

# 微生物感染之疾病與 DNA 晶片檢測

微生物會引發許多的疾病，特別是在人體免疫功能下降時，受到的侵犯會顯現急驟的發燒等病症，甚至引起死亡。近年隨著跨領域科技的抬頭與進步，已使各種檢驗方法及技術趨於簡單、快速、經濟之勢，且往更高靈敏度及高專一性之方向邁進。其中最受矚目的 DNA 晶片，除已被用來鑑定基因的突變之外，亦有用於鑑定各種病原菌感染之成功報導，不啻為臨床微生物感染醫學注入一股強心劑。本文將從微生物的分類與其所引起的疾病，進而就 DNA 檢測核苷酸之基本原理、設計與製作，以及它們在國內外的相關產品與臨床診斷的運用，作一概述。

劉向寧、張長泉、張憲彰

## 一、緒論

某些疾病直接緣起於基因之變異。過去二十年來，科學家逐漸掌握了某些去氧核糖核酸 (DNA) 序列與疾病之因果性，這些成果提供了醫界更準確的疾病診斷及有效的藥物治療，進而可利用為疾病預防之重要參考。細胞核內染色體上的 DNA，從序列定序至立體結構的分析法，是二十世紀分子生

物學專家們投入大量研究的課題之一。PCR 體外複製法的發現，配合多項限制的商品化，分子生物學的進步更是日以千里。DNA 研究的成果斐然，該成果也應用於一些特定的微生物鑑定上。

迄今在臨床醫學上，鑑定微生物感染大都先行採樣及培養，俟形成菌落後，初步依各菌所特有之特徵型態辨別，配合系列生化反應來加以鑑定。這種傳統式的檢驗方法雖然準確，但仍需花費 1 到 7 天不等的時間始能成功，其中可能會因化學反應過程繁雜，加上技術人員經驗上的因素，判斷錯誤的機率偶有發生。近年來，分子生物技術 (molecular biology technology) 蓬勃的發展，使得微生物的檢測方法趨向更快速及簡單；先有以免疫學為基礎的生物感測器 (biosensor) 之發展，現又有結合分子生物技術，開啟分子生物晶片 (biochip) 檢測新紀

---

劉向寧小姐現為國立成功大學醫學工程研究所博士班學生。

張長泉先生為國立台灣大學農化博士，現任國立成功大學醫事技術系教授。

張憲彰先生為日本國立東北大學化工博士，現任國立成功大學醫學工程研究所教授。

元。尤其已颳起全球旋風的 DNA 微矩陣晶片，非但是細胞生物學的探討利器，更將成為臨床檢驗的必備試片。本文將以微生物檢測晶片之發展為主，從微生物的分類及其所引起的疾病開始介紹，繼之陳述 DNA 檢測核苷酸的基本概念與各檢測方法之原理，以及設計與製作，最後將把國內外之相關研究、產品及臨床診斷的應用，加以介紹。

## 二、微生物之分類與感染

微生物可分為原核 (prokaryotes) 及真核生物 (eukaryotes) 兩大類。細菌 (bacteria) 是屬於原核生物，而真菌 (fungi) 及原蟲 (protozoa) 則屬於真核生物。兩者之差別在於原核生物無細胞核，其 DNA 是存在細胞質中。真核生物由細胞核、粒腺體、高基氏體、內質網、溶 體等胞器構成，DNA 存在於細胞核內，核膜將之與其他胞器隔離。原蟲是單細胞動物，有些原蟲是與人類共通的，透過寄主供應營養而繁殖。病毒所含的遺傳物質被包在保護性蛋白質殼內，並無細胞膜及細胞質的構造，故必須靠寄主提供所需來進行其代謝機轉而繁殖。表 1 所示為一些主要微生物之特徵。

感染常由各種不同的病毒、細菌、真菌或原蟲所引起。一般感染菌會在人體免疫力下降時侵犯人體而產生各種疾病，嚴重則導致死亡。人體比較容易被微生物感染部位有尿道及胃腸道，其他如上呼吸及下呼吸道、皮膚或神經系統之感染則比較少。表 2 所示為一般比較常見的感染菌，及其引起之感染性疾病。微生物很少只造成一種疾病，如金黃色葡萄球菌可造成心內膜炎、肺炎、毒素休克症及敗

血症等。有些病原菌像細菌、病毒、真菌和寄生蟲都可能產生相同的疾病，如腦膜炎。有些屬於外來的微生物 (流行性感冒病毒) 及人體內正常微生物，會在人體免疫力下降時引發各種疾病。微生物在人體內有些是短暫的，有些是長期共生的，有些則會產生疾病。若有準確的快速鑑定方法可幫助醫師診斷。

## 三、核苷酸之基本構造及 DNA 之複製

許多遺傳疾病 (genetic disease) 乃基因發生變化所致，在 DNA 之轉錄 (transcription) 及轉譯 (translation) 過程中，若出現反常現象 (突變) 或人體受到壓力外在因素的影響，都有可能使基因發生變化，而這些微小的變化很可能就會使基因出現病變。

### 1. DNA 之結構

DNA 是構成遺傳的基本物質，也是一種核酸 (nuclei acid)。DNA 分子以去氧核糖 (deoxyribose, D)、磷酸 (phosphate, P)、鹼基 (base, B) 組成的核苷酸 (nucleotides) 為單位，如圖 1 所示。去氧核糖與磷酸形成外側的鏈部分，鹼基則朝向內側。DNA 中的鹼基有 4 種，如圖 2 所示，分別為腺嘌呤 (adenine, A)、胸腺嘧啶 (thymine, T)、鳥嘌呤 (guanine, G) 及胞嘧啶 (cytosine, C)。DNA 是由兩條長鏈的分子靠一定的鹼基配對 (base pairing)，也就是 A 配 T 及 G 配 C，各以兩個及三個氫鍵結合而成，並以同一個軸為中心捲成螺旋狀形成雙螺旋結構分子。

種類	直徑	構造	增殖過程
病毒	18 - 300 nm	不屬於細胞，只有 DNA 或 RNA 及蛋白質成分。	須靠寄主細胞才能增殖
細菌	1 - 20 $\mu\text{m}$	原核單細胞生物，無細胞核。	無性方式進行分裂繁殖
真菌	1 - 50 $\mu\text{m}$	真核生物，有完整的細胞組織如細胞核、粒腺體、內質網、高基氏體等，以單細胞或絲狀型態存在。	可以有性或無性方式進行增殖。
原蟲	1 - 100 $\mu\text{m}$	屬於真核單細胞動物，有完整的細胞組織。	以二分法或多重分裂的有性方式進行繁殖。

表 1.  
微生物之分類。

表 2.  
常見之病原菌及其所引起之感染疾病。

微生物	疾病
狂犬病毒 (Rabies virus)	狂犬病
金黃色葡萄球菌 ( <i>Staphylococcus aureus</i> )	毒素休克症、敗血症
沙門氏桿菌 ( <i>Salmonella</i> spp.)	霍亂、腹瀉、敗血症
大腸桿菌 ( <i>Escherichia coli</i> )	敗血症、尿道感染
肺炎黴漿菌 ( <i>Mycoplasma pneumoniae</i> )	異型肺炎
肺炎披衣菌 ( <i>Chlamydia pneumoniae</i> )	異型肺炎
結核分枝桿菌 ( <i>Mycobacterium tuberculosis</i> )	肺結核病
梅毒密螺旋體 ( <i>Treponema pallidum</i> )	梅毒
人類免疫缺乏病毒 (Human immunodeficiency virus, HIV)	愛滋病
白色念珠菌 ( <i>Candida albicans</i> )	念珠菌症、鵝口瘡
髮癬菌 ( <i>Trichopyton</i> spp.)	皮癬症
B 型肝炎病毒 (Hepatitis B virus)	肝炎
腸球菌屬 ( <i>Enterococcus</i> )	尿道感染

## 2. 遺傳與 DNA

蛋白質是細胞重要的組成物質，係二十種胺基酸以各種順序相連的高分子。製造蛋白質時，那個胺基酸以何種順序排列是由 DNA 的鹼基序列指定；而 DNA 上的鹼基序列決定了蛋白質分子的胺基酸序列，進而決定了此蛋白質分子之構造及功能。然 DNA 要製造蛋白質需要如下所述之三種核糖核酸 (RNA) 的協助。RNA 是單股鏈狀分子，也是核酸的一種，雖與 DNA 同以糖、磷酸、鹼基形成的核苷酸的構成單位，但 RNA 的糖為核糖 (ribose)，四種鹼基中的 A、G、C 與 DNA 相同，但 T 則被尿嘧啶 (uracil, U) 取代。RNA 依角色不同，分為 mRNA (messenger RNA)、tRNA (transfer RNA)、rRNA (ribosomal RNA) 三種。此三種 RNA 之順序均由 DNA 來決定，即 DNA 將遺傳訊息經由 RNA 聚合作用傳遞給 RNA 分子，此過程稱為轉錄。

## 3. DNA 的複製

DNA 的複製在自然的狀況下，會在某特定點開始分開成為兩條單股 DNA。細胞內分別含有許多擁有 A、T、G、C 鹼基的核苷酸，這些核苷酸對應單股 DNA 的鹼基排列方式連接成新股 DNA。DNA 兩股的鹼基並不相同，一股的鹼基序列為另一股鹼基序列的模版。DNA 合成時都是從

5' 到 3' 的方向，所以在 DNA 複製時，一股是連續的複製，另一股則是不連續的複製，兩股的複製機制有一些不同。故每條雙股 DNA 由原來的一股 DNA 與新合成的一股 DNA 構成，所形成的兩條雙股 DNA 與原來的雙股 DNA 一模一樣。

## 四、微生物之傳統檢測法

傳統的鑑定是在感染部位或從臨床檢體取一些樣本培養後，以生長型態及生化反應來鑑別病原菌。有時也採用生化套組來鑑定，如 API (Hazelwood, Mo.)、RapID (Remel, Leneza, Ka.) 等。

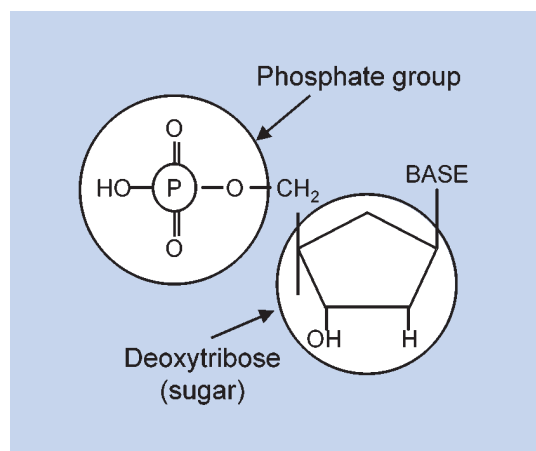


圖 1. DNA 之基本組成。

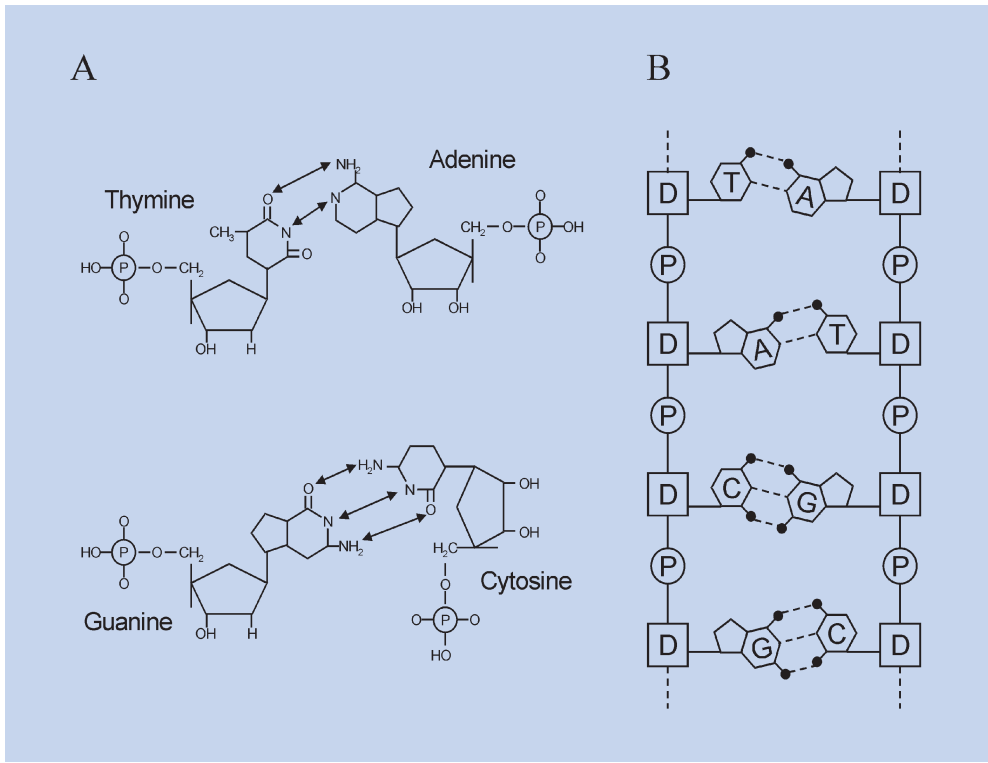


圖 2. (A) DNA 之基本結構 (A、T、G、C 四種核苷酸) 及它們之間的配對；(B) 雙股的 DNA 片段由 A-T 或 G-C 結合而成。

一般細菌的生長比真菌快，大約 24 小時便可長出一定的菌落來進行型態的觀察。真菌中，酵母菌的生長需要 24 - 72 小時，而黴菌則需要 3 到 7 天不等的培養時間。不同的培養時間會造成醫師在診斷及藥劑用量上有時間的耽誤，對病人的安危有時影響很大。

本研究群主要針對引起真菌性疾病的病原菌，開發臨床微生物感染的快速鑑定方法。圖 3 所示為檢測真菌的流程。以鏡檢法觀察檢體中菌種的基本型態，同時將菌種以固體培養基培養，由其生長型態分辨酵母菌及黴菌兩大類。酵母菌的生長通常需要 24 至 72 小時的培養，才會有明顯的菌落長出。雖然白色念珠菌 (*Candida albicans*) 可以利用發芽管實驗 (germ tube test) (以血清將菌種培養三小時，然後利用顯微鏡觀察菌種是否有發芽管長出)，來與其他菌種區分。但其他念珠菌種如 *Candida glabrata*、*Candida krusei*，甚至 *Saccharomyces*、*Trichosporon* 及 *Rhodotorula* 等酵母菌種，也是重要的病原菌<sup>(1-3)</sup>，卻無法用上述方法鑑定。有些菌種有相同的生化反應，而且在特殊培養基上也有類似

的生長型態，因此傳統方法不但耗時且無法準確的鑑定。真菌對一般常用的抗真菌藥物 (如 fluconazole) 具不同程度的抗藥性<sup>(4,5)</sup>，因此若無法準確鑑定所感染的菌種時，在藥物的決定和用量上會有困擾，故發展快速鑑定真菌的方法有其重要性。

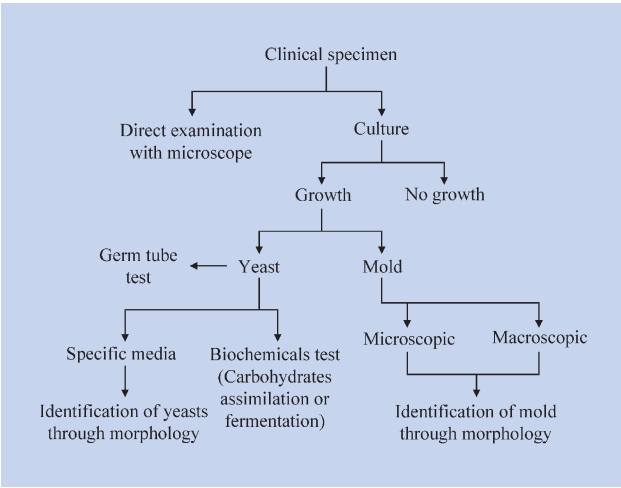


圖 3. 真菌的檢測流程。

## 五、分子生物學之方法

近年來科技的進步，帶動了分子生物技術的迅速發展，已有許多利用這些技術來檢測及鑑定微生物的成功例子<sup>(6,7)</sup>。甚至有許多的病原菌，不易由傳統的方法鑑定，卻可藉分子生物學法進行鑑定。這些技術具備快速、高靈敏度、特異性及再現性等優點<sup>(8)</sup>。

### 1. 聚合 連鎖反應

聚合 連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR) 為目前最普遍應用的分子生物技術，此技術為近代分子生物學開創出新的紀元。PCR 是一種可以在生物體外增殖 DNA 的技術，所需要的樣品量小，並可在短時間內將微量之 DNA 以 2 的次方倍放大幾百萬倍。圖 4 所示為 PCR 之原理，乃某一雙股 DNA 經過高溫加熱而分開成兩條單股 DNA，其次所選擇的引子 (primer) 將分別與這兩條單股 DNA 黏合後，在 PCR 的溶液內配合聚合 的協同作用複製成為兩條新的雙股 DNA。此程序反復進行，經過約 30 - 35 個適當溫控的循環後，DNA 的量因而呈指數增加。PCR 產物經由電泳分離後，在經過染色及紫外光照射後，即可觀察到結果。

PCR 之優點為敏感性高、特異性強、快速及簡便。在臨床上之應用也越來越廣，許多臨床微生物檢體，如細菌或病毒等，都需要經過培養以取得較大量的樣本後始能進行偵測。然近年來許多研究群改以 PCR 來檢測微生物。這樣非但可達到準確鑑定之目的，而且只需要微量的 DNA 樣本即可。由於一般的檢測過程都會遭遇樣本量太少而無法分析的問題，故許多研究者亦利用 PCR 配合其他分子生物學或是各種生物感測器來進行致病性微生物的偵測。表 3 為以 PCR 或配合其他偵測方法來快速鑑定酵母菌之發展過程。各研究群採用 PCR 增殖所要偵測的菌種後，再利用不同的分子生物學的方法，包括以限制 切割 DNA 片段或酵素免疫分析法來鑑定之，這些方法將在下文做詳細的介紹。

#### (1) PCR 反應

PCR 反應過程中，必須有三個程序： 變性

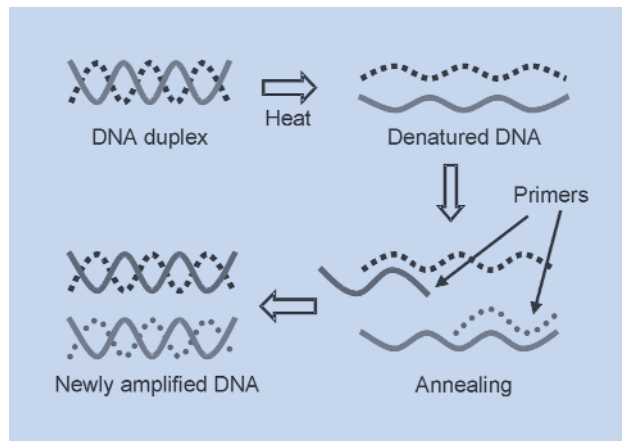


圖 4. PCR 之原理。

(denaturation)：高溫 (90 - 95 °C) 加熱使雙股 DNA 分開成兩條單股 DNA，一般所需時間為 1 - 5 分鐘； 粘合 (annealing)：此時單股 DNA 將在一適當之溫度下與所選擇之引子結合。一般溫度控制在 30 - 65 °C，依所選擇之引子而定，時間為 0.5 - 1 分鐘；以及 延伸 (elongation)：引子結合上 DNA 後，在 *Taq* 聚合 的催化下，按照單股 DNA 之序列的情報延伸而合成其互補性之 DNA 片段，一般溫度為 65 - 75 °C，且需時 1 - 4 分鐘。這三個程序連續循環 25 - 40 次，DNA 之量將會增加幾百萬倍。一般 PCR 產物經過凝膠電泳 (gel electrophoresis)、溴化乙啶 (ethidium bromide) 染色處理後，藉由紫外光的照射便可觀察其結果。

#### (2) PCR 之其他技術

除了運用最基本的 PCR 增殖原理外，還有其他新的技術先後發展出來。 反轉錄 PCR (reverse transcription PCR, RT-PCR)：這種技術是以 RNA 為樣本。由於 *Taq* 聚合 只適用於對 DNA 催化，所以當待測物是 RNA 時，需將之與逆轉錄 (reverse transcriptase) 合成 cDNA，然後再進行 PCR 反應增殖。 套式 PCR (nested PCR)：此方法是將第一次之 PCR 產物作為第二次 PCR 反應之模版來選擇其互補的序列。這種技術可以提高靈敏度及特異性。

多套式 PCR (multiplex PCR)：此方法利用多對引子同時進行 PCR，其好處在於可同時檢測有多處基因突變的序列或是可同時鑑定多種菌種。

年份	鑑定方法	靈敏度	鑑定時間	參考文獻
1992	RAPD	NA*	NA	9
1993	Nested PCR + REA or hybridization	NA	1 day	10
1994	PCR	1 - 2 cells	NA	13
1994	PCR + dot-blot hybridization	NA	NA	11
1995	PCR + REA	NA	~ 1 day	12
1995	PCR + EIA	NA	NA	13
1996	RAPD	NA	NA	14
1997	PCR + hybridization	1 CFU/mL	< 12 hr	15
1997	PCR + EIA	100 cell/0.2 mL	7 hr	16
1998	PCR + EIA or southern blotting	1 - 4 cell/mL	8 hr	17
1998	PCR + EIA	NA	7 hr	18
1999	PCR + CE	NA	< 7 hr	19
1999	PCR + REA	5 CFU/mL	24 - 36 hr	20
2000	PCR + liquid hybridization	2 - 20 CFU/mL	< 2 days	21
2000	PCR + LiPA	2 - 10 cell/mL	8 hr	22
2000	PCR + CE	NA	NA	23
2000	Nested PCR	2 cell/mL	6.5 hr	24
2000	PCR + EIA	1 cell/assay	6 hr	25
2000	PCR + cross-blot hybridization	2 cell/mL	7 hr	26
2001	PCR + EIA	NA	NA	27
2001	PCR	NA	5.5 hr	28
2001	PCR	20 CFU/mL	< 8 hr	30

\*NA: not applicable; RAPD: random amplified polymorphic DNA analysis; REA: restriction enzyme analysis; EIA: enzyme immunoassay; CE: capillary electrophoresis; LiPA: line probe assay

### (3) PCR 引子的設計

以上的技術都必須有特定的引子才会有高靈敏度及高特異性，所以引子之選擇是非常重要的。引子是一段設計合成與要測試 DNA 片段之互補的核苷酸，可分為三大類： 普遍性引子 (universal primer)：針對微生物的核糖體 DNA 片段而設計的； 專一性引子 (species-specific primer)：針對某特定菌種或菌株可增殖之 DNA 片段而設計的，

隨機增殖多型性引子 (random primer)：可任意增殖任何菌種之任何 DNA 片段，並不需要了解 DNA 之序列而可直接進行增殖。而所擴增出來之 DNA 片段有很大的差異，一般用在同種不同菌株之區別。這種引子通常是以單一引子進行增殖，而前兩種則是需要一對引子才可以進行複製。由於這種引子沒有專一性，因此在 PCR 反應時，粘合引

子之溫度需比較低，一般是在 30 - 50 °C 之間，而且引子之核苷酸數通常較少。

許多研究群利用這些不同的引子對基因突變或菌種鑑定進行研究。在 1992 年，Miyakawa 等<sup>(29)</sup> 利用 PCR 區分 *C. albicans* 與其他菌種，此方法之靈敏度為 2 - 10 cells。Niesters 等<sup>(15)</sup> 也利用套式 PCR 來鑑定念珠菌種。Makimura 等<sup>(13)</sup> 由真菌的 18S rRNA 序列中設計合成一對普遍性引子，以識別真菌種類，其偵測靈敏度可達 1 pg 之 DNA。在 1996 年 Liu 等<sup>(19)</sup> 利用隨機增殖多行型引子來區分各念珠菌菌種。他發現以這種方法來鑑定不同的菌種的效果非常好。本研究室也利用多套式 PCR 之方法來鑑定引發菌血症之酵母菌，PCR 之靈敏度可達 4 pg 之 DNA<sup>(30)</sup>。PCR 技術固然好，但是它本身只是一種 DNA 增殖的工具，依然需靠凝膠電泳分析其

表 3.

以 PCR 快速鑑定酵母菌之發展過程。

結果，在樣本數量及解析度的限制下，使鑑定工作出現困難度，所以許多研究者利用 PCR 配合其他偵測儀器以提高檢測效率<sup>(31-35)</sup>。

## 2. 脈衝式電場凝膠電泳法 (PFGE)

首先將臨床樣本培養在固狀或液狀培養基上到一定程度，然後取出與凝膠混合後，再用溶劑 (detergent-enzyme) 將菌之 DNA 以限制 (restriction enzyme) 切割，最後再利用凝膠電泳分離。經切割後的 DNA 之分子量大小不同，所以會使其在電泳中之移動率隨施加的電場方向及大小而產生差異。由於各菌種之 DNA 序列不同，而使所切割的片段會有差異，所以經過溴化乙啶染色後便可以在紫外線照射下觀察其不同點。這種方法雖然好，但費時，需要 2 到 3 天的時間才可將樣本完整分析出來。

## 3. 南方點墨法 (Southern Blotting)

南方點墨法是最早用來區分菌種 DNA 的技術。此方法利用限制將 DNA 切開，經過凝膠電泳分離後，轉印到硝酸纖維素或尼龍濾紙上，再與有標誌之特定的 DNA 探針雜交，然後觀察各菌種被限制切開後的位置來進行鑑定。

## 4. 限制性片段長度多態性 (RFLP)

這種方法乃是利用少切點的限制將特定的 DNA 片段切開，其切割後的片段結果將會明顯的比脈衝式電場凝膠電泳法與南方點墨法來得少，在電泳上看起會比較簡單。但是其區分效果一般比脈衝式電場凝膠電泳法差。Williams 等<sup>(17)</sup> 在 1995 年以 PCR 及 RFLP 來鑑定念珠菌種，而在 1999 年這種技術被 Velegriaki 等<sup>(36)</sup> 用來鑑定真菌之種類。

## 5. 酵素免疫分析法

酵素免疫吸附分析法 (enzyme immunosorbent assay, EIA) 是一個相當普遍用來偵測及鑑定菌種的方法。此方法是利用抗原抗體結合的反應特性。將欲測試之抗原或抗體附在一固相 (solid phase) 上，反應後產生的聚合體亦隨之結合在固相上，再加入酵素受質，使其呈色，最後將訊息傳出，達到定量

分析之目的。固相之選擇有許多因素考量，如在一定的體積下，要能附著高量的抗原抗體，附著後解離度要低，且附著後對巨分子的三級結構不能有太大的影響，才能保有免疫反應的特性。最普遍的固相是由塑膠材料製成的微量反應盤 (microliter plate)。目前免疫反應都有完善的偵測系統可以判讀訊號。不同的基質將需要不同的偵測儀器。如呈色基質 (chromogenic substrate) 要用比色計 (spectrophotometer)，螢光計 (fluorometer) 則偵測螢光基質 (fluorogenic substrate)，而冷光基質 (luminogenic substrate) 是利用冷光計 (luminometer) 偵測的。一般偵測 DNA 都是在微量反應盤上反應，然後以比色計偵測其反應<sup>(18,21,23,30)</sup>。雖然 EIA 有高等異性及高敏感性，即利用抗體的專一性及酵素不斷催化基質的功能加強敏感度，其反應後要將未結合的抗原抗體與固相上之聚合體分離之清洗 (washing) 步驟相當複雜。Fujita 等<sup>(18)</sup> 利用 PCR-EIA 之方法來偵測血液中念珠菌之感染，其靈敏度可達每毫升 10 個 *C. albicans* 細胞。另一組研究群，Shin 等<sup>(21)</sup> 也同樣的以 PCR-EIA 檢測陽性血瓶中之念珠菌，其靈敏度提高為 1 個 *C. albicans* 細胞/2  $\mu\text{L}$ ，而偵測時間只需 7 小時。

## 六、生物晶片

近年來因人類基因密碼的解開而使生物晶片蓬勃發展。生物晶片是當今一種可以提供快速分析生物化學的重要工具。它屬於微型裝置，科學家把大

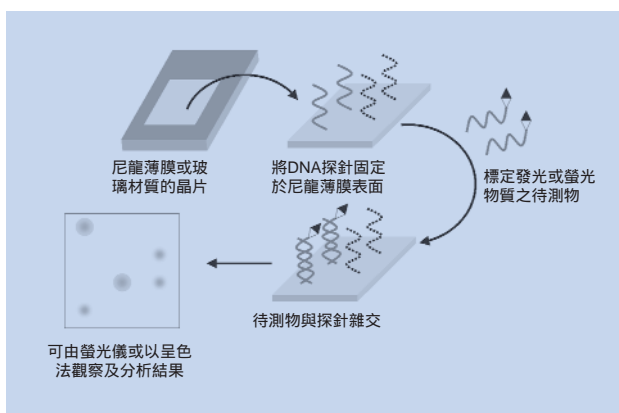


圖 5. DNA 晶片之檢測過程。

量特定的生物材料依序放在一片非常微小的玻璃、矽片、塑膠或尼龍薄膜等材質上，然後可用於各種的生化測定。這種方法既快速又準確，而且其靈敏度及重複性又高，不但可以節省時間還可以減低人力資源。目前有人利用此技術來分析 DNA 序列以檢測出基因突變的所在點，亦可對微生物或是病原菌作分類及鑑定。一般高密度排列整齊的晶片稱為微矩陣技術 (microarray)。目前比較普遍的有 DNA 微矩陣 (DNA microarray)、蛋白質微矩陣 (protein chip) 及生醫感測器晶片 (biosensorchip)，以 DNA 微矩陣發展最快。DNA 微矩陣是將數千或數萬個單股 DNA 或 cDNA 片段，以高密度之點陣固定在特定材質上，如圖 5 所示。若待測物是標有發光或螢光物質之 DNA (稱為 target)，當與固定於表面的互補 DNA 探針雜交後，可由呈色法或晶片檢測儀來分析其結果。

目前許多在臨床應用上具有潛力的 DNA 晶片不斷被發展出來，最主要運用在基因表現分析及快速檢測病原菌。根據 Khan 等<sup>(37)</sup> 的報告，利用 DNA 微點陣之技術，可以提供科學家對目前人類所罹患的疾病，透過基因表現有更進一步的認識，在診斷上有更準確的判斷。在一個面積小 (1 cm<sup>2</sup>) 的晶片表面固定上 25000 個 cDNA 探針，然後與互補之 cDNA 進行雜交反應。晶片上的基因表現

則利用雷射顯微鏡將影像傳送到電腦進行分析，由此可得知那些基因有異常的表現，進而找出引起疾病的原因，以提供正確的疾病治療。在 Young 等<sup>(38)</sup> 的報告中指出，除了疾病的診斷及治療外，DNA 微點陣還可以被利用在醫療藥物的發展上，不僅如此，此技術也可以配合 PCR 技術鑑定引起感染病之微生物，是一個又快又準確的鑑定方法。目前 DNA 晶片之發展大多著重於人類基因之表現，以便可以有適當的治療或預防遺傳疾病的發生<sup>(39-41)</sup>。另一方面，對於各種病原菌之偵測也在積極的研發中<sup>(42,43)</sup>。

### 1. DNA 晶片的製造

DNA 晶片的製造可分為三種：(1) 機械點記法 (mechanical spotting)：以機械手臂將已合成的 DNA 探針點觸到晶片上；(2) 噴墨法 (ink-jetting)：用噴墨印表的技術將已合成的 DNA 探針噴點到晶片上；(3) 光罩法 (photolithography)：目前是 Affymetrix 公司所使用的技術，一層一層的用光罩法將鹼基固定在晶片上。首先必須在晶片上修飾連結體及保護膜，保護膜將因紫外光的照射而被破壞，而 DNA 鹼基則是透過生化反應被固定在被破壞之保護膜位置。機械點記之技術最簡單而且價位低，但是其產量較低。噴墨法最普遍，因為其成本

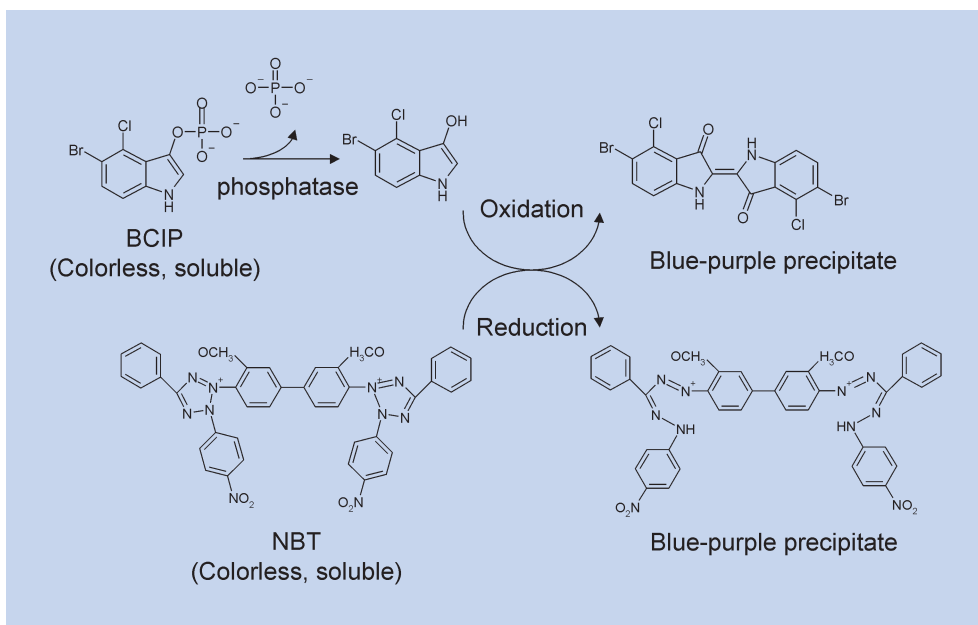


圖 6. DNA 晶片的酵素呈色反應機制。

較低且有高密度的產品。至於光罩技術，雖然可以有多變化、高密度及產量高的晶片，但是其成本高而且製作時間長。

## 2. DNA 探針之設計

DNA 晶片特性首重具有高特異性的 DNA 探針，即是固定於晶片上的單股 DNA 將與待測 DNA 進行雜交反應而提供準確的鑑定結果。每一種菌之 DNA 探針必須是高專一性，這樣在進行雜交反應時，才不會因交叉反應而錯誤判斷結果。在選擇 DNA 探針時必須注意下列幾個條件：

核苷酸之長度：一般是 20 - 30 個核苷酸，太短會減低其專一性，太長並不會提高專一性，反而在合成時會增加費用； 核苷酸之熔解溫度 (melting temperature, Tm)：一般溫度範圍在 55 - 65 °C，溫度太低會降低靈敏度及專一性； 探針之序列：G 與 C 的總數量應在 40% 以內，序列要避免有連續 5 個相同的核苷酸 (例：-AAAAA- 或 -GGGGG-)，或在探針的 3' 端要防止 G 與 C 的含量太高，因為會產生非特異性的結合，造成探針的專一性減弱；

物理特性：要防止探針本身的互補現象，這會減低可與待測 DNA 結合之引子的量； 探針之間的相互作用：探針間互相雜交會使欲與待測 DNA 結合之探針量減少，而使雜交的靈敏度下降； 待測 DNA 之長度：一般在 700 - 1000 bp 以內，過長 DNA 片段會影響雜交的效果。

表 4.

國外生物科技公司與其生物晶片產品。

公 司	產 品	產品簡介
Affymetrix (www.affymetrix.com)	GeneChip	主要研發造成基因突變的基因晶片
Research Genetics (www.resgen.com)	GeneFilter microarray	探討人類無表現的基因表現
CLONTECH (www.clontech.com)	Atlas cDNA arrays	研究哺乳類動物細胞週期基因的表現
Incyte Genomics (www.incyte.com)	Membrane expression arrays	主要針對人類基因表現，也研究植物組織裡的基因序列
Genometrix Inc. (www.genometrix.com)	Expression microarray	主要針對致癌基因
Vysis Inc. (www.vysis.com)	Genomic microarray	主要針對致癌細胞
Display System Biotech (www.displaysystems.com)	DiscoveryARRAY Gene Display	探討人類基因序列的表現

## 3. 偵測方法及結果分析

雜交反應之前，待測 DNA 必須先進行處理。待測 DNA 以 PCR 擴增特定的 DNA 片段。此時的引子是以放射性元素、螢光或非放射性物質為標記物，以便雜交後可觀察結果。目前較少用放射性物質因為其保存期限較短，且有危險性，故改用螢光物質或非放射性物質，如生物素 (biotin) 及毛地黃素 (dioxigenin)。DNA 晶片在雜交反應之後，可利用不同的分析儀器來觀察其結果。由於生物素本來就存在於生物體內，在反應過程中會造成干擾。所以只存在於毛地黃植物 (digitalis) 中<sup>(44)</sup> 的毛地黃素已逐漸的成為首選標記物。

### (1) 酵素呈色法

當酵素抗體與待測 DNA 片段上的抗原結合後，加入呈色受質，受質被酵素催化形成不溶性的有色物質。這種方法的好處在於呈色快，且不需特殊儀器來分析結果。毛地黃素 (digoxigenin) 與抗毛地黃素之抗體有極高結合能力，不但具高靈敏度，還有低背景值的優點<sup>(45)</sup>。抗毛地黃素之抗體通常帶有鹼性磷酸酵素 (alkaline phosphatase, AP)，而其受質為 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate (BCIP) 及 nitroblue tetrazolium salt (NBT)，圖 6 所示為酵素呈色的原理，在 AP 的催化下，BCIP 之磷酸根會被氫鍵取代，而後被氧化形成 5,5'-dibromo-4,4'-dichloroindigo。同時，NBT 將與兩個氫結合而形

公司 / 研究機構	產品
晶宇生物科技公司 (www.biodr-chip.com.tw)	腸病毒型別鑑定晶片、病原體抗藥性及分型晶片、動物疾病檢驗、食品病原菌檢測
工業研究院 (www.itri.org.tw)	微流體晶片、發燒晶片
晶 生化科技股份有限公司 (www.genemaster.com.tw)	MasterGene™、GalazyGene™、腦膜炎晶片、蛋白質晶片
佑寧生物科技股份有限公司 (www.u-gene.com.tw)	蛋白質晶片、抗癌生技及基因藥品

表 5.  
國內發展生物晶片的研  
究機構。

成 diformazan，與受質反應後可由顏色上的變化 (由無色變成藍紫色) 來鑑定菌種。酵素呈色法適用於尼龍薄膜上的雜交反應。

## (2) 螢光分析法

螢光分析法是一種簡單及可信賴的偵測方法。螢光抗體與待測的 DNA 抗原結合，置於紫外光線下，會出現綠色螢光 (fluorescein) 或紅色螢光 (rhodamine)。FITC (fluorescein isothiocyanate) 和 TMRITC (tetramethylrhodamine isothiocyanate) 為實驗室常用的螢光劑，因為 isothiocyanate 的衍生物較穩定，能與抗體蛋白質分子上的 free amino group 鍵結成 carbamido linkage。大多數的螢光物質是屬於有機物環狀結構，當分子被適當波長的光線激發，分子的電子因吸收光線的能量而跳躍至較高的能階 (激發態)，然後激發態的電子釋放出能量 (光子) 而回到基態。各種螢光物質有特定的吸光波長，fluorecein 會吸收 492 nm 的波長，而發射出 520 nm 呈黃綠色的光，rhodamine 則吸收 550 nm 的波長，發射出 580 nm 成橘紅色的光。由於螢光會隨時間逐漸消失，因此必須利用 X 光軟片把反應結果感光以便保存。

## (3) 電化學分析法

電化學分析法的主要原理為利用生物分子在電化學上的電子傳輸作用 (electron transfer)，即氧化還原反應，作為訊號產生方式，這些訊號包括電流 (amperometric)、電壓 (potentiometric)、電導 (conductance) 及電阻抗 (impedance)。對 DNA 的偵測是當兩股單股 DNA 經雜交後形成雙股 DNA，透過結合在 DNA 中的雜交指示劑 (hybridization

indicator) 之氧化還原反應，進而偵測待測 DNA 是否有與探針結合。當待測 DNA 與固定在電極表面的探針結合時，指示劑在電極表面之濃度會增加，由所量測到的電流訊號可以知道待測 DNA 結合之量。這些雜交指示劑包括 cationic metal complexes<sup>(46)</sup>、intercalators<sup>(47)</sup> 及 groove binder<sup>(48)</sup>。掃描電化學顯微鏡 (scanning electrochemical microscope, SECM) 是把樣品基材和微探針電極，置於含電解質溶液的電解槽中，當探針電極慢慢靠近基材表面時，發生電化學反應而產生法拉第電流 (Faradic current)。探針電極可作三維掃描，同時把法拉第電流轉化，而得知基材表面形貌，並可推導相關電化學反應。這些電化學反應主要發生於探針電極和樣品基材。掃描電化學顯微鏡已成功應用於觀察基材表面形貌，及對數種基材 (Si、Cu 等) 進行沉積、蝕刻等作用。亦可直接於基材掃描、蝕刻圖案，比傳統光學微影簡便。若縮小電極探針，可達奈米級微影解像度。此技術也開始應用在生化領域。Shiku 等<sup>(49)</sup> 以 SECM 來偵測極少量的癌細胞特有的抗原 carcinoembryonic antigen (CEA)。他們利用山葵過氧化 (horseradish peroxidase, HRP) 促進 ferrocenylmethanol (FMA) 的氧化還原反應，並透過 SECM 來偵測過氧化氫 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 的改變，以便得知 carcinoembryonic 抗原與其抗體結合的結果。此方法可以在半徑為 20 μm 的點內偵測大約 10<sup>4</sup> 的 CEA 分子。其他用來偵測的物質有 glucose oxidase (GOD) 及 fluorescein isothiocyanate (FITC)<sup>(50)</sup>。

國外在這方面的發展相當快，許多基因晶片已經商品化，大部份的產品是應用在臨床基因表現上，用來檢測各種基因疾病的源由。國內則有許多生物科技公司及研究機構，如工研院、中央研究

院、各所大學的相關研究單位等，已極集開發相關產品及研究，將台灣帶入分子醫學診斷的領域，並配合微小化技術將使產品更精細。表 4 及表 5 分別為國內外一些生物晶片的研究機構及其產品與研究方向。Affymetrix 是國外製造微矩陣的著名公司，發展相當多的基因晶片，而國內晶宇生技公司則是國內首家製造出腸病毒感染晶片的公司。

本研究室目前在發展一套檢測真菌之 DNA 晶片。其原理是把致病性真菌之 DNA 探針在尼龍膜片上點成微點陣，經過紫外線照射處理使之固定後，將要偵測之 DNA 檢體與點陣上之探針做雜交。本實驗所選擇的探針有 20 至 30 個核苷酸，是以非共價鍵與膜片接合。DNA 檢體先用有標記毛地黃素之引子進行增殖，然後再與已標定酵素之抗毛地黃素抗體結合。當加入受質時，酵素將催化受質使其呈色，可以以肉眼觀察，最後再依據反應點之探針鑑定檢體之種類。圖 7 所示為本實驗製作 DNA 微點陣之過程。若是標定物為螢光物質，亦可利用螢光顯微鏡觀察其反應。

## 七、結論

隨著社會的進步、科技的發達，各領域皆積極研發生物科技的技術，希望能夠多了解 DNA。這些相關資訊非但可以應用在遺傳學、細胞學、結構生物學、基因學上，對於臨床檢測、醫藥的研發或農業發展上也扮演極重要的角色。因此，近年來應用分子生物學並配合以電化學、光學、聲波學為基礎之 DNA 感測器陸續被發展出來。隨著醫藥界的需求，更微小化、快速、簡便且高靈敏度的 DNA 偵測方法，許多不需經 PCR 放大過程之偵測技術及產品亦將被開發出來。

## 參考文獻

1. G. Samanis and D. Bafaloukos, *American Journal of Medicine*, **94**, 577 (1992).
2. A. Voss, J. A. J. W. Kluytmans, J. G. M. Koeleman, L. Spanjaard, C. M. J. E. Vandenbroucke-Grauls, H. A. Verbrugh, M. C. Vos, A. Y. L. Weersink, J. A. A. Hoogkamp-Korstanje, and J. F. G. M. Meis, *European Journal of Clinical Microbiology Infectious Diseases*, **15**, 909 (1996).

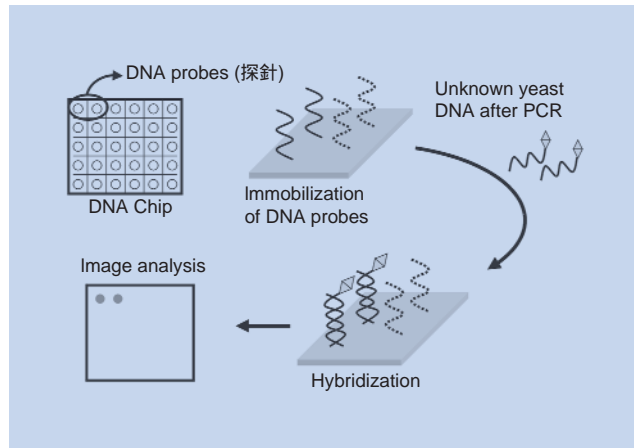


圖 7. 本研究室之真菌 DNA 晶片。

3. K. Jr. Vladimir and G. Kovacicova on behalf of the Slovak Fungaemia study group, *Diagnosis Microbiology Infectious Diseases*, **36**, 7 (2000).
4. J. H. Rex, M. G. Rinaldi, and M. A. Pfaller, *Antimicrobics Agents Chemotherapy*, **39**, 1 (1995).
5. G. St-Germain, M. Laverdiere, R. Pelletier, A. M. Bourgault, M. Libman, C. Lemieux, and G. Noel, *Journal of Clinical Microbiology*, **39**, 949 (2001).
6. D. M. Olive and P. Bean, *Journal of Clinical Microbiology*, **37**, 1661 (1999).
7. J. E. Olsen, *Food Research International*, **33**, 257 (2000).
8. K. Makimura, S. Y. Murayama, and H. Yamaguchi, *Journal of Medical Microbiology*, **40**, 358 (1994).
9. P. F. Lehmann, D. Lin, and B. A. Lasker, *Journal of Clinical Microbiology*, **30**, 3249 (1992).
10. H. G. Niesters, W. H. F. Goessens, J. F. M. G. Meis, and W. G. V. Quint, *Journal of Clinical Microbiology*, **31**, 904 (1993).
11. A. R. Botelho and R. J. Planta, *Yeast*, **10**, 709 (1994).
12. D. W. William, M. J. Wilson, M. A. O. Lewis, and A. J. C. Potts, *Journal of Clinical Microbiology*, **33**, 2476 (1995).
13. S. I. Fujita, B. A. Lasker, T. J. Lott, E. Reiss, and C. J. Morrison, *Journal of Clinical Microbiology*, **33**, 962 (1995).
14. D. Liu, S. Coloe, S. L. Jones, R. Baird, and J. Pedersen, *FEMS Microbiology Letters*, **145**, 23 (1996).
15. H. Einsele, H. Hebart, G. Goller, J. Löffler, I. Rothenhofer, C. A. Muller, R. A. Bowden, J. V. Burik, D. Engelhard, L. Kanz, and U. Schumacher, *Journal of Clinical Microbiology*, **35**, 1353 (1997).
16. J. H. Shin, F. S. Nolte, and C. J. Morrison, *Journal of Clinical Microbiology*, **35**, 1454 (1997).
17. M. Flahaut, D. Sanglard, M. Monod, J. Billie, and M. Rossier, *Journal of Clinical Microbiology*, **36**, 395 (1998).
18. C. M. Elie, T. J. Lott, E. Reiss, and C. J. Morrison, *Journal of Clinical Microbiology*, **36**, 3260 (1998).
19. C. Y. Turenne, S. E. Sanche, D. J. Hoban, J. A. Karlowsky, and

- A. M. Kabani, *Journal of Clinical Microbiology*, **37**, 1846 (1999).
20. G. Morace, L. Pagano, M. Sanguinetti, B. Posteraro, L. Mele, F. Equitani, G. D'Amore, G. Leone, and G. Fadda, *Journal of Clinical Microbiology*, **37**, 1871 (1999).
  21. P. H. Hendolin, L. Paulin, P. Koukila-kahkola, V. Anttila, H. Malmberg, M. Richardson, and J. Ylikoski, *Journal of Clinical Microbiology*, **38**, 4186 (2000).
  22. C. Martin, D. Roberts, M. Van Der Weide, R. Rossau, G. Jannes, T. Smith, and M. Maher, *Journal of Clinical Microbiology*, **38**, 3735 (2000).
  23. Y. C. Chen, J. D. Eisner, M. M. Kattar, S. L. Rassouljian-Barrett, K. Lafe, S. L. Yarfitz, A. P. Limaye, and B. T. Cookson, *Journal of Clinical Microbiology*, **38**, 2302 (2000).
  24. E. E. M. Jaeger, N. M. Carroll, S. Choudhury, A. A. S. Dunlop, H. M. A. Towler, M. M. Matheson, P. Adamson, N. Okhravi, and S. Lightman, *Journal of Clinical Microbiology*, **38**, 2902 (2000).
  25. R. Wahyuningsih, H. J. Freisleben, H. G. Sonntag, and P. Schnitzler, *Journal of Clinical Microbiology*, **38**, 3016 (2000).
  26. B. Posteraro, M. Sanguinetti, L. Masucci, L. Romano, G. Morace, and G. Fadda, *Journal of Clinical Microbiology*, **38**, 1609 (2000).
  27. M. D. Lindsley, S. F. Hurst, N. J. Iqbal, and C. J. Morrison, *Journal of Clinical Microbiology*, **39**, 3505 (2001).
  28. S. Fujita, Y. Senda, S. Nakaguchi, and T. Hashimoto, *Journal of Clinical Microbiology*, **39**, 3617 (2001).
  29. Y. Miyakawa, T. Mabuchi, K. Kagaya, and Y. Fukazawa, *Journal of Clinical Microbiology*, **30**, 894 (1992).
  30. H. C. Chang, S. N. Leaw, A. H. Huang, T. L. Wu, and T. C. Chang, *Journal of Clinical Microbiology*, **39**, 3466 (2001).
  31. N. Bianchi, C. Mischiati, G. Feriotto, and R. Gambari, *International Journal of Oncology*, **4**, 903 (1994b).
  32. N. Bianchi, C. Rutigliano, M. Tomassetti, G. Feriotto, F. Zorzato, and R. Gambari, *Clinical Diagnosis of Virology*, **8**, 199 (1997).
  33. E. Kai, K. Ikebukuro, S. Hoshina, H. Watanabe, and I. Karube, *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, **29**, 283 (2000).
  34. S. Tombelli, M. Mascini, C. Sacco, and A. P. F. Turner, *Analytica Chimica Acta*, **418**, 1 (2000).
  35. S. Tombelli, M. Mascini, L. Braccini, M. Anichini, and A. P. F. Turner, *Biosensors & Bioelectronics*, **15**, 363 (2000).
  36. A. Velegraki, M. E. Kambouris, G. Skiniotis, M. Savala, A. Mitroussia-Ziouva, and N. J. Legakis, *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, **23**, 303 (1999).
  37. J. Khan, M. L. Bittner, Y. Chen, P. S. Meltzer, and J. M. Trent, *Biochimica et Biophysica Acta*, **1423**, M17 (1999).
  38. R. A. Young, *Review: Biomedical discovery with DNA arrays*, *Cell*, **102**, 9 (2000).
  39. J. J. W. Chen, R. Wu, P. Yang, J. Huang, Y. Sher, M. Han, W. Kao, P. Lee, T. Chiu, F. Chang, Y. Chu, C. Wu, and K. Peck, *Genomics*, **51**, 313 (1998).
  40. M. Schena, R. A. Heller, T. P. Theriault, K. Konrad, E. Lachenmeier, and R. W. Davis, *Trend in Biotechnology*, **16**, 301 (1998).
  41. N. L. W. Van Hal, O. Vorst, A. M. M. L. van Houwelingen, E. J. Kok, A. Peijnenburg, A. Aharoni, A. J. van Tunen, and J. Keijer, *Journal of Biotechnology*, **78**, 271 (2000).
  42. R. M. Anthony, T. J. Brown, and G. L. Frence, *Journal of Clinical Microbiology*, **38**, 781 (2000).
  43. J. DeRisi, B. van den Hazel, P. Marc, E. Balzi, P. Brown, C. Jacq, and A. Goffeau, *FEMS Letters*, **470**, 156 (2000).
  44. C. Kessler, *Nonradioactive labeling, and detection of biomolecules*, New York: Springer-Verlag (1992).
  45. C. Kessler, H. J. Holtke, R. Seibl, J. Burg, and K. Muhlegger, *Biology Chemistry Hoppe-Seyler*, **371**, 917 (1990).
  46. K. M. Millan and S. R. Mikkelsen, *Analytical Chemistry*, **65**, 2317 (1993).
  47. S. O. Kelley, J. K. Barton, N. M. Jackson, and M. G. Hill, *Bioconjugate Chemistry*, **8**, 31 (1997).
  48. K. Hashimoto, K. Ito, and Y. Ishomori, *Analytical Chemistry*, **66**, 3830 (1994).
  49. H. Shiku, T. Matsue, and I. Uchida, *Analytical Chemistry*, **68**, 1276 (1996).
  50. I. Turyan, T. Matsue, and D. Mandler, *Analytical Chemistry*, **72**, 3431 (2000).