



基因晶片之簡介及其應用：

二十一世紀基因分析的利器

◎ 陳健尉 (台大臨床醫學研究部助研究員)

◎ 楊泮池 (台大醫院內科主任)

今年6月27日，受全球矚目的人類染色體組研究計劃，在美國國家衛生研究院和賽雷拉 (Celera) 公司共同合作下，宣佈完成人類基因圖譜解碼草圖。整個解碼工作也預計於西元2003年甚至提前完成，此媲美60年代登月計劃的人類染色體組研究計劃，亦將結束其長達約十五年的漫長發展過程。屆時，人類四十六條染色體九成五以上將定序完畢，大部分的模式生物 (model organisms) 亦可望完成定序工作，令人期待的後染色體組世紀，即將來臨。

定序完成只是提供讓人一窺遺傳密碼全貌的機會，欲瞭解基因、應用基因，最重要的是了解其功能。人類估計約有十萬個可表現的功能基因 (functional genes) 控制著人類生長、發育、遺傳、行為及疾病等等生理現象及生化反應，其中約90%是不知道功能的，如果定序的結果是一本電話簿，那麼裡面有九成是只有電話號碼和住址而沒有姓名。因此，探索基因的功能及其間的交互作用，是為後染色體組世紀的最重要工作之一。

基因為一切生命現象的基礎，傳統篩選及分析基因的方法已不敷多基因參與的生化過程或基因網路所求。近年來，有三項主要的科技被發展來大規模篩選並監測基因的表現：一、基因微陣列 (cDNA microarray)；二、基因聯結序列分析法 (Serial Analysis of Gene Expression)；三、DNA 晶片 (chip)。除此三項整體技術較為成熟並已實際應用之外，蛋白質晶片也被發展來偵測多數基因的功能，唯尚未成熟以應用於基因功能分析上。

生物晶片以製程而言，可分為陣列方式及晶片方式兩種，如圖一。前者為將經聚合酶鏈鎖反應增殖之片段或合成之寡核苷酸，以精密儀器佈放至尼龍薄膜或玻璃載玻片上，即微陣列 (microarray)，製作流程如圖二；而後者是利用半導體製程及化學合成技術，直接在矽晶片上合成寡核苷酸，即 DNA 晶片 (DNA chip)。兩者均蘊含有於一小範圍的基因承載物上，可同時獲得大量的基因訊息之意函。另一種具微管路

的晶片，或稱為實驗室晶片 (lab-on-a-chip)，與上述所稱之晶片是不同的。

晶片偵測技術上，以薄膜為基因承載物者，可利用免疫酵素顯色分析，這是由中央研究院生醫所白果能博士及本文作者所自行開發微陣列系統及顯色方法，為目前國內使用率最高者。法國馬賽大學癌症免疫研究所 Jordan BR 則利用放射線同位素 (^{32}P) 顯像，惟基因間佈放相對位置需達 $500\mu\text{m}$ 以上且放射顯像時間較長。顯色分析及螢光偵測，可小於 $200\mu\text{m}$ ，適用於較高解析之晶片。以玻片及矽晶片為基因承載物，如史丹佛大學 P. Brown 及 Affymetrix 生技公司所發展之晶片，則僅能以螢光偵測。

各種偵測法靈敏度之比較如表一所示。其中，免疫酵素顯色法經訊號放大 (signal amplification) 或核醣核酸增殖反應 (RNA amplification) 後，其靈敏度將可提高200倍，甚可超越其他兩法。更重要的是，此法是最經濟方便的方法，任何實驗室均能在適當的技術指導下，設立此一方法，既能保證晶片的品質，也能兼顧科學方法一般普遍性的原則。

筆者在台大醫院所設立之基因晶片核心實驗室，主要製備的即為薄膜陣列式晶片，目前已進入量產階段，可提供人類及老鼠兩類型的晶片以為研究之用，偵測訊號方法則以免疫酵素顯色法為主。未來亦將生產玻片陣列式晶片，並配合螢光偵測法使用。

隨著大量基因資訊的獲得，生物資訊學遂逐漸形成重要的研究工具之一。目前以叢集分析 (cluster analysis) 使用最廣，如 Hierarchical clustering 及 Self-organizing Maps 等。在此提供文獻中分析方法的一般性原則，以為研究者參考。

一、縝密的實驗設計：如進行多個實驗樣本，以表現的趨勢來選擇差異表現的基因。

二、資料標準化 (standardization)：以基因表現的型態 (shape) 為分析標準，例如可令 $Z_{ij} = (X_{ij} - \bar{X}_i) / S_i$ 並使 $\bar{Z}_{i\cdot} = 0$, $S_i^2 = 1$ 。

三、相似係數之擇定 (resemblance coefficients)：



選擇計算係數公式，如 average Euclidean distance coefficient。

四、資料過濾之擇定 (filtering data)：除去不適當的資料，如除去表現值在臨界值 (threshold) 以下的基因。

五、叢集分析法之擇定 (clustering method)：如以 Hierarchical 叢集法，將基因之相似係數做叢集歸類。

基因晶片之所以能成為本世紀最受矚目的功能基因研究工具之一，乃其具有同時進行大量樣本之差異性分析等特性，進而衍生出許許多多應用。以下列舉數個目前及未來可能的應用方向以爲參考：

一、差異表現基因的篩選：例如應用於具不同癌轉移能力之細胞株以獲得癌轉移相關基因。

二、細胞週期基因表現的研究：剖繪細胞週期中不同時期基因之表現，並探索細胞從靜止期 (G0) 回到生長週期的關鍵基因。

三、基因突變之解析：例如利用寡核苷酸晶片快速定出基因突變的位置及序列。

四、藥物開發及藥理學研究：可準確的篩選及預測新藥的功能，並大幅縮短藥物開發的時程，或可瞭解藥物在分子層次上的作用機制。

五、驗證基因或部分序列之效能：如楊泮池博士所領導的研究團隊，即轉染 (transfection) PTEN (tumor suppressor gene) 基因至高度癌轉移細胞，並以基因晶片分析受到影響的基因，亦爲基因網路研究之一環。

六、疾病之基因型分類：例如用於臨床上區分急性淋巴母細胞白血病 (ALL) 與急性骨髓細胞白血病 (AML)；或鑑定非霍奇金氏淋巴瘤之新亞型。

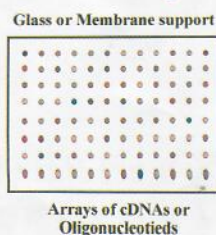
七、致病原對細胞宿主之影響：瞭解愛滋病毒 (HIV-1) 感染免疫細胞 (CD4+ T-cells) 後，整體基因表現改變的情形。

八、轉錄因子的搜尋：利用蛋白質晶片搜尋轉錄因子或其他核酸結合蛋白質，更直接反映出基因表現之功能。

九、遺傳網路的建構：如分析老鼠胚胎之脊髓及海馬迴中基因變化趨勢，進而拼湊出中樞神經系統發育的基因網絡。

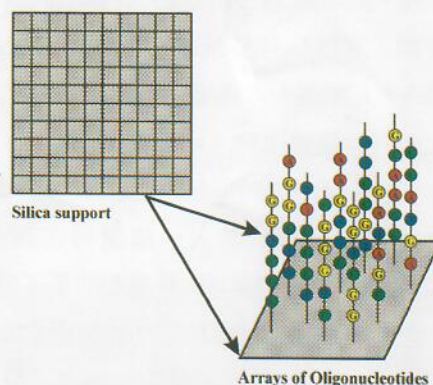
★ Array-based method

- * Konan Peck { Membrane vs. Colorimetry detection
- * Patrick O. Brown { Glass slide vs. Fluorescence
- * BR Jordan { Membrane vs. Radioisotope

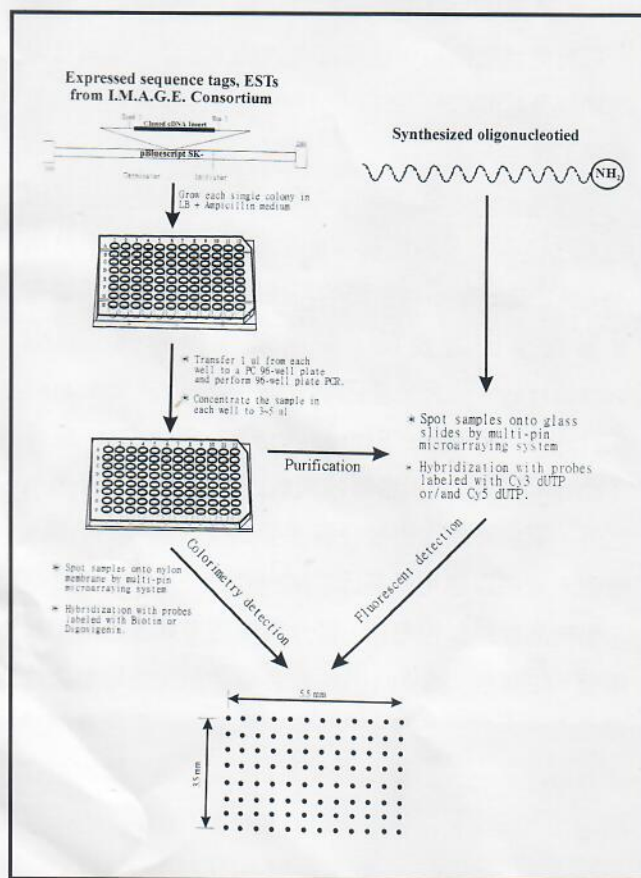


★ Chip-based method

- * Stephen P.A. Fodor, Sequencing { Silica support vs. Fluorescence
- * David J. Lockhart, Gene expression



↑ 圖一 基因晶片分類及偵測技術區分



↑ 圖二 微陣列系統作業流程



十、生物數量遺傳之研究：例如作物產量受多基因控制，利用基因晶片或可為分子育種學豎立新的里程碑。

以上所列基因晶片的應用，僅為冰山之一角，有許多的想法及應用仍需不斷繼續探索。

由於基因組計劃 (human genome project) 的即將結束，數以萬計的基因將被定序出來，而大部份的序列仍不知其功能為何。如何在眾多基因間解釋其相關性，更進而描繪出基因網絡 (genetic network)，已成 21 世紀的主流。單一或少數基因的研究，實難完整解釋複雜的基因交互作用現象。而基因晶片技術卻可提供成千上萬個基因同時進行分析工作，經由自動化程序及化繁為簡的統計方式，相關的基因或一組基因就有可能被分析出來，對基因功能的研究有快速且深遠的影響。除人類基因外，也期待這項科技能更廣泛應用於其他的生物體，如動物、植物等基因的研究。

在基因分析上，二十世紀若是基因組世紀 (human genome project)，二十一世紀無庸置疑應為功能基因世紀 (functional genome)，這項技術也挾其強大的多基因分析能力，被喻為二十一世紀功能基因分析的主流科技之一。它提供同時大量分析基因的功能，也提供一無限想像的基因空間。藉由它，生命科學家們將得以解開遺傳密碼的重重鎖鏈一窺生命的奧妙。Ω

推薦文獻

1. Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, Ma C, Lossos IS, Rosenwald A, Boldrick JC, Sabet H, Tran T, Yu X, Powell JJ, Yang L, Marti GE, Moore T, Hudson J Jr, Lu L, Lewis DB, Tibshirani R, Sherlock G, Chan WC, Greiner TC, Weisenburger DD, Armitage JO, Warnke R, Levy R, Wilson W, Grever MR, Byrd JC, Botstein D, Brown PO and Staudt LM: Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature*. 403:503-511,2000.
2. Bertucci F, Bernard K, Loriod B, Chang YC, Granjeaud S, Birnbaum D, Nguyen C, Peck K and Jordan BR: Sensitivity issues in DNA array-based expression measurements and performance of nylon microarrays for small samples. *Hum. Mol. Genet.* 8:1715-1722,1999.
3. Chen JJW, Wu R, Yang PC, Huang JY, Sher YP, Han MH, Kao WC, Lee PJ, Chiu TF, Chang F, Chu YW, Wu CW and Peck K: Profiling expression patterns and isolating differentially expressed genes by cDNA microarray system with colorimetry detection. *Genomics* 51:313-324,1998.
4. Golub TR, Slonim DK, Tamayo P, Huard C, Gaasenbeek M, Mesirov JP, Coller H, Loh ML, Downing JR, Caligiuri MA, Bloomfield CD and Lander ES: Molecular classification of cancer class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science* 286:531-537,1999.
5. Hong TM, Yang PC, Peck K, Chen JJW, Yang SC, Chen YC and Wu CW: Profiling the Down Stream Genes of Tumor Suppressor PTEN in Lung Cancer Cells by cDNA Microarray. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 23:355-363,2000.
6. Iyer VR, Eisen MB, Ross DT, Schuler G, Moore T, Lee JCF, Trent JM, Staudt LM, Hudson Jr. J, Boguski MS, Lashkari D, Shalon D, Botstein D and Brown PO: The transcriptional program in the response of human fibroblasts to serum. *Science* 283:83-87,1999.
7. Lockhart DJ, Dong H, Byrne MC, Follettie MT, Gallo MV, Chee MS, Mittmann M, Wang C, Kobayashi M, Horton H and Brown EL: Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays. *Nature Biotechnology* 14:1675-1680,1996.
8. Ross DT, Scherf U, Eisen MB, Perou CM, Rees C, Spellman P, Iyer V, Jeffrey SS, Van de Rijn M, Waltham M, Pergamenschikov A, Lee JC, Lashkari D, Shalon D, Myers TG, Weinstein JN, Botstein D and Brown PO: Systematic variation in gene expression patterns in human cancer cell lines. *Nat Genet.* 24:227-235,2000.
9. Schena M, Heller RA, Theriault TP, Konrad K, Lachenmeier E, Davis RW: Microarrays: biotechnology's discovery platform for functional genomics. *Trends Biotechnol.* 16:301-306,1998.
10. Scherf U, Ross DT, Waltham M, Smith LH, Lee JK, Tanabe L, Kohn KW, Reinhold W C, Myers TG, Andrews DT, Scudiero DA, Eisen MB, Sausville EA, Pommier Y, Botstein D, Brown PO and Weinstein JN: A gene expression database for the molecular pharmacology of cancer. *Nature genet.* 24:236-244,2000.
11. Tamayo P, Slonim D, Mesirov J, Zhu Q, Kitareewan S, Dmitrovsky E, Lander ES and Golub TR: Interpreting patterns of gene expression with self-organizing maps: methods and application to hematopoietic differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:2907-2912,1999.
12. Zhang L, Zhou W, Velculescu VE, Kern SE, Hruban RH, Hamilton SR, Vogelstein B and Kinzler KW: Gene expression profiles in normal and cancer cells. *Science* 276:1268-1272,1997.