

Ultra weak Chemiluminescence Analytical Technology Principle and Application.

ZHANG Zhong-Lun (*Institute of Biophysics, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China*).

Abstract Ultra weak chemiluminescence analyzers that detect weak light from samples were developed by ultra weak chemiluminescence analytical technology. BPCCL ultra weak chemiluminescence

analyzer has a lot of supper performance. It is satisfactory to research and application in the fields of biology, medicine and chemistry. The example that of to research DNA damage was introduced. It is approved that the technology and analyzer were advanced and practical.

Key words ultra weak chemiluminescence analyzer, DNA damage

DNA 微阵列 (或芯片) 技术原理及应用

何志巍 姚开泰

(湖南医科大学肿瘤研究所, 卫生部癌变原理重点实验室, 长沙 410078)

摘要 DNA 微阵列或芯片 (DNA microarray or chip) 技术是近年发展起来的又一新的分子生物学研究工具。它是利用光导化学合成、照相平板印刷以及固相表面化学合成等技术, 在固相表面合成成千上万个寡核苷酸探针, 或将液相合成的探针由微阵列器或机器人点样于尼龙膜或硅片上, 再与放射性同位素或荧光物标记的 DNA 或 cDNA 杂交, 用于分析 DNA 突变及多态性、DNA 测序、监测同一组织细胞在不同状态下或同一状态下多种组织细胞基因表达水平的差异、发现新的致病基因或疾病相关基因等多个研究领域。

关键词 DNA 微阵列 (或芯片), 原理, 应用

学科分类号 Q785

从人类基因组计划启动至今, 已积累了大量基因序列数据库, 而它们在疾病和发育中的生物学意义尚知之甚少^[1,2]。目前人们正在由研究基因的结构及染色体定位的结构基因组学, 向研究这些基因表达调控、在机体发育分化及疾病中作用的功能基因组学转变^[3]。而将多学科、多技术融合而成的 DNA 微阵列或芯片技术可研究同一或不同组织细胞在不同生理、病理条件下成千上万个基因结构、功能改变以及基因表达间相互作用的关系, 发现致病基因或疾病相关基因, 这必将为功能基因组学产生巨大的推动作用。本文主要介绍了该技术的概念、原理及在基因表达、基因突变或多态性分析及 DNA 测序等方面研究的最新进展。

1 概念理论依据

美国加州 Affymetrix 公司的 Lipshutz 等^[4]较早地介绍了高密度寡核苷酸微阵列的制造、检测、软件及应用, 随后该公司将照相平板印刷技术、计算机、激光共聚焦扫描、固相表面合成寡核苷酸及核酸分子杂交等结合起来, 研制出 DNA 芯片。

DNA 微阵列或芯片是指在大规模集成电路所控制的机器人在尼龙膜或硅片固相支持物表面, 有规律地合成成千上万个代表不同基因的寡核苷酸“探针”, 或液相合成探针后由阵列器 (arrayer) 或机器人点样于固相支持物表面。这些“探针”可与用放射标记物如³²P 或荧光物如荧光素、丽丝胺等标记的目的材料中的 DNA 或 cDNA 互补核酸序列相结合, 通过放射自显影或激光共聚焦显微镜扫描后, 对杂交结果进行计算机软件处理分析, 获得杂交信号的强度及分布模式图, 以此反映目的材料中有关基因表达强弱的表达谱。该技术仍以基因连锁、连锁不平衡、限制性长度多态性、可变串联重复序列及单核苷酸多态性标记等基因定位方法为基础, 采用分子杂交等多种技术方法为手段, 进行遗传作图, 对不同材料中的多个基因表达模式进行平行对比分析, 是一种高产出的、新的基因分析方法。以尼龙膜为固相支持物的 DNA 微阵列和以硅片为固相支持物的 DNA 芯片, 二者在原理上相同, 仅在支持物及检测手段等方面略有不同。

2 DNA 微阵列或芯片的制作和原理

2.1 固相表面高密度寡核苷酸探针的合成及排列

采用光导化学合成和照相平板印刷技术可在硅片表面合成寡核苷酸探针^[5], 如图 1. 当光通过照相平板印刷的“面具”到达固相合成特定区域时, 则激活这些区域内的酶底物 (如 α -甲基-6-氮胡椒酮甲羰基), 而产生自由羟基和使受光保护的基团去除, 继而脱氧核苷酸通过化学连接键添加于去保护位点上; 当光通过另一个新的“面具”到达酶底物的另一个区域发生同样反应, 如此循环直到所需要的核酸全部被合成. 而每次所添加的脱氧核苷酸是由“面具”上的顺序所决定的, 而后者又是由计算机根据设计者需要所控制的, 因此一个限定长度的寡核苷酸则排列在预定位置上. 对于 N 个碱基的探针, 需 $4N$ 个化学合成循环步骤可达到 4^N 个探针数, 如探针长度为 4 个碱基, 化学合成循环步骤为 16 次, 探针数为 256 个; 如探针长度为 8 个碱基, 则合成循环需 32 步即可达到 65 536 个探针. 这些探针在不同的照相平板印刷分辨率作用下, 可在单位面积上合成不同的位点数. 如分辨率为 200 μm , 合成密度为 2 500 个位点/ cm^2 , 如分辨率为 20 μm , 合成密度为 250 000 个位点/ cm^2 等, 由此构成高密度寡核苷酸微阵列.

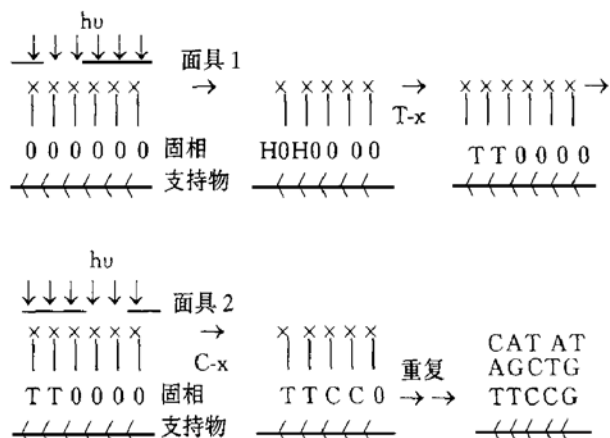


图 1 固相表面寡核苷酸探针阵列的光导化学合成

2.2 液相探针的合成及在固相表面的排列

由已知基因序列在液相中化学合成寡核苷酸链探针, 或通过 PCR 技术扩增已知基因的编码区部分序列, 或克隆的基因组片段, 均需通过纯化产物后再定量分析. 再由具有多个微细加样孔的阵列复制器 (arraying and replicating device, ARD) 或阵列机 (arrayer) 及由电脑控制的机器人, 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预处理好的硅片相应位置上, 再由紫外线胶联固定后即得到 DNA 微阵列或芯片^[6,7].

2.3 探针的杂交和检测

DNA 微阵列或芯片用于检测基因表达、多态性或突变等实际上是一种反向斑点杂交技术. 代表不同待检测基因的“探针”被固定于微阵列或芯片上, 而被检测核酸 DNA 或由 mRNA 逆转录而来的 cDNA 群体用放射性³²P/³³P 或荧光物标记后与固相阵列杂交. 如被检测核酸中有与阵列上“探针”互补的序列存在, 则二者以氢键结合. 在被检测核酸浓度、温度、缓冲液及盐浓度等相同条件下, 结合在“探针”上的被检测核酸量与其碱基构成和靶-探针匹配的量所决定. 对于一个相同长度的探针, GC 含量较高的与靶结合的强度高于 AT 含量较高者, 靶-探针完全匹配者结合强度远高于二者间存在不匹配、插入或缺失. 结合在“探针”上的被检测核酸可通过放射自显影或激光共聚焦显微镜检测杂交信号强弱和分布, 再通过计算机软件处理分析, 得到有关基因的表达谱.

3 应用

3.1 基因表达水平的检测

常见的基因表达水平的检测法均有其利弊, RNA 印迹法只适用检测高丰度的 mRNA; RT-PCR 虽可检测低丰度 mRNA 表达水平, 但因多种原因限制了检测基因表达的种类; mRNA 差异展示可同时检测多个基因表达, 但通常难于定量, 假阳性较多, 如为阳性还须进行亚克隆和测序以证实之; 基因表达系列分析 (SAGE) 是一种较好的 cDNA 测定方法, 但仍需复杂的样品制备和批量测序, 且以上方法均难于自动化. DNA 微阵列或芯片应用于基因表达水平检测的最大优越性是可自动、快速检测目的材料中成千上万个基因的表达情况.

在植物研究领域, Schena 等^[8]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, 经激光共聚焦显微镜扫描, 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高 500 倍表达. 在真菌研究方面, DeRisi^[9]和 Wodicka 等^[10]用包含所有酿酒酵

母基因在内的 DNA 微阵列, 观察了整个酵母基因组在发酵到呼吸反应过程中各基因表达的动态变化. 在细菌研究方面, Saizieu 等^[11]用包含代表流感嗜血杆菌的 106 个基因和肺炎链球菌 100 个基因的 DNA 芯片, 与分别来自 R6x 菌株生长至 $A = 0.3$ 时的总 RNA 和将细菌用活性刺激肽 (CSP) 作用 20 min 后的总 RNA 用生物素标记探针杂交, 定量检测了各基因在这两种状态下的转录水平, 其敏感性可达每细胞 1~5 个拷贝数. 在人类疾病研究中, Schena 等^[12]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 个基因在处理组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. DeRisi 等^[13]将作为对照的人黑色素细胞瘤细胞株 UACC-903 的 mRNA 和该细胞株插入人 6 号染色体后的 mRNA 逆转录为 cDNA 时, 采用两种不同荧光物分别标记, 再与 1161 个分别代表肿瘤抑制和分化基因的 cDNA 微阵列杂交. 发现介导 P₅₃ 基因的 WAF1 (P₂₁) 基因在处理组细胞表达升高而对照组抑制, 人褐色斑蛋白基因仅在对照细胞中有表达. 因此通过该方法可提供十分有价值的肿瘤发生的分子机制.

总之, DNA 微阵列或芯片技术已在某些植物、细菌、真菌的整个基因组范围内对各基因表达水平进行快速的检测. 而在 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待不会遥远^[14].

3.2 寻找可能致病基因或疾病相关基因

用 cDNA 微阵列技术通过比较组织细胞基因的表达谱差异, 可以发现新的可能致病基因或疾病相关基因^[3]. Gress 等^[15]从胰腺癌细胞株 PATU、胰腺癌组织、慢性胰腺炎及对照胰腺组织的每个文库中随机挑选 20 736 个 cDNA 克隆点样至 384 孔板中, 再用机器人规律点阵于 22 cm × 22 cm 大小尼龙膜上, 然后与 ³⁵S 标记以上组织来源各 2 μg mRNA 的 cDNA 探针杂交, 发现在胰腺癌存在 129 个新序列和 97 个 EST. 其中有参与增加糖酵解作用的基因, 有参与细胞结构和骨架改变或转录翻译机制的基因, 有参与恶性表型的基因等多个肿瘤形成机制中起作用的新基因. 首次提出了参与胰腺癌恶性表型形成的特异基因表达谱和可能的致病基因或疾病相关基因. Heller 等^[16]通过 cDNA 微阵列

比较了类风湿性关节炎 (RA) 和感染性腹部疾病组织的基因表达谱. 发现金属蛋白酶 1、铁蛋白轻链和锰超氧化物歧化酶基因在 RA 明显高表达, IL-3、ICE、化学促进因子 Groα、调节性活化正常 T 细胞表达和分泌基因 (RANTES) 及人基质金属弹性蛋白酶 (HME) 基因可能为 RA 的主要致病基因或相关基因. 现将 HME 作为药物抗 RA 治疗的靶基因, 而收到较好疗效.

3.3 基因点突变及多态性检测

根据已知基因的序列信息可设计出含有成千上万个不同寡核苷酸探针的 DNA 芯片, 再用荧光标记待测 DNA, 如二者完全匹配则杂交后结合牢固荧光强度高, 如不全匹配则荧光强度弱或无. 由此可判断点突变的存在与否及部位和个数. 根据这一原理如对 N 个碱基长度序列的每个碱基进行筛查, 则需 $4 \times N$ 个探针即可. 一般在 1.28 cm² 的支持物上可载 16 000 个探针, 可用于 4 kb 碱基序列的筛查. 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 → Gln, 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^[4]. 如将这些基因突变部位的全部序列构建为 DNA 芯片, 则可快速地检测待测病人是一个还是多个基因突变, 这对指导治疗和预后而具有十分重要的意义. Lee 等^[17]用含有 135 000 个探针的 DNA 微阵列分析了人线粒体基因组 DNA 多态性变化. 该组探针互补于人线粒体基因组全长 16.6 kb, 将之与不同个体来源的基因组 DNA 杂交, 发现人线粒体基因组存在 16 493 位 T → C 突变, 16 223 位 C → T 等多位点突变的 DNA 多态性特征.

3.4 DNA 序列测定

虽然 Sanger、Maxam、Gilbert 均有其标准的 DNA 测序方法, 但对 HGP 这类大范围的测序工作已显过时, 而用 DNA 微阵列或芯片快速测定待测 DNA 序列则具有十分诱人的前景. Pease 等^[5]阐述了该方法的原理并指出它是在人类遗传学、诊断学、病理检测及 DNA 分子识别等方面发挥作用的强有力工具. Hacia 等^[18]用含有 48 000 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 3.4 kb 长度范围内的核酸序列同源性在 98.2% 至 83.5% 之间, 高

度提示了二者在进化上的相似性。

4 展 望

DNA 微阵列或芯片几乎可用于所有核酸杂交技术的各个方面,而在同时比较各组织或同一组织在不同状态下成千上万个基因的表达状况、DNA 序列分析等方面具有更大的优越性^[19]。有人誉赞“微阵列技术铺平了通往 21 世纪的医学之路”^[20],美国在该技术的方法与应用上召开过两次会议,并得到克林顿总统在国会演讲上的赞赏与肯定^[21],目前全美已有 25 家公司投身于该技术的研制与开发。相信在不久的将来,DNA 芯片或微阵列技术将会广泛应用于基础及临床医学各个方面,而发挥出巨大的经济、社会效益。

参 考 文 献

- 1 Strachan T, Abitol M, Davidson D, *et al.* A new dimension for the human genome project: towards comprehensive expression maps. *Nature Genetics*, 1997, **16** (3): 126~ 132
- 2 Rowen L, Mahairas G, Hood L. Sequencing the human genome. *Science*, 1997, **278** (5339): 605~ 607
- 3 Brown P, Hartwell L. Genomics and human disease variations on variation. *Nature Genetics*, 1998, **18** (1): 91~ 93
- 4 Lipshutz D, Morris D, Chee M, *et al.* Using oligonucleotide probe arrays to access genetic diversity. *BioTechniques*, 1995, **19** (3): 442~ 447
- 5 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
- 6 Schena M, Heller R A, Thieriault T P, *et al.* Microarrays: biotechnology's discovery platform for functional genomics. *TIB Tech*, 1998, **16** (3): 301~ 306
- 7 Schummer M, Ng W, Nelson P S, *et al.* Inexpensive handheld device for the construction of high-density nucleic acid arrays. *BioTechniques*, 1997, **23** (6): 1087~ 1092
- 8 Schena M, Shalon D, Davis R W, *et al.* Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science*, 1995, **270** (5235): 467~ 470
- 9 DeRisi J L, Lyer V R, Brown P O. Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. *Science*, 1997, **278** (5339): 680~ 686
- 10 Wodicka L, Dong H, Mittmann M, *et al.* Genome-wide expression monitoring in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature Biotechnology*, 1997, **15** (13): 1359~ 1363
- 11 Saizieu A D, Certa U, Warrington J, *et al.* Bacterial transcript imaging by hybridization of total RNA to oligonucleotide arrays. *Nature Biotechnology*, 1998, **16** (1): 45~ 48
- 12 Schena M, Shalon D, Heller R, *et al.* Parallel human genome analysis: microarray-based expression monitoring of 1000 genes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, **93** (20): 10614~ 10619
- 13 DeRisi J, Penland L, Brown P O, *et al.* Use of a cDNA microarray to analysis gene expression patterns in human cancer. *Nature Genetics*, 1996, **14** (4): 457~ 460
- 14 Goffeau A. Molecular fish on chips. *Nature*, 1997, **385** (6613): 202~ 203
- 15 Gress T M, Muller-Pillasch F, Geng M, *et al.* A pancreatic cancer-specific expression profile. *Oncogene*, 1996, **13**: 1819~ 1830
- 16 Heller R A, Schena M, Chai A, *et al.* Discovery and analysis of inflammatory disease-related genes using cDNA microarrays. *Proc Natl Acad Sci*, 1997, **94**: 2150~ 2155
- 17 Lee M, Yang R, Hubbell E, *et al.* Accessing genetics information with high-density DNA arrays. *Science*, 1996, **274**: 610~ 613
- 18 Hacia J G, Makalowski W, Edgemon K, *et al.* Evolutionary sequence comparisons using high density oligonucleotide arrays. *Nature Genetics*, 1998, **18** (3): 155~ 158
- 19 Ramsay G. DNA chips: state of the art. *Nature Biotechnology*, 1998, **16**: 40~ 44
- 20 Nelson N. Microarrays pave the way to 21st century medicine. *Journal of the National Cancer Institute*, 1996, **88** (22): 1803 ~ 1805
- 21 Editorial: Getting hip to the chip. *Nature Genetics*, 1998, **18** (3): 195~ 197

Fundamental Principle and Applications of DNA Microarray or Chip. HE ZhǐWei, YAO KaiTai (Cancer Research Institute, Hunan Medical University, Changsha 410078, China).

Abstract DNA microarray or chip is a new technique in molecular biology. With combining the light-directed chemical synthesis, semiconductor-based photolithography, and solid-phase chemical synthesis, thousands of oligonucleotide probes were arrayed or spotted on the surface of solid support. This technology has successfully monitored the simultaneous expression of many thousands of genes, developed to screen DNA mutation and polymorphism, applied to sequence DNA, and discovered the novel disease-related genes by hybridization to radioisotope or fluorescence labeled DNA or cDNA coming from interesting tissues and cells.

Key words DNA microarray (or chip), principle, application