# 不治之症的新曙光—表觀遺傳學療法

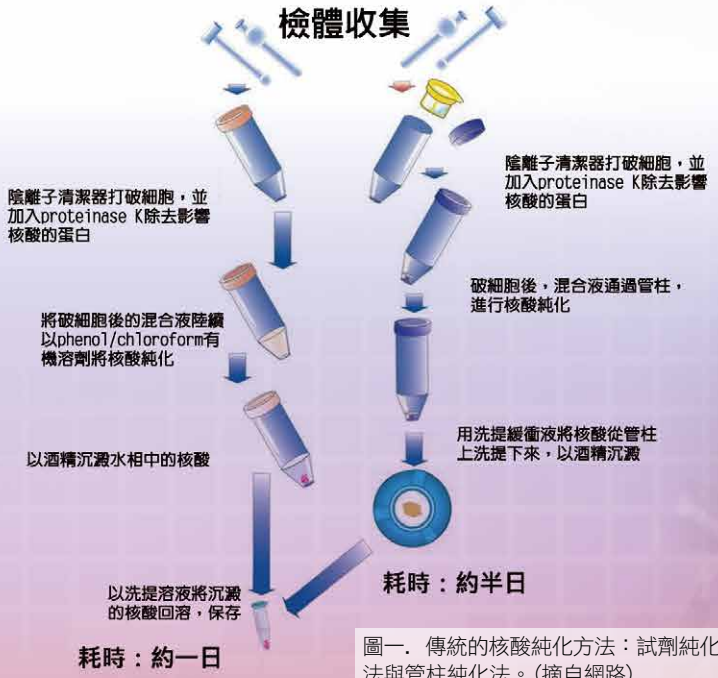
撰文：陳霽雲

## 前言

表觀遺傳學不牽涉到基因序列的改變，僅需要足夠的環境刺激與較短的時間，就能在生物體身上發現性狀調控的差異。常見的表觀遺傳調控包括DNA的甲基化、染色質重組與非編碼RNA的調控等等。其中，DNA的甲基化會造成基因的轉錄活力降低，有抑制轉錄的效果，常常是許多疾病的發生原因，例如癌症、先天性心臟病等等。由於表觀遺傳是一種對環境的刺激相當敏感，可以讓個體在暴露刺激後的短時間內產生的快速反應。從另一個角度來看，這樣的機制利於藥物的參與，提供治療的契機。因此，如果可以了解造成DNA甲基化的原因，作用機制與好發目標（族群或基因），建立延緩或中止甲基化的發生的策略，將可望應用在醫學領域上，設計合適的藥物來對症下藥，達到治療這些不治之症的目的。

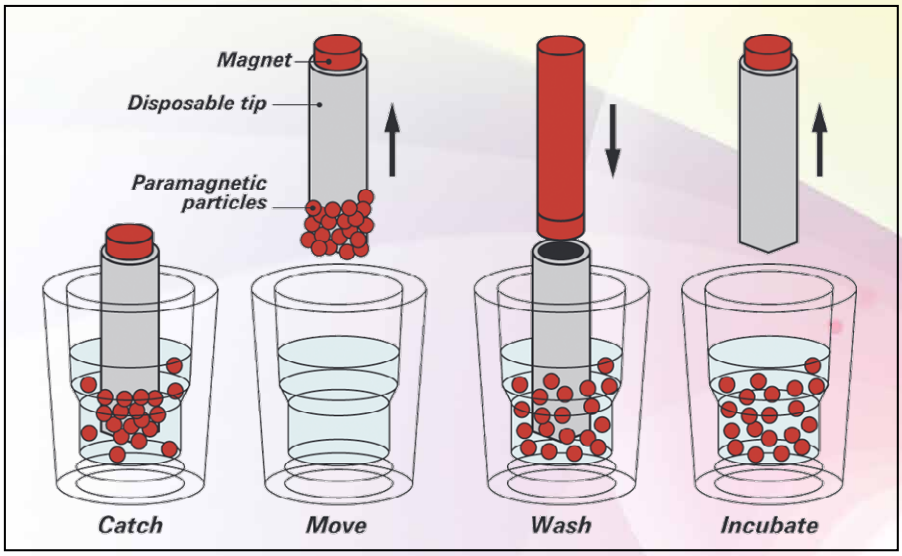
## 核酸的純化

甲基化現象是發生在基因序列外的調控。進行DNA甲基化的研究，首先要從檢體中純化其DNA。傳統上，核酸的純化方式有試劑純化法（Reagent Purification）或管柱純化法（Column Purification）（如圖一）。試劑純化法使用酚（phenol）、氯仿（chloroform）將細胞溶解，並利用DNA會分布於水相層的原理，將DNA分離最後以酒精清洗、沉澱，回溶於緩衝液中。管柱純化法則是以陰離子清潔劑打破細胞，配合加入蛋白酶K（proteinase K）將DNA自蛋白質上分離，接著通過純化管柱，DNA會被管柱中的濾膜結合。其他非DNA的物質則會流出，最後再用緩衝液洗提濾膜上的DNA。以上兩類傳統純化方法，都需要一段時間等待混合液的分層、通過管柱，即使搭配離心來加速流程，仍然要近半天才能完成實驗；混合液在試管、管柱間不斷地移動，在過程中容易產生較大的人為操作誤差。當分析的檢體DNA數量較多時（數十到數百個檢體以上），這樣的方法會嚴重影響到實驗的進度。因此，許多研究單位都會尋求自動化的核酸純化系統，兼顧節省人力、時間與維持純化核酸的品質。



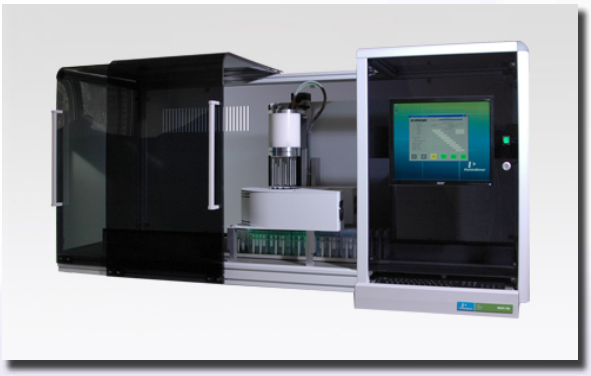

圖一．傳統的核酸純化方法：試劑純化法與管柱純化法。（摘自網路）

常見的自動化核酸純化，是利用對核酸具有吸附力、直徑極微小的磁珠來進行。一般有四個步驟：(1) 結合；(2) 移動；(3) 清洗；(4) 洗提(如圖二)。通過自動化儀器上的磁鐵棒，吸附核酸的磁珠可以在對核酸吸附度不同的溶液間進行移動。




圖二. 自動化核酸萃取一般流程，由左而右依序為(1) 結合、(2) 移動、(3) 清洗、(4) 提取。一般儀器會依2→1→3→4的步驟，利用磁棒將磁珠自(2)收集後，移至(1)的結合溶液中進行核酸的吸附。接著磁棒再將磁珠移動至(3)的清洗溶液中洗去磁珠上不是核酸的非特異性結合物質；再將磁珠移動到(4)的提取溶液中，讓磁珠上吸附的核酸釋放。最後移除磁珠，即可得到純淨的核酸。這個過程僅需磁棒的垂直與水平移動，可交由自動化機械手臂全權完成。

待多次的清洗、移動步驟後，磁珠最後會在洗提緩衝液中與核酸分離。最後再將磁珠去除，即可得到純化的核酸，可以開始進行後續的相關實驗。岑祥公司引進的PerkinElmer Chemagen自動化核酸萃取儀器系統(如圖三)，是目前市面上核酸萃取效率最高、檢體體積最大的系統。運用電磁鐵的技術，磁珠可以輕易地被磁棒收集與釋放；獨特的磁棒自轉式溶液混勻設計，不但可以讓磁珠在溶液中被充分地混合，讓核酸的吸附、非特異性結合物質的清洗或是核酸的提取都能達到最佳的效率，同時也可以減少核酸的斷裂，提升萃取核酸的品質。

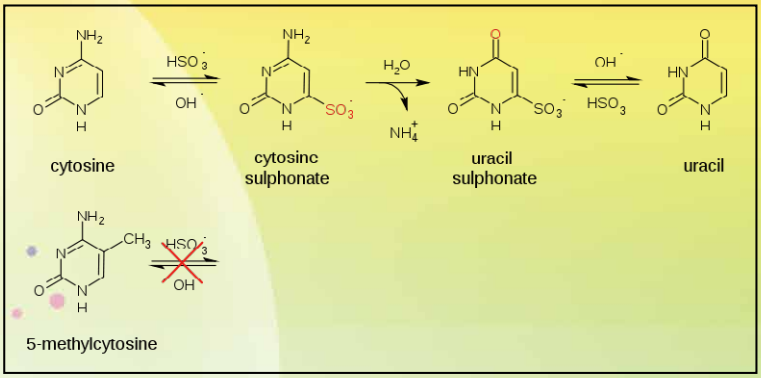


圖三. PerkinElmer Chemagen MSM-1自動化核酸萃取系統—MSM I，最多可同時純化96個檢體。

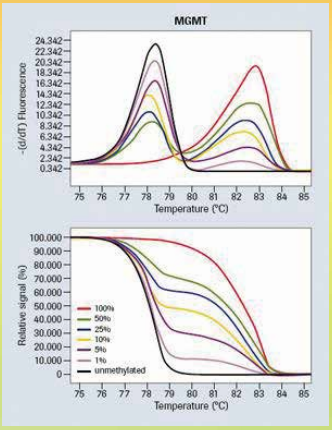
## DNA甲基化的研究方法

純化好的核酸可以開始進行相關的甲基化研究。常見的是利用重亞硫酸鹽(bisulfite, $HSO_3^-$)處理DNA樣品，再搭配PCR實驗或qPCR實驗來分析。當DNA經過重亞硫酸鹽處理後，DNA序列上的胞嘧啶(C)會轉變成脲嘧啶(U)再轉變成胸腺嘧啶(A)；但如果是甲基化的胞嘧啶($^mC$)，則不會受到重亞硫酸鹽的影響而改變，仍為胞嘧啶($^mC$)(如圖四)。DNA序列的改變與不改變將影響接下來PCR/qPCR實驗的結果。其中一種方法是搭配即時定量 PCR（Real-Time PCR）實驗，DNA樣品


岑祥股份有限公司www.thco.com.tw 台北02-2785-1156 新竹03-530-7592 台中04-2471-0255 高雄07-343-1735




圖四. 亞硫酸鹽轉換(Bisulfite Conversion)，未經甲基化的正常胞嘧啶(C)經過亞硫酸鹽處理後會被轉變成脲密啶(U)，而甲基化的胞嘧啶(mC)則維持原樣，造成序列上的差異。(摘自維基百科)

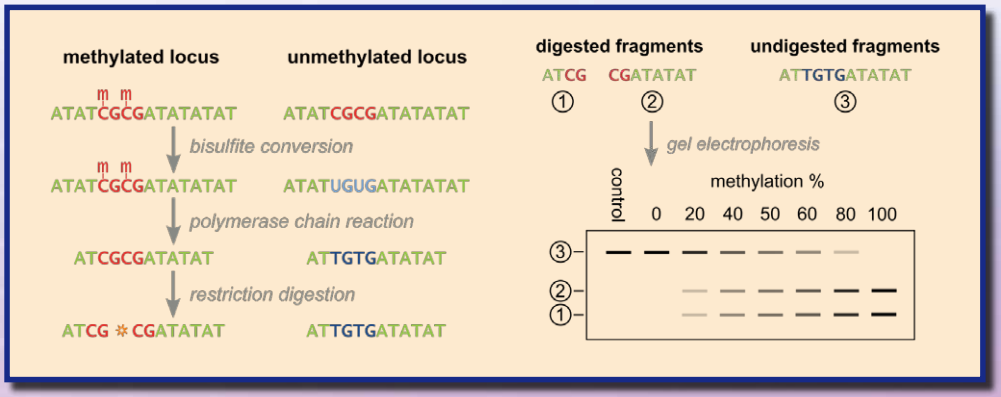



圖五. 以Real-Time PCR進行DNA甲基化的分析。甲基化程度不同，DNA解離曲線的型態會有所差異，Tm值也不同。由這些資訊可以判斷檢體甲基化的程度。檢體：MGMT，以HRM實驗觀察甲基化程度自100%至5%的差異變化。(摘自Methylation Analysis with the Real-Time PCR System，2013)

經$HSO_3^-$處理後，觀察DNA序列不同的檢體與標準品間在解離曲線(Melting Curve)圖形上與Tm值(半數DNA解離時的溫度)的差異，來判斷檢體DNA甲基化的程度(如圖五)。岑祥公司引進國際知名大廠Thermo Fisher的Real-Time PCR儀器，具有升降溫快(7℃/秒)、體積小、加熱槽均溫性(uniformity)佳(±0.3℃)、溫度控制精準(accuracy)(±0.2℃)的優點，可以快速地升降溫，縮短實驗時程，減少引子非特異性結合，減少雜band；是進行DNA甲基化觀察的好幫手(如圖六)。PikoReal Real-Time PCR更具有高解析度解離曲線分析(High Resolution Melting-curve Analysis, HRM) 的功能，精細達0.04℃的升降溫分辨率，提供良好的解離曲線解析度，即使只有一個鹼基的甲基化的差異也能分辨，無所遁形。

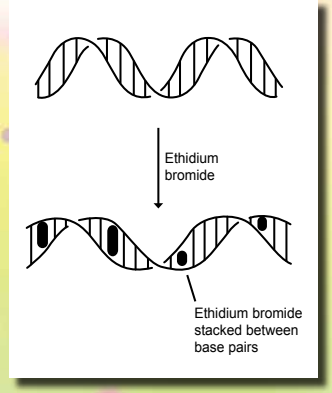
圖六. Thermo Scientific Piko PCR熱循環儀(左)與PikoReal Real-Time PCR即時定量熱循環儀(右)。

另一種普遍使用的方法是以限制酶切割搭配PCR實驗。限制酶會在指定的核酸序列切位上進行切割。當重亞硫酸鹽處理後，DNA序列改變影響限制酶的切割結果，產生不同大小的片段。經過PCR實驗放大後，以膠體電泳進行分離，比對膠體上的條帶(band)位置差異，即可了解檢體DNA甲基化的狀態(如圖七)。




圖七. 經過重亞硫酸鹽處理後，限制酶的切割結果會改變，經由PCR放大後在電泳膠體上會呈現不同型態的條帶。左圖，亞硫酸鹽處理配合PCR、限制酶切割實驗。甲基化的胞嘧啶(mC)不受重亞硫酸鹽影響，未甲基化的胞嘧啶轉換成脲嘧啶(U)，經過PCR放大和限制酶切割，會有不同長度的片段產生。右圖，將處理後的產物以膠體電泳分離，可以看到電泳膠上條帶呈現的型態不同。根據條帶的濃度深淺，可推得檢體的甲基化程度。(摘自維基百科)

用PCR實驗來判斷甲基化變異，是觀察DNA條帶的差異。條帶的產生仰賴與能DNA檢體嵌合的螢光染劑。目前實驗是最常用的DNA染劑是溴化乙錠(EtBr)，可以嵌合在DNA雙股螺旋相鄰重疊的兩對鹼基間(如圖八)，並在UV光的激發下發出波長590nm的發散光，經由影像系統的擷取即可讓研究人員觀察DNA條帶的分布。EtBr嵌合緊密，且過程不可逆，會嚴重影響基因表達，如不慎沾汙到研究人員身上，恐有致癌的風險，因此一般普遍都將EtBr歸類為毒性極高的實驗用試劑，需要確實隔離。近年來許多實驗室已經改採用泛稱為Safe dye的染劑來代替EtBr。這類染劑一般是和DNA雙股螺旋的大溝槽(major groove)或小溝槽(minor groove)做結合。經實驗結果證實，這種結合較不會引起基因的突變。且一般Safe dye可以用470 nm的藍光就足以激發，能減少研究人員暴露在UV下的機會，實驗上相對較安全；同時也減少對檢體的損傷，減少對條帶觀察後的切膠實驗的影響，已經漸漸成為分子生物學實驗的主流。岑祥公司所代理的Maestrogen MaestroSafe，是一款由國人自行研發、台灣製造的Safe dye染劑，是和DNA小溝槽結合，毒性低。靈敏度極高，在LED照射下檢體最少可達1ng，適合各種核酸的條帶觀察實驗，不需要擔心受怕地使用EtBr了。




圖八. EtBr會嵌合在DNA的鹼基對中，緊密地結合。(摘自維基百科)

另外，為因應不同研究需求，岑祥公司提供多元的DNA條帶影像觀察、擷取系統。若是常常需要切膠回收再純化條帶的實驗研究，推薦使用Maestrogen的UltraBright UV/LED燈箱、UltraSlim LED光板。特殊的濾片塗料設計，可以減少UV光對眼睛的傷害；採用筆記型電腦規格的特殊轉軸，可以將濾片調整、固定在任何角度，使用者可以在安全的保護下，輕鬆觀察DNA條帶與切膠。(如圖九)

UltraBright LED　UltraBright UV　UltraSlim LED

圖九. 適合觀察與切膠的Maestrogen UltraBright UV/LED燈箱、UltraSlim LED光板（由左至右）。

而 SAGE Creation 系列的專業凝膠呈像系統，則提供高品質條帶影像擷取最專業與多樣化的選擇。一體成形的SmartGel，配備觸控式螢幕與內建電腦，讓影像的觀察、擷取、記錄在一部儀器上輕鬆完成；旗艦級的ChampGel擁有良好的配件擴充性，可以依據使用者需求自由搭配升級，無論使用的染劑是EtBr或Safe dye，都可以搭配適合的UV光源或470 nm LED光源系統，在大光圈鏡頭(F1.2)與高感度科學等級CCD相機的組合下，呈現最佳的影像品質。(如圖十)

成功的實驗成果仰賴縝密的實驗設計、良好的實驗操作與合適的實驗儀器。如果您對文中提到的相關產品感興趣，請洽岑祥公司，我們將有專人為您服務。

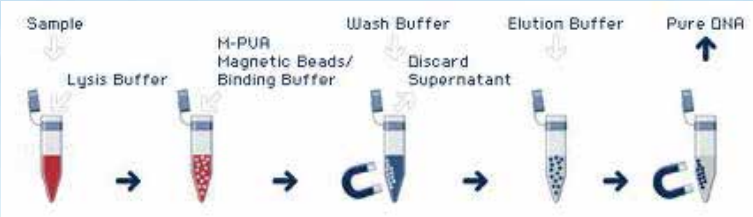
SmartGel　ChampGel

圖十. SAGE Creation高品質專業凝膠呈像系統。
左，一體成型的SmartGel，觸控式螢幕，操作方便。
右，旗艦級機種ChampGel，可搭載各種激發光源(UV/LED)、選配內建電腦、升降載台，功能升級隨心所欲。


岑祥股份有限公司www.thco.com.tw　台北02-2785-1156　新竹03-530-7592　台中04-2471-0255　高雄07-343-1735

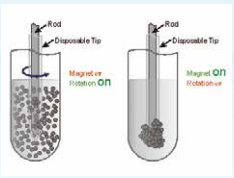
# 探索表觀遺傳學研究的便捷工具
# —自動化核酸萃取技術

表觀遺傳學探討基因受到外部的調控產生的表達差異，常需要大量檢體的核酸(DNA、RNA)萃取。PerkinElmer Chemagen自動化磁珠式核酸萃取技術利用特製的M-PVA磁珠吸附核酸，再以磁力配合自動化托盤移動進行核酸萃取，提供快速、大量、高品質的核酸萃取效果。

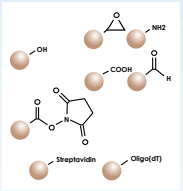



## 自動化步驟

1. 檢體以lysis buffer處理讓核酸從細胞中暴露出來。
2. 特製的M-PVA磁珠配合binding buffer從lysis後的檢體中吸附核酸。
3. 經由磁棒與M-PVA磁珠間的磁力，核酸可以在試劑間移動、洗去非核酸的雜質，提升產物核酸品質。
4. 收集到的核酸最後在elution buffer中被釋放。
5. 透過磁力移除M-PVA磁珠，即可獲得純化好的核酸。




電磁鐵式的磁棒，以通電決定磁力的產生與消失來吸附與釋放磁珠；利用磁棒的高速自轉來混勻試劑，可以減少機械性的衝擊，防止核酸斷裂。




專利打造的M-PVA磁珠，配合chemagic試劑，可有效吸附核酸；可因個人需求對磁珠表面增加官能基修飾，應用於蛋白質萃取、細胞分離等研究。

配合使用者檢體數量、體積的需求，PerkinElmer Chemagen 具備不同量級的儀器供選擇。海量型的Chemagen Multiple Separate Module I (MSM I) 可萃取10μL~10 mL的檢體，可依據萃取的檢體體積更換不同的磁棒頭(12、24、96 head)，最多一次可萃取多達96個檢體的核酸；外接分注器讓試劑自動分注，操作更方便；輕量型的Prepito一次可萃取12個檢體，體積最大可達1000μL，內建的分注器設計，試劑使用量控制更準確、操作更簡便。操作軟體介面簡單好用，可即時監測目前儀器運作進度、預估時間，適用所有儀器。

海量型 MSM-I

MSM-I 專用磁棒頭

軟體操作介面

輕量型Prepito含分注器

專利的Chemagic核酸萃取試劑組(Chemagic kits)含M-PVA磁珠，符合CE、IVD認證，萃取效果一流，核酸產量高達300μg(以10 mL kit為例)！試劑的應用層面廣泛，可萃取人類血液(buffy coat或全血)、細胞、組織、動植物、細菌、病毒等多種不同檢體。開放式的試劑設計，除了能用其搭配PerkinElmer Chemagen 自動化儀器進行核酸萃取，使用者也可以用手動的方式使用試劑，或搭配其他實驗室自動化儀器來使用。

PerkinElmer® For the Better

chemagen

# 表觀遺傳學研究上不可或缺的分生實驗工具

## 微量核酸濃度偵測首選

## MaestroNano 超微量分光光度計！

◆只要2μL檢體，快速獲得DNA/RNA/蛋白質濃度。
◆dsDNA偵測範圍廣，2~2000 ng/μL，不必再費神稀釋檢體。
◆特殊設計，光徑不需定期校正。
◆操作直覺易懂，內建熱感列印/USB輸出，data保存好方便。

MAESTROGEN

SAGECREATION
Service for Life science

## 核酸觀察必備

## 電泳照膠分析系統

**SmartGel**
All-in-One的完美設計

◆科學等級相機。
◆內置式PC，一體成型。
◆12.1吋觸控式螢幕。
◆體積小，不占空間。

**ChampGel**
旗艦機種，客製化首選

◆科學等級相機。
◆光源種類齊全：穿透白光/UV/藍光與反射白光/UV/RGB螢光。
◆選配2~7孔濾鏡轉輪。
◆可增加切膠口與觀察窗。

**MiniCute**
簡單一罩，輕鬆照膠

◆絕佳暗房效果，實驗觀察一把"罩"。
◆搭載千萬畫素相機，圖形清晰品質好。
◆相容於市售各種UV/LED光箱與燈板。



岑祥股份有限公司www.thco.com.tw　台北02-2785-1156　新竹03-530-7592　台中04-2471-0255　高雄07-343-1735