

主编 谭锦泉

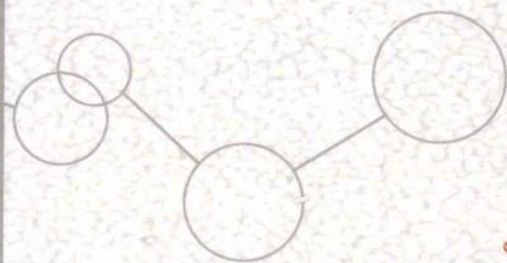
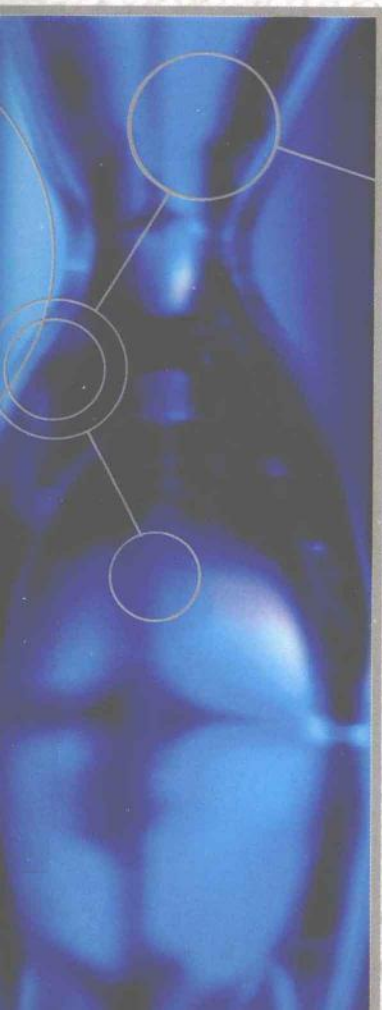
基因芯片技术

江西科学技术出版社

JYIN XINPIAN JISHU JYIN XINPIAN JISHU JYIN XINPIAN JISHU

一种新的革命性的技术……

JYIN XINPIAN JISHU



基因芯片技术

JIANJIYIN XINPIAN JISHU

安徽医科大学免疫学教研室

主 编 谭锦泉
编 者 (以姓氏笔画为序)

汪红俊	张林杰
李 群	罗畅民
胡春松	黄保军
谭锦泉	

江西科学技术出版社

图书在版编目(CIP)数据

基因芯片技术/谭锦泉主编. —南昌:江西科学技术出版社, 2002. 1
ISBN 7-5390-2135-7

I. 基… II. 谭… III. 人类基因-芯片-技术 IV. Q987

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2002)第 045027 号

国际互联网(Internet)地址:

HTTP://WWW.NCU.EDU.CN:800/

基因芯片技术

谭锦泉主编

出版 发行	江西科学技术出版社
社址	南昌市新魏路 17 号 邮编:330002 电话:(0791)8513294 8513098
印刷	南昌市印刷九厂
经销	各地新华书店
开本	850mm × 1168mm 1/32
字数	180 千字
印张	7.375
版次	2002 年 7 月第 1 版 2002 年 7 月第 1 次印刷
书号	ISBN 7-5390-2135-7/Q·17
定价	20.00 元

(赣科版图书凡属印装错误,可向出版社发行部或承印厂调换)

目 录

第一章 概述

第一节 微阵列技术的概念 /1

第二节 微阵列的应用原理 /3

第三节 微阵列技术的优越性 /3

第四节 微阵列(基因芯片)的应用 /4

第二章 基因、基因组及芯片

第一节 基因组的信息容量 /9

第二节 微阵列分析 /16

· II · 基因芯片技术

第三节 微阵列的应用/23

第四节 芯片和药物基因组学/24

第五节 小结/26

第三章 共聚焦扫描显微镜在微阵列检测中的应用

第一节 微阵列、荧光和检测仪/29

第二节 样品处理/38

第三节 微阵列共聚焦扫描/40

第四节 波长鉴别:减少背景成像/44

第五节 检测器/47

第六节 信号处理和仪器调控/48

第七节 仪器性能度量/52

第八节 ScanArray 共聚焦微阵列扫描仪/56

第四章 表达性差异分析法和微阵列杂交在差异性基因表达的克隆和筛选中的应用

第一节 概述/61

- 第二节 表达性差异分析/62
- 第三节 RDA 扣除杂交后文库的制作/71
- 第四节 微阵列的制备/75
- 第五节 微阵列杂交/76
- 第六节 用微阵列进行差异性表达的筛选/79
- 第七节 小结/80

第五章 寡核苷酸阵列在酶分析中的应用—— 最优化分析法

- 第一节 阵列制备/83
- 第二节 靶 DNA 的制备/89
- 第三节 阵列杂交/90
- 第四节 酶催化的延伸反应/92
- 第五节 实验记录的变化/97

第六章 反义寡核苷酸扫描阵列

第一节 概述/101

第二节 阵列的制作/102

第七章 喷墨打印技术在构建分子阵列中的应用

第一节 引言/127

第二节 喷墨技术/128

第三节 合成法构建分子阵列/132

第四节 通过沉积制作分子阵列/138

第五节 小结/147

第八章 激光俘获细胞基因表达的 cDNA 微阵列分析

第一节 激光俘获显微切割技术/149

第二节 扩增 RNA 的产生——第一轮循环/154

第三节 cDNA 微阵列/159

第九章 表达数据和向生物信息学挑战

第一节 基因/蛋白质/168

第二节 原始的数据通道/174

第三节 参考数据库/177

第四节 分子信息结构/179

第五节 医学词典和供者样品登记/184

第六节 数据采集——表达数据市场/185

第七节 小结/190

第十章 主动式微电子阵列用于 DNA 杂交分析

第一节 概述/193

第二节 电子阵列和杂交技术的理论背景/194

第三节 主动式微电子阵列制造技术/195

第四节 主动式电子阵列进行点突变分析/198

第五节 主动式 DNA 芯片的微型制造/199

第六节 单碱基错配分析示例/208

第七节 小结/210

第十一章 基因芯片和微阵列在疾病概况、药物 靶点发现、药物作用和毒性方面的应用

第一节 概述/212

第二节 方法/213

第三节 结果/218

第四节 讨论/225

第一章 概 述

2000年6月26日,美、英、德、日、法、中6国科学家同时向全世界公布,人类基因组工作草图绘制完毕。基因研究的重点开始从结构研究转向功能研究而进入后基因时代。面对分析人类基因组中10万个基因的复杂表达方式,确定细胞生命中错综复杂的调节表达信号的艰巨任务,传统的一次只能研究少量基因的方法已显不足,由此催生了一种新的、革命性的技术——微阵列技术(Microarray technology)。

第一节 微阵列技术的概念

微阵列技术是在一小片固相基质上储存大量生物信息的技术,即在一小片玻璃或尼龙膜上高密度排列成千上万个DNA片段、cDNA片段或其他生物信息。含有大量生物信息的固相基质称为微阵列(Microarray),又称生物芯片(Biochip)。根据储存的生物信息的类型,微阵列可分为组织微阵列(Tissuemicroarray)、寡核苷酸微阵列(Oligonucleotide microarray,又称DNA微阵列或

DNA 芯片)、cDNA 微阵列(cDNA microarray, 又称 cDNA 芯片)等。DNA 微阵列和 cDNA 微阵列一起又称基因芯片。

一、组织微阵列

组织微阵列由大量组织样本高密度排列而成。先在石蜡块上打出间距为 0.1mm, 直径为 0.6mm 的孔, 用针获取直径为 0.6mm 的组织块, 挤压到石蜡块孔里, 切出 5~8 μ m 的切片贴到玻片上, 经处理后用已知探针进行双色荧光原位杂交。Bubendorf 等将 371 例前列腺原位癌、复发癌和转移癌样本制成组织微阵列, 用荧光原位杂交检测 5 个基因的扩增情况, 结果显示组织微阵列技术是大样本量检测肿瘤进展各期分子变化的强大工具。

二、寡核苷酸微阵列

用照相平板印刷术 (Photolithography) 和固相合成术结合在基片上合成寡核苷酸, 1991 年由 Fodor 首先报道。该技术是先在玻片上涂上光敏化学材料, 盖上罩, 根据所要合成的碱基序列决定罩的透光位点。光照局部产生去保护作用, 用所需核苷酸冲洗玻片, 该核苷酸即在去保护部位粘合于玻片。核苷酸的 5' 末端以光不稳定基团修饰。该基团经光照而去保护, 与下一个核苷酸结合。如此重复直至获得所需核苷酸长度。每一层各点的 A、T、C、G 不同, 故每合成一层核苷酸需要 4 个不同透光位点的罩和 A、T、C、G 分别冲洗 1 次。通过 4 $\times$ n 次可合成含有 n 个核苷酸的寡核苷酸链。其主要特点是可按需要设计一定序列的寡核苷酸链。美国的 Affymetrix 公司已能生产 40 万个寡核苷酸/1.6cm² 的芯片。

三、DNA 微阵列

DNA 微阵列最先由 Schena 发展。将特定的或文库的 cDNA 经 PCR 扩增后用机械手点到基片上即成。美国 Synteni 公司的 cDNA 微阵列已达 10 000cDNA/3.6cm²。

第二节 微阵列的应用原理

微阵列应用的基本原理是分子杂交。用荧光染料标记样本 DNA 或 cDNA,与微阵列杂交,经激光共聚焦荧光显微镜检出杂交信号,通过计算机处理、分析,即可获得所需信息。用红、绿荧光分别标记实验样本和对照样本的 cDNA,混合后与微阵列杂交,可显示实验样本和对照样本基因的表达强度(显示红色、绿色或黄色),由此可在同一微阵列上同时检测两样本的基因差异表达。

第三节 微阵列技术的优越性

微阵列技术真正实现了基因分析的大规模、平行、小型和自动化。这些重要特征已产生了一系列以前的技术不可能做到的成就。

应用微阵列可以一次性获得大量的数据并进行平行分析,极大地加快了实验进程。微阵列最终将在一次反应中分析整个人类基因组。酵母基因表达实验在朝这个目标的道路上已跨出了重要的一步。

一次性分析多个样本是微阵列技术的一个重要特点。在一个阵列上进行多个样本比较,由于排除了一系列复杂因素导致的各项比较实验的内在差异,使一次性多样本比较性分析的精确性大为提高。

小型化是生物医学研究的一般倾向。微阵列分析大大减少了试剂用量,使反应容积变小,样本浓度增加,反应动力学加快。

计算机相连的图像分析系统使研究结果更客观、准确。通过对表达谱、突变和许多其他类型基因组信息的大规模平行分析而产生的洪水般的巨大数据,将由功能强大的生物信息工具来处理,大大增加了研究内容的广度和深度。

第四节 微阵列(基因芯片)的应用

一、基因表达

细胞的基因表达谱(Profile)决定了细胞的结构和生物学行为。肿瘤的发生、发展是以细胞内基因的结构或活性改变为基础的,表现为基因表达谱的改变,产生肿瘤不同的表型特征。通过基因表达谱可以探索肿瘤发生发展的分子机理,因此微阵列技术被大量用于肿瘤基因表达的研究。

Derisi 等应用 cDNA 微阵列检测了肿瘤抑制相关基因的表达。他们把正常人 6 号染色体转导入人黑色素瘤细胞株,使其致病性被抑制;用 cDNA 微阵列检测两株细胞的基因表达,几个表达有显著差异的基因被认为决定了黑色素瘤细胞成瘤的表型特征。

Wang 等用 5 766 个 cDNA 的微阵列研究卵巢正常组织和肿瘤组织的基因差异表达,发现了几个和卵巢癌进展相关的基因,

其结果为卵巢癌的诊断和治疗提供了新的指导。

Kononen 等把 cDNA 微阵列和组织微阵列结合,迅速确定并进一步评价了在肿瘤生物学中起作用的基因。他们先用有 5 184 个 cDNA 克隆的微阵列筛选了肾细胞癌和正常肾组织之间 89 个差异表达的基因,然后制作了 532 个肾细胞癌中的基因表达状况。

Welford 等将 cDNA 微阵列与表达性差异分析(RDA)结合检测肿瘤细胞差异表达基因。他们先用 RDA 比较了两个原发性 Ewng's 肉瘤,其中一个进展迅速并有转移,另一个为局部生长并对治疗反应良好。将 RDA 产物用鸟枪法克隆入载体,以载体特异引物扩增消减文库中单个克隆的插入片段,高密度阵列到玻片上,将两种肿瘤组织的起始扩增子(Starting amplicons)标记不同的荧光素后与微阵列杂交,荧光信号的强度与起始 mRNA(Starting mRNA)和 RDA 扩增子中片段中的丰度相关。RDA 提供了一个差异表达基因的富化库(Enriched library),用微阵列分析该库能快速地同时扫描数千个 DNA 分子,从而建立一个大的差异表达基因库。

微阵列技术能高度敏感地检测出有害化合物对人体的影响。有毒物质几乎都会直接或间接地改变基因表达,产生与某毒物相关的特异基因表达谱。用微阵列技术建立起各种毒物导致的特异基因表达谱数据库,样本细胞的基因表达与数据库比较,即可确定该样本曾遭何种毒物影响。

微阵列技术还可用于监测药物治疗引起的基因表达变化。分析基因表达类型(Pattern),了解基因功能有助于确定治疗的靶效应,有助于发现新的药品。

应用微阵列进行基因表达分析可进行疾病的诊断、预后、病理分析、药靶、效应、毒理等各种研究。

二、基因功能分析

目前对不知其特性的基因是通过酵母菌的基因突变株在选择性生长条件下的适应性来分析其功能的。Shoemaker 用 PCR 靶策略产生大量的缺失株,每个缺失株插入一个 20base 的单一标签序列,这一序列可以和 DNA 阵列杂交而被检出,从而起着分子条形码的作用。这样可以同时分析大量的在特殊生长条件下存活的缺失变异的酵母菌株,以此确定大量新鉴定的基因的生物学功能。

通过基因表达和特殊生理变化相关的分析,可以对一系列生物学过程的机理有更深入的了解。Iyer 等用人 9 804 个 cDNA 组成的微阵列检测了成纤维细胞在对血清反应中基因的程序性表达。将人成纤维细胞在无血清培养基中培养 48h,加入血清在 15min 到 24h 中取 12 个时间点检测其 8 613 个基因的 mRNA 水平。基因表达的时相程序和伤口修复的生理学相关,揭示了成纤维细胞在伤口修复过程中基因表达的状况,不仅发现了一些已知基因的新的作用,还发现了 200 多个未知基因在成纤维细胞对血清反应中的作用。这一实验方法可以用作模型来研究细胞从 G0 到增殖的控制调节。

了解转录因子的靶位点能更精确地操纵基因表达。斯坦福大学的学者将转录因子和 DNA 结合,用免疫沉淀法分离出结合物,再把 DNA 与转录因子分离,将此 DNA 用作探针和基因内元件(Intragenic elements)微阵列杂交,找出基因内和转录因子结合的区域。

三、基因制图

Kruglyak 等将微阵列技术用于双等位基因标记遗传图的连锁研究,能快速并高度自动化地鉴定基因型,还能确切地检测样本的纯合性和杂合性。

Cheung 等把基因组错配扫描 (Genomic mismatch screening, GMS) 与微阵列技术结合, 不需以标记物为根据的基因组分型而直接进行基因制图。他们对成对无亲缘关系的先天性高胰岛素血症患者进行 GMS, 将 GMS 产物与 11 号染色体的微阵列杂交, 从而将先天性高胰岛素血症基因定位于 11p15.1 的 Mb 范围内。

四、基因测序及突变和多态性检测

将经设计的不同序列的寡核苷酸组成微阵列, 与靶序列杂交, 从相应的寡核苷酸序列确定其互补的靶核苷酸序列, 通过计算机分析处理, 可迅速将正确的靶序列拼接起来。Chee 等以单杂交实验进行人类完整线粒体基因组测序, 用 135000 个寡核苷酸的阵列检测了线粒体基因组约 16.6kb 序列。Hacia 等用 96000 个寡核苷酸的阵列检测 BRCA1 基因 11 外显子 3.45kb 长度内的杂合性突变, 在 14/15 个患者标本中精确诊断了已知突变, 同时还检测出 38 个单核苷酸多态 (SNP)。Hacia 等还设计了高密度寡核苷酸阵列, 对与人进化相近的猩猩、大猩猩和黑猩猩的同源基因 BRCA1 的 11 外显子序列进行比较分析, 证明 83.5% ~ 98.2% 核苷酸相同。Favis 等把 PCR 和链接酶检测反应 (Ligase detection reaction, LDR) 结合, 在一个反应管里同时检测上百个突变, 再结合寡核苷酸微阵列, 就能同时迅速分析大量样本。他们应用该方法成功地描绘出结肠癌的 K-ras 和 p53 突变。并测出了 BRCA1 和 RCA2 中的低频突变。

Wen 等用寡核苷酸微阵列和常规 DNA 序列分析法检测 108 例卵巢癌 TP53 的突变, 比较了两者的效率、敏感性、特异性。57 例突变同时被两种方法检出而未被常规 DNA 序列分析法检出; 6 例被常规 DNA 序列分析法检出而未被寡核苷酸微阵列检出。寡核苷酸微阵列检测突变的准确率、敏感性和特异性分别为 94%、92% 和 100%, 而常规 DNA 序列分析法则为 87%、82% 和 100%。

微阵列技术一出现,就显示出了强大的生命力。令人鼓舞的应用前景引起生物界、医学界的热情关注,近年来微阵列技术及应用发展迅速。待人类基因组计划完成,在微阵列上对全基因组的变化进行检测将成为可能。用疾病相关微阵列进行疾病诊断将成为常规,真正实现把实验室搬到芯片上(Lab-on-chip)的梦想。

参考文献

1. Kononen J, et al. Nature Med, 1998; 4: 844
2. Bubendorf L, et al. Cancer Res, 1999; 59: 803
3. Fodor SPA, et al. Science, 1991; 251: 767
4. Schena M, et al. Science, 1995; 270: 467
5. Khan J, et al. Electrophoresis, 1999; 20: 223
6. Derisi J, et al. Nature Genetics, 1996; 14: 457
7. Lashkari DA, et al. Proc Natl Acad Sci USA, 1997; 94: 13057
8. Wang K, et al. Gene, 1999; 229: 101
9. Welford SM, et al. Nucleic Acids Res, 1998; 26: 3059
10. Medlin J. Environ Health Perspec, 1999; 107: 256
11. Debouck C, et al. Nature Genetics, 1999; 21(1 suppl): 48
12. Shoemaker DD, et al. Nature Genetics, 1996; 14: 450
13. Iyer VR, et al. Science, 1999; 283: 83
14. Kruglyak L. Nature Genetics, 1997; 17: 21
15. Cheung VG, et al. Nature Genetics, 1998; 18: 225
16. Chee M, et al. Science, 1996; 274: 610
17. Hacia JG, et al. Nature Genetics, 1996; 14: 441
18. Hacia JG, et al. Nature Genetics, 1998; 18: 155
19. Favis R, et al. Ann N Acad Sci, 2000; 906: 39
20. Wen WH, et al. Cancer Res, 2000; 60: 2716

(张林杰)