

## 芯片生化反应概述

该过程指将从生物样品分离到的蛋白、DNA 或 RNA 样品与生物芯片进行反应，从固定于芯片的探针阵列得到样品的序列信息。由于玻片本身的荧光本底很低，所以可用荧光标记的方法来对生物芯片实施检测和分析，同时具有快速、精确和安全等优点。而且，还可用多个荧光素进行标记以实现一次性分析多个生物样品 [1]。玻片作为支持物还可使反应体积缩小到 5-200 $\mu$ l，而通常的杂交反应体积为 5-50ml。这样一方面节约了试剂，同时还可以提高反应试剂的有效浓度(0.1-1 $\mu$ M)，是常规检测(0.4-4pM)的一万倍。因此促进了杂交速度减少了杂交时间，并可取得较强的荧光信号。

### 样品的制备

#### ①核酸样品

RNA 样品通常需要首先逆转录成 cDNA 并进行标记后才可进行检测。目前，由于检测灵敏度所限，尚难以普通探针对极少量的核酸分子进行杂交和检测，所以需要样品或后续测试信号进行适当的放大。多数方法需要在标记和分析前对样品进行适当程度的扩增，例如通过 PCR 方法，以使样品核酸的拷贝数有所提高达到检测的灵敏度。但用 DNA 芯片进行检测分析时需要样品大量的 DNA 片段进行扩增和标记，所以需要同时对样品核酸分子大量的区域进行扩增，这是一项工作量非常巨大的工作。顺应这一要求出现了许多解决办法，并在不同程度上减轻了工作量。例如，Mosaic Technologies 公司引入的固相 PCR 方法，将多对引物固定于支持物上（其位置和序列信息预定），以类似于原位 PCR 的方式一次性对样品多个片段进行扩增和放大，而且不会由于引物种类过多而出现相互间的竞争和抑制（这种情况曾出现于多重 PCR 中）。引物具有较强的特异性，扩增反应也不存在交叉污染，因而省略了处理常规多重和多个 PCR 反应的繁琐工作。再如，Lynx Therapeutics 公司引入的大规模并行克隆（massively parallel solid-phase cloning），可在一个样品中同时对数以万计的 DNA 片段进行克隆，且无需单独处理和分离每个克隆。

除了检测前对样品分子的放大外，通常仍需要有高灵敏度的检测设备来采集、处理和解析生物信息。但，亦有不经过对样品的扩增和放大而直接应用特殊处理的探针，例如分支探针技术，而达到较高的检测灵敏度水平。这种方法的原

理是，设计具有庞大分支结构的分支核苷酸探针，分支末端以酶标记。这样，经过分支核苷酸与酶的双重放大作用而将标本杂交时极弱的信号转换为较强的化学信号。该技术比较成功的例子就是 HCV 与 HBV 的检测。它的最大优点在于其操作简便，具有较高的灵敏度，同时也可以保证检测结果的特异性[2]。当然，由于不同检测方式的灵敏度不同对于样品的处理和扩增情况的要求亦有所不同，具体的处理和放大方法仍需根据实际情况进行选择。

## ②蛋白及其它生物样品

同样，基于生物大分子相互作用原理的生物芯片在检测时生物样品的处理遵循相似的方式，即信号的放大和样品的标记。例如，蛋白芯片在进行检测和分析时，可以将待分析的蛋白样品用荧光素或其它物质进行标记，然后与生物芯片上的生物大分子进行相互作用，最后依据标记物质的不同采取相应的检测方式采集和分析样品和芯片上生物大分子相互作用的结果。对与非核酸类的生物大分子，存在的问题是有时不便于对其进行扩增和放大，因为其它生物大分子的结构相对比较复杂不能进行简便的克隆或扩增。所以，这就向检测的灵敏度提出了更高的要求。其它生物大分子的检测和分析类似与蛋白分子。例如核酸与蛋白的相互作用，配体间的相互作用，糖与蛋白的相互作用等。