维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号：0253-3626(2002)04-0506-03

基因芯片技术及其在医学研究中的应用

王 佚 综述；金先庆 审校

（重庆医科大学儿科学院外科，重庆 400014）

【中国图书分类法分类号】R394 【文献标识码】B 【收稿日期】2001-09-10

生物芯片的研制开始于20世纪90年代初，在短短的的十余年里，基因芯片技术发展迅速，它以一种综合、全面、系统的观点来研究复杂的生命现象，充分利用生物科学、信息学等前沿学科的先进成果，以其快速、自动化程度高的特点而广泛的应用于医学科研的各个领域，为后基因组时代的生命科学研究提供了一种强有力的工具。本文简要介绍基因芯片技术的概况及其在医学研究中的应用。

1 基因芯片技术的发展史

基因芯片（gene chip or DNA chip or microarry），又称DNA微阵列，即将大量的靶基因或寡核苷酸片段有序地、高密度地排列在玻璃、硅、尼龙膜等载体上制成的高密度DNA微阵列。将待测的标记样品分子与芯片上的寡核苷酸链进行杂交，再通过激光共聚焦荧光检测系统对芯片进行扫描，检测每个探针分子的杂交信号强度，由计算机对每个探针上的荧光信号强度进行比较，可以迅速得到样品分子的数量和序列信号等重要信息[1]。基因芯片技术与传统的Northern印迹法、RNA保护试验等相比有操作简单、自动化程度高、可操作序列数量多、检测效率高等优点。故该技术自产生以来广泛用于基因表达谱分析、新基因的寻找、基因测序等领域。

20世纪90年代初，Bains[2]等将短的DNA片段固定到支持物上，借助杂交方式进行序列的测定。到1994年Pease等创造了光导原位合成（light-directed synthesis）高密、微化的寡核苷酸阵列的制作技术，为DNA芯片技术的产生奠定了基础。后来出现的探针固相原位合成技术与照相平板印刷技术结合，使合成并固定高密度的数以万计的探针分子成为可能；并借助激光共聚焦显微扫描技术对杂交信号进行实时、灵敏、准确的检测和分析，促使基因芯片技术由实验室走向工业化[3]。1992年，Affymetric公司运用半导体照相平板技术生产出第一块寡核苷酸芯片；1995年，第一块cDNA芯片在美国Stanford大学诞生，并初步显示了基因芯片技术在基因表达研究方面的巨大潜力，标志着该技术步入了广泛研究和应用的时代。

2 基因芯片的主要类型

基因芯片的类型根据分类方法不同而异。目前最常用的是根据探针阵列的形式分为原位合成(in situ synthesis)与合成后点样(off-chip DNA synthesis)两种。

原位合成以玻璃片、硅片等作为载体，其原理为：首先使支持物羟基化，并用光敏保护基团将其保护起来；合成所用的单体分子3'端按传统固相合成方法活化，5'端受光敏保护基团保护。合成时先利用光照射使支持物上的羟基端脱保护，然后一个5'端受保护的核苷酸单体连接上去，反复上述过程直至合成完毕。因此，每次只要通过控制蔽光膜的透光或不透光状态来决定活化的区域，根据需要选用单体的种类和反应顺序就可以实现在特定的位点上合成大量预定的寡聚核苷酸探针。该方法的优点是速度快、效率高，用较少的步骤合成大量的寡聚核苷酸探针。通过4n个化学步骤合成出4^n个可能结构的含n个核苷酸的寡聚核苷酸，其速度和效率是传统方法无法比拟的。该方法的缺点是操作较复杂，所需仪器设备昂贵；合成反应每步产率低于95%（通常的固相合成反应每步产率高于99%）[4]，使得探针的长度受限；并由于每步羟基去保护不很彻底而致杂交信号较模糊，信噪比降低。目前，由于光刻设备技术复杂，成本高，只有Affymetrix等专业化公司才能生产。该方法最适合于核酸再测序，查明点突变。

合成后点样是利用传统的DNA或多肽固相合成仪先合成好探针cDNA或基因组DNA，然后再用计算机控制高速点样机器人的打印/喷印头从96孔或384孔板上将探针取出并以较高的密度打印/喷印在芯片上。与打印法比较，喷印法定量准确，重现性好，使用寿命长，但由于喷印的斑点较大，制成的芯片探针密度低，通常只有400点/cm^2。此法较原位合成法简单，适用于比较分析，目前许多中小型公司多采用此法。

3 样品的制备、杂交和检测

从组织或细胞中抽提总RNA并分离和纯化出mRNA；把荧光染料接于dUTP上，将mRNA逆转录成标记cDNA；然后进行点样、杂交；洗去未杂交的分子；最后将杂交芯片置于荧光显微装置中进行扫描，并利用计算机进行图像数据转换和分析。实验发现DNA探针微阵列用2，6—二氨基嘌呤（2,6-diaminopurine）等类似物对A和T区域进行处理后，可以提高A—T含量丰富的基因芯片与荧光标记的RNA序列的杂交强度[5]。现在常用激光共聚焦显微扫描技术对高密度探针阵

作者介绍：王 佚（1975- ），男，博士研究生，主要研究方向：肿瘤的基因治疗。

维普资讯 http://www.cqvip.com

列每个位点的荧光强度进行定量分析来发现基因表达的差异。正常的Watson—Crick配对双链要比错配碱基的双链分子具有更高的热力学稳定性，所以如果探针分子与样品分子在某位点配对有差异则该位点荧光强度就会有不同。试验证明探针与样品完全配对时所产生的荧光信号强度是具有单个或两个错配碱基探针的5～35倍[6]。除此而外，荧光信号强度还与样品中靶分子的含量有一定线性关系。

4 基因芯片技术的应用

4.1 基因表达的检测

基因芯片技术适用于基因表达谱分析，它可以快速检测出以1:300 000水平出现的mRNA，并且可以同时检测成千上万的基因[7]，这对于研究基因的功能，确定基因与基因间的相互关系，从而揭示疾病的发生、发展的分子机制有着重要的意义。Yosbioka[8]等用该技术对小鼠在植入孕体前后6 500个子宫基因表达进行对比研究发现：有399个基因的表达发生了改变，包括192个基因表达增强和207个基因表达减弱。所以推断部分基因表达增强和部分基因表达减弱都是成功移植的必要条件。Bernstein[9]等对基因芯片技术定量检测基因表达及其敏感性、特异性进行研究。他们对108名卵巢肿瘤患者的P53基因变异情况分别用传统的DNA测序方法和P53基因芯片技术进行了检测，对于两种方法结果不同者再用人工和自动的二脱氧核苷酸测序法检测。分析结果发现P53基因芯片的准确率、敏感性、特异性分别为94%、92%、100%；而传统的DNA测序方法则为87%、82%、100%。Ahrendt[10]等对100例原发性肺癌病人的P53基因突变进行对比研究发现P53基因芯片检测出81%的突变（exons 2-11），而二脱氧核苷酸循环测序法（dideoxynucleotid cycle sequencing）仅检测出P53基因保守区域（exons 5-9）中76%的突变。在以上两个实验中均发现P53基因芯片对于单碱基替换的各种突变类型检出率较高，对于多碱基的缺失、插入及移码突变的检出率就不如传统方法。但由于P53基因芯片技术可以大大降低实验成本，节约实验时间，且总体准确率较高，故其不失为一种快速、高效检测P53基因突变的工具。

4.2 新基因的寻找

基因芯片技术对大量的基因表达水平进行定量检查的同时，也有可能发现一些对疾病诊断和治疗有意义的新基因。有人将该技术应用于炎症性疾病类风湿性关节炎（RA）和炎症性疾病（IBD）的基因表达研究中，发现除了炎症性疾病诱导的基因如TNF-α、IL或粒细胞集落刺激因子外，还检测出了一些以前未发现的基因如HME基因和黑色素瘤生长刺激因子[7]。Wilson[11]等对人类免疫缺陷病毒（HIV）致耐药性产生的基因变异进行了研究。他们采用HIV PRT基因芯片鉴定出了与目前艾滋病治疗失败有关的所有原始突变；HIV-1逆转录酶线性探针阵列法还发现了K70R，一种可能导致病人对齐多夫定（Zidovudine）耐药的逆转录酶基因突变。对HIV导致耐药的基因突变进行分析，有利于临床选择适当的药物组合来对病毒活性进行最大限度的抑制。

4.3 基因测序

DNA测序芯片是基于杂交测序（sequencing by hybridization SBH）发展起来的。SBH原理是任何线状单链DNA或RNA序列均可以分解成一系列碱基数固定错落而重叠的寡核苷酸即亚序列（subsequence）。如果能把原序列中的所有亚序列全部检测出来就可以重新组建原序列。微阵列中寡核苷酸数量和长度的增加，一方面可以提高SBH的效率，但同时也增加了微阵列的复杂性，降低了杂交的准确性。为了弥补SBH的缺陷，科学家们又发明了一种新的高效快速测序方法—邻堆杂交（contignous stacking hybridization CSH）技术。CHS技术的应用增加了微阵列寡核苷酸的有效长度，加强了序列的准确性，可进行较长的DNA测序。计算机模拟论证了8聚核苷酸微阵列和5聚核苷酸微阵列邻堆杂交相当于13聚核苷酸微阵列的应用，可以测定数千个核苷酸长的DNA序列[13]。

4.4 疾病的诊断

基因芯片技术还可以应用于临床,帮助疾病的诊断和治疗。Golup[12]等研制出一个系统性的可自动分类的检测DNA矩阵用于白血病的分型。此基因芯片上有6817个人类基因，选取白血病病人的骨髓样本抽提RNA，杂交后通过图象矩阵扫描检测基因表达图谱和AML、ALL的相关性。实验发现6817个人类基因中有约1100个基因与AML及ALL相关，测定后得到大量相关检测数据，从而建立一个AML和ALL的数据库。在1100个基因中选择50个与AML及ALL相关程度较高的基因和38例急性白血病人的样本进行杂交，在准确率测试中临床诊断符合率达到98%。Golup[12]等还在实验中设计出一个SOM自动分类图谱(selfognazing map isom),将白血病人样本分为ML，TALL，BALL和BAML四类，而这四类都有不同的生物学特点和临床治疗方法。SOM分类技术还可用于乳腺癌、前列腺癌的分型，为临床医生进行病情监测、准确诊断和治疗、并更快更早的预测病情发展提供了一种新的手段。

4.5 感染病毒检测

国内联合基因公司成功研制出国内第一代诊断芯片--检测HCV病毒诊断芯片，它在诊断丙型肝炎的灵敏度、检出率等方面均高于传统的PCR技术，准确率达到100%；现在该公司正在研制第二代基因芯片，试图在一张芯片上能同时检测HBV、HCV、HIV和TP（乙肝、丙肝、艾滋病、梅毒），用于血液检测和疾病监测。

基因芯片在科研领域应用广泛。在药物研究方面，可用克隆序列交叉杂交来确证药物相关靶标，检测待检药物对相关靶标的选择性，以降低药物的副作用[14]；它还可以用于基因突变体和多态性的检测，Lipshutz[15]等人采用含18，495个寡核苷酸探针微阵列对HIV-1 基因组逆转录酶基因及蛋白酶基因的高度多态性进行筛选，了解它们在疾病过程中发生变异所导致病毒对多种抗病毒药包括AZT、ddI等产生抗药性；此外基因芯片技术还可应用于毒理学研究、遗传作图、基因分型等研究。

维普资讯 http://www.cqvip.com

5 展 望

基因芯片技术与传统杂交技术相比有检测系统微型化、自动化、高效率、高特异性、高敏感性等优点，并在研究大量基因的功能及解释基因间表达的相互关系上有着无可比拟的优越性。但基因芯片作为高科技产品，目前价格还比较昂贵，国产含512条基因的芯片价值1000元，贵者愈万元；且目前生产的芯片仅能使用一次，对操作者的技术熟练程度要求较高。随着科学技术的发展，基因芯片技术还需要不断完善，主要需解决以下几个方面的问题：（1）提高探针阵列的集成程度，（2）进一步提高基因芯片检测的特异性及敏感性，（3）简化样品的制作及标记操作，降低成本，（4）形成一套标准化的检测方法，（5）开发和研制高度集成化的样品制备、基因扩增、核酸标记及检测仪器，（6）根据临床需要研制新的应用芯片。以上几个方面研究将成为今后一段时间内各国科学家共同研究的焦点，只有解决了这些问题才能使基因芯片技术更好、更广的应用于医学科学研究，大大推动医学科学研究的发展。

参 考 文 献

[1] Stipp D. Gene chip breakthrough[J].Fortune,1997;31(3):56-73.

[2] Bains W. Local self-similarity of sequence in mammalian nuclear DNA is modulated by a 180bp periodicity[J]. Theor Biol, 1993;161(2):137-143.

[3] Fodor SP, Rava RP, Huang XC, et al. Multiplexed biochemical assays with biological chips[J].Nature, 1993;364 (6432): 555-556.

[4] McGall GH, Fidanza JA. Light-directed synthesis of high-density oligonucleotide arrays using semiconductor photoresists [J].Proc Natl Acad Sc U.S.A.,1996;93(24):13555-13560.

[5] Fidanza JA, McGall GH. High-density nucleoside analog probe arrays forenhanced hybridization[J]. Nucleosides Nucleotides,1999;18(6-7):1293-1295.

[6] Pease AC, Solas D, Sullivan EJ, et al. Light-generated oligonucleotide arrays forrapid DNA sequence analysis[J]. Proc Natl Acad Sci U.S.A.,1994;91(11):5022-5026.

[7] 王升启. 基因芯片技术及应用研究进展[J]. 生物工程进展，1999;19(4):45-51.

[8] Yoshioka K, Matsuda F, Takakura K, et al. Determination of genes involved in the process of implantation:application of GeneChip to scan 6500 genes[J]. Biochem Biophys Res Commun,2000;272(2):531-538.

[9] Wen WH, Bernstein L, Lescallett J, et al. Comparison of TP53 mutations identified by oligonucl eotide microarray and conventional DNA sequence analysis[J]. Cancer Res,2000;60 (10):2716-2722.

[10] Ahrendt SA, Halachmi S, Chow JT, et al. Rapid p53 sequence analysis in primary lung cancer using an oligonucleotide probe array[J].Proc Natl Acad Sci U.S.A.,1999; 96(13):7382-7387.

[11] Wilson JW , Bean P, Robins T, et al. Comparative evaluation of three human immunodeficiency virus genotyping systems: the HIV-genotypR method,the HIV PRT GeneChip assay,and the HIV-IRT line probe assay[J].J Clin Microbiol. 2000;38(8):3022-3028.

[12] Golup TR , Lackner DF, Boson B, et al. Molecular classification of cancer:class discovery and class prediction by Gene Expression monitoring[J].Science,1999;286(5439):531-537.

[13] Dubiley S , Kirillov E, Lysov Y, et al. Fractionation, phosphorylation and ligation on oligonucleotide microchips to enhance sequencing by hybridization[J].Nucleic Acids Res,1997; 25(12):2259-2265.

[14] 邹宗亮. 基因芯片在药物研究和开发中的应用[J]. 国外医学·药理学分册，1999;26(6):332-334.

[15] Lipshutz RJ , Morris D, Chee M, et al. Using oligonucl eotide probe arrays to access genetic diversity[J]. Biotechniques, 1995;19(3):442-447.

(上接第490页)

综上所述，甲亢症患儿自主神经受损较重，表现为持续交感神经和迷走神经失去平衡，而为昼夜变化明显减少，故对甲亢症防治不可忽视。因此及时控制甲亢症，纠正心脏自主神经异常的病理生理现象，有利于减少甲亢症继发引起心脏病的发生。

参 考 文 献

[1] 胡宇美，王关炎，陆广华. 甲亢患者心率变异性分析[J]. 中华内分泌代谢杂志，1998;14(6):377-379.

[2] Hojgaard MV, Holstein-Rathlou NH, Agner E, et al. Dynamics of spectral components of heart rate variability during changes in autonomic balance[J]. Am J Physiol, 1998; 275(1 Pt 2):H213-219.

[3] Girard A, Hugues FC, Le Jeunne C, et al. Short-term variability of blood pressure and heart rate in hyperthyroidism[J]. Clin Auton Res, 1998; 8(3):181-186.

[4] Cacciatori V, Bellavere F, Pezzarossa A , et al. Power spectral analysis of heart rate in hyperthyroidism[J]. J Clin Endocrinol Metab, 1996; 81(8):2828-2835.

[5] Hayano G, Sakakibara Y, Yamada A, et al. Accuracy of assessment of cardiac vagal tone by heart rite variability in normal subject[J]. Am J Cardiol, 1990; 67:199-204.