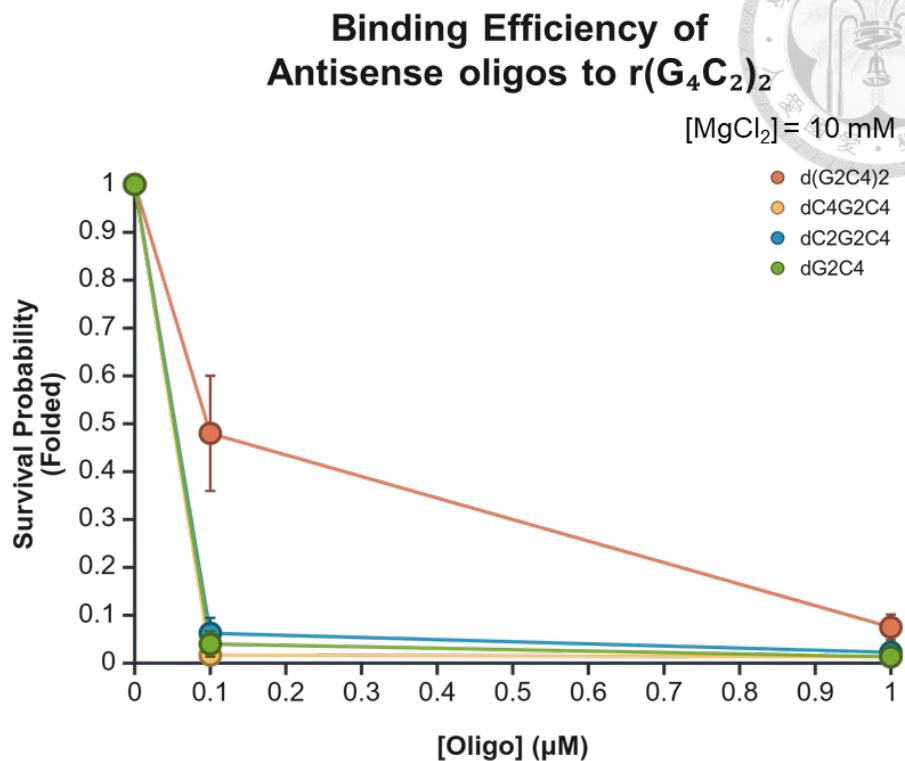
最後，透過緩衝液洗滌來移除游離的或結合較弱的反義寡核苷酸。若 ASO-RNA 結合不夠穩定，ASO 將會解離，使 G₄C₂ RNA 恢復部分摺疊狀態，導致 FRET 效率回升。

因此，透過監測 E_{FRET} 訊號的變化，我們便能解析 ASO 與 G₄C₂ RNA 的結合/解離情況，並進一步評估 G₄C₂ RNA 的結構穩定性。





C.



D.

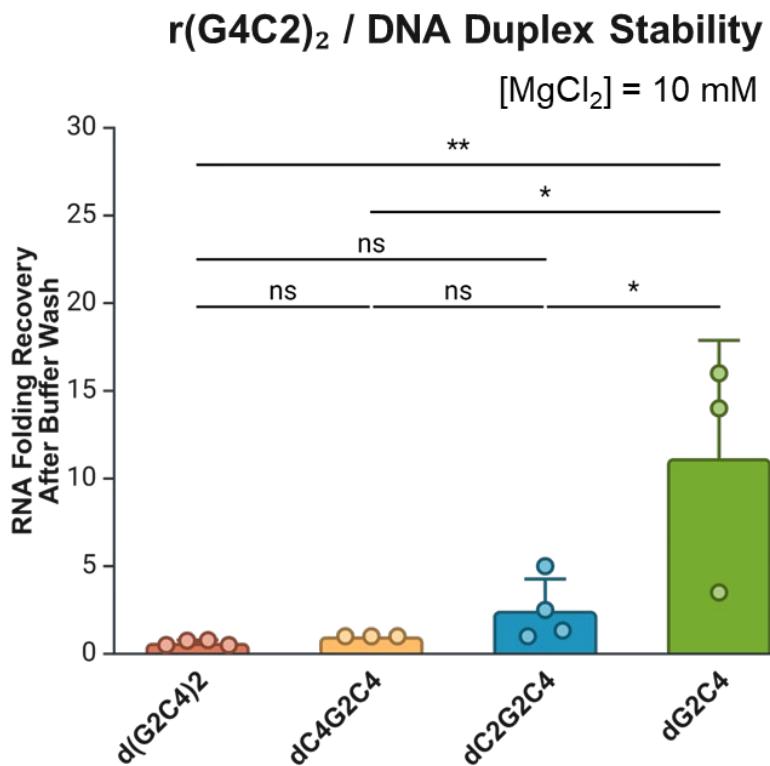
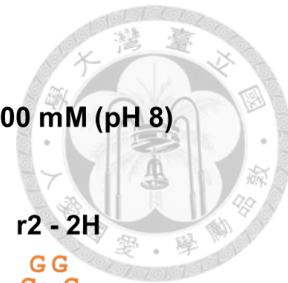




圖 5. 在 10 mM MgCl₂ 中，測定不同長度的寡核苷酸與 r(G₄C₂)₂ 的結合效率。

- A. 實驗設計：將慢速降溫處理的 r(G₄C₂)₂-2H 固定於玻片上，分別加在 0 (即為 RNA only)、100 nM 和 1 μM 的 Oligo 在 10 mM MgCl₂ 中進行反應。最後，使用相同的鹽離子緩衝液洗滌以測定 DNA-RNA 鍵結穩定性。經 UNAfold 軟體預測 DNA 與 RNA 結構。
- B. r(G₄C₂)₂-2H 分別在不同長度的寡核苷酸條件下的 FRET 族群分布圖，灰底為 r(G₄C₂)₂ 的初始摺疊狀態。
- C. 在不同長度的寡核苷酸作用下，計算不同實驗程序中 r(G₄C₂)₂-2H 摺疊形態倖存比例，此圖量化了 r(G₄C₂)₂-2H 結構展開的效率。
- D. 比較鹽離子緩衝液洗滌前後的 r(G₄C₂)₂-2H 摺疊形態倖存比例，以了解 DNA-RNA 鍵結穩定性，以 t test 作統計檢定，** P < 0.01, * P < 0.05, ns = not significant.。

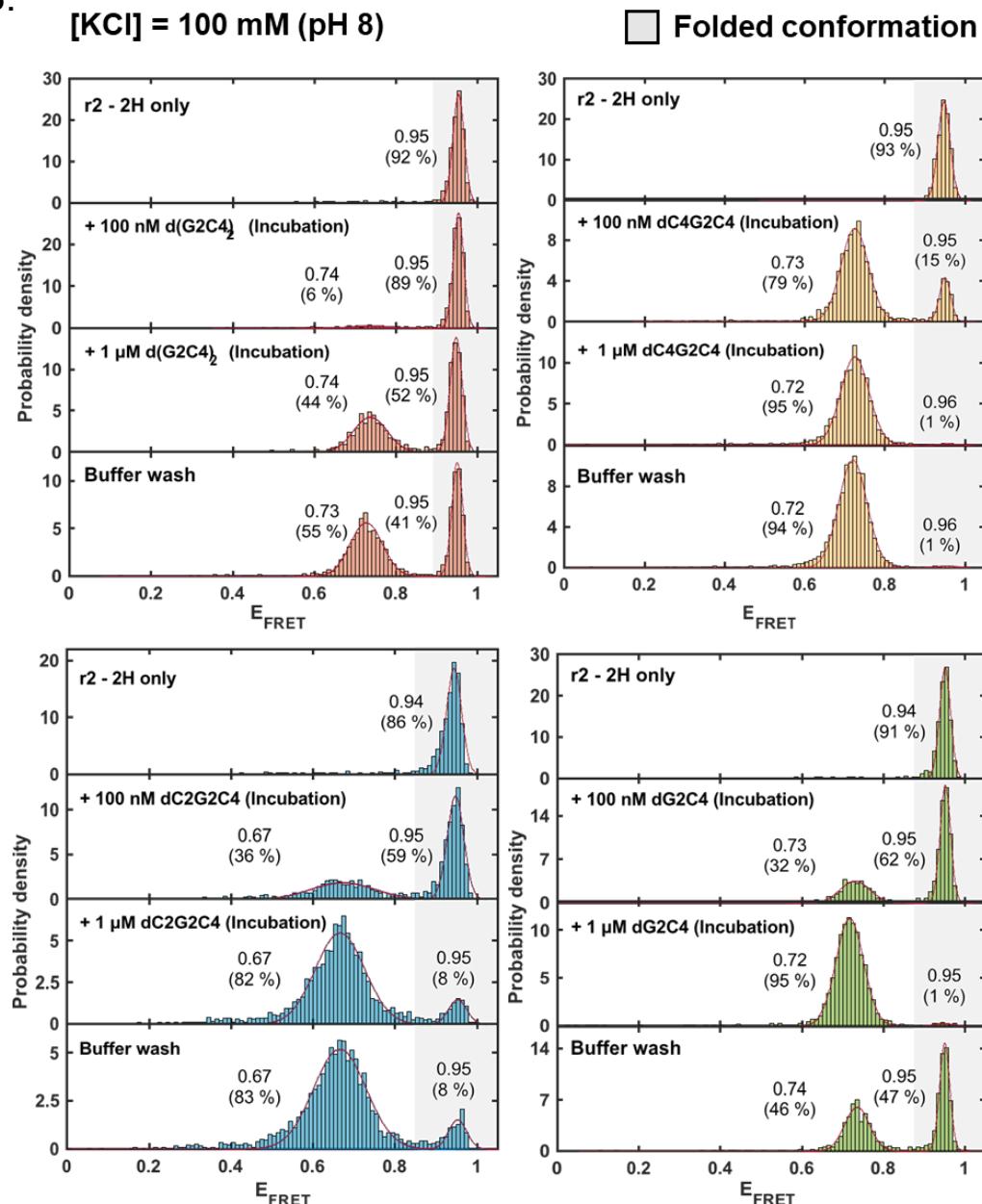
註：參考表 2



A.

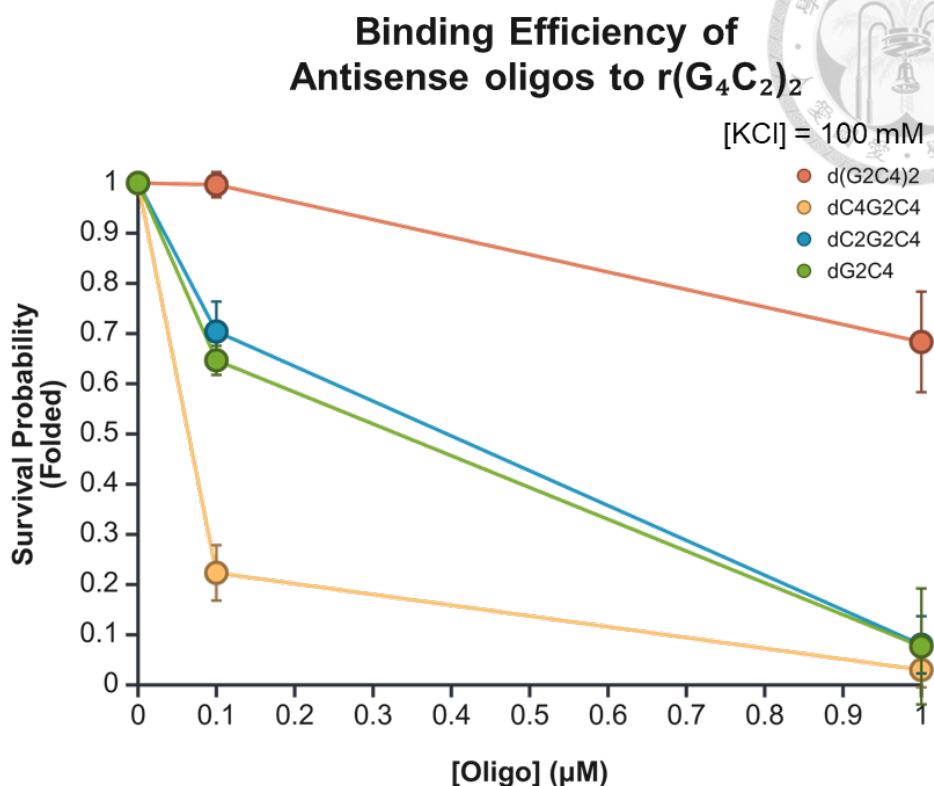


B.





C.



D.

 $r(G_4C_2)_2 / \text{DNA Duplex Stability}$

[KCl] = 100 mM

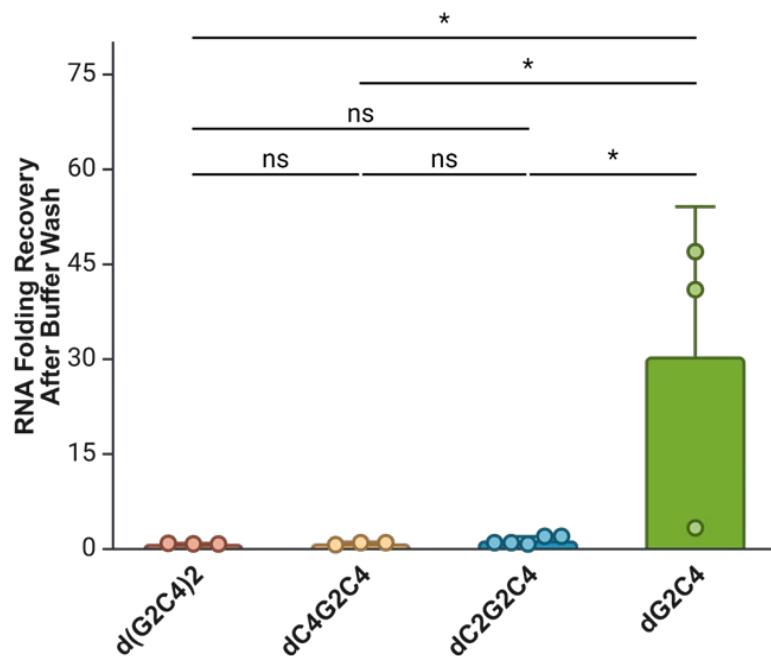




圖 6. 在 100 mM KCl 中，測定不同長度的寡核苷酸與 r(G₄C₂)₂ 的結合效率。

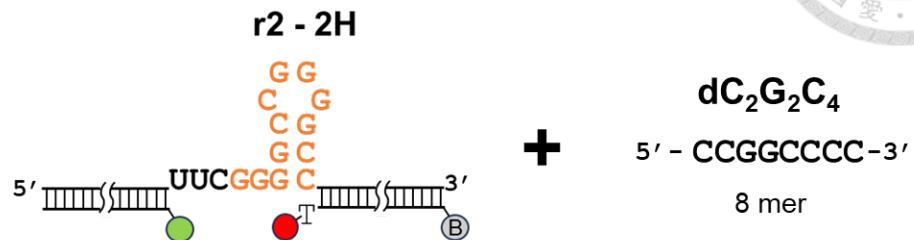
- A. 實驗設計：將慢速降溫處理的 r(G₄C₂)₂-2H 固定於玻片上，分別加在 0 (即為 RNA only)、100 nM 和 1 μM 的 Oligo 在 100 mM KCl 中進行反應。最後，使用相同的鹽離子緩衝液洗滌以測定 DNA-RNA 鍵結穩定性。經 UNAFold 軟體預測 DNA 與 RNA 結構。
- B. r(G₄C₂)₂-2H 分別在不同長度的寡核苷酸條件下的 FRET 族群分布圖，灰底為 r(G₄C₂)₂ 的初始摺疊狀態。
- C. 在不同長度的寡核苷酸作用下，計算不同實驗程序中 r(G₄C₂)₂-2H 摺疊形態倖存比例，此圖量化了 r(G₄C₂)₂-2H 結構展開的效率。
- D. 比較鹽離子緩衝液洗滌前後的 r(G₄C₂)₂-2H 摺疊形態倖存比例，以了解 DNA-RNA 鍵結穩定性。以 t test 作統計檢定，* P < 0.05, ns = not significant.。

註：參考表 3

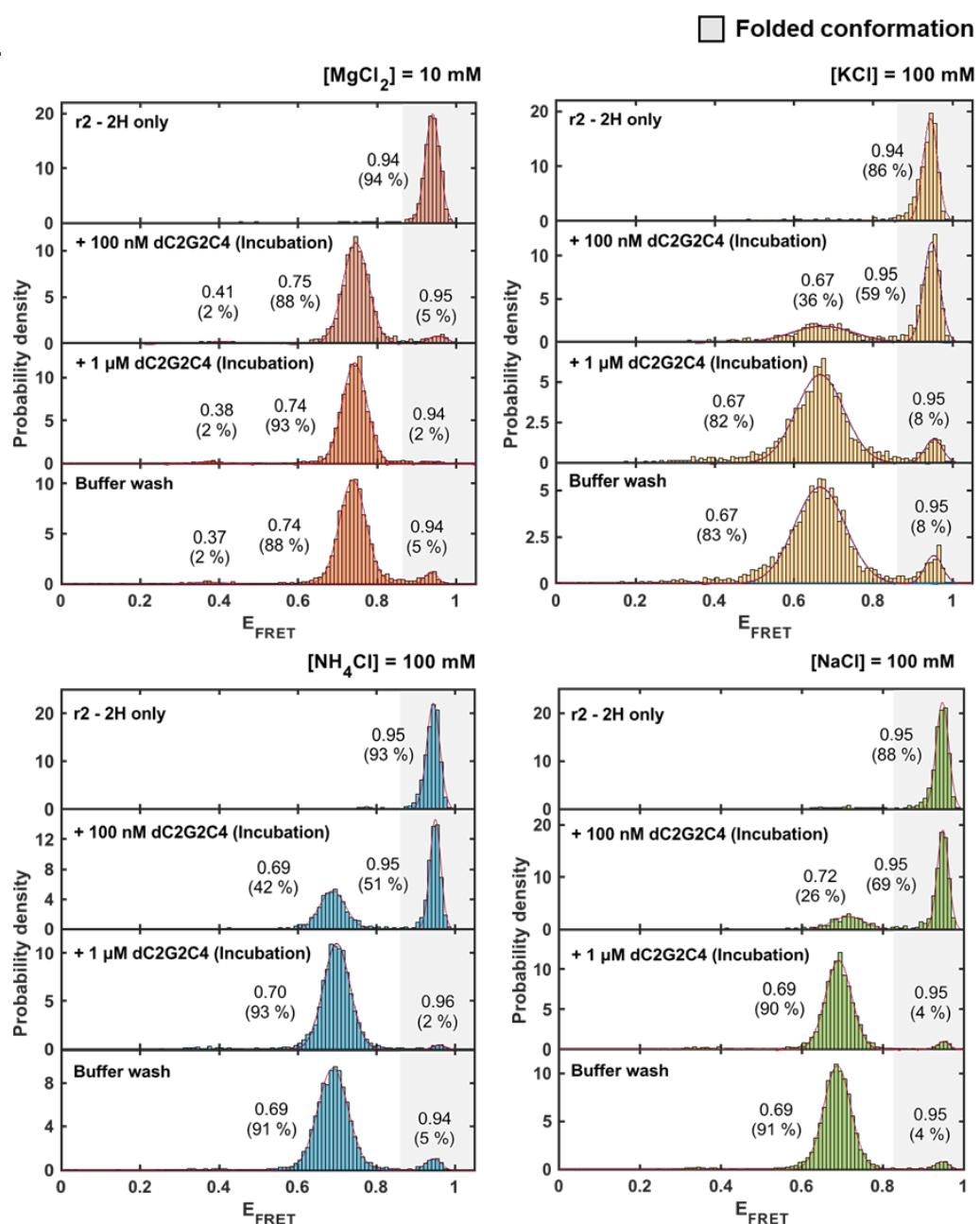


A.

$[\text{MgCl}_2] = 10 \text{ mM (pH 8)}$
 $[\text{KCl}] / [\text{NH}_4\text{Cl}] / [\text{NaCl}] = 100 \text{ mM (pH 8)}$

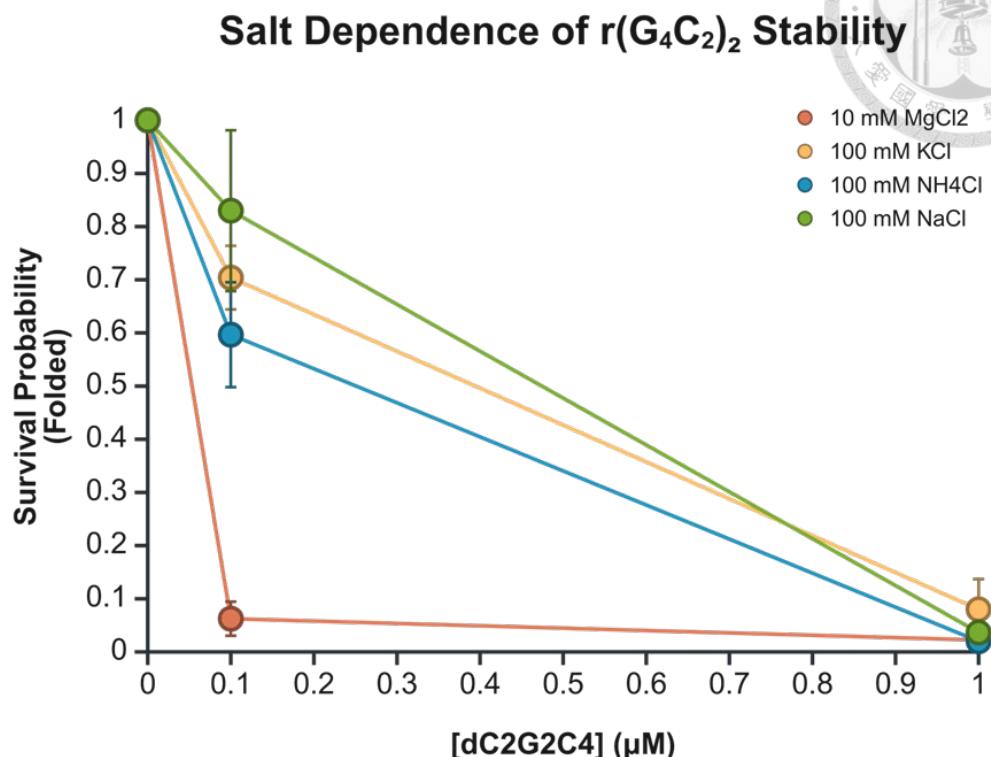


B.





C.



D.

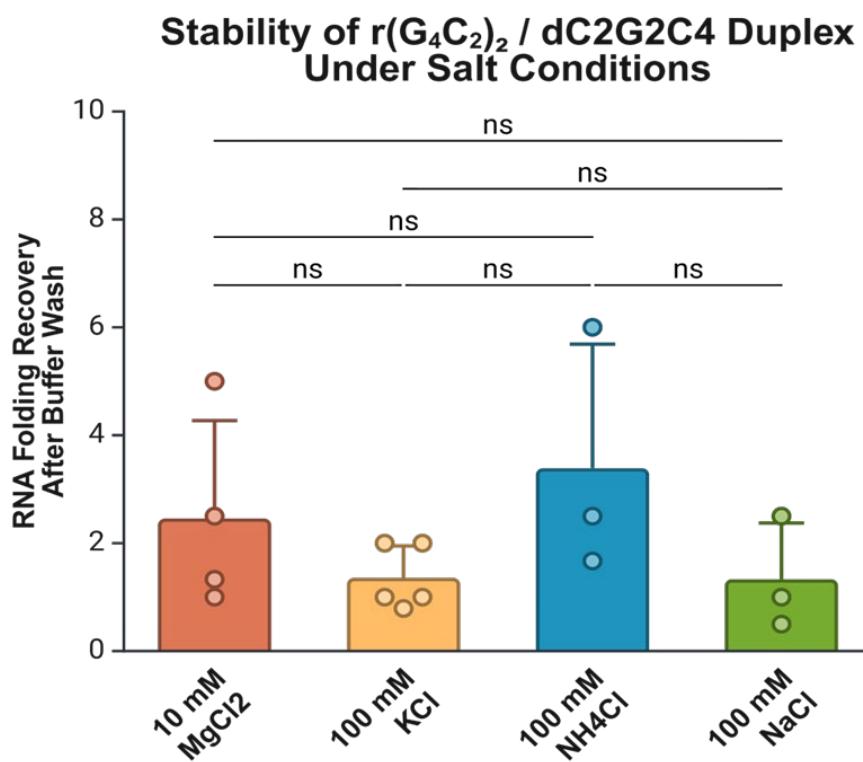




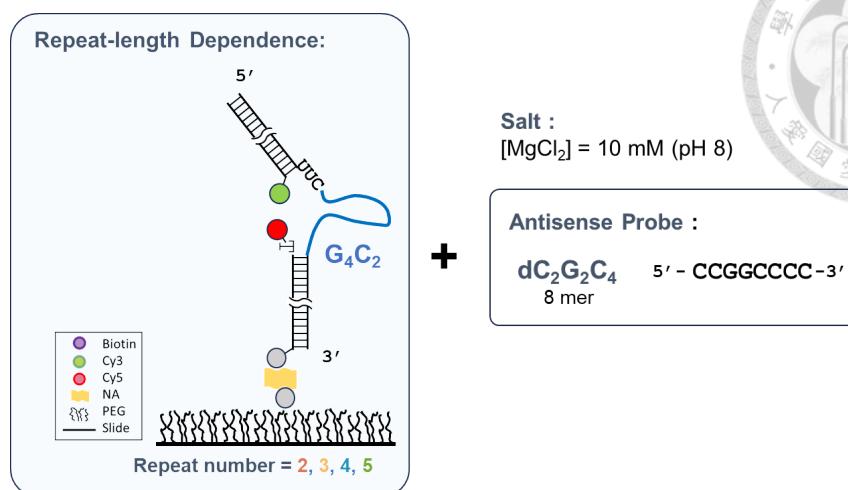
圖 7. 在不同鹽類環境中，以 dC₂G₂C₄ 測定 r(G₄C₂)₂ 的結構穩定性。

- A. 實驗設計：將慢速降溫處理的 r(G₄C₂)₂-2H 固定於玻片上，分別加在 0(即為 RNA only)、100 nM 和 1 μM 的 Oligo 在不同鹽類環境中進行反應。最後，使用相同的鹽離子緩衝液洗滌以測定 DNA-RNA 鍵結穩定性。經 UNAFold 軟體預測 RNA 結構。
- B. r(G₄C₂)₂-2H 分別在不同鹽類條件下的 FRET 族群分布圖，灰底為 r(G₄C₂)₂ 的初始摺疊狀態。
- C. 使用相同長度的寡核苷酸，在不同鹽類條件下，計算不同實驗程序 r(G₄C₂)₂-2H 摺疊形態倖存比例，此圖量化了 r(G₄C₂)₂-2H 結構展開的效率。
- D. 比較鹽離子緩衝液洗滌前後的 r(G₄C₂)₂-2H 摺疊形態倖存比例，以了解在不同鹽類條件下的 DNA-RNA 鍵結穩定性差異。以 t test 作統計檢定，ns = not significant.

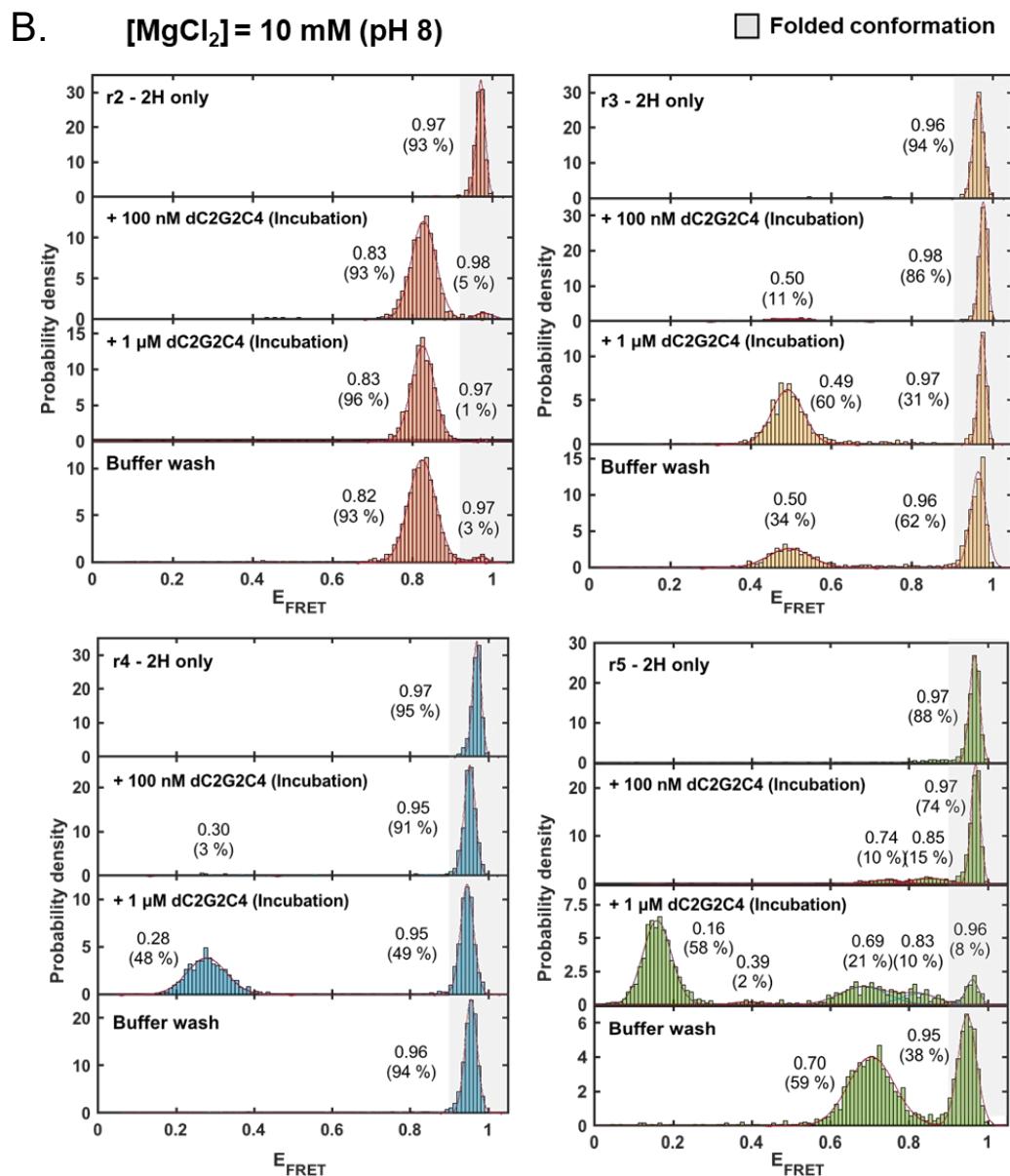
註：參考表 4

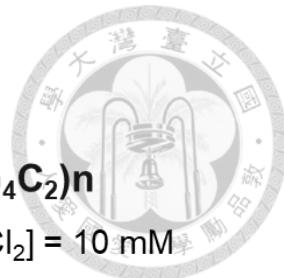


A.



B.

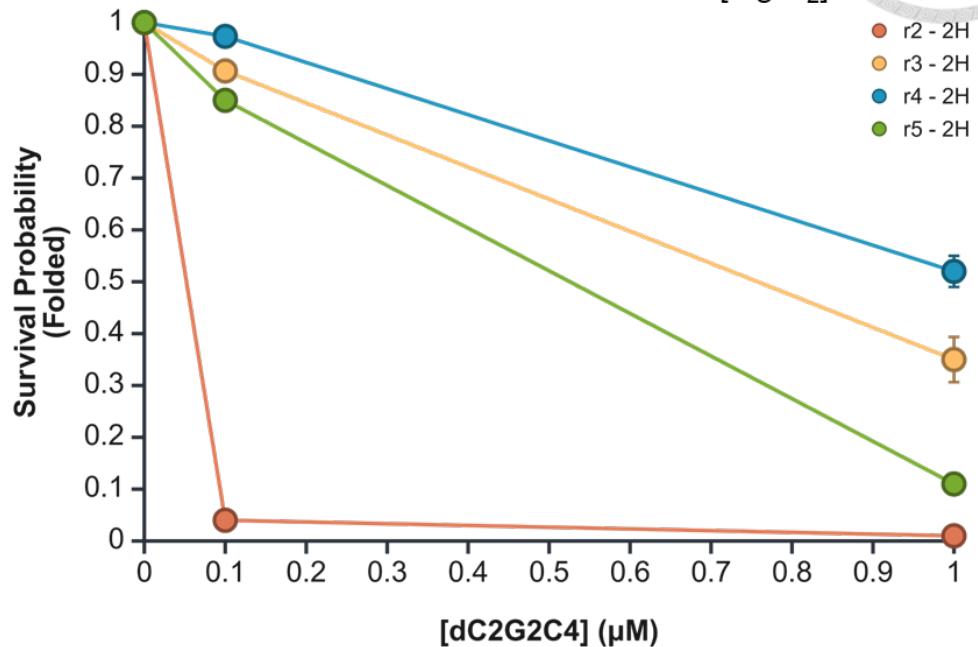




C.

Length-Dependent Stability of r(G₄C₂)_n

[MgCl₂] = 10 mM



D.

Stability of r(G₄C₂)_n / dC₂G₂C₄ Duplex

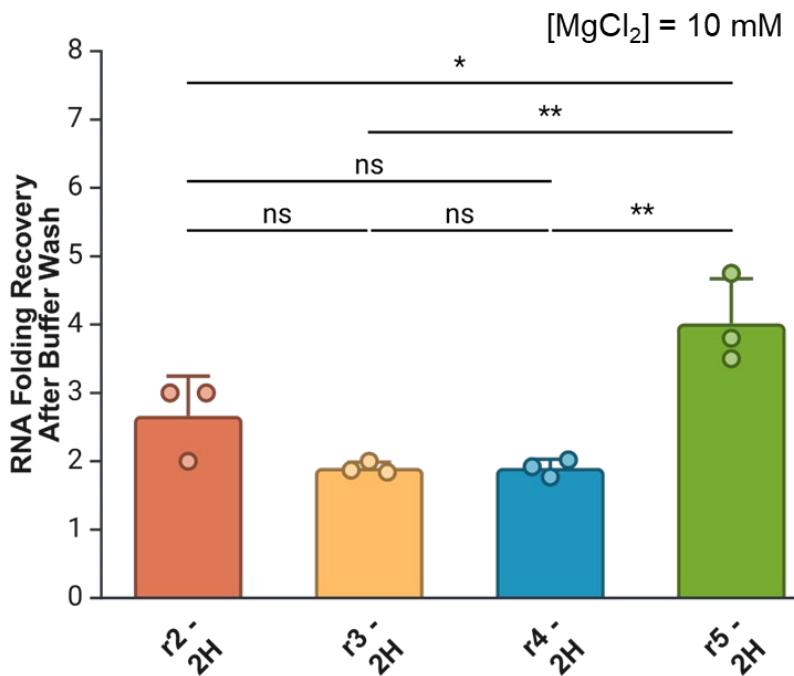




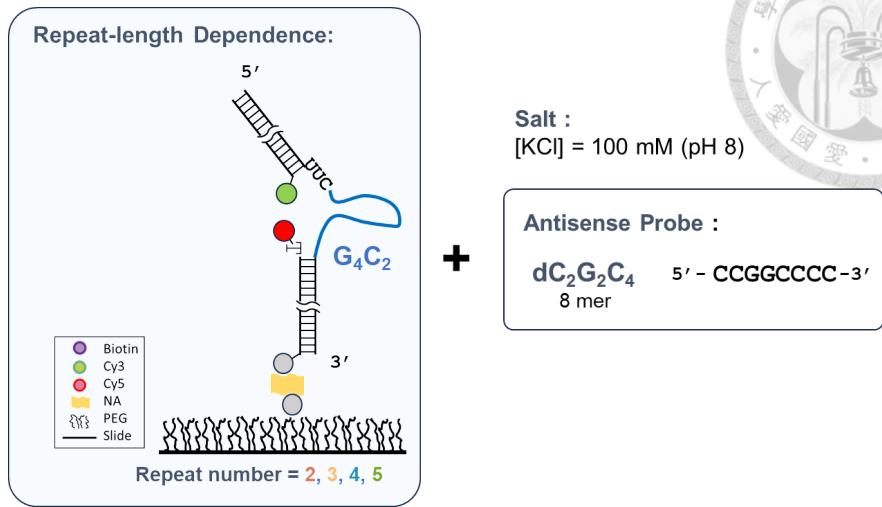
圖 8. 在 10 mM MgCl₂ 中，以 dC₂G₂C₄ 測定 r(G₄C₂)₂ 的結構穩定性。

- A. 實驗設計：將慢速降溫處理的 r(G₄C₂)_n-2H 固定於玻片上，n = 2, 3, 4, 5，分別加在 0 (即為 RNA only)、100 nM 和 1 μM 的 Oligo 在 10 mM MgCl₂ 中進行反應。最後，使用相同的鹽離子緩衝液洗滌以測定 DNA-RNA 鍵結穩定性。
- B. r(G₄C₂)_n-2H 分別在不同鹽類條件下的 FRET 族群分布圖，灰底為 r(G₄C₂)_n-2H 的初始摺疊狀態。
- C. 使用相同長度的寡核苷酸與鹽類條件下作用，計算不同實驗程序中 r(G₄C₂)_n-2H 摺疊形態倖存比例，此圖量化了 r(G₄C₂)_n-2H 結構展開的效率。
- D. 比較鹽離子緩衝液洗滌前後的 r(G₄C₂)_n-2H 摺疊形態倖存比例，以了解在不同重複次數條件下的 DNA-RNA 鍵結穩定性差異。以 t test 作統計檢定，** P < 0.01, * P < 0.05, ns = not significant.

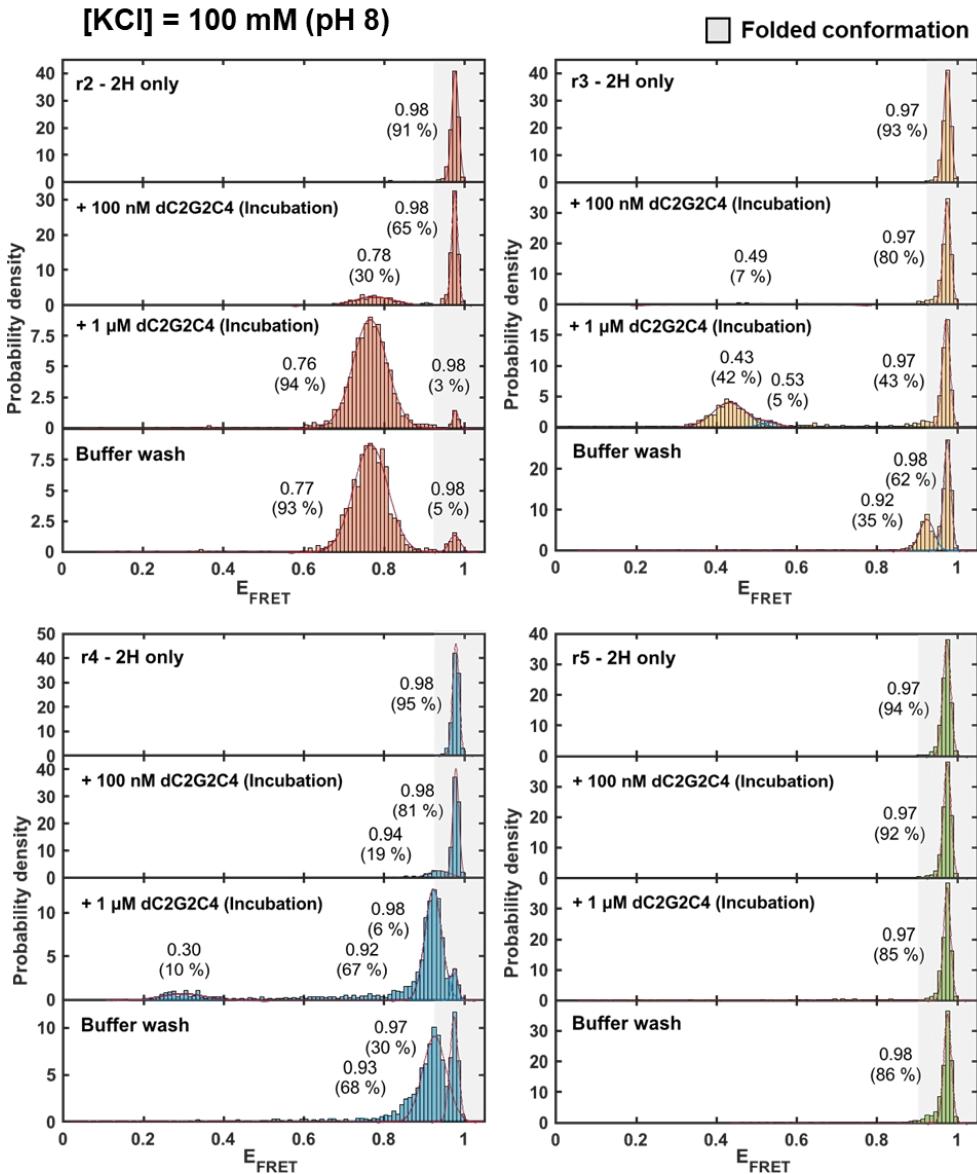
註：參考表 5

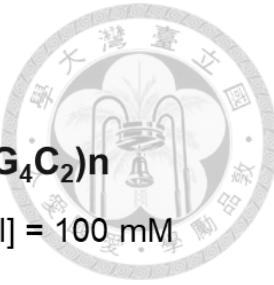


A.

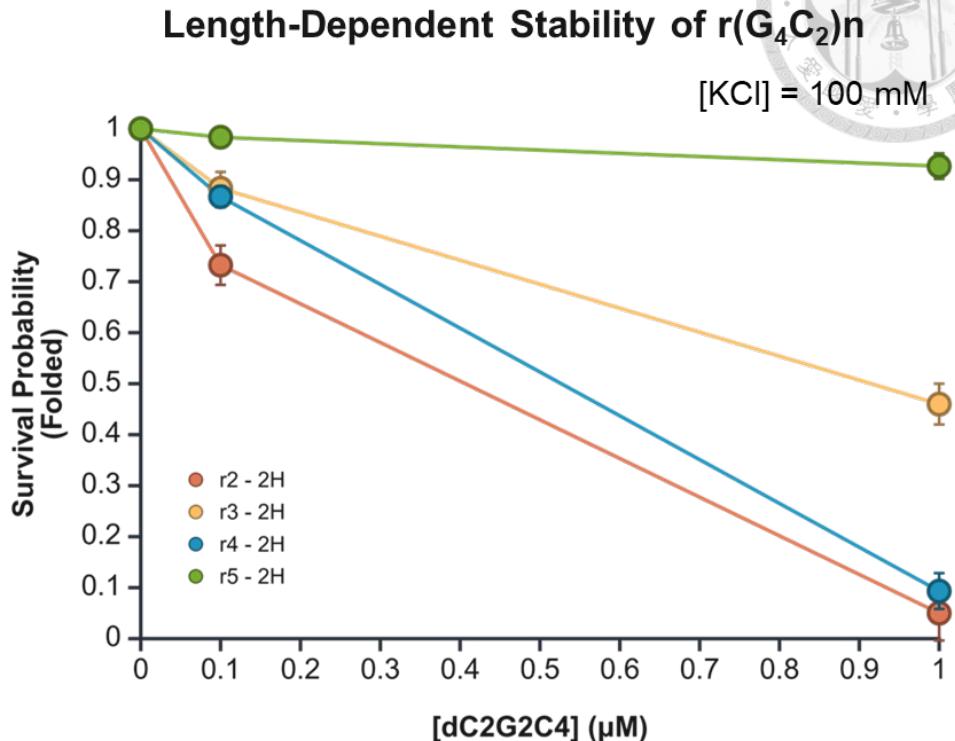


B.





C.



D.

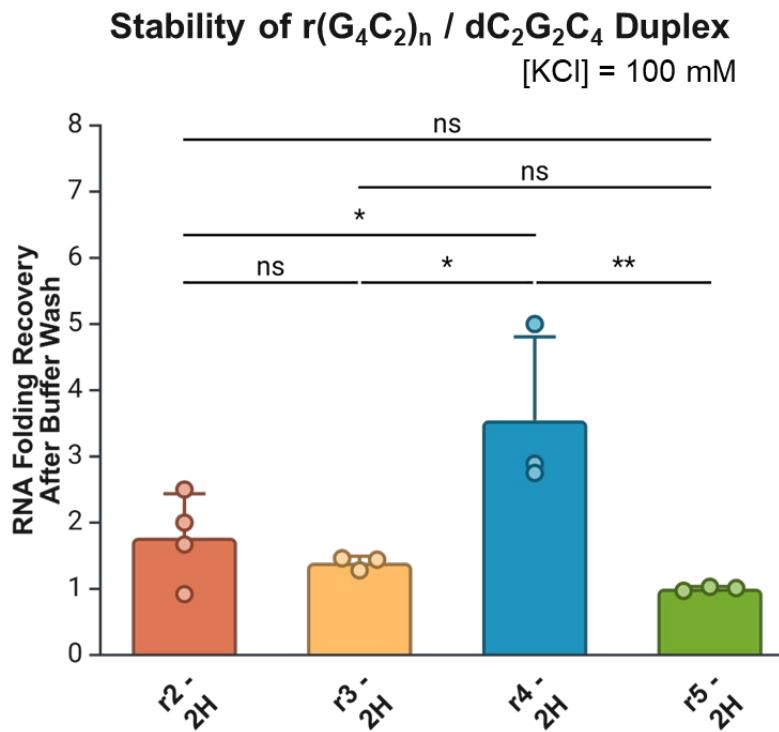
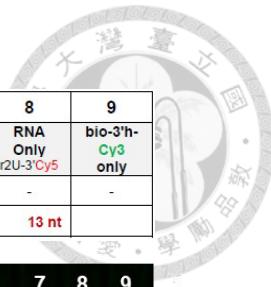




圖 9. 在 100 mM KCl 中，以 dC₂G₂C₄ 測定 r(G₄C₂)_n 的結構穩定性。

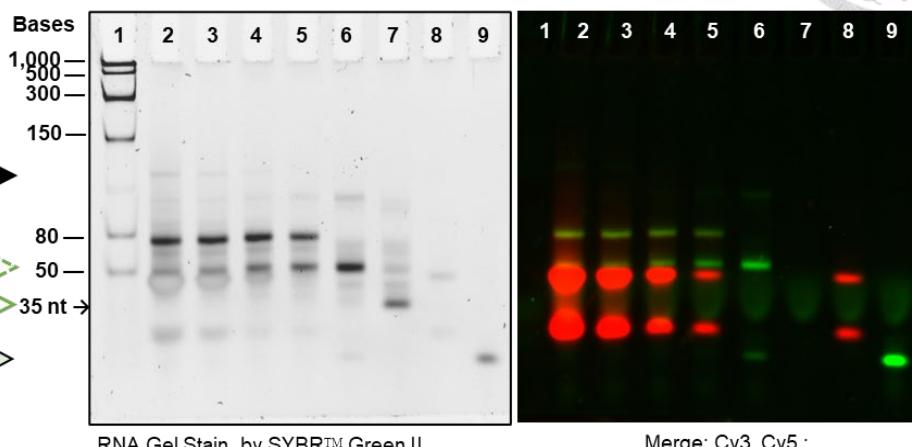
- A. 實驗設計：將慢速降溫處理的 r(G₄C₂)_n-2H 固定於玻片上，n=2, 3, 4, 5，分別加在 0 (即為 RNA only)、100 nM 和 1 μM 的 Oligo 在 100 mM KCl 中進行反應。最後，使用相同的鹽離子緩衝液洗滌以測定 DNA-RNA 鍵結穩定性。
- B. r(G₄C₂)_n-2H 分別在不同鹽類條件下的 FRET 族群分布圖，灰底為 r(G₄C₂)_n-2H 的初始摺疊狀態。
- C. 使用相同長度的寡核苷酸與鹽類條件下作用，計算不同實驗程序中 r(G₄C₂)_n-2H 摺疊形態倖存比例，此圖量化了 r(G₄C₂)_n-2H 結構展開的效率。
- D. 比較鹽離子緩衝液洗滌前後的 r(G₄C₂)_n-2H 摺疊形態倖存比例，以了解在不同重複次數條件下的 DNA-RNA 鍵結穩定性差異。以 t test 作統計檢定，** P < 0.01, * P < 0.05, ns = not significant.

註：參考表 6



A.

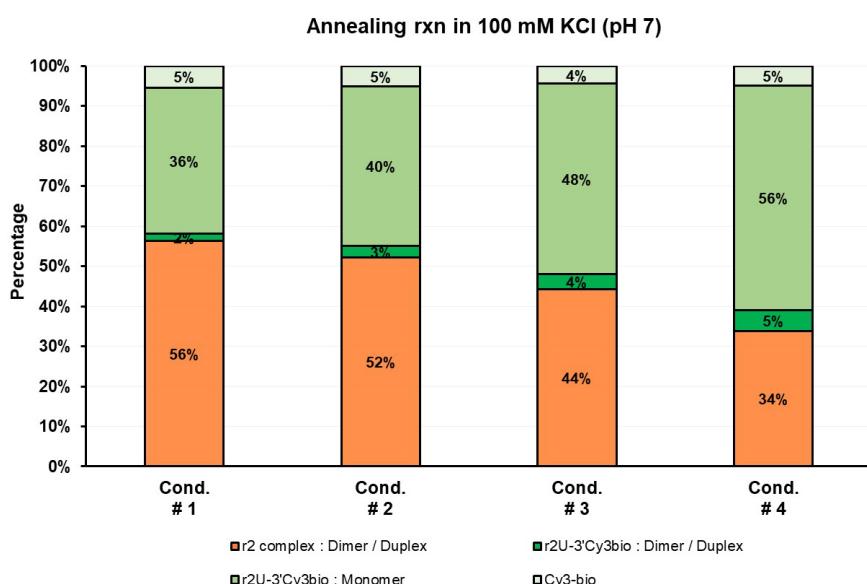
Lane	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Name	Low Range ssRNA Ladder (NEB # N0364)	Cond. #1	Cond. #2	Cond. #3	Cond. #4	r2U-3'Cy3bio	RNA Only r2U-3'h	RNA Only r2U-3'Cy5	bio-3'h-Cy3 only
RNA Size	-	S	S	S	S	S	-	-	-

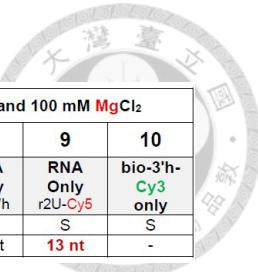


- Impurities from preparation of r2U-3'Cy5
- ▷ Bio-3'h-Cy3
- ▷ r2U-3'h (Dimer / duplex)
- ▷ r2U-3'h (Monomer)
- ▷ r2U-3'Cy3bio (Dimer / duplex)
- ▷ r2U-3'Cy3bio (Monomer)
- ▷ r2U-3'Cy5 (Dimer / duplex)
- ▷ r2U-3'Cy5 (Monomer)
- ▷ r2 complex (Dimer / duplex)

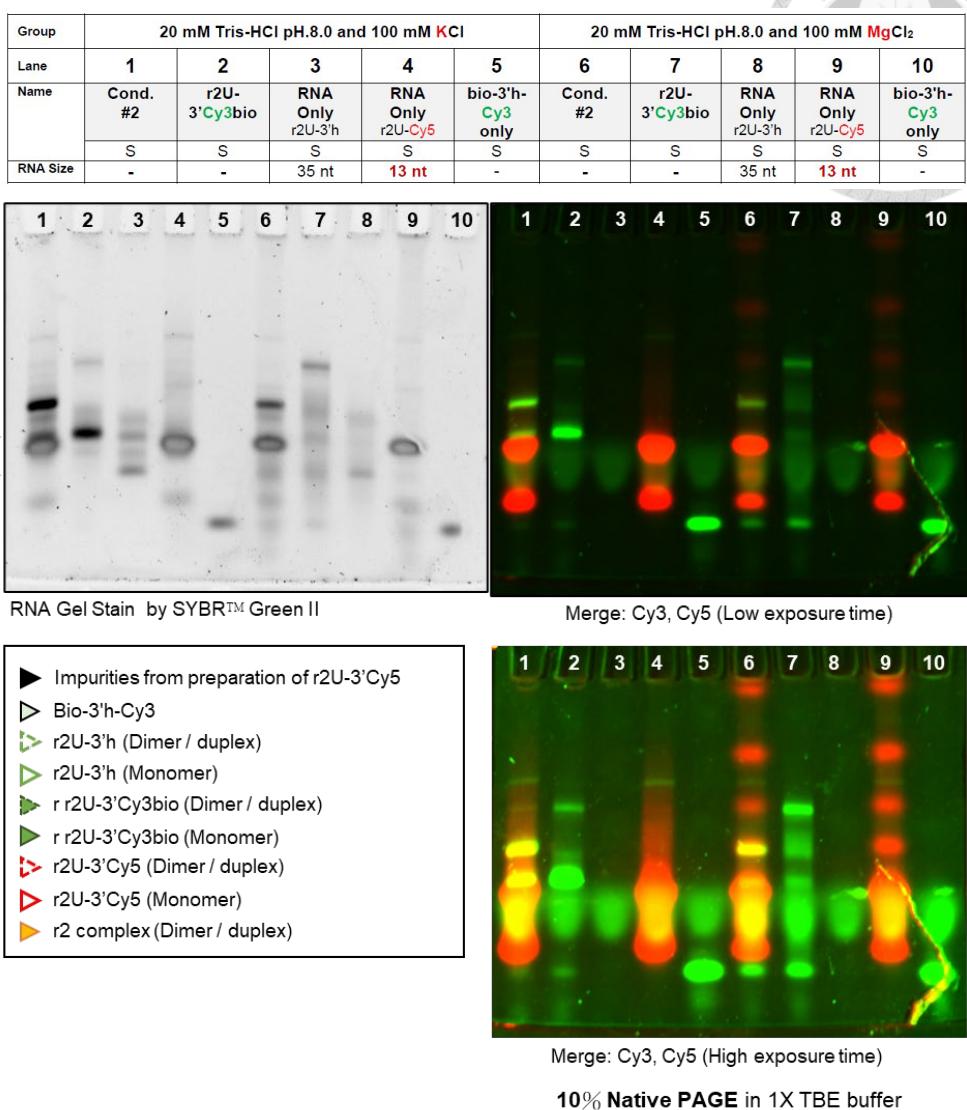
10% Native PAGE in 1X TBE buffer

B.





C.



D.

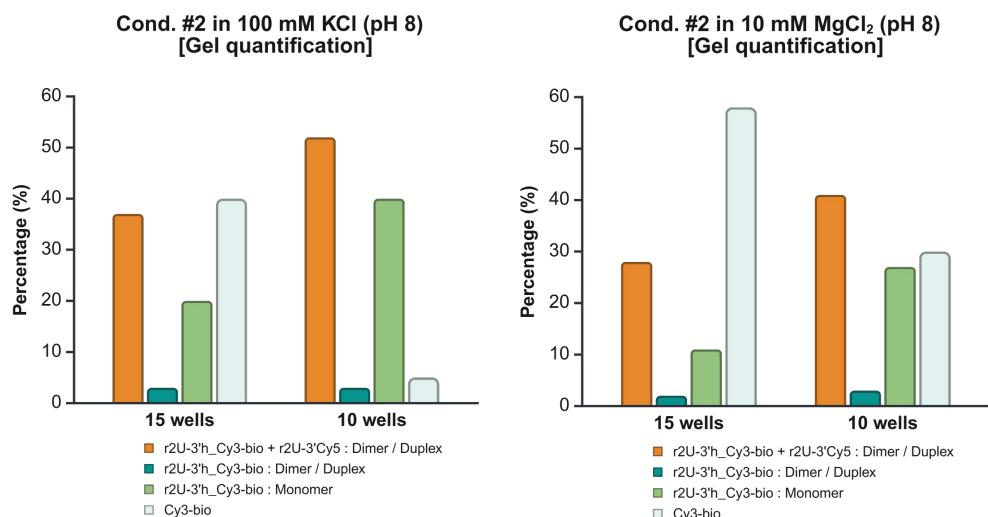




圖 10.利用膠體電泳檢測 r(G₄C₂)₂ 複合物的組裝效率。

- A. 在 20 mM Tris-HCl (pH 7) 和 100 mM KCl 的條件下，採用不同濃度的 r2U-3'Cy5 與固定比例的 r2U-3'h 和 Bio-3'h-Cy3 進行黏合反應以組裝 r(G₄C₂)₂ 複合物。

Cond.#1: 40 μM r2U-3'Cy5, 0.5 μM r2U-3'h 和 0.25 μM Bio-3'h -Cy3

Cond.#2: 20 μM r2U-3'Cy5, 0.5 μM r2U-3'h 和 0.25 μM Bio-3'h -Cy3

Cond.#3: 10 μM r2U-3'Cy5, 0.5 μM r2U-3'h 和 0.25 μM Bio-3'h -Cy3

Cond.#4: 5 μM r2U-3'Cy5, 0.5 μM r2U-3'h 和 0.25 μM Bio-3'h -Cy3

(S):為慢速降溫處理，在 90°C 進行 3 分鐘變性反應，接續以每分鐘降溫 1 °C，直到 25°C 至隔天收取樣品。

(-):保存於 4°C，待其他樣品跑膠。

- B. 將 A 膠圖所呈現的 Cy3 信號進行定量，以計算出 r(G₄C₂)₂ 複合物組裝效率與推測可能的結構形態。

- C. 採用圖 10A 之條件# 2 (20 μM r2U-3'Cy5, 0.5 μM r2U-3'h 和 0.25 μM Bio-3'h -Cy3) 分別在 100 mM KCl 和 10 mM MgCl₂ 下進行黏合反應以組裝 r2 complex。

(S):為慢速降溫處理，在 90°C 進行 3 分鐘變性反應，接續以每分鐘降溫 1°C，直到 25°C 至隔天收取樣品。

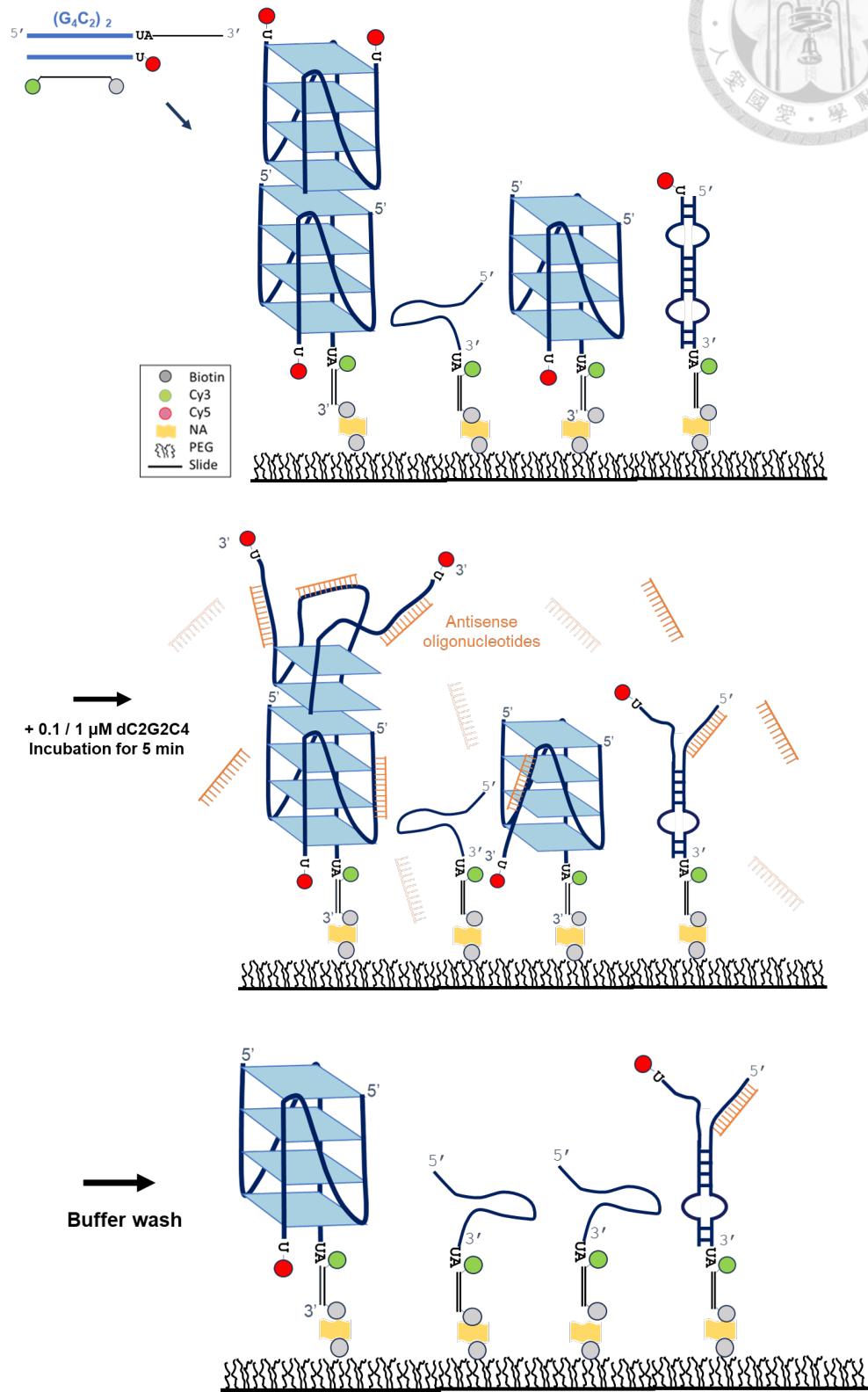
- D. 將 C 膠圖所呈現的 Cy3 信號進行定量，以計算出 r(G₄C₂)₂ 複合物在不同離子條件下的組裝效率與推測可能的結構形態。

註：以相同實驗配置在不同天分別以 15 wells 和 10 wells 進行膠體電泳與定量，發現凝膠的孔數會影響樣品的 band 清晰度，而造成定量結果差異。

Data from 2025/04/18, 2025/06/23, 2025/06/29



A.



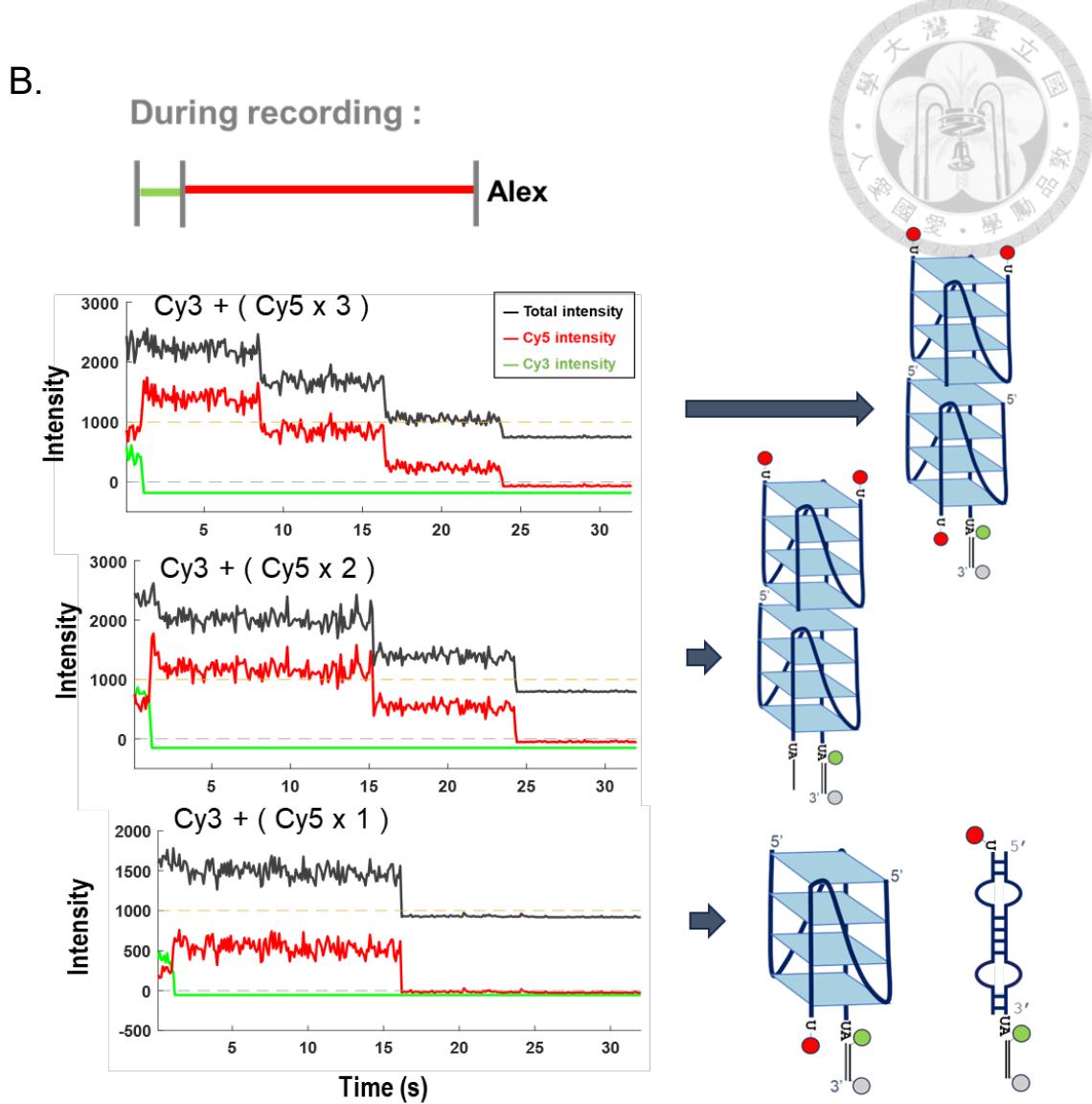


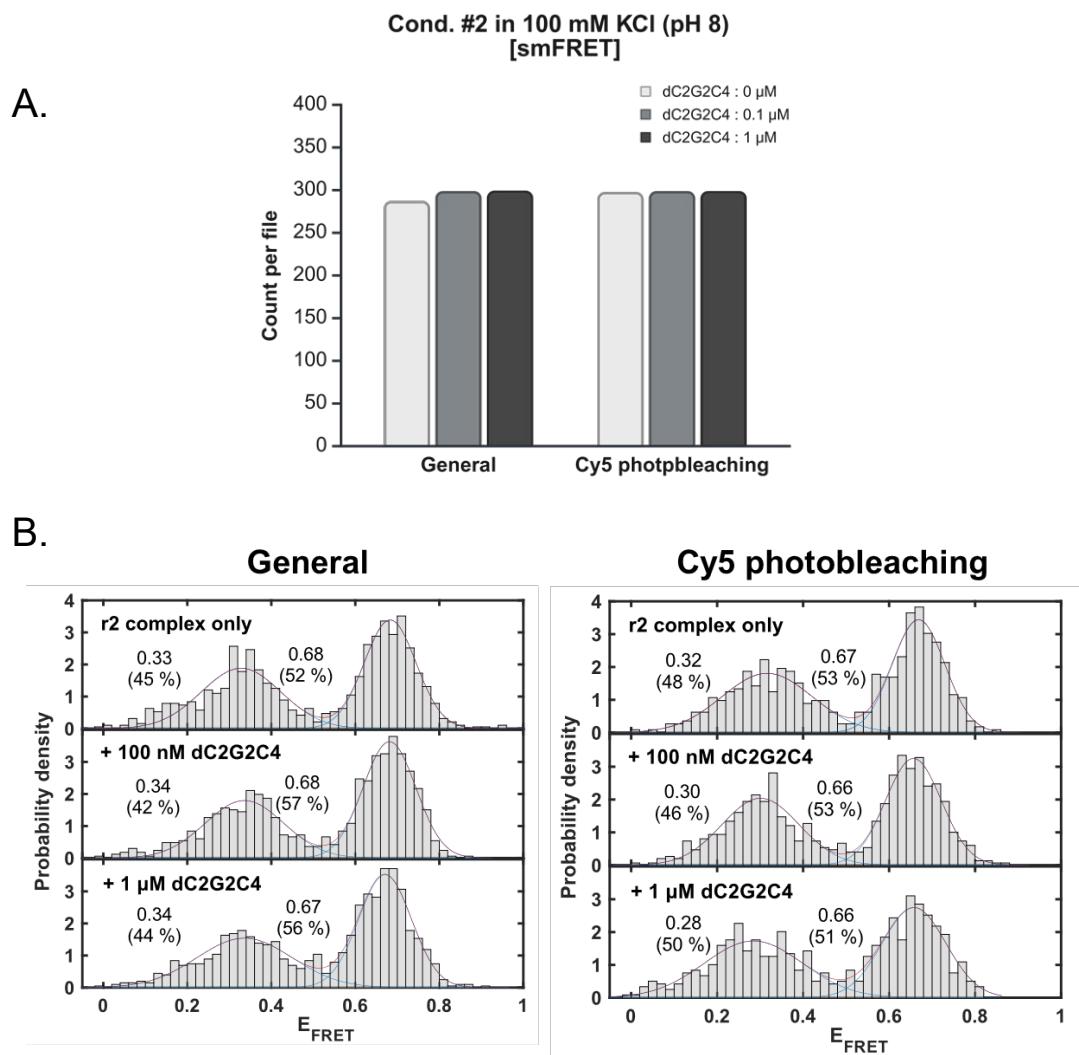
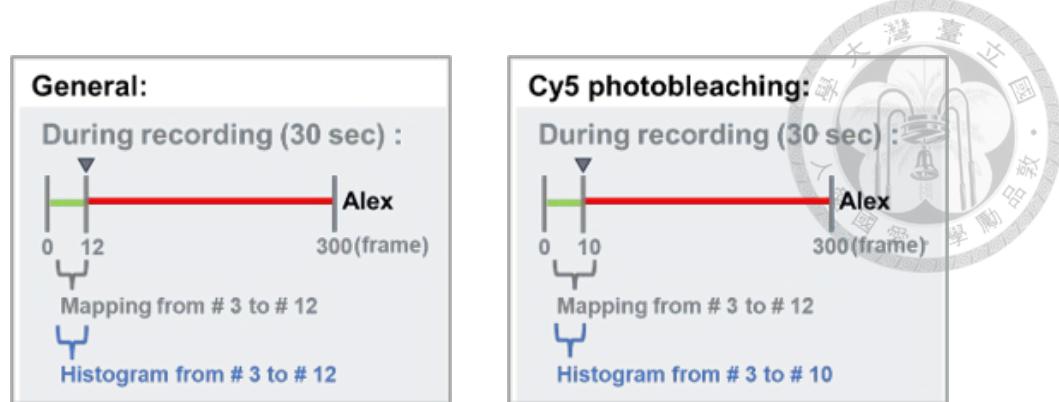
圖 11.利用反義寡核苷酸探測 $r(G_4C_2)_2$ 複合物結構穩定性之實驗示意圖。

- A. 將 $r(G_4C_2)_2$ 複合物固定於玻片上，以 Cy5 photobleaching 實驗以使 Cy5 信號光漂白測定其結構組成，再來，加入不同濃度的反義寡核苷酸作用 5 分鐘後用相同鹽類洗滌以中止反應，若反義寡核苷酸成功地結合於 $r(G_4C_2)_2$ 複合物，將可能破壞其結構而降低 Cy5 信號比例，以顯示其結構的穩定性。
- B. 雷射條件為初始以綠光激發 Cy3 螢光分子來定位 $r(G_4C_2)_2$ 複合物，接續以紅光追蹤 Cy5 信號以測定 r2 complex 結構形態。
- 上：樣品若帶有 Cy3 與三階的 Cy5 信號，有可能是 $r(G_4C_2)_2$ 複合物 (Tetramer G4)



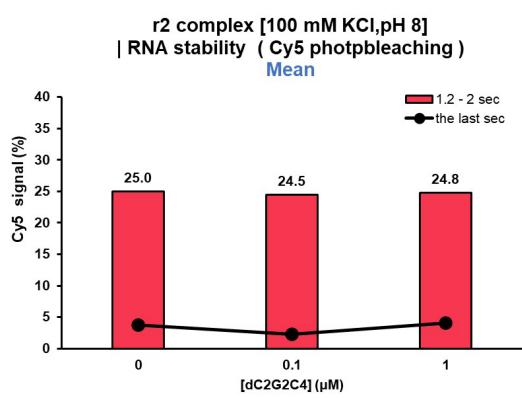
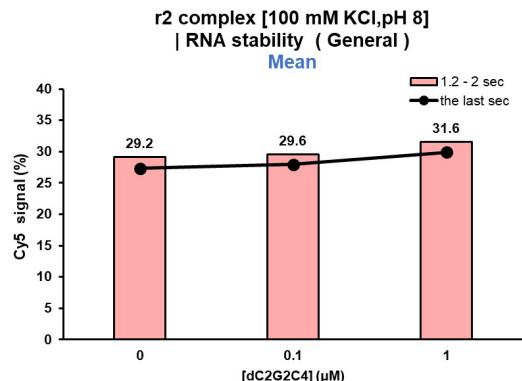
中：樣品若帶有 Cy3 與二階的 Cy5 信號，有可能是 $r(G_4C_2)_2$ 複合物（帶有一股未標示螢光的 Tetramer G4）

下：樣品若帶有 Cy3 與一階的 Cy5 信號，較為可能是 $r(G_4C_2)_2$ 複合物(Dimer G4 或是 Duplex)

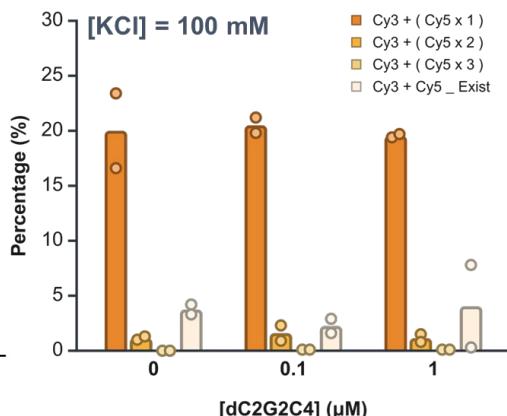




C. Cy5 photobleaching:
During recording (30 sec) :



D. Type of r2 complex



E.

r2 complex only :

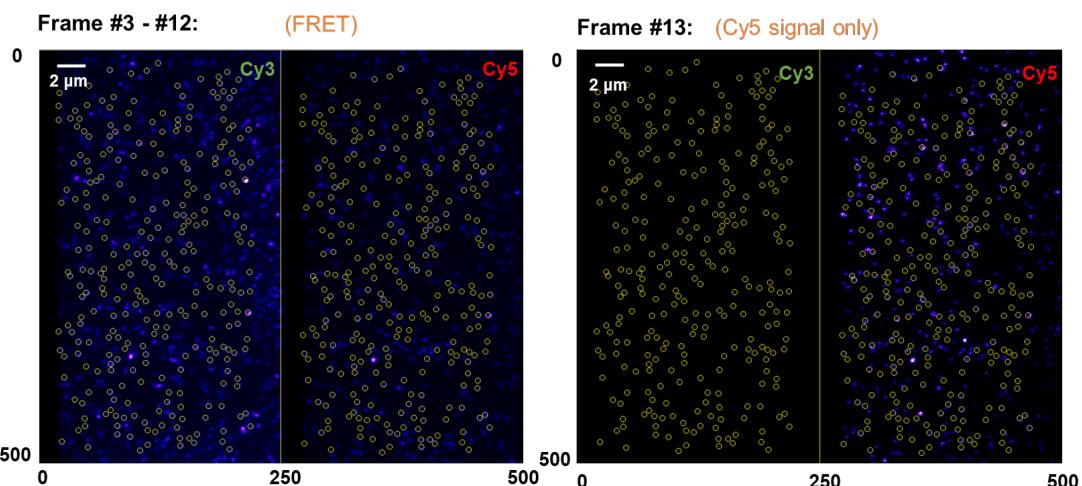
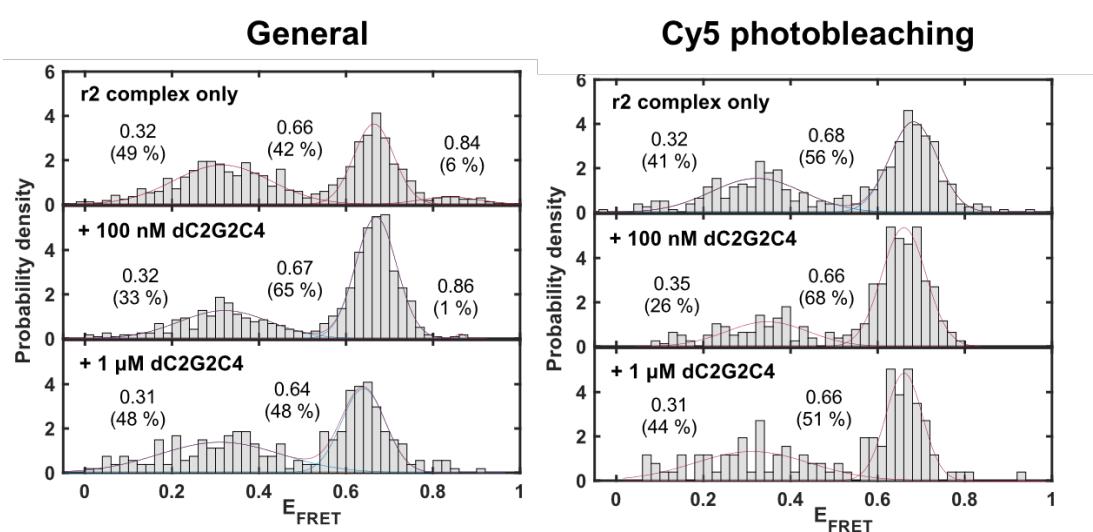
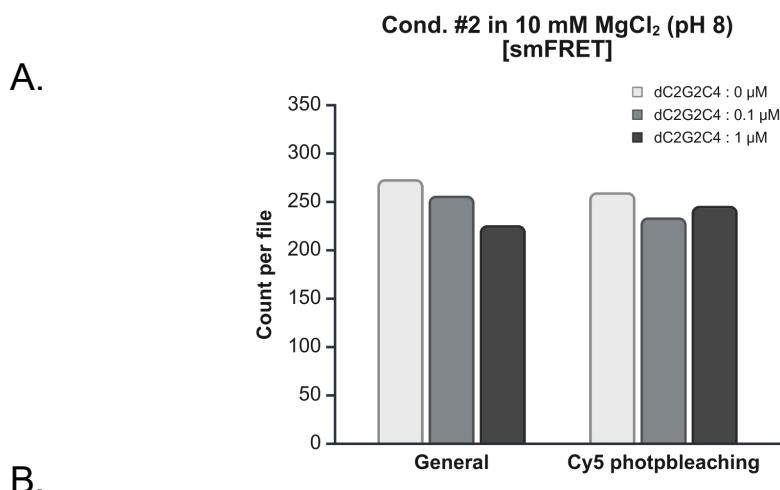
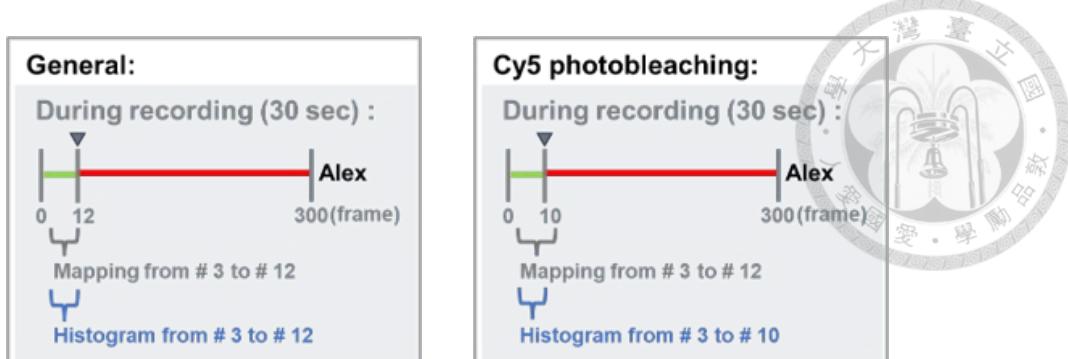




圖 12. 在 100 mM KCl 中，以 dC₂G₂C₄ 測定 r(G₄C₂)₂ 複合物的結構穩定性。

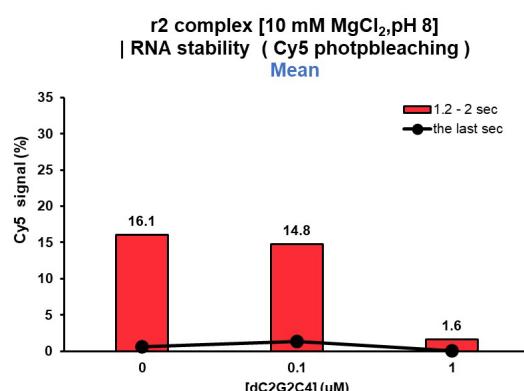
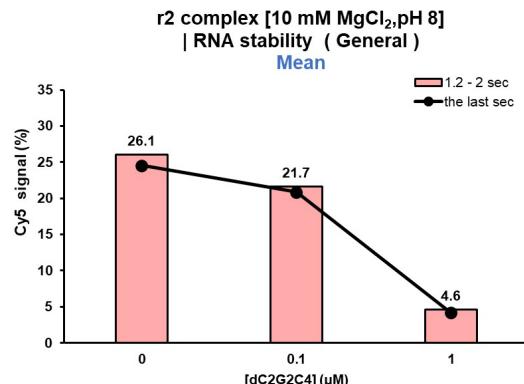
- A. 根據 Frame #3 至 #12 疊加的螢光信號，比較無/有 Cy5 photobleaching 的條件下在每個視野下（參考圖 12A，頂端）所能收錄的分子數量是否差異，結果表明螢光信號無明顯受影響，以兩次獨立實驗的平均數呈現。
- B. 此為在無/有 Cy5 photobleaching 的實驗下，Frame #3 至 #12 的 FRET 族群分布圖，在不同條件下無明顯差異。
- C. 在無/有 Cy5 photobleaching 的實驗下，比較在加入不同濃度 Oligo 作用後，在 Frame #12 至 #20 的 Cy5 信號占整體收錄分子的比例，顯示無明顯差異，並同時顯示最後一秒 Cy5 信號的比例以確定其穩定性，以兩次獨立實驗的平均數呈現。
- D. r2 complex 的化學計量分析。此 Cy5 光漂白步階分佈圖比較了在對照條件 (RNA only) 與不同濃度 ASO 作用並洗滌後，單個複合物中所含的 Cy5 分子數目。
- E. 此為在 Cy5 photobleaching 的實驗下，分別為 Frame #3 至 #12 (以綠光激發 Cy3 融光分子發生 FRET) 與 Frame #13 (僅以紅光照射追蹤 Cy5 信號)，黃色圓圈為 Cy3-Cy5 共定位的分子，可見在 Frame #13 可見其餘未能被圈點的亮點。

Data from 2025/07/03、2025/07/05

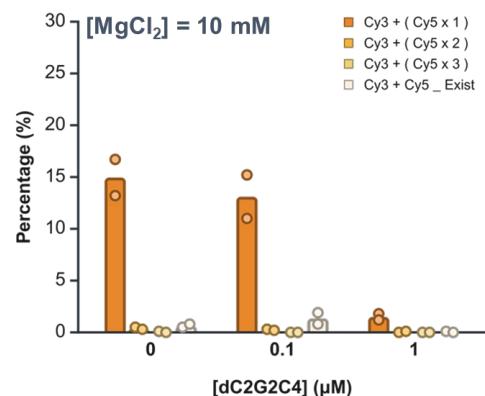




C. During recording (30 sec) :



D. Type of r2 complex



E.

r2 complex only :

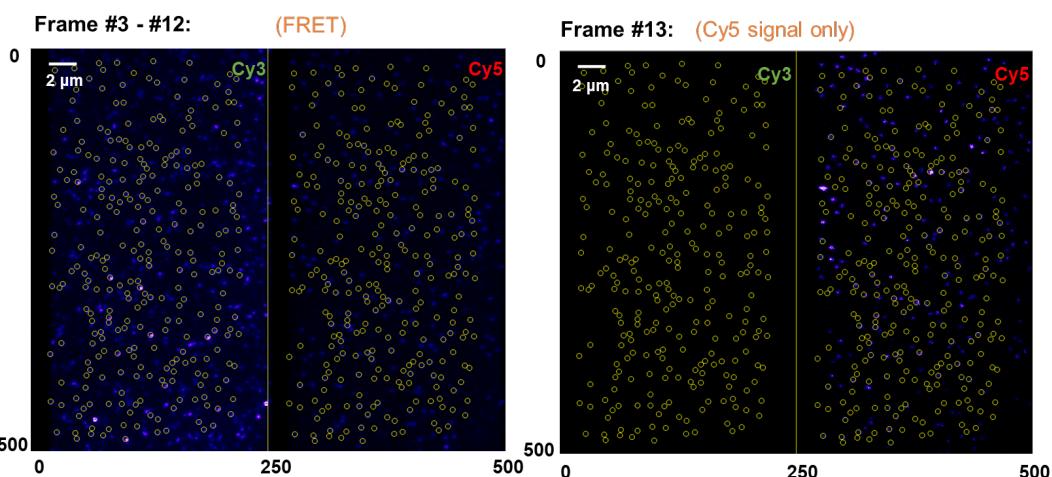




圖 13. 在 10 mM MgCl₂ 中，以 dC₂G₂C₄ 測定 r(G₄C₂)₂ 複合物的結構穩定性。

- A. 根據 Frame # 3 至 #12 疊加的 Cy3 信號（參考圖 13A，頂端），比較無/有 Cy5 photobleaching 的條件下在每個視野下所能收錄的分子數量是否差異，結果表明 Cy3 信號無略微影響，以兩次獨立實驗的平均數呈現。
- B. 此為在無/有 Cy5 photobleaching 的實驗下，Frame # 3 至 #12 的 FRET 族群分佈圖，在不同條件下無明顯差異。
- C. 在無/有 Cy5 photobleaching 的實驗下，比較在加入不同濃度 Oligo 作用後，在 Frame # 12 至 #20 的 Cy5 信號占整體收錄分子的比例，顯示在與 1 μM Oligo 進行作用後有明顯差異，並同時顯示最後一秒 Cy5 信號的比例以確定其穩定性，以兩次獨立實驗的平均數呈現。
- D. r2 complex 的化學計量分析。此 Cy5 光漂白步階分佈圖比較了在對照條件（RNA only）與不同濃度 ASO 作用並洗滌後，單個複合物中所含的 Cy5 分子數目。
- E. 此為在 Cy5 photobleaching 的實驗下，分別為 Frame # 3 至 #12 (以綠光激發 Cy3 融光分子發生 FRET) 與 Frame # 13 (僅以紅光照射追蹤 Cy5 信號)，黃色圓圈為 Cy3-Cy5 共定位的分子，可見在 Frame # 13 可見其餘未能被圈點的亮點。

Data from 2025/07/03、2025/07/05

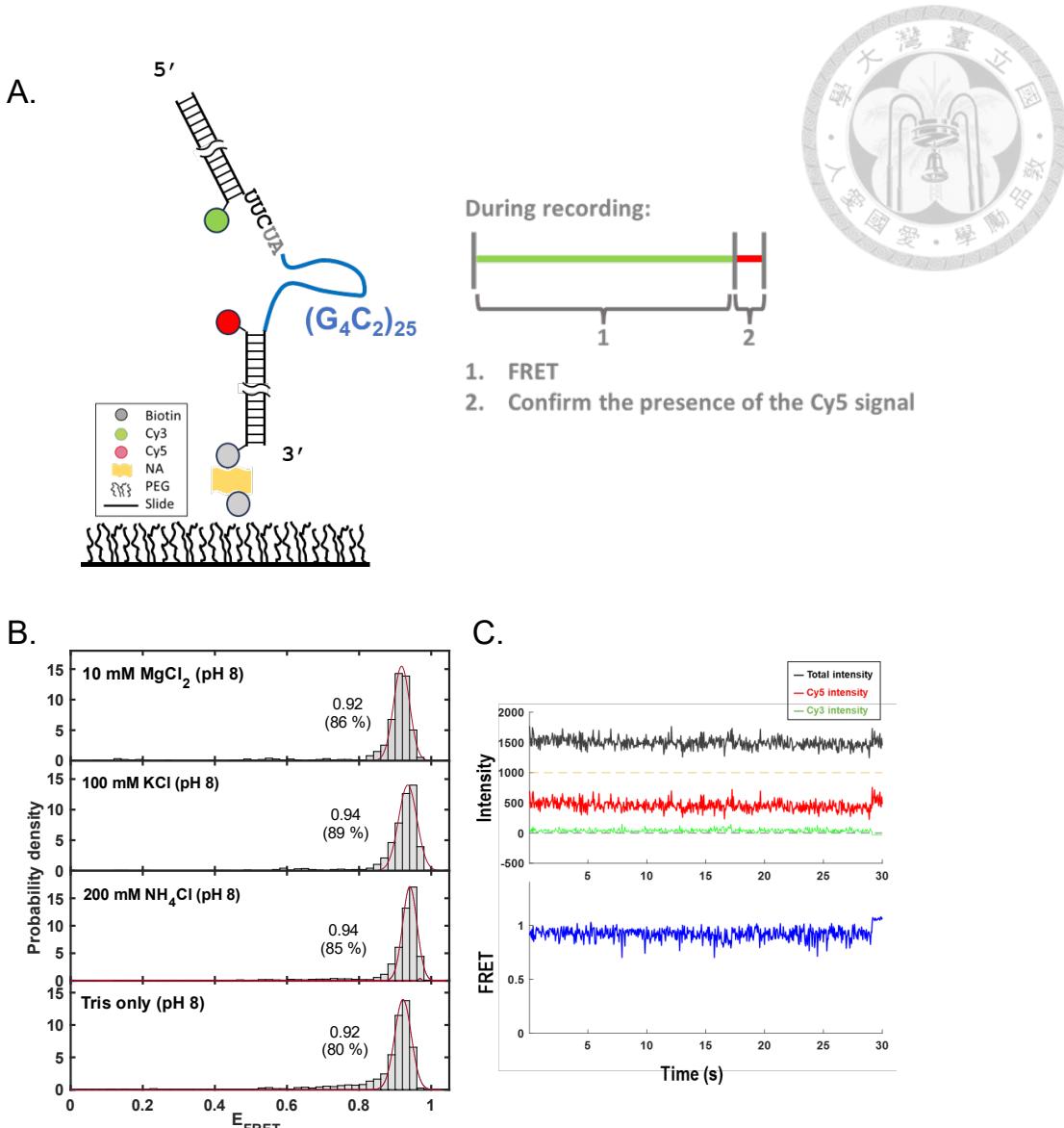


圖 14. 在不同鹽類中測定 $r(G_4C_2)_{25}$ 的構形特性。

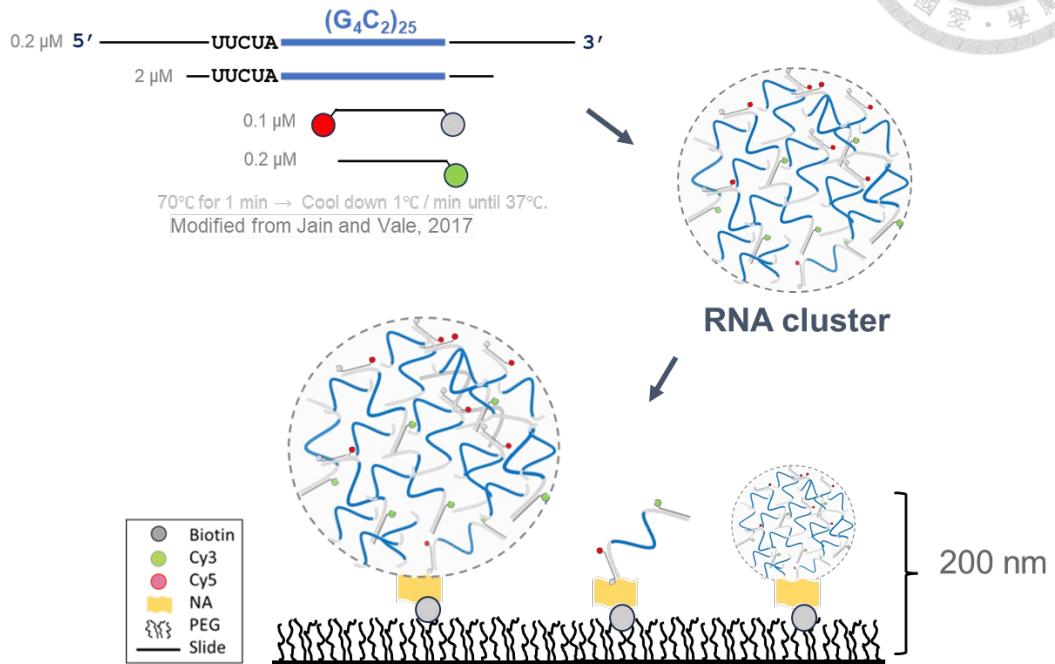
- A. 實驗設計：將快速降溫處理的 $r(G_4C_2)_{25}-2H$ 固定於玻片上，並分別在不同的玻片腔室測定鹽類條件。雷射條件設定為持續綠光激發 Cy3 融光分子以發生 FRET，最後一秒以紅光確認 Cy5 信號的穩定性。
- B. $r(G_4C_2)_{25}-2H$ 分別在 20 mM Tris-HCl, Ph 8.0 / + 10 mM $MgCl_2$ / +100 mM KCl /+ 200 mM NH_4Cl 的鹽類條件下之 FRET 族群分布圖。
- C. Trace 主要為非動態變化的 High FRET，此為取自 100 mM KCl 條件作為代表。

Data from 2024/09/04



A.

Under 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM MgCl₂:



B.

Total internal reflection

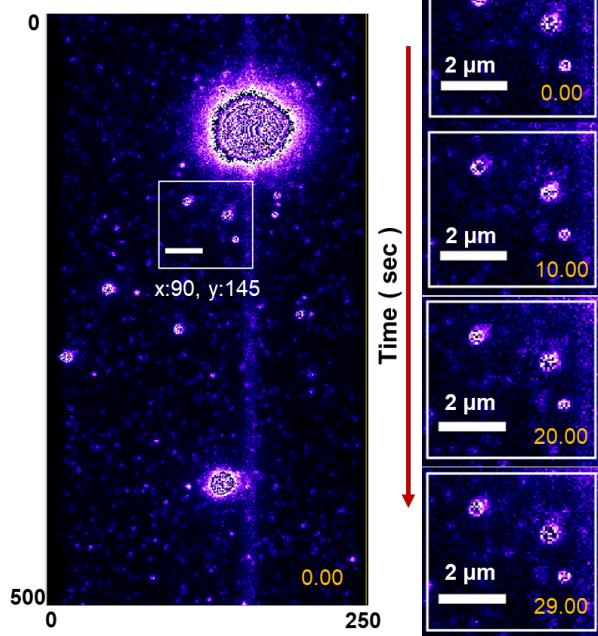
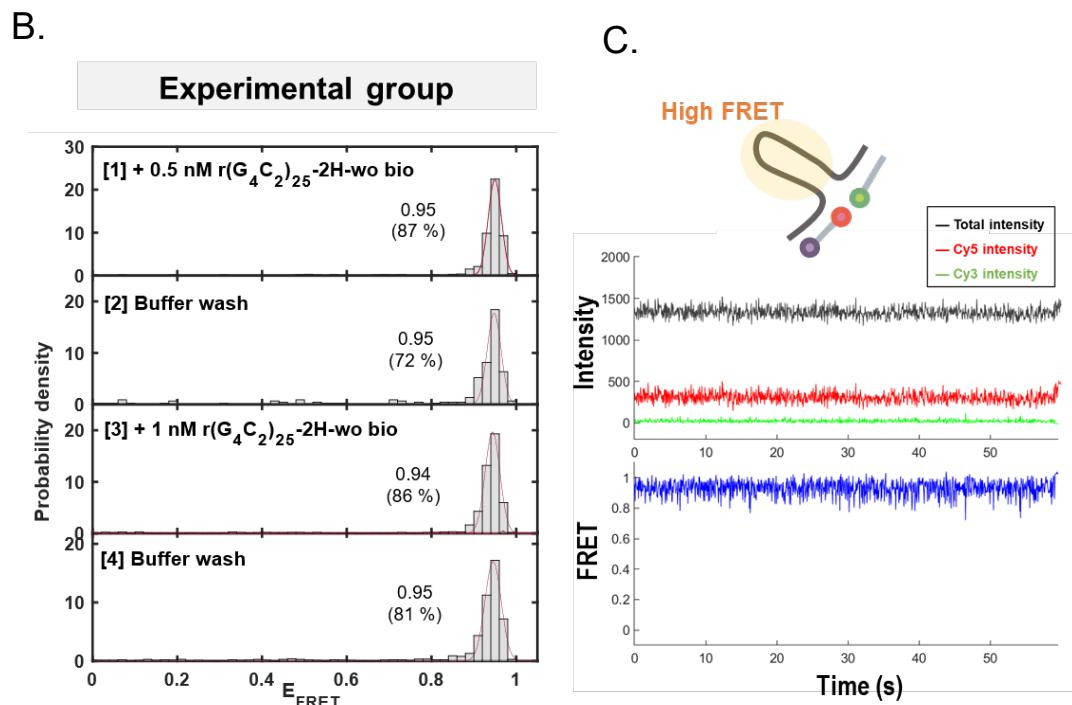
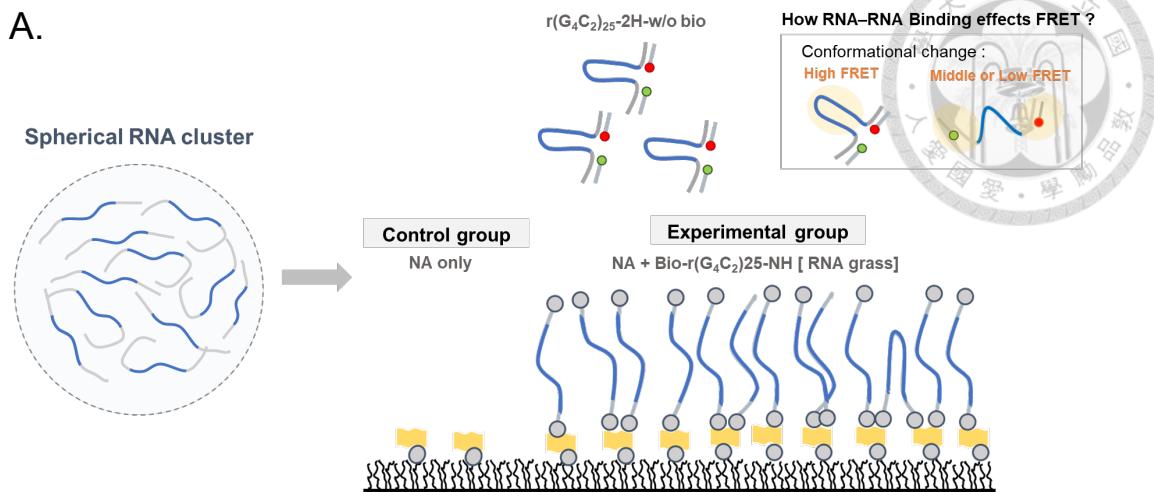




圖 15.在 10 mM MgCl₂ 中，由多個分子的 r(G₄C₂)₂₅ 組裝成 RNA 團簇。

- A. 參考先前文獻的研究方法 (Jain & Vale, 2017)，在 10 mM MgCl₂ (pH 8) 的條件下，使用 0.2 μM 帶有手柄側翼序列的 r(G₄C₂)₂₅ 黏合兩個單股 DNA 手柄以標記螢光及生物素分子(Cy3-, Cy5-, Bio-)，並與 2 μM 無手柄側翼序列的 r(G₄C₂)₂₅ 進行組裝。將混合物加熱至 70°C，緩慢冷卻 (-1°C/min) 至 37 °C，稀釋樣品濃度，最後，注入反應室，在全內反射螢光 (TIRF) 顯微鏡上須注意僅可觀察貼附於靠近蓋玻片 200 nm 以內所發生的螢光反應。
- B. 在 10 mM MgCl₂ (pH 8) 的條件下，使用約 20 nM 的樣品濃度，可見大小不等的 RNA Foci，與文獻結果類似。在錄製過程中，Cy3 channel 的 RNA 液滴大小未明顯變化。

Data from 2023/12/15



Traces per file:

Condition	Control group	Experimental group
[1]	4	66
[2]	1	26
[3]	3	161
[4]	2	83



圖 16. 在 10 mM MgCl_2 中，於 RNA 簇模擬環境中檢測 $r(\text{G}_4\text{C}_2)_{25}$ 分子之間的交互作用。

- A. 實驗設計：使用高濃度由 Biotin 標定的 Bio- $r(\text{G}_4\text{C}_2)_{25}\text{-NH}_3^+$ 以模擬 RNA 團簇的環境，並加入帶有黏合兩個螢光單股 DNA 手柄的，觀察 $r(\text{G}_4\text{C}_2)_{25}$ 的構形特性。為了確立樣品專一性結合情形，設計僅有 NA 組別做為控制組。
- B. 觀察到的帶有黏合兩個螢光單股 DNA 手柄的 $r(\text{G}_4\text{C}_2)_{25}$ 的 FRET 族群分布圖。
- C. 所觀察到的帶有黏合兩個螢光單股 DNA 手柄的 $r(\text{G}_4\text{C}_2)_{25}$ 的 trace 圖。

Data from 2024/03/05

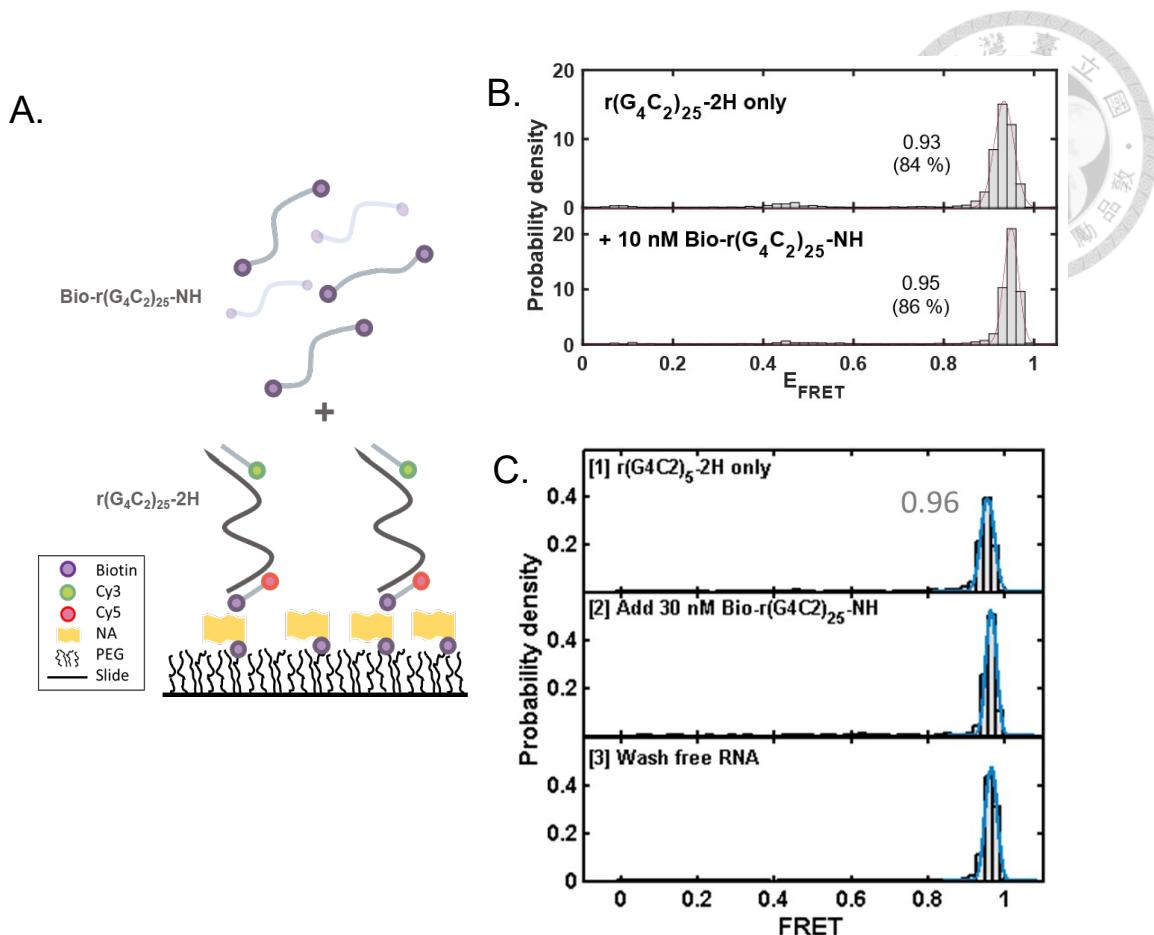
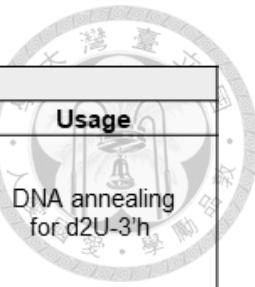


圖 17. 在 10 mM MgCl₂ 中，檢測 r(G₄C₂)₂₅ 分子之間的交互作用。

- A. 實驗設計：將快速降溫處理的 $\text{r}(\text{G}_4\text{C}_2)_{25}-2\text{H}$ 固定於玻片上，並使用高濃度由 Biotin 標定的 $\text{r}(\text{G}_4\text{C}_2)_{25}$ 與其作用以模擬 RNA 團簇的環境，測定 $\text{r}(\text{G}_4\text{C}_2)_{25}$ 之間結合情形。
- B. $\text{r}(\text{G}_4\text{C}_2)_{25}-2\text{H}$ 與 $\text{Bio-r}(\text{G}_4\text{C}_2)_{25}-\text{NH}$ 相互作用之 FRET 族群分布圖。
- C. $\text{r}(\text{G}_4\text{C}_2)_{25}-2\text{H}$ 與 $\text{Bio-r}(\text{G}_4\text{C}_2)_{25}-\text{NH}$ 相互作用之 FRET 族群分布圖。

Data from 2024/03/05, 2024/04/11



DNA oligonucleotides					
Name	Sequence (5' to 3')		Length	Usage	
T7	GAATTAATACGACTCACTATAAGGG		25	DNA annealing for d2U-3'h	
d(G ₂ C ₄) ₂ -T7	CGGGTCGCGTGGTGTACATTAGGCCCG GGCCCTATAGTGAGTCGTATTAAATT		57		
T7SP6-2X-F	AATTCGGGGCCGGGGCCT		18	Insert annealing for pT7SP6-2X	
T7SP6-2X-R	GTACAGGCCCCGGCCCCG		18		
BsrGI-C ₄ G ₂ -EcoRI	CATTGCGTTCTGTACATGGCCCCGGCCCCG GCCCGGCCCCGGCCCCGGCCCCGGCCCC CGGCCCCGGCCCCGGCCCCGGCCCCGG CCC GGCCCCGGCCCCGGCCCCGGCCCCGG GCC CGGCCCCGGCCCCGGCCCCGGCCCC CGGCCCCGGCCCCGGCCCCGGCCCC AATTCTATATCTCCTTCTTAAAG		193	Insert amplification for pT7SP6-25X (T/A)	
25R-EcoRI-F	CTTTAAGAAGGAGATATAGAATT		24		
S15-BT7	GGCGATTAAGTTGGTAA		18	DNA sequencing for pT7SP6 series	
d(G ₂ C ₄) ₂	GGCCCCGGCCCC		12		
dC ₄ G ₂ C ₄	CCCCGGCCCC		10		
dC ₂ G ₂ C ₄	CCGGCCCC		8		
dG ₂ C ₄	GGCCCC		6		

smFRET handles						
Name	Short name	5' modif.	Sequence (5' to 3')	3' modif.	Length	Usage
5'h-T7SP6-5'Cy3		Cy3	TTCTATAGTGTCA CCTAAATGGTACC CAATTGCCCC		36	5' ssDNA handle
pGAA_3'handle_Cy5	3'h-Cy5		CGGGTCGCGTGG TGTGTACAT	Cy5	21	3' ssDNA handle
pGAA_3'handle_Cy5_biotin	Bio-3'h-Cy5	Bio	CGGGTCGCGTGG TGTGTACAT	Cy5	21	3' ssDNA handle

表 1.引子設計序列。

註：為表示「modification」一詞，採用縮寫形式「modif.」。

Survival Probability of Folded r(G4C2) ₂ in 10 mM MgCl ₂						
Independent experiment	1	2	3	4	Mean	SD
Date	2025-02-12	2025-02-17	2025-03-10	2025-03-26		
d(G2C4) ₂	[Oligo] : 0 μM	1.00	1.00	1.00	1.00	0.00
	[Oligo] : 0.1 μM	0.60	0.55	0.44	0.48	0.12
	[Oligo] : 1 μM	0.07	0.09	0.10	0.08	0.03
	Buffer Wash	0.03	0.07	0.08	0.05	0.03
	△ Wash ¹	0.50	0.75	0.78	0.63	0.15
<hr/>						
Independent experiment	1	2	3	Mean	SD	
Date	2025-02-12	2025-02-21	2025-03-11			
dC4G2C4	[Oligo] : 0 μM	1.00	1.00	1.00	1.00	0.00
	[Oligo] : 0.1 μM	0.03	0.01	0.01	0.02	0.01
	[Oligo] : 1 μM	0.02	0.01	0.01	0.01	0.01
	Buffer Wash	0.02	0.01	0.01	0.01	0.01
	△ Wash ¹	1.00	1.00	1.00	1.00	0.00
<hr/>						
Independent experiment	1	2	3	4	Mean	SD
Date	2025-02-12	2025-02-21	2025-03-11	2025-04-22		
dC2G2C4	[Oligo] : 0 μM	1.00	1.00	1.00	1.00	0.00
	[Oligo] : 0.1 μM	0.05	0.11	0.05	0.04	0.07
	[Oligo] : 1 μM	0.03	0.03	0.02	0.01	0.02
	Buffer Wash	0.03	0.04	0.05	0.05	0.01
	△ Wash ¹	1.00	1.33	2.50	2.46	1.81
<hr/>						
Independent experiment	1	2	3	Mean	SD	
Date	2025-02-12	2025-04-07	2025-04-08			
dG2C4	[Oligo] : 0 μM	1	1	1	1.00	0.00
	[Oligo] : 0.1 μM	0.07	0.03	0.02	0.04	0.02
	[Oligo] : 1 μM	0.02	0.01	0.01	0.01	0.01
	Buffer Wash	0.08	0.15	0.17	0.13	0.05
	△ Wash ¹	3.50	14.00	16.00	11.17	6.71

註 1 : △ Wash = Survival Probability_{Buffer Wash} / Survival Probability_{[Oligo] : 1 μM}

表 2. 在 10 mM MgCl₂ 中，不同長度的寡核苷酸作用於 r(G₄C₂)₂-2H 摺疊形態保存比例。(參照圖 5)

Survival Probability of Folded r(G4C2) ₂ in 100 mM KCl						
Independent experiment	1	2	3			Mean
Date	2025-02-14	2025-03-26	2025-04-08			SD
d(G2C4) ₂	[Oligo]: 0 μM	1.00	1.00	1.00		
	[Oligo]: 0.1 μM	1.00	1.02	0.97		
	[Oligo]: 1 μM	0.76	0.72	0.57		
	Buffer Wash	0.68	0.58	0.45		
	△ Wash ¹	0.90	0.81	0.79		
Independent experiment	1	2	3			Mean
Date	2025-02-14	2025-04-07	2025-04-08			SD
dC4G2C4	[Oligo]: 0 μM	1.00	1.00	1.00		
	[Oligo]: 0.1 μM	0.25	0.26	0.16		
	[Oligo]: 1 μM	0.07	0.01	0.01		
	Buffer Wash	0.05	0.01	0.01		
	△ Wash ¹	0.67	1.00	1.00		
Independent experiment	1	2	3	4	5	Mean
Date	2025-02-14	2025-02-21	2025-03-11	2025-03-26	2025-04-22	SD
dC2G2C4	[Oligo]: 0 μM	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
	[Oligo]: 0.1 μM	0.69	0.73	0.72	0.77	0.70
	[Oligo]: 1 μM	0.09	0.10	0.18	0.02	0.08
	Buffer Wash	0.09	0.10	0.12	0.04	0.08
	△ Wash ¹	1.00	1.00	0.79	2.00	1.36
Independent experiment	1	2	3			Mean
Date	2025-02-14	2025-04-07	2025-04-08			SD
dG2C4	[Oligo]: 0 μM	1.00	1.00	1.00		
	[Oligo]: 0.1 μM	0.63	0.63	0.68		
	[Oligo]: 1 μM	0.21	0.01	0.01		
	Buffer Wash	0.69	0.43	0.52		
	△ Wash ¹	3.33	41.00	47.00		

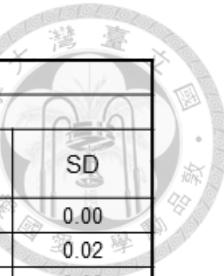
註 1 : △ Wash = Survival Probability_{Buffer Wash} / Survival Probability_{[Oligo]: 1 μM}

表 3. 在 100 mM KCl 中，不同長度的寡核苷酸作用於 r(G₄C₂)₂-2H 摺疊形態倖存比例。(參照圖 6)

Survival Probability of Folded r(G4C2) ₂ Under Salt Conditions								
Oligo : dC2G2C4	Independent experiment	1	2	3	4		Mean	SD
	Date	2025-02-12	2025-02-21	2025-03-11	2025-04-22			
10 mM MgCl ₂ (pH 8)	[Oligo] : 0 μM	1.00	1.00	1.00	1.00		1.00	0.00
	[Oligo] : 0.1 μM	0.05	0.11	0.05	0.04		0.07	0.03
	[Oligo] : 1 μM	0.03	0.03	0.02	0.01		0.03	0.01
	Buffer Wash	0.03	0.04	0.05	0.05		0.04	0.01
	△ Wash ¹	1.00	1.33	2.50	5.00		1.81	0.79
Independent experiment	1	2	3	4	5		Mean	SD
Date	2025-02-14	2025-02-21	2025-03-11	2025-03-28	2025-04-22			
100 mM KCl (pH 8)	[Oligo] : 0 μM	1.00	1.00	1.00	1.00		1.00	0.00
	[Oligo] : 0.1 μM	0.69	0.73	0.72	0.77		0.71	0.02
	[Oligo] : 1 μM	0.09	0.10	0.16	0.02		0.11	0.04
	Buffer Wash	0.09	0.10	0.12	0.04		0.10	0.02
	△ Wash ¹	1.00	1.00	0.79	2.00		0.93	0.12
Independent experiment	1	2	3				Mean	SD
Date	2025-03-11	2025-04-07	2025-04-08					
100 mM NH ₄ Cl (pH 8)	[Oligo] : 0 μM	1.00	1.00	1.00			1.00	0.00
	[Oligo] : 0.1 μM	0.71	0.53	0.55			0.60	0.10
	[Oligo] : 1 μM	0.03	0.01	0.02			0.02	0.01
	Buffer Wash	0.05	0.06	0.05			0.06	0.01
	△ Wash ¹	1.67	6.00	2.50			3.39	2.30
Independent experiment	1	2	3				Mean	SD
Date	2025-03-11	2025-04-08	2025-04-22					
100 mM NaCl (pH 8)	[Oligo] : 0 μM	1.00	1.00	1.00			1.00	0.00
	[Oligo] : 0.1 μM	1.00	0.78	0.71			0.83	0.15
	[Oligo] : 1 μM	0.04	0.05	0.02			0.04	0.01
	Buffer Wash	0.02	0.05	0.05			0.04	0.02
	△ Wash ¹	0.50	1.00	2.50			1.33	1.04

註 1 : △ Wash = Survival Probability_{Buffer Wash} / Survival Probability_{[Oligo] : 1 μM}

表 4. 在不同鹽類中，以 dC₂G₂C₄ 作用於 r(G₄C₂)₂-2H 摺疊形態倖存比例。(參照圖 7)



Survival Probability of Folded r(G4C2)n in 10 mM MgCl ₂						
Oligo : dC ₂ G ₂ C ₄						
Independent experiment		1	2	3	Mean	SD
Date		2025-04-30	2025-07-01	2025-07-02		
r2 - 2H	[Oligo] : 0 μM	1.00	1.00	1.00	1.00	0.00
	[Oligo] : 0.1 μM	0.03	0.06	0.03	0.04	0.02
	[Oligo] : 1 μM	0.01	0.01	0.01	0.01	0.00
	Buffer Wash	0.03	0.02	0.03	0.03	0.01
	△ Wash ¹	3.00	2.00	3.00	2.67	0.58
Independent experiment		1	2	3	Mean	SD
Date		2025-04-30	2025-05-10	2025-05-21		
r3 - 2H	[Oligo] : 0 μM	1.00	1.00	1.00	1.00	0.00
	[Oligo] : 0.1 μM	0.91	0.90	0.91	0.91	0.01
	[Oligo] : 1 μM	0.33	0.32	0.40	0.35	0.04
	Buffer Wash	0.66	0.60	0.73	0.66	0.06
	△ Wash ¹	2.00	1.87	1.84	1.90	0.09
Independent experiment		1	2	3	Mean	SD
Date		2025-04-30	2025-05-10	2025-05-21		
r4 - 2H	[Oligo] : 0 μM	1.00	1.00	1.00	1.00	0.00
	[Oligo] : 0.1 μM	0.96	0.98	0.98	0.97	0.01
	[Oligo] : 1 μM	0.52	0.55	0.49	0.52	0.03
	Buffer Wash	0.99	0.98	0.99	0.99	0.01
	△ Wash ¹	1.92	1.77	2.02	1.90	0.12
Independent experiment		1	2	3	Mean	SD
Date		2025-05-10	2025-05-21	2025-05-23		
r5 - 2H	[Oligo] : 0 μM	1.00	1.00	1.00	1.00	0.00
	[Oligo] : 0.1 μM	0.86	0.85	0.84	0.85	0.01
	[Oligo] : 1 μM	0.13	0.11	0.09	0.11	0.02
	Buffer Wash	0.46	0.44	0.43	0.44	0.02
	△ Wash ¹	3.50	3.80	4.75	4.02	0.65

註 1 : △ Wash = Survival Probability_{Buffer Wash} / Survival Probability_{[Oligo] : 1 μM}

表 5. 在 10 mM MgCl₂ 中，以 dC₂G₂C₄ 作用於不同重複次數的 r(G₄C₂)_n-2H 摺疊形態倖存比例。(參照圖 8)

Survival Probability of Folded r(G4C2)n in 100 mM KCl						
Oligo : dC2G2C4						
Independent experiment	1	2	3	4	Mean	SD
Date	2025-04-25	2025-04-30	2025-07-01	2025-07-02		
r2 - 2H	[Oligo] : 0 μM	1.00	1.00	1.00	1.00	0.00
	[Oligo] : 0.1 μM	0.76	0.71	0.77	0.69	0.04
	[Oligo] : 1 μM	0.13	0.03	0.02	0.02	0.05
	Buffer Wash	0.12	0.05	0.05	0.04	0.03
	△ Wash ¹	0.92	1.67	2.50	2.00	0.66
<hr/>						
Independent experiment	1	2	3		Mean	SD
Date	2025-04-25	2025-05-10	2025-05-21			
r3 - 2H	[Oligo] : 0 μM	1.00	1.00	1.00	1.00	0.00
	[Oligo] : 0.1 μM	0.92	0.86	0.87	0.89	0.03
	[Oligo] : 1 μM	0.42	0.46	0.50	0.46	0.04
	Buffer Wash	0.62	0.67	0.64	0.64	0.02
	△ Wash ¹	1.46	1.44	1.28	1.39	0.10
<hr/>						
Independent experiment	1	2	3		Mean	SD
Date	2025-04-25	2025-04-30	2025-05-10			
r4 - 2H	[Oligo] : 0 μM	1.00	1.00	1.00	1.00	0.00
	[Oligo] : 0.1 μM	0.86	0.85	0.89	0.87	0.02
	[Oligo] : 1 μM	0.09	0.06	0.13	0.09	0.03
	Buffer Wash	0.27	0.32	0.35	0.31	0.04
	△ Wash ¹	2.89	5.00	2.75	3.55	1.26
<hr/>						
Independent experiment	1	2	3		Mean	SD
Date	2025-04-25	2025-04-30	2025-05-10			
r5 - 2H	[Oligo] : 0 μM	1.00	1.00	1.00	1.00	0.00
	[Oligo] : 0.1 μM	0.97	1.00	0.98	0.98	0.02
	[Oligo] : 1 μM	0.93	0.95	0.90	0.93	0.02
	Buffer Wash	0.89	0.98	0.91	0.93	0.04
	△ Wash ¹	0.97	1.03	1.01	1.00	0.03

註 1 : △ Wash = Survival Probability_{Buffer Wash} / Survival Probability_{[Oligo] : 1 μM}

表 6. 在 100 mM KCl 中，以 dC₂G₂C₄ 與不同重複次數的 r(G₄C₂)_n-2H 摺疊形態
倖存比例。(參照圖 9)