

細菌性病原檢測之基因晶片簡介

吳嘉哲、張錦宜、林金榮

水產試驗所水產養殖組

生物晶片起源於 1980 年代後期，由 Affymetrix 公司以光導向平板印刷技術直接在矽晶片合成寡核苷酸點陣的高密度晶片，主要是利用玻璃或尼龍薄膜以及塑膠等材質所構成，其概念是來自電腦晶片，亦即將半導體策略應用在生物性分析系統中。生物晶片可區分為檢測型晶片和微流體晶片兩類，檢測型晶片又可稱為微陣列 (microarray) 晶片，又可分為基因晶片 (gene chip) 及蛋白質晶片 (protein chip) 二大類。微流體晶片則是指利用微機電系統技術的多功能性晶片，也稱為實驗室晶片。

目前全球生物晶片之發展以微陣列晶片發展和應用最為成熟，其主要特點是分析靈敏度高、專一性高、分析速度快，所需的檢測樣本和試劑少，可一次獲得整體性或平行化的實驗數據。基因晶片主要係利用專一性核苷酸探針 (small subunit rRNA, SSU rRNA)、DNA 序列的親緣關係以及建構演化樹系統 (unrooted phylogentic) 等原理為主要架構，在應用上遠較於其他種類的晶片操作快速且易於達成檢測目的，技術上也最為成熟 (賴，2005)。

在防疫檢測的基因晶片功能上，其特色是能同時平行檢測多種病原，也可以使用 PCR 或 ELISA 技術與基因晶片判讀結果進一

步映證基因晶片結果的準確性 (張和呂，2003)。防疫檢測的基因晶片可應用在細胞生理生化研究、防疫或生物醫學疾病檢測、動植物疾病 (張，2009) 的快速檢測、基因表達或食品檢測以及新藥品開發等多重領域。

細菌性檢測晶片製作流程可歸納成：標準菌株取得、演化樹建構、專一性探針設計、PCR 擴增、點片、探針強度固定、雜合反應、晶片判讀等。其中專一性探針具有影響基因晶片在檢測菌種數量和判讀分析上的準確性，就基因晶片而言，專一性探針扮演著重要的關鍵，以下就針對細菌性檢測晶片中的探針設計作一簡述。

DNA 是由 A-T-C-G 四種含氮鹼基隨機排列構成，DNA 序列排列的差異性取決於 DNA 含氮鹼基中 G + C% 含量，同種間的細菌 G + C% 含量差異約在 2—5% 左右，當 G + C% 差異大於 10% 以上，則可歸納成不同種的菌種，故 DNA 序列可作為種判斷依據，同時也是分類鑑定上的一項重要技術。細菌種間的親緣關係 (phylogenetic relationship) 是以 rRNA 作為演化樹序列支序圖的依據，rRNA 在演化上具有原始結構與序列、保守性高 (high conservation) 以及演化速率慢等重要特性。目前最常使用的菌種屬分子鑑定和分類標準方法包括了 16S rRNA 序列分析

與 16S-23S intergenic spaces (16S-23S IGS) (Warsen et al., 2004)。演化樹序列支序圖的構築是將不同菌種的同源基因(homologous genes)序列整齊排列，比較每個 DNA 位置上含氮鹼基的比例，將不同菌種之間的含氮鹼基比值視為演化距離 (evolutionary distance) 並且做出距離矩陣 (distance matrix) 建立序列支序圖，將支序圖上距離相近的菌種歸納成一類 (Takahashi and Nei, 2000)。

原核生物體中的三種核醣體 rRNA 分別為：16S rRNA (序列長度約 1500 個核苷酸)、23S rRNA (序列長度約 2300 個核苷酸) 及 5S rRNA (序列長度僅約 120 個核苷酸)，序列分析上 23S rRNA 序列長度是 16S rRNA 序列的 1.5 倍，在分析上困難度高，5S rRNA 的序列可提供的訊息少，16S rRNA 序列長度適中且能提供足夠的序列訊息。所以基因晶片的探針設計上所需的基因序列就是利用核醣體 (ribosome) 的 rRNA 基因序列來設計。rRNA 具有穩定三度空間結構和高保守度等特性，因此利用比較保守片段 (conservation regions) 以及變異片段 (variable regions) 的 rRNA 序列上的相互差異性，與細菌的 16S rRNA 基因資料庫來檢索及比對相似度，可設計出具有區別菌種間的特異性序列片段，進而合成專一性引子 (primer)，再以細菌的基因體 DNA 為模板進行 DNA 聚合酶鏈鎖反應來做為病原菌檢測技術；而與專一性引子相同原理，設計能區分不同菌種間的特異性片段序列合成的專一性探針，則可應用在基因晶片檢測技術上 (Rehnstam et al., 1989)。

而具有致病性的病原菌種則可以利用其 DNA 序列，或是利用現有基因庫的序列資料

中的互補核苷酸 (cDNA)，並且選用保守性高的 DNA 片段，設計成晶片探針 (probe) (Gonzalez et al., 2004)。在細菌性病原菌檢測上利用，僅需使用一片含有不同菌種探針的基因晶片便可同時進行多種不同病原菌之鑑定，在疾病檢測上是一種相當便利的輔助工具 (圖 1)。

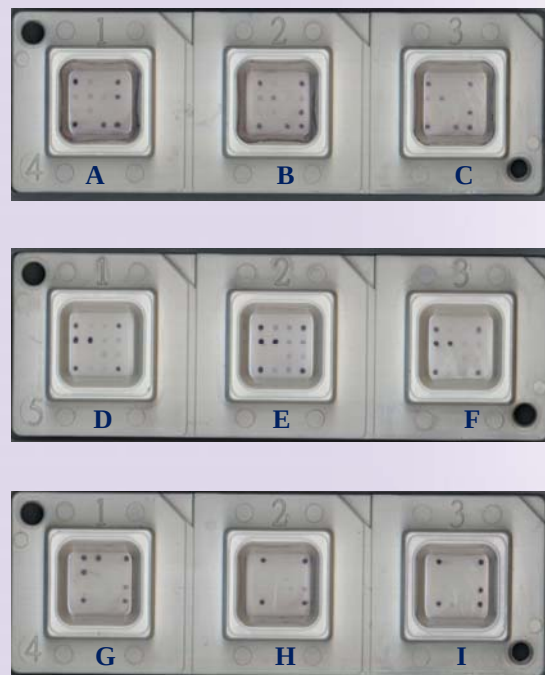


圖 1 專一性探針對水產病原菌株的檢測結果

- A. *Aeromonas salmonicida*
- B. *Edwardsiella tarda*
- C. *Escherichia coli*
- D. *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*
- E. *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*
- F. *Vibrio alginolyticus*
- G. *Staphylococcus epidermidis*
- H. *Enterococcus faecalis*
- I. *Mycobacterium fortuitum*