

# 寡核酸晶片製造及其在基因檢測之應用

寡核酸晶片是目前快速鑑定基因型的利器，利用它可以加速藥物發展，提高藥效以及用藥安全。將來它的應用結果可以幫助健康的您預測自己得到各種疾病的機率。本文介紹寡核酸晶片的製造方法與應用。

鄭鄧言、白果能

## 一、前言 - DNA 晶片 / DNA 微陣

近五年來，人類基因體定序之進展快速，去年(2000年)六月，人類基因體的序列初稿(90% working draft)由美國前總統柯林頓與英國首相布萊爾一起公佈，受到全世界各界的矚目。目前人類基因體的定序完成比例已經有大約93%。隨著基因體研究受到大眾(包含科學界與社會大眾)的重視，基因研究相關的技術也經常在非專業書刊之中被提及，基因似乎不再只是學術研究人員才該懂得的專業知識，而像是一般人茶餘飯後也會聊一聊的常識了。其中一項專業「常識」，就是本篇所要討論的DNA晶片。

目前一般所謂的DNA晶片，以其所使用的

---

鄭鄧言先生為國立臺灣大學化學博士，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。

DNA長短來區分，長的稱為cDNA晶片，短的就稱為寡核酸晶片(oligonucleotide chip)。由於晶片上樣品的尺寸微小又排列整齊如矩陣，所以也稱為cDNA微陣與寡核酸微陣(cDNA microarray與oligonucleotide microarray；其中cDNA的小寫c是complementary的縮寫)。至於GeneChip一詞(有人翻譯為基因晶片)，由於已經被美國Affymetrix公司所註冊，專指由該公司所生產的寡核酸微陣，一般人也就不便使用。另外也有人為了稱呼方便，簡稱cDNA微陣為DNA微陣。由於目前的報導中比較少提及寡核酸晶片的製造與應用，因此本篇文章的重點將著重在寡核酸晶片。

DNA晶片的操作原理是利用DNA序列的配對特性(A配T，G配C)，讓樣品與晶片上的相似序列進行雜合反應(hybridization)，藉以檢測樣品中的基因表現或基因型別。利用微陣列體積微小的特性(每平方公分可含有數千個基因)，可以在一次實驗中得到數以萬計的基因表現或基因型資料。所得到的資料比起研究單一基因快速而且廣泛，因而

能加速基因體研究、新藥發展、藥物篩檢等各種研究，而有極大的學術及商業價值。這樣的特性正是 DNA 微陣受到大家重視的其中一項原因。

cDNA 微陣或寡核酸微陣均可運用於基因表現的檢測，但是想要檢測基因型別，則必須運用寡核酸微陣。在本文中將先敘述目前製造寡核酸晶片的技術與各種技術的特性，再討論目前寡核酸晶片最重要的應用-基因型鑑定。

## 二、寡核酸晶片之製造

目前寡核酸晶片的製造方法可以分成兩大類。第一類是直接將寡核酸合成在基材上，稱為原位合成法 (*in-situ synthesis*)。另一類是把事先合成好的寡核酸，一一佈植在基材上，可以稱為佈放固定法，或簡稱為佈放法。不論使用何種方法，都牽涉到 DNA 的化學合成，因此我們簡述如下<sup>(1)</sup>。

### 1. DNA 固相合成化學

進行合成之前，基材表面必須先經過處理<sup>(1)</sup>，使含有可進行反應之官能基，然後才能進行合成反應。圖 1 所示為 DNA 化學合成的反應程序。每一個鹼基的加成可分為四個步驟：

活化 (去保護基, detritylation)

單體加成 (coupling)

阻斷活化基 (capping)

氧化 (oxidation)

每一個鹼基加成完畢後，再重複進行上述四個步驟，如此循環延伸，依照所需的序列，建構出所需的 DNA 序列。

第一步驟稱為活化，是利用有機酸或是激發光，將保護基去除，得到羥基 (-OH, hydroxyl group)，這些羥基是固定在固相基材上，排列在 DNA 分子的 5'-端。第二步驟加入合成單體，單體依照所含的鹼基或結構不同，市售有 A、G、C、T、間隔用單體 (spacer)，以及標記用單體 (biotin、一級氨基或是螢光分子)。所加入單體的 3'-端與基材上的 5'-端羥基形成鍵結。由於反應發生率並非百分之百，會有一定比例的羥基殘留。未成功形成鍵結的羥基，為了避免將來干擾反應，於第三步驟進行阻斷，經過阻斷的羥基就不再參與反應進行。成功形成的鍵結，在第四步驟中再經由氧化劑作用，將三價磷氧化為五價磷，以穩定結構。如此四個步驟形成一個循環，寡核酸向 5'-端延伸加成一個鹼基單體，下一個單體的加入，就再由第一步驟開始，經過多次循環，依序加入預定的

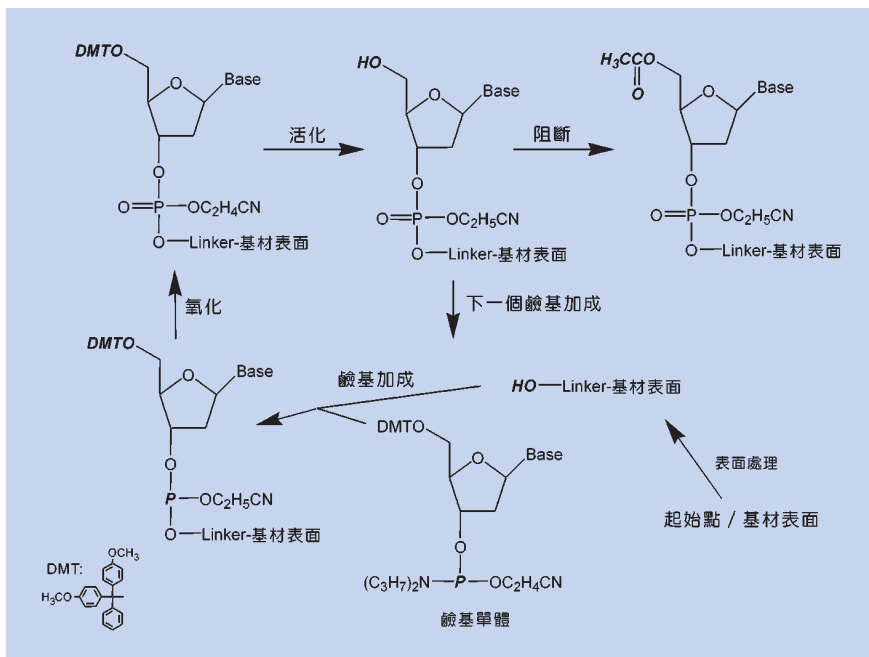


圖 1. DNA 化學合成程序。

鹼基，就可以得到所欲的序列。

在第二步驟中，單體加成的成功率稱為階段產率 (step yield)。經果多次的循環合成，總和產率是每一次階段產率的乘積，些微的階段產率不良，可能導致極低的總和產率。我們以合成一般用途的寡核酸為例子，其長度為 20，表 1 顯示不同的階段產率所對應的總和產率。一般市售的 DNA 合成儀，其階段產率至少要大於 98%。

化學合成寡核酸的一項特點為在單體加成反應中，寡核酸的 3'-端是固定在基材之上，鹼基的加成造成寡核酸由 3'-端往 5'-端延伸，所得到的所有產物，包含有最終全長產物與非全長的失敗產物；寡核酸延伸的方向與生體中的聚合酵素 (polymerase) 合成方向相反，聚合酵素的合成方向是由 5'-端往 3'-端。

## 2. 原位合成法

了解 DNA 合成方法後，便可應用於原位合成法，將寡核酸合成在基材上。但是要得到一個微陣，意味著在不同陣列點要有不同的序列，因此其技術的關鍵在於如何在基材上不同的區域合成出不同的序列；換言之，要有一個方法，可以將合成單體依照預定序列精確地送到不同的區域。目前存在的技術有下列數種：光罩選位法 (photolithography)<sup>(2)</sup>、數位微鏡 (digital micromirror device, DMD) 法<sup>(3)</sup>、噴墨選位法<sup>(4)</sup>，以及電化學選位法<sup>(5)</sup>。逐一分述如下。

### (1) 光罩選位

這個方法是由美國公司 Affymetrix 所研發成功。基本上是用半導體製程中常用的光蝕刻術 (photolithography) 來選擇合成區域。它的操作程序如圖 2 所示。首先將基材 (通常為玻璃或塑膠薄片) 做好表面處理，塗佈一層可反應之化學官能基。合成試劑目前有兩種類型，依照去保護基的方法可以分為酸去保護型與光激發去保護型，其中酸去保護型是市售合成儀所使用的反應型式。

酸去保護法 (圖 2(a)) 的製程要先在基材上塗佈一層光阻，再使用事先準備好之光罩，與基材對準後曝光。光罩是一片透明板，板面上各區域的透光

表 1. 長度為 20 的寡核酸，其階段產率與總和產率之差異。

階段產率 (%)	總和產率 (%)
99	82
98	67
97	54
96	44
95	36

度可以事先設計，另由光罩製作儀器製作，一片光罩一旦製作完成就不能再作修改。以本圖中所示的範例，欲合成的區域，光罩必須是不透光的，反之就必須是透光的。光阻經過曝光後，未照光區域的光阻溶解度較高，光阻在顯影時未照光的區域會被沖洗掉，這種型式的光阻稱為負光阻。光阻分為正光阻與負光阻兩型，正光阻的性質與圖 2 範例相反，照光的區域會被沖洗掉。理論上這兩型光阻均可用於選位，但由於受到 DNA 合成化學試劑之限制，目前實際的應用是以負光阻為主 (環氧樹脂光阻 Epoxy，如 SU-8)。經過顯影後的基材，在欲合成的區域露出保護基，這時可以加入有機酸將保護基去除，轉換為具有活性的羥基，再加入合成單體，就可以在所選擇的區域加成上新的鹼基。殘留的光阻經過去除即可完成一個循環。

另外一種去保護基的方法是使用光激發去保護的試劑，如圖 2(b) 所示。不需要塗佈光阻，直接利用光罩以及曝光選擇欲合成的區域。它與圖 2(a) 之差異僅在於使用不同的合成試劑。由於試劑合成效率的限制，目前酸去保護製程所得的階段產率較高。

不論適用何種試劑，由於 DNA 具有 A、G、C、T 四種鹼基，這樣的程序要經過四次循環，才能在每一個區域都加上一個鹼基，而每一次循環都需要一片設計、製作好的光罩。換言之，要完成 20 層鹼基，需要  $4 \times 20 = 80$  片光罩以及 80 次曝光、顯影、定影等程序。如果微陣中的任一個序列需要修改，必須重新設計 80 片光罩。若不同的實驗用途需要不同的 DNA 序列，也必須重新設計八十片光罩。目前光罩的製作成本並不低 (數千元至數萬元)，製作光罩也需要相當的時間，因此這種

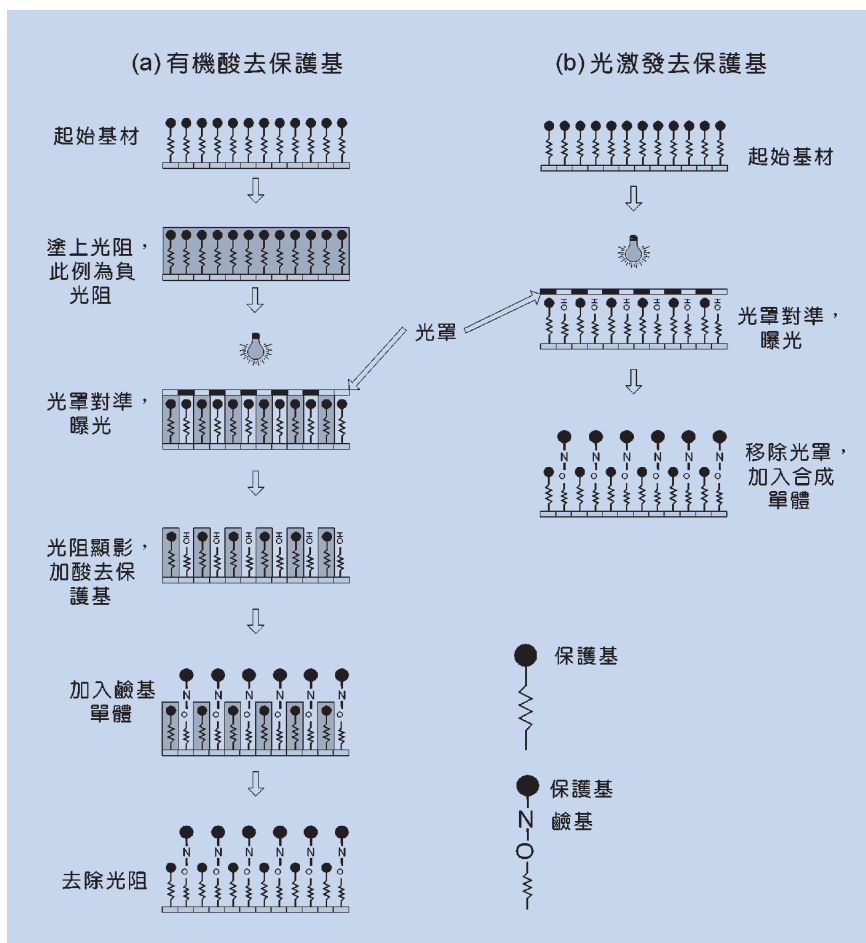


圖 2. 光罩選位法。

製作微陣的方法，彈性不高而成本偏高，並不適合小量的生產。這是最早發展出來的寡核酸微陣製造方法，目前 Affymetrix 利用這種方法生產出來的寡核酸微陣，每一個區域大小是  $25 \times 25$  微米 (micrometer)。

## (2) 數位微鏡選位

針對上述光罩選位法低彈性、高成本的缺陷，一種無光罩的選位法在 1999 年被發展出來。這種方法基本上與光蝕刻術類似，但由於不需要使用實體光罩，因而在此另外討論。這種方法巧妙地利用單槍投影機的數位光學處理裝置 (digital light processor, DLP)，又稱為數位微鏡裝置，取代了光罩法所需的實體光罩。DMD 是德州儀器公司 (Texas Instruments) 所發展出來的一種微機電系統 (MEMS) 裝置，它是由約七十萬片 ( $1027 \times 768$ ) 鏡

片組成，每一片鏡片的大小為  $16 \times 16$  微米。每一片鏡子的偏折可以獨立由電路控制。原本這項裝置的設計目的是為了以數位方法傳遞電影影像，目前的商業應用，除了稍後要提到的寡核酸晶片製作之外，已有數款單槍投影機使用此 DMD 為核心裝置。這項數位微鏡寡核酸晶片製作裝置與一般的液晶式單槍投影機最大的區別，就是它能傳遞 DNA 合成所需的紫外光。

圖 3 所示為利用 DMD 作選位合成的示意圖。利用電腦可以輕易決定每一面鏡片的偏折，而將紫外光投射於寡核酸微陣基材上預定之位置，紫外光所照射的區域，保護基被去除，而得以與加入的單體進行加成反應 (同圖 2(b))。鏡片若有偏折，紫外光不能到達寡核酸晶片基材，保護基不被去除，單體加成也就不會進行。這種裝置的好處是，合成區域的選位若需改變，可以經由電腦軟體控制

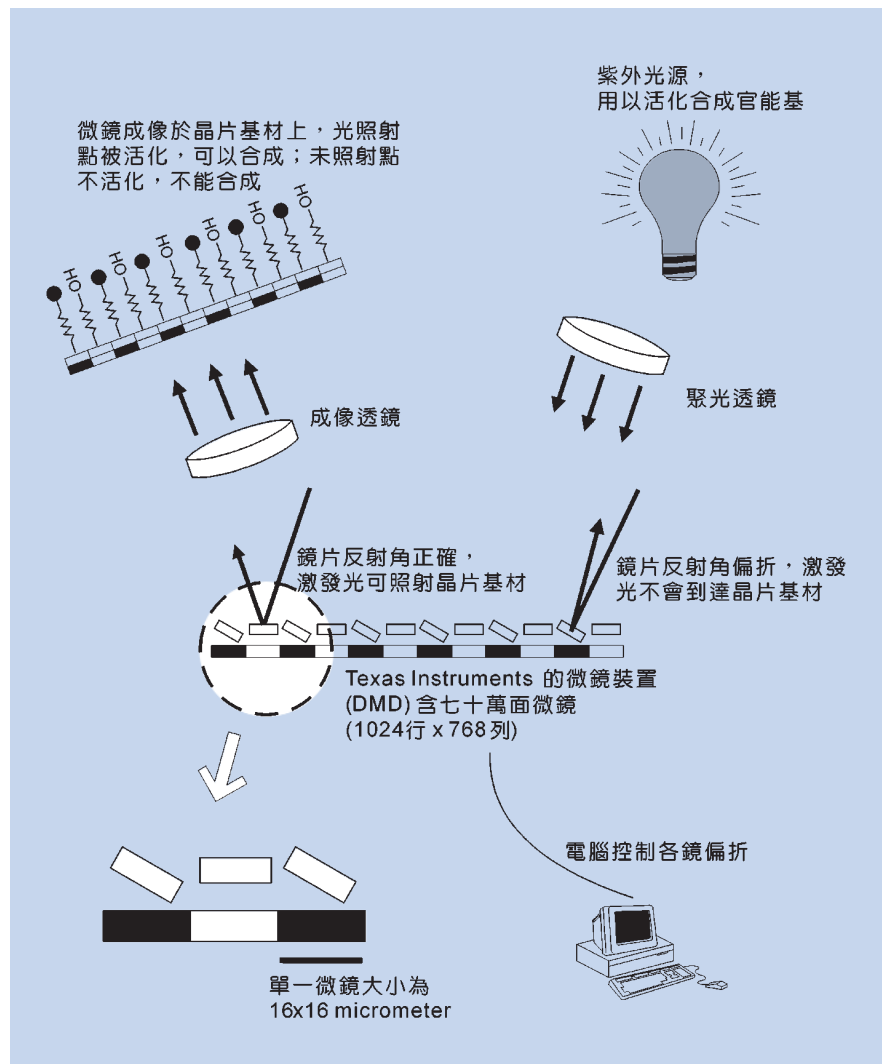


圖 3. 利用 DMD 作選位合成的示意圖。

各鏡片而達成，不需製作實體光罩；又因為不需更換實體光罩，這種方法不需經過光罩對準，大幅簡化操作的複雜度並節省合成時間。使用這種裝置，合成一整片寡核酸微陣 (七十萬個點，每一寡核酸長度為 20 鹼基) 僅需約 12 小時，材料成本約 60 美元<sup>(3)</sup>。目前這種裝置使用以光去保護的合成試劑，合成反應的階段產率較差。合成效率較高的酸去保護試劑的製程尚待開發。目前這一套技術由美國公司 NimbleGen 繼續發展中，尚未開始販售。

### (3) 噴墨選位

除了利用光蝕刻術來進行合成選位，另外還可以利用機械方式在不同區域噴放不同試劑，也能達

到選位合成的目的。讀者也許已經聯想到利用噴墨印表機來達到這個目的。目前噴墨印表機含有四種至六種墨水噴頭，若將墨水換成合成 DNA 用的單體，就可以像列印彩色圖片一樣，在不同區域噴灑不同的合成試劑，而在不同區域合成出不同序列。

圖 4 所示為利用噴墨頭作選位合成的示意圖。微陣列的基材經過處理後 (如同前述幾種合成法相同的程序)，利用分別裝有 A、G、C、T 合成單體的噴墨印表機噴墨頭，在預定合成的區域噴放合成試劑，單體與基材上的羥基加成後，即在所欲合成區域延伸出新的鹼基。這種選位方法不需要光罩，也不需要複雜的光罩對位儀器設備，若要合成不同序列，只需重新輸入 DNA 序列檔案給控制電腦，

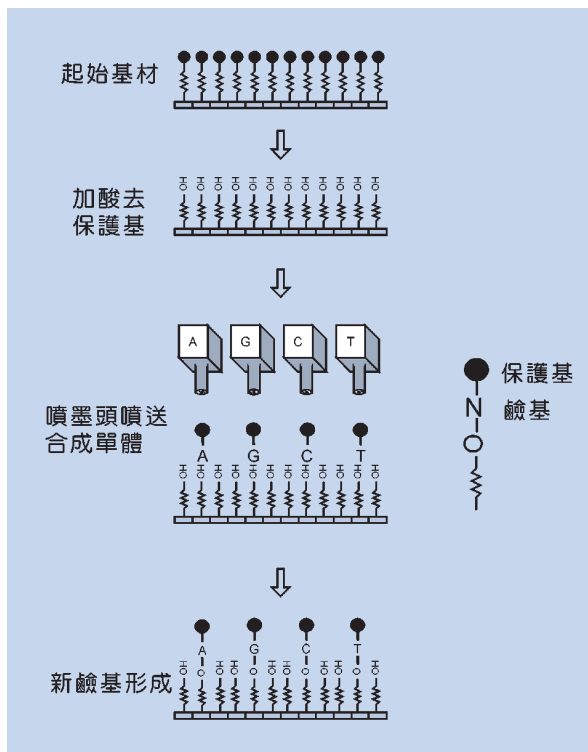


圖 4. 利用噴墨頭作選位合成的示意圖。

因此彈性很大。這一套技術目前為 Rosetta Inpharmatics、Agilent、Protogene 等公司所持有，產品僅提供合作研究機構使用，尚未有微陣或儀器販售。

#### (4) 電化學選位

圖 5 所示是另一種選位方法。利用電極以及電化學方法，在欲進行反應的區域促進反應進行，達到選位的目的。如圖中所示，微陣列的基材需先植入微電極，再於電極表面佈上反應官能基。然後在預定進行加成反應的電極區域通電，產生氫離子，提高該區域的酸性，而使該區域的保護基脫離。當合成單體加入時，便只能在保護基已脫離的區域進行加成反應。

這種方法如同噴墨法，有很大的序列變更彈性。但此法的實行要先在基材底層製備微電極，得借用到半導體的製程，對基材的選擇造成限制。目前此法只見於專利，尚未有微陣列及儀器商品。

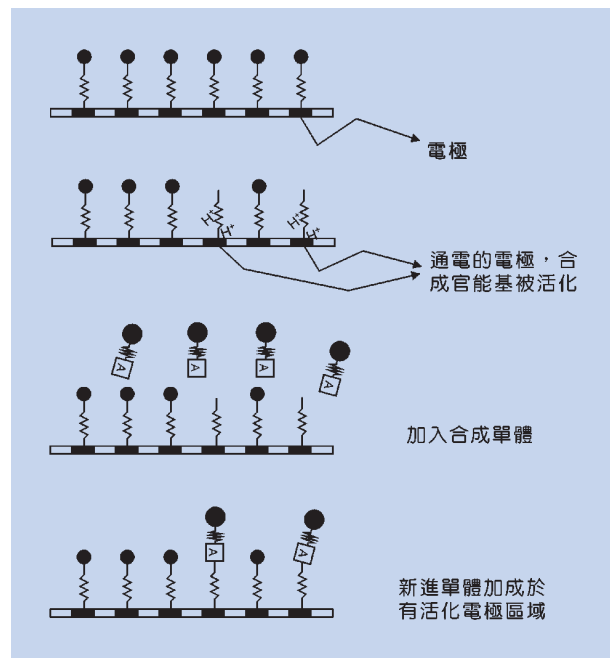


圖 5. 電化學選位合成程序的示意圖。

### 3. 佈放固定法

#### (1) 機械佈放

機械佈放法，顧名思義，就是利用機械手臂，將已合成之寡核酸樣品佈放在基材上，排列整齊成為微陣。此法最早在 1995 年發表時，是運用於 cDNA 樣品，但此法不受限於樣品材質，cDNA、寡核酸，甚至蛋白質均可適用。要利用此法製備寡核酸微陣，首先在合成寡核酸時，要在 5'-端加上一級氨標記 (aminolink)，以便與基材上的官能基形成共價鍵結，而固定寡核酸；若沒有加上一級氨標記，則寡核酸無法固定在基材上。目前全世界已經有十數家儀器商製造販售微陣佈放儀 (arrayer)，而且數目還在增加中。基材也有多家供應商，有多種寡核酸固定反應可供選擇<sup>(7)</sup>，可算是目前相當簡便且成本低廉的寡核酸微陣製備方法。使用機械佈放法製備寡核酸微陣，可以使用多種基材，包括玻璃與濾膜，目前都已有簡便的固定程序，基材除了可購得，也可以自行製備。此法所得到的最小微陣點大小約在 80 - 100 微米之間，微點距離最小約在 150 微米。

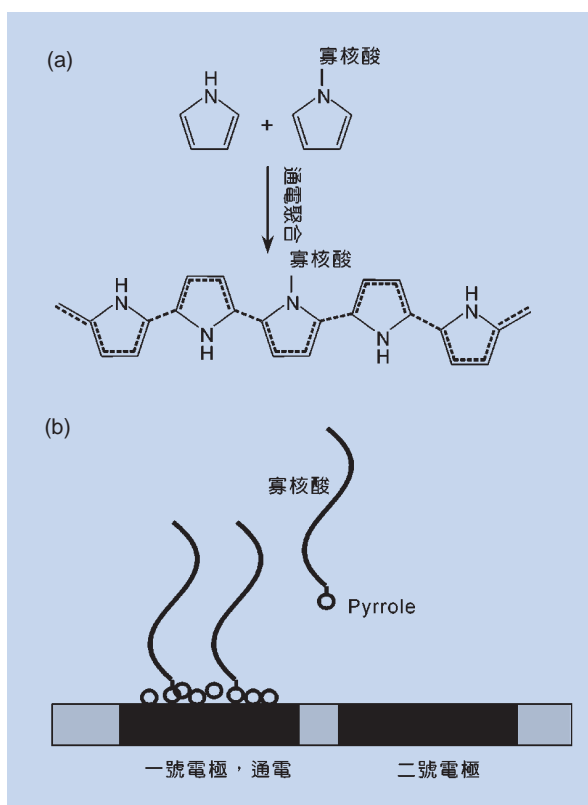


圖 6. 利用 Pyrrole 電聚合反應佈放寡核酸的程序。

## (2) 電極佈放

電極佈放法有兩種類型，一種是利用 pyrrole 的聚合反應，使 5'-端標記有 pyrrole 的寡核酸固定在電極表面<sup>(8)</sup>。另一種是利用電場力把帶負電的寡核酸吸引至正電極，再利用抗原抗體的結合力固定之<sup>(9)</sup>。圖 6 所示為利用 pyrrole 聚合反應佈放寡核酸的程序。圖 6(a) 是 pyrrole 的聚合反應。Pyrrole 經過電化學氧化聚合成鏈狀聚合物，形成薄膜而沉積於電極上。要在不同的電極佈放不同的寡核酸序列，只要依序分別啟動置放位址下的電極，並分別加入標記有 pyrrole 的不同寡核酸，即可將寡核酸固定在該電極上，如圖 6(b) 所示。如此依序加入寡核酸、啟動電極，即可製備出寡核酸微陣。

第二種電極佈放法係利用電泳動原理讓帶負電的寡核酸移至正電極，再利用抗原抗體的結合力固定之<sup>(9)</sup>。這個方法不僅利用電場力製造微陣，還利用電荷相吸及相斥的特性，縮短雜合反應所需的時間到僅需數十秒（原本需數十分鐘至數小時），並提

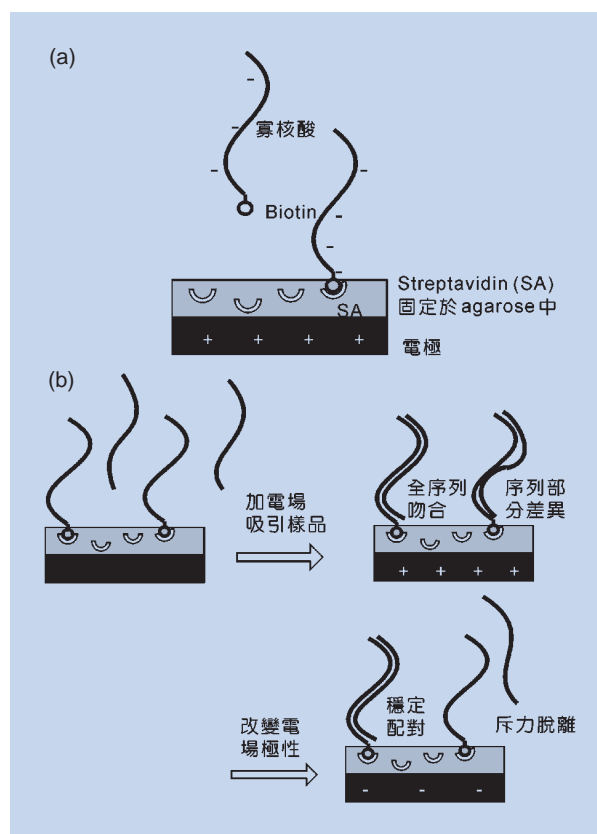


圖 7. 電極佈放法。

高相似序列的鑑別能力。這個方法是由美國 Nanogen 公司發展，目前已有商品，每片微陣含有約數十種寡核酸序列。它的製作程序如示意圖 7(a)，所使用寡核酸的 5'-端需標記有 biotin，電極則需披覆一層瓊膠 (agarose)，再將 streptavidine 包埋固定於瓊膠中。Biotin 與 streptavidine 的親合力非常強，結合常數 (affinity constant) 約有  $10^{15} \text{ M}^{-1}$ 。運用類似前述逐點啟動電極的佈放方法，可以依序將寡核酸佈植並固定在個別電極上。由於底部埋有電極，固定後之寡核酸的雜合反應，可以藉由電極上電荷的吸引，加速反應進行，如圖 7(b)。除了加速雜合反應，還可藉施放反向電壓，把親和力較差的錯配樣品（序列部分差異的樣品）驅趕回溶液中，這樣可以提高相似但非完全相合序列的鑑別能力，輕易地鑑別出僅有單鹼基序列差異的樣品。

這兩種電極佈放法都需要在基材底部先植入電極，都必須要借助於半導體蝕刻製程，因此不如機

方法	階段產率 (%)	成本	彈性	點直徑 (微米)	點密度	總點數
光罩選位	98	高	低	25	高	數十萬
數位微鏡	95	低	高	16	高	數十萬
噴墨選位	97	低	高	100	中	數萬
電化學選位	NA	NA	高	NA	NA	數百
機械佈放	-	低	高	150 - 1000	中	數萬
電極佈放	-	低	高	50	高	數百

表 2. 各種寡核酸晶片製造法綜合比較。

械佈放法簡便，所得到的微點大小與微點距離則視所使用微電極密度而定，約在數十微米左右。微點密度可相當於光罩選位法，但由於微電極的製作牽涉到電極配線的限制，總微點數目前僅達到數百點。

#### 4. 方法比較

以上所介紹的多種寡核酸微陣製備方法，都有其優缺點，適於不同的應用，目前並沒有任一種方法是絕對優於其他方法的。筆者在此對幾種原位合成法的優點及限制稍作描述，再比較原位合成法與佈放法的差異性，最後再比較這些方法的特性。

##### (1) 原位合成法之比較

目前幾種已發表的原位合成法，寡核酸的階段產率比一般的商用寡核酸合成儀都稍遜一籌。如「DNA 固相合成化學」一節中所述，一般商用合成儀的階段產率均大於 98%。在目前所討論的幾種原位合成法之中，僅有光罩選位法的階段產率較接近。其餘的方法，除了電化學選位法無詳細資料外，階段產率均不甚理想。如前所述，些微的階段產率損失會導致極差的總和產率，這顯示目前大部分的原位合成法都還有改進的空間。另外一項效能上的差異，是改變或重新合成不同寡核酸序列的彈性。使用光罩選位法，每一層鹼基需要製作四片光罩，製作好的光罩不能更改，若要重新合成不同的序列，所有八十片光罩必須重新設計、重新製作。這繁複的程序使得序列更換非常昂貴而又耗時，所以光罩選位法的序列更改彈性是非常差的。相較於此，數位微鏡法、噴墨選位法與電化學選位法的序列更改就很有彈性，序列的重新設計與重新合成，不需製作任何實體裝置，僅需在控制器（如控制用

電腦）更改程序或參數，即可達到目的，比較快速簡便。

在所得微陣的樣品密度方面，光罩選位法、數位微鏡法以及電化學選位法都借用到光學定位或半導體製程的輔助，每一微陣點的大小均在數十微米之譜，依現有製造技術，微點尺寸還可降低。而噴墨法目前合成的微點尺寸約為 100 微米，依傳統噴墨技術，微點尺寸能夠降低的程度有限。

在合成化學的選擇上，微鏡製程目前只能適用於光去保護法。電化學選位法所使用的合成化學與傳統 DNA 合成不同，在試劑的取得上不如傳統試劑方便，另外反應條件、操作參數也要另行研究。光罩選位與噴墨選位則沒有如此的顧慮與限制。

##### (2) 原位合成法與佈放法之比較

寡核酸合成反應產物包含了全長的預定序列與非全長的失敗序列產物。這些產物都存留在基材的表面上。目前並沒有簡便的純化方法，可以將失敗產物自基材表面去除，而僅保留全長序列。這是所有原位合成法所面臨的共同問題。另外，原位合成所得到的產物，其寡核酸的 3'-端是固定在基材表面，在某些寡核酸與酵素作用的反應中，需要自由懸浮的 3'-端。這項需求不是原位合成所能滿足的。

佈放固定法所使用的程序都要在 5'-端掛有標記，而此端是在合成反應的最後一道程序才加入，需有完整的全長序列，才會帶有此標記，因此在寡核酸的固定反應中，僅有具全長的寡核酸才會固定在基材上，非全長的失敗產物經過清洗就不能存留，這樣的選擇有如進行一次純化動作，僅保留全長的寡核酸序列。另外，寡核酸是藉由其 5'-端固定於基材上，其 3'-端是自由懸浮於溶液中的。

### (3) 綜合比較

表 2 所示為各種寡核酸晶片製造法綜合比較。

## 三、人類基因序列及單鹼基複型序列

人類基因序列已知有三十億鹼基對 ( $3 \times 10^9$  bp)，而其中個體與個體之間，有 99.9% 的序列是相同的，其餘極少部分的序列差異，卻表現為膚色、視力、身高、甚至是疾病抵抗力等個體之間的差異性。縱使我們從經驗得知個體的發展會受到環境的影響（如同卵雙胞胎之間的差異），但基因的組成確實具有相當的重要性。個體基因的差異性，目前已知有大部分是所謂的單鹼基複型序列 (single nucleotide polymorphism, SNP)。如果在一群個體中，在某一個鹼基位置出現變異的機率大於 1%，則可稱為 SNP，若小於 1% 則一般歸類於突變。依照目前的估計，在人體基因組平均約 1000 鹼基中存在一個 SNP，整個基因組估計約有三百萬個 SNP，有些會表現為個體差異，有些可能不會表現，這許多不同 SNP 的排列組合，就表現為個體外在的差異，這樣的排列組合，就稱為該個體的基因型。一種常見血液疾病的 SNP 稱為鐮刀型紅血球貧血症 (sickle cell anemia)。一般人珠蛋白 ( $\beta$ -globin) 上第六個氨基酸為麩胺酸 (glutamic acid)，所對應的基因序列為 GAG，當其中的單一鹼基 A 變異為 T，成為 GTG，則原本基因所對應的麩胺酸會改變為對應纈胺酸 (valine)，該珠蛋白所有其他的氨基酸均未改變，但含有此種變異珠蛋白的紅血球變得很脆弱，並且其 S 型血紅素 (hemoglobin S, Hb S) 容易聚合成長鍊狀，造成紅血球細胞形狀改變類似鐮刀，而有鐮刀型紅血球症的名稱。鐮刀型紅血球無法正常攜帶氧氣，患者因而有貧血症狀，還可能阻塞微血管，造成組織壞死。這樣一組對應的單鹼基變異，GAG 與 GTG，稱為一組雙型對偶基因 (bi-allelic alleles)，GAG 稱為 A 型對偶基因 (A allele)，GTG 則稱為 T 型對偶基因 (T allele)。人體的染色體有兩套，因此其基因型可以有同型體 (homozygote，如兩套的 A 型對偶基因)，或異型體 (heterozygote，如同時具有 A 型與 T 型對偶基因)。

## 四、SNP 之發現與基因型鑑定

研究 SNP 主要分為兩個階段。第一階段是去發掘基因組中哪些點是 SNP；第二階段才能深入研究各個 SNP 的意義（例如與疾病的關聯性），以及相互之間的關聯性。全面性的 SNP 發掘，需要定序足夠數量的個體樣品，是一項龐大的工程。目前有一項由十餘家國際性藥廠合資進行的人類基因 SNP 圖譜發掘計畫。這十餘家公司組成的 The SNP Consortium (簡稱 TSC)，計劃以兩年的時間（至 2002 年四月），用序列比對的方式，在二十四個匿名捐贈者的基因序列中，發掘人類基因體的三十萬個 SNP，並提供公眾免費使用<sup>(10)</sup>。這項計畫的成果所發掘的大量 SNP，將提供學術界以及合資的製藥公司研究疾病與基因變異的關聯，並藉此發展治療方法，其潛在的學術及商業價值可謂無窮。在這後續的研究程序中，要檢測各樣品中的各個 SNP 的組合，這樣的檢測稱為基因型鑑定 (genotyping)。由於人體的 SNP 為數眾多，即使是單一個體的所有基因型檢測也是一項相當不容易的工作，需要高效能的平行檢測技術，可以在短時間內檢測為數眾多的 SNP。SNP 的檢測方法有許多種，有利用層析法 (HPLC)、聚合鏈鎖反應 (PCR)，或是作短列定序 (mini-sequencing)，但都不適合一次檢測大量的（數千至數萬或數十萬）SNP。實際上要同時檢測數萬個 SNP，寡核酸微陣是較可行的方法<sup>(11)</sup>。

## 五、寡核酸微陣在基因型鑑定之應用

利用寡核酸鑑定基因型，首先要針對每一個對偶基因的序列設計寡核酸探針 (allele specific oligo probe)。收集到所有 SNP 檢測所對應的探針後，把每一個基因型的探針都個別排列佈放（或合成）在基材上，將其製備成微陣。再將樣品與此微陣進行雜合反應，不同的對偶基因依據序列配對與其對應的探針雜合後，即可以偵測雜合信號強弱，判斷樣品的基因型。

寡核酸探針序列有三種設計，一種是利用對偶基因的雜合差異區別基因型，另二種是依賴酵素的序列存真性 (fidelity) 辨別基因型，探針的總長度均在 15 - 21 鹼基之間。

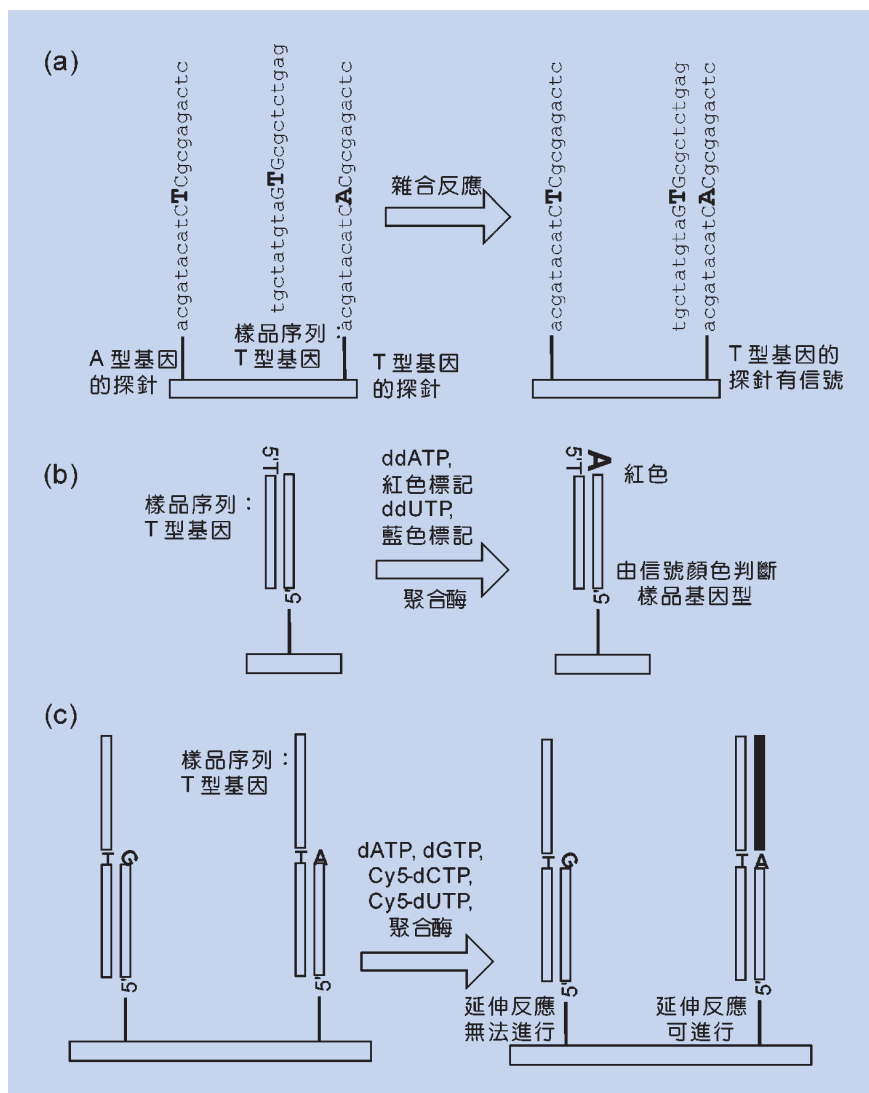


圖 8. 寡核酸探針設計。

第一種方法的探針設計，將變異鹼基（即 SNP 的位置）排列在探針的最中心點，由於最中心位置的變異對雜合反應有最大的影響，因此可以區別單一鹼基的序列差異（圖 8(a)）。

另一種探針序列設計，變異鹼基不排列在探針序列內，而是緊鄰在探針序列的 3'-端，探針與樣品雜合後，加入不同螢光標記的雙去氧核 酸 (ddATP、ddGTP、ddCTP 或 ddUTP)，並利用聚合 的作用，進行單鹼基延伸<sup>(12)</sup>，再檢測有進行鹼基延伸反應的探針螢光顏色，即可知樣品的基因型（圖 8(b)）。此聚合 延伸反應之進行需以樣品序列為模板（聚合 的 fidelity 特性），因此該延伸反應

所加成的鹼基種類會依照樣品基因型決定。

第三種序列設計是將變異鹼基排列在探針序列的 3'-末端<sup>(13)</sup>。樣品與探針雜合後，加入有螢光標記的去氧核 酸 (dATP、dGTP、Cy5-dCTP 或 Cy5-dUTP，參見附註) 與聚合 ，以樣品序列為模板進行多鹼基延伸聚合反應，探針末端鹼基與樣品序列必須吻合，則聚合反應才能進行（聚合 的 fidelity 特性），反之則無法進行，利用此一特性可以鑑別樣品基因型（圖 8(c)）。

原位合成的微陣都不能直接應用於第二種與第三種序列設計，原因是殘留在表面的失敗序列會干擾雜合反應，導致基因型鑑別錯誤。另一個原因是

表 3.  
不同基因型對相同藥物有不同  
的藥效與毒性。

基因型 (個體)	藥物標的基因 A	藥物代謝基因 B	藥效	副作用
甲	GCATGCATCGCG...	TCAGCATGCCA...	有效	強
乙	GCAAGCATCCCG...	TCAGCATGGCA...	無效	無
丙	GCATGCATCGCG...	TCAGCATGGCA...	有效	無

聚合 是由 DNA 的 5'- 端往 3'- 端延伸，而原位合成的寡核酸其 3'- 端是被固定在基材上，不能進行延伸反應。以佈放法所製備的寡核酸微陣則沒有限制，可以適用以上三種序列設計。

有了基因型鑑定的工具，可以應用於找出基因與個體外在表現的關聯性，這就是下一節所討論的基因型—表徵型關聯 (genotype-phenotype relationship)。

## 六、基因型與表徵型關聯與其應用

現代分子生物學的中心思想中有一個基本教條 (central dogma)，意謂基因 (DNA) 經過轉錄 (transcription) 得到 RNA，RNA 經過轉譯而得到蛋白質。因此基因序列有所變異時，蛋白質的表現也會隨之變化。而蛋白質是所有生理作用的直接操控者，舉凡細胞代謝、分化、分裂、訊息傳遞等種種物理化學變化，都受到蛋白質的調控。基於這樣的邏輯，個體之間的基因序列差異是所有外在差異的根源。這些外在差異除了外表之外，還包括對藥物的代謝模式、對致病原的抵抗能力，以及各種急性與慢性疾病的發生率。舉例來說，先前所述的鐮刀型貧血症，除了會導致患者貧血之外，帶有變異型基因的紅血球，對於瘧疾卻有較強的抵抗力。建立基因型與表徵型的關聯，可以深入了解生命現象，幫助我們尋找疾病的根源，設定藥物標的，並藉以發展治療方法或設計藥物。近幾年來，人類基因的定序以及全基因組 SNP 的發掘與研究，讓我們首度能以較廣泛的視野，來研究基因型與表徵型的關聯，雖然人類基因的變異，不是只有 SNP 這麼單純，卻是一個開始。我們以一個例子來說明這類研究的重要性。

### 1. 精確藥物使用與個人化醫療

藥物在人體內的代謝是由一連串複雜的基因調

控與環境影響所決定的。所以不同基因型的個體會產生不同的代謝結果、不同的藥效，以及不同的毒性。假設有甲、乙、丙三個病人 (表 3)，使用針對 A 基因為標的物的藥物 X，由於 A 基因型的差異，藥物 X 對甲與丙都有藥效，對乙卻無效果。然而由於代謝基因 B 的基因型不同，甲產生了強烈的副作用，所以病人丙是最適合使用藥物 X 的病人。有了如此的分析，醫師可以精確地根據每一位病人的基因型，開立不同的處方，提高藥效，減低副作用。研究基因型與表徵型最大的潛力就是可以了解並幫助我們預測治療的成效。有系統地從事關聯性研究，我們可以更精確地了解一個藥物的有效性。以表 3 的例子來說，我們知道藥物 X 雖然對某些人有嚴重副作用，但只要使用在適當的病人身上，仍然可以發揮它的價值，而不必因而放棄這個藥物。換個角度來說，許多曾經因為對某些病人造成嚴重副作用而停用的藥物，如果能夠經過系統的分類，找出適合使用的基因型病人，那麼它又可以敗部復活，再次發揮價值，這也相對地增加對於資源的有效利用，當然對於握有此藥專利的製藥公司，也是很大的利益誘因。

### 2. 疾病發生率與基因型

藥物發展個人化目前還是個願景，但是不同基因型所影響的疾病發生率，卻已是有例可循。除了上文所述的鐮刀型紅血球貧血對瘧疾的抵抗力之外，還有其他範例。較為人知的例子，如凝血因子基因 F5 (coagulation factor V) 的單鹼基複型，若由 G 變異為 A，得血栓的機率比一般型多 (此變異又稱為 Leiden mutation)。有許多疾病不是由單一變異所造成的，而可能牽涉許多個點變異以及環境因素的影響。對於這種疾病，需要大規模且系統的 SNP 研究，以勾勒出不同變異與疾病之間的關聯性。將來這類研究有了具體的成果後，就可以幫助我們預測個體罹患各種疾病的發生率，對於疾病，

我們除了可以「精確」治療之外，還可以事先預防。

## 七、結語

科技的應用可以提昇人類的生活，但是有時科技的應用也會帶來很大的衝擊。基因型與表徵型關聯的研究，固然可望幫助我們完成了解生命現象，控制疾病的夢想，但是也可能帶來意想不到的衝擊。也許將來真如電影情節一般，新生兒一出生，就可以由一滴血知道 IQ、未來身高、心臟病機率。果真如此，我們也許該認真思考：「人」，只是一串密碼嗎？

## 附註

標記用的核 酸也有非螢光標記如酵素免疫檢測法 (enzyme immunoassay, EIA) 所用的 Biotin-dUTP/dCTP、Digoxigenin-dUTP，或是質譜儀檢測所用的標記核 酸。

## 參考文獻

1. F. Eckstein, *Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach*, New York: Oxford (1991).
2. Glenn McGall *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 13555 (1996).
3. S. Singh-Gasson, R. D. Green, Y. Yue, C. Nelson, F. Blattner, M. R. Sussman, and F. Cerrina, *Nature Biotech.*, **17**, 974 (1999).
4. A. P. Blanchard, R. J. Kaiser, and L.E. Hood, *Biosensors and Bioelectronics*, **11**, 687 (1996).
5. D. D. Montgomery, *U.S. Patent 6093302* (2000).
6. M. Schena, D. Shalon, R. W. Davis, and P. O. Brown, *Science*, **270**, 467 (1995).
7. N. Zammateo, L. Jeanmart, S. Hamels, S. Courtois, P. Louette, L. Hevesi, and J. Remacle, *Anal. Biochem.*, **280**, 143 (2000).
8. T. Livache *et al.*, *Anal. Biochem.*, **255**, 188-194 (1998).
9. Nanogen R. G. Sosnowski, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 1119 (1997).
10. The SNP Consortium, <http://snp.cshl.org/>.
11. D. G. Wang, J. B. Fan, C. J. Siao, A. Berno, P. Young, R. Sapolsky, G. Ghandour, N. Perkins, E. Winchester, J. Spencer, L. Kruglyak, L. Stein, L. Hsie, T. Topaloglou, E. Hubbell, E. Robinson, M. Mittmann, M. S. Morris, N. Shen, D. Kilburn, J. Rioux, C. Nusbaum, S. Rozen, T. J. Hudson, R. Lipshutz, M. Chee, and E. S. Lander, *Science*, **280**, 1077 (1998).
12. T. T. Nikiforov, R. B. Rendle, P. Goelet, Y. H. Rogers, M. L. Kotewicz, S. Anderson, G. L. Trainor, and M. R. Knapp, *Nucl. Acid Res.*, **22**, 4167 (1994).
13. T. Pastinen, M. Raitio, K. Lindroos, P. Tainola, L. Peltonen, and A. C. Syvanen, *Genome Res.*, **10**, 1031 (2000).