

# What's fun in EE

臺大電機系科普系列

## 跨領域研究的結合：生物晶片

莊曜宇／臺大電機系教授、生醫電子與資訊學研究所教授  
盧子彬／臺大電機系畢業、生醫電子與資訊學研究所博士

### 生物晶片的歷史與發展

生物晶片的發展開始於 1980 年代的後期，當時歐美許多大學、研究機構及公司的科學家都致力於相關技術的開發。生物晶片顧名思義和電腦晶片有許多類似的地方，如同它們都是微型化的晶片，可以同步及平行在很短時間內完成大量的分析研究，並且很多生物晶片的製造是利用或移植電腦晶片相關的技術。

舉例來說，過去科學家從事基因研究時，特別是探討基因表現時，一次只能偵測一個基因或少數幾個基因，若需要研究多個基因或蛋白質，其實驗流程上不僅相當耗時，也需要大量的人力資源。有了生物晶片的發明，科學家便可以同時檢測數萬個基因或是蛋白質，因此生物晶片已成為基因體學或是蛋白體學研究的一項利器。

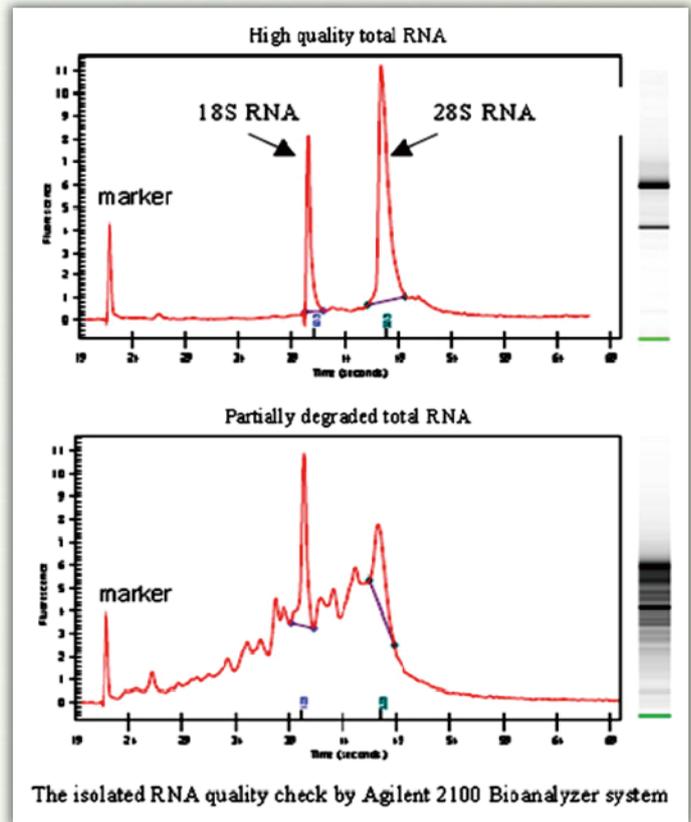
整體來說，生物晶片主要指的是在玻璃、塑膠、矽導體等等不同的化學材質上，透過現在的電機、機械與光學技術，在其表面上將生物分子固定，使得原本需在一整個實驗室進行的實驗，能夠縮小至單一晶片上即可執行，這樣子的實驗方法能大幅度減少樣品與實驗耗材的使用，且其實驗結果的精確度十分優良，因此能夠快速的產生大量且可信的數據，目前已成為生醫研究上之主流。

追溯生物晶片的發展歷史，從 1980 年代開始研究至今，市面上已有各式各樣的產品可供使用，其中發展最成功的晶片技術主要可以分為三種類型：晶片實驗室（Lab-on-a-Chip, LOAC）、奈米線電晶體（Nanowire transistor）和基因晶片微陣列技術（Gene Chip, microarray technology）。以下將針對此三者進行介紹：

#### 晶片實驗室（Lab-on-a-chip）：

此方法是透過微電機與電子技術，將微流體（microfluid）與微反應整合於一塊晶片上，使得複雜的實驗反應得以在微小化的單一晶片上進行，其主要的應用為

毛細管電泳晶片 (capillary electrophoresis)、聚合酶鏈鎖反應晶片 (Polymerase Chain Reaction) 等等。目前市面上最成功的 LOAC 晶片即為 Agilent 公司所出品的 Bioanalyzer 晶片 (圖一)，其主要功用為檢測去氧核糖核酸 (DNA)、核糖核酸 (RNA) 與蛋白質的樣本品質，使用者僅需將欲檢測的生物樣本滴入晶片便可以在三十至四十分鐘內獲得樣本品質檢驗結果，其實驗原理為在 Bioanalyzer 晶片上進行毛細管電泳，便可以透過圖像化的實驗光譜獲得樣本的光譜讀值，再將此讀值與標準品的光譜讀值進行比較，最終可以獲得定量後的樣品品質數據，相較於一般在實驗室中進行的凝膠、電泳等方法來確定樣本品質步驟而言，晶片實驗室的方法將可以縮短近乎一倍的實驗時間，且可以一次性的檢驗大量實驗樣本，大幅度的提升了實驗效率。



圖一 Agilent Bioanalyzer 晶片實驗結果

### 奈米線電晶體 (Nanowire transistor) :

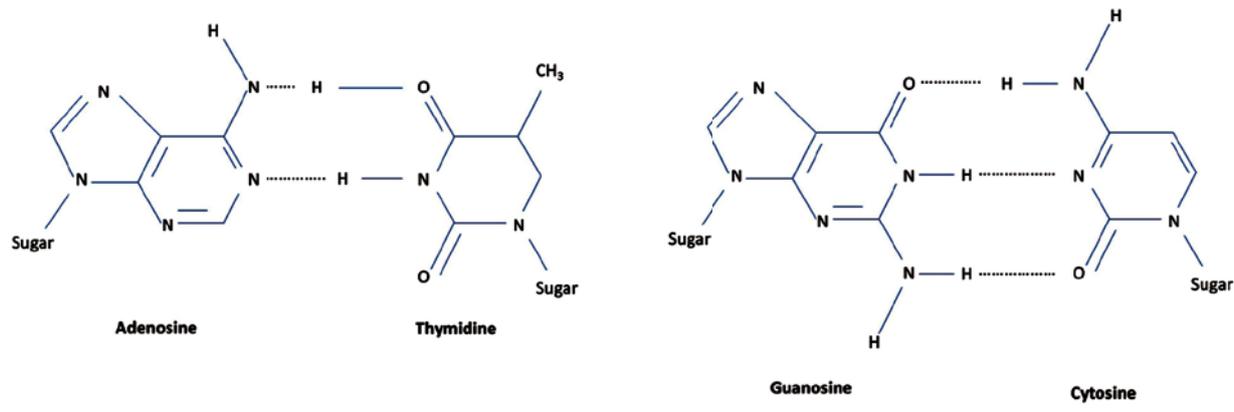
隨著微電子與半導體技術的快速發展，目前亦有許多研究人員嘗試將奈米線 (nanowire) 電晶體技術帶入生物晶片領域，其中主要是利用電晶體 FET 的特性作為癌症細胞早期診斷之用。由於目前癌症的診斷困難，許多癌症的惡性原因皆為無法早期發現，因此若能在血液中偵測出離散的癌細胞，將會對臨床醫療有十分大的幫助。舉例來說，我們可以在 FET 的外層加入欲辨認生物標記 (biomarker) 的抗體，並串接在整個電晶體上，當抗體成功的捕捉了抗原之後，電晶體會因為阻抗的改變，而造成電晶體電壓與電流的變異，根據此項原理，我們便可以偵測出目標的生物標記是否有鍵結的情形，而利用奈米線電晶體的優勢便在於其非常靈敏的特性，相較於傳統的電晶體，奈米線電晶體具有較低的偽陽性，同時亦可以在生物樣本量極低的情況下進行工作，因此，相當適合作為血液中循環性癌細胞 (circulating cancer cells) 的偵測方式。

### 基因晶片微陣列技術 (Gene Chip, microarray technology) :

此實驗方法的開創，奠定了高通量生物醫學研究的實驗基礎，過去進行基因表現量研究時，學者必須針對有興趣的基因，一個一個的進行實驗，雖然此方法能成功的進行每一個基因的檢驗與偵測，但在人類基因組已知含有超過兩萬個基因的情形下顯得十分沒有效率，且此方法需在已清楚標的基因下進行實驗，若面對的是未知的疾病或新開發的藥物影響，將會需要研究者先行猜測可能的標的基因才能進行後續實驗，如此不僅容易陷入研究者本身的選取偏差，更可能無法找尋出具有相關性的嶄新基因。因此，在 80 年代末期至 90 年代間，許多公司、研究機構致力於開發新式的實驗技術，期望能夠對基因表現量進行地毯式的偵測，而能夠獲得整體性的變化情形，在此背景下，基因晶片微陣列技術便因此而被開發出來。此類型基因晶片微陣列實驗最重要的技術原理為核酸中的鹼基共軛互補概念 (圖二)，當我們找出一個基因的特殊序列足以代表該基因時，我們將此特殊序列稱為探針 (Probe)，再經過不同的方法將探針序列點製在晶片後，取出實驗樣本與該晶片進行雜合反應 (Hybridization)，若實驗樣本中含有與探針序列互補的片段時，此二者將會經過鍵結反應黏合在晶片上，最終經過洗滌液沖洗掉沒有接合在探針上的實驗樣本後，我們便可以使用雷射掃描器產生生物晶片的發光影像，再透



根據 DNA 分子模型之 A-T 與 C-G 互補配對原則，C 鹼基必定和 G 鹼基鍵配對，而 A 鹼基也必定和 T 鹼基結合。生物晶片的設計原理即根據此項配對法則，利用探針上的核酸引子序列與實驗樣本中的核苷酸序列進行雜合實驗，並根據探針序列的獨特互補性獲得單一的雜合效果。



圖二 基因晶片生物實驗原理

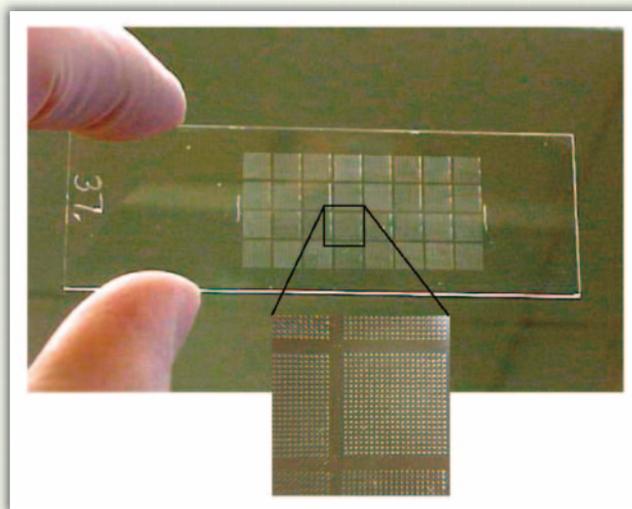
過各個探針螢光染劑的發光程度來測定該特定基因的表現量。這整個實驗過程可以想像成在一個充滿各式各樣魚群（基因）的大海（實驗樣本）中，我們替每一個基因設計了不同的釣竿（探針），而這些釣竿能夠透過互補原理精確的辨認出它們可以釣取的魚群，最終我們便可以藉由每一根釣竿上所帶有魚群數量，知道原本在實驗樣本中各基因的表現情形。而在經過近二十年的發展以來，基因晶片的製備方法可說是五花八門，各有其獨到之處，以下將分別介紹在具有設備下，實驗室可自行製作的點陣式晶片（spotted array）和四種目前市面上較常被使用的商用晶片實驗原理：

### 1. 點陣式晶片

此晶片的基底材料是經過表面鍍膜（coating）處理的玻璃片，再將預先製備好的 DNA 探針片段利用機械手臂透過純金製作的針頭快速且高密度的點製在玻璃片上。如圖三所示，其成品看起來便像是棋盤格一般，每個圓點代表的即為一個基因的探針，而每片晶片的探針總數可達到數萬甚至數十萬點，此影像亦為這類生物晶片又被稱為微陣列技術的由來。

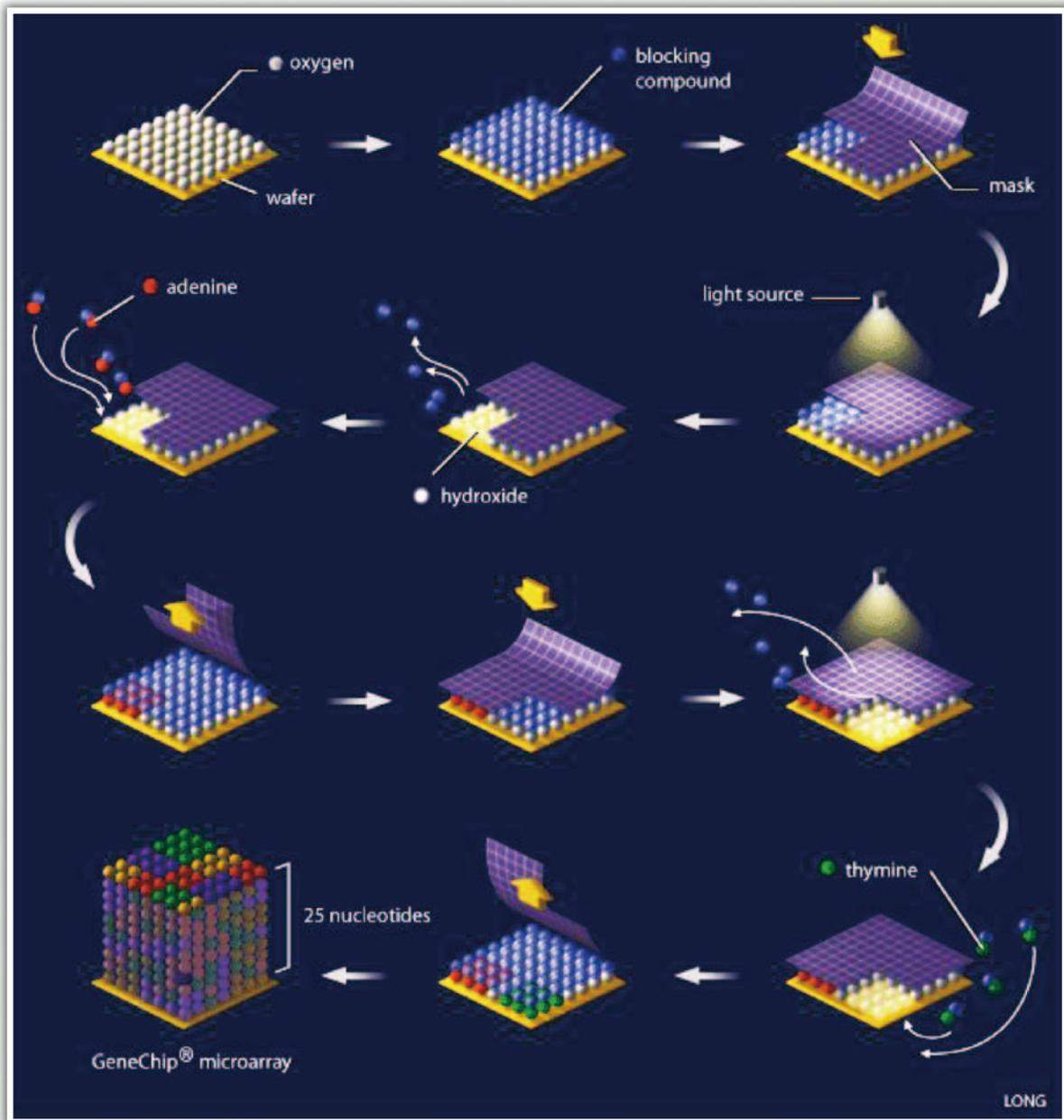
### 2. Affymetrix 晶片

此晶片製備的主要原理為 Affymetrix 公司研發出的光引導式 DNA 合成技術（light-directed synthesis），其中主要包含半導體製程中常使用的光學蝕刻法（Photolithography）及 DNA 化學合成部分。光學蝕刻法的流程如圖四所示，首先在一塊欲製備成生物晶片的晶圓（buffer）上，加上光敏性的阻擋性物質（blocking compound），此類物質的特性為在接受到紫外光照射後會離開晶圓並失去保護作用，接著再根據探針序列所需要的鹼基（A、T、G、C）位置設計不同的光罩（mask），在欲生成鹼基的區域將光罩挖空，使得紫外光可以直接照射在晶圓上並移除阻擋物質，最後放入該特定的鹼基與光罩挖空的位置進行耦合（coupling）反應而黏著在晶圓之上，最終重複放入阻擋性物質、光罩、照光、置入鹼基這四個動作，便可以在晶圓上生成具有特定探針序列的生物晶片，此方法成功的將電機工程的半導體實驗技術應用在生物實驗技術上，其產物穩定性及良率均高，是早期基因晶片微陣列市場中最具有影響力的商用品牌。



圖三 點陣式微陣列晶片



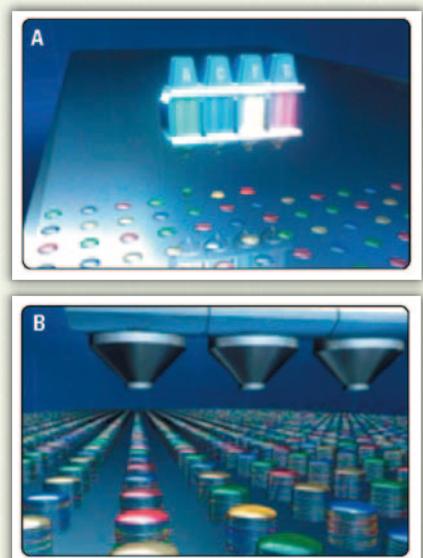


圖四 Affymetrix GeneChip

(<http://www.csbiotech.com.tw/kportal-deluxe/front/bin/fprint.phtml?Style=1&Part=affymetrix001>)

### 3. Agilent 晶片

談到 Agilent 公司的晶片製作原理就不得不提到其背後的母公司是以製作印表機聞名全球的 Hewlett-Packard Company，因此，Agilent 晶片的製作技術上有許多相似於噴墨印表機運作的步驟。我們可以把核酸中帶有的四種鹼基想像成一般彩色印表機含有的四色墨水（圖五），然後針對不同的探針序列，以噴灑四種鹼基的生物墨水方法，將核酸合成於晶片之上，晶片的可靠性十分優良。



圖五 Agilent SurePrint technology

(A) 四種鹼基以四色墨水圖像化。

(B) 針對不同的探針序列利用噴墨的方式將生物墨水合成於晶片上。

([http://www.chem.agilent.com/scripts/cag\\_filexfer.asp?iWHID=31888](http://www.chem.agilent.com/scripts/cag_filexfer.asp?iWHID=31888))

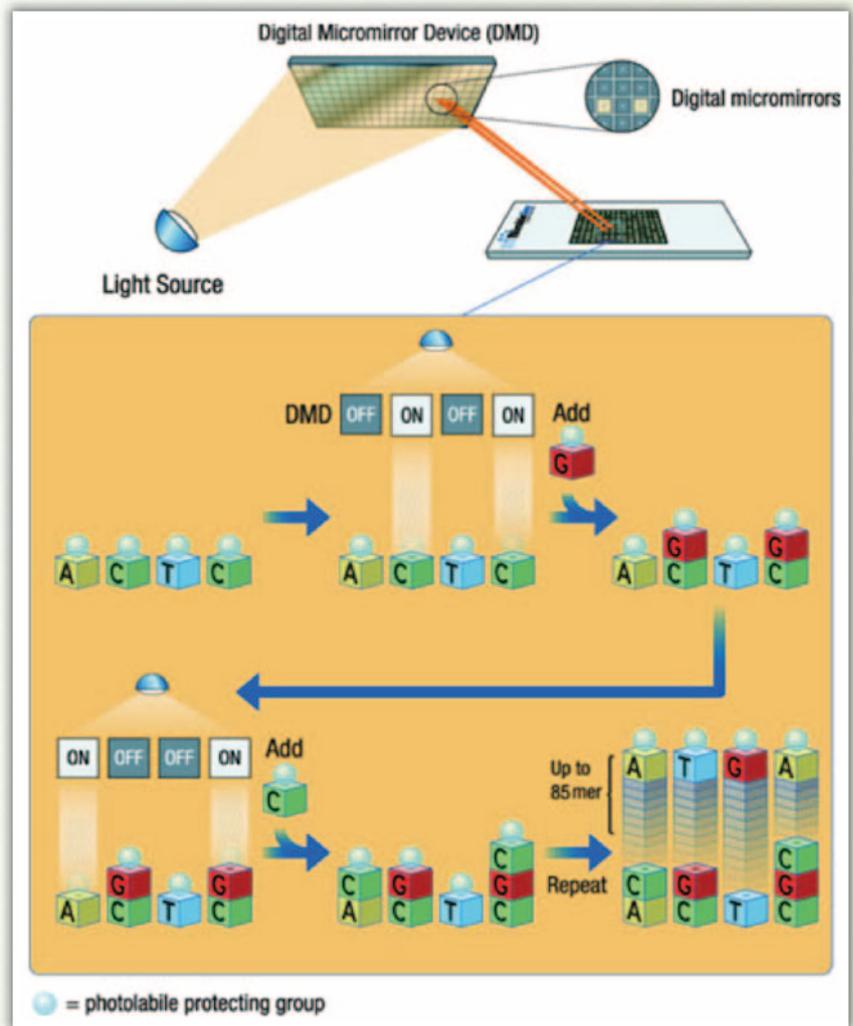


#### 4. Roche Nimblegen 晶片

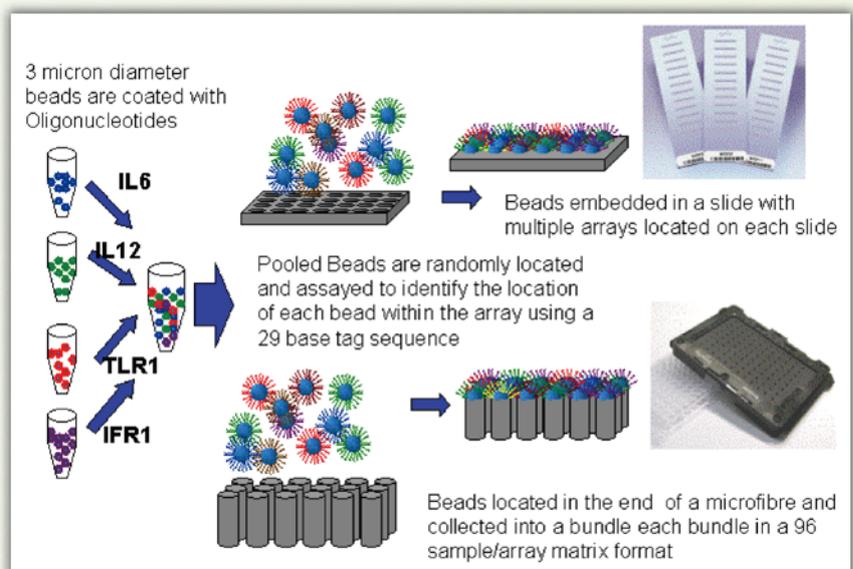
相較 Affymetrix 公司使用光罩作為進行光蝕刻的光源導引方法，Roche Nimblegen 公司則是透過數位微鏡面設備（Digital Micromirror Device, DMD）作為光源的開關控制（圖六），後續的核酸片段合成則十分類似，然而在 DMD 上進行控制鹼基合成與否遠較重新製作光罩簡單，成本亦低廉許多，因此在晶片設計上 Roche Nimblegen 公司較 Affymetrix 晶片來得彈性許多，使得客戶能夠根據其需求自行設計微陣列上需要的探針序列，而獲得許多研究人員的喜愛。

#### 5. Illumina 晶片

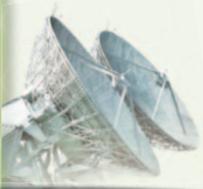
Illumina 公司所生產的微陣列晶片與上述幾種生物晶片有較大的不同，晶片上的探針並非直接在基質上進行耦合，而是先大量的被鑲嵌在磁珠上（圖七），最後這些磁珠才附著於載體的基質上成為晶片，其中載體可以利用兩種方式製作，包括在矽板上利用光學蝕刻（etching）或是使用光學纖維束（fiber optic bundle）。相較於其他廠牌的生物晶片而言，Illumina 公司的晶片特點為相同的探針序列在晶片上有許多重複的磁珠，因此，在實驗數據上等於具有多次測量的結果，因此能減少人為產生的實驗誤差，在單核苷酸多型性（Single Nucleotide Polymorphism）這類型需要高精確度的主題上具有較低錯誤率的優勢。



圖六 Nimblegen Array Synthesis Process  
(<http://www.nimblegen.com/company/technology/index.html>)



圖七 Illumina BeadArray Technology  
(<http://www.ipc.nxgenomics.org/newsletter/no8.htm>)



整體來說，不管上述經由何種方式製備的生物晶片，目前在實驗效果上均有相當不錯的表現，而這些晶片製程上的發展，多數包含了電子、半導體、機械、微流體等等的工程領域方法，再次突顯了在這個資訊爆炸的年代，如何成功的結合與應用跨領域的知識，是未來學術界與產業界重大的方向，如此才能在傳統的領域中帶入突破的能量以達到創新的目的。

## 生物晶片數據的分析與應用

在成功的進行了生物晶片的製備與實驗操作後，一個迫切而來的課題便是如何有效率且正確的分析產生出來的實驗結果。傳統的實驗方法能產生數十次的數據已經是相當豐富，但生物晶片每一次的實驗卻可以產生數萬筆至百萬筆的資料，尤其當檢測的實驗樣本數量較高時，研究人員需面對的實驗數據是超過上千萬筆的，在這個情形下，人工執行的統計分析不僅容易出錯，其效率也不足以應付如此龐大的資料流，因此我們需要透過電腦的協助，設計不同的演算法以及新式的統計模型來針對生物晶片的數據進行分析，而這部分便是屬於生物資訊學（Bioinformatics）的範疇。在實際的分析步驟上面，首先我們要透過正規化（Normalization）演算法來除去晶片之間的操作誤差及批次效應，以減少後續分析結果出現偽陽性（False Positive）的機率。接著利用回歸或是各式的統計模型尋找在晶片數據中各個實驗基因與欲觀測的樣本是否存在著緊密的相關性，能夠通過檢定的基因，就可以作為後續研究上的實驗標的，值得在進一步的實驗中去證實這些基因是否在研究主題中扮演重要的角色。

在人類基因體計畫已初步完成的後基因體時代，生物晶片提供了研究人員一個方便且有效率的實驗技術平台，目前除已被廣泛的應用在各類的生醫研究之上，且可使用的晶片涵括了許多基因調控機制，例如單核苷酸多型性晶片（SNP array）、比較式基因體雜合晶片（array-based comparative genomic hybridization）、甲基化晶片（methylation microarray）、微型核糖核酸晶片（microRNA microarray）等等，能夠進行各式各樣不同生物主題的研究，像是基因表現量分析、拷貝數變異分析（copy number variation analysis）、突變分析（mutation analysis），以及其他整合性的探索。這些晶片讓研究人員能夠快速的對生物體的基因體變化有所了解，尤其是在面對未知且複雜的疾病時，生物晶片能帶給使用者整體性的認識，根據其實驗數據，不僅能鎖定具有高度重要性的基因去探究其功能，更可以協助研究人員尋找出從未被報導過的關鍵基因，進而對疾病的發生原因有更全面的了解。舉例來說，癌症組織由於其多變且基因體不穩定的特性，使用傳統的單基因實驗方法顯得十分曠日費時且容易失敗，但在生物晶片的協助下，研究人員可以一次性的完整檢驗癌症組織的基因表現量變化情形，將能夠尋找出潛在的藥物標的，以作為後續治療之用。總結來說，生物晶片的發展已漸趨成熟，大量的被使用在生物醫學研究領域之中，其實驗結果對臨床醫療以及藥物開發均有潛在的應用空間，也再次證明結合跨領域的知識，已成為二十一世紀最重要的研究方向之一。

