DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.01.001
第24卷第1期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 1
2002年1月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jan. 2002

文章编号:1000-5404(2002)01-0001-02

专家论坛

生物芯片概述

General introduction to biochips

府伟灵 (第三军医大学附属西南医院检验科,重庆 400038)

21世纪是生命科学的世纪。人类基因组计划已经完成。蛋白质组计划已经启动。基因序列数据及蛋白质序列数据正在以前所未有的速度迅速增长。然而,怎样去研究如此众多基因及蛋白质在生命过程中所担负的功能就成了全世界生命科学工作者共同的课题。生物芯片正是在这样的背景下应运而生的。生物芯片不仅在高通量基因测序、基因表达研究方面已经发挥了重要作用,也将在后基因组时代研究蛋白质功能及蛋白质间的相互作用方面发挥极其重要的作用;也必将在临床基因诊断中占据重要的地位。生物芯片技术是生命科学研究中继基因克隆技术、基因自动测序技术、PCR技术后的又一次革命性技术突破。

狭义的生物芯片是将生物分子(寡聚核苷酸、cDNA、基因组DNA、多肽、抗原、抗体等)固定于硅片、玻璃片、塑料片、凝胶、尼龙膜等固相介质上形成的生物分子点阵。在待分析样品中的生物分子与生物芯片的探针分子发生杂交或相互作用后,利用激光共聚焦显微扫描仪对杂交信号进行检测和分析[1]。在此基础上发展的微流体芯片,则是将整个生化分析过程集成于芯片表面,从而实现对DNA、RNA、多肽、蛋白质及其他生物成分进行高通量检测。它是将生命科学研究中所涉及的许多分析步骤,利用微电子、微机械、化学、物理技术、传感器技术、计算机技术,使样品检测、分析过程连续化、集成化、微型化[2]。

目前应用最广泛的生物芯片是基因芯片(Gene chip, DNA chip, DNA microarray)。基因芯片是基因突变分析、基因测序、基因表达研究中的高效手段之一。基因芯片的制作通常采用原位合成或合成后点样的方法,前者利用光引导聚合技术(Light-directed synthesis)[3]或压电打印法(Piezoelectric printing)进行原位合成寡聚核苷酸探针,后者主要利用微型机械点样法或化学喷射法将合成好的探针、cDNA或基因组DNA通过特定的高速点样机器直接点在芯片片基上[4]。在基因芯片中基因表达谱芯片的应用最为广泛[5]。这种芯片可以检测整个基因组内的成千上万个基因在mRNA表达水平的变化,但对芯片点阵的密度要求较高,目前由Affymetrix公司研制的基因表达谱芯片的点阵数可高达400 000个点。表达谱芯片可以分析两种或两种以上不同细胞或组织来源的mRNA转录丰度的差异,通过计算杂交信号的比值和统计学分析,可以获得差异表达基因的信息,同时还可以用聚类分析算法研究在功能或表达调控上具有相关性的基因,最终为研究基因功能和基因遗传网络提供有力手段。利用基因芯片进行基因表达的研究主要包括:阵列构建、样品制备、杂交、芯片扫描、芯片图像处理和基因表达信息分析。尽管表达谱芯片在操作上较为复杂,但在基因组水平并行分析上有着基因芯片不可替代的特点。在肿瘤基因组学研究方面,基因表达谱芯片正发挥着越来越大的作用,被广泛地用于分析肿瘤组织与正常组织基因表达在mRNA水平上的差异。这不仅为研究肿瘤发生机制提供强有力的工具,也为肿瘤的早期诊断及预后判断提供了分子依据,极大地推动了肿瘤分子病理学的发展。在新药的研制过程中,高通量的基因表达分析具有重要的作用[6]。利用基因芯片研究疾病状态下细胞基因表达的差异,有助于发现新的药物作用靶分子;同样基因芯片也可用于药物作用机制、药物筛选的研究。目前对单核苷酸多态性(Single nucleotide polymorphisms, SNPs)的研究已成为药物基因组学的一个研究热点。一方面可以用基因芯片大规模地筛选新的SNPs,更为重要的是药物遗传SNPs的研究有助于新药的开发,并最终使"个体化医疗"得以实现[7]。在不远的将来,医生可根据病人的个体基因型预测该个体对某种疾病的易感性、个体患病后治疗该疾病的最好的方法、对特定药物的敏感性等。在临床基因诊断中,基因芯片也逐渐得以应用,如病原微生物的基因诊断(HIV、HCV、HBV、HPV、结核分枝杆菌等)、HLA分型、BRCA1突变分析、p53突变分析、囊性纤维化检测、地中海贫血基因突变检测等。

用于蛋白质功能研究及相互作用分析的生物芯片,即所谓的蛋白芯片。蛋白芯片的制作基本上与基因芯片的制作过程类似,也基本上采用原位合成、机械点样或共价结合的方法将多肽、蛋白、酶、抗原、抗体固定于芯片片基上。由于蛋白质具有易于变性、不易于与固体表面结合的特点,故在蛋白芯片的制备及在蛋白质功能及相互作用研究中的应用等方面的报道远远不及基因芯片的报道。在将蛋白质固定在固体支持物表面时,必须保持蛋白质的立体构象,才能使蛋白质探针具有生物活性。有人用微细加工的聚丙烯酰胺捕获蛋白质,并用微电泳的方法加速蛋白质的扩散,从而将蛋白质固定在芯片片基表面。因聚丙烯酰胺凝胶中含有水份,故可使蛋白质保持活性。哈佛大学的MacBeath等[8]则在用含醛的硅烷试剂处理玻片,并用含有30%甘油的PBS溶解蛋白质后,再用Affymetrix生产的GMS417阵列点样机将微量蛋白质点在玻片上,蛋白质的伯氨基与醛形成希夫式碱而将蛋白质以共价结合的方式附着在玻璃表面。甘油可避免水份的挥发,始终使蛋白质保持于水合状

基金项目:国家"九五"科技攻关项目(96-A23-04-04);国家自然科学基金资助面上项目(39870831);国家高技术计划生物技术领域青年基金资助项目("863"项目);全军"九五"医学科研计划资助面上项目(98MO94);全军"十五"医学科研计划资助面上项目(01MA180);全军"十五"医学科研计划指令性课题(01LO65);重庆市科委风险投资基金资助项目

作者简介:府伟灵(1955-),男,江苏省吴县人,博士,主任医师,教授,博士生导师,重庆市检验医学专业委员会副主任委员,全国和全军医院感染专业委员会副主任委员,获军队及省部级科技进步奖10项,获各类基金项目资助10项,主要从事生物芯片研制及其在临床实验诊断中的应用研究、医院感染的分子流行病学研究以及临床分子微生物学方面的研究,发表论文50余篇。电话:(023)68754429,E-mail:weilingfu@yahoo.com

收稿日期:2001-10-30;修回日期:2001-12-12

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

态而维持其活性构像。在孵育几小时后，将玻片浸入含牛血清白蛋白的缓冲液中，形成BSA分子层，以减少后续反应中蛋白质的非特异性结合。该研究组制备了含有10 800个蛋白点阵的蛋白质芯片，并成功地用于蛋白间相互作用的过筛、蛋白激酶底物的确证及小分子物质与蛋白间的相互作用的研究。耶鲁大学的Zhu等[9]在克隆了酵母基因组的5 800个开放阅读框后，成功地表达及纯化了他们编码的蛋白质。为加快酵母蛋白组的研究进度，他们也采用了与Gavin MacBeath相同的方法制备了高密度的酵母蛋白质芯片，并利用此芯片进行了蛋白质间相互作用的过筛及蛋白质与磷脂间相互作用的研究。他们发现了许多新的与钙调蛋白、磷脂发生作用的蛋白质，确证了与钙调蛋白结合的蛋白模体(Motif)。该研究组指出，此类蛋白芯片还可用于蛋白质与药物相互作用的研究及翻译后修饰的研究。同样，蛋白质芯片也可用于正常细胞与病变细胞间蛋白质表达谱差异的研究，从而在蛋白组整体水平上研究疾病的发生机制，及寻找新的疾病诊断标志物及药物作用的新的靶分子。

缩微实验室(Lab-on-a-chip)的构建是生物芯片研究的一个新的阶段，是生物芯片技术发展的最终目标。它将样品的制备、生化反应到检测分析的整个过程集成化形成微型分析系统。现在，已经有由加热器、微泵、微阀、微流量控制器、微电极、电子化学和电子发光探测器等组成的芯片实验室问世，并出现了将生化反应、样品制备、检测和分析等部分集成的芯片。例如可以将样品的制备和PCR扩增反应同时完成于一块小小的芯片之上。再如Gene Logic公司设计制造的生物芯片可以从待检样品中分离出DNA或RNA，并对其进行荧光标记，然后当样品流过固定于栅栏状微通道内的寡聚核苷酸探针时便可捕获与之互补的靶核酸序列，并应用其自己开发的检测设备即可实现对杂交结果的检测与分析。这种芯片由于寡核苷酸探针具有较大的吸附表面积，所以可以灵敏地检测到稀有基因的变化。同时，由于该芯片设计的微通道具有浓缩和富集作用，所以可以加速杂交反应，缩短测试时间，从而降低了测试成本。由于缩微实验室具有体积小、携带方便、能同时并行检测多种生物分子的特点，在军事医学领域中有着潜在的巨大的应用价值，在战区生物及化学毒剂的快速检测、战创伤感染病原微生物的基因诊断及伤员内脏功能损伤的早期诊断等方面都将发挥其独特的作用。我们深信在不远的将来，芯片式便携式快速侦毒仪、集基因芯片及蛋白芯片于一体的便携式野战实验诊断仪将装备到野战部队，为提高部队的战斗力、及时救治伤病员作出应有的贡献。

我国开展生物芯片研究的时间虽然不算太长，但已有众多大学进行了生物芯片的研制工作，如：清华大学、北京大学、东南大学、复旦大学、第一军医大学、第三军医大学、第四军医大学等。同时，在我国诞生了多家生物芯片公司，如：上海博华基因芯片有限公司、南京益来基因医学有限公司、北京奥博生物芯片有限公司、广州功能基因组公司、西安高科基因生命科技分公司、陕西超群科技股份公司、上海生物芯片有限公司等。尤其引人瞩目的是在不久前成立了北京国家生物芯片研究中心。这必将推动我国生物芯片的研究及产业化。纵观国内所有的研究机构所从事的生物芯片的研制，主要集中在高密度基因表达芯片上。而第三军医大学西南医院检验科生物芯片实验室则将生物芯片技术与传感器技术相结合，研制出临床诊断实用型低密度压电石英谐振传感器阵列基因芯片及免疫芯片及相应的信号采集、分析及报告软件。采用巯基结合法将寡聚核苷酸探针或抗体固定在压电石英传感器电极表面，作为传感器识别元件，在待测靶分子与探针分子结合后，引起电极表面质量负载发生变化，而致石英谐振频率下降。通过检测频率的下降情况，则可对待检分子进行定性、定量检测。由于石英微天平(Quartz crystal microbalance，QCM)具有极高的敏感性，可检出pg级的待检分子，这是其它生物芯片无法达到的灵敏度。由于压电石英谐振传感器具有实时检测的特点，故在检测靶分子时具有耗时短的特点。为进一步提高检测灵敏度，本科生物芯片实验室将链置换放大技术(Strand displacement amplification，SDA)与压电DNA传感器技术结合，构建了SDA压电DNA传感器阵列；同时该实验室以肽核酸(Peptide nucleic acid，PNA)作为分子识别元件，进一步提高生物芯片的检测特异性。到目前为止，本科生物芯片实验室已将压电石英谐振传感器阵列芯片用于HPV的检测与分型[10]、耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)、巨细胞病毒、结核分枝杆菌等病原微生物的基因检测，及多肽激素的检测等。

尽管生物芯片的研制中还存在很多技术难题，但我们深信随着科技的进步都会逐一加以解决。生物芯片必将在生命科学的研究及临床实验诊断、军事医学、司法鉴定、食品卫生监督、环境监测等领域得到广泛的应用。正如美国《财富》杂志刊文所说的那样："微处理器使我们的经济发生了根本改变，给人类带来了巨大的财富、改变了我们的生活方式。然而，生物芯片给人类带来的影响可能会更大……"。最后，希望我校有关研究单位加强协作，共同推动我校生物芯片的研制及其应用研究工作，并发展我校生物芯片研究的特色，以期在我国生物芯片的研制与开发中占一席之地。

关键词：生物芯片；基因组学；蛋白质组学；实验诊断
中图法分类号：R394；TP212.3 文献标识码：A

参考文献：

[1] Fodor S P A, Rava R P, Huang X V, *et al*. Multiplexed biochemical assays with biological chip[J]. Nature, 1993, 364: 555-556.

[2] Kricka L J. Microchips, microarrays, biochips and nanochips: personal laboratories for the 21st century[J]. Clin Chim Acta, 2001, 307(1-2): 219-223.

[3] Pease A C, Solas D, Sullivan E J, *et al*. Light-generated oligonucleotide arrays for rapid DNA sequence analysis[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1994, 91(11): 5 022-5 026.

[4] 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(7): 639-645.

[5] Schulze A, Downward J. Navigating gene expression using microarrays——a technology review[J]. Nat Cell Biol, 2001, 3(8): E190-E195.

[6] Lennon G G. High-throughput gene expression analysis for drug discovery[J]. Drug Discov Today, 2000, 5(2): 59-66.

[7] Jain K K. Biochips for gene spotting[J]. Science, 2001, 294(5542): 624-625.

[8] Macbeath G, Schreiber S L. Printing proteins as microarrays fir high-throughput function determination[J]. Science, 2000, 289(5 485): 1 760-1 763.

[9] Zhu H, Bilgin M, Bangham R, *et al*. Global analysis of protein activities using proteome chips[J]. Science, 2001, 293(5 537): 2 101-2 105.

[10] 汪江华，府伟灵，王颖莹，等. 组合靶基因自动检测仪快速检测人乳头瘤病毒[J]. 中华检验医学杂志，2000，23(5)：264-266.

（编辑 王 红）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net