

- RET proto-oncogene expression in neuroblastoma cells preceded neuronal differentiation and is not mediated by protein synthesis. *Exp Cell Res*, 1995, **217** (1): 92~ 99
- 4 Myers S M, Eng C, Ponder B A, *et al.* Characterization of RET proto-oncogene 3' splicing variants and polyadenylation sites: a novel C terminus for RET. *Oncogene*, 1995, **11** (10): 2039~ 2042
- 5 Asai N, Iwashita T, Matsuyama M, *et al.* Mechanism of activation of the RET proto-oncogene by Multiple Endocrine Neoplasia 2A mutations. *Mol Cell Biol*, 1995, **15** (3): 1613~ 1618
- 6 Barbara P, Isabella C, Giovanni R. RET mutation in human disease. *Trends in Genetics*, 1996, **12** (4): 138 ~ 142
- 7 Michele G, Massimo S, Maria T B, *et al.* PTC is a novel rearranged form of the RET proto-oncogene and is frequently detected *in vivo* in human thyroid papillary carcinomas. *Cell*, 1990, **60** (4): 557~ 563
- 8 Treanor J J, Goodman L, de Sauvage F, *et al.* Characterization of a multicomponent receptor for GDNF. *Nature* (London), 1996, **382** (6586): 76~ 80
- 9 但 凌, 章静波 (Dan L, Zhang J). 一种基因, 四种综合征. 国外医学 (遗传学分册) (Foreign Medical Sciences—Hereditas), 1995, **18** (3): 161~ 162
- 10 Santoro M, Sabino N, Ishizaki Y, *et al.* Involvement of RET oncogene in human tumors: specificity of RET activation to thyroid tumors. *Br J Cancer*, 1993, **68** (3): 460 ~ 464
- 11 Klugbauer S, Lengfelder E, Demidchik E P, *et al.* A new form of RET rearrangement in thyroid carcinomas of children after the Chernobyl reactor accident. *Oncogene*, 1996, **13** (5): 1099~ 1102

Ret: a Receptor Tyrosine Kinase and Its Mutation and Human Diseases. MAO Jiar-Ping, SUN Zhi-Xian (Beijing Institute of Radiation Medicine, Beijing 100850, China).

Abstract RET proto-oncogene was rearranged during transformation, and so has the name. It encodes a cell membrane receptor tyrosine kinase. In recent years, the possible correlation between human diseases and Ret activation by mutation, such as rearrangement, point mutation, and deletion were studied. Its rearrangement with other gene fragment was frequently found in thyroid papillary carcinoma tissues. Point mutations were detected in multiple endocrine neoplasia 2 and familial medullary thyroid carcinoma. Hirshsprung syndrom may be resulted from its deletion. The structure and possible function of RET gene, its mutation effects to various human diseases were summarized.

Key words receptor tyrosine kinase, RET proto-oncogene, mutation, disease

微芯片——生命科学领域的新工具

陈亚利¹⁾ 陆祖宏¹⁾

(东南大学国家教委分子与生物分子电子学开放实验室, 南京 210096)

摘要 微芯片 (有人称其为生物芯片 biochip) 是用硅、玻璃等材料, 经光刻、化学合成等技术微加工而成的、大小 1 cm^2 左右的芯片. 它可以用来对生物样品进行分离、制备、预浓缩, 还可以作为微反应池进行 PCR (polymerase chain reaction)、LCR (ligase chain reaction) 等反应. 最为吸引人的是, 芯片上制成多种不同的 DNA 阵列, 即可用于核酸序列的测定及基因突变检测. 对微芯片的制作、作用原理、性能及用途等进行了综述.

关键词 微芯片, 探针阵列, 分子诊断, 杂交测序, 杂交突变检测

学科分类号 Q52

¹⁾ 通讯地址: 南京军区南京总医院全军医学检验中心, 南京 210002.

收稿日期: 1997-09-01, 修回日期: 1998-01-12

近年来,美国的一些科研机构及几家大公司研制生命科学应用型微芯片(也有人称其为DNA芯片、基因芯片或生物芯片)^[1]的浪潮正冲击着与生命科学相关的领域.它顺着人类基因组计划(human genome project)实施的节拍,使我们感受到,在生命科学领域中将增添一件新工具.微芯片一出现,就显示出了强大的生命力,其发展速度以及其中运用到的技术令人瞩目,展示的应用前景使人鼓舞.本文仅就微芯片的制作、作用原理、性能及用途等方面作一简介.

1 芯片的类型及制作技术

微芯片是用硅、玻璃等材料制作而成的、尺寸为1 cm²左右的芯片.按其性能及用途,可粗分为两类:第一类是以硅(或硅表面覆一层二氧化硅)或玻璃作承载基片,通过微加工技术,在其上刻出微米级宽度的通道,这种通道具有类毛细管的性质,在电场的作用下即形成微芯片毛细管电泳体系;也可在芯片上刻蚀出微型反应池进行PCR等反应;我们称其为毛细管型微芯片.第二类芯片是用硅、玻璃、多孔硅、聚丙烯等材料作承载基片,经化学方法在其上“挂”满密集的寡核苷酸阵列,这种阵列实质属基因探针,我们称其为基因探针型微芯片.

第一类微芯片的制作,主要是利用光刻蚀技术进行的.可按所需的大小与形状在不同的材料上刻蚀出微通道、微反应池等,本文不作赘述.

第二类微芯片的制作,则是在第一类芯片的技术基础上,又增加了在芯片上引入寡核苷酸探针所必需的固相化学合成工艺.可由两种途径:一是将已合成好的探针连接到固相载体上;二是直接在芯片上逐个合成寡核苷酸阵列.后者需将固相化学合成与光刻技术联合使用,以下详述之.

将原位固相化学合成多肽方法移植到在微芯片上直接合成二维空间寡核苷酸阵列^[2],须应用光敏性保护基团及光刻掩模.图1阐明

了在芯片上直接合成寡核苷酸阵列的原理.

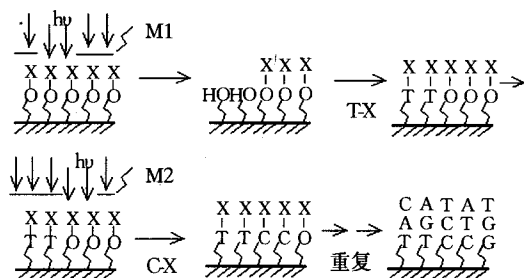


图1 光引导固相合成芯片上寡核苷酸阵列

如图1,首先在固相载体上接上一个光敏性羟基保护基团—X,光刻掩模M1使得固相载体上暴露部分的一X基团经光照而脱除并产生活性羟基,尔后,一个3'带活化羟基(5'—OH仍以—X保护)的核苷酸与载体上的羟基偶联,使载体上挂上第一个核苷酸(图中为T).再应用光刻掩模M2;按上述步骤选择性地脱保护、偶联,即可接上第二个核苷酸(图中为C).当芯片上的羟基全部接上第一个核苷酸后,可将掩模旋转90°,再按上述合成步骤进行反应,逐个接上不同的核苷酸,直至所需的寡核苷酸链长度.图2为光刻掩模在四核苷酸阵列合成中应用示意图.

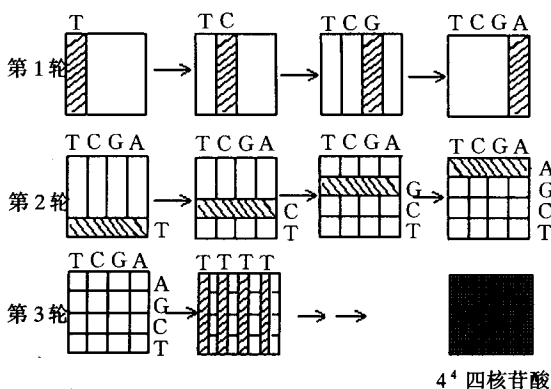


图2 光刻掩模在四核苷酸阵列合成中的应用

Pease等^[3]在一块1.28 cm×1.28 cm的芯片上合成256种八核苷酸阵列,需经16次化学反应循环,耗时4 h.可见利用较少的化学反应步骤和较短的反应时间,就能产生大量序

列不同的探针. 用氨基聚丙烯作载体^[4], 也可制作这样的微芯片.

2 微芯片作用原理

第一类微芯片的主要作用原理类似于毛细管. 在刻蚀出的微通道内充填非变性聚丙烯酰胺, 可用于分离双链 DNA 及测定其片段长度, 若充填变性聚丙烯酰胺, 则可分离单链 DNA (如对测序反应后的产物进行分离). 羟丙基纤维素等介质亦可在微通道内缠绕成筛网型结构, 用以分离 DNA 片段^[5].

第二类微芯片已不局限于仅在器件的材料、尺寸与形状上的改变, 而是经化学修饰后使芯片被赋予本身即为化学反应组分的特性. 这类芯片的作用原理是探针与靶基因的互补杂交. 不同来源、但序列互补的两条单链 DNA (ssDNA) 可发生杂交反应形成双链 DNA (dsDNA). 将其中之一 (探针或靶基因) 先行标记 (有时也在杂交反应后标记), 可以检测杂交信息. Drmanac 等^[6,7] 80 年代末即提出了利用杂交进行测序 (sequencing by hybridization) 的概念. 以下举例说明其原理: 设有一个六核苷酸的靶基因, 序列为 ATTGCT, 现以包含三核苷酸阵列的微芯片 (内有 $4^3 = 64$ 种核苷酸的探针阵列) 与之进行杂交反应, SBH 分析结果如图 3.

TAA — trimer1
AAC — trimer2
ACG — trimer3
CGA — trimer4

图 3 三核苷酸阵列芯片测序示例

根据图 3 结果进行排序, 可得六核苷酸序列为: TAACGA, 由此可知待测 DNA 的原序列为: ATTGCT.

利用杂交反应原理还可以进行突变基因检测, 即所谓 MDBH^[8] (mutation detection by hybridization) 方法. 该方法可通过图 4 来说明^[9].

如图 4, 芯片上的部分探针 (杂交前均经

过标记) 与靶基因特异性杂交, 可给出检测信号. 设计一套等位特异的寡核苷酸探针 (allele-specific oligonucleotides, ASOs), 即可检测包括单碱基突变在内的多种基因突变.

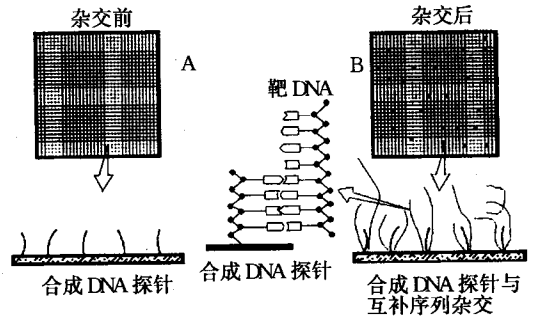


图 4 MDBH 原理

3 微芯片的性能及用途

第一类微芯片主要用于样品的制备及分离. 目前已研制出微过滤器^[10]、微泵、微阀、微芯片毛细管等. 微芯片毛细管用于电泳分离 DNA 具有很高的效率^[11,12], 有文献报道^[13], 此类芯片已可分辨长度仅相差一个碱基的 DNA 片段. 除上述用途外, 利用硅-玻璃复合芯片 (硅片上刻蚀出微反应池, 上覆钻好孔的玻璃片) 可进行 PCR、LCR 等反应, 与芯片毛细管体系联合使用, 可使“样品制备-化学反应-产物检测”过程在芯片上连续进行, 这种连续过程属典型的微型全化学分析系统 (miniaturized total chemical analysis, μ -TAS)^[14]. 由于这种芯片可一次性使用, 使 PCR 反应发生污染的可能性减小, 且需时短、样品及试剂的耗量少、装置便携、整个系统集成化、自动化.

第二类芯片上布满了 DNA 探针阵列, 此种探针不是序列相同的单一探针, 而是多种不同序列的探针的集合, 是一个微型的“探针池”. 它的一次检测, 即可完成用常规探针需几十次、几百次检测才能完成的任务. 这一点对根据 SBH 原理进行较大片段 DNA 的测序, 以及运用 MDBH 方法同时检测多种突变基因

至关重要。Hacia 等^[15]即应用含96 600个核苷酸 (20mer) 阵列对人乳腺癌及卵巢癌相关基因 BRCA1 进行了基因突变检测。显然, 基于已知的基因, 还可以设计出不同的探针阵列型芯片检测疾病相关基因, 也可用于某种 (或同时进行几种) 病原体基因的检测。

现行的常规测序方法步骤较繁, 需时较长 (一般 1 kb 需几小时或更长时间), 而利用微芯片测序需时较短 (几 kb 仅需几分钟)。利用 SBH 方法从数目庞大的重组 cDNA 克隆中筛选目的基因, 无疑具有时效上的优越性。且 SBH 应用的样品范围广泛, 可以是 PCR 扩增产物, 也可以是重组 DNA 或酶切基因片段混和物等。SBH 还有潜力用于未知的大片段 DNA 的从头测序, 以及对已知序列的某些基因的重新测序 (resequencing)。Affymetrix 公司现已可在 1 cm² 左右的芯片上固定 40 万种探针 (20mer) 阵列, 理论上, 10 块这样的芯片即可对整个基因组进行扫描。

综上所述, 两类微芯片在临床医学、诊断、基因药物的设计 (21 世纪基因产业之一) 法医学、农业、环境监测、HGP 的完成及 HGP 后的基因资源利用等方面均具有很大的应用潜力。

4 微芯片信号检测系统

对于在芯片上进行的核酸等物质的分离过程, 以及固定在芯片上的探针与溶液中的靶分子间的相互作用, 需要具有高灵敏度的信号检测系统进行检测。以下几种检测体系即可满足上述条件, 为芯片分析提供定性定量信息。

4.1 激光共焦荧光检测系统

该系统工作原理^[16], 是将表面布满探针阵列的芯片反转置于恒温流动池上, 池内为含有荧光标记的靶分子的溶液, 激发光从芯片背面射入, 并在芯片与溶液界面聚焦, 发射荧光由成像显微镜再通过一系列滤色器, 最终到达检测器 (如光电倍增管)。那些未结合到芯片探针上的标记分子由于不在聚焦部位, 发射光即不能被检测到。检测时, 通过激光扫描或平

移流动池, 即可得到杂交产物的二维荧光图像。该检测系统适合在芯片上进行的 MDBH 和 SBH 分析过程中应用, 如能进一步提高分辨率, 将为 SBH 的广泛应用奠定基础。

4.2 化学发光及反应检测系统

该系统已被应用于硅-玻璃芯片, 用不同的光度计测量发射光, 结果由电荷耦合摄像装置 (charge coupled device, CCD) 记录。

4.3 电化学发光检测系统

该系统有可能为芯片上 DNA 分子定量检测创造条件。在硅-玻璃芯片上插入一个金属膜作为阴极, 以及一个在玻璃表面镀有铂锡氧化物的阳极。由电化学反应产生的光信号通过透明的玻璃阳极, 再由光电倍增管检测。

4.4 光寻址电位计传感器检测系统

该系统是第一种用于硅芯片上 DNA 定量检测的商业化检测系统^[17, 18]。

4.5 TaqMan 系统

该系统利用 Taq 酶的 5'-3' 内切活性, 将寡核苷酸探针的 5' 端标以淬灭染料, 3' 端则以磷酸酯封闭, 杂交反应及酶切反应产生的 DNA 的量成比例, 可通过光电倍增管或 CCD 摄像来检测芯片上发生的 PCR 产物的量。该系统若与多荧光染料标记系统结合, 可用于芯片上 PCR 产物的定量检测^[19]。

以上各检测系统原理不同, 用于不同类型的芯片。在微芯片的发展中, 将得以不断改进与完善, 为微芯片多样化用途开辟新路。

5 问题与展望

首先是微芯片制作上的问题。如欲使微芯片用于 SBH 分析大片段未知序列, 需在芯片上合成一定长度的所有可能序列的探针阵列, 对于含 10 个核苷酸的探针, 合成 200~ 300 个不同的十核苷酸约需几小时。但合成一块完整的 4¹⁰种探针阵列芯片则需几个月, 显见其时间与成本消耗。为解决这一问题, 有人发展了可同时产生几百个短序列探针的“片段合成法”, 也有人采用“喷墨印刷式”等液体分配固化技术将探针沉积在芯片上, 休斯敦高级研

究中心 (HARC) 还尝试开发适宜的探针植入仪. 但至今仍未有哪种方法十分成熟并能大量制成产品.

另外, SBH 的实现尚有许多困难需要克服. 首先, 要发展适当的方法来建立根据杂交数据准确翻译出目的基因序列的算法. 其次, 检测系统要有能力分辨完全互补的真杂交与存在错配的假杂交信号. 芯片上合成的探针长度一般较短 (< 20 bp), 若待测序列较长, 其中某些短序列极可能重复出现, 就会给最后的测序造成困难. 另外, “错配”的问题有时会很严重, 比如一段富含 G, C 的 DNA 区域的错配杂交有可能比富含 A, T 的区域的真正互补杂交信号还强, 此种情况下的翻译结果显然易错. 其他问题, 象如何消除杂交反应检测中的二级结构的影响, 以及芯片表面与溶液界面效应等对检测结果的影响等, 均为 SBH 的实际应用所不容忽视.

尽管存在以上问题, 微芯片仍被认为一种有希望的高效工具. 对其研制的成果已初见端倪. 它最有可能被先用于小规模的重测序, 和对某些基因的 MDBH 扫描. 一旦其制作工艺得以完善、检测分辨率进一步提高, 检测结果的翻译得以自动化, 将为人类疾病基因的探查、基因药物的设计、HGP 的完成和 HGP 后的生命科学研究增添一种新工具.

参 考 文 献

- Cheng J, Fortina P, Surrey S, *et al.* Microchip-based devices for molecular diagnosis of genetic diseases. *Molecular Diagnosis*, 1996, **1** (3): 183~ 200
- Fodor S P A, Read J L, Pirning M C, *et al.* Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis. *Science*, 1991, **251** (4994): 767~ 773
- Pease A C, Solas D, Sullivan E J, *et al.* Light-generated oligonucleotide arrays for rapid DNA sequence analysis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, **91** (11): 5022~ 5026
- Matson R S, Rampal J, Pentoney S L, *et al.* Biopolymer synthesis on polypropylene supports: oligonucleotide arrays. *Anal Biochem*, 1995, **224** (1): 110~ 116
- Cheng J, Mitchelson K R. Glycero-enhanced separation of DNA fragments in entangled solution capillary electrophoresis. *Anal Chem*, 1994, **66** (23): 4210~ 4214
- Drmanac R, Labat I, Brukner I, *et al.* Sequencing of megabase plus DNA by hybridization: theory of the method. *Genomics*, 1989, **4**: 114~ 128
- Khrapko K R, Lysov Y P, Khorlyn A A, *et al.* An oligonucleotide hybridization approach to DNA sequencing. *FEBS Lett*, 1989, **256**: 118~ 122
- Lipshutz R J, Morris D, Chee M, *et al.* Using oligonucleotide probe assays to access genetic diversity. *BioTechniques*, 1995, **19**: 442~ 447
- Noble D. DNA sequencing on a chip. *Anal Chem*, 1995, **67** (5): 201A~ 204A
- Wilding P, Pfahler J, Bau H H, *et al.* Manipulation and flow of biological fluids in straight channels micromachined in silicon. *Clin Chem*, 1994, **40**: 43~ 47
- Woolley A T, Mathies R A. Ultra-high-speed DNA fragment separations using microfabricated capillary array electrophoresis chips. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, **91** (24): 11348~ 11352
- Effenhauser C S, Pautner A, Manz A, *et al.* High-speed separation of antisense oligonucleotides on a micromachined capillary electrophoresis device. *Anal Chem*, 1995, **66** (18): 2949~ 2953
- Woolley A T, Mathies R A. Ultra-high-speed DNA sequencing using capillary electrophoresis chips. *Anal Chem*, 1995, **67** (20): 3676~ 3680
- Effenhauser C S, Manz A. Miniaturizing a whole analytical laboratory down to chip size. *Am Lab*, 1994, **26**: 15~ 18
- Hacia J G, Brody L C, Chee M S, *et al.* Detection of heterozygous mutations in BRCA 1 using high density oligonucleotide arrays and two-colour fluorescence analysis. *Nat Genet*, 1996, **14** (4): 441~ 447
- Fodor S P A, Rava R P, Huang X C, *et al.* Multiplexed biochemical assays with biological chips. *Nature*, 1993, **364** (6437): 555~ 556
- Kung V T, Panfili P R, Shelden E L, *et al.* Picogram quantitation of total DNA using DNA binding proteins in a silicon sensor-based system. *Anal Biochem*, 1990, **187** (2): 220~ 227
- Briggs J, Panfili P R. Quantitation of DNA and protein impurities in biopharmaceuticals. *Anal Chem*, 1991, **63** (9): 850~ 859
- Lee L G, Connell C R, Bloch W. Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes. *Nucleic Acids Res*, 1993, **21** (16): 3761~ 3766

Microchip: Novel Tool in the Field of Life Science. CHEN Ya-Li, LU Zu-Hong (National Laboratory of Molecular and Biomolecular Electronics, Southeast University, Nanjing 210018, China).

Abstract Microchips are constructed with photolithography technology and chemical synthesis. Microchip-based devices can be applied for separation, preparation and preconcentration of biological sample. The devices are also used for

polymerase chain reaction or ligase chain reaction as the reaction vessels. The most attractive application is that the microchip immobilizing various oligonucleotide arrays can be used to detecting gene mutation. In addition, these compact arrays of probes may be used for ultra-

fast DNA sequencing. The fabrication, principle, characteristic and application of microchips were introduced.

Key words microchip, molecular diagnosis, sequencing by hybridization, mutation detection by hybridization

基因工程二硫键抗体*

毛春生 宋宏彬 王海涛

(军事医学科学院微生物流行病学研究所, 北京 100071)

摘要 二硫键抗体(dsFv)的概念最早出现于1990年,它是将抗体重链可变区(V_H)和轻链可变区(V_L)的各一个氨基酸残基突变为半胱氨酸,通过链间二硫键连接抗体可变区(Fv)的片段抗体.通用的突变位点是重链的44位和轻链的100位或重链的105位和轻链的43位.dsFv最显著的优点是生化性质稳定,能够耐受环境条件的剧烈作用,在血液中的半衰期长达14 d以上,符合临床给药要求.动物实验显示,dsFv毒素在不对动物造成毒副作用的情况下,可完全抑制肿瘤生长.

关键词 二硫键抗体, 基因工程, 分子设计

学科分类号 R392.11, Q78

二硫键抗体(disulfide-stabilized Fv, dsFv)是一类新型基因工程抗体,它是将抗体重链可变区(V_H)和轻链可变区(V_L)的各一个氨基酸残基突变为半胱氨酸,通过链间二硫键连接V_H、V_L的可变区片段抗体.

二硫键抗体是在单链抗体基础上发展起来的.

1 单链抗体

单链抗体(single chain Fv, scFv)是由一条连接肽将抗体重链可变区(V_H)和轻链可变区(V_L)连接来形成的单链可变区片段抗体.该类基因工程抗体最早报道于1988年,迄今已构建了多种scFv.scFv具有与完整抗体或Fab相同的抗原结合特异性.连接肽的作用有两个,一是既使V_H、V_L连接起来,又保持一定的灵活性,二是增加片段抗体的稳定性^[1,2].特定scFv的稳定性仅与V_H和V_L的

性质,V_H、V_L间表面相互作用的强度有关.同完整的抗体相比,单链抗体具有以下优点:
a. 分子小,为完整单体免疫球蛋白分子的1/6,容易进入组织(包括肿瘤),因而可用于肿瘤的诊断和治疗;
b. 因其为单链,易于进行分子改造,如与毒素等拼接成为免疫毒素,可以直接杀伤靶细胞;
c. 可由大肠杆菌等发酵,进行大批量生产.

将scFv与毒素如绿脓杆菌外毒素A(PE40)等连接起来成为scFv-毒素,动物实验证明,scFv-毒素可以完全抑制肿瘤的生长,充分展示了scFv用于肿瘤治疗的可能性,对此,已有很多文献作了综述^[3~5].但是,scFv也有一些缺点,a. 稳定性仍然较低,这主要是由于scFv分子内V_H和V_L间相互作用力较弱,不足以抵消分子间的作用力,因而易凝集

* 国家863计划资助项目(Z18-01).

收稿日期:1997-09-04,修回日期:1998-01-12