

科學檢測：DNA 序列

Scientific Testing: DNA Sequencing

王思芃 | 國立臺灣博物館典藏管理組

Wang, Szu-Peng | Collection Management Department, National Taiwan Museum

前言

基因是攜帶告訴細胞如何製造蛋白質指令的一段核苷酸（DNA 或 RNA）序列，可視作基本遺傳單位，亦是基因組（細胞內所有核苷酸序列的總和）中具有功能性的 DNA 或 RNA 序列。針對各物種獨有的核苷酸序列稱為「生命條碼（Barcode of Life）」，目前各國的博物館典藏也逐漸重視「生命條碼」資料庫的建立，目的在於加速物種的鑑定，以推動生物多樣性的保存，減少生物物種之消失、生物資源的永續利用，並公平合理地分享生物相關的資訊及所得之惠益。

而現今的自然史博物館除了以物種外觀的差異、過往記錄採集地理資訊（海拔高度、經緯度等），以及依照生物組織或器官功能性來對物種進行鑑定及分類研究外，也大量利用分子系統學的分析技術，使用物種特定的 DNA 序列作為生物的分類依據。

什麼是 DNA ？

DNA 是去氧核糖核酸（deoxyribonucleic acid）的英文縮寫。它是一種雙螺旋結構的長鏈聚合物，是組成基因的生物分子（圖 1）。DNA 是由一長串鹼基、醣類分子與磷酸，三者結合而成為完整的基本分子單位（也稱為核苷酸，Nucleotide）鏈結而成。組成 DNA 的鹼基，分別是腺嘌呤（adenine，縮寫

A）、胞嘧啶（cytosine，C）、鳥嘌呤（guanine，G）與胸腺嘧啶（thymine，T），4 種鹼基間，A 與 T 的分子結構能對應形成 2 條穩定氫鍵，而 G 與 C 的分子結構則對應形成 3 條穩定氫鍵，腺嘌呤與嘧啶間相對應所形成的氫鍵能使 DNA 分子穩定。而 DNA 上鹼基排列的次序，即稱為 DNA 的序列。此外，還

有1種鹼基稱為尿嘧啶(uracil, U)，出現在核糖核酸(RNA)分子中，角色相當於DNA裡的胸腺嘧啶。

一條DNA鏈上4種鹼基的排列組合，藏有大量告訴細胞如何製造各種蛋白質的遺傳指令。不管是人、動物，甚至植物，都使用同一套的遺傳指令。因此人類跟黑猩猩的基因組比對竟有98%相同，跟貓則有90%的相似度，與昆蟲果蠅的基因組相似度也達到了60%，甚至人類與植物香蕉的基因組之間有著50%的相似度。以哺乳動物來說，細胞內大約80%的鹼基序列，或者說基因組是相同的。

雖然不同的物種外表差異很大，但就細胞角度來說，卻有相似的基本細胞結構。由於編碼基因受到功能的限制，因此不同生物間編碼基因的相似性

比起整個基因組更高。基因控制生物重要性狀(例如身體四肢、雙眼、內臟器官)的功能，而控制這些結構的蛋白質功能受到嚴格的限制，太大的變異會導致功能的異常，進而對生物個體的健康、存活與繁殖造成不利影響，因此這些基因的序列在物種間就會高度相似。而有些基因控制的性狀(如毛髮和瞳孔的顏色、體型大小等等)，與個體的健康、存活與繁殖關係較小，所受到功能的限制較低，物種間基因序列的差異就會較大。

在生物的染色體中，編碼基因可能只佔了DNA序列的1.5%到2%之間，但因為這些編碼基因在物種間具有一定的相似性，不同物種間容易以相同的方法檢測分析；因此，特定編碼蛋白的基因序列，就常成為判斷物種之間差異性的依據。

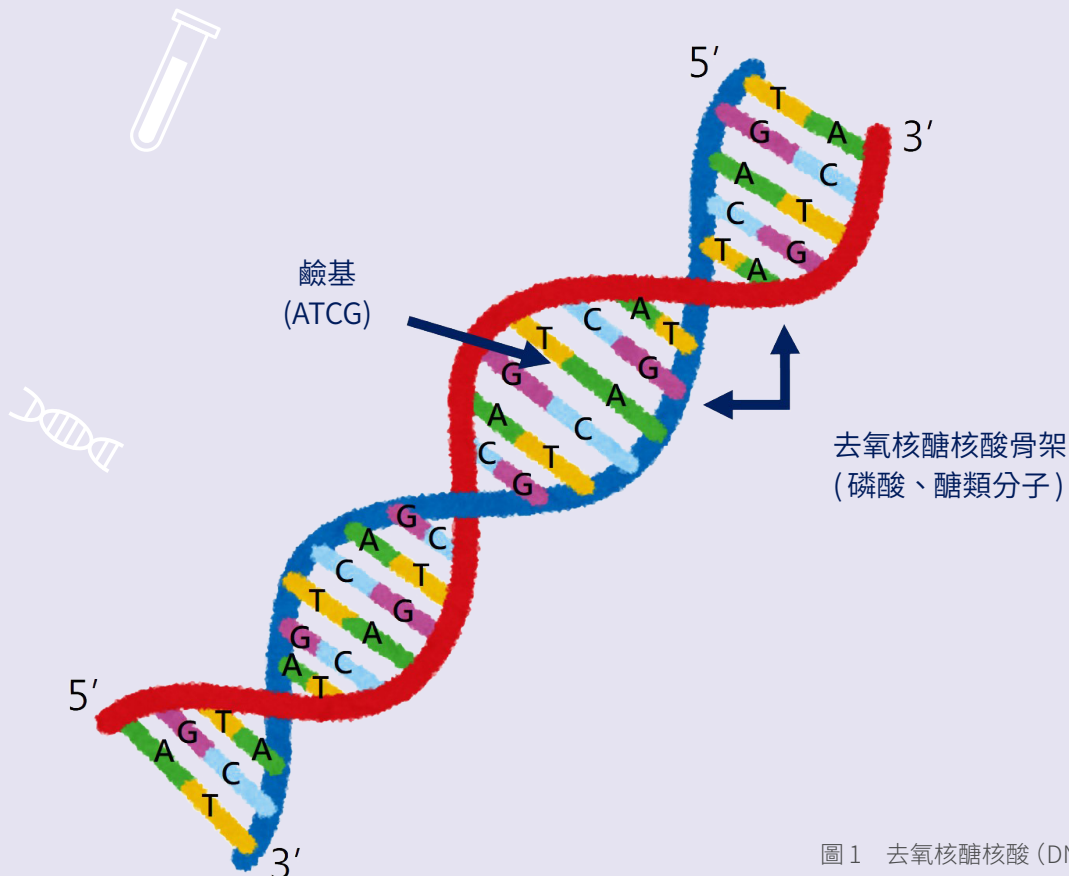


圖1 去氧核糖核酸(DNA)的雙股螺旋結構



聚合酶連鎖反應 (PCR)：DNA 序列的複製放大

聚合酶連鎖反應 (Polymerase chain reaction, PCR) 是一種複製 DNA 片段的技術，可以讓微量難以觀察的特定 DNA 片段快速進行大量擴增。目前廣泛地使用在分子生物學，已被成功應用於生物醫學研究、犯罪取證、疾病診斷及分子考古學等領域；最近 COVID-19 的病毒株不斷在變異，也是靠 PCR 技術來檢測病人所感染的病毒類型。

在聚合酶連鎖反應技術發明之前，生物的 DNA 在生物體外進行人工複製是一種耗時費事的程序，首先要使用限制酶將 DNA 裁剪出要複製的片段，接著利用連接酶送到適當的載體中，再運用瞬間電擊或加熱刺激的方式做轉形，將含有特定 DNA 片段的載體送到大腸桿菌的勝任細胞 (Competent cell) 中，最後將此菌培養增殖，經過分離及純化的步驟，才能取得大量經大腸桿菌複製的 DNA 片段。

1983 年，凱利·穆利斯 (Kary Mullis) 研發出 PCR 技術 (圖 2)，並於 1993 年獲得諾貝爾化學獎，他利用細胞內雙股 DNA 複製的原理，在試管內使用將特定 DNA 片段作為模板，先以高溫將雙鏈 DNA 解開成單鏈 (變性)，然後降低溫度讓具專一性的引子 (短片段 DNA 序列) 連結到單鏈模板上的特定位置 (黏合)，再利用 DNA 聚合酶從引子作為開端複製模板上的 DNA 序列 (延伸)，每經過一次這樣的熱循環 (升降溫) 反應，DNA 片段數目可以 2 的倍數增加 (圖 3)，所以經過 30 至 35 次熱循環反應後，可獲得 2^{30-35} (約十億至三千四百億) 倍的特定 DNA 片段。這個程序經進一步的研究改良後，可由機器自動反覆進行熱循環反應，大幅簡化 PCR 反應的操作，顯著提高了 PCR 反應的效率。

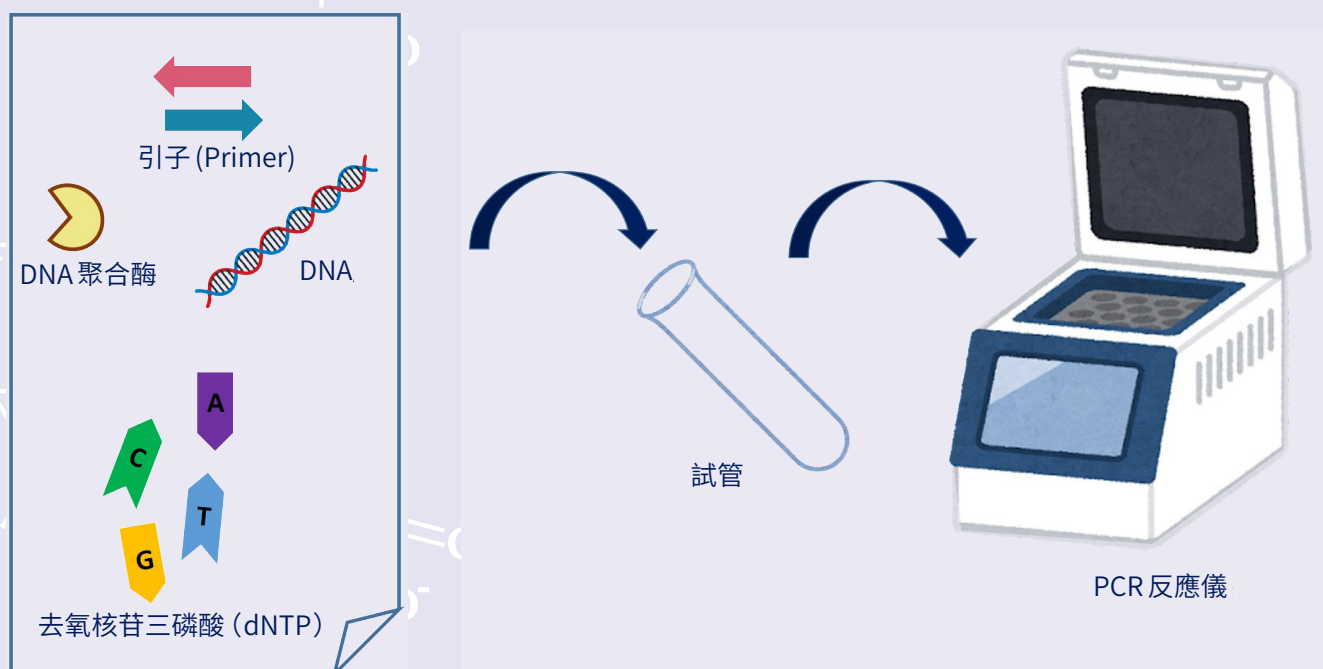
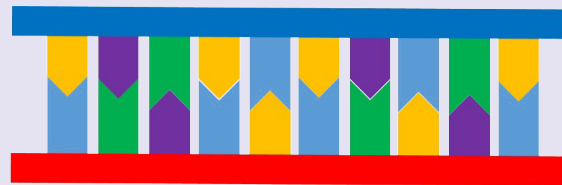
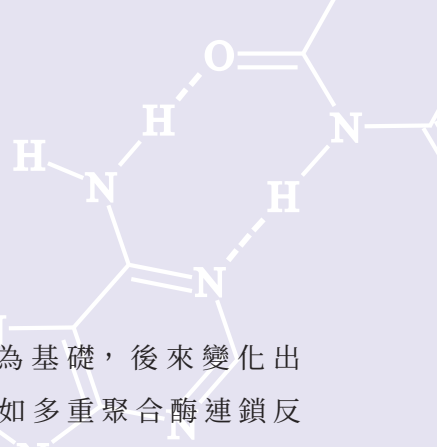
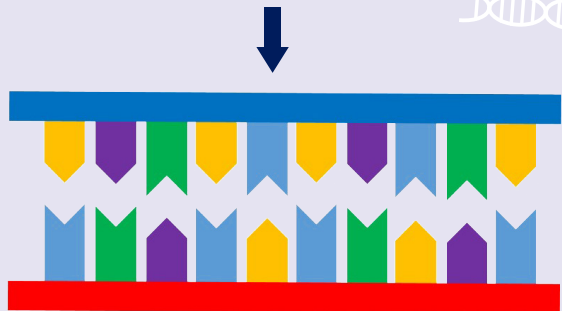


圖 2 聚合酶連鎖反應需要幾個基本的組成：DNA 板模、引子 (primer)、DNA 聚合酶和去氧核苷三磷酸 (dNTP)，在 PCR 反應儀進行 30 至 35 次熱循環反應

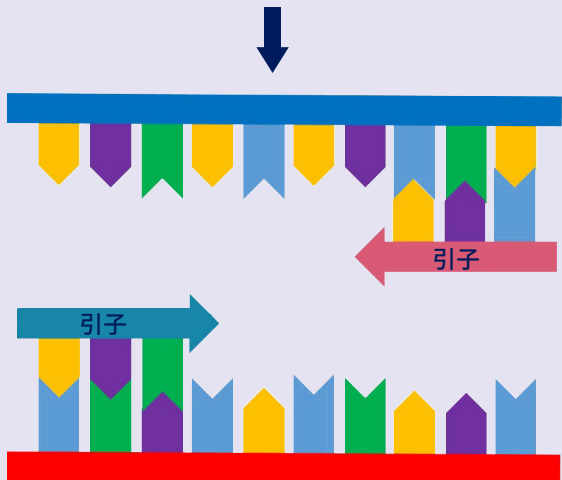




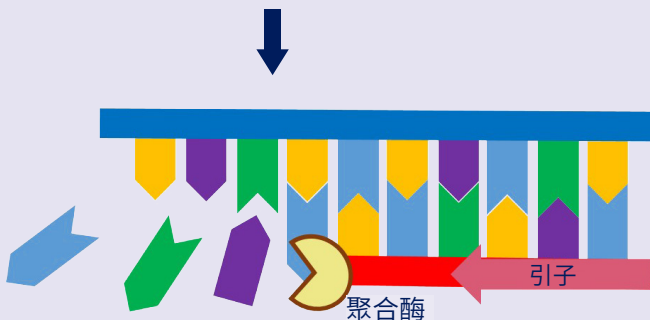
1. 變性
利用高溫 (95°C) 使雙鏈 DNA 分離。



2. 黏合
降低溫度使得引子可以結合於單鏈 DNA 上。



3. 延伸
DNA 聚合酶由降溫時結合上的引子，
開始沿著 DNA 鏈合成互補鏈。



以此 PCR 原理為基礎，後來變化出許多 PCR 技術，諸如多重聚合酶連鎖反應 (Multiplex PCR)、巢式聚合酶連鎖反應 (Nested PCR)、聚合酶連鎖反應—限制性片段長度多態性 (PCR-RFLP) 以及即時聚合酶連鎖反應 (Real-time PCR) 等。目前最為人知的，即是運用 Real-time PCR 技術，來檢測病患身上 COVID-19 病毒量的高低，以評估其傳染力。Real-time PCR 可算出病毒「陽性」定量的 CT 值 (Cycle Threshold)，意即 PCR 產物表現出螢光反應，到達設定的亮度閾值 (Threshold) 所歷經的循環數。如 CT 值是 32，代表該檢體經過 32 次的熱循環放大後，偵測到螢光值可達到閾值。因此 PCR 結果 CT 值越高，代表病毒濃度越低、受檢檢體所含病毒量越少；反之，CT 值越低，表示檢體中的病毒濃度越高，只要經過少數循環回合，即可測到一定程度的螢光反應，顯現病毒的存在。

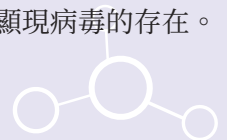
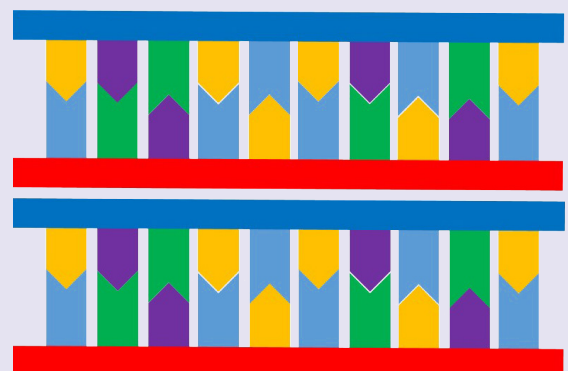


圖 3 聚合酶連鎖反應的 (單) 循環步驟



第一循環完成！
做出的兩段雙股 DNA 又可當作下一個循環模板。

DNA 序列解碼

自華生 (James Watson) 與克里克 (Francis Crick) 於 1953 年解開了 DNA 的構造後，為瞭解人類基因圖譜，科學家開始研究 DNA 定序的技術以解碼 DNA，然而定序技術的發展並不順遂，經科學家們的各種絞盡腦汁與挫敗，終於在 1975 年，英國科學家弗雷德里克·桑格 (Frederick Sanger) 成功發明了雙脫氧鏈終止法，或稱 Sanger 定序法。其原理是在 DNA 合成的過程中，利用 4 種雙脫氧核糖核苷酸 (ddNTPs：ddATP, ddGTP, ddCTP, ddTTP) 隨機終止 DNA 合成的過程，藉由分析終止的產物片段所帶的雙脫氧核糖核苷酸種類，反推其 DNA 序列。兩年之後，他利用此技術成功定序出一種噬菌體的基因組序列，這也是世界首次獲得生物完整的基因組定序。Sanger 定序法提供了 DNA 定序的技術基

礎，之後衍生出不同的定序技術，例如在 ddNTPs 上標定不同螢光，搭配毛細管電泳技術的螢光偵測定序儀器，讓 DNA 序列的判讀可由電腦自動化執行 (圖 4)。這個自動定序技術，直到現今仍被實驗室廣為運用中。

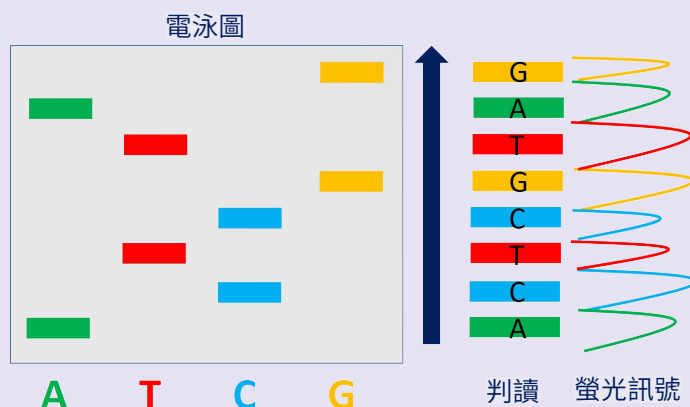


圖 4 利用螢光偵測之 Sanger 定序

博物館的 DNA 科學檢測

目前在國際生物學界皆使用特定 DNA 序列，例如動物學家使用細胞內胞器粒線體基因組中的細胞色素 c 氧化次單元 1 (CO1) 作為鑑定物種的「生命條碼」；建立臺灣原生特有物種的生命條碼就顯得相當重要，因此，中央研究院生物多樣性研究中心在 2004 年展開「台灣野生生物遺傳物質冷凍典藏」計畫，又稱之「冷凍方舟」計畫，蒐集並冷凍保存臺灣典藏存證的標本，以便未來進行 DNA 的比對鑑種，期許臺灣所有的野生動植物的遺傳物質在物種可能消失或滅絕之前，得以永久典藏保存。

臺灣冷凍方舟計畫仍繼續擴充及鑑定保存野生動植物的遺傳物質典藏，但是近年來因為進口貿



易、旅遊等因素，而引入外來種生物，導致本土物種的受脅、滅絕或者雜交個體頻繁出現，進而引起許多生態問題，造成基因變異。例如：外來種紅嘴藍鵲可能與原生特有種的臺灣藍鵲雜交，造成基因汙染。於是從早期古老標本提取 DNA，或許是一種獲取臺灣野生原生種基因基準的方式。

臺灣博物館 (以下簡稱為臺博館) 成立於 1908 年，是臺灣歷史最悠久的博物館，藏品蒐集更早於此，保存了許多臺灣早期珍貴標本，並從 2002 年起，對於浸泡在保存液中的標本，便改用不傷害 DNA 的酒精，作為標本保存液 (圖 5)，以備未來做基因定序用途。若能利用這些早期標本來建立臺灣



本土物種的生命條碼資料庫，在生物系統分類、演化研究及永續保育之應用價值，必定具有無窮潛力。

臺博館從2018年開始了動物類藏品的生命條碼計畫，陸續將博物館內的鳥類、爬蟲類及兩棲類等標本進行組織取樣：基於館內藏品取得不易，在取樣過程中採取部位皆以不影響藏品外觀為原則（圖6、7）。利用PCR技術對CO1基因的特定片段做DNA定序（圖8），以逐步建立其「生命條碼」資料庫，同時所獲得的每筆數據皆可對應到一件典藏標本，並將收集的資料數位化，上傳到國際公共平臺，供研究單位、檢疫單位、學者等利用。



圖5 酒精浸液標本



圖6、7 研究人員由口腔或泄殖腔進行組織採樣



圖8 臺博館藏品臺灣藍鵲標本CO1基因的定序成果

參考文獻

- 邵廣昭 (2008)。為台灣多樣生物編上條碼。科學人，81。
- 黃世彬、邵廣昭、鍾國芳、吳聲華 (2020)。台灣的冷凍方舟計畫。科學發展，573，23-27。