

# 微陣列分析於林木功能性 基因體研究上之應用

文 ■ 曲芳華 ■ 國立臺灣大學森林環境暨資源學系助理教授

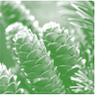
陳昱蓉 ■ 國立臺灣大學森林環境暨資源學系研究生

## 一、前言

隨著DNA定序技術的快速進步，不同之生物基因體序列定序工作已陸續完成，或正著手進行當中。經定序完成的基因體序列，就如同一本排滿字母卻未被註解的字典一般，蘊藏著許多未知的意義。因此，所謂「後基因體時代」(Post genome era)的來臨，即是由原本的基因體學(Genomics)研究，進入功能性基因體學(Functional genomics)的研究，也就是進一步去了解基因體序列中每一個基因所代表的功能，及其參與各種生理、生化途徑的調節機制。「微陣列」(Microarray)技術的快速發展，提供了一個在基因體層面上，對基因表現全面性了解的一種相當有力的研究方法(Kehoe *et al.*, 1999; Lockhart *et al.*, 2000; Richmond *et al.*, 2000)。所謂「微陣列」，就是將已知序列的DNA片段，以打點、噴墨、合成等的方式，將其置於玻片或尼龍膜上。因每一個點的直徑約只有200  $\mu$ m，且每一個點皆整齊排列成陣列、矩陣的形式，故被稱為「微陣列」。其中微陣列又可大致分為兩類，一類為

DNA 微陣列，主要是將DNA片段以機器手臂打點或噴墨的方式置於玻片或尼龍膜上；而另一類為寡核苷酸微陣列(Oligonucleotide microarrays)或稱Affymetrix Gene Chip TM，主要是在玻片上合成20~25mer的DNA片段(Lockhart *et al.*, 2000)。

首篇DNA微陣列的報告在1995年發表以後(Schena *et al.*, 1995)，再配合生物資訊(Bioinformatics)的蓬勃發展，如今此技術已被廣泛應用於人類致病基因及植物病理、逆境、光週期、生長調節、發育、二次代謝等研究領域的研究(Somerville *et al.*, 2000)。而微陣列目前也已被應用於林木之胚發育、細胞壁之生合成、木材形成、乾旱逆境反應，及調控二次代謝產物生理過程等相關基因表現的全面性研究。本文即是回顧並整理，微陣列分析於林木功能性基因體研究上之應用，首先介紹DNA微陣列之構築及其原理，續以林木之胚發育、木材及細胞壁的形成，以及二次代謝產物之調控等實例，介紹微陣列分析於林木功能性基因體上之發展與應用。



## 二、DNA 微陣列之構築

構築DNA微陣列的第一步，就是決定往後要置於玻片上之DNA片段的來源。其中最廣泛被利用的來源，即是「表現序列標籤」(Expressed sequence tags, ESTs)。所謂ESTs，就是當我們對於植物的特定組織、特定器官，或是特定時期、特定生長環境下表現的基因感興趣時，即將之mRNA抽出，並反轉錄成互補DNA (complementary DNA, cDNA)，再利用適當的限制酶切割，並進行選殖。之後，續將已得到的各個菌株加以整理，系統地對每一個菌株的插入片段，進行單向與單次的定序，如此所得的序列即稱之為ESTs，一般而言，長度約為300~500 bp。通常，會將所得之ESTs收集於96孔盤上，藉由聚合酶連鎖反應 (Polymerase chain reaction, PCR) 及電泳分析 (Electrophoresis)，對於ESTs做品質的控制。而後將品質良好的ESTs進行純化，並重新收集於384孔盤上。最後，再藉由機械手臂將其點於玻片或尼龍膜上，圖1即為DNA微陣列之構築簡圖。

因此，由以上的說明，我們可將DNA微陣列分析節納如下的步驟：即(1) mRNA的抽取；(2) 標定；(3) 雜合反應；(4) 影像獲取及(5) 資料分析等(如圖2所示)。以下僅將這些步驟主要的目的及原理，作一簡單的說明。

### 1. 抽取mRNA：

首先，需抽取兩個欲進行比較其基因表現差異之樣本的total RNA，再分別藉由其中

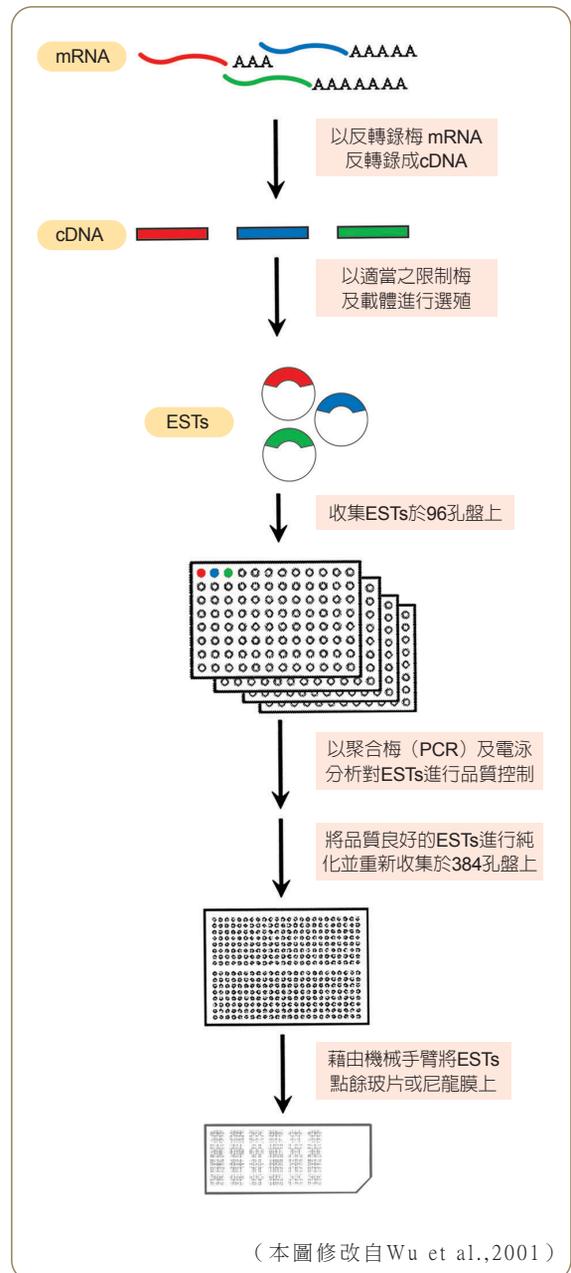


圖1. DNA 微陣列之構築簡圖

mRNA之3'端具Poly(A)之特性，以具oligo(dT)之引子(Primer)於total RNA中分離出mRNA。DNA微陣列主要是對於兩個樣本之基因所表現的mRNA做一全面性的比較，也就是在轉錄(Transcription)層面

做比較。

## 2. 標定 (Labeling) :

將上述兩個樣本的mRNA分別以不同的螢光物質進行標定，並反轉錄成cDNA。通常控制組或對照組是以Cy3標定，其經雷射激發後會發綠色光；而試驗組則以Cy5標定，其經雷射激發後會發紅色光。

## 3. 雜合反應 (Hybridization) :

將分別標定上Cy3及Cy5的兩個樣本混合，與先前已製備好的DNA微陣列進行雜合反應。

## 4. 影像獲取 (Image capture) :

將經雜合反應後的DNA微陣列，分別以適當波長之雷射 (Cy3：~550 nm；Cy5：~650 nm) 激發先前標定的螢光物質。當以雷射激發Cy3時，若點呈綠色，表示此點所代表的基因於控制組有表現；而當以雷射激發Cy5時，若點呈紅色，表示此點所代表的基因於試驗組有表現。將上述兩個影像重合，若點呈黃色，表示此點所代表的基因於控制組及試驗組上，同時都有表現；若點呈黑色，則表示此點所代表的基因於控制組及試驗組上，皆沒有表現。而每一基因於控制組及試驗組上表現差異的程度，則以其經雷射激發後，依紅光強度及綠光強度比例決定。

## 5. 資料分析 (Data analysis) :

將上述所獲得的影像，先經由電腦軟體將影像轉成數值，續據此進行運算、處理及分析，之後，再將欲分析比較之樣本中表現有差異的基因，或是有相關性的基因做全面性叢集 (clustering) 歸類。

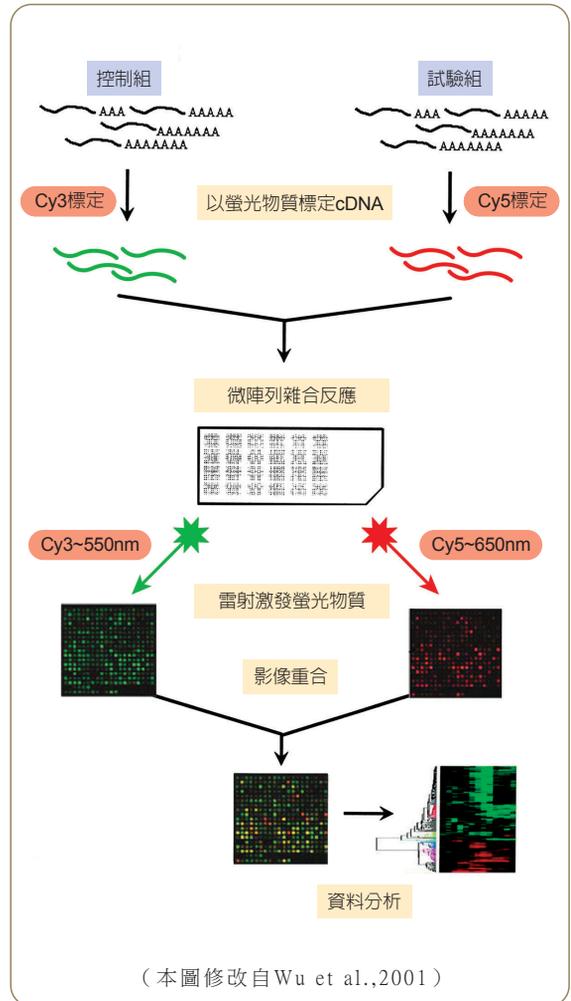
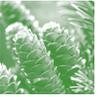


圖2. DNA 微陣列分析之步驟示意圖

## 三、微陣列分析於林木功能性基因體研究上之應用

試如前述，微陣列分析技術為一可快速提供基因表現狀況的有力方法，特別是在功能性基因體的研究中，微陣列分析技術更可發揮其對基因篩選的快速特性。雖然這項技術的發展歷史不到10年，但隨著晶片製造技術及數據處理能力日臻成熟，微陣列分析已成為基因體研究之新寵兒，讀者只要到科學文獻的資料庫搜尋，即會不難發現這樣的策



略來分析具功能性的基因已成為研究主流。在林木的功能性基因體研究上也不例外，愈來愈多林業科學家已開始採取這樣的策略來進行研究工作。以下僅以數個具代表性的研究綜合整理，希望使讀者有一較清楚的輪廓。

### 1. 微陣列分析於林木胚發育研究之應用

近來由於體胚形成 (Somatic embryogenesis, SE) 技術的發展，可有效地以無性繁殖的方式，繁殖經由林木改良或基因工程所得的優良表現型，可藉此提高木材之品質及產量。火炬松 (Loblolly pine, *Pinus taeda* L.) 為美國重要經濟樹種之一，然而此技術應用於火炬松時，其體胚形成的效率相當差，且胚的品質亦不適合做進一步的操作應用。Cairney等人 (1999) 分析了火炬松於基因層面的表現，對其合子胚形成 (Zygotic embryogenesis, ZE) 及體胚形成的差異進行比較，成功地提高了火炬松體胚形成的效率。

首先，Cairney等人利用差異性表現法 (Differential display, DD)，自火炬松各個不同發育時期的合子胚 (Zygotic embryo)，獲得約400個ESTs，並分別將其點於尼龍膜上，且每一個EST於尼龍膜上皆點4次，4點排列成一個矩形之微陣列。接著分別抽取各個不同發育時期的合子胚及體胚 (Somatic embryo) 之mRNA，將其反轉錄成cDNA，並以  $^{32}\text{P}$ -dCTP進行標定，再分別與之前製備好的微陣列進行雜合反應，最後經由放射能照相所得的影像，經掃描數位化後，利用電腦軟體GelPro 3.0進行分析。

由電腦軟體分析的結果顯示，有29個基因僅在SE表現或在SE期中倍加表現；沒有任何一個基因僅在ZE初期中表現，但有11個基因僅在ZE期表現。此外，有8個基因在SE晚期表現，亦在ZE發育之早期及中期皆有表現。此結果有助於了解火炬松SE各發育時期與ZE各發育時期基因表現的不同，進而改良SE在火炬松無性繁殖上的應用，以提高效率、品質及產量。

### 2. 木材及細胞壁的形成之應用

人類長久以來，日常生活與木材利用的關係仍密不可分。加上文明的快速進步，對於木材的需求也隨之增加。因此，對於木材的形成、品質、結構、化學性質等，需進一步清楚地了解，也才能提高木材的產量及品質。為了解木材及細胞壁形成過程所參與之基因的表現，Whetten等人 (2001) 以未成熟次級木質部、成熟次級木質部，及早期定序計畫所得共約3000個火炬松之ESTs，進行DNA微陣列的構築。接著以兩組樣本，分別為未成熟材 (Juvenile wood) 和成熟材 (Mature wood)、受壓木 (Compression wood) 和正常材 (Normal wood)，進行雜合反應分析。經由within-slide及Dunnett's test兩種分析法所得的結果，並以GeneBank中BLASTX的比對功能搜尋ESTs可能對應的蛋白質功能。結果顯示，於未成熟材中高度表現之基因對應的蛋白質功能有chitinase、actin、auxin-induced protein等；於成熟材中高度表現之基因對應的蛋白質功能有4-coumarate CoA ligase、caffeoyl-CoA

O-methyltransferase、phenylalanine ammonia-lyase等。而於受壓木中高度表現之基因對應的蛋白質功能有AGP4、phenylalanine ammonia-lyase、methionine synthase等；於正常材中高度表現之基因對應的蛋白質功能有pectinesterase、Phi-1-like protein、acid phosphatase-like等。由此可知，DNA微陣列分析技術，可快速篩選出參與木材形成之酵素。

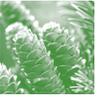
另一個代表性的研究為，Hertzberg等人(2001)以白楊(Poplar, *Populus tremula* × *Populus tremuloides*)之木材形成組織所得的2995個ESTs 構築DNA 微陣列。五個樣本的來源分別來自五個連續發育的區域(A)分生細胞(Meristematic cell)、(B)早期擴展細胞(Early expansion)、(C)晚期擴展細胞(Late expansion)、(D)次級壁構造(Secondary wall formation)、(E)晚期成熟細胞(Late cell maturation)。Hertzberg等人以這五個樣本等量混合做為對照組，再分別與五個樣本分別進行雜合反應。經由GENESPRING軟體進行分析，其中，發現大多數與次級細胞壁之生合成有關的基因，於C、D兩區域呈現高度表現。如兩個與纖維素合成酶(Cellulose synthase)表現有關的基因PttCESA1及PttCESA3，於C、D兩區域呈現高度表現；催化形成纖維素先驅物UDP-glucose 的酵素UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase，與其表現相關的基因，也於C、D兩區域呈現高度表現。除此之外，亦發現與木質素生合成有關的基

因4CL，於區域C-E呈現高度表現；兩個與木質化有關的基因CAD，於D、E兩區域呈現高度表現。由以上兩個例子可看出微陣列分析的運用，已逐漸證明參與木材形成之基因與其調控之酵素，相信更多的學者投入此課題後，將可釐清木材形成之相關問題。

### 3. 二次代謝調控之應用

植物擁有各種獨特的二次代謝產物，雖其不直接參與植物本身基本的生理功能，但卻扮演了防禦、吸引傳粉者、抵抗逆境等重要功能。除此之外，植物的二次代謝產物更具有重要的經濟價值(如橡膠)及藥用價值，也因此倍受重視(Raven *et al.*, 1999)。樹木所富含的二次代謝產物，儘管具有大量的經濟價值及科學上研究的重要意義，但至今對其二次代謝產物的形成、調控的機制等，了解甚少。因此Yang等人(2003)應用微陣列的技術，對洋槐(Black locust, *Robinia pseudoacacia*)樹皮/形成層區域(Bark / cambial region, BC)、邊材(Sapwood, SW)、移行帶(Transition zone, TZ)等，三個部份所進行基因表現的全面性探討。

首先Yang等人以10年生洋槐之BC、SW、TZ建構互補DNA基因庫(cDNA library)，並於其中挑選了2580個ESTs構築DNA微陣列，再以成熟洋槐(胸高直徑20 cm)之BC、SW、TZ，分別做一對一的雜合反應，最後經由電腦軟體GenePix Pro3.0進行分析及歸納。結果顯示與二次代謝調控相關之基因，在TZ有高度的表現，且其中多



與類黃酮 (Flavonoid) 化合物之生成途徑有關，如：Chalcone-flavone isomerase (BI642439)、Naringenin 3-dioxygenase (BI642499)、Flavonoid 3',5'-hydroxylase (BI642638)、Chalcone synthase (BI642100)、Flavonoid 3'-hydroxylase (BI642292)、Chalcone flavone isomerase (BI642412)、Dihydroflavonol 4-reductase (BI642387)、Chalcone reductase (BI642432)。事實上參與二次代謝產物的基因，往往非常複雜，每一個步驟都需要不同的酵素參與反應，因此，若用以往研究生合成的策略進行研究，往往要耗費大量的人力與時間。因此，若能結合DNA微陣列的技術，相信一定能夠獲得事半功倍的成果。

#### 四、結論

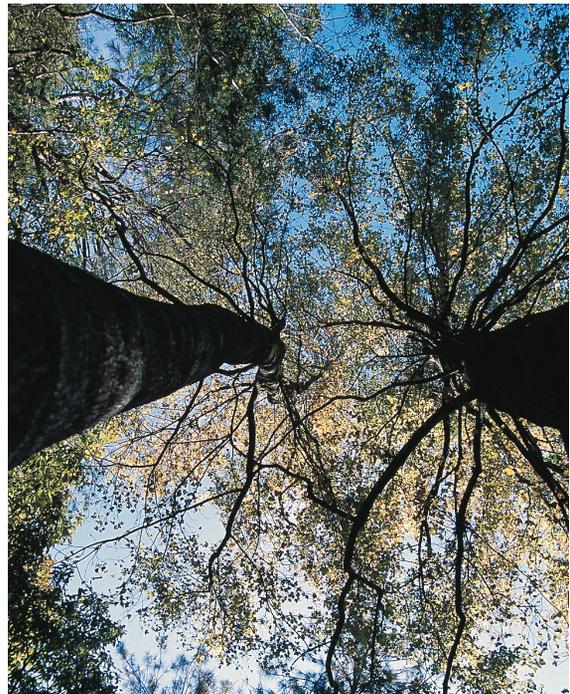
木本植物往往因為體型大、生長週期長、基因體大等因素，使其在遺傳改良、育種、生理調控等方面的研究，進展較非木本植物來得緩慢 (Merkle *et al.*, 2000)。近來由於分子生物技術的進步，已克服了木本植物體型大及生長週期長的研究障礙，若再加上微陣列技術及生物資訊的快速發展，也將更能克服木本植物基因體大在研究上造成的問題。

以往研究者對於基因功能的了解，需花費較長的時間，且在花費長時間之後，也只能知道少數基因的功能。而如今應用微陣列的技術，可以縮短研究所需的時間，並且可以同時全面性了解基因體內基因表現的情

形。除此之外，更可進一步定義未知基因的功能。

微陣列技術在林木功能性基因體的研究上，除了前述的應用之外，亦可應用於生態、演化、族群結構、族群遺傳學等的研究 (Gibson, 2002)。如今此技術已廣泛被應用於各種不同的研究領域，且仍不斷在進步當中。相信藉由此有力的技術，將可對林木的基因表現、生理生化功能、代謝途徑等，有更加深入的了解，並且也藉此提高林木的應用價值及經濟價值。🌱

#### 參考文獻 (請逕洽作者)



(圖片 / 高遠文化)