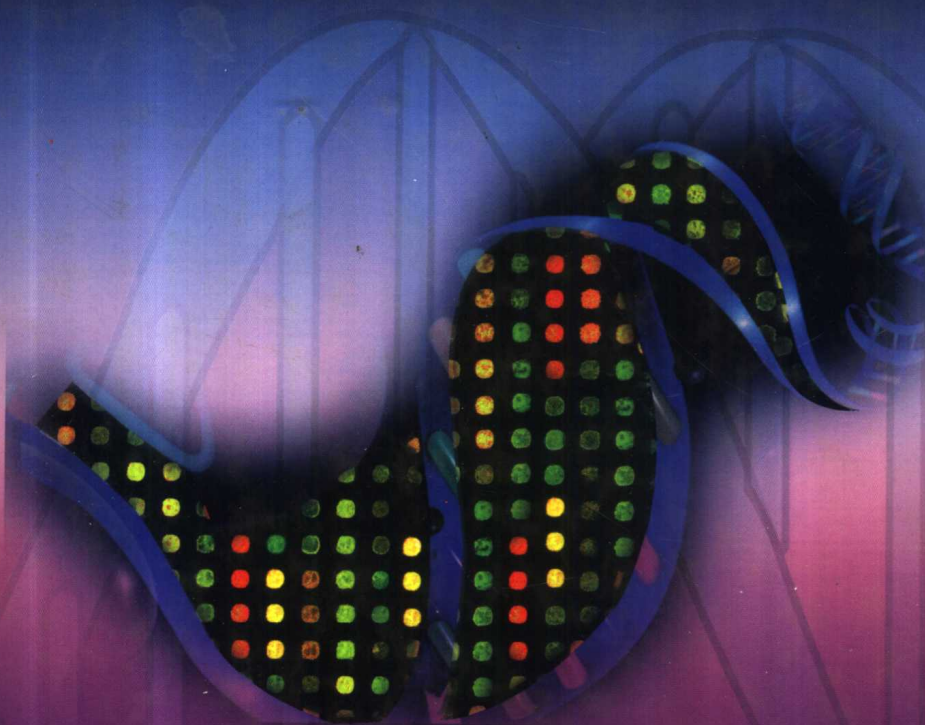


DNA

芯片技术 的方法与应用

马文丽 郑文岭 主编

Protocols and Applications of
DNA Chip Technology



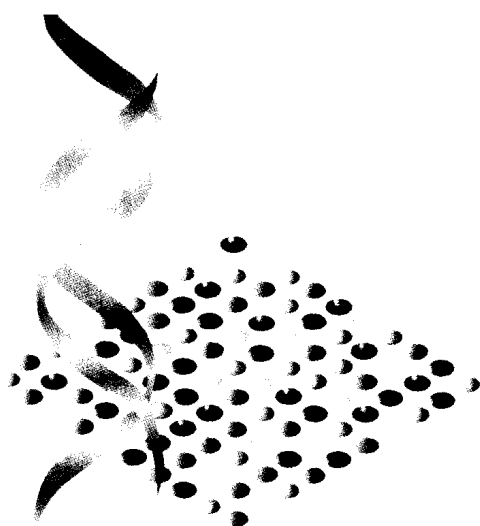
广东科技出版社

DNA 芯片

技术的方法与应用

主 编：马文丽 郑文岭

副主编：李 凌



广东科技出版社

广州

图书在版编目 (CIP) 数据

DNA 芯片技术的方法与应用 马文丽, 郑文岭主编. 广州: 广东科技出版社, 2002.8

ISBN 7-5359-3065-4

I. D... II. ①马... ②郑... III. 脱氧核糖核酸 IV. Q523

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2002) 第 032016 号

DNA Xinpian Jishu de Fangfa yu Yingyong

出版发行: 广东科技出版社

(广州市环市东路水荫路 11 号 邮码: 510075)

E - mail: gdkjzbb@21cn.com

http: //www.gdstp.com.cn

出版人: 黄达全

经 销: 广东新华发行集团

印 刷: 广东省东莞新丰印刷有限公司

(广东省东莞市凤岗镇天堂围区 邮码: 511751)

规 格: 787 mm×1 092 mm 1/16 印张 12.75 插页 6 字数 260 千

版 次: 2002 年 8 月第 1 版

2002 年 8 月第 1 次印刷

印 数: 1~2 000 册

定 价: 60.00 元

如发现因印装质量问题影响阅读, 请与承印厂联系调换。

编辑委员会

主 编 马文丽 郑文岭

副主编 李 凌

编著者

中国人民解放军第一军医大学分子生物学研究所

马文丽 李 凌 石 嵘 朱利娜

吴清华 祝 骥 刘翠华 胡子有

冯春琼 宋艳斌 姜 立 彭翼飞

郭秋野

中国人民解放军广州军区广州总医院

肿瘤分子生物学研究所

郑文岭 崔 东 邓 海 李建军



内 容 简 介

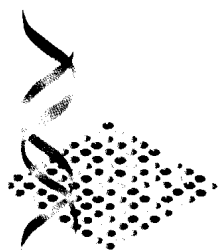
随着 DNA 芯片技术在全球广泛的推广和应用,国内不少科研机构也正开展(或准备开展)该技术领域的研究。但国内当前系统介绍该技术的图书却很少,使该技术的推广、应用遇到诸多不便。有鉴于此,中国人民解放军生物芯片重点实验室、第一军医大学的马文丽教授等特编写本书,旨在全面、系统地介绍 DNA 芯片技术的相关知识。全书共分四编。第一编概述了 DNA 芯片技术的基本原理;第二编系统阐述 DNA 微集芯片(DNA 微集阵列)技术的实验流程与方法,包括探针制备、支持物的预处理、芯片打印、打印后处理、样品制备与标记、杂交及杂交后清洗、芯片检测与数据分析等;第三编介绍 DNA 芯片技术在基因表达分析、基因突变检测与多态性分析、基因诊断及药物研发等方面的应用;第四编收录了 DNA 芯片技术的相关专题。

本书内容丰富,既系统阐述了 DNA 芯片技术的基本概念、原理及相关的基础理论,又提供了较详尽的实验方案及操作步骤,可供从事分子生物学、生命科学、临床医学、药学等学科的研究人员使用,是一本系统学习和掌握 DNA 芯片这一高新技术、开展 DNA 芯片相关课题研究的实用参考书。

序

20 世纪 90 年代，被誉为与阿波罗登月计划及曼哈顿原子弹计划相媲美的人类基因组计划正式启动，并从此引发了人类生物科技的革命。融合了分子生物学、材料科学、信息科学、计算机、微电子等多个学科的 DNA 芯片技术由此应运而生，在基因组研究，临床诊断，新药筛选等生命科学的各个领域都发挥了令人瞩目的作用。美国《财富》杂志曾写道：“20 世纪科技史上有两件事值得大书特书：一是微电子芯片，它改变了我们的经济和文化生活；另一个就是 DNA 芯片，它将给生命科学的研究方式带来重大改变，开辟一个生命信息研究和应用的新纪元。”

第一军医大学的马文丽、郑文岭两位教授在 DNA 芯片的研制上积累了丰富的经验，并研制出我国第一块应用型基因芯片，他们所主持的中国人民解放军生物芯片重点实验室为我国早期研究 DNA 芯片的实验室之一。通过总结他们实验室多年的工作，并结合近几年来国际上 DNA 芯片技术的发展，他们编写了《DNA 芯片技术的方法与应用》一书。该书从四个篇章上比较全面地介绍了 DNA 芯片技术的相关知识，既系统阐述了该技术的概念、原理及理论基础，又提供了较详尽的实验方案及操作步骤，并展示了 DNA 芯片技术在基因表达分析、突变检测、疾病诊断及药物研发等领域的应用。



目前，国内对基因芯片的研究方兴未艾，相信此书的出版，会推动并加快这项生物高新技术在我国发展的速度，从而带动整个生命科学的进步，使我国的生命科学研究在 21 世纪赶在世界前列！

吴祖泽

中国科学院院士

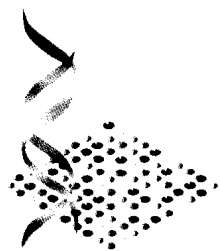
2002 年 6 月 26 日

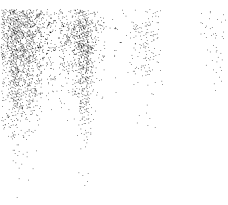
前 言

2000 年 6 月 26 日, 中美英法德日六国合作的人类基因组计划协作组在全球同一时间宣布完成人类基因组序列草图的绘制工作, 等待我们的是如何破译蕴藏其中的丰富信息, 以探明生命的奥秘。DNA 芯片技术, 这一继基因工程 (重组 DNA 技术)、聚合酶链式反应 (PCR) 之后, 分子生物学技术发展的又一重大突破, 不仅将推动分子生物学与生命科学的迅速发展, 而且也将为阐明生命的本质、揭开生命之谜发挥重要的作用。

DNA 芯片技术融合了生物学、微电子学、生物信息学等多学科, 从产生到飞速发展, 不过才短短的 10 年间, 就已经在生命科学的各个领域发挥了举足轻重的作用, 展示了令人振奋的诱人前景。它不仅是学科交叉组合的最佳典范, 更是研究生命奥秘的极好工具, 成为国内外众多学者与企业家们关注的焦点。国际上已有数十、上百家生物大公司及研究机构正在从事 DNA 芯片的研制及开发。相对而言, 国内则起步较晚, 但由于大量资金及人才的投入, 近几年来也取得了较大进展。

考虑到国内系统介绍该技术的基本原理与方法方面的书籍很少, 我们结合自己在 DNA 芯片研究方面的经验, 并参考最新的文献资料, 对 DNA 芯片技术的基本理论、实验方法与操作规程及其在基因表达分析与基因组研究、基因突变检测与多态性分析、基因诊断与药物研究开发等方面的应用, 以及国内外芯片技术发展的动态进行了系统阐述。本书将使读者对这一新技术有全面的了解, 希望也能为基因芯片以及分子生物学的研究、临床医学工作等提供有益的参考与帮助。本书适合在生命



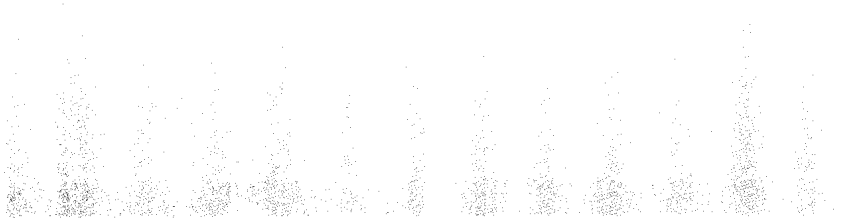
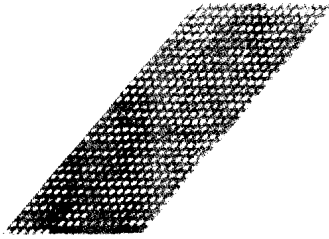


科学领域中从事教学与科研工作的高校教师、科研院所
研究人员、博士生、硕士生等作为开展 DNA 芯片相关
课题研究的参考书。

在 DNA 芯片的研究及本书的出版过程中，国家自
然科学基金、中国人民解放军总后勤部卫生部、广州市
科委及羊城晚报报业集团、广东科技出版社等给予了大
力的支持与帮助，在此深表感谢。由于 DNA 芯片技术
是一门新兴技术，发展迅速、更新快，所以，编写过程
中在理论与方法的阐述以及名词概念的表述上难免存在
不足之处，欢迎读者批评、指正，提出宝贵意见。

编 者

2002 年 3 月于广州第一军医大学



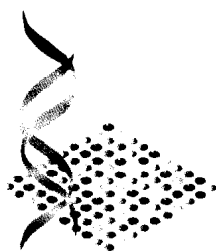
目 录

第一编 DNA 芯片技术概论

第一章 生物芯片与 DNA 芯片	2
一、生物芯片与 DNA 芯片的概念	2
二、DNA 芯片的主要类型	3
第二章 DNA 芯片技术的基本原理与方法	5
一、芯片的制备	5
二、样品的准备	7
三、分子杂交	8
四、检测分析	9
第三章 DNA 芯片技术的应用	11
一、DNA 序列分析	11
二、基因突变检测	12
三、基因表达谱分析	12
四、基因组研究	13
五、基因诊断	14
六、药物研究与开发	14
七、其他领域	15
第四章 发展与展望	16

第二编 DNA 微集芯片技术方法学

第一章 探针的设计与制备	21
一、探针的设计	21
二、探针的制备	22
三、打印前 DNA 探针的准备	25
实验一 PCR 扩增制备探针	25
第二章 支持物的类型与预处理	27
一、支持物的类型	27
二、表面化学处理	27
实验二 玻片的多聚-L-赖氨酸处理	28
实验三 玻片预处理的备选方案	29
三、支持物对实验的影响	30
第三章 芯片的打印	31
第一节 喷墨打印	31
第二节 针式打印	32
一、概述	32
二、微集阵列打印系统	32

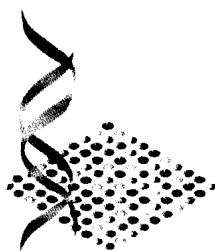


实验四 芯片打印的简单操作流程	35
三、针式打印分析	35
四、打印针的选择与维护	43
第四章 打印后处理	48
一、氨基化玻片的打印后处理	48
实验五 紫外交联法处理氨基化玻片	49
实验六 氨基化玻片打印后处理备选方案	50
二、醛基化玻片的打印后处理	50
实验七 Schiff 碱连接法处理醛基化玻片	51
第五章 样品的准备	52
一、组织、细胞中样品核酸的制备	52
实验八 肿瘤组织细胞总 RNA 的提取与 mRNA 纯化	52
实验九 大肠杆菌总 RNA 的提取	54
二、样品核酸的荧光标记	55
实验十 人类细胞 mRNA 样品的反转录荧光标记	56
实验十一 人类细胞 mRNA 样品反转录荧光标记的备选方案	57
实验十二 cDNA 样品的随机引物延伸标记	58
实验十三 基因组 DNA 的随机引物延伸标记	59
实验十四 PCR 线性扩增标记	60
实验十五 aa-dUTP 标记法	61
第六章 杂交与杂交后清洗	64
实验十六 芯片的杂交和清洗	64
第七章 检测分析	66
一、荧光染料	66
二、芯片的检测	66
实验十七 芯片扫描的基本操作	68
三、图像分析与数据处理	70
实验十八 基因表达谱芯片杂交图像分析	71
四、芯片检测时几种常见问题分析	74
第八章 芯片制备与检测概述	76
一、基因表达谱芯片	76
实验十九 基因表达谱 cDNA 芯片的制备与检测	76
二、寡核苷酸芯片	79
实验二十 寡核苷酸微阵列的制作	80

第三编 DNA 芯片技术的应用

第一章 DNA 芯片在基因表达分析中的应用	82
一、基因差异表达分析	82
二、基因鉴定	87
三、基因功能分析	88

第二章 DNA 芯片在基因突变检测与多态性分析中的应用	90
一、主要检测方法	90
二、基因突变检测	99
三、基因多态性分析	103
四、展望	109
第三章 基因诊断与 DNA 芯片	111
第一节 基因诊断概述	111
一、基因诊断的概念与特点	111
二、基因诊断的基本原理与临床意义	111
三、基因诊断的技术概论	112
四、基因诊断的基本方法	113
五、不同疾病基因诊断的基本策略	117
第二节 遗传病的基因诊断	118
一、血红蛋白病	118
二、杜氏肌营养不良症	122
三、苯丙酮尿症	123
四、血友病	124
第三节 感染性疾病的基因诊断	125
一、病毒性肝炎	125
二、细菌性疾病	127
三、寄生虫疾病	130
第四节 肿瘤的基因诊断	132
一、几种常见肿瘤的基因改变	132
二、肿瘤相关基因的检测	133
第五节 基因诊断在法医学中的应用	135
一、法医学鉴定的分子基础	135
二、DNA 指纹与法医学鉴定	135
三、其他技术	136
第六节 DNA 芯片在基因诊断中的应用	136
一、DNA 芯片与肿瘤的诊断与分型	136
二、DNA 芯片与感染性疾病的诊断	137
三、DNA 芯片与遗传病的基因诊断	138
四、DNA 芯片与法医学鉴定、人口优生、环境保护与监测	138
五、现状与展望	138
第四章 DNA 芯片在药物研究与开发中的应用	140
一、药物筛选	140
二、药物药理学与药物基因组学研究	141
三、药物毒理学研究及药物安全性评价	143
四、合理用药与个体化用药	144
五、在中药研究中的应用	144

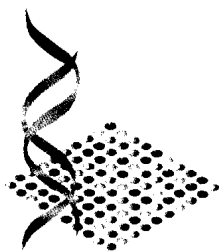


六、展望	146
------------	-----

第四编 专题篇

DNA 芯片上分子杂交过程	148
一、支持物与分子杂交	148
二、连接分子对杂交信号的影响	148
三、不同碱基组成和排列顺序对杂交的影响	149
四、靶分子的折叠和杂交双链的形成	150
五、尽量减少靶分子中的二级结构	150
六、利用 DNA 聚合酶与连接酶进行链延伸	150
表达谱基因芯片数据的聚类分析及其应用	152
一、数据的获取和处理	152
二、聚类统计量的选择	153
三、聚类分析	154
四、调控信号的推测与鉴定	154
基因表达信息学	158
一、信息的加工处理步骤和信息流	158
二、数据研究	160
DNA 微集芯片技术的研究现状	164
一、集成 DNA 片段的可能来源	164
二、DNA 芯片制备与实现的具体过程	165
三、DNA 微集芯片技术的意义	166
四、结语	166
当今技术水平的 DNA 芯片	167
一、DNA 芯片的类型与技术原理	167
二、应用	168
三、小结	171
DNA 芯片——具广阔前景的阵列	172
一、样品的分离纯化	172
二、芯片的制作	173
三、充分利用芯片	173
四、杂交的亲和性与条件	174
五、检测	175
六、使技术更易于接受	176

HIV 感染的分子诊断	179
一、HIV 基因检测	179
二、HIV 基因分型	180
三、HIV 感染的综合诊断展望	181
鼻咽癌的分子诊断研究	182
一、血清学诊断	182
二、基因诊断	183
三、展望	184
中英文词汇对照	185
参考文献	188
彩图	





DNA 芯片技术概论

DNA 芯片 (DNA chips) 技术是 20 世纪 90 年代初期发展起来的一门由分子生物学、微电子学、物理学、化学、计算机科学等多学科交叉融合而成的高新技术, 被评为 1998 年度世界十大科技进展之一。该技术既具有重大的学术价值, 又具有明显的产业化前景。DNA 芯片的出现为基因表达谱分析、新基因的发现、基因突变检测、多态性分析、基因组作图、功能基因组研究等提供了强有力的工具, 将使疾病的基因诊断、药物筛选、个体化用药等方面取得重大突破, 为生命科学研究、医学、药物研究与开发、法医鉴定、工农业以及食品与环境卫生监督等领域, 乃至整个人类社会带来广泛而深刻的变革。



第一章 生物芯片与 DNA 芯片

自古以来,人类一直在探索生命的奥秘,希望能找到生、老、病、死的秘诀。20 世纪 90 年代启动的、人类历史上最宏伟的计划——人类基因组计划(human genome project, HGP)在 2000 年 6 月即已提前完成全基因组序列测定草图,全部染色体共约 3×10^9 个核苷酸的序列分析也即将完成。然而,仅仅了解核苷酸的排列顺序,并不等于完全解码了生命本身,如同仅学会了英文的 26 个字母,还不能等同于读懂英文书。那么,在此基础上如何读懂人类全部的遗传奥秘这部天书呢?人类基因组计划下一个更为艰巨的任务是研究约 3×10^4 个基因的功能、基因与基因之间的相互作用,以及基因与疾病之间的关系。人类基因组计划即将进入后基因组(post-genomics)时代,人们研究的重点将由核苷酸转向蛋白质,将阐明从基因—蛋白—生命现象这一过程的奥秘。这将是 21 世纪生物学的重点。但是面对成千上万的基因,面对浩瀚如云的基因和蛋白序列分析的数据,常规的研究方法已显然不能适应研究的要求,如 Southern 印迹杂交、Northern 印迹杂交等技术复杂、耗时长,检测效率低,一次只能检测几个或十几个基因,因此必须采用一种高通量的检测技术来解决这一难题,DNA 芯片技术就是其中一个杰出的代表。

提起芯片,人们自然会想到计算机芯片。计算机中广泛应用的半导体集成电路芯片是把成千上万的电子元件集成到一块极小的硅片上,因而具有体积小、性能高、速度快,以及可进行大规模工业化生产等优点,可以对电信号进行大规模并行处理。目前计算机芯片已被广泛应用于各个产业部门。20 世纪 80 年代,人们希望借鉴计算机半导体芯片的方式,将代表生命信息的 DNA 等分子高度集成在芯片上,以实现大规模处理与分析生物信息。90 年代初,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,采用显微光蚀刻(photolithography)技术,在光引导下原位合成寡核苷酸而制备了 DNA 芯片。由于该项技术成本高且受专利保护,美国斯坦福大学 Patrick Brown 研究小组的 Mark Schena 等设计出另一种 DNA 芯片的制作方法,即将预先制备好的 DNA 探针以显微打印的方式固化在芯片上,从而极大地推动了 DNA 芯片技术的发展。这项技术的原理同样适用于蛋白质等,蛋白质芯片、组织芯片等检测芯片不断涌现。另一方面,在芯片上进行生物样品制备、生化反应等功能的生物芯片技术也在蓬勃地发展。

如果说 20 世纪初计算机的出现,彻底改变了我们的生活,并将人类带入数字化时代,那么在 21 世纪 DNA 芯片的发展将把生物技术带入到一个全新的时代。计算机刚出现时,谁也没有料到它会渗透到我们生活的各个方面。同样,今天谁都无法低估 DNA 芯片技术将会给我们的生活带来的巨大变化。

一、生物芯片与 DNA 芯片的概念

生物芯片是指通过微电子、微加工技术在平方厘米大小的固相介质表面构建的微型分析系统,以实现对组织细胞中 DNA、蛋白质及其他生物组分的快速、高效、敏感地处理与分析。目前生物芯片可以分为两大类:一类是信息芯片,以 DNA 芯片为代表,还包括蛋白质芯片、组织芯片、细胞芯片等。通过将生命相关的信息分子高度集成,来实现对基因、蛋白等生物活

性物质进行高通量的检测与分析。另一类是功能芯片,即在芯片上完成生命科学研究中样品的分离、扩增、生化反应等功能,包括生物样品制备芯片、核酸扩增芯片、毛细管电泳芯片等单功能芯片,以及多功能集成的缩微芯片和生物传感器芯片等新型生物芯片。缩微芯片也被称为缩微芯片实验室(laboratory on a chip),是通过采用类似集成电路制作过程中半导体光刻加工的缩微技术,把样品制备、生化反应和检测分析等复杂、不连续的过程全部集成到芯片上,使其连续化和微型化,构建成所谓的缩微实验室(microlab)。这与当年将数间房屋大小的计算机缩微成现在的笔记本式计算机有异曲同工之妙。

生物芯片中发展最成熟的是 DNA 芯片。DNA 芯片技术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 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。

采用上述两种方法制备的 DNA 芯片,其固定的探针除了 DNA、寡核苷酸,也可以是 cDNA^①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(gene chips)、DNA 阵列(DNA array)、cDNA 芯片(cDNA chips)、寡核苷酸阵列(oligonucleotide array)等。

二、DNA 芯片的主要类型

根据 DNA 芯片的制备方式可以将其分为两大类:原位合成芯片(synthetic genechip)和 DNA 微集阵列(DNA microarray)。

原位合成芯片是以美国 Affymetrix 公司为代表制备的一类 DNA 芯片,采用显微光蚀刻(photolithography)等技术,在芯片的特定部位原位合成寡核苷酸而制成。这种芯片的集成度较高,可达 $10 \times 10^4 \sim 40 \times 10^4$ 点阵/cm²。但合成的寡核苷酸探针长度较短,一般为 8~20 个核苷酸残基(nucleotide, nt),最长为 50 个 nt。因此,对于一般长度的基因,需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地鉴定。虽然物理集成度高,但相对而言,生物遗传信息的集成度受到影响。

DNA 微集阵列又称为 DNA 微集芯片(DNA microchips),是以斯坦福大学 Patrick Brown 研究小组为代表制备的一类芯片,采用常规分子生物学技术如 PCR^②、分子克隆、DNA 合成技术等,预先合成 DNA 或基因片段,然后以显微打印的方式,将这些基因片段有序地固化于支持物表面制成。这种方法需要精密的打印装置。虽然芯片的集成度相对较低,可达 $1 \times 10^4 \sim 10 \times 10^4$ 点阵/cm²,但使用的探针组的来源比较灵活,可以是合成的寡核苷酸短片段,也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,且技术实现未受到严格的专利控制,因而近年来发展很快。

这两类芯片的比较见表 1-1。

此外,根据芯片上探针分子种类的不同, DNA 芯片可以分为寡核苷酸芯片、cDNA 芯片与基因芯片。寡核苷酸芯片主要采用原位合成法制备, cDNA 芯片与基因芯片则采用 DNA 微阵列的制作方法。

① cDNA: complementary DNA, 互补 DNA

② PCR: polymerase chain reaction, 聚合酶链式反应