

微陣列生物晶片簡介及其應用

近年來生物晶片的熱潮席捲台灣，不僅一般報章雜誌廣為報導，多家與之有關的公司也相繼成立。但到底什麼是生物晶片，一般大眾可能只有朦朧的概念甚至錯誤的認知。本文僅就生物晶片中發展較成熟、使用較普遍的微陣列生物晶片為對象，就其原理、種類、設計、製造以及相關應用作一全面性的介紹。

周正中、白果能

一、前言

近 10 年來生物科技突飛猛進，其中最具革命性影響的關鍵技術當屬生物晶片。它的出現徹底地改寫了生命科學的遊戲規則，將傳統曠日費時的基因功能檢測與各種生物化學分析，從以往一次一個(或數個)瞬間提昇至成千上萬個；同時將過去體積龐大的儀器設備一下微縮至晶片般的大小。如此一來，不僅節省了無數試劑樣品的用量、大幅地增加了一次檢驗的數量，同時也巨幅降低檢測的時間和費用。目前它的應用遍及醫學、製藥、食品、農業和環保各個領域，可說是 20 世紀末期最重要的分子生物技術發明之一。

二、生物晶片的原理與分類

一般來說 生物晶片還沒有一致的定義與分類，但依其使用功能的不同，可以廣義地區分為二

周正中先生為美國馬里蘭大學化工博士，現任中央研究院生物醫學科學研究所博士後研究員。
白果能先生為美國密西根大學化學博士，現任中央研究院生物醫學科學研究所副研究員。

大類：(1) 微陣列生物晶片 (microarray)，主要目的是作為樣品檢測 (sample detection) 之用；(2) 微流體晶片 (microfluidic chip) 或微型實驗室晶片 (lab-on-a-chip)，主要功能則是處理 (processing) 樣品。其中微陣列晶片是目前發展較成熟、使用較普遍，廣為普羅大眾所熟知的。例如，一般報章雜誌所報導的基因晶片、腸病毒晶片和發燒晶片等就是屬於這一技術。目前這類的生物晶片主要應用在疾病的診斷上。至於第二類型的晶片還在研究發展階段，目前僅有少數公司有商業產品推出。主要是利用微機電技術 (micro-electro-mechanical-system, MEMS) 將一般生化實驗室中所使用到的分離、純化、混合以及各種酵素反應等裝置微型化到晶片上。此篇文章將以微陣列生物晶片的介紹為主。

微陣列生物晶片 (以下簡稱為微陣列晶片) 與我們一般所熟知的半導體晶片大不相同，它缺少整合性的電子電路和元件，但他們彼此的作用原理卻大同小異。其實，微陣列晶片只是將成千上萬個不同性質的微型生物感測器 (biosensor)，如陣列 (array) 般地佈放在一片微型的載體上，如玻璃、尼龍薄膜、矽晶片或塑膠等材質，然後藉著生物感測器上的生物探針 (probe) 與樣品 (sample) 中的特定

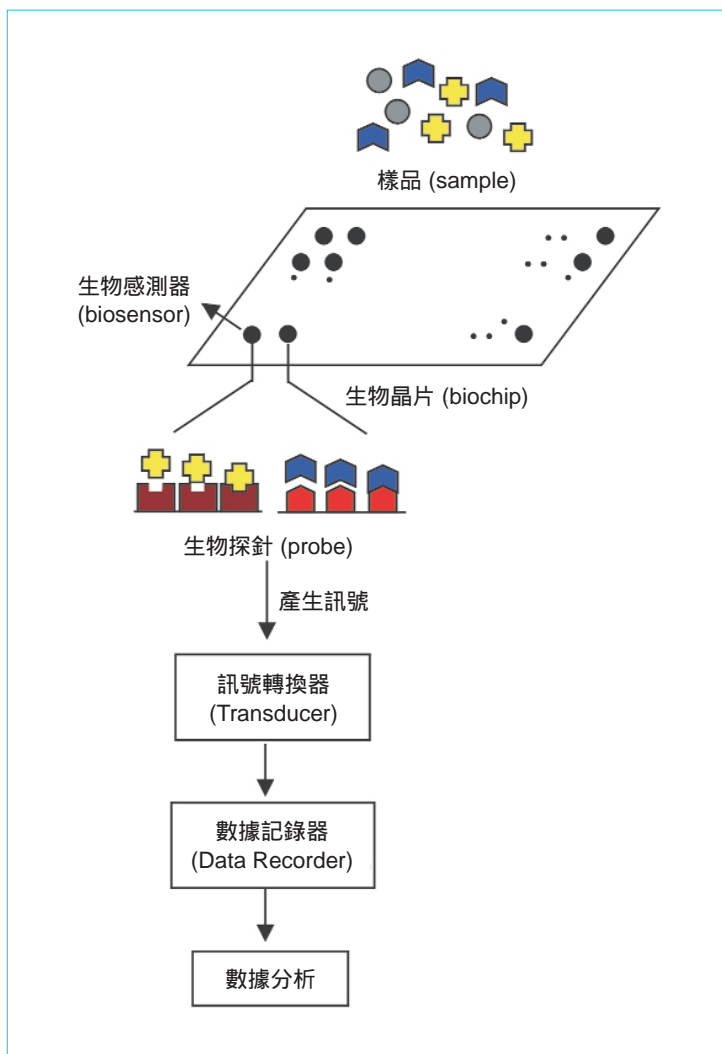


圖 1. 微陣列生物晶片的作用原理。

對象進行高選擇性的生化反應，並由訊號轉換器 (transducer) 將反應所產生的訊號轉換成可運算的資料型態，以進行後續的數據分析。由於上述的生化反應具有高度的專一性，因此一旦偵測到反應的發生，即可視為該特定對象存在於樣品中；而該反應所產生的訊號大小，正比於該特定物質存在於樣品中的濃度。整個原理流程如圖 1 所示。

微陣列晶片依其生物探針 (probe) 的不同，可以約略區分為 DNA (DNA chip) 以及蛋白質晶片 (protein chip) 二大類。

1. DNA 晶片

DNA 是去氧核糖核酸的英文縮寫，是每個生

命體中負責遺傳的基本物質。它是由四種不同的核苷酸分子 (nucleotide) 所組成 (一般以 A、T、C 及 G 代表)。在細胞中，DNA 是由二條單股的 DNA 以一定的配對型式所組成之雙螺旋的三度空間結構 (double helix)，如圖 2 所示。由於各個核苷酸有不同的化學官能基，因此在雙螺旋的 DNA 中，A 一定與 T，C 則與 G 互補配對，生物就是靠著 DNA 中不同核苷酸分子的序列，將遺傳訊息一代一代地傳遞下去。而所謂基因 (gene) 其實是指一段帶有特定遺傳訊息的 DNA 片段，此片段可經由細胞中聚合的作用產生蛋白質與各種酵素，來調控生物體中某個特定的生命功能。早期推測人類的基因數目約為十萬個，但根據去年所公佈的人類基因體序列初稿 (human genome working draft, 約已解出 90% 的人類基因體序列)，經由生物資訊 (bioinformatics) 的解析，目前的人類基因數目只有三至四萬個^(1,2)。

DNA 晶片就是將許多不同的單股 DNA 序列 (端視不同的應用，可以是任意 ATCG 的排列組合或者是基因中的部分片段) 當作生物探針 (probe) 固定在固體表面上，去檢測未知物中是否具有與之互補的 DNA 序列。由於 DNA 具有特殊的 A:T 和 C:G 配對特性，若樣品中恰巧有某個 DNA 之部分或全部序列與晶片上任一 DNA 序列互補，將會產生非常穩定的化學鍵結反應，稱之為雜合反應 (hybridization)。然後再將未產生雜合反應的 DNA 洗去，最後只剩下與生物探針產生雜合反應的 DNA 殘留在晶片上。若樣品事前先以放射性元素、螢光或顏色染料標記 (labeling)，利用適當的偵測儀器 (亦即圖 1 中的 transducer)，即可檢視那些位址有標記訊號。由於每個位址的 DNA 序列是已知的，所以可以推測樣品中含有那些 DNA 序列。一般說來，絕大部分固定在晶片上的 DNA 是基因的部分片段，用來檢測生物體內各個基因的表現，這類晶片俗稱為基因晶片。基因晶片的用途很廣，例如在醫療診斷上，可以用來判定患者被何種病原感染，患者的癌症屬於那種亞型，患者的特定基因是否產生突變等；在製藥工業上，可以快速且大量篩檢出那些藥物會影響特定基因組的功能，大大地降低新藥開發的時間。有關 DNA 晶片的應

用，將於後面章節再作較為詳盡的介紹。DNA 晶片上的 DNA 片段依其製造來源可以區分為 cDNA (complementary DNA，亦即互補或單股 DNA) 晶片和寡核苷酸 (oligonucleotide) 晶片。

(1) cDNA 晶片

cDNA 晶片⁽³⁾上的基因片段是將生物體內的基因片段轉殖 (clone) 到大腸桿菌 (*E. coli*) 中，利用大腸桿菌快速分裂成長的特性短時間大量複製這些基因後，將其冷凍至 -80°C 冰箱以長期保存。一旦需要，可從冰箱取出少許解凍，最後利用所謂生物體外 DNA 複製法 PCR (polymerase chain reaction 的縮寫，聚合連鎖反應) 再一次將這些微量的基因增加到足夠的數量後，就可固定在載體上使用。這種基因製備法的好處在於不需要事前知道各基因的 DNA 序列，最困難之處就是如何取得內含許多不同基因的大腸桿菌菌庫 (library)。所幸目前已有一些國外廠商如 Research Genetics 和 Incyte Genomics 等提供各種生物體的基因庫，但價格並不便宜。上述方法所產生基因片段的長度一般平均在 500 - 2000 bp (bp 是 base pair 的縮寫，代表一個 DNA 的長度單位) 左右，由於 DNA 探針的長度夠長，雜合反應後所產生訊號也夠強，便於偵測。然而，太長的 DNA 探針往往時常造成所謂非專一性雜合反應的發生 (cross-hybridization)。因為凡是兩股非完全互補的 DNA 單鏈，只要彼此之間的序列有 70% 以上的相似性，就會形成局部雜合反應而產生假性 (false positive) 訊號。基因片段的長度愈長，非專一性雜合反應的發生就愈頻繁。此外，大腸桿菌在經過多次繁殖複製後，極易遭受其他菌種感染而變質。因此之故，使得另一基因製備替代的方法 - 寡核苷酸晶片便應運而生。

(2) 寡核苷酸晶片

寡核苷酸晶片是指它的 DNA 探針是以化學合成方式 (非生物方法複製) 製造出的短鏈 DNA，一般它的長度多在 30-mer (或鹼基) 以下。由於是化學合成之故，DNA 序列必須事前知悉，幸好目前已有超過 50 個物種的基因體已完成或即將完成定序 (包含人類)。短鏈的基因探針序列設計必須借助

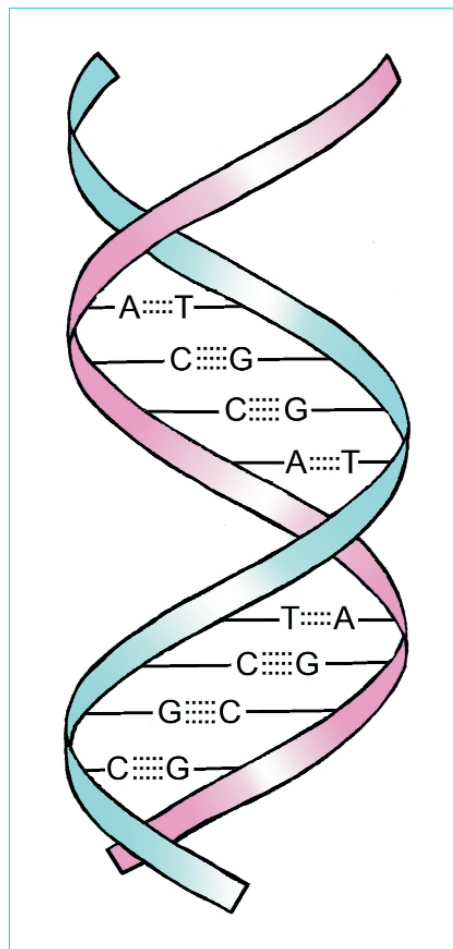


圖 2. DNA 的雙螺旋結構及其 A : T 和 C : G 配對特性。

生物資訊學的方法去尋找每個基因中最獨特 (unique) 的 DNA 序列。這個序列就如同指紋一般，可以區別每個基因間的不同，避免非專一性雜合反應的發生。此外，基因探針的長度也須詳加考慮，探針太長不但不易合成、價格昂貴，而且不容易找出高度專一性的 DNA 序列；太短的探針不僅不具代表性與專一性，且雜合反應效率不佳，容易造成雜交訊號太弱無法偵測。

早期在全球執牛耳的美國基因晶片製造公司 Affymetrix 使用 DNA 長度 25-mer 為探針，但目前多數歐美公司皆認為這個長度太短，因而競相開發較長的寡核苷酸探針，一般皆介於 50 - 80 mer 之間⁽⁴⁾，如表 1 所示。目前本實驗室正在發展一種長度介於 cDNA 與寡核苷酸之間的人類 15,000 個已

知功能的基因 DNA 探針，長度約為 150 mer 左右。這個長度的 DNA 探針是以 PCR 來複製每個基因的特有 DNA 序列，以避開探針太長、合成價格昂貴的缺點；同時由實驗也證實這個長度的 DNA 探針具有與 cDNA 探針相同的雜合反應效率，可以說避開了上述兩種晶片的缺點，但保留下他們的優點。

2. 蛋白質晶片

顧名思義，蛋白質晶片就是以蛋白質為生物探針，將其固定在固態載體上，去檢測樣品中是否存在會與蛋白質產生特定生化反應的物質。蛋白質是由 20 種氨基酸所組成，它是基因表現的最終產物，整個製造過程如圖 3 所示。首先雙股 DNA 中的其中一股被用來當作模板 (template)，經由轉錄

表 1. 國外生技公司寡核苷酸晶片 DNA 探針長度一覽表。

探針長度	公司名稱	網址
25-mer	Affymetrix Inc.	www.affymetrix.com
50-mer	MWG BiotechAG	www.mwgdna.com
60-mer	Agilent Technologies Inc	www.agilent.com
70-mer	QIAGEN Operon	www.operon.com
80-mer	Clontech Laboratories	www.clontech.com

作用 (transcription) 複製出與模板完全互補的單股核苷酸序列，稱為信使 RNA (messenger RNA, mRNA)。然後 mRNA 上每三個核苷酸會依序被轉譯 (translation) 成一個氨基酸，最後形成長條線性

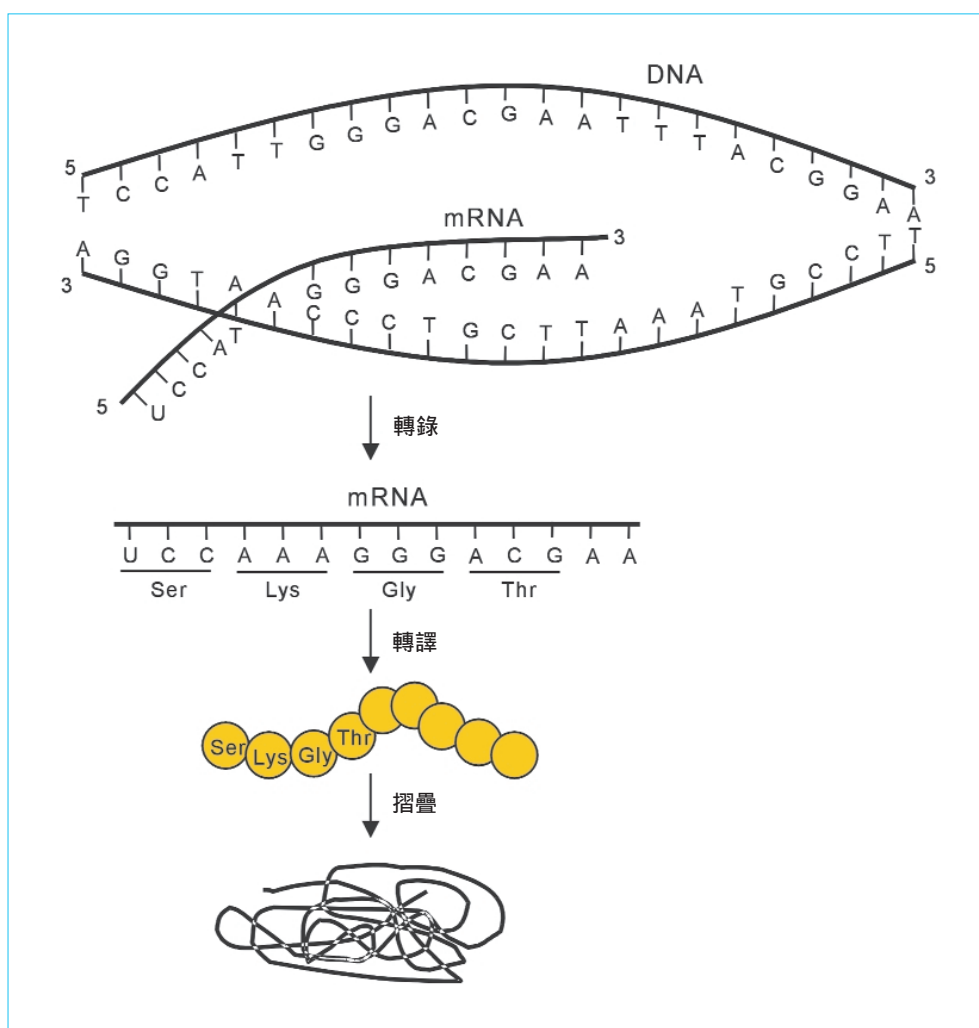


圖 3. DNA 經轉錄和轉譯作用製成活性蛋白質的示意圖。

的氨基酸序列，再經由各種氨基酸的化學鍵結作用，纏繞摺疊成複雜的三度空間結構。就是這三度空間結構賦予蛋白質執行特定的生理功能。

氨基酸不像 DNA 中的核苷酸具有彼此配對的特性，所以蛋白質的活性無法以簡單的雜合反應來檢測。事實上，蛋白質是以它本身三度空間結構所形成的活性位置 (active site) 與其他蛋白質或化學物產生特定結合。然而，維持這正確的三度空間構形 (conformation) 需要適當的溫度、鹽濃度和 pH 值；在晶片的製造過程中要全程保持在這嚴苛的條件下實非易事，因此蛋白質晶片的製作要比 DNA 晶片來得複雜且困難。不過，在蛋白質晶片中最常用來當做探針使用的抗體 (antibody)，可以在一定程度上克服上述的問題。抗體是高等動物免疫系統中一個重要的守護神，能夠與外來的物質 - 即所謂的抗原 (antigen) 產生非常緊密且專一的結合，進而消滅這些入侵者，使動物免於受外來病菌的侵襲。抗體之所以具有如此高的特定結合性，完全拜它的結構所賜。

不同的蛋白質有完全不同的三度空間結構，但是每一種抗體的基本結構都是相同的，如圖 4 所示，彼此之間唯一不同之處在於與抗原結合的輕鏈 (light chain)。抗體的輕鏈就像鎖匙中的鎖孔，抗原就像鑰匙，不同的抗體只能與其互補的抗原相結合。抗體的這種結構使得它能與成千上萬種不同抗原結合，再加上架構分子十分穩定，較能在惡劣的環境下依然保有活性，所以目前市面上販售的檢驗試劑如驗孕試劑等，絕大部分都使用抗體作為生物探針。然而，蛋白質 (包括抗體) 不像 DNA 可以使用 PCR 的技術在生物體外進行大量複製，因此無法將微量的蛋白質快速放大至可檢測的範圍，只能使用傳統曠日費時的生物轉殖法生產。對於目前一片生物晶片上動輒需要成千上萬的探針，想要製成高密度的蛋白質或抗體晶片，在短期之內是有其困難的。蛋白質晶片在應用上比 DNA 晶片更具實用價值，因為蛋白質是基因表現的最終產物，生物體內的生理及代謝功能都由其執行。由蛋白質晶片所得到的資訊能比 DNA 晶片更直接且忠實地呈現出生命體內的變化。蛋白質晶片可應用在研究蛋白質的功能、疾病的診斷和藥物的篩選等。蛋白質晶片

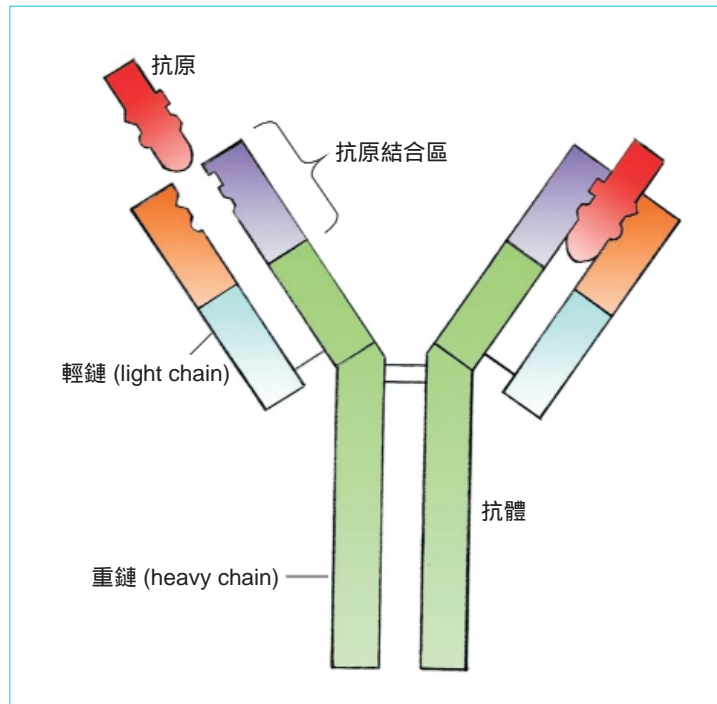


圖 4. 抗體結構圖以及抗體與抗原結合示意圖。

的另一項特別功用就是用來篩選與其高度專一結合的抗體。

在未來，蛋白質晶片的應用價值勢必凌駕於 DNA 之上。然而受限於蛋白質的合成產量和製作技術上的瓶頸，蛋白質晶片的研究腳步，一直是步履蹣跚，它的商業化進程，短期內是無法一蹴可及的。反觀 DNA 晶片，已經是一個成熟的技術，在不久的將來，很可能成為研究的標準工具以及人們日常生活的必備品，因此在以下的章節中，將只針對 DNA 晶片為介紹對象。

三、DNA 晶片的製備與檢測

1. 製備

一旦決定 DNA 晶片的種類並已取得所需的生物探針 (不管是向外購買或自行合成)，下一步就是如何將它們固定在晶片的基材上。目前固定化的方法可以分成 (1) 直接合成在載體上，稱為原位合成法 (in-situ synthesis)，(2) 將事先合成的探針佈放在載體上，稱為佈放法 (spotting)。原位合成法只能適用於 DNA 晶片的製造，最有名的當屬模仿半導

體製程的光罩法 (photolithography)⁽⁵⁾ 和模仿噴墨印表機的噴墨法 (ink-jet synthesis)⁽⁶⁾。這種方法適合生產高密度的 DNA 晶片 (總點數可達數十萬點), 但價格昂貴且受限於合成的效率, 只能原位合成 50-mer 以下的短鏈 DNA 是其缺點。佈放法則是使用機械手臂將事先合成好的生物探針 (包括 DNA 和蛋白質) 點印在晶片的基材上, 技術層次與價格較低, 適合學術單位使用。不同佈放法之間的差異只在於佈放的裝置不同, 從實心針 (solid pin)、鋼筆針 (quill pin) 到噴墨噴頭 (ink-jet head) 都有。上述兩種固定化方法的詳細介紹請參照本刊九十年四月第二十二卷第五期第 8 - 19 頁⁽⁷⁾, 於此不再贅述。

2. 檢測

DNA 晶片製作完成後, 接下來就是與樣品進行反應。反應之前, 樣品必須先行標記, 以利日後訊號的偵測。通常 DNA 晶片載體所使用的基材, 往往決定了標記方法的使用。例如, 傳統上使用的尼龍薄膜會在激發光的照射下產生反射光, 造成高偵測背景, 不適合螢光標記法。螢光標記法必須使用低反射背景光及低自發螢光的材質如玻璃。以下就目前常用的標示和檢測方法逐一介紹。

(1) 螢光檢測法 (Fluorescence Detection)⁽³⁾

最常應用在 DNA 晶片分析的標記分子是螢光染料, 不僅因為它具有相當好的訊號強度而且操作安全, 更重要的是, 每個螢光染料具有特定的激發 (excitation) 和放射 (emission) 波長, 使得我們能夠在一次的實驗中, 利用不同的濾鏡同時偵測到兩個以上不同螢光標記的樣品。這種特性對於 DNA 晶片的使用非常重要。例如, 在 DNA 晶片的製備過程中所產生晶片與晶片的差異, 時常嚴重影響到實驗結果的判讀。為了避免這個問題, 通常在每一次的實驗中, 除了加入螢光標記的待測樣品外 (test sample, 通常以 Cy5 螢光染料標記, 激發後放射出紅光), 另外還會再加入帶有不同螢光標記的參考樣品 (reference sample, 通常以 Cy3 螢光染料標記, 激發後放射出綠光) 作為內部訊號校正之用, 如圖 5 所示。一旦這兩種帶有不同螢光標記的樣品與晶片上的生物探針進行反應, 經過沖洗將未產生

反應的樣品去除, 再使用螢光偵測裝置, 如共焦雷射掃描器 (confocal laser scanner) 或者 CCD 照相機, 記錄下不同螢光標記的螢光強度後, 晶片上的每一個探針都可得到一組待測樣品與參考樣品的螢光強度比值 (ratio)。對於重覆相同的實驗而言, 由於生產時晶片與晶片的差異, 不同晶片上相同位址探針的待測樣品螢光強度也許差異很大, 但待測樣品與參考樣品的螢光強度比值應該是一致的。顯然地, 待測樣品的螢光強度經過參考樣品的校正後, 我們可以從 DNA 晶片得到更為正確的實驗數據。

(2) 放射性元素檢測法 (Isotope Detection)

除了使用螢光染料標示外, 亦可使用傳統放射性元素進行標示。雖然放射性元素在使用上具有安全上的顧慮, 但在目前已知的標示法中, 它所產生的訊號強度是最高的。但也因為訊號太強, 時有暈染現象發生, 導致對鄰近探針產生交互干擾。不過近年來經過一些公司的努力, 上述缺失已獲大幅改進, 使得放射性元素標示法再度受到重視。

(3) 酵素呈色法

另外一種標示法就是由本實驗室所開發出的 DNA 微陣列雙色酵素呈色法 (enzyme colorimetry)⁽⁸⁾。這個方法的基本原理如圖 5 所示。首先將待測樣品與參考樣品分別標記上生物素 (biotin) 和毛地黃素 (digoxigenine), 然後與 DNA 晶片進行雜合反應、沖洗後, 再同時加入會與前述兩標記物緊密結合的抗體 - 酵素複合物 (antibody-enzyme conjugate) streptavidin- β -galactosidase 和 anti-digoxigenine-AP (AP 是酵素 alkaline phosphatase 的簡稱)。其中 streptavidin 與 DNA 探針上的生物素 (biotin) 相結合後, 與 streptavidin 相連的 β -galactosidase 酵素會將稍後加入的呈色受質 (substrate) X-gal 反應催化成藍色沈澱物; 另一方面, 毛地黃素 (digoxigenine) 則與 anti-digoxigenine-AP 結合, 導致與之相連的 alkaline phosphatase 酵素將另一呈色受質 Fast Red 催化成紅色沈澱物。所以經過酵素呈色後, 晶片上所有產生雜合反應的探針顏色必定介於紅與藍之間。這些在尼龍薄膜上被轉化為顏色的訊號, 可以使用一般電腦用的掃描器 (scanner) 來讀取影像資

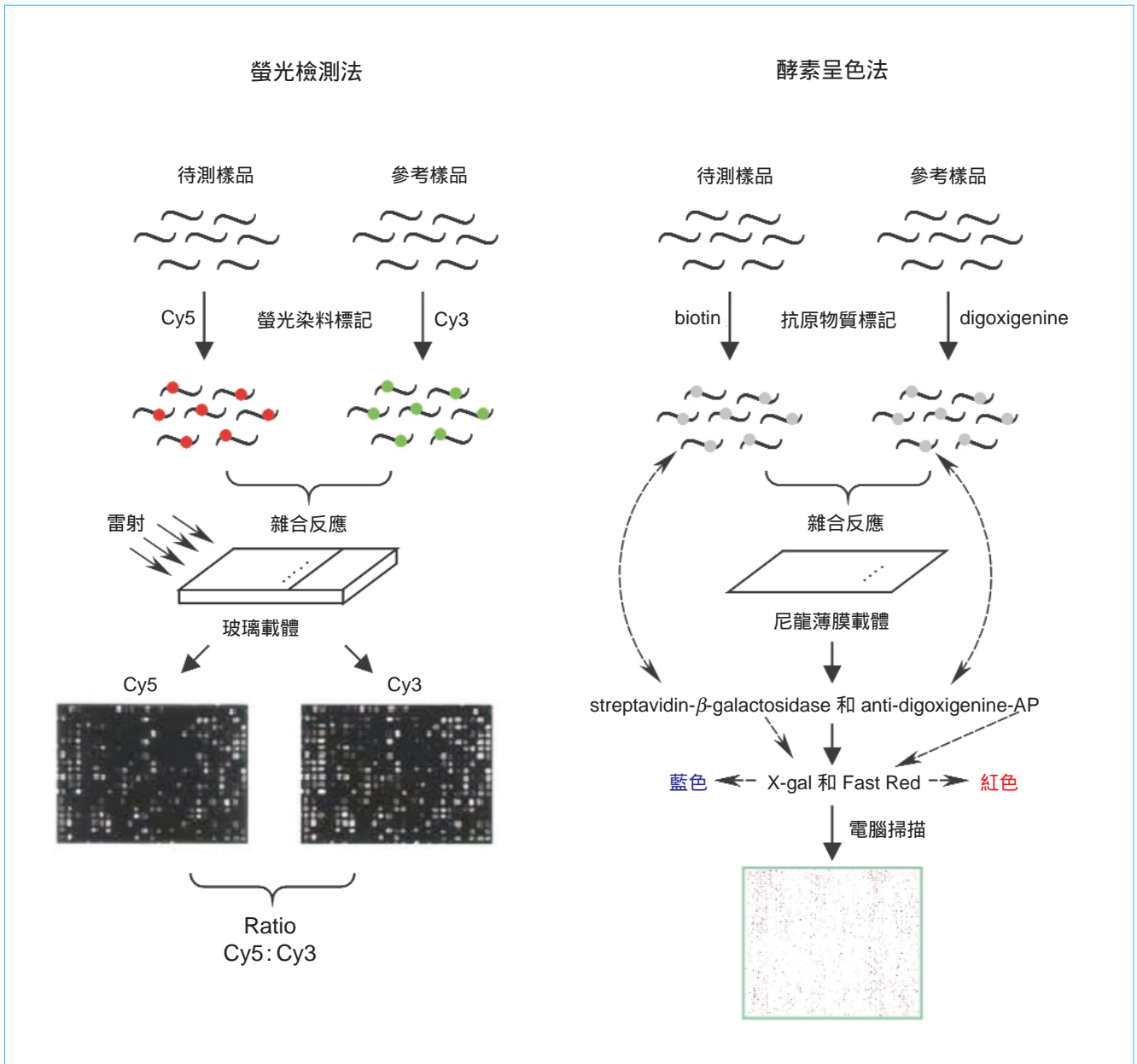


圖 5. DNA 晶片標示和檢測法示意圖。

料。越偏藍色的探針代表待測樣品 (test sample) 中該 DNA 所佔的濃度越高。圖 6 是一張 9600 點 DNA 微陣列經雙色酵素呈色法所得到的掃描影像。

四、DNA 晶片的應用

DNA 晶片的主要功能就是篩選 (screening) 和檢測 (detection)，因此它的應用也侷限在這二個領域。其中，DNA 晶片無疑是使用最普遍、市場最

龐大的一型晶片。而它最主要的應用是在於基因表現分析 (gene expression analysis) 和新藥的研發 (drug discovery)。

1. 基因表現分析

基因表現 (gene expression) 其實是基因被啟動或關閉的程度，可比擬為電子訊號的振幅大小。人類在某個生理狀態下，某些原本關閉的基因功能會被啟動，有的啟動程度大些，其基因表現就強些，



彩色掃描器

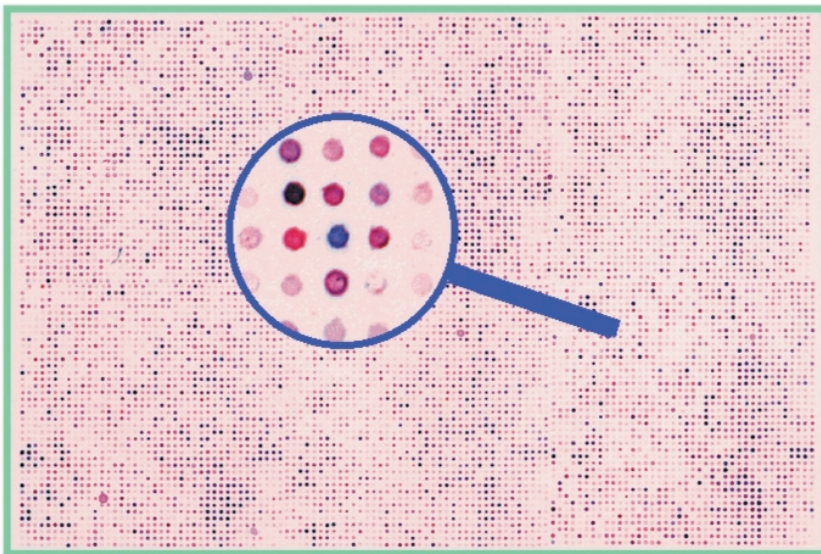


圖 6.
DNA 微陣列雙色酵素呈色法的掃描
影像。

反之亦然；相反地，另一些原本啟動的基因功能會被關閉，有的關閉程度大、有的關閉程度小些。那麼這些基因的關閉合有何重要性，為何要偵測分析他們呢？因為說穿了，人類的生命功能，舉凡生、老、病、死，其實都是由體內 3 至 4 萬個基因所調控。這些基因會彼此影響，形成一個類似電路的複雜調控網路 (regulatory network)。一旦某些基因產生變異，就如同電路中某些元件出現問題，因此導致某些生理功能失調而產生疾病。

從反推工程 (reverse engineering) 的觀點來看，要尋找那些基因造成疾病的產生，最簡單的方法就是比對健康和疾病時兩者基因表現的差異。相對於健康時的基因表現，那些在疾病時才被大大啟動或關閉的基因，就是與疾病相關的基因群了。以往使用傳統方法，一次只能偵測少數的基因表現，無法一窺全貌，對於尋找與疾病有關的基因沒有多大的

功效。現在由於 DNA 晶片可以一次監測成千上萬個基因，尋找與疾病相關的基因就變得輕而易舉。目前這種依比對正常與不正常檢體去找出問題基因的方法已被廣泛地使用在醫學和臨床的研究上。然而，找到與疾病相關的基因只是第一步，接下來更重要的是探索疾病產生的機制。也就是說，尋找這些問題基因在整個調控網路中扮演何種角色？這是一個十分艱鉅的任務，因為一組 DNA 晶片實驗所得到的數據極為龐大，如何處理、分析這些資料以釐清基因間複雜的互動關係，已經變成 DNA 晶片發展的最大瓶頸和最具挑戰性的課題。

事實上，DNA 晶片的資料分析已經自成一門學問，成為生物資訊學中極為重要的一個分支，吸引了如資訊、統計、數學、電機及物理等許多不同領域的專家學者競相投入研究。DNA 晶片與基因表現分析的關係就如同電腦中的硬體與軟體，當硬

體技術日趨成熟，軟體的價值就日趨重要，甚至凌駕硬體之上。在可預見的未來，誰能在基因表現分析上先馳得點，誰就掌握了 DNA 晶片市場的發言權。

2. 新藥的研發

當 DNA 晶片剛剛出現的時候，第一個熱情擁抱、同時也是最大顧客的就是製藥公司。因為當針對某一疾病發展新藥時，第一步就是找出可能的致病基因作為藥物標的。如前所述，DNA 晶片無疑是最好的篩選利器。不僅如此，一旦找到問題基因後，還可利用 DNA 晶片分析不同藥物對這些基因治療前和治療後的變化。事實上，已超過 90% 以上的美國製藥廠使用 DNA 晶片做為評估新藥的療效標準之一。

五、結語

DNA 晶片的出現，使得人類第一次有能力以全基因組 (genome) 的角度來看待生命現象，這無

疑是生命科學的一大突破。隨著技術的日趨成熟以及價格的持續下滑，DNA 晶片在不久的將來必會成為每個醫院和生化實驗室的標準儀器。如果微陣列晶片能夠與微流體和微機電技術加速整合，從樣品導入、分離、純化、放大到偵測皆能一氣呵成，DNA 晶片甚至可能就像體溫計一樣，成為每個家庭必備的家護用品。這不是科幻小說的情節，而是真正會有實現的一天。

參考文獻

1. The International Human Genome Sequencing Consortium, *Nature*, **409**, 860 (2001).
2. J. C. Venter, M. D. Adams, and E. W. Myers, *et al.*, *Science*, **291**, 1304 (2001).
3. M. Schena, D. Shalon, R. W. Davis, and P. O. Brown, *Science*, **270**, 467 (1995).
4. R. Timothy *et al.*, *Nature Biotech.*, **19**, 342 (2001).
5. G. McGall *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 13555 (1996).
6. A. P. Blanchard, R. J. Kaiser, and L. E. Hood, *Biosensors and Bioelectronics*, **11**, 687 (1996).
7. 鄭鄧言, 白果能, 科儀新知, **22** (5), 8 (2001).
8. J. J. Chen *et al.*, *Genomics*, **51**, 313 (1998).