

# 基因芯片技术研究进展

王洪水, 侯相山 (东营职业学院, 山东东营 257091)

**摘要** 主要就基因芯片的概念、技术原理、分类、主要技术流程、应用及其存在的问题和应用前景作了综述。

**关键词** 基因芯片; 基因组研究; 基因诊断; 技术流程

中图分类号 Q78 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2007)08-02241-03

Research Progress of Gene Chip Technology

WANG Hong-shui et al (Dongying Vocational College, Dongying, Shandong 257091)

**Abstract** Gene chip was a newly developed technology in recent years. Light-directed in situ oligonucleotide synthesis or microarray printing technique was adopted in its basic process in order to generate arrays of large amounts of probes on the surface of small substrates such as silicon chips, which was hybridized to the amplified and labeled samples. After scanning and analyzing, the signals provided hereditary information on the samples. This technology could not only be used to qualitative analysis or quantitative analysis of hereditary information, but also could be used to genome study and gene diagnosis. Concept, technique mechanism, category, main technique process, applications, existent problems and its application foreground of gene chip were summarized in this review.

**Key words** Gene chip; Genome research; Gene diagnose; Technique process

20世纪80年代初,人们根据计算机半导体芯片制作技术将晶体管集成在芯片上,并提出将寡核苷酸分子也集成在芯片上的设想<sup>[1]</sup>。Bains等将短的DNA片段固定在支持物上,通过杂交进行序列分析,做了有益的尝试<sup>[2]</sup>。从Schena 1995年在《Nature》上首次发表基因芯片研究的论文以来,基因芯片技术及其应用发生了巨大的变化。美国的Stephen Fodor等把这一设想变成了现实,他们在硅芯片表面涂布一种光敏材料,采用光蚀刻技术,在光引导下原位合成多肽链<sup>[3]</sup>,受此启发,改进技术后合成了DNA阵列,1996年底,由他们研制的第一块DNA芯片诞生了<sup>[4]</sup>。基因芯片技术的基本过程是采用寡核苷酸原位合成或显微打印手段,将大量探针片段有序地固定于支持物(如硅芯片)的表面,然后与扩增、标记的生物样品杂交,通过对杂交信号的检测分析,即可得出样品的遗传信息。该技术不仅可以对遗传信息进行定性、定量分析,而且还扩展到基因组研究和基因诊断等方面。为此,笔者对基因芯片技术的研究进展进行了综述。

## 1 基因芯片的概念

基因芯片的概念来源于计算机芯片,又叫DNA芯片或寡核苷酸芯片,最早是由Southern E.在1989年提出的<sup>[5]</sup>,因芯片有许多同义词,如DNA芯片(DNA chip)、DNA微集芯片(DNA microchip)、DNA阵列(DNA array)、DNA微集阵列(DNA microarray),且DNA是一种寡核苷酸,所以也称为寡核苷酸阵列或芯片(oligonucleotide array)。基因芯片是指采用寡核苷酸原位合成(in situ synthesis)或显微打印手段,将数以万计的DNA探针片段有序地固定于支持物表面上,产生二维DNA探针阵列,然后与标记的样品进行杂交,通过检测杂交信号来实现对生物样品的快速、并行、高效地检测或诊断。由于常用硅芯片作为固相支持物,且在制备过程中运用了计算机芯片的制备技术,所以称为DNA芯片技术<sup>[6]</sup>。

## 2 基因芯片技术原理

基因芯片技术是建立在基因探针和杂交测序技术上的一种高效快速的核酸序列分析手段。它将大量的基因探针

有序地、高密度地排列在一块1~2 cm<sup>2</sup>大小的玻片或胶片上,形成可与目的分子相互作用的固相表面,然后与标记的样品进行杂交,通过检测杂交信号的强度及分布进行分析。它与其他分析基因表达谱的技术,如RNA印迹(Northern blot)、cDNA文库序列测定、基因表达序列分析等的不同之处在于,基因芯片可以在一次试验中同时平行分析成千上万个基因<sup>[7]</sup>。

## 3 基因芯片技术的分类

基因芯片技术的分类方法很多,最常用的是按载体上所点探针的长度分为2种<sup>[8]</sup>:一是cDNA芯片,由Schena建立,是将特定的cDNA经PCR扩增后借助机械手直接点到基片上;二是寡核苷酸芯片,由Fodor首先报道,用照相平板印刷术和固相合成技术在基片上生成寡核苷酸,分为长寡核苷酸芯片和短寡核苷酸芯片,与cDNA芯片制作的一个主要不同点是多一步转录获得cRNA的过程。目前,关于不同基因芯片技术的灵敏度和特异性仍存在争议。起初,人们认为长寡核苷酸芯片和cDNA芯片有更高的特异性和灵敏度,现在看来,短寡核苷酸芯片同样有很高地特异性,因为每一个基因代表11~20个寡核苷酸<sup>[9]</sup>。

## 4 基因芯片主要技术流程

**4.1 芯片的设计与制备** 基因芯片的设计实际上是指芯片上核酸探针序列的选择以及排布,设计方法取决于其应用目的,如表达型芯片的目的是在杂交试验中对多个不同状态样品(不同组织、不同发育阶段、不同药物刺激)中数千基因的表达差异进行定量检测,探针序列一般来自于已知基因的cDNA或EST库,设计时序列的特异性应放在首要位置,以保证与待测目的基因的特异结合。对于同一目的基因可设计多个序列不重复的探针,使最终的数据更为可靠。

芯片制备方法主要包括两种类型<sup>[10]</sup>:①点样法。首先是探针库的制备,根据基因芯片的分析目标从相关的基因数据库中选取特异的序列进行PCR扩增或直接人工合成寡核苷酸序列;然后通过计算机控制的三坐标工作平台用特殊的针头和微喷头分别把不同的探针溶液逐点分配在玻璃、尼龙以及其他固相基片表面的不同位点上,通过物理和

**作者简介** 王洪水(1967-),男,山东东营人,副教授,从事畜牧兽医教学与科研工作。

**收稿日期** 2006-12-05

化学的方法使之固定。该方法各环节均较成熟,且灵活性大,适合于研究单位根据需要自行制备点阵规模适中的基因芯片。②原位合成法。该法是在玻璃等硬质表面上直接合成寡核苷酸探针阵列。目前应用的主要有光去保护并行合成法,压电打印合成法等,其关键是高空间分辨率的模板定位技术和高合成产率的 DNA 化学合成技术,适合制作大规模 DNA 探针芯片,实现高密度芯片的标准化和规模化生产。

**4.2 靶基因的标记** 靶基因的制备和标记是基因芯片实验流程的一个重要环节,靶基因在与芯片探针结合杂交之前必须进行分离、扩增及标记。标记方法根据样品来源、芯片类型和研究目的的不同而有所差异。通常是在待测样品的 PCR 扩增、逆转录或体外转录过程中实现对靶基因的标记。对于检测细胞内 RNA 表达水平的芯片,一般需要从细胞和组织中提取 RNA 进行逆转录,并加入偶联有标记物的 dNTP,从而完成对靶基因的标记过程。对于阵列密度较小的芯片可以用同位素,所需仪器均为实验室常规使用设备,易于开展相关工作,但是在信号检测时,一些杂交信号强的点阵容易产生光晕,干扰周围信号的分析。高密度芯片的分析一般采用荧光素标记靶基因,通过适当内参的设置及对荧光信号强度的标化可对细胞内 mRNA 的表达进行定量检测<sup>[10]</sup>。近年来运用的多色荧光标记技术可更直观地比较不同来源样品基因表达的差异,即把不同来源的靶基因用不同激发波长的荧光素标记,并使它们同时与基因芯片杂交,通过比较芯片上不同波长荧光的分布图获得不同样品间差异表达基因的图谱,常用的双色荧光试剂有 Cy3-dNTP 和 Cy5-dNTP<sup>[12]</sup>。多态性和突变检测型基因芯片采用多色荧光技术,可以大大提高芯片的准确性和检测范围,例如用不同的荧光素分别标记靶序列及单碱基缺失错配的参考序列,使它们同时与芯片杂交,通过对不同荧光强弱的比较得出靶序列中碱基缺失错配的信息。

**4.3 芯片杂交与杂交信号检测** 基因芯片与靶基因的杂交过程与一般的分子杂交过程基本相同,杂交反应的条件要根据探针的长度、GC 碱基含量及芯片的类型来优化,如用于基因表达检测,杂交的严格性较低,而用于突变检测的芯片的杂交温度高,杂交时间短,因此条件相对严格。如果是用同位素标记靶基因,其后的信号检测即是放射自显影,若用荧光标记,则需要一套荧光扫描及分析系统,对相应探针阵列上的荧光强度进行分析比较,从而得到待测样品的相应信息。由于基因芯片获取的信息量大,所以对基因芯片杂交数据的分析、处理、查询、比较等需要一个标准的数据格式。目前,一个大型的基因芯片的数据库正在构建中,若能将各实验室获得的基因芯片的结果集中起来,那么今后对数据的交流及结果的评估与分析将非常有利<sup>[13]</sup>。

## 5 基因芯片的应用

### 5.1 在生命科学研究中的应用

**5.1.1 在绘制基因缺失图谱和基因表达分析中的应用。** DNA 微阵列芯片经首次报道后,被用于不同生物体基因表达方式的研究中,利用 DNA 微阵列技术对基因表达的研究可以说是一场技术革命<sup>[14]</sup>。绘制 B 型流感病毒基因组图谱,用荧光标记 PCR 扩增得到的单链 DNA 产物,与预先设计

好的所有节段的高度同源 B 型流感病毒株特异的寡核苷酸探针进行杂交,发现微阵列杂交具有高度重复性,通过绘制基因图谱同时可以在混合的 B 型流感病毒株中区分各个基因节段,还可以确定疫苗候选株,这对研制基因疫苗具有重大意义。

**5.1.2 在基因突变检测中的应用。**由于一些病毒性疾病,如流感病毒因其外部血凝素和神经氨酸糖蛋白抗原极易发生抗原漂移和抗原转换,以至于新的流感病毒亚型不断产生,这就给流感病毒的诊断及治疗带来很大的困难<sup>[15]</sup>。选择固定在硅片微通道的寡核苷酸探针,用探针来识别流感病毒各亚型血凝素基因和神经氨酸酶基因;将多重或随机反转录 PCR 产生的生物相关扩增子与流感病毒芯片的微阵列寡核苷酸杂交,然后用过氧化物辣根酶染色,并用酶作用物化学发光基质成像;最后用芯片分析程序,对从吸液管到基因弹簧筒的样品进行实时分析,整个过程在 5 h 内完成。根据杂交结果分析病毒的变异基因,进而确定抗原成分的变异情况,从而可以鉴定病毒亚型<sup>[16]</sup>。用带有不同结构和特性的 Muts 重组融合蛋白的 DNA 芯片检测 DNA 突变体。

**5.1.3 在病毒病原体的检测和基因分型中的应用。**病毒病原体的检测在生物学、医学和农业领域的应用是很重要的,因为现有的技术使大量的病毒谱检测受到严重的限制。所以建立了一种基因芯片技术对病毒的流行进行高度监测,这样有利于在一个特定的生物学环境中进行全面地、正确地分析病毒的流行。这种方法为长寡核苷酸 DNA 微阵列,它能有效监测和鉴定很多不同的病毒,其对流感病毒型和亚型的鉴定已有报道<sup>[17]</sup>。流感病毒抗原容易发生遗传变异,所以每年都会周期性发生一次,引起中等或严重的呼吸道疾病,造成了重大的经济损失。最近,在基因芯片中又建立了一种新的 DNA 芯片,即 DNA 流动芯片(Flow-Thru Chip, FTC)来鉴定流感病毒型和亚型。它是三维微孔道生物芯片,与以往的二维生物芯片相比具有以下优点:①FTC 10 μm 微孔道中,通过微孔道建立的微环境可以提高杂交反应效率,同时靶标和探针在芯片基质上可以快速分散,且在几秒钟内可自动按类排列好。②FTC 的结构具有可渗透性,因此 FTC 可以以相似的方式包埋流体系统中,这可使 FTC 弹簧筒结构在一个开放的系统中随意地接受要完成实验所需的所有试剂。因此,应用基因芯片技术对流感病毒进行快速检测、分型及亚型,在临床和流行病学中具有重要的应用价值。

**5.1.4 在细菌检测中的应用。**虽然理论上 DNA 微阵列在细菌鉴定方面有十分广泛的应用前景,但是目前的实际应用还非常有限,主要原因:①监测对象所处的遗传背景比较复杂,而且还常常包含许多未知因素;②DNA 微阵列杂交存在一定的假阳性信号<sup>[18]</sup>,所以有必要优化杂交技术和条件,解决目前杂交种存在的问题。

**5.1.5 在生命科学研究中其他方面的应用。**应用微生物芯片监测电化学诱导产生的有机突变物质;依据微流体学原理,利用荧光原位杂交和基因芯片对海洋细菌群的分析;在细胞信号转导和基因表达调控,生物发育和分化,生物衰老和凋亡,生物体内生理和生化研究,寻找新基因等方面都得到了广泛应用<sup>[19]</sup>。

## 5.2 在医学研究中的应用

5.2.1 在临床诊断与检测中的应用。由于基因芯片所需样品和剂量极小,而且快速省时、无污染、诊断结果精确又适合于自动化操作,很适合疾病诊断与检测。目前,已应用寡核苷酸微阵列诊断细菌性急性上呼吸道感染、病毒性疾病、炎症、癌症、神经系统疾病等方面的诊断与检测<sup>[20]</sup>。

5.2.2 在寻找药物作用靶位点中的应用。所谓“寻找药物作用靶位点”是指在基因组范围内对 DNA 进行测序和基因表达分析,从蛋白质或核酸中找出最佳的药物作用靶点,进行药物筛选<sup>[21]</sup>。

5.2.3 在医学研究中其他方面的应用。基因芯片在医学研究中其他方面已有广泛地应用,如遗传病的遗传机制研究及诊断、病原体及分型诊断、耐药性检测、药物筛选、各类实质性器官移植和骨髓移植中受体的配型、自身免疫病、毒理学研究等方面<sup>[22]</sup>。目前基因芯片一次能检测多种传染病和遗传病,将已知的多种传染病和遗传病基因点于基因芯片上,就可以对一个标本进行多种疾病的检测,并且具有高度灵敏性、特异性、结果快速省时等优点。

## 6 基因芯片存在的问题及其应用前景

随着人类基因组计划的进展,人类已进入了这种大规模、大通量的基因研究时代<sup>[23]</sup>。目前一些传统的血清学诊断技术和分子生物学检测技术,如以抗体为基础的相关方法和技术等一些常规的诊断工作和 PCR 诊断技术虽然有一定的实用性和优越性,但其实际应用还存在一定的局限性,还必须借助其他一些如 DNA 测序、杂交和荧光 PCR 的辅助方法作进一步证明,使得实验方法比较繁琐,既费时又费力。因此,今后的研究不仅需要现有的技术支持,还更需要有技术革新。而基因芯片技术正是在这一背景下诞生的,基因芯片作为一种新兴的技术,在目前的科研中已显示出巨大的作用及应用潜力<sup>[24]</sup>。

基因芯片由于其巨大的分析能力、极少的样品用量、简单、快速、高效的使用方式,它的成熟和应用必将为疾病诊断和治疗、新药开发、分子生物学、军事、农业、司法鉴定、食品卫生和环境监测等领域带来一场革命,同时也为人类提供了能够对个体生物信息进行高速、并行采集和分析的强有力的技术手段<sup>[25]</sup>。基因芯片技术还只处在研发阶段,并没有转化为商品进行大量地使用,是因为该技术仍存在许多问题。其最主要的问题是成本过高,其次是芯片的标准化问题,即如何将不同实验室、不同操作人员做出的结果进行统一化、标准化的问题,目前认为,这些误差可以通过传统的蛋白质分析技术如酶谱、双向电泳、免疫组织化学等方法进行验证<sup>[26]</sup>。同时,如何提高芯片的特异性、简化样品制备和标记操作程序,增加信号检测的灵敏度和消除芯片背景对于结果分析的影响等都是亟待解决的问题。

随着生命科学和信息学的发展,基因芯片技术也会日趋完善,并广泛应用于科研和日常生活中。从生物医学纳米技术 2000 年会议上获悉,未来治疗威胁生命的疾病如癌症、心脏病将离不开一种新型的微芯片即生物微电子机械装置(bioMEMS),它被移植到体内,起到向有关器官输送药物和新细胞的作用<sup>[27]</sup>。美国已研制出一种可植入人体的米粒大的生物芯片,上面记录着个人的身份病史等信息,芯片

可以对外发射无线信号,附近的仪器对其进行扫描时,芯片就会在仪器上显示数据,这将是疾病诊断史上的一次重大革命。在其他领域,生物芯片也有广阔的应用前景:通过基因芯片可以逐个筛选生物基因,找出最优良的品种,从而提高农作物单产、品质及抗旱、抗病虫害的能力,还可检测出市场出售的肉、菜、瓜、果是否残留农药及细菌超标等<sup>[28]</sup>;在育种工作中,利用基因芯片筛选出携带优良基因的个体,能使育种工作变得高效、简单。生物芯片在外太空探索、国防方面也很有发展前途。相信随着生物学、信息学等学科的发展,生物芯片必将产业化,且在人类的生活中占据越来越重要的位置。

总之,核酸芯片技术与基因组和后基因组时代的需求相适应,其以本身具有的革命性的优势,作为一种理想的强有力的分析工具,必将在生命科学、医学及其他相关科学中扮演重要角色。

## 参考文献

- [1] MARSHALL A, HODGSON J. DNA chips: An array of possibilities [J]. *Nat Biotechnol*, 1998, 16(1): 27-31.
- [2] CHANG J C, HILSENBECK S G, FUQUA S A. Genomic approaches in the management and treatment of breast cancer [J]. *Br J Cancer*, 2005, 92(4): 618-624.
- [3] SUBRAMANYA R D, LUCCHESI G, KANDUC D, et al. Clinical applications of DNA microarray analysis [J]. *J Exp Ther Oncol*, 2003, 3(6): 297-304.
- [4] WANG Y, KLIJN J G, ZHANG Y, et al. Gene expression profiles to predict distant metastasis of lymph-node-negative primary breast cancer [J]. *Lancet*, 2005, 365(9460): 671-679.
- [5] ARANGO D, WILSON A J, SHI Q, et al. Molecular mechanisms of action and prediction of response to oxaliplatin in colorectal cancer cells [J]. *Br J Cancer*, 2004, 91(11): 1931-1946.
- [6] 白丽荣. 生物芯片技术及其应用概述 [J]. *生物学教学*, 2003, 28(12): 7-8.
- [7] ROBERTS S S, MORI M, PATTEE P, et al. GABAergic system gene expression predicts clinical outcome in patients with neuroblastoma [J]. *J Clin Oncol*, 2004, 22(20): 4127-4134.
- [8] 王宝琴, 魏战勇. 生物芯片及其在疾病诊断中的应用 [J]. *中国兽医科技*, 2003, 33(5): 33-35.
- [9] GHADIMI B M, GRADE M, DIFLIPPANTONIO M J, et al. Effectiveness of gene expression profiling for response prediction of rectal adenocarcinomas to preoperative chemoradiotherapy [J]. *J Clin Oncol*, 2005, 23(9): 1826-1838.
- [10] MICHIELS S, KOSCIELNY S, HILL C. Prediction of cancer outcome with microarrays: A multiple random validation strategy [J]. *Lancet*, 2005, 365(9458): 488-492.
- [11] 章军建. 基因芯片在医学研究中的应用 [J]. *国外医学遗传学分册*, 2002, 25(1): 7-10.
- [12] 许树成. 生物芯片技术研究的现状与进展 [J]. *阜阳师范学院学报: 自然科学版*, 2003, 20(3): 43-45.
- [13] 李凌. 芯片技术研究进展 [J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2000, 9(2): 33-35.
- [14] 吴浩扬. 生物芯片技术 [J]. *科学*, 2002, 54(3): 12-16.
- [15] 申爱英. 生物芯片研究现状及进展 [J]. *生物学杂志*, 2002, 9(6): 45-48.
- [16] 刘春龙, 李忠秋, 孙海霞, 等. 生物芯片技术应用及其趋势展望 [J]. *农机化研究*, 2003, 10(4): 13-15.
- [17] 薛晓红, 刘胜. 基因芯片及其在中医药研究中的应用思考 [J]. *中国医药学报*, 2003, 8(9): 556-557.
- [18] 王全军. 芯片技术在药物毒理学中的应用 [J]. *国外医学药学分册*, 2004, 3(2): 110-113.
- [19] 刘春龙, 李忠秋, 孙海霞, 等. 生物芯片技术应用及其趋势展望 [J]. *农机化研究*, 2003, 10(4): 13-15.
- [20] 王全军. 芯片技术在药物毒理学中的应用 [J]. *国外医学药学分册*, 2004, 3(2): 110-113.

(上接第 2243 页)

[21] 林炳承.微全分析系统中的微分离学极其在生命科学中的应用[J].现代科学仪器,2001,4(1):21-24.

[22] ZHANG X,FENG J,HENG Y,et al.Characterization of differentially expressed gene sinovarian cancer by DNA microarrays[J].Int J Gynecol Cancer,2005,15(1):50-57.

[23] SONG,TANG J W,WANG B,et al.Identify lymphatic metastasis-associated genes in mouse hepatocarcinoma cell lines using gene chip[J].World J Gastroenterol,2005,1(10):463-472.

[24] 东亭,自柏,军志.生物芯片产业化发展现状及存在问题[J].国生物

制品学杂志,2004,17(5):327.

[25] 阿茹娜,吴岩.生物芯片技术及其应用进展[J].内蒙古医学院学报,2004,26(3):230-231.

[26] 薛晓红,刘胜.基因芯片及其在中医药研究中的应用思考[J].中国医药学报,2003,8(9):556-557.

[27] 常胜合,舒海燕,李滨,等.生物芯片技术研究进展[J].生物信息学,2004,10(3):31-34.

[28] 李克勤,宫奇琳,徐焕春.生物芯片技术及应用[J].生物医学工程研究,2004,23(10):59-60.