

基因芯片技术在诊断微生物学中的研究进展及应用

田美慧, 杨洪一

(东北林业大学 生命科学院, 黑龙江 哈尔滨 150040)

摘要:近年来,基因芯片技术发展迅速,已广泛应用于多种领域,被视为一次意义深远的现代科技革命。通过总结基因芯片制备技术及其在诊断微生物学的应用进展,分析目前在临床应用中存在的问题和不足,指出基因序列信息缺乏和专利限制等因素是制约该技术发展和应用的瓶颈,为未来基因芯片技术的发展提供参考和借鉴。

关键词:基因芯片;诊断微生物学;临床应用

中图分类号:Q789 **文献标识码:**A **文章编号:**1002-2767(2015)07-0168-03 DOI:10.11942/j.issn1002-2767.2015.07.0168

基因芯片技术是近 20 年来分子生物学技术的重大发明,已经逐渐被应用到各个领域,在微生物的诊断方面,这一技术更是起到了决定性的作用。与传统的诊断方法相比较,它缩短了检测时间,提升了效率,且敏感程度极高,因此这一技术的应用将会为诊断微生物学的研究带来更加广阔的前景。

1 诊断微生物学

诊断微生物学(Diagnostic Microbiology)是一门研究临床常见微生物的相关检测和诊断技术的学科^[1]。为了准确获取微生物诊断的结果,需在严格消毒确保无菌的条件下,从濒临死亡或死亡几小时内的动物体中采取病料来保持病料新鲜,根据临床初步诊断所怀疑的若干种疾病以及需要检查的项目来确定采集病料的种类。

使用传统的鉴别方法采样后,需要先对微生物进行培养,待长出菌落后才能开始鉴定,整个过程鉴定周期长且精确度不高。现代分子技术的快速发展和应用无疑为这门学科解决很多问题,例如在核酸检测方法正式应用之前,需要用组织培养的方法来寻找脑脊液中单纯的疱疹病毒几乎是一项不可能完成的任务,而现在则可以利用分子技术直接在待检 DNA 上检测,几小时之内就可以确定是否有病毒存在^[2]。利用基因芯片技术还能够快速、准确、高效的进行诊断,例如疱疹性脑炎是儿童常见的中枢神经系统的感染性疾病,与

疱疹病毒的 DNA 具有较高的同源性,利用多聚酶基因区设计引物和寡核苷酸探针,制成基因芯片,用多重 PCR 技术可以一次性同时扩增并标记鉴定分型 7 种人的疱疹病毒,整个检测过程只需 4~5 h^[3]。

2 诊断微生物学中基因芯片的制备

基因芯片(gene chip)又称 DNA 芯片(DNA chip)、DNA 微阵列(DNA microarray)、生物芯片,它可以把数目大的核酸片段(寡聚核苷酸、cDNA、基因组 DNA)按照前期所设定的顺序依次固定在硅片、玻片等载体之上,构成一个二维 DNA 探针阵列,然后将目的基因和芯片上的探针分子进行杂交,通过检测杂交后的信号强度来获取目的基因的序列信息^[4]。基因芯片作为一种先进大规模、高通量、连续自动化的检测技术,其主要的优点有:高度灵敏、准确;快速简便;可同时检测多种疾病。

2.1 探针的设计

核糖体是细菌具有的唯一一个细胞器结构,是将氨基酸合成蛋白质的分子机器。编码 rRNA 的基因碱基序列是按照 16S—23S—5S 的顺序排列的,被两个非编码区间隔开,16S rDNA、23S rDNA 和 5S rDNA 这三个组分共同形成一个 RNA 操纵子。通常 16S rDNA 和 23S rDNA 序列都可以作为较理想的基因序列,这两段基因序列都是由保守区和可变区共同组成的,承担的是生物学中最重要的功能,在进化的压力下逐渐演变为保守区。可以在很多细菌细胞中找到,它来源广、通用性强,因此是最合适的探针来源。

2.2 载体材料的选择

载体表面应该选择可在结合之后发生化学变

收稿日期:2015-02-02

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31300573)

第一作者简介:田美慧(1988-),女,黑龙江省双鸭山市人,硕士,从事微生物学研究,E-mail:tianmeihui88@126.com。

通讯作者:杨洪一(1978-),男,吉林省九台市人,博士,副教授,从事微生物学研究。E-mail:yhyil@sohu.com。

化的基团,使 DNA 分子之间进行偶联,同时载体的性质必须非常稳定,因为只有稳定程度高且具备优良化学性质的载体,才可以在反应过程中承受透射光或反射光的多次测量。通常这两类材料可作为载体即固体片状和薄膜状。其中玻片、硅片和瓷片等是主要的固体片状材料,而膜性材料主要有硝酸纤维素膜、尼龙膜以及聚丙烯膜等^[5]。

2.3 芯片的制备

原位合成法是以组合化学的合成原理作为基础,利用一组定位模板来确定基片表面化学性质不同的个体联位点及其排列次序,并以此为基础将探针直接在载体上进行合成。这个过程中最重要的是高空间分辨率通过基板定位技术和高产率的 DNA 化学合成技术的完美结合。光去保护并行合成法、虚拟掩模法、喷印合成法、光致酸合成法和分子印章原位合成法等都是常用的方法^[6]。其中合成法优先制成的探针在使用特定的高速点样机器后直接将其喷接在芯片上,这一过程必须有数个细微加样孔的阵列复制器或阵列器和被电脑直接控制的机器人所共同完成的,所使用的机器人需具备一套由计算机直接操控的三维移动装置,以确保机器人可以精确的将探针定位在预先设计好的位置上,然后在芯片的基板之上形成直径大约为 100~150 μm 的斑点,再使用紫外光交联固定最终即可获得 DNA 微阵列^[7]。目前也有一些技术使用肽核酸,它是以多肽骨架取代糖磷酸主链的 DNA 类似物,而后使用亚甲基酰来完成碱基的连接,使用这种分子合成方式难度较低,所形成的分子不会因为遇到核酸酶而降解,在杂交过程中对外界条件的要求也没有 DNA 高,最关键的是在 PNA 链式结构中不带负电荷、不存在磷酸骨架,这就导致 PNA/RNA 或 PNA/DNA 双链结合的稳定性和特异性都很高,具有很强的信号,这种分子探针已经在很多实验室开展应用,并获得了成功^[8]。

3 诊断微生物研究中基因芯片的临床应用进展

3.1 检测微生物病原菌中的致病因子

大部分致病基因都受特定条件调节的影响,因此基因芯片技术除了应用比较基因组技术对病原菌中的致病因子检测外,还可以应用于致病菌与寄主作用过程的检测。Israel 等^[9]将基因芯片技术应用在比较 *Helicobacter pylori* 菌种间基因组差异的研究,并获得了一些致病候选基因,通过

比较两个致病不同程度的 *H1pylori* 菌株,发现这两个菌株在调节上皮细胞对炎症反应能力的高低取决于是否存在一个完整的致病岛。实践证明应用基因芯片技术对受病原菌侵染的寄主的基因组转录水平的变化研究存在着巨大潜力,今后可以将该技术与常规检验分析手段结合起来,会更有助于揭示寄主与病原菌的致病机理。

3.2 病原微生物的鉴定分类

近年来,基因芯片技术已经多次应用在病原微生物的鉴定分类上,通过对重要基因的筛选可直接分析细菌的基因组,并进行菌种鉴定及分类,比如全基因组芯片技术就能够弥补传统的 16S rRNA 的分类方法不能全面的对许多微生物进行系统分类的这一缺陷。核糖体基因(rDNA)被视为分子分类学上的“金指标”,因为它在进化过程中具有相当的保守性,因此 rDNA 可作为重要的探针。Anthony^[10]通过应用基因芯片技术,可在 4 h 内对菌液进行快速的诊断鉴定,且准确率可高达 77.8%。Lorelei 等^[11]在同一张基因芯片上,通过原位扩增检测了能够代表细菌特异性种类的基因,成功实现了对细菌种类进行鉴定和分类。翟俊辉等^[12]通过制备大肠杆菌、伤寒门氏菌等 20 多种细菌的基因芯片,成功的检测到临床常见的感染性细菌。蒋红霞等^[13]应用寡核苷酸芯片检测到了 3 种病原菌的 *gyrA* 基因的 83 位和 87 位发生的突变。未来基因芯片技术将会生产代表微生物物种的 16S rRNA 序列、23S rRNA 序列和许多具有重要功能的基因芯片,这种芯片将在众多行业和领域得到广泛应用和发展。

3.3 新的致病基因的发现

很多疾病的发生都是由基因导致的,传统分子生物学方法在解释生物生理过程中众多基因间的互作、序列信息都不够全面,而基因芯片技术可以完全弥补这些缺陷,对一些疾病进行早期准确的诊断和医治,尤其是对强致病基因的发现。Heller 等^[14]利用基因芯片技术研究了肠炎类风湿关节炎的组织基因,通过对差异表达基因的分析鉴定,发现了 IL-3、Gro-A 等相关基因。Wang 等^[15]利用基因芯片技术筛选出了肿瘤细胞中耐药性的相关基因,其中的两个新耐药基因分别 c-Yes、c-Flip。Yao 等^[16]利用基因芯片技术,通过分析乳腺癌基因的表达式,发现了 2 个致癌新基因: *H2AFJ* 和 *EPS8*。同样利用基因芯片技术, Madsen^[17]用基因芯片技术研究发现了温度对肺

炎球菌基因表达量的差异,还发现了超过 90 个未知功能的新基因。

3.4 药物、抑制剂等作用途径

抑制细胞的代谢会对细胞的反馈调控和基因的表达产生影响,而基因芯片技术的应用将有助于阐释药物、抑制剂等有害成分对基因的作用及表达的影响。Wilson 等^[18]通过基因芯片技术用抗肺结核药物如异烟肼对肺结核菌做了诱导处理,结果表达了相关的蛋白。实践证明药物不仅会使与之互作基因的表达量发生改变,还会影响并诱导该药物毒副作用的相关基因的表达。除此之外,随着用药时间的加长,同时伴随着抗药性的发生。因此,可以利用基因芯片技术研发毒副作用较小、难产生病原菌抗性的新药。在基因芯片的发展带动下,对新药物的研发和医疗事业的发展起到了助推的作用。

4 结论

基因芯片技术是一门集多学科交叉融合而成的衍生科技,其发展之迅速已在医学、农业、环境等诸多领域得到了广泛的应用^[19]。基因芯片技术实现了将量化概念与高通量信息学的合并分析,使诊断微生物学从传统的“形态学+生化反应+血清学”的思维模式转型为大规模集成化的新型数据体系^[20]。这种突破不但提高了微生物学的诊断速度与质量,还揭示出了许多过去没能被发现的生物学规律。相比其它技术,基因芯片在微生物检测方面有其独有的优越性,但仍需继续完善,比如基因序列信息缺乏、基因芯片技术专利的限制、芯片检测的费用过高等相关技术急需改进与提高^[21]。

参考文献:

- [1] 刘怡,曾照芳. 诊断微生物学的基因芯片的研制与进展[J]. 国际检验医学杂志,2006,27(6):518-520.
- [2] 郇凡,吴亦栋,尚世强. 常见人疱疹病毒 PCR-基因芯片技术快速诊断儿童疱疹性脑炎[J]. 浙江医学,2009,31(5):718-719.
- [3] 朱艳敏,吴亦栋,尚世强. 检测 7 种疱疹病毒的基因芯片法及其初步应用[J]. 临床检验杂志,2009,27(5):363-365.
- [4] 曹明楠,崔俊,李卫东. 基因芯片技术在抗肿瘤药物研究和肿瘤诊断中的应用[J]. 中国药理学与毒理学杂志,2014,28(6):932-938.
- [5] 王晓银,朱峰,王在学,等. 一次染色清染色液在宫颈快速细胞学微生物学诊断及宫颈癌筛查中的应用[J]. 国际妇产科学杂志,2014,41(1):57-59.
- [6] 王洪水,侯相山. 基因芯片技术研究进展[J]. 安徽农业科

学,2007,35(8):2241-2243.

- [7] 谭仕旦,易志恩,谭大平. 山羊腐败梭菌、巴氏杆菌混合感染的微生物学诊断[J]. 江苏农业科学,2009(5):211-212.
- [8] 陈杏春,赵丽,林伟,等. 颗粒链球菌引起感染性心内膜炎的微生物学诊断与临床治疗分析 [J]. 中华检验医学杂志,2009,32(3):288-290.
- [9] Israel D A ,Salama N ,Arnold C N ,et al. Helicobacter pylori strain specific differences in genetic content ,identified by microarray ,influence host inflammatory responses [J]. J Clin Invest,2001,107:611-620.
- [10] Anthony R M,Brown T J,French G L. Rapid diagnosis of bacteremia by universal amplification of 23S ribosomal DNA followed by hybridization to an oligonucleotide array[J]. J Clin Microbio,2000,38(2):781-788.
- [11] 宋振强,王江辉,薛双,等. 基因芯片在动物医学中的应用进展[J]. 郑州牧业工程高等专科学校学报,2006,26(2):21-22.
- [12] 翟俊辉,郭兆彪. 16SrDNA 基因芯片检测临床常见感染性细菌[J]. 临床检验杂志,2002,20(3):133-137.
- [13] 蒋红霞,陈仗榴,寡核苷酸芯片检测兽医病原菌耐药性研究[J]. 中国农业科学,2004,37(9):1385-1389.
- [14] Heller R A,Schena M,Chai A,et al. Discovery and analysis of inflammatory disease-related genes using cDNA microarrays[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences,1997,94(6):2150-2155.
- [15] Wang W,Cassidy J,O'Brien V,et al. Mechanistic and predictive profiling of 5-Fluorouracil resistance in human cancer cells[J]. Cancer research,2004,64(22):8167-8176.
- [16] Yao J,Weremowicz S,Feng B,et al. Combined cDNA array comparative genomic hybridization and serial analysis of gene expression analysis of breast tumor progression[J]. Cancer Research,2006,66(8):4065-4078.
- [17] Madsen M L,Nettleton D,Thacker E L,et al. Transcriptional profiling of Mycoplasma hyopneumoniae during heat shock using microarrays[J]. Infection and immunity,2006,74(1):160-166.
- [18] Wilson M,DeRisi J,Kristensen H,et al. Exploring drug-induced alterations in gene expression in Mycobacterium tuberculosis by microarray hybridization[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences,1999,96(22):12833-12838.
- [19] 周美启,周逸平,汪克明. 基因芯片技术在中医药领域中的应用研究进展[J]. 安徽中医学院学报,2006,25(1):49-53.
- [20] Tripathy S,Kumar N,Mohanty S,et al. Characterisation of Pseudomonas aeruginosa isolated from freshwater culture systems[J]. Microbiological Research,2007,162(4):391-396.
- [21] 饶志明,张荣珍,王正祥,等. 基因芯片技术在微生物学研究中的应用[J]. 中国生物工程杂志,2003,23(8):61-65.

黑龙江县区农业科技园区建设与持续发展对策

潘大海, 张 颖, 雷光宇
(东北农业大学, 黑龙江 哈尔滨 150030)

摘要:黑龙江省通过农业科技合作共建,建立了覆盖全省的县区农业科技示范园区,对促进县域农业经济发展发挥了巨大作用。通过简要介绍农业科技园区的分类、县区农业科技园区的功能与作用,分析了黑龙江省县区农业科技示范区的发展现状和存在的问题,提出了可持续发展的对策。

关键词:黑龙江省;县区农业科技园区;持续发展策略

中图分类号:F306.3 **文献标识码:**A **文章编号:**1002-2767(2015)07-0171-04 **DOI:**10.11942/j.issn1002-2767.2015.07.0171

农业科技园区在我国已经历了 20 a 的历程,国家农业科技园区自设立以来,引进新品种 3.82 万个并示范和推广;建成科技示范区 333.3 万 hm^2 ,19 万农户直接参与,取得了巨大的经济效益和社会效益^[1-2]。目前对国家级园区进行了广泛而深入的探讨,但专门针对县区农业科技园区的研究和报道甚少。黑龙江省自 2003 年开始组织有关大学、农业科研院所的农业推广部门在全省 66 县区开展农业科技合作共建,在每个共建县区都建立了县级农业科技园区,使得基层农技人员和广大农民的科技素质得到了提高,农业标准化生产水平得到提高,农业科技成果的转化率得到

提高,农民收入水平得到提高^[3]。促进了当地农业经济发展,取得了较好的经济效益和社会效益^[4]。本文旨在通过深入了解科技园区对当地农业生产的技术辐射带动和引领作用,分析黑龙江县区农业科技园区建设过程中的现状和问题,并提出一些探索性的建议。

1 农业科技园区的分类

从类型上看,蒋和平对现代农业科技园区分区进行了专门研究,他依据国家和地方项目、经营方式、生态类型和科技示范目的等,把当前的园区划分成多种类型。其中按国家和地方项目来划分,包括国家级农业高新技术开发区和省、市级农业科技园区等。依据上述分类方法,县区政府参与投资创办的示范区称为县区农业科技园区。县区农业科技园区一般硬件投入少,示范项目和当地农业生产关系密切。

收稿日期:2015-01-16
第一作者简介:潘大海(1982-),男,黑龙江省哈尔滨市人,学士,工程师,从事农业科技管理工作。E-mail: pandaihai@sinac.com。

Research on Development and Application of Gene Chip in Diagnostic Microbiology

TIAN Mei-hui, YANG Hong-yi
(College of Life Science, Northeast Forestry University, Harbin, Heilongjiang 150040)

Abstract: In recent years, gene chip technology had rapidly developed and also been widely applied, therefore it was regarded as a revolution in science and technology. The application of gene chip in pathogenic microorganism-caused diseases diagnosis had been made the breakthrough as well, and it would become an effective technical means in some complex diagnosis and treatment. The development of the gene chip and its application in the diagnosis of microbiology were reviewed, and the problems in clinic application were pointed out. The results concluded that the lack of genome sequence and the patent issues were the main limit factors in the technique development as a suggestion for the future improvement.

Keywords: gene chip; microbiological techniques; clinical application