基因指纹和芯片技术 在生物资源调查和标本整理中的应用

张于光¹ 刘学端² 李迪强¹

(1. 中国林业科学研究院森林生态环境与保护研究所, 国家林业局森林生态环境重点实验室, 北京 100091; 2. 中南大学资源加工与生物工程学院, 湖南长沙 410083)

摘要: 随着PCR技术的广泛应用, 基因指纹和芯片技术得到快速发展, 已成为分子生物学研究的重要手段并得到广泛应用。文章首先综述了目前常用的基因指纹和芯片技术及其优缺点。常用的技术有: DNA限制性片段长度多态性分析(RFLP)、随机扩增多态性DNA分析(RAPD)、扩增片段长度多态性分析(AFLP)、微卫星DNA多态性分析(SSR)、单核苷酸多态性分析(SNP)等。然后简要概述这些技术在生物资源调查和标本整理中的应用。主要应用于物种鉴定和分类、个体识别和种群数量调查、资源植物关键信息研究等。最后展望这些技术在生物资源调查和标本整理中的应用。

关键词: 基因指纹; 基因芯片; 生物资源调查; 标本整理

中图分类号: Q949

文献标识码: A

DOI: 10.3772/j.issn.1674-1544.2010.02.013

Application of Gene Fingerprint and Biochip Techniques in Biological Resource Investigation and Specimen Inventory

Zhang Yuguang¹, Liu Xueduan², Li Diqiang¹

(1. Institute of Forest Ecology, Environment and Protection, and the Key Laboratory of Forest Ecology and Environment of State Forestry Administration, Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091;
2. School of Minerals Processing and Bioengineering, Central South University, Changsha 410083)

Abstract: With the development of PCR technique, gene fingerprint and biochip techniques have a rapid evolution and become one of the important tools in molecular biology study. At present, the gene fingerprint techniques including: DNA restriction fragment length polymorphism (RFLP), random amplified polymorphic DNA (RAPD), amplified fragment length polymorphism (AFLP), simple sequence repeat (SSR) and single nucleotide polymorphism (SNP), and so on. The microarray is a powerful genomic tool for the characteristics of high density, high sensitivity and automation. In this paper, the authors reviewed the basic theory and characteristics of the general gene fingerprint and biochip techniques and their application in biology resource investigation and specimen inventory. At present, the major studies in biology resource investigation and specimen inventory include: species identification and classification, individual identification and population number investigation, and the key information research on resource plant.

Keywords: gene fingerprint, biochip, biology resource investigation, specimen inventory

作者简介: 张于光(1976-), 男, 博士, 研究方向: 分子生态学。

基金项目: 国家科技基础条件平台建设项目(2005DKA21404)。

收稿日期: 2009年2月23日。

基因指纹技术, 又称 DNA 指纹技术, 是经分子遗传标记而构建的具有高度特异性的遗传学图谱技术。20 世纪 90 年代初, 由于 PCR 技术的广泛应用, DNA 的检测可以通过体外克隆方法快速、直接、高效、灵敏地检测出来, 许多新的基因指纹技术应运而生, 包括 DNA 限制性片段长度多态性分析 (RFLP)、随机扩增多态性 DNA 分析 (RAPD)、扩增片段长度多态性分析 (AFLP)、微卫星 DNA 多态性分析 (SSR)、单核苷酸多态性分析 (SNP) 等^[1]。基因芯片技术是伴随人类基因组计划而产生的, 由于具有高通量、高灵敏度和高自动化程度等特点, 迅速成为分子生物学研究的一种重要技术手段^[2]。基因指纹和芯片技术的快速发展, 为开展生物资源调查和标本整理等提供了新的手段, 并为资源的开发和创新利用提供了可能。本文就主要的基因指纹和芯片技术的原理和特点进行简单的介绍, 并对其在生物资源调查和标本整理中的主要应用进行了综述。

1 不同类型的基因指纹和芯片技术

1.1 DNA 限制性片段长度多态性分析

DNA 限制性片段长度多态性 (RFLP) 是 20 世纪 80 年代初发展起来的第一代分子遗传标记技术, 至今仍被广泛应用。其基本原理是利用 DNA 限制性酶识别 DNA 链特异性的序列, 催化核苷酸内切性裂解, 从而产生特定长度的片断。片断与同位素或非同位素标记的探针杂交, 而显示与探针含同源顺序的酶切片段在长度上的差异, 依其分子大小分离出片断。RFLP 标记呈孟德尔遗传, 广泛分布于生物的基因组中, 不受环境影响, 是一种共显性标记, 可区分纯合基因型和杂合基因型。非等位的 RFLP 标记之间不存在上位效应, 结果稳定可靠, 重复性好。然而 RFLP 需要的 DNA 量较大, 只能检测内切酶识别位点上的变异, 能提供的信息有限^[3]。

1.2 随机扩增多态性 DNA 分析 (RAPD)

随机扩增多态性 DNA 分析 (RAPD) 技术建立在 PCR 技术的基础上, 它是利用一系列随机排列的寡核苷酸为引物, 对所研究的基因组 DNA 进

行 PCR 扩增。这些扩增 DNA 片段的多态性反映了基因组相应区域的 DNA 多态性^[4-5]。由于所用的引物是任意的, 因此 RAPD 技术并不需要对所研究的生物基因组了解太多。像其他应用 PCR 的技术一样, 对每个测试个体的 DNA 量要求甚少, 所以能应用于分析少量 DNA 模板的个体, 因此可以从毛发、脱落组织甚至动物的粪便中提取微量 DNA 进行直接扩增, 这对于珍稀濒危物种的基因组分析是十分有效的^[6]。RAPD 最大的缺点是实验结果的重复性和稳定性较差。

1.3 扩增片段长度多态性分析

扩增片段长度多态性分析 (AFLP) 是 Zabeau 等发明的一项技术, 其原理非常简单^[7]。基因组 DNA 经限制性内切酶完全消化后, 在限制性片段两端连接上人工接头作为扩增的模板。设计的引物与接头和酶切位点互补, 并在 3' 端加上 2 ~ 3 个碱基, 因此在基因组被酶切后的无数片段中, 只有一小部分限制性片段被扩增, 即只有那些与引物 3' 端互补的片段才能进行扩增, 称为选择性扩增。由于接头和引物设计不需要预先知道被研究基因组的序列信息, 以及它们之间搭配上的巧妙与灵活, 使得采用少数几对引物的多种组合即可获得大量遗传信息。用 AFLP 鉴定的多态性是典型的按孟德尔方式遗传和选择中性的, 因此目前人们认为 AFLP 是构建遗传图谱较好的分子标记, 在鉴定遗传多样性和物种亲缘关系的研究中也显示出较大的优越性^[1]。

1.4 微卫星多态性分析

微卫星 (microsatellite) 是指以少数几个核苷酸为单位的多次串联重复 DNA 序列 (多为 1 ~ 6 个核苷酸), 其中两核苷酸的重复频率最高, 如 (AC)_n 重复在哺乳动物基因组中约 10 万个碱基中就发生一次^[8]。微卫星具有数量大, 分布广且均匀, 多态信息含量高, 引物通用, 分析方便, 适合于进行自动化和半自动化分析检测等优点。因此在短短十几年内, 微卫星已广泛应用于动植物的各个研究领域, 包括构建遗传连锁图谱、进行种群遗传多样性研究、进行亲子鉴定和建立遗传谱系等。微卫星在 PCR 扩增时, 偶尔会出现“无效等位基因” (null allele) 的现象, 即无特异性扩增产物, 这可能是微卫星位点引物结合部位的

点突变、插入或缺失阻碍微卫星的扩增，而且这种突变并没有在群体中固定，则只有一部分等位基因会被扩增出来，因此在电泳时实际上杂合的位点，仅形成单条电泳带而呈纯合现象，这样给结果分析带来错误的信息^[9]。

1.5 单核苷酸多态性分析

单核苷酸多态性分析 (SNP) 是随着人类基因组计划的进展而发现的新的 DNA 遗传标记，是指在基因组水平上由单个核苷酸的变异引起的序列多态性，这种变异包括单碱基的转换、颠换、插入和缺失等。SNPs 的位点极其丰富 (在人的基因组中有上百万个 SNPs)，并在许多物种基因组的编码区和非编码区广泛分布。已有的研究显示，在基因组中大约平均每 300 ~ 1000bp 就会出现一个 SNPs^[10-11]，这样 SNP 在整个基因组的分布就会达到 300 万个甚至更多，代表了基因组中最广泛分布的序列变异类型。SNPs 的应用在相当长的一段时间里仍主要局限在一些模式生物 (如人、果蝇等)^[11]。随着技术的进步，SNPs 分析技术在物种种群结构、遗传多样性、适应与进化、种群历史动态、系统地理学、个体识别和谱系鉴定中得到广泛的应用^[12-14]。

1.6 基因芯片技术

基因芯片 (Gene Chip, 又称 DNA 芯片、生物芯片) 是随着人类基因组计划的逐步实施和分子生物学的迅猛发展应运而生的。其概念来自于计算机芯片，其实质是在面积不大的基质表面上有序的点阵排列了大量固定于一定位置的可寻址的识别分子^[15]。具体来说，也就是在玻璃、硅等载体上有序的、高密度的 (点与点间的距离小于 500 微米) 排列、固定了大量的靶基因片段或寡核苷酸片段 (也叫分子探针)，这些被固定的分子探针在基质上就形成了高密度的 DNA 微阵列，因此基因芯片也叫基因微矩阵。基因芯片的制备方法主要有 3 种形式：①原位合成型。将多个寡核苷酸片段用单核苷酸底物直接合成到载体特定位置上。②接触式点样型。利用机器人将 cDNA 或合成的寡核苷酸 (探针) 针点到片基上。③喷点式点样型。利用机器人将探针喷印到片基上^[15]。

将待测样品用荧光染料等标记制成探针与芯片进行杂交，通过检测探针分子的杂交信号强

度而获取样品分子的数量和序列信息，从而可对基因序列及其功能进行大规模、高通量的研究，是传统生物技术的一次重大创新和飞跃。该技术综合了分子生物学、半导体微电子、激光、化学染料等领域的最新科学技术，是当今世界高度交叉、高度综合的前沿科学与研究热点，为快速准确完成物种定名、多样性的调查、外来物种问题、遗传多态性、个体识别及亲子鉴定等提供了便利的方法^[16-17]。

2 在生物资源调查和标本整理中的应用

2.1 在物种鉴定和分类中的应用

在野生环境中，许多动植物尤其是近缘种地形态、生活习性十分相似，仅通过标本和野外观察有时难以确定一个生态系统中的物种组成。传统的物种鉴定，结合基因指纹和芯片技术可以鉴定不同物种的差异。传统的物种鉴定是根据物种间的形态、习性、繁殖方式等特征进行确认。随着分子生物学的发展，为实现野外近似物种的鉴定提供了可能，可以通过 18SrDNA (或 16SrDNA 等)、线粒体 DNA 序列差异和微卫星等位基因频率的不同来区分不同的物种^[17]。张于光等对野外收集 109 个疑似雪豹粪便样品进行了鉴定，鉴定有 31 个来自雪豹，其他粪便样品来自猞猁、狐狸和狼等肉食动物^[18]。Tsoi 等通过基因芯片对贝母几个种属基因分型和种类鉴别进行了研究，一些多态性片段的特异性寡核苷酸探针点在芯片上进行杂交实验，结果显示 DNA 芯片技术可为植物种属的鉴别与质量控制提供了一种快速、高通量筛选的检测工具^[19]。

民族医药植物和资源植物的真伪鉴别及品种鉴定是目前基因指纹和芯片技术在生物资源调查和标本整理中应用最多的一个领域。目前药材市场上大量存在不同替代品混用的现象，不同地区同名异物入药，或是紧俏药材使用其近缘植物入药，甚至使用其他伪品假冒名贵药材。尽管药材在干燥过程中 DNA 有所降解，但干品仍然带有足够多的 DNA 信息特别是稳定的小分子带，可供鉴别药材使用。因此，不论新鲜药材还是干品饮

片,或是不同药用部位,通过DNA指纹图谱皆能准确予以鉴别。近年来这方面的研究较多,如人参、西洋参的鉴别,西洋参及其伪品的鉴别等。

2.2 在动物个体识别和种群数量调查中的应用

传统的野生动物数量调查方法是通过一定的技术手段(如目击、足迹和粪便等),在设定的样线或样方中,计算动物的数量,以此为基础,推及整个动物分布区的动物数量。这种方法不可避免地受到动物分布均匀程度及单个个体重复计算的影响。而在许多大型哺乳动物中,含DNA的样品(如粪便、毛发、唾液等)经常可在一些确定的路线(如兽径及分布区边缘)有规律地被发现。因而,可以在特定路线反复地进行这些物质的收集,并进行分析,通过比对,得出确切的数据。以大熊猫为例,为了保护大熊猫物种,制定了切实可行的保护管理规划。我国曾在上世纪70年代和80年代两次组织全国性的大熊猫普查,采用路线调查法及生物横向密度估计法,历时数年,所获得的结果仍然难以表明现存大熊猫的野外真实数量。近年来,在大熊猫数量调查上利用分子粪便学研究方法进行了大量的工作。以野外采集的大熊猫粪便为材料,应用DNA指纹技术和个体识别技术,进一步确认了大熊猫种群数量^[20]。张于光等应用基因指纹技术并结合粪便DNA技术,对雪豹粪便DNA进行微卫星分析,结果表明,在Ladakh和南Gobi检测到的31个雪豹粪便样品分别有4个和5个不同的雪豹个体^[18]。

通过应用基因指纹和芯片技术进行个体识别和种群数量调查,为开展自然保护区生物资源调查提供了可靠的、有力的技术支撑,从而准确地掌握动物的种群数量和分布区域,这对于物种的保护和管理是很重要的,特别是对于一些珍稀濒危的大型兽类,同时,也为标本的整理和挖掘标本背后的信息提供了重要依据。

2.3 在资源植物关键信息研究中的应用

资源植物关键信息的研究是植物开发和创新应用的重要前提,如药用植物的药效成分、药物筛选、药物靶标的发现和关键功能基因的寻找等研究,同时也为自然保护区民族医药植物的保护利用和标本的可持续采集、整理和共享工作的开展提供了重要的依据。民族医药植物的质量除了

与药材特定的生长环境和特殊的采收加工技术有关外,还与该药材产区这一物种的地方种群或居群遗传上的特殊性有关。通过基因指纹和芯片技术,就有可能研究中药药物自身的基因信息差异以及对受体基因表达水平的影响,为筛选高效的药物资源和探索中药的分子作用机制提供了有效工具。如Li等研究了知母根中提取的皂苷成分对心血管疾病的分子作用机制,实验结果显示皂苷成分通过调节内皮细胞的功能对心血管疾病起良性作用^[21]。Yin等用cDNA微阵列研究了半枝莲*Scutellaria barbara* D.Don的抗癌机制,结果发现16个基因(包括DNA损伤、细胞周期调控、蛋白质磷酸化的相关基因)表达上调了5倍以上,显示这些基因可能参与了半枝莲诱导的癌细胞死亡过程^[22]。

进行民族医药植物标本采集整理整合,对重要的和代表性民族医药植物制备基因组标本和样品,提取化学指纹和基因指纹图谱,建立化学指纹图谱库/基因图谱库和医药植物信息(功效)一标本—实物—指纹的一体化和共享体系,是自然保护区生物标本整理整合共享子项目的重要工作内容之一。该项目已经成功对不同环境区域的70多种传统利用植物进行了标志性和关键性信息的补充,获取基因指纹图谱800多张。同时,通过在GenBank数据库搜索不同的药用成分功能基因,如生物碱、黄酮类、萜类和甾类等,在国内首次构建了中药材相关的功能基因芯片,并对黄连、长春花和青蒿等中药材料的相关功能基因进行了分析。

3 展 望

随着基因指纹和芯片技术的不断发展和后基因组时代的到来,这些技术将在生物资源调查和标本整理中得到更广泛的应用,如中药功能芯片的构建和发展,将为开展我国民族医药植物的药效成分、功能基因和药效相关分子机理等研究提供重要的手段。这些工作将为建立自然保护区生物标本—信息—实物—生境的一体化共享体系,为数字化自然保护区的建设和实现生物资源的开发和创新应用提供更广泛的前景。

参考文献

- [1] Zhou Yuping, Ge Song, Wang Xiaodong. Molecular Markers of Systematic and Evolutionary in Plant [M]. Beijing: Scientific Press, 2001: 10 — 25 (in Chinese).
〔邹喻苹, 葛颂, 王晓东. 系统与进化植物学中的分子标记 [M]. 北京: 科学出版社, 2001: 10 — 25. 〕
- [2] Shalon D, Smith S J, Brown P O. A DNA Microarray System for Analyzing Complex DNA Samples Using Two-color Fluorescent Probe Hybridization[J]. Genome Res, 1996, 6: 639 — 645.
- [3] Qiu Fang, Fu Jianmin, Jin Demin, Eang Bin. The Molecular Detection of Genetic Diversity [J]. Chinese Biodiversity, 1998, 6(2): 143 — 156 (in Chinese)
〔邱芳, 伏健民, 金德敏, 王斌. 遗传多样性的分子检测 [J]. 生物多样性, 1998, 6 (2): 143 — 150. 〕
- [4] Williams J G K, Kubelik A R, Livak K J. DNA Polymorphisms Amplified by Arbitrary Primers are Useful as Genetic Markers [J]. Nucl Acids Res, 1990, 18:6231 — 6235.
- [5] Welsh J, McClelland M. Fingerprinting Genomes Using PCR with Arbitrary Primers [J]. Nucl Acids Res, 1990, 18: 7213 — 7218.
- [6] Zhang Yuguang, Li Diqiang, Rao Liqun, et al. Identification of Polymorphic Microsatellite DNA Loci and Paternity Testing of Amur Tigers[J]. Acta Zoologica Sinica, 2003, 49(1): 118 — 123. (in Chinese)
〔张于光, 李迪强, 饶力群, 等. 东北虎微卫星 DNA 遗传标记的筛选及在亲子鉴定中的应用[J]. 动物学报, 2003, 49(1): 118 — 123. 〕
- [7] Zebeau M, Vos P. Selective Restriction Fragment Amplification: A General Method for DNA Fingerprinting: European, 92402629. 7[P]. 1993-04-01.
- [8] Tautz D. Hypervariability of Simple Sequences as a General Source for Polymorphic DNA Markers [J]. Nucleic Acid Res, 1989, 17: 6463 — 6471.
- [9] Fan Bin, Li Kui, Peng Zhongzhen, et al. Genetic Variation of 27 Microsatellite Loci in Three Hubei Indigenous Pig Breeds. Chinese Biodiversity, 1999, 7 (2): 91 — 96. (in Chinese)
〔樊斌, 李奎, 彭中镇, 等. 湖北省三品种猪 27 个微卫星座位的遗传变异[J]. 生物多样性, 1999, 7(2): 91 — 96. 〕
- [10] Brouillette J A, Andrew J R, Venta P J. Estimate of Nucleotide Diversity in Dogs with a Pool-and-sequence Method [J]. Mammalian Genome, 2000, 11: 1079 — 1086.
- [11] Aitken N, Smith S, Schwarz C, Morin P A. Single Nucleotide Polymorphism (SNP) Discovery in Mammals: A Targeted Gene Approach [J]. Molecular Ecology, 2004, 13: 1423 — 1431.
- [12] Seddon J M, Parker H G, Ostrander E A, Ellegren H. SNPs in Ecological and Conservation Studies: A Test in the Scandinavian Wolf Population [J]. Molecular Ecology, 2005, 14: 503 — 511.
- [13] Sezgin E, Duvernell D D, Matzkin L M, et al. Single-locus Latitudinal Clines and Their Relationship to Temperature Adaptation in Metabolic Genes and Derived Alleles in *Drosophila Melanogaster*[J]. Genetics, 2004, 168: 923 — 931.
- [14] Brown G R, Gill G P, Kuntz R J, Langley C H, Neale D B. Nucleotide Diversity and Linkage Disequilibrium in Loblolly Pine [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 2004, 101(42): 15255 — 15260.
- [15] Ma Liren, Jiang Zhonghua. Biochip [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2000: 1 — 3. (in Chinese)
〔马立人, 蒋中华. 生物芯片 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2000: 1 — 3. 〕
- [16] Hoss M, Kohn M, Paabo S, et al. Excrement Analysis by PCR [J]. Nature, 1992, 359: 199.
- [17] Li Shaoping, Dong Tingxia, Zhan Huaqiang, et al. The Application and Prospect of Biochip Technology in Traditional Chinese Medicine Identification [M]. World of Science and Technology—Doctor Forum of Chinese Medicine Modernization. 2000, 2 (3): 15 — 19. (in Chinese).
〔李绍平, 董婷霞, 詹华强, 等. 生物芯片技术在中药鉴定研究中的应用与展望 [M]. 世界科学技术—中药现代化博士论坛, 2000, 2 (3): 15 — 19. 〕
- [18] Zhang Yuguang, Jan E J, Li Diqiang, et al. Population Survey and Genetic Diversity of Snow Leopards *Panthera Unica* as Reveled by Fecal DNA[J]. Acta Zoologica Sinica, 2008, 54 (5): 762 — 766. (in Chinese)
〔张于光, Jan E J, 李迪强, 等. 基于粪便 DNA 的雪豹种群调查和遗传多样性 [J]. 动物学报, 2008, 54(5): 762 — 766. 〕
- [19] Tsoi P Y, Woo H S, Wong M S, et al. Genotyping and Species Identification of *Fritillaria* by DNA Chips [J]. Acta Pharm Sin, 2003, 38(3): 185 — 190.
- [20] Wei Fuwen, Rao Gang, Li Ming, et al. Molecular Scatology and Its Application—Reliability, Limitation and Prospect[J]. Acta Theriologica Sinica, 2001, 21(2): 143 — 152. (in Chinese)
〔魏辅文, 饶刚, 李明, 等. 分子粪便学及其应用——可靠性、局限性和展望 [J]. 兽类学报, 2001, 21(2): 143 — 152. 〕
- [21] Li Z S, Li D L, Huang J, et al. Investigations on the Molecular Mechanisms of Saponins from *Anemarrhena Asphodeloides* Bunge Using Oligonucleotide Microarrays [J]. Acta Pharm Sin, 2003, 38(7): 496 — 500.
- [22] Yin X, Zhou J, Jie C, et al. Anticancer Activity and Mechanism of *Scutellaria Barbata* Extract on Human Lung Cancer Cell Line A549 [J]. Life Sci, 2004, 75(18): 2233 — 2244.