

เทคโนโลยียีนชิป

จรีรัตน์ มงคลศิริวัฒนา

สาขาวิชาพันธุศาสตร์ สายวิชาวิทยาศาสตร์ คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140

Email: faascrp@ku.ac.th

เทคโนโลยียีนชิป (GeneChip technology) เป็นเทคนิคดีเอ็นเอไมโครอาร์เรย์ (DNA microarray) ขั้นสูง คัดแปลงมาจากเทคโนโลยีการผลิตไมโครชิป (microchip) ในอุตสาหกรรมการผลิตแผงวงจรคอมพิวเตอร์ ร่วมกับเทคโนโลยีการสังเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยวิธีทางเคมีบนแผ่นชิป ซึ่งเทคโนโลยีดีเอ็นเอไมโครอาร์เรย์แบบเดิมนั้น เป็นการนำ cDNA หรือ บางส่วนของ cDNA ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR (polymerase chain reaction) หรือ โอลิโกนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการสังเคราะห์ด้วยวิธีทางเคมี มาวางเรียงบนแผ่นชิป ดีเอ็นเอที่นำมาวางเรียงนี้ เรียกว่า โพรบ (probe) ดังนั้น ดีเอ็นเอไมโครอาร์เรย์จึงสามารถแบ่งได้เป็น 2 ประเภทตามชนิดของโพรบ คือ (1) cDNA microarray และ (2) oligonucleotide microarray (Zhu, 2003; Hardiman, 2004) ถึงแม้ว่าเทคโนโลยียีนชิปจะใช้โพรบที่เป็นโอลิโกนิวคลีโอไทด์ เช่นเดียวกับ oligonucleotide microarray ทั่วไป แต่มีข้อแตกต่าง คือ สายโอลิโกนิวคลีโอไทด์ที่ใช้เป็นโพรบนี้เกิดจากการสังเคราะห์ขึ้นบนแผ่นชิปโดยตรง (*in situ synthesis*) ด้วยวิธี photolithography ซึ่งเป็นเทคนิคที่มีศักยภาพในการผลิตแผ่นชิป ให้มีความหนาแน่นของโอลิโกนิวคลีโอไทด์ได้สูง (Lipshutz *et al.*, 1999; Thomson and Furdato, 1999; McGall and Christians, 2002) ภายในแผ่นชิป 1 แผ่น สามารถบรรจุโอลิโกนิวคลีโอไทด์ที่เป็นตัวแทนของยีนได้หลายหมื่นยีน ดังนั้น จึงมีการนำเทคนิคนี้มาประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์การแสดงออกของยีน การกลาย

ของยีน หรือการวิเคราะห์จีโนมไทป์ในระดับจีโนม (Hacia *et al.*, 1998; Hacia, 1999; Hacia and Collin, 1999; Mockler and Ecker, 2005) ซึ่งในปัจจุบันงานวิจัยทางด้านพันธุศาสตร์โมเลกุลได้มุ่งเน้นถึงการวิเคราะห์ในระดับจีโนม เพื่อมองภาพรวมของการทำงานร่วมกันของยีนทั้งหมด ของกระบวนการทางชีววิทยาที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ จึงทำให้เทคโนโลยียีนชิปเข้ามามีบทบาทอย่างมากในงานวิจัยสาขาต่างๆ ไม่ว่าจะเป็น ด้านวิทยาศาสตร์การแพทย์ วิทยาศาสตร์เกษตรทั้งด้านพืชและสัตว์ เป็นต้น ซึ่งคำว่า GeneChip นี้ มีชื่อเรียกแตกต่างกันไป เช่น Biochip, DNA chip, high-density oligonucleotide microarray, gene array หรือ genome chip เป็นต้น แต่อย่างไรก็ดี บริษัท Affymetrix ได้จดทะเบียนการค้าเทคโนโลยีนี้ และให้ชื่อว่า GeneChip®

เทคโนโลยีการผลิต GeneChip array

Fodor *et al.* (1991) นักวิจัยของบริษัท Affymetrix เป็นผู้ริเริ่มในการผลิตแผ่น GeneChip array จากการใช้แผ่นผลึกควอตซ์ (quartz wafer) เป็นวัสดุสำหรับแผ่นชิป และสังเคราะห์โอลิโกนิวคลีโอไทด์บนแผ่นชิปด้วยวิธี photolithography การผลิตแผ่น GeneChip array ด้วยระบบของ Affymetrix นี้สามารถแบ่งได้เป็น 2 ขั้นตอน คือ (1) ขั้นตอนการเตรียมแผ่นชิปให้มีคุณสมบัติเชื่อมต่อกับสารชีวโมเลกุลได้ และ (2) ขั้นตอนการสังเคราะห์สายโอลิโกนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธี photolithography

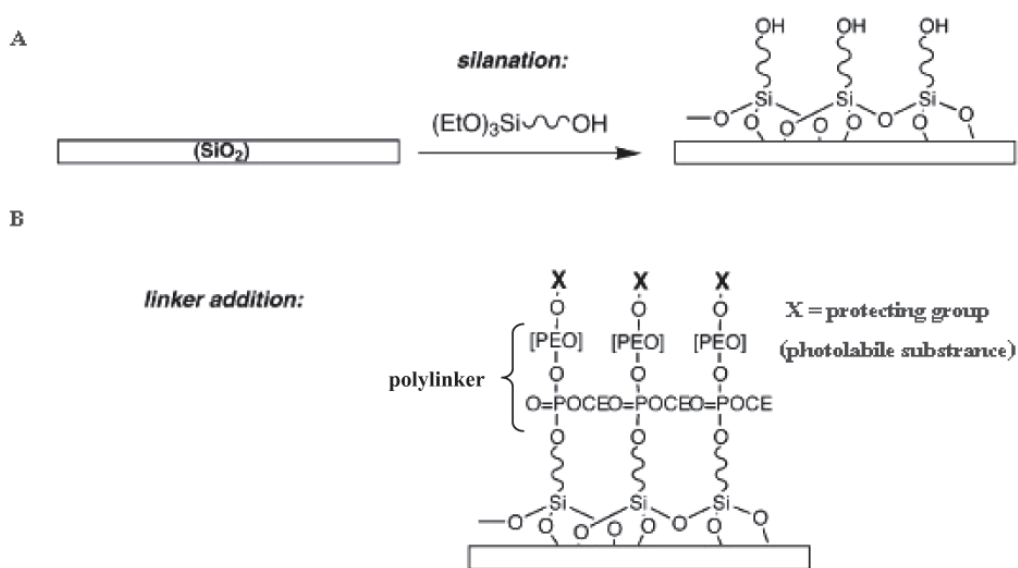


Figure 1 Chemical preparation of glass substrates for light-directed synthesis of oligonucleotide arrays. (A) Silanation process; and (B) linker addition. A solid support is derivatized with covalent linker molecule terminated with a photolabile protecting group (modified from McGall and Christian, 2002).

1. การเตรียมแผ่นชิป

ก่อนที่จะทำการสังเคราะห์สายโอลิโกนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธี photolithography ลงบนแผ่นชิปนั้น จะต้องเตรียมผิวของแผ่นชิปให้มีสมบัติสร้างพันธะเคมีกับนิวคลีโอไทด์ตั้งต้นได้ โดยการเคลือบด้วยสารซิลเลน (silane) ด้วยกระบวนการ silanation ที่ทำให้ผิวของแผ่นชิปมีหมู่ hydroxyl ที่สามารถนำนิวคลีโอไทด์มาเชื่อมต่อได้ (Fig. 1A) แต่อย่างไรก็ตาม เนื่องจากต้องควบคุมตำแหน่งและลำดับการสังเคราะห์ด้วยแสง จึงต้องมีการนำโมเลกุลของ polylinker (ethylene oxide) มาทำปฏิกิริยาเชื่อมต่อกับหมู่ hydroxyl บนผิวของแผ่นชิปอีกชั้นหนึ่ง โดยที่ส่วนปลายโมเลกุลของ polylinker นี้มีหมู่ hydroxyl เช่นเดียวกัน แต่ถูกป้องกันไม่ให้ทำปฏิกิริยากับสารอื่นด้วยการเชื่อมต่อกับหมู่ป้องกัน (protecting group) ซึ่งหมู่ป้องกันที่ใช้นี้มีสมบัติสลายตัวได้เมื่อถูกแสง (photolabile substance) (Fig. 1B) ดังนั้นจึงทำให้สามารถกระตุ้นผิวของแผ่นชิปให้เชื่อมต่อกับนิวคลีโอ

ไทด์ชนิดใดชนิดหนึ่งได้ด้วยแสง (McGall and Christian, 2002)

2. การสังเคราะห์สายโอลิโกนิวคลีโอไทด์บนแผ่นชิป

การสังเคราะห์สายโอลิโกนิวคลีโอไทด์ที่มีลำดับเบสที่จำเพาะบนแผ่นชิป กำหนดได้โดยการออกแบบแผ่นม่านบังแสง (photolithographic mask) ให้มีช่องแสงผ่านในตำแหน่งที่จำเพาะ ตามข้อมูลของลำดับเบสที่ออกแบบมาแล้วด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ ช่องที่ให้แสงส่องผ่านจะตรงกับตำแหน่งที่ต้องการต่อนิวคลีโอไทด์ชนิดใดชนิดหนึ่ง แผ่นม่านนี้จะวางเทียบกับแผ่นชิปในตำแหน่งที่ถูกต้องแม่นยำ และเมื่อกำหนดให้แสงอัลตราไวโอเลตส่องผ่านแผ่นม่านนี้ ตำแหน่งที่ถูกแสงจะมีการกำจัดหมู่ป้องกันออกไป (deprotection) เป็นการกระตุ้นให้แผ่นชิปในตำแหน่งดังกล่าว สามารถเชื่อมต่อกับนิวคลีโอไทด์ได้ (Fig. 2) ส่วนตำแหน่งที่ไม่ถูกแสงยังคงมีหมู่ป้องกันอยู่ ลำดับต่อมาคือ นำสารละลาย

deoxynucleoside phosphoramidite monomer ใส่ให้ทั่วแผ่นชิป ซึ่งจะทำให้นิวคลีโอไซด์เกิดปฏิกิริยาเชื่อมต่อกับ linker (coupling) ได้เป็นจุดเริ่มต้นของการสังเคราะห์โอลิโกนิวคลีโอไทด์ลำดับที่ 1 ของเบสชนิดที่ 1 (Fig. 3) จากนั้นใช้แผ่นม่านบังแสงสำหรับกำหนดเบสชนิดอื่น จนครบทั้ง 4 ชนิด ดังนั้น

การสังเคราะห์โอลิโกนิวคลีโอไทด์ในแต่ละลำดับเบสจึงประกอบด้วย กระบวนการกำจัดหมู่ป้องกัน และการค่อนิวคลีโอไทด์ 4 รอบ จนได้โอลิโกนิวคลีโอไทด์ที่มีขนาดตามต้องการ (Fig. 3) โดยทั่วไปคือ 20-25 นิวคลีโอไทด์ จึงประกอบด้วย 80 ถึง 100 รอบ (McGall and Christian, 2002)

A Photolithography

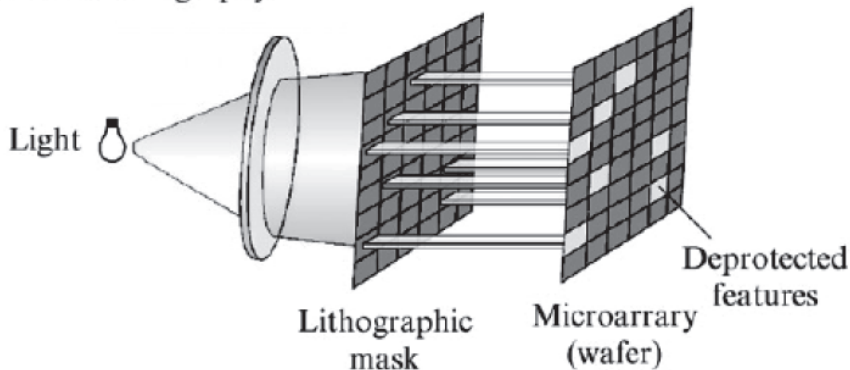


Figure 2 Manufacture of a GeneChip probe array using photolithography. Near-ultraviolet light is passed through a mask containing open windows. The size and the location of each open window delineate the surface on the quartz wafer that will be activated for chemical synthesis (Dalma-Weiszhausz *et al.*, 2006).

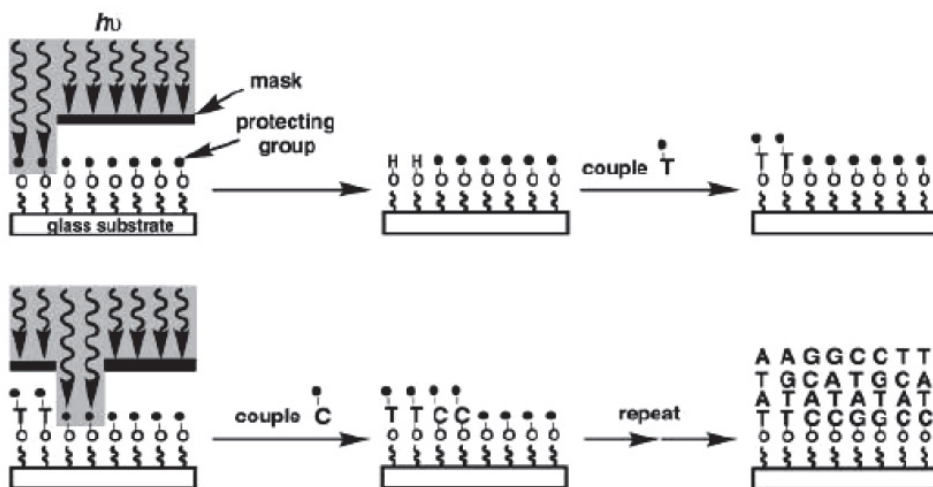


Figure 3 Light-directed synthesis strategy used in the manufacture of GeneChip array (McGall and Christian, 2002).

การออกแบบโพรบของเทคโนโลยียีนชิป

เทคโนโลยียีนชิป นอกจากนำมาใช้ในการตรวจสอบการแสดงออกของยีนแล้ว ยังมีการดัดแปลงมาใช้ในการวิเคราะห์ความผันแปรของจีโนมอีกด้วย ดังนั้น การออกแบบโพรบของเทคโนโลยียีนชิป จึงขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ของการนำไปใช้ เช่น การออกแบบโพรบเพื่อใช้ตรวจสอบระดับการแสดงออกของ mRNA จะใช้ลำดับเบสในบริเวณปลาย 3' ก่อนถึงตำแหน่ง poly (A) หรือการออกแบบเพื่อวิเคราะห์ splicing ของทรานสคริปต์จะใช้ลำดับเบสในบริเวณที่เป็นเอกซอนเท่านั้น ที่เรียกว่า exon array หรือการออกแบบโพรบเพื่อใช้ตรวจสอบดีเอ็นเอทั้งจีโนม จะใช้ลำดับเบสทั้งหมดภายในจีโนมโดยไม่ต้องคำนึงถึงว่า ตำแหน่งใดบ้างที่เป็นยีน เรียกว่า tiling array เป็นต้น (Fig. 4) อย่างไรก็ตามการออกแบบโพรบของเทคโนโลยียีนชิปเกือบทุกประเภท จะประกอบด้วยโพรบ 2 ชนิด ที่เป็นคู่กัน คือ (1) โพรบที่มีลำดับเบสคู่สมกับบริเวณเป้าหมายที่ใช้ตรวจสอบ เรียกว่า perfect match probe (PM) และ (2) โพรบที่มีลำดับเบสเหมือนกับ PM ยกเว้นในตำแหน่งตรงกลางที่มีเบสแตกต่างออกไป เรียกว่า mismatch probe (MM) (Fig. 5) โดยบริเวณที่ถูกคัดเลือกสำหรับการออกแบบโพรบนั้น ประกอบด้วย 10-20 ตำแหน่งที่ไม่เหลื่อมซ้อนกัน (ยกเว้นการออกแบบโพรบเพื่อวิเคราะห์หาลำดับเบส) นำมาออกแบบโพรบจำนวน

10-20 คู่โพรบ หรือที่เรียกว่า ชุดโพรบ (probe set) (Fig. 5) ซึ่งโพรบ 1 ชุดนี้จะใช้เป็นตัวแทนในการตรวจสอบ 1 ทรานสคริปต์ หรือดีเอ็นเอ 1 ตำแหน่งนั่นเอง (Dalma-Weiszhausz *et al.*, 2006)

โอลิโกนิวคลีโอไทด์ที่มีลำดับเบสที่จำเพาะของแต่ละโพรบ จะถูกสังเคราะห์ในบริเวณตารางสี่เหลี่ยม (probe cell) บนแผ่นชิปเป็นจำนวนล้านๆ โมเลกุลในพื้นที่เพียง 11×11 ตารางไมโครเมตร เท่านั้น ซึ่งแผ่นชิปทั่วไปมีขนาดประมาณ 1.28 ตารางเซนติเมตร จึงสามารถบรรจุโพรบที่มีลำดับเบสที่จำเพาะแบบต่างๆ ได้มากกว่า 1.4 ล้านโพรบ (Fig. 6) และถ้ามีการลดขนาดของ probe cell ให้เหลือเพียง 5 ตารางไมโครเมตร ทำให้สามารถบรรจุโพรบแบบต่างๆ ได้มากกว่า 6.5 ล้านโพรบ (ในพื้นที่ 1.28 ตารางเซนติเมตรเท่าเดิม) ตัวอย่างเช่น Human Mapping 500K Array Set (Affymetrix, 2005) จึงทำให้เทคโนโลยียีนชิปสามารถตรวจสอบทรานสคริปต์ หรือดีเอ็นเอตำแหน่งต่างๆ ได้ครอบคลุมทั้งจีโนมในการทดลองเพียงครั้งเดียว

นอกจากโพรบที่ออกแบบมาเพื่อใช้ในการตรวจสอบทรานสคริปต์ หรือดีเอ็นเอเป้าหมายที่จำเพาะแล้ว ภายในแผ่นชิปยังประกอบด้วยโพรบที่ใช้เป็นตัวควบคุม ได้แก่ โพรบที่ใช้เป็นตัวควบคุมขั้นตอนการไฮบริไดเซชัน โพรบที่ใช้เป็นตัวควบคุมในขั้นตอนปฏิกิริยา reverse transcription (ในกรณี

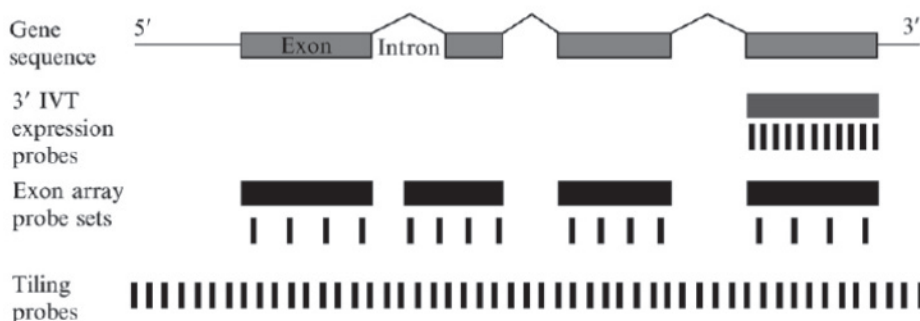


Figure 4 GeneChip probe array design. The gene sequence shown at the top represents an example of a target transcript. Rectangles represent exon, while the connecting line represents introns (Dalma-Weiszhausz *et al.*, 2006).

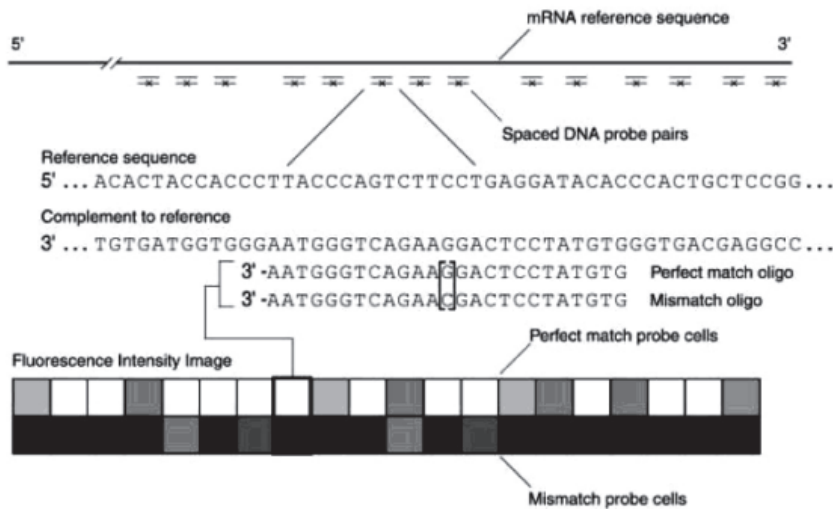


Figure 5 Probe array design of GeneChip technology. The presence of mRNA is detected by a series of probe pairs that differ in only one nucleotide. Hybridization of fluorescent mRNA to these probe pairs on this chip is detected by laser scanning of the chip surface. The use of the PM minus MM differences averaged across a set of probes greatly reduces the contribution of background and cross-hybridization and increase the quantitative accuracy and reproducibility of measurements (Lipshutz *et al.*, 1999; Dalma-Weiszhausz *et al.*, 2006).

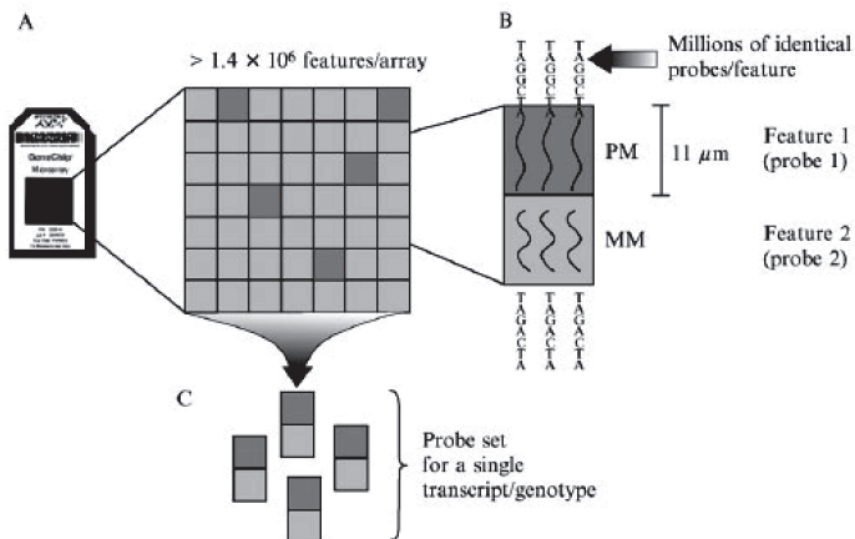


Figure 6 Dissection of a probe array. (A) Inside the probe array is a piece of quartz, generally containing a synthesis area of 1.28 cm² and carrying more than a million different features, assuming 11-mm feature spacing. Each feature on the array is composed of millions of oligonucleotide sequences. (B) For every perfect match (PM) feature, a mismatch (MM) feature is included. (C) A probe set refers to all features (PM and MM) that interrogate the same target sequence (Dalma-Weiszhausz *et al.*, 2006).

เป็น GeneChip expression array) และ โพรบที่ใช้เป็น ตัวบ่งบอกขอบเขตของแผ่นชิป ซึ่งโพรบเหล่านี้ จะ จับกับโอลิโกนิวคลีโอไทด์ที่ติดฉลากแล้ว ที่รวมอยู่ในสารละลายไฮบริไดเซชัน (hybridization cocktail) (Affymetrix, 2005)

การใช้เทคโนโลยียีนชิปวิเคราะห์การแสดงออกของยีน

กระบวนการทางชีววิทยาที่เกิดขึ้นภายใน เซลล์ของสิ่งมีชีวิตเป็นกลไกที่สลับซับซ้อน เกิดจากการแสดงออกของยีนที่ทำงานร่วมกันอย่างจำเพาะ ไม่ว่าจะเป็นชนิดของเซลล์ ระยะของการพัฒนาและการเจริญเติบโตของสิ่งมีชีวิต หรือการตอบสนองต่อสิ่งแวดล้อม เป็นต้น ดังนั้นการตรวจสอบระดับการแสดงออกของยีนโดยรวมทั้งหมด สามารถใช้ในการอธิบายกลไกทางชีววิทยาในเชิงโมเลกุลของสิ่งมีชีวิตนั้นได้ เทคโนโลยียีนชิปที่ผลิตขึ้นมาในระยะแรก จึงมีเป้าหมายเพื่อใช้ในการวิเคราะห์การแสดงออกของยีนโดยรวมในระดับจีโนม ผู้นำเทคโนโลยีในการผลิตคือ บริษัท Affymetrix จากการนำข้อมูลของลำดับเบสในฐานข้อมูลสาธารณะ เช่น GenBank, dbEST และ RefSeq เป็นต้น มาใช้ในการออกแบบโพรบ (Zhu, 2003; <http://www.affymetrix.com>) เนื่องจากการผลิตแผ่นชิป จำเป็นต้องทราบข้อมูลลำดับเบสของยีนที่ต้องการตรวจสอบ ดังนั้นแผ่นชิปมาตรฐานที่ผลิตเป็นการค้าทั่วไป จึงเป็นแผ่นชิปสำหรับการตรวจสอบการแสดงออกของยีนของสิ่งมีชีวิตต้นแบบที่ทราบลำดับเบสภายในจีโนมทั้งหมดแล้ว ตัวอย่างเช่น แมลงหวี่ หนูเม้าส์ หนูแรท อะราบิโดปซิส และ ข้าว (<http://www.affymetrix.com>) เป็นต้น อย่างไรก็ตาม การผลิตแผ่นชิปเพื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน ไม่ได้จำกัดเฉพาะสิ่งมีชีวิตต้นแบบเท่านั้น นักวิจัยสามารถสังเคราะห์แผ่นชิปสำหรับตรวจสอบการแสดงออกของยีนที่สนใจในสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น ที่ทราบลำดับเบสของยีนแล้วได้เช่นเดียวกัน ซึ่งเรียกว่า custom array นอกจากนี้ยังมีการนำแผ่นชิปที่ผลิตขึ้นมาสำหรับตรวจสอบการแสดงออกของยีนในสิ่งมีชีวิตชนิด

หนึ่ง ไปใช้ตรวจสอบการแสดงออกของยีนในสิ่งมีชีวิตอีกชนิดหนึ่งได้อีกด้วย ตัวอย่างเช่น Ji *et al.* (2004) ได้นำ Human Genome U133A GeneChip ซึ่งเป็นแผ่นชิปสำหรับตรวจสอบการแสดงออกของยีนในคน ไปใช้ตรวจสอบการแสดงออกของยีนใน วัว สุนัข และ หมู โดยมีการปรับค่าอะกอร์ิทึมสำหรับการคัดเลือกโพรบ ในขั้นตอนการวิเคราะห์การแสดงออกของยีน ให้เหมาะสมกับสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด

การตรวจสอบการแสดงออกของยีนด้วยเทคโนโลยียีนชิป สามารถทำได้หลายรูปแบบตามชนิดของโพรบที่วางบนแผ่นชิป (หรือที่เรียกว่า แอรัย) เช่น การตรวจสอบทรานสคริปต์ที่มีความจำเพาะ การตรวจสอบตำแหน่ง splicing สำหรับ mRNA ที่มีการ splicing ได้หลายแบบ หรือ ตรวจสอบขนาดของ polyA เป็นต้น การเลือกใช้แอรัยแบบใดนั้น ขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ของการวิจัย อย่างไรก็ตาม การตรวจสอบทุกรูปแบบประกอบด้วยขั้นตอนหลักที่เหมือนกัน ต่างกันเพียงการเลือกใช้ค่าอะกอร์ิทึมที่แตกต่างกันไปตามชนิดของโพรบ

ขั้นตอนการตรวจสอบการแสดงออกของยีนด้วยเทคโนโลยียีนชิป ประกอบด้วยหลายขั้นตอน ทุกขั้นตอนมีความสำคัญและมีผลต่อเนื่องกัน ได้แก่ (1) ขั้นตอนการสกัดอาร์เอ็นเอให้บริสุทธิ์ (2) การเตรียม cDNA ด้วยปฏิกิริยา reverse transcription (3) ขั้นตอนการทำ *in vitro* transcription (IVT) เพื่อสังเคราะห์ cRNA (complementary RNA) จาก cDNA ต้นแบบพร้อมกับติดฉลาก cRNA ด้วยสารไบโอติน (4) การทำ cRNA ให้เป็นสายสั้นๆ (fragmentation) (5) การทำปฏิกิริยาไฮบริไดเซชัน และ (6) การตรวจสอบสัญญาณและการวิเคราะห์ผล (Fig. 7) ซึ่งจะเห็นได้ว่าการเตรียมตัวอย่างกรดนิวคลีอิกเป้าหมาย เพื่อใช้ในการไฮบริไดเซชันนั้น มีความแตกต่างจากเทคนิคอื่นอาร์เอ็นเอไมโครแอรัยทั่วไป คือ เป็นการเตรียมให้อยู่รูปของ cRNA ที่ติดฉลาก และทำให้เป็นท่อนสั้นๆ ด้วยปฏิกิริยา hydrolysis แต่อย่างไรก็ดี สามารถเตรียมตัวอย่างเป้าหมายให้อยู่ในรูปของ cDNA ได้

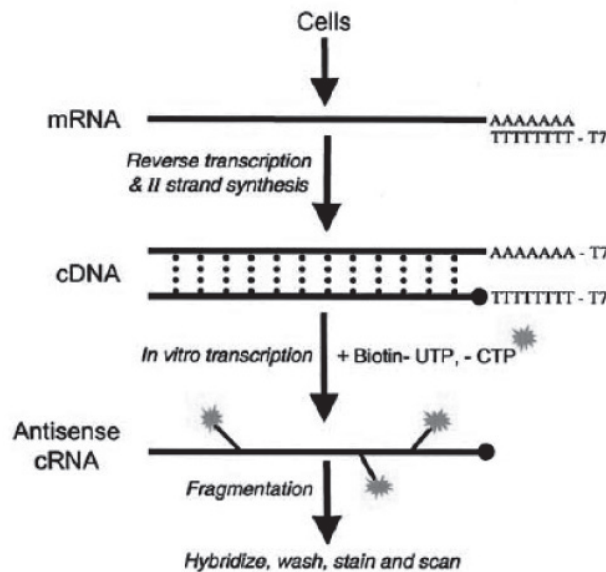


Figure 7 Overview of expression analysis using GeneChip technology (Aharoni and Vorst, 2001).

เช่นเดียวกัน และทำให้เป็นท่อนสั้นๆ ด้วยเอนไซม์ DNaseI (Dalma-Weiszhausz *et al.*, 2006)

การเตรียมตัวอย่างเป้าหมายให้อยู่ในรูปของ cRNA โดยใช้ปฏิกิริยา IVT นี้ นอกจากเป็นขั้นตอนสำหรับการติดฉลากแล้ว ยังเป็นการเพิ่มปริมาณตัวอย่างเป้าหมาย จึงทำให้เทคนิคนี้มีความไวมากยิ่งขึ้น สามารถใช้ตรวจสอบยีนที่มีการแสดงออกในปริมาณน้อยๆ ได้ วิธีการคือ หลังจากที่ได้สกัดอาร์เอ็นเอจากเซลล์เป้าหมายให้บริสุทธิ์และสังเคราะห์ cDNA สายแรกด้วย oligo-dT ที่เชื่อมต่อกับโปรโมเตอร์ T7 RNA polymerase เป็นไพรเมอร์ สร้างเป็น cDNA สายคู่ที่เชื่อมต่อกับโปรโมเตอร์ T7 แล้วจึงนำไปเพิ่มปริมาณด้วยปฏิกิริยา IVT ที่มีโรโบนิวคลีโอไทด์ที่ติดฉลากด้วยสารไบโอติน (biotinylated ribonucleotide analogue) ได้เป็น cRNA เป้าหมายปริมาณมาก ในกรณีที่มีตัวอย่างอาร์เอ็นเอในปริมาณน้อยมาก (10-100 นาโนกรัม) สามารถที่จะเพิ่มปริมาณตัวอย่างให้เพียงพอสำหรับการตรวจสอบได้ โดยการเพิ่มรอบการสังเคราะห์ cDNA สายคู่ เป็นสองรอบก่อนเข้าสู่ขั้นตอนการติดฉลาก (two cycle target labeling) (Fig. 8) คือ หลังจากได้ cDNA สายคู่ในรอบแรกแล้ว

ยังไม่มีก็นำไปติดฉลาก แต่นำมาสังเคราะห์เป็นอาร์เอ็นเอ ด้วยปฏิกิริยา IVT แล้วจึงนำอาร์เอ็นเอที่ได้นี้สังเคราะห์เป็น cDNA สายคู่อีกครั้งหนึ่ง (รอบที่สอง) แล้วจึงนำ cDNA สายคู่ที่ได้จากรอบที่สอง ไปใช้เป็นต้นแบบในการสังเคราะห์ cRNA ที่ติดฉลากด้วยปฏิกิริยา IVT ต่อไป (Fig. 8)

การติดฉลากกรดนิวคลีอิกเป้าหมายที่ใช้ในเทคโนโลยีนี้ จะติดฉลากด้วยสารไบโอติน หลังจากปฏิกิริยาไฮบริไดเซชัน จึงตรวจสอบโดยการย้อมด้วยโมเลกุลเรืองแสง ที่สามารถจับกับไบโอตินอย่างจำเพาะ คือ streptavidin-phycoerythrin (SAPE) ในวิธีการย้อมนี้จะเพิ่มขั้นตอนการขยายสัญญาณโดยการใช้อแอนติบอดีสำหรับ streptavidin (anti-streptavidin antibody) ที่จับกับ SAPE ที่จำเพาะ แล้วจึงย้อมด้วย biotinylated IgG และ SAPE อีกครั้งตามลำดับ (Fig. 9)

แผ่นแอร์เรย์ที่ผ่านขั้นตอนการย้อมเรียบร้อยแล้ว สามารถตรวจสอบสัญญาณด้วยเครื่องสแกนที่เป็น confocal laser และแปลสัญญาณความเข้มของสารเรืองแสงตามปริมาณ cRNA เป้าหมายที่จับกับโพรบบนแผ่นแอร์เรย์ เนื่องจากการติด

ผลได้ด้วยโมเลกุลเรืองแสงเพียงชนิดเดียว ดังนั้นการวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของยีน เพื่อเปรียบเทียบระหว่างตัวอย่าง 2 ตัวอย่างหรือมากกว่า จึงเป็นการวิเคราะห์แบบแยกแผ่นแอร์เรย์ คือ วิเคราะห์สัญญาณของแต่ละชุดโพรบเป็นค่าสัมบูรณ์ (absolute) ของแต่ละแผ่นก่อน (single array analysis) แล้วจึงนำค่าที่

ได้มาเปรียบเทียบกับ ซึ่งแตกต่างจากเทคนิค cDNA microarray ทั่วไป ที่ติดผลากตัวอย่างเป้าหมาย 2 ตัวอย่าง ด้วยสารเรืองแสง 2 ชนิดที่ให้สีต่างกัน และนำมาทำปฏิกิริยาไฮบริโดเซชันแบบแข่งขันบนแผ่นแอร์เรย์เดียวกัน ถึงแม้ว่าจะสะดวกเพราะมีขั้นตอนการไฮบริโดเซชันเพียงครั้งเดียว แต่มีข้อจำกัดคือ

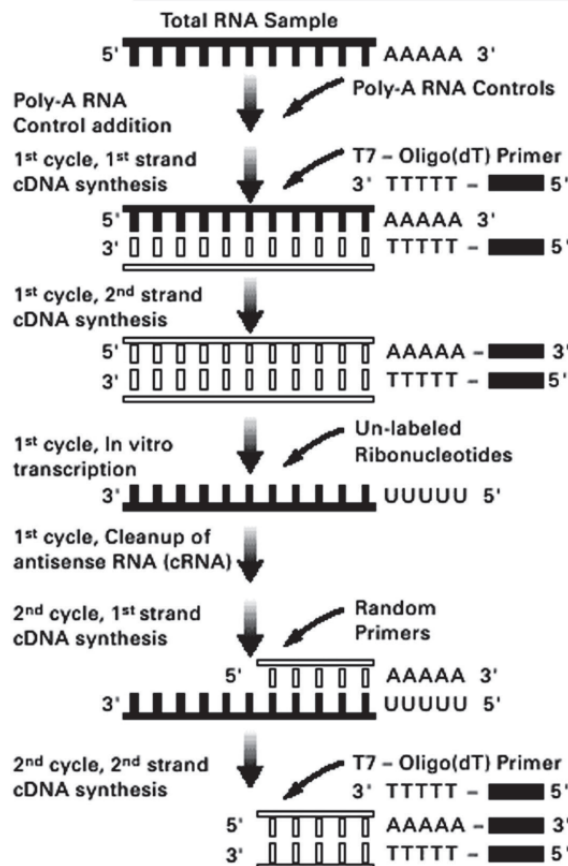


Figure 8 Two cycle target labeling (Affymetrix, 2005).

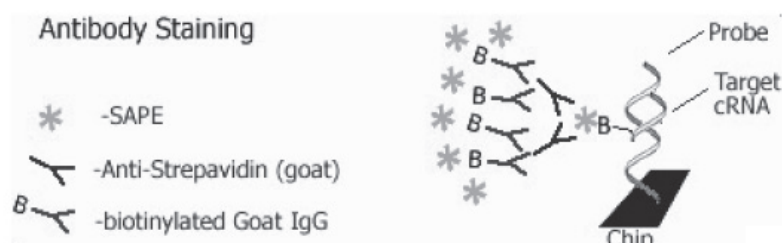


Figure 9 Schematic illustration of staining strategy in GeneChip technology (<http://www.gene-chip.com>).

สามารถวิเคราะห์เปรียบเทียบการแสดงออกของยีนได้เพียงครั้งละ 2 ตัวอย่างเท่านั้น ส่วนเทคโนโลยียีนชิปสามารถเปรียบเทียบได้มากกว่า 2 ตัวอย่าง และสามารถใช้เปรียบเทียบต่างการทดลองกันได้อีกด้วย

ข้อมูลสัญญาณที่ได้จากแผ่นแอร์เรย์แต่ละแผ่น จะนำมาวิเคราะห์ด้วยซอฟต์แวร์สำเร็จรูปที่จำเพาะ เช่น MASS และ GCOS ของบริษัท Affymetrix เป็นต้น ข้อมูลที่ได้ประกอบด้วย (1) ระดับสัญญาณ (signal value) ที่บ่งบอกปริมาณการแสดงออกของยีน

(ปริมาณทรานสคริปต์) (2) ค่า detection call เป็นค่าที่บ่งบอกว่าทรานสคริปต์นั้นๆ มีการแสดงออกหรือไม่ หรือ ขาดหายไปบ้าง ตรวจสอบทรานสคริปต์ได้อย่างแท้จริง ซึ่งประกอบด้วยค่าอะกอร์ริทึมที่เป็นไปได้ 3 ค่า คือ Absent (A), Present (P) และ Marginal (M) และ (3) ค่า detection call p value ซึ่งเป็นค่าที่บ่งชี้ความเชื่อมั่นทางสถิติของชุดโพรบ ในการตรวจสอบทรานสคริปต์ แสดงตัวอย่างดัง Figure 10 (Affymetrix, 2005; Dalma-Weizhausz *et al.*, 2006)

	Stat Pairs	Stat Pairs Used	Signal	Detection	Detection p-value
AFFX-BioB-5_at	20	20	338.0	P	0.000972
AFFX-BioB-M_at	20	20	667.6	P	0.000060
AFFX-BioB-3_at	20	20	389.9	P	0.000060
AFFX-BioC-5_at	20	20	893.5	P	0.000110
AFFX-BioC-3_at	20	20	858.9	P	0.000044
AFFX-BioDn-5_at	20	20	1340.8	P	0.000052
AFFX-BioDn-3_at	20	20	4810.4	P	0.000195
AFFX-CreX-5_at	20	20	11307.3	P	0.000052
AFFX-CreX-3_at	20	20	11381.5	P	0.000044
AFFX-DapX-5_at	20	20	21.6	A	0.108979
AFFX-DapX-M_at	20	20	48.7	A	0.131361
AFFX-DapX-3_at	20	20	7.2	A	0.737173
AFFX-LysX-5_at	20	20	14.2	A	0.368438
AFFX-LysX-M_at	20	20	35.8	A	0.544587
AFFX-LysX-3_at	20	20	27.6	A	0.185131
AFFX-PheX-5_at	20	20	4.6	A	0.772364
AFFX-PheX-M_at	20	20	1.9	A	0.910522
AFFX-PheX-3_at	20	20	45.6	A	0.485110
AFFX-ThiX-5_at	20	20	10.9	A	0.529760
AFFX-ThiX-M_at	20	20	37.4	A	0.411380
AFFX-ThiX-3_at	20	20	5.8	A	0.904333
AFFX-TrpX-5_at	20	20	12.1	A	0.440646
AFFX-TrpX-M_at	20	20	2.6	A	0.804734
AFFX-TrpX-3_at	20	20	4.0	A	0.588620
AFFX-r2-Ec-bioB-5_at	11	11	478.1	P	0.000244
AFFX-r2-Ec-bioB-M_at	11	11	707.3	P	0.000244
AFFX-r2-Ec-bioB-3_at	11	11	622.3	P	0.000244
AFFX-r2-Ec-bioC-5_at	11	11	1069.3	P	0.000244
AFFX-r2-Ec-bioC-3_at	11	11	1786.8	P	0.000244
AFFX-r2-Ec-bioD-5_at	11	11	4591.0	P	0.000244
AFFX-r2-Ec-bioD-3_at	11	11	6257.3	P	0.000244
AFFX-r2-Ec-bioE-5_at	11	11	12191.4	P	0.000244

Figure 10 Data analysis output for a single array analysis includes stat pairs, stat pairs used, signal, detection and the detection p -value (Affymetrix, 2005).

ค่าระดับสัญญาณของแต่ละชุดโพรบนั้น เป็นค่าที่ได้จากการประเมินสัญญาณของคู่โพรบ ภายใน 1 ชุดโพรบ ซึ่งการใช้โพรบบ่อยหลายโพรบ ในการตรวจสอบอาร์เอ็นเอ 1 ตำแหน่ง (probe redundancy) ร่วมกับการใช้โพรบบ่อย MM เป็นการเพิ่มประสิทธิภาพการตรวจสอบ คือ เพิ่มความจำเพาะ และความถูกต้องในการวิเคราะห์ปริมาณอาร์เอ็นเอ สามารถจัดสัญญาณที่เกิดจากการไฮบริไดเซชันข้าม (cross-hybridization) ระหว่างยีนที่มีลำดับเบส คล้ายคลึงกัน โดยเฉพาะยีนที่อยู่ในแฟมิลีเดียวกัน จึงลดปริมาณการเกิด false positive

ค่า detection call เป็นค่าที่ได้จากการ ประเมินสัญญาณของชุดโพรบ โดยการเปรียบเทียบ ระดับสัญญาณระหว่างโพรบบ่อย PM และ MM ซึ่งเป็นค่าที่ชี้ให้เห็นว่าทรานสคริปต์นั้นๆ แสดงออก (present: PM>MM) หรือไม่แสดงออก (absent: PM<MM) ถ้าให้สัญญาณก้ำกึ่ง (marginal: PM $\cong$ MM) จะไม่นำมาพิจารณาในการวิเคราะห์ ส่วนค่า detection call p value เป็นค่าที่บ่งชี้ถึงความเชื่อมั่นของชุดโพรบ ซึ่งได้จากการประเมินสัญญาณของแต่ละคู่โพรบ ซึ่งค่า p ที่ใช้ในการคัดเลือกโพรบนั้นขึ้นอยู่กับ ข้อกำหนดของนักวิจัย ถึงแม้ว่าบางชุดโพรบอาจจะ ให้ค่าสัญญาณที่สูงและค่า detection call เป็น P (present) แต่ถ้ามีค่า p ไม่ตรงตามที่กำหนดก็จะไม่นำ มาใช้ในการวิเคราะห์ ซึ่งการกลั่นกรองข้อมูลแบบ เข้มงวด จะทำให้ได้ข้อมูลที่น่าเชื่อถือ และสามารถทำซ้ำได้เหมือนเดิม (reproducible)

การวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของยีน เป็นการเปรียบเทียบสัญญาณของแต่ละชุดโพรบ ระหว่างแผ่นแอร์เรย์ที่ใช้เป็นตัวควบคุม หรือ baseline กับแผ่นแอร์เรย์ที่ต้องการตรวจสอบ หรือ experiment ซึ่งต้องปรับค่าสัญญาณ (normalization) ที่ทำให้เกิด ความผันแปรระหว่างแผ่นแอร์เรย์ก่อน เนื่องจาก ข้อมูลที่ได้เป็นข้อมูลขนาดใหญ่ประกอบด้วยชุด โพรบจำนวนมาก ดังนั้น จึงต้องมีการคัดกรองข้อมูล เลือกเฉพาะชุดโพรบที่มีค่าความเชื่อมั่นสูงเท่านั้นมา

ใช้ในขั้นตอนการวิเคราะห์ ค่าความเชื่อมั่นของชุด โพรบนอกจากพิจารณาจากค่า p ของค่า detection call แล้ว ยังมีการเพิ่มความเข้มงวดในการคัดกรองชุด โพรบ คือ พิจารณาร่วมจากจำนวนซ้ำ (biological replication) ที่ทำการทดลอง โดยเลือกเฉพาะชุด โพรบที่ให้ค่า detection call เป็น P มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ของจำนวนซ้ำในกลุ่ม baseline หรือ กลุ่ม experiment เช่น ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ ประกอบด้วยแผ่นแอร์เรย์ที่เป็น baseline 3 แผ่น และ ที่เป็น experiment 3 แผ่น ชุดโพรบที่ถูกคัดเลือกต้องมีค่า detection call เป็น P ในกลุ่มใดกลุ่มหนึ่ง อย่าง น้อย 2 แผ่น เรียกวิธีการนี้ว่า “detection call filter” (McClintick and Edenberg, 2006) ชุดโพรบที่ผ่าน การคัดกรองตามข้อกำหนดเท่านั้น ที่นำมาคำนวณหา ค่าสัญญาณเฉลี่ย และเปรียบเทียบอัตราส่วนค่าระดับ สัญญาณระหว่างแอร์เรย์ทั้ง 2 ชุด ค่าที่ได้แสดงในรูป ของ จำนวนเท่า (fold change) ที่แสดงถึงการ เปลี่ยนแปลงระดับการแสดงออกของยีนที่เพิ่มขึ้น หรือลดลง ผลที่ได้จากการวิเคราะห์ทำให้ทราบว่า ยีน ใดบ้างที่ถูกชักนำ (up-regulated gene) ยีนใดบ้างที่ถูก ยับยั้ง (down-regulated gene) ในสภาวะที่กำลังศึกษา เช่น Krep *et al.* (2002) ใช้เทคโนโลยียีนชิปบ่งชี้ยีนที่ ตอบสนองต่อความเครียดเนื่องจากสิ่งแวดล้อมใน อะราบิโดปซิส ได้แก่ ความเครียดเนื่องจากเกลือ ความเครียดเนื่องจากออกซิเจน และ ความเครียด เนื่องจากอุณหภูมิต่ำ พบยีนที่เกี่ยวข้องกับความเครียด ทั้ง 3 สภาวะ ถึง 2,409 ยีน เช่นเดียวกับ Mongkolsiriwatana (2008) ใช้เทคโนโลยียีนชิปตรวจ สอบการแสดงออกของยีนที่ตอบสนองต่อช่วงแสง (photoperiod) ในข้าว พบยีนที่เข้ามาเกี่ยวข้อง 184 ยีน เป็นยีนที่ถูกชักนำ 79 ยีน และ ถูกยับยั้ง 105 ยีน เป็นต้น ซึ่งข้อมูลที่ให้มีเป็นจำนวนมาก แสดงถึงการ ทำงานร่วมกันของยีน ดังนั้นการแปลผลให้เป็นข้อมูล ทางชีววิทยา จึงจำเป็นต้องใช้เทคโนโลยีสารสนเทศที่ เชื่อมโยงระหว่างข้อมูลที่ได้จากเทคโนโลยียีนชิป กับ ฐานข้อมูลอื่นที่มีการรวบรวมไว้ ได้แก่ ฐานข้อมูล

ด้านจีโนม โปรตีน และเมแทบอลิซึม เพื่อแสดงให้เห็นภาพกลไกการทำงานของจีโนมในการตอบสนองต่อกระบวนการทางชีววิทยานั้นๆ จึงได้มีการพัฒนาฐานข้อมูลและชุดซอฟต์แวร์ต่างๆ จำนวนมากเพื่อสนับสนุนการวิเคราะห์ข้อมูลที่ได้จากเทคโนโลยียีนชิป ตัวอย่างเช่น ฐานข้อมูลสำหรับวิเคราะห์วิถีเมแทบอลิซึม อาทิ The Gene Ontology project (GO) (<http://www.geneontology.org>), The Kyoto Encyclopaedia of Gene and Genome (KEGG) (<http://www.genome.jp/kegg/>), NetAffix GO mining tool สำหรับการวิเคราะห์ยีนชิปที่ผลิตโดยบริษัท Affymetrix (<http://www.affymetrix.com/analysis>), Pathway processor (<http://cgr.harvard.edu/cavalierii/pp.html>) และ MAPPfinder (<http://www.genmapp.org>) เป็นต้น นอกจากนี้ ยังมีฐานข้อมูลสำหรับการวิเคราะห์โปรโมเตอร์ และ *cis*-regulatory element ของยีนที่ถูกควบคุมให้มีการแสดงออกร่วมกัน (co-regulated gene) อาทิเช่น ฐานข้อมูล RiCES (<http://hpc.irri.cgiar.org/>

[tool/nias/ces](http://nias/ces)), RSAT (Regulatory sequence analysis tools; <http://rsat.ulb.ac.be/rsat/>) เป็นต้น โดยฐานข้อมูลดังกล่าวนี้ใช้สนับสนุนการวิเคราะห์ข้อมูล ทั้งที่ได้จากเทคนิคดีเอ็นเอไมโครอาร์เรย์และเทคโนโลยียีนชิป

การใช้เทคโนโลยียีนชิปตรวจสอบการกลาย

การวิเคราะห์หาลำดับเบสด้วยเทคนิคไฮบริไดเซชันครั้งแรกรายงานโดย Drmanac and Crkvenjakov (1987) ต่อมาได้ดัดแปลงมาใช้กับเทคโนโลยียีนชิป เพื่อวิเคราะห์หาความผันแปรของดีเอ็นเอภายในจีโนมหลายตำแหน่งพร้อมๆ กัน ซึ่งเป็นการวิเคราะห์หาลำดับตำแหน่งที่เกิดการไฮบริไดเซชันระหว่างโพรบที่มีลำดับเบสต่างจากดีเอ็นเอเป้าหมาย 1 ตำแหน่ง (single base mismatch) โดยดูจากสัดส่วนของค่าสัญญาณที่ลดลงต่างไปจากการจับกับดีเอ็นเอเป้าหมายของไวด์ไทป์ (wild type) แบบสมบูรณ์ (perfect match) (Fig. 11)

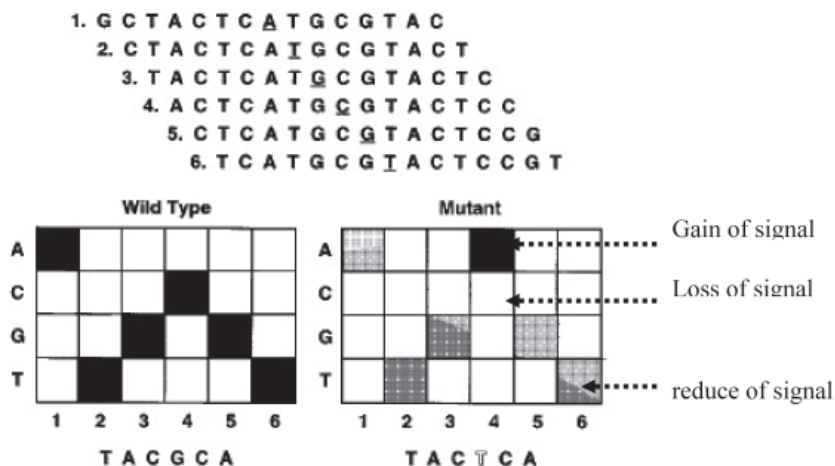


Figure 11 Mutational analysis of GeneChip Array. Schematic of a chip containing 6 columns of 15-mers, with each column containing four groups of oligonucleotides that differ only at the central position (underlined). Incubation of the chip with a fluorescent sample results in sequence-specific hybridization events between the probe and oligonucleotide targets on the surface (solid blocks). Comparative fluorescence intensity analysis of each column allows base-by-base resequencing of wild type (TACGCA) and mutant (TACTCA) genes. The single base mutation in the mutant sequence leads a general reduction of signal (stippled blocks) in the proximity of the point mutation (Lemieux *et al.*, 1998).

การวิเคราะห์หาลำดับเบสแต่ละตำแหน่งบนสายดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยวิธีไฮบริไดเซชันนั้น ใช้ชุดโพรบที่ประกอบด้วยโพรบ 4 แบบ ซึ่งโพรบทั้ง 4 แบบนี้มีลำดับเบสเหมือนกัน ยกเว้นตำแหน่งตรงกลางของโพรบ ซึ่งเป็นตำแหน่งเบสที่ต้องการตรวจสอบ จะมีเบสที่แตกต่างกันไป คือ A, T, C หรือ G ชนิดใดชนิดหนึ่ง (Fig. 12 A) ซึ่งโพรบ 1 ใน 4 แบบของชุดโพรบที่มีลำดับเบสคู่สมกับดีเอ็นเอเป้าหมายทุกตำแหน่ง จะให้ค่าสัญญาณการเรืองแสงสูงสุด (Fig. 12 B) แสดงถึงลำดับเบสที่ถูกต้องของดีเอ็นเอเป้าหมาย (Fig. 12) ส่วนการตรวจสอบการกลายโดยใช้เทคโนโลยียีนชิปนั้น เป็นการตรวจสอบการกลายที่เกิดขึ้นเนื่องจากการผันแปรของดีเอ็นเอแบบ point mutation โดยเปรียบเทียบดีเอ็นเอระหว่างไวด์ไทป์และมิวแทนต์แบบเบสต่อเบส ซึ่งมีวิธีการตรวจสอบด้วยกัน 2 วิธี ตามกลยุทธ์ของการออกแบบโพรบและการตรวจสอบสัญญาณ คือ

1. วิธีการตรวจสอบสัญญาณที่ลดลง (loss of signal approach)

โดยการเปรียบเทียบปริมาณสัญญาณของโพรบ ที่มีลำดับเบสคู่สมกับดีเอ็นเอเป้าหมายทุก

ตำแหน่ง (perfect match) ระหว่างดีเอ็นเอตัวอย่างที่ต้องการทดสอบ (test sample) กับ ดีเอ็นเอของไวด์ไทป์ที่ใช้เป็นดีเอ็นเออ้างอิง (reference target) ถ้าเป็นไปตามหลักการแล้ว เมื่อเกิดการกลายกับดีเอ็นเอตัวอย่างทั้งสองแอลลิล (homozygous mutant) นอกจากสัญญาณโพรบในตำแหน่งเป้าหมายที่ลดลงอย่างสมบูรณ์แล้ว สัญญาณของโพรบที่ใช้ตรวจสอบลำดับเบส ที่ขนาดตำแหน่งเบสเป้าหมายทั้งสองด้าน ควรจะมีสัญญาณที่ลดลงก่อนข้างสมบูรณ์ แต่ถ้าเกิดการกลายเพียงแอลลิลเดียว (heterozygous mutant) ควรจะมีสัญญาณที่ลดลงประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงตัวอย่างใน Figure 11

2. วิธีการตรวจสอบสัญญาณที่เพิ่มขึ้น (gain of signal approach)

เป็นการตรวจสอบสัญญาณที่เพิ่มขึ้นของโพรบ ในตำแหน่งสำหรับตรวจสอบการกลายที่จำเพาะ การตรวจสอบด้วยวิธีนี้จะเป็นการตรวจหาการกลายแบบต่างๆ ที่เป็นไปได้ ของลำดับเบสในแต่ละตำแหน่งว่าเกิดขึ้นแบบใด ดังนั้นการตรวจหาลำดับเบสในแต่ละตำแหน่ง จึงต้องใช้ชุดโพรบสำหรับตรวจสอบการกลายแบบต่างๆ ที่เป็นไปได้ทุก

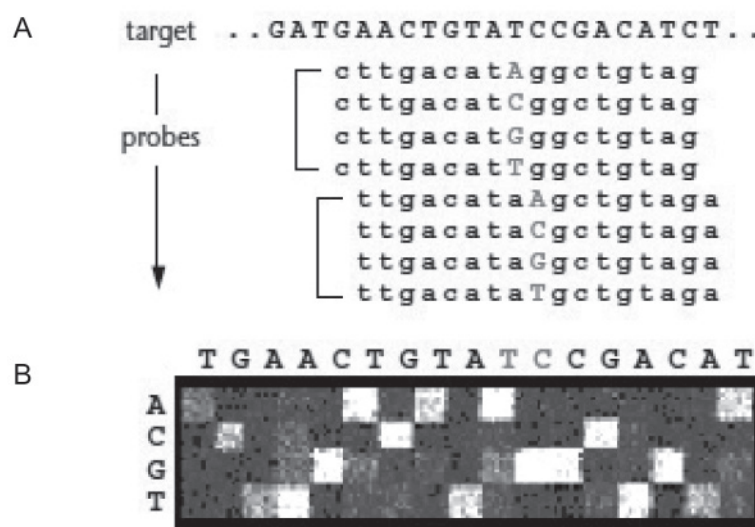


Figure 12 Sequence analysis of GeneChip array. Determination of DNA sequence is accomplished by using a four-probe interrogation strategy (Lipshutz *et al.*, 1999).

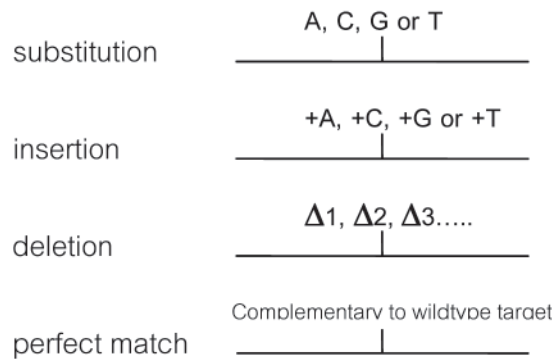


Figure 13 Typical oligonucleotide probes used in gain of signal sequence analysis. Substitution probes interrogate for the presence of all possible single nucleotide substitution sequence variation. Insertion probes interrogate for the presence of inserted sequences, with single nucleotide insertions being the most feasible to completely represent on the array. Deletion probes interrogate for the presence of all possible nucleotide deletion lengths up to a certain size. Perfect-match probes are fully complementary to wild type sequence. One of these will be represented in the substitution set, but the presence of additional perfect match probes over a range of size facilitates the quantitative robustness of the loss-of-signal analysis (Hacia, 1999).

รูปแบบ ได้แก่ โพรบสำหรับตรวจสอบการกลายแบบแทนที่เบส (substitution) แบบเพิ่มเบส (insertion) และแบบขาดหายไปของเบส (deletion) (Fig. 13) ซึ่งเมื่อเกิดการกลายพันธุ์ขึ้นแบบใด ตำแหน่งโพรบสำหรับตรวจสอบการกลายที่จำเพาะดังกล่าว จะให้ค่าสัญญาณที่เพิ่มขึ้นสูงสุด (gain of signal) ดังแสดงตัวอย่างใน Figure 14) และโพรบที่มีลำดับเบสคู่สมกับดีเอ็นเอเป้าหมายของไวต์ไทป์ทุกตำแหน่ง (perfect match) ซึ่งใช้เป็นโพรบควบคุมสำหรับเปรียบเทียบสัญญาณ กับโพรบสำหรับตรวจสอบการกลายแบบต่างๆ ข้างต้น ถึงแม้ว่า 1 ใน 4 ของชุดโพรบย่อยสำหรับตรวจสอบการกลายแบบแทนที่เบสนั้น โพรบใดโพรบหนึ่งจะมีลำดับเบสที่คู่สมกับดีเอ็นเอเป้าหมายทุกตำแหน่ง คือ มีลำดับเบสเหมือนกับโพรบแบบควบคุมก็ตาม แต่ในการผลิตแผ่นแอร์เรย์ ยังต้องมีโพรบแบบควบคุมไว้ด้วย เพื่อใช้ในการเปรียบเทียบวิเคราะห์หาปริมาณสัญญาณที่ลดลง (loss of signal) เพื่อเป็นการยืนยันและให้ผลการวิเคราะห์ที่แม่นยำ นอกจากนี้แล้ว การวางโพรบ

ควบคุมบนแผ่นแอร์เรย์นั้น จะออกแบบวางให้ห่างจากชุดโพรบย่อยแบบแทนที่เบส (Fig. 14) เพื่อใช้ในการควบคุมสัญญาณแบบไม่จำเพาะ (non-specific signal) ที่อาจจะเกิดขึ้นได้ เนื่องจากความไม่สม่ำเสมอของตำแหน่งบนพื้นผิวของแผ่นแอร์เรย์ (Hacia *et al.*, 1998) เพื่อเพิ่มความถูกต้องแม่นยำให้มากยิ่งขึ้น เนื่องจากเทคโนโลยีซินธิสิสสามารถบรรจุโพรบได้เป็นจำนวนมาก ดังนั้น จึงสามารถออกแบบโพรบสำหรับตรวจสอบดีเอ็นเอทั้งสองสายพร้อมกันได้ เพื่อยืนยันและให้ผลการทดลองที่มีความน่าเชื่อถือ มากยิ่งขึ้น ถ้าต้องการตรวจสอบดีเอ็นเอทั้งสองสายที่มีขนาดความยาว N คู่เบส ภายในแผ่นแอร์เรย์ต้องประกอบด้วยชุดโพรบ สำหรับตรวจสอบการกลายแบบแทนที่เบสและแบบเพิ่มเบสอย่างละ 8N โพรบ และแบบขาดหายไปของเบส 1 ตำแหน่ง จำนวน 2N โพรบ ในกรณีที่ต้องการตรวจสอบการเพิ่มเบสที่เพิ่มเข้ามาขนาด x คู่เบสนั้น ต้องใช้โพรบแบบต่างๆ ที่เป็นไปได้จำนวน $2(4^x)N$ โพรบ (Hacia and Collins, 1999) ตัวอย่าง เช่น ถ้าต้องการตรวจ

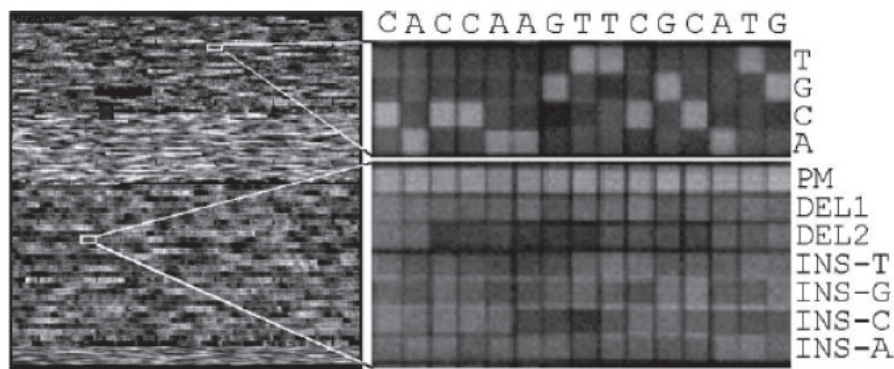


Figure 14 Target image comparisons. Gray-scale raw images showing hybridization pattern of GeneChip array. The target sequence is shown on the leftmost side along magnified region base substitution (top right) and insertion and deletion (bottom right) probes. PM strands for perfect match probe separately locates from substitution probe set (Hacia, *et al.*, 1998; Karaman *et al.*, 2005; <http://www.affymetrix.com>).

สอบดีเอ็นเอทั้งสองสายขนาด 10 กิโลเบส ต้องใช้ชุดโพรบสำหรับตรวจสอบการกลายแบบแทนที่เบสจำนวน 80,000 โพรบ สำหรับตรวจสอบการกลายแบบขาดหายไปของเบสที่ขนาด 1-5 คู่เบส จำนวน 100,000 โพรบ สำหรับตรวจสอบการกลายแบบเพิ่มเบสที่ขนาด 1-5 คู่เบส ต้องใช้โพรบแบบต่างๆ 27,280,000 โพรบ ดังนั้นรวมทั้งหมดแล้ว ต้องใช้โพรบสำหรับตรวจสอบการกลายแบบต่างๆ จำนวน 28,360,000 โพรบ ผลที่ได้จากการตรวจสอบนอกจากบ่งชี้ได้อย่างชัดเจนว่าเกิดการกลายที่ตำแหน่งใด และเป็นการกลายแบบใดแล้ว ยังสามารถระบุจีโนไทป์ของมิวแทนต์ได้ว่า เกิดการกลายเพียงแอลลีลเดียว (heterozygous mutation) หรือ ทั้งสองแอลลีล (homozygous mutation) (Fig. 15) แต่อย่างไรก็ดี การตรวจสอบการกลายด้วยเทคโนโลยีชิปนี้ ไม่เหมาะสมกับการกลายที่เกิดการขาดหายไปของดีเอ็นเอขนาดใหญ่ หรือบริเวณที่มีปริมาณ GC สูง เนื่องจากไม่สามารถแยกความแตกต่างของสัญญาณระหว่างไวต์ไทป์และมิวแทนต์ได้ (Lemieux *et al.*, 1998)

การใช้เทคโนโลยีชิปตรวจสอบสเนป (single nucleotide polymorphism, SNP)

เทคโนโลยีชิป นอกจากสามารถประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบการแสดงออกของยีน และวิเคราะห์ความผันแปรของดีเอ็นเอภายในจีโนมได้อย่างรวดเร็วแล้ว ยังนำมาใช้ในการวิเคราะห์สเนป กลยุทธ์ของแต่ละวิธีนั้นขึ้นอยู่กับวิธีการออกแบบโพรบตามที่กล่าวมาแล้วข้างต้น สำหรับการวิเคราะห์จีโนไทป์ของสเนปนั้น การตรวจสอบลำดับเบสของแต่ละแอลลีล ใช้ชุดโพรบที่ประกอบด้วยโพรบหลายโพรบ แต่ละคู่โพรบจะมีลำดับเบสที่แตกต่างกัน 1 เบสในตำแหน่งตรงกลางและเป็นตำแหน่งสำหรับตรวจสอบสเนป (PM และ MM) นอกจากโพรบสำหรับตรวจสอบตรงตำแหน่งสเนป (ตำแหน่งที่ 0) แล้ว ยังประกอบด้วยคู่โพรบสำหรับตรวจสอบลำดับเบสที่ขนาบตำแหน่งสเนปอีกด้วย คือ ตำแหน่ง +1, +4 และ -1, -4 เพื่อเป็นการยืนยันผลการตรวจสอบ (Fig. 16) และการตรวจสอบสเนปด้วยเทคโนโลยีชิปนี้ จะตรวจสอบดีเอ็นเอทั้งสองสายพร้อมกัน ดังนั้นการตรวจสอบสเนปแต่ละแอลลีล จึงประกอบด้วยโพรบจำนวน 40 โพรบ และผลที่ได้จากการวิเคราะห์สามารถบ่งชี้จีโนไทป์ของสเนปแต่ละตำแหน่งได้ทั้ง

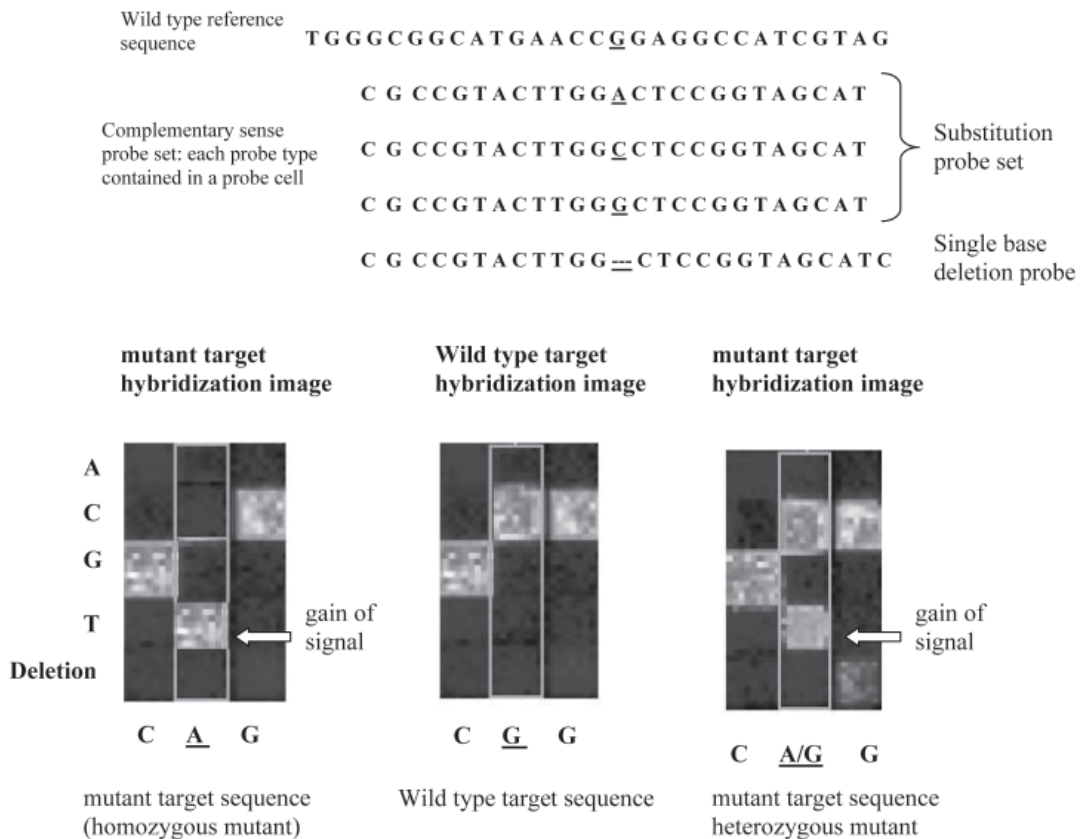


Figure 15 Schematic representation of chip array system. Probe on the array are arranged in sets of five. Each probe in the set is complementary to reference sequence except for a mismatch position, called the “substitution” position. At the substitute position, each of the four possible nucleotide (A,C, G, T) and single base pair deletion are represented in the probe set. Assay condition optimize hybridization of the fluorescently labeled DNA target to the probe that best matches its sequence. This hybrid yields higher fluorescence intensity relative to the other target-probe hybrids in the set (modified from <http://www.affymetrix.com>).

แบบฮอโมไซกัส และเฮเทอโรไซกัส จากความสามารถของเทคโนโลยีการผลิตแผ่นชิป ที่บรรจุโปรบได้ อย่างหนาแน่นจำนวนมาก จึงทำให้เทคนิคนี้สามารถใช้วิเคราะห์สิ่งมีชีวิตที่ซับซ้อนมีจีโนมขนาดใหญ่ เช่น มนุษย์ (McGall and Christians, 2002) และพืชเศรษฐกิจหลายชนิด เช่น ข้าว (Kumar *et al.*, 2007) ข้าวบาร์เลย์ (Cui *et al.*, 2005) และ ข้าวโพด (Krist *et al.*, 2006) เป็นต้น

เทคโนโลยียีนชิปกับการพัฒนาพืชเศรษฐกิจ

การวิเคราะห์หน้าที่การทำงานของจีโนม โดยการตรวจสอบการแสดงออกของยีนทั้งหมดที่ตอบสนองต่อสภาวะต่างๆ ทำให้เข้าใจถึงกลไกควบคุมการเจริญเติบโตและการพัฒนาของพืช และช่วยให้นักปรับปรุงพันธุ์ สามารถนำไปใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืชเศรษฐกิจได้รวดเร็วยิ่งขึ้น การรวบรวมฐานข้อมูลทางด้านการแสดงออกของยีน ที่ได้จาก

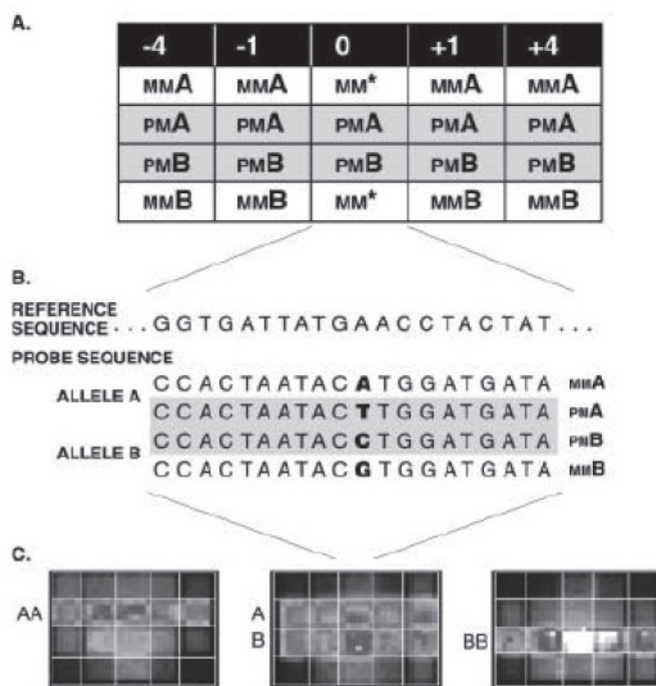


Figure 16 SNP GeneChip array design. (A) A known biallelic polymorphism at position 0 is interrogated by a block of five probe sets. Each probe set consists of four probes, a perfect match and a mismatch to allele A, and a perfect match and a mismatch to allele B. One probe set in a block is centered directly over the polymorphism “0”, and others are centered upstream (-4, -1) and downstream (+1, +4). (B) The sequences of the probe set centered over the polymorphism is shown. (C) Sample images of blocks showing homozygous A, heterozygous A/B, or homozygous B at the same SNP site (McGall and Christains, 2002).

เทคนิคดีเอ็นเอไมโครแอร์เรย์ ทำให้ทราบถึงการทำงานของยีนที่จำเพาะต่อชนิดของเนื้อเยื่อ ระยะของการพัฒนา การตอบสนองต่อสภาวะแวดล้อม ข้อมูลเหล่านี้ช่วยให้นักวิจัยสามารถบ่งชี้ยีนที่สำคัญต่อลักษณะทางเศรษฐกิจได้ การใช้เทคโนโลยียีนชิปเพื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีนสำหรับพืชเศรษฐกิจมีรายงานแล้วหลายชนิด (Table 1) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าได้มีการนำเทคโนโลยียีนชิปมาใช้งานวิจัยด้านการเกษตรมากยิ่งขึ้น และมีการจัดทำฐานข้อมูลรวบรวมข้อมูลการทดลอง และการแสดงออกของยีนในพืชเศรษฐกิจที่ได้จากเทคโนโลยียีนชิป คือ PLEXdb (Plant Expression Database)

(<http://www.plexdb.org>) ซึ่งนักวิจัยสามารถนำข้อมูลเหล่านี้ไปใช้ประโยชน์ต่อไปได้

Rice GeneChip® เป็นเทคโนโลยียีนชิปชนิดแรกที่เกิดขึ้นมา เพื่อใช้ในการตรวจสอบการทำงานของจีโนมข้าว ซึ่งผลิตโดยบริษัท Affymetrix และได้นำมาใช้ในการตรวจสอบการแสดงออกของยีนในสภาวะต่างๆ ตัวอย่างเช่น Hazen *et al.* (2005) ใช้ Rice GeneChip array ตรวจสอบการแสดงออกของยีนที่ตอบสนองต่อความแห้งแล้งในข้าว โดยศึกษาผลของการปรับแรงดันออกซิเจน ซึ่งเป็นกระบวนการที่สำคัญของการทนแล้งในพืช ซึ่งการศึกษาในครั้งนี้สามารถเชื่อมโยงกลุ่มของยีนที่เกิดการเปลี่ยนแปลงนี้

Table 1 Recent GeneChip arrays designed for crop plant biology studies.

Plant species	geneChip platform	Resources
Barley	Affymetrix	http://www.affymetrix.com/product/array/specific/barley.affx
Brassica	Affymetrix	http://www.affymetrix.com/community/research/consortia.affx
Critus	Affymetrix	http://www.affymetrix.com/community/research/consortia.affx
Grape	Affymetrix	http://www.affymetrix.com/product/array/specific/vitis.affx
Maize	Affymetrix	http://www.affymetrix.com/product/array/specific/maize.affx
Medicago	Affymetrix	http://www.affymetrix.com/community/research/consortia.affx
Rice	Affymetrix	http://www.affymetrix.com/product/array/specific/rice.affx
Rice	Agilent	http://www.chem.agilent.com/Script/PDS.asp?lpage=12133
Soybean	Affymetrix	http://www.affymetrix.com/product/array/specific/soybean.affx
Sugarcane	Affymetrix	http://www.affymetrix.com/product/array/specific/sugarcane.affx
Tomato	Affymetrix	http://www.affymetrix.com/community/research/consortia.affx
Wheat	Affymetrix	http://www.affymetrix.com/product/array/specific/wheat.affx

กับเครื่องหมายดีเอ็นเอที่อยู่ใกล้ชิดกับลักษณะทนแล้งในข้าวได้ Ito *et al.* (2006) ศึกษาหน้าที่การทำงานของยีน *Dehydration-responsive element binding protein 1 (DREB1)* ซึ่งเป็น transcription factor ที่ตอบสนองต่อความเครียดเนื่องจากเกลือ โดยนำยีน *DREB1* ถ่ายเข้าสู่ข้าว แล้วนำต้นข้าวคัดแปลงพันธุกรรมที่ได้ มาตรวจสอบการแสดงออกของยีนที่ตอบสนองต่อความเครียด เนื่องจากเกลือ ความแห้งแล้ง และอุณหภูมิต่ำ ด้วย Agilent Rice Array ซึ่งสรุปได้ว่ายีน *DREB1* เป็นยีนสำคัญที่ทำให้พืชทนทานต่อความเครียดในสภาพแวดล้อมต่างๆ Zhang *et al.* (2006) ใช้ Affymetrix GeneChip ในการค้นหายีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการต้านทานโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัส และ เชื้อราของข้าวบาร์เลย์ พบว่ายีน *Rpg1* ซึ่งเป็นยีนที่ต้านทานโรคราสนิม ส่วนแอลลีลที่ไม่ต้านทานนั้นเกิดจากการกลายแบบขาดหายของเบส และพัฒนาดีเอ็นเอตำแหน่งดังกล่าว เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอสำหรับการคัดเลือกพันธุ์ นอกจากตัวอย่างที่กล่าวมาแล้ว การทราบรูปแบบของการแสดงออกของยีน ที่สัมพันธ์กับลักษณะฟีโนไทป์ที่ต้องการ เช่น ทราบรูปแบบการแสดงออกของยีนที่ให้ผลผลิตสูง ต้านทานแมลง หรือความเครียดเนื่องจากสภาพแวดล้อมต่างๆ แล้ว การ

คัดเลือกพืชคัดแปลงพันธุกรรมตามลักษณะฟีโนไทป์เป้าหมายนั้น ไม่จำเป็นต้องทดสอบต้นพืชคัดแปลงพันธุกรรมในแปลงปลูก เพียงนำ transgenic lines ที่ได้มาวิเคราะห์ด้วยเทคโนโลยียีนชิป ว่ามีการแสดงออกของยีนเป้าหมาย ที่สอดคล้องกับฟีโนไทป์ตามต้องการหรือไม่ ซึ่งเป็นการลดต้นทุนและร่นระยะเวลาการทดสอบในแปลง และให้ผลการตรวจสอบที่รวดเร็ว

การใช้เทคโนโลยียีนชิปในการวิเคราะห์ความผันแปรของลำดับเบสภายในจีโนมของพืชเศรษฐกิจ ทำได้กว้างขวางมากขึ้น เนื่องจากสามารถใช้บ่งชี้ DNA polymorphism ได้ละเอียดและรวดเร็ว และเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ได้สามารถนำมาใช้ในโปรแกรมการปรับปรุงพันธุ์ เช่น Spiegelman *et al.* (2000) ใช้เทคโนโลยียีนชิป ทำแผนที่จีโนมมะราบีคอปซิส และบ่งชี้ตำแหน่งยีนต้านทานเชื้อรา *Erysiphe orontii (RSF1)* และสามารถโคลนยีนดังกล่าวได้ แล้วนำมาประยุกต์ใช้กับข้าวบาร์เลย์ เป็นต้น

ถึงแม้ว่าเทคโนโลยียีนชิปเป็นเทคโนโลยีขั้นสูง ที่สามารถตอบคำถามของกระบวนการทางชีววิทยาได้อย่างรวดเร็ว แต่การที่จะนำมาใช้ทางด้านการเกษตรเช่นเดียวกับทางด้านการแพทย์นั้น จะเกิดขึ้นได้หรือไม่ขึ้นอยู่กับต้นทุนของเทคโนโลยี ว่าสามารถ

ที่จะสนับสนุนกลุ่มงานวิจัยด้านการเกษตรหรือไม่ แต่จากกระแสนงานวิจัยและการพัฒนาเทคโนโลยีเพื่อลดต้นทุนการผลิต น่าจะทำให้ระบบเทคโนโลยีขั้นสูงที่ครบวงจรมีราคาที่ลดลงในอนาคตอันใกล้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ รศ. ดร. สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล และ รศ. ดร. อรินทร์ชัย ธรรมชัยพิเนต ที่สละเวลาอันมีค่าในการตรวจสอบความถูกต้องของต้นฉบับ

เอกสารอ้างอิง

- Affymetrix. 2005. *GeneChip Expression Analysis Technical Manual*. Santa Clara, USA.
- Aharoni, A. and Vorst, O. 2001. DNA microarray for functional plant genomics. *Plant Mol Biol* 48: 99-118.
- Cui, X.P., Xu, J., Asghar R., Condamine, P., Svensson, J.T., Wanamaker, S., Stein N., Roose M. and Close, T.J.. 2005. Detecting single feature polymorphisms using oligonucleotide arrays and robustified projection pursuit. *Bioinformatics* 21: 3852-3858.
- Dalma-Weiszhauz, D.D., Warrington J., Tanimoto Y. E. and Miyada, C.G. 2006. The Affymetrix GeneChip³Platform: An overview. *Methods Enzymol* 40: 3-27.
- Drmanac, R.T. and Crkvenjakov, R.B. 1987. Method of sequencing of genomes by hybridization with oligonucleotide probes. *Yugoslav patent application* 570/87.
- Fodor, S.P, Read, J.L., Pirrung, M.C., Stryer, L., Lu, A.T. and Solas, D. 1991. Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis. *Science* 251: 767-773.
- Hacia, J.G., Sun, B., Hunt, N., Edgemon, K., Mosbrook, D., Robbins, C. and Fodor, S.P.A. 1998. Strategies for mutation analysis of the large multiexon ATM gene using high-density oligonucleotide arrays. *Genome Res* 8: 1245-1258.
- Hacia, J.G. 1999. Resequencing and mutational analysis using oligonucleotide microarray. *Nat Genet* (supplement) 21: 42-47.
- Hacia, J.G. and Collins, F.S. 1999. Mutational analysis using oligonucleotide microarray. *J Med Genet* 36: 730-736.
- Hacia, J.G., Brody, L.C. and Collins, F.S. 1998. Application of DNA chips for genomic analysis. *Mol Psychiatr* 3: 483-492.
- Hardiman, G. 2004. Microarray platforms-comparison and constrast. *Pharmacogenomics* 5: 487-502.
- Hazen, S.P., Pathan, M.S., Sanchez, A., Baxter, I., Dunn, M., Estes, B., Chang, H-S., Zhu, T., Kreps J.A. and Nguyen, H.T. 2005. Expression profiling of rice segregating for drought tolerance QTLs using a rice genome array. *Funct Integr Genomics* 5: 104-116.
- Ito, Y., Katsura, K., Maruyama, K., Tajiri, T., Kobayashi, M., Seki, M., Shinozaki K. and Yamaguchi-Shinozaki, K. 2006. Functional analysis of rice DREB1/CBF-type transcription factors involved in cold-responsive gene expression in transgenic rice. *Plant Cell Physiol* 47: 141-153.
- Ji, W., Zhou W., Gregg K., Yu, N. and Davis, S. 2008. A method for cross-species gene expression analysis with high-density oligonucleotide microarray. *Nucleic Acids Res* 32: 1-14.
- Karaman, M.W. Groshen, S., Lee, C-C. and Pike, B. L. 2005. Comparison of substitution, insertion and deletion for resequencing and mutational analysis using oligonucleotide microarray. *Nucleic Acids Res* 33: 1-9.
- Kirst, M., Caldo R., Casati, P., Tanimoto, G., Walbot, V., Wise, R.P. and Buckler, E.S. 2006.

- Genetic diversity contribution to error in short oligonucleotide microarray analysis. *Plant Biotechnol J* 4: 489-498.
- Kreps, J.A., Wu, Y., Chang, H-S., Zhu, T., Wang, X. and Harper, J. F. 2002. Transcriptome changes for *Arabidopsis* in response to salt, osmotic, and cold stress. *Plant Physiol* 130: 2129-2141.
- Kumar, R., Qiu, J., Joshi, T., Valliyodan, B., Xu, D. and Nguyen, H.T. 2007. Single nucleotide feature polymorphism discovery in rice. *PlosONE* 2: e144.
- Lemieux, B., Aharoni, A. and Schena, M. 1998. Overview of DNA chip technology. *Mol Breed* 4: 277-289.
- Lipshutz, J. R., Fodor, S.P.A., Gingeras, T. R. and Lockhart, J. 1999. High density synthetic oligonucleotide array. *Nat Genet* (supplement) 21: 20-24.
- McClintick, J.N. and Edenberg, H.J. 2006. Effects of filtering by Present call on analysis of microarray experiment. *BMC Bioinformatics* 7: e49.
- McGall, G.H. and Christians, F.C. 2002. High-density GeneChip oligonucleotide probe array. In: Scheper, T. (ed.). *Advance in Biochemical Engineering/Biotechnology*. Springer-Verlag, Berlin.
- Mockler, T.C. and Ecker, J.R. 2005. Application of DNA tiling arrays for whole-genome analysis. *Genomics* 85: 1-15.
- Mongkolsiriwatana, C. 2008. Expression Analysis of Photoperiod Responsive Genes in Rice (*Oryza sativa* L.) KDML105. PhD Thesis. Kasetsart University, Bangkok.
- Spiegelman, J.I., Mindrinos M.N. and Oefner, P.J. 2000. High-accuracy DNA sequence variation screening by DHPLC. *Biotechniques* 29: 1084-1092.
- Thompson, M. and Furdato, L.M. 1999. High density oligonucleotide microarray for analysis of target DNA. *Analyst* 124: 1133-1136.
- Zhang, L., Fetch, T., Nirmala, J., Schmierer, D., Brueggeman, R., Steffenson, B. and Kleinhofs, A. 2006. *Rpr1*, a gene required for *Rpg1*-dependent resistance to stem rust in barley. *Theor Appl Genet* 113: 847-855.
- Zhu, T. 2003. Global analysis of gene expression using GeneChip microarray. *Curr Opin Plant Biol* 6: 418-425.