

基因芯片技术及其在疾病研究中的应用

王 敏(综述), 王少元(审校)

基金项目:福建省重大科研项目(2003F003)

作者单位:350001 福州, 福建医科大学附属协和医院血液科

作者简介:王 敏(1983-),女,硕士研究生,研究方向:家族性白血病致病基因的定位克隆。E-mail:minmin3891@123.com

【摘要】 人类基因组计划(human genome project, HGP)的完成,极大地带动了人类疾病相关基因的定位、克隆、结构与功能研究。人类基因组草图基本绘就之后,人类基因组计划也由此加入到功能基因组时代;生命科学的重点也由基因序列研究上升为基因功能研究,基因芯片就是在这个背景下发展起来的一项先进技术。与传统方法相比,它具有快速、高通量、高准确性、低成本等特点,能够满足临床基因检测的要求;且其操作简单、易于标准化、适于推广,显示出广阔的临床应用前景。本文就基因芯片技术的研究进展及其在疾病研究中的应用做一简要综述。

【关键词】 基因芯片; 表型; 疾病相关基因

【中图分类号】 Q 753 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1674-3806(2009)04-0346-03

doi:10.3969/j.issn.1674-3806.2009.04.008

Gene chip technology and its application in diseases research WANG Min, WANG Shao-yuan. Research Institute of Hematology, The Affiliated Union Hospital, Fujian Medical University, Fuzhou 350001, China

【Abstract】 The Human Genome Project (Human Genome Project, HGP) has successfully completed, which greatly stimulate the study of structure and function, positioning, cloning of the human disease-related genes. After the basic human genome draft had been drawn, the HGP also enter into the functional genomics era; the focus of life science research has also escalated from the study of gene sequences into gene function studies. Therefore the advanced technology of Gene chip has developed gradually. Being different from those traditional methods, such as low time and money consuming, high performance and accuracy, which make gene chip fit to be used in clinic gene testing. In addition, its features of easy manipulation, standardization and popularization endue it perfect prospect in clinical application. The goal of this review is to outline the progress of gene chip technology and it's application in the study of disease.

【Key words】 Microarray; Phenotype; Disease-related genes

基因芯片技术是在不同学科和技术的基础上产生的,是多学科、多技术交叉的结晶,它涉及物理学、化学、材料科学、生物化学、核酸化学、分子生物学、统计学及计算机科学等,这些学科的研究和先进技术的发展都直接或间接促进基因芯片技术的发展。自从1991年Fodor等人提出DNA芯片的概念后,近年来以DNA芯片为代表的生物芯片技术得到了迅猛发展,目前已有多种不同功用的芯片问世,而且有的已经在生命科学研究中开始发挥重要作用。基因芯片是研究最成熟、应用最广泛的一种生物芯片,从核酸水平研究生命现象出发并将研究成果推向临床应用。

1 基因芯片的原理

基因芯片是发展最早、最快的生物芯片之一,它的概念源自于计算机芯片。又称DNA芯片或DNA微阵列,是指一

种平面上有规则地、特异地吸附着基因或基因产物的基质载体^[1]。其原理是将许多特定的寡核苷酸片段或基因片段有序地、高密度地排列固定于支持物上,待测的样品核酸分子经过标记,与固定在载体上的DNA阵列中的点按碱基配对原理同时进行杂交(杂交形式属于固-液杂交,与膜杂交相似),然后通过激光共聚焦荧光检测系统等对芯片进行扫描,检测杂交信号强度而获取样品分子的数量和序列信息,用计算机软件进行数据的比较和分析,从而对基因序列及功能进行大规模、高通量的研究。它与其他基因表达谱分析技术,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。基因芯片技术具有微型化、自动化和网络化等特点。所谓微型化,一方面是指成千

上万种探针分子仅仅点在几平方厘米的介质上,另一方面则是指样品和药品消耗量小;所谓自动化,是指点样、杂交图像处理都可以用计算机指导的自动化系统自动或者半自动地完成;所谓网络化,是指点样和数据处理都需要利用 Internet 上庞大的生物信息数据库,如 Genebank、UCSC 等。

2 基因芯片分类

由于基因芯片的制备方法和应用范围的不同,可以将基因芯片依据不同的标准分为不同种类:(1)以载体材料区分,可以分为玻璃芯片、膜芯片、硅芯片和陶瓷芯片等。(2)以制作方法区分,可分为原位合成芯片、直接点样法芯片(其中又包括喷点芯片和针点芯片两种)等。(3)以芯片的应用区分,还可以分成用于检测基因表达水平的表达谱芯片、用于疾病检测的诊断类芯片、用于确定基因组中单核苷酸多态性的 SNP 分型芯片、用于基因序列测定的 DNA 测序芯片以及用于连锁不平衡作图的芯片等。根据基因芯片的应用,总体可以归纳成两大主要类型:即用于对基因及其表达的量进行检测的基因表达谱芯片和用于对待检测样品的基因结构及组成进行检测的寡核苷酸芯片。

3 基因芯片的应用

基因芯片产生的两个标志性事件是 1991 年 Affymetrix 公司生产的第一块原位合成的基因芯片和 1994 年斯坦福大学用直接点样法制备的第一块微阵列 cDNA 芯片。随着人类基因组计划的完成,基因芯片技术也被广泛应用于各个领域,本文着重介绍基因芯片在疾病及遗传病研究方面的应用。

3.1 疾病的研究 疾病的产生是多种因素作用的综合结果,包括遗传、饮食、环境和感染因素等,疾病与基因表达调控异常有密切关系,不同疾病导致不同的基因表达异常。基因芯片技术可以用于所有疾病的研究中,其中癌症是应用基因芯片研究最多的疾病,这是因为癌症的病因复杂,涉及基因组水平、基因调控水平和表观遗传水平的改变等,常规方法很难全面展开研究,而采用基因芯片技术有明显的优势。其他疾病的研究,如糖尿病、心血管疾病、艾滋病、贫血病等,也利用芯片技术进行了广泛的研究。Ghadimi 等^[2]根据直肠癌的基因表达谱来选择手术前的化学放射疗法。通过比较正常组织和疾病组织的表达谱差异,可以了解直肠癌发生的分子基础,从而更好地预防和治疗疾病。Ito^[3]等用一种新的超灵敏的不依赖 RNA 扩增的 DNA 芯片,通过对术前的活组织检查可以精确地诊断食管癌,他们认为这种新的 DNA 芯片可以用于多种癌症的诊断和治疗。将基因芯片上的 DNA 阵列分别与来自正常人和患者基因组 DNA 进行杂交,对杂交后的两种图谱进行比较分析就可以找出引发病变的 DNA 信号。李江涛等^[4]应用表达谱芯片进行了大量的胆囊癌与胆囊正常组织之间差异表达基因的比较分析,发现了许多新的差异表达的序列,其中部分基因可能被证实为新的胆囊癌相关基因,从而为胆囊癌的早期诊断提供新思路与线索。Goodwin 等^[5]则利用含有 12000 个已知寡核苷酸探针的基因芯片,比较了 3 例支气管肺泡癌(BAC)的癌组织与正常肺

组织间差异表达的基因,结果发现 BAC 中有 12 种基因呈 2 倍以上的上升,6 种基因有 20% 左右的下调,这些基因在转录水平上的改变至少可以部分解释 BAC 的发病机制,并对 BAC 的诊断和治疗有一定意义。

3.2 遗传性疾病相关新基因的筛查 遗传物质的微小改变(基因突变或基因多态性)可以导致蛋白质不能行使正常功能,从而导致疾病的发生或导致疾病易感性增加。目前已发现的疾病基因与疾病相关基因有上千个,其中包含着大量与疾病相关的基因突变或 SNP,另外,不同的基因型会导致对药物的不同耐受能力。人类基因多态性在阐明人体对疾病的易感性与耐受性,人类疾病临床表现的多样性以及人类对药物治疗的反应性上都起着重要的作用。因此,如果能阐明基因型(genotype)与表型(phenotype)之间的联系,对每个个体的遗传体质进行筛查,针对每个个体的特征进行个体化诊断,根据诊断结果采用不同的治疗方案和选择不同的药物或不同的用药剂量,就能实现个性化治疗。个性化诊断还可以对疾病进行早期诊断和预测,从而更好地预防疾病。单核苷酸多态性是继限制性长度多态性(restriction fragment length polymorphism, RFLP)和短串联重复序列(short tandem repeats STR)之后,出现的第三代 DNA 水平遗传多态性标记。SNP 具有高密度性、高度稳定性、易于自动化分析等特点,因此广泛应用于药物、法医学鉴定及遗传性疾病相关新基因的定位克隆上。国外有学者分别应用 10~500K 的 SNP 基因芯片技术对少于十个样本的小样本、小家系的局灶性癫痫^[6]、新生儿糖尿病^[7]、分层蛋白阳性的先天性肌肉萎缩症^[8]、关节弯曲-肾脏(肾小管)功能不良-胆汁淤积病三联综合征^[9]等遗传病成功地进行致病基因定位克隆。Straussberg^[10]等应用 10KSNP 的芯片对四个患小脑性共济失调综合征的儿童和他们的 6 个父母亲进行基因分型,然后做遗传学分析,将疾病致病基因的范围缩小到 3.8Mbp 的区域之内,对该范围之内的基因进行测序发现, CNTNAP2 基因的 22 号外显子上 3709 位有一个碱基的突变,导致翻译的提前终止,产生了疾病相关症状。Vierimaa^[11]等应用 50KSNP 芯片对一个家系的 16 个样本进行分析,发现 11 号染色体 11q12-11q13 区域内约 7.3Mb 的范围与垂体瘤相关,该区域含有 295 个基因,然后对 16 个样本做 AFFY 表达谱芯片,筛选出 295 个基因中表达异常的基因,最终筛选出了与疾病相关的 AIP 基因突变。Chiang 等^[12]应用 100KSNP 基因芯片对一个近亲家庭里的 4 位巴比二氏综合征患者进行基因分型,成功地定位出巴比二氏综合征的致病基因所在的染色体位置为 9q33.1 上的一个 2.4Mb 区域,接着发现了与疾病有关的 TRIM32 基因的突变。Shojaee 等^[13]用 500KSNP 芯片对一个患有帕金森综合征的大家系进行全基因组范围的扫描而后进行连锁分析,结果在 22 号染色体上找到了一个与疾病有关的 FBXO7 基因的纯和性突变。

4 基因芯片的现状与展望

基因芯片的出现正在给生命科学研究、疾病诊断、新药开发、生物武器战争、司法鉴定、食品卫生监督、航空航天等

领域带来一场革命,由于具有传统的生物技术不可比拟的高效、快速、高通量等特点,基因芯片技术被广泛应用于各个研究领域。发明至今虽然短短几年,但已展示出广阔的应用前景。人们普遍预测基因芯片技术将给新世纪生命科学和医学研究带来一场革命,加快了人类弄清生命系统运行奥秘的步伐。

尽管基因芯片有许多其它检测方法难以比拟的优越性,但是人们也该清醒的意识到,基因芯片技术还有许多不足之处。有学者指出,基因芯片技术作为一种预测手段还不稳定,应慎重选择^[14]。而且技术成本高、对实验条件要求严格、不利于普及推广;探针制备、合成过程要求严格,增大了制作难度和测定误差。芯片技术方面还有许多问题亟待解决,比如须提高芯片的特异性、简化样品制备和标记操作程序、增加信号检测的灵敏度等。但是随着生物技术、物理、化学等各个学科的飞速发展,在未来几年内这些不足将得以解决,人类所有的约3万个基因有望集成在一块1 cm²的芯片上,那时基因芯片技术将在生命科学领域发挥更大的作用。

参考文献

- 1 Cowell JK, Hawthorn L. The application of microarray technology to the analysis of the cancer genome[J]. *Curr Mol Med*, 2007, 7(1): 103-120.
- 2 Ghadimi BM, Grads M, Difilippantonio MJ, et al. Effectiveness of gene expression profiling for response prediction of rectal adenocarcinomas to preoperative chemo radiot herapy[J]. *J Clin Oncol*, 2005, 23(9): 1826-1838.
- 3 Ito T, tanaka E, Kadowaki T, et al. An ultrasensitive new DNA microarray chip provides gene expression profiles for preoperative esophageal cancer biopsies without RNA amplification[J]. *Oncology*, 2007, 73(5-6): 366-375.
- 4 李江涛、冯雪冬、刘颖斌,等. 肿瘤表达谱基因芯片筛选胆囊癌肿瘤相关基因的初步研究. [J] *中华外科杂志*, 2006, 44(21): 1508-1509.
- 5 Goodwin LO, Mason JM, Hajdu Si, et al. Gene expression patterns of paired brochioloal veolar carcinoma and benign lung tissue[J]. *Ann Clin Lab Sci*, 2001, 31(4): 369-375.
- 6 Strauss KA, Puffenberger EG, Huentelman MJ, et al. Recessive symptomatic focal epilepsy and mutant contactin - associated protein - like2 [J]. *N Engl J Med*. 2006, 354(13): 1370-1377.
- 7 Sellick GS, Garrett C, Houlston RS, et al. A novel gene for neonatal diabetes maps to chromosome 10p12.1-p13[J]. *Diabetes*, 2003; 52(10): 2636-2638.
- 8 Sellick G. S, Longman C, Brokington M, et al. Localisation of merosin - positive congenital muscular dystrophy to chromosome 4p16.3[J]. *Hum Genet*, 2005, 117(2-3): 207-212.
- 9 Gissen P, Johnson CA, Morgan NV, et al. Mutations in VPS33B, encoding a regulator of SNARE - dependent membrane fusion, cause arthrogryposis - renal dysfunction - cholestasis(ARC) syndrome[J]. *Nat Genet*, 2004, 36(4): 400-404.
- 10 Straussberg R, Basel - Vanagaite L, Kivity S, et al. An autosomal recessive cerebellar ataxia syndrome with upward gaze palsy, neuropathy, and seizures[J]. *Neurology*, 2005; 64(1): 142-144.
- 11 Vierimaa O, Georgitsi M, Lehtonen R, et al. Pituitary adenoma predisposition caused by germline mutations in the AIP gene[J]. *Science*, 2006, 312(5777): 1228-1230.
- 12 Chiang AP, Beck JS, Yen HJ, et al. Homozygosity mapping with SNP arrays identifies TRIM32, an E3 ubiquitin ligase, as a Bardet Biedl syndrome gene[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(16): 6287-6292.
- 13 Shojaaee S, Sina F, Banihosseini SS, et al. Genome - wide linkage analysis of a parkinsonian - pyramidal syndrome pedigree by 500 K SNP Arrays[J]. *Am J Hum Genet*, 2008, 82(6): 1375-1384.
- 14 Michiels S, Koscielny S, Hill C. Prediction of cancer outcome with microarrays: a multiple random validation strategy [J]. *Lancet*, 2005, 365(9458): 488-492.

[收稿日期 2009-02-26][本文编辑 韦挥德 黄晓红]

《中国临床新医学》杂志投稿须知

凡投本刊的稿件,务请补全以下内容与项目:

- 1 中文摘要、关键词(按规范格式书写)。
- 2 英文题目,作者(汉拼),英文单位名称,英文摘要和关键词(按规范格式书写)。
- 3 论文的统计学处理方法。
- 4 单位投稿介绍信。
- 5 作者简介(姓名、性别、出生年月、学历、学位、职称、研究方向)。
- 6 须寄付 A4 纸打印稿一份,并发电子邮件到本编辑部。
- 7 第一作者联系地址、邮编、电话和 E-mail。

•本刊编辑部•