

基因芯片的制备、应用与前景

陈华友, 崔振玲 (上海 200062 华东师范大学生物系分子生物学实验室)

摘要: 基因芯片技术是 90 年代中期以来快速发展起来的分子生物学高新技术, 是各学科交叉综合的崭新科学。其原理是采用光导原位合成或显微印刷等方法, 将大量 DNA 探针片段有序地固化于支持物的表面, 然后与已标记的生物样品中 DNA 分子杂交, 再对杂交信号进行检测分析, 就可得出该样品的遗传信息。基因芯片技术目前国内外都取得了较大的进展, 该技术可用于 DNA 测序, 基因表达及基因组图的研究, 基因诊断, 新基因的发现, 药物筛选, 给药个性化等等, 所以为二十一世纪生物医药铺平道路, 将为整个人类社会带来深刻广泛的变革, 促进人类早日进入生物信息时代。

关键词: 基因芯片; 微阵列; 基因诊断; 药物筛选

生物芯片技术是随着"人类基因组计划"(human genome project, HGP)的进展而发展起来的, 它是 90 年代中期以来影响最深远的重大科技进展之一, 它融微电子学、生物学、物理学、化学、计算机科学为一体的高度交叉的新技术, 具有重大的基础研究价值, 又具有明显的产业化前景。生物芯片技术包括基因芯片、蛋白质芯片、细胞芯片、组织芯片、以及元件型微阵列芯片、通道型微阵列芯片、生物传感芯片等新型生物芯片(1)。本文主要讨论基因芯片技术, 它为"后基因组计划"时期基因功能的研究提供了强有力的工具, 将会使基因诊断、药物筛选、给药个性化等方面取得重大突破, 该技术被评为 1998 年度世界十大科技进展之一。

1 基本概念

基因芯片(gene chip)也叫 DNA 芯片、DNA 微阵列(DNA microarray)、寡核苷酸阵列(oligonucleotide array), 是指采用原位合成(in situ synthesis)或显微打印手段, 将数以万计的 DNA 探针固化于支持物表面上, 产生二维 DNA 探针阵列, 然后与标记的样品进行杂交, 通过检测杂交信号来实现对生物样品快速、并行、高效地检测或医学诊断, 由于常用硅芯片作为固相支持物, 且在制备过程运用了计算机芯片的制备技术, 所以称之为基因芯片技术。

2 技术基本过程

2.1 DNA 方阵的构建

选择硅片、玻璃片、瓷片或聚丙烯膜、尼龙膜等支持物，并作相应处理，然后采用光导化学合成和照相平板印刷技术可在硅片等表面合成寡核苷酸探针；（2）或者通过液相化学合成寡核苷酸链探针，或 PCR 技术扩增基因序列，再纯化、定量分析，由阵列复制器（arraying and replicating device ARD），或阵列机（arrayer）及电脑控制的机器人，准确、快速地将不同探针样品定量点样于带正电荷的尼龙膜或硅片等相应位置上，再由紫外线交联固定后即得到 DNA 微阵列或芯片（3）。

2. 2 样品 DNA 或 mRNA 的准备。

从血液或活组织中获取的 DNA/mRNA 样品在标记成为探针以前必须进行扩增提高阅读灵敏度。Mosaic Technologies 公司发展了一种固相 PCR 系统，好于传统 PCR 技术，他们在靶 DNA 上设计一对双向引物，将其排列在丙烯酰胺薄膜上，这种方法无交叉污染且省去液相处理的繁琐；Lynx Therapeutics 公司提出另一个革新的方法，即大规模平行固相克隆（massively parallel solid-phase cloning）这个方法可以对一个样品中数以万计的 DNA 片段同时进行克隆，且不必分离和单独处理每个克隆，使样品扩增更为有效快速（4）。

在 PCR 扩增过程中，必须同时进行样品标记，标记方法有荧光标记法、生物素标记法、同位素标记法等。

2. 3 分子杂交

样品 DNA 与探针 DNA 互补杂交要根据探针的类型和长度以及芯片的应用来选择、优化杂交条件。如用于基因表达监测，杂交的严格性较低、低温、时间长、盐浓度高；若用于突变检测，则杂交条件相反（5）。芯片分子杂交的特点是探针固化，样品荧光标记，一次可以对大量生物样品进行检测分析，杂交过程只要 30min。美国 Nangon 公司采用控制电场的方式，使分子杂交速度缩到 1min，甚至几秒钟（6）。德国癌症研究院的 Jorg Hoheisel 等认为以肽核酸（PNA）为探针效果更好。

2. 4 杂交图谱的检测和分析

用激光激发芯片上的样品发射荧光，严格配对的杂交分子，其热力学稳定性较高，荧光强；不完全杂交的双链分子热力学稳定性低，荧光信号弱（不到前者的 1/35~1/5）（2），不杂交的无荧光。不同位点信号被激光共焦显微镜，或落射

荧光显微镜等检测到，由计算机软件处理分析，得到有关基因图谱。目前，如质谱法、化学发光法、光导纤维法等更灵敏、快速，有取代荧光法的趋势。

3 应用

3.1 测序

基因芯片利用固定探针与样品进行分子杂交产生的杂交图谱而排列出待测样品的序列，这种测定方法快速而具有十分诱人的前景。Mark chee 等用含 135000 个寡核苷酸探针的阵列测定了全长为 16.6kb 的人线粒体基因组序列，准确率达 99% (7)。Hacia 等用含有 48000 个寡核苷酸的高密度微阵列分析了黑猩猩和人 BRCA1 基因序列差异，结果发现在外显子 11 约 3.4kb 长度范围内的核酸序列同源性在 98.2%到 83.5%之间，提示了二者在进化上的高度相似性 (8)。

3.2 基因表达水平的检测。

用基因芯片进行的表达水平检测可自动、快速地检测出成千上万个基因的表达情况。Schena 等采用拟南芥基因组内共 45 个基因的 cDNA 微阵列 (其中 14 个为完全序列, 31 个为 EST), 检测该植物的根、叶组织内这些基因的表达水平, 用不同颜色的荧光素标记逆转录产物后分别与该微阵列杂交, 经激光共聚焦显微扫描, 发现该植物根和叶组织中存在 26 个基因的表达差异, 而参与叶绿素合成的 CAB1 基因在叶组织较根组织表达高 500 倍。(9) Schena 等用人外周血淋巴细胞的 cDNA 文库构建一个代表 1046 个基因的 cDNA 微阵列, 来检测体外培养的 T 细胞对热休克反应后不同基因表达的差异, 发现有 5 个基因在处理后的存在非常明显的高表达, 11 个基因中度表达增加和 6 个基因表达明显抑制。该结果还用荧光素交换标记对照和处理组及 RNA 印迹方法证实 (10)。在 HGP 完成之后, 用于检测在不同生理、病理条件下的人类所有基因表达变化的基因组芯片为期不远了 (11)。

3.3 基因诊断

从正常人的基因组中分离出 DNA 与 DNA 芯片杂交就可以得出标准图谱。从病人的基因组中分离出 DNA 与 DNA 芯片杂交就可以得出病变图谱。通过比较、分析这两种图谱, 就可以得出病变的 DNA 信息。这种基因芯片诊断技术以其快速、高效、敏感、经济、平行化、自动化等特点, 将成为一项现代化诊断新技术。例如, Affymetrix 公司, 把 P53 基因全长序列和已知突变的探针集成在芯

片上,制成 P53 基因芯片,将在癌症早期诊断中发挥作用。又如, Heller 等构建了 96 个基因的 cDNA 微阵,用于检测分析风湿性关节炎(RA)相关的基因,以探讨 DNA 芯片在感染性疾病诊断方面的应用(12)。现在,肝炎病毒检测诊断芯片、结核杆菌耐药性检测芯片、多种恶性肿瘤相关病毒基因芯片等一系列诊断芯片逐步开始进入市场。基因诊断是基因芯片中最具有商业化价值的应用。

3.4 药物筛选

如何分离和鉴定药的有效成份是目前中药产业和传统的西药开发遇到的重大障碍,基因芯片技术是解决这一障碍的有效手段,它能够大规模地筛选、通用性强,能够从基因水平解释药物的作用机理,即可以利用基因芯片分析用药前后机体的不同组织、器官基因表达的差异。如果再用 m RNA 构建 c DNA 表达文库,然后用得到的肽库制作肽芯片,则可以从众多的药物成分中筛选到起作用的部分物质。或者,利用 RNA、单链 DNA 有很大的柔性,能形成复杂的空间结构,更有利与靶分子相结合,可将核酸库中的 RNA 或单链 DNA 固定在芯片上,然后与靶蛋白孵育,形成蛋白质-RNA 或蛋白质-DNA 复合物,可以筛选特异的药物蛋白或核酸,因此芯片技术和 RNA 库的结合在药物筛选中将得到广泛应用。在寻找 HIV 药物中, Jellis 等用组合化学合成及 DNA 芯片技术筛选了 654536 种硫代磷酸八聚核苷酸,并从中确定了具有 XXG4XX 样结构的抑制物,实验表明,这种筛选物对 HIV 感染细胞有明显阻断作用。(13)生物芯片技术使得药物筛选,靶基因鉴别和新药测试的速度大大提高,成本大大降低。基因芯片药物筛选技术工作目前刚刚起步,美国很多制药公司已开始前期工作,即正在建立表达谱数据库,从而为药物筛选提供各种靶基因及分析手段。这一技术具有很大的潜在应用价值。

3.5 给药个性化

临床上,同样药物的剂量对病人甲有效可能对病人乙不起作用,而对病人丙则可能有副作用。在药物疗效与副作用方面,病人的反应差异很大。这主要是由于病人遗传学上存在差异,如药物应答基因,导致对药物产生不同的反应。例如细胞色素 P450 酶与大约 25%广泛使用的药物的代谢有关,如果病人该酶的基因发生突变就会对降压药异喹肼产生明显的副作用,大约 5%~10%的高加索人缺乏该酶基因的活性。现已弄清楚这类基因存在广泛变异,这些变异除对药物产生不

同反应外,还与易犯各种疾病如肿瘤、自身免疫病和帕金森病有关。如果利用基因芯片技术对患者先进行诊断,再开处方,就可对病人实施个体优化治疗。另一方面,在治疗中,很多同种疾病的具体病因是因人而异的,用药也应因人而异。例如乙肝有较多亚型,HBV 基因的多个位点如 S,P 及 C 基因区易发生变异。若用乙肝病毒基因多态性检测芯片每隔一段时间就检测一次,这对指导用药防止乙肝病毒耐药性很有意义。又如,现用于治疗 AIDS 的药物主要是病毒逆转录酶 RT 和蛋白酶 PRO 的抑制剂,但在用药 3-12 月后常出现耐药,其原因是 rt、pro 基因产生一个或多个点突变。Rt 基因四个常见突变位点是 Asp67→Asn、Lys70→Arg、Thr215→Phe、Tyr 和 Lys219→Glu,四个位点均突变较单一一位点突变后对药物的耐受能力成百倍增加(14)。如将这些基因突变部位的全部序列构建为 DNA 芯片,则可快速地检测病人是这一个或那一个或多个基因发生突变,从而可对症下药,所以对指导治疗和预后有很大的意义。

此外,基因芯片在新基因发现、药物基因组图、中药物种鉴定、DNA 计算机研究等方面都有巨大应用价值。

4 基因芯片国内外现状和前景

自从 1996 年美国 Affymetrix 公司成功地制作出世界上首批用于药物筛选和实验室试验用的生物芯片,并制作出芯片系统(15),此后世界各国在芯片研究方面快速前进,不断有新的突破。美国的 Hyseq 公司、Syntexi 公司、Nanogen 公司、Incyte 公司及日本、欧洲各国都积极开展 DNA 芯片研究工作;摩托罗拉、惠普、IBM 等跨国公司也相继投以巨资开展芯片研究。98 年 12 月 Affymetrix 公司和 Molecular Dynamics 公司宣布成立基因分析协会(Genetic Analysis Technology Consortium)以制定一个统一的技术平台生产更有效而价廉的设备,与此相呼应,英国的 Amersham Pharmacia Biotechnology 公司也在同一天宣布将提供部分掌握的技术以推动这项技术的应用(16)。美国关于芯片技术召开了两次会议,克林顿总统在会上高度赞赏和肯定该技术,将基因芯片看作是保证一生健康的指南针(17)。预计在今后五年内生物芯片销售可达 200-300 亿美元;据《财富》杂志预测(97.3),在 21 世纪,生物芯片对人类的影响将可能超过微电子芯片。

我国在生物芯片研究方面刚刚起步,以 97 香山会议以来,我国对生物芯片

高度重视，98年10月，中科院将基因芯片列为“九五”特别支持项目，利用中科院在微电子技术、生化技术、物理检测技术方面的优势，组织跨所、跨学科合作。现在以中科院上海冶金所为龙头，与上海原子核所、有机所、生化所、遗传所、肿瘤所、武汉病毒所、上海医科大学、上海市疾病检测中心、华东师大等单位组成强强联合，在微阵列芯片和基于MEBS的芯片方面有大的突破，在DNA芯片设计、基片修饰、探针固定、样品标记、杂交和检测等方面的技术都有较大的进展，已研制出肝癌基因差异表达芯片、乙肝病毒多态性检测芯片、多种恶性肿瘤病毒基因芯片等有一定实用意义的基因芯片和DNA芯片检测仪样机。中科院上海冶金所等又将在徐元森院士、赵建龙博士等带领下，决心开发重大传染性疾病的诊断芯片及检测设备，如HBV、HCV、TB三种基因诊断芯片。上海细胞所正在进行人类全套基因组的cDNA阵列和微阵列制备，为我国科研和开发提供一个技术平台，并使之产业化。同时，清华、复旦、东南大学、北京军事医学科学院、华东理工大学、第一军医大学等单位都在积极进行芯片研究。2000年国际生物芯片技术大会于10月11-14在北京召开，这又是对我国生物芯片技术有很大的促进作用。

总之，我国基因芯片研究也紧跟国际前沿，力争在此高新技术领域里有一席之地，它将对我国生命科学研究，医学诊断，新药筛选具有革命性的推动作用，也将对我国人口素质、农业发展、环境保护等作出具大的贡献，同时带动我国科学整体进步，为各相关高科技产业创造机会。基因芯片将成为21世纪最引人注目的高新技术领域之一，将使人类早日进入生物信息时代。

[参考文献]

1. 徐炳森、邵健忠 几种新型生物芯片的研究进展。生物化学与生物物理进展。2000.27(3):251-253.
2. Pease AN, Solas D, Sullivan EJ, et al. Light-generated oligonucleotide arrays for rapid DNA sequences analysis. Proc Natl Acad Sci USA, 1994, 91(11):5022-5026
3. Schena M, Heller KA, Thériault TP, et al. Microarrays: biotechnology's discovery platform for functional genomics. TIB Tech, 1998, 16(3):301-306
4. Marshall A, Hodgson J. DNA chips: An array of possibilities. Nat Biotechnol, 1998, 16(1):27-31.
5. Shohe pinov MS. Nucleic Acids Res.1997, 25:1155-1161

6. Cheng J, Sheldom EL, Wu L. Preparation and hybridization analysis of DNA/RNA from *E. coli* on microfabricated bioelectronic chips. *Nat Biotechnol*, 1998, 16(6):541-546
7. Chee M, Yang R, Hubbell E, et al.. Accessing genetic information with high-density DNA arrays. *Science*, 1996, 274:610-613
8. Hacia JG, Makalowski W, Edgemon k, et al. Evolutionary sequence comparisons using high-density oligonucleotide arrays. *Nature Genetics*, 1998, 18(3):155-158.
9. Schena M, Shalon D, Davis RW, et al. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science*, 1995, 270(5235):467-470.
10. Schena M shalon D, Heller R, et al. Parallel human genome analysis: microarray-based expression monitoring of 1000 genes. *Pro Natl Acad sci USA*, 1996, 93(20):457-460.
11. Goffeau A, Molecular fish on chips. *Nature*, 1997, 385(6613):202-203
12. Heller RA, Schena M, Chai A et al. Discovery and analysis of inflammatory disease-related genes using cDNA microarrays. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94:2150-2155
13. Jells CL. Defining critical residues in the epitope for HIV-neutralizing monoclonal antibody using phage display and peptide array technologies [J]. *Gene*, 1993, 137910:63-68
14. Lipshutz D, Morris D, Chee M et al. Using oligonucleotide probe array to access genetic diversity. *Biotechniques*, 1995, 19(3):422-447
15. Editorial. To affinity.....and beyond! *Nat Genet*, 1996, 14(4):367.
16. Andrew M. *Nat Biotechnol*, 1998, 16
17. Editorial: Getting hip to the chip. *Nature Genetics*, 1998, 18(3):195-197.