

·学科进展·

DNA 微集阵列技术的研究进展

马文丽* 郑文岭†

(* 第一军医大学基础部生物化学和分子生物学教研室,广州 510515;

† 广州军区广州总医院分子肿瘤学研究所,广州 510010)

[摘要] DNA 微集阵列(DNA Microarray)技术采用寡聚核苷酸原位合成或显微打印方式,将大量 DNA 探针片段显微固化于支持物的表面,以实现遗传信息的快速、敏感和高效检测,该技术在基因组研究、新基因发现及基因诊断等方面有着重要的理论意义和应用前景。

[关键词] DNA,微集阵列

近年来,DNA 微集阵列(DNA Microarray)技术的快速发展,引起生物学领域的普遍关注^[1]。以大量 DNA 片段为探针,显微固化于支持物(substrates)的表面,可实现遗传信息的高效、敏感和自动化检测,因而可在基因组研究和分离等过程中发挥重要作用。本文拟针对 DNA 阵列技术的研究背景、国内外现状与进展以及其在基因组研究和基因诊断中的应用等方面进行综述。

1 研究背景

DNA 微集阵列有时也被称作 DNA 微集芯片(DNA microarray chips)^[2]或 DNA 芯片。将大量 DNA 片段(上百种甚至上万种),通过一定的方式,显微集成于平方厘米大小的固体支持物表面,然后与标记的待检测样品进行分子杂交,使待测样品中的基因成分得到鉴定。由于常用的固体支持物是含硅玻片或硅芯片(silicon chip),并且在芯片制备过程中,使用了显微光蚀刻(photolithography)或显微打印等计算机芯片制备方法,因此套用了 DNA 芯片(DNA chip)名称。目前的 DNA 芯片虽然还不能以计算机芯片的方式处理生物信息,但却可能大大提高基因分子的检测效率。

DNA 微集阵列的概念萌发于 1990 年初,当时美国 Affymex 公司的 Steven Fodor 研究组,发现了一种新型的光敏材料^[3]。该光敏材料涂被在硅芯片表

面,可使芯片表面的活性基团羟基(OH)被有效地保护起来,因而多肽分子无法在其表面合成或延伸。当采用可见光照射时,光敏材料解聚,对活性基团的保护脱去,因而在光点的指引下,可定点将不同的多肽链原位合成并固化于芯片表面。后来研究发现,该方法不仅可导引多肽阵列、通过技术改进,亦可用于 DNA 阵列的合成。1993 年,美国国家科学基金会(NSF),以 100 万美元的强度,资助了 Affymex 公司的这项研究课题。近年来,该技术的研究取得了突破性进展,通过光栏(Light Mask)组合与紫外或激光引导,DNA 阵列的集成度可高达每平方厘米 10—40 万个探针点阵,具体技术细节已经申请了技术专利的保护,一个以基因芯片研制和开发为主的新公司 Affymetrix 也从 Affymex 公司中独立出来^[4]。

与上述方式有所不同的另一种 DNA 阵列制作,是采用显微打印的方式。美国斯坦福大学科耐尔研究所(Cornell Institute)的 Brown 研究小组,以显微打印的方式,将各种来源的 DNA 探针片段,固定到支持物的表面,制成 DNA 微集阵列。该方法虽需要精密的显微打印装置,但使用的探针组的来源比较灵活,可以是合成的寡聚核苷酸片段,亦可采用来自基因组的较长的 DNA 片段;可以是双链,亦可采用单链的 DNA 或 RNA 片段,并且技术实现未受到严格的专利控制^[5],因而近来发展速度也很快。将酵母基因组编码的基因,集成制备含一种生物体完整基

国家自然科学基金资助项目,批准号 39880032.

本文于 1999 年 1 月 18 日收到.

因组的微集阵列,是DNA微集阵列应用于基因组研究的重要例证^[6]。

2 国内外研究现状及发展趋势

虽然DNA微集阵列的制作方式有所不同,但其实现的过程,基本上是类似的,即均包括探针片段的获得、探针片段的固化、样品的标记、分子杂交、杂交信号的检测分析等过程。

2.1 DNA探针片段的获得及DNA片段的固化过程

目前DNA探针主要来自2个途径,即以Affymetrix公司为代表的寡聚核苷酸片段原位合成技术(*In Situ synthesis*)和通过常规分子生物学手段获得DNA片段。

原位合成技术利用了选择性光阑进行光路的定位^[4]。没有光阑的部位由于透光,所在位点的光敏保护剂被脱去,活性OH基团暴露出来,从而使特定的单核苷酸,被定位合成或延伸。由于技术的突破,目前该方式合成速度可以很快,例如,合成 6×10^4 个八核苷酸阵列,只需不到8h的时间。因为是平行化过程,平均每个碱基合成所需的时间只相当于26ms。该方法目前受到的限制是,合成寡聚核苷酸探针的长度一般较短(2—8个碱基,最长为50碱基)。因此,对于一般长度的基因,必须使用多个相互重叠的探针片段进行检测,才能对基因进行准确的鉴定^[7],因而会对DNA阵列的实际集成程度造成影响。

采用常规分子克隆技术或多聚酶链反应(PCR)进行探针的制备,然后通过显微打印方式,使DNA探针被分别固化于芯片的不同位点以制成微集阵列,是近年来DNA芯片制备采用的另一种方式。这种方式较灵活,探针片段可来自多个途径,如分子克隆或PCR扩增等。集成度虽然比原位合成法低,但由于阵列中除了可使用寡聚核苷酸探针,也可使用较长的基因片段^[8],这种情况下,阵列的实际集成度可与原位合成法相当或更高。这个领域虽然尚无技术垄断或专利的限制,但大量收集或合成用于阵列制备的探针,早期即需投入较大的资金。原位合成法及显微打印法进行微集阵列制备的比较见表1。

2.2 待测样品标记及分子杂交过程

目前待测样品的标记,主要采用荧光色素。常规标记的过程为,提取生物样品的mRNA或DNA,通过随机引物、体外转录或PCR扩增等方式,使待测样品中的核酸成分被拷贝或扩增,而荧光标记的

单核苷酸分子,则在拷贝延伸的过程中,被掺入新合成的DNA片段,后者变性后,即可与DNA微集阵列进行分子杂交。目前比较常用的荧光分子有Fluorescein、Lassamine和Phycoerythrin^[9]等等。

表1 两种微集阵列制备途径的比较

内容	原位合成	显微打印
方式	光引导原位化学合成	探针收集、显微打印
最高集成度	10—40万点阵/平方厘米	1—4万点阵/平方厘米
探针长度	短,小于50个碱基	可较长,100—500个碱基或更长
杂交过程	条件要求较高,较不易于控制	条件要求较低,较易于控制
其他	专利控制严格,技术难以实现	无专利控制,需制备大量探针

常规经典的分子杂交过程,将待检测样品,固定于滤膜上,与同位素标记的探针在一定杂交液及温度下进行杂交,一般均需要较长的时间(4—24h)才能完成分子杂交过程,且一般每次只能检测为数不多的一个到几个探针。DNA微集阵列将已知序列的DNA探针,显微固化于支持物的表面,而将待检测样品,进行标记并与微集阵列进行杂交。这种方式不仅使得检测过程平行化,可以同时检测成百上千的基因序列,而且由于集成的显微化,使得杂交所需的探针及待检测样品均大为减少,杂交时间明显缩短,一般的分子杂交过程可在30min内完成^[4]。

美国Nanogen公司近来报告了一种通过交变电场,使分子杂交速度显著提高的新方法。这种技术的原理是利用核酸分子所带的强负电荷,通过快速反转电场的正负极,驱使待检测分子与探针分子间的快速结合与分离。通过控制电场的强度,使完全杂交的特异性核酸分子通过氢键的结合而保留在阵列的表面,不完全杂交或非特异性结合的片段,在正电场的作用下,与靶探针分离,从而达到检测特异性基因的目的。据称,采用这种新方式,分子杂交速度可缩短至1min甚至数秒钟^[10]。Nanogen目前DNA阵列的集成度虽比较低,每平方厘米集成的点阵数不足百个,但该阵列杂交过程中采用的新颖杂交方式,使其应用前景大为拓宽。

2.3 杂交信号的检测与信号处理

经荧光样品杂交后的芯片,荧光信号可经过荧光显微镜、激光共轭聚集显微镜或激光扫描仪进行信号的收集。收集后的信号,经过计算机处理,并与探针阵列的位点进行比较,可得出杂交的检测结果。

Livache等^[11]通过显微加工技术,将核酸分离、扩增、标记及检测等过程,显微安排在同一块芯片内

部,试图进一步提高 DNA 芯片应用的自动化程度。该技术目前只适于单基因检测,但将各单元进一步微缩与集成,可使 DNA 阵列的检测完全自动化,因而前景也十分诱人。

Wang 等^[12]则利用生物传感技术,将 DNA 点阵显微集成,再通过半导体传感器元件,使杂交信号被直接转变为电子信号,从而实现信号的计算机直接收集与处理,使芯片的应用过程更为简化和实用。

3 DNA 微集阵列的应用前景

DNA 微集阵列技术,伴随着人类基因组计划的快速发展而产生。随着越来越多生物基因序列被阐明,DNA 微集阵列技术,在研究基因的突变、基因多态性标志、基因表达的差异等基因组课题以及临床基因诊断等多个方面,均有十分广泛的应用前景。

Hacia 等^[13]采用一含有 96 000 个合成寡聚探针的微集阵列,研究了乳腺癌相关的 BRCA1 和卵巢癌相关癌基因可能发生的杂合子突变。采用双色荧光法,分别标记待检测样品与对照样品,他们研究了 15 个病人的基因型,结果证明,这些病人的 BRCA1 中,存在有不同程度点突变的发生。

采用 Affymetrix 合成微集阵列,Lipshutz 等^[14]研究了 HIV 感染过程中,其逆转录酶与蛋白酶基因发生突变的情况。由于这些突变是导致 HIV 抗药性产生的根源,因此,这些突变机制的阐明,对于最终控制爱滋病(AIDS)至关重要。他们首先研究了未使用蛋白酶抑制剂的 114 个样品,结果发现,采用微集阵列得到的结果与采用常规 DNA 序列分析的结果,吻合率高达 98%。

Chee 等^[15]应用一含有 135 000 个长度为 25 个碱基的(25 mer)探针的阵列,探测了 16.6 kb 的人类线粒体基因组。从 10 个样品中,检测出多达 505 个基因组多态性标志位点。研究结果表明,DNA 微集阵列和常规方法相比较,在基因组突变和多态性检测方面,具有较为明显的优势。

随着基因组序列被阐明,基因组功能的机制也逐渐成为人们关注的焦点之一。基因表达、基因调控以及基因应答方式等诸多课题,都可以通过 DNA 微集阵列技术,进行研究和探索。DeRisi 等^[16]采用来自恶性肿瘤细胞系 UACC903 和逆转了的相应细胞的 1161 个 cDNA 克隆,制备成微集阵列,并分别对两种细胞的基因表达差异进行了探测,发现 p21 基因在恶性肿瘤细胞中处于失活或关闭状态,但在逆转的细胞系中呈现表达。

同一个研究组还采用了来自酵母基因组开放读码框的 260 000 个 25 mer 阵列,对酵母细胞不同生活状态下的基因表达进行了系统分析^[6]。研究表明,90% 以上的酵母基因,包括结构基因和核糖体基因等,在营养丰富及贫乏的培养基中生长时,其基因表达没有明显的差异。但他们也发现了另外 36 个基因在营养丰富培养基中生长时,有较多的表达,而 140 个基因在营养贫乏的培养基中生长时表达增加。上述发现中,有些是功能尚未被阐明的新基因。微集阵列在这方面的应用,表明其在新基因发现、基因差异显示等方面,亦可发挥重要作用。

Yershov 等^[17]采用一 10 mer 阵列,检测了 β 地中海贫血患者的血液细胞,结果可清楚地显示在 β 珠蛋白基因中存在的 3 个明确的突变位点。是 DNA 微集阵列应用于基因诊断的实际例子。与传统基因诊断技术相比较,基因芯片技术有着的明显优势:(1)采用显微固化的 DNA 探针阵列进行检测,将大大节省探针和样品,缩短处理步骤,因而可显著地降低基因诊断的成本。(2)由于在单位面积上集成大量探针信息,因此单个基因检测所需的相对或绝对时间,都有所缩短,使基因诊断的速度提高^[18]。(3)通过分子杂交进行的诊断,在控制杂交严谨度的前提下,其假阳性与假阴性率均可进一步降低。

综上所述,DNA 微集阵列是近年来兴起的基因分析与检测新技术。可以预测,这一技术在基因组研究中、在临床疾病的基因诊断中,都将发挥重要的作用。

参 考 文 献

- [1] Marshall A, Hodgson J. DNA chips: an array of possibilities. *Nat. Biotechnol.*, 1998, **16**(1):27-31.
- [2] Chen J J, Wu R, Yang P C et al. Profiling expression patterns and isolating differentially expressed genes by cDNA microarray system with colorimetry detection. *Genomics*, 1998, **51**(3):313-24.
- [3] Fodor S P A, Read L J, Pirrung M C et al. Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis. *Science*, 1991, **251**:767-73.
- [4] Butler D. Trace likely in battle over 'DNA-chip' patent rights. *Nature*, 1997, **387**(6630):221.
- [5] Macas J, Nouzov M, Galbraith D W. Adapting the Biomek 2000 Laboratory Automation Workstation for printing DNA microarrays. *Biotechniques*, 1998, **25**(1):106-10.
- [6] Service R F. DNA chips survey an entire genome. *Science*, 1998, **281**(5380):1122.
- [7] Proudnikov D, Timofeev E, Mirzabekov A. Immobilization of DNA in polyacrylamide gel for the manufacture of DNA and oligonucleotide microchips. *Anal. Biochem.*, 1998, **259**(1):34-41.
- [8] Welford S M, Gregg J, Chen E et al. Detection of differentially ex-

- pressed genes in primary tumor tissues using representational differences analysis coupled to microarray hybridization. *Nucleic Acids Res.*, 1998, **26**(12):3059—65.
- [9] O'Donnell-Maloney M J, Smith C L, Cnator C C. The development of microfabricated arrays for DNA sequencing and analysis. *Trends Biotech.*, 1996, **14**:401—407.
- [10] Cheng J, Sheldon E L, Wu L et al. Preparation and hybridization analysis of DNA/RNA from *E. coli* on microfabricated bioelectronic chips. *Nat. Biotechnol.*, 1998, **16**(6):541—6.
- [11] Livache T, Fouque B, Roget A et al. Polypyrrole DNA chip on a silicon device: example of hepatitis C virus genotyping. *Anal. Biochem.*, 1998, **255**(2):188—94.
- [12] Wang J, Cai X, Rivas G et al. Nucleic-acid immobilization, recognition and detection at chronopotentiometric DNA chips. *Biosens Bioelectron.*, 1997, **12**(7): 587—99.
- [13] Hacia J G, Brody L C, Chee M S et al. Detection of heterozygous mutations in BRCA1 using high density oligonucleotide arrays and two-colour fluorescence analysis. *Nat. Genet.*, 1996, **14**(4):441.
- [14] Lipshutz R J, Morris D, Chee M et al. Using Oligonucleotide probe arrays to access genetic diversity. *Biotechniques*, 1996, **19**:442—447.
- [15] Chee M, Yang R, Hubbel et al. Accessing genetic information with high-density DNA arrays. *Science*, 1996, **274**:610—613.
- [16] DeRisi J L, Lyer V R, Brown P O. Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. *Science*, 1997, **270**: 680—686.
- [17] Yershov K, Barsky V, Belgovskiy A et al. DNA analysis and diagnostics on oligonucleotide chips. *Genetics*, 1996, **93**:4913—4918.
- [18] Johnston M. Gene chips: array of hope for understanding gene regulation. *Curr Biol*, 1998, **8**(5):R171—4.

THE RESEARCH AND DEVELOPMENT OF DNA MICROARRAY TECHNOLOGY

Ma Wenli* Zheng Wenling†

(* Dept. of Biochemistry and Molecular Biology, The First Military Medical University, Guangzhou 510515;

† Institute of Molecular Oncology, Guangzhou 510010)

Abstract DNA Microarray technology employs light directed *in situ* oligonucleotide synthesis and/or DNA microarray printing device, to produce matrices of large number of DNA probes in the tiny surface of silicon substrates, which make it possible that the gene detection be conducted efficiently with high speed and sensitivity. The DNA microarray may play important part in the genome research, gene discovery and various genetic diagnoses. The research and development of the DNA microarray technology are reviewed.

Key words DNA, DNA microarray

·资料·信息·

“全球变化的区域响应”论坛在京举行

1999年6月29日—7月1日,国家自然科学基金委员会“21世纪科学问题论坛”之六——“全球变化的区域响应”论坛在京举行。来自国内十几所高等院校和研究机构的,从事地球科学、生命科学、化学科学等相关领域研究的40余位专家参加了会议。国家自然科学基金委员会副主任孙枢院士、张新时院士和地球科学部主任周秀骥院士共同主持了会议。

会议认为,全球变化研究是迄今为止规模最大的国际合作研究活动,涉及到地球科学、生物科学、

环境科学、天体科学及遥感技术、地理信息系统及网络化高科技技术的应用等众多学科领域,代表着当前世界科学的发展趋势。从全球变化研究的前沿领域出发,结合我国研究的优势和基础,建议“十五”期间全球变化的区域响应重点开展以下5个方面的研究:(1)海洋-大气-陆地相互作用与水循环;(2)东亚季风形成与演变;(3)陆地生态系统对全球变化的响应;(4)生源要素的生物地球化学过程;(5)人类活动对区域环境的影响。

(政策局 供稿)