

從 SNP 到個人化醫療——轉譯醫學的展望

撰文：陳霽雲

前言

從孟德爾神父在菜園中觀察豌豆的性狀開始，遺傳學到今天已將近有150年的歷史。運用統計學，孟德爾神父提出了分離律、自由配合律兩大定律，開後世遺傳學之先河。今日，在發達的電腦技術輔助下，我們可以將收集到的生物資訊模組化、資料庫化，快速地運算，探索更多未知的生命奧秘。拜先進的技術之賜，我們漸漸了解，性狀的遺傳不僅僅是基因間的排列組合，甚至是微觀到核苷酸的序列差異，任何的增減、取代，都可能造就完全不同的生物特性。其中，普遍存在於生物體基因組中的SNP，就是其中一種調控機制。

什麼是SNP?

<定義>

單一核苷酸多型性(single nucleotide polymorphism, SNP)代表的是「DNA序列中的單一鹼基對 (base pair) 的變異」，也就是DNA序列中因為四種核苷酸A、T、C、G的改變，造成基因體(genome)的一個特異的位點出現兩種或多種不同鹼基配對可能性。這樣的變異有可能來自基因發生刪除(deletion)、插入(insertion)或是取代(replacement)的反應。

以圖1.為例，同種生物的兩個不同個體，在某一相對應的DNA序列上，有AAGCCTA和AAGCTTA兩種組合，其中包含一組單一鹼基對的變異，一個個體是C-G，另一個個體是T-A。

目前已知的SNP中，所佔比例最多、最常發生的單一鹼基對變異，就是以T(thymine)取代C(cytosine)，約佔已知SNP總數的三分之二。

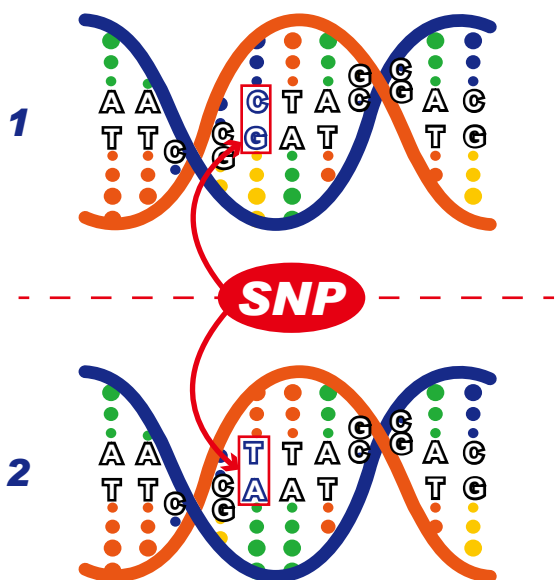


圖1. SNP示意圖。同種生物兩個體在某一對應的DNA序列上，包含一組單一鹼基對的變異，一為C-G，另一為T-A。(摘自維基百科)

<SNP vs. 突變>

以往把SNP認為是一種突變。但現今由於生物資訊的發達，對物種演化有更深的認識和了解，已不再認為SNP是突變的一種。過去曾經用這樣的定義區別SNP和突變(mutation)：「在對應的DNA序列上，SNP發生的機率占該序列各種變化的比例等於或小於1%，將該SNP歸類為一種突變」。事實上，SNP是一種普遍發生的遺傳變異。在人類的發生的機率約有0.1%左右，也就是每1200到1500個鹼基對中，就可能有一個SNP存在。更具體的說，在人類的DNA序列裡，每隔約1kb的長度，就至少會有一次「單一鹼基變異發生」，頻率很高。也由於這樣的高發生率，SNP常被當作一種基因標記(genetic marker)進行研究。

SNP 的重要性及其應用

SNP決定著群體和個體基因序列的細微差別。科學家將可以從這些差別中，找到疾病的易感基因(susceptibility genes)，了解疾病的生成發展，並使個人化(personalized)醫療成為可能。舉例來說，透過對易感基因的分析，我們能鎖定特定疾病的好發性人群，針對該人群進行生活或飲食方式的調整，「對症下藥」地促進其健康。因此，人類的大部分疾病是可以被預防的。另一方面，藉由對藥物代謝相關基因的SNP研究，能讓我們了解不同患者間藥物代謝及藥效差別的遺傳基礎，進而根據不同患者的個別遺傳背景，提出優化治療方案，達到個體化治療的效果。這些研究將會為全人類的疾病的預防與治療產生巨大貢獻，讓基礎研究的種子臨床治療上開花結果。這正好就是近幾年來生醫學界倡導的「轉譯醫學」的精髓。

<SNP的具體應用>

關於SNP的具體應用，可分成下列幾類：

1. 尋找致病基因：

許多遺傳疾病中已發現SNP造成影響的例子。如鐮型血球性貧血、糖尿病、阿茲海默症、心血管疾病、抗愛滋病、靜脈血栓等等，原因都出在SNP。然而必須特別注意，並非所有的SNP都有臨床意義。因為即使有SNP的發生，也不一定產生胺基酸編碼或基因表達的改變，影響蛋白質結構和活性。因此，對疾病發生和藥物治療有重大影響的SNP，只佔數以百萬計SNP的很小一部分。而如何從中篩選出這些關鍵SNP，是個人化醫療首先會遇到的嚴峻挑戰。

2. 尋找致病基因：

藉由對致病基因的瞭解與認識，與SNP的出現進行相互對照，可以更正確地診斷與預測潛在的或遺傳性疾病。

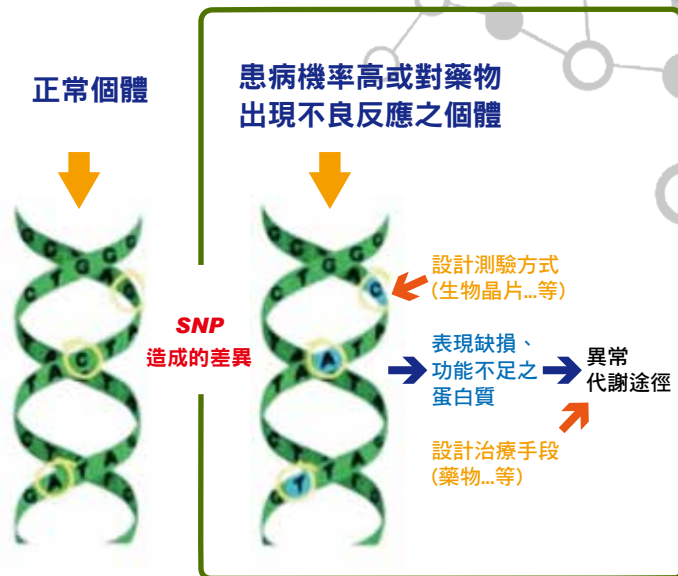


圖2. SNP造成個體差異。比較正常個體與易致病或藥物不良反應個體間的SNP差異，了解SNP於其中扮演的角色(影響胺基酸編碼、基因表達、造成蛋白質的結構與功能改變、增減)，系統化地整理歸納，有助於建立適合的檢測與治療手段，提高痊癒的機會。摘自工研院IEK-IT

3. 新藥開發：

許多臨床治療的實踐清楚地表明，藥物的有效與否、安全劑量會因個體不同而有著極大的差異。這些個體差異可以視為一種基因的表現型(phenotype)，也就是俗稱的「體質」。個體差異影響藥物功效的原因可歸納為下列幾項：

- ▶ 藥物目標的基因發生變異，會改變藥物與目標蛋白間的反應
- ▶ 負責運輸藥物的蛋白其基因變異，會影響藥物的吸收、運送和排出
- ▶ 藥物代謝酶的基因變異，會改變藥物的代謝
- ▶ DNA修復酶的基因變異，則可能改變藥物的安全性

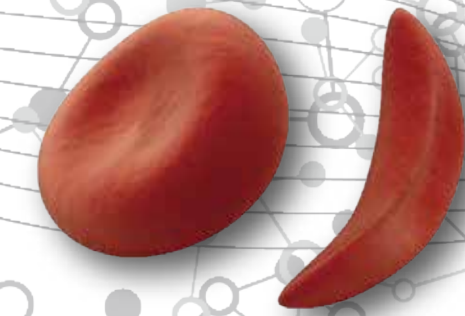
運用SNP與現有的基因診斷體系接軌，能協助檢驗醫學從「表型診斷」轉向「基因型診斷」，並降低藥物副作用的影響，提高療效之餘增加安全性。另一方面，對於藥物的功效也可有進一步的認識，甚至可以預測用藥結果，減少藥物的誤用或濫用。

4. 身分鑑定：

結合目前的DNA微陣列(DNA microarray)及基因晶片技術，讓大量的SNP篩檢在短時間內完成，對於親緣鑑定、身分識別可以提供更有效、更精確的判斷。

5. 研究族群演化：

由於SNP具有相當程度的穩定性，即使經過代代相傳，SNP所引起的改變卻不大，因此是用來研究族群演化的重要指標之一。



NORMAL β -GLOBIN

DNA ----- TGA GGA CTC CTC
 mRNA ----- ACU CCU CAC CAC
 Amino acid -- (thr) (pro) (glu) (glu)

MUTANT β -GLOBIN

DNA ----- TGA GGA CAC CTC
 mRNA ----- ACU CCU CUC CTC
 Amino acid -- (thr) (pro) (val) (glu)

圖3. 鐮刀型血球。鐮刀型貧血是典型與SNP有關的遺傳性疾病。患者的血紅素 β 鏈的胺基酸序列因為SNP(由T變成A)而發生改變(由麩胺酸glu變成纈胺酸)，使其在氧氣不足的情況下凝聚成長條狀，使紅血球扭曲成鐮刀型。(摘自BioCat, Catalyze Your Success)

<尋找SNP—PCR & qPCR>

如何經由實驗的方法找出SNPs呢？常用的方法，是利用聚合酶鏈反應(Polymerase Chain Reaction, PCR)，以設計好的適當引子(primer)，針對選定想要分析的特殊基因或一段序列，進行序列數量的擴增。接著輔以電腦及軟體對序列進行分析，來找出可能存在的SNP。而利用螢光訊號的變化，得以監視PCR擴增過程的即時定量PCR(real-time quantitative PCR, real-time qPCR)，更是現今普遍使用來檢測SNP的利器。

qPCR檢測SNP的方法，可分為三類：

1. 擴增曲線(amplification curve)的性質分析：

SNP的存在造成DNA序列上的差異，可以藉探針系統(probe system)的設計，在擴增曲線上呈現。首先，根據已知的目標基因SNP種類，設計好包含該目標SNP的兩組探針序列。不同的探針上攜帶不同的螢光訊號。如果一組探針可以專一地與目標SNP結合並開始擴增，我們可以觀察到螢光訊號並繪製擴增曲線；相反的如果一組探針沒有與目標SNP結合，則無法觀察到螢光訊號。比較兩種螢光訊號的強度，可以了解該個體的SNP是屬於哪一種，是同型合子或是異型合子。(如圖4.)

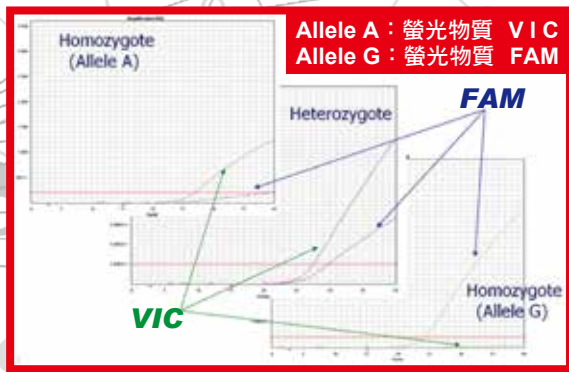


圖4. 利用擴增曲線型態來辨別SNP。不同的SNP由不同的螢光探針偵測，比較偵測到的螢光訊號，可辨別檢體所攜帶的SNP種類。(摘自Macrogen.com)

2. 解離曲線(melting curve)的性質分析：

當PCR的熱循環反應結束後，產物已放大的感興趣DNA片段。此時如果再將溫度漸漸升高，可以破壞核苷酸之間的氫鍵，讓雙股的DNA片段逐漸解離，最後成為單股的DNA。將雙股DNA的數量對時間做圖，我們便可以得到一條雙股DNA的解離曲線，並求得半解離溫度(T_m 值)。由於SNP的存在，不同的個體其DNA序列有差異，氫鍵數和鍵結強度也不同，會造成不同的解離曲線，因此比較解離曲線的 T_m 值，可以用來分辨個體攜帶的不同SNP。(如圖5-1, 圖5-2)

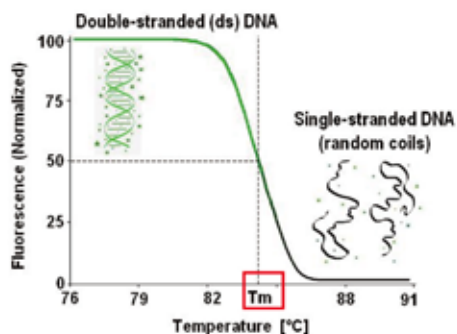


圖5-1. 半解離溫度(T_m 值)。將DNA加熱，DNA雙股間的氫鍵會漸漸被破壞而打開形成單股DNA，稱為解離。當一半的DNA解離成單股時的溫度，稱為半解離溫度。如上圖紅框處，約為84°C。(摘自Gene-Quantification.de)

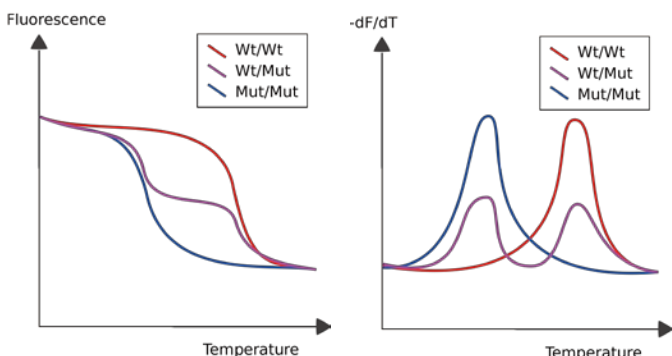


圖5-2. 以 T_m 值來區分SNP。將解離曲線的螢光讀值(F)對溫度(T)取負的微分(-dF/dT)，繪製成新的圖形。圖形的波峰為 T_m 值，Wild Type(Wt)和Mutant(Mut)不同，異形合子同時具有兩種SNP，會有兩個波峰。比較 T_m 值的大小和數量可分辨不同檢體。(摘自Wikipedia)

3. 高解析度解離曲線(high resolution melting, HRM)分析：

這是新一代的qPCR技術。相較於傳統解離曲線，HRM將溫度升高的幅度控制得更加精細，小到0.1°C以下。這樣的改變讓解離曲線圖形上的訊號點增加，大幅地提升

圖形的解析度。有了比較精細的解離曲線，再配合將圖形標準化(normalize)、差異化(differentiate)的過程，即使兩種SNP在 T_m 值上差異微乎其微，仍然可以輕易地將不同的SNP區分開來(如圖6.)。與使用探針系統的擴增曲線分析方法比較，HRM不需要特別設計的探針，不需要先知道目標SNP的完整序列，僅需一般可以雙股DNA結合的螢光染劑，在成本上較為低廉；HRM採取的是逐漸升溫促進雙股DNA解離成單股的簡單步驟，時間快速、操作簡便。因此，由上述可知，是否能夠利用qPCR技術將不同的SNP做區分，關鍵就在於「溫度控制」精準程度。

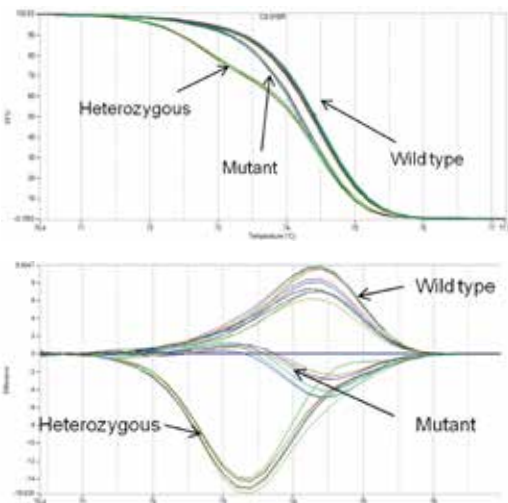


圖6. HRM分析。上圖：將原始的解離曲線的螢光讀值單位進行標準化(normalize)，讓RFU=0~100，比較不同檢體的曲線型態，可看到Mutant和Wild Type的曲線形狀類似，較不易區分。下圖：將螢光讀值差異化(differentiate)，於每個溫度點上取一基準螢光讀值，用個檢體同溫度點的螢光讀值與其相減求差值，再將差值連成曲線，可看到三群個體(Mutant, Wild Type, Heterozygous)可以更清楚的被區分。

結語

所謂理想的個人化醫學，就是：病人就醫時隨身帶著一張智能資料卡，上面除了姓名、性別、年齡、生活史等常規資料外，還有與「藥物代謝」以及「與療效有關的各種基因型資料」。根據這些資料，醫生可以預測各種藥物的效應，充分運用適當的藥物，達到更高的療效，並減少醫療資源浪費。

何謂個人化醫學

"If it were not for the great variability among individuals, medicine might as well be a science and not an art"

-Sir William Osler (1849-1919)



Right time
Right patient
Right treatment



圖7. 個人化醫療的理想願景：在對的時機點上，給予特定的病人合適的治療。(摘自工研院IEK, 王, 2011)

要達到這樣的理想，毫無疑問的，因個體不同而有所差異的SNP的研究在其中扮演相當重要的角色。從基因體學的角度出發，當SNP研究與其他學科互相配合，例如藥物遺傳學、臨床藥理學、毒理學、生物信息學、蛋白質體學、生物資訊學等，針對個人基因特質的醫藥方式，絕對是值得我們期待的。