

華人甲基丙二酸血症 *MMAA* 和 *MMAB* 基因之
分子遺傳學研究

Molecular Genetic Studies of the *MMAA* and *MMAB* Genes
in Chinese Methylmalonic Acidemia

研 究 生：張嘉玲 (Chia-Ling Chang)

指導教授：蕭廣仁 (Kwang-Jen Hsiao, Ph.D.)

蘇宗笙 (Tsung-Sheng Su, Ph.D.)

國立陽明大學
生命科學院
遺傳學研究所
碩士論文

National Yang-Ming University
School of Life Sciences
Institute of Genetics
Master Thesis

中華民國九十五年八月
August 2006

目錄

中文摘要.....	I
英文摘要.....	IV
壹、緒論	
一、甲基丙二酸血症之成因.....	1
二、甲基丙二酸血症之分類與臨床症狀.....	2
三、甲基丙二酸血症之鑑別診斷.....	3
四、甲基丙二酸血症之治療和預後.....	5
五、甲基丙二酸血症之產前診斷.....	6
六、 <i>cbl</i> 型甲基丙二酸血症之分子遺傳學研究.....	6
七、研究目的.....	7
貳、材料與方法	
一、檢體來源.....	8
(一) 正常人 DNA 樣品來源.....	8
(二) 對照組細胞 – GM1673；GM595 來源.....	8
(三) 甲基丙二酸血症病人及其家屬檢體來源.....	8
二、甲基丙二醯輔酶 A 變位酶 (MCM) 活性分析.....	13
三、基因變異分析.....	14
(一) 南方點墨法 (Southern blot).....	14
(二) 聚合酶鏈反應 (PCR).....	18
(三) 自動核酸定序及序列比對.....	20

(四) 核苷酸多型性變異分析.....	20
(五) 核苷酸多型性單套型分析.....	21
四、基因之 pre-mRNA 及 mRNA 表現分析.....	21
(一) RNA 之抽取.....	21
(二) 反轉錄聚合酶鏈反應 (RT-PCR).....	21
參、結果	
一、甲基丙二醯輔酶 A 變位酶 (MCM) 活性分析結果.....	25
二、MMAA、MMAB 基因核苷酸多型性分析.....	26
(一) MMAA 基因核苷酸多型性分析.....	26
(二) MMAB 基因核苷酸多型性分析.....	28
三、甲基丙二酸血症患者之基因突變與 RNA 表現分析.....	30
(一) MMAA 基因突變與 RNA 表現分析.....	30
(二) MMAB 基因突變與 RNA 表現分析.....	33
(三) MUT 基因突變分析.....	34
肆、討論	
一、MMAA 基因.....	37
二、MMAB 基因.....	38
三、MUT 基因.....	40
四、MMACHC 基因.....	41
伍、結論.....	42
陸、參考文獻.....	46
圖表.....	52
附件	

中文摘要

甲基丙二酸血症 (Methylmalonic acidemia, MMA) 為體染色體隱性遺傳之有機酸代謝異常疾病。通常於嬰幼兒時期發病，發病時血液及尿液中有大量的甲基丙二酸 (methylmalonate) 堆積。主因為患者粒線體中的甲基丙二醯輔酶 A 變位酶 (methylmalonyl CoA mutase, MCM, EC 5.4.99.2) 功能缺陷或其輔酶因子腺嘌呤核苷鈷胺素 (adenosylcobalamin, 其前驅物為維他命 B12) 生合成缺陷導致。臨床上甲基丙二酸血症因病因不同可區分成：*mut* type 及 *cbl* type MMA。*mut* type MMA 依患者甲基丙二醯輔酶 A 變位酶活性高低可再細分為 *mut*⁻ 及 *mut*⁰ 型；*cbl* type MMA 為 adenosylcobalamin 生合成缺陷所導致，依 adenosylcobalamin 生合成過程中的缺陷之互補試驗 (complementation test) 可再區分為 6 型 (A、B、C、D、F、H)。

本研究以病人細胞甲基丙二醯輔酶 A 變位酶 (MCM) 活性、尿液中甲基丙二酸堆積、血液中高胱胺酸含量等生化指標及臨床症狀，對 12 名患者所罹患之甲基丙二酸血症分型：其中 1 名患者為 *mut* type MMA；11 名為 *cbl* type MMA (11 位 *cbl* type MMA 病患中有 7 位同時合併有高胱胺酸血症是 *cblC*、*cblD* 或 *cblF* type MMA)。本實驗以聚合酶鏈反應、自動核酸定序分析對血液中沒有高胱胺酸堆積的 *cbl* type 甲基丙二酸血症患者之 *MMAA* 和 *MMAB* 基因作基因突變分析以便進一步瞭解華人 *cblA*、*cblB* type MMA 之可能致病機轉。針對 *MMAA* 基因上的 5 端與 3 端非轉譯區、轉譯區及外顯子和內含子接連處進行核酸定序分析研究共發現 12 個 SNP (Single Nucleotide Polymorphism 單核苷酸多型性)，其中 5 個為國外已發表的 SNP - c.-2263A/C、c.-1755A/G、c.-1391A/T、c.-996C/T、c.1089G/C 及 7 個新發現之 SNP - c.-1740A/G、c.-713A/G、c.-469A/G、

c.67+52C/T、c.734-264G/A、c.819+168C/G、c.884+2678C/T。上述的 SNP 在華人族群中的分佈除了 c.-2263A/C 未進行實驗探討及 c.-469A/G、c.67+52C/T 未達 H-W equilibrium 外，其餘皆已達到 H-W equilibrium。在 *MMAB* 基因的分析上則有 4 個已被發表的 SNP - 56-57GC/AA、c.520-96C/T、c.585-204A/G、c.716T/A 及 3 個新發現之 SNP - c.-414C/T、c.520-159C/T、c.520-128C/T。上述的 SNP 在華人族群中的分佈除了 c.585-204A/G 未進行實驗探討外，其餘皆已達到 H-W equilibrium。上述的核苷酸多型性可作為日後研究基因啟動子、RNA 穩定性和 mRNA splicing 機制的連鎖標誌。

本研究針對 4 名可能為 *cblA* 或 *cblB* 或 *cblH* type MMA 病患進行 *MMAA* 和 *MMAB* 基因分析。在近親通婚家庭 MMA001 患者的 *MMAA* 基因找到一個同型合子之已發表的突變 c.742C>T，而在 *MMAB* 基因除了 SNP 外，並未發現任何致病性突變。MMA021 患者在 *MMAA* 和 *MMAB* 基因除了 SNP 外，僅在 *MMAA* 基因預測基因啟動子區找到可能的致病性突變 c.-504 C>T，該變異造成患者 pre-mRNA 表現量下降 40%。另兩名患者 MMA010、MMA011 除了在 *MMAA* 和 *MMAB* 基因僅發現 SNP 而未發現致病突變外，利用南方點墨分析的方法亦未發現 *MMAA* 和 *MMAB* 基因有大片段的刪除、插入、重組。針對這兩名患者的 RNA 表現進行探討，MMA010 family 患者在 *MMAA* 基因的 RNA 表現上並無異常，而在 *MMAB* 基因之 mRNA 表現上則有 intron 6 - r.519_520ins519+91_519+177 的保留，alternative splicing form 的 RNA 雖會造成提前終止轉譯（原應轉錄出 250 個胺基酸，但有了 intron 6 的保留，則在轉錄 173 個胺基酸後提前終止），但因為病人同時表達正常 splicing form 的 RNA，足以維持身體正常代謝機能的運作。MMA011 family 於 *MMAB* 基因的 RNA 表現上並無異常，而在 *MMAA* 基因之 pre-mRNA 表現上則少了一個 allele 的表

達，但這個現象並非 *MMAA* 基因的預測啟動子區域有基因變異所導致，成因尚待進一步研究探討。

英文摘要

Methylmalonic acidemia (MMA) is an autosomal recessive disease of organic acid metabolism caused by defects in mitochondrial methylmalonyl-CoA mutase (MCM, EC 5.4.99.2) or the synthesis deficiency of adenosylcobalamin that acts as a cofactor for MCM. Generally speaking, MMA patients often fall ill in infant stage and accumulate a lot of methylmalonate in blood and urine during acute illness. MMA is classified into *mut* and *cbl* type according to different complementation groups. Further, *mut* type MMA can be classified into two sub-type, *mut*⁻ or *mut*⁰, caused by partial or complete enzyme deficiency, respectively. *Cbl* type MMA caused by the synthesis deficiency of adenosylcobalamin can be classified into six complement groups, namely *cblA*, *cblB*, *cblC*, *cblD*, *cblF*, and *cblH*. Among which *cblA*, *cblB* and *cblH* are isolated MMA while *cblC*, *cblD* and *cblF* are combined MMA and homocystinuria.

Twelve patients with elevated urinary methylmalonate were included in this study and classified by clinical symptoms and biochemical findings for the MCM activity, accumulation of methylmalonate in urine and homocysteine in blood. One of these MMA patients was *mut* type and the others were *cbl* types. Two of these *cbl* type MMA patients were differentiated as isolated *cbl* type MMA; seven were combined methylmalonic aciduria and homocystinuria and two were unable to classify. In this study, both the *MMAA* and *MMAB* genes were scanned to identify the genetic mutation for four unrelated Chinese *cbl* type MMA patients without homocystinuria. DNA sequence analysis of the 5'-UTR, 3'-UTR, coding region, and the flanking regions of exons for the *MMAA* gene had identified twelve single

nucleotide polymorphisms (SNPs) in the Chinese population. Among which five SNPs, termed c.-2263A/C, c.-1755A/G, c.-1391A/T, c.-996C/T and c.1089G/C had been reported elsewhere while the others were novel SNPs, namely c.-1740A/G, c.-713A/G, c.-469A/G, c.67+52C/T, c.734-264G/A, c.819+168C/G and c.884+2678C/T. For the *MMAB* gene, we had identified four published SNPs, 56-57GC/AA, c.520-96C/T, c.585-204A/G and c.716T/A, and three novel SNPs, namely c.-414C/T, c.520-159C/T and c.520-128C/T. The SNP identified in the Chinese population for the *MMAA* and *MMAB* genes were in H-W equilibrium except c.-2263A/C (allele frequency not determined) and c.-469A/G for *MMAA* and c.585-204A/G (allele frequency not determined) for the *MMAB*. These SNPs in *MMAA* and *MMAB* genes may assist in studying promoter, RNA stability and mRNA splicing mechanism of these genes.

Mutation analysis of the *MMAA* gene for four unrelated Chinese *cbl* type MMA patients without homocystinuria had identified a c.742C>T and a c.-504C>T substitution. A homozygote of c.742C>T mutation (Q248X), which had been reported as a disease-causing mutation, was identified in the patient MMA001 from a consanguineous family. In the patient MMA021, we had found a c.-504C>T alteration in the predicted promoter region of the *MMAA* gene. RT-PCR combined sequencing analysis of the *MMAA* pre-mRNA for MMA021 had shown 40% decreased expression of the c.-504T allele as compare to the c.-504C allele. This data suggested the c.-504C>T mutation might affect *MMAA* expression and leads to the disease.

mRNA analysis of the *MMAB* gene for MMA010 patient had found to have some extent of intron 6 retention (r.519_520ins519+91_519+177) while the mRNA of the

MMAA gene expressed normally. This retention of intron 6 affects the original reading frame of the protein leading to pre-mature translation stop and produces a truncated protein with seventy-seven amino acids deleted at its C-terminus. However, this intron 6 retention was also found in normal lymphoblast cells suggesting alternative splicing in lymphoblast cells. None of the variation other than SNP in both the *MMAA* and *MMAB* genes (including the predicted promoter regions) was found in patient MMA011. RT-PCR analysis of the *MMAA* pre-mRNA suggested one of the *MMAA* allele did not expressed in this patient. The genetic mutation of MMA011 patient remains to be addressed further.

壹、緒論

一、甲基丙二酸血症之成因

甲基丙二酸血症 (Methylmalonic acidemia, MMA) 於 1967 年在國外首次被發表並探討、描述此疾病 (Oberholzer *et al*, 1967; Stokke *et al*, 1967)。該疾病為一種先天性有機酸代謝異常疾病，屬於體染色體隱性遺傳疾病，在美國發生率約為 1/48,000 (Coulombe and Shih, 1981)，台灣則尚未有此症發生率之統計資料，但已知為華人有機酸代謝異常疾病中最常見的疾病之一 (Tsao *et al*, 1986; Wong *et al*, 1992; Luo *et al*, 2003; Gu *et al*, 2004; Jin *et al*, 2004; Han *et al*, 2005)。患者通常於嬰幼兒時期發病。其血液及尿液中有大量的甲基丙二酸 (methylmalonate) 堆積，主要是由於患者粒線體中的甲基丙二醯輔酶 A 變位酶 (methylmalonyl-CoA mutase, MCM, EC 5.4.99.2) 功能缺陷或輔酶因子腺嘌呤核苷鈷胺素 (adenosylcobalamin, Adocbl，其前驅物為維他命 B 12) 生合成缺陷所導致 (Fenton *et al*, 2001)。

人體內由食物消化、分解所形成的支鏈胺基酸、奇數碳脂肪酸、膽固醇及胸腺嘧啶等在降解為丙醯輔酶 A (Propionyl-CoA) 後繼續羧化成 D-甲基丙二醯輔酶 A (D-Methylmalonyl-CoA)，經由甲基丙二醯輔酶 A 消旋酶 (methylmalonyl-CoA racemase, EC 5.1.99.1) 轉變成 L-甲基丙二醯輔酶 A (L-Methylmalonyl-CoA)，L-Methylmalonyl-CoA 由 methylmalonyl-CoA mutase 和 adenosylcobalamin 共同作用、異構化成丁二醯輔酶 A (Succinyl-CoA) 進入三羧酸循環 (Tricarboxylic Acid Cycle, TCA cycle)。Methylmalonyl-CoA mutase 或 adenosylcobalamin 的缺陷，均會造成體內 L-methylmalonyl-CoA 無法進一步代謝成 succinyl CoA 進入 TCA cycle，因此體內的 L-methylmalonyl-CoA 會走另外兩個次代謝路徑，造成血液及尿

液中堆積大量的 methylmalonate 和較少量的 propionyl-CoA 及其代謝產物 (β -hydroxypropionate 和 methylcitrate) (圖一) (Fenton *et al*, 2001) , 引起 methylmalonic acidemia 。

二、甲基丙二酸血症之分類與臨床症狀

臨床上甲基丙二酸血症因病因不同可區分成兩種類型

(1) *mut* type MMA (MIM251000) : 因為 methylmalonyl-CoA mutase 功能缺陷所造成, 又可再細分為 *mut*⁻ 及 *mut*⁰ 型。*mut*⁰ 型患者完全缺乏 methylmalonyl-CoA mutase 活性, 而 *mut*⁻ 型患者則具有正常人 2 % ~ 75 % 的酵素活性 (Fenton *et al*, 2001) 。

(2) *cbl* type MMA : 因為 adenosylcobalamin 生合成缺陷所導致, 依 adenosylcobalamin 生合成過程中的缺陷以互補試驗 (complementation test) 可再區分為 6 型 (A 、 B 、 C 、 D 、 F 、 H) 。其中 *cblC* (MIM277400) 、 *cblD* (MIM277410) 、 *cblF* (MIM277380) 型患者除了 adenosylcobalamin 生合成有機障外, 在合成高胱氨酸 (homocystine) 代謝為甲硫氨酸 (methionine) 所需的輔酶因子 methylcobalamin (MeCbl) 同樣發生問題, 所以除了甲基丙二酸血症外也伴隨有高胱氨酸尿症 (homocystinuria) ; *cblA* (MIM251100) 、 *cblB* (MIM251110) 、 *cblH* (MIM606169) 型僅在 adenosylcobalamin 生合成有缺陷, 故不會產生 homocystinuria , 但尿液有大量的 methylmalonate 堆積, 引發 methylmalonic acidemia (Fenton *et al*, 2001) 。

若為 methylcobalamin 生合成的機障, 除了有 *cblC* 、 *cblD* 、 *cblF* type MMA 患者外, *cblE* 及 *cblG* 型患者的 homocystine 代謝發生問題, 但因

不影響 adenosylcobalamin 生合成，故患者僅有 homocystinuria，不會有 methylmalonic acidemia（圖二）（Dobson *et al*, 2002）。

所有 methylmalonic acidemia 患者之血液及尿液中均可檢測出大量 methylmalonate。正常人一天排出 methylmalonate 的量少於 0.04 mmol，methylmalonic acidemia 患者的排出量可高達 2.1 ~ 49 mmol (240 ~ 5700mg)。正常人血漿中無法偵測到 methylmalonate，而患者血漿中 methylmalonate 之濃度則可達 0.22 ~ 2.9 mM (2.6 ~ 34 mg/dl) (Chalmers and Lawson, 1982)。mut⁰ type of MMA 患者通常較早發病，大約 80 % mut⁰ 型患童於出生後一週內發病，而多數 mut⁻、cblA 及 cblB 型出生超過一個月才會發病。主要症狀有餵食困難、嗜睡、反覆嘔吐、脫水、呼吸困難、昏迷、發育遲緩、肝腫大、代謝性酸中毒、酮血症 (ketonemia)、高血氨 (hyperammonemia)、高甘胺酸血症 (hyperglycinemia)、低血糖 (hypoglycemia) 等 (Matsui *et al*, 1983; Fenton, 2001)。methylmalonate 的累積會抑制糖質新生作 (gluconeogenesis) 與尿素循環 (urea cycle) 過程中的酵素，進而引起 hypoglycemia、hyperammonemia 及酸中毒等，此外，cblC、cblD、cblF 型患者體液中有較高之 methylmalonate 及 homocystine，但患者血清中血氨及甘胺酸 (glycine) 含量不會升高 (Fenton *et al*, 2001)。

三、甲基丙二酸血症之鑑別診斷

methylmalonic acidemia 之病因分為許多種，臨床症狀之表現、治療方式及預後亦不相同，鑑別診斷有助於 methylmalonic acidemia 之分類及診療之進行。患者發病時，可於尿液中檢測出大量 methylmalonate。雖然惡性貧血患者之尿液中亦可檢測出 methylmalonate (Ho *et al*, 1987)，但二者

methylmalonate 之含量相差甚鉅 (methylmalonic acidemia 患者尿液中之 methylmalonate 含量可為惡性貧血患者的兩倍甚至更多)，故仍可互相區別 (Chalmers and Lawson, 1982)。在診斷初期，臨床上有代謝性酸中毒、ketonemia、hyperammonemia、hypoglycemia 之患者可以先進行尿液有機酸分析：以尿液薄層色層分析 (Thin-Layer Chromatography, TLC) (Wang *et al*, 1982) 或 PNA 測試 (Para-Nitroaniline test) 進行 methylmalonate 定性分析 (Giorgice and Luhby, 1969)，之後利用氣相層析-質譜儀 (GC/MS) 分析病人尿液中 methylmalonate 含量 (Yeh SF, 1986) (圖三)，輔以串聯質譜儀 (Tandem Mass Spectrometer) 檢測患者血液中 propionyl-carnitine 堆積，再者進行鑑別診斷：培養患者細胞進行丙酸併入分析 (propionate incorporation analysis) (Morrow *et al*, 1976; Willard *et al*, 1976) 測定細胞內丙酸代謝情形，偵測丙酸代謝路徑是否發生機障。為確認 methylmalonic acidemia 病人之分型，利用高效能液相層析儀 (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) 分析方法，以 methylmalonyl-CoA 為受質，加入輔酶因子 adenosylcobalamin 反應之後，分析 succinyl-CoA 之生成量，偵測患者 skinfibroblast 或 lymphoblast 之 mutase 活性 (Kikuchi *et al*, 1989)。此外，以胺基酸分析儀分析血中 glycine、methionine、homocysteine 及尿中 homocystine 含量，合併檢測資料鑑別是否為同時具有 methylmalonate 及 homocystine 代謝機障的 *cblC*、*cblD*、*cblF* type MMA 或是僅有 methylmalonate 代謝機障的 MMA。 mut^- 及 mut^0 type MMA 為 methylmalonyl-CoA mutase 缺陷致病，所以進行 propionate incorporation analysis 會發現細胞內丙酸無法正常代謝，外加輔酶因子 adenosylcobalamin 作酵素活性分析時， mut^0 type MMA 仍缺乏酵素活性， mut^- 型患者則具有 2%~75% 的活性。*cbl* type MMA 為輔酶 adenosylcobalamin 生合成缺陷所引發，同樣無法正常代謝細胞內之丙酸，但在外加入輔酶因子 adenosylcobalamin 進行 methylmalonyl-CoA mutase 活性分析可測得

methyalmalonyl-CoA mutase 的活性正常。*cblA*、*cblB*、*cblH* type MMA 由於沒有 methylcobalamin 合成機障，所以僅有 methylmalonic acidemia 而不具 homocystinuria。*cblC*、*cblD*、*cblF* type MMA 則同時有 methylmalonic acidemia 及 homocystinuria (表一)。*cbl* type MMA 可進一步以互補試驗 (complementation test) 鑑別別分型 (Gravel *et al*, 1975)。

四、甲基丙二酸血症之治療和預後

methylmalonic acidemia 患者主要是由於支鏈胺基酸代謝異常所導致的疾病。需以不含 isoleucine、valine、methionine、threonine 之特殊配方奶粉限制患者支鏈胺基酸之攝取及低蛋白飲食限制 (Nyhan *et al*, 1973; Satoh *et al*, 1981)。對於 *cbl* type MMA 患者可給予每日 1 至 2 mg cyanocobalamin 或 hydroxycobalamin 治療，其中以 *cblA* 型患者治療反應最佳，能有效減低血液及尿液中 methylmalonate 之含量，少數在輔酶因子 adenosylcobalamin 結合區有缺陷的 *mut* 型患者也對此治療法有良好反應 (Matsui *et al*, 1983)。持續治療後定期 1~3 個月檢查血液及尿中 methylmalonate 含量，追蹤生長發育、智能發展情形 (蕭廣仁, 2004)。

一般而言若為酶元本身產生缺損，即便外加大量的輔酶因子對於酵素活性的提升亦無作用。所以通常以 *mut*⁰ type MMA 症患者之預後最不理想，約 60 % 患者死亡，40 % 患者存活但發育遲緩；*mut*⁻ 型甲基丙二酸血症患者約 40 % 死亡，20 % 存活但發育遲緩，40 % 存活且發育正常 (Matsui *et al*, 1983)。*Cbl* type MMA 症患者，除了可採用低蛋白質飲食限制外，還可輔以鈷胺素 (cobalamin, Cbl) 的治療，所以其預後通常較 *mut* type MMA 患者佳 (Matsui *et al*, 1983)。

五、甲基丙二酸血症之產前診斷

對於 methylmalonic acidemia 患者家庭之產前診斷，可取母親懷孕中期的羊水或尿液，利用 GC/MS 檢測 methylmalonate 含量 (Morrow *et al*, 1970)，培養羊水細胞分析 methylmalonyl-CoA mutase 活性以及 cobalamin 之代謝 (Mahoney *et al*, 1975) 進行 *mut* 或 *cbl* type MMA 之產前診斷。此外，也可以聚合酶鏈反應 (PCR)、自動核酸定序分析 (sequencing) 及微衛星多型性標誌 (microsatellite marker) 連鎖分析等分子遺傳學的方法進行檢測 (Wang *et al*, 1990; 鄧友婷, 2003)。

六、*cbl* 型甲基丙二酸血症之分子遺傳學研究

Dobson 等人在 2002 年分別鑑定 *cblA* 和 *cblB* type MMA 的致病基因為 *MMAA* 和 *MMAB* (Dobson *et al*, 2002a, 2002b)。*MMAA* 和 *MMAB* 基因分別位於染色體 4q31.1-q31.2 和 12q24，各有 7 個 exon 和 9 個 exon，基因全長分別為 17.1 Kb 及 18.87 Kb (圖四和圖五)，cDNA 全長則分別為 1404 bp 和 2361 bp。*MMAA* 基因轉譯後形成包含 418 個胺基酸的鈷胺素還原酶 (*cbl-reductase*)

(<http://www.expasy.org/cgi-bin/niceprot.pl?Q8IVH4>)；*MMAB* 基因轉譯後形成包含 250 個胺基酸的鈷胺素腺嘌呤核苷轉化酶 (*cobalamin-adenosyltransferase*) (<http://www.expasy.org/uniprot/Q96EY8>)。近年來針對 *cbl* type MMA 的研究，白種人和日本人已知的突變在 *MMAA* 基因上有 29 個，而在 *MMAB* 基因上有 15 個，包括點突變，小片段的插入、刪除和 duplication (Dobson *et al*, 2002; Yang *et al*, 2004; Lerner-Ellis *et al*, 2004; Lerner-Ellis *et al*, 2006)。在 *MMAA* 基因上白種人常發生的突變位點為 c.433C>T (R145X) (Lerner-Ellis *et al*, 2004)，分析其突變發生位置在 CpG

dinucleotides，CpG dinucleotides 為目前已知容易發生突變的 hot spot (Cooper DN, 1988)；而在日本人則以 503delC 為最常見的突變。此外，在白種人的 MMAB 基因研究上，所發現的常見突變點 R186W (Yang *et al*, 2004)，亦位於容易造成點突變的 CpG dinucleotides。

七、研究目的

有鑑於基因突變位點會因種族不同而有差異，且目前並無針對華人 MMAA 及 MMAB 基因進行突變分析之研究報告。期望本實驗能藉由對華人甲基丙二酸血症的 MMAA 及 MMAB 基因突變之研究與了解，以應用於華人 methylmalonic acidemia 確認診斷，帶原者偵測與產前診斷，甚而瞭解疾病發生的原因，作為日後研究 methylmalonic acidemia 診治之研究基石。

貳、材料與方法

一、檢體來源

(一) 正常人 DNA 樣品來源

本文中所使用之正常人 DNA 樣品乃取自 72 個無血緣關係，且無 MMA 表型或其他相關疾病的國人之全血或細胞，抽取其 genomic DNA 進行相關實驗 (抽取方法詳見附錄一)。

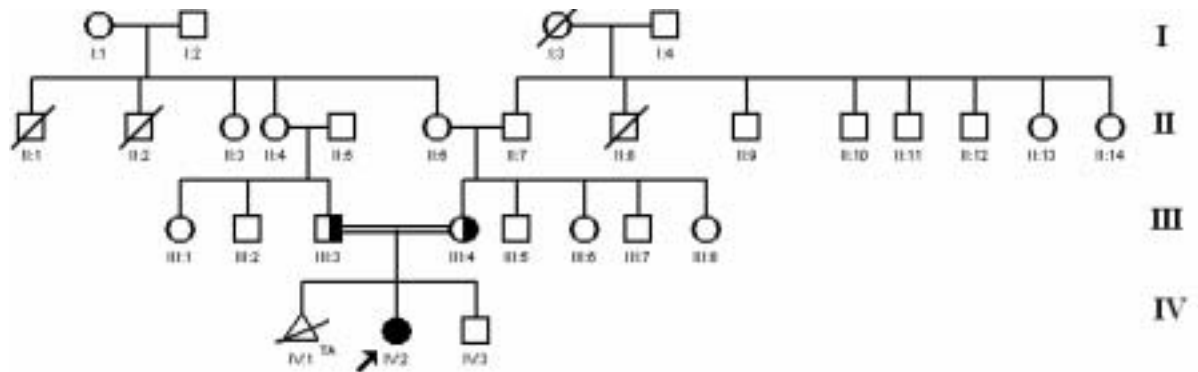
(二) 對照組細胞 – GM1673；GM595 來源

對照組細胞皆購自 Corriell Cell Repositories。細胞 GM1673 是一名 *mut*⁰ type MMA 白人男性，已知突變為 c.1217delG，個案於初生後一天即死亡。細胞 GM595 為一名 *cblA* type MMA 白人男性，已知突變為 c.592delACTG。

(三) 甲基丙二酸血症病人及其家屬檢體來源

本研究以 12 個 methylmalonic acidemia 家庭為研究對象，個案及其家屬檢體由台北榮民總醫院臨床生化實驗室、台北馬偕醫院林炫沛醫師與北京大學第一醫院兒科楊豔玲醫師提供。

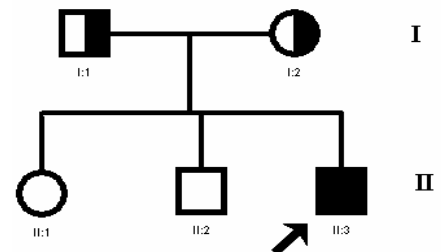
1. MMA001



MMA001 為父母皆客家人且近親通婚的個案，其家庭族譜如上。個案 MMA001 (IV:2) 出生後呈現嗜睡、嘔吐、發育遲緩等症狀。經檢查後發現有代謝性酸中毒、hyperammonemia。個案的尿液有機酸分析發現有大量的 methylmalonate 堆積，其皮膚細胞經培養後進行 propionate incorporation analysis 實驗顯示患者丙酸代謝路徑異常 (PA incorporation : 86/120 pmol/hr/mg protein ; normal reference range : > 330 pmol/hr/mg protein) (實驗方法詳見附錄二)。propionate incorporation analysis 實驗排除經由貧血等其他問題造成 methylmalonate 堆積因而誤判的可能。此外，患者對於鈷胺素 (B12) 治療具有成效。MMA001 於患者之前尚有一胎 (IV:1) 在出生前即人工引產故不明是否患病，而患者之後的弟弟 (IV:3) 至兩歲其生長情形與一般幼兒無異，並非 methylmalonic acidemia 患者。

2. MMA010

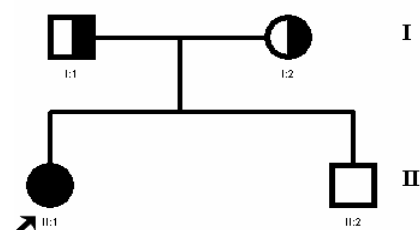
MMA010 為臺灣 methylmalonic acidemia 個案家庭，家庭族譜如右。個案 MMA010 (II:3) 經檢查後發現尿液中有大量的



methylmalonate 和 methylcitric acid 堆積，胺基酸分析血中 glycine、alanin 含量高於一般正常值，且患者對於鈷胺素 (B12) 治療具成效。患者的姐姐 (II:1) 哥哥 (II:2) 經診斷並非 methylmalonic acidemia 患者。

3. MMA011

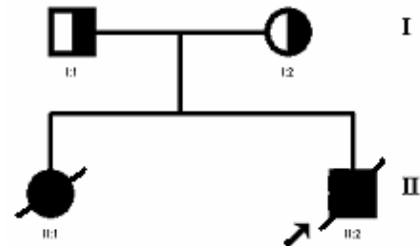
MMA011 為台北馬偕醫院林炫沛醫師所提供的臺灣 methylmalonic acidemia 個



案，其家庭族譜如右。個案 MMA011 (II:1) 經檢查有代謝性酸中毒、尿液中有 methylmalonate，對鈷胺素 (B12) 治療具成效，並持續以 B12 治療中。此家庭中的次子 (II:2) 經診斷非 methylmalonic acidemia 患者。

4. MMA013

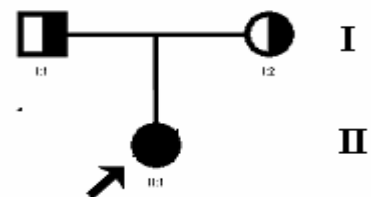
MMA013 為北京大學第一醫院兒科楊豔玲醫師提供的 methylmalonic acidemia 個案，父母皆設籍河南其家庭族譜如右。個



案 (II:2) 於出生後七天發病，有痙攣、嘔吐、肌張力不足、發育遲緩、代謝性酸中毒、hyperammonemia、hypoglycemia、ketonemia 等症狀，此外尿液中有 methylmalonate，對鈷胺素 (B12) 治療具成效，且尿液中 homocystine 含量超過正常值 (Homocystine : 202.4 umol/L ; normal reference : < 20 umol/L)。患者於兩歲時死亡，個案的姊姊 (II:1) 於出生後 30 天發病、40 天時死亡。

5. MMA014

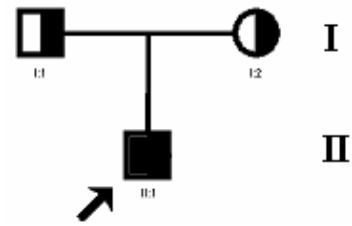
MMA014 為北京大學第一醫院兒科楊豔玲醫師提供的 methylmalonic acidemia 個案，父母皆設籍山東其家庭族譜如右。個



案 (II:1) 於出生後兩個月發病，有嘔吐、發育遲緩、hyperammonemia 等症狀，此外尿液中有 methylmalonate 堆積且血液中 homocysteine 含量超過正常值 (Homocysteine : 38.2 umol/L ; normal reference : 4~12 umol/L)。

6. MMA019

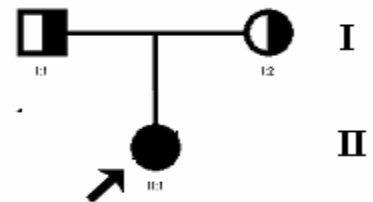
MMA019 為北京大學第一醫院兒科
楊豔玲醫師提供的 methylmalonic
acidemia 個案，父母皆設籍北京其家庭族



譜如右。個案 (II:1) 於出生後一年發病，有嘔吐、嗜睡、發育遲緩、
代謝性酸中毒、ketonemia 等症狀，此外尿液中有 methylmalonate 堆積
，血液中 homocysteine 含量超過正常值 (Homocysteine : 210.5 umol/L
； normal reference : 4~12 umol/L)。

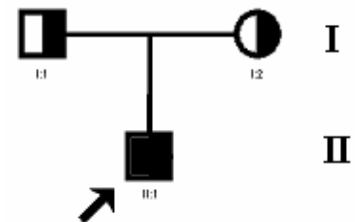
7. MMA021

MMA021 為台北馬偕醫院林炫沛醫師
所提供的臺灣 methylmalonic acidemia 個
案，其家庭族譜如右。個案 MMA021 (II:1)
尿液中有 methylmalonate，對鈷胺素 (B12) 治療具
成效，並持續以 B12 治療中。



8. MMA022

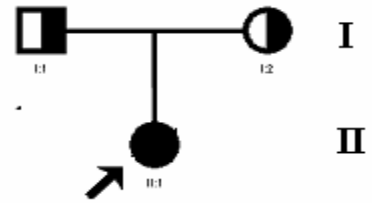
MMA022 為北京大學第一醫院兒科楊豔
玲醫師提供的 methylmalonic acidemia 個案



。個案 (II:1) 有發育遲緩、肌張力不足等症
狀，經檢測尿液中有 methylmalonate，homocystine 含量超過正常值
(Homocystine : 470.6 umol/L ; normal reference : < 20 umol/L)。

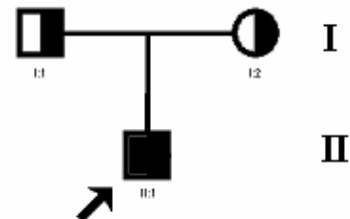
9. MMA023

MMA023 為北京大學第一醫院兒科楊豔玲醫師提供的 methylmalonic acidemia 個案。個案 (II:1) 經檢測尿液中有 methylmalonate 堆積，homocystine 含量超過正常值 (Homocystine : 114.5 $\mu\text{mol/L}$; normal reference : < 20 $\mu\text{mol/L}$) 。



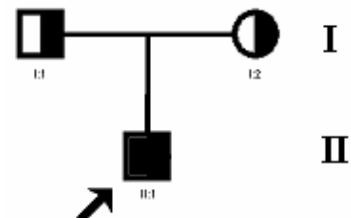
10. MMA024

MMA024 為北京大學第一醫院兒科楊豔玲醫師提供的 methylmalonic acidemia 個案。個案 (II:1) 經檢測尿液中有 methylmalonate 堆積，homocystine 含量超過正常值 (Homocystine : 24.8 $\mu\text{mol/L}$; normal reference : < 20 $\mu\text{mol/L}$) 。



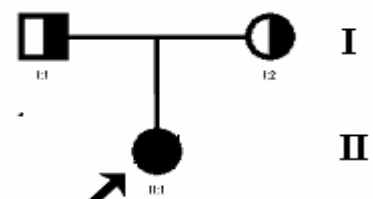
11. MMA025

MMA025 為北京大學第一醫院兒科楊豔玲醫師提供的 methylmalonic acidemia 個案。個案 (II:1) 於出生後餵食困難、智力發展遲緩、常有嘔吐、嗜睡等臨床症狀，經檢驗發現有 ketonemia、尿液中 methylmalonate 濃度過高，血液中 homocysteine 含量正常。醫師曾嘗試利用鈷胺素治療，但病患的病情並無減緩。



12. MMA026

MMA026 為北京大學第一醫院兒科楊豔玲醫師提供的 methylmalonic acidemia



個案。個案(II:1) 智力發展遲緩、常有嘔吐、嗜睡等臨床症狀，尿液中 methylmalonate 和血液中 homocysteine 濃度過高 (Homocysteine: 105.3 $\mu\text{mol/L}$; normal reference: 4~12 $\mu\text{mol/L}$)，醫師嘗試以鈷胺素治療，患者尿液中 methylmalonate 濃度顯著下降，長期以往病人的智力發展明顯改善。

二、 甲基丙二醯輔酶 A 變位酶 (MCM) 活性分析

臨床上，methylmalonic acidemia 可依照導致代謝路徑產生機障的因素區分成兩大類。由於 methylmalonyl-CoA mutase 功能缺陷所造成稱為 *mut* type MMA，病人的 methylmalonyl-CoA mutase 活性約為正常人的 0~75%；而由於 mutase 的輔酶 adenosylcobalamin 生合成缺陷導致 mutase 無法正常執行功能的，則歸類為 *cbl* type MMA。針對上述初步確診為 methylmalonic acidemia 的 11 名病患，作 methylmalonyl-CoA mutase 活性分析 (MMA011 已由林華峰於 2002 完成 methylmalonyl-CoA mutase 活性分析，MCM 活性=1.2 nmol/min/mg protein; normal reference range: > 1.1 nmol/min/mg protein)。由臺北榮民總醫院臨床生化實驗室的細胞室取得待測活性的病人細胞共 11 株與控制組細胞 (包含正常人 skinfibroblast – CG1476、正常人 lymphoblast – CG1486、*mut*⁰ type MMA skinfibroblast – CG1673、*mut*⁻ type MMA skinfibroblast – CG440、*cbl* type MMA skinfibroblast – GM595) 進行活性分析。將冷凍保存的細胞解凍後以 50 mM (pH7.0) phosphate buffer 沖散，在冰浴中以細胞震碎儀將細胞震碎 (25W X 10sec X 3 time)，取震碎後之細胞液每管 45 μl 分三管，一管為零點扣除細胞內原有的 succinyl-CoA 的背景值，其餘兩管為反應 10 min 的 duplicate，每管加入 25 μl 的 400 mM phosphate buffer (pH7.5) 和 5 μl 輔酶 180 μM Adocbl 於 37°C 反應 5 min，之後加入 25 μl 的受質 1.6 mM methylmalonyl-CoA 待酵素於 37°C 下反應 10 min 後，加入 4.2 N HClO₄ 10 μl 停止反應。以 4°C 轉速

12000 rpm 離心 10 min 後取 85 ul 上清液加入 17.5 ul 的 1.0 M Na₂CO₃ 中和反應。最後以 HPLC (HPLC : Jasco PU-2080 plus ; column : Finepak SIL C187-5) 分離過量殘存的反應物 methylmalonyl-CoA 和產物 succinyl-CoA , 利用 254 nm 的 UV 偵測並以積分儀對層析圖譜吸收峰作積分。根據 succinyl-CoA 標準濃度曲線迴歸定量 succinyl-CoA 之生成量 , 以 succinyl-CoA 生成量除以對應之蛋白質含量 (實驗方法詳見附錄三) 計算各細胞之 MCM 活性 (nmol/min/mg protein) (實驗方法及藥品配製詳見附錄四) 。

三、 基因變異分析

(一) 南方點墨法 (Southern blot)

本實驗共使用四個探針 (probe) (圖六、七) 分別包含 MMAA 與 MMAB 基因之 cDNA 全長 , 針對兩名正常人與三名病患 - MMA010 、 MMA011 、 MMA021 之 genomic DNA 進行南方點墨法實驗分析。

(1) 構築質體 :

抽取正常人之 total RNA , 以 oligo dT 為引子進行反轉錄作用獲得 cDNA , 之後以 cDNA 為模版 , 利用表二所列之引子和 *PfuTurbo*® DNA polymerase (Stratagene, CA, USA) 進行 PCR 反應 , PCR 反應後於 72°C 以 Prozyme (finnzymes, Inc., Espoo, Finland) 處理 10 分鐘在產物 3' 加一個核苷酸 A , 凝膠電泳純化 PCR 產物以 pcDNA3.1/V5-HIS TOPO TA Expression Kit (Invitrogen, Inc.) 構築含有 MMAA 基因 cDNA 全長之 pcDNA3.1/V5-His-TOPO 質體 , 而 MMAA 與 MMAB 基因 5'UTR 之 pcDNA3.1/V5-His-TOPO 質體則利用 KOD DNA Polymerase (TOYOBO) 進行 PCR 反應構築 (同樣需經過 Prozyme 處理才能進行載體的接合反應) (圖六) 。包含 MMAB 基因 cDNA 全

長之 pOTB7 質體 MGC:20496 (圖七) 則由陽明大學基因體研究中心取得。

PCR 反應試劑：

10uM S/AS primer	1ul/1 ul
10X pfu/ KOD buffer (Mg^{2+} free)	2.5 ul
2.5mM dNTP	1.5 ul
pfu / KOD DNA polymerase	1/0.5 ul
cDNA	3 ul
Mg^{2+}	如表二
DMSO	如表二
ddH ₂ O	補水至 25 ul

total 25 ul

PCR 反應程式：

(1) 95°C	5 min
(2) 95°C	1 min
(3) annealing temperature	1 min
(4) 72°C (pfu / KOD)	2 /1.5 min
(5) go to step (2) for 34 cycle	
(6) 72°C	10 min
(7) 4°C	10 min

Prozyme 處理試劑：

PCR product 25 ul

Prozyme 1 ul

total 26 ul

Prozyme 反應程式：

72°C 10 min

ligation (接合反應) 處理試劑：

prozyme 處理後之 PCR product 4 ul

salt solution 1 ul

pcDNA3.1/V5-His-TOPO vector 1 ul

total 6 ul

ligation 反應程式：

room temperature 30 min

on ice ready for transformation

(2) 轉型作用 (transformation)：

將 ligation 產物與 competent cell – *ECOS 101* (益生)

混合後靜置於冰上 15 min，於 42°C 水浴熱休克 45 sec，在冰浴 15 min，最後將適量的菌液塗抹於含有 50 ug/ml ampicillin 或 25 ug/ml chloramphenicol 的 LB 培養基上，37°C 隔夜培養所長之菌落即為成功轉型之細菌株。

(3) 質體之抽取與切割：

刮取 LB 培養基上隔夜生長之菌落接種至 3 ml LB 培養液，內含 3 ul 之 50 ug/ml ampicillin (pcDNA3.1/V5-His-TOPO 質體) 或 25 ug/ml chloramphenicol (pOTB7 質體)，置於 37 °C 培養箱中以 200~250 rpm 搖動約 12~14 小時，以 QIAGEN Plasmid Mini Kit (Qiagen, Inc., Valencia, CA, USA) 抽取質體 DNA。最後分別將四個質體以表三所列之酵素進行切割，之後以凝膠純化取得南方點墨法之探針。

(4) 檢體之處理與雜合反應：

在檢體 genomic DNA 的處理上，探討 MMAA 基因是否有大片段的插入、刪除和重組時，每個檢體各取 10 ug 之 genomic DNA 分別以 *Hind* III、*Nco* I、*Sac* I 限制酶酵素處理，再以 0.8 g/dl 瓊脂凝膠電泳進行南方點墨法。而 MMAB 基因的研究則改以 *Bam*HI、*Bgl* II、*Hind* III 限制酶酵素處理進行南方點墨法實驗 (實驗方法詳見附錄五)。

限制酶切割反應試劑：

plasmid / genomic DNA	依產物濃度決定用量
restriction enzyme	依酵素濃度決定用量
10 X NEBuffer	4 ul
ddH ₂ O	補水至 40 ul

total 40 ul

限制酶切割反應程式：

依限制酶反應溫度而異，隔夜反應後依切割片段大小選擇
0.8 g/dl 或 2 g/dl 瓊脂凝膠電泳純化。

(二) 聚合酶鏈反應 (PCR)

實驗所需之引子對序列，乃參考文獻 (*MUT* gene - Qureshi *et al*, 1994; Adjalla *et al*, 1998a; Jansen and Ledley, 1990; *MMAA* and *MMAB* genes - Dobson *et al*, 2002; *MMACHC* gene - Lerner-Ellis *et al*, 2005) 取得或以 Oligo 5.0 軟體依 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 或 UCSC (<http://genome.cse.ucsc.edu>) 發表之 genomic DNA 序列設計。引子對由明欣或瑞林公司合成，分別擴增出含有 *MMAA* 基因 7 個外顯子 (包含 exon / intron junction) 與預測啟動子區域之片段 (表四)；*MMAB* 基因 9 個外顯子 (包含 exon / intron junction) 與預測啟動子區域 (表五)；*MUT* 基因 13 個外顯子 (包含 exon / intron junction) (表六)；*MMACHC* 基因 1 個外顯子 exon4a (包含 exon / intron junction) (表七) 之片段。

PCR 反應試劑：

Prozyme; 10 X PCR buffer (含 10 mM Tris-HCl, pH 8.8 at 25°C, 1.5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 0.1% Triton X-100, 購自 Finnzymes, Inc., Espoo, Finland) 10 X PCR buffer – 不含 1.5 mM MgCl₂ (含 10 mM Tris-HCl, pH 8.8 at 25°C, 50 mM KCl, 0.1% Triton X-100, 購自 Finnzymes, Inc., Espoo, Finland) ; 25 mM MgCl₂ (購自 Finnzymes, Inc., Espoo, Finland) ; dNTP 購自 Promega (Mardison, WI, USA.)

PCR 反應各個 exon 所需之 Mg^{2+} 濃度不同，所以有兩種 10 X PCR buffer 可選擇，若該反應所需最後 Mg^{2+} 濃度為 1.5 mM 則直接選用含 Mg^{2+} 之 buffer 即可；若所需 Mg^{2+} 濃度非 1.5 mM 則選擇不含 Mg^{2+} 之 buffer，再以 25 mM $MgCl_2$ 調整至所需濃度即可。

10uM S/AS primer	1 ul/1ul
10X prozyme buffer	2.5 ul
2.5mM dNTP	1.5 ul
prozymeDNA polymerase	0.25 ul
genomic DNA (0.1ug/ul)	1 ul
Mg^{2+}	如表四 – 表七
DMSO	如表四 – 表七
ddH ₂ O	補水至 25 ul
total	25 ul

PCR 反應程式：

(1) 95°C	5 min
(2) 95°C	1 min
(3) annealing temperature	1 min
(4) 72°C	1 min
(5) go to step (2) for 27 cycle	
(6) 72°C	10 min
(7) 4°C	10 min

(三) 自動核酸定序及序列比對

聚合酶鏈反應之產物以 2 g/dl 瓊脂凝膠 (agarose gel) 確定如預期長度無誤後，若無非專一性產物干擾則直接進行純化 (Viogenic PCR Clean Up-M system, 富聯生物科技股份有限公司, 台北) 以去除剩餘的 PCR 引子、dNTP 或是鹽類、離子等干擾反應因子。反應產物如帶有非專一性產物則需以凝膠電泳切膠純化 (Viogenic Gel Extraction Kit, 富聯生物科技股份有限公司, 台北)。取純化後之聚合酶鏈反應產物加入 PCR 之正反向引子 (表四、五、六、七、八 - MMAB 基因 exon 9 使用原本的 primer 進行自動核酸定序會有 dinucleotides 干擾，故設計新的引子對表八進行定序) 利用 ABI Prism™ BigDye™ Termination Cycle Sequencing Ready Reaction Kit version 1.1 或 3.1 (Applied Biosystem , Foster City , CA , USA) 進行正反向 (sense and antisense) 之自動核酸定序反應實驗 (實驗方法詳見附錄六)。最後以 ABI Prism 3700 或 3730 Autosequencer [Applied Biosystems, Foster City, CA, USA] 電泳分析。核酸定序結果利用 PolyPhred (Nickerson *et al*, University of Washington, Seattle, USA, 1997) 找尋可能的異合子位置 (heterozygote site)。每個檢體實驗需獨立重覆 2 次，以自動核酸定序或限制酶切割分析確定該核苷酸變異並非聚合酶鏈反應或自動核酸定序分析造成的錯誤。

(四) 核苷酸多型性變異分析

自動核酸定序分析發現之核酸變異，需以獨立的 PCR 產物再次進行自動核酸定序或限制酶切割分析 (表九)，以確定此核苷酸改變並非聚合酶鏈反應或自動核酸定序反應時所產生的錯誤。本實驗利用自動核酸定序及限制酶酵素分析的方法尋找位於 MMAA 與 MMAB 基因上的核苷酸多型性變異。非致病性的核苷酸變異 (Single Nucleotide Polymorphism ; SNP) 可作為日後探討基因啟動子表現、RNA 穩定性、mRNA splicing 的

指標，亦能應用於連鎖分析，協助家族產前診斷和疾病帶原者的偵測。

(五) 核苷酸多型性單套型分析

以聚合酶鏈反應增值出欲分析的核苷酸單套型片段 (haplotype) 進行質體構築和轉型作用，將來自父方與母方的 haplotype 分開，再進行自動核酸定序及序列比對確定 haplotype 的核酸分佈。或利用 GENECOUNTING (version 2.1) (Zhao *et al*, 2002, 2004) 軟體分析 MMAA 和 MMAB 基因上 haplotype 之排列與連鎖分析。

四、基因之 pre-mRNA 及 mRNA 表現分析

(一) RNA 之抽取

培養患者之皮膚纖維母細胞 (fibroblast) 或淋巴母細胞 (lymphoblast)，將收取之細胞離心去除培養液，以 TRIZOL (Invitrogen, Inc.) 溶解細胞團抽取 total RNA。(若不接續抽取 RNA 可將細胞溶解於 TRIZOL 中放置 -70°C 可保存數個月。)

(二) 反轉錄聚合酶鏈反應 (RT-PCR)

(1) 反轉錄反應 (reverse transcription, RT)

pre-mRNA 之分析需排除 genomic DNA 之影響，所以在抽取 total RNA 之後必須以 DNase I (Roche, Mannheim, Germany) 去除在 RNA 抽取過程中一同萃取到的少量 DNA，處理過後的 RNA 需經過酒精沈澱去除多餘的鹽類和 DNase I。若為 mRNA 之分析則可省去此步驟。由患者細胞萃取所得之 RNA 分別與 MMAA ex6AS、MMAA ex7AS、MMAB ex9AS (表十)、oligo dT (18 個 mer – 由明欣公司合成) (MMA010、MMA021 - MMAA ex6AS、MMAB ex9AS、oligo

dT ; MMA011 - MMAA ex7AS 、 MMAB ex9AS 、 oligo dT) 和
 SuperScriptTM III Reverse Transcriptase (Invitrogen, , CA, USA) 、
 RNaseOUTTM (Invitrogen, , CA, USA) 反應合成 cDNA 。

反轉錄反應試劑：

(A)

total RNA	1 ug
10 uM reverse primer / oligd dT	2/1 ul
10nM dNTP	1 ul
ddH ₂ O	補水至 13 ul

total 13 ul

(B)

5 X first strand duffer	4 ul
0.1M DTT	1 ul
SuperScript TM III RT	1 ul
RNaseOUT TM	1 ul

total 7 ul

反轉錄反應程式：

(1) 65°C	5 min
(2) on ice	1 min
(3) 加入試劑 (B)	
(4) 55°C/50°C	1 hr
(5) 70°C	15 min

以 65°C 加熱 5 min 後迅速置於冰上，打開 RNA 二級結構，再加入 (B) 之反應試劑。置入 PCR 機器 55°C (gene specific reverse primer) 或 50°C (oligo dT) 反應 1 小時後，以 70°C 作用 15 分鐘去除反轉錄酶活性。

(2) 聚合酶鏈反應

以 cDNA 為模版和對應之引子對 (表十) 進行聚合酶鏈反應。

PCR 反應試劑：

10uM A/AS primer	1 ul/1ul
10X prozyme buffer	2.5 ul
2.5mM dNTP	1.5 ul
prozyme DNA polymerase	0.25/0.5 ul
cDNA	3 ul
Mg ²⁺	如表十
DMSO	如表十
ddH ₂ O	補水至 25 ul

total 25 ul

PCR 反應程式：

(1) 95°C	5 min
(2) 95°C	1 min
(3) annealing temperature	1 min
(4) 72°C	1/1.5/3 min
(5) go to step (2) for 35 cycle	
(6) 72°C	10 min
(7) 4°C	10 min

聚合酶鏈反應產物以 0.8 g/dl 或 2 g/dl 瓊脂凝膠確定長度後，經純化利用表十之引子對進行自動核酸定序分析。利用 *MMAA*、*MMAB* 與 *MUT* 基因上非致病性的 SNP 探討 RNA 穩定性、mRNA splicing 和基因啟動子的表現。

參、結果

一、甲基丙二醯輔酶 A 變位酶 (MCM) 活性分析結果

以待測活性病人細胞 11 株與控制組細胞五株 (包含正常人 skinfibroblast – CG1476、正常人 lymphoblast – CG1486、*mut*⁰ type MMA 細胞 – CG1673、*mut* type MMA 細胞 – CG440、*cbl* type MMA 細胞 – GM595) 進行活性分析觀測在輔因子 adenosylcobalamin 之存在下，病患本身的 methylmalonyl-CoA mutase 是否可將大量 L-Methylmalonyl-CoA 轉為 Succinyl-CoA (圖八)。結果發現 12 名病患中 (包括林華峰於 2002 年完成的 MMA011 之 MCM 活性分析)，有 11 名病患具有正常的 MCM 活性，僅有一名病患 (MMA025) 偵測不到酵素活性 (反應產物 Succinyl-CoA 產量 0.3 uM 為偵測極限 – data not show)，酵素活性值為 0 (表十一)。

一般而言，methylmalonic acidemia 的患者在尿液中都有大量的 methylmalonate 堆積，而 MCM 活性則依照患病類型有所不同，*mut* type 的病人會有較低的酵素活性，而 *cbl* type 的病人酵素活性則與一般正常人無異，同樣的由於患病成因的不同，*mut* type 的病人大多數對 B12 的治療不具成效，但 *cbl* type 的病人利用 B12 治療可使病況改善。此外，對某些 *cbl* type 的病人而言，血液中有大量的 homocysteine 堆積 (不包含 *cblA*、*cblB*、*cblH* type)。利用臨床醫師所提供之生化指標、臨床症狀與實驗所測得之 MCM 活性可以進一步推斷 12 名病患所罹患之 methylmalonic acidemia 分型。依上述結果推斷：12 名患者中有 2 名 (MMA011、MMA021) 為 *cblA* 或 *cblB* 或 *cblH* type MMA；7 名 (MMA013、MMA014、MMA019、MMA022、MMA023、MMA 024、MMA026) 為 *cblC* 或 *cblD* 或 *cblF* type MMA；1 名 (MMA025) 為 *mut* type MMA (表十一)，剩餘 2 名 (MMA001、MMA010) 病人在生化指標與臨床症狀診斷皆為

methylnmalonic acidemia 病患，但由於沒有進行血液或尿液中 homocystine 含量檢測，僅能依據 MCM 活性正常初步排除為 *mut* type MMA 而判定為 *cbl* type MMA 病患，但無法針對 *cbl* type MMA 再作進一步的分型。

二、MMAA、MMAB 基因核苷酸多型性分析

(一) MMAA 基因核苷酸多型性分析

本實驗共發現 12 個 SNP。其中有 11 個為非讀碼區的 SNP：

c.-2263A/C、c.-1755A/G、c.-1740A/G、c.-1391A/T、c.-996C/T、c.-713A/G、c.-469A/G、c.67+52C/T、c.734-264G/A、c.819+168C/G、c.884+2678C/T，1 個為讀碼區上的 SNP：c.1089G/C (Q363H)。其中 5 個為已發表的 SNP (表十二)，7 個為本實驗新發現的 SNP (表十三)。非讀碼區上的 SNP 可成為研究基因啟動子是否正常表現的指標；讀碼區上的 SNP 除了可研究基因啟動子表現外，也可用於探討 RNA 穩定性、mRNA splicing 的機制。

(1) 國外已發表的 SNPs

c.-2263A/C (rs2017398)、c.-1755A/G (rs4835236)、c.-1391A/T (rs2242370)、c.-996C/T (rs1497125) 為非讀碼區上的 SNP，所以並不會造成 MMAA 基因所轉譯的 *cbl*-reductase 有任何胺基酸的改變。此外，這些 SNP 亦不在預測的 MMAA 基因啟動子區域內 (c.-628 ~ c.-67+8) (利用 UCSC 網站 <http://genome.cse.ucsc.edu/> 預測基因啟動子位置：於 Expression and Regulation 區域選取 CpG Islands、FirstEF - First -Exon and Promoter Prediction、TFBS Conserved - HMR Conserved Transcription Factor Binding Sites 預測可能的基因啟動子位置) (圖九)，可能不會藉由影響 MMAA 基因之 RNA 表現致病，且 c.-1755A/G、c.-1391A/T 及 c.-996C/T 在華人族群中經由卡方

檢定已達 H-W equilibrium，同時 c.-1391A/T 及 c.-996C/T 在國外已發表的對偶基因異合子頻率 (Heterozygosity) 約為 0.5 (表十二)，顯示此變異並不影響酵素的正常表現，所以列為 MMAA 基因上的 SNP。

c.1089G/C (rs2270655) 為讀碼區上的 SNP，會造成 cbl-reductase 第 363 個胺基酸由 glutamine 變成 histidine (Q363H)，但這個 SNP 在本實驗所完成的正常人族群分析中亦可發現 (allele frequency = 0.10) 且已達 H-W equilibrium (表十二)，所以此變異應不至於造成 cbl-reductase 酵素活性降低，因此列為 MMAA 基因上的 SNP。

(2) 新發現的 SNPs

c.-1740A/G、c.-713A/G、c.-469A/G、c.67+52C/T、c.734-264G/A、c.819+168C/G、c.884+2678C/T 皆為非讀碼區上的 SNP，所以皆不可能經由改變蛋白質胺基酸的形式影響酵素活性。其中，c.-469A/G 雖在預測的基因啟動子區域上(圖九)，但在本實驗所完成的正常人族群分析中亦可觀察到相同變異 (allele frequency = 0.06) (表十三)。此外，c.-1740A/G、c.-713A/G、c.734-264G/A、c.819+168C/G、c.884+2678C/T 在華人族群中經卡方檢定皆已達 H-W equilibrium (表十三)。上述的 SNP 均可能為 MMAA 基因上的 SNP，並非致病性的突變。

針對上述位於 MMAA 基因的 11 個 SNP，本實驗以 GENECOUNTING (version2.1) 軟體分析 56 位正常華人的核苷酸多型性單套型排列以及 SNP 之間是否有連鎖不平衡的情形。分析結果顯

示，於 *MMAA* 基因上的 11 個核苷酸多型性單套型排列以 AGACGGCGCTG 發生頻率最高 (haplotype frequency = 0.428) (表十四)。單核苷酸連鎖分析則發現：c.-1391A/T 與 c.884+2678C/T；c.819+168C/G 與 c.1089G/C 分別有連鎖關係 (P value < 0.0001) (表十六)。

(二) *MMAB* 基因核苷酸多型性分析

本實驗共發現 7 個 SNP。其中有 5 個為非讀碼區的 SNP：c.-414C/T、c.520-159C/T、c.520-128C/T、c.520-96C/T、c.585-204A/G，2 個為讀碼區上的 SNP：c.56-57GC/AA、c.716T/A (表十二、表十三)。非讀碼區上的 SNP 可成為研究基因啟動子是否正常表現的指標；讀碼區上的 SNP 除了可研究基因啟動子表現外，也可用於探討 RNA 穩定性、mRNA splicing 的機制。

(1) 國外已發表的 SNPs

c.56-57GC/AA (rs10774774、rs10774775) 及 c.716T/A (rs9593) 為讀碼區上的 SNP，會分別造成 cob(I)alamin adenosyltransferase 第 19 個胺基酸由 arginine 變成 glutamine (R19Q) 和第 239 個胺基酸由 methionine 變成 lysine (M239K)，但這兩個核苷酸的變異在白種人與本實驗所完成的華人正常人族群中 (allele frequency = 0.11 及 0.29) 都發現相同的變異，且在華人族群分析中已達 H-W equilibrium (表十二)，顯示這兩個變異於華人族群中並非致病性突變，應不至於影響 cob(I)alamin adenosyltransferase 酵素活性，為 *MMAB* 基因上的 SNP。c.520-96C/T (rs11610545) 與 c.585-204A/G (rs2287182) 為非讀碼區上的 SNP，不會造成 cob(I)alamin adenosyltransferase 胺基酸的改變。此外，c.520-96C/T 與

c.585-204A/G 在正常人族群中都可發現相同的 SNP (c.520-96C/T 在華人族群 allele frequency = 0.15 ; c.585-204A/G 在高加索族群 allele frequency = 0.13) 且達 H-W equilibrium (表十二) , 顯示變異並不影響 *MMAB* 基因之 mRNA splicing 機制和酵素活性 , 是 *MMAB* 基因上的 SNP 。

(2) 新發現的 SNPs

c.-414C/T、c.520-159C/T 及 c.520-128C/T 皆為非讀碼區上的 SNP , 所以不可能經由改變蛋白質胺基酸的形式影響酵素活性。其中 , c.-414C/T 雖在預測的基因啟動子區域上 (c.-697 ~ c.83) (利用 UCSC 網站 <http://genome.cse.ucsc.edu/> 預測基因啟動子位置 : 於 Expression and Regulation 區域選取 CpG Islands、FirstEF - First-Exon and Promoter Prediction、TFBS Conserved – HMR Conserved Transcription Factor Binding Sites 預測可能的基因啟動子位置)(圖十) , 但在本實驗所完成的正常華人族群分析中亦可觀察到相同變異 (allele frequency = 0.04) 且已達 H-W equilibrium (表十三) , 為華人族群中常見的 SNP 。c.520-159C/T 及 c.520-128C/T (allele frequency = 0.26) 經卡方檢定在華人族群也已達 H-W equilibrium 。上述的 3 個 SNP 可能並非致病性的突變 , 而是 *MMAB* 基因上的 SNP 。

針對上述位於 *MMAB* 基因的 6 個 SNP , 本實驗以 GENECOUNTING (version2.1) 軟體分析 56 位正常華人的核苷酸多型性單套型排列以及 SNP 之間是否有連鎖不平衡的情形。分析結果顯示 , 於 *MMAB* 基因上的 6 個核苷酸多型性單套型排列以 C(GC)CCCT 發生頻率最高 (haplotype frequency = 0.714)(表十五) 。單核苷酸連鎖分析則發現 : c.56G/A 與 c.57C/A ; c.520-159C/T 與

c.520-128C/T 與 c.520-96C/T 分別有連鎖關係 (P value < 0.0001)
(表十七)。

三、甲基丙二酸血症患者之基因突變與 RNA 表現分析

由於實驗開始之初，僅 *cblA*、*cblB* type MMA 之基因 *MMAA*、*MMAB* 被鑑定出來，所以本實驗先以 *MMAA* and *MMAB* 基因進行突變分析。

(一) *MMAA* 基因突變與 RNA 表現分析

(1) c.742C>T

根據臨床診斷與實驗分析的結果，初步將 MMA001 歸類為 *cbl* type MMA (表十一)。針對 MMA001 進行 *MMAA* 和 *MMAB* 基因聚合酶鏈反應及自動核酸正、反向定序分析，在 *MMAA* 基因上發現同型合子 c.742C>T 的核苷酸變異 (圖十一)。此突變會造成 *MMAA* 基因第 248 個胺基酸由 glutamine 轉變成停止轉譯的終止密碼子 (Q248X)，使得胺基酸的轉譯提前終止。過去也曾有文獻指出在黑人的 *cblA* type MMA 患者發現 c.742C>T 之突變 (Lerner-Ellis et al,2004)。由於該變異並不會產生新的限制酶酵素切位，所以在進行第二次獨立的 PCR 反應後，同樣以自動核酸正反向定序確定該變異並非實驗中的錯誤所造成。同時針對 MMA001 的雙親進行相同核苷酸位點的分析。由於父親並無檢體可供研究，所以僅就母方檢體進行分析。結果發現在相同位點，患者的母親為帶有相同核苷酸變異的雜合子，且根據病患的族譜顯示，該病患出生在一個近親通婚的家庭，所以極可能會帶有祖先遺傳下來的相同核苷酸變異，實驗結果顯示該病患遺傳來至父母雙方的兩條對偶基因同時帶有 c.742C>T 的核苷酸變異使胺基酸轉譯提前終止 (圖十一)。此外，在 MMA001 病患的

MMAA 基因之 5' 端與 3' 端非轉譯區 (5' and 3' UTR region)、轉譯區及 exon / intron junction 中並未發現其他核苷酸變異(表十八)，在 MMAB 基因上也沒有其他致病性突變的發現。

(2) c.-504C>T

根據臨床診斷與實驗分析的結果，初步將 MMA021 的病患歸類為 *cbl* type MMA。針對 MMA021 進行 MMAA 和 MMAB 基因聚合酶鏈反應及自動核酸正、反向定序分析，在 MMAA 基因上發現 c.-504C>T 的核苷酸變異 (圖十二)。經由第二次獨立 PCR 反應和自動核酸正反向定序分析確定該變異並非實驗錯誤所造成。此外，針對 c.-504C>T 核苷酸變異，我們作了 72 個正常人族群分析，並未發現有相同的核苷酸變異，且同時對雙親進行相同核苷酸位點分析。於該位點，患者與父親帶有相同的核苷酸變異，該變異不在 MMAA 基因的轉譯區上，所以並不會改變轉譯的密碼子而造成胺基酸變異。但該變異點落在 UCSC 網站 (<http://genome.cse.ucsc.edu/>) 所預測的 MMAA 基因啟動子區域內(圖九)，所以本實驗推測，該變異或許會對 MMAA 基因啟動子的表達產生影響。進一步我們利用病患位於 MMAA 基因上的 SNP c.884+2678C/T 為指標去觀察患者的 pre-mRNA 是否能正常轉錄。結果發現正常人在 pre-mRNA 層面，c.884+2678C/T 位點之對偶基因異型合子的表現率約為 1：1，但在 MMA021，與 c.-504C>T 連鎖的 C allele 表現量經過標準量化後顯示為 T allele 的 0.6 倍 (圖十三)，C allele 的表現量明顯降低了。根據上述實驗結果推測：c.-504C>T 可能會影響患者 MMAA 基因之 pre-mRNA 的轉錄，可能是一個致病性的突變。另外，針對病患 MMAA 基因之 5' 端與 3' 端非轉譯區(5' and 3' UTR region)、轉譯區及 exon / intron junction 進行分析，除了 SNP 外皆未發現其他核苷酸變異，

而在 *MMAB* 基因上也沒有 SNP 以外的其他致病性突變(表十八)。除上述分析之外，以 *MMAA* 基因 5'UTR region (圖十四) 和轉譯區與 3'UTR region (圖十五) 為探針作南方點墨法皆未發現 MMA021 病患在 genomic DNA 層面有大片段的 deletion、insertion 或 rearrangement。

(3) MMA011 之 *MMAA* 基因 pre-mRNA 的表現分析

根據臨床診斷與實驗分析結果，初步將 MMA011 的病患歸類為 *cbl* type MMA。針對 MMA011 proband 進行 *MMAA* 和 *MMAB* 基因聚合酶鏈反應及自動核酸正、反向定序分析。在 *MMAA* 和 *MMAB* 基因之 5' and 3' UTR region、轉譯區及 exon / intron junction 除了 SNP 外皆未發現可能的致病性突變(表十八)。此外，我們利用 *MMAA* 基因 5' UTR (圖十四) 和轉譯區與 3'UTR (圖十五) 為探針作南方點墨法亦未發現 MMA011 病患及其家屬 (包含父、母親) 在 genomic DNA 層面有大片段的 deletion、insertion、rearrangement。另外，利用該病患 *MMAA* 基因上的 SNP c.1089G/C 為指標觀察患者的 pre-mRNA 是否正常轉錄，結果發現相較於 genomic DNA 層面，病患在 pre-mRNA 轉錄時少了一個對偶基因的表達 - C (圖十六)。為避免實驗錯誤造成這樣的結果，本實驗重複了一次病患 RNA 抽取、第二次獨立 PCR 和自動核酸定序分析等實驗，結果獲得相同的實驗結果。同時，針對病患的父、母親進行 *MMAA* 基因上之 c.1089 單點核苷酸分析，結果顯示病患的對偶基因 C 遺傳自母親，且病患母親於 c.1089 位點亦為異型合子表現。為排除正常人在 *MMAA* 基因之 pre-mRNA 轉錄時，同樣會少了 C 對偶基因表達的可能性，所以我們找了一個在 c.1089 位點上同樣是異型合子表現的正常人連同病患之母進行 RNA 抽取、聚合酶鏈反應和自動核酸定序分析實驗。實驗

資料顯示，正常人的 pre-mRNA 轉錄於 c.1089 位點上同樣是異型合子表現，但患者與母親則少了一個對偶基因的表達 (圖十七)。由此推測，pre-mRNA 的不正常轉錄可能與基因啟動子的表現有關。對此，我們利用 UCSC 網站所預測的 MMAA 基因啟動子區域 (c.-628 ~ c.-67+8) (圖九) 進行基因突變分析，結果並未在該區域找到可能的突變。且先前的南方點墨法實驗結果也顯示在該區域沒有大片段的 deletion、insertion 可能影響 PCR 分析結果之判讀。pre-mRNA 少了 C allele 的轉錄，可能與 enhancer 或 3'UTR 的突變有關，需再進一步探討。

(二) MMAB 基因突變與 RNA 表現分析

根據臨床診斷與實驗分析結果，初步將 MMA010 的病患歸類為 *cbl* type MMA。針對 MMA010 進行 MMAA 和 MMAB 基因聚合酶鏈反應及自動核酸正、反向定序分析。在 MMAA 和 MMAB 基因之 5' and 3' UTR region、轉譯區及 exon / intron junction 除了 SNP 外皆未發現可能的致病性突變(表十八)。接下來分別利用病患於 MMAA 和 MMAB 基因上的 SNP - c.884+2678 C/T 與 c.716T/A，觀察患者的 pre-mRNA 是否正常轉錄，結果發現與 genomic DNA 層面相較並無差異。另外，分別針對患者 MMAA 和 MMAB 基因之 mRNA 表現作分析，結果發現患者於 MMAA 基因之 splicing 機制正常，但由於患者於 MMAA 基因上並無 cSNP 可利用，所以對於來自父、母雙方的兩對偶因之 mRNA 是否皆穩定存在無法得知。另一方面在 MMAB 基因的表現上則有小片段的序列插入 (圖十八)，為避免實驗錯誤造成誤判，本實驗重複抽取一次病患的 RNA、進行第二次獨立 PCR 和自動核酸定序分析，但仍獲得相同的實驗結果。但由於缺乏父母親的檢體，所以也無從判斷該變異是由父或母方所得。MMAB 基因上的小片段序列插入後經由序列比對結果發現是 intron 6 被部分保留

(r.519_520ins519+91_519+177) (圖十九)。在正常華人族群中，實驗結果顯示於 *MMAB* 基因上有 c.520-159T / c.520-128T / c.520-96T SNP 單套型的人也同樣會有 intron 6 被部分保留之 alternative splicing form RNA 產生。顯示 MMA010 病患在 *MMAB* 基因 mRNA 表現的 alternative splicing 可能不是致病之異常表現。此外我們利用 *MMAB* 基因 5'UTR (圖二十) 和轉譯區與 3' 端非轉譯區 (圖二十一) 為探針作南方點墨法亦未發現 MMA010 病患在 genomic DNA 層面有大片段的 deletion、insertion 或 rearrangement。

(三) *MUT* 基因突變分析

根據臨床診斷與 mutase 活性分析結果，初步將 MMA025 的病患歸類為 *mut* type MMA (表十一)。針對 MMA025 proband 進行 *MUT* 基因轉譯區與 exon / intron junction 聚合酶鏈反應及自動核酸正、反向定序分析，在 *mut* 基因上發現 c.729_730insTT、c.1082-33delCTTT (或 c.1082-36delTTTC) 和 c.970G>A 的核苷酸變異 (圖二十二、二十三、二十四)。除進行第二次獨立 PCR 和自動核酸定序實驗避免實驗錯誤外，同時針對病患家屬進行此三位點的基因突變分析。c.729_730insTT 遺傳自病患母親的核苷酸變異位於 *MUT* 基因之轉譯區上，這個 dinucleotides 的插入會使甲基丙二醯輔酶 A 變位酶上第 244 個胺基酸由 aspartic acid 轉變成 leucine，且在繼續轉譯 39 個胺基酸後提前終止轉譯。根據結果推測，此突變應該會影響甲基丙二醯輔酶 A 變位酶正常的功能表現，可能是一個致病性的突變。其餘的兩個核苷酸變異 c.1082-33delCTTT (或 c.1082-36delTTTC) 和 c.970G>A 皆遺傳自患者的父親，由於 c.1082-33CTTT (或 c.1082-36delTTTC) 發生變異的位置位於 RNA splicing 機制中的 branch point consensus sequence 位置附近 (3' splice acceptor site 往前 20~50 bp) (<http://www.web-books.com/Mobio/Free/Ch5A4.htm>)，且針對 53 名正常華人該位點分析並未發現相同變異，故推測該位點的變異可能會影響

RNA 的 splicing。因此，我們抽取患者的 RNA 進行 mRNA 之 RT-PCR 分析。若 c.1082-33 CTTT (或 c.1082-36delTTTC) 會影響 RNA 的 splicing 機制，我們將有兩種 RT-PCR 產物片段。但實驗的結果不如預期，抽取患者的 RNA 所進行的 mRNA 之 RT-PCR 實驗無法 amplify 出任何片段 (data not show)。為避免人為錯誤，我們重新獨立進行第二次的實驗，並同時進行 MMAA 基因之 mRNA 的 RT-PCR，利用同一批 RNA 可正常 amplify 出 MMAA 基因之 mRNA 片段，但無法獲得 MUT 基因之 mRNA 片段。於是我們再次重新假設：c.729_730insTT 可能造成 nonsense-mediated mRNA decay 導致不帶有 c.1082-33 CTTT (或 c.1082-36delTTTC) 變異的對偶基因不能經由 RT-PCR 被偵測到，而帶有 c.1082-33 CTTT (或 c.1082-36delTTTC) 的對偶基因則因為無法正常啟動 splicing 機制導致片段過大，亦無法利用 RT-PCR 的方式偵測到。對此新假設，我們同時抽取病患母親的 RNA 進行 mRNA 之 RT-PCR 實驗，且增加 PCR 反應之 cycle 數。若 c.729_730insTT 會造成 nonsense-mediated mRNA decay，以 c.729_730insTT 為指標針對病患與母親進行 mRNA 之 RT-PCR 實驗，則自動核酸定序分析不會呈現 dinucleotides 插入的結果。實驗資料顯示，無論病患或其母親 mRNA 之 RT-PCR 於 c.729_730insTT 位點都沒有 dinucleotides 插入的自動核酸定序結果 (圖二十五)，且病患於 c.970G>A 的位置僅偵測到來自父方的 A allele (圖二十四)。這除了說明 c.729_730insTT 可造成 nonsense-mediated mRNA decay 外，由於 PCR 產物大小和定序結果與正常人無異，所以同時證明了 c.1082-33 CTTT (或 c.1082-36delTTTC) 並不會造成 splicing 機制被破壞。c.1082-33 CTTT (或 c.1082-36delTTTC) 可能僅為一個發生率較低的核苷酸多型性變異。另一個同樣遺傳自病患父親的 c.970G>A 核苷酸變異位於 *mut* 基因之轉譯區上，會使 methylmalonyl-CoA mutase 上第 324 個胺基酸由 alanine 轉變成 threonine (A324T)，這樣的胺基酸變異或

許會影響 methylmalonyl-CoA mutase 正常的功能表現，成為致病性的突變。近來有文獻指出在 mut^0 type MMA 的亞洲人和 mut^- type MMA 的西班牙人患者，分別發現 c.729_730insTT 和 c.970G>A 之突變(Worgan *et al*, 2006)。



肆、討論

一、MMAA 基因

(1) 在 MMA001 的 MMAA 基因分析發現 c.742C>T 的 homozygote mutation，過去曾有文獻指出在黑人的 *cblA* type MMA 患者發現相同的基因突變 (Lerner-Ellis *et al*, 2004)，且該突變會使基因提早停止轉譯。在 MMA001 家族分析中，由於缺乏父方檢體，且患者在 c.742C>T 位點附近並無 SNP，所以我們無法排除 c.742C>T 的 homozygote mutation 是否為來自父方的對偶基因有基因刪除的情形而無法利用 PCR 的方法被增值放大，使得自動核酸定序結果被誤判為 homozygote mutation。雖然 *cbl-reductase* 的蛋白質結構尚未發表，無從得知該位點的重要性。但以該胺基酸位點在七種不同進化程度的物種間具有高度保留性 (圖二十六) 的觀點來看，顯示該位點於 *cbl-reductase* 的結構與功能之重要性，此位點的胺基酸變異或消失的確可能致病。

(2) MMA021 患者在 UCSC 網站所預測的 MMAA 基因啟動子區域內發現 c.-504C>T 的核苷酸變異，以 MMAA 基因上的 SNP - c.884+2678C/T 為指標作確認，患者在 pre-mRNA 的分析上 C allele 表現量經過標準量化後顯示為 T allele 的 0.6 倍，C allele 的表現量明顯降低顯示該點為可能的致病性突變。但就 methylmalonic acidemia 為隱性體染色體遺傳疾病而言，單一對偶基因的突變並不足以構成患者發病。根據本論文所進行的南方點墨法實驗，排除 MMA021 病患在 genomic DNA 層面有大片段的 deletion、insertion、rearrangement。聚合酶鏈反應、自動核酸正反向定序分析，則說明了致病性突變可能不是發生在 MMAA 基因之 5' and 3' UTR region、轉譯區及 exon / intron

junction。綜合上述實驗結果，我們推測另一個致病性突變可能發生在 intron 或 enhancer 影響基因表現量，或為 3' UTR region 的 deletion 致使聚合酶鏈反應無法 amplify 出該片段，且造成 RNA 的不穩定。由於 MMA021 在 MMAA 基因上並無 cSNP 作為 RNA 穩定性的指標作探討，以致於無法利用本論文的實驗方法找出致病突變。

(3) MMA011 患者在 MMAA 基因的 pre-mRNA 表現上少了一個 allele，推測可能為基因的啟動子上產生變異，但分析病患該基因的預測啟動子區域並未發現有任何不正常的變異，故初步排除為啟動子變異影響 pre-mRNA 表現，影響 pre-mRNA 表現的或許為 enhancer 或 3' UTR 影響 RNA 穩定性，但此假設有待進一步實驗的證明。除了可能由於 enhancer 或 3' UTR 有致病性突變造成病人罹患 methylmalonic acidemia 外，根據本論文所進行的南方點墨法實驗，排除 MMA011 病患在 genomic DNA 層面有大片段的 deletion、insertion、rearrangement。聚合酶鏈反應、自動核酸正反向定序分析，則說明了致病性突變可能不是發生在 MMAA 基因之 5' and 3' UTR region、轉譯區及 exon / intron junction。綜合上述，我們推測另一個致病性突變可能同樣發生在 intron 或 enhancer 或 3' UTR 影響基因表現量，以致於無法利用本論文的實驗方法找出致病突變。此外，由於依據病人的臨床症狀、生化指標判斷為 cbl type MMA 病人，所以也可能需要針對其他可能造成 cbl type MMA 的基因作進一步分析，才能找出其致病性突變。

二、MMAB 基因

MMA010 在 mRNA 表現分析上在 exon6 和 exon7 之間有一段 intron 被保留 (r.519_520ins519+91_519+177)，為探討其中可能的機制，首

先我們針對 MMA010 proband 和沒有 splicing 機制問題的正常人之 MMAB 基因 exon6 + intron6 + exon7 片段進行序列比對，結果發現：在此片段上 proband 有 c.520-159T / c.520-128T / c.520-96T SNP 單套型。接下來我們利用哥倫比亞大學的生資網站 (<http://cubweb.biology.columbia.edu/pesx/>) 預測這個 SNP 單套型的改變是否會創造新的 ESE (Exonic Splicing Enhancers) 或 ISE (Intronic Splicing Enhancers) 影響 splicing 機制。結果發現當 SNP - c.520-128 之單核苷酸由 C 變成 T 時，會創造一個 ISE site，且在 intron 6 上有超過一組的 splicing donor and acceptor site (圖二十七)。上述的兩個原因可能是造成 MMA010 在 MMAB 基因的 intron 6 有不同 splicing 機制的原因。此外，利用美國冷泉港實驗室的生資網站 (<http://rulai.cshl.edu/tools/ESE/>) 進行相同預測，結果發現當 SNP - c.520-159 之單核苷酸由 C 變成 T 時，會創造兩個 ESE site 分別提供 SF2/ASF 和 SRp55 兩種 SR protein 的 binding (圖二十八)，復以 intron 6 上多一組 splicing donor and acceptor site 的協助，造就不同 splicing form 的形成。但 SNP - c.520-96 不論單核苷酸為 C 或 T，皆不造成 ESE 或 ISE 變異影響 splicing。

c.520-159C/T、c.520-128C/T 是本實驗在華人族群中新發現的 SNP，為瞭解上述對於 splicing 機制的假設是否正確，我們利用六位具有 c.520-159C/T、c.520-128C/T 異型合子與一位同型合子 (TT) 的正常人進行 MMAB 基因之 mRNA 表現分析，結果顯示異型合子帶有約 33% alternative splicing form RNA；而同型合子 (TT) 帶有約 66% alternative splicing form RNA (圖二十九)。alternative splicing form RNA 雖會造成提前終止轉譯，但即使為同型合子 (TT) 亦可發現正常 splicing form 的 RNA 足以維持身體正常代謝機能的運作不致病。此外，在 MMAA 和 MMAB 基因之 5' and 3' UTR region、轉譯區及 exon / intron junction 皆未發現可能的

致病性突變，且排除病患在 *MMAB* 之 genomic DNA 層面有大片段的 deletion、insertion 或 rearrangement。*MMAA* 基因之 RNA 表現分析未發現變異。綜合上述，針對 MMA010 proband 之致病性突變之探討，除了可能在 *MMAB* 基因的 intron 或 enhancer 外，由於僅能依據病人的臨床症狀、生化指標判斷為 *cbl* type MMA 病人，所以可能需要針對其他可能造成 *cbl* type MMA 的基因作進一步分析，才能找出其致病性突變。

三、*MUT* 基因

(1) c.729_730insTT (D244LfsX39) 曾有國外的文獻報告指出於亞洲的 *mut*⁰ type MMA 患者發現該突變 (Worgan *et al*, 2006)。該突變所影響的 methylmalonyl-CoA mutase 之第 244 個胺基酸胺基酸在物種間具有高度保留性 (圖三十)，且根據早先所發表的 methylmalonyl-CoA mutase 結構圖 (圖三十一) (Thoma and Leadlay, 1996)，該點位於 methylmalonyl-CoA mutase 與受質結合處 ($\alpha\beta$)₈，除了會影響酵素與受質結合外，由於該突變會使基因提早停止轉譯，無法製造出完整的 methylmalonyl-CoA mutase，同時影響了酵素與受質和酵素與輔酶 adenosylcobalamin 間的結合，該變異破壞 methylmalonyl-CoA mutase 執行正常功能為致病性的突變。

(2) c.970G>A 有國外的文獻報告指出於西班牙的 *mut*⁻ type MMA 患者發現該突變 (Worgan *et al*, 2006)。該突變造成 methylmalonyl-CoA mutase 上第 324 個胺基酸由 alanine 轉變成 threonine，該胺基酸位點在物種間具有高度保留性 (圖三十)。根據早先所發表的 methylmalonyl-CoA mutase 結構 (圖三十一) (Thoma and Leadlay, 1996)，該點位於 methylmalonyl-CoA mutase 與受質結合處 ($\alpha\beta$)₈，胺

基酸的改變可能會因而影響酵素與受質的結合，破壞 methylmalonyl-CoA mutase 的功能成為致病性的突變。

四、*MMACHC* 基因

MMA013、MMA019、MMA022、MMA023、MMA026 family 於 *MMACHC* 基因找到 c.609G>A (W203X) 的核苷酸變異，此變異在國外已發表的文獻中提到為亞洲人常見的突變點，該突變會使基因提早停止轉譯 (Lerner-Ellis *et al*, 2005)。在 MMA014、MMA026 family 的 *MMACHC* 基因找到 c.657_659delGAA (220delQ) 尚未有文獻發表之新變異，該變異並不會造成胺基酸改變，但對整個 *MMACHC* 基因所轉譯的蛋白質而言損失了第 220 個胺基酸 lysine。由於上述二個胺基酸位點在不同進化程度的物種間皆具有高度保留性 (圖三十二)，顯示這些位點的變異可能是致病的突變。

伍、結論

一、根據臨床症狀、尿液中 MMA 堆積、mutase 活性測試、B12 治療反應、homocysteine 是否堆積等結果初步判斷 12 名華人病患中，有 1 位為 *mut* type MMA；其餘 11 位 *cbl* type MMA。爾後由基因突變與 RNA 表現分析結果，再將 11 位 *cbl* type MMA 病人細分為 3 名 *cblA* type MMA；7 名 *cblC* type MMA。(其中 MMA010 proband 僅能依據臨床症狀、生化指標判斷為 *cbl* type MMA 病人，但無法藉由本實驗作進一步的分類。)

二、針對 *MMAA*, *MMAB* 基因核苷酸多型性分析：在華人族群中 *MMAA* 基因有 5 個已被發表的 SNP - c.-2263A/C、c.-1755A/G、c.-1391A/T、c.-996C/T、c.1089G/C 及 7 個新發現之 SNP - c.-1740A/G、c.-713A/G、c.-469A/G、c.67+52C/T、c.734-264G/A、c.819+168C/G、c.884+2678C/T，其中 c.-1391A/T 與 c.884+2678C/T；c.819+168C/G 與 c.1089G/C 分別有連鎖關係；*MMAB* 基因則有 4 個已被發表的 SNP - c.56-57GC/AA、c.520-96C/T、c.585-204A/G、c.716T/A 及 3 個新發現之 SNP - c.-414C/T、c.520-159C/T、c.520-128C/T，其中 c.56G/A 與 c.57C/A；c.520-159C/T、c.520-128C/T、c.520-96C/T 分別有連鎖關係。

三、分別以 *MMAA*、*MMAB* 基因之 5'UTR region (圖十四、二十) 和轉譯區與 3'UTR region (圖十五、二十一) 為探針作南方點墨法皆未發現病患在 genomic DNA 層面有大片段的 deletion、insertion 或

rearrangement。

四、在基因的突變與 RNA 的表現分析上

(1) MMA001 family 在患者的 MMAA 基因找到一個已發表之突變 c.742C>T。患者生長於近親通婚的家庭，帶有祖先遺傳下來的相同核苷酸變異，基因突變分析結果為同型合子之突變。突變的胺基酸位點在不同物種具高度保留性且使胺基酸轉譯提前終止，使得 cbl-reductase 功能無法正常表達。

(2) MMA010 family 於 MMAB 基因之 mRNA 表現上有 intron 6 - r.519_520ins519+91_519+177 的保留，為 splicing 機制上的異常。MMA010 proband 於 MMAB 基因上有一 allele 為 c.520-159T、c.520-128T 之 SNP 單套型，會造成 alternative splicing form RNA 產生。有 intron 6 保留的 mRNA 雖會造成提前終止轉譯，但正常 splicing form 的 RNA 則維持身體正常代謝機能的運作，所以此變異並非致病性突變。MMA010 proband 之致病性突變除了可能在 MMAB 基因的 intron 或 enhancer 外，由於僅能依據病人的臨床症狀、生化指標判斷為 cbl type MMA 病人，所以可能需要針對其他可能造成 cbl type MMA 的基因作進一步分析，才能探究其致病原因。

(3) MMA011 family 於 MMAA 基因之 pre-mRNA 表現上少了一個 allele 的表達，但 MMAA 基因的預測啟動子區域並未發現有任何不正常的變異，需進一步實驗的證明可能是 enhancer 影響 pre-mRNA 的表現或 3'UTR 的 deletion 造成 RNA 不穩定，此外，另一對偶基因的致病性突變除了需針對 MMAA 基因之 intron 或 enhancer 和 3'UTR

作研究外，亦可分析其他可能造成 *cbl* type MMA 的基因，探究其致病原因。

(4) MMA021 family 於預測基因啟動子區找到可能的致病性突變 c.-504 C>T，該變異可能是造成患者 pre-mRNA 表現異常的因素，後續必須針對患者針對 MMAA 基因之 intron 或 enhancer 和 3' UTR 作進一步的分析，尋找另一對偶基因的致病性突變。

(5) MMA025 family 在 *MUT* 基因上找到兩個已發表之突變 c.729_730insTT 與 c.970G>A。突變之胺基酸位點在物種間具有高度保留性，前者使基因提早停止轉譯，無法製造出正常的 methylmalonyl-CoA mutase，後者胺基酸變異點位於 methylmalonyl-CoA mutase 與受質結合處 ($\alpha\beta$)₈，可能藉由破壞酵素與受質的結合進而影響 methylmalonyl-CoA mutase 的功能。

(6) 針對 *cblC* type MMA 作基因突變分析，MMA013、MMA019、MMA022、MMA023、MMA026 family 於 *MMACHC* 基因找到一個已發表的 c.609G>A (W203X) 致病性突變；在 MMA014、MMA026 family 的 *MMACHC* 基因找到一個新的可能致病性突變 c.657_659delGAA (220delQ)。這些胺基酸位點在不同物種間皆具有高度保留性判斷，顯示可能致病 (圖三十二)。

(7) 根據臨本實驗室近年來對甲基丙二酸血症之研究與本論文的實驗結果，華人族群中以同時伴隨有 homocysteine 堆積的 *cblC*、*cblD*、*cblF* type MMA (表十一) 和 mutase 活性有問題的 *mut* type MMA 居多，以本實驗室所收集的個案為例，其中南方華人多為 *mut* type MMA，北方

華人則以 *cbIC* type MMA 為主。



陸、參考文獻

Acquaviva C, Benoist JF, Pereira S, Callebaut I, Koskas T, Porquet D, Elion J. (2005) Molecular basis of methylmalonyl-CoA mutase apoenzyme defect in 40 European patients affected by mut(o) and mut- forms of methylmalonic acidemia: identification of 29 novel mutations in the MUT gene. Hum Mutat 25: 167-76

Chalmers RA, Lawson AM. (1982) The methylmalonic aciduria: Organic acids in man. London New York. 311

Cooper DN, Youssufian H. (1988) The CpG dinucleotide and human genetic disease. Hum Genet 78: 151-55.

Cotton RGH, Scriver CR. (1998) Proof of “Disease Causing” Mutation. Hum Mutat 12: 1-3.

Coulombe, J.T, Shih, ME. (1981) Massachusetts metabolic disorders screen program II. Methylmalonic aciduria. Pediatr 67: 26-31.

Dobson CM, Wai T, Leclerc D, Wilson A, Wu X, Dore C, Hudson T, Rosenblatt DS, Gravel RA. (2002a) Identification of the gene responsible for the cblA complementation group of vitamin B12-responsive methylmalonic acidemia based on analysis of prokaryotic gene arrangements. PNAS U S A 99: 15554-9.

Dobson CM, Wai T, Leclerc D, Kadir H, Narang M, Lerner-Ellis JP, Hudson TJ, Rosenblatt DS, Gravel RA.(2002b) Identification of the gene responsible for the cblB complementation group of vitamin B12-dependent methylmalonic aciduria. Hum Mol Genet. 11: 3361-9.

Giorgice AJ, Luhby AL. (1969) A rapid screening test for the detection of congenital methylmalonic aciduria in infancy. Amer J Clin Pathol 52: 374-9.

Gravel RA, Mahoney MJ, Ruddle FH, Rosenberg LE.(1975) Genetic complementation in heterokaryons of human fibroblasts defective in cobalamin metabolism. PNAS. 72: 3181-5.

Gu Xue-fan, Han Lian-shu, Gao Xiao-lan, Yan Yan-ling, Ye Jun, Qiu Wen-juan. (2004) 串聯質譜技術在遺傳性代謝高危兒童篩查中的初步運用. 中華兒科雜誌 42:401-4

Han Lian-shu, Gao Xiao-lan, Ye Jun, Qiu Wen-juan, Gu Xue-fan.(2005) 串聯質譜技術在有機酸血症篩查中的運用研究. 中華兒科雜誌 43:325-30

Ho CH, Chang HC, Yeh SF. (1987) Quantization of urinary methylmalonic acid by gas chromatography mass spectrometry and its clinical applications. Eur J Haematol 38: 80-4.

Jin Hong, Zou Li-ping, Zhang Chun-hua, Fang fang, Xiao Jing, Wu Hu-sheng, Zhu Cheng, Guo Wei, Jin Zhen. (2004) 甲基丙二酸血症 14 例診斷及治療

分析. 中華兒科雜誌 42:581-4

Kikuchi M, Hanamizu H, Narisawa K, Tada k. (1989) Assay of methylmalonyl CoA mutase with high-performance liquid chromatography. Clini Chim Acta 184: 307-14.

Lerner-Ellis JP, Dobson CM, Wai T, Watkins D, Tirone JC, Leclerc D, Dore C, Lepage P, Gravel RA, Rosenblatt DS.(2004) Mutations in the MMAA gene in patients with the cblA disorder of vitamin B12 metabolism. Hum Mutat. 24: 509-16.

Lerner-Ellis JP, Gradinger AB, Watkins D, Tirone JC, Villeneuve A, Dobson CM, Montpetit A, Lepage P, Gravel RA, Rosenblatt DS.(2006) Mutation and biochemical analysis of patients belonging to the cblB complementation class of vitamin B12-dependent methylmalonic aciduria. Mol Genet Metab. 87: 219-25.

Luo Xiao-ping, Wang Mu-ti, Wei Homg, Liang Yan, Wang Hong-wei, Lin Han-hua, Dong Yong-sui, Liu Wan-jun, Fang Jun-min, Ning Qin. (2003) 尿濾紙片法氣相色譜-質譜分析技術在遺傳性代謝病高危篩查診斷中的運用. 中華兒科雜誌 41:245-8

Mahoney MJ, Hart AC, Steen VD, Rosenberg LE. (1975) Methylmalonicacidemia: biochemical heterogeneity in defects of 5'-deoxyadenosylcobalamin synthesis. PNAS. U S A. 72: 2799-803.

Matsui SM, Mahoney MJ, Rosenberg LE. (1983) The natural history of the inherited methylmalonic acidemias. N Engl J Med 308: 857-61.

Morrow G, Schwartz RH, Hallock JA, Barness LA. (1970) Prenatal detection of methylmalonic acidemia. J Pediatr 77: 120-3.

Nickerson DA, Tobe VO, Taylor SL. (1997) PolyPhred: automating the detection and genotyping of single nucleotide substitutions using fluorescence-based resequencing. Nucleic Acids Research 25: 2745-51.

Nyhan WL, Fawcett N, Ando T, Rennert OM, Julius RL. (1973) Response to dietary therapy in B₁₂ unresponsive methylmalonic acidemia. Pediatrics 51: 539.

Oberholzer VG, Levin B, Burgess EA, Young WF. (1967) Methylmalonic aciduria: an inborn error of metabolism leading to chronic metabolic acidosis. Arch Dis Childh 42: 492-504.

Satoh T, Narisawa K, Igarashi Y, Saitoh T, Hayasaka K, Ichinohazama Y, Onodera H, Tada K, Oohara K. (1981) Dietary therapy in two patients with vitamin B₁₂-unresponsive methylmalonic acidemia. Eur J Pediatr 135: 305-12.

Stokke D, Eldjarn L, Norum KR, SteenJohnsen J, Halvorsen S. (1967) Methylmalonic aciduria: a new inborn error of metabolism which may cause fatal acidosis in the neonatal period. Scand J Clin Lab Invest 20: 313-28.

Tsao LY, Lai ES, Shih MJ. (1986) Methylmalonic acidemia two case report.
Acta pediatrica sinica 27: 566-9.

Wang TR, Hou JW, and Tsai HM. (1990) Restriction fragment length
polymorphisms at the methylmalonyl CoA mutase locus in normal Chinese.
Acta Paed Sin 31: 275-9.

Wayne A Fenton, Roy A Gravel, David S Rosenblatt. (2001). Disorders of
Propionate and Methylmalonate Metabolism. In: Scriver, Beaudet, Valle, Sly,
Childs, Kinzler, Vogelstein. (8th ed), *The metabolic & Molecular Bases of
inherited Disease*. (p2165-93). MC Graw-Hill.

Wang TR, Chen SH, Lee TC. (1982) Application of thin-layer
chromatography for the detection of methylmalonic acid in urine -- a modified
method. *Acta Paediatrica Sinica* 23: 45-9.

Willard HF, Ambani LM, Hart AC, Mahoney MJ, Rosenberg LE. (1976)
Rapid prenatal and postnatal detection of inborn errors of propionate,
methylmalonate, and cobalamin metabolism: a sensitive assay using cultured
cells. *Hum Genet* 15:34(3): 277-83.

Wong SN, Low LC, Lau YL, Nicholls J, Chan MY. (1992)
Immunodeficiency in methylmalonic acidemia. *J Paediatr Child Health* 28:
180-3.

Yang X, Sakamoto O, Matsubara Y, Kure S, Suzuki Y, Aoki Y, Suzuki Y,

Sakura N, Takayanagi M, Iinuma K, Ohura T.(2004) Mutation analysis of the MMAA and MMAB genes in Japanese patients with vitamin B(12)-responsive methylmalonic acidemia: identification of a prevalent MMAA mutation. Mol Genet Metab 82: 329-33.

Yeh SF, Hsiao KJ, Hung SH, Chang KT. (1986) Identification of abnormal urinary organic acids in inherited metabolic diseases by gas chromatography – mass spectrometry. J Chin Chem Soc 33: 251-6.

Zhao, J. H., Lissarrague, S., Essioux, L. and P. C. Sham (2002). Gene-counting for haplotype analysis with missing genotypes. Bioinformatics 18: 1694-5

Zhao, J. H. (2004) 2LD, GENECOUNTING and HAP : Computer programs for linkage disequilibrium analysis. Bioinformatics 20: 1325-6

林華峰. (民國 91 年) Functional Analysis of the Methylmalonyl Coenzyme A Mutase Mutations Found in Chinese Patients with Methylmalonic Acidemia. 國立陽明大學生命科學系學士論文.

鄧友婷. (民國 92 年) Molecular Genetic Studies of the *MUT* Gene in Chinese Methylmalonic Acidemia Caused by Methylmalonyl CoA Mutase Deficiency. 國立陽明大學遺傳學研究所碩士論文.

蕭廣仁. (民國 93 年) 國內新生兒先天異常疾病篩檢項目增減」可行性之探討 (DOH92-HP-1210). 衛生署國民健康局專題研究計畫成果報告.

表一、甲基丙二酸血症之鑑別診斷

	PNA test	Methylmalonate in urine (GC/MS)	PA incorporation	MCM activity	B12 responsive treatment	Homocysteine accumulation
<i>mut^o</i>	+	+	-	0	-	-
<i>mut^f</i>	+	+	-	2~75%	- /+	-
<i>cblA cblB cblH</i>	+	+	-	100%	+	-
<i>cblC cblD cblF</i>	+	+	-	100%	+	+

表二、南方點墨法之探針使用之引子序列及黏合溫度

Primer name	Primer sequence(5'-3')	annealing temperature ()	MgCl ₂ , (mM)	DMSO (%)
MMAA 5' RT-PCR primer	GGAGGTCACAATCACATTGAGCCA	66	1.2	0
MMAA 3' RT-PCR primer	CAAACAAAGAAGACAAGAGCACCA			
The primer of MMAA promoter 4F	AACCATATCTACTCGTCATTGA			
MMAA exon1 AS	CCCCCACCCTCAAATCCTCCAG	63	1.5	0
MMAB promoter F	ACAAGGCTGCAGAAAACAC	61	0.8	4
MMAB ex1 AS	ACG TCA GAA CAG CGT GGA GA			

表三、南方點墨法之探針製備

probe	Restriction enzyme	NEB buffer NO.	Temperature ()	BSA
MMAA full length cDNA	<i>Bam</i> H I+ <i>Eco</i> R V	<i>Bam</i> H I	37	1X
MMAB full length cDNA	<i>Eco</i> R I + <i>Nco</i> I	<i>Eco</i> R I	37	
MMAA 5'UTR	<i>Eco</i> R V + <i>Kpn</i> I	2	37	1X
MMAB 5'UTR	<i>Bam</i> H I + <i>Eco</i> R V	<i>Bam</i> H I	37	1X

100 X BSA : 10mg/ml

表四、MMAA 基因聚合酶鏈反應之引子對與反應條件

Primer name	Primer sequence (5'-3')	annealing temperature (°C)	MgCl ₂ (mM)	DMSO (%)
The primer of MMAA promoter 4F	AACCATATCTACTCGTCATTGTA			
MMAA ex1 AS	CCCCACCCCCAAAATCCTCCAG	63	1.5	0
MMAA ex1 S	GCGTCTCTCCCTCACCCCCACATT			
MMAA ex1 AS	CCCCACCCCCAAAATCCTCCAG	69	1.2	0
MMAA ex2 S	TAC TAC CAA AAA CTC TGA TTA TGT G			
MMAA ex2 AS	TTT AAA ATT CAT CCA AAT ATT GTG	55	1.5	0
MMAA ex3 S	TAA TTG TGG TTT TAA TAC ATT AGG G			
MMAA ex3 AS	GAA ATT TGC ATT TGA TCA TCT	55	1.5	0
MMAA ex4 S	GGA ACT GGC TGA TAA TTG ACC CGT A			
MMAA ex4 AS	CCT AAT GTT TAC AGT TCT CCT CTG GC	62	1.5	0
MMAA ex5 S	GGT TGA CTG TGT GAC CAT GAG TAT G			
MMAA ex5 AS	GCT GGA GCG ATC CAT GTA TTT CAG T	62	1.5	0
MMAA ex6 S	CTG CCA CTC AAT CAT GTT GTG ACT T			
MMAA ex6 AS	TCA TGA CTA CAC ACT CCG TCT TTG TC	60	1.5	0
MMAA ex7 S	TAA GAA TTA ACT GGC AGG TAT CAG C			
MMAA ex7 AS	CTA ACT TCC TTC AAG TTT TCA AGC A	56	1.2	0

表五、MMAB 基因聚合酶鏈反應之引子對與反應條件

Primer name	Primer sequence (5'-3')	annealing temperature (°C)	MgCl ₂ (mM)	DMSO (%)
MMAB promoter F	ACAAGGCTGCAGAAACAC			
MMAB promoter R	GGTTCCCGTCCAGTCC	61	0.8	4
MMAB ex1 S	GAA CTG CGA ACC AAT AAA AAT TGA A			
MMAB ex1 AS	ACG TCA GAA CAG CGT GGA GA	64	1.5	0
MMAB ex2 S	AGA TGA CCA TCT AAG CAG TAA GG			
MMAB ex2 AS	CGC GCC TGG TAT ATT ATA CTT TA	58	1.5	0
MMAB ex3 S	GCC TGG ATG ACA GAG TGA CTG TT			
MMAB ex3 AS	ATA AGG GCT GAC AAC CTC CGA GG	58	1.5	0
MMAB ex4 S	AAG GCT ATA ATG TTC TTA TTG TTA G			
MMAB ex4 AS	CTC ACA GAG GGA GAG TAA CT	54	1.2	0
MMAB ex5 S	CAC CTC CAA CTC TGG GGA TCA CA			
MMAB ex5 AS	TGG GAT CCC AGA TGG TGA CCC TA	58	0.8	5
MMAB ex6 S	CAC GGG TGG GTC AGT TAG CCT TGC T			
MMAB ex6 AS	TTG GGG AAC TGG AGG ACA GCG TCT	58	1	0
MMAB ex7 S	ATC CCT CTT TTC ACA GTG ACA GA			
MMAB ex7 AS	GTC TGT TGA TGT GTG GCT GGA TG	59	0.8	0
MMAB ex8 S	CTC ACC AGC CAT CCT TGA TCC CT			
MMAB ex8 AS	ACA CTA AGG GAA TGA AGG AGG GG	60	1.2	0
MMAB ex9 S	CAT TAA GTG CAA GAT GGC TGG GC			
MMAB 3'UTR reverse primer	CAGAGGTGACTAAACTTCCAAATC	68	1.8	0

表六、*MUT* 基因聚合酶鏈反應之引子對與反應條件

Primer name	Primer sequence (5'-3')	annealing temperature (°C)	MgCl ₂ (mM)	DMSO (%)
MMAex1s	GAT CCT AAG GGC AGA TCT TTT A	58	1.5	0
MMAex1as	TCA AAA TAC AGG GGT AGA GAG G			
MMAex2s	CCT TTC TTA TGA GTA GCT CCT A	52	1.5	0
MMAex2as	GAG TGA ATA TCA TCT TTA CAG AGA			
MMAex3s	CCA GAC TCT TGA ATC TTA CAT	52	1.5	0
MMAex3as	CAA GGA ACT ATA GAA AAA C			
MMAex4s	ATA ATG TTT ATG CTT AGA AAG TGG	54	1.5	0
MMAex4as	TCT CTA AAT AGC TGG AGA CAA G			
MMAex5s	AAT TAAATT CTG GAC CTA	44	1.5	0
MMAex5as	ACT TTA TTA AAA TTC TAC AT			
MMAex6s	TGC TAT TCT GAA GCT TAA TAT G	55	1.5	0
MMAex6as	TTT AAA ATC TAT AAA TCT TGA CTT G			
MMAex7s_2	ACA CTC ATA ACA AAT TTA TAT AG	50	1.5	0
MMAex7as	TGT TAT CTT CAA ACA GAA ATG A			
MMAex8s	CAT CAT AAC CTG AGC ATT ACA A	50	1.5	0
MMAex8as_2	AAA AGC AAG CTA TTA AT			
MMAex9s	CCT TTC CTT GAC TTT TTC	52	1.5	0
MMAex9as_3	ATG CCA TTA TTT TCT TTT GGG			
MMAex10s	AGT AAT TTC AGA AGA GAT GCT TTC A	60	1.5	0
MMAex10as	TTAAGCTCCAGTAGATCAAGG			
MMAex11s	ACT TGA AGA TTT GCT GTG	55	1.5	0
MMAex11as	TGT CTG TCA TCA TTT TAC TAC			
MMAex12s	CAG GGT TTT TAT AGT CAT TA	58	1.5	0
MMAex12as	CAA GAT TCC CAT CAC AGT			
MMAex13s	GAG TGA CAA AGA AGA AAG GAT AGG G	64	1.5	0
MMAex13as	CAA CCT GCT GTG CTT GAT TTT A			

*exon 9, 11, 12 引子序列參考 Qureshi et al, 1994; exon 3, 5 引子序列參考 Adjalla et al, 1998

表七、MMACHC 基因 exon 4a 聚合酶鏈反應之引子對與反應條件

Primer name	Primer sequence (5'-3')	annealing temperature ()	MgCl ₂ , (mM)	DMSO (%)
MMAC ex4aF	AGGCCTAGCTTGCAATGATG			
MMAC ex4aR	GAAGGCAGATGGGAATTCTG	69	1.5	0

(Lerner-Ellis *et al*, 2005)

表八、MMAB 基因 exon 9 自動核酸定序之引子對

Primer name	Primer sequence (5'-3')
MMAB exon9 S-new	ACCATTCTGTTTGCTTCTCTCTCT
MMAB exon9 R-new for sequencing	CACACACACACACGGCTCCAGC

*MMAB 基因 exon 9 使用原本的 primer 進行自動核酸定序會有 dinucleotides 干擾，故設計新的引子對進行定序

表九、以限制酶切割分析核苷酸多型性變異

polymorphism	Restriction enzyme	1 X NEBuffer NO.	temperature()	BSA*
c.-414C/T (<i>MMAB</i>)	<i>BsiE</i> I	2	60	
c.56-57GC/AA (<i>MMAB</i>)	<i>Hha</i> I	4	37	1 X
c.520-128C/T (<i>MMAB</i>)	<i>BsaJ</i> I	2	60	1 X
c.520-159 (<i>MMAB</i>)	<i>BstN</i> I	2	60	1 X
c.716 (<i>MMAB</i>)	<i>Nla</i> III	4	37	1 X

*100 X BSA : 10mg/ml

表十、反轉錄聚合酶鏈反應之引子對與反應條件

Primer name	Primer sequence (5'-3')	Annealing temperature ()	MgCl ₂ , (mM)	DMSO (%)
MMAA ex6 S	CTG CCA CTC AAT CAT GTT GTG ACT T			
MMAA ex6 AS	TCA TGA CTA CAC ACT CCG TCT TTG TC	62	0.8	1
MMAA ex7 S	TAA GAA TTA ACT GGC AGG TAT CAG C			
MMAA ex7 AS	CTA ACT TCC TTC AAG TTT TCA AGC A	61	0.8	0
MMAB ex9 S	CAT TAA GTG CAA GAT GGC TGG GC			
MMAB ex9 AS	TCC TTC TCA TTG CAG CAA TCA CT	65	1.2	0
MMAA 5' RT-PCR primer	GGAGGTCACAATCACATTGAGCCA			
MMAA 3' RT-PCR primer	CAAACAAAGAAGACAAGAGCACCA	67	1.2	0
MMAB RT-PCR 5' S	GGCAGGAGGTCAAGCAGCC			
MMAB plasmid 2 AS	TGCAGCAATCACTTTACCTGTCTTT	72	1.5	2
MCMAI	TCC AGG AGT GAA GCC ATT CAC A			
MCMAII	CAG GCC AGC CTG GAG TCC AGT T	70	1.5	0
MCMBI	CAT TCT TCA ATT CGA AGT TTA G	57	1.5	0
MMA2393AS	TAC TCT CTT CTT TGA TCA TAA C	61	1.5	0

表十一、病人之甲基丙二醯輔酶 A 變位酶活性分析結果 與 甲基丙二酸血症分型

patients	Area	Methylmalonate in urea (GC / MS)	MCM activity nmol/min/mg protein ^c (cell type)	B12 responsive treatment	Homocysteine accumulation ^d	MMA type
MMA001 ^a	Taiwan	+	5.7 (F)	+	Not available	<i>cbl</i> type
MMA010	Taiwan	+	9.7 (L)	+	Not available	<i>cbl</i> type
MMA011 ^b	Taiwan	+	1.2 (L)	+	-	<i>cblA</i> 或 <i>cblB</i> 或 <i>cblH</i>
MMA013	Beijing	+	9.3 (F)	+	202.43 (U)	<i>cblC</i> 或 <i>cblD</i> 或 <i>cblF</i>
MMA014	Beijing	+	8.4 (F)	Not available	38.18 (B)	<i>cblC</i> 或 <i>cblD</i> 或 <i>cblF</i>
MMA019	Beijing	+	10.5 (F)	+	210.46 (B)	<i>cblC</i> 或 <i>cblD</i> 或 <i>cblF</i>
MMA021	Taiwan	+	5.3 (L)	+	-	<i>cblA</i> 或 <i>cblB</i> 或 <i>cblH</i>
MMA022	Beijing	+	9.5 (L)	Not available	470.57 (U)	<i>cblC</i> 或 <i>cblD</i> 或 <i>cblF</i>
MMA023	Beijing	+	6.7 (L)	Not available	114.54 (U)	<i>cblC</i> 或 <i>cblD</i> 或 <i>cblF</i>
MMA024	Beijing	+	7.5 (L)	Not available	24.8 (U)	<i>cblC</i> 或 <i>cblD</i> 或 <i>cblF</i>
MMA025	Beijing	+	0 (L)	+	-	<i>mut</i>
MMA026	Beijing	+	6.5 (L)	+	105.33 (B)	<i>cblC</i> 或 <i>cblD</i> 或 <i>cblF</i>
control cell- GM595	Caucasian	Not available	12.9 (F)	+	Not available	<i>cblA</i>

^aPA incorporation : 86/120 pmol/hr/mg protein (ref : >330)

^bMCM activity of MMA011 was determined by 林華峰

^cMCM reference range

L : lymphoblast - >1.1 nmol/min/mg protein

F : skinfibroblast - >1.4 nmol/min/mg protein

^dHomocystein reference range :

U : Urine - <20 umol/L

B : Blood - 4-12 umol/L

表十二、國外已發表之 *MMAA* 及 *MMAB* 基因的核苷酸多型性

polymorphism	Heterozygosity		Allele frequency in Chinese		H-W equilibrium ^c (χ^2)
	Chinese ^a	Caucasian ^b			
c.-2263A/C (<i>MMAA</i>)	ND ^d	Not available			
c.-1755A/G (<i>MMAA</i>)	0.5	Not available	A (0.53)	G (0.47)	+ (0.21)
c.-1391A/T (<i>MMAA</i>)	0.49	0.49	T (0.56)	A (0.44)	+ (0.15)
c.-996C/T (<i>MMAA</i>)	0.5	0.5	C (0.55)	T (0.45)	+ (1.66)
c.1089G/C (Q363H) (<i>MMAA</i>) ^e	0.18	0.125	G (0.9)	C (0.1)	+ (0.65)
c.56-57GC/AA (R19Q) (<i>MMAB</i>) ^e	0.2	0.262	GC (0.89)	AA (0.11)	+ (0.86)
c.520-96C/T (<i>MMAB</i>)	0.26	Not available	C (0.85)	T (0.15)	+ (0.04)
c.585-204A/G (<i>MMAB</i>)	ND ^d	0.225			
c.716T/A (M239K) (<i>MMAB</i>) ^e	0.41	0.5	T (0.71)	A (0.29)	+ (2.71)

^aHeterozygosity in chinese is calculated with 56 normal chinese obtained in this study

^bHeterozygosity in caucasian is listed in dbSNP of NCBI

^c+ : in H-W equilibrium ; - : in H-W disequilibrium

^dND : not determined

^epaper reported (Ref : Dobson *et al*, 2002b; Lerner-Ellis *et al*, 2004)

表十三、新發現之 *MMAA* 及 *MMAB* 基因的核苷酸多型性

polymorphism	Heterozygosity Chinese ^a	Allele frequency in Chinese		H-W equilibrium ^b (χ^2)
c.-1740A/G (<i>MMAA</i>)	0.04	G (0.98)	A (0.02)	+ (0.02)
c.-713A/G (<i>MMAA</i>)	0.49	G (0.57)	A (0.43)	+ (0.68)
c.-469A/G (<i>MMAA</i>)	0.11	G (0.94)	C (0.06)	- (14.15)
c.67+52C/T (<i>MMAA</i>)	0.3	C (0.82)	T (0.18)	- (37.37)
c.734-264G/A (<i>MMAA</i>)	0.21	G (0.88)	T (0.12)	+ (2.46)
c.819+168C/G (<i>MMAA</i>)	0.18	C (0.9)	G (0.1)	+ (0.65)
c.884+2678C/T (<i>MMAA</i>)	0.49	C (0.96)	T (0.04)	+ (0.15)
c.-414C/T (<i>MMAB</i>)	0.08	C (0.96)	T (0.04)	+ (0.08)
c.520-159C/T (<i>MMAB</i>)	0.26	C (0.85)	T (0.15)	+ (0.04)
c.520-128C/T (<i>MMAB</i>)	0.26	C (0.85)	T (0.15)	+ (0.04)

a.Heterozygosity in chinese is calculated with 56 normal chinese obtained in this study

^b + : in H-W equilibrium ; - : in H-W disequilibrium

表十四、*MMAA* 基因上之核苷酸多型性單套型於正常華人之發生率

NO	Haplotype	Haplotype frequency (n=112)
1	AGACGGCGCTG	0.428
2	GGTTAGCGCCG	0.330
3	AGTCGGTAGCC	0.079
4	GGTTAACGCCG	0.063
5	GGTTGGCACCG	0.018
6	GGTTAGTGCCG	0.018
7	GATTAGCGCCG	0.018
8	AGTCGGCAGCC	0.010
9	AGACGGTGCTG	0.009
10	AGTCGGTGGCC	0.009
11	GGTTGGCGCCG	0.009
12	GGTTAGCACCG	0.009
13	AGTCAGTAGCC	< 0.001
14	GGTTAGTACCG	< 0.001

SNP 依序為： c.-1755A/G、c.-1740A/G、c.-1391A/T、c.-996C/T、c.-713A/G、c.-469A/G、c.67+52C/T、c.734-264G/A、c.819+168C/G、c.884+2678C/T、c.1089G/C

表十五、MMAB 基因上之核苷酸多型性單套型於正常華人之發生率

NO	Haplotype	Haplotype frequency (n=112)
1	C(GC)(CCC)T	0.714
2	C(GC)(TTT)A	0.107
3	C(AA)(CCC)A	0.104
4	T(GC)(TTT)A	0.036
5	C(GC)(CCC)A	0.027
6	T(AA)(CCC)A	0.012
7	T(GC)(CCC)T	< 0.001

SNP 依序為：c.-414C/T、c.56-57GC/AA、c.520-159C/T、c.520-128C/T、c.520-96C/T、c.716T/A

表十六、MMAA 基因上之核苷酸連鎖分析

Results of pair-wise LD statistics between all pairs of markers

		Cramer's U										
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
p value	1		0.144	0.821	1.000	0.947	0.277	0.152	0.147	0.305	0.821	0.305
	2	0.18969		0.115	0.148	0.152	0.035	0.047	0.049	0.044	0.115	0.044
	3	0.00000	0.33747		0.807	0.778	0.229	0.236	0.319	0.291	1.000	0.291
	4	0.00000	0.17731	0.00000		0.945	0.282	0.141	0.135	0.300	0.807	0.300
	5	0.00000	0.16151	0.00000	0.00000		0.293	0.148	0.232	0.289	0.778	0.289
	6	0.00410	0.61012	0.01776	0.00843	0.00250		0.091	0.094	0.086	0.229	0.086
	7	0.18462	0.49762	0.01639	0.22067	0.16586	0.19760		0.624	0.808	0.236	0.808
	8	0.21462	0.47950	0.00224	0.25790	0.03197	0.19492	0.00000		0.815	0.319	0.815
	9	0.02477	0.51693	0.00458	0.03235	0.02207	0.24010	0.00000	0.00000		0.291	1.000
	10	0.00000	0.33747	0.00000	0.00000	0.00000	0.01776	0.01639	0.00224	0.00458		0.291
	11	0.02477	0.51693	0.00458	0.03235	0.02207	0.24010	0.00000	0.00000	0.00000	0.00458	

SNP 依序為：c.-1755A/G、c.-1740A/G、c.-1391A/T、c.-996C/T、c.-713A/G、c.-469A/G、c.67+52C/T、c.734-264G/A、c.819+168C/G、c.884+2678C/T、c.1089G/C

分析程式：GENECOUNTING (version2.1)

N = 56

表十七、MMAB 基因上之核苷酸連鎖分析

Results of pair-wise LD statistics between all pairs of markers

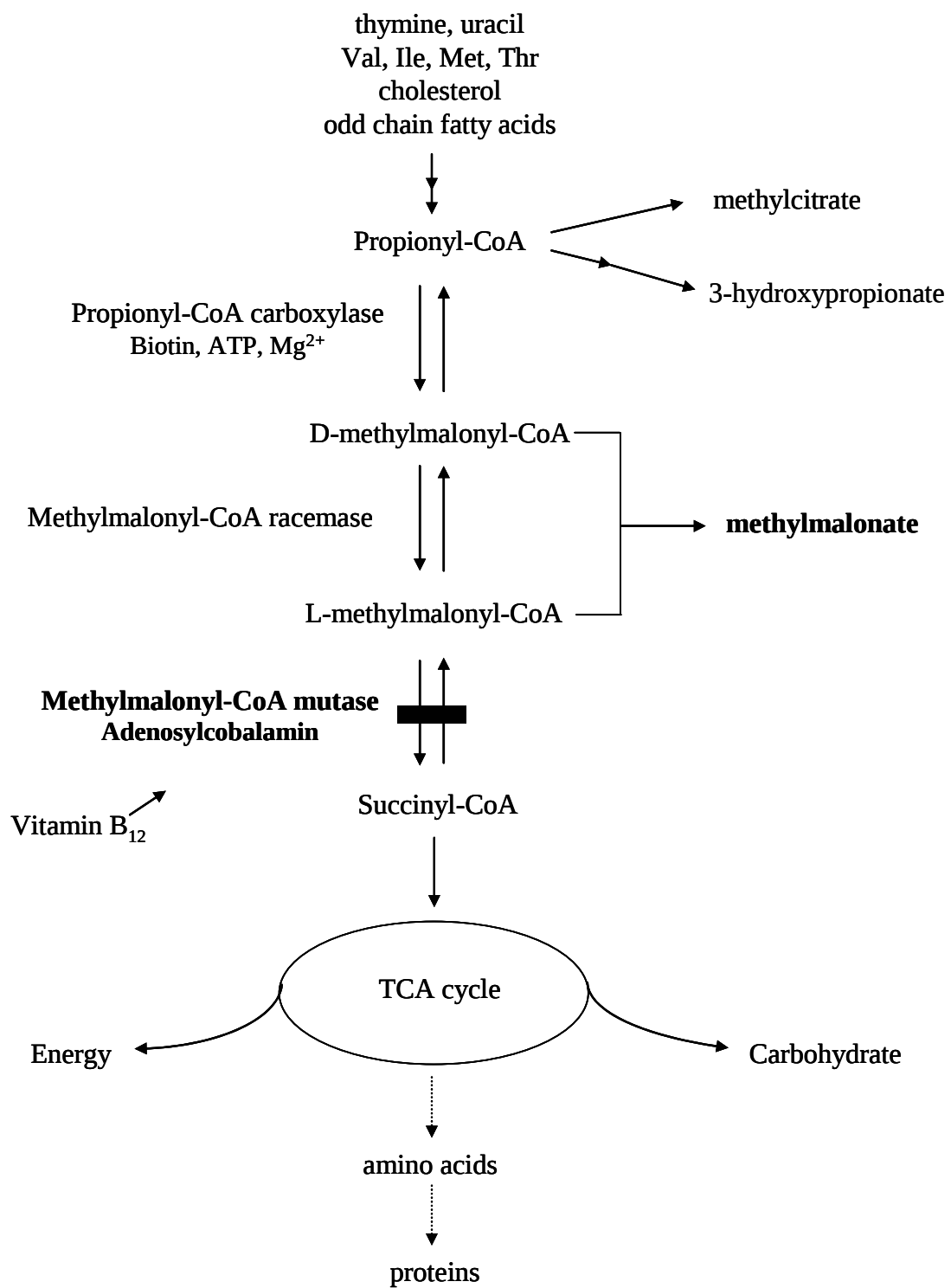
		Cramer's U					
		1	2	3	4	5	6
p value	1		0.145	0.404	0.404	0.404	0.353
	2	0.34278		0.138	0.138	0.138	0.573
	3	0.00932	0.36518		1.000	1.000	0.645
	4	0.00932	0.36518	0.00000		1.000	0.645
	5	0.00932	0.36518	0.00000	0.00000		0.645
	6	0.00489	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	

SNP 依序為 c.-414C/T、c.56-57GC/AA、c.520-159C/T、c.520-128C/T、c.520-96C/T、c.716T/A
 分析程式：GENECOUNTING (version2.1)
 N = 56

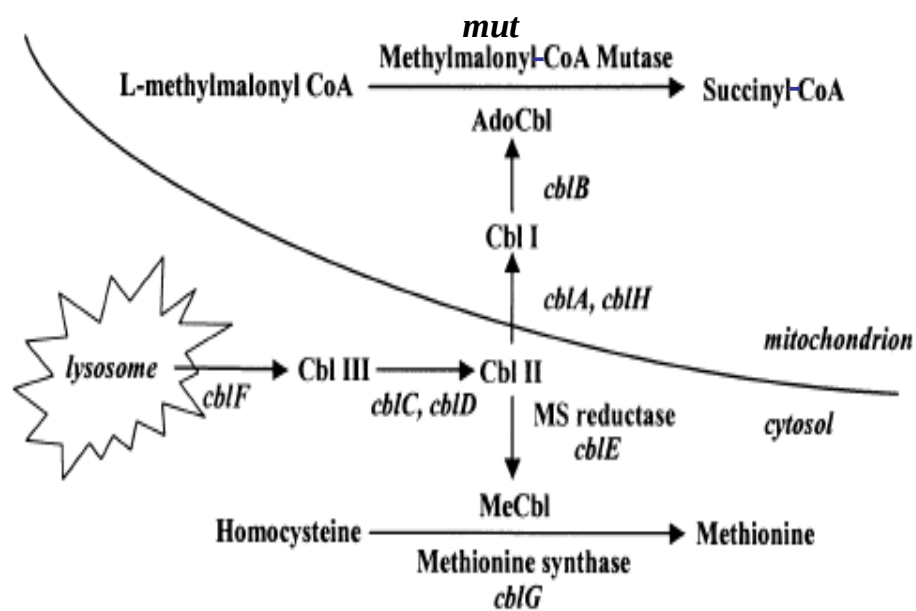
表十八、病人之 MMAA 及 MMAB 基因的核苷酸多型性

patient	MMAA	MMAB
MMA001	NF ^a	c.716T/A
MMA010	c.-2263A/C c.-1755A/G c.-1391A/T c.-996C/T c.-713A/G c.-469G/G c.884+2678C/T (IVS5-169C/T)	c.-414C/T c.520-159C/T (IVS6-159C/T) c.520-128C/T (IVS6-128C/T) c.520-96C/T (IVS6-96C/T) c.585-204A/G (IVS7-204A/G) c.716T/A
MMA011	c.-2263A/C c.-1755A/G c.-996C/T c.-713A/G c.-469A/G c.67+52C/T (IVS1+52C/T) c.734-264G/T (IVS4-264G/T) c.819+168C/G (IVS5+168C/G) c.1089G/C	c.56-57GC/AA c.716T/A
MMA021	c.-2263A/C c.-1755A/G c.-1740 A/G c.-1391A/T c.-996C/T c.-713A/G c.-469G/G c.884+2678C/T (IVS5-169C/T)	c.716T/A

^a NF : not found



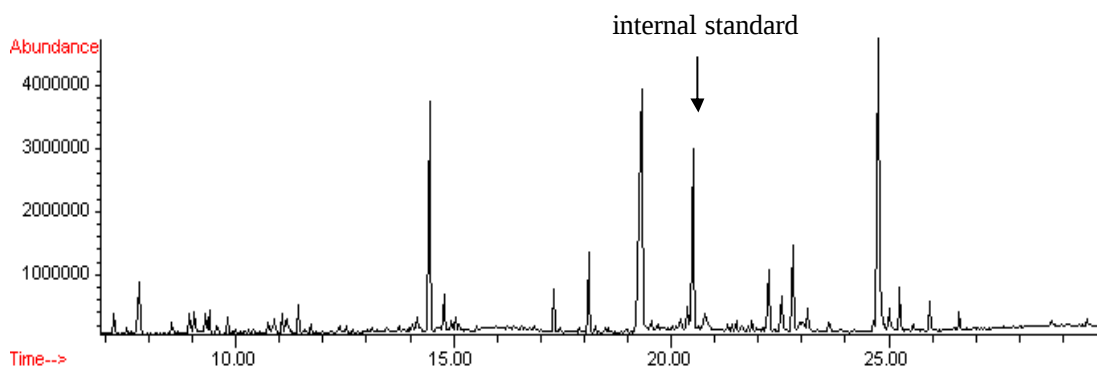
圖一. 甲基丙二酸代謝途徑



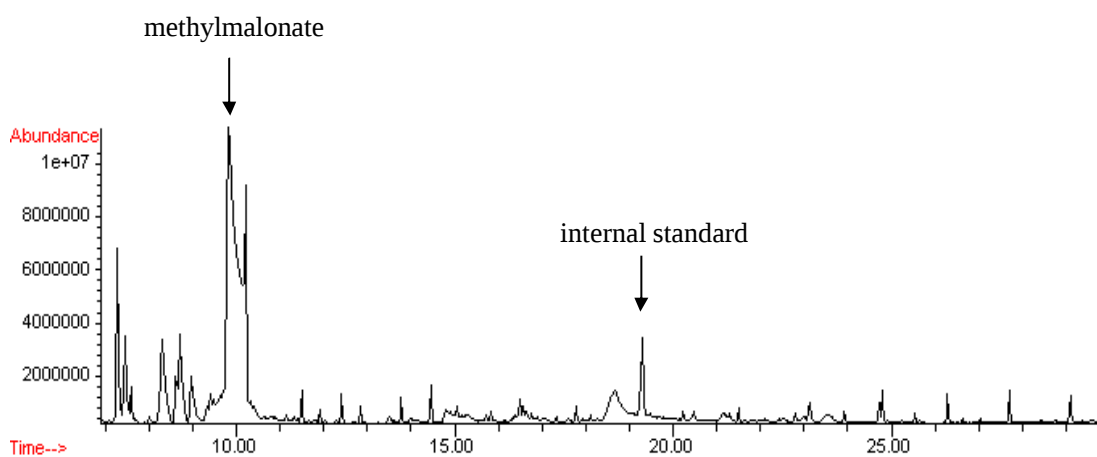
(Dobson *et al*, 2002a, 2002b)

圖二．甲基丙二酸血症之分類

(A) normal



(B) MMA patient



GC/MS : HP6890 MS5973

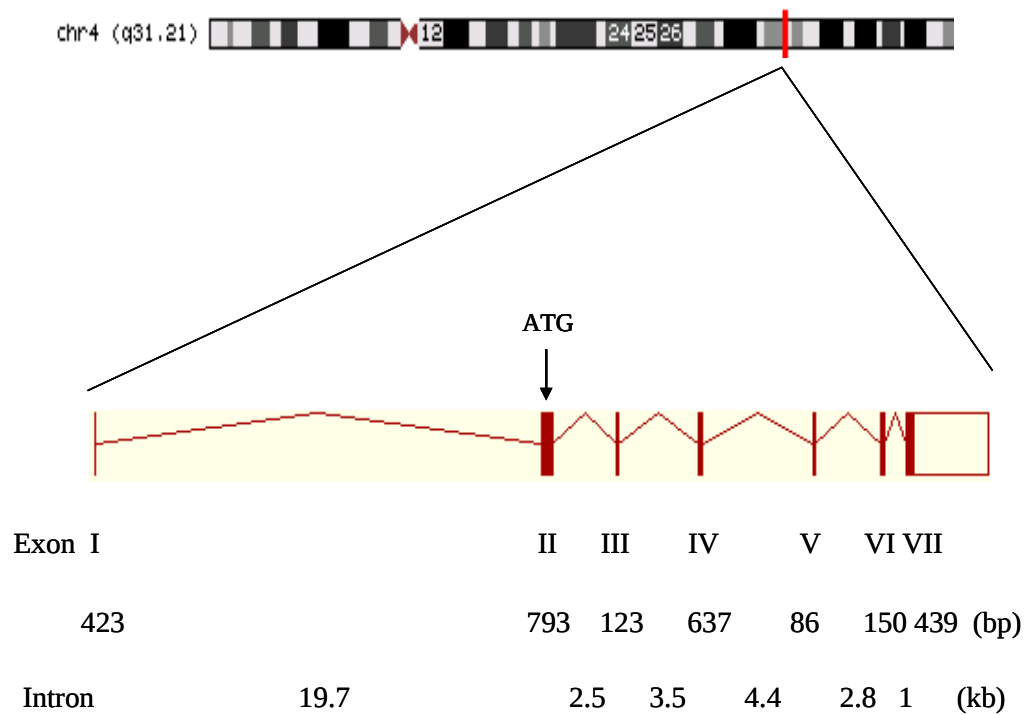
Column : HP-5MS

Internal standard : PDA (pentadecanoic acid)

圖三.尿液有機酸之氣相層析質譜儀 (GC/MS) 分析圖譜

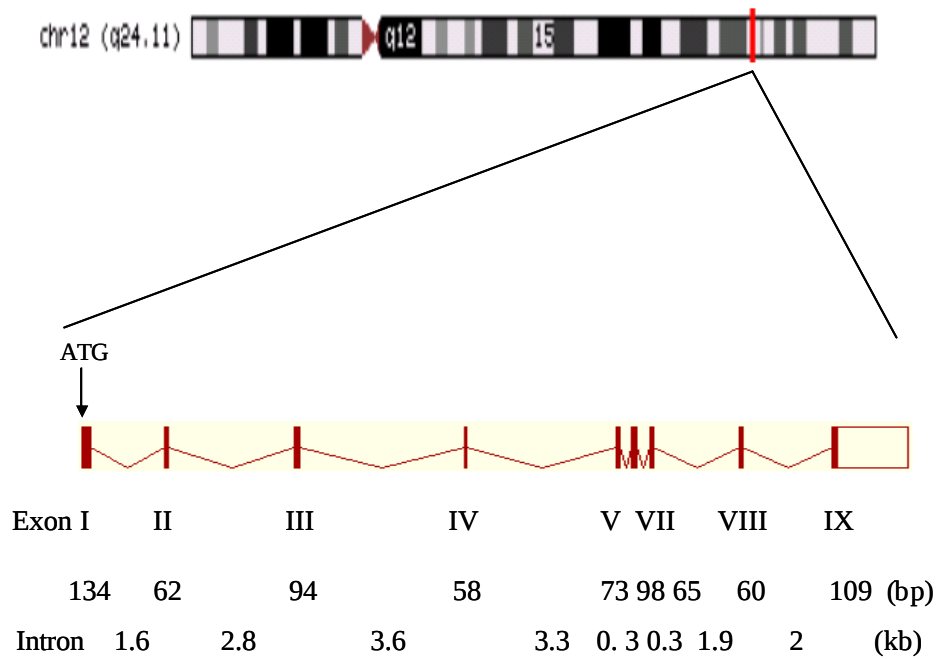
(A) 正常人

(B) MMA 患者在尿液 GC/MS分析圖譜中可觀察到 methylmalonate 堆積



GeneBank accession No : genomic DNA : AF524841-AF524846
 mRNA : NM_172250

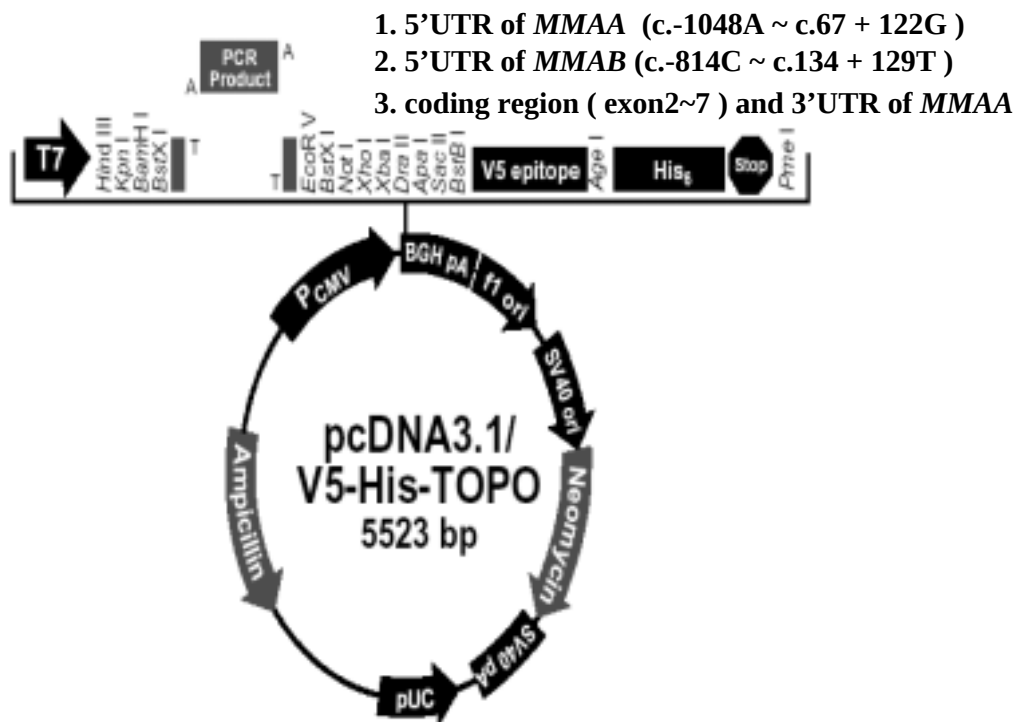
圖四、*MMAA* 基因結構圖



GeneBank accession No : genomic DNA : AF550396-AF550404

mRNA : NM_052845

圖五、MMAB 基因結構圖



https://www.invitrogen.com/content/sfs/manuals/pcdna3.1topota_man.pdf

圖六、 pcDNA3.1/V5-His-TOPO 載體之結構圖

以 pcDNA3.1/V5-His-TOPO 為載體構築了三個質體作為南方點墨法的探針

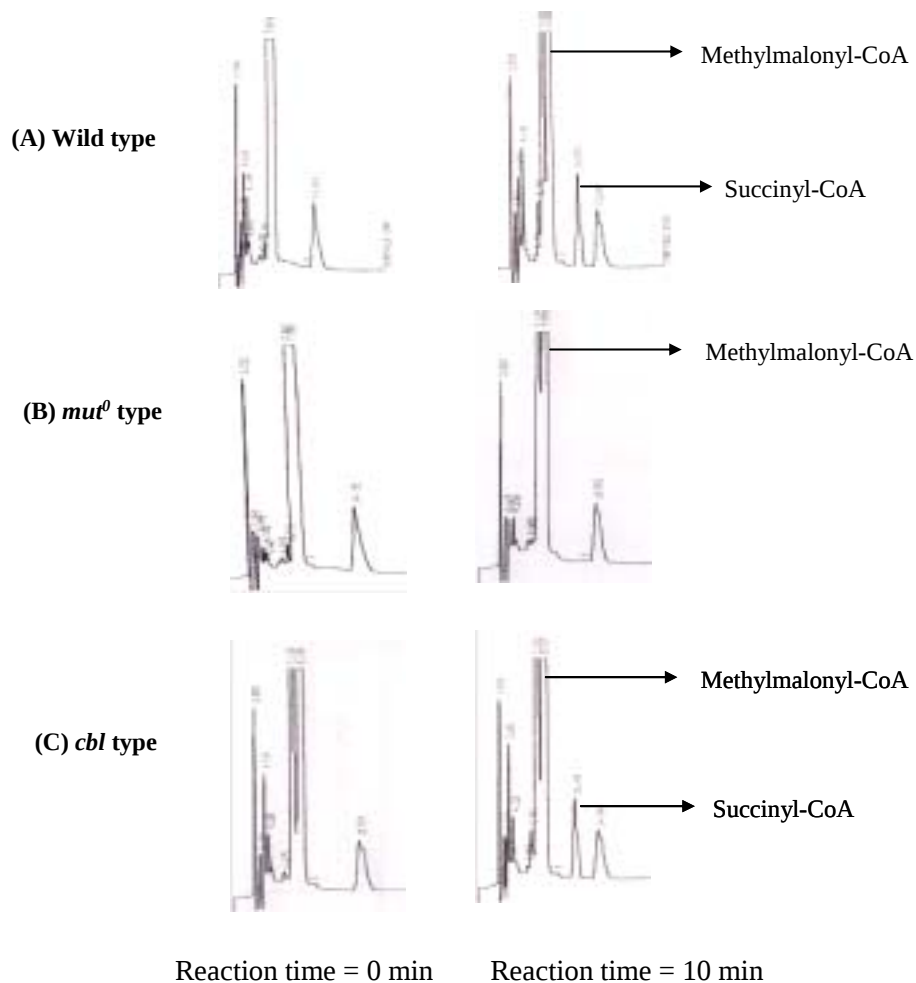
- (1) 包含 *MMAA* 基因 5' UTR的質體
- (2) 包含 *MMAB* 基因 5' UTR的質體
- (3) 包含 *MMAA* 基因 coding region (exon2-7) 和 3' UTR的質體



<http://mgc.nci.nih.gov/Tissues/LibInfo?ORG=Hs&LID=7635>

圖七、 pOTB7 載體之結構圖

以 pOTB7 為載體包含 MMAB 基因 cDNA 全長的質體 (由陽明大學基因體研究中心提供)

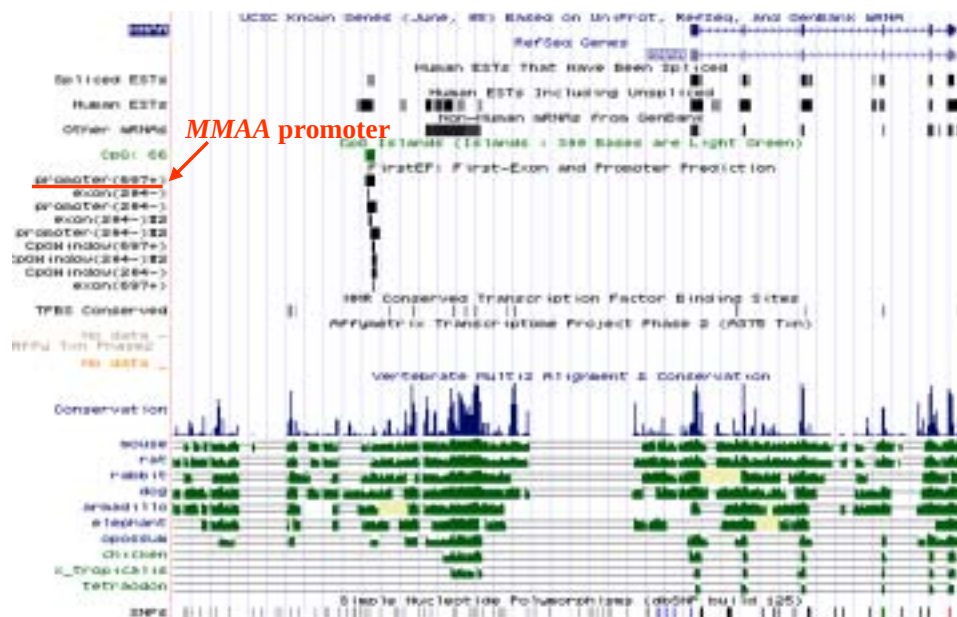


Column : Finepak SIL C187-5 , 保護管柱 : Nucleosil 120-5 C-18
 Mobile phase : 220mM phosphate buffer(pH 4.0)內含14 % (v/v) methanol及0.4 % (v/v) chloroform
 流速 : 1.0 ml/min
 分析管柱溫度 : 30
 UV 偵測器 : 波長254nm

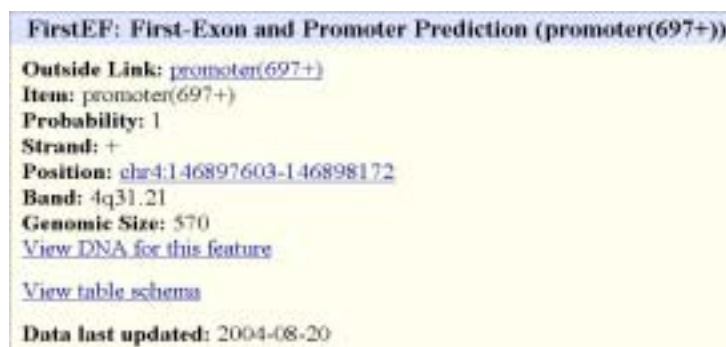
圖八、MCM 活性分析結果圖

- (A) 正常人具 MCM 酵素活性將 methylmalonyl-CoA 代謝成 succinyl-CoA
 (B) *mut* type MMA病人缺乏 MCM 酵素活性將 methylmalonyl-CoA 代謝成 succinyl-CoA
 (C) *cbl* type MMA病人具 MCM 酵素活性將 methylmalonyl-CoA 代謝成 succinyl-CoA

(A)

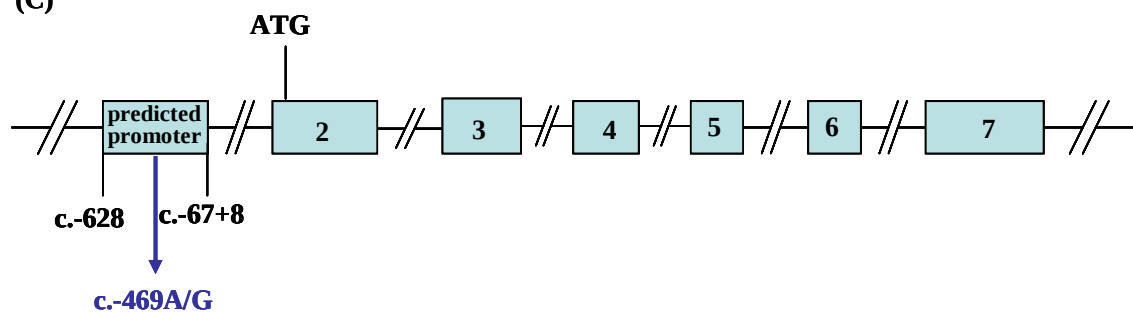


(B)



<http://genome.cse.ucsc.edu/>

(C)



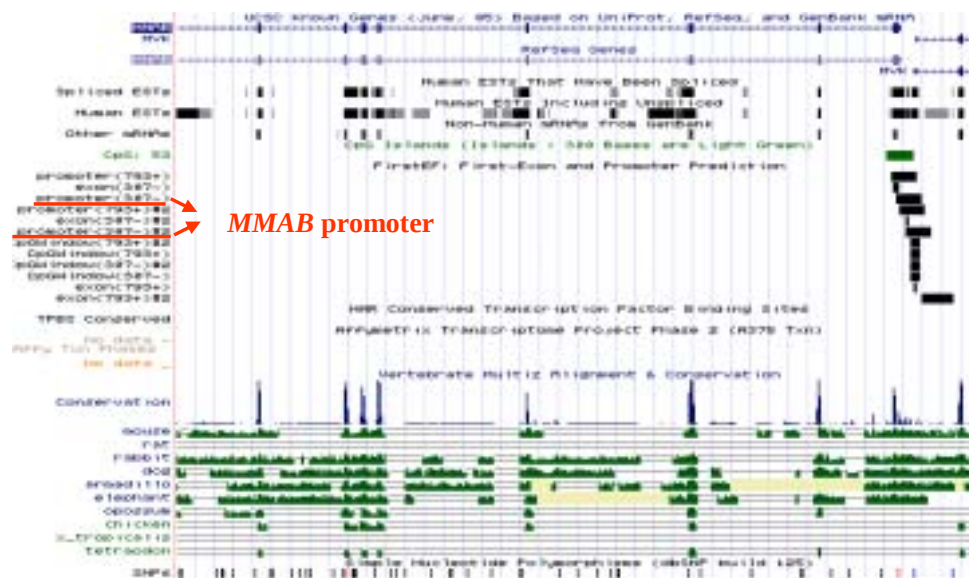
圖九、MMAA 基因 promoter region 預測

(A) 利用 UCSC 網站所預測的 MMAA 基因啟動子

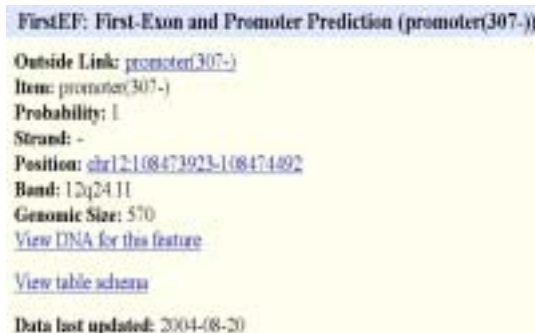
(B) MMAA 基因啟動子位置

(C) MMAA 基因啟動子區域示意圖 (c.-628 ~ c.-67+8)

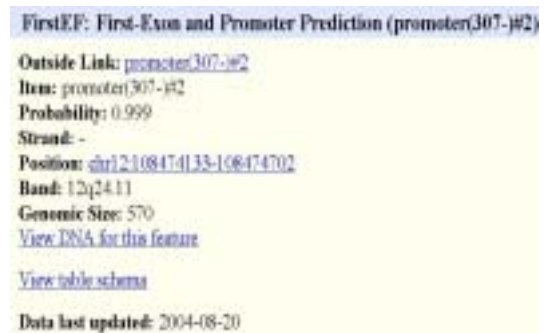
(A)



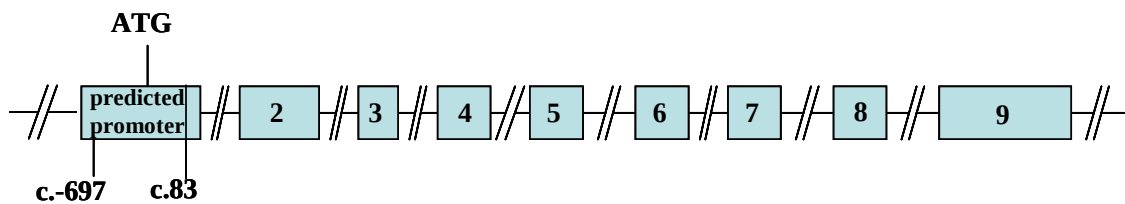
(B)



(C)



(D)



<http://genome.cse.ucsc.edu/>

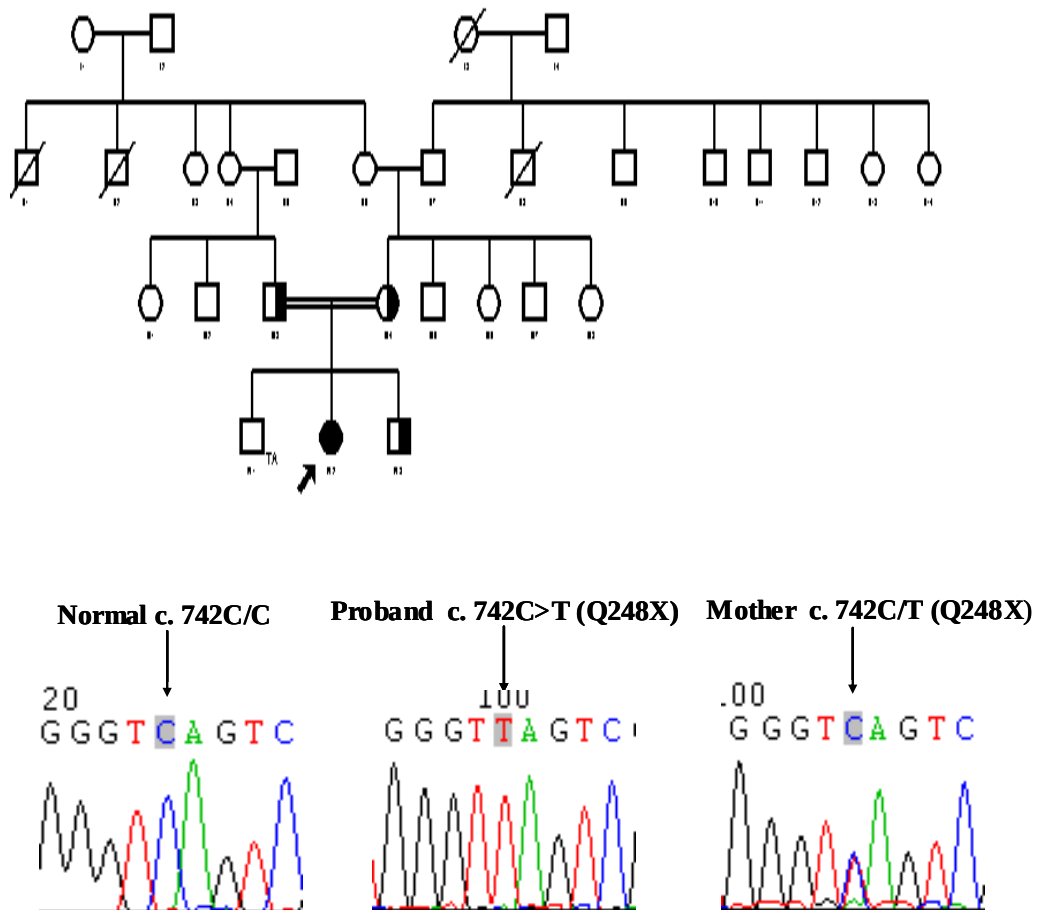
圖十、MMAB 基因 promoter region 預測

(A) 利用 UCSC 網站所預測的 MMAB 基因啟動子

(B)(C) MMAB 基因啟動子位置

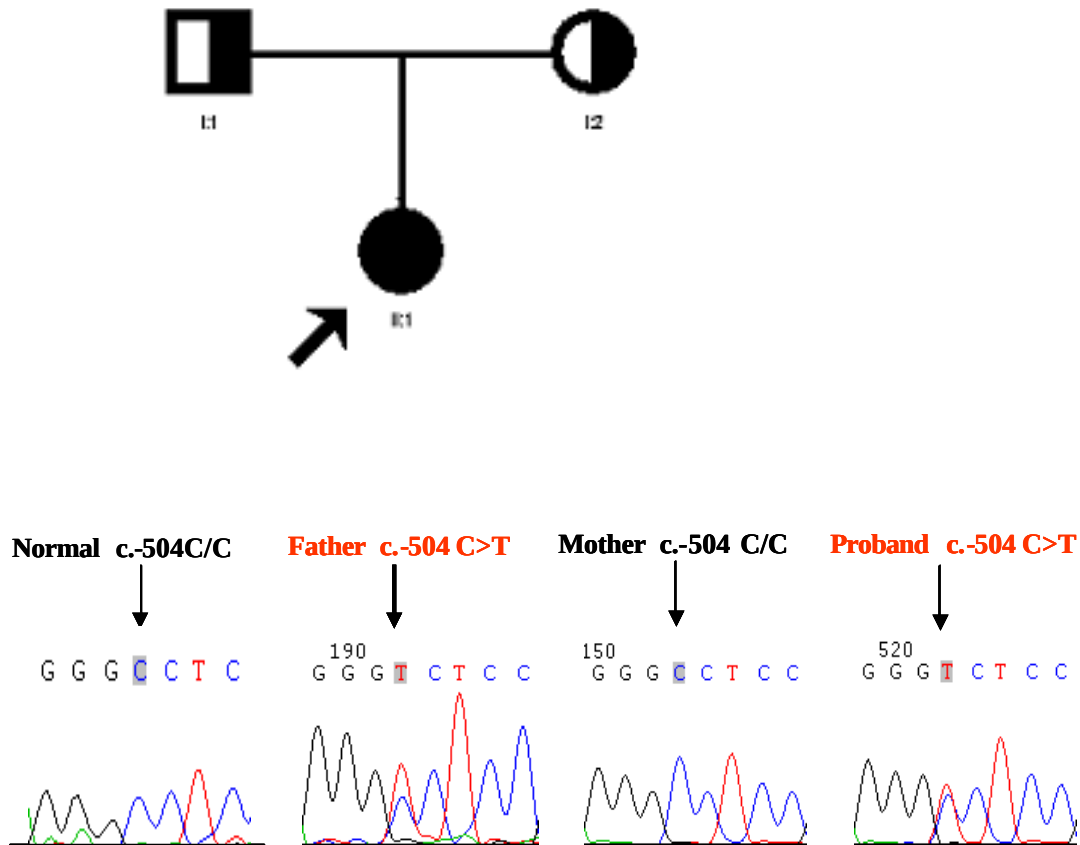
(D) 合併(B)(C)所得之 MMAB 基因啟動子區域示意圖 (c.-697 ~ c.83)

MMA001 Family



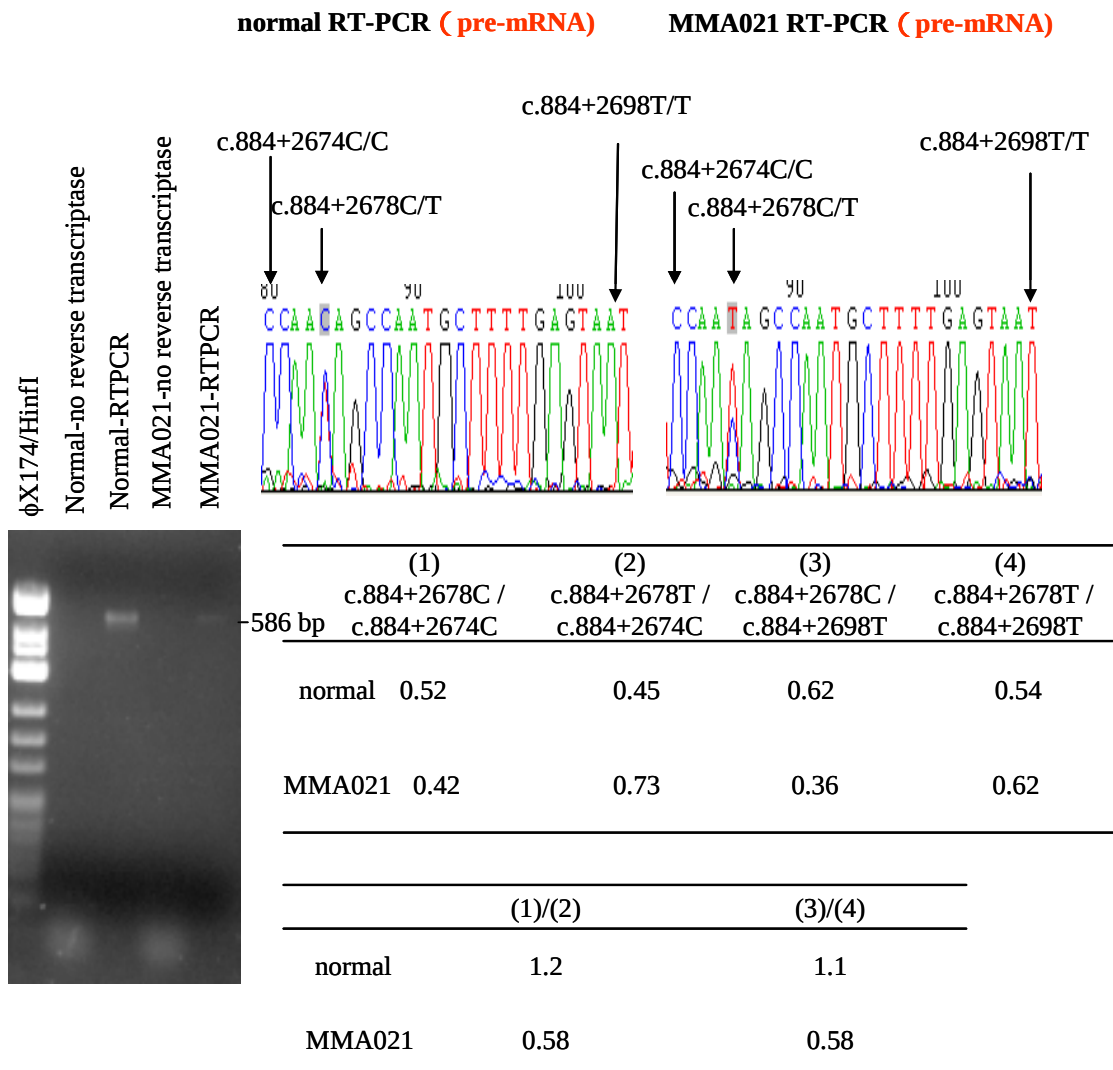
圖十一、MMA001 family 家庭 MMAA 突變分析 – MMAA : c.742C>T
 proband (IV:2) 為 c.742C>T homozygote
 mother (IV:2) 為 c.742C>T heterozygote

MMA021 Family



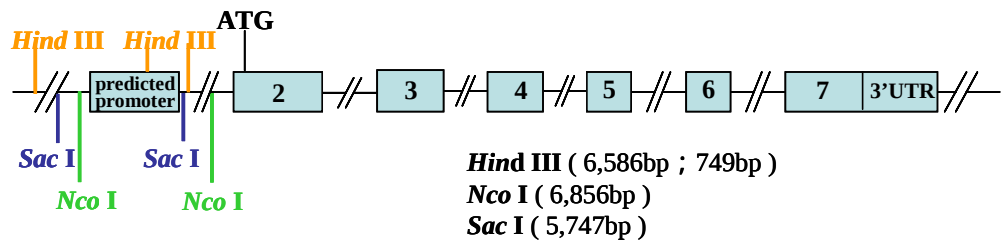
圖十二、MMA021 family 家庭 MMAA 突變分析 – MMAA : c.-504C>T
 proband (II:1) 和 father (I:1) 為 c.-504C>T heterozygote
 mother (I:2) 和 normal 為c.-504C/C homozygote

MMA021 Family

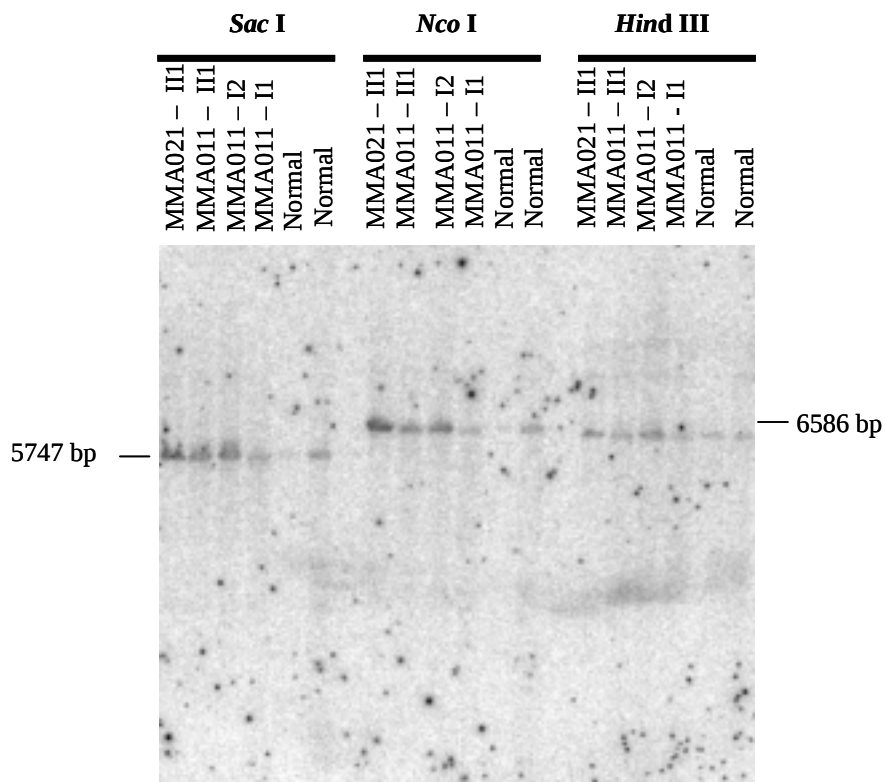


圖十三、MMA0021 family MMAA pre-mRNA 之 RT-PCR 分析
 度量 sequence peak 高度並標準化結果顯示病患自父親遺傳而來的 C allele 在 precursor RNA level 表現量上為 T allele (來自母親) 的 0.6 倍

(A)



(B)



圖十四、MMA011 和 MMA021 家庭之 MMAA 基因 5' UTR 南方點墨法分析

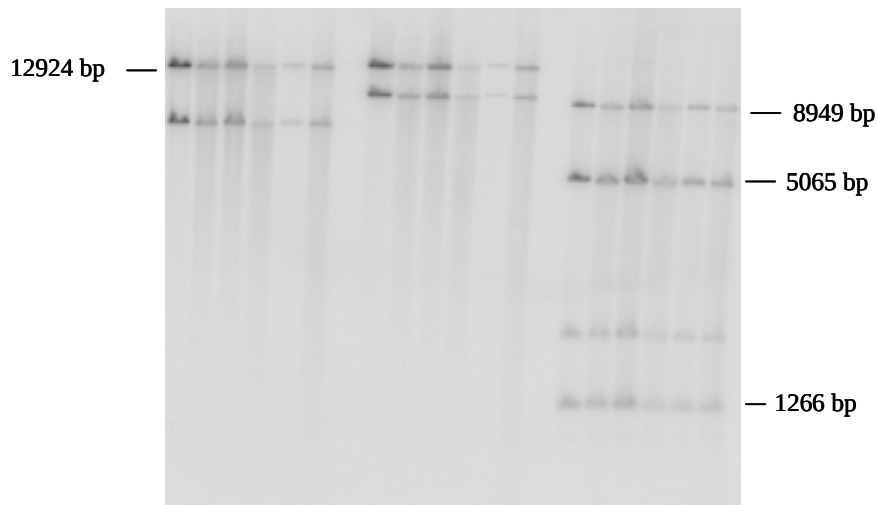
(A) 以 MMAA 基因 5' UTR 為探針可偵測的基因位置與片段大小示意圖

(B) normal, MMA011 和 MMA021 家庭之 MMAA 基因 5' UTR 南方點墨法分析結果圖

Diagram illustrating the pCMV8.2 vector construct. The construct is a linear DNA molecule with a central multiple cloning site (MCS) flanked by two light blue boxes labeled '2' and '7'. The MCS contains seven restriction sites: Hind III, Sac I, Nco I, Hind III, Sac I, Nco I, and Hind III. The 3' UTR is located downstream of box 7. The construct is flanked by an ATG start codon and a Hind III site. The vector is circular, as indicated by the break symbol at the end.

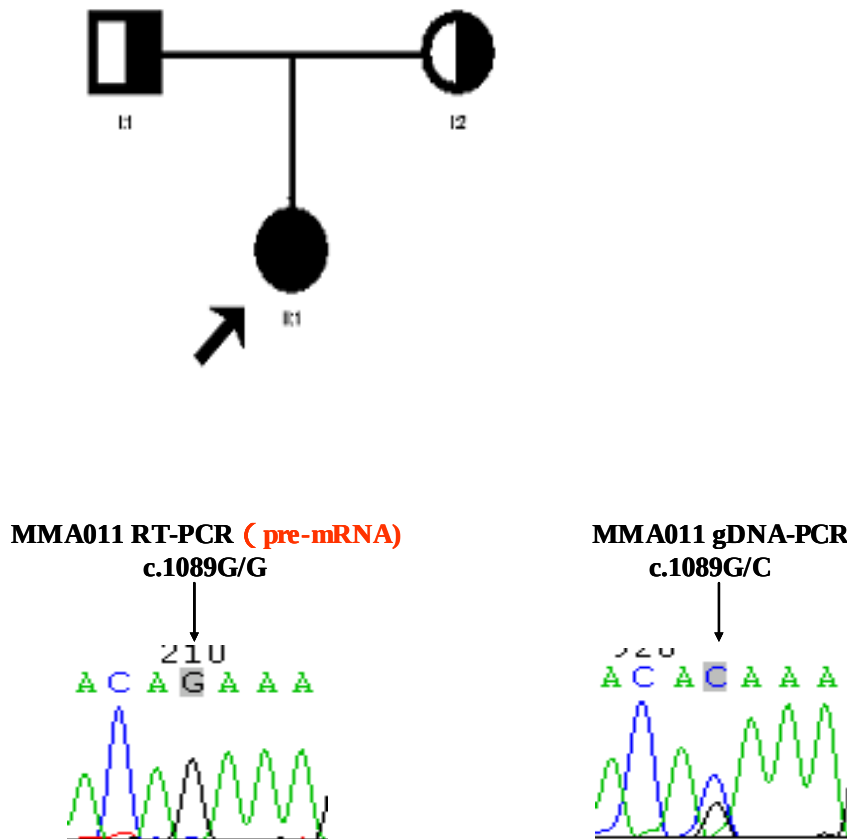
SacI (12,924bp ; 7,261bp)

<i>Sac</i> I		<i>Nco</i> I		<i>Hind</i> III	
MMA021 – II1		MMA021 – II1		MMA021 – II1	
MMA011 – II1		MMA011 – II1		MMA011 – II1	
MMA011 – I2		MMA011 – I2		MMA011 – I 2	
MMA011 – I1		MMA011 – I1		MMA011 – I1	
Normal		Normal		Normal	
Normal		Normal		Normal	



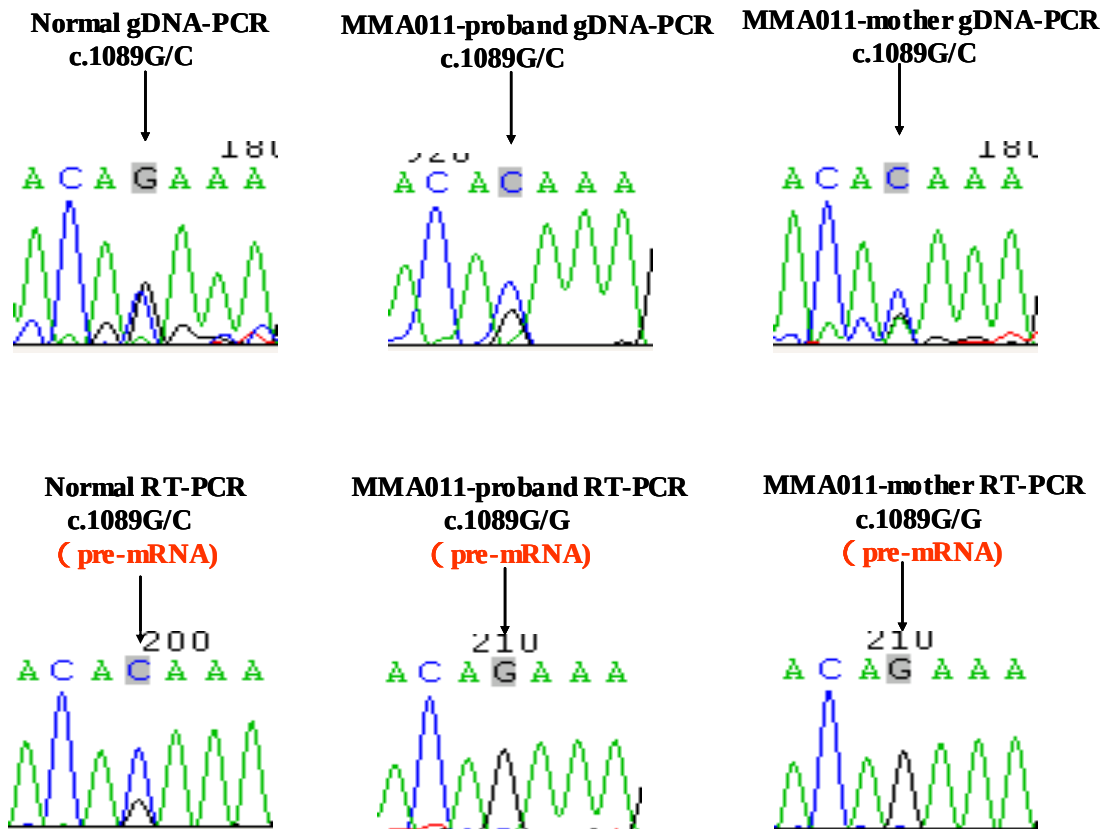
分析結果圖

MMA011 Family



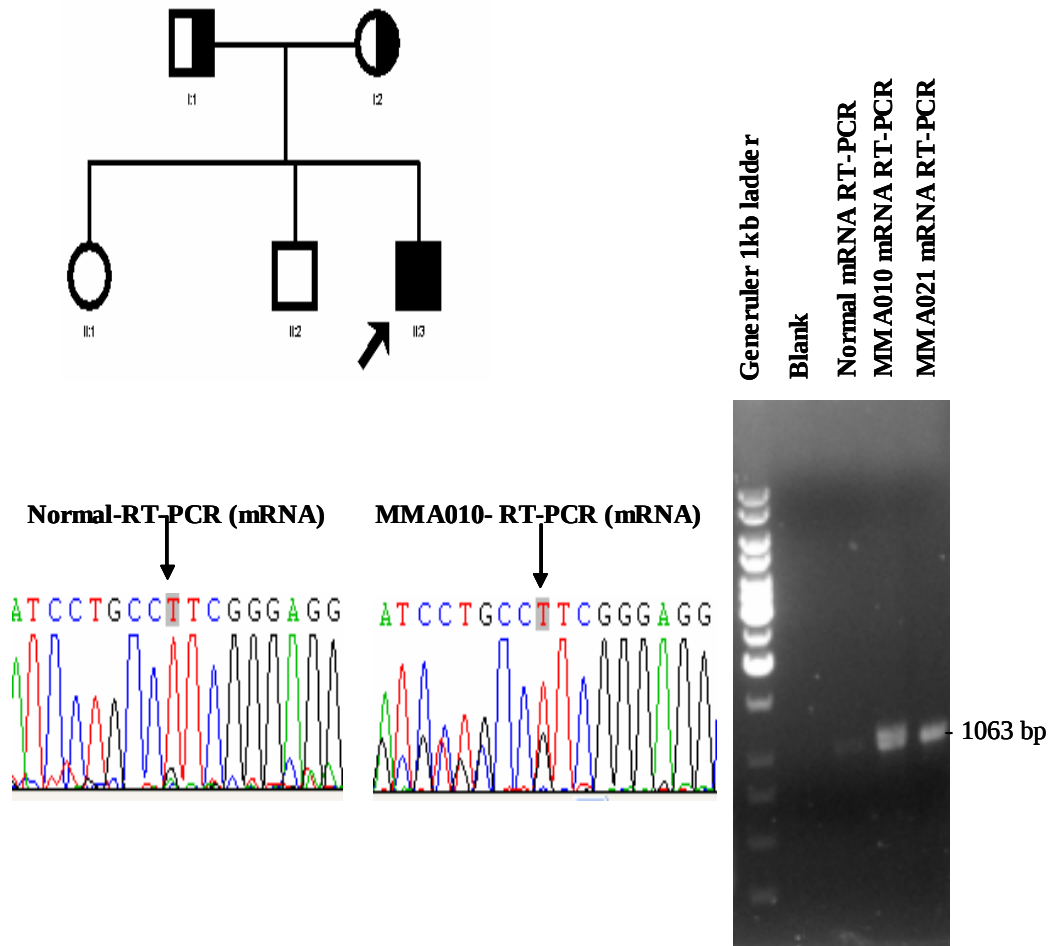
圖十六、MMA011 之 *MMAA* pre-mRNA RT-PCR 定序分析
prband (II:1) 在 precursor RNA 轉錄時少了一個對偶基因 C allele 的表達

MMA011 Family



圖十七、MMA011 family 之 MMAA pre-mRNA RT-PCR 定序分析
與正常轉錄兩個對偶基因的正常人相比，proband 和 mother 少轉錄了一個對偶基因 C allele

MMA010 Family

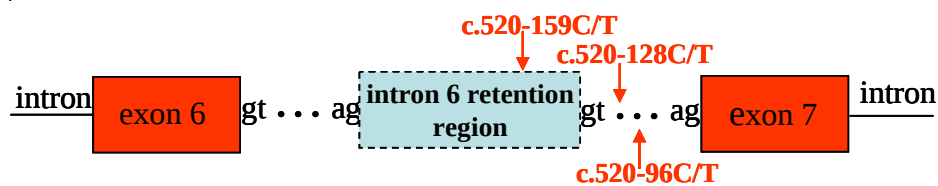


圖十八、MMA010 family 之 *MMAB* mRNA RT-PCR 定序分析
proband 在 mRNA level 表現上多了小片段的 intron 保留

(A)

tctggtgggtgatggcctcatggcagttccctctgctccttggtcctcagAGTATACCACGTTCAAGGCG
 GGGCCCATCCTGGAGCTGGAGCAGTGGATCGACAAGTACACCAGCCAGCT
 CCCACCACTCACGGCCTTCATCCTGCCTgtaggtactgggcaggcttaaccgggggcggctgca
 ggcaggttcagtgacagacacacatgggctctgaataaatccctcttttcacagtacagacgctgtcctccagttcccaa
 gtccctccaggtcctcaccgggtccctccagccctgccactctggagcagcgtgcccggtgggtgtgctgtggcaggg
 ctctggagggcagaacactgccgggttggggggcagggctggacttcagaggagctcctgtccgcagtgggcacacct
 tcccacctgtcaggcaatgtccctttctccttcagTCGGGAGGCAAGATCAGCTCGGCGCTG
 CATTTCTGCCGGGCCGTGTGCCGCCGGCCGAGAGACGgtaagagggtggagagag

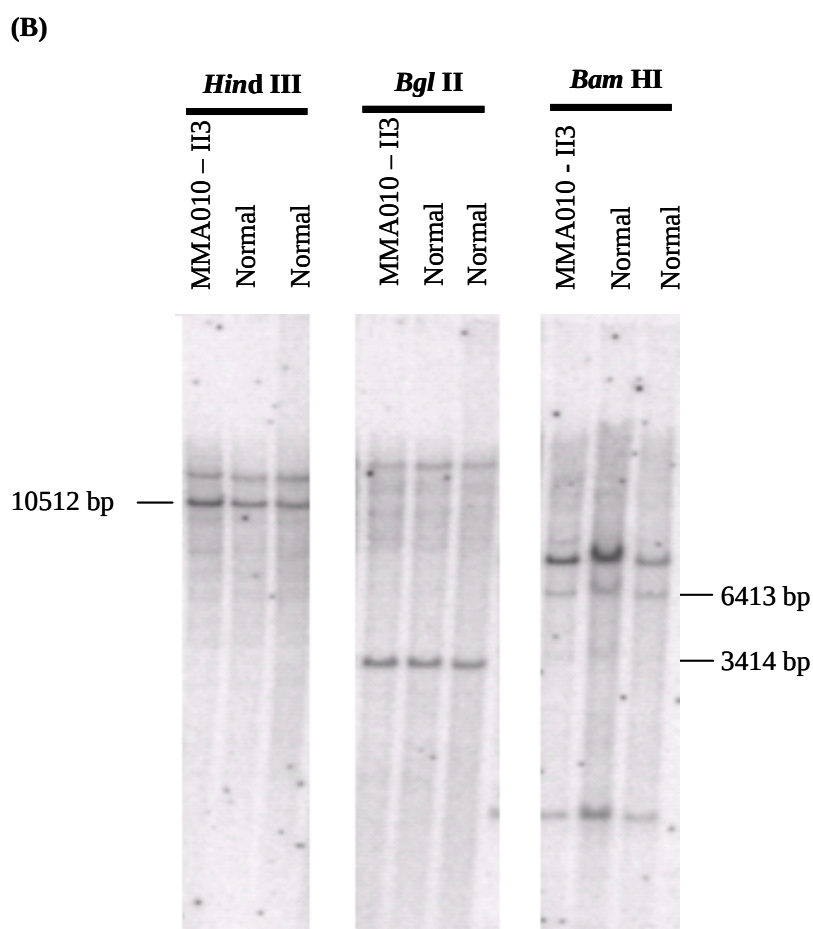
(B)



圖十九、 MMA010 family 之 *MMAB* 基因 intron 6 retention region

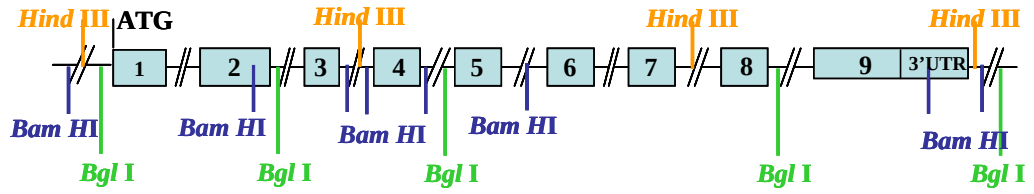
(A) 英文字母大寫代表 exon；小寫代表 intron；箭頭所示為 intron 的保留區域
 下標線代表三個連鎖 SNP

(B) 為 *MMAB* 基因 intron 6 retention region 示意圖



圖二十、MMA010 家庭之 MMAB 基因 5' 端非轉譯區南方點墨法分析
 (A) 以 MMAB 基因 5' UTR 為探針可偵測的基因位置與片段大小示意圖
 (B) normal 和 MMA010 家庭之 MMAB 基因 5' UTR 南方點墨法分析結果圖

(A)

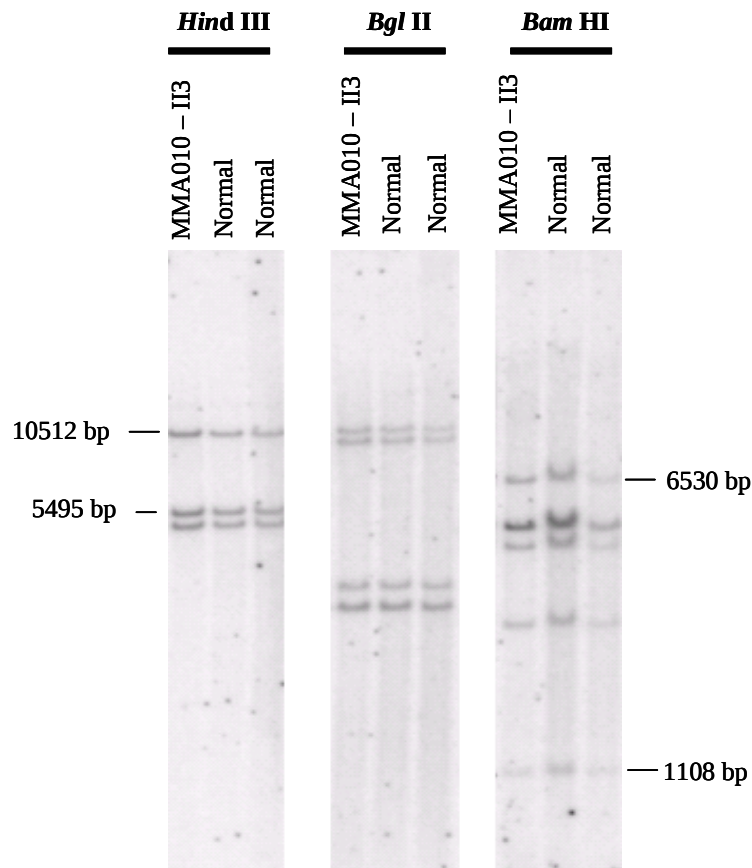


Bam HI (6,530bp ; 6,413 bp ; 4,706 bp ; 4,224 bp ; 2,704 bp ; 1,108 bp)

Bgl II (10,510 bp ; 9,338 bp ; 3,414 bp ; 3,012 bp)

Hind III (10,512bp ; 5,495 bp ; 5,041 bp)

(B)

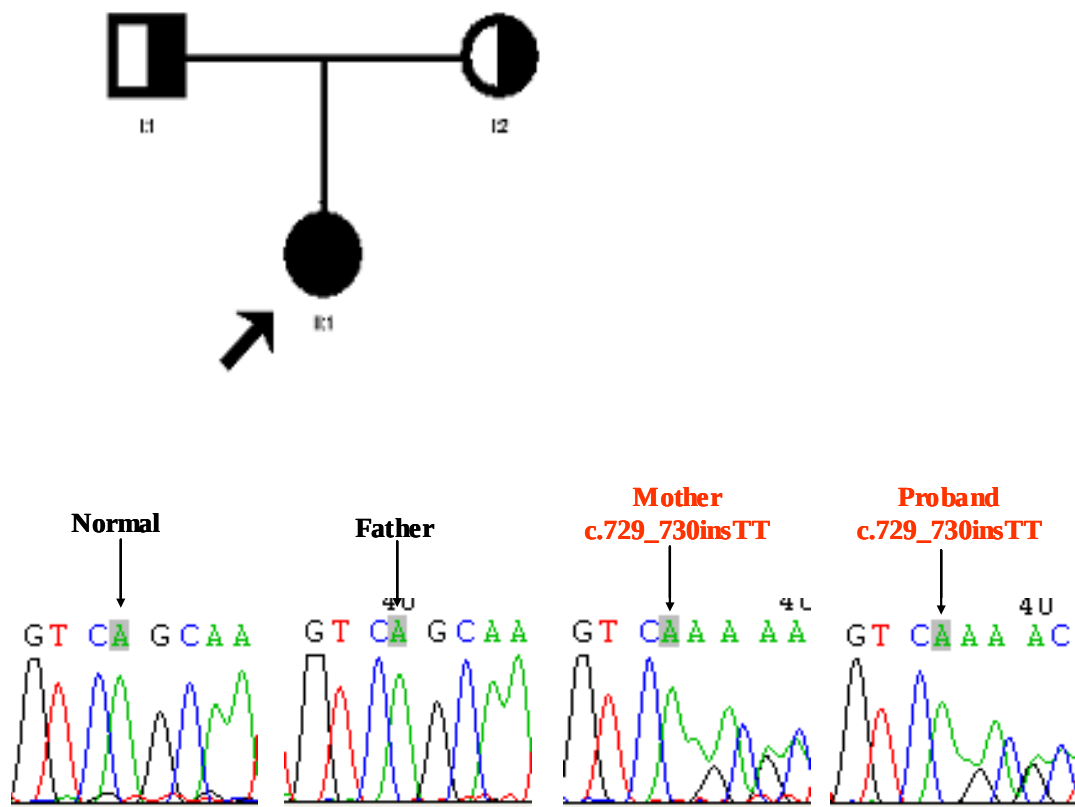


圖二十一、MMA010家庭之 *MMAB* 基因轉譯區和 3' UTR 南方點墨法分析

(A) 以 *MMAB* 基因轉譯區和 3' UTR 為探針可偵測的基因位置與片段大小示意圖

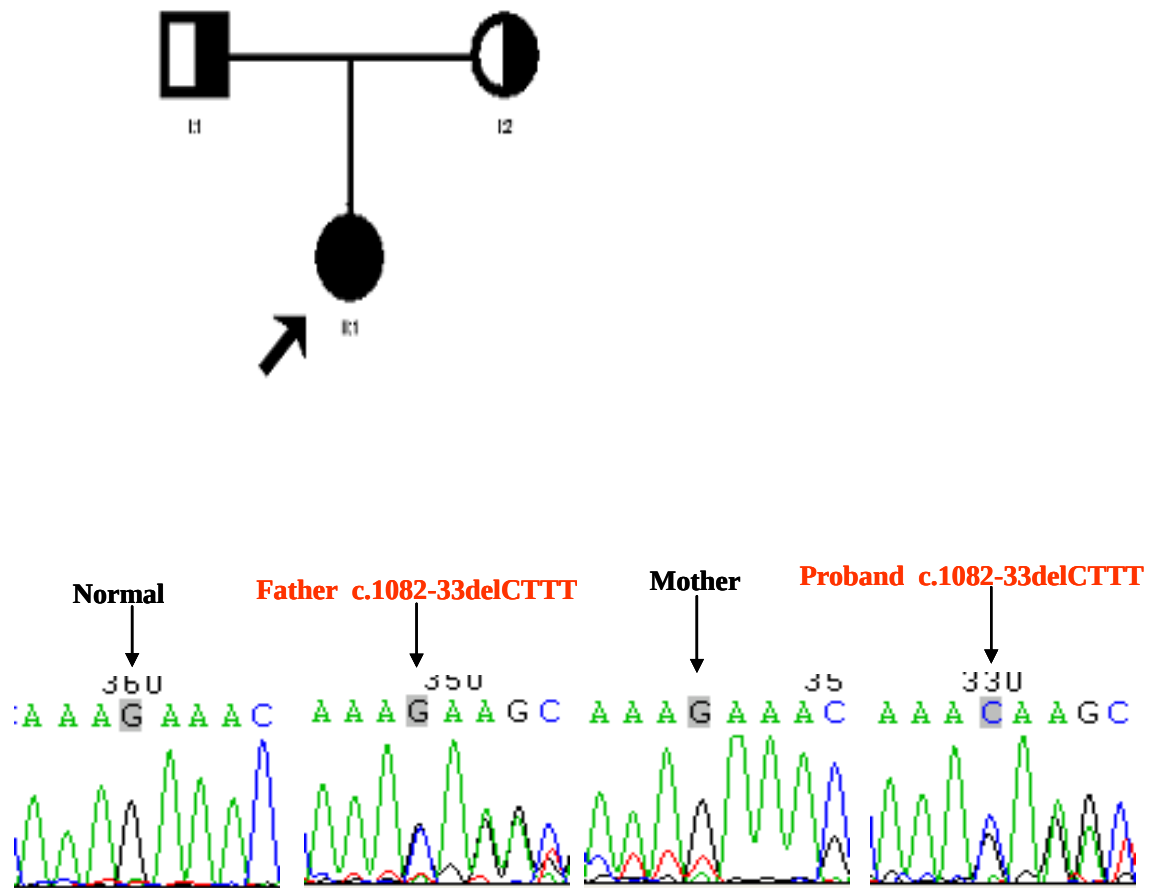
(B) normal 和 MMA010 家庭之 *MMAB* 基因轉譯區和 3' UTR 南方點墨法分析結果圖

MMA025 Family



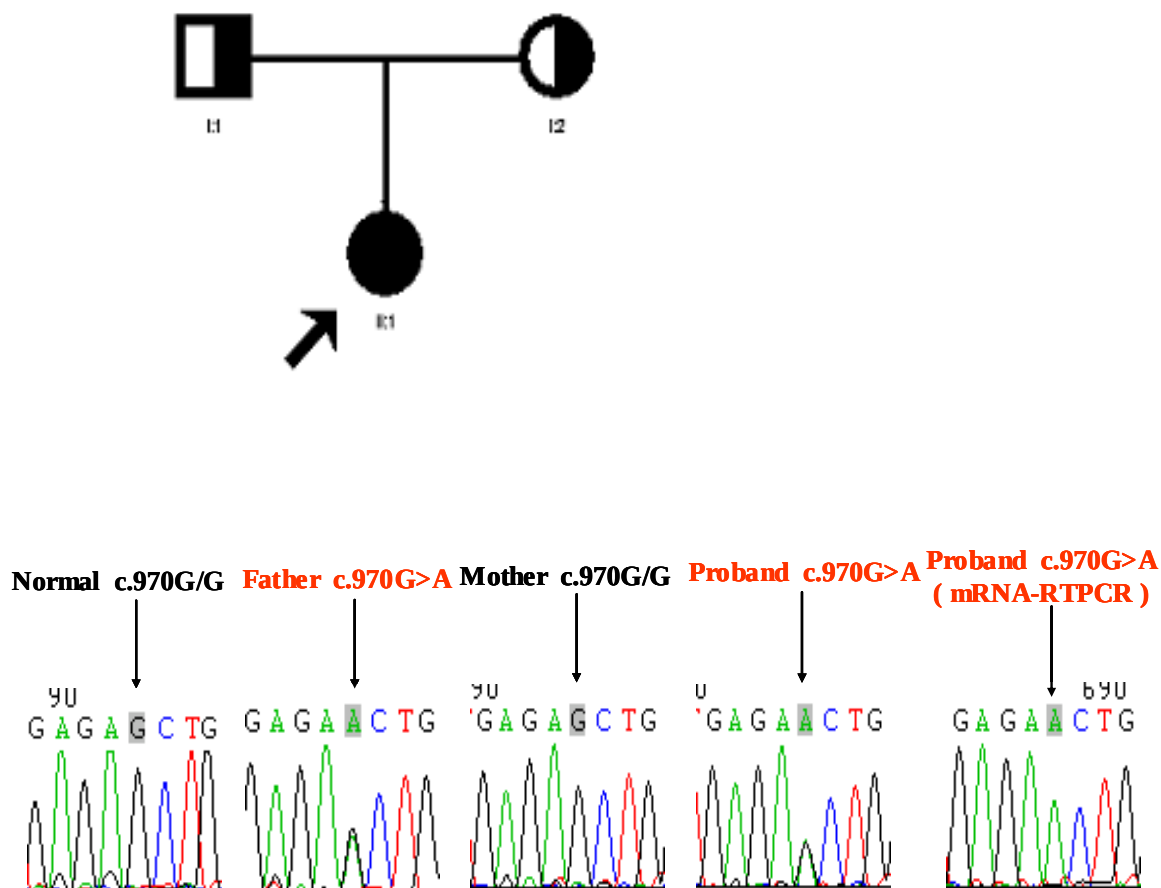
圖二十二、 MMA025 family 家庭突變分析 – *MUT* : c.729_730insTT
 proband (II:1) 和 mother (II:2) 有 c.723_730insTT之插入
 father (I:1) 表現和 normal 相同不具小片段之插入

MMA025 Family



圖二十三、MMA025 family 家庭突變分析 – *MUT* : c.1082-33delCTTT
 proband (II:2) 和 father (I:1) 有 c.1082-33delCTTT 之刪除
 mother (I:2) 和 normal 表現相同不具小片段的刪除

MMA025 Family



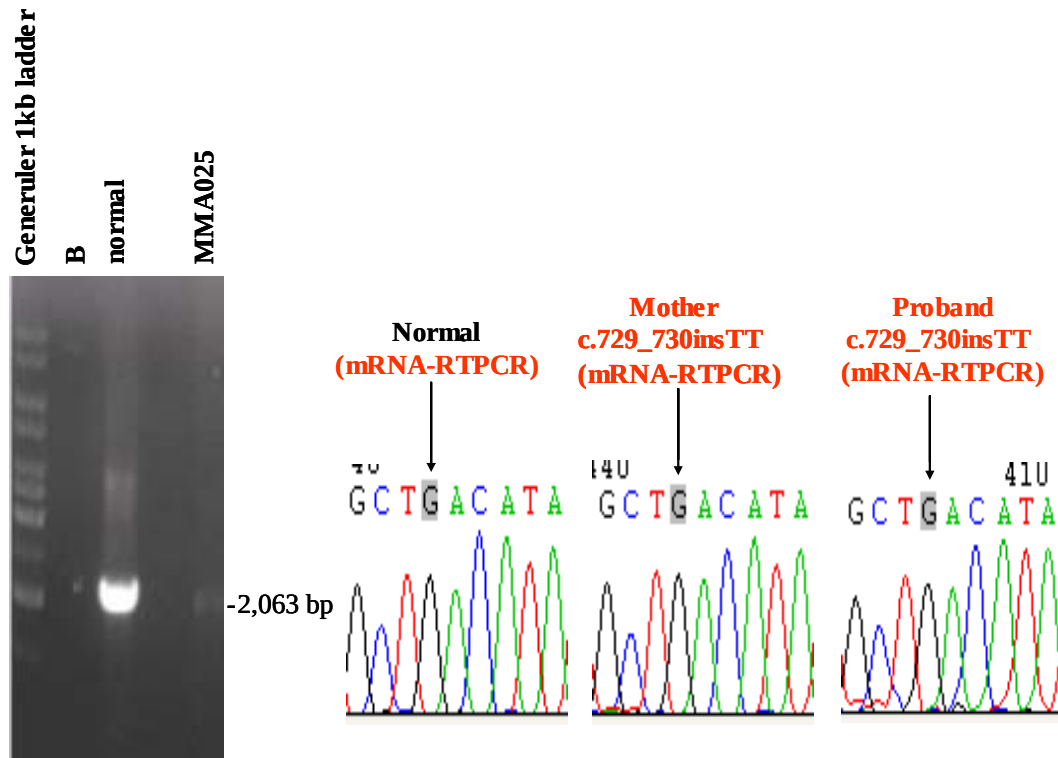
圖二十四、MMA025 family 家庭突變分析 – MUT: c.970G>A

proband (II:1) 和 father (I:1) 為 c.970G>A heterozygote

mother (I:2) 和 normal 為 c.970G/G homozygote

proband (II:1) 自母親遺傳 c.729_730insTT 可能為一個 nonsense-mediated mRNA decay, 所以 c.970G>A 之 mRNA RT-PCR 僅表現了來自父親的 A allele

MMA025 Family



圖二十五、MMA025 family mRNA of *mut* RT-PCR 分析
 proband, mother and normal 在 mRNA level 表現上並無差異，不見在 genomic DNA level 上於 proband 和 mother 顯現的小片段插入，這說明了 c.729_730insTT 可能導致 nonsense-mediated mRNA decay，而 proband 的 mRNA RT-PCR 產物來自於父親遺傳而來的對偶基因之表現

			(Q248X)
			↓
human	— UniProt/Swiss-Prot Q8IVH4 MMAA	PTSGTLGGVTRTTNEAAILLCEGAGYDIILLIETVGVGQSEFAVADMVDMFV	261
chimp	— gi 55623376 ref XP_526697.1	PTSGTLGGVTRTTNEAAILLCEGAGYDIILLIET-----	243
mouse	— UniProt/Swiss-Prot Q8C7H1 MMAA	PTSGTLGGVTRTTNEAIVLCEGGGYDIILLIETVGVGQSEFAVADMVDMFV	258
rat	— gi 34851579 ref XP_214659.2	PTSGTLGGVTRTTNEAIVLCEGGGYDIILLIETVGVGQSEFAVADMVDMFV	258
chicken	— ENSGALT00000016214	PTSGTLGGVTRTTNEAAILLCEGGGYNVVLVETVGVGQSEFAVADMVDMFI	236
zebrafish	— ENSDART00000026631	PTSGTLGGVTRTTNEAIVLCEGAGYDIVLVETVGVGQSEFAVADMVDMFV	549
c.elegans	— gi 32564864 ref NP_495466.2	PTSGSLGGVTRGIHEAVILCEGAGYDIVIIETVGVGQSETSVSDMCDMMC	243
	UniProt/Swiss-Prot Q8IVH4 MMAA	LLLPPAGGDELQGIKRGIIEMADLVAVTKSDGDLIVPARRIQAIEYVSALK	311
	gi 55623376 ref XP_526697.1	-----GIKRGIIEMADLVAVTKSDGDLIVPARRIQAIEYVSALK	281
	UniProt/Swiss-Prot Q8C7H1 MMAA	LLLPPAGGDELQGIKRGIIEMADLVVITKSDGDLIVPARRIQAIEYVSALK	308
	gi 34851579 ref XP_214659.2	LLLPPAGGDELQGIKRGIIEMADLVVITKSDGDLVVPARRIQAIEYVSALK	308
	ENSGALT00000016214	LVLPPAGGDELQGIKRGIIEMADLVAINKADGDLIVPARRIQAIEYVSAMK	286
	ENSDART00000026631	LLIPPAGGDELQGIKRGIIEMADLVVVTKSDGELVVPARKIQAIEYVSALK	599
	gi 32564864 ref NP_495466.2	LLSPANGDELQGVKRGIMESDILLVVTKDDGDLKAKAKMTQAIEYVSALK	293
			

圖二十六、 七個物種 cbl-reductase 胺基酸排列之比較

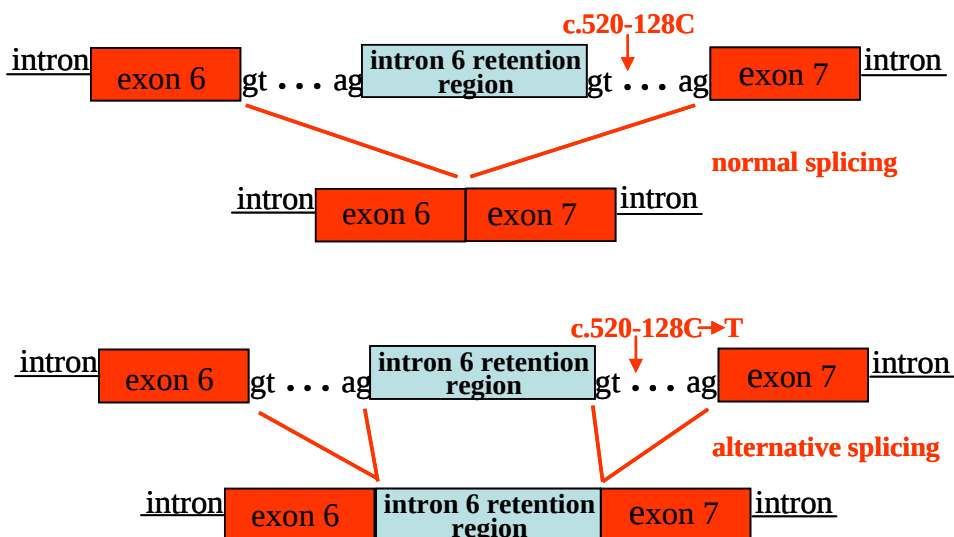
human、chimp、mouse、rat、chicken、zebrafish、c.elegans 等七種物種在 cbl-reductase 的第 248 個胺基酸位點具有一致性，為物種演化上的高度保留

(A)

tctgggtgggtgatggcctcatggcagttccctctgctccttggctcctcagAGTATACCACGTTCAAGGCG
GGGCCCATCCTGGAGCTGGAGCAGTGGATCGACAAGTACACCAGCCAGCT
CCCACCACTCACGGCCTTCATCCTGCCTgtaggtactgggcaggcttaaccggggggcggtgca
ggcaggttcagtgacagacacacatgggctctgaataaatccctcttttcacagtgacagacgctgtctccagtcccaaa
gtccctccaggtctccaccgggtccctccagccctgcccactctggagcagcgtgcccggtgggtgtgcgtggcaggg
ctcctggaggcagaacactgcccgggttggggggcagggtgacttcagaggagctcctgtccgcagtgggcacacct
ttcccacctgctcaggcaatgtccctttctccttcagTCGGGAGGCAAGATCAGCTCGGCGCTG
CATTTCTGCCGGGCCGTGTGCCGCCGGCCGAGAGACGgtaagagggtggagagag

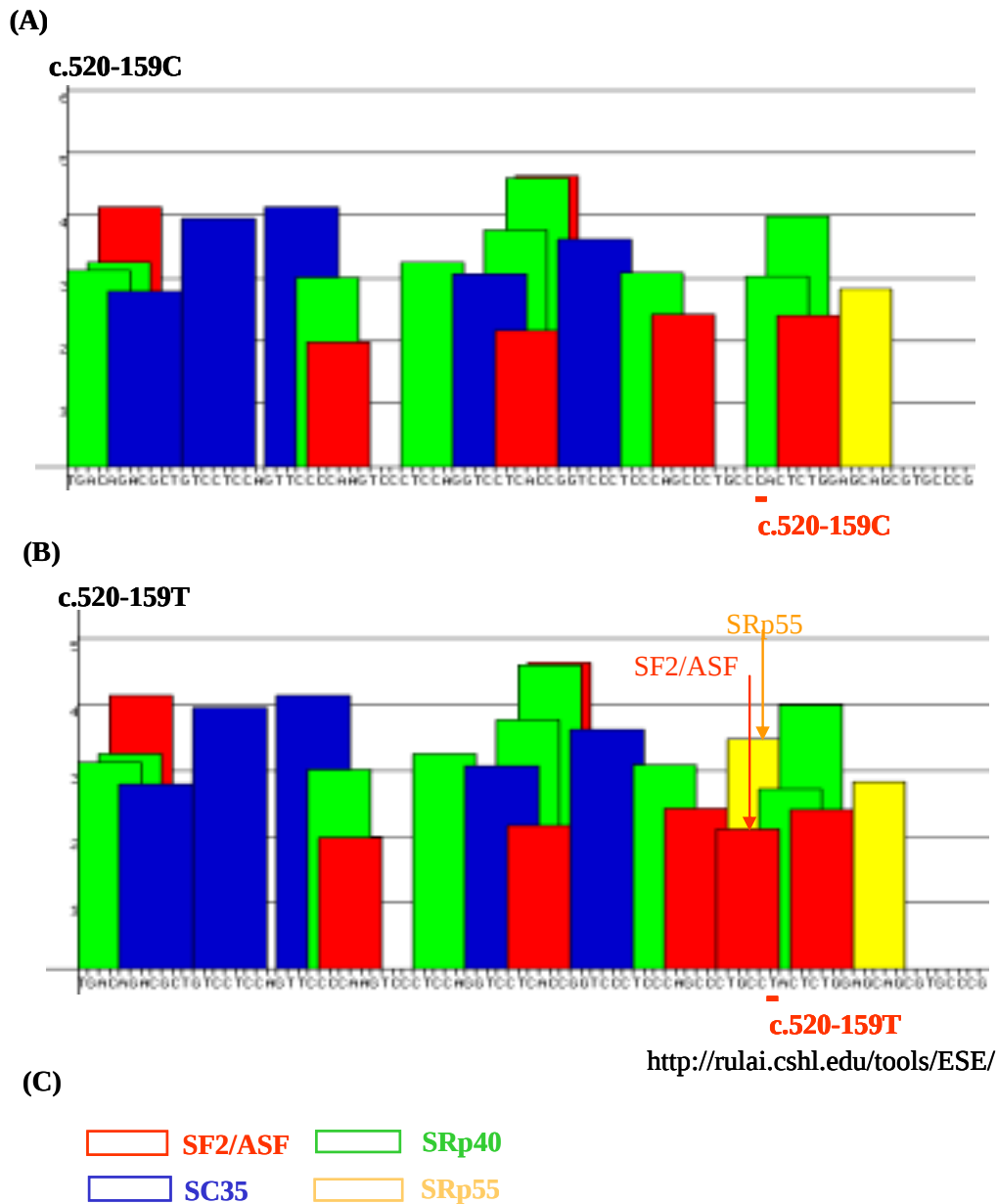
<http://cubweb.biology.columbia.edu/pesx/>

(B)



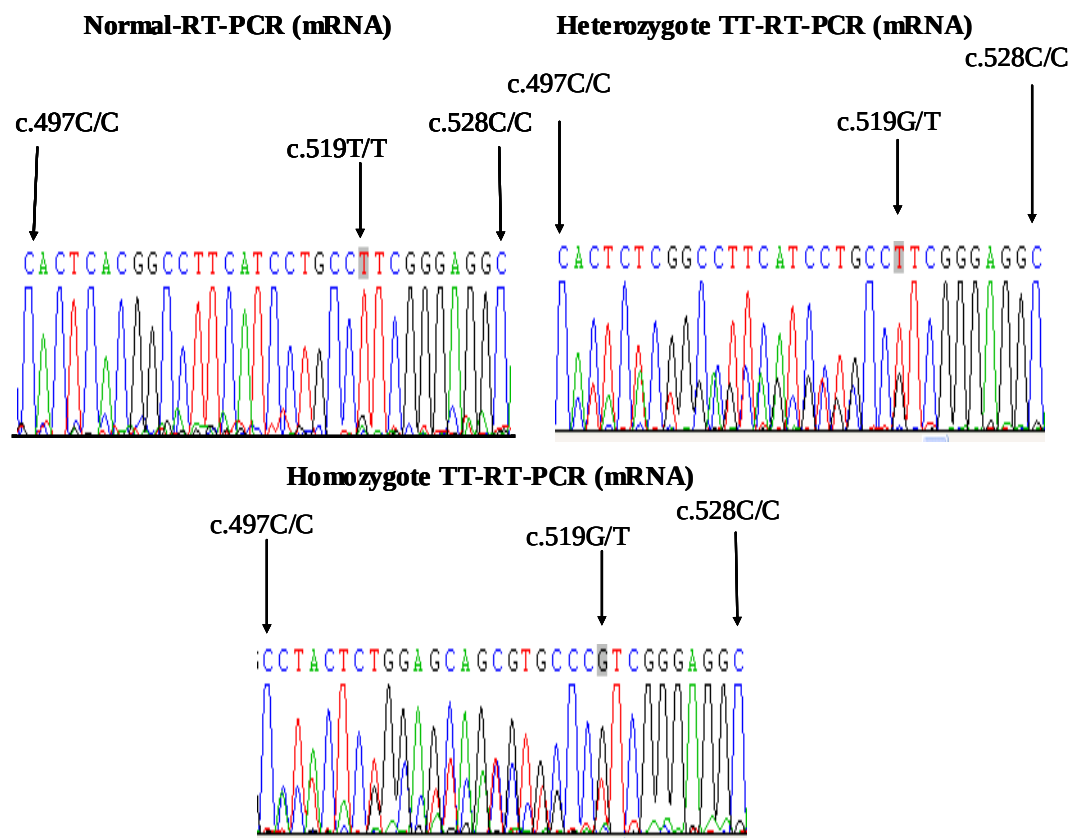
圖二十七、哥倫比亞大學生資網站預測之ISE

- (A) 英文字母大寫代表 exon；小寫代表 intron；箭頭所示為 intron 的保留區域；有下標線的三個連鎖 SNP 之 c.520-128 由 C 變 T 時會創造一個 ISE site，這可能是造成 alternative splicing 的原因
(B) 根據哥倫比亞大學生資網站所預測的 splicing 示意圖



圖二十八、美國冷泉港實驗室生資網站預測之 ESE

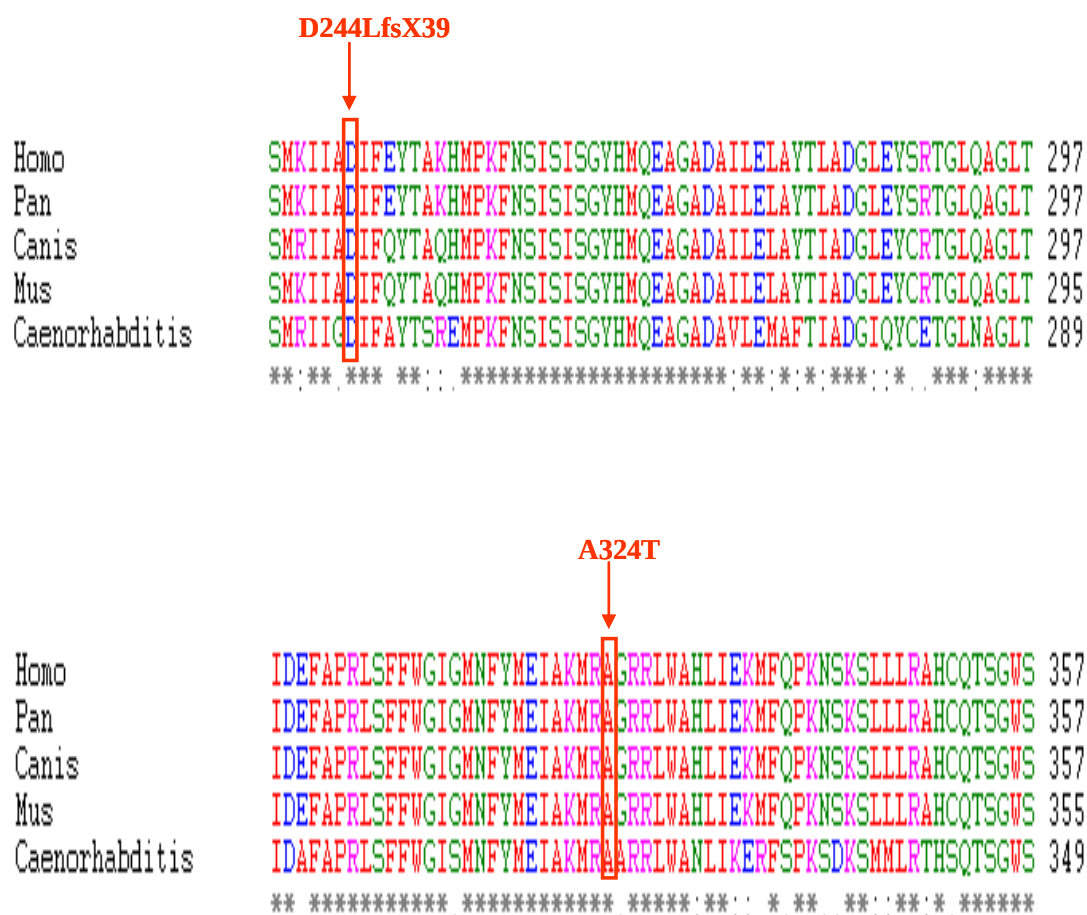
- (A) 根據冷泉港實驗室生資網站預測當 SNP - c.520-159C 時，附近的 SR protein 分佈
- (B) 根據冷泉港實驗室生資網站預測當 SNP - c.520-159T 時，附近的 SR protein 分佈，(B)與(A)相較多了兩個 SR protein binding，顯示當 c.520-159 由 C 變 T 會創造兩個 ESE site
- (C) SR protein 代表顏色示意圖



	(1) c.519G / c.528C	(2) c.519T / c.528C
Heterozygote TT	0.31	0.67
Homozygote TT	0.52	0.26

	(1)/(2)
Heterozygote TT	0.46
Homozygote TT	2

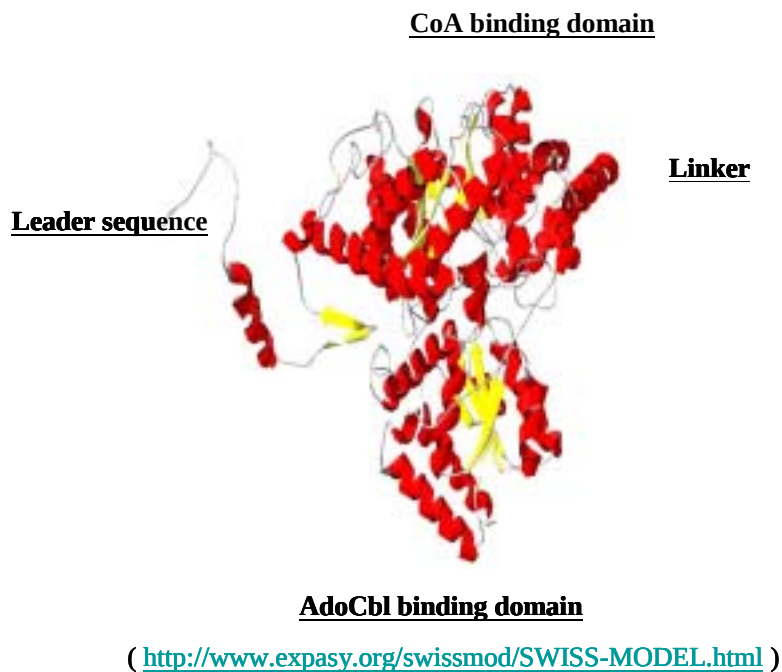
圖二十九、MMA010 family 之 mRNA of MMAB RT-PCR 分析
 度量 sequence peak 高度並標準化結果顯示，帶有 SNP - c.520-159C/T 和 c.520-128C/T 異型合子之 MMAB mRNA 表現約 33% alternative splicing form RNA；而同型合子 (TT) 表現約 66% alternative splicing form RNA



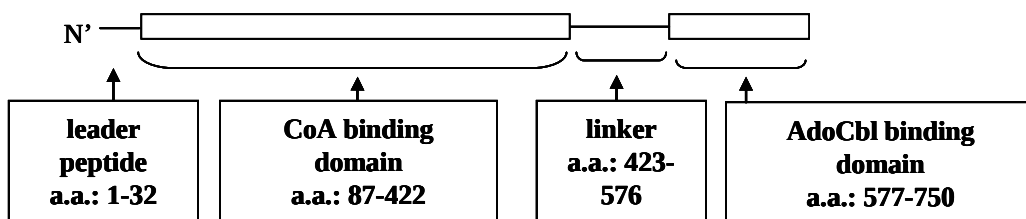
圖三十、五個物種 MCM 胺基酸排列之比較

human、pan、canis、mus、caenorhabditis 等五種物種在 MCM 的第 244 個和第 324 個胺基酸位點具有一致性，為物種演化上的高度保留

(A)



(B)

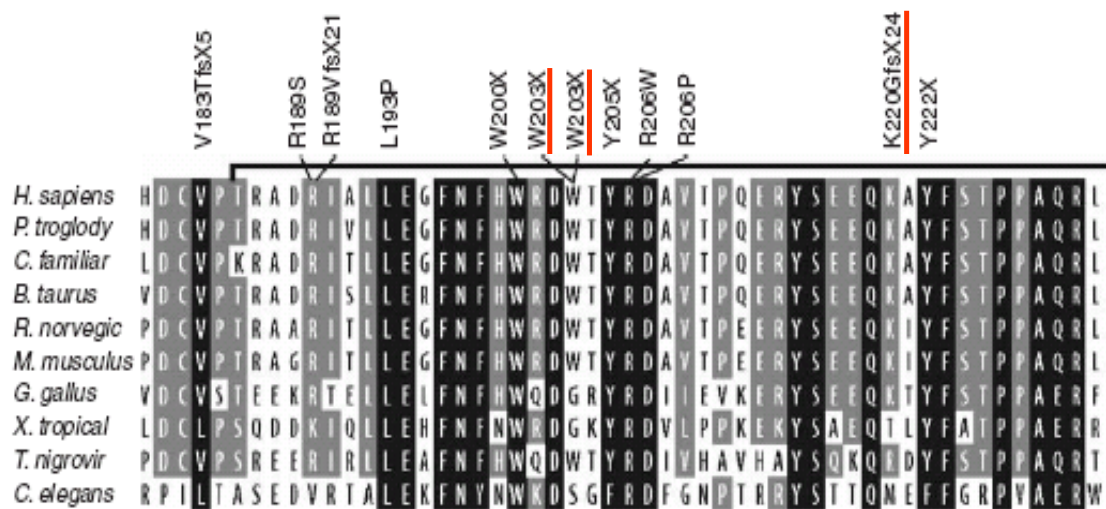


(Thoma and Leadlay, 1996)

圖三十一. methylmalonyl CoA mutase (MCM) 結構圖

(A) 利用 SWISS-PORT 上的 SWISS-MODEL 程式，以 *P. shermanii* 的 MCM 結構 (PDB Id: 1REQA) 為模板，模擬人類 MCM 3D 結構

(B) 人類 MCM 結構圖



(Lerner-Ellis *et al*, 2005)

圖三十二、 十個物種 *MMACHC* 胺基酸排列之比較

共有十個物種在 *MMACHC* 所轉譯的蛋白質第 203 個和第 220 個胺基酸位點具有一致性，為物種演化上的高度保留

附錄一

Laboratory Manual of
Clinical Biochem.Res.Lab.
Veterans General Hospital (Taipei)

Geno. DNA. Pre.DOC
Ver1.0 (Feb. 10, 1995)
Rev.By S. F. Lu

Genomic DNA Isolation

I. Principle:

Mammalian DNA is usually isolated by digestion of cells with proteinase K in the presence of EDTA and a detergent such as SDS, followed by extractions with phenol. This method yields DNA whose size (100-150 kb) is adequate for Southern analysis .

II. Specimen:

Collect approximately 10 ml of fresh blood in tubes containing EDTA. This anticoagulant is suitable to preserving high-molecular-weight DNA during storage of blood. the blood may be stored at 0 for several days or at -70 indefinitely before the DNA is prepared.

III. Reagent: (See Laboratory Manual of Preparation of Common Reagents for DNA/RNA research)

1. 0.144M ammonium chloride (NH_4Cl)
2. 0.01M ammonium bicarbonate (NH_4HCO_3)
3. 0.9% NaCl (normal saline)
4. TNE buffer
 - 10mM Tris-HCl , pH8.0
 - 150mM NaCl
 - 10mM EDTA
5. 10% SDS
6. proteinase K , 20mg / ml in TNE (fresh preparation)
7. Buffer-Saturated Phenol (GIBCO BRL Cat. No. :5513UB)
8. 100% Chloroform
9. 5M NaCl
10. 100% and 75% ethanol

IV. Procedure:

1. Draw 10ml blood into Na₂EDTA vacutainers. Centrifuge at 2000-2500 rpm for 15 min.
2. Aspirate top 90% of plasma (freeze for other testes or discard). To the remaining blood, add 5 vol. of 0.144M NH_4Cl plus 0.5 vol. of 0.01M NH_4HCO_3 , mix , and wait for 20-30 min, till RBC lyse.
3. Centrifuge at 2500 rpm for 20 min. Discard supernatant by a pasteur pipette.
4. Wash WBC pellet by 0.9% NaCl three times (centrifuge at 2000-2500 rpm for 10 min. each). Aspirate supernatant by a pasteur pipette.

5. Resuspend WBC pellet in 8-10ml TNE, add SDS to final conc. 0.5%, proteinase K to final conc. 150µg/ml , mix well.
6. Incubate at 37 °C overnight. Alternatively, place the suspension of lysed cells on a 50 °C rocking platform for 3 hours.
7. To extract ,mix sample with equal vol. of Buffer-Saturated Phenol, mix well (note: **do not vortex** and use **Polypropylene Centrifuge Tubes**), centrifuge at 2500 rpm for 10 min., remove aqueous phase with wide tip pipet.
8. Repeat step 7.
9. To the aqueous phase , add equal vol. of chloroform, mix well, centrifuge at 2500 rpm for 10 min., remove aqueous phase with wide tip pipet. (note: use chloroform resistant tubes)
10. Repeat step 9.
11. To the aqueous solution, add 1/10 vol. of 5M NaCl and 2-2.5 vol. of 100% ethanol.
12. Store at -20 °C for overnight or at -70 °C for 30 mins.
13. Transfer the DNA with a wide-bore pipette to eppendorf tube and wash the DNA with 75% ethanol 5 times, centrifuge at 12000 rpm for 1min.
14. Remove as much as possible of the 75% ethanol, and store the pellet in an open tube at room temperature until the last visible traces of ethanol have evaporated.
15. Add 200~300 µl of H₂O. Place the tube until the DNA has completely dissolved . This usually takes 12-24 hours.
16. Determine OD₂₆₀ and OD₂₈₀ using 5 µl DNA solution diluted to 1 ml H₂O. (1 OD₂₆₀ = 50 µl DNA /ml.)
17. Store the DNA in 4 °C that can be used indefinitely until needed.

V. Notes:

- i. It is essential that the pH of the phenol be approximately 8.0 to prevent DNA from becoming trapped at the interface between the organic and aqueous phase.
- ii. With a wide-bore pipette (0.3-cm-diameter orifice), transfer the viscous aqueous phase to a clean centrifuge tube .
- iii. When transferring the aqueous phase, it is essential to draw the DNA into the pipette very slowly to avoid disturbing the material at the interface.
- iv. In step 14 , do not allow the pellet of DNA to dry completely; otherwise, it will be very difficult to dissolve.
- v. Measure the absorbance of the DNA at 260 nm and 280 nm. The ratio of A₂₆₀ to A₂₈₀ should be greater than 1.75. A lower ratio is an

indication that significant amounts of protein remain in the preparation. In this case, add SDS to a concentration of 0.5% and then repeat 5-14.

- vi. The usual yield of DNA from 10ml of normal blood is approximately 125 μg .

VI. Reference:

1. 蘇宗笙(1994) Genomic DNA isolation. 台北榮總教研部分子生物 研究室實驗室標準操作流程. p. 1-3
2. J. Sambrook, E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. Molecular cloning a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory.

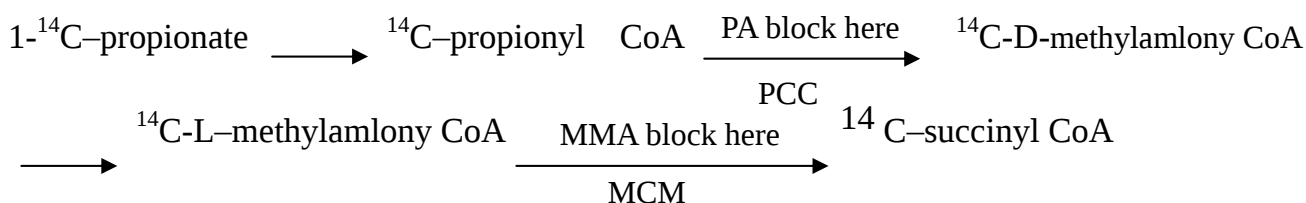
附錄二

Labortory Manual of
Clin.Biochem.Res. Lab.
Veterans General Hospital

May 16th, 2005
Mei-Ying Liu revised
PA incorporation v.2

IN VIVO 1-¹⁴C-PROPIONATE INCORPORATION FOR DETECTION OF DEFECT IN PROPIONATE METABOLISM

I. Principles :



II. Final concentration of culture medium

1 Leucine-free medium

	Vol (ml)	Final concentration
1x RPMI 1640 w/o Gln and Leu	84	-
200 mM glutamine	1	2 mM
100 % FBS	15	15 %
Total vol	100	

2 Modified Puck's saline F

	Vol (ml)	Final concentration
Puck's saline	82	-
Antibiotic-Antimycotic solution	1	
FBS	15	15%
10 mM 1- ¹⁴ C-propionic acid (S.A 31 dpm/pmol)	1	0.1 mM (S.A .31 dpm/pmol)
520 mg/L ³ H-leucine (S.A. 16dpm/pmol)	1	5.2 mg/L (S.A. 16 dpm/pmol)
Total vol	100	

The stock solutions of 1-¹⁴C-propionic acid , ³H-leucine are combined with 30 ml modified Puck's saline F and the mixture is sterilized with 0.2 um filter membrane. Some modified Puck

saline are passed through the same filter membrane to flush the residual isotope. Then antibiotics and FBS are added to final concentration. Aliquot the modified Puck saline F and store at 4 °C.

III. Preparation of reagents

- 1 1x RPMI 1640 without L-glutamine and L-leucine (ICN, Cat. No.16-291-49)
- 2 200 mM glutamine (GIBCO BRL, Cat. No. 25030-81)
- 3 Puck saline F

Components	Amount	
CaCl ₂	0.014	gm
KCl	0.285	gm
KH ₂ PO ₄	0.083	gm
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.154	gm
NaCl	7.4	gm
NaHCO ₃	1.26	gm
Na ₂ HPO ₄	0.154	gm
D-glucose	4.8	gm
0.5 % Phenol red	1	ml
HEPES	2.6	gm
H ₂ O	1	L

Adjust pH to 7.3 with NaOH or HCl

notes : All contents are mixed well and adjusted pH to 7.3. Then Puck saline is sterilized by 0.2 µm filter membrane. Aliquot of medium is removed to test microbial contamination. Puck saline F is store at 4 °C.

- 4 100 X Antibiotic-Antimycotic solution (Atlanta biologicals, Cat. No. B22110)
Contains 10,000 µg/ml Streptomycin, 10,000 units/ml Penicillin, and 25 ug/ml amphotericin B in 0.85% saline
- 5 10 % TCA (Trichloroacetic acid)
100 % TCA (g / dL) 10 ml
H₂O 90 ml
store at 4 °C
- 6 2 % Na₂CO₃ in 0.1 N NaOH
NaOH 0.4 gm

- | | | |
|--|---------------------------------|--------|
| | Na ₂ CO ₃ | 2 gm |
| | H ₂ O | 100 ml |
| | store at 4 | |
- 7 0.9 % NaCl
- | | | |
|--|------------------|------|
| | NaCl | 9 gm |
| | H ₂ O | 1 L |
| | store at 4 | |

- 8 0.01 M 1-¹⁴C-propionic acid (100 X stock)

cat. No. = 12217

lot. No. = 9727103

1-¹⁴C-propionic acid = 0.25 mCi

specific activity (SA) = 56.8 mCi / mmol

vol = 0.25 ml

concentration = 1 mci / ml

expected SA = 31 dpm / pmol

expected conc = 0.01 M (100 X stock)

calculation :

$$\text{total amount of } 1-^{14}\text{C-propionic acid} = \frac{1 \text{ mci/ml}}{56.8 \text{ mci/mmol}}$$

$$= 0.0176 \text{ mmol / ml}$$

$$= 0.0176 \text{ M}$$

$$\text{so original } 1-^{14}\text{C-propionic acid} = 0.0176 \text{ M} \times 0.25 \text{ ml}$$

$$= 0.0044 \text{ mmole}$$

$$1 \text{ mci} = 2.22 \times 10^9 \text{ dpm}$$

$$\text{expected SA} = 31 \text{ dpm / pmol}$$

$$\text{so total } 1-^{14}\text{C-propionic acid} = \frac{2.22 \times 10^9 \text{ dpm/mCi} \times 0.25 \text{ mCi}}{31 \text{ dpm/pmol}}$$

$$= 0.0179 \times 10^9 \text{ pmol}$$

amount of cold propionic acid will be added

$$= 0.0179 \text{ mmol} - 0.0044 \text{ mmol} = 0.0135 \text{ mmol}$$

vol of 0.1 M cold propionic acid will be added

$$= 0.0135 \text{ mmol} / 0.1 \text{ M} = 0.135 \text{ ml}$$

total vol of 0.01 M $1\text{-}^{14}\text{C}$ -propionic acid = $0.0179 / 0.01 \text{ M}$

$$= 1.79 \text{ ml}$$

vol of sterilized H_2O will be added = $(1.79 - 0.135 - 0.25) \text{ ml} = 1.405 \text{ ml}$

preparation: 0.25 ml $1\text{-}^{14}\text{C}$ -propionic acid + 0.135 ml cold propionic acid + 1.405 ml H_2O , mix well and dispense to 100 ul per sterilized vial, store at -20°C .

Notes : dilute the prepared 0.01 M $1\text{-}^{14}\text{C}$ -propionic acid to 10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} . Transfer 20 ul to the counting solution (Szintisol , Merck) and count for 2 min at β – counter. Calculate with the formula below :

$$\begin{aligned} \text{Real SA} &= \frac{\text{dpm}}{0.01\text{M} \times 20 \text{ ul}} \times \frac{1}{\text{dilution factor}} \\ &= \frac{\text{dpm}}{0.01\text{M} \times 10^{12} \text{ dpm}/10^3 \text{ ml} \times 20 \times 10^{-3} \text{ ml}} \times \frac{1}{\text{dilution factor}} \\ &= \frac{\text{dpm}}{2 \times 10^5 \text{ pmol}} \times \frac{1}{\text{dilution factor}} \end{aligned}$$

9 520 mg/ ^3H -L-leucine (100x stock)

Cat. No. = NET-460A

Lot No. = 3538-392

Leucine , $[3,4,5\text{-}^3\text{H} (\text{N})] = 1 \text{ mCi}$

specific activity (SA) = 173 Ci / mmol

vol = 0.2 ml

concentration = 5 mCi / ml

expected SA = 16 dpm / pmol

expected conc = 520 mg/L (100x stock) = 4 mM

calculation :

$$4 \text{ mmol/L} = 4 \times 10^6 \text{ pmol/ml}$$

total dpm of 100 x stock of 1 ml volume should be

$$= 4 \times 10^6 \text{ pmol/ml} \times 16 \text{ dpm/pmol} = 6.4 \times 10^7 \text{ dpm/ml}$$

expected ^3H -leucine added to 100 stock of 1 ml volume

$$= \frac{6.4 \times 10^7 \text{ dpm}}{2.22 \times 10^6 \text{ dpm/uCi}} = 28.8 \text{ uCi}$$

$$\begin{aligned} \text{vol of } ^3\text{H-leucine should be added to cold 100 X leucine} &= \frac{28.8 \text{ uCi}}{5 \text{ uCi/ul}} \\ &= 5.76 \text{ ul} \end{aligned}$$

Preparation: 5.8 ul ^3H -leucine + 1 ml 4 mM L-leucine, mix well. Because of high specific activity of ^3H -leucine, amount of hot leucine could be ignored and be added to 100x stock directly.

Note: dilute and count the radioactivity of ^3H -leucine stock solution as described in $1\text{-}^{14}\text{C}$ -propionic acid.

IV. Protocol

- 1 Cultured skin fibroblast and amniocytes at 25T flask with DMEM containing 10-20 % FBS and RPMI 1640 containing 10-20 % FBS, respectively. Cells are seeded into 25 cm² plastic flasks with cell density of about $2\text{-}4 \times 10^5$ cells. All cells are kept culture for 2 days till reach partially confluence, about 50-70 % confluence. All cells are at log phase.
- 2 Remove culture medium and replace by 4 ml leucine-free medium containing 15 % FBS. Cells are kept culture under 37 for 4 hours.
- 3 Remove culture medium and replace by 4 ml of modified Puck saline F, containing Puck saline (pH 7.3), 0.1 mM $1\text{-}^{14}\text{C}$ – propionic acid (S.A. 31 dpm/pmol), and 5.2mg/L ^3H -leucine (S.A. 16 dpm/pmol) . Fastened the cap tightly to prevent pH change.
- 4 Incubated cells at 37 incubator for 18 hr . Before harvest, cell density should reach to about 90 % confluence.
- 5 Remove the modified Puck saline F.
- 6 Rinse 3 times with 10 ml of cold 0.9 % NaCl .
 - a. Add 5 ml saline to rinse the cells quickly, discard the saline, then add 5 ml saline.

- b. Discard the saline, add 10 ml saline to rinse the cells then discard the saline. Add another 10 ml saline.
 - c. Remove the saline and aspirate the residual saline with glass pipett.
- 7 Add 1 ml of cold 10 % TCA .
 - 8 Incubate at 4 °C for 30 min . Rock the flask every 10 to 15 min.
 - 9 Discard the residual TCA soluble radioactive material .
 - 10 The remaining attached cells are rinsed 3 times with 10 ml cold 0.9 % NaCl .
 - 11 Dry in a 37 °C room till flasks till dry completely.
 - 12 Add 1 ml of 2 % Na₂CO₃ in 0.1 N NaOH .
 - 13 Place at 37 °C room for 30 min .
 - 14 Aliquot of 100 ul sample is added to 4 ml counting solution (Szintisol , Merck) and counted at β-counter to determine the amount of 1-¹⁴C-propionic acid incorporated into TCA insoluble fraction . Aliquots of 100 ul 2 % Na₂CO₃ is added to counting solution for back ground.
 - 15 The residual of this TCA insoluble fraction is used for protein determination by Lowry method, use disposable cuvette for reading at spectrophotometer .
 - 16 Calculate the incorporation with the formula as below :

$$\begin{aligned}\text{Factor} &= \frac{1000 \text{ ug/mg}}{18 \text{ hr} \times \text{SA of 1-}^{14}\text{C-propionic acid}} \\ &= \text{X ug . pmol / mg . hr . dpm}\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Incorporation} &= \frac{\text{Dpm of sample - background}}{\text{Ug protein for test}} \times \text{factor} \\ &= \text{Y pmol / hr . mg protein}\end{aligned}$$

Notes

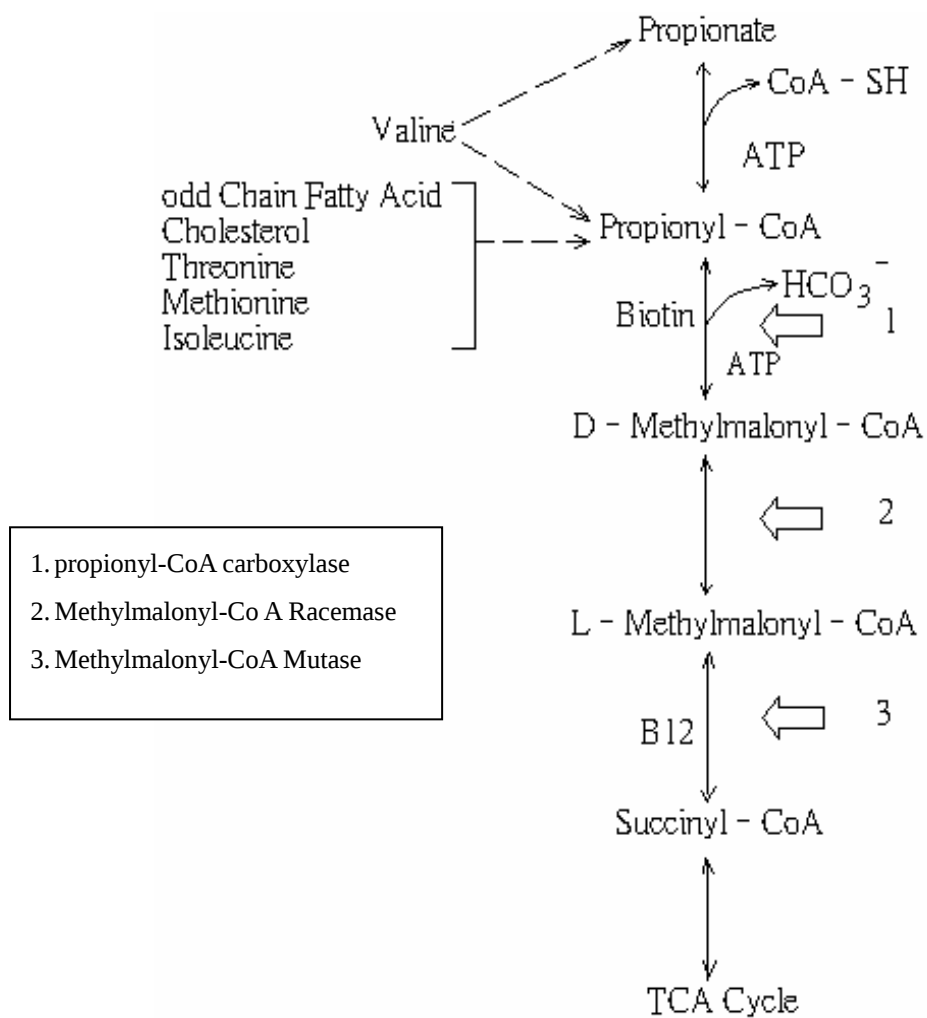
1. Prepare the stock of 1 – ¹⁴C – propionic acid (S.A. 31 dpm/pmol), and 5.2mg/L- ³H-leucine (S.A. 16 dpm/pmol) before preparation of modified Puck saline F.
2. The flasks have to be dried completely, otherwise the background will be high.
3. If time is not enough to complete the whole process. The dried flasks can be tightly fasten

and store at 4 °C. But the caps only can be loosened only when the temperature of the flasks reach to the room temperature.

4. The eluted lysate can be stored at 4 °C.

V. Reference :

1. Morrow et al . 1976 Clin. Genet . 10 : 218–221 .
2. Willand et al . 1976 Hum . Genet . 32 : 277–283 .
3. Yeek Yong Tan 1987 In vivo 1-¹⁴C-propionate incorporation for detection of defect in propionate metabolism. Laboratory manual of Clin. Biochem. Res. Lab



Flow chart of PA incorporation

$2-4 \times 10^5$ Cells are seeded into 25T flasks and cultured till reaching log

↓ Culture for 2 days

Remove culture medium and replace with 4 ml of leucine-free medium

↓ 37 incubate for 4 hour.

Remove leucine-free medium and replace with 4 ml of modified Puck's saline F containing 15% FBS, 0.1 mM ^{14}C -propionate (S.A. 31dpm/pmol) and 5.2 mg/L ^3H -leucine (S.A. 16 dpm/pmol)

↓ 37 incubate for 18 hour

Remove modified Puck's saline F



Rinse with cold 0.9% NaCl for three times

↓ Treat with 1ml 10% TCA (w/v) at 4 for 30 min

Discard the residual TCA soluble material



Rinse TCA insoluble material with normal saline for three times

↓ Dried at 37

Add 1 ml 2% Na_2CO_3 in 0.1 N NaOH

Incubate at 37 room for 30 min



Aliquot of 100ul lysate is taken to determine radioactivity



Aliquot of 100ul lysate is taken to determine protein concentration by Lowry method

附錄三

Laboratory manual of
Clinical Biochem. Res. Lab.
Veterans General Hospital-Taipei

Ver1.1 (Mar,23, 2004)
Rev. by S.J. Wu

Protein Determination by Lowry Method

I、原理： 樣品經

I. Preparation of ingredients:

1. 1% $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ solution:

1 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ was dissolved in 100 ml distilled water

2. 2% NaK Tartrate solution:

2 g NaK Tartrate were dissolved in 100 ml distilled water

3. 2% Na_2CO_3 in 0.1N NaOH solution:

20 g Na_2CO_3

4 g NaOH

were dissolved in 1000ml distilled water

4. 0.25 mg/ml Bovine serum Albumin (BSA) standard solution:

100 mg BSA were dissolved in 100 ml distilled water,

以 1 ml 分裝於 1.5 ml 的 vial 中, 冷藏於 -20°C 。

II. Working reagents:

1. Solution A:

Solution I : 1% CuSO_4 solution : 2% NaK Tartrate solution = 1: 1

Solution I : Solution II (2% Na_2CO_3) = 1 : 50

2. Solution B:

Folin-Ciocalteu phenol : H_2O = 1 : 1

working reagents 須每次實驗時才配製。

III. Procedure:

1. 配製測定蛋白質之 BSA 標準品溶液：稱取 25mg 的 BSA 標準品溶於水中最後體積為 100ml，配製成 0.25mg/ml 濃度的標準品。
- 依下列的(Table) 所述稀釋成 50, 37.5, 25, 12.5 ug 的濃度當 working standard

	H ₂ O (ul)	BSA standard solution (ul)	Total (ul)	Concentration (ug)
Blank	200	0	200	0
Standard 1	150	50	200	12.5
Standard 1	150	50	200	12.5
Standard 2	100	100	200	25
Standard 2	100	100	200	25
Standard 3	50	150	200	37.5
Standard 3	50	150	200	37.5
Standard 4	0	200	200	50
Standard 4	0	200	200	50

2. 樣品取 20 ul，其最後體積為 200ul。
3. 加入 1 ml solution A 混合均勻，在室溫下靜置 10 分鐘。
4. 加 0.1 ml solution B 混合均勻，在室溫下靜置 30 分鐘。
5. 測 OD_{660nm}

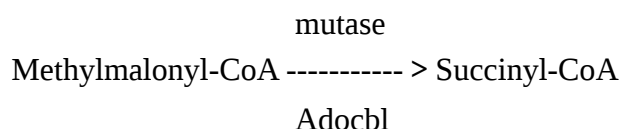
附錄四

Laboratory Manual of
Clinical Biochem. Res. Lab.
Veterans General Hospital -Taipei

wu\lab\mutase.doc
Ver1.0(May 17,1995)
S.J. Wu

Determination of Mutase activity by HPLC for Methylmalonic Aciduria

I.實驗原理：



II.檢体採集與保存：

1.檢体來源:

- (1)皮膚纖維母細胞:收集正常或非甲基丙二酸血症之其它不相關疾病的皮膚纖維母細胞,並由美國 Coriell 醫學研究中心購買人類甲基丙二酸血症纖維母細胞株做為對照組。
- (2)羊水細胞:以收集懷孕 15-20 週之正常羊水細胞為對象。
- (3)白血球:收集含 heparin 抗凝劑之正常人全血約 10ml。

2.檢体處理:

- (1) 皮膚纖維母細胞及羊水細胞在無菌狀況下採集後,皮膚纖維母細胞,加入含有 20%胎牛血清之 DMEM 培養到 logphase,而羊水細胞入在含有 10%胎牛血清之 changB 培養到 logphase 後,以含 15-20%胎牛血清之 RPMI 培養。然兩者再繼代培養(subculture)至足夠分析所需的細胞量(約一個 75T flask)後,同時需做 Mycoplasma 污染測試,以排除 Mycoplasma 污染。然後將細胞收集,冷凍於-70 中待分析。
- (2) 收集白血球,將含 heparin 抗凝劑全血 10ml,離心去除上清液部分,取出 Buffycoat 加入等量 0.01M NH_4HCO_3 :0.144M

NH_4Cl =1:10 溶液，目的去除多餘之紅血球，然後離心取 pellet，用去離子水清洗後再離心，將 pellet 取出，冷凍於-70 中待分析。

III.試 劑 備 製 與 保 存：

1. 400mM sodium phosphate 緩衝液：取 11.98 克 NaH_2PO_4 溶於水体積至 250ml 及取 14.19 克 Na_2HPO_4 溶於水体積至 250ml，將兩者依比例混合配製成濃度為 400mM(pH=7.5)之緩衝液，冷藏保存。
2. 50mM sodium phosphate 緩衝液：取 400mM sodium phosphate 緩衝液 25ml 加水稀釋至體積 200ml(pH=7.0)，冷藏保存。
3. 220mM NaH_2PO_4 ：取 26.4 克 NaH_2PO_4 溶於水中最後體積至 1000ml(pH=4.0)，冷藏保存。
4. 4.2N HClO_4 ：取 9.2N HClO_4 45.6 ml 加水稀釋至體積 100ml，室溫保存。
5. 1.0M Na_2CO_3 ：取 5.4 克 Na_2CO_3 溶於水中最後體積至 50ml，室溫保存。
6. Methanol, chloroform：(JT Baker,USA)，以 0.45 μ 過濾膜過濾。
7. 180 μ M Adenosylcobalamin (Adocbl)又稱 Coenzyme B_{12} ：取 2.9mg Adocbl 溶於 10ml 水中，分裝冷凍於-70 保存。
8. Succinyl CoA 標準液的配製：取 5mg 溶於 1.1ml 水中配製成 5.2mM，依所須之濃度配成 22 μ M、11 μ M、5.5 μ M，分裝冷凍於-70 保存。
9. Methylmalonyl CoA：取 5mg 溶於 3.4 ml 水中配製成 1.6mM，分裝冷凍於-70 保存。

IV. 實驗步驟：

本分析方法係依據 kikuchi⁽¹⁾等人報告之方法加以必要修定後應用。

1. 每個檢體須做 Duplicate，且加做 Control。
2. 將檢體懸浮於 0.8ml 50mM(pH 7.0) phosphate buffer 中，用細胞震碎機 (25W×15"×3)，將細胞震碎。
3. 取震碎後之細胞溶液 45μ l 於 0.5ml vial 中，加入 400Mm phosphate buffer(pH 7.5) 25μ l，並加入 180μ M Adocbl 5μ l，然後在 37℃ 下反應 5 分鐘。
4. 然後在加入 1.6mM MethylmalonylCoA 25μ l，在 37℃ 下反應 10 分鐘後，加入 10μ l 4.2N HClO₄ 停止反應。
5. 然後在 4℃ 下轉速 12000 rpm 離心 10 分鐘，取 85μ l 之上清液加入 17.5 μ l 1.0M Na₂CO₃ 將反應液中和。
6. 將反應液以高效液相層析法分析，其分析條件如下：
Column: Finepak SIL C187-5, 保護管柱: Nucleosil 120-5 C-18, 30×4mm。
Mobile phase: 220mM phosphate buffer(pH 4.0) 內含 14 % (v/v) methanol 及 0.4 % (v/v) chloroform。
流速：1.0 ml/min。
分析管柱溫度：30℃。
UV 偵測器：波長 254nm。
7. 利用積分儀對層析圖譜之吸收峰積分，依標準曲線可求得未知檢體之濃度再除以蛋白質之濃度，計算出 mutase activity。(nmol/min/mg protein)
8. 蛋白質定量依 Lowry's method。

附錄五

Laboratory Manual of
Clinical Biochem. Res.Lab.
Veterans General Hospital (Taipei)

SOUTHERN.DOC
Ver1.0(Jan.23,1995)
By Jyh-Yeang Chiou

Analysis of Genomic DNA by Southern Hybridization

I.Principle:

Localization of particular sequences within genomic DNA is usually accomplished by the transfer techniques described by Southern (1975). Genomic DNA is digested with one or more restriction enzymes, and the resulting fragments are separated according to size by electrophoresis through an agarose gel. The DNA is then denatured in situ and transferred from the gel to solid support (usually a nitrocellulose filter or nylon membrane). The relative positions of the DNA fragments are preserved during their transfer to the filter. The DNA attached to the filter is hybridized to radiolabeled RNA, and autoradiography is used to locate the positions of bands complementary to probe.

The amount of genomic DNA needed to generate a detectable hybridization signal depends on a number of factors, including the proportion of the genome that is complementary to the probe, the size of the probe and its specific activity and the amount of genomic DNA transferred to the filter. Under the best conditions the method is sufficiently sensitive to detect, in a autoradiographic exposure of several days, less than 0.1 pg of DNA complementary to a probe that has been radiolabeled with ^{32}P to high specific activity ($>10^9$ cpm/ μg). A sequence of 1000 bp that occurs only once in the mammalian genome (i.e., 1 part in 3 million) can be detected in an overnight exposure. If 10 μg of genomic DNA is transferred to the filter and hybridized to a probe several hundred nucleotides in length. Because the strength of the signal is proportional to the specific activity of the probe and inversely proportional to its length, Southern hybridization reaches the limits of its sensitivity when very short probes are used. To obtain a detectable signal with oligonucleotide probes, it is therefore necessary to radiolabel oligonucleotides to the highest specific activity possible, to increase the amount of target DNA on the filter, and to expose the autoradiograph for several days.

.Specimens:

Genomic DNA may be prepared from WBC in whole blood with EDTA as the anticoagulant, from cultured lymphoblasts, fibroblasts, amniotic cells or chorionic cells by the methods described by the laboratory manual of Genomic DNA Isolation. Genomic DNA should be stored in DNA BANK at 4 °C.

.Reagents:

1. Restriction Enzyme Digestion and Agarose Gel Electrophoresis

(1) gel and running buffer (1×TAE or 1×TBE)

(a) TAE

Working solution	stock solution (per liter)
1×:0.04M Tris-acetate	50×:242g Tris base
0.001M EDTA	57.1ml glacial acetic acid
	100ml 0.5M EDTA (pH8.0)

(b) TBE

Working solution	stock solution (per liter)
1×:0.09M Tris-borate	5×:54g Tris base
0.002M EDTA	27.5g boric acid
	20ml 0.5M EDTA (pH8.0)

(2) agarose, LE, SeaKem-FMC Bioproducts, cat. no. 50004

(3) gel-loading buffer

- 0.25% bromophenol blue
- 0.25% xylene cyanol FF
- 30% glycerol in water

(4) ethidium bromide

- 10mg/ml in H₂O (stock)

2. DNA Transfer to Nylon Membrane (positively charged, Boehringer Mannheim, cat. no. 1417240) .

Method A : (20×SSC transfer)

(1) denaturation solution

1.5M NaCl

0.5N NaOH

(2) neutralization solution

1.5M NaCl

1.0M Tris-HCl

pH 7.4

(3) 20×SSC

3M NaCl

0.3M Sodium Citrate

pH 7.0

(4) 2×SSC

Method B (alkaline transfer)

(1) 0.25N HCl

(2) 0.4N NaOH

3. DNA Probe Labeling

(1) random primed labeling kit (Boehringer Mannheim, cat. no. 1004 760)

(2) α - ³²PdCTP (DuPont NEN Research Products, cat. no. NEG-013Z,
6000Ci/mmol, 20mCi/ml)

(3) 10% SDS

(4) 0.5M EDTA, pH 8.0

(5) TNE

0.1M NaCl

10mM Tris-HCl, pH 8.0

1mM EDTA, pH 8.0

4. Prehybridization and Hybridization (for DHPR)

(1) prehybridization solution

50% deionized formamide

0.1% SDS

5×SSC

5×Denhardt's solution (*100×: 10g Ficoll 400-Pharmacia, 10g polyvinylpyrrolidone, 10g bovine serum albumin/500ml H₂O*)

0.1mg/ml salmon sperm DNA (sheared and denatured)

(2) hybridization solution

45% deionized formamide

0.02% SDS

5×SSC

1×Denhardt's solution

20mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄, pH6.8

10% dextran sulfate

0.1mg/ml salmon sperm DNA (sheared and denatured)

5. Wash (for DHPR), Autoradiography and Deprobe

(1) washing solution I

2×SSC/0.1%SDS

(2) washing solution II

0.1×SSC/0.1%SDS, 55 or 65 prewarmed

(3) deprobe solution

0.1×Denhardt's solution

1mM EDTA, pH8.0

1mM Tris-HCl, pH8.0

0.1% SDS

.Procedures:

(1) Restriction Enzyme Digestion and Agarose Gel Electrophoresis

(2) Digest 10μg genomic DNA with 40 units restriction enzymes and appropriate buffer in total 40μl mixture at optimal reaction temperature.

(3) (For complete digestion, add 20 units enzyme for 2-10 hours at first, then add the other 20 units enzyme for other 2-10 hours.)

(4) Seal the edges of the open ends of the plastic tray supplied with the

Electrophoresis apparatus with autoclave tape so as to form a mold. Set it on a horizontal section of the bench.

- (3) Prepare a 0.8%-2% agarose gel depended on the size to be analyzed. Melt the agarose with gel buffer (1×TAE or 1×TBE) by microwave oven till the solution become clear.

Table. Range of Separation in Gels Containing Different Amounts of Agarose

Amount of agarose in gel (%1w/v1)	efficient range of separation of linear DNA molecules(Kb)
0.3	5-60
0.6	1-20
0.7	0.8-10
0.9	0.5-7
1.2	0.4-6
1.5	0.2-3
2.0	0.1-2

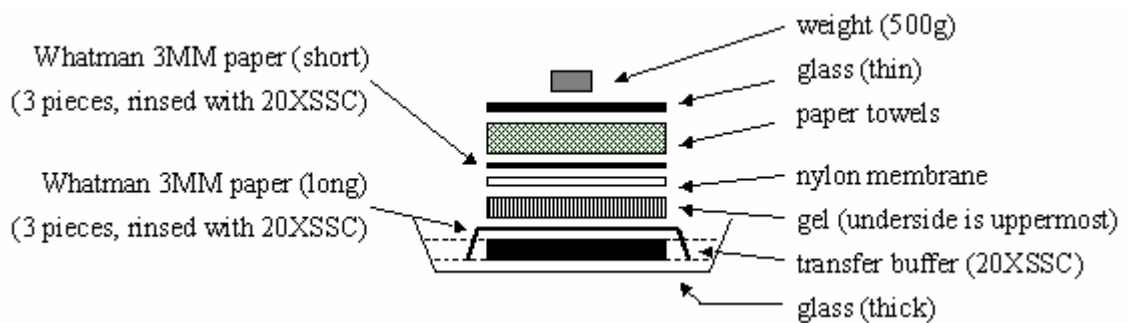
- (4) Cool to 60 and pour the warm agarose solution into the mold, then position the comb 0.5-1.0 mm above the plate.
- (5) After the gel is complete set (1 hour at room temperature), carefully remove the comb and autoclave tape and mount the gel in the electrophoresis tank.
- (6) Fill the electrophoresis tank with sufficient running buffer, and check the wells to make sure that are not leaky. (Running buffer and gel buffer and gel buffer must be identical.)
- (7) Choose appropriate DNA marker, add 1/10 volume of gel-loading buffer to the DNA samples and marker, mix well.
- (8) Load the marker and DNA samples to the slots, run 16 hours at 45 Volts (or 18 hours at 40 Volts, optimal condition:1cm/1hour) at room temperature.
- (9) Carefully remove the gel and stain the gel with 0.5μ g/ml ethidium bromide (dilute 20000×with 10mg/ml stock in H₂O of running buffer), 15 minutes at room temperature.
- (10) Destain background with deionized water for 15 minutes at room temperature.
- (11) Expose the gel to long UV light for 30 seconds. Put the gel into UV box,

photograph with a ruler.

2. DNA Transfer to Nylon Membrane

Method A : (20×SSC transfer)

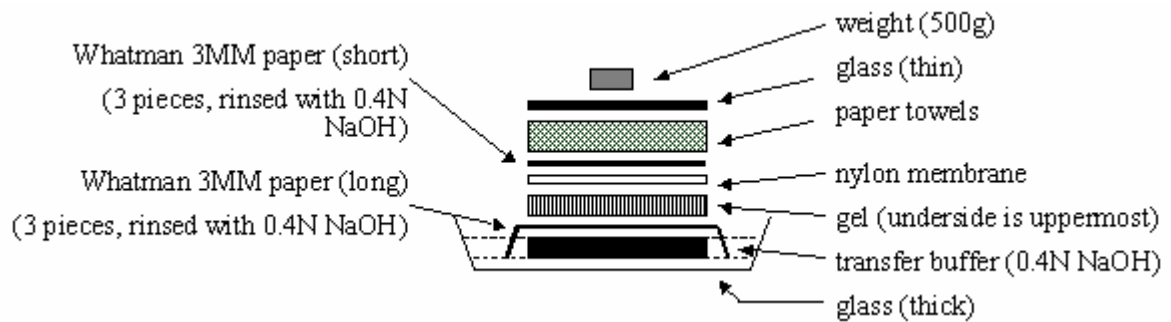
- (1) Soak gel in 250ml denaturation solution twice, each 15 minutes at room temperature, with constant and gentle agitation.
- (2) Rinse the gel briefly in deionized water.
- (3) Soak gel in 250ml neutralization solution twice, each 15 minutes at room temperature, with constant and gentle agitation.
- (4) Assemble transfer stack, then transfer with 20×SSC.



- (5) Transfer for 24 hours. (Maintain transfer buffer level and replace paper towels when they become wet)
- (6) After transfer, mark the positions of gel slots on the nylon membrane, and lay this membrane on a dry sheet of 3MM paper (DNA side up).
- (7) Air dry nylon membrane at least 30 minutes, then expose 254nm ultraviolet irradiation to immobilize DNA on membrane.
- (8) Store the membrane in plastic bag at room temperature until needed.

Method B: (alkaline transfer)

- (1) Soak gel in 250ml 0.25ml 0.25N HCl for 15 minutes at room temperature, with constant and gentle agitation.
- (2) Soak gel in 250ml 0.4N NaOH at room temperature, then prepare transfer stack.
- (3) Transfer with 0.4N NaOH.



- (4) Transfer for 6 hours. (Maintain transfer buffer level and replace paper towels when they become wet.)
- (5) After transfer, mark the positions of gel slots on the nylon membrane, and lay this membrane on a dry sheet of 3MM paper (DNA site up).
- (6) Air dry nylon membrane at least 30 minutes, then expose 254nm ultraviolet irradiation to immobilize DNA on membrane.
- (7) Store the membrane in plastic bag at room temperature until needed.

3. DNA Probe Labeling

- (1) To denature DNA probe, put the DNA sample and H₂O mixture (25ng DNA in 11μ l deionized water) into boiling water for 5 minutes, then chill on ice for 5 minutes.
- (2) Add the volume of each reagent to the DNA tube in the following order on an ice bath:

denatured DNA probe(25ng)	11μ l
dATP	1μ l
dTTP	1μ l
dGTP	1μ l
reaction buffer with primer	2μ l
α - ³² P-dCTP	3μ l
Klenow enzyme (Boehringer Mannheim, cat. no. 1008 412, 2u/μ l)	1μ l
total	20μ l

- (3) Mix, then incubate at 37 °C for 1 hour.
- (4) Add 5μ l 10% SDS and 1μ l 0.5M EDTA to stop reaction.
- (5) There are two methods to remove the unincorporated α -³²P-dCTP from radiolabeled DNA probe.

Method A

- (a) Remove the end caps from NucTrap push column (Stratagene, cat. no. 400702).
- (b) Add 70 μ l TNE to prerinse the push column.
- (c) Add 44 μ l deionized water to DNA probe, then add probe in a total volume of 70 μ l to the push column.
- (d) Recover radiolabeled DNA probe by syringe. (unincorporated α -³²dCTP will be trapped in the column.)

Method B

- (a) Add DNA probe to micro-spin filter (Millipore UFC3LGC00, MW 10000), then centrifuge at 6000 rpm for 40 minutes.
- (b) Recover probe by washing the filter with 50 μ l TNE twice to a total volume of 100 μ l.
- (6) Count 2 μ l of the probe solution to determine the radioactivity. (Generally, the total incorporated probe is about 1×10^8 cpm, specific activity 10^9

How to calculate specific activity:

$$\frac{\text{Cpm of separated probe}}{\text{cpm of unseparated probe}} = \text{proportion incorporated}$$
$$\text{proportion incorporated} \times \text{total probe weight} = \text{total amount of product}$$
$$\frac{\text{total amount of product}}{\text{total cpm incorporated}} = \text{specific activity}$$

4. Prehybridization and Hybridization

- (1) Rinse the nylon membrane with 2 $\times$ SSC, cut it with mesh and put it into hybridization tube, then roll the tube to attach membrane to the tube wall. Pour 2 $\times$ SSC away.
- (2) Add prehybridization solution 20ml (salmon sperm DNA must be denatured for 5 minutes in boiling water before adding to the prehybridization solution) to the tube, then incubate at 42 $^{\circ}$ C in the rolling oven, at least 6 hours.
- (3) Denature probe in boiling water for 5 minutes, then chill on ice. The optimal concentration of probe is 1×10^6 cpm/ml hybridization solution.)
- (4) After prehybridization, pour away prehybridization solution and add hybridization solution 20ml (salmon sperm DNA must be denatured for 5 minutes in boiling water and denatured probe. Incubate at 42 $^{\circ}$ C for 24-36 hours in rolling oven.

5. Wash (for DHPR), Autoradiography and Deprobe

- (1) After hybridization, wash the nylon membrane in following order:
- (2) washing solution I 500ml, room temperature 15 minutes.
- (3) Washing solution 500ml, 55 15 minutes for Hinf I, Msp I or 65 15 minutes for Ava II, Nco I.
- (4) Allow membrane to air dry on 3MM paper, then cover to with Saran Wrap to prevent contamination.
- (5) For autoradiography, expose nylon membrane to X-ray film with intensifying screen for 1-5 days at -70 or to phosphoimage cassette overnight at room temperature.
- (6) After autoradiography, remove radiolabeled probe from membrane by adding 500ml deprobe solution for 2 hours at 75 , air dry membrane on 3MM paper, then store the membrane in plastic bag at room temperature.

V. Notes:

- (1) From prehybridization to washing, do not let nylon membrane dry out, or it will be very difficult to wash background off.
- (2) Before autoradiography, remember to cover membrane with Saran Wrap, or it will be possible to contaminate cassettes.
- (3) Be careful when you use ethidium bromide and α -³²P-dCTP.

. References:

1. J. Sambrook, E.F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. Molecular cloning-a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory.
2. F. M. Ausubel et. Al. 1992. Short protocols in molecular biology, 2nd ed. Greene Publishing Associates and John Wiley & Sons.

附錄六

Laboratory manual of
Clinical Biochem. Res. Lab.
Veterans General Hospital (Taipei)

DT.doc
Version 1.2 (MAY 25, 2004)
By Y. C. Chang

Cycle Sequencing with Big Dye Terminators for ABI DNA Sequencer

I、Material & Reagent :

- (1) 0.2 ml、 0.5 ml PCR tubes 或 skirted 96-well PCR plates (SSI , part#:3420-00)及 1.5 ml eppendorff。
- (2) ABI PRISM™ BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit Reagents (PERKIN ELEMER version 1.1 或 3.1) , -15 到-25 下保存 , 避光使用。
- (3) Sequencing positive control :
檢體為 PCR product 者 , 由陽明基因體中心提供 A06 (200 ng/ul)及所需的核酸引子 M13 Forward primer ; 為質體 DNA 者 , 則依使用者需求提供 A06 (200 ng/ul)及所需的核酸引子 T7、Sp6 或 T3。
- (4) Big -Dye Terminator Sequencing dilution buffer 5X (附於 ABI PRISM™ BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit 內 , 4 保存)
- (5) 100 % DMSO (避光使用 , 不需冷凍 , 室溫保存)
- (6) Sterile deionized water
- (7) 100 % and 70 % ethanol (EtOH , 室溫保存)
- (8) Sodium acetate (NaOAc), 3 M, pH 5.2

II、Instrument

1. PCR 機器 : 如 GeneAmp PCR System 9700 (PE)、 PTC-100 或 PTC-200 Programmable Thermal Controller (MJ Research, Inc.)等。
2. 離心機 :
 - (1) 0.2 ml、 0.5 ml PCR tubes : 桌上型高速離心機(fix-angle , 控溫式)
 - (2) 96-well PCR plates : fix-angle 及 swing angle 桌上型高速離心機。

III、Method：

1. Sequencing 反應：

(1) 準備 template 及試藥

a. PCR 產物：

PCR 產物需先確定為單一產物,並經純化,去除多餘的 dNTP 及 primer,在 OD. 260 下或跑瓊脂凝膠電泳以測定 template 濃度。

b. 質體 DNA：

在 OD. 260 下或跑瓊脂凝膠電泳以測定 template 濃度。

c. BigDye Terminator Mix (ver 1.1 或 3.1) 使用前將 stock 在冰上解凍, , primer 亦在冰上解凍, 混合均勻後快速離心放冰上備用。

(2) 先配製 Premix**(即不含 template), Sequencing 反應配方如下所示(依序加入)：

Reagent	質體 DNA	PCR 產物
Deionized water	-----	-----
5X dilution buffer	0.5 ul	1.4 ul
100 % DMSO	0.5 ul	0.0 ul
BigDye Terminator Mix (ver 1.1 / 3.1)	1.0 ul	1.0 ul
Primer (Forward 或 Reverse)	1.6 pmol	2.0 pmol
Double-strand DNA**	200-500 ng*	1-100 ng*
Total volume	10 ul	7 ul

*DNA 建議用量：

Template	Quantity
質體 DNA	200-500 ng
PCR 產物：	
100-200 bp	1-3 ng
200-500 bp	3-10 ng
500-1000 bp	5-20 ng
1000-2000 bp	10-40 ng
>2000 bp	40-100 ng

**Premix 配製範例：

若要進行 Sequencing 反應的質體 DNA 共有 9 個,濃度各為 200 ng/ul, 使用同樣 primer

T7，濃度為 3.2 uM，扣除 template 所佔體積為 2ul，需配製 10 份，配方為：

Reagent	1 份	10 份
Deionized water	4.5 ul	45 ul
5X dilution buffer	0.5 ul	5 ul
100 % DMSO	0.5 ul	5 ul
BigDye Terminator Mix (ver 1.1 / 3.1)	2.0 ul	20 ul
3.2 uM T7 primer	0.5 ul	5 ul
Per tube or well	8.0 ul	8.0 ul

將水、dilution buffer、DMSO、BigDye Terminator Mix 及 T7 primer 加在 1.5 ml eppendorff，混合均勻後快速離心，分裝到 0.2 ml、0.5 ml PCR tubes 或 96-well plate 後，加入 template。

(3) Premix 配製完成後混合均勻後快速離心，分裝到 0.2 ml、0.5 ml PCR tubes 或 96-well plate 後，加入 template 後混合均勻後快速離心，置冰上備用。

(4) Sequencing positive control A06 為質體 DNA，其 sequencing 反應配方：

Reagent	A06
Deionized water	4.5 ul
5X dilution buffer	0.5 ul
100 % DMSO	0.5 ul
BigDye Terminator Mix (ver 1.1 / 3.1)	2.0 ul
3.2 uM Primer (見 Material & Reagent 3)	0.5 ul
A06 template	2.0 ul
Total volume	10 ul

加到 0.2 ml 或 0.5 ml PCR tubes 中；若為 96-well plate，則置於盤子 A-6 位置。

(5) 加入 template 後加蓋快速離心。

(6) 照下面的條件進行 PCR：

- 96 1 min
- 96 10 sec
- 52 10 sec
- 60 4 min
- 重複步驟(b)-(d)共 50 個 cycle

f. 4 ∞

(5) Sequencing 反應結束後快速離心，若不直接作酒精沉澱，貼上鋁箔或加蓋密封暫存 4 冰箱，得保存 24 小時。

(6) 0.2 ml 或 0.5 ml PCR tubes 者，需將 sequencing 產物轉移至 1.5 ml eppendorff 或 96-well plate，進行酒精沉澱步驟；96-well plate 者則可直接進行酒精沉澱步驟。

(7) 酒精沉澱步驟

BigDye Terminator Mix version	1.1		3.1	
Sequencing 產物體積	10 ul	7 ul	10 ul	7 ul
3M NaOAc, pH 5.2 (ul)	1.0	0.7	3.0	2.1
100 % EtOH (ul)	25.0	17.5	59.4	41.6
Sterile deionized water (ul)	0.0	0.0	27.6	19.3
Total (ul)	26.0	18.2	90.0	63.0

Premix 配製範例：

視檢體數量來說，配製所需份數，加到 1.5 ml eppendorff 中混合均勻後快速離心

(8) 震盪混合後室溫靜置 20 分鐘。

(9) 依照容器種類不同，做以下處理：

	1.5 ml eppendorff	96-well plate
離心	30 min, 14000xg (4)	45 min, 1700xg (4)
清洗 pellet	小心吸去上清液 - 加入 500 ul 70 % EtOH，震盪混合 -	盤面反轉倒掉上清液，不要翻回來並在下方墊擦手紙或衛生紙 倒轉離心 400xg、1 min，以免上清液殘留 加入 100 ul 70 % EtOH，震盪混合 貼上鋁箔或加蓋密封，震盪混合
離心	10 min, 14000xg(4)	15 min, 1700xg (4)
乾燥	小心吸去上清液 -	盤面反轉倒掉上清液，不要翻回來並在下方墊擦手紙或衛生紙 倒轉離心 400xg、1 min，以免上清液殘留
	避光，室溫風乾 20 min	避光，室溫風乾 20 min

(10) 乾燥後貼上鋁箔或加蓋密封需放在-20 下遮光保存。

(11) 檢體運送時請避光且不需冷藏，請附上檢體名稱及要求讀長表單。

Reference：

1. ABI PRISM™ BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit Protocol. *PERKIN
ELMER*