

生物芯片应用于海洋生物学领域的前景展望*

PROSPECTS ON APPLICATION OF BIOCHIP TECHNIQUES IN MARINE BIOLOGICAL SCIENCE

梁俊¹ 李道季¹ 卢莉琼²

(¹ 华东师范大学河口海岸国家重点实验室 上海 200062)

(² 华东师范大学环境科学与技术系 上海 200062)

中图分类号 Q81 文献标识码 A 文章编号 1000-3096(2003)03-0013-05

从1994年美国能源部防御研究计划署、俄罗斯科学院和俄罗斯人类基因组计划共同合作研制出第一块生物芯片至今不过短短几年时间,生物芯片却以神奇的速度飞速发展。基因芯片(以及后来的蛋白芯片)已经被广泛应用于新药开发、物种改良、临床诊断、DNA测序、基因表达分析等各个方面。目前,生物芯片技术已经逐渐代替一些传统的方法和手段在生物学研究中扮演越来越重要的角色。

种类繁多的海洋生物是人类有待研究和开发的重要资源。随着陆地资源开发利用日趋达到极限,世界各沿海国家都把注意力集中到了海洋生物资源的研究和开发利用上来。而海洋生物资源的合理开发和利用很大程度上取决于海洋生物技术的研究和水平。因此,将生物芯片技术尽快引入这一领域已经迫在眉睫。本文就生物芯片在海洋生物学领域的应用前景及存在的问题作一展望。

1 生物芯片简介

“生物芯片”是国际上近年来发展起来的一门新兴技术。简单地说,生物芯片技术就是运用大规模集成电路的光刻技术以及生物大分子(蛋白质和DNA)的自组装技术,在一个微小的芯片上构建成千上万不同的蛋白质或DNA的生物分子微阵列及流体分析系统。实现对活体细胞、抗原、基因等进行准确、快速、大规模的测定和分析。实际上,它就是将生命科学研究中许多不连续的实验步骤——样品制备、生化反应和结果检测及分析等集中到芯片上进行(图1),使其连续化、微型化。因此生物芯片又被称为芯片实验室(lab on a chip)^[1]。

生物芯片的诞生有其必然性。随着人类基因组计

划的完成以及其它一些重要生物(大肠杆菌、酵母、水稻等)基因组测序的陆续完成,生命科学研究将从以“结构基因组学”时代进入到破译、识别、解读、开发基因组功能为主的“功能基因组学”时代。面对如此庞大的DNA信息,传统的核酸杂交、蛋白质印迹、RNA酶保护实验、SI核酸酶分析、噬菌斑杂交反应、抗原-抗体反应等分析方法不能提供足够的通量来有效地、快速地利用迅速增加的DNA序列信息资源。为此,必须发展高通量的、平行的检测基因表达的新方法——基因芯片(DNA芯片)。与此同时,人们还发现依靠传统方法来获取生物活性物质(主要是蛋白质)犹如大海捞针,远远不能满足生产、生活的需要。于是,按照DNA芯片的思路人们设计出了蛋白质芯片来解决免疫分析、药物筛选、细胞分析等难题^[2]。

2 在海洋生物学领域的应用前景

目前生物芯片的应用已经给医学、药学、农林等生物学各个领域带来了重大变革。下面就生物芯片在海洋生物学领域的应用前景作一展望。

2.1 生物芯片在海洋微生物的筛选、分类和鉴定中的应用

海洋微生物广泛分布于各种海洋环境中。它是

* 上海市重点学科资助项目及高等学校骨干教师资助计划资助。

第一作者:梁俊,出生于1978年,硕士研究生。目前在研课题:西太平洋日本鳗鲡种群分化的分子生物海洋学研究。

E-mail: junliang@public4.sta.net.cn

收稿日期:2002-07-02;修回日期:2002-08-29

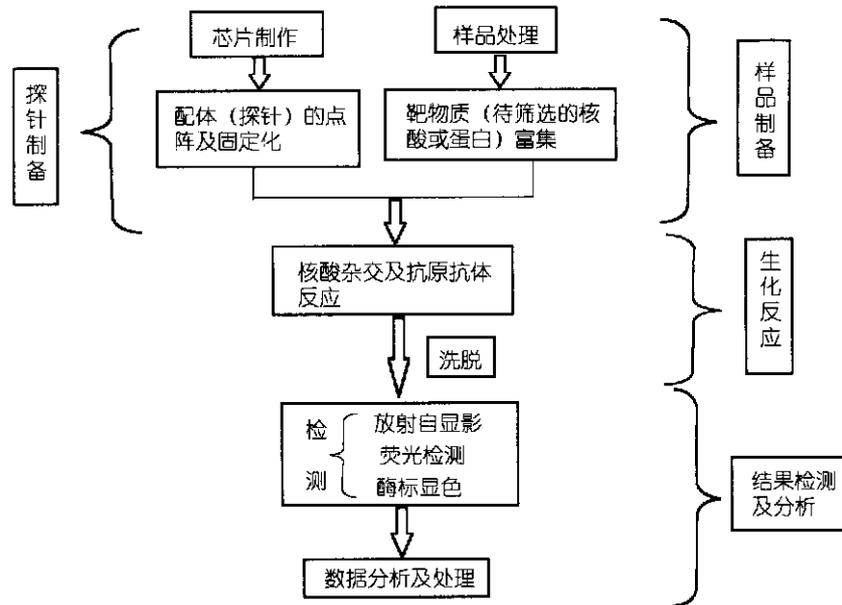


图1 生物芯片的分析步骤

海洋生物学研究的重要对象。对海洋微生物的分离、鉴定是海洋生物学研究的基础工作之一。

2.1.1 海洋微生物的分离

传统的微生物分离方法首先要根据微生物对营养盐、酸碱度、溶解氧等条件需求的不同提供适宜的培养条件。有时还需加入某种抑制剂或采用选择性培养基造成只利于某种菌的生长而抑制其它种类微生物生长的环境,然后再用稀释涂布平板法、稀释混合平板法或平板划线分离法等方法分离、纯化该微生物。其缺点显而易见——费时,培养条件的非特异性,无法实时分离,在转运、培养过程中易造成污染。

为了解决上述问题,从生物芯片诞生之初,人们就已经设计出了专供细胞、菌种分离的样品制备芯片^[3,4]。其原理是在硅芯片上制做一系列各种排列的金属电极和在这些电极上施加高频电场,这样就可以使不同的细胞感受到偶电极。而这些偶电极又反过来使不同的细胞要么承受正介电力,要么承受负介电力,从而将它们从不同的液态样品中分离出来。这种方法其实是将介电电泳的过程转移到了芯片实验室上进行。由于其体积小、操作简单,非常适合在海洋微生物分离(特别是在海上采样后的实时分离)中使用。同时它又避免了传统分离法的缺陷。随着生物芯片技术的日趋成熟,成本的不断下降,相信在不久的将来生物芯片一定会成为海洋微生物分离中的“常规武器”。

2.1.2 海洋微生物的分类、鉴定

对海洋微生物的分类、鉴定是海洋生物学研究的基础工作。其目的是为了认识多种多样的微生物,充分发掘微生物的多样性资源,了解它们之间的亲缘关系,并为微生物资源的开发、利用、控制和改造提供理论依据。

60年代前,微生物的分类、鉴定都是基于形态、生理生化及生态等指标。近年来,随着分子细胞生物学的迅猛发展,微生物的分类、鉴定依据也从经典的表型特征推进到了遗传学特性和细胞的化学组成。但由于传统分子生物学技术和细胞生物学技术在操作上较复杂,且尚未有一套标准的鉴定系统,而且,从海洋环境中分离到的微生物采用上述遗传、生化指标鉴定仍有局限性。比如,Mc Donnell报道,用API20E鉴定海洋及河口细菌时,稀释液的盐度对鉴定结果会产生影响^[5]。因此,人们在不断探索一种新的更有效的分类鉴定方法以适用于海洋微生物的实时分类、鉴定。

近年来,DNA芯片在微生物重要基因(致病基因、抗药性基因)的筛选,以及直接分析细菌基因组进行菌种鉴定已有不少成功的报道。比如:Gingeras^[6]、Troesch^[7]用枝杆菌DNA芯片杂交图像进行基因分型和菌种鉴定,并对利福平的抗药性基因进行了筛选、检测。由于细菌、病毒等微生物的基因组上常带有编码致病基因、抗药性基因的DNA序列。这些序列的差异可以被用作基因分型或菌种鉴定的依据。因此,

我们就可以利用已知的编码这些基因的 DNA 序列作为探针,将其固定在杂交芯片上。利用样品制备芯片首先分离海洋微生物样品,富集培养后的菌液经高压脉冲胞解后,释放出细胞内含的 DNA 及 RNA 作为靶物质与杂交芯片进行杂交反应。在获得杂交图像后,形成一套某一物种所特有的 DNA 指纹图。Gingeras 等人^[6]利用 ηpB 寡核苷酸芯片对 10 种分枝杆菌的菌种鉴定结果表明,每种菌种的杂交图像十分稳定、保守性强、重复性非常好。

虽然用生物芯片对微生物进行分类和鉴定仅仅是一种尝试,但其技术上的优越性已经显露无疑。相信随着生物芯片技术日趋成熟,海洋微藻、细菌的特异性表达基因不断发现,生物芯片在海洋微生物分类和鉴定领域的应用前景将十分广阔。

2.2 生物芯片应用于海洋动物基因的克隆选择及 cDNA 文库筛选

基因工程技术是现代生物学史上的一次革命。它给分子生物学带来了革命性的进步。简单地说,基因工程就是将含有目的基因的异源 DNA 组合进载体分子中,并使它在宿主系统中扩增和表达。它的应用已经使胰岛素、多种细胞因子、生长激素等重要的生物大分子成功地在原核生物及一些哺乳动物的特定器官(乳腺)中异源表达。这项技术在海洋生物学领域应用前景十分广阔。首先从生物多样性的角度看,海洋生物多样性资源是陆地生物所不能比拟的。这些生物为了适应海洋这一特殊环境,自身产生了大量有价值的生物大分子,如激素、细胞因子等^[8]。正因为如此,越来越多的人将基因工程今后发展的空间定位在海洋。他们首先遇到的问题便是目的基因的筛选。从浩瀚的基因库中选择某一特定的目的基因好比大海捞针。而且由于真核生物基因组上内含子的存在,直接从基因组上筛选目的基因几乎不可能。使用传统的 Southern Blotting 等方法筛选 cDNA 文库步骤又太复杂、太费时。为了能更有效地利用世界上 16 万~20 万种海洋生物的遗传因子资源,迫切需要引入一门新技术以更高效地进行目的基因的克隆选择。

生物芯片的诞生使得人们有可能将复杂的分子杂交、显影等步骤转移到“芯片实验室”上进行,做到自动化实时检测。其原理是将已知序列的编码生物大分子的靶基因片段以点阵的形式固定在芯片上,然后将 cDNA 文库中的各 cDNA 克隆与之杂交,研究这些靶基因的差异性表达。最终在文库中筛选出相关基因。Schna 等人^[9]曾经通过双色差示表达系统研究人 T 淋巴细胞在热休克条件下及佛波酯作用下 1046 个未知序列的 cDNA 基因诱导表达的情况。生物芯片筛

选的结果发现,两种方式均诱导了其相关基因的表达。通过对 cDNA 测序并与已知基因比对证实了生物芯片筛选结果的可靠性。这是利用基因芯片在 cDNA 水平上筛选目的基因的成功范例。最近,Ziauddin 等人^[10]运用类似方法将 192 种哺乳动物的 cDNA 片段与芯片杂交,筛选出了酪氨酸激酶、细胞凋亡因子和细胞粘连信号的基因。Icker 等人^[11]最近又用 DNA 芯片证实了酵母菌的乳糖代谢途径中至少 997 种相关的 mRNA 有表达,而且至少有 15~298 种蛋白质与转录后修饰有关。从浩瀚的基因文库中筛选这些特定基因,依靠传统的方法是很难有如此高的通量和效率的。

除了在核酸水平的研究之外,Max Planck 领导的研究小组最近利用蛋白质芯片对抗体筛选进行了尝试^[12]。结果证明,该芯片筛选出的抗体分子具有与单克隆抗体相似的特异性,由于蛋白质芯片并不只限于抗原-抗体反应,因此它可以普遍适用于受体-配体相互作用分析。在此基础上 Zhu 等人^[13]已经开始用蛋白质芯片对酵母的蛋白质组进行了蛋白质的功能及与其它生物大分子(磷脂、激素)相互作用关系的研究。

当然,生物芯片技术要想在海洋生物基因工程领域中得到广泛应用还有一些困难亟待解决。首先,还有很多海洋生物还没有被人类发现,即使在所有发现的海洋生物中,还有不少尚未构建 cDNA 文库。其次,在发现的大量海洋生物提取物中,特别是微藻提取物或其细胞产物中活性成分的性质尚不清楚^[5]。相信随着各国加大对海洋生物资源开发的投入,这些问题一定会得到有效解决,届时生物芯片一定能找到其用武之地。

2.3 生物芯片用于检测海洋生物的遗传多样性

目前,生物多样性资源的保护已经成为重大环境问题之一,其中心环节就是遗传多样性的保护^[14]。与陆地生物相比,海洋生物在整个自然界生物多样性资源中占有显著重要的位置。海洋生物遗传多样性的检测技术在海洋生物多样性保护以及海洋生物资源开发、利用中无疑起到十分重要的作用。

早期的种群遗传学研究多以形态性状、生理性状、杂交亲和性及生态地理分布作为遗传标记,反映其遗传多样性。但这些建立在个体性状、描述水平和宏观水平上的结论往往是不完善的。表型的变异如果没有经过遗传分析确证,严格来讲是不能称为变异的。随着生物学的研究深入到细胞学水平、分子生物学水平之后,染色体的多态性、蛋白质(等位酶)的多

态性和 DNA 分子标记的多态性逐渐成为研究生物遗传多样性的重要工具。但是, 这些方法仍有不少缺陷。比如, 对于染色体数目相等、形态相似的种群或同一种群的不同个体来说, 单用染色体多态性来研究其遗传多样性是不够的。而等位酶作为基因表达的产物而非基因本身, 因此, 等位酶分析也有其内在局限性。进入 20 世纪 90 年代之后, 随着分子生物学技术的迅猛发展, 人们建立了许多 DNA 标记技术 (RFLP、DNA 指纹、小卫星 DNA、微卫星 DNA、RAPD、实时定量 PCR 等) 直接检测基因组的遗传变异, 为遗传多样性的检测提供最直接的证据。但这些方法都有其应用上的局限性, 生物芯片技术的出现为这些方法提供了有益的补充。此外对于海洋生物这一特殊研究对象来说还牵涉到一个样品检验的实时性问题^[15], 这正是生物芯片技术之长处。

为了更好地适应海洋环境中生物遗传多样性检测的要求, 迫切需要一种新技术, 它能够将复杂的分子杂交、显影、PCR 扩增等复杂的实验步骤简化甚至归并, 以适应海洋环境中大规模实时检测和分析 DNA 的变异及多态性。Guo 等人^[14]在 SBH (Sequencing by Hybridization) 技术的基础上, 建立了简单、快速的基因多态性分析方法——DAFT (Direct Allele-Specific Fluorescence Targeting)。他首先将等位基因特异性的寡核苷酸共价固定于玻璃片 (载体) 上, 然后设计一荧光标记的 PCR 引物来扩增基因组 DNA, 将扩增后的基因组 DNA 的片段与寡核苷酸杂交, 并用荧光扫描杂交后的信号。用此方法对人的酪氨酸激酶基因第四个外显子内含有的 5 个单核苷酸突变进行分析, 结果发现, 这种方法可以快速、定量地获得突变基因的信息。随着芯片制造技术的日趋进步, DNA 芯片现在不仅可以准确地确定突变位点及突变类型, 更主要的是它可以同时检测多个基因乃至更长碱基序列的突变。随后, Chee 等人^[16]用含有 1.35×10^5 个长度为 25 个单核苷酸的寡核苷酸探针, 分析了 16.6kB 的人类线粒体 DNA, 在 10 个样本中共检出 505 个多态性位点。此外, Cronin^[17]设计了一种含有 1 480 个探针的芯片来检测囊性纤维化跨膜传导调节 (CFTR) 基因的突变, 他将检测结果与传统的 PCR-RFLP 分析结果进行比对后发现结果完全一致, 而 DAFT 的快速、高效的优点却是其它方法所无法比拟的。

作为一种新兴的遗传多样性检测技术, DAFT 尚未得到广泛应用。由于海洋环境的特殊性, 相信这门新技术将在今后的海洋生物遗传多样性检测中发挥巨大作用。

2.4 生物芯片应用于海洋环境质量的生物监测

海洋环境质量生物监测是利用海洋生物个体、

种群或群落对海洋环境污染或其变化所产生的反应来判定海洋环境污染状况及变化动态。自 1916 年德国生物学家 J. Wilhelmi 用小头虫 (*Capitella capitata*) 作为有机物污染的指示生物进行海洋环境监测以来, 有关海洋环境生物监测技术有了长足的发展。目前海洋环境质量的生物监测, 已经由采用单种生物个体数量变化作为监测指标发展到了采用生物个体的形态、生理和生化指标作为监测依据的新阶段^[15]。

其中, 特别值得一提的是利用高度特异性的混合功能氧化酶 (MFO) 和金属硫蛋白作为指标监测海洋环境污染。

简单地说, 生物体内 MFO 的含量与有机类杀虫剂 (包括石油碳氢化合物) 的代谢有关。而金属硫蛋白则参与酶促反应, 参与金属的解毒。这两种反应都是高度特异性的, 灵敏度非常高, 具有较高的信噪比。但是作为一种生化指标, 它们的测定需要昂贵的仪器设备以及大量的时间和金钱, 而且由于蛋白质容易失活, 这两个指标必须现场测定。正因为上述种种限制, 这两种监测方法至今未能广泛应用。

根据前人设计的蛋白质芯片的思路^[2], 笔者认为完全有可能设计出一种蛋白质芯片。首先将与 MFO 或金属硫蛋白特异性结合的荧光标记抗体固定于芯片上, 然后与生物样品进行杂交反应。最后通过荧光扫描来检测信号强度以定量测定 MFO 或金属硫蛋白的含量。虽然目前尚未有人进行过这方面的尝试, 但是相信利用生物芯片技术优化后的这两项检测指标一定会成为海洋环境质量生物监测领域的常规监测指标, 生物芯片的应用必将对海洋环境监测技术产生深远影响。

2.5 生物芯片用于筛选海洋生物活性物质

从广义上讲, 海洋生物活性物质的研究与开发属于海洋生物技术的范畴^[15]。由于海洋特殊的环境使海洋生物活性物质具有很多独特的性质。首先, 海洋生物体内含有大量的萜类、肽类、氨基酸类、脂肪酸类、生物碱、有机酸、皂甙、多氧和多醚类物质。它们中很多都具有很有意义的化学性质和显著的生理活性。其次, 由于海洋生物物种间的相互作用过程远比陆生生物复杂和广泛, 其个体之间相互作用多通过化学物质在物种间传递信息。因此, 对海洋生物活性物质的研究和分析具有重大意义。

各国对海洋生物活性物质的兴趣大多集中在开发新的药物上。有关专家认为, 当今工业化规模的新药开发有三大技术支柱^[18]: (1) 为新药开发提供新的化合物源; (2) 提供新的作用靶标; (3) 提供有效的筛选方法。

海洋中丰富的生物资源为我们所提供的大量生物活性物质无疑为第一个关键问题提供了最佳的解

决方案。而生物芯片作为一种高度集成化的分析手段,恰好能够应对后两个关键问题,即:新靶标的选择和筛选效率的提高。

选择合适的药物作用靶标是基于机理药物筛选乃至定向合成的关键因素之一。选用的靶标应兼具灵敏性和特异性,并且易于放大。随着人类社会的进步、疾病谱的改变和社会环境因素对流行病学的影响,确定、筛选靶标越来越困难。利用生物芯片可以比较正常组织(细胞)及病变组织(细胞)中大量相关基因表达的变化,从而发现一组疾病相关基因作为药物筛选靶标。这种方法尤其适用于病因复杂或尚未有定论的情况,如恶性肿瘤相关基因的发掘^[19]。

生物活性物质的筛选工作量大、花费多,而且由于人们对海洋生物的研究还不够深入,海洋生物活性物质的筛选是一件苦差事。随着生物芯片的引入,这项工作已经广泛开展了起来。生物活性物质(天然药物)的筛选要求平行、快速,生物芯片这种高通量、多参数而又近乎实时的筛选方式无疑具有巨大的优越性。其中,cDNA芯片可以用于反义寡核苷酸类药物的筛选。至于以酶受体、抗体等蛋白质分子作为靶标的筛选系统,各类蛋白质芯片可以给出充足的信息。

虽然生物芯片在选择药物靶标及多靶位同步高通量药物筛选等领域具有无可比拟的优势。但由于海洋生物这一研究对象的特殊性,这种新技术至今尚未在这一领域得以广泛应用。目前的困难在于:(1)由于生存环境上的差异,海洋生物与陆生生物体内活性物质的结构、作用方式不尽相同。因此,无法用传统的给体-配体反应(以陆生生物活性物质为探针进行杂交反应)简单地确定某种生物活性物质。(2)海洋生物的基因信息库还不完全,可以用做靶标的cDNA序列仅限于有限的几种海洋生物。随着各国开始重视从海洋中开发天然药物的重要性,不断加大在这方面的投入,海洋生物学的基础资料将越来越丰富。同时,随着生物芯片技术的日趋成熟,成本的不断下降。这两者的结合必将对全球制药工业产生巨大冲击——新药开发的成本、周期将大大降低,将会有越来越多的高效天然药物投向市场,从而进一步提高人类的生活质量。

3 结语

随着生物芯片研究与开发的不断深入,海洋生物技术的进一步发展和应用必将为人类提供更多、更好的生物制品,必将为人类定向改良海洋生物的遗传特性、保护海洋生态系统的良性循环做出应有的贡献。

参考文献

1 陆祖宏. 生物芯片的研究、发展和应用. 电子科技导报, 1998, 11: 5-9

2 许俊泉. 生物芯片技术的发展与应用. 科学通报, 1999, 44(24): 2600-2606

3 Cheng J. Electric field controlled preparation and hybridization analysis of DNA/RNA from *E. coli* on microfabricated bioelectronic chips. *Nature Biotechnology*, 1998b, 16: 541-546

4 Cheng J. Sample preparation in microstructured devices. In: Manz A, Becker H. *Microsystem Technology in Chemistry and Life Science*, a special volume in *Topics in Current Chemistry*. Heidelberg: Springer, 1998. 215-231

5 张士瑾. 海洋生物技术原理和应用. 北京: 海洋出版社, 1998. 1-20

6 Gingeras T R. Simultaneous genotyping and species identification using hybridization pattern recognition analysis of generic mycobacterium DNA arrays. *Genome Research*, 1998, 8(5): 435-438

7 Troesch A. Mycobacterium species identification and rifampin resistance testing with high density DNA probe arrays. *Journal of Clinical Microbiology*, 1999, 37(1): 49-55

8 Degnan B M. Molecular analysis of invertebrate development and growth: Identification of developmentally regulated genes in model and commercially important species. In: Keith E C. *Molecular approaches to the study of the ocean*. London: Chapman & Hall, 1998. 343-358

9 Schena M. Parallel human genome analysis: microarray-based expression monitoring of 1000 genes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93(20): 10 614-10 619

10 Ziauddin J, Sabatini D M. Microarrays of cells expressing defined cDNAs. *Nature*, 2001, 411: 107-110

11 Ideker T. Integrated genomic and proteomic analyses of a systematically perturbed metabolic network. *Science*, 2001, 292: 929-934

12 Lueking A. Protein microarrays for gene expression and antibody screening. *Analytical Biochemistry*, 1999, 270: 103-111

13 Zhu H. Global analysis of protein activities using proteome chips. *Science*, 2001, 293: 2 101-2 105

14 Guo Z. Direct fluorescence analysis of genetic polymorphisms by hybridization with oligonucleotides arrays on glass supports. *Nucleic Acids Research*, 1994, 22(24): 5 456-5 465

15 曾呈奎. 海洋生物技术. 山东: 山东科学出版社, 1998. 199-661

16 Chee M. Accessing genetic information with high density DNA arrays. *Science*, 1996, 274: 610-614

17 Cronin M T. Cystic fibrosis mutation by hybridization to light generated DNA probe DNA arrays. *Hum Mutat*, 1996, 7(3): 244-255

18 马立人. 生物芯片. 北京: 化学工业出版社, 2000. 194-198

19 Berns A. Cancer: Gene expression in diagnosis. *Nature*, 2000, 403: 491-492

(本文编辑:刘珊珊)