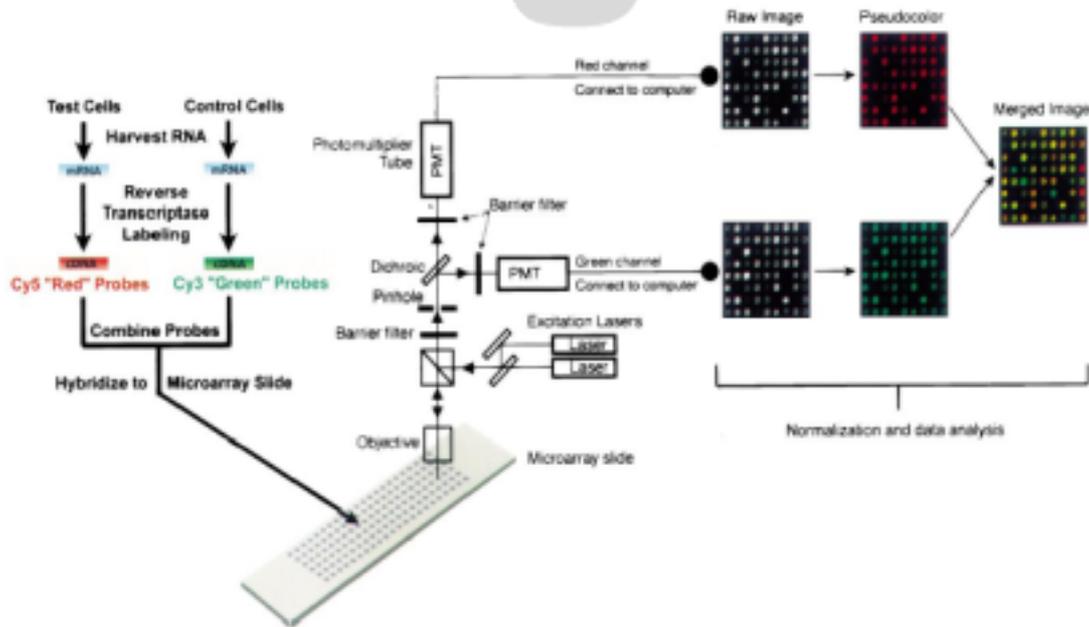


# 生物晶片於食品病原菌 快速檢測之應用

蔣育錚 中興大學食品科學系博士班

## 生物晶片簡介

生物晶片技術（亦稱之為微點陣技術（Microarrays technology））的開發與運用在 20 世紀末已成為研究癌症過程，新藥開發，疾病診斷，基因治療，生命科學及生物技術的一條康莊大道。約四分之一世紀以前，Southern, E. M. 首先利用標定之核酸探針（labeled nucleic acid probe）偵測固定在濾膜（filter）上受測樣本的核酸序列。標定核酸探針的核酸序列會與受測樣本中具有互補的核酸序列（complementary sequence）產生雜交作用（hybridization），經由標定核酸探針雜交的位置，研究者可以發現具有互補核酸序列之所在，進而推論實驗結果。傳統的南方墨點法（Southern blotting）是將受測的樣本固定在尼龍膜（nylon membrane）上，再利用特定已知的探針來偵測樣品中是否存在有互補的核酸序列。生物晶片雖然在核心的原理（core principle）上與傳統的墨點法相同，但卻反相地將各種探針固定在基質上，用以偵測受檢測樣品中各種與探針互補的核酸物質之變化。標準的微點陣技術是將探針（通常是 DNA 或 complementary DNA（cDNA）），以高密度點陣技術將 DNA 或 cDNA 固定排列在經除孔處理過的玻璃（non-porous glass slide）、帶正電的尼龍紙片（nylon membrane）、或表面經過特殊處理之塑膠片（plastic membrane）及其他固態基質的表面上，而受測的樣本則是標的物與其互補的探針做雜交。樣本中標的核酸，會與 cDNA 微點陣上含有互補的核酸序列的探針的點進行雜交；再經過一連串的清洗將沒有雜交的樣本核酸去掉，然後進行數據的判讀，如此就可以記錄下有雜交反應點的位置，只需要一次的實驗就能夠將成千上萬的基因表現的樣式（gene expression patterns）記錄下來。如圖一所示為生物晶片流程簡圖。



圖一、生物晶片流程 (Khan et al., 1999)

生物晶片可運用在分析基因的表現 (gene expression), 可由生物個體中訊息 RNA (mRNA) 被誘導產生或抑制的種類及程度, 瞭解更完整的轉錄作用 (transcription) 的變化, 生物晶片亦可運用在生物的基因型分型 (genotyping), 可從數百個 DNA 樣本中的上萬個基因座 (loci) 標定出對偶基因 (alleles) 的異同, 進而提供訊息, 包括研究不只一個基因所引起的多基因型異常疾病 (polygenic disorder), 或者可由偵測特定對偶基因的異型 (allelic heterogeneity), 做為篩選可能罹患遺傳性或基因異常引起的病變之個體或族群的指標; 並且可由個體或族群中對偶基因的多型性 (polymorphisms) 分析來控制基因性疾。

由於一生物晶片上含有上千至萬的基因樣點, 並且目前的方法容許偵測到極微細的細胞內變化, 數幾個訊息 RNA 的改變, 使得研究者可透過晶片上的數據得到整體性訊息, 對於極少量或不易取得的樣品的研究, 生物晶片是唯一可提供大量資料的途徑。目前以核酸為樣點的生物晶片已經廣泛地被發展中, 尤其在基因表現 (gene expressions), 基因圖譜 (mapping), 及疾病診斷 (diseases diagnosis) 有非常顯著的成果, 甚至某些可以做 DNA 定序及偵測細微核苷酸異

常的晶片已被完成，以蛋白質、抗體、抗原或細胞為樣點的生物晶片亦是科學家們感興趣的方向。在不久的將來，更成熟，更靈敏的生物晶片技術可提供生命科學的研究者及從事者瞭解生物的生命密碼的全面性訊息。

## 生物晶片與食品病原菌

在人類生活的環境中存在許多細菌，若食品受到病原細菌的污染，會造成食物中毒，細菌微小不可見，要有快速鑑別有害的細菌的方法，用以杜絕食品污染的事件發生及擴大。

食品病原菌的種類，以細菌所造成的食物中毒案例較為常見，根據 Pan 的研究指出 (Pan et al., 1996; Pan et al., 1997)，台灣地區自 1986~1995 年間的食品病原細菌所造成食物中毒案例，以腸炎弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*)、金黃色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 與仙人掌桿菌 (*Bacillus cereus*) 所造成的細菌性食物中毒比率較高，而根據行政院衛生署的調查資料顯示，台灣其他常見的食品病原菌如沙門氏菌 (*Salmonella* sp.) 病原性大腸桿菌、李斯特菌或霍亂弧菌等也是食品中毒中常見的種類。可造成人類 Salmonellosis，而其中 *Salm. typhimurium*, *Salm. typhi* 及 *Salm. enteritidis* 等為其中重要且常見的血清型 (Pan et al., 1996, 1997)，上述沙門氏菌原，常可見於食品污染，*Salm. typhimurium*, *Salm. enteritidis* 且為人畜共通病原菌。

傳統以沙門氏菌檢測方法，包括有預培養 (pre-culture) 選擇性培養基培養 (Selective medium culture)，生化型鑑定 (Biotype test)，及血清型鑑定，其步驟約需 5-7 天，常緩不濟急，也因此快速檢測方法相當重要。而其中以腸炎弧菌的發生率佔所有食品中毒事件的 61%~71% (於 1996 年至 1999 年間) 是所有食品中毒事件中發生率最高的種類，主要的污染來源是海鮮類食品及醃漬食品 (Chiou et al., 2000)。一般而言，細菌性的食物中毒可分為 (1) 感染型 - 如沙門氏菌、腸炎弧菌 (2) 中毒型 - 由細菌所產生的毒素所造成的，如金黃色葡萄球菌、肉毒桿菌、仙人掌桿菌等等 (Meng & Doyle, 1997)。而這些不同種類的食品病原細菌必須要有一套快速、可信賴的檢測方法來進行微生物污染的分析。而傳統的檢測方法一般包括預培養 (pre-culture)，選擇性培養基培養

(selective culture), 以及生化檢測測試各菌的生化特性 (Biotype), 血清型鑑定 (serotype) 等。近年來, 利用 DNA 探針及其相關技術所發展的微生物快速檢測方法, 如 PCR 方法; PCR fingerprinting (Beyer et al., 1998)、multiplex-PCR DNA 定序法 (Marx et al., 1999) PCR-RFLP (Samadpour, 1995) RAPD (Czajka & Batt, 1994; Wong et al., 1999b) gene-specific probe hybridization (Modrusan et al., 2000) ribotyping (Wong et al., 1999a) 等方法已陸續用於食品及臨床病原菌的檢測之用。然而, 這些方法所面臨的重要問題是如何克服面臨大量樣本, 檢體的操作方便性, 以及同時能否鑑別不同種屬的菌(株)等問題。以 PCR 方法為例, 目前所發展的 PCR 技術的缺點是對於不同的目標基因或目標菌必須要用不同的引子組來進行檢測。在目標菌種不明確時, 進行較為困難, 例如, 如何選擇適當的引子組; 即是一個問題。因此必須發展更新更靈敏的檢測方法, 供作快速篩檢多種目標菌之用 (Himeibloom, 1998)。

生物科技為 21 世紀的主流, 各國莫不以大量的人力、物力進行生物技術的研發, 而應用在食品病原菌的檢測方面, 所面臨面解決的問題是如何在最短的時間, 以最低的成本來完成多種不同病原菌的檢測之工作。利用高密度的生物晶片技術為解決此一問題最好的方法。細菌檢測用的生物晶片, 即利用每一菌種具有專一性的 DNA 片段便可作為菌種鑑定之用; 而 DNA 序列的差異可分為不同等級, 利用不同等級的差異可鑑定出分屬不同科、屬、種的菌(株) (Talaat et al., 2000)。每一種細菌在晶片上具有不同的 DNA 雜交 pattern, 因此可以藉由不同的 pattern, 來鑑定不同的病原菌, 因此只要利用同一張晶片便可以鑑定不同的細菌屬、種。而生物晶片有幾種型式如寡核酸晶片、基因微陣列、蛋白質晶片、抗體晶片與微流體晶片, 這些不同的晶片各有其應用的相關研究, 而其原理也大致相同。利用生物晶片可獲得大量生物訊息, 未來不只在研究一個基因, 而是研究整體基因的表現 (Debouck & Goodfellow 1999; Wilson et al., 1999; de Saizieu et al., 2000; Talaat et al., 2000)。

病原菌檢測用生物晶片上探針的設計常利用 23S rDNA、16S rDNA 在 DNA 序列上之差異, 設計一片段作為設計不同 Genus 或 species 的細菌檢測用 DNA 晶片的探針, 如 Anthony et al. (2000) 利用生物晶片檢測敗血症 (Bacteremia) 中含有

何種微生物，可快速鑑定造成敗血症的微生物為哪些，來幫助醫生投與病患適當的抗微生物物質，如抗生素等。在敗血症的治療過程中若投與不適當的藥物，可能會造成微生物的抗藥性產生，或造成不適當的醫療，而延誤了病情。相同的檢測方法亦可應用於食品中病原菌的檢測，將這些食品病原菌特異性的探針，以 oligonucleotide probe 的形式放置在所設計的生物晶片上，利用此方法鑑定不同的種類的病原菌(株)。

以生物晶片的方法，可解決目前眾多不同病原菌無法同時檢測之技術問題，因此，生物晶片提供了許多研究者在快速檢測微生物上一個相當有力的工具。

### 參考文獻

1. Anthony, R. M., Brown, T. J., and French, G. L. 2000. Rapid Diagnosis of Bacteremia by Universal Amplification of 23S Ribosomal DNA Followed by Hybridization to an Oligonucleotide Array. *Journal of clinical microbiology*. 38(2):781~788.
2. Beyer, W., F.M. Mukendi, P. Kimmig & R. Bohm. 1998. Suitability of repetitive-DNA-sequence-based PCR fingerprinting for characterizing epidemic isolates of *Salmonella enterica* serovar Saintpaul. *J Clin Microbiol* 36: 1549-54.
3. Chiou, C.S., S.Y. Hsu, S.I. Chiu, T.K. Wang & C.S. Chao. 2000. *Vibrio parahaemolyticus* serovar O3:K6 as cause of unusually high incidence of food-borne disease outbreaks in taiwan from 1996 to 1999. *J Clin Microbiol* 38: 4621-5.
4. Czajka, J. & C.A. Batt. 1994. Verification of causal relationships between *Listeria monocytogenes* isolates implicated in food-borne outbreaks of listeriosis by randomly amplified polymorphic DNA patterns. *J Clin Microbiol* 32: 1280-7.
5. de Saizieu, A., C. Gardes, N. Flint, C. Wagner, M. Kamber, T.J. Mitchell, W. Keck, K.E. Amrein & R. Lange. 2000. Microarray-based identification of a novel *Streptococcus pneumoniae* regulon controlled by an autoinduced peptide. *J Bacteriol* 182: 4696-703.
6. Debouck, C. & P.N. Goodfellow. 1999. DNA microarrays in drug discovery and development. *Nat Genet* 21: 48-50.
7. Himelbloom, B.H. 1998. Primer on food-borne pathogens for subsistence food handlers. *Int J Circumpolar Health* 57: 228-34.
8. Khan, J., Bittner, M. L., Chen, Y., Meltzer, P.S., Trent, J.M. 1999. DNA microarray technology: the anticipated impact on the study of human disease *Biochimica et Biophysica Acta* 1423:M17-M28.
9. Marx, A., D.K. Shay, J.S. Noel, C. Brage, J.S. Bresee, S. Lipsky, S.S. Monroe, T. Ando, C.D. Humphrey, E.R. Alexander & R.I. Glass. 1999. An outbreak of acute gastroenteritis in a geriatric long-term-care facility: combined application of

- epidemiological and molecular diagnostic methods. *Infect Control Hosp Epidemiol* 20: 306-11.
10. Meng, J. & M.P. Doyle. 1997. Emerging issues in microbiological food safety. *Annu Rev Nutr* 17: 255-75.
  11. Pan, T.M., C.S. Chiou, S.Y. Hsu, H.C. Huang, T.K. Wang, S.I. Chiu, H.L. Yea & C.L. Lee. 1996. Food-borne disease outbreaks in Taiwan, 1994. *J Formos Med Assoc* 95: 417-20.
  12. Pan, T.M., T.K. Wang, C.L. Lee, S.W. Chien & C.B. Horng. 1997. Food-borne disease outbreaks due to bacteria in Taiwan, 1986 to 1995. *J Clin Microbiol* 35: 1260-2.
  13. Samadpour, M. 1995. Molecular epidemiology of *Escherichia coli* O157:H7 by restriction fragment length polymorphism using Shiga-like toxin genes. *J Clin Microbiol* 33: 2150-4.
  14. Talaat, A.M., P. Hunter & S.A. Johnston. 2000. Genome-directed primers for selective labeling of bacterial transcripts for DNA microarray analysis. *Nat Biotechnol* 18: 679-82.
  15. Wilson, M., J. DeRisi, H.H. Kristensen, P. Imboden, S. Rane, P.O. Brown & G.K. Schoolnik. 1999. Exploring drug-induced alterations in gene expression in *Mycobacterium tuberculosis* by microarray hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 12833-8.
  16. Wong, H.C., C.C. Liu, T.M. Pan, T.K. Wang, C.L. Lee & D.Y. Shih. 1999b. Molecular typing of *Vibrio parahaemolyticus* isolates, obtained from patients involved in food poisoning outbreaks in Taiwan, by random amplified polymorphic DNA analysis. *J Clin Microbiol* 37: 1809-12.

健康是您的權利  
保健是您的責任

