

東海大學理學院化學研究所

碩士論文

Graduate Institute of Chemistry

College of Science

Tunghai University

Master Thesis

以超解析顯微鏡同時定位
微型核醣核酸及訊息核醣核酸

Simultaneous localization of miRNA and mRNA
by super-resolution microscopy

周雅柔

Ya-Jou Chou

指導教授：張柏齡 博士

Advisor : Dr. Po-Ling Chang

中華民國 108 年 7 月

摘要

已經有許多研究確認微型核糖核酸 (microRNA) 的生物功能，發現 miRNA 具有調控基因表達的特性，也與疾病的發展有關係，使得精確偵測 miRNA 成為重要的研究課題。而肝癌屬於常見的癌症之一，具有高度的致死率與復發率，已有研究發現肝癌細胞中的 has-miR-10b-3p 具有高度表達之特性。以往檢測 miRNA 的表現量都是透過 RNA 萃取技術針對特定序列進行放大，但其步驟較為繁瑣。本實驗利用分子信標 (molecular beacon) 的特異性辨識，對肝癌細胞中的目標序列進行螢光雜合作用，再藉由高靈敏度 HILO 螢光顯微鏡系統可以直接觀測肝癌細胞中的 miRNA 與其標靶 mRNA 的螢光訊號，並透過單分子影像分析其表現量。本實驗證明此方法可以透過設計不同的 molecular beacon 與不同激發波長的光源，同時觀測感興趣之序列並由影像圖分析目標序列的表現量。已知 miRNA 可以同時調控多種目標 mRNA，為了探討 miRNA 與目標 mRNA 的相關性，利用超解析技術進行觀測，並嘗試利用不同的激發光源強度、擷取螢光影像的數量以及重組螢光影像之設定值篩選出最佳條件，希望可以藉由超解析圖像進行分析，並進一步的探討 miRNA 與目標 mRNA 在細胞內部之間的關係。

Abstract

Many research have proved that the family of microRNAs (miRNAs) played an important role in gene regulation and also related to the occurrence of diseases. Therefore development of accurate detection of miRNAs has become an important research topic.

Hepatic carcinoma is one of the most common cancers with a high mortality and recurrence rate. It has been found that hepatic carcinoma cells have a characteristic of has-miR-10b-3p high expression. RNA extraction was usually used to detect miRNA expression amount in previous researches, but the operation was so complicated that it was not applied easily.

In this study, we used the molecular beacons, which specifically identified to perform fluorescence hybridization of miR-10b and its target (HOXD10 mRNA). Next, we detected slight fluctuations in ultra-trace amounts of miRNA by highly inclined and laminated optical sheet (HILO) fluorescence microscopy. The results showed that we could simultaneously observe the sequence of interest by designing different molecular beacons and using different excitation wavelengths. It was known that miRNAs can regulate a variety of mRNAs. In order to explore their correlation, we localized miRNA and mRNA at the same time by super-resolution microscopy. Moreover, we tested various excitation wavelengths, the amounts of fluorescence images, and parameters to choose the best condition. We expected this method could get more information about the relationship between miRNAs and mRNA by analyzing super-resolution images.

目錄

第一章 微型核糖核酸及螢光顯微鏡簡介	1
1.1 微型核糖核酸 (microRNA, miRNA)	1
1.1.1 緒論	1
1.1.2 微型核糖核酸之發現	2
1.1.3 微型核糖核酸之生物合成途徑及調控機制	3
1.1.4 微型核糖核酸與疾病之相關性	6
1.1.5 微型核糖核酸檢測之方法	9
1.1.6 細胞內微型核糖核酸之偵測	11
1.1.7 分子信標 (Molecular beacon)	12
1.2 單分子螢光顯微系統	14
1.2.1 緒論	14
1.2.2 螢光物理原理	15
1.2.3 漸逝波	17
1.2.4 光學系統	18
1.2.5 單分子螢光顯微鏡之發展	21
1.2.6 超解析顯微鏡 (super-resolution microscopy)	22
第二章 結合超解析技術觀測肝癌細胞中微型核糖核酸	30
2.1 研究動機	30

2.2 實驗流程及設備.....	31
2.2.1 玻片前處理.....	31
2.2.2 細胞培養.....	31
2.2.3 溶液製備.....	32
2.2.4 細胞實驗流程.....	35
2.2.5 儀器設備.....	39
2.2.6 系統架構.....	39
2.3 實驗結果.....	43
2.3.1 比較 TB11-Alexa Fluor 647 時間與吸附量之關係.....	43
2.3.2 定量不同濃度之 TB11-Alexa Fluor 647.....	47
2.3.3 毛細管電泳確認 RT-qPCR 之產物.....	50
2.3.4 確認 molecular beacon 可經由雜合機制放光.....	52
2.3.5 比較不同方法降低細胞背景值.....	58
2.3.6 has-miR-10b-3p 及 HOXD10 的分子探測.....	60
2.3.7 利用超解析技術觀測細胞中的 microRNA.....	63
2.3.8 測試 K_2PtCl_4 白金離子對細胞背景值之影響.....	67
2.3.9 K_2PtCl_4 處理細胞之超解析影像.....	70
2.3.10 探討 miRNA 及目標 mRNA 在細胞內的共定位.....	79
2.3.11 扣除細胞背景值對超解析影像之影響.....	83

2.3.12 比較不同方法防止吸附.....	92
2.4 結論與未來展望.....	97
參考資料.....	98

圖目錄

圖 1-1	miRNA 之生物功能	5
圖 1-2	molecular beacon 的發光機制.....	13
圖 1-3	Jablonksi 示意圖	16
圖 1-4	螢光顯微系統之示意圖	20
圖 1-5	超解析技術的基本原理	25
圖 1-6	dSTORM 示意圖	29
圖 2-1	細胞培養流程圖	33
圖 2-2	利用 EDC 反應固定 miRNA 之機制圖	37
圖 2-3	細胞實驗流程圖	38
圖 2-4	100 倍油鏡下之微米尺.....	41
圖 2-5	螢光顯微鏡系統之裝置圖	42
圖 2-6	以 647nm 100mW 觀測放置不同時間之 Alexa 647	44
圖 2-7	單分子吸附數量與時間之關係	45
圖 2-8	單分子螢光訊號與時間之關係	46
圖 2-9	以 647nm 100mW 觀測不同濃度之 Alexa 647	48
圖 2-10	定量不同濃度之 TB11-Alexa Fluor 647 。	49
圖 2-11	has-miR-10b-3p stem loop RT-qPCR product 電泳圖	51
圖 2-12	HOXD10 mRNA 之序列	54

圖 2-13	miR-10b 與目標 HOXD10 結合位點	55
圖 2-14	molecular beacon 雜合序列示意圖	56
圖 2-15	以螢光顯微鏡系統確認 molecular beacon 的放光	57
圖 2-16	比較不同方法處理之細胞背景值.....	59
圖 2-17	於 HILO 螢光顯微系統對 miR-10b 及 HOXD10 進行分子 探測.....	61
圖 2-18	比較細胞背景值、未在 T _m 下雜合之細胞及經雜合反應之 細胞的細胞質螢光強度差異	62
圖 2-19	加入 switching buffer 後使用 647nm 100mW 觀測 Huh7 細 胞.....	65
圖 2-20	比較不同設定參數對於細胞背景值與雜合 miR-10b beacon 樣品的超解析影像之差異。	66
圖 2-21	比較不同時間點加入 K ₂ PtCl ₄ 對細胞背景值之影響	68
圖 2-22	比較不同 K ₂ PtCl ₄ 濃度對細胞背景值之影響.....	69
圖 2-23	利用超解析技術觀測肝癌細胞中 hsa-miR-10b-3p 之表現量	71
圖 2-24	以 647nm 雷射 60 至 100mW 取得之超解析影像。	73
圖 2-25	以 647nm 雷射 10 至 50mW 取得之超解析影像。	74
圖 2-26	以 647nm 雷射 2 至 8mW 取得之超解析影像。	75
圖 2-27	以 488nm 雷射 60 至 100mW 取得之超解析影像。	76

圖 2-28	以 488nm 雷射 10 至 50mW 取得之超解析影像。.....	77
圖 2-29	以 488nm 雷射 2 至 8mW 取得之超解析影像。.....	78
圖 2-30	miR-10b 及 HOXD10 mRNA 在肝癌細胞內共定位	81
圖 2-31	改變 488nm 雷射強度對 miR-10b 及 HOXD10 mRNA 在肝 癌細胞內共定位之影響	82
圖 2-32	扣除細胞背景值之螢光影像圖	84
圖 2-33	以 488nm 照射細胞樣品並扣除不同細胞背景值.....	85
圖 2-34	以 647nm 照射細胞樣品並扣除不同細胞背景值.....	86
圖 2-35	以 488nm 照射細胞樣品並改變細胞背景值之曝光時間	87
圖 2-36	以 647nm 照射細胞樣品並改變細胞背景值之曝光時間	88
圖 2-37	扣除細胞背景值曝光時間 15ms 之超解析影像	89
圖 2-38	扣除不同曝光時間的細胞背景值對肝癌細胞內共定位之影 響.....	91
圖 2-39	以 647nm 50mW 觀測不同防止吸附之方法.....	94
圖 2-40	以 488nm 50mW 觀測不同防止吸附之方法.....	95
圖 2-41	比較不同防止吸附方法之螢光強度.....	96

表目錄

表 1-1 癌症與 miRNA 之相關性	8
表 1-2 檢測 miRNA 之方法	10

第一章 微型核糖核酸及螢光顯微鏡簡介

1.1 微型核糖核酸 (microRNA, miRNA)

1.1.1 緒論

近年來，隨著全基因組定序技術的進步，改變了生物學及分子偵測之研究，陸續發現新的小短片 RNA (small RNA, sRNA) 可作為疾病特異性之生物指標，而 miRNA 也被證實普遍存在於生物體中，能作為非入侵性之生物指標。成熟的 miRNA 通常會標示為 5' 或 3'，如 miR-10b-3p，亦或以星號表示，如 miR-10b*。一段成熟的 miRNA 為長度約 19 至 23 個核苷酸的單股短序列 RNA，不會轉譯合成蛋白質，但具有調控基因表達之特性¹。

基因表達的過程為去氧核糖核酸 (DNA) 轉錄為訊息核糖核酸 (messenger RNA, mRNA)，再由 mRNA 轉譯形成蛋白質 (protein)。隨著分子生物技術的發展，研究發現部分 RNA 分子並不會轉譯成蛋白質，此種 RNA 被命名為非編碼核糖核酸 (noncoding RNA)，包括轉移 RNA (transfer RNA, tRNA)、核糖體 RNA (Ribosomal RNA, rRNA) 以及小片段 RNA，如 miRNA、小片段干擾核糖核酸 (small interference RNA, siRNA)、piRNA (piwi interacting RNA)、snoRNA (small nucleolar RNA)、snRNA (small nuclear RNA) 等，統稱為 RNA 干擾 (RNA interference)，可以調控 mRNA 達到細胞分化、細胞增生、細胞死亡、

腫瘤形成及致死基因之表達。

目前在人體中已檢定出 1500 種以上之 miRNA，其中超過 30% 的 miRNA 可以於人體基因中定位²。且多種 miRNA 可以共同調控單一基因，而單一 miRNA 也可能具有多個目標基因，因此 miRNA 的基因調控範圍很廣，也與許多疾病產生關連性，並對於疾病之診斷、偵測、分類有很大的影響力，研究如何精準偵測 miRNA 成為重要之課題。

1.1.2 微型核糖核酸之發現

第一個 miRNA 在 20 世紀末被發現，直至 21 世紀初 miRNA 才被認定為是一種獨特的生物調節劑。最早被發現的兩個 miRNAs 為秀麗隱桿線蟲 (*Caenorhabditis elegans*) 中的 lin-4 和 let-7³。1990 年 Napoli 等人於矮牽牛花基因轉染實驗中發現轉染程度與內生或外源引入之 chalcone 合成酶基因的 mRNA 有關，但對其同源基因共同抑制 (co-suppression) 之現象無法解釋；1993 年 Lee 等人於秀麗隱桿線蟲的研究中發現一段長度約為 22 個核苷酸的短片段 RNA，而後命名為 lin-4 miRNA。lin-4 基因為 61 個核苷酸長的 miRNA 前驅物轉變而成的成熟非編碼 RNA，其序列與 lin-4 mRNA 的 3'端非編碼區 (3'-UTR) 之序列有互補。當 miRNA 通過與 3'-UTR 內特定的結合位點結合時會抑制 lin-4 mRNA 的轉譯，進而影響 LIN-4 蛋白質的合成，產生

基因抑制之現象。2000 年 Reinhart 等人在秀麗隱桿線蟲研究中發現 let-7 miRNA，其會抑制 lin-41 並對秀麗隱桿線蟲的後期發育有所影響，此時開始將此種小調節 RNA 稱為 microRNA，簡稱為 miRNA，而 let-7 miRNA 成為第二個被發現的 miRNA，並促進更多關於 miRNA 的研究。

之後陸續在動物與植物中發現一系列的 miRNA，例如：人類、老鼠、線蟲、果蠅、擬南芥及野生稻等等。目前已發現 700 多個 miRNA，絕大多數的 miRNA 於哺乳類中得知⁴，其他生物則以線蟲 88 個 miRNA 暫居第一，其次為 16 個 miRNA 的擬南芥，而 miRNA 之多樣性逐漸受到研究重視。

2008 年從血清中發現穩定表達之 miRNA⁵，也在其他生物體液像是尿液、唾液、淚液、腦脊液、母乳及羊水中發現 miRNA。並已經成功利用福馬林固定石蠟包埋切片、骨髓穿刺活檢等技術從各種臨床樣本中分離出 miRNA⁶。

1.1.3 微型核糖核酸之生物合成途徑及調控機制

miRNA 存在於真核細胞之中，由部分 DNA 轉錄而來，但無法進一步轉譯成蛋白質的 RNA(非編碼 RNA)。miRNA 通過與目標 mRNA 結合，可以抑制轉錄後的基因表達，進而在調控基因表達、細胞周期、生物體發育時序等方面起重要作用。miRNA 要達到調節基因之功能，

必須先經過一連串之生化合成途徑。如圖 1-1 所示，DNA 在細胞核中完成轉錄後形成長度約為數千個鹼基之 pri-miRNA (primary miRNA)，是 miRNA 形成之前最開始的樣子⁷。pri-miRNA 會被屬於 RNase III 之 Drosha 切割成 3 端 OH 基有兩個核苷酸突起的莖環(stem-loop) pre-miRNA (precursor miRNA)，此時長度約為 70 個核苷酸⁸。RNA GTP-dependent transporter exportin 5 能辨識莖環之二級結構，並將 pre-miRNA 傳送至細胞質⁹。在細胞質中，RNase III 家族的 Dicer 蛋白酶可以將 pre-miRNA 切割成雙股 miRNA (miRNA* duplex)。接著 miRNA* duplex 的雙股會解開形成成熟之單股 miRNA (mature miRNA)，成熟 miRNA 與 Argonaute 蛋白 (AGO) 結合形成 RNA 誘導沉默複合體 (RNA-induced silencing complex, RISC) 蛋白，而帶有 miRNA 的 RISC 複合體稱之為 miRISC¹⁰，其最終長度約為長度約為 19 至 25 個核苷酸。miRISC 中的 miRNA 會與互補目標基因的 mRNA 進行配對，當兩者序列完全結合時，會誘導裂解 mRNA 之機制啟動，造成 mRNA 斷裂，進而抑制蛋白質生成；當兩者序列為不完全結合時，亦會影響 mRNA 轉譯合成蛋白質，此為 miRNA 調控基因表達之機制^{11, 12}。

miRNA 除了與 mRNA 結合可以影響其作用，與蛋白質之間的作

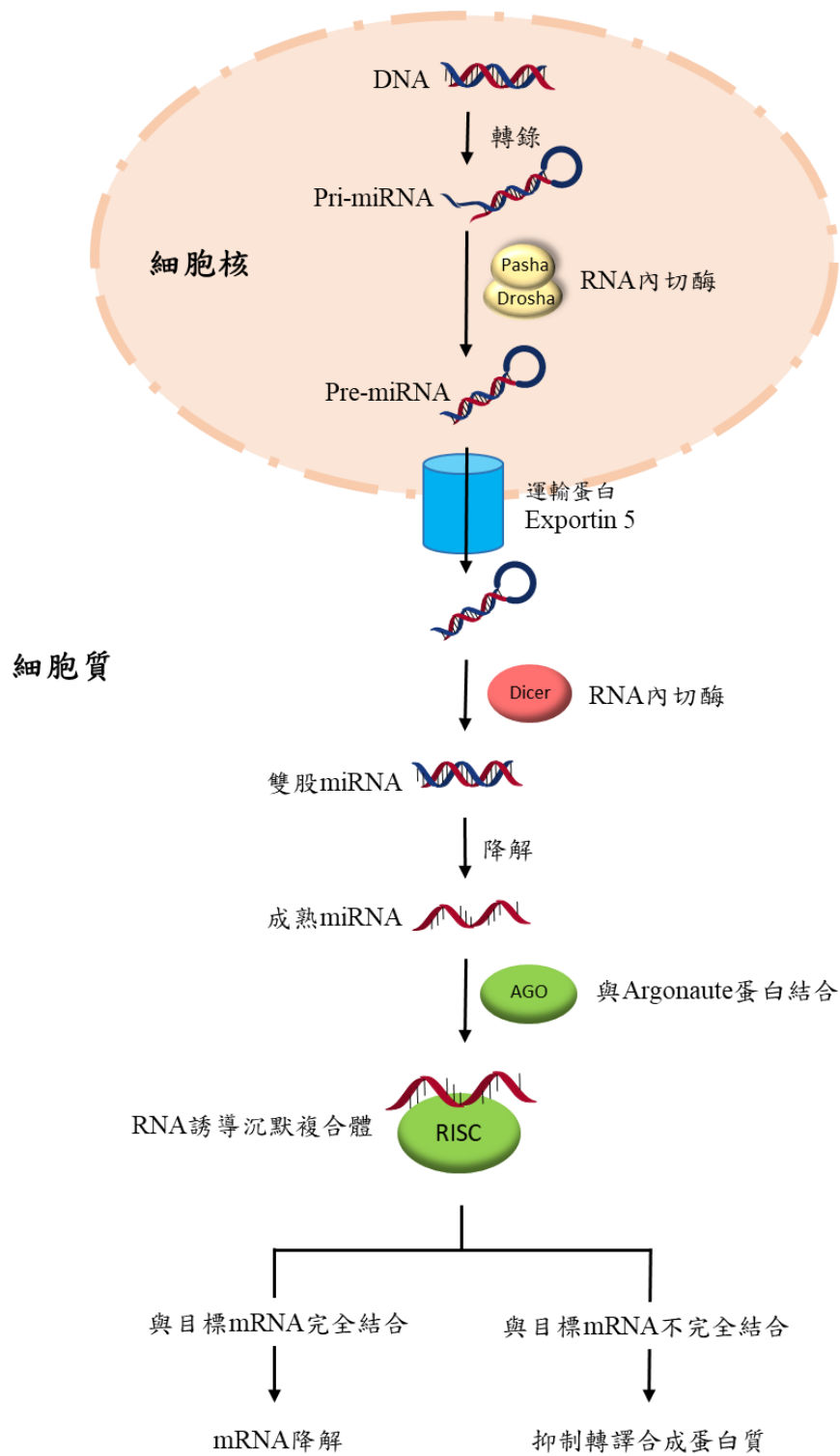


圖 1-1 miRNA 之生物功能。

用也存在重要的意義。近年來，研究發現一個 miRNA 可能同時調控多個 mRNA，其中以癌症最為常見¹³，其次為心血管疾病，也曾於病毒性之疾病中發現。

1.1.4 微型核糖核酸與疾病之相關性

miRNA 對於基因表達之調控有極大的影響，並與癌症及神經系統疾病的發生有關，因此研究 miRNA 之檢測對於了解細胞生化途徑及預防疾病皆為重要的課題。過去研究已證實 miRNA 會影響腫瘤的形成及抑制，當目標基因為致癌基因 (oncogene) 時，miRNA 會抑制致癌基因，使其無法產生腫瘤生長所需之蛋白質，進而使腫瘤無法生成；當目標基因為腫瘤抑制基因時，腫瘤細胞增殖少了負調控因子，則會造成癌症惡化。miRNA 被認為是重要的生物指標 (biomarker)，可以藉由其數量變化來診斷或預測疾病。現今已發現多種癌症與 miRNA 表達有關，例如：骨髓性白血病、大腸癌¹⁴、乳腺癌^{15,16}、肝癌¹⁷⁻¹⁹、肺癌²⁰及前列腺癌等。除此之外，其亦會造成腦部疾病、心血管疾病、神經系統疾病等。

對於 miRNA 之調節差異篩選，通常會選擇癌症組織或癌症周圍組織，也可進一步選用存在於流體基質的個別 miRNA²¹。miRNA 之研究常於血清及血液中進行，亦不乏其他生物體液。如唾液之 miRNA 與口腔癌有關²²，尿液之 miRNA 與腎癌及膀胱癌有關，痰液之 miRNA

與肺癌有關²³，而腦脊液之 miRNA 則與淋巴瘤相關²⁴。

研究顯示，miRNA 之含量與癌症類型或是疾病狀態密切相關，並可作為具特異性之生物指標，具有預測癌症分期及分類之能力。Kong 等人以慢性胰腺癌樣本驗證 miR-196a 之特異性；Hank 等人使用患者尿液樣本進行膀胱癌不同分期之研究；而 Asaga 等人的研究顯示罹患晚期乳腺癌之患者相較於早期乳腺癌之患者具有較高濃度的 miR-21²¹。miRNA 的生物指標尤其以心血管疾病最為重視，miR-1 及 miR-499 已被證實可以用於急性心肌梗塞之生物指標，且被廣泛運用在高血壓、心臟衰竭或冠狀動脈疾病等其他心臟疾病上²⁵。於口腔及尿液樣本中的多種 miRNA，像是 miR-210 及 miR-18a 等，可作為急性或慢性末期腎臟之生物指標²⁶；而在慢性 C 型肝炎之肝臟中也發現大量 miR-122 和 miR-192，研究證實可用於藥物管理及化合物篩選毒性之監測。

miRNA 近 20 年來受到普遍的研究，除了上述所提及的疾病，如表 1-1，整理出現代較為常見的癌症，可以得知許多 miRNA 不僅能夠調控單一基因，也會導致不同癌症之發生。為了更清楚得知 miRNA 所透露的訊息，可以藉由 miRBase 資料庫搜索 miRNA 之序列，或是 microRNA-cancer 資料庫中找尋 miRNA 相關之研究文獻，以了解 miRNA 與癌症病理之相關性。

癌症名稱	相關miRNA
肝癌 (Hepatocellular carcinoma)	miR-18、miR-125、miR-199、miR-200、miR-224 miR-122、miR-130a、miR-150、miR-221 miR-21、miR-222、miR-224
肺癌 (Lung cancer)	miR-21 miR-34 family miR-200 miR-221、miR-222
乳腺癌 (Breast cancer)	miR-22 miR-200 family、miR205
大腸癌 (Colorectal cancer)	miR-21 miR-143、miR-145
鼻咽癌 (Nasopharyngeal carcinoma)	miR-100 miR-141 miR-200a
食道癌 (Esophageal cancer)	miR-19b miR-21、miR-27b、miR-125b、miR-203、 miR-205、miR-342 miR-143、miR-145、miR-194、miR-203、 miR-205、miR-215 miR-192、miR-223

表 1-1 癌症與 miRNA 之相關性。

1.1.5 微型核糖核酸檢測之方法

miRNAs 因為短小、高度同源且彼此之間僅有微小差異之特性，使得 miRNA 之檢測具有高度的挑戰性。傳統檢測 miRNA 之方法包括北方墨點法 (northern blot)²⁷、反轉錄聚合酶連鎖反應 (reverse transcription-PCR, RT-PCR)²⁸、微陣列技術 (microarrays)²⁹ 等，但這些方法都各自有其侷限性。北方墨點法是利用探針偵測由凝膠電泳分離之 RNA 片段的特定序列，但此方法較複雜且須進行放射性標記，會引起嚴重污染，檢測效率低；而 RT-PCR 與微陣列偵測極限雖良好，但需負擔高成本之設備及材料，造成使用上之限制。

miRNA 是化學生物學研究領域的重要標靶，而後發展出各種方法，如基於等溫指數擴增方法 (Isothermal exponential amplification-based methods)、基於滾動循環放大方法 (Rolling cycle amplification-based methods) 皆不需 PCR 即有高效率及高靈敏之特性，但其探針設計複雜，需使用多種酶；基於 DSN 和 AuNP 之系統 (DSN and AuNPs-based system) 可偵測至 0.2fmol，探針設計簡單但耗時；基於毛細管電泳的測定 (Capillary-electrophoresis-based assay) 則需要專業設備但具有探針設計簡單，多目標檢測的優點。分析 miRNA 的方法各有其優缺點，如表 1-2，可以依照研究目標做設計調整。

方法	偵測方式	特點
北方墨點法 (Northern blotting)	放射性偵測	操作簡單 樣品需求量大、耗時、靈敏度低、具放射性危害
微陣列技術 (Microarray)	電化學、化學放光、 量子點及螢光偵測	樣品需求量大、具高通量 操作複雜、再現性及靈敏度不佳
反轉錄聚合酶連鎖反應 (RT-PCR)	螢光偵測	樣品需求量大、高靈敏度 無法同時檢測多種樣品
毛細管電泳 (CE)	螢光偵測	樣品需求量大、快速、靈敏度高 無法同時檢測多種樣品、再現性不佳
原位雜合 (ISH)	螢光偵測	屬於直接偵測，可用於細胞組織 miRNA 容易在實驗過程中流失，造成靈敏度不佳

表 1-2 檢測 miRNA 之方法。

1.1.6 細胞內微型核糖核酸之偵測

一般藉由間接測定之方法檢測細胞中 miRNA 的表現量，需要萃取細胞的總核糖核酸，再利用不同方法放大 miRNA 序列。由於 miRNA 的生物功能及表達是以單細胞為基礎下進行探討，可以利用螢光原位雜合 (Fluorescence in situ hybridization, FISH) 觀測單細胞中的基因表達。FISH 是藉由標記螢光分子的單鏈核酸(DNA 或 RNA) 作為探針，以鹼基互補的原理與細胞上的 DNA 或 RNA 進行雜交，形成雜交雙鏈核酸進而被偵測。此方法源自 1989 年，DeLong 等人利用與 RNA 互補之特定序列探針，對不同細菌進行專一性雜合反應，並使用螢光顯微鏡觀察探針上標記之螢光分子。需要注意的是，包含探針之序列設計、探針之專一性、樣品之前處理、雜合反應、螢光分子之種類及螢光顯微鏡之操作與軟體分析皆為影響螢光原位雜合之因素。

當探針與目標序列進行雜合反應，此時溫度須控制在 DNA 熔點溫度，也就是探針與目標序列結合一半之溫度，而此溫度稱之為 T_m 值。影響雜合反應的主要因素為溫度、甲醯胺及鹽類濃度，其中溫度依照序列有所差異，而甲醯胺與鹽類濃度能夠控制探針結合與否，若增加甲醯胺之濃度可以幫助雙股核苷酸序列分開，並降低 T_m 值；反之增加鹽類之濃度則可提升 T_m 值。

1.1.7 分子信標 (Molecular beacon)

分子信標 (Molecular beacon) 為一段核酸序列探針，具特異性，並透過雜合機制得到螢光訊號³⁰。molecular beacon 的螢光特異性來自於它的結構，如圖 1-2 所示，其是由一段夾板序列 (stem sequence) 及環狀序列 (loop sequence) 所構成，且其長度不超過 30 個核苷酸。molecular beacon 的 5' 端修飾一個螢光基團 (fluorophore)、3' 端修飾一個消光基團 (quencher)，在正常情況下其髮夾結構使螢光基團與消光基團靠在一起，當螢光基團受到光激發放光時，光會被消光基團所吸收，便無法得到訊號；但若透過溫度調控使夾板序列打開，在於 T_m 下與目標序列進行雜合反應，因為這時消光基團與螢光基團並不會緊密的靠在一起，當螢光基團受到光激發所放出來的光並不會被消光基團所影響，因此可以偵測到其訊號。

近年來 molecular beacon 已廣泛運用在檢測 miRNA³¹，例如 miRNA 與 molecular beacon 於晶片電泳中進行雜合分析，或是利用 molecular beacon 於總核糖核酸中定量 miRNA 等。且 molecular beacon 能夠隨著實驗改變進行設計，除了能夠替換修飾的螢光基團與消光基團，所使用的序列也可以選擇 DNA、RNA、及 LNA 來改變 molecular beacon 的穩定性，達到實驗條件的最佳化。

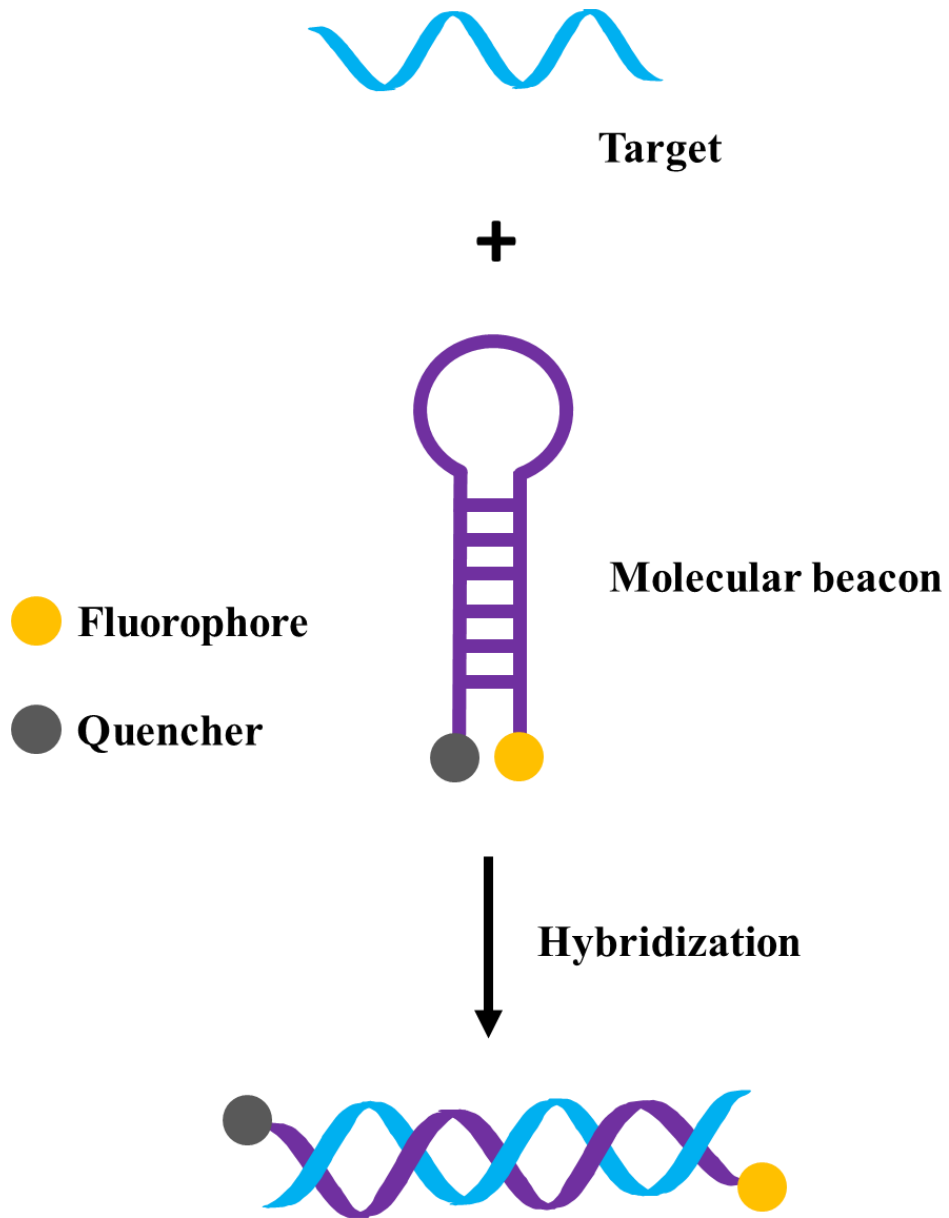


圖 1-2 molecular beacon 的發光機制。

1.2 單分子螢光顯微系統

1.2.1 緒論

傳統生命科學實驗是在集合水平上進行的，以細胞培養物為例，其中含有數千個細胞群，群體特徵可以平均該群體中潛在異常細胞之觀察結果，但也同時提升了丟失有關生物學相關異質性研究之風險。單分子研究與整體大分子之測量形成對比，單分子生物物理學研究專注於以分子作為生物系統中最小的功能單位，可以更深入且準確的了解重要的生物過程，像是人體免疫反應、基因表達和細胞分化。

由於光學繞射極限 (diffraction limit) 之影響，要利用傳統光學方法偵測單分子是困難的，因為當觀察的兩個物體距離小到一個程度時，在影像上會呈現為一個點，無法區分兩者。可以利用計算或是以光程差 (Optical Path Difference, OPD) 的峰谷差值 (Peak to Valley) 來判斷系統是否到達繞射極限。傳統光學顯微鏡是利用光的吸收與反射來觀測物體，而螢光顯微鏡是藉由光在波長方面的特性來觀測分子。特定種類之螢光基團 (fluorophore) 可以吸收短波長的光並放出長波長的光，觀測時將激發光過濾掉後便只可看見長波長的光，這樣一來即可斷定特定之螢光分子是否存在。螢光顯微鏡可以提供卓越的對比度及標記的高特異性，且對生物樣品的擾動相對較小，可以結合螢光分子標記在目標生物分子上，藉由螢光間接觀測。例如在特定蛋白加上

螢光蛋白，並將這類蛋白作為細胞內之追蹤分子，或是於抗體上加載螢光蛋白，透過抗體抗原反應來辨識特定生物分子。標記多種螢光分子可以得到多個通道的圖像，或是對他們進行共定位分析，有助於了解生物結構與感興趣分子之間的相互作用。但當螢光分子相當靠近時仍會受到繞射極限影響，單一螢光訊號非常微弱且生命期短，約為 10^{-8} 秒，加上粒子碰撞或其他原因導致能量損失，使得量子產率無法達到百分之百，所以降低背景雜訊提升螢光訊號成為重要之課題。如今，螢光顯微技術已是單分子研究中不可或缺之工具。

1.2.2 螢光物理原理

當光子被螢光基團吸收時，螢光團中基態 (ground state) 之螢光分子吸收短波長的能量，使其電子被激發至具有更高能量的激發態 (excited state)，並隨即以光的形式衰退回基態，而此時所放出波長較長且能量較低的光即為所謂的螢光 (fluorescence) 或磷光 (phosphorescence)。

Jablonski 模型圖用圖形形式描述了不同能量狀態轉換之發光機制。穩定分子多數都有偶數電子，其電子成對且自旋方向相反，此為單重基態 (singlet ground state, S_0)，此時分子吸收外界輻射能，分子吸收能量，而電子由基態躍遷至激發態之過程為吸收 (absorption)，此時具有螢光特性之分子，所位於 S_1 的電子極易以輻射方式返回基態 S_0

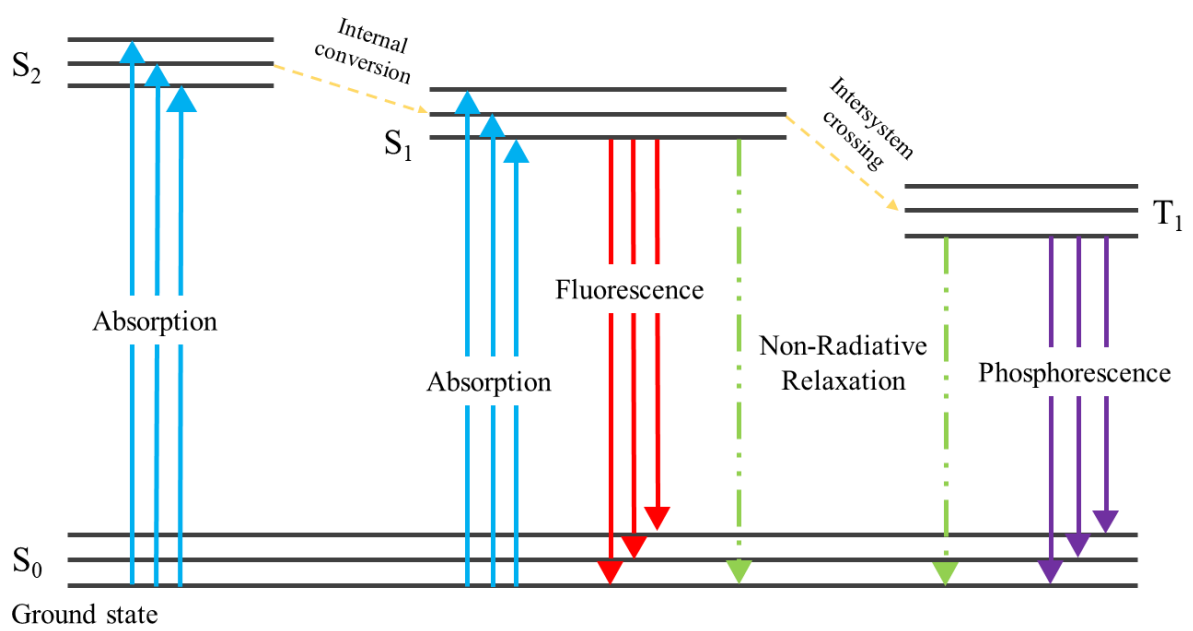


圖 1-3 Jablonksi 示意圖。S 表示為單重態，T 表示為三重態。

的任一振動能階而放出螢光，其生命期大約為使處於基態之電子被激發至較高能階之激發態，而電子從單重激發態 (singlet excited state, S_1) 衰退返回基態的方式包含振動衰減、螢光放射及磷光放射。 $10^{-5} \sim 10^{-8}$ 秒，但螢光分子亦可能藉由吸收光能被激發到較高能量之電子態 S_2 ，透過內轉換 (internal conversion) 釋放能量至 S_1 ，最後由螢光放射模式從激發態 S_1 回到基態 S_0 。除了螢光釋能的方式外，經由分子間相互碰撞後，將較高的振動能轉換為動能或傳遞給其他分子，最後回到基態 S_0 ，此稱為振動衰減，或是透過非放光的非輻射緩解 (non-radiative relaxation) 回到基態 S_0 ；另外具有重金屬效應之分子，當激發態電子透過內轉換停留於 S_1 時，因為位於 S_1 的最低振動能階與 T_1 的最高振動能階有重合現象，此時電子可能透過系統間穿越 (intersystem crossing) 改變自旋方向進入三重態 (triplet state, T_1)，而位於 T_1 的電子再將能量以磷光放射的形式返回基態 S_0 ，其生命期較長，約為 $10^{-6} \sim 10^{-2}$ 秒。

1.2.3 漸逝波

漸逝波 (Evanescent wave) 是指當光從不同介質穿透時，由於不同介質的折射率不同，導致穿透光偏離法線，並在介面產生隨著指數衰減的一種波。

雖然共軛焦顯微鏡 (confocal microscopy) 及全內反射螢光顯微鏡

(total internal reflection fluorescence) microscopy, TIRFM) 觀察微弱的螢光訊號都有不錯的效果,但大部分的單分子研究是採用 TIRFM。因為共軛焦顯微鏡的工作原理是在共軛焦點處增加一個針孔 (pinhole), 降低焦點外的背景雜訊, 但焦點處的雜訊仍無法去除。而 TIRFM 將光源以超過臨界角的角度射入, 進而產生漸逝波, 其強度會隨著深度增加而遞減, 僅能激發深度約 200nm 以內的螢光分子, 且激發光因為全反射的緣故, 將所產生的散射光降至最低, 即可大幅增加訊號雜訊比。

1.2.4 光學系統

螢光顯微技術所使用的光學系統大致分為 Epi-fluorescence 光學系統³²、全內反射螢光顯微鏡 (total internal reflection fluorescence microscopy, TIRFM)^{33, 34} 及本文所使用的高度傾斜和層壓光學片 (highly inclined and laminated optical sheet, HILO) 顯微鏡³⁵ 三種。Epi-fluorescence 使用於單分子研究的之入射光會完全穿透玻片, 所以背景訊號較高, 且單一的螢光訊號非常微弱, 使得無法解析出來; 近年來許多偵測單分子的研究, 為了降低背景訊號採用了全內反射螢光顯微鏡, 而 TIRFM 是單分子成像中最常使用的螢光顯微鏡, 其主要是利用光學中的全反射原理, 使得雷射光於蓋玻片與樣本介質的界面產生全反射現象, 此時於另一面會產生漸逝波激發另一面的螢光分子,

使受激發的樣本厚度僅 200 nm，降低了背景訊號，增加訊號雜訊比 (Signal-to-noise ratio, S/N)。然而當科學家開始對具有厚度的生物樣品開始感興趣，但 TIRFM 僅限於表面偵測，即無法觀測深層的訊號，而 HILO 之光學系統藉由改變入射光角度 (略小於臨界角)，使得部分入射光穿過樣品，進而激發較深層的螢光分子，使得可以於具有厚度之生物樣品中觀測到單分子的螢光訊號，還能維持一定的訊號雜訊比。於 2008 年，HILO 螢光顯微鏡系統被證實可於觀測細胞中的單分子訊號，且可清楚的看到不同平面的單分子螢光訊號，厚度達 $2\mu\text{m}$ ³²。

由於單分子的訊號非常的微弱，些許的雜訊都會使微弱的訊號被忽略，所以訊號雜訊比在單分子的觀測上是十分關鍵的因素。螢光顯微系統可以搭配電子倍增耦合元件 (electron-multiplying charge-coupled device, EMCCD) 技術，將在微光下測量到的畫素內極小電荷多次倍增，將訊號放大到雜訊基準 (Noise Floor) 以上並進行偵測。一般掃描式顯微鏡，像是共軛焦雷射掃描顯微鏡 (confocal laser scanning microscope, CLSM) 可以對具有厚度的生物樣品進行 3D 影像掃描，但其接收頻率大約只能達到 0.1 至 5MHz；而 EMCCD 的接收訊號頻率可達到 10MHz。EMCCD 內含熱電致冷晶片 (Thermoelectric Cooler, TE-Cooler) 可以將溫度降至 -70°C ，來降低熱電子效應，並降低雜訊，對觀測單分子訊號有極大的幫助。而電子顯

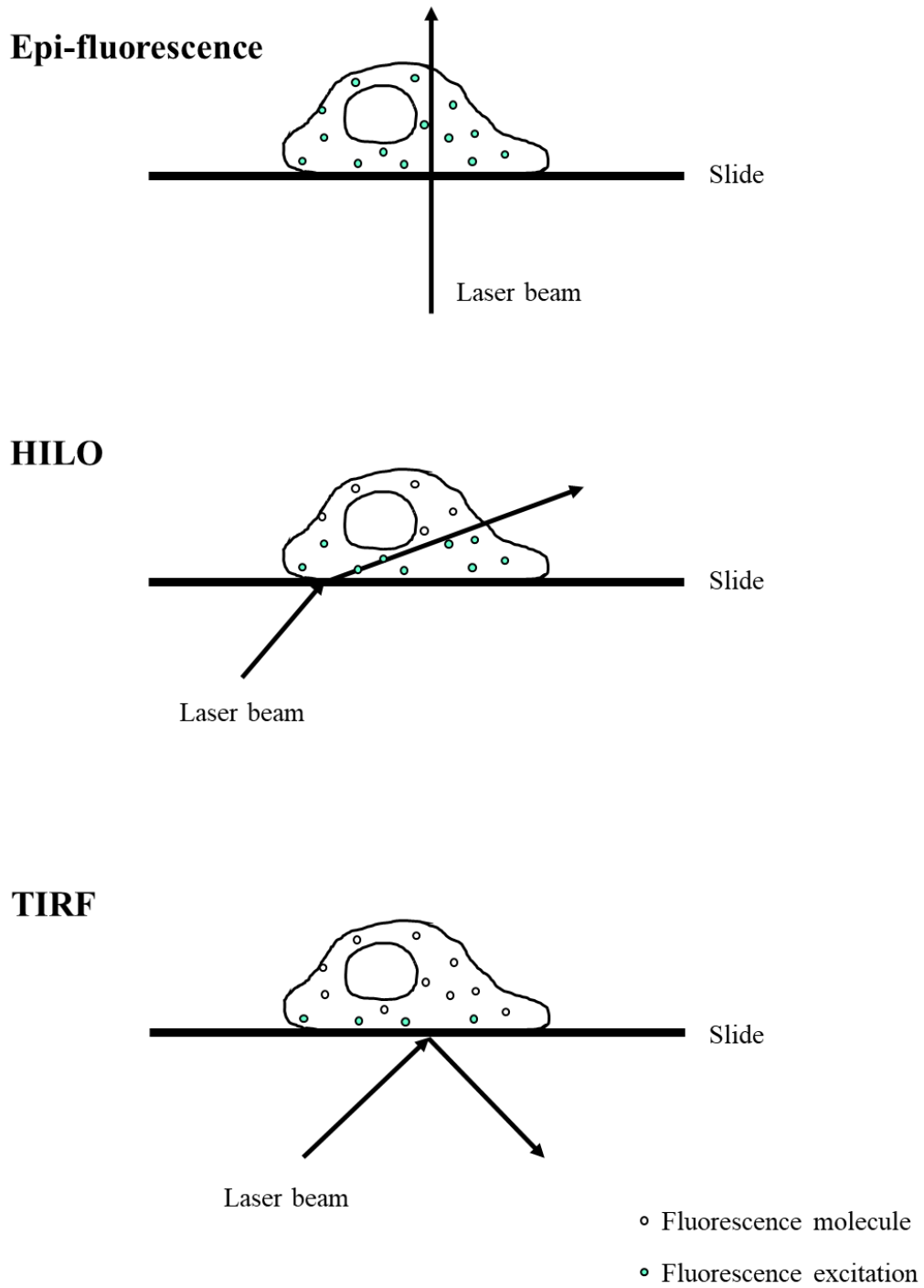


圖 1-4 螢光顯微系統之示意圖。

微鏡 (electron microscope, EM) 的解析度可以到 0.2nm，雖然提供了極佳的分辨率，但其樣品製備繁瑣且無法用於活體細胞。綜觀不同的顯微鏡系統，一般螢光顯微鏡較容易與其他光學技術進行配合，所以本實驗選用 HILO 螢光顯微鏡系統搭配 EMCCD，針對具有厚度的生物樣品進行分析。

1.2.5 單分子螢光顯微鏡之發展

1961 年 Boris Rotman 使用螢光顯微鏡推斷單分子的存在；1976 年 Thomas Hirshfeld 用有機染料螢光團分子標記蛋白質球蛋白，為首次使用螢光顯微鏡直接檢測單個分子，之後在 1990 年代利用螢光顯微鏡提高單分子檢測空間分辨率方面取得許多重要的進展。2014 年，Eric Betzig、Stefan W. Hell 及 William E. Moerner 因為超解析螢光顯微鏡 (super-resolved fluorescence microscopy) 的發展共同獲得諾貝爾化學獎³⁶。超解析技術打破傳統光學顯微鏡的物理障礙，擁有比光學分辨極限更好的精度渲染空間訊息，可以藉由開發一系列超解析技術打破光學分辨率之極限，研究單分子水平下生物亞結構的功能定位及相互作用，並達到奈米級解析度³⁷。至今超解析影像技術已經廣泛運用在奈米材料、細胞研究、生物樣品及生物醫學研究上。

1.2.6 超解析顯微鏡 (super-resolution microscopy)

1.2.6.1 緒論

螢光成像在成像平面中空間分辨率受限在約 200 奈米，但螢光顯微鏡可以對活細胞中的動態過程進行成像，相較於電子顯微鏡或其他成像技術仍具有優勢。螢光成像技術成為生物和生物醫學科學中用於活細胞和組織的三維成像之必要工具。而近年來發展的超解析顯微鏡是指一系列新的螢光顯微鏡方法，其突破了以往繞射極限的限制。通過調製這些近距離的螢光分子到不同的狀態，從而區分它們的螢光信號並突破繞射極限的空間分辨率。

超解析顯微鏡大致可分為兩種方法：一種方法是在空間上調製照明光，使用這種方法最著名的技術是刺激發射消耗 (Stimulated Emission Depletion, STED) 顯微鏡和照明結構顯微鏡 (Structured Illumination Microscopy, SIM)³⁸；另一種方法是基於隨機切換單個螢光分子在螢光或黑暗狀態，藉由調節光可切換 (photoswitchable) 或可光活化 (photoactivatable) 的螢光蛋白及有機螢光分子在螢光開關之間的狀態轉化來控制螢光團的螢光發射。此類型有隨機光學重建顯微鏡 (Stochastic optical reconstruction microscopy, STORM)³⁹、光活化定位顯微鏡 (Photoactivated localization microscopy, PALM)⁴⁰ 和螢光光活化定位顯微鏡 (Fluorescence photoactivated localization

microscopy, FPALM) ⁴¹。STORM、PALM 和 FPALM 利用不同波長的雷射光激發隨機的螢光分子或螢光蛋白，達到螢光開關的狀態。螢光基團的光化學性質被用於誘導弱發射或不發射的非螢光狀態 (off state) 狀態，理想狀態下非常少部分的螢光基團被激發回到激發態並被偵測，且圖像中只允許最小程度的重疊以便識別。而後利用單分子定位的成像技術，取得一系列的影像並分析重組，進而得到超解析圖像。而後對於此種方法再加以改良實施，進而產生了更多名詞，像是直接隨機光學重建顯微鏡 (dSTORM) ⁴² 和基態耗盡單個分子返回 (Ground State Depletion Microscopy Followed by Individual Molecule Return, GSDIM) ⁴³。但其實這些方法皆具有相同的基本原理和儀器，並進行數據分析。

1.2.6.2 光可切換螢光分子之特性

超解析影像是以單分子定位作為基礎，結合螢光分子在螢光態 (on state) 及非螢光態 (off state) 兩者間的轉換特性，可以精確的定位獨立螢光光點，進而得到超解析影像。螢光染料在 on state 與 off state 的轉換稱之為光可切換 (photoswitch)。由於不同子集合在不同時間放光，用偵測的光子數和螢光背景之高斯分布來定位這些放光點的輪廓，而自體螢光與環境背景螢光即被定義為 off state。在 on state 的消光係數及量子產率皆大於 off state，使光切換時兩者有很明顯的

差異性。

如圖 1-5 所示，首先將可光切換的螢光分子密集標記於樣品，一開始以強光激發樣品上的螢光分子，使大部分的螢光分子以 off state 存在，理想狀態下，單個螢光團可以隨機返回到 on state，被激發並被檢測到，最後利用單分子定位的成像技術，將一系列的影像進行分析重組得到超解析圖像。需要注意的是，發射輪廓必須在每個圖像中表現出最小重疊才可被識別，並藉由重複的光活化、定位獨立螢光分子、去活化及閃爍，提升螢光重建影像的解析度，甚至可達到 20 奈米。

1.2.6.3 隨機光學重建顯微鏡 (STORM)

STORM 是諾貝爾獎獲獎超分辨率單分子定位顯微鏡 (SMLM) 家族之一，用於生物系統的可視化。STORM 的光學配置幾乎與普通的 TIRFM 相同，只是入射角略小於臨界角，其儀器架構簡單及成本相對較低，可以實現高空間分辨率，此優勢受到研究超分辨率顯微鏡技術的用戶歡迎。儘管設置相對容易，但在實際應用中要獲得完美的 STORM 圖像卻也不一定是簡單的。大多數研究是在培養細胞中完成的，然而對於發展生物學的研究通常需要在組織中進行成像，有時甚至需要在生物體中進行長期觀察，可想而知對超解析顯微鏡是困難的挑戰。

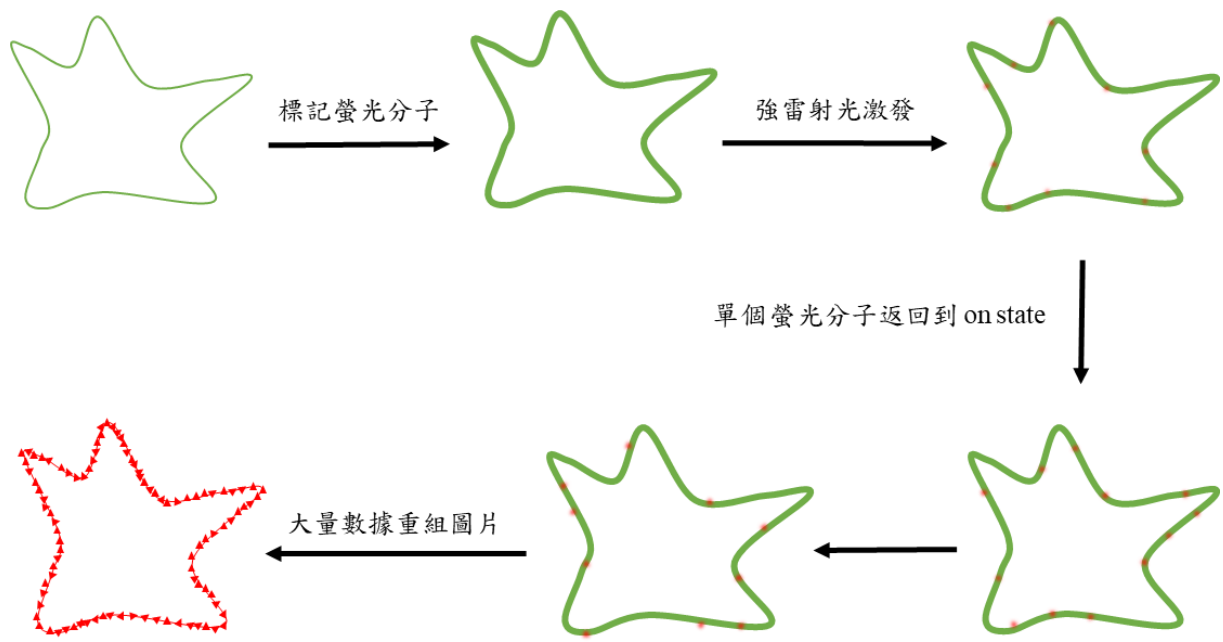


圖 1-5 超解析技術的基本原理。將螢光分子標記於樣品上，並以強雷射光進行激發，使大部分螢光分子達到 off state，而單個螢光分子隨機返回 on state 並被偵測，藉由獲取大量數據分析重組得到超解析圖像。

STORM 很適合用於亞細胞結構成像，包括三維、多色和實時成像，其組織成像主要面臨的挑戰是需要高靈敏度來檢測單個螢光團。單一個螢光分子的信號非常微弱，典型的可光活化螢光蛋白允許在光漂白之前檢測到少於 1000 個光子，有機染料則可以更亮，但大多數情況下檢測到的光子數仍然小於 5000 個。然而，在大組織體積檢測單一螢光分子仍會受到組織散射引起的信號損失和組織誘導的光學像差以及來自自體螢光和離焦螢光團的高背景的影響。

STORM 對於確定螢光分子位置的精度通常可以達到標準偏差至 10nm。而蛋白質分子的大小約為 1nm 至 20nm，因此他們可以小於標記樣品結構的相鄰螢光團之間的距離，並不會妨礙研究單個分子的特性。為了避免單分子圖像的重疊阻礙單分子定位，激活的螢光團平均密度不超過 $0.5/\mu\text{m}^2$ 。可以藉由使用更快的相機或是使用即時圖像開始重疊也可以識別單個分子的算法來改善時間分辨率。

進行活細胞和組織成像的能力是螢光顯微鏡的特點之一，一般認為 STORM 不適用於活細胞成像，因為重建一個超解析成像通常需要數千幀而耗費時間。然而一些研究成功證明 STORM 的活細胞成像，並使用合成染料代替螢光蛋白（fluorescent proteins, FPs）。

1.2.6.4 直接隨機重建光學顯微鏡 (dSTORM)

dSTORM 不同於 STORM 是藉由不同波長雷射激發隨機螢光分子或螢光蛋白達到螢光開關的效果，而是使用單一激發光源，並控制緩衝溶液環境達到超解析成像，也是本實驗所使用之超解析技術。

dSTORM 使用光譜上不同的探針應用在市售的螢光基團和標記試劑，但不同的螢光基團通常需要配合不同的緩衝溶液，而且色差 (Chromatic Aberration, CA) 現象使得透鏡無法將各種波長的色光都聚焦在同一個點上，雖然在一般光學顯微系統下通常影響並不大，不過當在奈米尺度時這種現象會變得非常的顯著。dSTORM 使用的標準有機螢光團，如 Alexa Fluor 和 ATTO 染料，可以作為可逆光開關操作，代表覆蓋整個可見光譜。在水性緩衝液中存在活化劑螢光團及毫莫爾濃度 (mM) 含有硫醇的還原劑，像是二硫蘇糖醇 (dithiothreitol, DTT)、穀胱甘肽 (glutathione, GSH) 或巰基乙胺 (beta-Mercaptoethylamine, MEA) 時，含硫醇和氧氣的緩衝液會形成一個氧化還原系統 (reducing and oxidization system, ROXS) 可以實現光誘導的可逆光切換。硫醇化合物的還原劑有效的淬滅螢光基團的三重態，並產生穩定的 off state。on state 可以藉由水性溶劑中天然存在的分子氧 ($\sim 250\mu\text{M}$) 自發恢復或光誘導。

大多數螢光團轉移到非螢光黑暗狀態和單個螢光團的精確定位

對於 dSTORM 十分重要，與螢光團的亮度、螢光分子標記密度和 off state 的穩定性及壽命都有密切的關係。如圖 1-6 所示，高強度雷射激發單分子染料，使其從基態 (F_0) 越遷至激發態 (F_1)，再以放出螢光的方式回到基態 (F_0)，此部分視為 on state。單一激發光使染料被激發，但只有隨機子集的螢光分子可以放出螢光，而其他螢光分子會因為電子的系統性穿越 (intersystem crossing) 自旋方向改變進入三重態 (triplet state, 3F)，部分三重態的電子再經系統性的穿越近基態 (F_0)。而另一部分的三重態電子則會經硫醇還原成陰離子自由基 ($^3F'$)，最後再被氧化回到基態。由於陰離子自由基很穩定，可以長時間存在，且三重態不會放出螢光，此部分視為 off state。

dSTORM 結合化學標籤可以有效的提高超分辨率成像時間與空間的分辨率潛力，這種光轉換是一些有機螢光分子本身的特性，不需要第二個螢光團精確共軛，且在不同時間使螢光分子隨機返回到 on state，並達到奈米級的精準度。

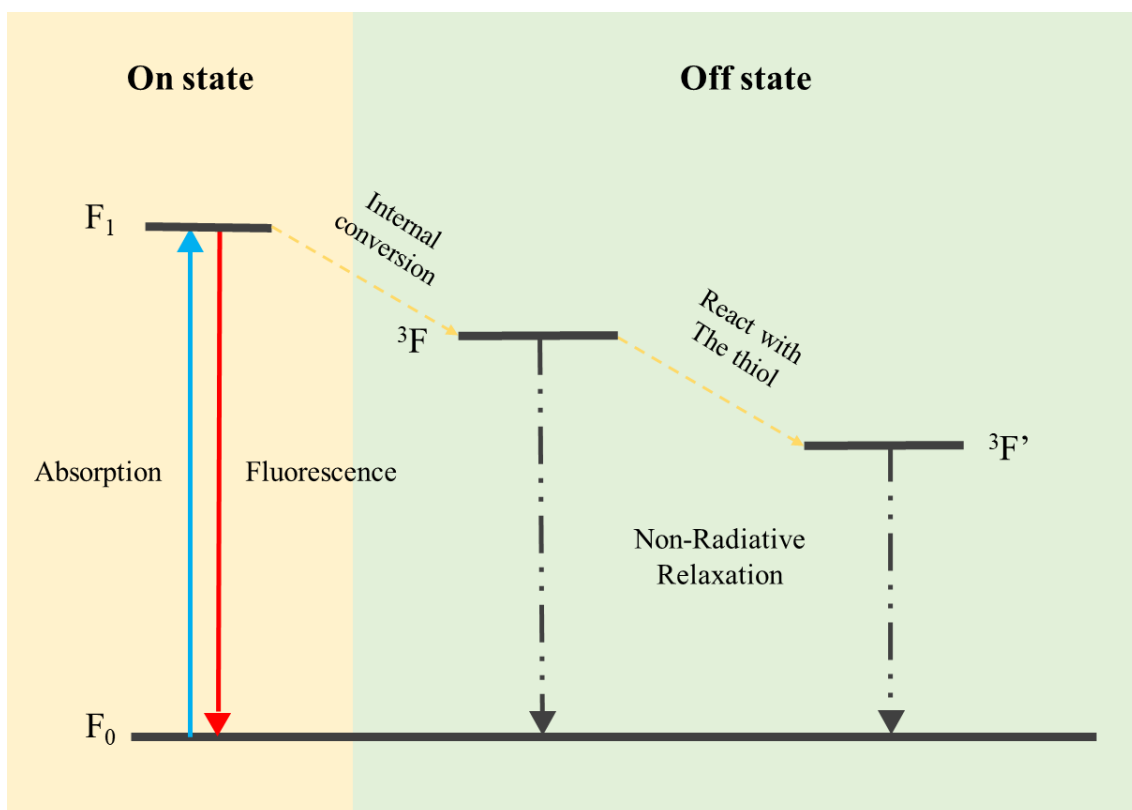


圖 1-6 dSTORM 示意圖。 F_0 表示為基態， F_1 表示為激發態， 3F 表示為三重態， $^3F'$ 表示為陰離子自由基。

第二章 結合超解析技術觀測肝癌細胞中微型核糖核酸

2.1 研究動機

隨著越來越多研究確認 miRNA 的生物功能，發現 miRNA 具有調控基因表達的特性，也與疾病發展有關，使得如何精確地偵測 miRNA 成為重要的課題。

肝癌是常見的癌症之一，具有高度的致死率。近年來得知 has-miR-10b-3p 在肝癌細胞中有高度表達的特性，以往檢測 miRNA 的表現量都是透過繁瑣步驟，經過 RNA 萃取後針對特定序列進行複製放大，而其中以 RT-qPCR 為目前最靈敏的方法之一，但在低濃度下不斷放大存在著定量準確度不佳的情況。而本實驗利用分子信標 (molecular beacon) 對肝癌細胞中的目標序列進行螢光雜合作用 (hybridization)，藉由高靈敏度 HILO 顯微鏡系統直接觀測肝癌細胞中 miRNA 的螢光訊號，並透過單分子影像分析 miRNA 之表現量。再進一步將分別標記 hsa-miR-10b-3p 及 HOXD 10 之 molecular beacon 同時做螢光雜合反應，藉由 647nm 與 488nm 激發兩種不同的 molecular beacon，再結合超解析 (super-resolution) 技術對其進行共定位分析以確定兩者的相對重疊，探討 miRNA 在細胞內的相關訊息。

2.2 實驗流程及設備

2.2.1 玻片前處理

本實驗所使用之玻片由德國 Paul Marienfeld 公司生產製造，型號為 NO.1.5，硼矽酸玻璃材質製成，玻片厚度為 0.16 至 0.19mm。玻片使用前皆須於去離子水中以超音波震盪 5 分鐘，再置於 1MHCl 中以超音波震盪 30 分鐘，再以去離子水震盪 5 分鐘後，置於 1MNaOH 中震盪 30 分鐘，接著以去離子水震盪 5 分鐘及 30 分鐘，將玻片沖洗乾淨。震盪後使用 95% EtOH 潤洗，再浸泡以 95% EtOH 配置之 5% APTES 溶液 1 小時，最後於 95% EtOH 中以超音波震盪 5 分鐘兩次，去除多餘未反應之 APTES。

塗覆 APTES 將玻片表面修飾成帶正電荷之胺基，以利生物樣品吸附於玻片表面，再以高溫高壓滅菌即成為乾淨玻片。

2.2.2 細胞培養

細胞培養使用試藥：培養基 (DMEM)、胎牛血清 (FBS) 及 0.5% Trypsin-EDTA 向 Gibco 公司購買，三合一抗生素 (Pen-Strep Ampho. Solution) 及丙酮酸鈉 (sodium pyruvate) 向 Biological Industries 公司購買，氯化鈉 (sodium chloride) 向美國 Sigma-Aldrich 公司購買，氯化鉀 (potassium dihydrogenphosphate) 向日本 SHOWA 公司購買，乙二胺四乙酸 (EDTA) 向美國 J.T.Baker 公司購買。

將肝癌細胞 Huh7 cell 培養於 6 cm 的培養皿中，加入 3 mL 培養液 (包含 10%FBS、0.01x PSA 及 1 mM 丙酮酸鈉之 DMEM 培養液)，置於 37°C、5% CO₂ 環境之培養箱內。待細胞滿盤後吸棄培養液，以 1x PBS 清洗後吸棄，再加入 3 mL 1x trypsin in PBS 於 37°C 培養箱中反應 3 分鐘，使細胞離開培養皿表面，再以等量培養液終止反應，收集細胞至離心管中，並以 400 xg 離心 5 分鐘。吸棄上清液，以 3 mL 培養液沖散細胞，繼代培養。

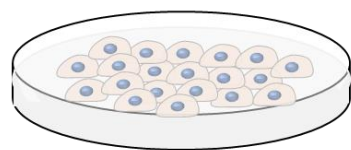
本實驗亦將 Huh7 cell 置於 0.1x 培養液中，將細胞溶液放置在塗覆 APTES 且經高壓滅菌之玻片上，待細胞貼平於玻片後，使用顯微鏡確認是否為分布均勻之單顆細胞，再利用 4% 甲醛固定細胞 overnight，最後再用 1x PBS 清洗，即完成細胞培養，玻片之細胞樣品可保存於 -20°C。

本實驗所使用之肝癌細胞株由台灣大學基因體中心腫瘤醫學研究所歐大諒教授提供。

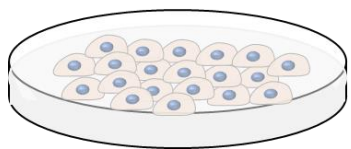
2.2.3 溶液製備

細胞樣品前處理試藥：三羥甲基氨基甲烷 (Tris)、甘胺酸 (glycine) 及甲醛 (formaldehyde) 向美國 J.T.Baker 公司購買，檸檬酸鈉 (sodium citrate) 及 1-甲基咪唑 (1-methylimidazole) 向美國 Sigma-Aldrich 公司購買，EDC (1-(3-Dimethylaminopropyl) -

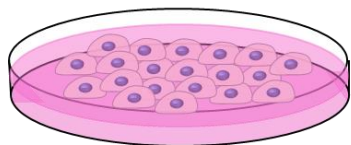
Huh7 cell



加入1x Trypsin 使細胞脫離培養基



加入等量medium終止反應



離心400xg，5min
回溶0.1x medium



將細胞溶液滴於APTES玻片



待細胞貼平，以4%甲醛固定



圖 2-1 細胞培養流程圖。

3ethylcarbodiimide hydrochloride) 及 APTES ((3-Aminopropyl) triethoxysilane) 向美國 Alfa Aesar 公司購買，牛血清蛋白 (Bovine serum albumin) 向美國 UniRegion 公司購買，Proteinase K 向瑞士 Roche 公司購買，甲醯胺 (formamide) 向德國 Merck 公司購買，Fluoro-Gel with DABCO (1,4-diazobicyclo- (2,2,2) -octane) 向美國 Electron Microscopy Sciences 公司購買，DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) 向美國 Life technologies 公司購買。

TBS 緩衝溶液之配製方法為取 Tris (50mM) 及 NaCl (150mM)，並使用 HCl 調整至 pH7.4，即完成配製，再以此溶液配製 Proteinase K 溶液 (20 μ g/mL)、glycine 溶液 (0.2%) 及 formaldehyde 溶液 (4%)。1-methylimidazole 溶液之配製方法為取 1-methylimidazole (130mM)，使用 HCl 調整至 pH8.0，再加入 NaCl (300mM)，即完成配製。SSC 緩衝溶液配置之方法為取 NaCl (3M) 及 sodium citrate (300mM)，並使用 HCl 調整至 pH7.0，即完成溶液濃度為 20x 之 SSC 緩衝溶液。再依實驗所需濃度加去離子水稀釋，並以此溶液配製 formamide 溶液 (50%)。PBS 緩衝溶液之配製方法為取 NaCl (137mM)、KCl (2.7mM)、NaHPO₄ (10mM) 及 KH₂PO₄ (2mM)，此時溶液 pH 值為 7.4。

Switching buffer 製備方法為混和 Enzyme stock solution (A)、Glucose stock solution (B)、Reducing agent stock solution (C) 在 1x

PBS，其比例為 1：8：2：9。Enzyme stock solution (A) 的配製方法為取 catalase(20 μ g/mL)、Tris(2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride (4mM)、glycerin (50%)、KCl (25mM)、Tris-HCl, pH 7.5 (20mM) 及 glucose oxidase (1 mg/mL)；Glucose stock solution (B) 的配製方法為混和 glucose (100 mg/mL) 及 glycerin (10%)；Reducing agent stock solution (C) 則是配製 MEA-HCl (1M)。製備完成之 Enzyme stock solution (A)、Glucose stock solution (B) 和 Reducing agent stock solution (C) 分裝保存在-20 $^{\circ}$ C，switching buffer 需要使用時須立即配製，不可久放。

2.2.4 細胞實驗流程

將保存於-20 $^{\circ}$ C之細胞樣品回復至室溫，使用去離子水清洗後，以 20 μ g/mL Proteinase K 溶液覆蓋細胞表面。於 37 $^{\circ}$ C反應 5 分鐘，將細胞膜上之蛋白質切掉些許，以利後續所加入的反應試劑能夠進入細胞。使用 TBS 緩衝溶液清洗三次，終止 Proteinase K 之反應。浸泡於 4% Formaldehyde 溶液反應 15 分鐘，再浸泡 0.2% Glycine 溶液 5 分鐘，再以 TBS 緩衝溶液清洗二次，再浸泡 0.13M 1-methylimidazole 溶液反應 10 分鐘，重複二次，以加速 EDC 反應速率，接著使用 EDC 溶液反應 1 小時，以進行 miRNA 固定反應。如圖 2-2 所示，藉由 miRNA 的 5' 端的磷酸基與蛋白質的胺基 (-NH₂) 形成氨基磷酸脂鍵

(phosphoramidate linkages),使 miRNA 固定於細胞內之蛋白質上⁴⁴, 避免之後清洗步驟造成 miRNA 之流失。接著浸泡 0.2% Glycine 溶液 5 分鐘,再以 TBS 緩衝溶液清洗二次,其後加入 1 μ M 隨機短序列 DNA 及 5% BSA 於 0.3x SSC 雜合溶液封片。此舉是為了將 BSA 及 DNA 吸附於玻片表面,以防止其後加入的標記螢光分子 molecular beacon 會直接吸附於玻片表面。之後再使用紅色及綠色 LED 燈泡(3W) 照射一個晚上,可以大幅降低甲醛固定細胞和培養基的自體螢光 (autofluorescence) 之背景干擾,使細胞背景螢光降低以利觀測螢光分子訊號。照光後以去離子水清洗,再以 TBS 緩衝溶液清洗,加入 0.1 μ M molecular beacon 及 5% BSA 於 0.3x SSC 雜合溶液,在 T_m 值 50°C 下避光進行雜合反應 1 小時,使 molecular beacon 與目標序列鍵結。完成雜合反應後,在避光環境下使用含 50% Formamide 的 2x SSC 溶液、含 50% Formamide 的 1x SSC 溶液於 T_m 值 50°C 下將未鍵結的 molecular beacon 清洗乾淨,各洗 3 次,接著使用 0.3x SSC 溶液於 36°C 下清洗,再以 1x SSC 溶液於室溫將樣品洗淨,去除 Formamide 溶液。最後使用 DAPI 對細胞核進行染色並以 HILO 螢光顯微鏡進行觀測,或加入 switching buffer 協助超解析影像之拍攝。

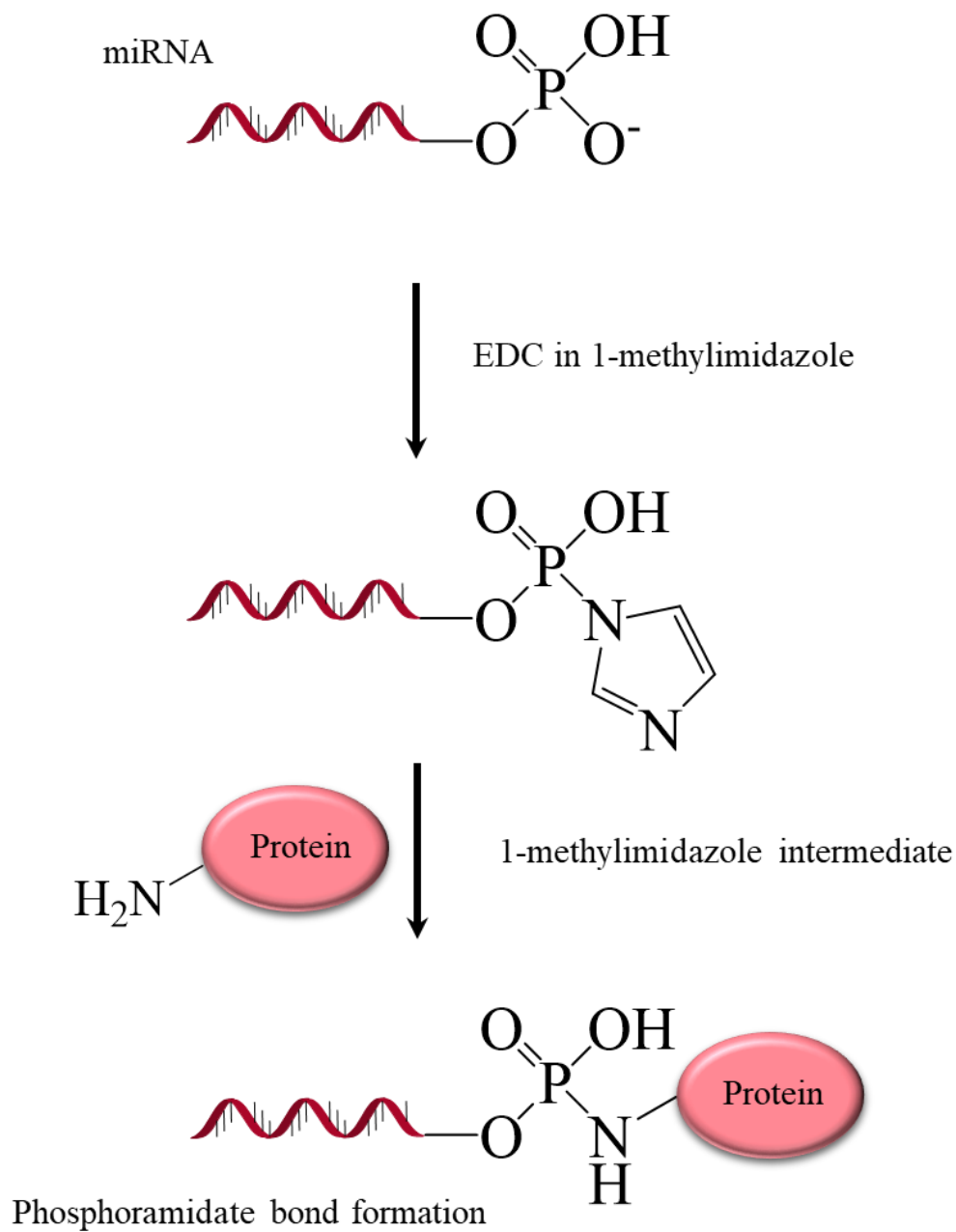


圖 2-2 利用 EDC 反應固定 miRNA 之機制圖。

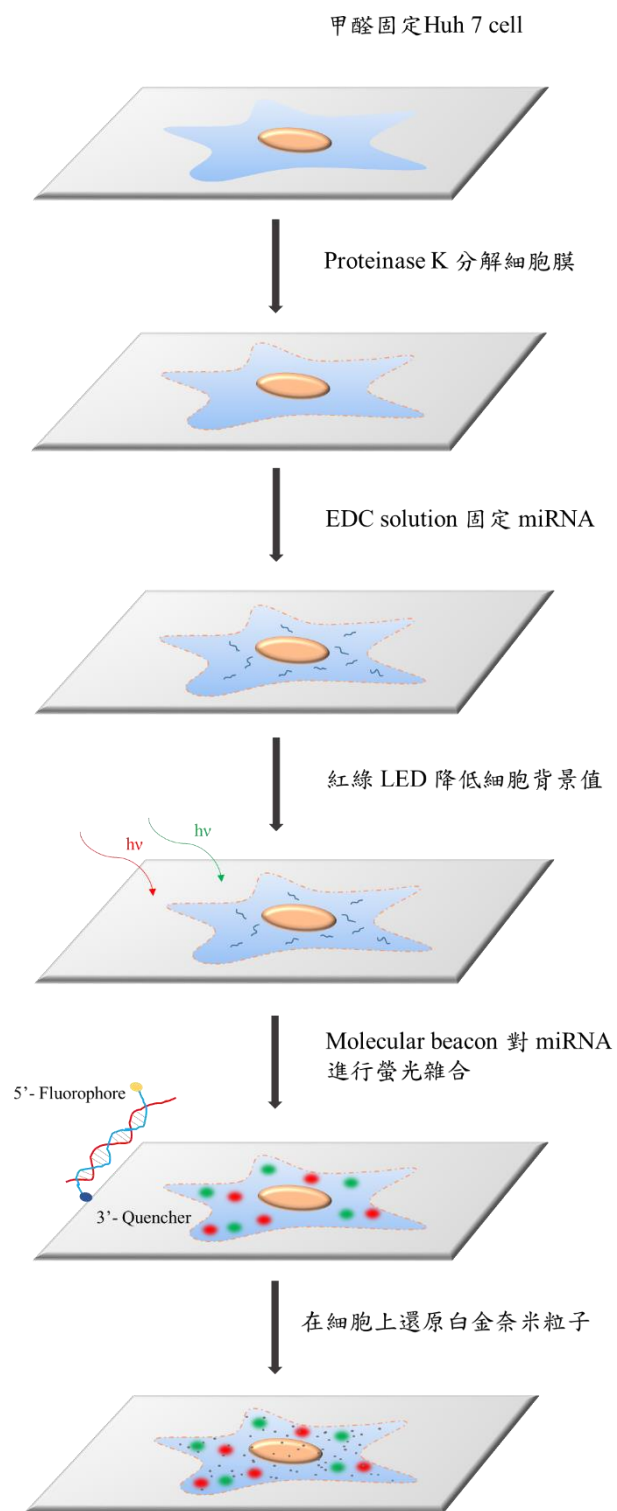


圖 2-3 細胞實驗流程圖。

2.2.5 儀器設備

細胞培養所使用之安全操作平台為台灣 yakos65 公司製造之 SAFZONE Class II A2 BSC，培養箱為日本 Panasonic 公司製造之 MCO-170 AIC。

2.2.6 系統架構

本實驗所使用之高靈敏度螢光顯微系統設有四道功率可調式雷射光源：一為 405nm 的固態雷射，用於激發 DAPI 螢光分子，以確定觀測細胞之位置；二為 488nm 的固態雷射，用於激發 6-FAM 及 Alexa Flour 488 螢光分子之氫離子雷射；三為 561nm 的固態雷射；四為 640nm 的固態雷射，用於激發 Cy5 螢光分子，以進行螢光分子之偵測。放置於光源前方之 405nm、488nm、561nm、647nm 干涉濾光片（interference filter）為美國 Semrock 公司製造，以利純化雷射光源，再利用美國 Semrock 公司製造之 dichroic beamsplitters LM02-427-25 及 LM02-427-25 將四道雷射光源匯聚成單一光束，再通過由美國 Thorlabs 公司製造之光閘，控制雷射通過與否，經由 10x beam expander 放大光束，並使用透鏡將光束聚焦於顯微鏡中的物鏡之聚焦面（back focal plane, BFP）上，亦可透過調整此透鏡之三為方向控制不同角度之光束及調控光束聚焦的位置。

本實驗使用由美國 Olympus 公司製造之倒立式螢光顯微鏡，型號

為 IX71，上方搭載二維式移動平台，可藉由控制平台之 Z 軸調整入射光角度、X 軸及 Y 軸調整欲觀測樣品波片之位置。顯微鏡使用型號為 ZEISS 100x 之油鏡，由德國 ZEISS 公司製造，其 N.A. 為 1.46，油鏡所使用之鏡油為 Olympus 所生產之 Immersion Oil Type-F。螢光顯微鏡內部之濾鏡盒 (filter cube) 包含可反射激發光源與可使螢光穿透之雙色分光鏡 (dichroic beamsplitters)，型號為 FF409-Di03-25x36、FF511-Di01-25x36 及 FF650-Di01-25x36，加上型號為 FF01-447/60-25、FF01-525/26-25 及 FF01-680/30-25 的可過濾螢光訊號之 interference filter，上述均由美國 Semrock 公司所製造。

基於單分子之螢光訊號極為微弱，故需要使用較靈敏的電子倍增電荷耦合裝置 (electron multiplying charge coupled device, EMCCD) 收集螢光影像，其型號為 ProEM: 512B，512x512 個像素，由美國 Princeton Instruments 公司製造。本實驗使用 CCD 之設定參數：曝光時間 (exposure) 為 30 毫秒、Gain 值為 100，並經 Lightfield 軟體儲存影像後，再使用 Image J 軟體做影像之處理。

此外，利用微米尺對畫面實際尺寸進行量測，如圖 2-4 所示，已知微米尺一小格為 10 微米，經 Image J 測量得知一小格長度約為 69 個像素，則一個像素長度約為 0.145 微米，即 145 奈米。

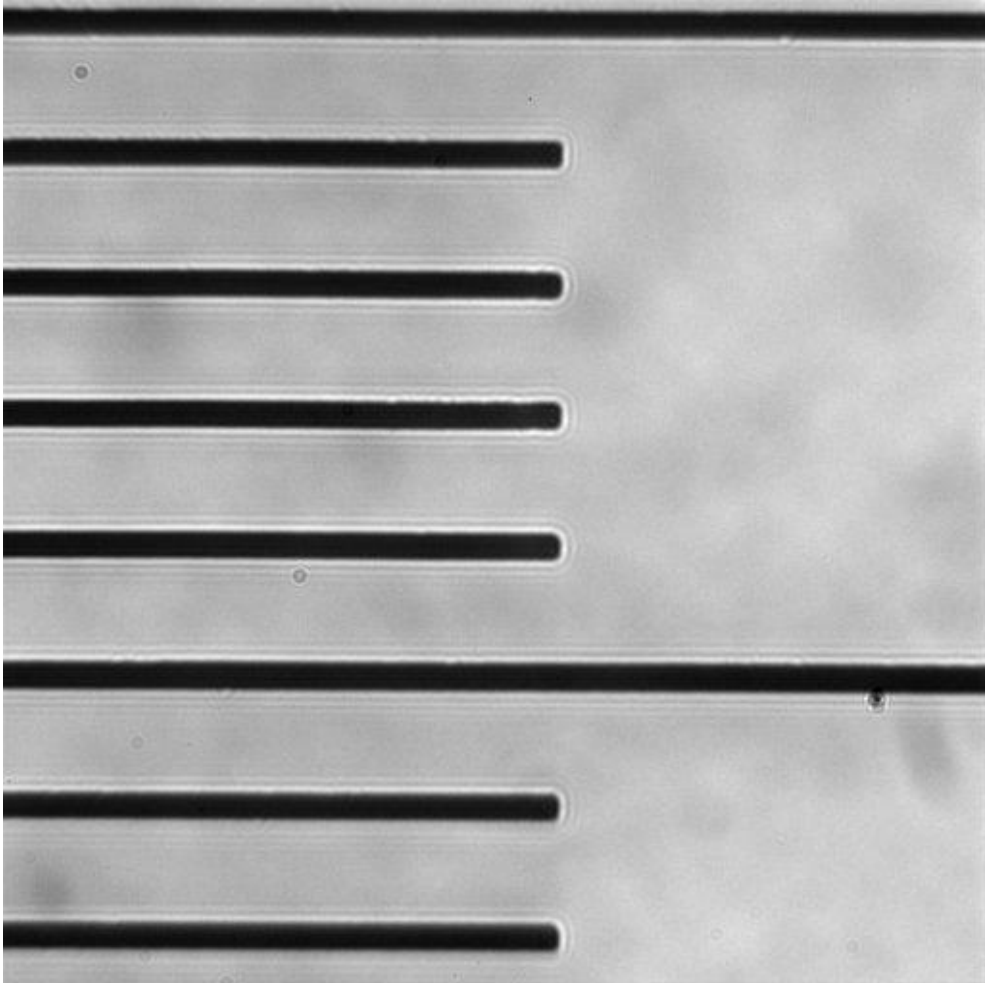


圖 2-4 100 倍油鏡下之微米尺。微米尺一小格長度為 10 微米，約為 69 個像素，則一個像素長度約為 145 奈米。

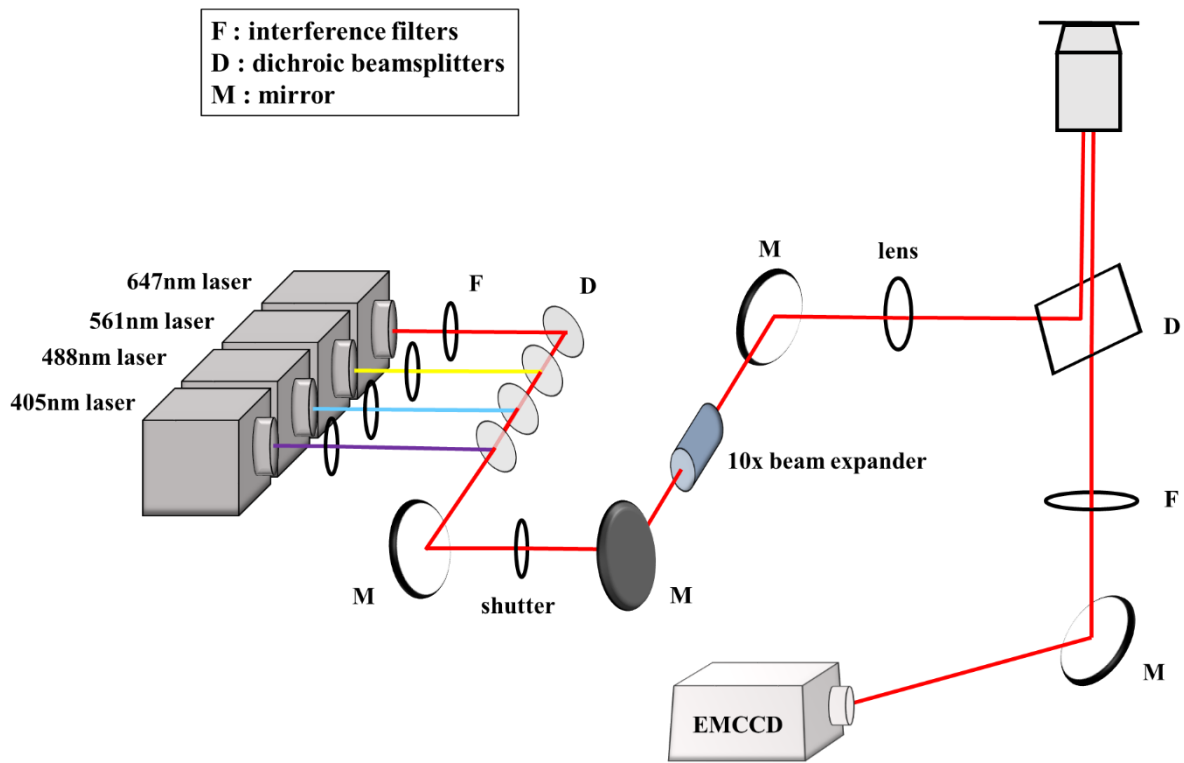


圖 2-5 螢光顯微鏡系統之裝置圖。代號 F 表示為 interference filters，D 表示為 dichroic beamsplitters，M 表示為 mirror。

2.3 實驗結果

2.3.1 比較 TB11-Alexa Fluor 647 時間與吸附量之關係

TB11-Alexa Fluor 647 為一段合成之核甘酸 (TB11, 5'-ACCAACGATGGTGTGTCCAT-3') 在 5'端修飾一個螢光基團 (Alexa Fluor 647, λ_{ex} : 650nm、 λ_{em} : 665nm)。將 10^{-9} M TB11-Alexa Fluor 647 取 25 μ l 滴在塗覆 APTES 之玻片上，並分別放置 1 分鐘、10 分鐘、1 小時、3 小時、6 小時及 overnight，再以 1x PBS 進行清洗，加入 switching buffer 後，以 647nm 100mW (末端瓦數為 36.9mW) 進行觀測。

如圖 2-6 可以看出，TB11-Alexa Fluor 647 吸附在玻片上的數量隨著放置時間增加，當放置時間在 3 小時以上時，常有染料聚集的現象。利用 Image J 計算其亮點數目，依序為 714 個、2508 個、5965 個、3236 個、1986 個及 824 個，放置 3 小時以上之樣品因為聚集的原因進而影響到取得的亮點數目，使得無法利用亮點數目推斷 TB11-Alexa Fluor 647 放置時間與吸附量的關係。再利用 Image 計算單張螢光影像的平均螢光亮度，其數值依序為 675.82、708.11、715.47、839.17、1773.80 及 3095.07。由於單個螢光分子的訊號是固定的，螢光訊號愈高代表吸附之單分子數目愈多，如圖可以證明 TB11-Alexa Fluor 647 放置時間愈久，吸附在塗覆 APTES 玻片的單分子數量也會愈多。

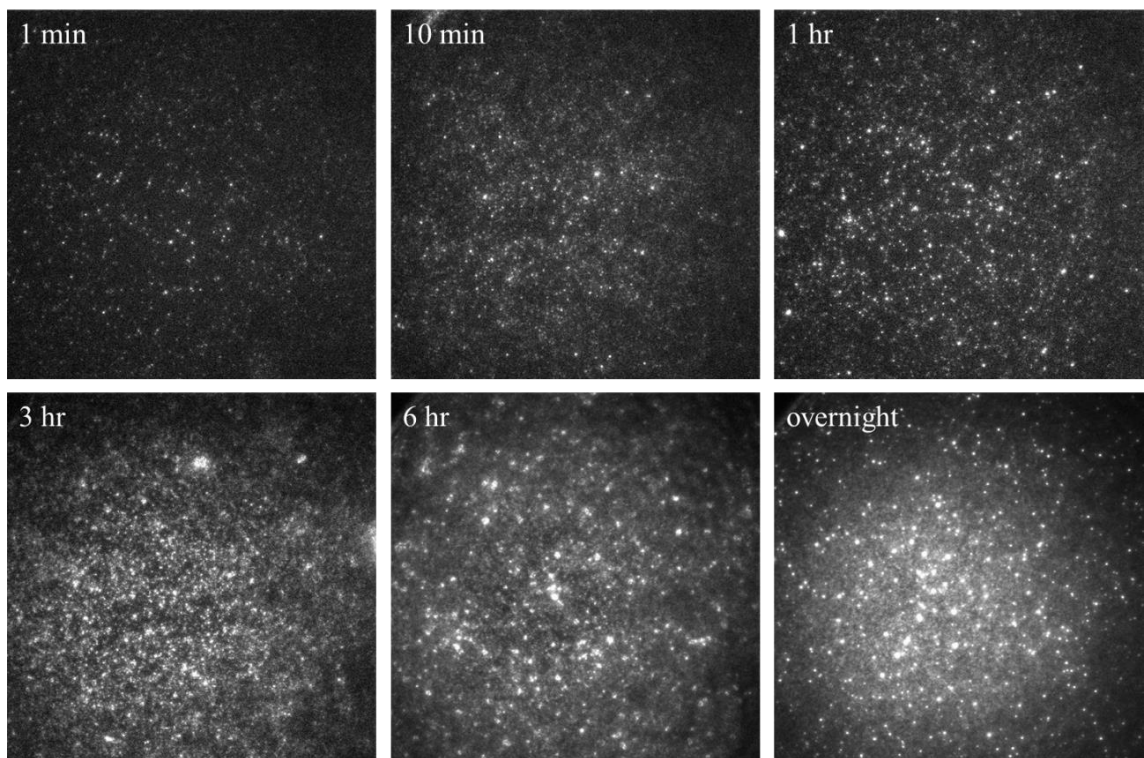


圖 2-6 以 647nm 100mW 觀測放置不同時間之 Alexa 647。

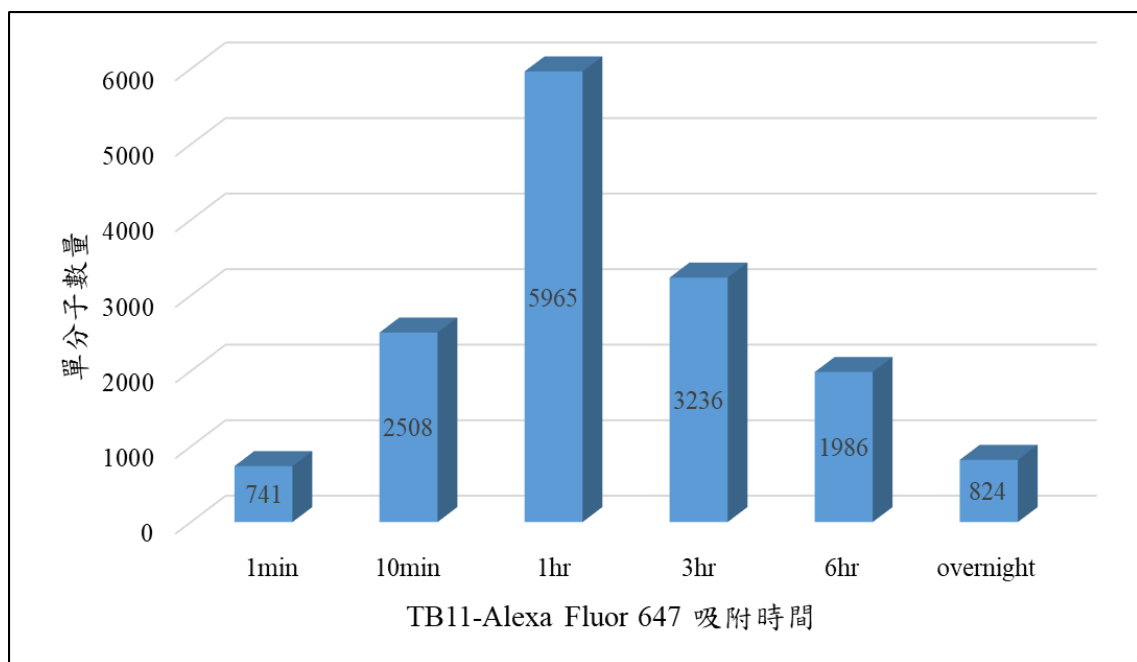


圖 2-7 單分子吸附數量與時間之關係。

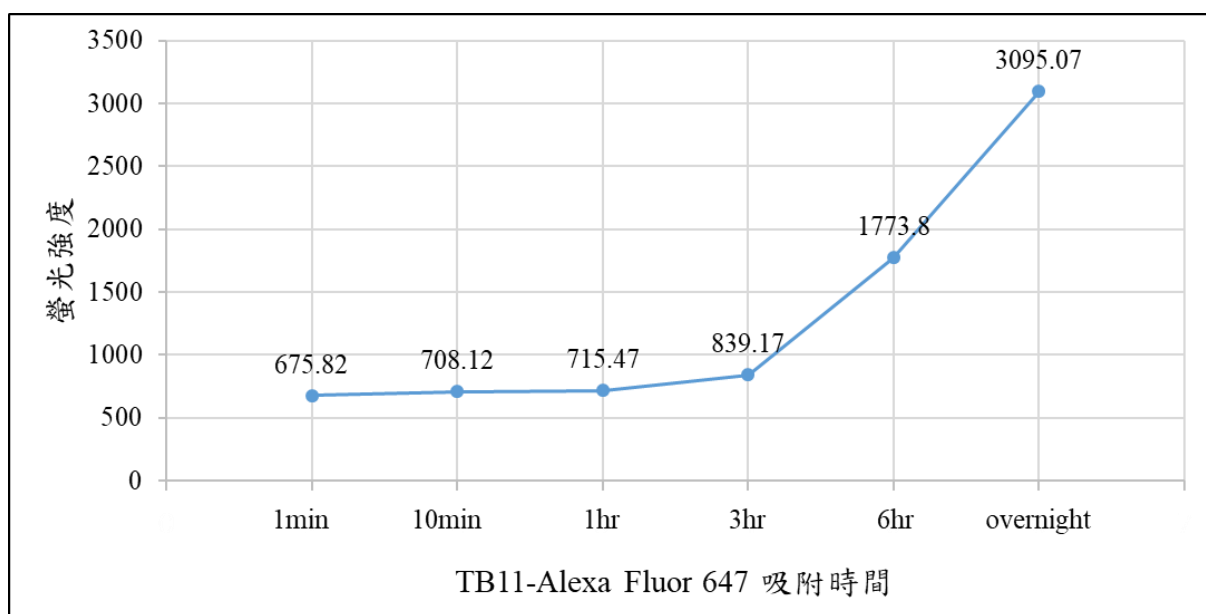


圖 2-8 單分子螢光訊號與時間之關係。

2.3.2 定量不同濃度之 TB11-Alexa Fluor 647

已知染料吸附程度與在玻片上放置的時間有關，此部分實驗依序稀釋 TB11-Alexa Fluor 647，將 10^{-8} M 至 10^{-15} M 的 TB11-Alexa Fluor 647 分別取 10 μ l 滴在塗覆 APTES 之玻片上，放置 overnight，再使用 1x PBS 清洗，並加入 switching buffer 以 647nm 100mW（末端瓦數為 36.9mW）拍攝 1000 張螢光影像進行觀測。如圖 2-9 所示， 10^{-13} M 為可觀測到單個螢光分子的最低濃度，為了確保低濃度如 10^{-14} M 及 10^{-15} M 有對焦到正確的位置，在樣品製備時加入 TB11-Alexa Fluor 488（Alexa Fluor 647， λ_{ex} ：495nm、 λ_{em} ：519nm） 10^{-10} M 幫助對焦。

藉由 Image J 計算亮點數目，可以得知 10^{-9} M 至 10^{-15} M 的亮點數目分別為 1190 個、2970 個、287 個、60 個、8 個、0 個、0 個。而由於 10^{-8} M TB11-Alexa Fluor 647 單分子聚集的情形較嚴重，便不列入計算。實驗數據表明，實際吸附數量並未依照濃度等比例增加，除了 10^{-8} M 外，也可以 10^{-9} M 的螢光影像圖看出 TB11-Alexa Fluor 647 有明顯聚集的現象，而 10^{-10} M 也有少部分聚集的情況，這些聚集的單分子會影響到影響亮點數目的可信度。

本實驗可以定量吸附在塗覆 APTES 玻片上不同濃度的 TB11-Alexa Fluor 647，並藉由超解析圖像得知單分子數目，能應用在之後單分子數量相對於多少濃度之參考。

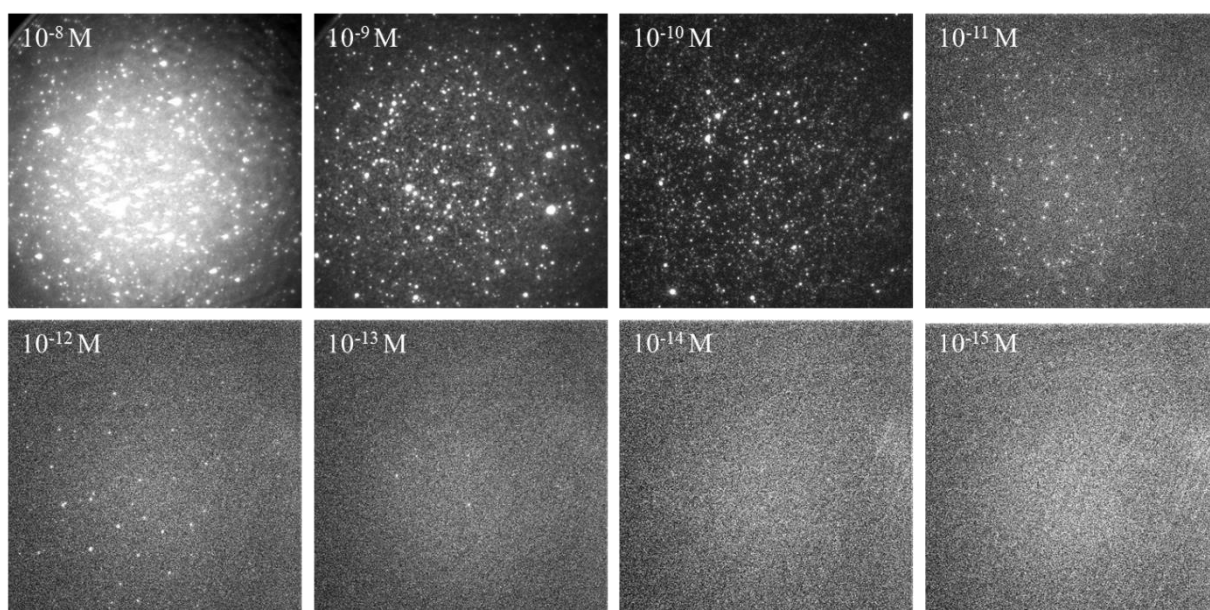


圖 2-9 以 647nm 100mW 觀測不同濃度之 Alexa 647。

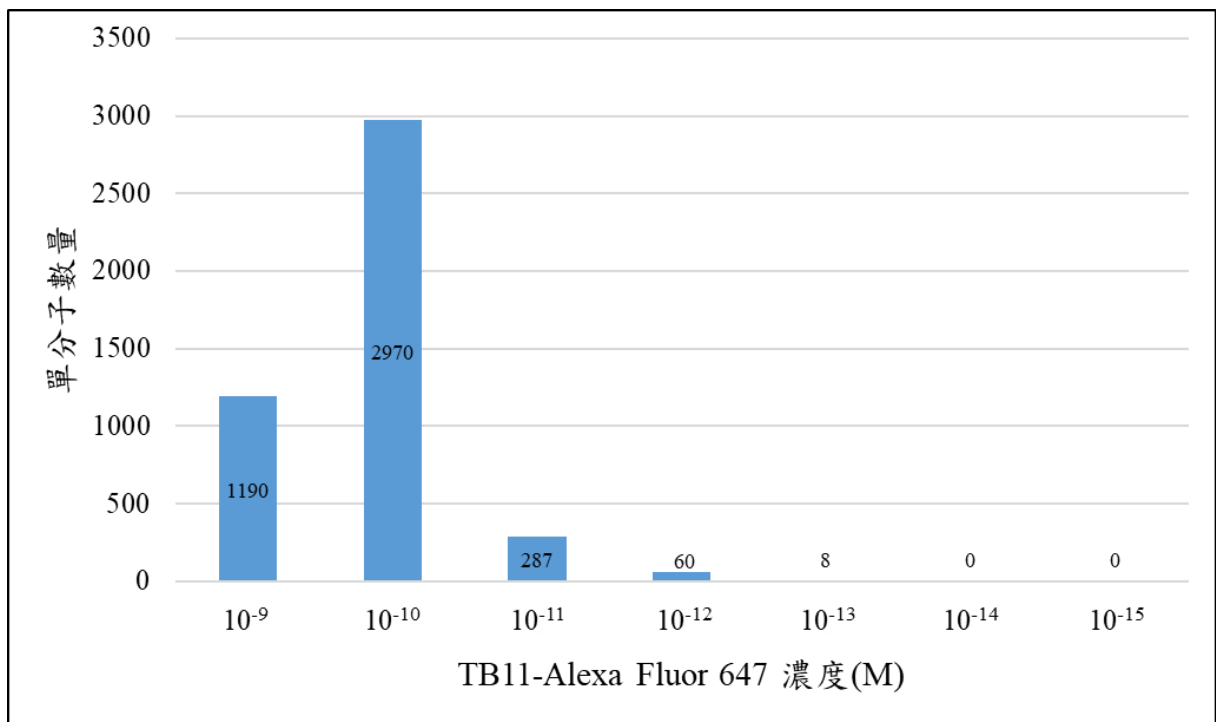


圖 2-10 定量不同濃度之 TB11-Alexa Fluor 647。

2.3.3 毛細管電泳確認 RT-qPCR 之產物

反轉錄即時定量聚合酶連鎖反應 (RT-qPCR) 是現今檢測 miRNA 最靈敏的方法之一，本實驗針對 has-miR-10b-3p 進行反轉錄即時定量聚合酶連鎖反應。第一階段反轉錄聚合酶連鎖反應 (Reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR) 分別加入 1 μ l hsa-miR-10b-3p RNA 標準品、0.5 μ l dNTP (10 mM) 及 1 μ l RT primer (0.5 μ M)，補水至總體積 6 μ l，反應 65 $^{\circ}$ C 5 分鐘；再加入 2 μ l 5x First-Strand buffer、0.1 μ l SuperScript III Reverse transcriptase (200U/ μ l) 及 0.5 μ l DTT (0.1M)，最後補水至總體積 10 μ l，反應於 25 $^{\circ}$ C 10 分鐘，25 $^{\circ}$ C 至 55 $^{\circ}$ C 梯度升溫 60 分鐘，55 $^{\circ}$ C 30 分鐘，以進行反轉錄過程，最後於 85 $^{\circ}$ C 5 分鐘終止反應。

第二階段為即時偵測聚合酶連鎖反應 (Real-time polymerase chain reaction, qPCR)，先將反轉錄之 DNA 產物 (cDNA) 稀釋 20 倍，再分別加入 2 μ l Reverse primer (1 μ M)、2 μ l GS primer (1 μ M)、5 μ l SYBR Green Mix。反應條件 95 $^{\circ}$ C 4 分鐘；接著 95 $^{\circ}$ C 15 秒、63 $^{\circ}$ C 30 秒，循環兩次；接續 95 $^{\circ}$ C 15 秒、45 $^{\circ}$ C 30 秒、63 $^{\circ}$ C 30 秒，循環 50 次；最後 63 $^{\circ}$ C 30 秒、25 $^{\circ}$ C 30 秒。為確定得到的最終產物產物複製結果是否成功，利用 10 bp marker 與 has-miR-10b-3p stem loop RT-qPCR 產物混和後，以毛細管電泳分析判斷此 DNA 產物之序列長度是否正確。

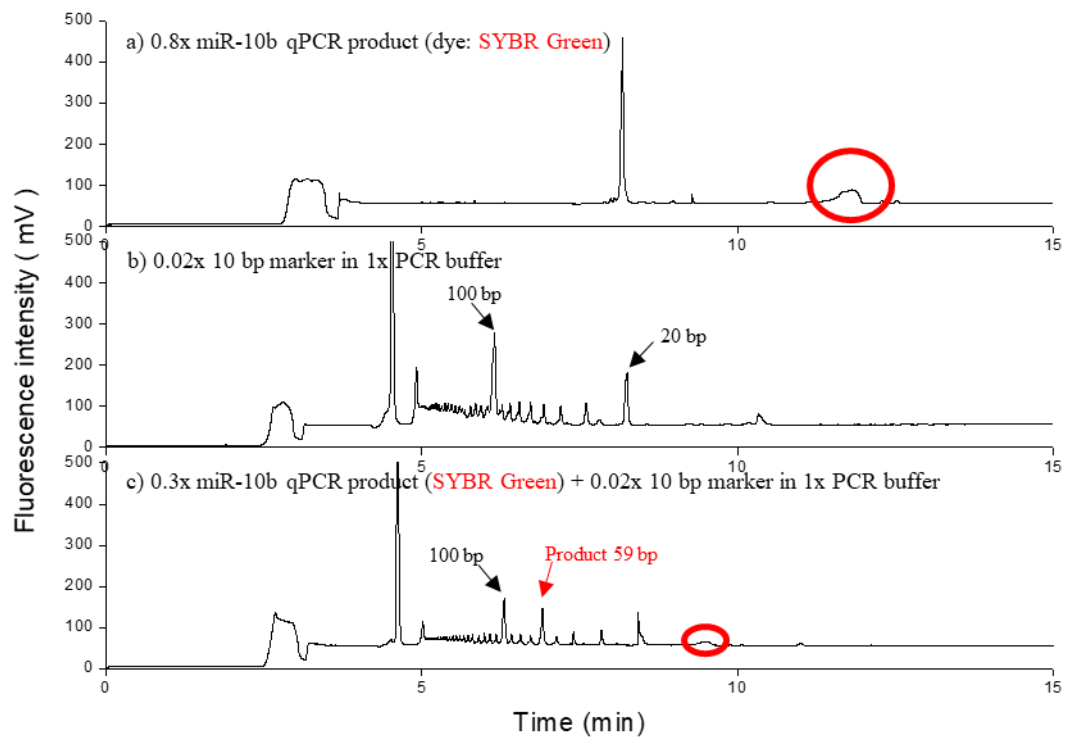


圖 2-11 has-miR-10b-3p stem loop RT-qPCR product 電泳圖。(a) 為 500ng Huh7 Total RNA 之 hsa-miR-10b-3p stem loop RT-qPCR product 之電泳圖，(b) 為 10 bp marker 之電泳圖，(c) 為兩者混合標示之電泳圖。

實驗所使用的核苷酸 has-miR-10b-3p RNA 長度為 22，其序列為 5'-ACA GAU UCG AUU CUA GGG GAA U-3'；has-miR-10b RT primer 長度為 44，其序列為 5'-CTC AAC TGG TGT CGT GGA GTC GGC AAT TCA GTT GAG ATT CCC CT-3'；Reverse primer 長度為 24，其序列為 5'-CTG GTG TCG TGG AGT CGG CAA TTC-3'；has-miR-10b GS primer 長度為 22，其序列為 5'-CGG CGG ACA GAT TCG ATT CTA G-3'。

2.3.4 確認 molecular beacon 可經由雜合機制放光

Molecular beacon 可以藉由螢光雜合法標記細胞樣品內的 miRNA，本實驗針對 has-miR-10b、U6 snRNA 及 HOXD10 mRNA 分別設計可標記此序列之 molecular beacon。

目標 miRNA has-miR-10b 的序列為 5'-ACA GAU UCG AUU CUA GGG GAA U-3'，其 molecular beacon 序列為 5'-Cy5-GCA CAT TCC CCT AGA ATC GAA TCT GTG C-lowa Black RQ-Sp-3'，5'端標記 Cy5 螢光分子，而 3'端為 lowa Black RQ-Sp 消光基團。當所設計 molecular beacon 之環狀序列與目標 miRNA 完全互補配對時，氫鍵部分打開，使 Cy5 螢光分子不受 lowa Black RQ-Sp 消光分子影響放光；若為不完全配對時，部分維持的氫鍵會使 Cy5 螢光分子受到 lowa Black RQ-Sp 消光基團影響而無法放出螢光。Cy5 螢光分子最大激發波長為

647nm，最大放射波長為 665nm，所以選用 647nm 的固態雷射作為激發光源。此序列由美國 Integrated DNA Technologies 公司生產合成。另外再設計一段 molecular beacon 來標記 has-muR-10b 標的的 HOXD 10 mRNA，來觀測 miRNA 生物功能中影響標的 mRNA 之關係。hsa-miR-10b-3p 是與 HOXD10 mRNA 的 3'UTR 區域黏合⁴⁵，為避免此區域與其他 RNA 結合導致 mRNA 不穩定進而抑制轉譯作用，設計的黏合序列為編碼區域（即不包含 5'UTR 和 3'UTR），其序列為 5'-/Alexa 488/-AGC AGG TCG GTG AGG TTA ACG CTC TTC CTG CT-/BHQ-1/-3'，其中 Alexa 488 螢光分子最大激發波長為 495nm，最大放射波長為 519nm，所以選擇 488nm 之氬離子雷射作為激發光源。此序列由德國 IBA 公司生產合成。

本實驗利用聚合酶連鎖反應（Polymerase chain reaction, PCR）來確認所設計之 molecular beacon 是否可以經過雜合機制放光。首先配製 HOXD10 DNA + HOXD10 beacon in 1xPCR buffer 及 miR-10b DNA + miR-10b beacon in 1xPCR buffer，將混和均勻的兩管 tube 放進 PCR 的熱循環設備，設定 55°C 5 分鐘，50°C 10 分鐘，36°C 10 分鐘，28°C 8 分鐘，藉由高溫將其夾板序列打開。反應完成後將 HOXD10 beacon、miR-10b beacon、HOXD10 DAN + HOXD10 beacon in 1xPCR buffer、miR-10b DNA + miR-10b beacon in 1xPCR buffer，分別取 10 μ L 至 coating APTES 之玻片，其濃度皆為 10⁻⁹M，並分別使用 488nm 20mW

HOXD 10 mRNA

1 CGGGGAATGT TTTCTAGAG ATGTCAGCCT ACAAAGGACA CAATCTCTCT TCTTCAAATT
61 CTTCCCCAAA ATGTCCTTTC CCAACAGCTC TCCTGCTGCT AATACTTTTT TAGTAGATTC
121 CTTGATCAGT GCCTGCAGGA GTGACAGTTT TTATTCCAGC AGCGCCAGCA TGTACATGCC
181 ACCACCTAGC GCAGACATGG GGACCTATGG AATGCAAACC TGTGGACTGC TCCCGTCTCT
241 GGCCAAAAGA GAAGTGAACC ACCAAAATAT GGGTATGAAT GTGCATCCTT ATATACCTCA
301 AGTAGACAGT TGGACAGATC CGAACAGATC TTGTGCAATA GAGCAACCTG TTACACAGCA
361 AGTCCCCACT TGCTCCTTCA CCACCAACAT TAAGGAAGAA TCCAATTGCT GCATGTATTC
421 TGATAAGCGC AACAACTCA TTTCGGCCGA GGTCCCCTCG TACCAGAGGC TGGTCCCTGA
481 GTCTTGTCCT GTTGAGAACC CTGAGGTTCCCGTCCCTGGA TATTTTAGAC TGAGTCAGAC
541 CTACGCCACC GGGAAAACCC AAGAGTACAA TAATAGCCCC GAAGGCAGCT CCACTATCAT
601 GCTCCAGCTC AACCTCGTG GCGCGGCCAA GCCGCAGCTC TCCGCTGCC AGCTGCAGAT
661 GGAAAAGAA ATGAACGAGC CCGTGAGCGG CCAGGAGCCC ACCAAAGTCT CCCAGGTGGA
721 GAGCCCCGAG GCCAAAGGCG GCCTTCCCGA AGAGAGGAGC TGCCTGGCTG AGGTCTCCGT
781 GTCCAGTCCC GAAGTGCAGG AGAAGGAAAG CAAAGAGGAA ATCAAGTCTG ATACACCAAC
841 CAGCAATTGG TCACTGCAA AGATGGCAG AAAGAAGAGG TGCCCTTACA CTAAGCACCA
901 AACGCTGGAA TTAGAAAAAG AGTTCTTGTT CAATATGTAC CTCACCCGCG AGCGCCGCT
961 AGAGATCAGT **AAGAGCGTTA ACCTCACCGA** CAGGCAGGTC AAGATTTGGT TTCAAACCG
1021 CCGAATGAAA CTCAAGAAGA TGAGCCGAGA GAACCGGATC CGAGAACTGA CCGCAACCT
1081 CACGTTTTTCT TAGGTCTGAG GCCGGTCTGA GGCCGGTCAG AGGCCAGGAT TGGAGAGGGG
1141 GCACCGCGTT CCAGGGCCCA GTGCTGGAGG ACTGGGAAAG CGGAAACAAA ACCTTCACCG
1201 CTCTTTGTTT GTTGTTTTGT TGTATTTTGT TTTCTGCTA GAATGTGACT TTGGGGTCAT
1261 TATGTTCTGT CTGCAAGTGA TCTGTAATCC CTATGAGTAT ATATATATAT ATATATATAT
1321 ATATATAAAA ACTTAGCACG TGTAATTTAT TATTTTTTCA TCGTAATGCA GGGTAACTAT
1381 TATTGCGCAT TTTCATTTGG GTCTTAACTT ATTGGAAGT TAGAGCATCC ATCCATCCAT
1441 CCATCCAGCA ATGTGACTTT TTCATGTCTT TCCTAACACA AAAGGTCTAT GTGTGTGGTT
1501 AGTCCATGAA CTCATGGCAT TTTGAATACA TCCAGTACTT TAAAAATGAC ATATATATTT
1561 AAAAAAAAAA GATTAAGAAA ACCACAAGT TGGAGGGAGG GGGACTTAAA AAGCACATTA
1621 CAATGTATCT TTCACAAAT GAATTTAGCA GTTGTCTTGT GTGAGATGGG ATATTGGCGA
1681 TTTATGCCTT GTAGCCTTTC CCTTGTGGTGCATCTGTGGT TTGGTAGAAG TACAACAGCA
1741 ACCTGTCCTT TCTGTGCATG TTCTGGTCGC ATGTATAATG CAATAAACTC TGGAAATGAG
1801 TTCAAAAAAAAA AAAA

圖 2-12 HOXD10 mRNA 之序列。紅色部分為與所設計之 HOXD10 beacon 雜合位點。

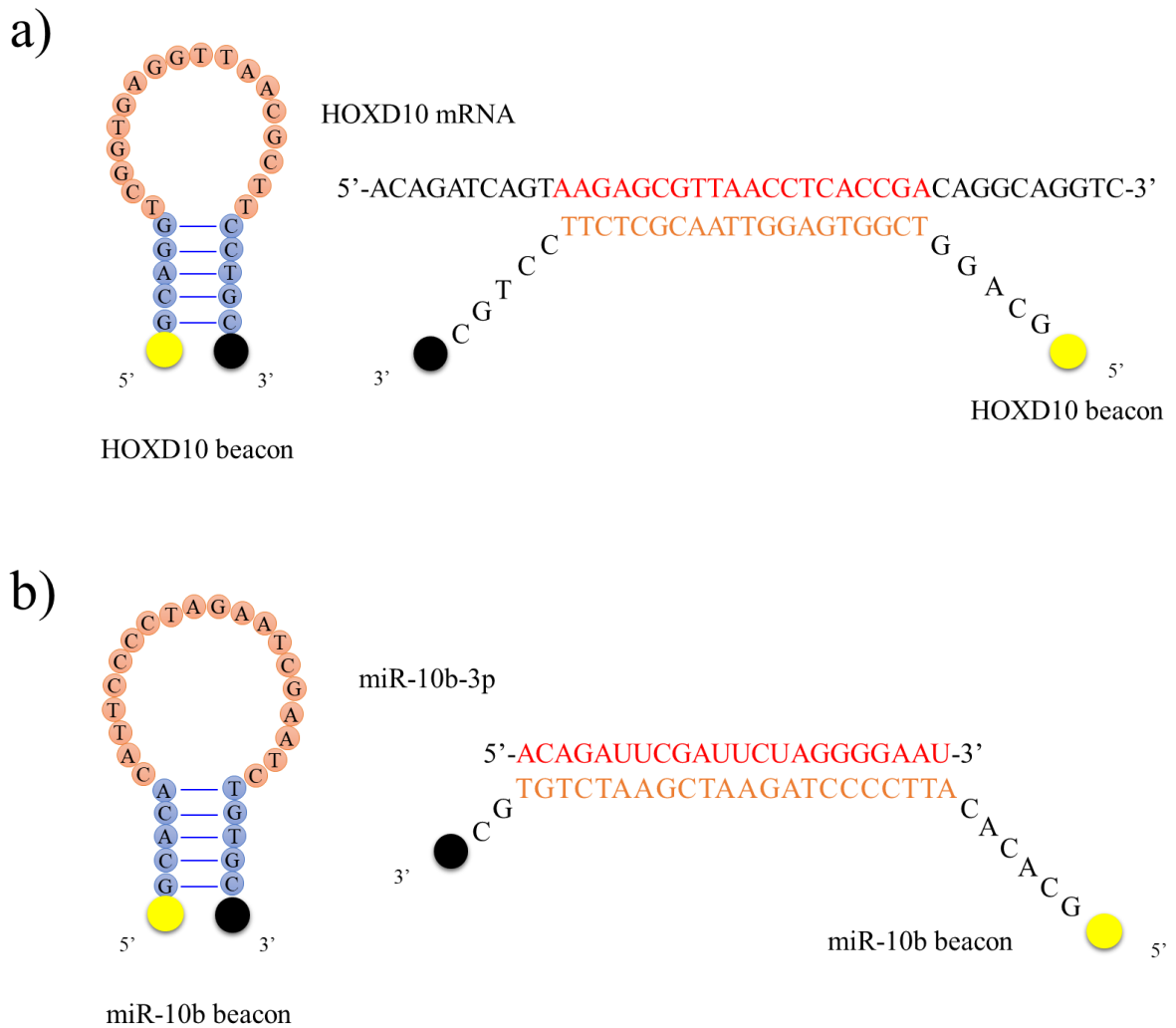


圖 2-14 molecular beacon 雜合序列示意圖。(a) HOXD10 beacon 與目標 HOXD10 mRNA 之雜合序列，(b) miR-10b beacon 與目標 miR-10b-3p 之雜合序列。

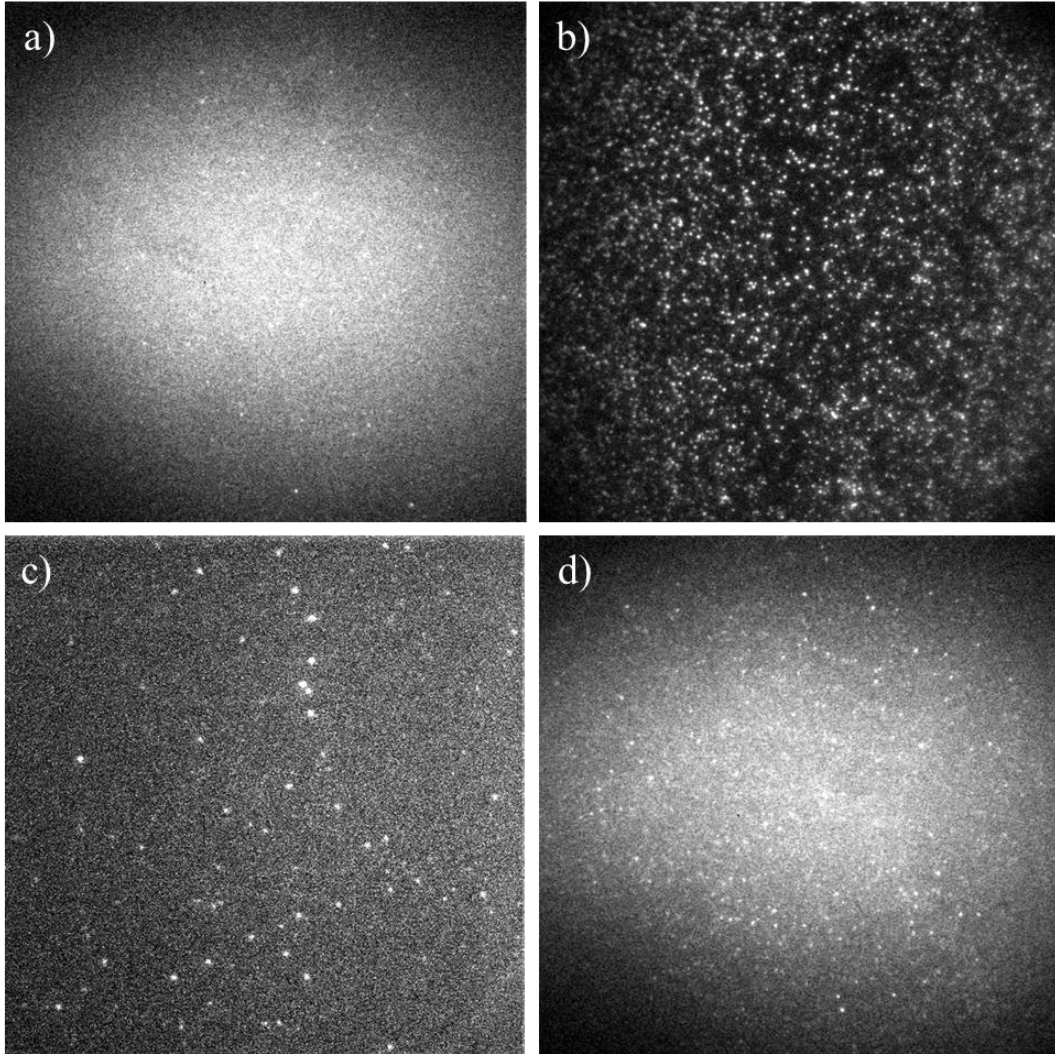


圖 2-15 以螢光顯微鏡系統確認 molecular beacon 的放光。(a) 647nm 激發 miR-10b beacon, (b) 647nm 激發 miR-10b DNA + miR-10b beacon in 1xPCR buffer, (c) 488nm 激發 HOXD10 beacon, (d) 488nm 激發 HOXD10 DNA + HOXD10 beacon in 1xPCR buffer。

(末端瓦數為 10.1mW) 及 647nm 20mW (末端瓦數為 9.9mW) 雷射在螢光顯微鏡系統下觀測。如圖 2-15 所示，miR-10b beacon 經雜合反應後其螢光亮度由 637 提升至 751，HOXD10 beacon 經雜合反應後其螢光亮度則由 838 提升至 1470，即可確認所設計之 molecular beacon 可與目標序列完全結合而放出螢光。

2.3.5 比較不同方法降低細胞背景值

較高的細胞自體螢光會影響到後續觀測之螢光訊號，為降低細胞背景值，測試下列四種方法：未處理之細胞、經 LED 照射之細胞、LED 照射加硫酸銅溶液處理之細胞及加熱後 LED 照射加硫酸銅溶液處理之細胞，經不同處理後使用 488nm 5.5mW(末端瓦數為 2.8mW) 觀測其細胞質平均螢光強度之差異性。

脂褐素 (lipofuscin) 為脂色素的一種，是含有脂肪的殘存物與溶酶體消化物組成的顆粒狀黃色色素，會隨著年紀或細胞操勞而上升，主要分布在細胞核周圍，可見於肝臟、腎臟、心肌、神經細胞等，且已有研究指出硫酸銅溶液(10Mm CuSO₄ in 50mM CH₃COONH₄, pH5.0) 可以減少或消除脂褐素的自發螢光⁴⁶。

實驗結果顯示，未處理之 Huh7 肝癌細胞其平均細胞質亮度為 900.51 ± 46.53 ；經 LED 照射 20 小時後的平均細胞質亮度為 815.31 ± 13.85 ；LED 照射 20 小時後再使用硫酸銅溶液處理 1 小時的平均細胞

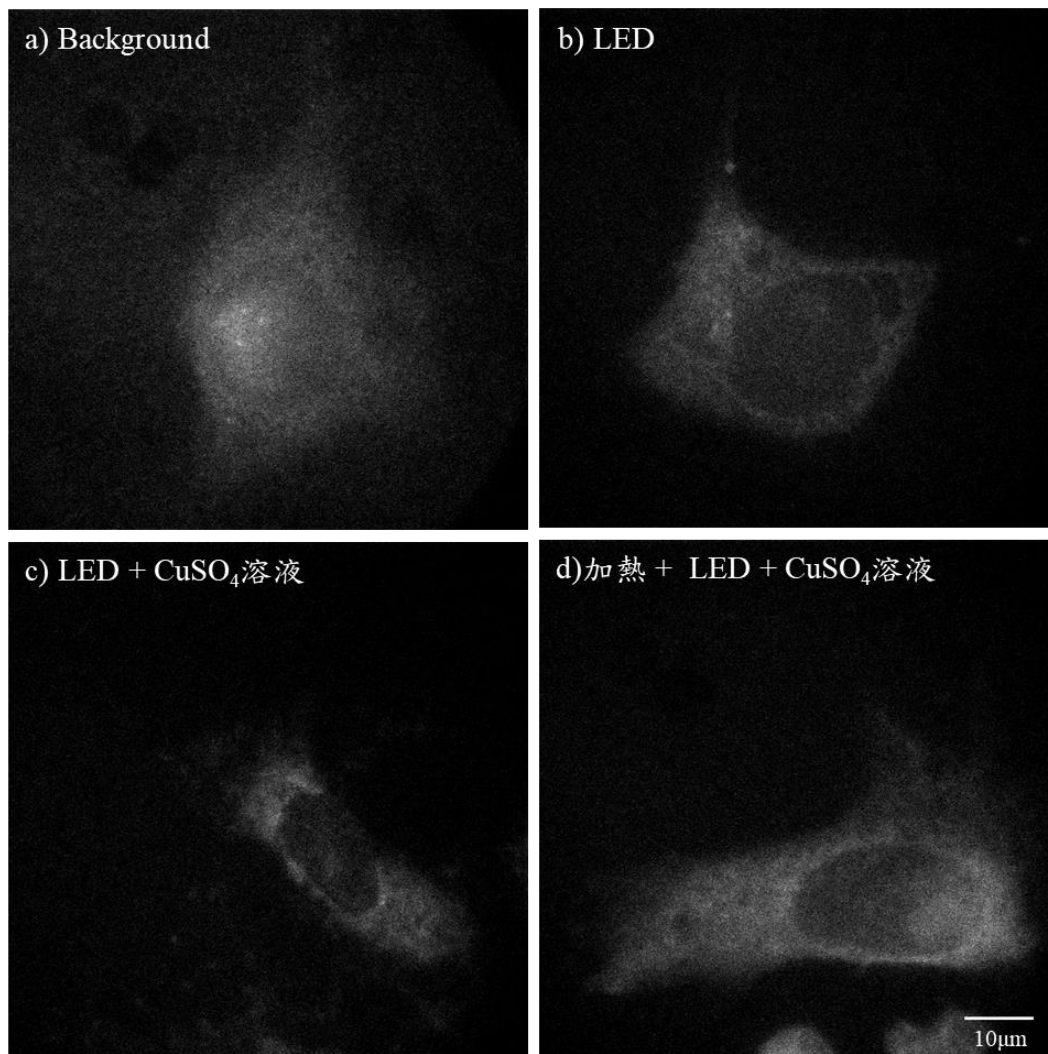


圖 2-16 比較不同方法處理之細胞背景值。以 488nm 5.5mW 進行觀測 (a) 未處理之 Huh7 肝癌細胞，(b) LED 照射 20 小時，(c) LED 照射 20 小時後硫酸銅溶液處理 1 小時，(d) 56°C 下加熱 18 小時經 LED 照射 20 小時後硫酸銅溶液處理 1 小時。

亮度為 778.47 ± 24.56 ； 56°C 下加熱 18 小時經 LED 照射 20 小時後硫酸銅溶液處理 1 小時之細胞樣品平均細胞亮度為 850.09 ± 47.33 。上述三種方法處理之 Huh7 肝癌細胞比起未處理的細胞質平均亮度皆有下降，考慮到實驗所需時間及降低背景值之幅度，選用 LED 照射 20 小時的方法進行接下來的步驟。

2.3.6 has-miR-10b-3p 及 HOXD10 的分子探測

將固定過的 Huh7 肝癌細胞經過一連串的处理，並使用 LED 照射 20 小時降低細胞自體螢光，而本實驗所設計之 molecular beacon 具有專一性，只會與目標序列進行雜合反應。將兩種分別標記 hsa-miR-10b-3p 及 HOXD10 之 molecular beacon 同時做螢光雜合反應，並使用 DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) 對細胞核進行染色。以 405nm 雷射找到細胞位置，再藉由 647nm 與 488nm 激發兩種不同的 molecular beacon，透過 HILO 螢光顯微鏡系統得到之影像圖進行比較，藉此同時檢測 miR-10b-3p miRNA 與 miR-10b 的標靶基因 HOXD10 之表達。

個別針對 30 顆細胞影像進行量化，如圖 2-17，Huh7 肝癌細胞在未加入 molecular beacon 並使用 647nm 4.75mW (末端瓦數為 2mW) 及 488nm 2mW (末端瓦數為 1.1mW) 所得到之細胞質自體螢光平均訊號為 754.41 ± 26.59 和 868.19 ± 97 ；同時雜合 has-miR-10b-3p 及

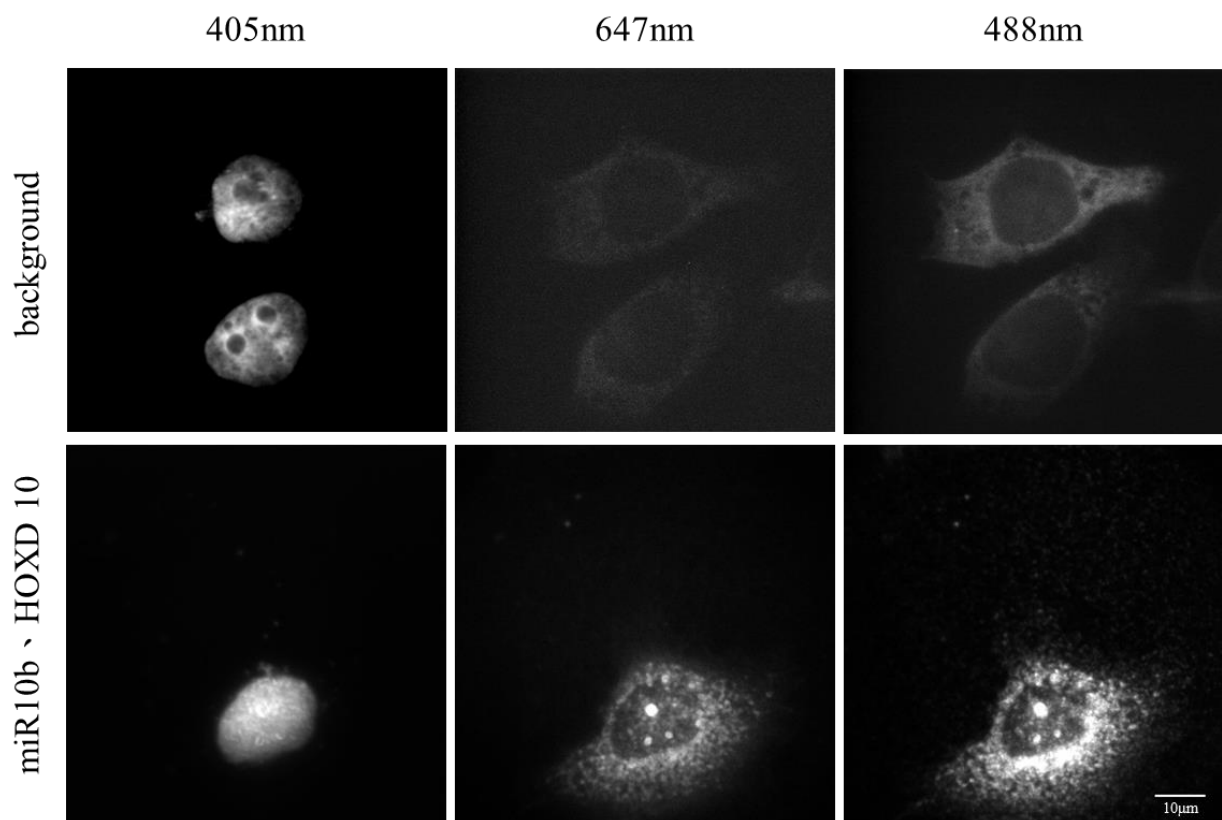


圖 2-17 於 HILO 螢光顯微系統對 miR-10b 及 HOXD10 進行分子探測。以 405nm 雷射激發 DAPI，以 647nm 雷射激發 miR-10b beacon，以 488nm 雷射激發 HOXD10 beacon。

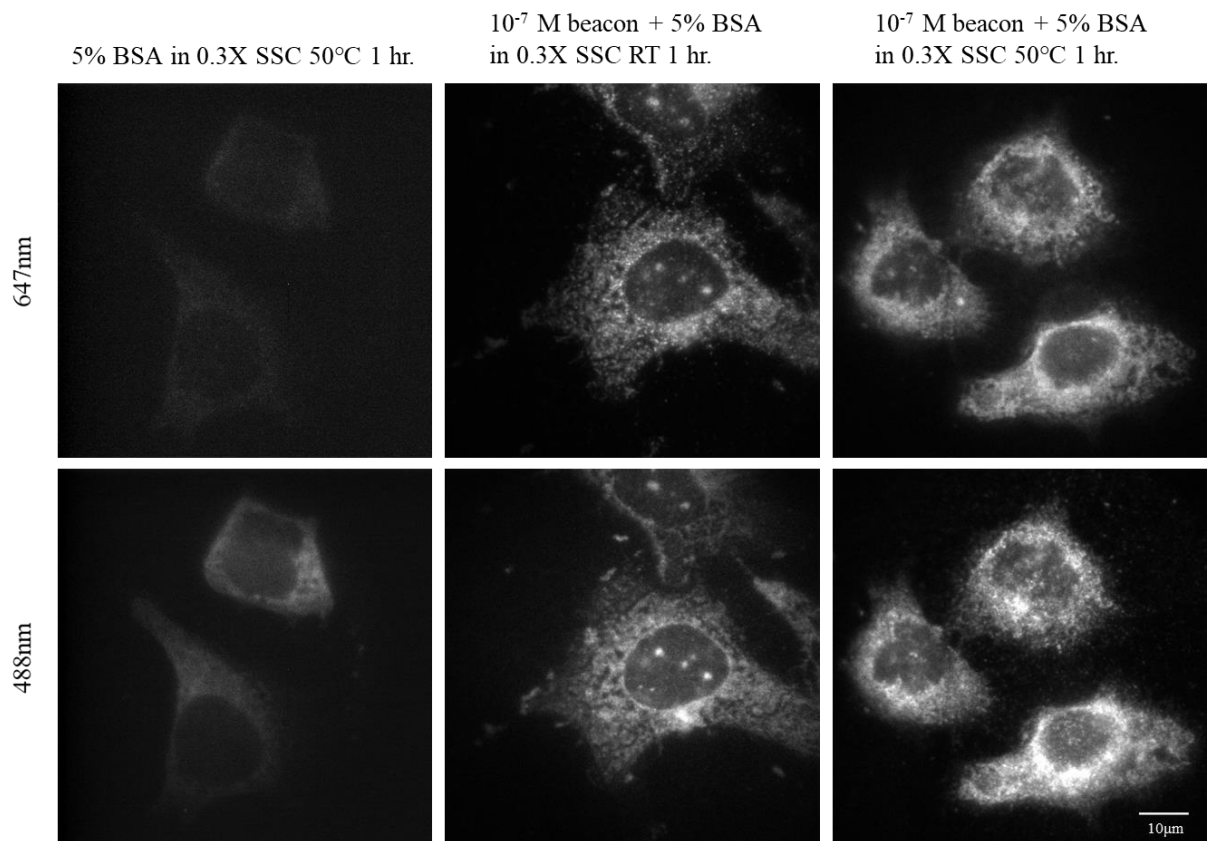


圖 2-18 比較細胞背景值、未在 T_m 下雜合之細胞及經雜合反應之細胞的細胞質螢光強度差異。以 647nm 4.75mW、488nm 2mW 進行觀測。

HOXD10 beacon 的 Huh7 肝癌細胞其細胞質平均訊號為 1471 ± 463 及 2786 ± 714 。實驗與計算結果顯示，此方法可以透過設計不同 molecular beacon 與不同激發波長之光源，同時觀測感興趣之序列。

為了確定雜合反應後未鍵結的 molecular beacon 的清洗程度，不會影響分子探測之可信度，多設計一組實驗，將 molecular beacon 在室溫下與細胞反應一小時，並在室溫下使用含有 Formamide 及 SSC 的溶液清洗，最後再利用 647nm 雷射及 488nm 觀測其螢光訊號，比較其與細胞背景及雜合 molecular beacon 之細胞質平均螢光亮度之差異。如圖 2-18，細胞背景值平均螢光亮度為分別為 751.82 ± 62.34 、 873 ± 76.62 ；同時雜合 miR-10b beacon 及 HOXD10 beacon 螢光訊號為 1520 ± 324 、 2623 ± 578 ；而 molecular beacon 在室溫下反應及清洗之細胞質平均螢光亮度為 1105.94 ± 332 、 1298.51 ± 192 ，介於細胞背景值與雜合完全的細胞之間，這表示使用含有 Formamide 及 SSC 的溶液清洗只能清洗掉大部分未鍵結的 molecular beacon，但仍可以區分三者之差異。

2.3.7 利用超解析技術觀測細胞中的 microRNA

本實驗使用 HILO 螢光顯微鏡觀測細胞樣品中的螢光單分子訊號並利用 molecular beacon 與細胞中的目標序列進行螢光雜合，不但可以同時標記兩段不同的 molecular beacon，證明此方法的專一性，也

能利用多光源同時偵測不同的目標序列，相對定量出 has-miR-10b-3p 於細胞中的表現量以及 has-miR-10b-3p 影響標的的 HOXD10 mRNA 之變化量。接著利用超解析技術更進一步觀測細胞中的 miRNA，在樣品上加入 switching buffer 反應，並使用 647nm 100mW（末端瓦數為 36.9mW）獲取 10000 張螢光影像圖，利用 Image J 計算螢光亮點定位，得到超解析影像圖。

超解析技術是利用強雷射光激發將大多數螢光分子到達 off state，使單個螢光分子可以隨機的返回到 on state。超解析圖像比起一般螢光影像更能精確定位螢光分子，得到更多細胞內部訊息。圖 2-19 所呈現的超解析影像是使用 Image J → Plugins → ThunderSTORM → Run analysis 計算得到的，其中 Peak intensity threshold 的設定值為 $\text{std}(\text{Wave.F1}) * 1$ 。當設定值為 $\text{std}(\text{Wave.F1}) * 1$ 時，細胞背景值與雜合 miR-10b beacon 的超解析圖像皆可清楚的辨識出細胞的樣子，並無法區分兩者差異。

可以藉由改變不同 filter 的設定值控制 Image J 對隨機閃爍螢光分子的取點定位，如圖 2-20 所示，隨著 Peak intensity threshold 設定值增加，過濾的螢光點也隨之增加。當設定值為 $\text{std}(\text{Wave.F1}) * 2$ 以上時，細胞背景值之超解析影像圖已經沒辦法識別出細胞的樣子，而雜合

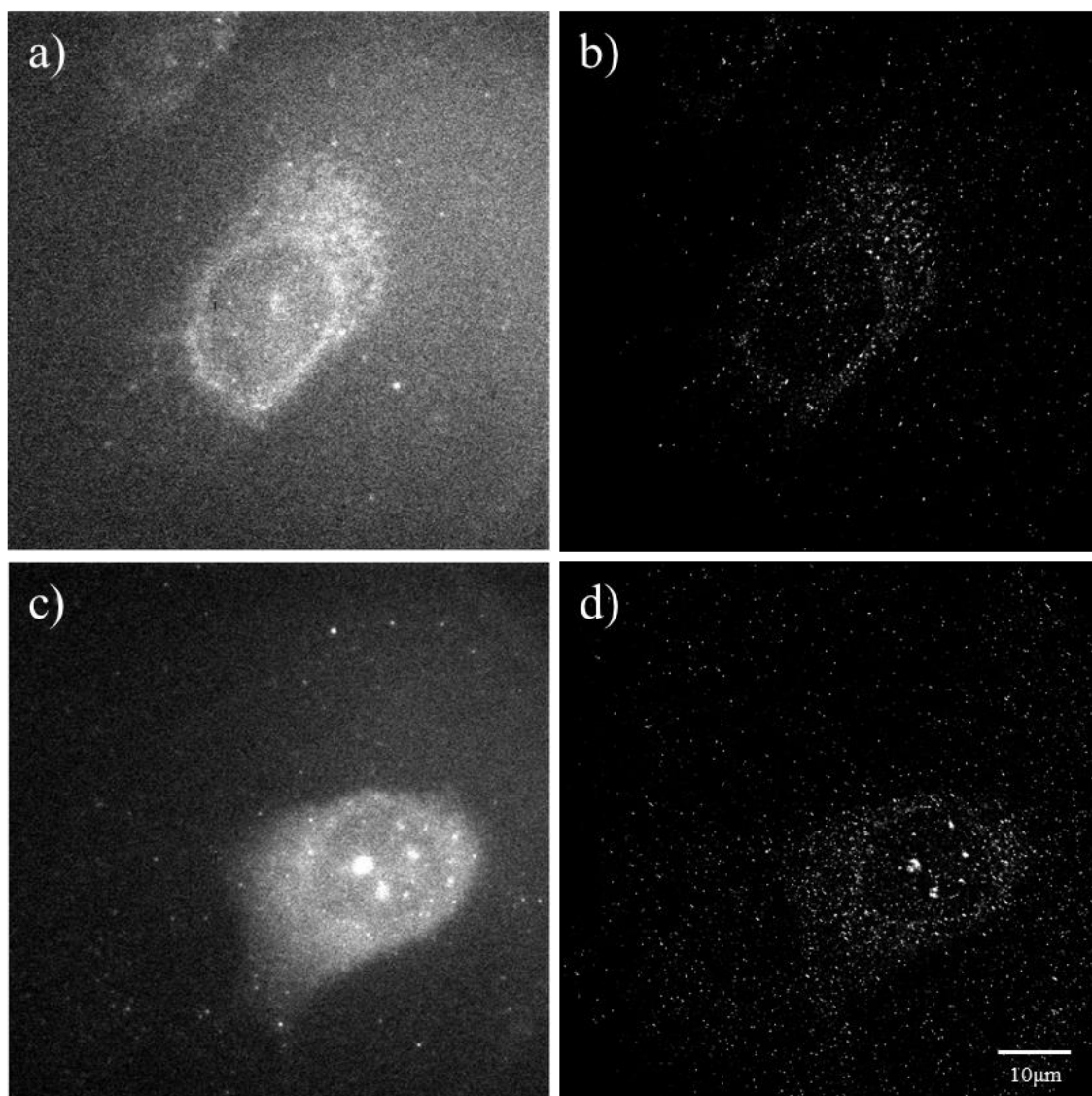


圖 2-19 加入 switching buffer 後使用 647nm 100mW 觀測 Huh7 細胞。

(a) 使用 647nm 照射之細胞背景，(b) Huh7 肝癌細胞背景之超解析影像圖，(c) 雜合 miR-10b beacon 之 Huh7 肝癌細胞，(d) 雜合 miR-10b beacon Huh7 肝癌細胞的超解析影像圖。

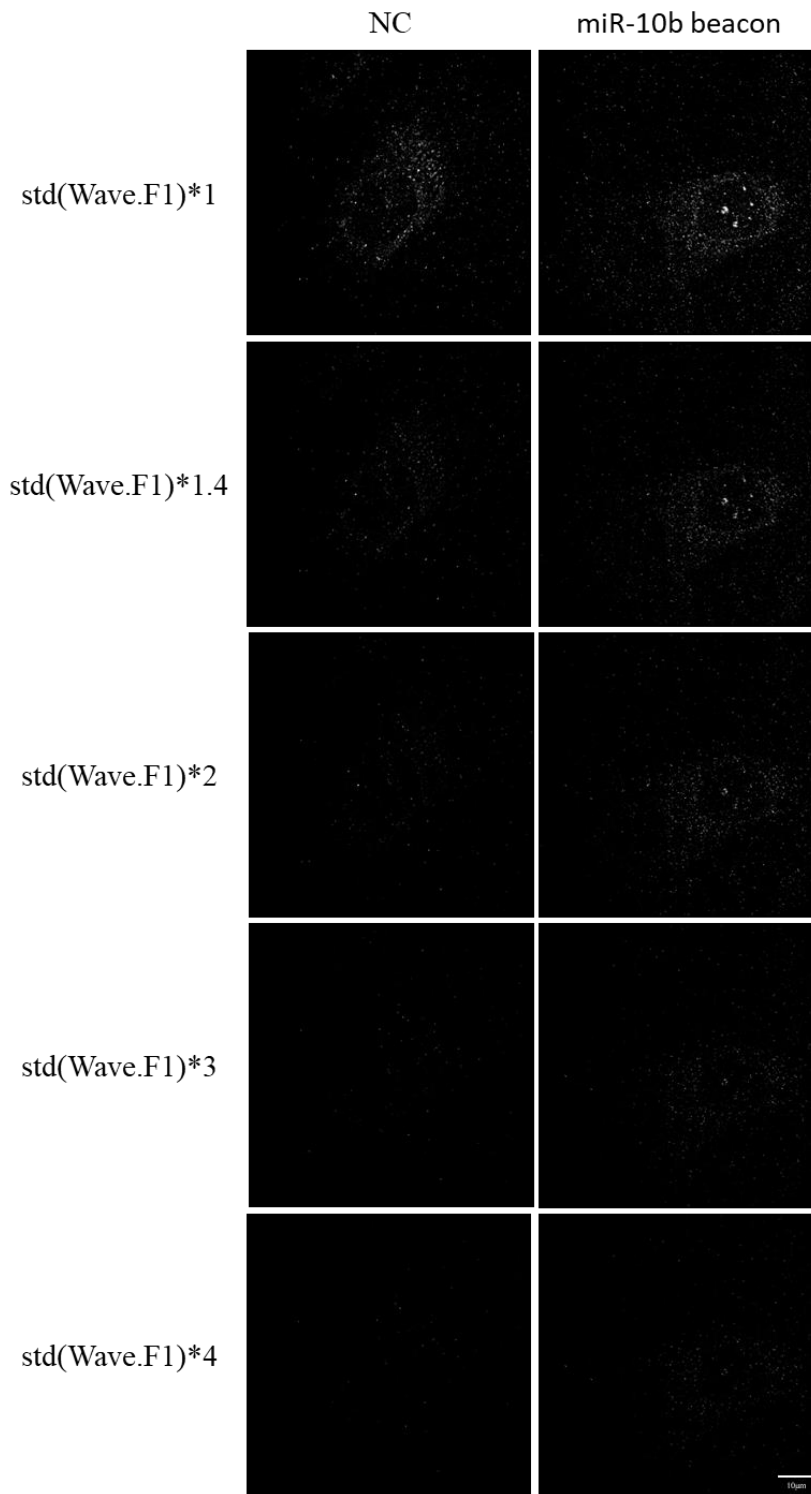


圖 2-20 比較不同設定參數對於細胞背景值與雜合 miR-10b beacon 樣品的超解析影像之差異。

miR-10b beacon 的 Huh7 肝癌細胞超解析圖像依然可以辨識出細胞，因此可以直接由超解析圖像區分兩者之差異。

2.3.8 測試 K_2PtCl_4 白金離子對細胞背景值之影響

先前實驗已經可以利用個別量化細胞質螢光訊號或是超解析影像區分細胞背景值及雜合 molecular beacon 之細胞，但兩者皆需要將螢光影像進行處理，無法直觀的辨識出差異性。此部分實驗延續 LED 照射 20 小時降低細胞自體螢光，接續嘗試浸泡四氯鉑酸鉀 (K_2PtCl_4 白金離子) overnight，再使用 1M 二甲基胺硼烷 (Dimethylamine-Borane, DMAB) 將其還原成白金奈米粒子，DMAB 終點濃度控制在 10mM。預期 K_2PtCl_4 白金離子可以更進一步降低細胞背景值，並可以直接用螢光影像清楚識別細胞背景及雜合之細胞差異。

首先，測試 K_2PtCl_4 白金離子反應之時間點：一為在 20 μ g/mL Proteinase K 溶液在 37°C 反應 5 分鐘前，以 K_2PtCl_4 白金離子 10⁻⁵M 浸泡細胞樣品 12 小時，再加入 1M DMAB 還原劑吸吐均勻放置 10 分鐘後將液體倒乾；另一為在雜合實驗 wash 完畢後做 K_2PtCl_4 白金離子處理。以 647nm 20mW (末端瓦數為 9.9mW) 照射得到的螢光亮度分別為 1105.58 和 1062.71，以 488nm 20mW (末端瓦數為 10.1mW) 照射得到的螢光亮度為 3478.22 和 2688.45，實驗結果表明後者的對

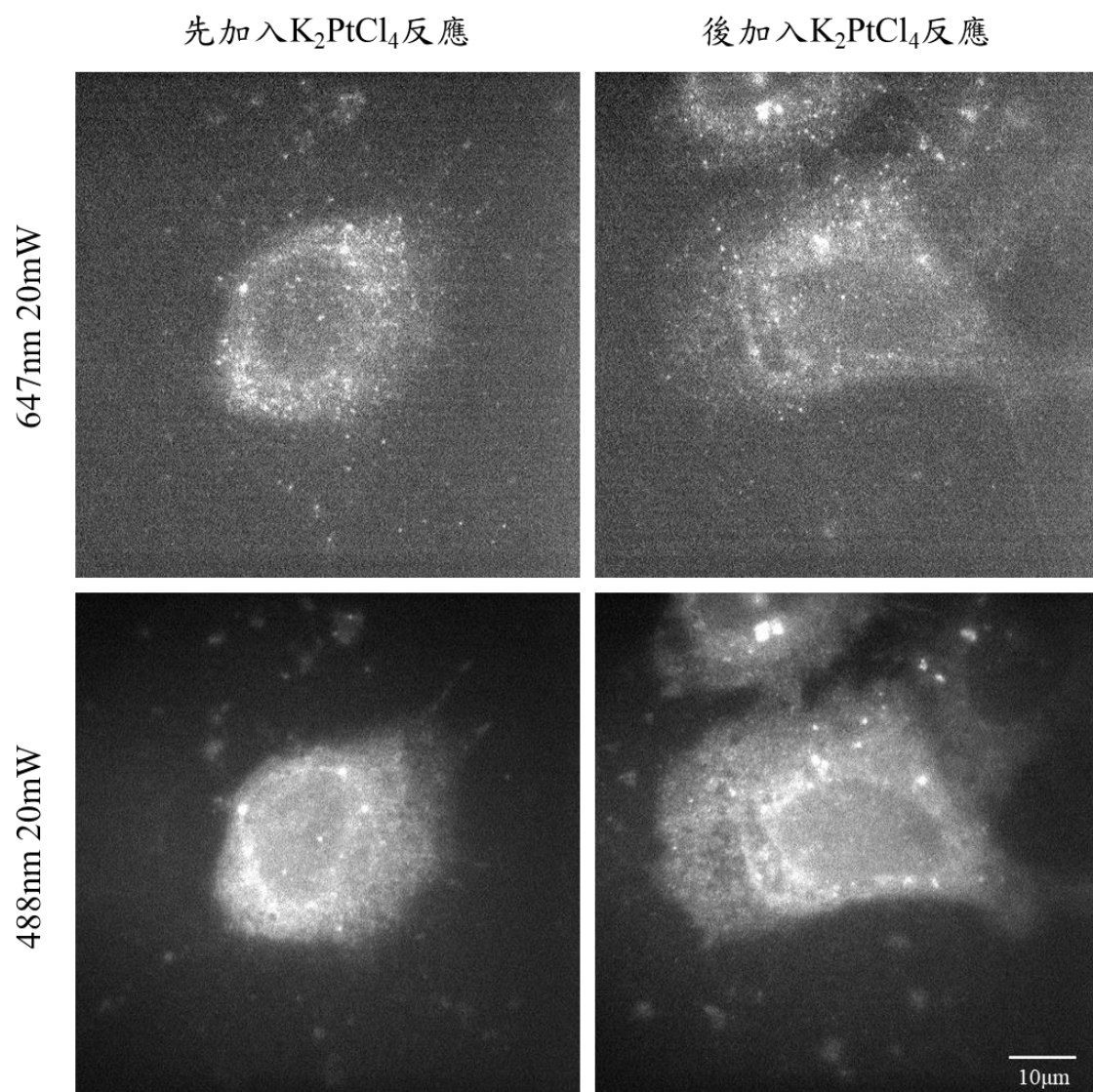


圖 2-21 比較不同時間點加入 K_2PtCl_4 對細胞背景值之影響。

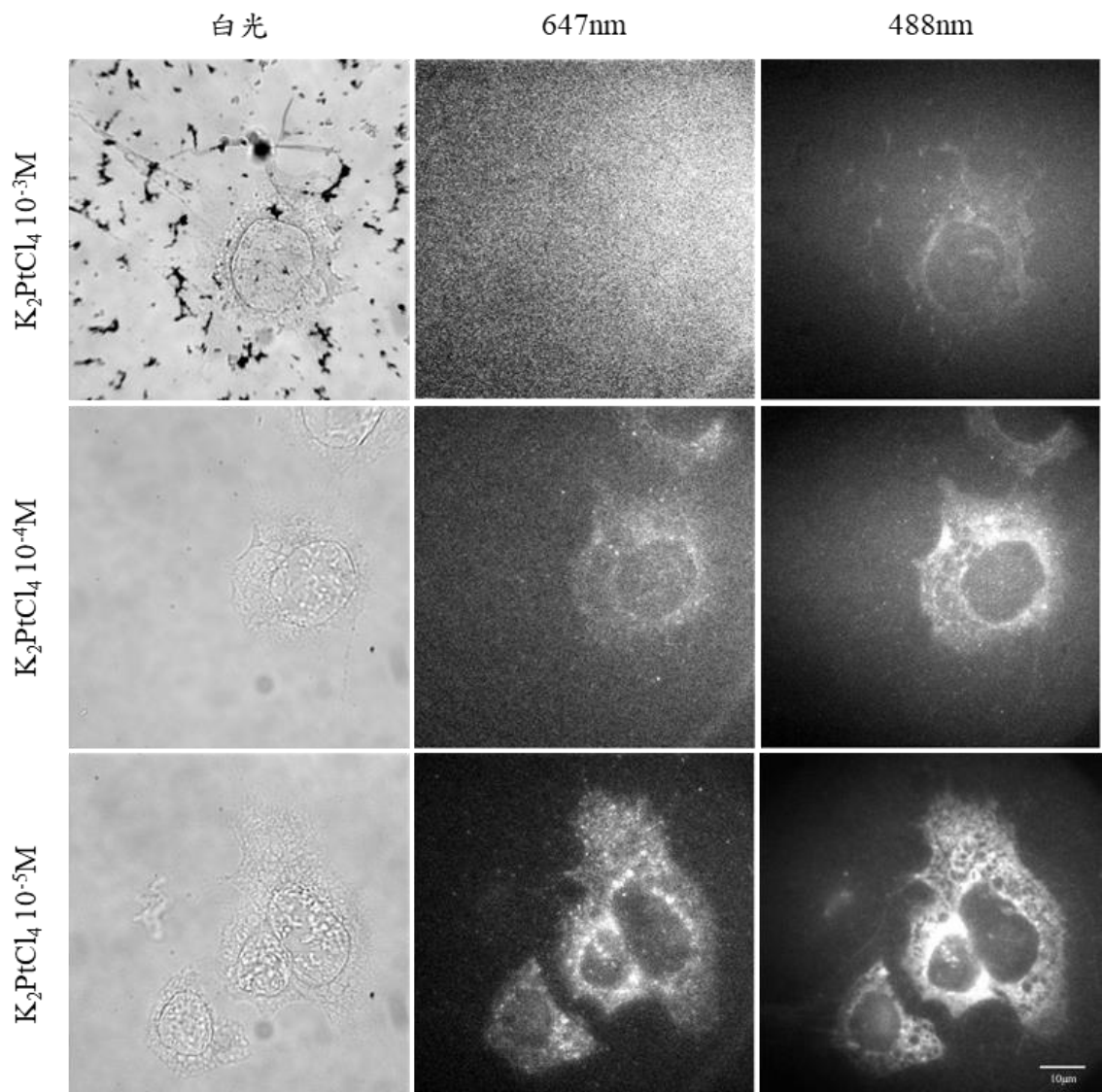


圖 2-22 比較不同 K_2PtCl_4 濃度對細胞背景值之影響。白光確定細胞位置，並使用 647nm 雷射及 488nm 雷射激發，比較三者的細胞背景值差異。

於降低細胞背景值有較好的效果，推論可能是因為 Proteinase K 與細胞膜上的蛋白質作用，使 K_2PtCl_4 白金離子較好進入細胞內反應。

接著改變 K_2PtCl_4 白金離子的濃度對細胞背景值的影響。比較浸泡 K_2PtCl_4 $10^{-5}M$ overnight 之白金離子及經浸泡 K_2PtCl_4 $10^{-4}M$ overnight 之白金離子經 1M DMAB 還原後，可發現濃度較高之 K_2PtCl_4 其細胞自體螢光較濃度低之 K_2PtCl_4 明顯下降。再提高 K_2PtCl_4 之濃度，發現浸泡 K_2PtCl_4 $10^{-3}M$ overnight 之白金離子經 1M DMAB 還原後，還原之液體明顯呈現灰黑色。以 647nm 雷射經由 HILO 螢光顯微鏡系統並無法觀測到細胞之自體螢光，而 488nm 雷射偵測到訊號的訊號也十分微弱，所以藉由白光清楚確定細胞位置，並可發現有黑色顆粒在樣品上。實驗結果表明使用 K_2PtCl_4 浸泡 overnight 後使用 1M DMAB 還原可以有效降低細胞的自體螢光，且細胞自體螢光強度與 K_2PtCl_4 的濃度具有相關性。當 K_2PtCl_4 濃度達到 $10^{-3}M$ ，且以 647nm 雷射激發時，即無法分辨出細胞的自體螢光與暗電流之背景值。

2.3.9 K_2PtCl_4 處理細胞之超解析影像

2.3.9.1 K_2PtCl_4 $10^{-3}M$ 處理細胞之超解析影像

已知白金離子可以有效降低細胞自體螢光，結合先前實驗，肝癌細胞在一連串的反应及清洗步驟處理後，加入 K_2PtCl_4 $10^{-3}M$ overnight

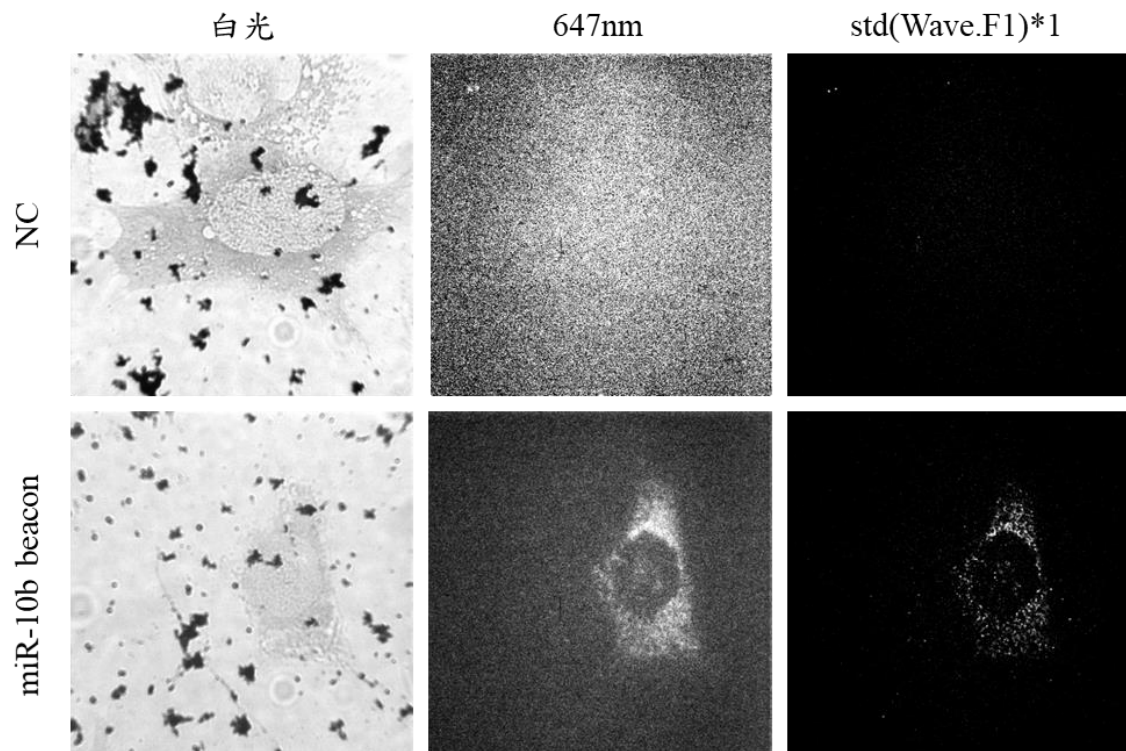


圖 2-23 利用超解析技術觀測肝癌細胞中 hsa-miR-10b-3p 之表現量。比較經 K_2PtCl_4 $10^{-3}M$ 處理後經 647nm 雷射激發之肝癌細胞自體螢光及雜合 miR-10b beacon 的螢光影像圖與經 Image J 處理之超解析圖像。std(Wave.F1)*1 為使用 Image J 軟體計算之設定值。

並使用 1M DMAB 還原，即完成樣品的製備。

在細胞樣品上加入 switching buffer 蓋上蓋玻片並使用 647nm 雷射激發，透過超解析技術得到的影像圖觀測細胞背景及加入 molecular beacon 雜合後之差異。由於經 K_2PtCl_4 $10^{-3}M$ 處理後的細胞螢光亮度會明顯下降，先使用白光確定細胞位置，在使用 647nm 雷射 20mW（末端瓦數為 9.9mW）激發螢光，每個細胞樣品皆取 10000 張影像圖，在經由 Image J 處理得到超解析圖像。如圖 2-23 所示，首先利用白光找到完整細胞並觀察到 K_2PtCl_4 離子還原後產生之黑色顆粒，接著以 647nm 雷射照射可以觀測到細胞經 K_2PtCl_4 $10^{-3}M$ 處理過後的細胞背景值幾乎無法與 CCD 暗電流背景值作區分；而經雜合處理的細胞樣品，其細胞質螢光強度雖然也受 K_2PtCl_4 $10^{-3}M$ 影響而下降，但仍可以清楚的識別出細胞。將螢光影像圖經由 Image J 計算單個螢光分子之定位，得到的超解析影像圖可以清楚比較出細胞背景及 Huh7 細胞中 has-miR-10b-3p 表現量之差異。

2.3.9.2 探討不同雷射強對超解析影像之影響

雖然經由 K_2PtCl_4 $10^{-3}M$ 處理之細胞背景值可以幾乎接近 CCD 暗電流，但螢光分子隨機閃爍的程度也明顯下降。由於超解析技術是仰賴於隨機閃爍的螢光分子進行定位，為了提升其閃爍程度，調整 K_2PtCl_4 的濃度至 $10^{-4}M$ ，並觀察不同雷射強度對其之影響。分別測試

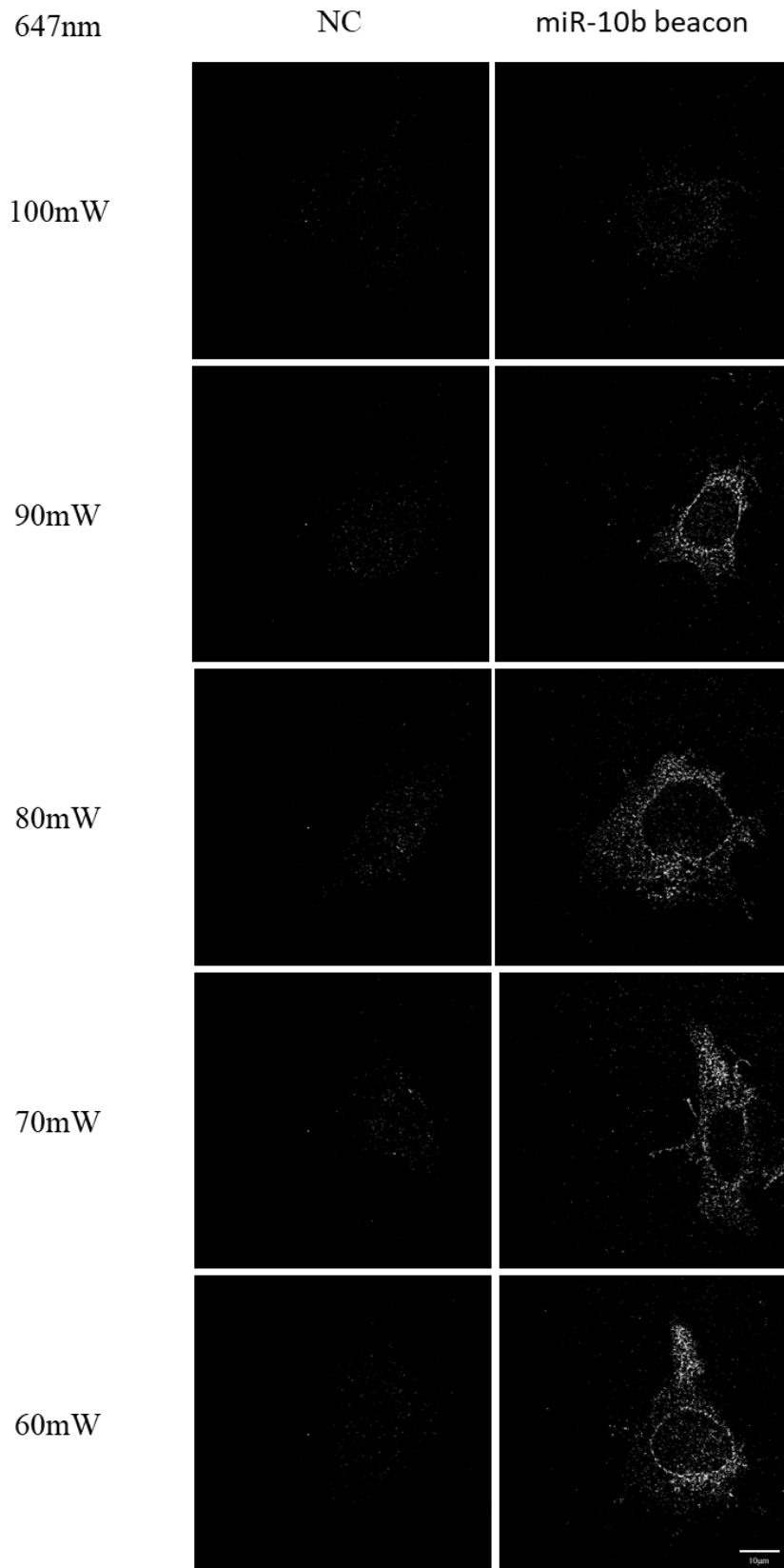


圖 2-24 以 647nm 雷射 60 至 100mW 取得之超解析影像。

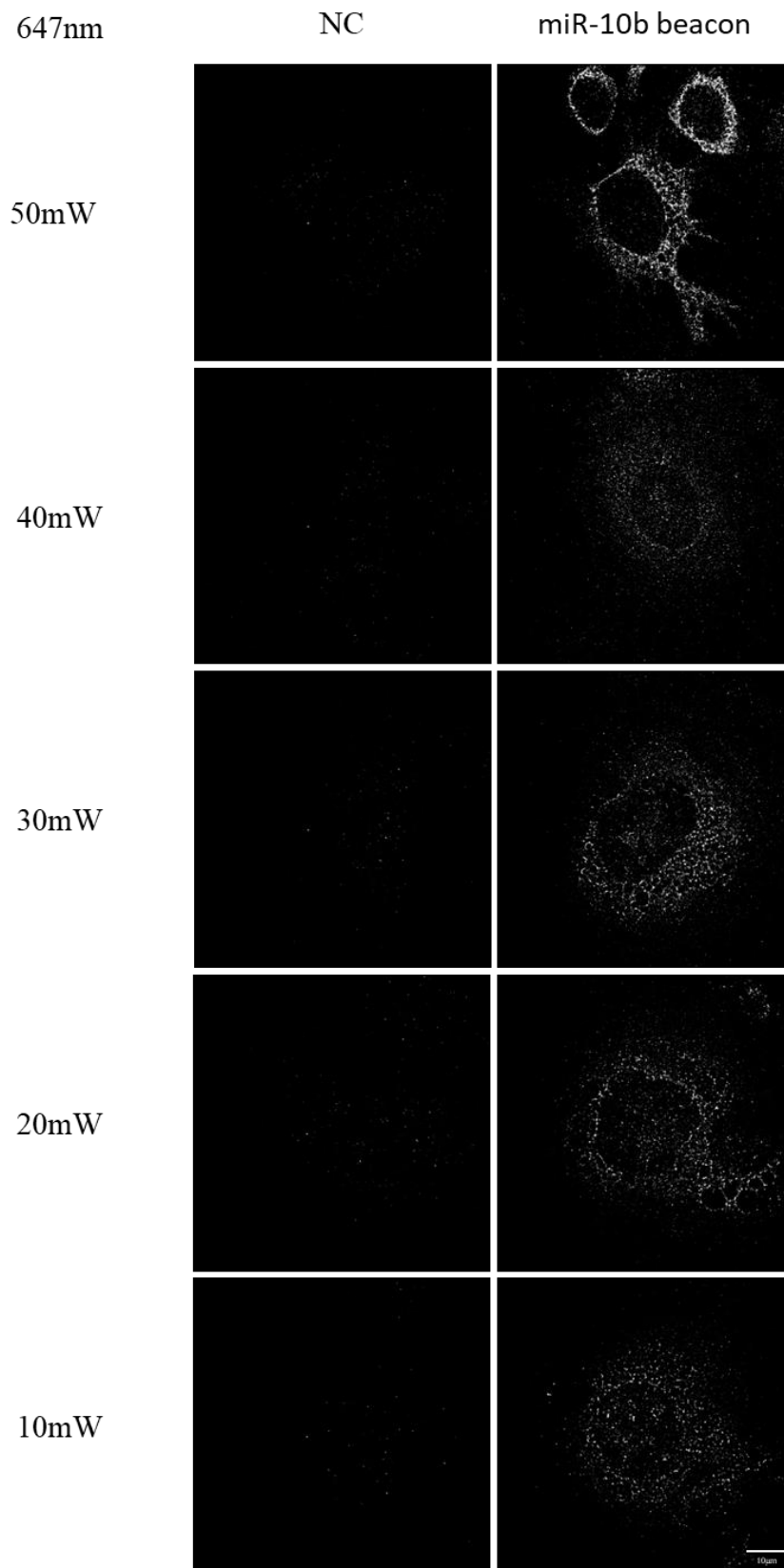


圖 2-25 以 647nm 雷射 10 至 50mW 取得之超解析影像。

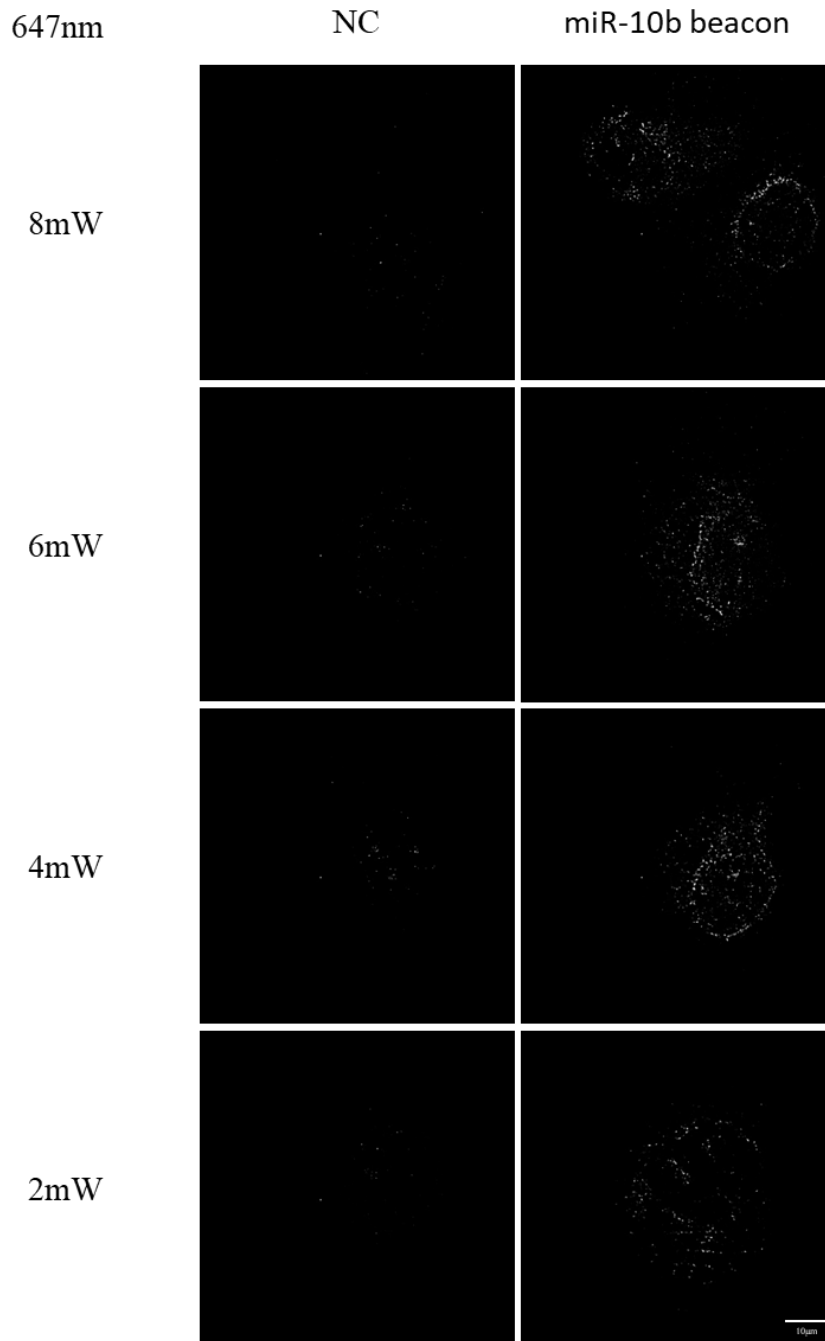


圖 2-26 以 647nm 雷射 2 至 8mW 取得之超解析影像。

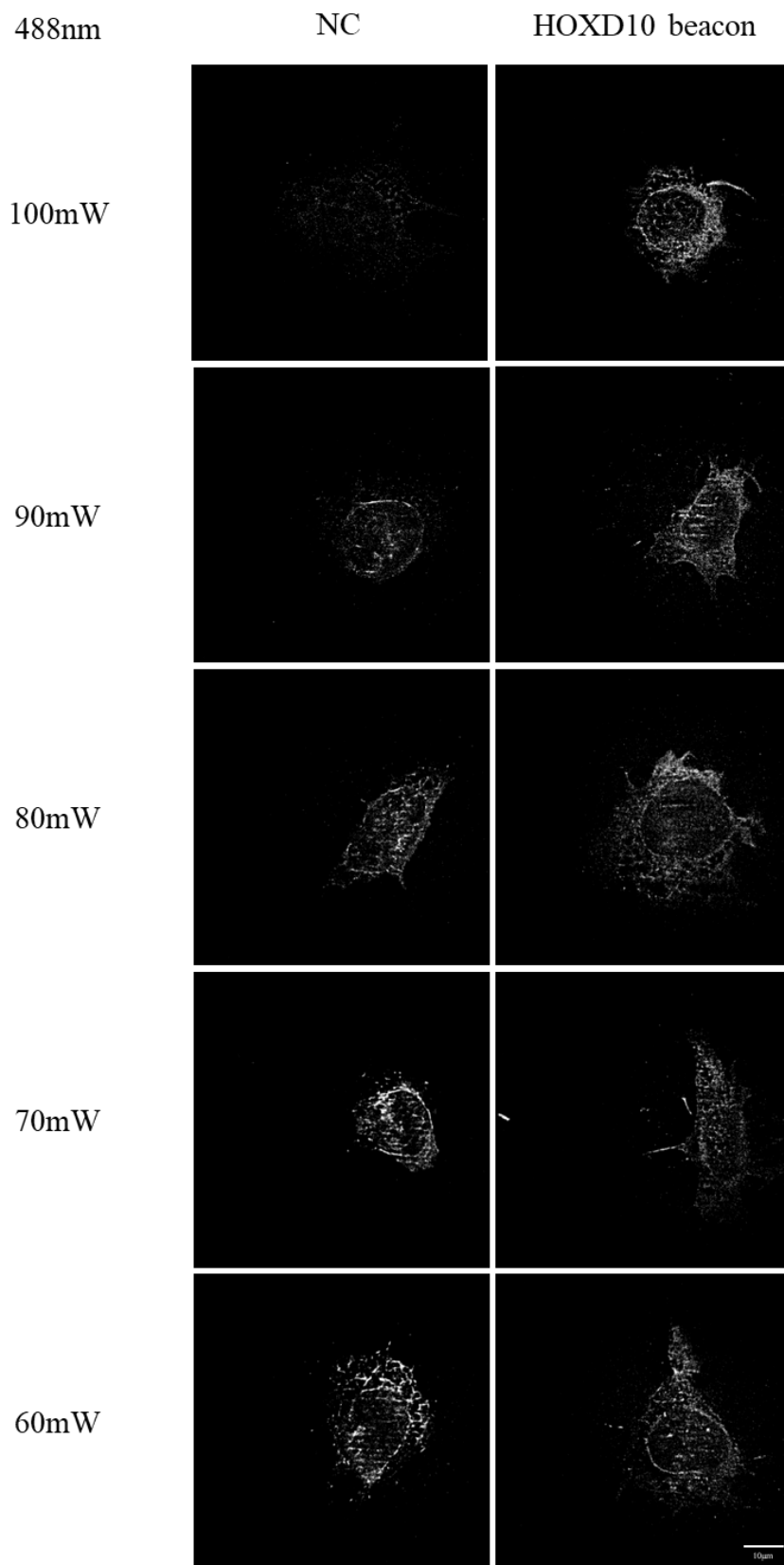


圖 2-27 以 488nm 雷射 60 至 100mW 取得之超解析影像。

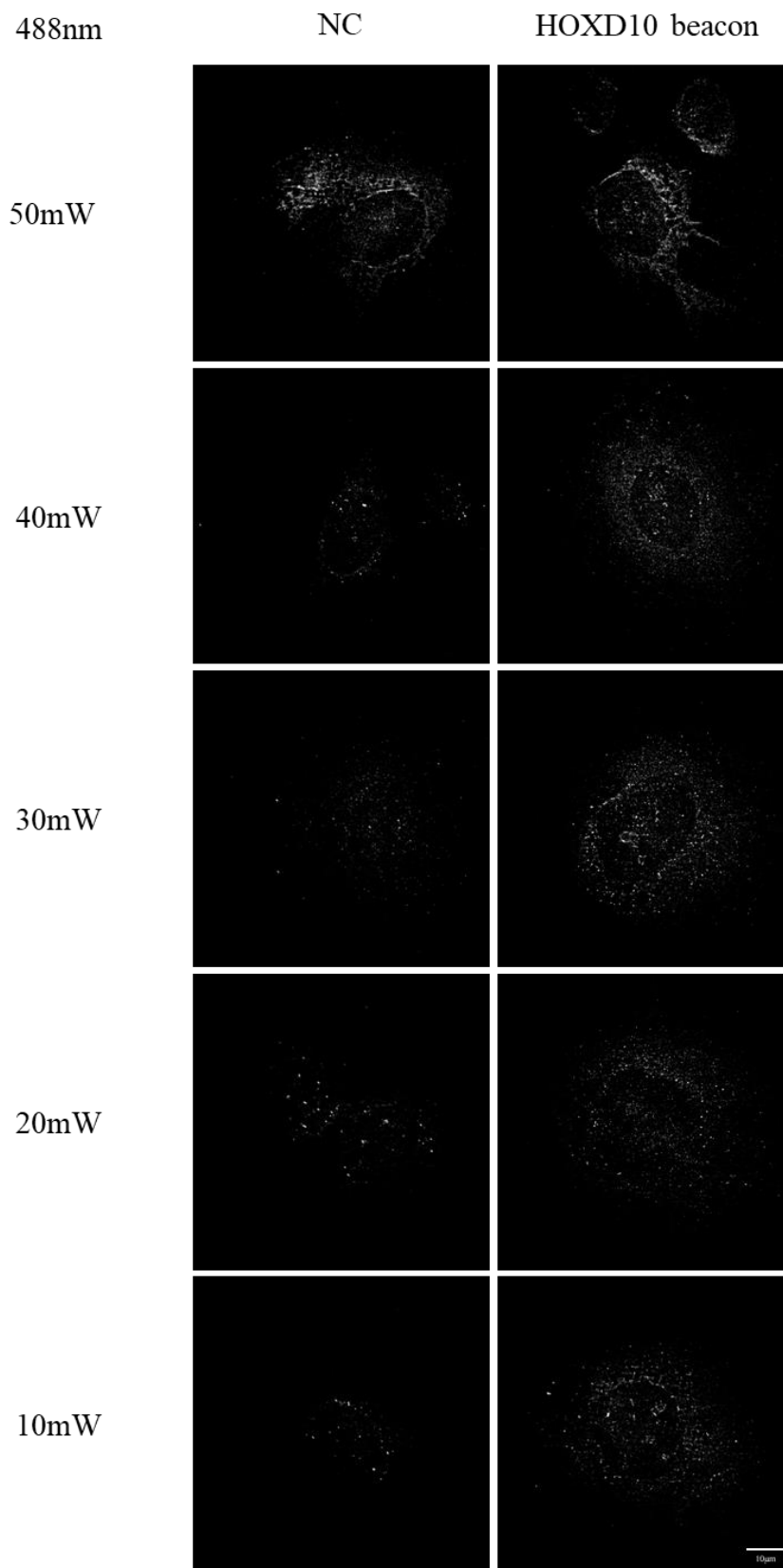


圖 2-28 以 488nm 雷射 10 至 50mW 取得之超解析影像。

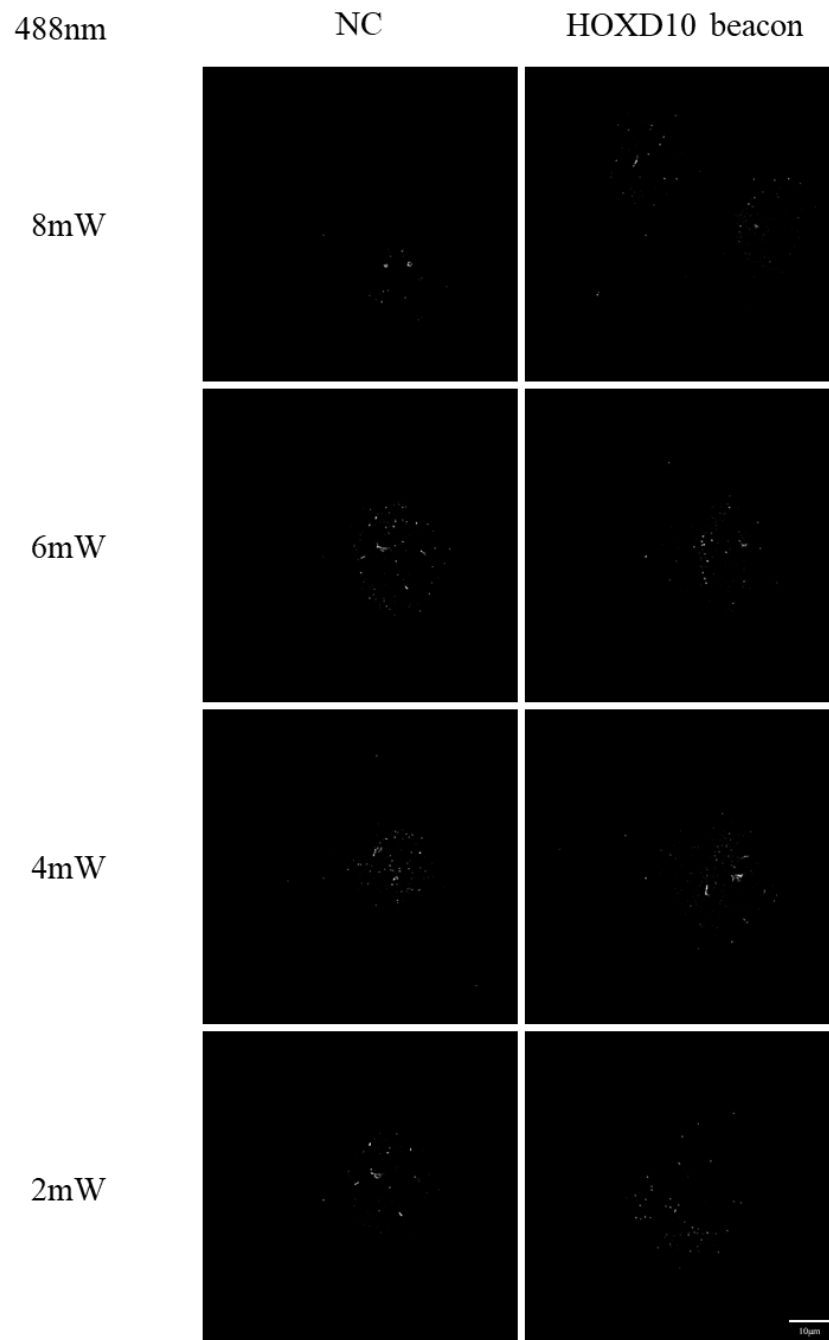


圖 2-29 以 488nm 雷射 2 至 8mW 取得之超解析影像。

647nm 及 488nm 雷射強度從 100mW 到 2mW，每一個雷射強度條件皆拍攝 10000 張螢光影像圖彙整成一張超解析圖像，此部分 Peak intensity threshold 的設定值為 $\text{std}(\text{Wave.F1}) * 2$ 。以 647nm 100mW 照射雜合 miR-10b beacon 的超解析圖像明顯比較低瓦數，例如 647nm 90mW、647nm 80mW 得到的圖像相對不清晰，這是因為 647nm 100mW 雖然閃爍程度十分隨機，但大部分螢光分子達到 off state，需要更多影像圖片才能組成更加完整的超解析圖像。當 647nm 雷射強度為 60mW 至 10mW 時，皆可以由超解析圖像區分兩者差異；而 488nm 所激發的細胞背景值較強，雷射強度在 40mW 至 10mW 時，勉強可以分辨出兩者差異。考慮到螢光分子隨機閃爍程度與細胞背景值和雜合 molecular beacon 細胞之超解析圖像對比，647nm 雷射強度選用 50mW（末端瓦數為 24.3mW）、488nm 雷射強度選用 30mW（末端瓦數為 14.7mW）視為最佳條件。

2.3.10 探討 miRNA 及目標 mRNA 在細胞內的共定位

肝癌細胞中 hsa-miR-10b-3p 直接影響之標的 mRNA 為 HOXD10 mRNA，當 miRNA 與 RNA 誘導沉默複合體（RNA-induced silencing complex, RISC）蛋白結合後，其夾帶的 miRNA 會與互補目標 mRNA 進行配對，當兩這序列完全結合時會誘導裂解之 mRNA 機制啟動，導致 mRNA 斷裂，進而抑制蛋白質的合成。has-miR-10b-3p 會與

HOXD10 mRNA 之 3'UTR 區域黏合，即中止密碼子之後的一段非編碼區域，此序列不會轉譯出蛋白質，但這段區域若與其他 RNA 結合會導致 mRNA 不穩定進而抑制其轉譯作用。實驗針 HOXD10 mRNA 對所設計 molecular beacon 之黏合序列為編碼區域（不包含 5'UTR 及 3'UTR），及能轉譯出蛋白質的某段序列，並進行螢光訊號偵測。

將兩種分別標記 has-miR-10b-3p 及 HOXD10 mRNA 之 molecular beacon 同時作螢光雜合反應，再透過 647nm 及 488nm 激發兩種不同的 molecular beacon，並配合超解析技術得到的影像圖進行疊圖分析。由圖 2-30 所示，先使用 647nm 雷射 50mW（末端瓦數為 24.3mW）激發 miR-10b beacon，並擷取 10000 張影像圖；接著使用 488nm 雷射 30mW（末端瓦數為 14.7mW）激發 HOXD10 beacon，同樣擷取 10000 張影像圖。再經由 Image J 分析得到超解析影像，並將兩張超解析影像作疊圖並放大觀測，其 Peak intensity threshold 的設定值為 $\text{std}(\text{Wave.F1}) * 2$ 。由於以 488nm 30mW 所得到之超解析影像相對於 647nm 50mW 較不完整，接著嘗試增加 488nm 的雷射強度進行測試。

圖 2-31 比較 488nm 雷射強度從 30mW 至 100mW 對於 miR-10b 及 HOXD10 mRNA 在肝癌細胞內共定位之影響，由局部放大圖片能看出當雷射強度達到 50mW 以上時，可以提升 HOXD10 beacon 超解析圖像的完整性。再將兩種光源激發得到之超解析圖像進行疊圖分析，

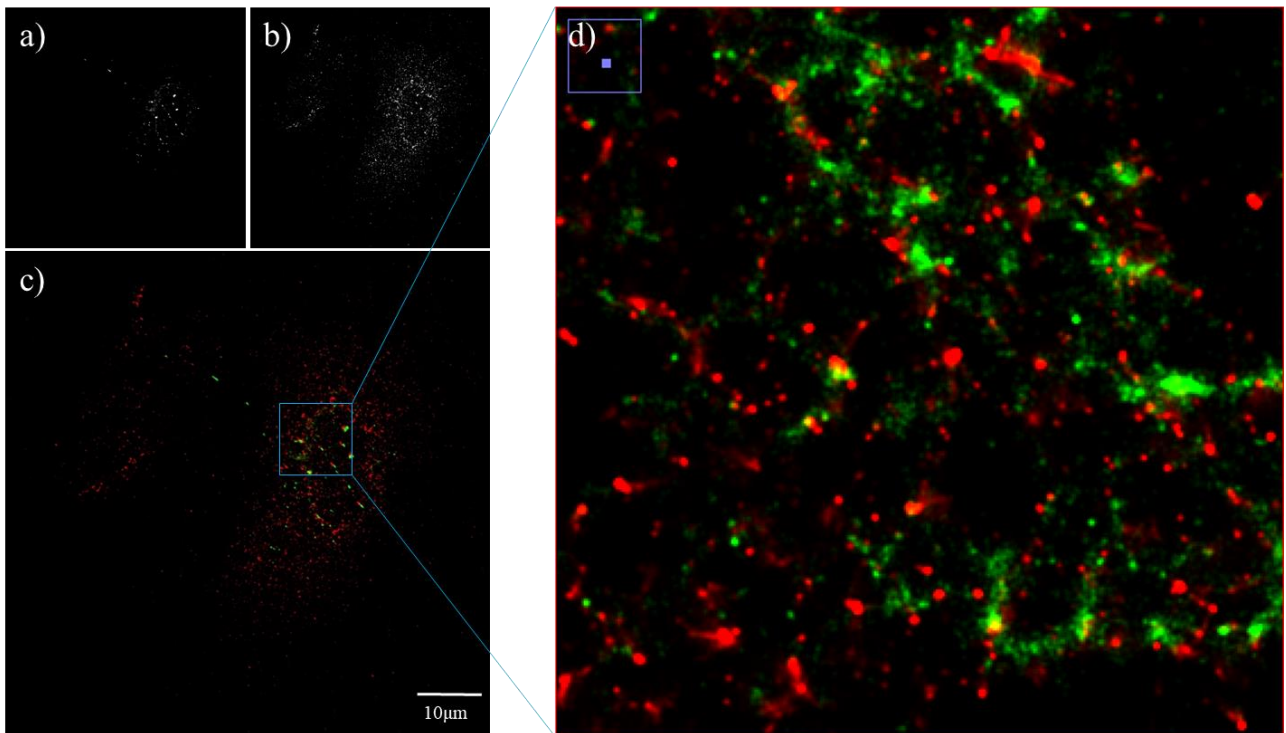


圖 2-30 miR-10b 及 HOXD10 mRNA 在肝癌細胞內共定位。(a) 為 488nm 30mW 激發 HOXD10 beacon 之超解析圖像，(b) 為 647nm 50mW 激發 miR-10b beacon 之超解析圖像，(c) 疊圖 (a) (b) 之影像，(d) 局部放大圖像。

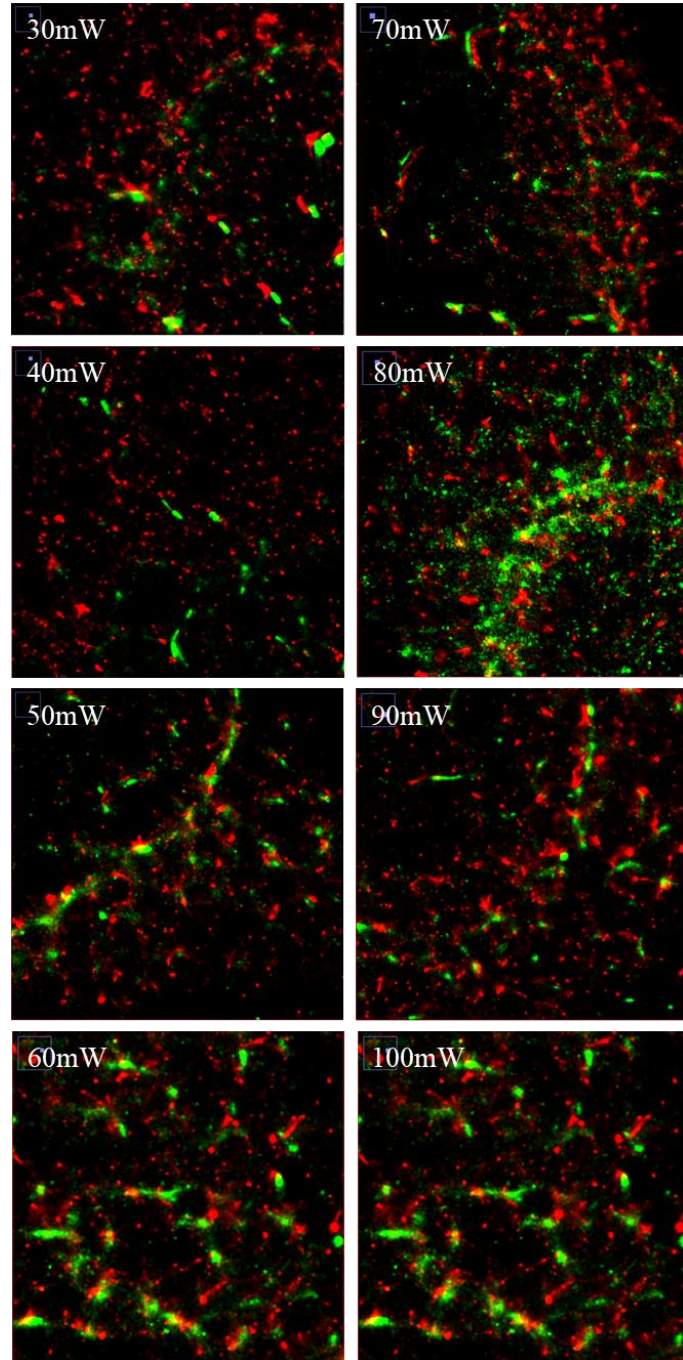


圖 2-31 改變 488nm 雷射強度對 miR-10b 及 HOXD10 mRNA 在肝癌細胞內共定位之影響。以 647nm 50mW，並配合不同瓦數之 488nm 雷射進行觀測，並將兩者取得之超解析影像疊圖及局部放大。

由圖片可以看出來兩者大部分有對在一起，但不完整而且也沒有完全重疊，並無法清楚得知兩者在細胞內部之相關性。

2.3.11 扣除細胞背景值對超解析影像之影響

經由測試不同的 Peak intensity threshold 設定值和雷射強度，可以得到 647nm 激發 miR-10b beacon 之單分子閃爍明顯的螢光影像及完整的超解析圖像，但 488nm 激發 HOXD10 beacon 所得到的影像圖並不理想，學生認為也許跟 488nm 激發的細胞背景值較高，使得單分子閃爍不明顯，進而影響單分子定位及超解析圖像。因此，嘗試使用不同雷射條件扣除細胞背景值，探討扣除細胞背景值對超解析影像之影響。

首先嘗試兩種條件，第一種是以 561nm 50mW(末端瓦數為 26mW) 拍攝單張螢光影像圖當作對照之細胞背景值，接著利用 488nm 100mW (末端瓦數為 40mW) 照射 5 分鐘使大部分螢光分子達到 off state，再以 488nm 70mW (末端瓦數為 30mW) 獲取 2000 張影像，接著使用 647nm 50mW (末端瓦數為 24.3mW) 同樣擷取 2000 張影像圖；第二種則以 561nm 10mW (末端瓦數為 5.95mW) 拍攝單張螢光影像圖當作對照之細胞背景值，同樣先用 488nm 100mW 照射 5 分鐘，再以 488nm 50mW (末端瓦數為 23.2mW) 及 647nm 50mW 各拍攝 2000 張影像圖。如圖 2-32 所示，隨著拍攝張數增加，經扣除細胞背

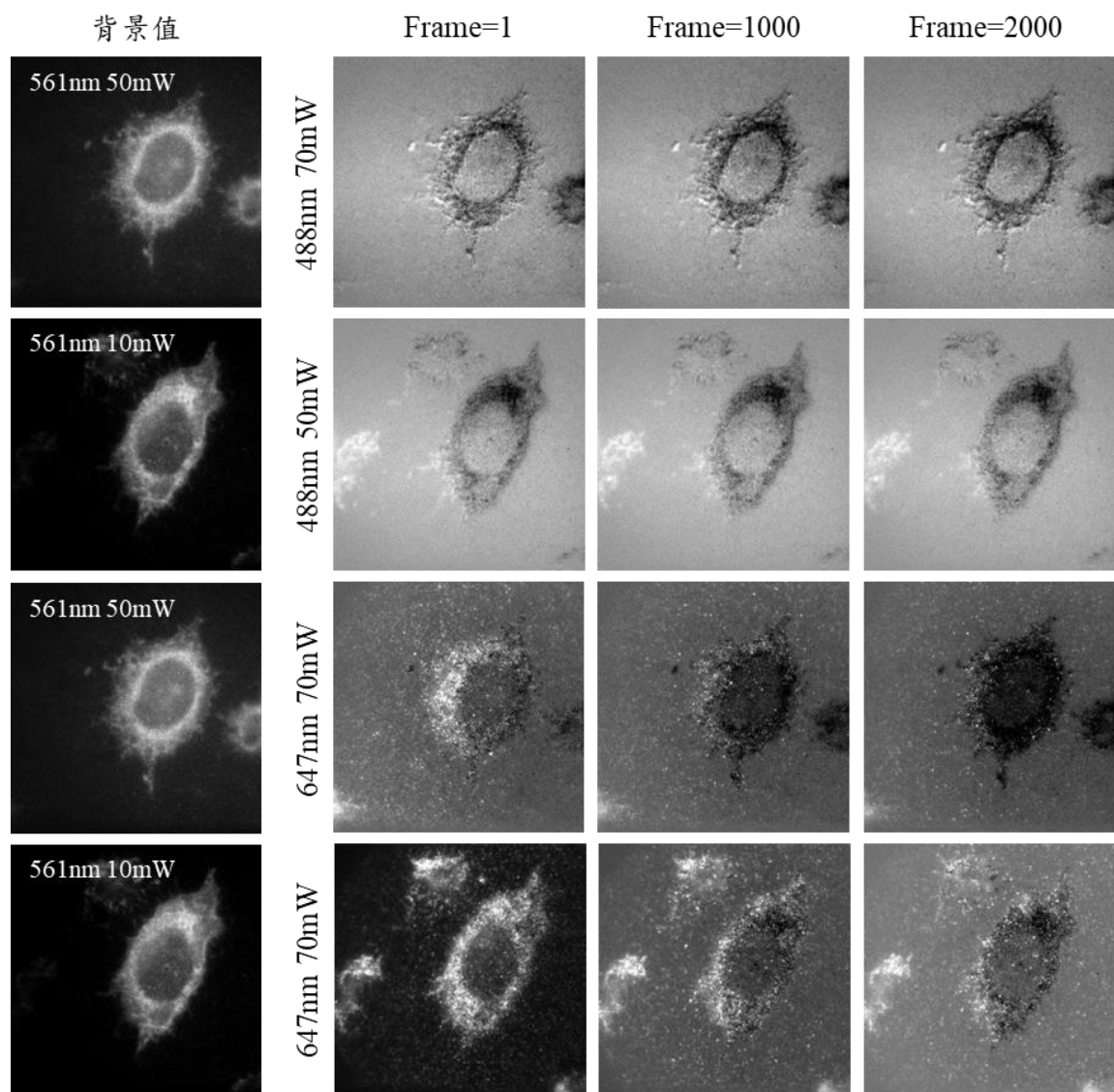


圖 2-32 扣除細胞背景值之螢光影像圖。分別以 561nm 10mW 及 50mW 拍攝之影像作為背景值，並比較以 488nm 及 647nm 扣除背景值之效果。

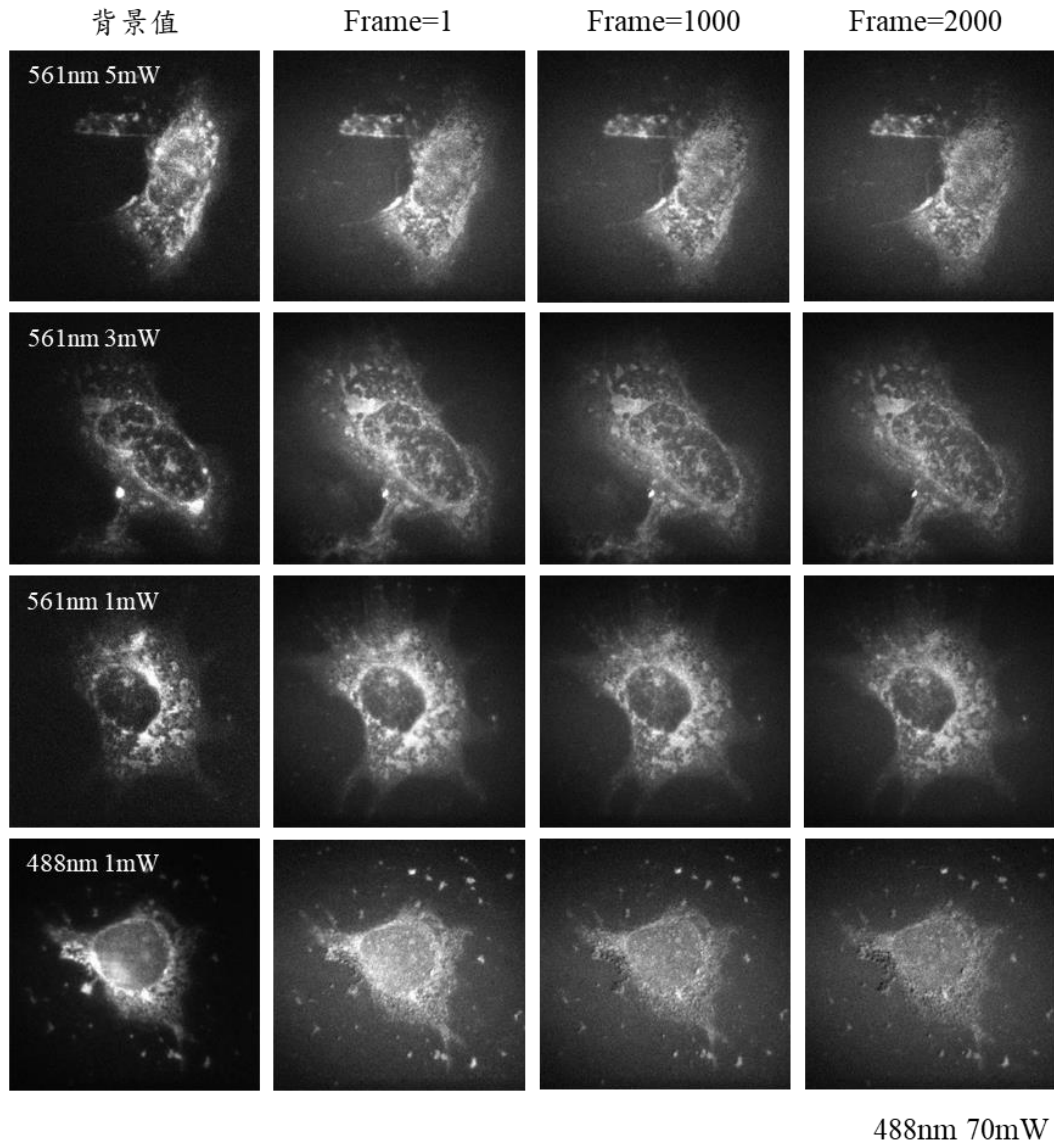


圖 2-33 以 488nm 照射細胞樣品並扣除不同細胞背景值。以 488nm 70mW 觀測細胞樣品並比較扣除不同雷射及瓦數得到的細胞背景值之差異。

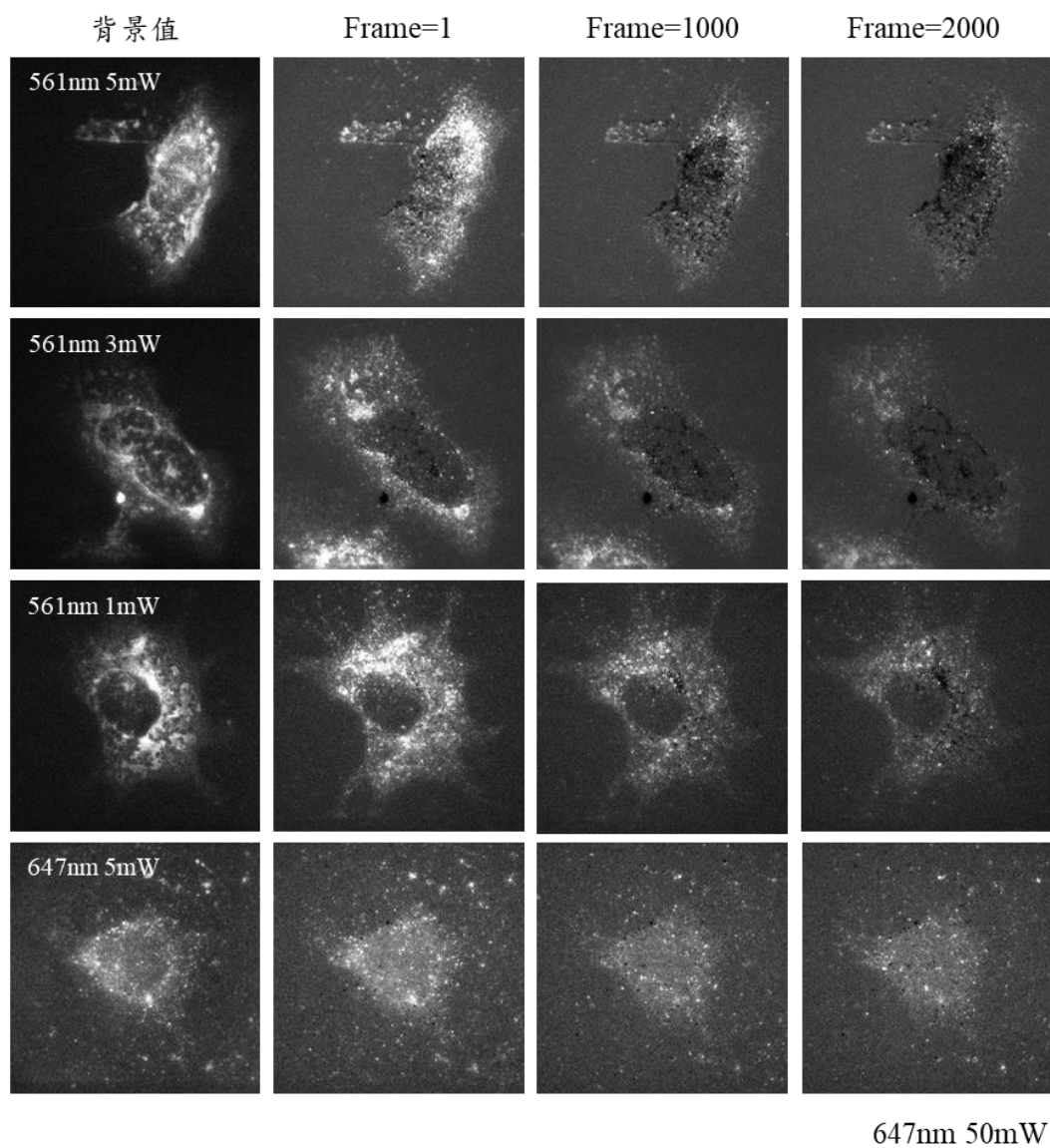


圖 2-34 以 647nm 照射細胞樣品並扣除不同細胞背景值。以 647nm 50mW 觀測細胞樣品並比較扣除不同雷射及瓦數得到的細胞背景值之差異。

景值的細胞質螢光訊號已經低於暗電流之背景值，使我們看到的螢光影像呈現黑色之區塊。為了避免影像圖失真，去除 488nm 100mW 照射 5 分鐘之步驟，並嘗試降低 561nm 雷射之瓦數進行細胞背景值之拍攝，此時 488nm 雷射固定為 70mW、647nm 雷射固定為 50mW。如圖 2-33，當 561nm 5mW（末端瓦數為 3.33mW）以下時，由 488nm 的螢光影像圖可看出已無低於暗電流背景值之情形，而圖 2-34 以 647nm 激發的螢光影像仍有部分黑色區塊之區域。

由於雷射強度設定低於 1mW 時雷射會較不穩定，所以將拍攝單張細胞背景值的 561nm 雷射固定在 1mW（末端瓦數為 0.25mW）並縮短曝光時間（exposure），從原本設定的 30ms 降至 15ms、10ms、5ms 及 1ms，488nm 雷射與 647nm 雷射強度接設定為 50mW，且拍攝時曝光時間依然為 30ms。同時增加擷取影像，從 2000 張提升至 10000 張。如圖 2-35，降低 561nm 雷射拍攝細胞背景時的曝光時間對於 488nm 的螢光影像差異並不大，即使增加拍攝張數也只會觀察到螢光亮度下降，並不會出現低於暗電流背景值之情形；而當 561nm 的曝光時間下降到 10ms 時，由圖 2-36 可以看出 647nm 螢光影像少於 2000 張時並不會有低於暗電流背景值的區域。隨著影像張數提升，螢光強度逐漸下降，仍會出現黑色區塊部分，如要完全避免低於暗電流背景值的情況，需要將 561nm 的曝光時間下降至 5ms。

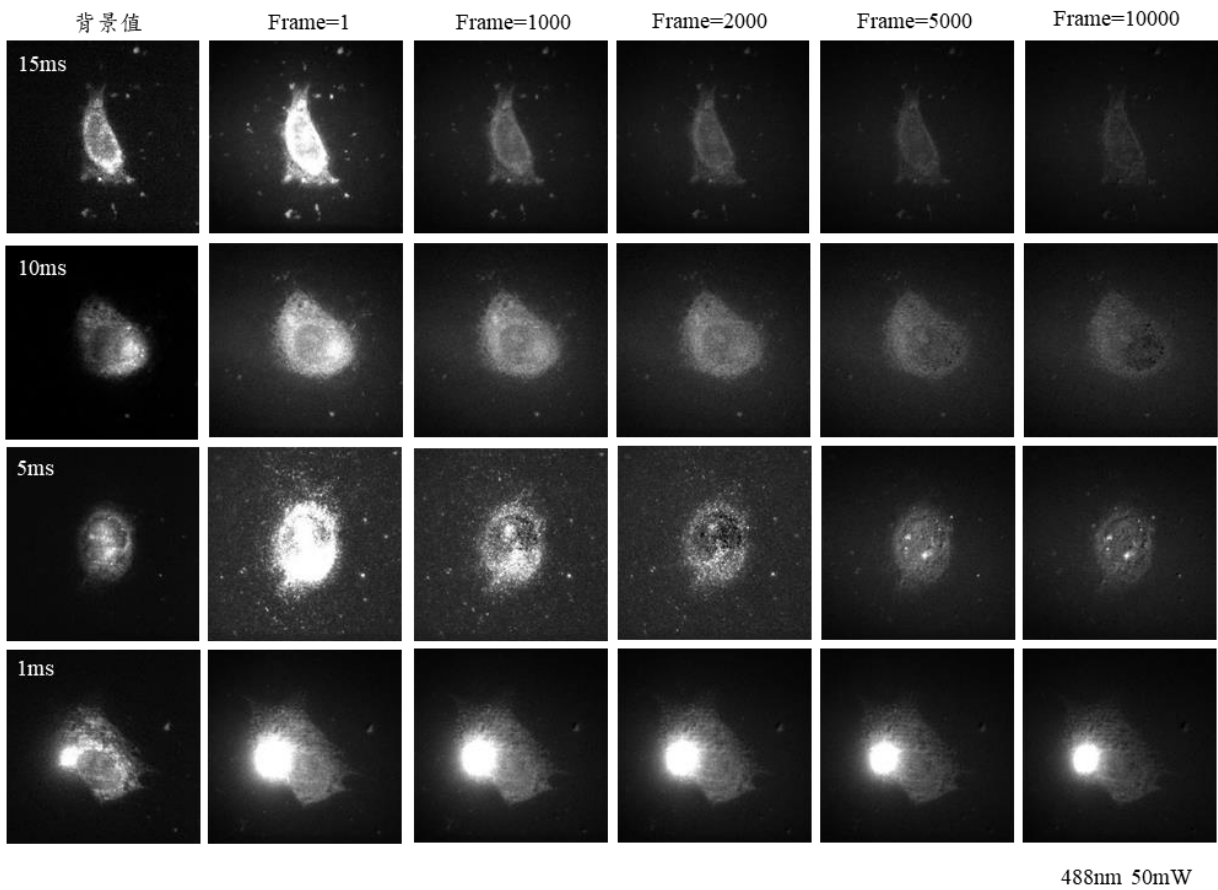


圖 2-35 以 488nm 照射細胞樣品並改變細胞背景值之曝光時間。降低 561nm 1mW 照射細胞背景值之曝光時間，並以 488nm 50mW 進行觀測。

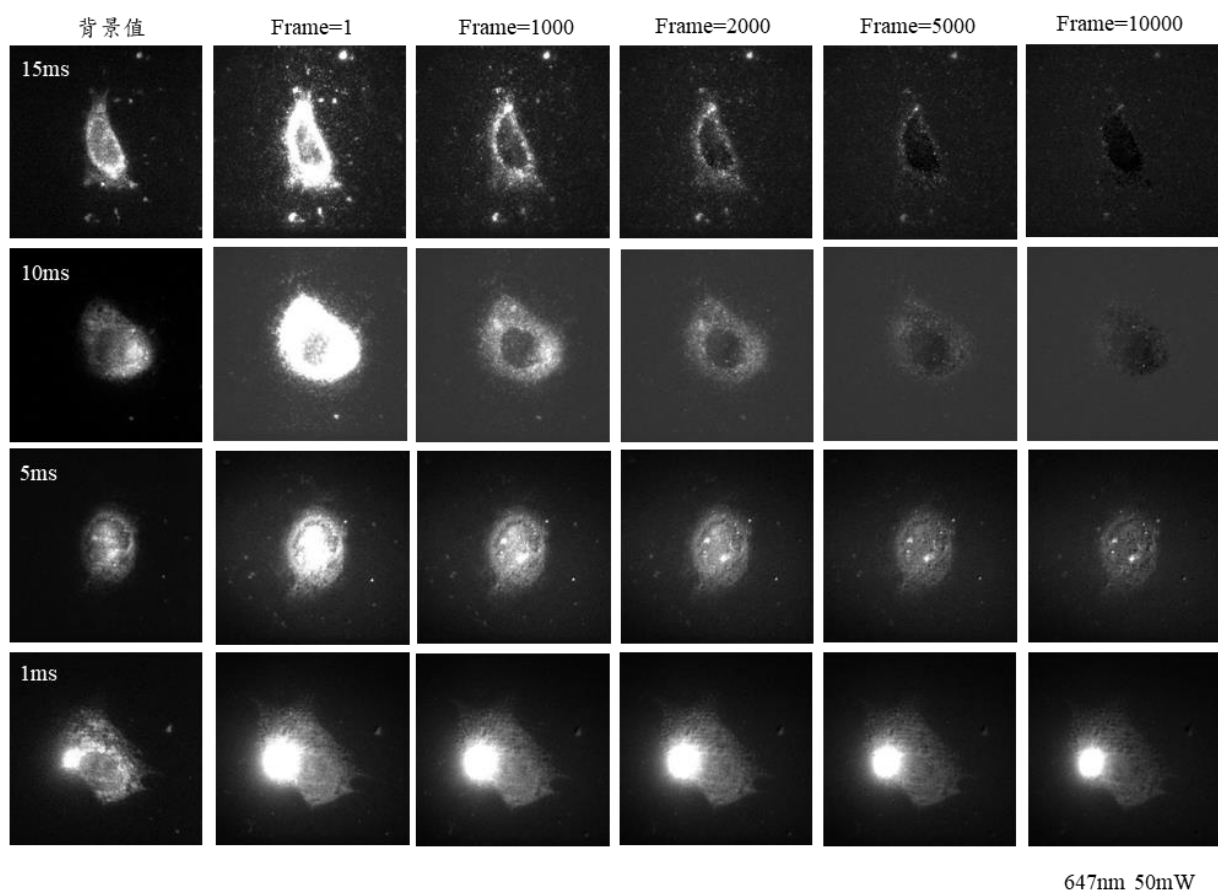


圖 2-36 以 647nm 照射細胞樣品並改變細胞背景值之曝光時間。降低 561nm 1mW 照射細胞背景值之曝光時間，並以 647nm 50mW 進行觀測。

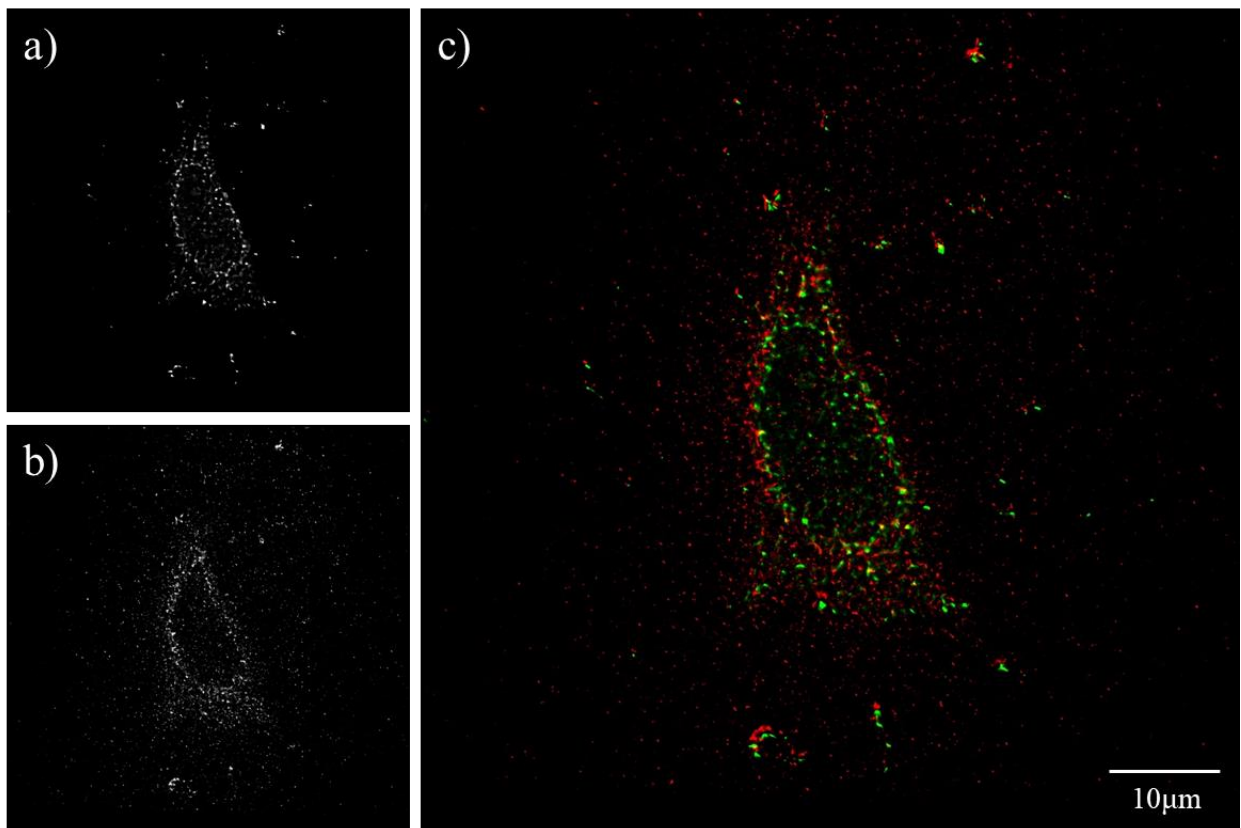


圖 2-37 扣除細胞背景值曝光時間 15ms 之超解析影像。(a) 488nm 50mW 扣除 561nm 1mW exposure 15ms 之超解析影像，(b) 647nm 50mW 扣除 561nm 1mW exposure 15ms 之超解析影像，(c) 疊圖，定位細胞中的 miR-10b 及 HOXD10 mRNA。

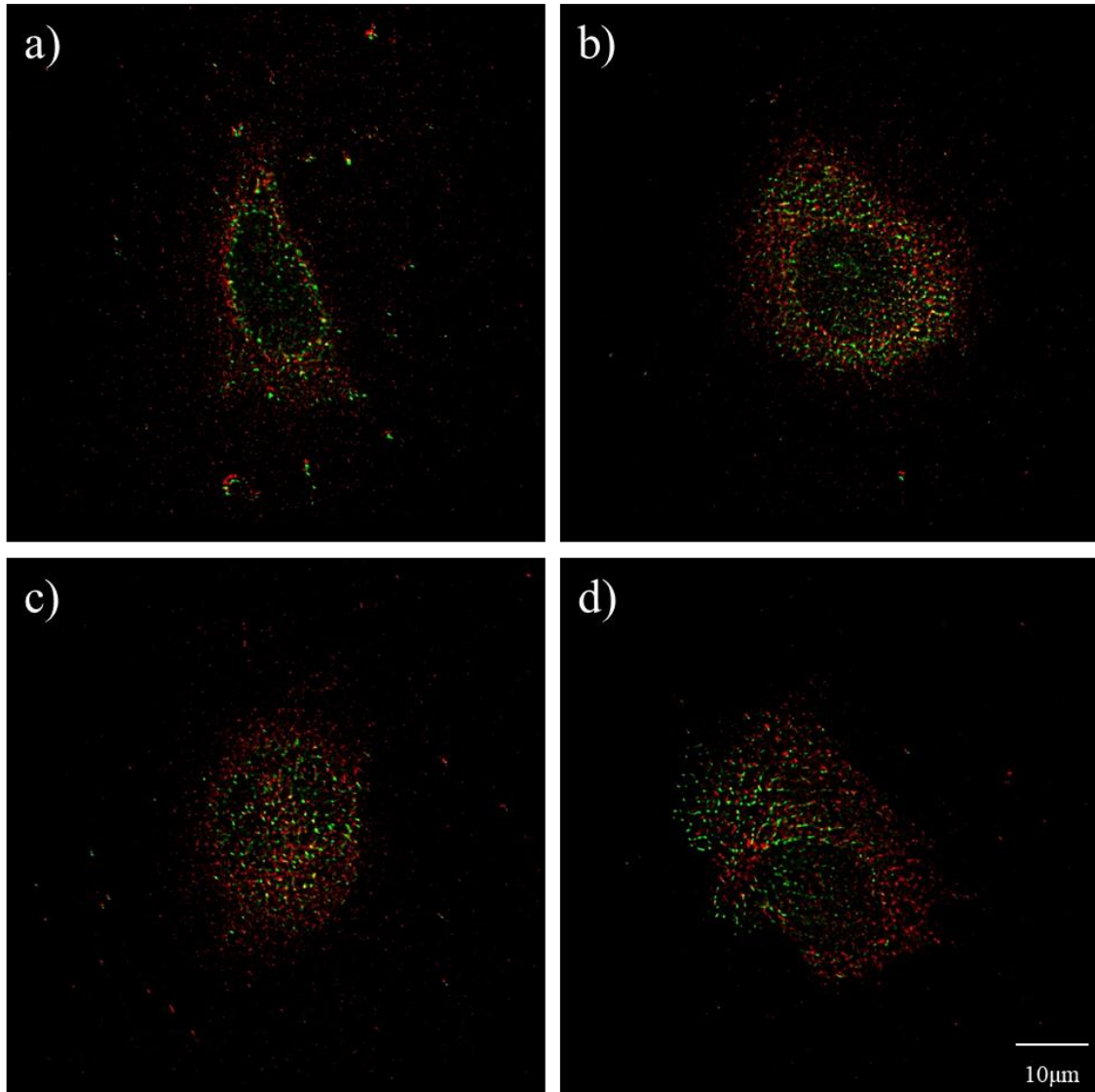


圖 2-38 扣除不同曝光時間的細胞背景值對肝癌細胞內共定位之影響。(a) 扣除細胞背景值曝光時間 15ms 之超解析影像疊圖，(b) 扣除細胞背景值曝光時間 10ms 之超解析影像疊圖，(c) 扣除細胞背景值曝光時間 5ms 之超解析影像疊圖，(d) 扣除細胞背景值曝光時間 1ms 之超解析影像疊圖。

接著以超解析圖像觀測細胞中 miRNA 及 mRNA 的定位。先分別取得以 488nm 50mW 及 647nm 50mW 扣除 561nm 1mW exposure 15ms 拍攝 10000 張之超解析圖像，再將兩者疊圖並進行觀測。如圖 2-37，大部分 HOXD10 mRNA 的定位都與 miR-10b 重疊，再進一步比較扣除不同曝光時間之背景值對於細胞內 mRNA 和 miRNA 共定位的影響。可以由圖 2-38 得知曝光時間為 5ms 及 1ms 時的定位只有約一半重疊，而曝光時間為 15ms 及 10ms 時的定位則有較好的一致性。

2.3.12 比較不同方法防止吸附

樣品製備時有使用 1 μ M 隨機短序列 DNA 及 5%BSA 於 0.3x SSC 雜合溶液防止 molecular beacon 直接吸附於玻片表面，在低瓦數拍攝單張螢光影像時，吸附於背景的 molecular beacon 相對於細胞質螢光訊號是可以被忽略的，但當使用 switching buffer 並配合高瓦數激發螢光分子時，吸附於玻片表面的 molecular beacon 也受到強光激發而變得不可忽略，除了可以明顯從螢光影像上看出，甚至是超解析影像也能定位到吸附的螢光分子。為了解決 molecular beacon 吸附的影響，除了原本的方法外，還嘗試了下列幾種不同的溶液：1 μ M 隨機短序列 DNA 及 5%脫脂奶粉於 0.3x SSC 雜合溶液、全脂牛奶、低脂牛奶、1 μ M 隨機短序列 DNA 及全脂牛奶於 0.3x SSC 雜合溶液、1 μ M 隨機短序列 DNA 及低脂牛奶於 0.3x SSC 雜合溶液。在塗覆 APTES 的玻

片上分別加入上述溶液，在室溫下反應 1 小時後使用去離子水清洗，接著在 50°C 下與含有 0.1 μ M molecular beacon 及 5%BSA 於 0.3x SSC 雜合溶液反應 1 小時，最後使用含有 Formamide 與 SSC 之溶液清洗，加入 switching buffer 後以 488nm 雷射及 647nm 雷射進行觀測。

如圖 2-39 及圖 2-40 可以看出以 1 μ M 隨機短序列 DNA 及 5%脫脂奶粉於 0.3x SSC 雜合溶液處理後的玻片吸附的螢光分子較少，並實際計算不同溶液處理後的樣品螢光亮度。以 647nm 50mW（末端瓦數為 24.3mW）照射的螢光亮度依序為 2985、1296、5367、3527、4978、3756；以 488nm 50mW（末端瓦數為 23.2mW）照射的螢光亮度則分別為 4946、2491、5210、3787、5315、3813。如圖 2-41 可以清楚比較六種方法處理後樣品的螢光亮度，並藉此了解樣品吸附的程度。實驗結果表明 1 μ M 隨機短序列 DNA 及 5%脫脂奶粉於 0.3x SSC 雜合溶液防止吸附的能力最好，其次是原先使用的 1 μ M 隨機短序列 DNA 及 5%BSA 於 0.3x SSC 雜合溶液，至於牛奶防止吸附的能力並不如預期，其中低脂牛奶的效果較全脂牛奶來得好。

實驗結果表明使用 1 μ M 隨機短序列 DNA 及 5%脫脂奶粉於 0.3x SSC 雜合溶液防止 molecular beacon 吸附在塗覆 APTES 的玻片上的能力更佳，之後將改用含有脫脂奶粉的 blocking 溶液進行接下來的實驗。

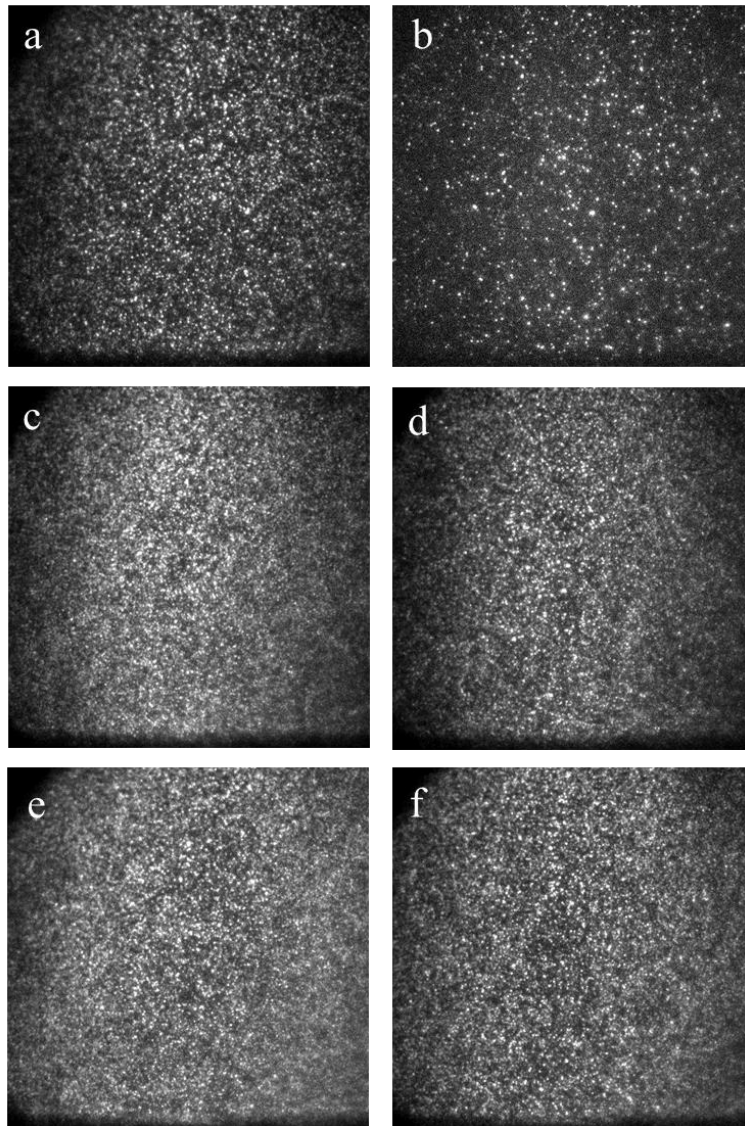


圖 2-39 以 647nm 50mW 觀測不同防止吸附之方法。樣品先以不同溶液進行處理以防止吸附，再以 647nm 雷射觀測含有 0.1 μ M molecular beacon 之雜合溶液吸附之程度。防止吸附方法分別為 (a) 10^{-6} M Primer + 5%BSA in 0.3x SSC，(b) 10^{-6} M Primer + 5%脫脂奶粉 in 0.3x SSC，(c) 全脂牛奶，(d) 低脂牛奶，(e) 10^{-6} M Primer + 全脂牛奶 in 0.3x SSC，(f) 10^{-6} M Primer + 低脂牛奶 in 0.3x SSC。

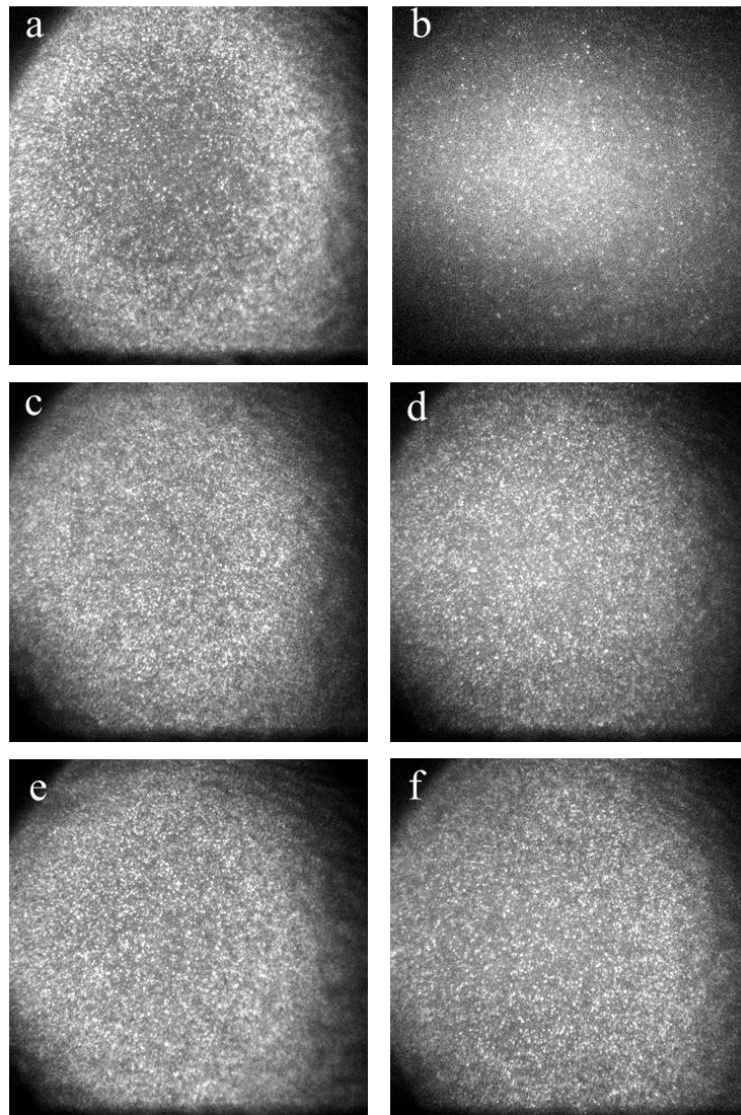


圖 2-40 以 488nm 50mW 觀測不同防止吸附之方法。樣品先以不同溶液進行處理以防止吸附，再以 488nm 雷射觀測含有 $0.1\mu\text{M}$ molecular beacon 之雜合溶液吸附之程度。防止吸附方法分別為 (a) 10^{-6}M Primer + 5%BSA in 0.3x SSC，(b) 10^{-6}M Primer + 5%脫脂奶粉 in 0.3x SSC，(c) 全脂牛奶，(d) 低脂牛奶，(e) 10^{-6}M Primer + 全脂牛奶 in 0.3x SSC，(f) 10^{-6}M Primer + 低脂牛奶 in 0.3x SSC。

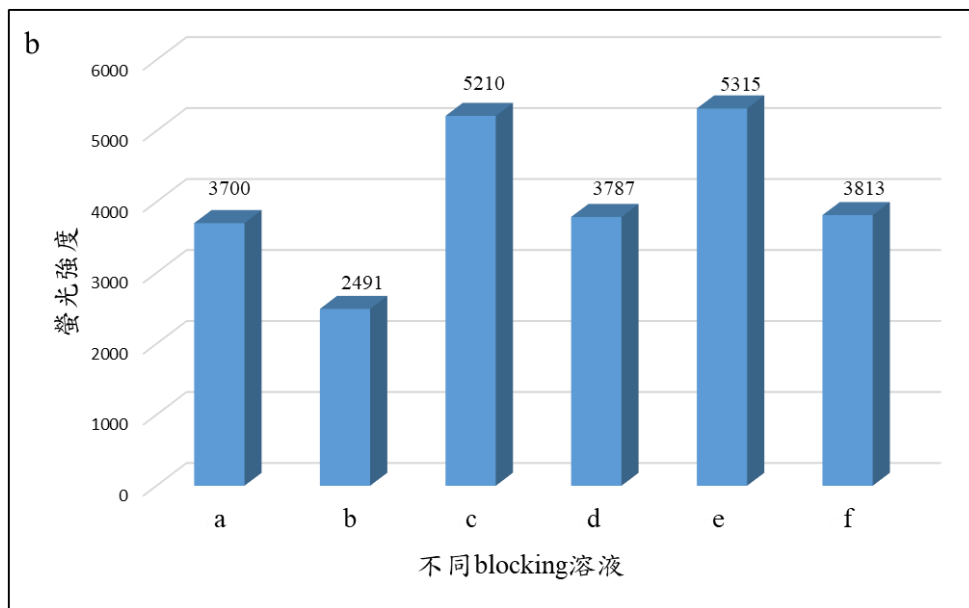
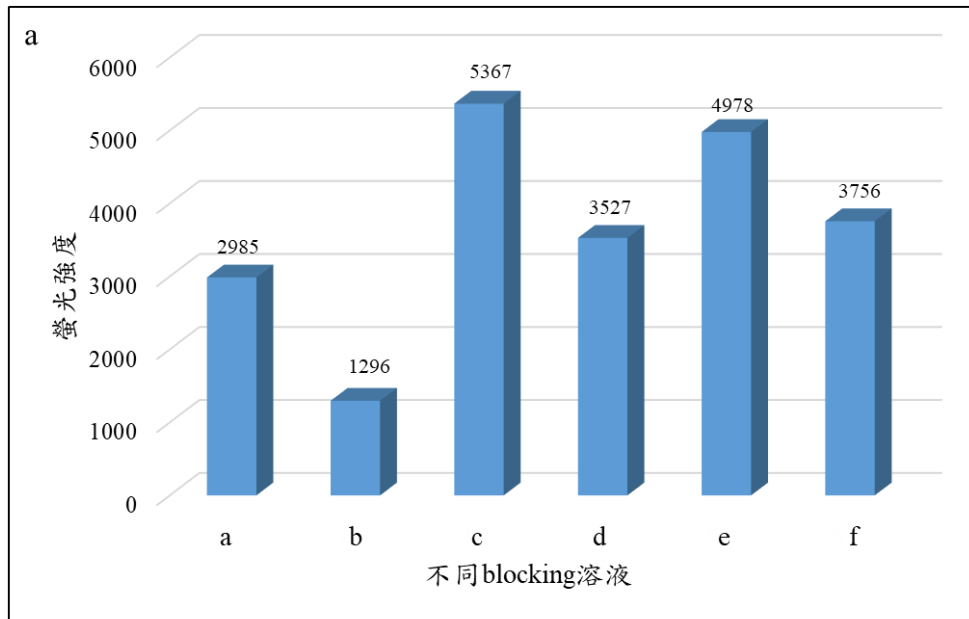


圖 2-41 比較不同防止吸附方法之螢光強度。(a) 以 647nm 50mW 觀測不同方法處理後含有 0.1 μ M molecular beacon 之雜合溶液吸附之螢光強度，(b) 以 488nm 50mW 觀測不同方法處理後含有 0.1 μ M molecular beacon 之雜合溶液吸附之螢光強度。

2.4 結論與未來展望

本實驗利用 molecular beacon 與細胞中的 miRNA 進行螢光雜合作用，並於 HILO 螢光顯微鏡系統下觀測同時標記之 HOXD10 mRNA 和 miR-10b。實驗結果表明此方法之專一性，且可以利用多光源同時偵測不同的目標序列，也可直接觀測 has-miR-10b-3p 於細胞中的表現量。透過 LED 照射及 K_2PtCl_4 離子在細胞樣品上還原成白金奈米粒子可以有效地降低細胞背景值，並藉由超解析成像可以直接區分出雜合 molecular beacon 之樣品及細胞背景值。

已知 miRNA 對於基因表達調控與疾病的發展有密切的關係，為了進一步探討 miRNA 與目標 mRNA 在細胞內的相關性，利用不同雷射激發螢光分子對 miRNA 與目標 mRNA 進行共定位，且藉由改變雷射強度、扣除細胞背景值及不同計算設定值改善超解析圖像。目前共定位的最佳觀測條件為以 488nm 50mW（末端瓦數為 23.2mW）及 647nm 50mW（末端瓦數為 24.3mW）進行拍攝，並同時扣除 561nm 1mW（末端瓦數為 0.25mW） exposure 15ms，並測試出含有脫脂奶粉的溶液可以更有效的防止 molecular beacon 吸附於玻片。預期目標 mRNA 位置可以完全重疊於 miRNA，以提供學界一個新的資訊協助了解兩者之間的關係。

參考資料

1. He, L.; Hannon, G. J., Micromnas: Small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat. Rev. Genet.* 2004, 5 (7), 522-531.
2. A., K.; S., G.-J., miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data. *Nucleic Acids Res.* 2011, 39, D152-D157.
3. Lee, R. C.; Feinbaum, R. L.; Ambros, V., The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 1993, 75 (5), 843-54.
4. Bentwich, I.; Avniel, A.; Karov, Y.; Aharonov, R.; Gilad, S.; Barad, O.; Barzilai, A.; Einat, P.; Einav, U.; Meiri, E.; Sharon, E.; Spector, Y.; Bentwich, Z., Identification of hundreds of conserved and nonconserved human microRNAs. *Nature genetics* 2005, 37 (7), 766-70.
5. Lawrie, C. H.; Gal, S.; Dunlop, H. M.; Pushkaran, B.; Liggins, A. P.; Pulford, K.; Banham, A. H.; Pezzella, F.; Boulwood, J.; Wainscoat, J. S.; Hatton, C. S.; Harris, A. L., Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma. *British journal of haematology* 2008, 141 (5), 672-5.
6. Siebolts, U.; Varnholt, H.; Drebber, U.; Dienes, H. P.; Wickenhauser, C.; Odenthal, M., Tissues from routine pathology archives are suitable for microRNA analyses by quantitative PCR. *Journal of clinical pathology* 2009, 62 (1), 84-8.
7. Lee, Y.; Kim, M.; Han, J.; Yeom, K. H.; Lee, S.; Baek, S. H.; Kim, V. N., MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *The EMBO journal* 2004, 23 (20), 4051-60.
8. Lee, Y.; Ahn, C.; Han, J.; Choi, H.; Kim, J.; Yim, J.; Lee, J.; Provost, P.; Radmark, O.; Kim, S.; Kim, V. N., The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* 2003, 425 (6956), 415-9.
9. Bohnsack, M. T.; Czaplinski, K.; Gorlich, D., Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *RNA (New York, N.Y.)* 2004, 10 (2), 185-91.
10. Schwarz, D. S.; Zamore, P. D., Why do miRNAs live in the miRNP? *Genes & development* 2002, 16 (9), 1025-31.
11. Engels, B. M.; Hutvagner, G., Principles and effects of microRNA-mediated post-transcriptional gene regulation. *Oncogene* 2006, 25

- (46), 6163-9.
12. Bartel, D. P., MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 2009, 136 (2), 215-33.
 13. Esquela-Kerscher, A.; Slack, F. J., Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nature reviews. Cancer* 2006, 6 (4), 259-69.
 14. Volinia, S.; Calin, G. A.; Liu, C. G.; Ambs, S.; Cimmino, A.; Petrocca, F.; Visone, R.; Iorio, M.; Roldo, C.; Ferracin, M.; Prueitt, R. L.; Yanaihara, N.; Lanza, G.; Scarpa, A.; Vecchione, A.; Negrini, M.; Harris, C. C.; Croce, C. M., A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2006, 103 (7), 2257-61.
 15. Song, S. J.; Poliseno, L.; Song, M. S.; Ala, U.; Webster, K.; Ng, C.; Beringer, G.; Brikbak, N. J.; Yuan, X.; Cantley, L. C.; Richardson, A. L.; Pandolfi, P. P., MicroRNA-antagonism regulates breast cancer stemness and metastasis via TET-family-dependent chromatin remodeling. *Cell* 2013, 154 (2), 311-324.
 16. Gregory, P. A.; Bert, A. G.; Paterson, E. L.; Barry, S. C.; Tsykin, A.; Farshid, G.; Vadas, M. A.; Khew-Goodall, Y.; Goodall, G. J., The miR-200 family and miR-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1. *Nature cell biology* 2008, 10 (5), 593-601.
 17. Murakami, Y.; Yasuda, T.; Saigo, K.; Urashima, T.; Toyoda, H.; Okanoue, T.; Shimotohno, K., Comprehensive analysis of microRNA expression patterns in hepatocellular carcinoma and non-tumorous tissues. *Oncogene* 2006, 25 (17), 2537-45.
 18. Gramantieri, L.; Ferracin, M.; Fornari, F.; Veronese, A.; Sabbioni, S.; Liu, C. G.; Calin, G. A.; Giovannini, C.; Ferrazzi, E.; Grazi, G. L.; Croce, C. M.; Bolondi, L.; Negrini, M., Cyclin G1 is a target of miR-122a, a microRNA frequently down-regulated in human hepatocellular carcinoma. *Cancer research* 2007, 67 (13), 6092-9.
 19. Ladeiro, Y.; Couchy, G.; Balabaud, C.; Bioulac-Sage, P.; Pelletier, L.; Rebouissou, S.; Zucman-Rossi, J., MicroRNA profiling in hepatocellular tumors is associated with clinical features and oncogene/tumor suppressor gene mutations. *Hepatology (Baltimore, Md.)* 2008, 47 (6), 1955-63.
 20. Garofalo, M.; Jeon, Y. J.; Nuovo, G. J.; Middleton, J.;

- Secchiero, P.; Joshi, P.; Alder, H.; Nazaryan, N.; Di Leva, G.; Romano, G.; Crawford, M.; Nana-Sinkam, P.; Croce, C. M., MiR-34a/c-Dependent PDGFR-alpha/beta Downregulation Inhibits Tumorigenesis and Enhances TRAIL-Induced Apoptosis in Lung Cancer. *PloS one* 2013, 8 (6), e67581.
21. Asaga, S.; Kuo, C.; Nguyen, T.; Terpenning, M.; Giuliano, A. E.; Hoon, D. S., Direct serum assay for microRNA-21 concentrations in early and advanced breast cancer. *Clinical chemistry* 2011, 57 (1), 84-91.
 22. Park, N. J.; Zhou, H.; Elashoff, D.; Henson, B. S.; Kastratovic, D. A.; Abemayor, E.; Wong, D. T., Salivary microRNA: discovery, characterization, and clinical utility for oral cancer detection. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2009, 15 (17), 5473-7.
 23. Xing, L.; Todd, N. W.; Yu, L.; Fang, H.; Jiang, F., Early detection of squamous cell lung cancer in sputum by a panel of microRNA markers. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 2010, 23 (8), 1157-64.
 24. Teplyuk, N. M.; Mollenhauer, B.; Gabriely, G.; Giese, A.; Kim, E.; Smolsky, M.; Kim, R. Y.; Saria, M. G.; Pastorino, S.; Kesari, S.; Krichevsky, A. M., MicroRNAs in cerebrospinal fluid identify glioblastoma and metastatic brain cancers and reflect disease activity. *Neuro-oncology* 2012, 14 (6), 689-700.
 25. Creemers, E. E.; Tijssen, A. J.; Pinto, Y. M., Circulating microRNAs: novel biomarkers and extracellular communicators in cardiovascular disease? *Circulation research* 2012, 110 (3), 483-95.
 26. Saikumar, J.; Hoffmann, D.; Kim, T.-M.; Gonzalez, V. R.; Zhang, Q.; Goering, P. L.; Brown, R. P.; Bijol, V.; Park, P. J.; Waikar, S. S., Expression, circulation, and excretion profile of microRNA-21,-155, and-18a following acute kidney injury. *Toxicological Sciences* 2012, 129 (2), 256-267.
 27. Lee, E. J.; Baek, M.; Gusev, Y.; Brackett, D. J.; Nuovo, G. J.; Schmittgen, T. D., Systematic evaluation of microRNA processing patterns in tissues, cell lines, and tumors. *RNA (New York, N.Y.)* 2008, 14 (1), 35-42.
 28. Hurley, J.; Roberts, D.; Bond, A.; Keys, D.; Chen, C., Stem-loop RT-qPCR for microRNA expression profiling. *Methods in*

- molecular biology (Clifton, N.J.) 2012, 822, 33-52.
29. Ranade, A. R.; Weiss, G. J., Methods for microRNA microarray profiling. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.) 2011, 700, 145-52.
 30. Tyagi, S.; Kramer, F. R., Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization. *Nature biotechnology* 1996, 14 (3), 303-8.
 31. Ho, S. L.; Chan, H. M.; Ha, A. W.; Wong, R. N.; Li, H. W., Direct quantification of circulating miRNAs in different stages of nasopharyngeal cancerous serum samples in single molecule level with total internal reflection fluorescence microscopy. *Analytical chemistry* 2014, 86 (19), 9880-6.
 32. Tokunaga, M.; Imamoto, N.; Sakata-Sogawa, K., Highly inclined thin illumination enables clear single-molecule imaging in cells. *Nature methods* 2008, 5 (2), 159.
 33. Qu, X.; Wu, D.; Mets, L.; Scherer, N. F., Nanometer-localized multiple single-molecule fluorescence microscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2004, 101 (31), 11298-11303.
 34. Roy, R.; Hohng, S.; Ha, T., A practical guide to single-molecule FRET. *Nature methods* 2008, 5 (6), 507.
 35. Webb, D. J.; Brown, C. M., Epi-fluorescence microscopy. In *Cell Imaging Techniques*, Springer: 2012; pp 29-59.
 36. Choquet, D., The 2014 Nobel Prize in Chemistry: a large-scale prize for achievements on the nanoscale. *Neuron* 2014, 84 (6), 1116-9.
 37. Chiu, S. W.; Leake, M. C., Functioning nanomachines seen in real-time in living bacteria using single-molecule and super-resolution fluorescence imaging. *International journal of molecular sciences* 2011, 12 (4), 2518-42.
 38. Gustafsson, M. G., Nonlinear structured-illumination microscopy: wide-field fluorescence imaging with theoretically unlimited resolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2005, 102 (37), 13081-6.
 39. Bates, M.; Huang, B.; Dempsey, G. T.; Zhuang, X., Multicolor super-resolution imaging with photo-switchable fluorescent probes. *Science* (New York, N.Y.) 2007, 317 (5845), 1749-1753.
 40. Betzig, E.; Patterson, G. H.; Sougrat, R.; Lindwasser, O. W.; Olenych, S.; Bonifacino, J. S.; Davidson, M. W.; Lippincott-Schwartz, J.; Hess, H. F., Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution. *Science* (New York, N.Y.) 2006, 313

- (5793), 1642-1645.
41. Hess, S. T.; Girirajan, T. P.; Mason, M. D., Ultra-high resolution imaging by fluorescence photoactivation localization microscopy. *Biophysical journal* 2006, 91 (11), 4258-4272.
 42. Heilemann, M.; van de Linde, S.; Schuttpelz, M.; Kasper, R.; Seefeldt, B.; Mukherjee, A.; Tinnefeld, P.; Sauer, M., Subdiffraction-resolution fluorescence imaging with conventional fluorescent probes. *Angewandte Chemie (International ed. in English)* 2008, 47 (33), 6172-6.
 43. Folling, J.; Bossi, M.; Bock, H.; Medda, R.; Wurm, C. A.; Hein, B.; Jakobs, S.; Eggeling, C.; Hell, S. W., Fluorescence nanoscopy by ground-state depletion and single-molecule return. *Nat Methods* 2008, 5 (11), 943-5.
 44. Pena, J. T.; Sohn-Lee, C.; Rouhanifard, S. H.; Ludwig, J.; Hafner, M.; Mihailovic, A.; Lim, C.; Holoch, D.; Berninger, P.; Zavolan, M., miRNA in situ hybridization in formaldehyde and EDC-fixed tissues. *Nature methods* 2009, 6 (2), 139.
 45. Liao, C. G.; Kong, L. M.; Zhou, P.; Yang, X. L.; Huang, J. G.; Zhang, H. L.; Lu, N., miR-10b is overexpressed in hepatocellular carcinoma and promotes cell proliferation, migration and invasion through RhoC, uPAR and MMPs. *Journal of translational medicine* 2014, 12, 234.
 46. King, R. S.; Newmark, P. A., In situ hybridization protocol for enhanced detection of gene expression in the planarian *Schmidtea mediterranea*. *BMC developmental biology* 2013, 13, 8.