cDNA 芯片技术和病毒感染的基因表达

项春生^① Yidong Chen^② Jiang Yuan^② Gerald C. Gooden^②
Michael L. Bittner^② Paul S. Meltzer^② Jeffery M. Trent^②
Steve Zeichner^③

(^① Virology Division, US Army Medical Research Institute of Infectious Diseases, Frederick, MD 21702;

^② National Human Genome Research Institute; ^③ National Cancer Institute, National

Institutes of Health, Bethesda, MD 20892 USA)

摘要 论述了最近发展的 cDNA 芯片技术及其在基因的发现和表达以及在疾病诊断上的应用。该技术是把 cDNA 的阵列由高速自动控制仪器置于玻璃片上,用标记的探针测定互补结合的情况,可同时进行大量基因的表达和基因的发现研究。这是一个高效率和大规模的基因组分析和表达的研究技术。使用这一新技术,发现了 HIV 感染期间 hsp 70 基因表达发生的变化,传统的 Northern 分析证实了芯片的测定结果。综述中还包括了作者未发表的有关 HIV 和 HHV8 的研究资料,一致说明了 cDNA 芯片技术对新基因的发现、疾病描述和鉴定与疾病相关基因方面的可靠性和适用性。

关键词 cDNA 芯片 原理与技术 病毒感染 基因表达

维持一个有机体并使其正常运转是非常复杂的事情。由一个受精卵发育为成人体,并保持该个体的正常生存,大约需要 100 000 个基因,其中每个基因都在精确的时间和空间将其活性调整到精确程度。在过去的十年中,全世界从事人类基因组研究计划的科学家已经对这一复杂的遗传机器做了大量非凡的工作。该计划是建立人类基因组的详细遗传和物理图谱。以确定人类 DNA 全部的核苷酸序列,并对实验中常用的其他生物模型系统的基因组^[1]进行类似分析。描述某种生物基因组的核心是对其所有基因的序列及定位编出全面的目录。现在,科学家已获得一些生物的全部基因序列,包括 141 种病毒,51 种细胞器,几种真细菌(流感嗜血杆菌、产甲烷球菌、支原体 *M. genitalium*)和一种真核生物(酿酒酵母),其数量还在增长。实验室中常用的大肠杆菌的完整序列刚刚发表^[2]。通过世界性的合作酿酒酵母的基因组序列分析已于 1996 年完成^[3]。这是到目前为止已完成的最大的基因组,也是第一个完整的真核生物的基因组序列。酵母基因组显示出相当数量的明显的遗传冗余。今后在酵母基因组研究项目中要解决的主要问题是阐明所有这些基因的生物功能。另一方面,人们认为人类基因组含有 50 000~100 000 个基因。人类基因组序列的研究正在稳步发展,研究者已列出 500 000 个表达序列标记(expressed sequence tags, ESTs),人类基因组 DNA 的全部 30 亿个核苷酸预期在 2005 年^[4]被确定。目前,已鉴定的人类基因中 3/4 的功能还不清楚。鉴定基因只是研究的初步阶段。深入了解基因对生物的影响或基因的功能,是现代分子生物学面临的最大挑战,要成功地完成这些宏伟目标有待于各种新技术的开发。

研究基因生物学的最好方式是监测基因在不同组织、不同发育阶段以及不同健康状况机体中活性的变化。但这是一项非常麻烦的工作,3 年前,一次才能检测一个基因。有几种同时监测大量基因表达的新技术,这种系列分析方法包括对 cDNA 直接测序^[5,6];与之相似的分析

方法是基于对一玻璃片表面上固定的 cDNA 的分子杂交^[7]或与硅片上固定的人工合成的寡核苷酸杂交^[7,8]。我们称之为 cDNA 芯片技术,它是最有效的技术之一,已在世界上许多医药公司和研究单位普遍使用。这一新技术允许研究者同时测定成千上万个基因的作用方式,几周内获得的信息用其他方法几年才能得到。芯片技术对控制发育和分化的遗传学机制的研究是一个巨大突破。

1 cDNA 芯片技术的生物学

一个细胞要靠它的基因产物履行各种不同的功能,包括产生能量、大分子的生物合成、细胞结构的维持和对环境刺激的应答。蛋白质是细胞机器活跃的功能成分,而 DNA 储存蛋白质合成的信息, RNA 传递 DNA 中编码的指令。在真核细胞的细胞核、细胞质和线粒体中存在 3 种不同功能的 RNA。信使 RNA (mRNA) 以其对氨基酸序列特异的碱基序列编码从 DNA 拷贝来的遗传信息;转移 RNA (tRNA) 是通向密码的关键,特异的 tRNA 分子把 mRNA 分子的碱基序列所指定的氨基酸携带到生长的多肽链的末端;核糖体 RNA (rRNA) 与一组蛋白质结合而成,在核糖体上有蛋白合成所必需的所有相互作用分子的结合位点。除少数例外,所有种属的真核生物 mRNAs 均有多聚腺苷酸,它是在核内加到不均一 RNA (hnRNA) 游离的 3'-OH 端上的。这一过程发生在 hnRNA 剪切之后, mRNA 转运到细胞质之前。在哺乳动物每个细胞中估计大约有 500 000 个 mRNA 分子,他们在细胞中是相对稳定的。哺乳动物细胞中 mRNA 的半衰期可长达数日。一般在一特定细胞中 mRNA 的水平代表其特定基因的活性。人类细胞含有 50 000 ~ 100 000 个基因。一些基因在所有类型的细胞中均可表达,另一些基因仅在特定类型的细胞中表达。在发育过程中或者被物理化学因子刺激后细胞的状态发生变化时,细胞内基因的表达方式也会改变。对正常细胞和病理细胞(例如 HIV 感染的)的基因表达方式进行比较能提供有用的诊断指纹,并有助于失常功能的鉴定,这可能是治疗介入的合理的靶子。

cDNA 芯片技术是以定量的方式同时监测大量基因相对表达的强有力的新方法。它已成功地用于同时检测 1 000 多个基因的表达^[9,10]和人类癌^[11]基因的表达研究。这些 cDNA 芯片是由大量 PCR 扩增的基因片段以许多不连续的微点固定于玻璃片上构成的^[12]。来自 2 种不同类型的细胞(未感染的和感染的) RNAs 的 cDNA 探针,各自用不同颜色的荧光标记,与芯片上的扩增片段杂交。芯片上每一基因片段的 2 种不同颜色的信号的相对强度提供了该基因在 2 种细胞中的相对表达量的信息(例如特定基因在感染的和未感染的细胞中的表达)。封面图及其说明(见封 2)介绍了芯片技术的要点。由于许多份的芯片被同时印迹,所以该技术可提供同一套基因在许多不同样品中相对表达的信息。它能够大量基因在体外实验和在临床样品中表达的信息。

2 cDNA 芯片技术的生物信息学

尽管在发展技术上已投入很大努力,但对突出数据分析的计算生物学和基因表达方式的解释都注意甚少,原因之一是缺乏基因表达方式的数据,在 DNA 序列数据库发展的早期阶段也存在同样的问题。当 DNA 序列在 Genbank 中积累了 15 年之后,发展了许多基于序列的工具,诸如 BLAST^[13,14]和 UniGene Cluster^[15]。同时生物医学研究的出版物已将其注意力转到成千上万个基因的功能方面,而不是单个基因的结构信息^[16]。与基因表达研究并行的方法探索对整个生物信息学界提出了新的挑战,一些最紧迫的问题包括:(1) 实验室信息管理;(2) 芯片图象分析;

(3) 基因表达描述分析; (4) 遗传指纹图或表达方式识别; (5) 高水平控制系统模型问题.

实验室信息管理系统(LIMS)的主要目的是追踪和管理材料信息流^[16]. 每一个芯片实验数据库中的基本信息包括: (1) 特异的 cDNA 克隆插入物的排列信息(诸如克隆的 ID、名称和数据库超连接等); (2) 探针信息(诸如样品来源、实验条件和荧光类型等); (3) 图象信息(粗扫描图象、每个靶克隆的强度和比例等). 数据库的一个例子如: Array DB, 可在 <http://www.nhgri.nih.gov/DIR/LCG/15K/HTML> 中找到.

芯片图象分析是通过统计图象分析技术诸如靶的分割、测量和比例分析来推断出图象排列中每个靶的强度和比例的^[17]. 单一玻片分析成功的关键是样品间表达比例的测定和作为比例标定用的一套“当家基因”的选择. 在适当条件下, 许多表达监测实验通过一次杂交就可满足需要. 有些实验, 如在研究一些生物体系的发育时, 为了弄清有机体内基因之间的生物学作用或基因表达顺序的行为时, 监测基因表达方式的瞬时变化就变得非常重要.

人们已研究了一些标准成套的技术并用于不同的目的^[10,18]. 在 NIH 也研究了类似的技术, 作为阵列 DB 的部分补充(不公开的部分). 基因表达的“指纹”概念不仅限于瞬时表达方式, 还被用于一类组织样品, 如从乳腺、皮肤或前列腺的癌组织样品. 这里, 组织样品的指纹图是指特别选择的一套基因, 其表达水平的变化与所研究样品的特有的病理学有关.

3 方法学

(1) DNA 片段的制备. DNA 片段是用特异的引物从各个克隆进行 PCR 扩增, 或在所有的基因被克隆到通用载体上时用通用引物扩增而来. 100 μL 的 PCR 反应混合物包括: 1 $\times$ 反应缓冲液(由制造者加了 Taq DNA 聚合酶), 20 $\mu\text{mol/L}$ 每种 dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP); 2.5 mmol/L MgCl_2 ; 每种引物为 1 $\mu\text{mol/L}$ 和 Taq DNA 聚合酶 5 U/100 μL . PCR 扩增的程序为, 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 25 个循环, 55 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 25 个循环和 72 $^{\circ}\text{C}$ 2.5 min, 25 个循环. PCR 产物纯化并用乙醇沉淀. DNA 沉淀重悬于 3 $\times$ SSC(20 $\times$ SSC, 含 3 mol/L 氯化钠, 0.3 mol/L 柠檬酸钠), 使其终浓度为 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

(2) DNA 芯片的制作. 芯片在多聚赖氨酸(Sigma)显微镜载玻片上制作, 在包被多聚赖氨酸之前, 需将载玻片(Gold Seal Slides, Cat 3010)清洗. 清洗和包被的步骤如下(50 个玻片架子放在一个 350 mL 的玻璃盘内): 1) 将 100 g 氢氧化钠颗粒溶解到 400 mL 双蒸水中. 2) 加 600 mL 95% 乙醇, 搅拌直至溶液变清澈. 3) 如果溶液仍然混浊, 加双蒸水直到清澈. 4) 将溶液倒入载玻片盒内. 5) 把架子浸泡在清洗液中. 6) 在轨道振荡器上浸泡振荡至少 2 h. 7) 用双蒸水清洗载玻片 5 次, 每次 5 min. 8) 将干净的载玻片移到一个能放 25 ~ 30 个载玻片的架子上. 9) 制备多聚赖氨酸溶液: 35 mL 多聚赖氨酸与 35 mL 组织培养用的 PBS (不含 Mg^{2+} , Ca^{2+}) 及 280 mL 双蒸水混合. 10) 把玻片架移进多聚赖氨酸溶液中, 振荡 1 h. 11) 在双蒸水中洗 1 min. 12) 把玻片架离心以去除多余的液体. 13) 立即转入一个干净的切片盒中. 14) 切片在印迹前需放置 2 周. 一个定做的排列机器从 96 孔板的相应孔取约 1 μL PCR 扩增片段, 在 48 个玻片的每一片上每种样品放置 5 nL^[12].

在国家人类基因组研究所, 排列机器包括一个装有 16 个羽毛笔型探针的 XYZ 悬臂式自动装置、一个能夹 48 个标准显微镜载玻片的可移动真空夹头、带有 20 个微量滴定盘的加样/升降台、一个清洗/干燥台、一个起控制作用的 PC 机、空气操纵部件和一个操作柜. 自动装置只移动探针装置器. 16 个不锈钢针的功能作为“羽毛笔”, 它们以 9 mm 的中线间隔开以适应

标准的96孔微量滴定盘上的孔的间距。这些针装有弹簧以适应在针的长度、玻片及孔的位置上的微小差异。PC机控制所有其他部件,并允许操作者输入各种参数,如探针、托盘、玻片的数目,在玻片上点样的间隔和方式,每一循环组分的持续时间和速度及自动装置的加速度。排列器能够在70 s内在48个玻片的每一片上点16个样品,并为下一盘的另一套cDNA清洗和干燥探针。这段时间大部分被实际点样占用,因为清洗和干燥循环只占大约2 s,加样大约占10 s。因此96孔盘的内容物,每7 min可点1次,10000个样品需12 h。后处理的程序为:1)将玻片悬在一热的ddH₂O上1 min,使之再水化。2)把玻片(DNA的一面朝上)放在一个100℃的板上,快干3 s。3)用一套Stratalinker以60 mJ将DNA紫外交联到玻璃上。4)溶解5 g琥珀酸酐(Aldrich)于315 mL n-甲基-吡咯烷酮中。5)向该液加35 mL 0.2 mol/L的硼酸钠(pH 8.0),搅拌至溶解(用NaOH调节pH值)。6)将玻片浸(同时振荡)在该溶液里15 min。7)将玻片转移到95℃水浴中2 min。8)迅速将玻片转移到95%乙醇中1 min。9)为除去玻片上多余的液体,将玻片架放在微量滴定板运载器上,500 r/min离心。10)玻片立即投入使用。

(3) 荧光标记探针的制备。用RBL的Trizol试剂按其说明,提取不同组织和细胞系的总RNA。用分光光度法对RNA定量。总RNA或poly(A⁺)RNA均可用于标记。用Pharmacia的oligo dT纤维素试剂盒制备poly(A⁺)RNA。经过一轮筛选,洗脱后的mRNA纯度接近50%。把mRNA样品以10000×g离心5 min去除纤维素,然后上清液不加糖原用乙醇沉淀。

标记反应混合物的体积是40 μL,包括8 μL的5×第1条链缓冲液(含有Super script II逆转录酶,BRL);2 μL的Oligo(dT)_{12~18}(500 μg/mL, Pharmacia);4 μL 10×低dT的dNTPs(dGTP, dATP, dCTP,各25 μmol/L, 10 μmol/L dTTP, Pharmacia);4 μL 氰3(Cys3)-或氰5(Cy5)-dUTP;4 μL 0.1 mol/L DTT(含有Super Script II逆转录酶,BRL);1 μL RNasin(Promega),7 μL的DEPC处理水和10 μL RNA(5 μg mRNA或100 μg总RNA)。在双荧光实验中为了标准化目的,设置了一些细菌基因作为阳性对照。为此,用PCR扩增细菌基因,将其印迹在玻璃片上。另外,从细菌基因的克隆载体pSP64体外转录出poly(A⁺)RNA,以不同的浓度加入待测细胞或组织的mRNA的标记反应中。把待测样品置于每一个合成的基因上。反应混合物于65℃变性5 min,42℃复性,加2 μL Super script II逆转录酶,42℃温育30 min。再加2 μL Super script II型逆转录酶,继续在42℃温育60 min。反应结束时,加5 μL 0.5 mol/L EDTA,10 μL 1 mol/L氢氧化钠,65℃温育60 min以消化模板RNA。最后用乙醇沉淀探针,悬浮于30 μL水中。在微型琼脂糖凝胶上加1 μL样品通过电泳估计产物大小来判断探针的质量。取2 μL产物进行分光光度分析以确定合成的cDNA的量和掺入荧光核苷酸的百分比。

(4) 杂交。1)成对的待检样品荧光标记的cDNA探针最后应溶于作为封闭液的4×SSC,其中含0.2 mg/mL的酵母tRNA(Sigma Chemical Co. St. Louis, MO),0.4 mg/mL poly dA(40~60)(Pharmacia biotech. Piscataway, NJ)和0.5 mg/mL人Cot-1 DNA(Life technologies, Gaithersburg, MD)中。2)加热到98℃2 min,然后骤冷;加SDS使其终浓度为0.1%。3)探针与一个芯片在65℃杂交16 h,依次用0.5×SSC,0.01% SDS,0.006×SSC于室温洗5 min去除未结合的探针。4)然后离心除去残留的液体并空气干燥。

(5) 扫描和资料分析。芯片阅读器是带有一个三联激光照明系统,由电脑控制的倒置扫描荧光共聚焦显微镜。照明系统由3个气冷激光器组成:488 nm,100 mW的氩离子激光器用于激发FITC,532 nm,100 mW钕和钇铝石榴石激光器,用于激发氰3 633 nm,35 mW氦氖激

光器用于激发氘 5. 任何 2 束激光都可以同时打开, 它们的光束通过一个二色镜和一个物镜 (0.75NA, 0.66 mm wd) 到达标本. 发射的光线在通过物镜和第 1 个二色镜返回后, 通过一个共聚焦小孔和第 2 个二色镜聚焦到 2 个同时控制两种不同波长的冷 PMT 镜上. 这种镜台是标准的计算机控制显微镜台, 它能每秒钟扫描 100 mm, 分辨力是 5 μm . 一次可扫描 2 个标准的 25 mm $\times$ 75 mm 玻片. 速度为 100 mm/s, 像素为 20 μm 时, 在 20 min 内可扫描一个 40 mm $\times$ 20 mm 的面积 (能容易地印迹 10000 个样点). 每个 10 pg/ μL cDNA 样品能可靠地被检测出来.

芯片图象分析软件, Arraysuite, 是 Macintosh 计算机的 IpLab 谱的分件 (Scanalytics, Inc., Fairfax, VA), 由 NHGRI 开发, 用于分析红色和绿色的杂交强度及其比例^[19].

我们获得了检测 HIV 感染的 H9 细胞中基因表达变化的芯片图象 (未发表资料). 在获得性免疫缺陷综合征 (AIDs) 的病原物 HIV-1 感染时, 病毒基因、基因产物和宿主细胞的各种成分之间有复杂的相互作用. 研究指出, HIV 逐渐形成了改变细胞的基因表达的机制以便完善病毒复制的细胞环境并干扰宿主对感染的应答, 另一方面, 宿主细胞因子可能激发防御反应以破坏 HIV-1 复制. 已证明, 细胞内对代谢反应或环境的胁迫的应答是由热休克蛋白家族介导的^[20,21]. 不断增多的发现提示应激蛋白在病毒复制中的中介作用, 在受各种 RNA 及 DNA 病毒急性感染的细胞中诱导了应激蛋白的表达^[22]. 用 cDNA 芯片检测的许多基因表达的变化中, 有一种热休克蛋白基因, hsp 70, 在 HIV-1 急性感染 H9 细胞后发生改变^[23]. 其芯片数据被 Northern blot 分析进一步证实, 两者的结果非常吻合.

4 结论和展望

cDNA 芯片技术已用于测定植物^[7]、酵母^[10,24,25]、人类^[9,11]和病毒样品未 (发表资料) 基因的表达水平, 在起初的工作中, Schena 等人用含 48 种成对 cDNA 材料的 cDNA 芯片测定了拟南芥菜 (*Arabidopsis thaliana*) 中的差异表达. Schena 等人用热休克或佛波酯调节基因的双色差异表达监测分析了 1 046 种人的未知序列的 cDNA. 这一技术被用于炎症疾病, 如风湿性关节炎和肠炎的特异性基因表达的研究^[26]. Derisi 等人使用双色荧光研究了肿瘤产生的遗传基础. 实际上已制成了包含酵母所有基因的 cDNA 芯片^[10]. 在 NIH 制备了人 8-型疱疹病毒 (HHV8) 所有开放阅读框架的芯片, 用于研究病毒转录程序对 BCBL-1 细胞中的 12-O-十四烷酰佛波酯-13-乙酯 (TPA) 的刺激 (未发表资料). 芯片技术在膜滤器上的新应用^[19,27,28]及其商品开发的可能性 (遗传研究, Huntsville, AL, Clontech, Palo Alto, CA 和基因组体系, St. Louis, MO), 使人们可以廉价地使用这一技术. 基因组对芯片的杂交技术^[29]提供了一种比常规基因组杂交分辨率高得多的方法. 类似的芯片技术, 组织芯片也已经研究^[30].

cDNA 芯片技术迅速发展. 它在基因的发现、表达和物理图谱方面的应用已有报道. cDNA 芯片技术在疾病的描述及与疾病相关基因的鉴定方面的适用性也已证实. 该项新技术能为药物设计和疾病治疗提供新的靶标. 因此, 这一技术为人和动物的基因序列和临床医学之间建立了有益的联系.

参 考 文 献

- 1 Watson J D. Human genome project: past, present, and future. *Science*, 1990, 248: 44 ~ 51
- 2 Blattner F R, Plunkett III G, Bloch C A, et al. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science*, 1997, 277: 1 453

- 3 Goffeau A, Barrell B G, Bussey H, et al. Life with 6000 genes. *Science*, 1996, 274: 546 ~ 567
- 4 Schuler G D, Boguski M S, Stewart E A, et al. A gene map of the human genome. *Science*, 1996, 274: 540 ~ 546
- 5 Velculescu V E, Zhang L, Vogelstein B, et al. Serial analysis of gene expression. *Science*, 1995, 270: 484 ~ 487
- 6 Adams M D. Serial analysis of gene expression: ESTs get smaller. *Bioassays*, 1996, 18: 261 ~ 262
- 7 Schena M, Shalon D, Davis R W, et al. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science*, 1995, 270: 467 ~ 470
- 8 Fodor S P, Richard P R, Xiaohua C H, et al. Multiplexed biochemical assays with biological chips. *Nature*, 1993, 364: 555 ~ 556
- 9 Schena M, Shalon D, Heller R, et al. Parallel human genome analysis: microarray-based expression monitoring of 1 000 genes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93: 10 614 ~ 10 619
- 10 Derisi J, Vishwanath R L, Brown P O. Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. *Science*, 1997, 278: 680 ~ 686
- 11 Derisi J, Penland L, Brown P O, et al. Use of a cDNA microarray to analyse gene expression patterns in human cancer. *Nature Genetics*, 1996, 14: 457 ~ 460
- 12 Shalon D, Smith S J, Brown P O. A DNA microarray system for analyzing complex DNA samples using two-color fluorescent probe hybridization. *Genome Res*, 1996, 6: 639 ~ 645
- 13 Altschul S F, Gish W, Miller W, et al. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*, 1990, 215: 403 ~ 410
- 14 Altschul S F, Madden T L, Schaffer A A, et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res*, 1997, 25: 3 389 ~ 3 402
- 15 Schuler G D. Pieces of the puzzle: expressed sequence tags and the catalog of human genes. *Mol Med*, 1997, 75(10): 694 ~ 698
- 16 Ermolaeva O, Ratsogi M, Pruitt K D, et al. Data management and analysis for gene expression arrays to appear. *Nature Genetics*, 1998, 20(1): 19 ~ 23
- 17 Chen Y, Dougherty E R, Bittner M L. Ratio-based decisions and the quantitative analysis of cDNA microarray images. *Journal of Biomedical Optics*, 1997, 2(4): 364 ~ 374
- 18 Wen X, Fuhrman S, Michaels G S, et al. Large-scale temporal gene expression mapping of central nervous system development. *Proc Nat Acad Sci*, 1998, 95: 334 ~ 339
- 19 Chen J J W, Wu R, Yang P, et al. Profiling expression patterns and isolating differentially expressed genes by cDNA microarray system with colorimetry detection. *Genomics*, 51: 313 ~ 324
- 20 DeNagel D C, Pierce S R. Heat shock proteins in immune response. *Crit Rev Immunol*, 1993, 13: 71 ~ 81
- 21 Morimoto R I. Heat shock: the role of transient inducible responses in cell damage transformation and differentiation. *Cancer cells*, 1991, 3: 295 ~ 301
- 22 Andrews J M, Oglesbee M J, Trevino A V, et al. Enhanced human T-cell lymphotropic virus type 1 expression following induction of the cellular stress response. *Virology*, 1995, 208: 816 ~ 820
- 23 Wainberg Z, Oliveira M, Lerner S, et al. Modulation of stress protein (hsp27 and hsp 70) expression in CD4 + lymphocytic cells following acute infection with human immunodeficiency virus type-1. *Virology*, 1997, 233: 364 ~ 373
- 24 Lashkari D A, McCusker J H, Davis R W. Whole genome analysis: experimental access to all genome sequenced segments through larger-scale efficient oligonucleotide synthesis and PCR. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997a, 94: 8 945 ~ 8 947
- 25 Lashkari D A, Derisi J L, McCusker J H, et al. Yeast microarray for genome wide parallel genetic and gene expression analysis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997b, 94: 13 057 ~ 13 062
- 26 Heller R A, Schena M, Chai A, et al. Discovery and analysis of inflammatory disease related genes using cDNA microarray. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94: 2 150 ~ 2 155
- 27 Pietu G, Alibert O, Guichard V, et al. Novel gene transcripts preferentially expressed in human muscles revealed by quantitative hybridization of a high density cDNA array. *Genome Research*, 1996, 6: 492 ~ 503
- 28 Drmanac S, Stavropoulos N A, Labat I, et al. Gene-representing cDNA clusters defined by hybridization of 57,419 clones from infant brain libraries with short oligonucleotide probes. *Genomics*, 1996, 37: 29 ~ 40
- 29 Solinas-Toldo S, Lampel S, Stilgenbauer S, et al. Matrix-based comparative genomic hybridization: biochips to screen for genomic im-

balances. Genes, Chromosomes, & Cancer, 1997, 20: 399 ~ 407

- 30 Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, et al. Tissue microarray for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. Nature Medicine, 1998, 4: 844 ~ 847

(1998-09-04 收稿, 1998-12-31 收修改稿)

二噁英的生成及降解研究进展

郑明辉^① 刘鹏岩^② 包志成^① 徐晓白^①

(^①中国科学院生态环境研究中心, 北京 100085; ^②河北大学化学系, 保定 071002)

摘要 综述了二噁英的主要生成源及其环境输入量, 指出环境中的二噁英主要来自于人类工业化生产过程中所产生的副产物. 着重介绍了焚烧过程中二噁英的生成机理. 概述了光解、生物降解等治理二噁英污染的研究进展.

关键词 二噁英 污染源 环境输入量 生成机理 降解机理

多氯代二苯并-对-二噁英(Polychlorinated dibenzo-p-dioxins, PCDDs)和多氯代二苯并呋喃(Polychlorinated dibenzofurans, PCDFs)通常总称为二噁英(dioxins), 它们是氯代三环芳香化合物, 由于氯原子的取代数目和位置不同, 构成了 75 种 PCDD 和 135 种 PCDF. 在这 210 种化合物中, 有 17 种(2,3,7,8 位被氯原子取代的)被认为对人类健康有巨大的危害. 其中 2,3,7,8-四氯代二苯并-对-二噁英(TCDD)在目前已知化合物中毒性最大且动物实验表明其具有强致癌性. 二噁英广泛分布于全球环境介质中, 其化学性质稳定, 难以生物降解, 已证实此类化合物可在食物链中富集. 1991 ~ 1994 年美国环保局进行了一项全面的、肯定二噁英评价, 初步研究表明二噁英类不仅对人类具有致癌性, 显著增加癌症死亡率, 还能降低人体免疫能力, 影响正常荷尔蒙分泌^[1]. 这一结论已得到美国科学界的普遍认可.

二噁英的生成及降解研究是当今环境化学研究的前沿课题, 了解二噁英的生成及降解规律对减少并治理二噁英环境污染具有十分重要的意义. 我国目前在此方面的研究还较少, 仅对个别污染源的初步调查显示, 由于工业生产过程中的废弃物及化学品中所含的二噁英对环境造成的污染问题相当严重^[2~9], 而采用焚烧方式处理城市生活垃圾正陆续在我国一些城市开展. 结合我国国情, 吸取国内外先进的研究成果, 研究具有我国地域特色和生成特点的二噁英生成及降解机制, 是今后我国环境科学研究领域的一个重要课题.

1 自然界中二噁英的生成

有机物燃烧时能与无处不在的氯离子结合生成氯甲烷和有机氯化物, 这使人们联想到在自然界的燃烧过程中有可能产生二噁英. 实验证实, 木材在燃烧过程中会生成 ppb 级的二噁英. Nestrick 和 Sheffield 等人的研究说明森林和灌木起火是环境中二噁英的一个重要来源. 据估算, 加拿大每年由于森林火灾可产生二噁英的总量达 59 kg^[10,11]. 最近的调查显示, 美国森林火灾年均产生二噁英 0.2 kg I-TEQ(二噁英毒性当量)左右^[12]. 世界上每年发生森林火灾约 20 万起, 过火面积达 43 000 平方公里, 由于多数森林火灾是由闪电所致, 因此有理由认为