



DNA 芯片技术：新一代基因诊断技术

目前, 分子治疗、新药开发的研究相当活跃, 而基因诊断研究则相对滞后。基因诊断技术主要包括核酸分子杂交、聚合酶链式反应(PCR)、限制酶酶谱分析、单链构象多态性分析以及DNA序列测定等技术。PCR作为当前基因诊断中最主要的技术, 常与其他技术相联合, 在遗传病、感染性疾病等领域的分子诊断中得到广泛应用。但是由于PCR实验中常出现假阳性、假阴性结果, 严重干扰了疾病的诊断和治疗[1]。近年来兴起的DNA芯片技术以其更敏感、特异、简便等特点与优势引起人们的普遍关注。

1 DNA芯片技术概述

DNA芯片技术, 实际上就是一种大规模集成的固相杂交, 是指在固相支持物上原位合成(*in situ synthesis*)寡核苷酸或者直接将大量预先制备的DNA探针以显微打印的方式有序地固化于支持物表面, 然后与标记的样品杂交。通过对杂交信号的检测分析, 得出样品的遗传信息(基因序列及表达的信息)。由于常用计算机硅芯片作为固相支持物, 所以称为DNA芯片[2]。根据芯片的制备方式可以将其分为两大类: 原位合成芯片和DNA微集阵列(DNA microarray)。芯片上固定的探针除了DNA, 也可以是cDNA、寡核苷酸或来自基因组的基因片段, 且这些探针固化于芯片上形成基因探针阵列。因此, DNA芯片又被称为基因芯片、cDNA芯片、寡核苷酸阵列等。

作为新一代基因诊断技术, DNA芯片的突出特点在于快速、高效、敏感、经济, 平行化、自动化等, 与传统基因诊断技术相比, DNA芯片技术具有明显的优势[3]: ①基因诊断的速度显著加快, 一般可于30 min内完成。若采用控制电场的方式, 杂交时间可缩至1 min甚至数秒钟[4]。②检测效率高, 每次可同时检测成百上千个基因序列, 使检测过程平行化。③基因诊断的成本降低。④芯片的自动化程度显著提高, 通过显微加工技术, 将核酸样品的分离、扩增、标记及杂交检测等过程显微安排在同一块芯片内部[5], 构建成缩微芯片实验室。⑤因为是全封闭, 避免了交叉感染; 且通过控制分子杂交的严谨度, 使基因诊断的假阳性率、假阴性率显著降低。

2 DNA芯片技术在基因诊断中的应用

2.1 临床疾病的基因诊断

人类疾病都直接或间接地与基因有关。也就是说, 基因突变是大多数疾病的主要病因。根据这一概念, 人类疾病可分为3类: 经典的单基因病(由一个基因位点上突变引起)、多基因病(如高血压、糖尿病和肿瘤等)和获得性基因病(即病原微生物感染引起的传染病)。因此, 人们可以在基因水平上对大多数疾病作出诊断。利用DNA芯片技术, 不仅可以在DNA水平上检测与疾病相关的内源基因和外源基因的存在、结构变异及基因多态性, 而且可以在RNA水平上检测致病基因的表达异常。

2.1.1 疾病相关基因(内源基因)的检测

2.1.1.1 DNA芯片技术与肿瘤的基因诊断 肿瘤的形成是遗传因素与环境因素相互作用的结果。与肿瘤相关的基因包括癌基因、抑癌基因及DNA错配修复基因等。当癌基因、抑癌基因发生突变时,癌基因活化,抑癌基因失活,以及其它基因异常不断积累,导致肿瘤发生发展。因此,检测癌基因、抑癌基因中发生的基因突变有助于肿瘤的早期诊断。

BRCA1基因与人类遗传性乳腺癌和卵巢癌密切相关,该基因最常见的突变包括点突变、小范围的插入与缺失等。这些突变将破坏该基因编码的蛋白质结构。Hacia等[6]采用含有96 600个20-mer寡核苷酸探针的基因芯片,检测了BRCA1第11外显子3 450 bp长度内可能发生的杂合性突变,并采用双色荧光法,对15名患者进行诊断,确诊14例,而20例对照中均未出现假阳性结果。

抑癌基因p53是人类肿瘤中最常见的突变基因,约50%以上的肿瘤都存在该基因的突变。有些组织类型p53基因突变率高,如小细胞肺癌约为75%,大肠癌约70%等。通过将p53基因外显子2~11区域内所有突变位点的突变探针以及对应的正常序列探针集成在一块芯片上,制成p53基因芯片,可为肿瘤的早期诊断、分类提供一条新途径。Ahrendt等[7]人应用该芯片检测了100例早期肺癌患者的p53基因序列,并与测序结果相比较,该芯片检测突变的准确率达98%。

2.1.1.2 DNA芯片技术与遗传病的基因诊断 遗传病是由遗传物质(即基因)的异常或缺失所致,利用DNA芯片技术直接检测致病基因的突变或进行多态性分析,从而对遗传病进行分子水平的诊断。

β -地中海贫血(简称 β -地贫)是由于 β -珠蛋白基因突变引起其编码蛋白合成障碍所致。Yershov等[8]将合成的10-mer寡核苷酸固定在聚丙烯酰胺凝胶包被的玻片上,构建了寡核苷酸微集芯片。以PCR扩增 β -地贫患者血液红细胞的DNA并进行标记,将得到的DNA片段与微集芯片杂交,然后通过序列分析,准确地检测到 β -珠蛋白基因第1个外显子和内含子之间的三个突变位点。Drobyshev等[9]以相似的方法鉴定 β -地贫基因突变,所不同的是患者基因组DNA经扩增后以T7 RNA聚合酶在体外转录成RNA,片段化后以酶标或化学方法标记,然后进行杂交。这样大大提高了 β -地中海贫血突变检测的准确性、有效性和可靠性。Cronin等[10]应用固定有428个探针的芯片研究了囊性纤维化的CFTR(囊性纤维化跨膜传导调节蛋白)基因中的突变,从10例患者的样品中检测到CFTR中第10、11外显子已知的缺失、插入或碱基置换突变。上述研究表明,芯片技术可以有效地应用于遗传性疾病的诊断。

2.1.2 外源基因的检测 感染性疾病是由于病原微生物(病毒、细菌、寄生虫等)侵入机体而引起。目前已经获得一些生物的全部基因序列,包括141种病毒,几种细菌(流感嗜血杆菌、产甲烷球菌、支原体M. genitalium及实验室常用的大肠杆菌等)和一种真核生物(酿酒酵母),且数量还在增长[11]。因此,将一种或几种病原微生物的全部或部分特异的保守序列集成在一块芯片上,可快速、简便地检测出病原体,从而对疾病作出诊断及鉴别诊断。

艾滋病(AIDS)是由人类免疫缺陷病毒(HIV)感染所致。Lipshutz等[12]应用含有18 495个寡核苷酸探针的微集阵列,对HIV-1基因组中逆转录酶基因与蛋白酶基因的多态性进行了分析。这两个基因在疾病过程中容易发生突变,这些突变将导致病毒对多种抗病毒药物如AZT、ddI等产生抗药性。因此,基因芯片技术可为艾滋病病毒抗药性的判断提供可靠的依据。Livache等[13]成功地应用DNA芯片对病人血液样品中的丙型肝炎病毒进行基因分型,以指导病毒传染研究以及干扰素的应用。

2.1.3 致病基因的表达监测 某些疾病的发生,并非其基因结构发生了改变,只是在基因表达与调控水平上出现了变化。因此在RNA水平上对致病基因的表达情况进行监测,这是疾病基因诊断的另一种方式。DNA芯片技术可以平行检测大量mRNA的种类及丰度,从而在RNA诊断上具有很大的优越性。

Lockhart等[5]首先应用寡核苷酸阵列来监测基因表达。他们发现,每个细胞中几个拷贝至几个数量级的转录产物均可被定量检测出来。每一个基因只需20个左右的探针对即可对其基因表达进行准确检测,因此一块芯片通常可以检测10 000个以上基因。

Heller等[14]应用cDNA微集阵列技术分析了类风湿性关节炎病变细胞与正常细胞间基因表达谱的差异,又发现了一些与炎症相关的基因,如白介素-3、趋化因子Gro- α 等。肿瘤细胞的基因表达与正常细胞存在明显的差别,Wang等[15]应用微集芯片检测了肺鳞癌组织基因的过度表达,发现17条差异表达基因(包括4条新基因)。这些基因的发现,可以作为疾病诊断的新靶标,并对疾病的治疗及预后也有重要意义。此外,还可依据

肿瘤细胞基因表达谱对肿瘤进行分子病理分型。

综上所述，DNA芯片技术不仅能对临床疾病作出早期、确切的诊断，也能确定与疾病关联的状态，如对疾病的易感性，是否具有抗药性，而且在疾病分期分型、疗效监测、预后判断中将发挥极其重要的作用。

2.2 在法医学、人口优生、环境监测等方面的应用

人体的多样性和个性取决于基因组DNA核苷酸序列的差异，即DNA的多态性。运用DNA芯片技术可以快速、简便地搜寻和分析DNA多态性，极大地推动法医学的发展。目前正在分离第三代DNA多态性标记系统——单核苷酸多态性(Single nucleotide polymorphisms, SNPs)标记物，这种标记物在人类基因组中多达300万个，平均每1 000 bp就有一个，因此可作为特异性基因标记。将个体SNPs设计在一块DNA芯片上，与样品DNA杂交，即可鉴定基因的差异。人的体型、长相约与500多个基因相关，应用DNA芯片原则上可以揭示人的外貌特征、脸型、长相等，这比一般意义的DNA指纹谱又进了一步<HZ[16]>。

应用DNA芯片还可以在胚胎早期对胎儿进行遗传病相关基因的监测及产前诊断，为人口优生提供有力保证；而且可以全面监测200多个与环境影响相关的基因，这对生态、环境控制及人口健康有着重要意义。

3 展望

目前芯片的研究热点之一在于提高探针阵列的密度。随着技术的发展，人体所有约5万个基因集成在1 cm²大小的芯片上将成为可能。因此，每个人的大量遗传信息可记录在一张芯片上，从而使疾病诊断更快速、确切、个体化。我们科室研制的应用型基因芯片已经问世，以创新的限制性显示(RD-PCR)技术，制备肝炎系列基因、艾滋病毒基因、遗传病及肿瘤相关基因以及相应的鉴别诊断基因探针，然后将其打印到硅芯片上，研制和开发临床疾病的基因诊断芯片。

参考文献：

- [1] 曾溢滔. 基因诊断及其合理应用[J]. 上海医学, 1999, 22(2): 69-70.
- [2] 李凌, 马文丽. DNA芯片技术研究进展[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2000, 16(2): 151-5.
- [3] 马文丽, 郑文岭. DNA微集阵列技术的研究进展[J]. 中国科学基金, 1999, 13(5): 270-3.
- [4] Cheng J, Sheldon EL, Wu L. Preparation and hybridization analysis of DNA/RNA from *E. coli* on microfabricated bioelectronic chips[J]. *Nat Biotechnol*, 1998, 16(6): 541-6.
- [5] Lockhart D, Dong H, Byrne MC, et al. Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays[J]. *Nat Biotechnol*, 1996, 14:1675-80.
- [6] Hacia JG, Brody LC, Chee MS, et al. Detection of heterozygous mutations in BRCA1 using high density oligonucleotide arrays and two-colour fluorescence analysis[J]. *Nat Genet*, 1996, 14(4): 441-7.
- [7] 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 USA*, 1999, 96:7382-7.
- [8] Yershov G, Barsky V, Belgovskiy A, et al. DNA analysis and diagnostics on oligonucleotide microchips[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93: 4913-18.
- [9] Drobyshev A, Mologina N, Shik V, et al. Sequence analysis by hybridization with oligonucleotide microchip: identification of β -thalassemia mutation[J]. *Gene*, 1997, 188: 45-52.
- [10] Ramsay G. DNA chips: state-of-the art[J]. *Nat Biotechnol*, 1998, 16(1): 40-4.
- [11] 项春生, Chen Y, Yuan J, et al. cDNA芯片技术和病毒感染的基因表达[J]. 科学通报, 1999, 44(5): 449-54.
- [12] Lipshutz RJ, Morris D, Chee M, et al. Using oligonucleotide probe arrays to

access genetic diversity[J]. *Biotechniques*, 1996, 19: 442-7.

[13] Livache T, Fouque B, Roget A, et al. Polypyrrole DNA chip on a silicon device: example of hepatitis C virus genotyping[J]. *Anal Biochem*, 1998, 255: 188-94.

[14] Heller RA, Schena M, Chai A, et al. Discovery and analysis of inflammatory disease-related genes using cDNA microarrays[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94: 2150-5.

[15] Wang T, Hophkins D, Schmidt, et al. Identification of genes differentially over-expressed in lung squamous cell carcinoma using combination of cDNA subtraction and microarray analysis[J]. *Oncogene*, 2000, 1519-28.

李民乾. DNA芯片的发展和应⽤[*J*]. *科学*, 1998, 50(5):6-8.

参考文献:

[1] 曾溢滔. 基因诊断及其合理应⽤[*J*]. *上海医学*, 1999, 22(2): 69-70.

[2] 李凌, 马文丽. DNA芯片技术研究进展[*J*]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2000, 16(2): 151-5.

[3] 马文丽, 郑文岭. DNA微集阵列技术的研究进展[*J*]. *中国科学基金*, 1999, 13(5): 270-3.

[4] Cheng J, Sheldon EL, Wu L. Preparation and hybridization analysis of DNA/RNA from *E. coli* on microfabricated bioelectronic chips[*J*]. *Nat Biotechnol*, 1998, 16(6): 541-6.

[5] Lockhart D, Dong H, Byrne MC, et al. Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays[*J*]. *Nat Biotechnol*, 1996, 14:1675-80.

[6] Hacia JG, Brody LC, Chee MS, et al. Detection of heterozygous mutations in BRCA1 using high density oligonucleotide arrays and two-colour fluorescence analysis[*J*]. *Nat Genet*, 1996, 14(4): 441-7.

[7] 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 USA*, 1999, 96:7382-7.

[8] Yershov G, Barsky V, Belgovskiy A, et al. DNA analysis and diagnostics on oligonucleotide microchips[*J*]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93: 4913-18.

[9] Drobyshev A, Mologina N, Shik V, et al. Sequence analysis by hybridization with oligonucleotide microchip: identification of β -thalassemia mutation[*J*]. *Gene*, 1997, 188: 45-52.

[10] Ramsay G. DNA chips: state-of-the art[*J*]. *Nat Biotechnol*, 1998, 16(1): 40-4.

[11] 项春生, Chen Y, Yuan J, et al. cDNA芯片技术和病毒感染的基因表达[*J*]. *科学通报*, 1999, 44(5): 449-54.

[12] Lipshutz RJ, Morris D, Chee M, et al. Using oligonucleotide probe arrays to access genetic diversity[*J*]. *Biotechniques*, 1996, 19: 442-7.

[13] Livache T, Fouque B, Roget A, et al. Polypyrrole DNA chip on a silicon device: example of hepatitis C virus genotyping[*J*]. *Anal Biochem*, 1998, 255: 188-94.

[14] Heller RA, Schena M, Chai A, et al. Discovery and analysis of inflammatory disease-related genes using cDNA microarrays[*J*]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94: 2150-5.

[15] Wang T, Hophkins D, Schmidt, et al. Identification of genes differentially over-expressed in lung squamous cell carcinoma using combination of cDNA subtraction and microarray analysis[*J*]. *Oncogene*, 2000, 1519-28.

回结果列表