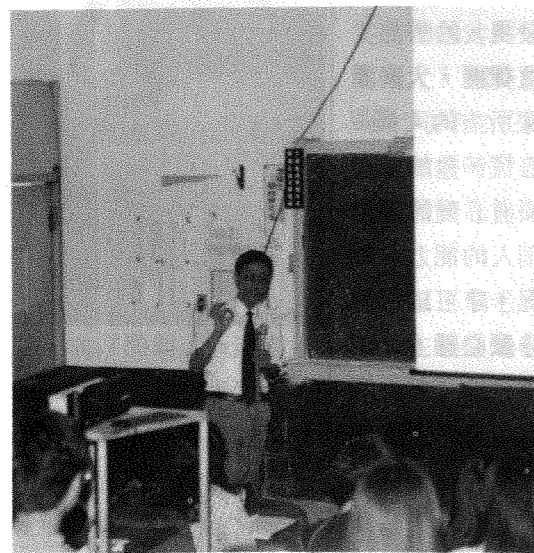
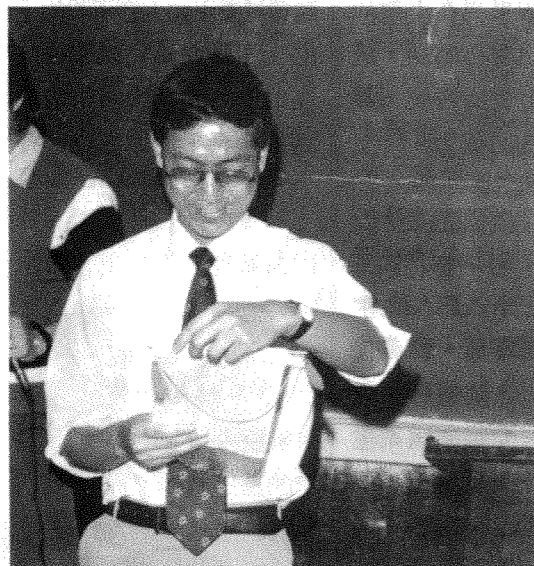


The Probe of DNA

談遺傳工程—Biotechnology

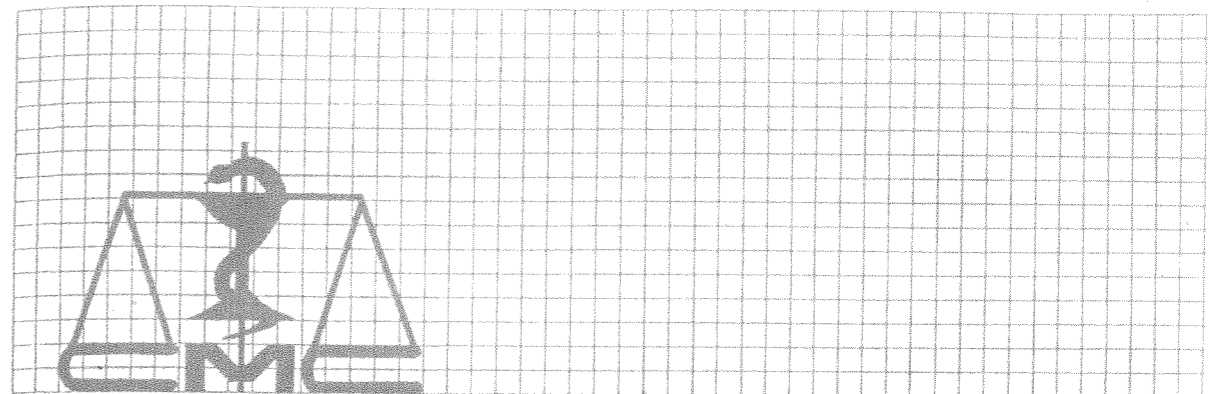


演講者 ■ 駝家駒 博士
 記錄 ■ 林茗雅
 總整理 ■ 倪大仁

前言：

我想今天利用差不多一個小時的時間，跟大家介紹一些有關 Recombinant DNA，所謂遺傳工程的 Biotechnology，尤其是利用在臨床醫學和藥學上的一些新發展。遺傳工程這名詞，最近大家常常聽到，尤其另外一個名詞是“Bintechnology”也就是“生物科技”，這名詞用得很鬆，以致常常被濫用，實際上，Biotechnology 是在過去差不多 8~10 年才發展出來的。今天，是以很淺的方式，跟大家介紹一些定義，什麼樣的研究叫遺傳工程，什麼樣的事情可以用遺傳工程來做？

駝教授現任職長庚醫院生化科主任。

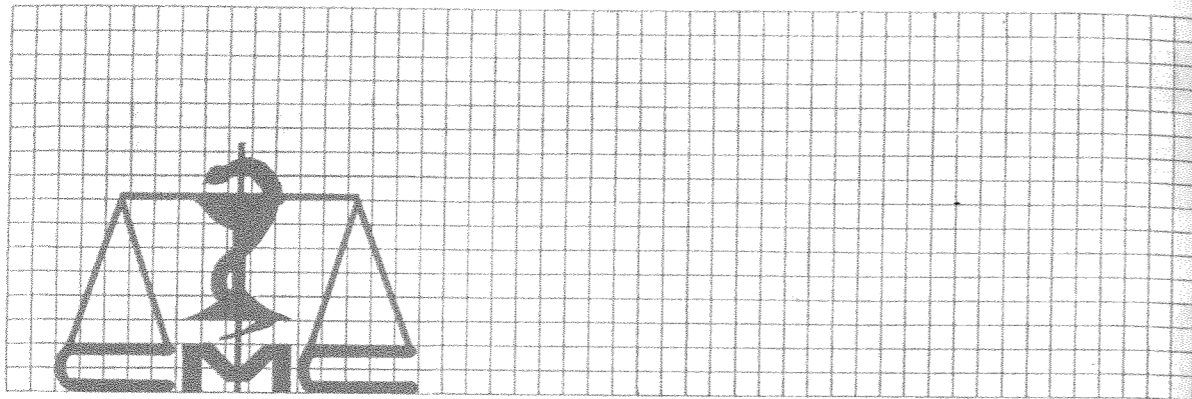


◆ Outline :

1. Definition of recombinant DNA technology / Biotechnology.
2. Date line of recombinant DNA research (the DNA story)
3. Current applications of recombinant DNA research.
4. Some technique used in DNA recombinant work.
5. Development in the future.

1. 遺傳工程研究的定義：把需要的 gene，比如：the hemoglobin gene，the interferon gene，the insulin gene，把它 identify，isolate，然後 code，這 basic，其實就是遺傳工程最主要的工作。再略談 DNA 的 structure 及 function：
 (figure：介紹早期 Recombinant DNA 所做的事) figure：
 有一種 enzyme 叫 restriction enzyme，是一種專門 digest DNA 的 enzyme，它有一種 function 特點，就是說目前有一、二百種不同的 restriction enzyme 每一種 recognize 一種不同的 sequence even 4 個 bases or 6 個 bases。它只能 recognize 這幾個 bases，然後將 DNA break open，利用這種特性使用兩種不同的 DNA，用同樣一個 restriction enz.，把它打開，在合適的情況下，它可以 combine 起來，這就是 recombinant DNA 最基本的工作（也是早期 Recomb-

inant DNA 所做的事，現在的人，還是在做同樣的事，只是更深入一點而已）。
 Plasmid 本身的定義就是一種 small arch，可以自己 replicate 的 DNA，通常在 bacterias 中被發現，目前，幾乎所有的 bacteria 都帶有 plasmid，plasmid 的 function 在以前被認為是帶有“drug resistance factor”，遺傳工程的人拿 plasmid 當作是一種 factor，carrier，若能把它打開，把所要 pure 的 gene 塞進去，然後放回 E. coli 中，如此，幾乎百分之百 pure 的 gene 就被複製出來了。
 遺傳工程應用在實際上，是大家當初最主要的目的之一，可是最初都是從 basic science，從實驗室中研究出來的，遺傳工程：所以會如此 excite 的原因就是想到它能應用在臨床，工業上，商業上的用處是非常大的，幾乎是 out of imagination 簡單地說，在 clinicae，pharmaceutic industry 和 commercial 上可以做到什麼地步呢？譬如說一家藥廠希望在 E. coli 中大量製造 pure 的 growth hormone 而不需從死的豬、牛的 gene 來 extract，基本上，必需要有 plasmid，animal gene or human gene 把它作成 recombinant plasmid 放進 E. coli 中，此 plasmid 就可在 E. coli 中



replicate, 然後 identify growth hormone gene, isolate, purified, 然後大量製造——這就是遺傳工程在 pharmaceutical industry 的應用。

2. 1871 年就已知有 DNA

1943 年利用 pneumococcus 證明 DNA 和遺傳有關。

真正現代分子生物, 該說是從 1953 年開始, 英人利用物理學的方式把 DNA 的 structure 交出來, 而於 1960 年得到諾貝爾獎。

1950 年代後期到 1960 年代前期, 證明人體所謂遺傳的奧秘——一個人的上一代傳到下一代, 是靠著 DNA 裡的排列順序, 之後, 又有人做了其他的實驗, 比如說那三個 bases 決定一個 nucleic acid? 又如人的 genetic code 和豬 or 牛的是否一樣? 這時期可以說是研究分子生物的一個重要時期。

1970 年, 發現了 restriction enz, 為遺傳工程奠下了基礎 (目前已有 170 ~ 180 種 restriction enz. 了)

1972 年是遺傳工程的真正轉捩點——將 me use DNA 和 E. coli DNA 接起來, 這是一種很新的嚐試。

1970 年代後期到 1980 年代前期, 開始有許多東西被製造出來包括在 basic science 的實驗室中做出來的, 另外在實用方面也有許多東

西被做出來, 例如: growth hormone, insulin 等。除了在製藥工業上頗有進展外, 其他 basic science 上也有很新奇的事發生, 如 “super mice” 的產生即為一例, ——這是將人的 gene 放進 animal 的 gene 中, 但我們要做的剛剛和此相反, 是要將 animal 的 gene 放入人的 gene 中, 用來治療遺傳病, 也就是所謂的 “gene therapy” 例如一個 “growth hormon deficiency” 的 patient, 當然, 這還只是個 dream 而已, 遺傳工程在製藥方面的另一大貢獻, 就是 vaccine 的製造, 而且較諸其他製藥方面的成就貢獻更為弘大。

3.

Foundations for recombinant DNA.

(1) Enzymology research

restriction endonuclease
DNA modification enzymes

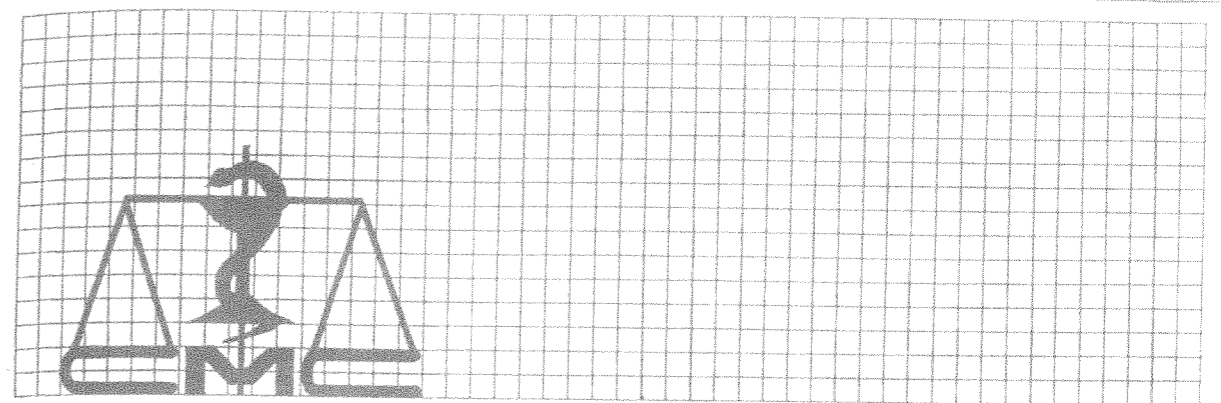
(2) Microbial / Molecular genetic research gene organization

plasmid / phase vector genetics
transformation / transduction

(3) Rapid sequencing of DNA & protein

(4) Chemical synthesis of gene (DNA)

過去被 well established 的技術, 被應用



在遺傳工程上, 第一個就是 enzyme 的 study 這些 enzyme 並不是說我們想要做遺傳工程才去發展之, 而是說過去在分子生物學, 生物化學上已經有人研究這些 enzyme, 而剛好應用在遺傳工程的研究上, 這是一個很重要的 foundation。另外, 遺傳工程講得簡單就是把一段 gene, 放入細菌中, 讓它長, 這必須將細菌知道得很清楚才行不單是對細菌的 physiology 要懂, 對細菌的 genetics 也要懂 Microbial genetics 包括些什麼? 包括 Gene organization 要知道 plasmid 是什麼東西, 要怎樣才能使它長得更好, 要知道什麼情況下才能使 code 的 gene expression 最高, 另外, 有兩種技術, 這是過去 5 年, 7 年所沒有發展出來的, 第一是 DNA & protein 之 sequence 第二是 Gene (DNA) 的 chemical synthesis, 均是最近很重要的發展。

4. 遺傳工程實際應用的第一個是 “Basic science”, “Basic science 可以做很多東西, 如: 如果沒有猜錯的話, 一個人 average 大概有 5 萬個 ~ 10 萬個 gene, 大概沒有人去 study 全部有幾個, 不過其中有些 gene 的 organization 已經被 study 出來, 比如: Hemoglobin 的 gene, 如果此 gene 出了毛病可以造成一些病。

這些研究, 對於將來遺傳病的研究, 甚至遺傳

病的治療, 都有很大的幫助, 雖然現在還停留在 basic science 的 gene research 階段, 現在沒有人能做 gene therapy or 遺傳病的產前診斷, 但是已漸漸有人在做了, 所以說很多目前被應用在臨床上的, 在幾年前都還停留在實驗室階段。雖然, 現在仍有很多還是停留在實驗室階段, 但是, 一年、二年、五年, 最後還是會被研究完全的。在真正實用方面, 我們可以分成 industrial, environmental 等等。

(1) Basic science research

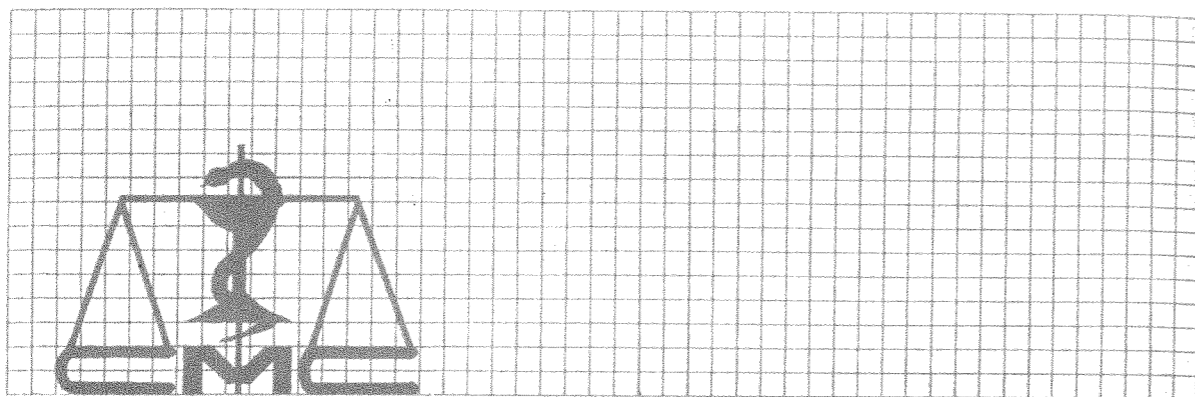
- Gene organization
- Regulation of Gene expression

(2) Applied research & development

- Medical / pharmaceutical
Generation of Novel Compound
Diagnosis
Gene therapy
- Agriculture
- Industrial environmental

今天, 花點時間 concentrate 在 Medical / pharmaceutical 上面。

遺傳工程在這兩方面能做的也不外乎三點而已: 第一是: “Genetic of Novel Compound”, “Novel Compound” 即以前難做, 不能做的東西, 現在已經做出來了。第二是



有關診斷方面，這是非常重要的，唸藥學系的同學不要以為診斷不是你們的事，唸醫技的同學更要知道將來診斷不光是靠生化、血清，微生物就可以的，DNA的診斷就將開始。所以在製藥 or 臨床診斷方面，DNA的function多得，這是將來必然的發展方向。在Diagnosis方面，可以分成兩方面：第一，利用DNA的方法，可以製造出一些診斷的試劑，這些試劑可用來診斷 antigen antibody。

Diagnostic tool / reagent

- infections disease
- viral infection
- oncogene detection
- in born errors

另外，利用DNA的probe，可以直接screen infection。也可以screen oncogene及一些遺傳病——以上所述，及遺傳工程在醫學、藥學上，現在已經在做的東西。

下面以一個實際的例子，跟大家講遺傳工程在clinical diagnosis方面可以怎麼做。

剛才提過：製藥，不光是製造可以治病的藥，製造可以診斷的藥，也是製藥的一部份，這是藥學系的同學必須明白的。

下面就談到DNA probes screening，一般來說，在診斷一些疾病，尤其是感染的疾病時

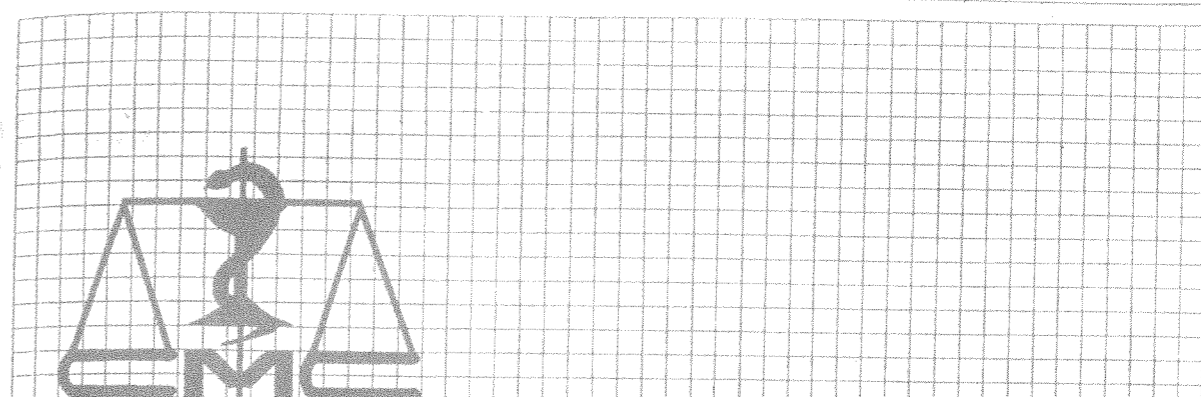
，我們都利用 antigen - antibody reaction 來測，Antibody代表一個人對infection的反應，一旦人體受infection，他會有anti - antigen的reaction存在，但是體內有antibody並不就代表他現在正受infection，而只能說這以前是否exposure過，這就是利用Ag - Ab reaction 來診斷疾病的一大問題。

另外，就是敏感度的問題：用DNA診斷，是用 10^{-12} gram，用Ag-Ab是 10^{-9} gram，兩者有1000 倍的差異，這種差異代表什麼？比如說有一個人剛得到B型肝炎，在Ag - Ab 量還不夠的情況下，DNA的probe screening已經能測到了——這是敏感度問題。

第三，DNA 診斷的好處是：它的診斷是最直接的，Ag - Ab只是一個bacterial infection or viral infection的副產品而已，用DNA screening 的方法，是直接去看檢體內是否有virus DNA的存在，若有表示有virus infection，這完全是直接的方式，也是利用DNA來診斷疾病的好處之一。

DNA in diagnostic reagent (with DNA as probe)

- (1) why & when do we need it ?
- (2) Principle of DNA hybridization
- (3) Example of Slot Blot tests



(4) Difficults & future

(1) why & when

比如說一個人得到hepatitis B，但是serum中沒有sensitive make 這時就必須考慮用DNA來診斷，另一些疾病，如：chlamydia 的感染，它可以在體內引起antibody的產生，但是抗體不具免疫性保護性，也就是說，雖有抗體，但仍受到感染，此除不應用Ag - Ab reaction 的方法來diagnosis，而要用DNA screening 的方法，雖然culture也可以，但有它的限制性（時間的限制）

(2) 同上 slide

(3) 同上 slide

(4) 同上 slide

這是一張有關B型肝炎感染後的disease course的圖可以看到剛開始有surface Ag. HBeAg 稍後會發現AntiHBeAb, AntiHBe-sAb 這是正常的course 特別值得注意的是，在前面一個月到三個月之間（incubation-period 沒有HBsAg，也沒有HBeAg，這個時候用血清的檢查，根本檢查不出來，必須用DNA的方法才能檢驗出。

下面是一個用DNA診斷疾病的例子：

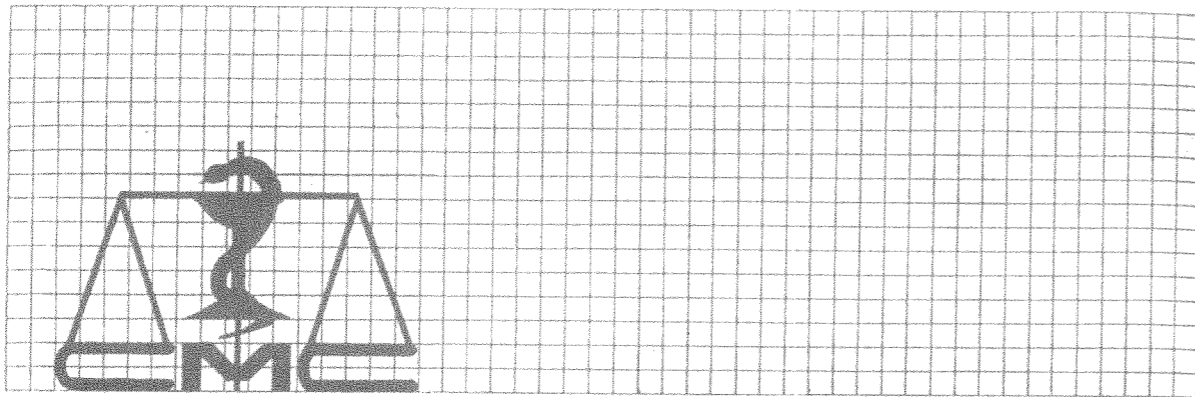
做腎臟透析的病人（Patient undergoing renal dialysis）往往會引起免疫功能不好

，而不會develop Antibody，容易得到B型肝炎的感染，而且具有高度的傳染力，如果這些病人能夠早點detect出來，加以隔離治療，就能不傳染給他人，針對這點長庚醫院曾查了239個病人的B型肝炎抗原，結果我們發現，其中有197個病人的HBV是negative（佔80%），針對這些197個病人，在serum中找不出marker的有11.2%但是用DNA的方法却可測出帶有B型肝炎病毒，這可能是敏感度較高或這些病人的immunity不好的原因。

所以我們的結論是；我們可以用一種方法，也就是HBeV DNA的方法，來測出本來測不出有B型肝炎感染，但實際上是已經感染了病人，這些病人尤其是腎臟透析的病人，都要隔離治療，若不能以HBeV DNA的方法來及早detect一些肝炎患者的話，以目前台灣相當普遍的肝炎罹患率來講，永遠要形成一個在防治上的死角。

利用DNA 的方法來診斷疾病有幾點好處，前面已經提到過，但是它也有它的壞處，這些壞處是：

1. DNA 須以X - ray來label，很多人不願意去touch 實際上它並不會造成太大的傷害。
2. DNA的program並不容易得到（specificity的問題）



3.用DNA來診斷，祇能診斷出current infection

4. sensitivity的問題。

Conclusion，最後一點。

目前長庚醫院在生物科技研究室中，用DNA可以診斷出來的Virus有：

- 1.HBV
- 2.CMV（和新生兒的畸型有關）
- 3.Herpes Virus（type 2）
- 4.Human papillo Virus（type 16），（和Cervix Ca有關）
- 5.EB Virus（和NPCA有關）
- 6.Human T-cell lymphotropic Virus（type 3）

另外可診斷出來還包括有 chlamydia trachomatis（介於細菌和Virus之間）和Mycobacterium tuberculosis 在 prenatal genetic evaluation 方面，DNA probe 在應用在Fetal sex determination，RFLP analysis of thalassemia RFLP analysis of Hemophilia A

一句話

閣下：假如視力有任何問題或眼鏡有任何毛病！？

請到上上，為您作最完善的服務。保證一切OK謝謝！

技術至上
品質至上
服務至上

請大家告訴大家
上上隱形眼鏡公司

台中市學士路180號
服務電話：(04)2357168

Therapeutic Drug Monitoring

(T.D.M)

療效監測

演講者 ■ 余秀英 教授

余秀英教授現任教於台大醫學院。



△何謂T.D.M.

定量病人體液中（通常為血漿或血清）之藥品或其他代謝物濃度，再根據藥品動力學及藥品動態學之原則，闡釋所得結果。其目的在對病人個別提供最適當劑量。

TDM主要強調是個別的，要一般資料在書上可找到，但對個別的病人往往造成不適當的情況。我們可以根據所得的data解釋其所代表的意義。

△何時最能表現TDM的功用？

- (一)藥品濃度與療效及（或）毒性之相關性良好者，可憑TDM得到最安全有效的藥品治療。
 - (二)缺少劑量指南時，TDM成為劑量憑據。
 - (三)存在或預料會發生治療問題時，TDM有助於解決或預防。
 - (四)會有不遵守醫囑服藥或出現過生體使用有問題的病患，TDM可使問題明朗。
- 若藥效可由臨床檢查測定者，例如降血糖劑的療效，可由檢查血糖得知，則TDM較不能顯出其重要性。

△TDM摻合下列各門：

- Drug metabolism 藥物代謝
- Pharmacokinetics 藥品動力學
- Pharmacodynamics 藥效學
- Pathophysiology 病體生理學