

邱秀文, 吴小芹, 黄麟, 等. 基因芯片技术在生物研究中的应用进展[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(5): 60–62.

基因芯片技术在生物研究中的应用进展

邱秀文, 吴小芹, 黄麟, 叶建仁

(南京林业大学森林资源与环境学院/江苏省有害生物入侵预防与控制重点实验室, 江苏南京 210037)

摘要: 基因芯片是生物科学领域的一项高新技术, 在基因组测序、基因表达、发现新基因、基因芯片绘制图谱及病原检测等方面得到了广泛应用。本研究介绍了基因芯片技术在生物研究中的研究进展, 并对未来研究方向进行展望。

关键词: 基因芯片; DNA 微阵列; DNA 测序

中图分类号: Q789 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002–1302(2014)05–0060–03

基因芯片技术是将大量已知序列的核酸片段有规律地固定在玻璃片、硅片、尼龙膜等各种固体支持物上形成分子阵列, 然后与用荧光标记过的核酸样品进行杂交, 当样品与基因芯片上对应位置的核酸探针发生互补配对时, 可以通过荧光强度来确定探针位置, 获得与探针互补的核酸序列, 从而获知样品信息。高通量是基因芯片的最大优点, 在基因芯片出现之前, 研究基因表达变化的手段包括原位杂交技术、Northern Blot 技术, 这 2 种技术的缺点是低通量, 很难在有限的试验次数内检测众多基因的变化规律。由于基因芯片技术自动化程度高、效率也高, 因此, 在研究基因组测序、基因表达、发现新基因、基因芯片绘制图谱及病原检测等方面都得到了广泛的运用。本研究介绍基因芯片技术在生物研究中的研究进展, 旨在为推广基因芯片技术提供依据。

1 基因芯片概述

基因芯片 (gene chip) 别称 DNA 芯片、DNA 微阵列、寡核苷酸微阵列, 是生物芯片的一种^[1]。基因芯片技术最早出现在美国, 具有快速、高效、连续、准确等特点^[2]。该技术是以基因探针、核酸杂交技术为基础的核酸序列分析方法^[3]。基因芯片分类方法多样, 依据载体基质不同, 分为有机基因芯片、无机基因芯片; 根据使用功能的不同, 分为表达谱芯片、测序芯片、基因差异表达芯片^[2]。

1.1 基因芯片原理

基因芯片的原理是将特定的已知核酸序列的 cDNA 片段或寡核苷酸片段有规律地固定在固相支撑物 (硅片、陶瓷或玻璃片等) 表面作为基因探针, 根据碱基互补配对原则, 与用荧光或放射性同位素标记过的 DNA 或 RNA 样品进行杂交, 通过检测系统的杂交信号进行分析, 可以高效快速地检测靶基因的存在量及其变异性^[4]。

1.2 基因芯片制备

基因芯片的制备方法有 2 种: 一种是原位合成法, 是指将数量众多的电极固定在固相支持物上, 电极上具有生物亲和性的多孔空间, 用于合成 DNA 片段所需的 4 种单核苷酸可以进入电极上的多孔空间, 在电极上合成 DNA 片段, 原位合成法又可分为光导原位合成法与原位喷印合成法; 另一种是直接点样法, 是指将人工合成的寡核苷酸片段直接点在固相支持物上。原位合成法一般用于制备基因芯片, 直接点样法既可以用于制备基因芯片也可以用于制备蛋白质芯片^[5]。

1.2.1 光导原位合成法 光导原位合成法是由美国昂飞公司研发的, 利用光敏保护基将碱基单体的 5' 端羟基保护起来, 之后固相支持物上的光敏保护基与 1 个核苷酸单体连接, 如此循环直到合成完成。光导原位合成法制备探针之间的距离为 5~10 μm , 1 cm^2 可以容纳 106 个探针, 这种方法的优点是步骤简单、合成速度快且合成探针量大, 缺点是合成的探针长度不是很长^[6–9]。

1.2.2 原位喷印合成法 喷印合成法原理与传统的 DNA 固相合成原理一致, 形式类似于喷墨打印, 有多个喷印头及墨盒, 墨盒里面装有 4 种碱基的液体。喷印头可以在整个载体上任意移动, 根据载体上不同位点探针的序列要求将特定的碱基喷印在特定的位置。

1.2.3 直接点样法 目前很多公司都是使用直接点样法生产基因芯片, 这种方法可以根据使用者的要求生产出符合目的的相应芯片。直接点样是将合成好的探针、cDNA、基因组 DNA 片段通过人工或高速点样器直接点在固相支持物上。根据点样方式不同可将直接点样法分为接触点样、非接触点样^[10]。对于直接点样法来说, 点样器的好坏直接决定了基因芯片的探针密度及结合强度, 点样装置质量的衡量指标有点样速度、点样稳定性、点样密度等。

2 基因芯片在生物研究中的应用

2.1 基因表达分析

通过基因芯片检测生物不同发育阶段或病原体不同致病阶段的基因表达情况, 可以研究基因的功能及病原的致病机理。Girke 等运用基因芯片对拟南芥种子发育过程进行了研究, 发现通过基因芯片筛选到的拟南芥 2 600 个基因中, 有 25% 的基因在种子中的表达量是叶子及根的 2 倍^[11]。沙门氏菌对家禽危害很大, 可以引起家禽沙门氏菌病。Luan 等制备了包含有 13 319 个探针的鸡基因芯片, 在 2 周龄小鸡感染

收稿日期: 2013–09–25

基金项目: 国家“973”计划 (编号: 2009CB119205); 国家林业局推广项目 (编号: 2011–51)。

作者简介: 邱秀文 (1984—), 男, 江西南康人, 博士, 主要从事生物信息学研究。E-mail: qiuixiwen3@163.com。

通信作者: 叶建仁, 教授, 主要从事森林病理研究。Tel: (025) 85427305; E-mail: jrye@njfu.com.cn。

沙门氏病菌前后,检测到了 588 个差异表达基因,其中 276 个是已知功能基因,并且通过实时荧光定量 PCR 鉴定验证了 4 个基因^[12]。Zhou 等制备了水稻基因组表达芯片,经过低能 N⁺ 光束处理后,每 30 个与组蛋白相关的基因中有 1 个基因表达上调,每 38 个溴结构域蛋白基因中有 1 个基因表达上调,1 个基因表达下调。Revel 等运用基因芯片对莱姆病原菌在不同培养条件下基因表达情况进行了研究,发现把莱姆病原菌放在新环境下培养时,其基因表达情况会在很短的时间内发生瞬变,并与新环境在很大程度上缓和,以适应新环境,一旦适应了新环境,莱姆病菌的基因表达情况趋于稳定不变^[13]。病原微生物可以通过自身基因表达变化很快适应新环境,这也是病原菌能快速产生抗药性的重要原因之一。

2.2 DNA 测序

DNA 测序是指测定 DNA 分子中的核苷酸排列顺序。基因芯片技术早期应用于基因结构及序列分析。利用基因芯片进行 DNA 测序过程如下:将包含已知核酸探针的 DNA 芯片与待测的 DNA 样品进行分子杂交,在 DNA 芯片表面可检测到荧光信号,通过分析形成的图谱获知样品序列^[14]。对已知序列进行重测序是 DNA 芯片的主要应用之一,重测序指的是某种群或物种完成基因组测序后,对个体或群体的差异性分析,需要进行再测序。由于序列已知,利用基因芯片技术开展重测序的效率大为提高^[15]。DNA 芯片测序具有快速、高效等优点,应用前景广阔,主要测序方法有 SBH 技术 (sequencing by hybridization)、CSH 技术 (con-tiguous stacking hybridization)。CSH 技术测序的长度大于 SBH 测序的长度^[16]。目前基因表达谱芯片技术在检测健康组织以及病害组织基因表达差异上得到了广泛应用,为揭示病害的发生机制以及寻找快速诊断防治方法提供了依据。在测定植物与病原物基因组突变等方面,基因芯片是强有力的工具^[17-18]。参照已知基因序列,在载体上合成大量寡核苷酸探针,与待测样品进行杂交,两者匹配程度越高,杂交信号越强。基因芯片技术测序的准确率较高,国外学者利用包含大量探针的微列阵对人类线粒体基因组的序列进行测定,准确率达 99%^[19]。Hacia 等利用近 5 万个核苷酸阵列对人、黑猩猩基因序列进行测定,结果表明,二者同源性高,即进化相似性强^[20]。

2.3 发现新基因

基因芯片技术为发现新基因提供了思路,基因组序列的发展为后基因组研究分析未知功能基因提供了参考。传统的分子生物学方法具有无法明确解释生物生理过程中多基因之间的相互作用、序列信息不全、特异性不高等缺点^[21-22]。基因芯片技术克服了传统方法的不足,能获得大量基因表达模式,分析其调控过程,并且从数以万计的基因中找出差异表达基因^[23-24]。利用基因芯片技术发现新基因在医学上有极其重要的意义,尤其是致癌基因的发现。Yao 等采用基因芯片技术,设计了乳腺癌比较基因组杂交阵列,分析了与扩增区域有关的每个基因表达水平,发现 2 个致癌新基因,分别为 *H2AFJ*、*EPS8*^[25]。Wang 等利用基因芯片筛选肿瘤细胞中耐药性相关基因,通过对差异表达基因进行分析鉴定,发现了 2 个耐药新基因,分别为 *c-Yes*、*c-Flip*^[26]。Heller 等利用基因芯片研究了肠炎、类风湿关节炎 (炎症性) 组织基因表达差异性,还发现了与炎症有关的基因 *IL-3*、*Gro-A* 等^[27]。利用

基因芯片技术,Misson 等研究了拟南芥植物缺磷条件下的基因表达谱变化,发现了对磷缺乏起诱导、抑制作用的新基因,这为植物养分管理开拓了新的研究思路。Madsen 等研究了温度对肺炎球菌基因表达差异的影响,用基因芯片技术设计微列阵,分析其差异表达基因,发现了 91 个未知功能新基因^[28]。研究人员利用基因芯片技术,筛选微生物诱导后的成年果蝇差异表达基因,发现数百个未知功能的新基因。目前,松材线虫已扩散到我国南方多个省区,威胁我国许多重要旅游地区的生态安全,被认为是一种毁灭性传染病害^[29-30]。目前松材线虫全基因组测序已经完成,利用基因芯片处理产生的海量数据,研究松材线虫致病基因,对松材线虫防治具有重要意义。

2.4 病原检测

DNA 芯片技术作为一种强有力的检测工具,在临床诊断、环境检测、食品安全检测等领域得到了广泛运用^[31-32]。杨朋欣等通过弓形虫、旋毛虫的特异序列设计出特异性探针,建立了弓形虫、旋毛虫的液相基因芯片检测方法^[33]。周钧等利用日本血吸虫基因芯片对江西省、湖南省的钉螺进行检测,结果显示,江西省、湖南省感染性钉螺检出率为 100%^[34]。张锦海等根据疟原虫高度保守的基因片段制备了疟原虫诊断、分型基因芯片,能快速诊断出疟原虫及其分型,对疟疾的防治具有重要意义^[35]。Tares 等用同源 DNA 分别开发了松材线虫特异性探针,可以将特异性探针固定到固相载体 (如硅片、玻璃、塑料、尼龙膜等) 上制成基因芯片,用于快速、精确检测松材线虫^[36]。

2.5 绘制图谱

采用基因芯片探针阵列与相应的生物信息方法可以进行基因文库作图。张新建等用基因芯片技术研究了水稻白叶枯病菌的侵染过程,并分析其基因表达谱,发现侵染过程中有 5 个基因发生了明显变化^[37]。赵宝存等采用基因芯片技术获得小麦基因的差异表达图谱,并分析了在不同盐胁迫时间下小麦根部基因表达的变化,包括盐诱导、盐抑制表达基因^[38]。

3 展望

基因芯片技术具有快速、高效、高通量等优点,已被广泛应用于医疗、农林、畜牧、食品以及环境检测等诸多领域。但基因芯片技术仍然存在一些不足,主要表现在技术与设备方面。基因芯片技术在 DNA 测序、基因表达分析、发现新基因、绘制图谱及病原检测等方面有巨大的应用价值。

参考文献:

- [1] 唐晨,田晓玲,胡乐琴,等. 基因芯片在海洋微藻研究中的应用前景[J]. 生物技术通报,2010(11):72-75,86.
- [2] 孙兵,闫彩霞,张廷婷,等. 基因芯片技术在植物基因克隆中的应用研究进展[J]. 基因组学与应用生物学,2009,28(1):153-158.
- [3] 黄峰,何文锦,代容春,等. 利用基因芯片筛选甘蔗成熟期叶片差异表达候选基因[J]. 亚热带农业研究,2012,8(1):46-50.
- [4] 付建,黄胜斌,陈磊,等. 基因芯片技术在细菌学研究中的应用进展[J]. 湖北农业科学,2009,48(7):1765-1768.
- [5] 李瑶,陈菊祥,裘敏燕,等. 基因芯片的制备研究[J]. 第二军医大学学报,2000,21(9):812-814,902.

- [6] Lipshutz R J, Fodor S P, Gingeras T R, et al. High density synthetic oligonucleotide arrays[J]. Nat Gene, 1999, 21(Suppl 1): 20–24.
- [7] Duggan D J, Bittner M, Chen Y, et al. Expression profiling using cDNA microarrays[J]. Nature Genetics, 1999, 21(Suppl 1): 10–14.
- [8] Hacia J G, Collins F S. Mutational analysis using oligonucleotide microarrays[J]. Journal of Medical Genetics, 1999, 36(10): 730–736.
- [9] Khan J, Bittner M L, Chen Y, et al. DNA microarray technology: the anticipated impact on the study of human disease[J]. Biochim Biophys Acta, 1999, 1423(2): 17–28.
- [10] 田新, 张国庆. 基因芯片技术应用和展望[J]. 齐鲁医学检验, 2005, 16(1): 33–35.
- [11] Girke T, Todd J, Ruuska S, et al. Microarray analysis of developing *Arabidopsis* seeds[J]. Plant Physiology, 2000, 124(4): 1570–1581.
- [12] Luan D Q, Chang G B, Sheng Z W, et al. Analysis of gene expression responses to a *Salmonella* infection in Rugao Chicken intestine using Gene Chips[J]. Journal of Animal Science, 2012, 25(2): 278–285.
- [13] Revel A T, Talaat A M, Norgard M V. DNA microarray analysis of differential gene expression in *Borrelia burgdorferi*, the Lyme disease spirochete[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2002, 99(3): 1562–1567.
- [14] 张品品, 王恺. DNA 芯片技术及其应用[J]. 黄河水利职业技术学院学报, 2011, 23(1): 52–54.
- [15] Rehm B H. Bioinformatic tools for DNA/protein sequence analysis functional assignment of genes and protein classification[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2001, 57(5/6): 579–592.
- [16] 周卫东, 沈君. 基因芯片技术及其应用[J]. 伊犁师范学院学报: 自然科学版, 2007(2): 24–27.
- [17] 魏松红, 刘志恒, 纪明山, 等. 基因芯片技术在植物病害中的应用[J]. 河南农业科学, 2008(3): 20–22.
- [18] 李森, 檀根甲, 周冬生, 等. 基因芯片技术及其在植物病害研究中的应用[J]. 植物保护, 2003, 29(1): 5–9.
- [19] 韩莹, 桑锋, 鲁亚平. 基因芯片技术及其应用研究[J]. 生物技术通报, 2006(4): 12–15.
- [20] Hacia J G, Edgemon K, Sun B. Evolutionary sequence comparisons using high-density oligonucleotide arrays[J]. Nature Genetics, 1998, 18(3): 155–158.
- [21] 刘雷山, 金小宝, 朱家勇. 基因芯片技术在新基因发现中的应用[J]. 生物技术通讯, 2007, 18(2): 325–328.
- [22] Nie D, Xiang Y. Molecular cloning and characterization of a novel human testis-specific gene by use of digital differential display[J]. Journal of Genetics, 2006, 85(1): 57–62.
- [23] Lievens S, Goormachtig S, Holsters M. A critical evaluation of differential display as a tool to identify genes involved in legume nodulation; looking back and looking forward[J]. Nucleic Acids Research, 2001, 29(17): 3459–3468.
- [24] Bertone P, Stolc V, Royce T E, et al. Global identification of human transcribed sequences with genome tiling arrays[J]. Science, 2004, 306(5705): 2242–2246.
- [25] Yao J, Weremowicz S, Feng B, et al. Combined cDNA array comparative genomic hybridization and serial analysis of gene expression analysis of breast tumor progression[J]. Cancer Research, 2006, 66(8): 4065–4078.
- [26] Wang W, Cassidy J, O'Brien V, et al. Mechanistic and predictive profiling of 5-Fluorouracil resistance in human cancer cells[J]. Cancer Research, 2004, 64(22): 8167–8176.
- [27] Heller R A, Schena M, Chai A, et al. Discovery and analysis of inflammatory disease related gene cDNA microarray[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1997, 94(6): 2150–2155.
- [28] Madsen M L, Nettleton D, Thacker E L, et al. Transcriptional profiling of *Mycoplasma hyopneumoniae* during heat shock using microarrays[J]. Infection Immunity, 2006, 74(1): 160–166.
- [29] 汤坚, 陈凤毛, 叶建仁, 等. 松材线虫分子检测技术研究进展[J]. 林业科技开发, 2008, 22(5): 5–9.
- [30] 陈玉惠, 叶建仁, 魏初奖. 松材线虫病诊断方法研究进展[J]. 南京林业大学学报: 自然科学版, 2001, 25(6): 83–87.
- [31] Bryant P A, Venter D, Robins-Browne R, et al. Chips with everything: DNA microarrays in infectious diseases[J]. Lancet Infect Dis, 2004, 4(2): 100–111.
- [32] Lemarchand K, Masson L, Brousseau R. Molecular biology and DNA microarray technology for microbial quality monitoring of water[J]. Critical Reviews in Microbiology, 2004, 30(3): 145–172.
- [33] 杨朋欣, 张子群, 路义鑫, 等. 食品中弓形虫和旋毛虫液相基因芯片检测方法的研究[J]. 中国预防兽医学报, 2010, 32(10): 777–780.
- [34] 周钧, 陶开华, 李越希, 等. 基因芯片检测日本血吸虫及其现场应用[J]. 医学动物防制, 2003, 19(9): 524–527.
- [35] 张锦海, 陶开华, 李越希. 分型基因芯片检测疟原虫的研制及应用[J]. 中国公共卫生, 2003, 19(10): 1179–1181.
- [36] Tares S, Abad P, Bruguier N, et al. Identification and evidence for relationship among geographical isolates of *Bursaphelenchus* spp. (pine wood nematode) using homologous DNA[J]. Heredity, 1992, 68(2): 157–164.
- [37] 张新建, 许景升, 何晨阳. 用基因芯片技术分析水稻白叶枯病菌侵染过程的基因表达图谱[J]. 植物病理学报, 2005, 35(6): 164–167.
- [38] 赵宝存, 赵芊, 葛荣朝, 等. 利用基因芯片研究小麦耐盐突变体盐胁迫条件下基因的表达图谱[J]. 中国农业科学, 2007, 40(10): 2355–2360.