

生物芯片技术

一、概述：

生物芯片这一名词最早是在 80 年代初提出的，主要指分子电子器件。美国海军实验室研究员 Carter 等试图把有机功能分子或生物活性分子进行组装，想构建微功能单元，实现信息的获取、贮存、处理和传输等功能。用以研制仿生信息处理系统和生物计算机。产生了"分子电子学"同时取得了一些重要进展：如分子开关、分子贮存器、分子导线和分子神经元等分子器件，更引起科学界关注的是建立了基于 DNA 或蛋白质等分子计算的实验室模型。

进入 90 年代，另一类"生物芯片"引起了人们的关注，通过机器人自动打印或光引导化学合成技术在硅片、玻璃、凝胶或尼龙膜上制造的生物分子微阵列。实现对化合物、蛋白质、核酸、细胞或其它生物组分准确、快速、大信息量的筛选或检测。

二、分类

根据分子间特异性相互作用的原理，将生命科学领域中不连续的分析过程集成了芯片表面，构建微流体(Microfluidics)生物化学分析系统。按照芯片上固定的生物分子的不同，可以将生物芯片划分为：基因芯片、DNA 芯片、蛋白质芯片及芯片实验室(Lab-on-chip)。从其功能不同的角度，又可分为：测序芯片、表达芯片和比较基因组杂交(CGH)芯片。

三、制备

1. 载体材料的要求：作为载体必须是固体片状或者膜、表面带有活性基因，以便于连接并有效固定各种生物分子。

2. 载体种类：玻璃片、PVDF 膜、聚丙烯酰胺凝胶、聚苯乙烯微珠、磁性微珠。

3. 芯片制备方法：两大类：一类是原位合成；一类是预合成后点样。

原位合成：适用于寡核苷酸，通过光引导蚀刻技术。已有 P53、P450，BRCA1/BRCA2 等基因突变的基因芯片。

预合成后点样：是将提取或合成好的多肽、蛋白、寡核苷酸、cDNA、基

基因组 DAN 等 通过特定的高速点样机器人直接点在芯片上。由于该技术相对简易低廉,被国内外广泛使用,目前市场上销售的芯片大多采用这一技术制作的。

接触式点样:是指打印针从多孔板取出样品后直接打印在芯片上。打印时针头与芯片接触。优点是探针密度高,通常一平方厘米可打印 2500 个探针。缺点是定量准确性及重现性不太好。

非接触式点样:针头与芯片保持一定距离。优点是定量准确重现性好,缺点是喷印的斑点大,密度低。通常一平方厘米只有 400 点。但是日本佳能公司能把喷印点直径大小由 150-100 μm 降到 30-25 μm 。可将哺乳动物整个基因组 DNA 点阵于一张芯片上成为可能。

4. 生物样品的制备:分离纯化、扩增、获取其中的蛋白质或 DNA、RNA 并用荧光标记,才能与芯片进行反应。用 DNA 芯片做表达谱研究时,通常是将样品先抽提 mRNA,然后反转录成 cDNA。同时掺入带荧光标记的 dCTP 或 dUTP。

四、 检测设备:

以基因芯片为例:基因芯片的原型是 80 年代中期提出的,兴起于 90 年代后期。基因芯片的测序原理是杂交测序方法,即通过与一组已知序列的核酸探针杂交进行核酸序列测定的方法,可以用图来说明。在一块基片表面固定了序列已知的八核苷酸的探针。当溶液中带有荧光标记的核酸序列 TATGCAATCTAG,与基因芯片上对应位置的核酸探针产生互补匹配时,通过确定荧光强度最强的探针位置,获得一组序列完全互补的探针序列。据此可重组出靶核酸的序列。

杂交反应是荧光标记的样品与芯片上固定的探针间进行特异性选择反应的过程。芯片杂交属于固-液相杂交。芯片杂交结果的检测要依据标记的报告分子的种类来选择不同的检测设备。

早期使用的同位素标记法,需经过暴光、显影,再用特殊的扫描仪扫读。目前最常见最成功的标记法是荧光标记,杂交反应后各个反应点上的荧光位置。荧光强弱经过芯片扫描仪和相关软件进行分析,将荧光信号转换成数据。即可获得有关生物信息。

1. 质谱分析技术:应用于蛋白质芯片结果的分析,不仅能检测到和芯片上蛋

白质发生相互作用的靶蛋白，并且能同时测算出靶蛋白的分子量甚至结构。

2. CCD 检测：(Charge coupled device)：应用于基因芯片和 DNA 芯片。分辨率低，一般 30~50 μm 。

3. 激光扫描共聚焦：(Laser Scanning Confocal Imaging System)：应用于基因芯片和 DNA 芯片。基因芯片微阵列的点非常微小，利用激光共聚焦原理可以让光路直接聚焦到样品点表面，有效防止杂质信号产生的背景噪音干扰。包括：灰尘荧光，样本背面的污染，固相基质如玻璃的荧光信号和来自扫描仪光学组件荧光污染。

共聚焦：是指光（激发和发射）在两个位置上聚焦。

激发光聚焦在样本上。

发射光聚焦在针孔上。这一针孔限制仪器在样本表面的聚焦深度从而降低背景信号的强度。

激光共聚焦的分辨率可高达 5 μm ，并可以根据实验需要选择不同的分辨水平 5 μm ，10 μm ，20 μm ，30 μm ，50 μm 。

微阵列点的直径范围通常在 25 μm 到 50 μm ，大多在 100 μm 左右。对 100 μm 的点进行精确的分析就要求检测系统能够将每个微阵列点分割成尽可能多的像素。有意义的像素越多，在进行荧光信号的定量分析时每个点的边缘就可以分析的越准确，就越可以与其它非特异性的信号区分开。一般来说，像素大小或空间分辨率不应大于最小的微阵列点直径的 1/8~1/10（例如 10 μm 分辨率检测 100 μm 微阵列点。）

五、 生物芯片的应用

1. 基因差异表达分析 表达芯片主要是采用 DNA 芯片分析两组来源不同的 mRNA 转录丰度的差异，是生物芯片技术最常见最广泛的应用。DNA 微阵列和寡核苷酸基因芯片两种不同芯片模式在基因表达谱分析具体实验方法上还有差异。

采用 DNA 微阵列模式，两组 mRNA 样本分别反转录成 cDNA 并分别掺入可分辨的不同荧光素标记（如 Cy3 和 Cy5），二者同比例混合并同时和 DNA 微阵

列杂交。

采用寡核苷酸基因芯片模式，两组 cDNA 样本带上同种荧光素标记，但分别和芯片单独杂交再进行比较。二者都要通过计算两组样本杂交信号的比值（Ratio）并通过设立域值（Threshold）来确定已知基因在不同来源样本中表达的差异或寻找不同样本间差异表达的基因甚至是新基因。

2. DNA 测序、基因突变及多态性扫描 测序芯片是出现最早的生物芯片。通常 SBH 采用 8 聚（Hyseq）或者 20 聚（Affymetrix）寡核苷酸微阵列，与待测样品进行杂交，根据杂交结果可推算出样品 DNA 序列全长。基于此，寡核苷酸芯片也被用于基因突变及多态性扫描。

3. 基因组 DNA 突变及染色体变异检测 许多疾病是和染色体的缺失、重复、移位等变异有关。比较基因组杂交（CGH）是检测染色体或基因组 DNA 水平发生变异的有效方法，但是存在分辨率低、难于进行特异性基因的定位及需要制备中期染色体等缺点。为克服这些缺点，Solinas-Toldo S 等推出一种名为“微阵列 CGH”的新技术，无需制备中期染色体，荧光标记的基因组 DNA 与 NA 与微阵列上的明确 DNA 序列杂交。

4. 肿瘤的发生机理、肿瘤分型和诊断 DNA 微阵列被广泛用于检测肿瘤细胞和正常细胞在 mRNA 水平的差异，这不仅为肿瘤的诊断提供手段，而且为肿瘤发生机理的研究提供强有力工具。随着 DNA 芯片技术的不断成熟，肿瘤发生机理研究、肿瘤分型和诊断技术的发展将会大大加强癌症治疗的特异性和有效性。并可解决临床上肿瘤治疗中存在副作用大等问题。

5. 传染病诊断 目前国际国内对于传染病诊断芯片的研制投入了大量人力物力，方法也是各不相同，有的用 DNA 芯片，有的用蛋白质芯片。DNA 芯片是将许多特定的寡聚核苷酸或 DNA 片段固定在芯片的预设区域内，以检测对应片段是否存在、存在量多少。蛋白质芯片则是期望将传统的 ELISA 诊断方法缩微化，把不同传染病的抗原或抗体点阵于芯片上不同区域，再与病人血清进行免疫反应，以检测血清中因感染外部传染源发生免疫应答而产生的自身免疫抗体及外来病原体。

6. 环境保护和监测 在环境监测和环境保护上，可以利用生物芯片快速检测污染微生物或有机化合物对环境、人体、动植物的污染和危害。我们都知道，环

境的变化会引起细胞发生基因表达谱模型的变化，DNA 芯片是高效的监测基因表达谱变化的手段。所以，国外许多实验室纷纷探索用 DNA 微阵列技术监测环境污染和提高环境保护技术水平。生物芯片在环境保护方面的应用还可以通过大规模的筛选寻找保护基因，制备防治危害的基因工程药品及能够治理污染源的基因产品。

7. 生物芯片的其它应用除上述应用外，生物芯片技术还广泛应用于基因组文库作图、疾病预测、药物筛选、衰老和发育过程研究等等。另外生物芯片在农业、食品监督、商品检验、司法鉴定及军事等方面都将作出重大贡献。

如上所述，生物芯片已经并将继续被广泛应用于生命科学研究及实践领域。但是我们也该清醒地意识到，生物芯片技术还有许多问题亟待解决，如提高芯片的特异性、简化样品制备和标记操作程序、增加信号检测的灵敏度等等。另外，生物芯片如欲获更大发展空间，尤其是如果想进入临床检验诊断市场，以下各方面是急需解决的问题。

(1)、生物芯片的重复利用。现在的生物芯片都是一次性使用的易耗品，价格非常昂贵。这就要求生产厂商要么生产出可重复利用的生物芯片，要么降低芯片一次性消耗的成本。

(2)、生物芯片的多重用途。现在的芯片基本都是单一用途，不象微电子芯片能通过程序控制发挥多重用途。

(3)、统一的行业标准。医学检验都必须经过严格审查，检验结论都必须具有科学的解释，而且是建立在标准化基础之上。生物芯片如欲推向临床诊断市场，必须建立统一的行业标准。

(4)、定量分析。如 DNA 芯片检验结果不仅要告知某特异性 DNA 是否存在于待测 DNA 样品中，还应该告知该特异性 DNA 在待测样品中的含量。