

DNA條碼在防偽墨水之應用

指導教授：廖珮玲 老師
研究學生：羅婕予、吳竺燕
陳立倫

摘要

DNA防偽是一種應用性廣泛的生物特徵辨識技術，利用DNA序列的特異性與印刷相結合，應用於一般性的印刷產品上，能避免商品被仿冒所蒙受的巨大損失。DNA條碼是由加拿大的赫伯特博士(Paul Hebert) 於2002 年提出，是利用粒線體基因上的片段DNA 序列cytochrome c oxidase 1 (COI)分辨生物種類，此片段的差異性可以辨識地球上大多數物種，而DNA條碼與圖書出版所使用的ISBN條碼相類似，把DNA條碼以外加的方式加入墨水之中，DNA防偽墨水經過印刷、書寫或印鑑蓋章後附著在被印物上，若有需要鑑定其產品之真偽，將DNA印刷墨水中的DNA抽取出來，以分子生物技術鑑定DNA的序列，並與NCBI資料庫比對便能得知該產品之真偽。

關鍵詞：DNA防偽技術、DNA條碼、DNA防偽墨水

壹、緒論

一、研究背景與動機

為了有效防止仿冒之猖獗，各式的防偽技術被開發使用，將防偽技術與印刷相結合是應用在產品防偽上最廣泛的一種方式。當中又以DNA防偽印刷技術屬於生物科技防偽的一種高門檻、不易被仿冒的新興技術(洪時凱2005)。DNA是由A、T、C、G四種核酸排列組合而成，每一個位置有A、T、C、G四種排列可能性，兩個核酸序列其排列組合便有16種可能性，以此類推，當有n個序列其排列組合便有4的n次方種可能性，由於這種序列排列的高度複雜性，使得DNA適合應用在防偽的用途且不易被仿冒，被識為是目前最高門檻且艱深的一項技術(黃昌宏2003)全球貿易受到仿冒的影響很大，防止仿冒的技術始終無法有效遏阻，本研究即以物種分類學上使用純熟的理論去探討其在生物防偽技術上之應用。

二、研究目的

1. 生物技術在目前仍屬於高門檻技術，在市場上的產品應用上並不普及，若能使用已純熟的理論，將可增進使用者對DNA防偽印刷技術的認同，更高其使用之意願。
2. 受限於生產公司，可以送到任何有能力及公證力的檢驗單位鑑識。

三、研究重要性

在DNA防偽的辨識方式有顯性及隱性方式，顯性方式多是利用在單價較低的商品上，利用呈色方式用肉眼即可辨識。隱性方式多是應用於特殊用途之商品，需要送到檢驗實驗室才能鑑別，需要較長的時間辨別真偽，本研究雖屬隱性辨識方法，但探討是否能有效縮短鑑識時間，改善使用的便利性，並且維持本方法的正確性以提供使用者作參考。

四、研究流程

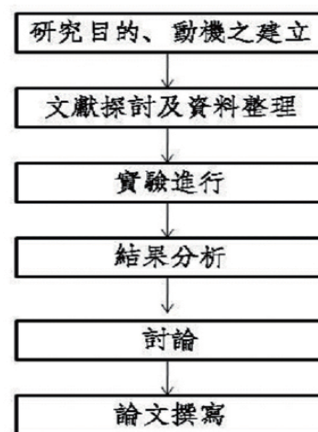


圖1：研究流程圖。

五、研究假設

假設本研究有添加DNA條碼之墨水與無添加DNA條碼之墨水是否分別可以PCR及DNA定序方法鑑定。基於上述的動機及問題，本研究提出以下假設等待驗證。

H1：有添加DNA條碼之墨水以PCR及DNA定序方法可鑑定出其所含之DNA，其結果為陽性(得證)。

H0：無添加DNA條碼以PCR及DNA定序方法鑑定其結果為陰性。

六、研究範圍與限制

(一) DNA驗證技術隨著分子生物技術進步，除了PCR、DNA定序外還有許多種常見的技術如即時定量PCR、奈米微粒篩檢(陳俊顯2001)、PCR-RFLP(楊鎮璿2007)、生物晶片等等，本研究是以PCR、DNA定序等最基本且最廣泛應用

的生物技術為主要辨識方法。

- (二) 本研究的主要目的是從DNA製程技術與DNA驗證技術探討DNA條碼在DNA防偽墨水之應用，對於DNA分子包覆保存、DNA油墨分散技術、DNA油墨穩定性則不在本篇論文探討範圍。

七、名詞釋義

(一)DNA防偽技術

DNA防偽技術是運用DNA生物序列的獨特性於各項產品上，除增加產品的附加價值外，更可有效杜絕產品被仿冒的風險。

(二)DNA條碼

利用粒線體基因上的片段DNA 序列cytochrome oxidase I (COI)分辨生物種類。

(三)DNA防偽墨水

將DNA分子混入墨水當中，並運用到有價證券、鈔票上或其他產品，不僅難以解碼，想要複製仿冒更是難上加難。

貳、文獻探討

一、發展

在1984年英國Leicester大學Alec Jeffreys博士發現DNA指紋(DNA fingerprinting)可用於身份的鑑別，於1986年首次運用在英國發生的二名女學生遭姦殺的刑事案件偵查上，開啟了法醫鑑識科學的另一個里程碑。鑑識科學進行的DNA鑑定理論即建立在DNA鹼基序列的特異性上(呂文忠 2006)。在去年,台灣則有醫生利用癌症切片檢體詐領保險金的案件,最後也是靠檢驗粒線體DNA才得以偵破,因為一般檢體的DNA很快就被福馬林破壞了,所以國泰醫院曾欽元主任利用最新技術「粒線體DNA」來分辨檢體來自不同人而使案情真相大白。

隨著科技的發展,仿冒的技術也越來越精進,因此防偽技術為了保障自家產品的權利也必需不斷開發新興技術作為因應之道。DNA防偽印刷是一種以DNA科技為根基,結合分子生物、油墨(墨水)及印刷等三種不同技術共同開發的前瞻性防偽技術。由於DNA防偽是一種無法仿冒的設計,透過DNA防偽油墨的開發並應用於產品包裝印刷上無異將有效遏阻仿冒者猖獗,對於商品流通與消費者更是一大保障。

DNA防偽技術主要原理是將動、植物的去氧核糖(DNA)擷取下來經萃取、剪接、合成等步驟,並由遺傳工程技術處理後,再經特殊生產製程,使得DNA能在常態下長久保存下來。DNA序列極長,針對每個顧客客製化剪接製造出來的DNA序列被破解的可能性為四的三十億分之一,不可能被破解(威達康防偽科技)。在台灣有博微生技、新美光油墨公司、山水印刷公司及印刷工業技術研究中心都曾投入新型DNA防偽油墨之開發研究(黃昌宏2003)。DNA防偽辨識解密驗證平台已有DNA分子包覆保存技術、防偽立即辨識、DNA油墨分散技術、DNA油墨穩定性、DNA油墨設計

可提供技術轉移。(謝美君2008)

二、認識粒線體DNA

動物的遺傳物質可分為染色體DNA (genomic DNA) 和粒線體 (mitochondrial DNA; mt DNA)。由於動物的mt DNA 具有母系遺傳特性,並且缺乏對錯誤的修補能力,其演化速率較染色體DNA 快5-10 倍,因此被廣泛應用於族群遺傳、地理親緣關係和生物演化方面的研究。mt DNA 為雙股環狀構造,其基因組成包含12S 及16S 兩個核醣體RNA(ribosomal RNA; rRNA)、22 個轉移RNA(transfer RNA; tRNA)、13 個蛋白質基因(protein coding genes)以及一個控制區(control region, D-loop), COI (cytochrome oxidase subunit I) 基因為13 個蛋白質基因之一。

(一)mtDNA(mitochondrial DNA)

除了細胞核內的染色體DNA 外,位於細胞質中的粒線體亦含有DNA,稱為粒線體DNA (mitochondrial DNA, mtDNA)。粒線體是存在於細胞質的一個含有雙層膜的重要細胞器,是細胞的氧化中心和動力站。幾乎人體所有細胞中均有粒線體,但不同組織細胞中粒線體的數目有所差異,如肝臟、心肌、骨骼肌等組織細胞中粒線體數目含量較多,每一個肝細胞中均有1,000-2,000 個粒線體,可能與這些組織中的代謝率高有關。粒線體有自己的遺傳系統,粒線體DNA 是人類第二套基因組DNA,也是人細胞中除核之外唯一含有DNA 的細胞器。粒線體也有自己的蛋白質翻譯系統和遺傳密碼。粒線體的基因組編碼tRNA、rRNA 及一些功能蛋白質。由於受精卵中的粒線體幾乎全來自於卵細胞(因為精子細胞中含有極少量的粒線體,只有50 個拷貝),所以粒線體遺傳系統往往表現為母系遺傳,母親所攜帶的mtDNA 突變可傳給她的子女。

mtDNA 是裸露的,不與組蛋白結合,存在於粒線體的基質內或黏附於粒線體內膜。在一個粒線體內往往有一至數個mtDNA 分子。mtDNA 的自我複製也是以半保留複製方式進行的。粒線體基因組是人類基因組的重要組成部分,英國劍橋大學的Anderson 等人於1980 年完成了對粒線體基因組的全序列測定,該序列可在基因庫中找到,稱之為Anderson 序列或劍橋序列。現都以Anderson 序列作為標準,進行人粒線體DNA 序列多型性比對。現代的粒線體是以古代的一個細菌祖先進化衍生而來的。人類粒線體基因組的序列共含16569 個鹼基對,粒線體基因組共編碼了37 個基因。除編碼區外,粒線體DNA 還含有一個非編碼區,叫控制區 (control region,CR),又謂D-環區 (D-loop),這個名字得自於電子顯微鏡觀察到的粒線體DNA 在複製過程中形成的一種結構形狀。

(二)粒線體DNA 的遺傳系統的遺傳系統表現出與核DNA 遺傳系統不完全相同,其特點如下:

1. 複製數量多:

在正常細胞中,一個細胞的細胞核中只有一套染色體或核基因組,一個基因座位上有兩個等位基因,一個來自母親,另一個來自父親。然而,每個細胞內則含有多個粒線體,並且每個粒線體內含多個複製的粒線體基因組DNA (血小板和未受精的卵子例外,它們中的每個粒線體內只含有一個複製的mtDNA),體細

胞大約含有200-1700 個複製mtDNA。組織類型不同，數目也不同。由於有相對豐富的mtDNA，因此，在核DNA 已裂解的樣品中仍有較大可能萃取到mtDNA。

2. 高突變率：

mtDNA 具有比核DNA 更高的突變率，mtDNA 中某些區域的進化速度是核基因組的6-17 倍。mtDNA 的非編碼區在個體間表現出高度的差異性，例如，高加索人在mtDNA 的高變區I 和II 中平均有8 個核苷酸不同。

3. 異質性：

一個個體的mtDNA 有兩種或兩種以上不同鹼基序列差異的情況稱之為異質性 (heteroplasmy) 或雜合性；一個個體的所有mtDNA 分子都相同，則稱之為同質性 (homoplasmy) 或同一性。個體mtDNA 異質性的存在形式有三種：其一，個體的同一組織中含有一種以上的mtDNA序列。其二，同一個體不同組織的mtDNA 序列不同，一種組織含有一種mtDNA 序列，而在另一組織中存在著另一種mtDNA 序列。其三，個體的一種組織中的mtDNA 為同質性，而在另一種組織表現為異質性。在細胞發育過程中，mtDNA 分子彼此獨立複製，不涉及細胞減數分裂，因此本質上沒有重組。而且mtDNA 分子存在著差異，並且不同的變異體獨立複製、分配。但是mtDNA 傳遞過程中的遺傳瓶頸限制mtDNA 變異體在後代中的遺傳。使其在人群中分布沒有那麼廣泛，只有2%-8%人群存在異質性。異質性的存在顯然使法醫學鑑定複雜化，但有其鑑定意義。在實際應用中必須考慮異質性的存在，了解異質性出現的位置，有助於指導結果解釋。由於調查的有異質性的樣品數太少，尚未獲得精確的大多數核苷酸位置異質性發生的頻率。mtDNA 的高突變率及核苷酸的取代是異質性產生的原因，不同位置的鹼基取代速度明顯不同。在mtDNA 以親代向子代傳遞過程中涉及一個或多個遺傳瓶頸，造成同一個體不同組織中異質性比例不同、同一母系成員中mtDNA 不同，甚至變成一個同質性的核苷酸取代。因此，mtDNA 分析方法進行母系成員鑑定對照，要考慮異質性的存在，以避免假排除。

4. 母系遺傳：

在精卵結合的受精過程中，受精卵中幾乎所有的mtDNA 來自於卵子，表現為母系遺傳 (maternal inheritance)。主要原因是簡單的數量問題，因為精子頭部不含或極少有mtDNA，而卵子則含有上百萬個複製mtDNA。mtDNA 分子的遺傳與孟德爾遺傳不同，表現為母系遺傳。母親將攜帶的突變mtDNA 分子傳給她的子女，再由她的女兒能把這種突變傳給下代，四代內沒有變異發生。

5. 不同的遺傳密碼：

粒線體的遺傳密碼與核的遺傳密碼不完全等同。

三、DNA條碼的緣起

DNA條碼概念是由加拿大的赫伯特(Paul Hebert)於2002 年所倡，意味利用一小片段DNA 序列區辨生物種類，此片段具備普遍性足以辨識當今全球多數物種。這個新的鑑識系統是利用粒線體基因的片段

cytochrome c oxidase 1 (CO1) DNA序列來標示物種，因為粒線體基因在演化過程中較不受壓力和環境的影響，也因為子代的粒線體DNA 僅遺傳自母系世代，不受父系遺傳影響，因此歷經許多世代也甚少變化，只會循一定的機率突變，藉此特性採用粒線體DNA 多態性表現可追溯母系種源，並能運用於物種間的親源分析。在生物演化過程中，由於內外環境因子的改變，單憑外部形質來界定類源關係可能有趨同演化造成的錯誤的。而DNA生物條碼的運用，將能解決許多物種型態、生物功能性上的爭議。也可避開傳統繁瑣不便的分類工作，因此馬上贏得了分類學者和生態學者的喜愛。

四、運用

生物資訊學(Bioinformatics)，是目前最熱門的領域，原本包括了基因、物種和生態系三個不同層次的所有生物多樣性之資料，但由於分子生物及基因(DNA)之資料在過去廿年來的飛躍進展，以及人類和若干物種之基因庫被完全解碼後，其龐大之資訊量幾乎已佔據了所有生命資訊之全部，並因潛藏廣大生藥商機而更受到重視，也因此「生物資訊學」已成為研究基因資料庫之代名詞。研究所有物種及生態系層次之資料乃被迫歸併到另一名詞「生物多樣性資訊學」(Biodiversity Informatics)中。

利用生物DNA生物條碼建立全球的生命大百科之計劃(DNA Barcode System)提出後，即被視同於「人類基因庫解碼」(Human Genome Project)，及建置基因序列資料庫(如GenBank) 一樣的一項「重大科學計劃」(Big Science Project)，將會對人類科學及社經產生革命性的影響。因此馬上獲得美國費爾德自然史博物館、哈佛大學、史密森尼博物院……等學術機構之支持，並獲得美國最大之麥克阿瑟基金會(John D. and Catherine MacArthur Foundation)及以支助科學研究為主之Alfred Sloan 基金會(Alfred Sloan Foundation)各支助1000萬及250萬美金之經費後，由美國國家科學院(National Academy of Sciences, NAS)正式對外公開。

DNA生物條碼計劃之執行方式，是號召全球成千上萬的科學家，將各自的研究成果或所收集到地球上180萬種生物之相關圖文、影音、地圖圖資等等資料，經由自由軟體，共同創作方式透過網路來上傳及分享，成為一個線上的百科全書。

目前DNA生物條碼條碼的運用，已經在各分類學的領域進行，以哥斯大黎加植物為例，生命條碼聯盟預期以三年的時間，完成全部八千種植物的生命條碼，共計約三萬條序列，總花費大約三十萬美金。除了這個例子以外，目前已經準備組成兩個次聯盟，分別是世界鳥類物種的生命條碼聯盟以及全世界魚類物種的生命條碼聯盟，吾等也可以藉由網路連結到該資料庫。(藍旻暉、曾吉村、林政億、李元民 2007)

生命條碼計畫的重點在建立完整的物種條碼資料庫，在應用科學方面，利用DNA條碼製成生物晶片來快速鑑種的方法，已在美、日、韓等國開始實際應用，相信不久之後，小型手持式的條碼機或是大型的物種篩檢儀就會問世。屆時對入侵種防治、食品檢驗、非法貿易、水樣中的生物監控、生態監測等管理

工作，均會有革命性的突破和進展，鑑種工作即可因條碼的鑑別，既客觀又快速且自動化地進行。本研究探討如果將生命條碼應用於DNA防偽技術，可配合已建立之龐大資料庫之使用將有利於此技術之推廣。(楊鎮琨 2007)

五、PCR(polymerase chain reaction)技術

(一)何謂PCR

聚合酶連鎖反應技術即PCR 是一種體外擴增特異DNA 片段的技術，此種方法操作簡單，短時間內在試管中可以獲得數百萬個複製的特異DNA 序列。此技術能在體外快速複製出大量特定DNA 的方法，於1984年由美國生化學家Kary B. Mullis 提出，由於此法操作簡單、反應快速及靈敏度高的優點，很快地被應用到與分子生物學相關的醫學、遺傳學、動物學、植物學、考古人類學等學科的研究，大幅縮短了人類對基因奧秘探索的時間。在鑑識科學之生物跡證鑑定中，PCR 提供了遺傳符號快速鑑定的應用，為刑事DNA鑑定方法在限制片段長度多型性鑑定法被發明後的另一個里程碑，PCR 在鑑識科學應用上具有適宜微量DNA與裂解DNA 的兩個優點，使得犯罪案件中，僅有的微量與陳舊的生物跡證，重新燃起破案的希望。

PCR 的理論基礎，源自體內細胞的DNA 複製，當DNA 複製時，某些酵素會將雙股拉開形成泡狀之環，RNA 聚合酶則分別以兩股DNA 為模板，合成一段RNA 引子 (primer)，DNA 聚合酶再延伸RNA 引子的3'端，合成新股DNA。在細胞外，由於尚未找到具有能適時解開雙股DNA 能力的酵素，因此，只能以加熱法將雙股DNA 變性分開，讓人工合成的小段DNA 引子結合到互補序列區，再以DNA 聚合酶合成新股DNA。在大量合成複製時，只要重複上述步驟即可，然而，最初的方法是以大腸桿菌DNA 聚合酶I 外的Klenow 片段為複製酵素，此酵素不能耐高溫，故每次在95°C 加熱變性階段後，此酵素即失去活性，必須重新補充，在此繁瑣勞累的步驟下，複製DNA 是一件非常不容易的事。後來在美國黃石公園間歇泉及溫泉水中發現的嗜熱菌(*Thermus aquaticus*)細胞中，可分離出Taq DNA 聚合酶。這種已完全適應其環境，並可在稍低於沸點的95°C 高溫長期培育下生存，這是能將兩股DNA變性分開的溫度。基本上沒有任何一種其他酵素，能在這個溫度下仍保持活性。因此，知名的科學(Science)雜誌也遴選Taq 作為他們1989 年的「年度分子」(Molecule of the Year)。在發現耐高溫的Taq DNA 聚合酶後，DNA反覆加熱變性的複製工作，由於不需隨時補充酵素，變得簡單，進而設計成自動化的PCR 法，只要自動重複複製20 次，DNA 量就被放大百萬倍以上，由原來不易偵測的微量DNA，放大到可輕易偵測的大量DNA，充分表現了複製DNA 的最高效率與PCR 在分子生物學的應用潛力。

(二)步驟

PCR 的主要步驟有：DNA 變性 (denaturation)、引子結合 (primer annealing) 與引子延伸 (primer extension)，茲分述如下：

1. DNA 變性

基因組之雙股DNA 以高溫加熱而分開，在溶液中

維持單股游離，以利降溫後的引子結合。

2. 引子結合

DNA 聚合酶只對含有引子的DNA 模板進行合成作用，因此，合成所欲複製基因之雙股模板3'端互補序列之一小段為引，作複製區之' 兩端，當引子結合時，藉著溶液由高溫逐漸降低，引子遂在適當的溫度下，結合上的兩條引子之3'端相對。由於引子濃度很高，有利引子與DNA模板之結合，使得DNA 模板間再相互結合的可能性降低。

3. 引子延伸

當引子結合後，DNA 聚合酶即依DNA 模板序列，於引子之端開始催化互補鹼基聚合作用，延伸方向由引子3'端開始，由5'至3'，直到模板終點或進入下一個循環之加熱變性為止，複製之新股DNA 包含引子與延伸部分。兩條引子延伸的方向正好相對，在第一個循環之變性、結合、延伸後，形成兩倍量之PCR 複製產物。第二個循環時，除原DNA模板外，新股DNA 亦為其模板，複製後，產生四倍量。第三個循環，產生八倍量，依次以等比級數增加。到了第二十個循環，即產生一百萬倍以上之複製DNA。

PCR 只是DNA 鑑定的一種前處理技術而已，並不是一種鑑定法，也就是說，PCR 所提供的僅是複製DNA 序列中某一特異序列而已，至於所複製出來的PCR 產物，必須再藉由其他的方法(如電泳分離、定序、點墨雜交等)，將其特性呈現出來。由於能夠擴增甚至僅1 分子的DNA，極微量的污染使可能導致假陽性的結果，PCR 中污染源有四種，即標本間的交叉污染、實驗室中非人DNA 污染、技術人員的DNA 污染(如頭皮屑、脫落細胞和毛髮)、PCR 產物的污染，亦稱殘留污染，最後一種中污染源最為嚴重。

4. 核酸定序 (DNA Sequencing)

方法有兩種：(1) Maxam-Gilbert 化學斷裂法 (2) Sanger 酵素合成法。這兩種方法的發明使Dr. Maxam、Dr. Gilbert、Dr. Sanger獲得1980年諾貝爾獎的殊榮。其中，以Sanger 酵素合成法最為常用，這項發明也讓Dr. Sanger獲得生平第二個諾貝爾獎。

(三)基因定序原理：

1. Maxam-Gilbert化學切割法：

先將雙股DNA變性分離成單股DNA，在其5'端以放射線物質P32標示，各以四種化學物質，分別對四種鹼基作用，每一反應只對單一鹼基進行修飾，並且在該鹼基的地方斷裂開，得到一系列長度不同的核酸片段。電泳可依照這些 DNA 片段的大小，在膠體中排開，即可依序判讀 DNA 分子上核苷酸的序列；比較如此四組鹼基序列電泳，即可組合成整段 DNA。

2. Sanger酵素合成法：

以樣品 DNA 作為模板，使用 DNA polymerase在試管中合成 DNA。分成四個反應，每個反應各缺單一種去氧核苷酸 (dNTPs)，而以其類似物雙去氧核苷酸 (ddNTPs) 代替。在合成新股DNA時，dNTPs 會用其5' 碳端加到核酸引子 (Primer) 的3' -OH 上，形成磷酸酯鍵，利用此方式將dNTPs一個個的加上去而合成新的一股。雙去氧核苷酸 (ddNTPs) 在

合成新股DNA時也和dNTP作用方式一樣，ddNTPs會用其5' 碳端加到核酸引子的3' -OH上，形成磷酸鍵，但因ddNTPs缺少3' -OH，無法與下一個進來的核苷酸形成鏈結，所以，加入一個ddNTP後，DNA就無法加長了，因此，此法又稱為鏈終止法（Chain Termination）。利用此原理，部分合成反應會停在該類似物的核苷酸處，造成各種長短不一的DNA片段，以電泳分離，即可組合判讀DNA序列。

早期這兩種方法都是以P32標示核酸分子，最後再用X光偵測呈現。後來Sanger的方法不斷地被改良，目前都是用螢光染料取代放射線物質，而且反應過程也都有自動化儀器可以使用，輸出量也增為每次2小時可以讀取384個檢體，而且偵測長度也大幅提升到1000-bp。

參、研究方法與步驟

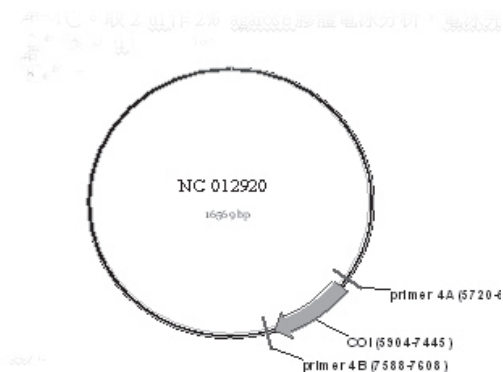
一、研究步驟

(一)DNA之抽取

用含有EDTA之採血管收集5 ml血液。使用離心機以1600g 轉速離心10分鐘，取buffy coat部分滴在Whatman FTA Elute卡上，徹底乾燥。用打洞方式取3 mm圓片孔，放入微量離心管中，用500 ul的無菌去離子水沖洗，洗3~5秒，將水去除，加入50 ul的無菌去離子水，加熱95°C 30分鐘，DNA即溶於其中，用分光光度計測OD值。

(二)PCR

PCR每個反應管中加入100~200 ng的DNA (100~200 ng)，200 μmol/L dNTP(含10mM dATP, 10 mM dCTP, 10mM TTP, 10mM dGTP, 1.5 mmol/L MgCl₂, 5 ul的10x PE reaction buffer (500 mmol/L KCl, 150 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0)，100 pmol正反方向引子4A及4B，(PCR長度為1889 bp) (圖二)(Tzen, Tsai et al. 2001)，1 U AmpTaq Gold Enzyme (ABI, Foster City, California)，加入ddH₂O至反應體積為50 ul。放入DNA thermal cycler (GeneAmp PCR System 9700; ABI, Foster City, California)，設定最初denaturation: 95°C，10分鐘，其後設定35個循環反應過程如下:denaturation: 94°C，1分鐘，annealing of primer: 60°C，1分鐘，primer extension: 72°C，1.5分鐘，循環反應後以72°C反應10分鐘，存放在4°C。取2 ul作2% agarose膠體電泳分析，電泳完後用ethidium bromide染色，並在UV下觀察結果。



圖二、引子和COI的相對位置。

圖一 引子和COI的相對位置。

(三)DNA定序

以全自動核酸螢光定序儀分析PCR產物，其反應步驟。

Cycle Sequencing：

撷取適量（3~10ng，不能超過10ng）純化過的PCR產物，加上緩衝溶液、酵素、核苷酸（dNTPs、ddNTPs-使用BigDye螢光標示）、單一方向的引子，放入Thermal Cycler中反覆進行下列步驟。

1. Denature：

利用高溫（94~96°C）將雙股DNA分離成單股DNA。

2. Annealing：

將溫度降低到50°C，引子會連結到特定的位置，此步驟只使用單一方向的引子。（註：PCR是使用雙方向的引子）

3. Extension：

雖然一般的DNA聚合酶的最佳作用溫度為72°C，但是因為ddNTPs化學結構與原本的dNTPs不同，所以將溫度降低到60°C、作用時間延長，讓ddNTPs、dNTPs有足夠的時間可以依據模版DNA密碼逐一地加到DNA上，一但加上ddNTPs，因其缺少3' -OH官能基而無法再繼續進行DNA合成，反應隨即中止，DNA就不再加長。

上列三步驟反覆進行約25次，約2.5小時可完成。

將PCR產物純化後加入墨水中調成最後濃度每ul墨水中含200 ng PCR product，將含有DNA及不含DNA之墨水分別在兩張紙上用滴管滴入20 ul墨水，等乾燥後以剪刀剪下再將DNA抽取出來，再進行一次PCR及DNA定序反應，將兩次定序結果做比較。

(四)序列分析

使用Vector NTI Suite 10 軟體。

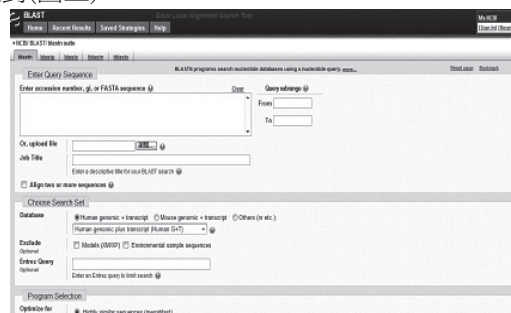
(五)DNA墨水配置

將100 ul PCR產物純化後加入原先從血液中抽取之100 ul DNA(濃度為500ng/ul)並與墨水混合，調成最後濃度每ul墨水中含200 ng/ul DNA。

將含有DNA及不含DNA之墨水分別在兩張紙上用滴管滴入20 ul墨水，等乾燥後以剪刀剪下再將DNA抽取出來，再進行一次PCR及DNA定序反應，將兩次定序結果用Vector NTI Suite 10 軟體做比較。

(六)序列分析比對

將序列放在NCBI基因庫<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>作比對(圖三)。



圖三：將定序之結果貼於方框位置。

本研究所用之DNA與參考序列NC_001807.4只有2個位置的差異。

ref|NC_001807.4| Homo sapiens mitochondrion, complete genome
Length=16571

Score = 2843 bits (1539), Expect = 0.0
Identities = 1541/1542 (99%), Gaps = 0/1542 (0%)
Strand=Plus/Plus

```
Query 1 ATGTTCCGCGACCGTTGACTATTCTCTACAAACCAAGACATTGGAACACTATACCTA 60
Sbjct 5905 ATGTTCCGCGACCGTTGACTATTCTCTACAAACCAAGACATTGGAACACTATACCTA 5964

Query 61 TTATTCCGCGCATGAGCTGGAGTCTAGGCACAGCTCTAAGCCTCCTTATTGAGCCGAG 120
Sbjct 5965 TTATTCCGCGCATGAGCTGGAGTCTAGGCACAGCTCTAAGCCTCCTTATTGAGCCGAG 6024

Query 121 CTGGGCGAGCCAGGCAACCTTCTAGGTAACGACCATCTACAAGCTTATCGTCACAGCC 180
Sbjct 6025 CTGGGCGAGCCAGGCAACCTTCTAGGTAACGACCATCTACAAGCTTATCGTCACAGCC 6084

Query 181 CATGCAATTGTAATAATCTTCTCATAGTAATACCATCATATAATCGGAGGCTTGGCAAC 240
Sbjct 6145 TGACTAGTTCCCTTAATAATCGGTGCCCGGATATGGCGTTTCCCGCATAAACACATA 6204

Query 241 TGACTAGTTCCCTTAATAATCGGTGCCCGGATATGGCGTTTCCCGCATAAACACATA 300
Sbjct 6145 TGACTAGTTCCCTTAATAATCGGTGCCCGGATATGGCGTTTCCCGCATAAACACATA 6204

Query 301 AGCTTCTGACTCTTACCTCCCTCTCTCTACTCTGCTCGCATCTGCTATAGTGGAGGCC 360
Sbjct 6205 AGCTTCTGACTCTTACCTCCCTCTCTCTACTCTGCTCGCATCTGCTATAGTGGAGGCC 6264

Query 361 GGAGCAGGAACAGGTTGAACAGTCTACCCCTCCCTAGCAGGGAACCTCCCAACCTGGA 420
Sbjct 6265 GGAGCAGGAACAGGTTGAACAGTCTACCCCTCCCTAGCAGGGAACCTCCCAACCTGGA 6324

Query 421 GCCTCCGTAGACCTAACCTCTTCTCTACACCTAGCAGGTGTCTCTCTATCTTAGGG 480
Sbjct 6325 GCCTCCGTAGACCTAACCTCTTCTCTACACCTAGCAGGTGTCTCTCTATCTTAGGG 6384

Query 481 GCCATCAATTTTCATCACAACAATATCAATATAAAACCCCTGCCATAACCCAAATACCA 540
Sbjct 6385 GCCATCAATTTTCATCACAACAATATCAATATAAAACCCCTGCCATAACCCAAATACCA 6444

Query 541 ACGCCCTCTTCTGCTGATCGCTCTAATCAGCAGTCTCTACTCTCTATCTCTCCCA 600
Sbjct 6445 ACGCCCTCTTCTGCTGATCGCTCTAATCAGCAGTCTCTACTCTCTATCTCTCCCA 6504

Query 601 GTCTAGTCTGCTGGCATCACTATACTACTAACAGACCGCAACCTCAACACCACTCTTCT 660
Sbjct 6505 GTCTAGTCTGCTGGCATCACTATACTACTAACAGACCGCAACCTCAACACCACTCTTCT 6564

Query 661 GACCCCGCGGAGGAGGAGACCCCATCTATACCAACACCTATTCTGATTTTTCGGTCAC 720
Sbjct 6565 GACCCCGCGGAGGAGGAGACCCCATCTATACCAACACCTATTCTGATTTTTCGGTCAC 6624

Query 721 CCTGAAGTTTATATTCTTATCTACCAGGCTTCGGAATAATCTCCCATATTGTAACCTAC 780
Sbjct 6625 CCTGAAGTTTATATTCTTATCTACCAGGCTTCGGAATAATCTCCCATATTGTAACCTAC 6684

Query 781 TACTCCGGAAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG 840
Sbjct 6685 TACTCCGGAAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG 6744

Query 841 GGCTTCTAGGTTTATCTGCTGAGCAGCACCATATATTTACAGTAGGAATAGAGCTAGAC 900
Sbjct 6745 GGCTTCTAGGTTTATCTGCTGAGCAGCACCATATATTTACAGTAGGAATAGAGCTAGAC 6804

Query 901 ACACGAGCATATTTACCTCCGCTACCATATATCATCGCTATCCCCACCGCGTCAAGTA 960
Sbjct 6805 ACACGAGCATATTTACCTCCGCTACCATATATCATCGCTATCCCCACCGCGTCAAGTA 6864

Query 961 TTTAGTCTGACTCGCCACACTCCAGGAAGCAATATGAAATGATCTGCTGAGCTGCTGTA 1020
Sbjct 6865 TTTAGTCTGACTCGCCACACTCCAGGAAGCAATATGAAATGATCTGCTGAGCTGCTGTA 6924

Query 1021 GCCCTAGGATTATCTTCTTTTACCGTAGGTGGCTGACTGGCATTGTATTAGCAAC 1080
Sbjct 6925 GCCCTAGGATTATCTTCTTTTACCGTAGGTGGCTGACTGGCATTGTATTAGCAAC 6984

Query 1081 TCATCACTAGACATCGTACTACAGCAGCTACTACGTTGTAGCCCACTTCCACTATGTC 1140
```

```
Sbjct 6985 TCATCACTAGACATCGTACTACAGCAGCTACTACGTTGTAGCTCACTTCCACTATGTC 7044

Query 1141 CTATCAATAGGAGCTGATTTTGGCATCATAGGAGGCTTCACTCACTGATTTCCCTATTTC 1200
Sbjct 7045 CTATCAATAGGAGCTGATTTTGGCATCATAGGAGGCTTCACTCACTGATTTCCCTATTTC 7104

Query 1201 TCAGGCTACACCCCTAGACCAAACTACGCCAAAATCCATTTCATATCATATTTCATCGGC 1260
Sbjct 7105 TCAGGCTACACCCCTAGACCAAACTACGCCAAAATCCATTTCATATCATATTTCATCGGC 7164

Query 1261 GTAAATCTAACTTTCTTCCCAACAACCTTTCTGGGCTATCGGAATGCCCGACGTTAC 1320
Sbjct 7165 GTAAATCTAACTTTCTTCCCAACAACCTTTCTGGGCTATCGGAATGCCCGACGTTAC 7224

Query 1321 TCGGACTACCCGATGCATACACCATGAAACATCCTATCATCTGTAGGCTCACTTCACT 1380
Sbjct 7225 TCGGACTACCCGATGCATACACCATGAAACATCCTATCATCTGTAGGCTCACTTCACT 7284

Query 1381 TCTCTAACAGCAGTAATATTAATAATTTTCATGATTGAGAAGCCTTCGCTTGAAGCGA 1440
Sbjct 7285 TCTCTAACAGCAGTAATATTAATAATTTTCATGATTGAGAAGCCTTCGCTTGAAGCGA 7344

Query 1441 AAAGTCTTAATAGTAGAAGAACCCCTCCATAAACCTGGAGTGAATATGATGAGGAGGAGGAG 1500
Sbjct 7345 AAAGTCTTAATAGTAGAAGAACCCCTCCATAAACCTGGAGTGAATATGATGAGGAGGAGGAG 7404

Query 1501 CCCTACCACACATTGCGAAGAACCCGTATACATAAAATCTAGA 1542
Sbjct 7405 CCCTACCACACATTGCGAAGAACCCGTATACATAAAATCTAGA 7446
```

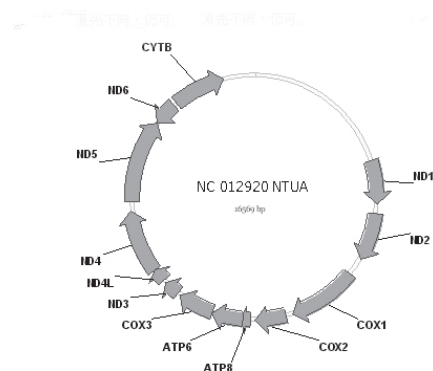
伍、結論與建議

一、結論

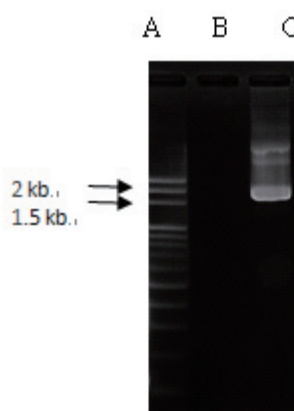
DNA是水溶性，含DNA的墨水PCR反應為陽性，不含DNA的墨水則PCR反應為陰性（圖五）。

人類粒線體COI位於5904~7445之間，共1542 bp長。本研究所用之DNA與參考序列NC_001807.4相比對僅有2個位置的差異。

先前有人將自己的細胞中所抽取之DNA置入印泥中作為防偽印鑑用，但可以全基因擴增放大技術破解此防偽作用，其原理雖然不是將放入的DNA序列解密，卻是將原物品上的DNA用全基因擴增放大技術大量複製，若以PCR、DNA定序進行鑑定，其結果是無法辨識其真偽，但以即時定量PCR檢測相同檢體中不同基因含量，以不同基因間的相對比率作為依據，全基因擴增放大技術所產生的不同基因間的相對比率會與原先不同，仍可推斷其產品被仿冒。



圖四 人類粒線體COI位於5904~7445之間，共1542bp長



圖五 A為100 bp marker，B是不含DNA的墨水，
C是含DNA的墨水。

[illegible]

圖六：比對的結果均為人類的粒線體DNA。

二、建議

如何避免高單價的藝術作品被仿冒是需要有鑑賞力的專家才能辨識，所以將藝術家本身的DNA抽取後混入印泥中當成是個人化印泥，因為不會影響到作品本身，甚至還能增添作品的特異性，在大陸已有藝術家用在創作中以利將來分辨作品的真偽(藝術新聞2007)。但以全基因擴增大技術破解此防偽作用，其原理雖然不是將放入的DNA序列解密，卻是將原物品上的DNA用全基因擴增大技術大量複製，若以PCR、DNA定序進行鑑定，其結果是無法辨識其真偽。

DNA防偽墨水是否因此有防偽漏洞呢？若能以即時定量PCR檢測相同檢體中不同基因含量，以不同基因間的相對比率作依據，全基因擴增放大技術所產生的不同基因間的相對比率會與原先不同，仍可推斷其產品被仿冒。在本實驗設計中因加入僅有1.8 kb之短片段PCR產物可以避免全基因擴增放大技術的作用，並且因primer 5' 端因接有M13之非人類DNA序列，可作為另一種辨識效果。

參考文獻

1. Tzen, C. Y., J. D. Tsai, et al. (2001). "Tubulointerstitial nephritis associated with a novel mitochondrial point mutation." *Kidney Int* 59(3): 846-854。
2. 呂文忠 (2006)。"DNA 證據在刑事案件運用之實證研究 -以台北、士林、板橋地方法院訴訟轄區為例"。
3. 威達康防偽科技 "DNA防偽技術說明." 威達康防偽科技. <http://www.dnawinner.com>。
4. 洪時凱(2005)。"淺談DNA防偽印刷技術." 中華印刷科技學會會訊 74期: 第11-13頁。
5. 陳俊顯(2001)。"以奈米微粒篩檢特定鹼基序列之DNA." 研究新領域報導: 第55-57頁。
6. 黃昌宏(2003)。"何謂DNA防偽技術." 印刷新訊第52期 第52期: 第18-19頁。
7. 楊鎮環(2007)。"利用粒線體基因以PCR-RFLP方法鑑定頭足類動物及其加工品物種之應用"。
8. 謝美君(2008)。"DNA 油墨電腦配色防偽研究." 中華印刷科技年報: 397-401。
9. 藍旻暉、曾吉村、林政億、李元民(2007)。"簡介DNA生物條碼." 醫檢論壇: 第55-58頁