

# 基因芯片技术在人线粒体遗传研究中的应用

孙恒文(综述)/胡义德\*(审校)

(第三军医大学附属新桥医院全军肿瘤中心,重庆 400037)

**【摘要】**线粒体携带除核 DNA 外的遗传物质线粒体 DNA。由于线粒体 DNA 的多拷贝 随细胞分裂的随机性 造成了非严谨性的遗传特性。研究发现 线粒体编码的 13 个多肽在电子传递链中发挥重要作用 ,同时也可能直接影响细胞的分裂和增殖。因此 线粒体的功能异常可引起许多与能量代谢相关的疾病,称之为线粒体相关性疾病。基因芯片技术可同时检测成千上万个基因的突变和差异表达情况 ,为我们全面研究线粒体遗传功能规律提供了条件和可能性。本文综述了基因芯片技术在 mtDNA 突变分析、mtDNA 基因表达谱分析、线粒体疾病研究及法医学方面的研究进展。

**【关键词】**基因芯片; 线粒体 DNA; 突变; 基因表达

中图分类号: R34

文献标识码: A

文章编号: 1004 - 616X(2007)02 - 0157 - 02

线粒体是真核细胞能量代谢的中心,能量代谢的中心环节是发生在线粒体中的氧化磷酸化(OXPHOS)。而 OXPHOS 的物质基础是 5 个多肽酶复合体,发挥传递电子并合成 ATP 的功能。位于真核细胞线粒体中的线粒体 DNA(mitochondrial DNA, mtDNA)是独立于核 DNA(nDNA)之外的唯一遗传系统。人组织细胞 mtDNA 是一个含 16 569 个碱基的双链闭环分子,编码 2 种 rRNA 和 22 种 tRNA,还编码 13 种多肽 mRNA,这 13 种多肽产物分别参与构成复合体 I、III、IV、V。因此 mtDNA 编码的多肽产物在人组织细胞能量代谢中具有重要作用,同时也可能直接影响细胞的分裂与增殖。研究发现线粒体的功能异常与许多疾病相关,与线粒体功能异常相关的疾病被称为线粒体疾病(mitochondrial disorders),如神经肌肉变性疾病、糖尿病、阿尔茨海默病等。

基因芯片技术以其高通量、集约化、快速便捷的特点在众多分子生物学技术中独树一帜。目前,其在抗肿瘤药物的筛选、肿瘤分子诊断和分子分型及肿瘤基因多态性等方面广泛应用<sup>[1-3]</sup>。本文将讨论基因芯片技术在 mtDNA 突变分析、mtDNA 基因表达谱分析、线粒体疾病研究及法医学方面的研究进展。

## 1 mtDNA 突变分析

mtDNA 由于独立于 nDNA 之外,缺乏组蛋白的保护,自我修复能力也远不及 nDNA。研究发现 mtDNA 的突变远远高于 nDNA,位于 D-loop 的 HVR I 的突变率高于 nDNA 100~200 倍。mtDNA 的突变累积到一定数量可导致线粒体表达基因的功能异常,从而导致线粒体相关性疾病。因此,研究 mtDNA 的变异的工作很有意义,也是进行 mtDNA 功能研究的基础。mtDNA 虽然相对 nDNA 已

经非常精练,但是用常规的测序方法去研究这些序列的变异仍存在一定的难度。基因芯片的测序原理是 80 年代中期提出的,设计芯片时采取等长位移法,也就是按照靶序列从头到尾依次取一定长度的互补核苷酸形成一组探针,其中相邻探针序列相差一个或多个碱基,覆盖的碱基数目是恒定的。接着对于每一种野生型探针,将其中间位置的某一碱基分别用 A、G、C、T 4 种碱基替换,形成 4 种不同单点变化的核苷酸探针,将得到的 4 个探针依次放在 A 行、G 行、C 行和 T 行的对应位置上。这种设计可以对某一核酸序列的所有可能的碱基突变进行扫描。Chee 等<sup>[4]</sup>研制了可以测定 mtDNA 全长序列的寡核苷酸芯片,采用等长位移法设计了 135 000 个寡核苷酸探针,将探针原位合成于硅片。应用双色荧光标记策略,可同时检测并比较一对 DNA 或 RNA 样本。经过实验,证实该芯片具有识别单碱基的分辨率和极高的效率,其优势是以往任何测序方法都无法比拟的,可用于分析包括基因表达、遗传变异在内的多种分子遗传学问题。

## 2 mtDNA 基因表达谱芯片的研制

人 mtDNA 全长序列早在 1981 年已被测定完毕,这就是国际公认的剑桥序列。人 mtDNA 包含 37 个基因,其中编码的 13 多肽参与氧化呼吸链的构成,这些基因表达水平是线粒体功能状态的基础。既往,有许多关于个别多肽在各种肿瘤组织中表达水平变化的研究<sup>[5]</sup>。但这些个别基因表达水平的研究不能反应整个 mtDNA 基因的表达状态和基因间的相互协调关系。近来,作者所在实验小组研制了人 mtDNA 基因表达谱芯片<sup>[6]</sup>,该芯片可同时检测 mtDNA 编码的 13 种 mRNA、2 种 rRNA 和 9 种 tRNA 基因及

收稿日期: 2005-06-21; 修订日期: 2005-11-20

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(No.30080030,30170293)

作者简介: 孙恒文(1976-)男,河南南阳人,硕士,研究方向:线粒体相关性疾病。Sunrise761114@tom.com

\* Correspondence to: HU Yi-de.

nDNA 编码的 5 种凋亡相关基因的差异表达情况,并在此基础上,应用所研制的 mtDNA 基因表达谱芯片,初步探讨了顺铂作用下肺腺癌 A549 细胞 mtDNA 基因差异表达规律,研究发现顺铂诱导下的肺腺癌 A549 细胞 mtDNA 大部分基因显著上调表达,其中 *tRNA-Asp*、*ND-1*、*ND-4L*、*Cytb*、*12S rRNA* 基因表达持续上调,表明线粒体氧化磷酸化功能的代偿性增强参与了癌细胞对顺铂的抗性形成过程。

### 3 线粒体疾病研究

线粒体疾病仅有 (1~2)/100 万的发病率,可以对线粒体疾病进行临床和实验室诊断的研究中心也为数不多。因此,直至今日人们对线粒体疾病的认识还不很清晰。上个世纪 90 年代初期随着 mtDNA 全长序列的测定和 mtDNA 突变导致疾病<sup>[7]</sup>的识别,人们对线粒体疾病产生了巨大的兴趣。研究发现不少疾病与 mtDNA 突变有关,如糖尿病和神经肌肉性疾病。目前,有三种芯片技术可用于线粒体相关基因变异检测,分别是普通 cDNA 微阵列、用户型 cDNA 微阵列和普通寡核苷酸微阵列<sup>[8]</sup>。用户化 cDNA 阵列引起人们更多重视,这种所谓的线粒体芯片 (mitochip) 包含了代表几百个定位于线粒体的蛋白。VanDer 等<sup>[9]</sup>研制可检测复合体 I 相关基因病理性突变的芯片,该芯片可检测细胞系复合体 I 中任何可引起基因差异表达的突变,取得了很好的应用效果。KirbyDM 等<sup>[10]</sup>近来用普通寡核苷酸芯片来研究复合体 I 缺陷病人细胞系中的 RNA 表达,该微阵列采用 60 mer 长度探针,可同时检测 17 260 个线粒体功能相关等位基因的表达变化。初步用于两个来自不同家族的复合体 I 缺陷病人细胞系表达水平的变化。发现 50 多个差异表达的基因,其中 10 个是共同差异表达基因,在此基础上正在分析这些差异表达的基因的生物意义。

### 4 线粒体单核苷酸多态性(SNP)分析与法医学

在法医学的研究中,mtDNA 有许多细胞 nDNA 无法比拟的优点,如拷贝数高,是其它核基因拷贝数的 10 倍左右;对样本质量要求不高,如变性坏死的组织、毛发、骨、血斑,甚至从古遗迹所取的样本均可;对样本需求量低,仅需 pg 水平的量等。这些特点非常适合法医物证检材的需要,尤其是毛发、骨等物证所含完整 nDNA 量极少,不易用常规 DNA 分析法检测,此时对 mtDNA 多态区进行扩增测序很有价值。由于 mtDNA 呈母系遗传,兄弟姐妹间的 mtDNA 序列均相同,故可用于做身源鉴定和同一认定,尤其在父母无法提供物证的情况下,运用 mtDNA 做个人识别非常成功。mtDNA 序列不仅存在个体差异,而且尚发现有种族差异,故也可以用于鉴定个体的种族来源问题。Divne 等<sup>[11]</sup>研制了一个用于法医鉴定的 SNP 检测芯片,该芯片可同时检测 21 个 mtDNA 和 12 个 nDNA 的 SNP,其中 mtDNA 的 21 个 SNP 来自相关文献<sup>[12]</sup>,分布于 HV I、HV II 和编码区,用 PCR 技术扩增待测样本来提高检测敏感性。应用该芯片检测了 4 例罪犯遗留下来的毛发样本,通过 PCR 扩增样本与芯片杂交获得了其 mtDNA 的 SNP 特征, DNA 测序结果和芯片检测结果一致。随着技术的不断完善,芯片方法将会对法医取证及案情侦破产生重大意义。

### 5 结语及展望

综上所述,近年来基因芯片技术为线粒体研究带来了许多突破性进展。mtDNA 一级结构的变异和其编码基因表达水平的变化将对细胞生命活动产生重要影响,在整体水平上识别这些特异变化将有助于对线粒体相关疾病的认识。

但是,毕竟蛋白质才是发挥功能的终末产物,有研究发现线粒体编码基因在 mRNA 水平的高表达并不一定会导致其对应多肽数量增多,可见在 mRNA 的翻译水平还存在一些未知的调节因素。因此,直接对线粒体电子传递链中的多肽变异和活性的检测才能直接反应线粒体的功能状态。随着蛋白质芯片技术的不断成熟,可同时检测线粒体蛋白质组表达水平的蛋白芯片将用于线粒体的功能状态研究。人们将从 mtDNA 一级结构、mtDNA 转录和 mRNA 翻译 3 个水平全面认识线粒体的功能变化和不同水平间变化的内在联系,将会进一步深入全面的认识线粒体在不同病理状态下的发病机理和自我调节机制。

### 参考文献:

- [1] Clarke PA, Robert P, Workman P. Gene expression microarray technologies in the development of new therapeutic agents [J]. *Eur J Cancer*, 2004, 40(17): 2560-2591.
- [2] Yu Wang, Igor VT, Mark AH, et al. Gene selection from microarray data for cancer classification machine learning approach [J]. *Computat Biol and Chem*, 2005, 29(1): 37-46.
- [3] Mockler TC, Ecker JR. Applications of DNA tiling arrays for whole genome analysis [J]. *Genomics*, 2005, 85(1):1-15.
- [4] Chee M, Yang R, Hubbell E, et al. Accessing genetic information with high-density DNA arrays [J]. *Science*, 1996, 274(5287):610-614.
- [5] Bianchi MS, Bianchi NO, Bailliet G. Mitochondrial DNA mutations in normal and tumor tissues from breast cancer patients [J]. *Cytogenet Cell Genet*, 1995, 71(3): 99-103.
- [6] 孙恒文,胡义德,孙玉兰,等. 顺铂诱导肺腺癌 A549 细胞线粒体基因组及凋亡相关基因差异表达 [J]. *解放军医学杂志*, 2004, 29(12):1051-1054.
- [7] Wallace DC, Singh G, Lott MT, et al. Mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy [J]. *Science*, 1988, 242(3):1427-1430.
- [8] Thorburn DR, Sugiana C, Salemi R, et al. Biochemical and molecular diagnosis of mitochondrial respiratory chain disorders [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2004, 1659(4):121-128.
- [9] VanDer F, Westhuizen H, VanDen L, et al. Human mitochondrial complex I deficiency: investigating transcriptional responses by microarray [J]. *Neuropediatrics*, 2003, 34(1):14-22.
- [10] Kirby DM, Salemi R, Sugiana C, et al. NDUFS6 mutations are a novel cause of lethal neonatal mitochondrial complex I deficiency [J]. *Clin. Invest*, 2004, 114(2):112-114.
- [11] Divne AM, Allen M. A DNA microarray system for forensic SNP analysis [J]. *Forensic Science International*, 2005, 154(2-3):111-121.
- [12] Ingman M, Kaessmann H, Paabo S, et al. Mitochondrial genome variation and the origin of modern humans [J]. *Nature*, 2000, 408(2): 708-713.