

(4070) 核酸相關技術—萃取、偵測與定序

1. 核酸萃取

核酸擴增技術 (nucleic acid amplification technology, NAT) 基本原則及各種技術定義已在核酸相關技術—通則 (通則6025) 中討論，本篇則涵蓋萃取與純化不同來源檢品中核酸之一般步驟。

分子生物學門在藥物及生物醫學研究與發展上之角色日漸重要，由疾病新標誌之快速發現及其檢測技術快速進展可見一斑。待分析之核酸標的可能分離自各種不同檢體，其核酸標的之質與量會因為檢體收集、處理及採用之萃取步驟等因素而受到影響。

以分子生物技術分析複雜生物體時，必須要能分離出高純度、高分子量基因體DNA及完整之全長RNA。應用這些分子生物技術，可提供相關生物體或外來病原之檢測、鑑別與特性分析。近期發展之試驗更可利用純化之人類DNA分析單核苷酸多型性 (single nucleotide polymorphisms, SNP)，或進行遺傳性疾病之易感性、帶原或甚至發病之遺傳檢測，例如：囊性纖維化、遺傳性血色素沉著症或Tay-Sachs症。

DNA水解酶與RNA水解酶是核酸不安定之主要來源。雖然，這兩種酶普遍存在，且易於核酸萃取過程中釋出，但RNA水解酶較DNA水解酶安定得多且較難失活，因為它們在執行功能時通常不需要輔酶。微量RNA水解酶便足以破壞RNA，因此需更小心避免於分離過程或分離之後不經意將這些水解酶引入檢品中。若是為了進行特定基因表現分析而收集RNA，研究者應該謹記檢品收集過程可能會影響基因表現之分析結果。由於RNA水解酶隨處可見，在藥學領域上，測定細胞內RNA標的於患者管理與標的特性分析上之貢獻遠不如DNA標的。然而，由於RNA代表生物體當下狀態，所以是連接表型及其相關基因活性之重要工具。RNA之不安定性會使NAT檢測之標準化具相當難度，並且容易產生偽陰性之結果——陰性結果是由於檢體處理不當使標的基因降解，而非因未罹病或基因活性未調控所造成。不過，近年來已有市售分離與檢測系統可用，這些系統可提供較高程度之標準化與耐變性，使RNA分析得以進行。在接下來章節將討論用於萃取及純化源自不同檢品之核酸之一般步驟，並將聚焦在(1)檢品之收集、處理與保存；(2)檢品之分解；(3)

後續之核酸萃取與純化與（4）已純化核酸之保存。

1.1. 檢品來源

檢體種類各不相同，必須有不同之收集程序。例如：血液檢品建議以含適當抗凝劑或其他添加物之試管採集；血漿或骨髓穿刺檢品（bone marrow aspirate, BMA）則建議使用之抗凝劑為乙二胺四乙酸（ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA）或檸檬酸葡萄糖（acid citrate dextrose, ACD）。不同組織間之DNA及RNA含量差異很大，如果適於自組織中萃取DNA或RNA，其組織最適量通常為1~2 g（依組織不同而異）。一般而言，要獲得10 µg以上之DNA或RNA時，往往需要大於10 µg之組織。由於不同組織之間所含有蛋白質與其他雜質之含量及種類差異甚大，以及核酸分離步驟具有組織專一性，且各種立即可用之核酸分離萃取系統套組已被多家廠商開發出來。另外，組織種類也會影響檢體中DNA及RNA之安定性，且這兩種核酸在檢品製備及下游分析上均大不相同，上述這些議題將於本篇之後段介紹。

1.2. 預分析步驟及檢品收集

儘管生物體遺傳組成多半長期維持不變，但mRNA之組成會因應細胞所處之條件狀態而表現，因此是高度動態的。為了防止mRNA降解及/或保持細胞中mRNA原始轉錄模式，應將組織立即置於冰上或以液態氮快速冷凍。然而，冷凍會破壞細胞結構並釋出RNA水解酶（RNases）。因此，一般在分離RNA（如mRNA、核糖體RNA、病毒RNA等）時，必須在RNase失活緩衝液中解凍。有一種較為方便之方法是在室溫下使用安定劑，針對不同類型檢品（例如組織或細菌）已有幾種市售試劑可選用。過去曾使用釩鹽（vanadium salts）以抑制RNase活性，但它們已被可抑制RNase並安定RNA之離液劑（chaotropic agents）所取代。檢品在這些試劑中，較易被收集，且在分離RNA前可保存數日至數週。

如果要得到可靠之基因表現分析結果，一個必要先決條件是要能迅速安定RNA表現模式及RNA本身。生物檢品經收集萃取後，其基因表現模式可能隨即因專一性與非專一性RNA降解及轉錄誘導作用而改變。不論是何種具相當可信度之定量基因表現分析，如生物晶片、陣列分析與定量反轉錄聚合酶鏈鎖反應（RT-PCR），都應避免基因表現模式產生此種改變。

在處理試劑及RNA檢品時必須戴手套，以防止與皮膚表面或實驗室設備接觸導致RNase污染。為了建立並保持一個無RNase之環境，實驗室人員應以焦碳酸二乙酯（diethylpyrocarbonate, DEPC）處理水或緩衝溶液，透過共價化學修飾使RNase失活。由於DEPC不僅會刺激眼睛、皮膚及粘膜，亦是一種可能之致癌物質，應小心使用或改使用市售無RNase之溶液及試劑。另可使用市售的RNase抑制蛋白，但其效果會因RNase類型不同而有所差異。不論用何種方法，應注意DEPC不能與Tris緩衝溶液一起使用。許多科學家建議在操作RNA時，應使用拋棄式容器，非拋棄式玻璃器皿應用洗滌劑清潔，徹底沖洗，並在使用前置於240°烤箱烘烤4小時以上（僅施以高壓滅菌並不會使RNase完全失活）；或以DEPC處理玻璃器皿。至於非拋棄式塑料製品，應先以0.1 M氫氧化鈉及1 mM EDTA徹底沖洗，再以不含RNase之水徹底沖洗；或以氯仿沖洗耐氯仿塑料製品以使RNase失活。使用抗氣霧過濾式滴管尖頭對於避免RNase污染也很重要。這些議題對於DNA則非關鍵，只要能遵循良好實驗室作業規範（good laboratory practice, GLP），通常就足以成功分離DNA。

一般而言，工作人員在處理組織或體液（人類或其他生物）時應遵守所有適用之安全防護措施。其中一些防護措施（如使用拋棄式手套）亦可防止檢品受到污染。國際醫藥法規協會已經出版有關收集及處理人體衍生材料適用之準則及標準。

1.3. 檢品的分解與均質化

於萃取前先將材料分解並均質，其分解是為了要將固體組織及細胞之細胞壁與細胞膜完全破壞，以釋出檢體中之DNA及RNA，通常可搭配使用細胞組織裂解緩衝液，使內生性核酸酶失活。除了破壞組織，均質過程還可同時剪切高分子量DNA及細胞成分。進行RNA分離時，科學家通常必須在最終分離前降低細胞裂解物粘度（因高分子量DNA分子所引起），以使後續萃取步驟較容易且有效率。不完全均質作用可能會干擾後續RNA純化步驟（如RNA無法有效與矽膜結合），而導致產率顯著降低。典型剪切高分子量DNA並均質檢品之做法是使裂解物重複通過小注射針頭，但此操作過程耗時，且不適合大量檢品製備。如欲完全分解及均質細胞與組織，較好做法包括在含有磁珠之細胞組織裂解緩衝液中快速攪拌（磁珠研磨）或採用轉子一定子均質機進行均質化。

在磁珠研磨過程中，磁珠與細胞發生碰撞，藉由剪力和粉碎作用達到分解與同步均質化目的。細胞分解效率會受磁珠之大小與組成、攪拌器之速度與結構、緩衝液與磁珠之比例、分解時間及起始材料量所影響，這些參數必須依不同應用經驗而定。當採用研鉢進行分解時，應先將檢品置於液態氮中冷凍後並在液態氮下以研鉢及杵磨成細粉。操作液態氮時，應遵循標準安全防護措施並應穿戴安全服裝保護皮膚與眼睛。轉子一定子均質機能夠在5至90秒內破碎並均質動物及植物組織，其時間長短取決於檢品種類，該轉子利用高速轉動使檢品在擾流及機械剪力之共同作用下被分解。另可使用結合矽膜技術之市售離心管柱均質機，此法可快速並有效均質化細胞及組織裂解物，且不產生檢品交叉汙染。

為了達到完全分解檢品，不同檢品類型需以不同程序處理。從組織中培養之細胞單層或懸浮液，只要加入細胞組織裂解緩衝液（通常含有陰離子界面活性劑、蛋白酶及離液劑之緩衝鹽混合溶液）就可輕易分解之。相較之下，要從纖維組織如骨骼肌、心臟和主動脈中分離核酸則較為困難，因這些組織含有大量收縮性蛋白質、結締組織及膠原蛋白。新鮮或冷凍之組織檢品可切成小塊以幫助裂解。血液檢品，包括已經處理去除紅血球之檢品，則可用細胞組織裂解緩衝液及蛋白酶進行有效裂解。

一般來說，可以相同程序萃取DNA及RNA。分離DNA時，通常會選用較溫和的方法；但在RNA分離過程，則可使用磨碎機破碎細胞及組織，因RNA沒有被剪切的風險。若下游應用需高分子量DNA，應注意不要使DNA分子受到剪切，而不適於做進一步分析應用。

1.4. 萃取與純化

雖有多種萃取核酸方法，但萃取方法之適用性則視起始材料、所分離核酸種類與純度及可能之後續應用而定。下述幾種主要方法，目前市面上已有數種適用於不同檢品類型與應用之套組可供選用。

1.4.1. 分層萃取（Phase extraction）

最初從裂解檢品中萃取DNA及RNA是應用分層萃取技術，以苯酚和氯仿混合溶劑萃取核酸。根據不同pH及鹽濃度，使DNA或RNA保留於水相。在中性/鹼性時，DNA保留於水相中，RNA則保留於有機相或與蛋白質一起保留於兩相之間。而在酸性環

境下，檢品中DNA被質子化，因電荷中和而分配到有機相中，至於RNA因保持帶電而分配至水相中。以離心方式分離兩相，將水相用苯酚及氯仿混合液萃取，接著再用氯仿萃取以除去殘留之苯酚，而後再以酒精沉澱從水相中回收核酸。若是要萃取RNA，在萃取過程通常會結合蛋白酶分解、酒精或氯化鋰沉澱及/或氯化鈯密度梯度。此法回收DNA或RNA可能有有機溶劑污染問題，可能會干擾後續酵素反應或光譜讀值。

1.4.2. 氯化鈯密度梯度離心 (cesium chloride density gradient centrifugation)

分離高分子量基因體DNA之傳統方法是氯化鈯密度梯度離心，將細胞以界面活性劑裂解後，以酒精沉澱從裂解物中分離出DNA，再將DNA與氯化鈯及溴化乙啶(EtBr)混合並以高速(通常為 $100,000 \times g$)離心數小時。藉由溴化乙啶插入DNA之特性，可於UV光照射下觀察到帶狀DNA區域，由離心管收集此DNA條帶，再以異丙醇萃取除去溴化乙啶，並以乙醇沉澱回收DNA。此萃取程序可分離出高品質的DNA，但過程耗時且使用大量溴化乙啶，其安全性也是一需考量之問題。

1.4.3. 陰離子交換層析法 (Anion-exchange chromatography)

高分子量基因體DNA也可採用陰離子交換層析法純化，其原理為利用核酸上帶負電之磷酸基團與陰離子交換樹脂上帶正電表面分子進行交互作用。兩者在低鹽濃度下結合，而後使用中鹽濃度緩衝液洗去如RNA、細胞蛋白質及代謝物等雜質，再用高鹽緩衝液將純DNA沖洗下來，並以酒精沉澱進行脫鹽與濃縮。由此法獲得DNA之純度及生物活性與氯化鈯梯度進行兩次純化所得之DNA相當，但所需時間較少。此方法亦可避免使用有毒物質，並可適用於不同規模之純化。此法可用於分離長達150 kb之DNA。市售已有幾種利用陰離子交換技術分離DNA之套組可供選用，其程序依操作所需時間、分離之DNA品質及大小各有不同。

1.4.4. 二氧化矽技術 (Silica technology)

二氧化矽技術為目前多數應用之首選，其可用於分離全長RNA或平均長度為20至50 kb之DNA，但此技術無法有效萃取超過100 kb之高分子量DNA。此方法係依據在高濃度離液鹽存在時，

核酸會選擇性吸附至二氧化矽之特性，雖然兩種核酸皆會吸附至二氧化矽上，但可利用裂解過程中使用特定緩衝液，以確保僅吸附所需核酸，而其他核酸、細胞蛋白質及代謝物則會保留於溶液中。去除雜質後，以低鹽緩衝液將高品質之RNA或DNA從二氧化矽上沖洗出來。二氧化矽基質可以懸浮液中之顆粒、磁珠、或薄膜型式呈現。此技術適用於大量檢品製備，且已有許多商業套組及自動化處理系統可購得。然而，這些水性裂解緩衝液（相對於以如苯酚等有機溶劑為主之裂解緩衝液）對難裂解檢品（如脂肪組織）而言並不理想，目前亦有專門設計用於促進脂肪組織裂解及抑制RNase之試劑套組。二氧化矽試劑套組可提供快速、可靠之DNA及RNA純化方法，常被採用於核酸萃取。

雖然可由這些步驟得到純化之核酸，但因部分應用上，即使微量RNA或DNA污染也可能會造成干擾，此時須以DNase或RNase進行預處理，或以專一性探針擷取處理之。而超純核酸之相關應用可參考核酸相關技術－擴增作用（通則4071）

1.5. 難萃取原料之特殊應用

1.5.1. 福馬林固定與石蠟包埋檢體之核酸萃取

經福馬林固定之石蠟包埋（formalin-fixed paraffin embedded, FFPE）檢體，其核酸通常已嚴重斷裂且已被甲醛化學修飾。雖然甲醛修飾無法被如凝膠電泳等標準之品質管制分析檢測，但甲醛修飾卻會干擾酵素分析。以蛋白酶長時間作用可充分萃取DNA並去除甲醛修飾作用，但如此一來將可能導致RNA嚴重斷裂及降解。雖然有一些分離系統已經優化，以盡可能在不造成進一步RNA降解之情況下逆轉甲醛修飾，仍應避免將FFPE檢品純化之RNA用於下游需全長RNA之應用中。一些應用可能需要再做調整以俾能使用片段之RNA（例如：設計可用於RT-PCR之小擴增片段）。

1.5.2. 細菌與病原體之核酸萃取

雖然革蘭氏陰性菌相對上比較容易裂解，革蘭氏陽性菌或酵母菌通常需進行酵素性預處理，以除去細胞壁使裂解更有效。此方法僅適用於分離DNA，因為酵素性處理會影響生物體之表現模式，因此RNA分離需要一個更快速之裂解步驟。另一個考量

因素是微生物通常在宿主或環境基質（例如土壤）之背景下產生，會因抑制性成分存在而使得聚合酶鏈鎖反應（PCR）檢測困難，這意味著必須針對特定生物體及檢品類型仔細調整及優化分離程序。現已有商業套組可於市面上取得，大多數使用溶菌酶去除細胞壁。

1.5.3. 樣品量有限之特殊考量

多種基因試驗技術，包括：單核苷酸多型性分析、短重複序列分析、陣列定序或基因型鑑定、即時聚合酶鏈鎖反應（real-time PCR）及其他分析步驟皆取決於是否可取得高品質之DNA。因為人類基因體DNA或個體基因型之檢品通常有限，所以如有一能使核酸檢品無限擴增之步驟，便可克服此種限制。適用於基因型鑑定之步驟已於“核酸相關技術—基因型鑑定”（通則4053）中討論。近期已有使用全基因體擴增反應（whole-genome amplification, WGA）技術從已純化之DNA或直接從未經DNA純化之臨床或案件檢品中針對有限基因體DNA進行擴增。目前有兩種WGA基本技術可用，是以PCR為主或仰賴多重置換等溫擴增作用，可參考核酸相關技術—擴增作用（通則4071）。

1.6. 樣品處理與長期保存

DNA是相對而言較穩定之大分子，一旦分離出來，可於2~8°保存至少1年。然而，當DNA含量非常少，如檢測DNA殘留量時，則建議將之保存在低於或等於-20°之條件下。DNA一般會保存於溶液中，如果DNA在分離後數日內將用於PCR反應及/或以核酸內切酶進行水解，則可以去離子水保存之。然而，DNA之保存多傾向於選用pH值在7.5~8.5間之Tris-EDTA緩衝液，因為水之緩衝能力有限，DNA在水中可能會發生降解。純化之核酸樣品以冷凍溶液保存時，在長期保存期間仍保持可識別之特徵。DNA應以原液保存在-80°，也可以冷凍乾燥後乾燥儲存而不需冷藏。在某些情況下，DNA可保存於可結合DNA之特殊濾紙上，並於室溫下以乾燥狀態保存多年。

由於RNase普遍存在，在處理RNA時需要額外之防範措施。分離得到之RNA在分取過程中，應置於冰上。在操作過程中，建議使用含濾膜之微量吸管尖，以防止吸取時受到RNase之汙染，並使用無菌之拋棄式聚丙烯管盛裝，因為該聚丙烯管通常不帶有

RNase，因此不需再進行RNase去活性之前處理。純化之RNA可溶於水中保存在 -20° 或 -80° 。在這些條件下，通常不會檢測到RNA降解。不像DNA，鹼性緩衝液對於RNA的長期保存並無益處，因RNA對鹼性環境敏感。通常，若核酸檢品需進行多項分析，則RNA與DNA檢品應小量分裝保存在 -80° 以備後續分析，一方面可避免重複解凍造成降解，也可使因汙染而導致分析不準確之機會降到最小。

2. 核酸之定性與定量

本篇描述用以評估純化後核酸之純度、完整性及數量之方法，包括：光譜分析程序，核酸片段之電泳分析和探針技術。運用擴增反應檢測及定量分析可參考核酸相關技術—擴增作用（通則4071）。

吸收光譜—

光譜學之基本原理於分光吸光度測定法（通則1008）中有論述。就核酸而言，是測定260 nm之吸光值，此方法無法區分DNA與RNA，但可利用吸光值來估算核酸中蛋白質汙染量。因蛋白質最大吸收光在280 nm，核酸最大吸收光在260 nm，故可計算 A_{260}/A_{280} 之比率以估計核酸製備物中蛋白質汙染量，一般希望此比率介於1.8~2.0間。以下舉例做進一步說明：每毫升每毫克雙股DNA在260 nm時之吸光係數為20；在280 nm處之吸光係數為10，而每毫升每毫克蛋白質在280 nm之吸光係數約為1（取決於其中之酪胺酸及色胺酸含量）；在260 nm之吸光係數為0.57。由此可知，因蛋白質吸光值靈敏度較低，即使 A_{260}/A_{280} 之比率大於1.8，仍可能存有大量蛋白質汙染。此外，由於DNA吸光值變化（ $\Delta A/\Delta \lambda$ ）在波長280 nm處相對急遽，若分光光度計缺乏校正，可能導致測量不正確；而DNA在波長260 nm處之波峰較寬，此波長之量測值對校正問題較不敏感。

至於非蛋白質類雜質，則可透過對DNA檢品從220~320 nm做一掃描得到相關資訊。純DNA在260 nm附近之吸收波峰幾乎對稱；在320 nm處吸光值為零；且在230 nm具有最小吸光值；而230 nm之吸光值再次提升至220 nm。干擾物質可與DNA一起被純化出來，並在UV範圍波長較小處（約230 nm處）有吸收值，此干擾物質

導致DNA含量高估，因此除了波長260 nm及280 nm處測量吸光值外，至少需測量波長230 nm之吸光值。而波長大於300 nm之吸光值可能來自其他污染物及顆粒性物質。分離DNA時常用之試劑如苯酚及醇等溶劑，若沒有完全去除，則會干擾DNA吸光值之量測，分析者應了解這類測量之限制。最後，須注意DNA吸光值及A260/A280比率會依離子強度而有所不同，其差異高達30%。基因體DNA吸光值較高，而溶於純水中DNA之A260/A280比率會比溶在緩衝液或鹽溶液之相同DNA為低。

定量核酸時，建議使用下述DNA及RNA各自之吸光係數。當採用1 cm比色管測得之吸光值為1時，相當於50 µg/mL之雙股DNA [E (比吸收係數) = $0.02 (\mu\text{g/mL})^{-1}\text{cm}^{-1}$]；RNA在260 nm處之比吸收係數為 $E = 0.025 (\mu\text{g/mL})^{-1}\text{cm}^{-1}$ (吸光值為1.0時相當於40 µg/mL之RNA)；而單股DNA之 $E = 0.027$ (吸光值為1.0時相當於37 µg/mL之單股DNA)。測吸光值時，應以溶解該DNA檢品之相同溶液做為空白對照組。一般希望吸光讀值落在0.1至1.0之範圍內具適當 (讀值-濃度) 線性關係，當吸光值高於1.0時，會隨著吸光值增加而變得不線性；吸光值低於0.1 (5 µg/mL之DNA) 時，讀值之準確度則取決於分光光度計之品質與雜訊程度。

2.1. 螢光定量DNA與RNA之程序

花青素染劑衍生物 (cyanine dye derivatives) 之所以能用於核酸定量，是因其可專一性與核酸 (DNA、RNA及寡核苷酸) 產生交互作用，並且僅在結合時發出螢光。其交互作用之確切機制並不完全清楚，但可能與插入雙股DNA中及結合至DNA表面有關。

此法可使用螢光計或讀盤器進行測量。此染劑之螢光靈敏度遠高於吸光值，因此當DNA濃度很低 (低至25 pg/mL) 時，這些染劑提供了極佳之偵測效用。染劑必須防止光照，以避免光漂白作用。在 $10^3 \sim 10^4$ 範圍內仍保持線性相關性。通常以小牛胸腺DNA和 λ 噬菌體DNA作為校正物以建立標準曲線。這些染劑中已有一些被最佳化以結合雙股DNA或單股RNA及寡核苷酸，其中有一種DNA結合染料僅在低離子強度下亦會與單股DNA及RNA結合，且相同質量之單股DNA及RNA所得之訊號強度約僅為雙股DNA之10%或更低。因此，若在DNA製備過程中未刻意移除RNA時，此法是測量DNA之首選方法。另有一針對RNA測量進行優化之螢光染劑，分析人員使用此染劑之兩種不同濃度，可檢測低至1 ng/mL及高達

1 $\mu\text{g/mL}$ 之RNA。此染劑與DNA結合後亦會發出螢光，但無法如前述DNA染劑（如與DNA及雙股DNA結合之染劑）般可利用調整試驗條件來儘可能減少與非標的核酸結合，故此染劑定量時可能會受到核酸雜質（例如：RNA製備物中之DNA或DNA製備物中之RNA）影響。若DNA存於RNA製備物中，則須要用DNase前處理。蛋白質較不可能干擾這些染劑，但一些清潔劑以及苯酚會導致螢光逸失，因此應確認核酸萃取試劑對後續螢光測定之影響。雙苯甲醯亞胺螢光染劑（如bisbenzimidazole，又稱Hoechst 33258）是測量DNA之另一選擇。研究人員發現這些染劑可與DNA雙股螺旋之小凹槽（minor groove）結合，並且發現DNA序列中腺嘌呤或胸腺嘧啶核苷酸序列提供了能與此類染劑做最佳結合之小凹槽空間，致使螢光訊號強度與DNA序列相關，因此校正物DNA應具有與待測DNA相似之核苷酸組成。這些染劑不如花青素染劑那麼靈敏，但比吸光值測量靈敏。使用此類染劑時，為能區分雙股DNA與RNA，分析人員應使用低染劑濃度及高離子強度；若要區分雙股DNA與單股DNA，則需要在低離子強度下進行分析。

2.2. 偵測DNA分子大小

2.2.1. 瓊脂凝膠電泳

瓊脂凝膠電泳提供了一個透過片段大小分離核酸之簡單且準確方法。此技術可用於分離大範圍之DNA分子片段，且可以用於製備或分析。舉例來說，可使用凝膠電泳驗證PCR反應產物是否具有正確大小之片段。DNA片段可從凝膠切片回收，提供足夠純度之PCR產物以進行DNA選殖或定序。一般RNA完整性也可透過凝膠電泳測定之。核酸片段大小（以鹼基對數目表示）與磷酸根負電荷之比例關係提供了分離之參考依據。除質體外，電泳一般不至受DNA構形影響。超螺旋質體DNA在電泳時會移動在線性或開環/切口質體DNA之前，可利用此特性來判斷製備得到之質體DNA構形。相比之下，分離RNA時則多使用變性凝膠，因RNA傾向形成分子間和分子內二級結構。

瓊脂凝膠電泳使用水平電泳裝置，將凝膠置於電泳槽中間凸起之平台處，平台兩側凹槽填充特定緩衝液，緩衝液填充至凝膠表面以上約1毫米之高度。雖然主要電阻位於凝膠本身，核酸上所帶電荷仍足以使片段在凝膠中移向陽極。片段移動速度與其

大小成比例，最小片段移動速度最快。影響電泳的主要參數是凝膠孔徑、緩衝液濃度及電壓梯度。分離DNA片段能力之依據主要為凝膠孔徑，其取決於瓊脂濃度。針對<100至25,000個鹼基對之DNA片段，常使用之瓊脂濃度範圍為0.5%至1.0%間；當區分較小DNA片段時，會使用較高瓊脂濃度。降低凝膠之瓊脂濃度可提昇大片段DNA電泳之解析度，但同時會使小片段DNA之解析度下降，對於更大片段DNA，可使用（逆向）脈衝式電泳進行分析。

為了達到均勻之電泳，瓊脂必須完全溶化，並溶解於電泳緩衝液中，其最常用於DNA分離之緩衝液為TBE (tris-borate-EDTA) 或TAE (tris-acetate-EDTA)。TBE之緩衝能力較TAE高；若要從凝膠中回收DNA，則應使用TAE。使RNA變性之凝膠可使用MOPS緩衝液 (40 mM MOPS, 10 mM sodium acetate, 1 mM EDTA, pH 7.0)。以微波爐加熱可使瓊脂溶化，而瓊脂易沸騰，需將瓊脂溶液短時間微波數次並混合均勻，直到瓊脂完全溶化。溶化時瓊脂顆粒會從白色轉變為透明，可將燒瓶對著光且旋轉之以檢視瓊脂是否溶化完全，若瓊脂溶液未完全溶化至均勻透明，則需再行加熱，將完全溶化之瓊脂稍微冷卻後，再倒入鑄膠盒中，目前亦有供特定應用之市售即用型瓊脂凝膠以供使用。製備RNA變性用之凝膠時，則需在通風櫃中將最終濃度為2.2 M或6.7%之甲醛加入已溶化之瓊脂中。分析人員應於瓊脂凝固前放置適用孔梳於其中，使之形成可加入檢品及標準品之孔槽。待瓊脂凝固後置於電泳槽中，加入緩衝液至瓊脂兩側之電泳凹槽，其緩衝液高度至瓊脂表面，使瓊脂亦覆有一層緩衝液。接著將10倍追蹤緩衝液(含0.25%溴酚藍或0.25%二甲苯藍或含有兩者之40%蔗糖溶液)加至各DNA檢品中，如此可增加檢品密度並因含有追蹤染劑以評估電泳是否完成，另檢品密度之增加有助於讓檢品進入檢品孔槽，並在電泳開始時檢品移行至瓊脂凝膠內之前都能保留在樣品孔槽中。

進行瓊脂凝膠電泳時，至少應保留一或更多孔槽以加注分子量範圍與檢品及瓊脂濃度相對應之DNA標準品，各種不同片段大小範圍之DNA標準品已有市售品可供選用。於瓊脂凝膠兩側孔槽加注標準品，而將檢品加注於中間之孔槽，有助於確定電泳梯度在凝膠上是否均勻。由於真核細胞RNA製備物中，被共同

萃取出之18S及28S核糖體RNA (rRNA, 分別含1900及4700個核苷酸) 經電泳後會形成二明顯條帶 (band), 此亦可作為分子大小之標準品。此外, 核糖體RNA提供了RNA完整性之訊息, 若rRNA條帶不見或模糊, 則表示RNA製備物之品質有問題。將檢品加入瓊脂凝膠之孔槽後, 蓋上電泳槽蓋子並連接電源。藉由添加至檢品及標準品中之追蹤染劑, 可輕易判定電泳進行之程度, 溴酚藍可與小於500鹼基對之DNA片段一起移動; 二甲苯藍則可與大小為5000鹼基對之DNA片段一起移動。電泳進行時, 常將電源設定在固定電壓 (1~10 V/cm 凝膠長度), 若提高電壓將使電流增加, 產生具破壞性之熱並耗盡緩衝液。

2.2.2. 脈衝式電泳

脈衝式電泳適用於分離50,000~200,000個鹼基對之大DNA片段, 與一般電泳不同之處在於增加了一個於恆定電壓下可轉換電場之設備。大片段DNA藉由改變構形穿過瓊脂孔隙, 而較大片段在電場轉換時需要較長時間重新調整, 因此會比較小片段移動得更慢, 如此歷經數小時脈衝式電泳後, 可提供較好之解析力。通常正向與反向 (電場) 比例為3:1, 且電泳過程中, 常將電場交替轉換時間逐步拉長, 電泳可持續進行10~16小時, 須避免凝膠溫度、黏度及其他特性產生波動, 而造成失真現象。

2.2.3. 聚丙烯醯胺膠體電泳 (PAGE)

PAGE型式與瓊脂凝膠電泳型式有極大差異。PAGE之一般程序描述於聚丙烯醯胺膠體電泳法 (通則4046) 中。如要解析大小範圍在10~500鹼基對間之小片段DNA, 非變性聚丙烯醯胺膠體電泳比瓊脂凝膠電泳更合適, 因分離該大小片段所需孔徑比瓊脂凝膠小得多。該凝膠藉由丙烯醯胺單體聚合而製備成, 丙烯醯胺之濃度百分比決定了最佳解析之片段大小範圍, 例如, 20%丙烯醯胺適用之大小範圍為10~100鹼基對, 5%丙烯醯胺可用於100~500鹼基對範圍, 亦可使用適合區分特定大小之市售即用型聚丙烯醯胺膠體。經電泳分離之核酸可透過硝酸銀溶液染色顯現, 而非溴化乙錠或花青素染劑。然而, 硝酸銀染色費力且耗時, 且不適合含有大量蛋白質之核酸製備物, 因蛋白質亦可被硝酸銀染色。

2.2.4. 毛細管電泳與雷射誘導螢光偵測法 (CE-LIF)

以CE分離DNA片段已有多數歷史(毛細管電泳的一般原則可參見毛細管電泳法(通則1040))，此分析程序與瓊脂凝膠電泳原理相似。毛細管電泳可利用凝膠電泳中使用之交聯緩衝系統，亦可使用為產生孔隙纏住蛋白質所設計之聚合物溶液(例如聚甲基纖維素)。這些聚合物溶液可於各次進樣之間添加至毛細管中，因此可於每次電泳前提供”新鮮”之凝膠，此外，相較於聚合凝膠填充毛細管，聚合物溶液允許更多次進樣。分離作用之解析能力取決於孔隙大小，而此乃依據凝膠組成而定。目前市面上已有適用於分離特定片段大小範圍之商業套組，其套組分離適當片段大小DNA時之結果具有相當可性度，若DNA片段大小在凝膠解析範圍之外時，雖然還能進行分離，但由於已超過凝膠解析之能力，故分離結果可能就不具可信度及再現性。

DNA片段可透過各種機制來偵測，利用紫外光偵測DNA之吸光值是可行的，但是一般偏好與常用之檢測程序其實是利用雷射誘導螢光(LIF)。螢光偵測之選擇性及靈敏度均優於UV檢測，且螢光偵測極限較紫外光更低，其差距約為 $10^2 \sim 10^3$ 倍。雖DNA本身即具有內生性螢光，但背景螢光值與複雜雷射光譜之需求阻礙了其內生螢光之應用，而多以外接螢光標記方式進行偵測。最常用於標記DNA之方法於上述之**螢光定量DNA與RNA之程序**一節中已有描述，此系統因其簡單性(將染劑加至檢品或反應緩衝液中)及有效性而被廣泛使用。毛細管電泳優勢包括：分析速度、使用最小量檢品體積之靈敏度以及自動化潛力，其優勢主要是透過凝膠小型化而達成。自動化系統為RNA與DNA無論在定性、定量及片段大小上皆提供了可穩健進行大量分析之平台。由於無處不在之RNase導致RNA不安定並逐漸降解，更突顯出以毛細管電泳評估RNA完整性之重要性，一些以28S與18S比例做為評估之新技術，可改善這些方法分析能力。

3. 膜雜交反應與體外探針標記

雜交反應(hybridization)技術很早便開始應用於分子生物學，用以鑑別個體核酸與預測物種間相似度。在本篇與其他篇章皆描述雜交反應廣泛使用於觀察及鑑別核酸序列(參考核酸相關技術-擴增作用(通則4071)、核酸相關技術-基因型鑑定(通則4053))。在以內切限制酶水解DNA與依分子量大小進行電泳分離之方法

出現後，利用探針標記進行雜交反應更提供了一個可觀察特定基因體中基因排列組成之方法。

在此描述之雜交反應技術包括圓點與狹縫墨點法、北方墨點法、南方墨點法、原位雜交反應及螢光原位雜交反應（fluorescent *in situ* hybridization, FISH）。這些技術都仰賴核酸探針，此探針是指以放射性、螢光、冷光、化學標籤或酵素（報導分子）等標記之具特定DNA或RNA序列之寡核苷酸。藉雜交探針結合至標的核酸之互補序列，可觀察與鑑別標的物，如下所述。

3.1. 圓點與狹縫墨點法（Dot and Slot Blotting）

圓點墨點法是雜交技術中最簡單且最快速者，於此法中將核酸直接點在硝化纖維素膜或尼龍支撐膜上，無需先透過瓊脂凝膠電泳分離核酸物質。使用微量分注器或圓點、狹縫墨點裝置將核酸點到支撐膜上，此裝置含有兩個膜框架，以三明治方式將核酸點樣之支撐膜夾於中間，底部膜框架會連接真空裝置，而位在上面框架具有細槽，核酸檢品注入槽中後透過真空拉引推進支撐膜中，使核酸結合於膜上，將膜風乾後可透過將硝化纖維素膜加熱至80°或將尼龍膜暴露於預先設定好時間之紫外光而將核酸固定在膜上。利用已標記之探針進行雜交反應可鑑別核酸，但無法提供任何關於核酸檢品數量或大小之資訊，若同時將已知濃度之純化核酸標準品與未知檢品點至膜上，則可將兩者產生之訊號進行比較，以定量未知目標核酸。

3.2. 南方墨點法（Southern Blotting）

南方墨點法是指將DNA從瓊脂或聚丙烯醯胺膠體轉移到硝化纖維素膜或尼龍膜上，再使用短小且單股DNA探針來觀察與鑑別目標DNA。南方墨點分析以轉移與固定方法為基礎，並搭配DNA片段之電泳分離技術係開發於1975年。具體而言，此方法通常是於一限定之基因圖譜（如限制酶圖譜）中鑑別特定核酸序列用。利用多種限制酶結合南方墨點分析，可準確定位病毒基因體中之基因位置。此方法需有足量DNA進行分析，利用瓊脂凝膠電泳依分子量大小分離DNA片段，若為雙股DNA片段，則在轉印前必須先變性成單股DNA，再透過毛細作用將其附著於膜上，接著將附著之DNA與硝化纖維素膜或尼龍膜如上所述進行交聯以固定於膜上，若使用帶正電之尼龍膜則不需將DNA固定於尼龍膜上。硝

化纖維素膜較脆弱，可使用不同探針進行最多三次之雜交反應；而尼龍膜較堅固，可進行高達10~12次之反應，但可能會產生更多背景雜訊，特別是使用帶有呈色基團之探針時。

3.3. 北方墨點法 (Northern Blotting)

北方墨點分析包含一系列分離、轉印及固定RNA等步驟，與南方墨點分析之DNA處理方式相近。RNA需變性以減少二級結構，確保RNA能依據長度於瓊脂中均勻分離，其變性作用可於進行電泳前加入乙二醛或二甲基亞砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO) 或以含有甲醛之凝膠進行電泳。而轉印方式與南方墨點相同，但北方墨點法於轉印前不需要進行RNA變性，因已於電泳分離RNA前完成變性作用，附著於膜上之RNA與膜之交聯方式則與DNA類似。

3.4. 原位雜交反應及螢光原位雜交反應 (Fluorescent *In Situ* Hybridization, FISH)

核酸之原位雜交作用一般是指決定該核酸序列在其自然狀態一組織、個別細胞或染色體上之位置。藉由設計原位雜交探針以結合互補之DNA或RNA核酸序列，進而探索組織中特定基因之RNA表現位置，或定位染色體上特定DNA序列。染色體DNA序列之定位是將銀顆粒化學性連接到探針序列，再計算細胞分裂中期染色體上之銀顆粒密度。雖然，過去這些方法效果不錯，但靈敏度始終是個問題，其解決方式是使用比一般報導基團更敏感且安全之報導基團，即螢光原位雜交 (FISH) 技術中使用之螢光。FISH之另一優點為可利用不同顏色螢光同時觀察多個雜交反應，而其他偵測系統無法辦到。

3.5. 雜交反應中使用標記探針檢測DNA及RNA

透過DNA或RNA標記探針所進行之專一性雜交反應，可觀察並定位我們感興趣之核酸種類。使膜或檢品 (如原位雜交與FISH時已固定之細胞或組織) 與標記探針在適當溫度及鹽濃度下作用，將能進行專一性雜交反應，接著以含不同濃度清潔劑與鹽之緩衝液於不同溫度下洗滌，使非專一性雜交產生之背景訊號最小化。以下將討論探針之類型與標記方式。

探針類型可以為試管反應生成之RNA探針，或以雙股片段、質體或單股寡核苷酸形式存在之DNA探針，其內含部分目標基因片段有利於偵測。探針標記方式可於探針序列中嵌入有³²P或³⁵S放射性

追蹤劑標記之核苷酸，或嵌入非放射性標記（如生物素）之修飾鹼基（如與生物素鍵結之單磷酸腺苷（AMP））。放射性探針藉由將轉印膜放在X-光底片上顯像觀測；生物素標記探針則是透過與鏈親和素-鹼性磷酸酶（streptavidin-alkaline phosphatase）結合而偵測，其透過鹼性磷酸酶催化受質進行酵素性反應，並於探針處產生不溶性有色產物。除此之外，非放射性探針尚有多種不同形式，如對DNA進行其他修飾作用，並與抗體-鹼性磷酸酶進行結合，或以化學冷光標記後於X-光底片上進行偵測。

核酸可透過酵素或化學方法合成與操作修飾，此系統可修飾核酸結構並引入外來部分成分以產生獨特分子，後者有利於偵測相對於宿主核酸（背景值）而言數量極少之病毒核酸。核酸之化學合成及其純化已成常見且均能達到高品質之生產，且可合成片段也愈來愈長，藉由設計部分片段進行連結與接合以生產出更大片段。

一般實驗室使用市售試劑與設備即可合成客製化之DNA寡核苷酸，亦可向業者訂購客製化探針。通常利用分子篩方法進行純化，藉以去除不完整之寡核苷酸。RNA寡核苷酸亦可以化學方式合成，或於試管中以不同原核RNA聚合酶啟動子控制互補之轉殖DNA片段產生RNA。進行雜交反應時常使用DNA探針，但是還是有一些應用會需要RNA-RNA或RNA-DNA結合之使用。

標記DNA之主要方法包括利用激酶反應直接將標記核苷酸接在各單股DNA之最末端、透過大腸桿菌DNA聚合酶I之Klenow片段所具有之DNA修復功能將標記核苷酸連接到DNA切口（又稱鏈裂移位）以及聚合酶連鎖反應。而聚合酶連鎖反應可產生相對而言較多之內部標記探針，因每一輪PCR熱循環可使標記探針量加倍，然而利用激酶或Klenow等標記方法，每一模板分子所產生探針比例則會少於一。此外，聚合酶連鎖反應亦可用來產生於末端有各種不同組成分之獨特探針。

4. 核酸定序

關於DNA定序方法之描述首見於1977年，利用化學裂解方式使DNA鏈在特定序列處斷裂（稱為Maxam及Gilbert定序），此方法於分子生物學發展初期廣受應用，但於高通量定序中未見其使用，因此在此處不作詳細討論。現今主要定序方法皆依據Sanger於1977

年所描述之雙脫氧定序方法（Sanger定序）。其利用聚合酶之酵素專一性於特定鹼基位置中斷DNA鏈，此方法從根本上改變了定序方法，成為最廣泛認可之定序方式，以及分子生物學實驗室之常規分析方法。無論是儀器設備、樣品製備與收集、數據管理、數據分析與基因序列組裝等方面之創新都需仰賴此定序程序作為基礎。

高通量定序納入定序過程之所有要素，並將其應用於大量收集序列數據，通常用於較大基因體，但亦可用於較小之研究。欲獲得最終序列資訊須經由樣品製備、定序、數據彙整及數據總結等相關過程，而要達成這些個別目標，則需考量儀器設備、拋棄式耗材、實驗步驟與程序等各個面向。

4.1. 定序反應

雙去氧定序步驟是利用Klenow酶之專一性，在聚合酶所催化之核酸鏈延伸過程中間歇性引入雙去氧核苷酸使延伸終止。每一檢品定序時需要四個獨立反應（一個反應針對一種鹼基進行之），其反應所獲得之不同長度核苷酸鏈之混合物可依據其各別分子量大小進而分離之，且於定序反應時加入含放射性標記核苷酸可用以偵測核苷酸鏈。

隨著生物技術之進步，科學家已經發現更多具高度準確性及穩定性之酵素，可增加定序反應讀取之長度與序列準確性，這些進展增加了循環定序之可行性，且已成為常見方法之一。此循環定序程序之原理結合了Sanger定序法及PCR擴增法，將雙去氧核苷酸導入擴增幅之DNA中。相對於Sanger定序法，循環定序法可使標定DNA片段濃度更高、涵蓋範圍更廣，因而使得可讀取之DNA序列長度更長。

4.2. DNA定序片段之分離過程

本篇前面數節所討論之對象主要是完整DNA與RNA分子；而接下來則將針對定序反應所產生片段分離之挑戰（特別是平板凝膠定序及毛細管電泳）加以討論。隨後將說明偵測技術及序列完整性。

4.3. 平板凝膠定序（Slab Gel Sequencing）

聚丙烯醯胺膠體電泳通常稱為平板凝膠電泳，是最早應用於分離DNA定序反應片段之分離機制。如上所述，DNA片段於電泳時主

要是依據反應混合物中片段大小而達到分離效果。不過，在進行平板凝膠定序時需選擇適當凝膠孔徑，使能達到於數百個鹼基中亦可解析單一鹼基之解析度。凝膠中除了聚丙烯醯胺外，常內含變性劑如尿素以確保DNA片段能維持在變性狀態。在集束毛細管定序系統受到採用前，平板凝膠分離機制之分離及通量能力常被認為是最先進的。

4.4. 毛細管電泳定序 (Capillary Electrophoresis Sequencing)

如上所述，毛細管電泳更優於以凝膠為主之分離方式。然而，就像平板凝膠定序一樣，需選擇適當孔徑，才能達到在數百個鹼基中區分單一鹼基之解析度。市售之集束毛細管系統是由8~384個毛細管所組成，此系統是大規模DNA定序時主要採用之系統，理論上此系統每年產量可獲得超過1.1億個鹼基對之DNA序列。

4.5. 偵測方式

4.5.1. 放射性同位素偵測

DNA定序反應起初是利用放射性同位素(如 ^{32}P 或 ^{35}S)來進行偵測，主要因為當時此法常應用於凝膠分離實驗中，其優點在於此偵測作用具通用性、偵測極限低、不因標記而影響分子移動速度，且不因DNA聚合酶差異而影響其準確度。而其缺點則包括處理廢棄物與安全防護之成本高、無法同時進行多重偵測(具通量限制)，且需24~36小時之曝光時間(指無法做即時偵測)。

4.5.2. 螢光偵測

螢光染劑於DNA定序上已大大取代了放射性同位素，成為重要之偵測工具，主因為螢光染劑沒有放射性探針之缺點，且螢光染劑可以其最大激發波長做為區別，可同時進行多重螢光偵測，每一檢品之四個定序反應被取代為使用四種不同顏色之螢光標記進行單一反應，故膠體電泳時僅需單一檢品槽而非放射性探針所需之四個檢品槽。此外，其他優點為可獲得更高通量與收集自動化即時數據。

4.5.3. 質譜測定法

質譜測定法(MS)使生化研究領域產生變革，且於核酸定序領域中具有顯著之發展潛力。軟性離子化技術如電噴灑游離與基質輔助雷射脫附游離法擴展了質譜於DNA定序之應用性。質譜

具有其他偵測法所不能及之優點，包括DNA片段偵測速度（訊號擷取僅於微秒範圍，而傳統偵測方法則需數小時）與準確度（如每一DNA片段分子量都可以極準地偵測）。Sanger方法是利用聚合反應過程中產生DNA片段之質量差異來定序；而質譜可非常精確解析僅僅相差一個鹼基對長度之DNA片段。可惜的是，質譜偵測之靈敏度會隨著片段長度增加而受到影響，目前尚無法跨越100個鹼基對之門檻。

近期崛起之定序技術乃利用大規模平行定序技術，以試圖降低定序成本。例如：固相定序或利用高度平行與小型化焦磷酸根定序法，這些定序技術將於核酸相關技術—基因型鑑定（通則4053）中描述。

4.6. 序列完整性

要成功進行自動化收集並解讀數據之先決條件，在於品質良好之定序數據，意即要盡量減少人為介入，讓系統於偵測後鑑別各鹼基。為確保能準確進行鹼基鑑定，其關鍵步驟為DNA雙股進行數次最小定序。此外，亦可以採用其他策略，例如使用不同序列位置之引子，可增加兩次定序反應所得共有序列之準確性，若使用市售之特定軟體套組，則此項任務更易完成。近期技術發展已提供更適合進行大規模定序研究之替代定序平台，包括於陣列平台之晶片上進行目標短片段序列之定序，再將原始數據提供給複雜電腦軟體進行序列重組。另外亦已開發用於快速定序短核酸序列（如短PCR產物之寡核苷酸）方法，包括以質譜為基礎及焦磷酸根定序平台，後者於核酸相關技術—基因型鑑定（通則4053）中描述。