

基因芯片技术及其在烟草改良中的应用前景

姚忠达¹⁾ 魏利²⁾ 陈学平³⁾ 郭家明³⁾ (¹⁾合肥卷烟厂, 合肥 230031; ²⁾沈阳卷烟厂; ³⁾中国科学技术大学)

摘要 讨论了 DNA 芯片制作的基本原理和主要步骤, 介绍了基因芯片的主要类型。探讨了基因芯片技术在转基因烟草检测、烟草基因表达与调控研究、烟草种子检测和烟草分子育种中的应用前景。

关键词 烟草; 基因芯片; 分子检测; 遗传改良

中图分类号 Q789 **文献标识码** C **文章编号** 0517- 6611(2002) 02- 0283- 02

The Technology of Gene Chip and its Applicability to Tobacco

Yao Zhongda et al (Hefei Cigarette Factory, Hefei 230031)

Abstract The principle and methods of making gene chip or DNA chip were reviewed in this paper. The technology of DNA chip has shown a lot of potential applicability for tobacco industry in these fields of detecting transgenic tobacco, gene expression, tobacco variety identification and molecular breeding of tobacco.

Key words Tobacco, Gene chip, Molecular detection, Genetic improvement

基因芯片又称 DNA 芯片、DNA 微集列阵、生物芯片或寡核苷酸微芯片。利用 DNA 芯片技术可以将大量的核苷酸分子同时固定于载体上, 1 次就可以检测、分析大量的 DNA/ RNA 片段, 解决了常规核酸印迹杂交技术复杂、自动化程度低、检测目标分子数量少、成本高、效率低等不足。该技术具有高度并行性、多样化、微型化和自动化进行 DNA 分析的特点^[1~ 4]。目前已经广泛应用于基因表达研究、疾病诊断、发现新基因及药物筛选等领域^[5~ 7]。

1 基因芯片制作的原理与技术

基因芯片制作原理的核心就是根据核酸杂交原理来检测未知核酸分子, 将 DNA/ RNA 片段按照一定顺序排列在固相支持物上形成密集的分子列阵。具体实现该技术的步骤可以分为以下 3 步:

(1) DNA 微集列阵的集成。即以大量 DNA 特殊片段为探针, 采用物理和化学的方式, 将其固定在载体的表面, 形成密集度很高的、有序的 DNA 分子列阵。

(2) 样品制备和分子杂交。利用常规分子技术提取和纯化 DNA/ RNA 待测样品, 用荧光对待测样品进行标记后与基因芯片进行分子杂交。

(3) 杂交信号的检测和分析。杂交后与探针互补的样品产生结合, 从而呈现阳性荧光信号可被检测到。由于在较小的面积上集成了大量的探针分子, 杂交效率大为提高, 获得的大量信号可以通过激光扫描仪进行扫描采集, 进而将所得的信号传送到计算机系统进行分析处理, 获得样品核酸分子的鉴定结果。

在上述 3 个步骤中, 基因微集列阵的集成是关键^[8],

它涉及到列阵的制作技术和探针的设计 2 部分。DNA 芯片制作主要有两种方法:

1. 1 光导原位合成法

即采用光蚀刻技术与固相化学相结合, 以化学合成的方法使 DNA 寡聚片段固定于硅芯片表面。这种方法制作出的基因芯片具有集成度高、可直接从数据库获得要合成序列的信息, 不用自己去克隆和测序等优点。然而, 由于该方法合成的只是寡聚 DNA 片段, 分子量较小, 一般在 20~ 25bp, 所获得的遗传信息的总集成量受到限制; 而且每个芯片要用大量的光刻掩膜, 杂交和检测条件要求亦较高, 成本较高。由这种方法得到的基因芯片称为 GenechipTM。利用化学合成制作基因芯片是美国 Affymetrix 公司的专利^[9], 该公司已经具有同时检测 6 500 个已知人类基因的基因芯片, 已有用检测艾滋病病毒基因、乳腺癌、卵巢癌等疾病相关基因等多种基因芯片^[10]。

1. 2 自动化分区点样法

点样分子可以是核酸也可以是寡核苷酸。采用人工点样方法将寡核苷酸点样于化学处理后的载玻片上, 制备好的 DNA 芯片可以置于缓冲液中保存。这种方法费时费力, 不适合大规模基因芯片制作。采用多聚赖氨酸包被固相支持物玻片, 经过分区后用计算机控制的微阵列点样机按照预先设计顺序进行点样, 点样量很小(5 nl)。这种方法就如打印机打印, 所以有人称为自动化快速打印。即将纯化的 DNA 样品打印到常规纤维素膜和玻片的表面, 形成高密度的 DNA 微集列阵^[11]。

2 DNA 芯片技术在烟草改良中的潜在应用价值

2. 1 基因芯片技术与转基因烟草检测

转基因烟草包括烟草转基因研究材料和转基因烟草品种。无论是哪一种类型的材料, 大量检测时用常规分子技术都会花费大量人力物力。由于工作量很大, 中间某个环节出现问题就会影响检测结果的准确性。将转基

注: 本课题获得国家烟草专卖局资助(110200101006)。

作者简介: 姚忠达(1974-), 男, 安徽省安庆市人, 硕士, 助理农艺师, 主要从事烟草科学研究。

收稿日期: 2002- 03- 06

因所特有的启动子、标记基因、选择基因和目前在 Genbank 中存在的可能用于转基因的序列制作成探针,进而制作成基因芯片,可以快速有效地对大量样品进行检测。

2.2 基因芯片技术与烟草基因表达研究

基因组学的迅速发展已经使相关研究从结构基因组学发展到功能基因组学。也就是说从以往的基因结构研究转向重点研究特定组织、不同的发育阶段或者疾病的不同时期相关基因的表达情况,多个基因及其序列的并行分子遗传学行为和研究方法。每个细胞在某一特定阶段都有数以千计的基因在表达,细胞间基因的表达差异往往能够反映这些细胞是否发育正常,进而确定是否开始病变甚至向恶性肿瘤细胞发展。此外,植物某个性状的表达可能是通过一系列基因表达的综合体现。例如,烟草等作物的系统获得抗病性(SAR)的性状表现过程中存在一系列复杂的生理生化代谢反应,涉及到信号分子的转导等环节,是许多相关基因的表达。虽然目前该领域已经成为植物学科的研究热点之一,并且在分子生物学研究方面取得了诸多进展,但是,这些研究均是在单个基因表达研究的基础上进行的综合,无法同时对多个基因的时空表达情况进行详细的研究。又如,烟草香味物质的产生涉及到十分复杂的代谢过程,其中有大量的基因表达参与。如果期望从遗传学角度实施遗传改良,需要研究这些基因之间的表达关系,甚至是否存在主效基因和辅助基因控制等许多问题,进而才能改造和控制这些基因使其向我们期望的方向组合和表达。这些巨大工作量的分子生物学工作是无法用常规的分子技术实现的。采用基因芯片技术可以根据分子杂交的情况提供大量的多基因差异表达的信息,用生物信息学方法分析处理从而获得有价值的组合。基因芯片技术将给基因克隆、基因表达、疾病诊断和药物筛选带来巨大的革命^[12]。

2.3 基因芯片技术与烟草种子检测

烟草种子纯度是种子质量的重要指标。生产实践中曾因种子混杂而造成生产损失,引起经济纠纷。目前烟草种子纯度鉴定的方法主要是大田植物学性状鉴定和同工酶谱带分析鉴定,其科学性、准确性仍然有待进一步提高。近期的植物分子生物学研究结果已经表明可以筛选出特异的分子探针,将不同的品种加以区别。目前的 RAPD、RFLP、SSR、AFLP 及 PCR 分子标记技术已经成熟,在植物遗传多态性、品种鉴定、基因克隆和分子辅助育种等方面取得了长足的进展。用这些具有多态性的 DNA 片段对烟草品种进行筛选,获得一些特异性的分子探针,制作成基因芯片可以快速、准确对烟草品种的纯度加以鉴定。

2.4 基因芯片技术与烟草分子育种

利用分子生物学技术进行烟草育种的最大难度是缺乏快速、准确的分子检测手段,因而选择也就无从谈起。在水稻等许多作物上进行的分子标记工作进展十分迅

速,已经获得了较为丰富的遗传图谱,利用这些遗传图谱可以将许多性状基因加以定位。烟草这方面研究工作起步较晚,但是借助于其他植物研究的成功经验来开展工作会大大提高研究速度。一旦获得较为丰富的遗传图谱,就可以将重要的性状进行定位。根据对特定性状紧密连锁的分子标记进行筛选可以获得较为理想的选择效果。同时,也可以采用图位克隆法将相关的基因克隆出来,用于烟草的遗传改良。此外,利用一些已经获得的基因类似物或基因片段制作出特异探针在烟草分子辅助育种中发挥作用。由于育种工作需要大量的后代材料实施选择,而常规的分子技术操作上速度远远不能满足需要。而将相关的基因片段制成特异探针,进而制作出相应的基因芯片就可以进行快速鉴定、筛选,可以将分子技术和常规育种充分结合,真正实现分子辅助育种。

当然,DNA 芯片技术对于烟草综合利用的开发方面也具有重要作用。对于选择高蛋白品种、低烟碱品种以及利用烟草作为生物反应器开发防治癌症、艾滋病的药品等方面也同样有明显的作用。其原理和上述的基本相似。

3 参考文献

- 1 Lockhart D J, Dong H, Byrne M C, et al. Expression monitoring by hybridization to highdensity oligonucleotide arrays[J]. *Nature Biotechnology*, 1996, 14: 1675- 1680.
- 2 Saizieu A de, Certa U, Warrington J, et al. Bacterial transcript imaging by hybridization of total RNA to oligonucleotide arrays[J]. *Nature Biotechnology*, 1998, 16: 45- 48.
- 3 Derisi J, Penland L, Brown P O, et al. Use of a cDNA microarray to analyze gene expression patterns in human cancer[J]. *Nature genetics*, 1996, 14: 457- 460.
- 4 Heller R A, Schena M, Chai A, et al. Discovery and analysis of inflammatory disease related genes using cDNA microarray[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94: 2150- 2155.
- 5 Schena M, Shalon D, Davis RW, et al. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray[J]. *Science*, 1995, 270: 467- 470.
- 6 Schena M, Shalon D, Heller R, et al. Parallel human genomic analysis: microarray-based expression monitoring of 1000 genes[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93: 10614- 10619.
- 7 Yershov G, Barsky V, Belgovsky A, et al. DNA analysis and diagnostics on oligonucleotide microarray[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93: 4913- 4918.
- 8 Chen M, Yang R, Fodor S P, et al. Accessing genetic information with high-density DNA arrays[J]. *Science*, 1996, 274: 610- 614.
- 9 Fodor S P, Richard P R, Xiaohua C H, et al. Multiplexed biochemical assays with biological chips[J]. *Nature*, 1993, 364: 555- 556.
- 10 <http://www.affymetrix.com/products/faq.html>.
- 11 Shalon D, Smith S J, Brown P O, et al. A DNA microarray system for analyzing complex DNA samples using two colour fluorescent probe hybridization[J]. *Genome Research*, 1996, 6: 639- 645.
- 12 Scangos G. Drug discovery in postgenomics era[J]. *Nature Biotechnology*, 1997, 15: 1220- 1221. (责任编辑: 夏静 责任校对: 夏静)