

系統識別號:C09300610

公務出國報告提要

頁數: 47 含附件: 否

報告名稱:

分子定量檢驗病原真菌—從基因體出發

主辦機關:

經濟部

聯絡人/電話:

林純白/23212200#267

出國人員:

李淑英 行政院衛生署 疾病管制局 副研究員

出國類別: 研究 實習

出國地區: 德國

出國期間: 民國 92 年 08 月 31 日 -民國 92 年 09 月 13 日

報告日期: 民國 92 年 11 月 10 日

分類號/目: J4/公共衛生、檢疫 /

關鍵詞: 病原微生物, 定量分子檢驗, 基因體

內容摘要: 1.本次參加國合處所辦理之九十二年度赴德技術研習計畫, 主要目的係為研習有助於提升我國相關產業之競爭力, 促進產業升級或未來國家發展所需技術及專業知識。2.二十一世紀全球將面臨一連串的傳染病威脅, 如愛滋病、狂牛病、SARS、流行性感冒等, 這些傳染病雖然對人類健康帶來帶來莫大的威脅, 但也為醫藥生物技術產業帶來無限商機, 舉凡早期偵測、檢驗分型、治療策略、疫苗研發均對傳染病防治十分重要。而其中即時偵測及快速檢驗技術更在疫情爆發初期有關鍵性之影響。近年來, 基因體計畫的蓬勃發展, 基因序列解碼工作在全球競相進行, 病原菌基因序列的解密, 更為病原檢驗帶來新契機, 新檢驗技術如定量即時分子檢驗、生物晶片等隨之開發出來。本人有幸經國合處之甄選, 同意赴德研習「分子定量檢驗病原真菌—從基因體出發」二週, 這段期間主要選擇南德慕尼黑城附近的雷根斯堡醫院附設微生物學研究所, 研習定量分子檢驗技術。除希望能實際應用於檢驗研究業務上, 亦能對提昇國內相關生計產業有所助益。3.我國生物技術為國內重要之產業, 目前除積極迎頭趕上與列強誤差外, 正面臨新興開發國家之競爭, 提升我國生物技術產業之技術水準為刻不容緩之工作。因此擬藉由本計畫研習先進國家提升生物技術水準, 發展高科技、高附加價值之生技產品。做為本國推動生物技術產業轉型, 邁向知識經濟產業之路的參考。

本文電子檔已上傳至出國報告資訊網

J4/
C09300610

系統識別號:C09300610

公 務 出 國 報 告 提 要

頁數: 含附件: 否

報告名稱:

分子定量檢驗病原真菌—從基因體出發

主辦機關:

經濟部

聯絡人/電話:

林純白/23212200#267

出國人員:

李淑英 行政院衛生署 疾病管制局 副研究員

出國類別:

研究 實習

出國地區:

德國

出國期間:

民國 92 年 08 月 31 日 -民國 92 年 09 月 13 日

報告日期:

民國 年 月 日

分類號/目:

/ /

關鍵詞:

內容摘要:

本文電子檔已上傳至出國報告資訊網

目錄

壹、研修目的-----	3
貳、研修行程與工作紀要內容-----	5
參、研修內容重點-----	6
一、 前言-----	6
二、 基因體計畫發展對分子檢驗之影響-----	8
三、 研習分子定量檢驗病原菌分子定量檢驗實務---	24
肆、心得與建議-----	43
伍、致謝-----	47

壹、研修目的

1. 本次參加國合處所辦理之九十二年度赴德技術研習計畫，主要目的係為研習有助於提升我國相關產業之競爭力，促進產業升級或未來國家發展所需技術及專業知識。
2. 二十一世紀全球將面臨一連串的傳染病威脅，如愛滋病、狂牛病、SARS、流行性感冒等，這些傳染病雖然對人類健康帶來帶來莫大的威脅，但也為醫藥生物技術產業帶來無限商機，舉凡早期偵測、檢驗分型、治療策略、疫苗研發均對傳染病防治十分重要。而其中即時偵測及快速檢驗技術更在疫情爆發初期有關鍵性之影響。近年來，基因體計畫的蓬勃發展，基因序列解碼工作在全球競相進行，病原菌基因序列的解密，更為病原檢驗帶來新契機，新檢驗技術如定量即時分子檢驗、生物晶片等隨之開發出來。本人有幸經國合處之甄選，同意赴德研習「分子定量檢驗病原真菌—從基因體出發」二週，這段期間主要選擇南德慕尼黑城附近的雷根斯堡醫院附設微生物學研究所，研習定量分子檢驗技術。除希望能實際應用於檢驗研究業務上，亦能對提昇國內相關生計產業有

所助益。

3. 我國生物技術為國內重要之產業，目前除積極迎頭趕上與列強誤差外，正面臨新興開發國家之競爭，提升我國生物技術產業之技術水準為刻不容緩之工作。因此擬藉由本計畫研習先進國家提升生物技術水準，發展高科技、高附加價值之生技產品。做為本國推動生物技術產業轉型，邁向知識經濟產業之路的參考。

貳、行程與工作記要

研修日期	工作記要
8月31日	抵達(台北→日內瓦→德國慕尼黑)
9月1日 至 9月12日	於雷根斯堡微生物研究所研習分子定量檢驗 病原菌實務
9月13日	返程(德國慕尼黑→台北)

參、研修內容

一、 前言

本次參加國合處所辦理之九十二年度赴德技術研習計畫，主要目的係為研習有助於提升我國相關產業之競爭力，促進產業升級所需技術及專業知識。我國生物技術為國內重要之產業，目前除積極迎頭趕上與列強誤差外，正面臨新興開發國家之競爭，如何提升我國生物技術產業之技術水準，發展高科技、高附加價值之技術，推動生物技術產業轉型，邁向知識經濟產業為刻不容緩之工作。

隨著人類壽命的增長、生活型態的改變及環境的變遷，使得新的病害隨之崛起。二十一世紀全球將面臨一連串的傳染病威脅，除了愛滋病、狂牛病、肺結核外，每年都有新面孔出現的流感病毒以及最近發生的 SARS。這些傳染病雖然對人類健康帶來帶來莫大的威脅，但也為醫藥生物技術產業帶來無限商機，舉凡早期偵測、檢驗分型、治療策略、疫苗研發均對傳染病防治十分重要。而其中即時偵測及快速檢驗技術更在疫情爆發初期有關鍵性之影響。

近年來，基因體計畫的蓬勃發展，基因序列解碼工作在全球競相進行，有人將這比喻為全球性新一波的工業革命，不過不同於前一波的工業革命，競爭的標的已不再是原料的取得及加工，而是生物資訊的取得、加工與分佈。基因的解碼及利用將成為未來的關鍵技術。其過程將對社會及經濟發展十分重要。經濟將益形植根於知識與訊息。在人類、動物、植物及微生物的遺傳組成中，隱藏著疾病起因、致病機轉、器官功能、老化、藥物治療的相關訊息。基因體研究將會幫助我們瞭解這些遺傳訊息，進而有助於發展新型藥物、疫苗及檢驗試劑。新科技結合了電腦與網路、產品及服務將隨之產生。以致病性微生物為例，病原菌基因序列的解密，為病原檢驗帶來新契機，新檢驗技術如定量即時分子檢驗、生物晶片等隨之開發出來。本人有幸經國合處之甄選，同意赴德研習「分子定量檢驗病原真菌—從基因體出發」二週，這段期間主要選擇南德慕尼黑城附近的雷根斯堡醫院附設微生物學研究所，研習定量分子檢驗技術。除希望能實際應用於檢驗研究業務上，亦能對提昇國內相關生技產業有所助益。

二、基因體計畫發展現況及其對分子檢驗之影響

隨著人類壽命的增長、生活型態的改變及環境的變遷，使得新的病害隨之崛起。最近的例子如 HIV 病毒引發愛滋病或 Prionen CJD(Creutzfeldt-Jakob-Disease)致病原引發的狂牛病。Prion 蛋白、病毒、細菌及真菌等病原均由基因體資訊組成，基因體的解碼揭密，針對病原與非病原基因資訊的瞭解與比較，為醫學研究開啟了全面闡明致病機制之新契機，使得吾人對於疾病的起因、器官之功能、致病機轉及老化之過程更行瞭解，並有助於瞭解遺傳性疾病如癌症、心血管疾病之危險因子，進而研發新型式預防及治療方式。

基因體計畫可望創造新產品及新製程，未來醫藥界將可以依據基因體研究分析基因產物、其生物功能及疾病相關、器官特異及發生學相關標的基因，並依據這些生物反應過程的知識設計藥物及診斷試劑。如此可望闡明疾病的分子致病機轉並有助於加速發展診斷及治療新標的。人類100,000個基因解碼完畢後使得基因體研究進入新紀元。從約3000個單基因的遺傳性疾病，僅有少於10%的分子遺傳機制被明確瞭

解。最明顯的例子如血友病，基因缺陷與凝血因子產物之相關性。未來即使是需經由多步驟且涉及多基因的缺陷的多因子疾病，經由全面的基因圖譜資訊可使得分子層次的探討更行容易。如癌症心血管疾病，新陳代謝疾病如糖尿病，一些中樞神經系統疾病及精神病等。晚近，preseniline的二個基因被鑑定出來，其改變會導致阿滋海默症。而在果蠅及線蟲身上亦發現preseniline基因。因此吾人可快速地在二物種上進行相關實驗以瞭解preseniline的細胞功能及其對細胞內蛋白質的運送及生長與發育調控的重要性。基因晶片技術及分析微陣列數據的發展，輔以對遺傳疾病及其症狀系統性之瞭解，將使得鑑定這類基因之速度大幅加快。這也導致首次基因療法的成功。將Adenosindesaminase 基因轉移至此基因缺陷的患者身上，可望改善患者嚴重免疫缺損之症狀。利用細菌生產胰島素屬於基因科技及基因體研究的一個重要里程碑。現在幾乎有90%的糖尿病患者都用遺傳重組胰島素治療。遺傳重組胰島素較諸從動物萃取的安全性高且無副作用。重商業角度觀之遺傳重組胰島素也十分重要。1997年末共有48個遺傳重組藥物在德國銷售，營業額約18億馬克（約

360億台幣)。基因訊息的解密使得這類基因藥物種類大幅躍升。如洗腎患者重要的紅血球增生素(Erythropoietin)之生產也是有賴基因工程才得以實現。最近的例子則是從11個蛋白酶抑制劑中挑選二種加以提煉以對抗HIV病毒。肺結核、傷寒、胃癌等感染性微生物全基因圖譜的解讀，使得有助於發展對抗這些可怕病原的策略。相同原則亦適用於對抗植物及動物病原，相較於傳統的抗生素及農藥，新藥物可望提高專一性，降低副作用。治療用藥物的生產將會與智慧型電腦製程結合，鑑別並模擬分子作用標的(藥物標的)。未來人類個別基因組合將對於個人化藥物選擇及劑量使用有關鍵性影響。未來臨床研究上醫藥基因體學將對於發掘藥物新作用標的及避免副作用上扮演舉足輕重角色。除醫藥領域成功的例子，其他領域如農業食品工業，生物技術及環保科技等領域亦可望藉此提煉新產品及發展新產程。在這些領域基因體研究會對民生經濟會較諸醫學領域有更深遠的影響。

基因體研究可望製造新的工作機會，基因體研究過去數年來年帶動了許多具有商業潛力的關鍵科技，未來在工業分

項目和製造大量工作機會將取決於後續發展和這些科技的應用。正如美國的發展範例，基因科技的創新潛力創造出具國際競爭力產品和新的工作機會。1997年德國生物技術報告顯示營業額達44億馬克，總計465家大小生物科技企业研究和發展領域雇用10,000工作人員。尤其令人鼓舞的為在生物技術核心領域新成立許多中、小型公司。在1997年有173家中小型企業成立雇用了4000名員工，相較之下1995年僅75家；1996年僅104家。將這些數字與其他國家尤其是美國比較之下，美國在1997年在這項科技領域約成立了1270家中小型企業提供14萬個工作機會。這項趨勢亦顯示德國的生物技術工業在強調創新的國際生物技術居於領導地位。現在更是繼續運用先發的優勢，趁勝追擊。在美國很早就體認到基因體研究對經濟發展的重要性並充分應用。結果成立了許多新的生物技術公司，很快的成功結合基礎學術研究和發展工業應用研究。在德國經歷初期對基因科技的疑慮，現已充分瞭解基因體研究之遠景及龐大潛力。明確提供的益處，目前民眾至少在診斷和治療人類疾病方面對這項科技給予正面評價，德國較諸其他國家在投資基因體研究上的投入仍有很大有待努

力的空間。德國每年公共投資約 7 千萬馬克於基因體研究。各領域分配分別為：人類基因體研究(4 千萬馬克)，植物基因體研究(目前 5 百萬馬克)，微生物(約 7 百萬馬克)和科技發展(約 2 千萬馬克)。放眼其他國家美國也是居於領先，美國將基因體研究置於非常高的優先順序。單以政府機構來的經費即超過德國約十倍。以人類基因體研究為例，在美國 1998 年投資 2 億 5 千萬美金。此外，在美國也有大量的投資來自私人企業。私人公司如 HGS (人類基因體科學公司)，千禧醫藥公司，Incyte 醫藥公司，Celera- PE-生物系統公司和其他生物技術公司其研究經費之規模與公家機構不相上下。另一個例子則是在哈佛大學成立基因體及蛋白質體中心。針對這個及奈米科技研究中心將投入 7 千萬美金。而歐洲國家如英國和法國因為及早開始於基因體研究競爭上搶得先機如劍橋的 Sanger 中心(英國)或在 Evry 的 Genthon (法國)。德國雖然起步雖晚但也逐步趕上搶奪先機。在 1996 年成立的國家人類基因體計畫發展傑出。僅僅二年內，一個新的充滿活力的生物技術工業應運而生。法律週邊條件已有大幅改善，社會對這些科技的接受度也大幅提高在許多大學城成立了許多科技園

區，將研究成果實際落實為創新產品。德國於工業化國家中位居領導地位，不僅擁有高教育素質極高成就動機的自然科學家、工程師及專業技術人力，也配備有極高效率之交通、通訊及寬頻網路基礎建設。德國在自然科學基礎建設之世界競爭力是無庸置疑的，這也可以從德國出了一系列的物理、化學、生物及醫學諾貝爾獎得主的輝煌紀錄獲得印證。這些領域之競爭力為新興起之基因體研究奠定了厚實的基礎，尤其是在闡明基因與疾病相關性上之研究。

微生物基因體小而完整，其序列分析工作較諸其他物種來的快且有效率。全球微生物基因體解碼及分析的競逐正如火如荼的展開。近來發現，除傳統病原菌外許多人類身體的正常菌叢也與某些人類疾病息息相關，例如心血管和癌症。基因體研究將有助於釐清因果關係，並闡明其致病機轉。藉由使用DNA探針可在最短時間內鑑別人類、動物和植物的病原，如此可省卻冗長的培養過程。尋找參與複雜的宿主-病原交互作用特定基因並加以定性。比較病原和非病原基因序列組成對於鑑別致病因子和致病機轉十分必要。藉由探討模式

生物並將結果擴及至病人及族群在微生物感染時易罹性 (susceptibility) 之差異。這些新知也可望成為鑑別新藥物標的 (藥物targets) 和發展專一性高，效果強的抗生素，疫苗的基礎。地球上據估計僅有10%的微生物為人類所知。基因體研究開啟了不需培養經過活體直接偵測的可能性。如此一來，不僅可讓我們詳細瞭解整體生態系統的生物多樣性的組成，亦可讓我們進一步明白早期演化及生物起始的奧妙。此外，一些具備特殊新陳代謝功能的微生物，往往能夠適應特殊的生存條件，這些極端微生物也形成微生物學的特殊熱門研究領域。基因體研究將對這些微生物應用於合成新的生物分子(新陳代謝工程)和發展新的生物程序(環境清潔，材料提煉，環保替代能源)上提供無窮的潛力。微生物是基因體研究基礎科技重要材料。除例行性的利用基因突變分析基因功能工作，全基因體表現之探討(轉錄質體Transkriptome和蛋白質體Proteome)也是持續進行研究的一部份。

分子檢驗上，尚包括DNA晶片科技之測試。現在生物反應器內的醱酵過程或微生物的特殊催化反應，如廢水處理裝

置，均能自動監控。其應用領域甚至延伸至食品和飲水的品質管制。DNA晶片能偵測極微量的外來微生物。基因體分析未來亦將例行性地應用於食品工業和生物技術的生產菌株製程關鍵因子之控制上。抗原及抗體晶片未來可望應用於感染症血清學快速診斷上。黏覆有多種病原抗體之生物晶片，可檢測病原及病原毒素。黏覆有多種病原重組抗原之生物晶片，可檢測病患血清中病原抗體。蛋白質晶片可望成為多項分析之利器，尤其是在鑑定不具特異病徵疾病時（如高燒）或是不同病因可能造成相同病徵時（如關節炎、自體免疫等）幫助甚大。將多種病原或因子固定在晶片上，可大舉節省時間及金錢，並可使病人得到及時的治療。病床邊及時診斷的夢想不再遙不可及。

對生物晶片、利用基因體或蛋白體研究，衍生出的診斷技術及儀器創新的診斷技術生物晶片長足進展對診斷領域影響甚大生物晶片開啟了診斷技術的新紀元。實驗室基於成本考量，近年來診斷技術益朝自動化、微小化及多因子檢測分析發展。此領域大進展應屬最生物晶片，尤其是DNA晶片。

其他平行發展的系統尚包括珠粒科技和微流體系統。DNA 晶片已獲商業化重要性，相較之下蛋白質晶片仍有待成熟。不過在德國由於健保並無計畫給付因此市場阻力仍大。生物晶片為標的分子平均的塗佈在晶片上以供分析的陣列，塗佈固定化的物質可為 DNA，RNA，peptides，蛋白質等生物學分子，甚至全細胞。點若小於 200 μm ，則稱為微陣列。若大於 300 μm ，則稱為巨陣列。現今現今技術晶片陣列密度可高達數百萬點。生物分子可直接於晶片上合成 (in situ process)，這是 DNA 晶片最普遍的生產方式。至於 ex situ 製程，則是分子於晶片外合成接著以一定量置於晶片上。一般而言，廠商生產各種因應不同應用需求的生物晶片；客戶分析各種待測樣本。整合系統則是生物晶片首先自動化固定化標的分子於晶片表面上，接著是與對應分子分子鍵結，從待分析和偵測樣本並包括利用特殊軟體分析結果。

微小化分析可望節約材料及藥劑而大舉節省成本。此外因為微陣列的敏感度高，樣品需求量較低。在單一實驗同時分析數千個變數成為可能，故可大舉節省時間。此外，高度

的自動化，更大幅提高再現性。生物晶片主要應用於醫學及醫藥工業。亦應用於食品工業，例如，偵測基因改造之食品。環保技術上則可偵測某些微生物的可能污染。依表面分子種類而定，晶片種類有 DNA 晶片，蛋白質晶片，細胞晶片，晶片上實驗室。最常見為 DNA 及蛋白質晶片。

DNA 晶片為最早的生物晶片已發展且目前佔生物晶片市場最大宗。領航者為美國 Affymetrix 公司，數年前推出基因晶片，單一晶片可塗佈 400 000 點。DNA 晶片，片段之單股核酸能鑑別標的分子，包括寡去氧核糖核酸，cDNA，RNA 甚至整段染色體。PCR 增幅和寡核甘酸合成使得生產高專一性標的 DNA 分子成為可能。標的可能為人類、老鼠、酵母菌或細菌來源。固定表面的 DNA 分子可以 *in situ* 或 *ex situ* 合成之。分析標的為核酸分子，不過前提為這些核酸分子需先用螢光呈色物質加以標幟。DNA 晶片主要原理為固定化在晶片表面上的標的分子檢體來的游離、已標幟之分子雜和。待測檢體之單股核酸分子與固定晶片上互補之片段做高專一性結合。被結合之標幟分子可以光學或電子學偵測。光學偵測

量測的是標幟分子上的螢光，冷光或放射性物質。訊號強度可加以定量。樣本中物質濃度越高，訊號越強。電子偵測原理為單股 DNA 導電能力較雙股差；不過無法區分雜和與未雜和 DNA。DNA 晶片是典型的"高通量"雜和系統。單一實驗可產生大量資訊接著以特定軟體加以分析。

DNA 晶片可應用於許多領域。主要應用領域在於探討基因表現。例如探討在某些組織的基因活動例如，表現樣式可比較在健康與疾病組織間。單一陣列可比較分析二種不同樣本。mRNA 從組織分離分析並轉為 cDNA，二種待比較樣本的核酸以不同螢光物質標誌。一個微陣列可同時雜合二種不同樣本。結果為多種顏色的螢光樣式。經過分析可鑑別僅在疾病組織中活化基因。分析健康和疾病的組織樣本表現樣式可提供許多疾病基因活動改變之訊息例如，高血壓、阿滋海默症's 病和提供治療選擇之參考。

因此，醫藥工業也利用 DNA 晶片發展活性物質。可定義加入藥物前後在組織的表現樣式及探討基因樣式對醫療物

質治療之反應。應用 DNA 晶片鑑別序列，例如建立 SNP (single nucleotide polymorphism，單核苷酸多樣性)樣式。基因的單核苷酸置換可能造成蛋白質變異和影響個體對特定疾病之傾向。一個病人的 SNP 樣式可代表針對某些疾病的基因背景和個體個別治療的可能性。在法醫學，可能利用 DNA 晶片生產基因指紋。從個別待測物質(如血，唾液，皮屑或毛囊)分離和複製 DNA 後，嫌疑的標的分子在晶片上雜和。每一個體有其獨特的基因序列，比較基因指紋可用以鑑別特定個人。

蛋白質晶片方面，人類基因體計畫全序列定序完畢後主要焦點將集中在鑑別各別基因之功能，這將顯現在轉譯的蛋白質。生物系統 mRNA 樣式可藉助於傳統 DNA 晶片闡明。但蛋白質樣式和蛋白質活性並不全然相對應。因此，DNA 晶片所提供細胞過程資訊有限。從 DNA 晶片技術優點轉移至蛋白質分析。尤其在蛋白質體研究領域意味著探討蛋白質功能和其在細胞之交互作用，對蛋白質晶片興趣大增。瞭解生物學系統或系統生物學需要蛋白質相關知識。發展蛋白質生物晶片，面臨許多問題，DNA 和蛋白質化學和物理性狀差異甚

大，從物化觀點，核酸為穩耐分子，蛋白質則對外在影響相當敏感，如溫度，酸鹼值，離子濃度等相當敏感。對特定蛋白質，偏移最適條件將造成變性，因此失去生物學活性。不同於蛋白質，核酸的化學性狀很相似，僅由四種核苷酸組成。相反的，蛋白質形成較多不同物質種類。它們包含了 20 種化學性狀截然不同的氨基酸(親水性/疏水性，酸性/鹼性)。不僅如此，許多蛋白質僅於特定物理化學環境發揮功能性狀。DNA 能利用 PCR 方法快速且便宜的增幅或小片段合成，蛋白質方面卻無類似 PCR 快速低成本增幅的方法。相較於蛋白質，DNA 鏈的互補雜和相當容易。為確保蛋白質和標的分子在晶片上，有必要保持 3-D 結構。總之，對蛋白質晶片的需求遠高於 DNA 晶片。這也是為何如此少的蛋白質晶片上市。

蛋白質晶片應用領域，抗體陣列，抗體陣列各種抗體被固定化至晶片表面。他們主要備用來製備蛋白質表現樣式。依外在因子的變化例如，年齡，壓力及疾病，可檢視某些蛋白質的出現。例如，可作為診斷標誌，應用於鑑別特定臨床狀況的蛋白質。一般而言，蛋白質陣列有特定的重組蛋白質。

主要探討功能與交互作用。此外，主要檢視酵素-受質反應，受器-官能基交互作用及蛋白質-蛋白質交互作用。例如，將固定化生物分子，與可能有作用的蛋白質作用，以鑑別結合某些代謝物的蛋白質。目的為生產包含生物全蛋白質體之蛋白質晶片並適合探討複雜功能。蛋白質陣列亦被用於診斷以探討免疫狀態。在此，抗原抗體反應被固定化。固定化抗原使得在病人血清偵測各種病原抗體成為可能。多數的醫藥標的多集中於蛋白質。這就是為何蛋白質晶片被用於尋找物質。測試是否為新物質接合至固定化蛋白質或測試醫藥物質對某些蛋白質有作用。目的在鑑別潛在的藥物標的，例如，由生理失序造成的蛋白質變化。

德國基因體計畫之現況：以生物醫學為重點的

Helmholtz 中心為德國人類基因體計畫重鎮，不僅為策略性機構，對整體德國學術競爭能力亦發揮正面影響，目前有一系列發展顯示這種動能。在此包括其他衛星中心和資源中心如柏林 Max-Delbrueck 的分子醫學中心(MDC)、海德堡的德國癌症研究中心(DKFZ)、德國生物技術研究中心(GBF)及 GSF 研

究中心。GBF 從事第 21 號染色體序列分析及利用基因 Trap 或 ENU-致變方法系統性的生產變異種老鼠，最近新改造為微生物學基因體研究中心，以研究宿主-病原-交互作用為重點。GSF 則致力於健康和環保問題。NGFN 成立於 2001 年，獲得聯邦政府一億八千萬歐元（匯率 41，約台幣 74 億）補助，宗旨在於發現疾病的遺傳因子並發展新一代治療藥物。NGFN 包含五大重點—癌症、新血管疾病、神經系統疾病、環境引致之疾病、感染及發炎相關疾病。主要資助五個卓越研究單位為德國海德堡癌症研究中心，布朗希威格生物技術研究中心，慕尼黑環境及 GBF 致力於以基因體解讀為重點的生物資訊學，並以宿主-病原交互作用作為未來的核心研究領域。尤其在於鑑別可能調控相關的基因體序列為主要重點。基因體研究經由將成為生物學研究活動原動力之一。不論國家或國際經驗均顯示傑出的研究需整合資源，研究和群體的串聯合作，尤其及終於具競爭力的明確重點。基於 NGFN 於短期之內績效卓越並成功的將學術研究轉換為商品化企業，德國政府宣布，打算於未來三年再分配一億三千五百萬歐元（約台幣 55 億）給國家基因研究網(NGFN)。在政府大力捍

注下，已有陸續會有豐碩的有專利成果。這些增加的補助可望進一步縮短研究所需時程。為吸引美國生技公司來德國設立子公司，德國祭出獎勵優惠為：聯邦政府配合資金 300 萬美元，德國創投基金 300 萬美元，地方政府 300 萬美元。

三、研習分子定量檢驗病原菌分子定量檢驗實務

感染為全世界最常見之死因。許多疾病是由感染引起或受其影響。此次研習單位為德國雷根斯堡大學附設醫院醫學微生物及衛生研究所(Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Universitätsklinikum Regensburg, Franz-Josef-Strauß-Allee 11)，在 Dr. Udo Reischl 的分子檢測實驗室學習及時定量檢測感染性微生物之實務（圖一、二）。

Dr. Reischl 負責除病毒以外所有其他病原的分子檢驗（包括細菌、真菌、寄生蟲等病原）。由於他們平常即例行性提供醫院臨床檢體病原分子檢驗服務因此實務經驗豐富。研習期間實際學習他們各種檢體處理流程及分子實驗室嚴格的操作管理，包括如何嚴格執行 three-room-policy，以避免偽陽性結果的產生（圖三）。此外，該實驗室又是羅氏藥廠(Roche) 分子檢驗的合作實驗室，因此更有德國第一手有關分子檢驗的最新技術資訊。在他們實驗室也學到從基因體資料做基因蒐尋、比對、引子及探針設計等技巧。

在他們實驗室的方向可大約概述如下：

發展臨床相關病原的特異性檢驗及流行病學分型高敏感度方法

發展新的可靠的樣本製備方法及評估適合的引子及探針。重點在發展高敏感病原檢測方法如結核桿菌 (*Mycobacterium tuberculosis*, TB)，非典型分枝桿菌(atypische Mykobakterien, MOTT)，退伍軍人病桿菌 (*Legionella pneumophila*)，多重抗藥性金黃色葡萄球菌 (Multiresistente *Staphylococcus aureus*, MRSA)，出血性大腸桿菌 (Enterohämorrhagische *Escherichia coli*, EHEC)及沙眼批衣菌 (*Chlamydia trachomatis*)。經由直接比較 30 多種不同引子對建立了高特異性及敏感 PCR 方法偵測臨床檢體中伯氏疏螺旋體(*Borrelia burgdorferi*)。

值得一提的是他們從臨床檢體發現許多新的分枝桿菌品種，並加以分離及定性，並與瑞士公司合作建立分枝桿菌的序列資料庫，以供序列比對鑑定種別。

發展核酸分型技術建立分子流行病學資料如 RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)分析方法分析 *Mycobacterium tuberculosis* 及 *M. avium*。以及建立隨意引子 (Arbitrarily Primed, AP)PCR 分析病人及環境檢體腦膜炎球菌或退伍軍人菌。

發展更快速，特異性及可自動化的 **RAPID CYCLE REAL-TIME PCR** 檢測系統

在面臨感染病例時，儘快獲得微生物學結果對於特異性及成功地投藥治療相當有助益。發展可直接從臨床檢體分離核酸的 PCR 檢測系統。測試"LightCycler" PCR 系統及"MagNA Pure LC"儀器的創新型技術平台，並評估用於自動化樣本製備及增加分子檢驗的再現性之可行性。

發展病原特異性 PCR-快速檢測系統應用於直接檢測百日咳 (*Bordetella pertussis*)，副百日咳菌 (*Bordetella parapertussis*)，肺炎批衣菌(*Chlamydia pneumoniae*)，肺炎黴漿菌(*Mycoplasma pneumoniae*)，肺炎鏈球菌(*Streptococcus*

pneumoniae)，嗜血桿菌(*Haemophilus influenzae*)，白喉桿菌(*Corynebacterium diphtheriae*)，幽門螺旋桿菌(*Helicobacter pylori*)，弓蟲(*Toxoplasma gondii*)，腦膜炎雙球菌(*Neisseria meningitides*)，無乳鏈球菌(*Streptococcus agalactiae*)，腸道出血型大腸桿菌 (EHEC)，及檢測 MRSA 及 Clarithromycin-resistant *H. pylori* 抗藥性相關基因。臨床評估及驗證檢測法系統並與國家及國際參考實驗室針對特定病原建立密切合作關係。

發展快速及可自動化病原基因分型方法

在快速檢測及鑑別細菌性病原上微生物學實驗室日益依賴核酸相關方法。核酸檢測方法較諸依賴表現型的傳統檢測方法快速、特異性及易於標準化。一般微生物學往往應用 PCR 特異性檢測特定病原或致病因子，主要在建立生體外增幅細菌性基因體片段之方法，如 16S rDNA 或核糖體 ITS 區域具備高保守性及高變異性，並具有種別特異性區段。除了一系列已知病原外尚可發現新的迄今未知細菌的種別及於 DNA 層次加以定性。增幅產物可加以定序或以特異性 DNA 探針雜

和以正確地區分種別（圖四）。自動化的偵測可應用具有不同 DNA 探針陣列的生物感測器。獲得各種不同病原精確及全面性的序列資料。這些序列資料能反映臨床菌株的變異性，儲存經驗證的序列資料庫，並選擇適當的探針序列固定化於表面以發展生物感測器。

發展高敏感非培養方法快速檢測及鑑定臨床相關病原

經由一系列臨床案例(如經由眼睛未明原因感染或懷疑細菌性腦膜炎)迫切需要快速檢測及鑑定致病原。雖然傳統微生物學方法往往可以應付所需，再處理病人時，培養鑑定病原往往耗時太久或根本無法分離。核酸檢測技術則不需培養出病原。主要方法為 PCR 檢測及快速鑑別真菌、革蘭氏陽性及陰性細菌、葡萄球菌屬、鏈球菌屬、大腸桿菌 (*Escherichia coli*)、棒狀桿菌 (*Corynebacterium*)、初油酸菌屬 (*Propionibacterium*)、嗜血桿菌屬 (*Haemophilus spp.*)及芽胞桿菌屬 (*Bacillus spp.*)、腦膜炎雙球菌 (*Neisseria meningitides*)，*Toxoplasma gondii*、*Acanthamoeba* 及 *Leptospira*. 等

發展新的增幅及檢測方法於數小時內得到可靠的結果。
探討水晶球體發炎相關病原如檢測罕見病原如李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*)、螺旋菌(*Spiroplasma spp.*)、無乳鏈球菌 (*Streptococcus agalactiae*)及貓抓熱巴東體(*Bartonella henselae*)。

檢驗實務上，針對各病原的檢驗策略及標的基因如下：

A. 一般性檢測及鑑別方法

A.1. 16S rRNA 基因的增幅與雜和 (Reverse Dot-Blot)

1. **Eubacteria** 專一性引子對能區分革蘭氏陽性與陰性

2. 真菌專一性引子對

A.2. 增幅並定序 16S rRNA 基因 (鑑定種別)

1. **Eubacteria** 專一性引子對 ("Bacteria-PCR")

2. 真菌專一性引子對 ("Fungi-PCR")

B. 專一性檢測及鑑別方法

B.1. Mycobakterien (PCR)

1. *M. tuberculosis* 菌群 (16S rDNA; COBAS, LCx)
2. *M. tuberculosis* 菌群 (IS 6110)
3. *M. avium* / *intracellulare* (16S rDNA; COBAS)
4. *Mycobacterium spp.* (16S rDNA 及定序)
5. *Mycobacterium spp.* (65 kD Antigen 基因)
6. *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. spp.* (Multiplex PCR)

B.2. 腸道病原 (PCR)

LightCycler PCR:

1. 出血性大腸桿菌 (EHEC) (stx-1, stx-2, hlyA 和 eae-Gene)
2. 產毒性大腸桿菌 (ETEC) (ST, LT 基因)
3. 病原性大腸桿菌 (EPEC) (EAF 質體)
4. 聚合性大腸桿菌 *E. coli* (EAEC) (奇特 DNA 片段)
5. 侵襲性大腸桿菌 *E. coli* (EIEC) / *Shigella sp.* (ial 基因)

傳統 PCR:

1. *Salmonella spp.* (特異 DNA 片段)

2. *Yersinia enterocolitica* (16S rDNA)

B.3. *Borrelia burgdorferi* / *B. afzelii* / *B. garinii* (PCR)

1. Flagellin 基因

2. osp A 基因

3. 16S rDNA

B.4. *Neisseria meningitidis* (LightCycler PCR)

1. Inverted Repeat Element IS1106 (對 Meningococcus 具特異性)

2. ctrA (capsular transfer gene)

B.5. *Corynebacterium diphtheriae* (LightCycler PCR)

1. Diphtherie-Toxin Gen

B.6. *Legionella pneumophila* (LightCycler PCR)

1. MOMP Gen (major outer membrane protein)

2. 16S rDNA

B.7. *Neisseria gonorrhoeae* (PCR)

1. pilE 基因
2. rmp8 Gen

B.8. *Chlamydia trachomatis* (PCR)

1. Abbott LCx 檢測系統
2. pTTC-7 質體

B.9. *Chlamydia pneumoniae* (LightCycler PCR)

1. 專一性 PstI-片段

B.10. *Mycoplasma pneumoniae* (LightCycler PCR)

1. P1 黏覆蛋白基因

B.11. *Haemophilus influenzae* (LightCycler PCR)

1. P6 外膜蛋白

B.12. *Moraxella catarrhalis* (LightCycler PCR)

1. glycyl-tRNA synthetase beta subunit (GlyRS)

B.13. *Streptococcus pneumoniae* (LightCycler PCR)

1. 16S rDNA

B.14. *Pseudomonas aeruginosa* / *P. cepacia* (PCR)

1. 16S rDNA

B.15. *Staphylococcus aureus* (PCR)

1. Exfoliatives Toxin A 基因
2. Exfoliatives Toxin B 基因
3. Toxic shock syndrome Toxin 基因
4. Enterotoxin A 基因
5. nuc 基因(具種別專一性)

B.16. *Toxoplasma gondii* (LightCycler PCR)

1. P30 MOMP 基因
2. Kryptisches Multicopy Gene element (300 Kopien)

I. B-1 Multicopy Gene element

B.17. *Pneumocystis carinii* (PCR)

1. 粒腺體及核糖體 RNA

B.18. *Helicobacter pylori* (LightCycler PCR)

1. Urease Gen (對 *H. pylori* 具專一性)
2. 16S rDNA (檢測並鑑別 *Helicobacter* spp.; 如 *H. heilmanii*)

B.19. *Bordetella pertussis* (LightCycler PCR)

1. Inverted Repeat Element IS481 (對 *B. pertussis* 具專一性)

B.20. *Bordetella parapertussis* (LightCycler PCR)

1. Inverted Repeat Element IS1001 (對 *B. parapertussis* 具專一性)

B.21. *Bartonella henselae* (PCR)

1. 16S rDNA

B.22. *Bacillus anthracis* (PCR)

1. 專一性 *Plasmid pX01* (*protective antigen 基因*)
2. 專一性 *Plasmid pX02* (*capsule region 的 B 和 C 基因*)

B.23. *Leptospira spp.* (PCR)

1. 16S rDNA

B.24. *Candida albicans* (PCR)

1. 28S rDNA

B.25. *Aspergillus spp.* (LightCycler PCR)

1. 18S rDNA

B.26. *Candida spp.* (LightCycler PCR)

1. 18S rDNA

B.27. *Cryptococcus spp.* (LightCycler PCR)

1. 18 S rDNA

C. 流行病學檢測

C.1. 限制酵素片斷多型性(Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP)

1. *M. tuberculosis* 菌群 (IS6110 / PvuII)

2. *M. tuberculosis* 菌群 (Mixed-Linker PCR)

3. *M. avium* (IS1311 / PvuII)

C.2. Intergenic Region 16S - 23S RNA

定序多變異間隔區可得到病原菌流病上的類緣關係

C.3. 利用隨意引子(arbitrarily primed, AP) PCR 方法快速精確病原細菌與真菌流行病學調查(包括 *Staphylococcus*, *Legionella*, *Helicobacter*, *Pseudomona* 及其他高抗原性病原菌)

C.4. 脈衝式電泳(Pulsed Field Gelelektrophorese, PFGE)法
für aussagekräftige 病原細菌與真菌流行病學調查(包括
Staphylococcus, Legionella, Pseudomonas, Haemophilus,
Serratia, Escherichia, Proteus, Enterobacter, Listeria,
Streptococcus, Klebsiella, Acinetobacter, Campylobacter,
Neisseria, 及各種 Candida).

D. 檢測抗藥性機制

D.1. Staphylococcus (LightCycler PCR)

1. mecA 基因 (Methicillin 抗藥性)

D.2. Enterococcus (PCR)

1. van A, B, C, 和 D-基因 (Vancomycin 抗藥性)

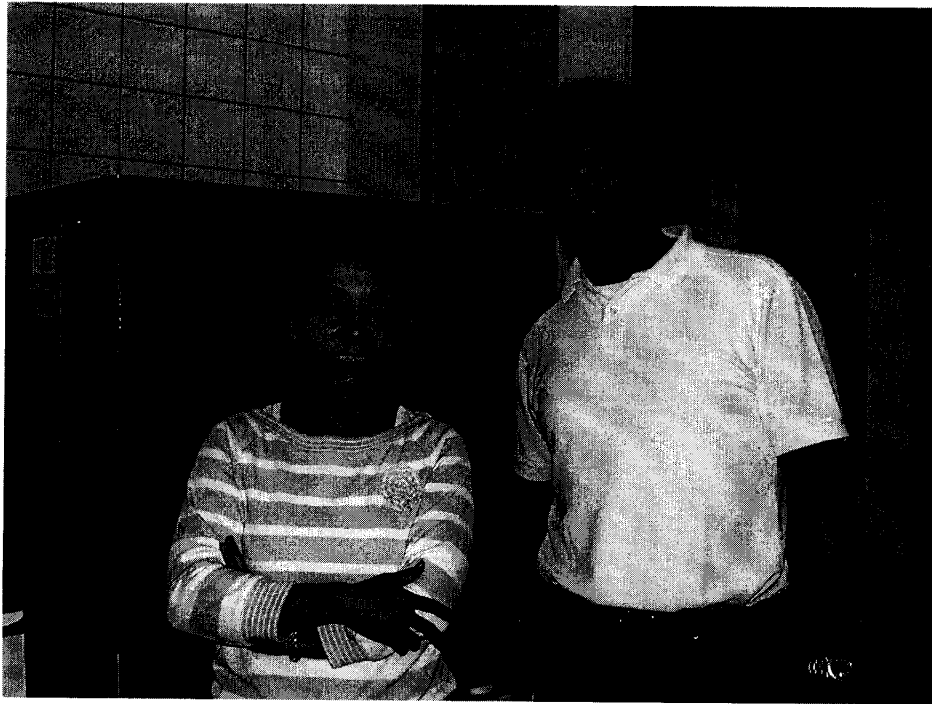
D.3. Fluoroquinone-抗藥性 (PCR /定序)

1. gyrA 基因
2. parC 基因

D.4. *Helicobacter* 的 Clarithromycin 抗藥性 (PCR/定序)

1. 利用核酸定序檢測 23S rDNA 內典型的突變
2. LightCycler PCR 系統直接檢測

這些檢驗方法的發展未來受基因體計畫的衝擊，勢必更加推陳出新。這次研習學習檢驗流程實務，尤其是學到了病原真菌、批衣菌、黴漿菌的快速檢驗方法，在研習期間即將所學方法傳真回實驗室，同步建立方法，並將這些先進檢測方法實際應用於國內 SARS、發燒篩檢、不明原因肺炎的檢驗上，對於釐清國內相關疫情亦有所助益。此外，並學習利用豐沛的公共基因資料庫找尋所需基因標的並依實驗需求設計出所需序列。未來希望能更強化從基因體計畫資料探勘資料，進而全基因體蒐尋更多、更全面的檢驗與流病調查相關的標記，進而發展相關檢驗試劑及疫苗。



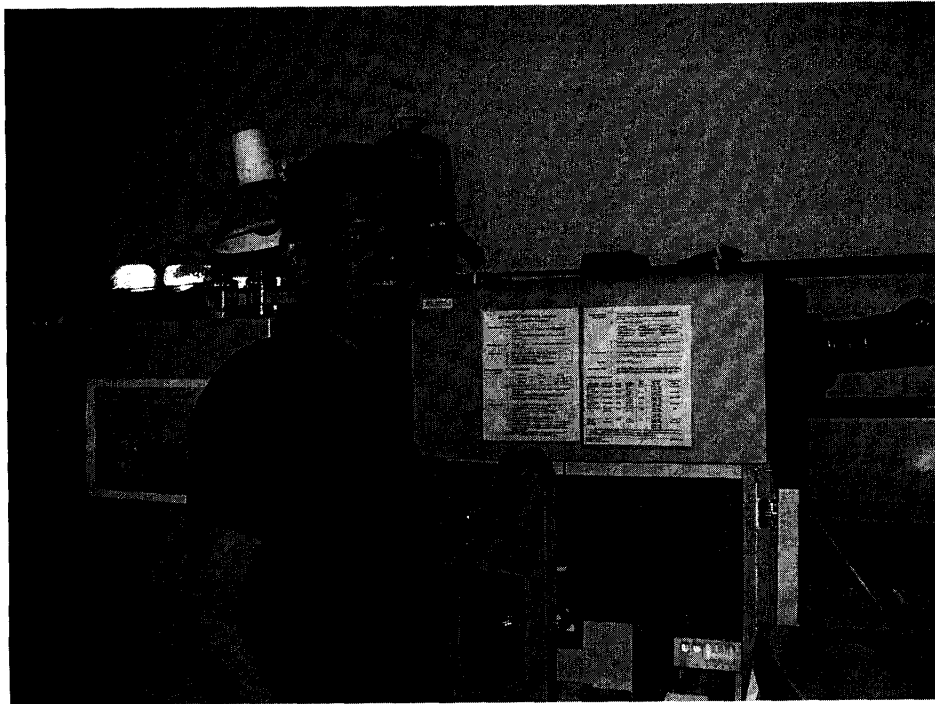
圖一、與研習實驗室負責人 Dr. Udo Reichl 於實驗室自動核酸
萃取機前合影。



圖二、與研習 Dr. Udo Reichl 實驗室同仁相處愉快，受益頗多，
合影留念。



圖三、PCR 實驗室的規劃依循 three-room-policy, 這間為 PCR 試劑準備室，對於可能受空氣污染的檢驗如檢驗 *Aspergillus* 等微生物時，試劑準備更在生物安全操作櫃進行。



圖四、序列分析日益應用於未知細菌、真菌檢體之檢驗，他們使用的核酸序列分析儀為 ABI310。

肆、心得與建議：

在世界舞台競逐上台灣和其他許多國家一樣，正面臨嚴峻的考驗，台灣若要擺脫經濟衰退的陰霾，持續保持優勢，拉大與開發中及新興工業國家（尤其是中共）之距離，並趕上科技列強，台灣必須在短期間內善用知識經濟，發展關鍵性高科技產業設法升級轉型，脫胎換骨。

生物技術向來是政府積極輔導的重要產業，發展生物技術也符合充分善用台灣生物多樣性、環保永續發展、高附加價值生產之目標。近年來在台灣，生物技術上的發展雖尚未有如電子產業般的明星產品出現，但也累積了豐沛的人力資源及關鍵性技術。許多國外研究報告也指出，台灣在發展生物技術上潛力雄厚，如何將這些量能化為具體的產業，是目前最重要的課題。此外，近年來生物資訊及基因體學的崛起，更為生物產業界帶來莫大的衝擊。有些學者將這比喻為全球性新一波的工業革命，不過不同於前一波的工業革命，競爭的標的已不再是原料的取得及加工，而是生物資訊的取得、加工與分佈。基因的解碼及利用將成為未來的關鍵技術。

全球基因體解碼的競逐正如火如荼的展開，在人類、動物、植物及微生物的遺傳組成中，隱藏著生長、分化、疾病起因、致病機轉、器官功能、老化、藥物治療的相關訊息。據估計，地球上僅有 10% 的微生物為人類所知。基因體研究開啟了不需培養經過活體直接偵測的可能性。如此一來，不僅可讓我們詳細瞭解整體生態系統的生物多樣性的組成，亦可讓我們進一步明白早期演化及生物起始的奧妙。一些具備特殊新陳代謝功能的微生物，往往能夠適應特殊的生存條件，這也形成特殊的熱門研究領域。基因體研究將會幫助我們瞭解這些遺傳訊息，進而有助於發展新食品、新型藥物、疫苗及生物晶片等檢驗試劑，並將在合成新的生物分子（新陳代謝工程）和發展新的生物程序（環境清潔，材料提煉，環保替代能源）上提供無窮的潛力。結合了電腦與網路各種的科技、產品及服務將隨之產生。其過程將對社會及經濟發展十分重要。所謂知識經濟將在此充分體現。能將各種生物物種全基因體基因資訊解讀、分析者，在後續應用及開發相關生技產品時將勢如破竹、如虎添翼。未能搭上這波潮流者，將

如生物界的文盲，在各項發展上瞠堂落後，徒呼奈何。

在美國很早就體認到基因體研究對經濟發展的重要性，因此將基因體研究置於非常高的優先順序並充分應用。投入數百億研發經費，很快的成功結合基礎學術研究和發展工業應用研究的結果成立了許多新的生物技術公司。在德國經歷初期對基因科技的疑慮，現已充分瞭解基因體研究之遠景及龐大潛力，政府約投入數十億台幣研發基因體計畫。德國雖然起步雖晚但也逐步趕上。而其他歐洲國家如英國和法國因為及早開始於基因體研究競爭上搶得先機如劍橋的 Sanger 中心(英國)或在 Evry 的 Genthon (法國)。

台灣擁有高教育素質極高成就動機的自然科學家、資訊工程師及專業技術人力，也配備有極高效率之交通、通訊及寬頻網路基礎建設在未來競爭上，若有好的輔導策略，仍可爭得利基。茲建議如下：

1. 強化知識經濟之概念：

- 甲、強化專利申請，加強研究人員專利及智財權保護的習

慣及能力，在各研究機構廣設專利相關人員，協助研究人員保護其可能具商機研發成果。

乙、訓練從研發成果辨識商機之能力。

丙、善用各育成中心，將研究成果實際落實為創新產品。

丁、建立行銷通路。

2. 人才的培育及教育訓練：

甲、積極解決與國外科技資訊的落差：

乙、就新科技而言，教科書的研讀無法及時傳達最新的知識，應由國家整合出資，廣為訂閱電子期刊，縮短時差。

丙、善用我國資訊大國的優勢，與尖端科技大學透過視訊、遠距教學合作汲取新知。

丁、個別派員出國研習有時成果有限，可設計階段性課程延請國外講師來台授課，資訊共享效果更好。

3. 應由政府帶頭大力發展基因體相關研究，投資研發經費。

以德國為例其重點分配相關經費為：人類基因體研究

和模式生物 (40 %)(包括倫理道德和法律問題)、植物 (20 %)、微生物 (20 %)生物資訊學未來發展(10%)核心設施，科技發展 (10%)。

4. 研究中心應將基因體研究列為重點研究項目。仿照國外的生技製藥產業的發展經驗，選擇正確的切入位置，同時結合政府及研究機構的蛋白質體研究中心資源，讓我國生技製藥產業得以掌握成功的關鍵。
5. 將全基因體研究的方法應用於檢驗試劑、疫苗的開發及流行病學的調查。

陸、致謝

感謝衛生署給予機會及經濟部之預算支應，亦誠摯地感謝疾病管制局尹蕙露小姐、經濟部國際合作處張玉燕小姐之安排與協助，使本人能順利完成本次研修。