

清华大学学术专著

# 生物芯片技术

邢婉丽 程京 著

清华大学出版社

清华大学学术专著

# 生物芯片技术

邢婉丽 程 京 著

清华大学出版社

北京

## 内 容 简 介

生物芯片是 20 世纪末以来发展迅速且引人瞩目的一个前沿领域。本书对生物芯片技术进行了全面而详尽的介绍。

全书共分 11 章,分别从生物芯片的起源和发展、生物芯片的分类、生物芯片的制备技术和工艺、与生物芯片相关的学科以及生物芯片的应用等方面作了详细的介绍和阐述。

本书可作为生物芯片技术相关专业,如生物学、生物物理、生物化学、药理学、遗传学、发育生物学和临床化学等的教学参考书,亦可供从事生物芯片研究领域的科研人员参考。

### 图书在版编目(CIP)数据

生物芯片技术/邢婉丽,程京著. —北京:清华大学出版社,2004

ISBN 7-302-07412-7

I. 生… II. ①邢… ②程… III. 生物—芯片—研究 IV. Q78

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2003)第 092831 号

出 版 者: 清华大学出版社

地 址: 北京清华大学学研大厦

<http://www.tup.com.cn>

邮 编: 100084

社 总 机: 010-62770175

客户服务: 010-62776969

责任编辑: 金文织

印 装 者: 三河市印务有限公司

发 行 者: 新华书店总店北京发行所

开 本: 153×235 印张: 24 插页: 2 字数: 402 千字

版 次: 2004 年 3 月第 1 版 2004 年 3 月第 1 次印刷

书 号: ISBN 7-302-07412-7/Q·34

印 数: 1~5000

定 价: 66.00 元

---

本书如存在文字不清、漏印以及缺页、倒页、脱页等印装质量问题,请与清华大学出版社出版部联系调换。联系电话: (010)62770175-3103 或 (010)62795704



## 作者简介

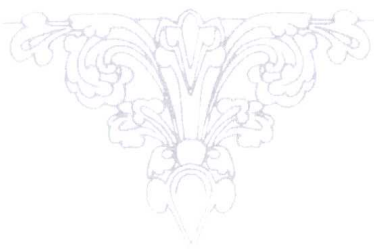
---



程京 清华大学生命科学与医学研究院教授、博士生导师、“长江学者计划”特聘教授、生物芯片北京国家工程研究中心主任。1963年生于北京，1983年本科毕业于上海铁道大学电气工程系，1992年在英国史查克莱大学获司法生物学博士学位。之后在英国史查克莱大学、阿伯丁大学和美国宾夕法尼亚大学作博士后。曾任宾夕法尼亚大学医学院研究助理教授、美国Nanogen公司首席科学家、首席研究员、Aviva Biosciences公司技术总监。他作为第一发明人研发的世界首套芯片实验室系统在Nature Biotechnology杂志封面发表后，被Science杂志引入了1998年世界十大科技突破之一。1999年至今负责主持了国家计委关于生物芯片北京国家工程研究中心建设项目和国家“十·五”重大科技专项“功能基因组与生物芯片”中全国生物芯片项目的工作，主持完成了国家自然科学基金重点项目、杰出青年科学基金和863项目各一项。发表论文74篇，编著了生物芯片英文专著5本、中文专著2本。申请专利46项，其中7项已获欧美授权。



邢婉丽 清华大学生命科学与医学研究院副教授、生物芯片北京国家工程研究中心常务副主任。1968年生于天津，1997年于南开大学化学系获得博士学位。曾先后从事液膜分离技术、生物化学传感器、化学计量学、生物芯片技术等领域的研究。发表论文共36篇，其中被SCI收录16篇。



# Preface

This book is intended to make an overall and detailed introduction of biochip technology, an interdisciplinary research area of interest from the end of 20th century.

The book consists of eleven chapters, which are easy to read and give a large number of references for further details. The chapters have been chosen to give a good overview of biochip technology, including origin and development of biochips, categorization of biochips, fabrication of biochips, other related fields and application of biochips.

The book is aimed at teachers and students with a biology, biochemistry, chemistry or engineering background, as well as researchers and scientists in the field of biochip technology.

# 前 言

自从 1991 年 Fodor 等人提出 DNA 芯片的概念后,近年来以 DNA 芯片为代表的生物芯片技术得到了迅猛发展,目前已有多种不同功能的芯片问世,有的已经在生命科学研究中发挥重要作用。现在,生物芯片已被公认将会给 21 世纪的生命科学和医学研究带来一场革命,并因此而成为各国学术界和工业界所瞩目并研究的一个热点。美国商界权威刊物 *Fortune* 对其重大意义作了如下阐述:“微处理器在本世纪使我们的经济结构发生了根本改变,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,它可能从根本上改变我们的医学行为和生活质量,从而改变世界的面貌。”

作为一项综合性的高新技术,生物芯片技术研究所追求的是以微加工技术、化学和生物技术等为依托,将生命科学研究中的许多不连续过程(如样品制备、生化反应、检测步骤)集成到一块普通邮票大小的芯片上,并使这些分散的过程连续化、微型化,以实现大量生物样品和指标进行快速、并行处理的目的。

到 20 世纪 90 年代初期,精密机械控制、光学检测、微加工等技术的日益成熟,为生物芯片技术的发展提供了技术基础。在学科交叉不断深入的基础上诞生的生物芯片技术已成为国际上的前沿研究领域和热点。

如今,作为一个技术平台,生物芯片已广泛应用于基因表达研究、功能基因组学、疾病诊断、药物筛选等多个领域。正是由于生物芯片技术的飞速发展,美国科学促进协会将其评为 1998 年的十大科技突破之一。生物芯片技术发展的最终目标之一是将样品制备、生化反应到检测的整个分析过程集成化,以获得所谓微型全分析系统或称缩微芯片实验室(Lab-on-a-chip)。

本书共分 11 章,各章的题目和参与写作的作者如下:第 1 章:生物芯片的起源与发展(张亮),第 2 章:样品制备型生物芯片(李刚),第 3 章:微反应型生物芯片(李刚),第 4 章:检测型生物芯片(陶生策,邵威,项光新,张岩,刘鹏,林深,梁冬,栗云天),第 5 章:微缩芯片实验室及其他类型生物

芯片(邵威,杜宏武),第6章:生物芯片制作技术及工艺(万妮,吴瑞阁,张旭),第7章:生物芯片相关设备(黄国亮,王东,宋立滨,陈恩,郭良宏,王栋),第8章:材料科学与生物芯片(陈德朴,孙保全,衣光舜,谢欣),第9章:生物芯片与微流体力学(吴健康),第10章:与生物芯片相关的生物信息学(周一鸣),第11章:生物芯片的应用(马雪梅,杜建宇,王栋,刘瑞凝,邓沱,郭永,王国青,高华方)。全书由邢婉丽博士统稿,程京博士对全书内容进行了审定。

由于生物芯片技术的发展日新月异,书中定有不少我们未能包含的新内容和我们尚未认识的不妥之处,敬请读者们批评指正。

在此向参与本书写作的作者们表示深深的谢意。

程 京

2003年10月于清华园

# 目 录

|                           |     |
|---------------------------|-----|
| 前言 .....                  | III |
| 第 1 章 生物芯片的起源和发展 .....    | 1   |
| 参考文献 .....                | 4   |
| 第 2 章 样品制备型生物芯片 .....     | 7   |
| 2.1 样品制备芯片的特点和重要性 .....   | 7   |
| 2.2 样品制备芯片的制备方法 .....     | 8   |
| 2.3 样品制备芯片的分类 .....       | 9   |
| 2.4 技术难点和展望 .....         | 26  |
| 参考文献 .....                | 27  |
| 第 3 章 微反应型生物芯片 .....      | 30  |
| 3.1 微反应芯片的特点 .....        | 30  |
| 3.2 微反应芯片的研究进展 .....      | 31  |
| 3.3 微反应芯片的应用 .....        | 35  |
| 3.4 微反应芯片研究的技术难点及展望 ..... | 45  |
| 参考文献 .....                | 46  |
| 第 4 章 检测型生物芯片 .....       | 49  |
| 4.1 核酸芯片 .....            | 49  |
| 4.2 蛋白质芯片 .....           | 70  |
| 4.3 细胞芯片 .....            | 78  |
| 4.4 组织芯片 .....            | 92  |
| 4.5 毛细管电泳芯片 .....         | 102 |
| 4.6 色谱芯片 .....            | 135 |



|                                   |            |
|-----------------------------------|------------|
| 4.7 质谱芯片 .....                    | 148        |
| 参考文献 .....                        | 151        |
| <b>第5章 微缩芯片实验室及其他类型生物芯片 .....</b> | <b>170</b> |
| 5.1 微缩芯片实验室 .....                 | 170        |
| 5.2 其他类型生物芯片 .....                | 175        |
| 参考文献 .....                        | 177        |
| <b>第6章 生物芯片制作技术及工艺 .....</b>      | <b>179</b> |
| 6.1 与生物芯片制作技术相关的表面化学技术 .....      | 179        |
| 6.2 与生物芯片制作相关的微加工技术 .....         | 191        |
| 参考文献 .....                        | 203        |
| <b>第7章 生物芯片相关设备 .....</b>         | <b>208</b> |
| 7.1 微阵列生物芯片制备系统 .....             | 208        |
| 7.2 生物芯片检测系统 .....                | 231        |
| 参考文献 .....                        | 248        |
| <b>第8章 材料学与生物芯片 .....</b>         | <b>251</b> |
| 8.1 生物标记材料与生物芯片 .....             | 251        |
| 8.2 微珠体与生物芯片 .....                | 264        |
| 参考文献 .....                        | 276        |
| <b>第9章 生物芯片与微流体力学 .....</b>       | <b>282</b> |
| 9.1 与生物芯片相关的微流体力学概述 .....         | 282        |
| 9.2 与生物芯片相关的微流体力学研究 .....         | 283        |
| 9.3 与生物芯片相关的微流体力学的发展趋势 .....      | 289        |
| 参考文献 .....                        | 289        |
| <b>第10章 与生物芯片相关的生物信息学 .....</b>   | <b>291</b> |
| 10.1 概述 .....                     | 291        |
| 10.2 研究内容 .....                   | 292        |
| 10.3 存在的问题与展望 .....               | 302        |

---

|                               |            |
|-------------------------------|------------|
| 参考文献 .....                    | 305        |
| <b>第 11 章 生物芯片的应用 .....</b>   | <b>308</b> |
| 11.1 生物芯片在生命科学研究中的应用 .....    | 308        |
| 11.2 生物芯片在药物研究与开发领域中的应用 ..... | 320        |
| 11.3 生物芯片在农业领域的应用 .....       | 328        |
| 11.4 生物芯片在环境科学中的应用 .....      | 336        |
| 11.5 生物芯片在国防领域的应用 .....       | 341        |
| 11.6 生物芯片在法庭科学中的应用 .....      | 346        |
| 11.7 生物芯片在航空航天领域的应用 .....     | 353        |
| 参考文献 .....                    | 355        |
| <b>索引 .....</b>               | <b>365</b> |

# Contents

**Preface** ..... III

**Chapter 1 The Origin and Development of Biochips** ..... 1

    References ..... 4

**Chapter 2 Biochips for Sample Preparation** ..... 7

    2.1 A Few Point about Sample Preparation chips ..... 7

    2.2 Fabrication Methods for Sample Preparation chips ..... 8

    2.3 Categorization of Sample Preparation chips ..... 9

    2.4 Technic Challanges and Perspective ..... 26

    References ..... 27

**Chapter 3 Biochips for Microreaction** ..... 30

    3.1 The Features and Advantages ..... 30

    3.2 The Reserch and Development ..... 31

    3.3 Applications ..... 35

    3.4 Technical Difficulties and Prospects ..... 45

    References ..... 46

**Chapter 4 Biochips for Detection** ..... 49

    4.1 DNA Microarray ..... 49

    4.2 Protein Microarray ..... 70

    4.3 Cell Array ..... 78

    4.4 Tissue Array ..... 92

    4.5 Chip-based Capillary Eletrophoresis ..... 102

    4.6 Chip-based Chromatography ..... 135

    4.7 Chip-based Mass Spectrometry ..... 148

    References ..... 151

---

|                   |                                                         |     |
|-------------------|---------------------------------------------------------|-----|
| <b>Chapter 5</b>  | <b>Lab-on-a-chip System and Other Types of Biochips</b> | 170 |
| 5.1               | Lab-on-a-chip System                                    | 170 |
| 5.2               | Other Types of Biochips                                 | 175 |
|                   | References                                              | 177 |
| <b>Chapter 6</b>  | <b>Fabrication Technologies for Biochips</b>            | 179 |
| 6.1               | Surface Chemistry                                       | 179 |
| 6.2               | Microfabrication Techniques                             | 191 |
|                   | References                                              | 203 |
| <b>Chapter 7</b>  | <b>Biochip Related Instruments</b>                      | 208 |
| 7.1               | Microarrays                                             | 208 |
| 7.2               | Detection Instruments                                   | 231 |
|                   | References                                              | 248 |
| <b>Chapter 8</b>  | <b>Biochip Related Materials</b>                        | 251 |
| 8.1               | The labeling materials                                  | 251 |
| 8.2               | Microbeads                                              | 264 |
|                   | References                                              | 276 |
| <b>Chapter 9</b>  | <b>Biochips and Microfluidics</b>                       | 282 |
| 9.1               | Introduction to Biochip-related Microfluidics           | 282 |
| 9.2               | Research on Biochip-related Microfluidics               | 283 |
| 9.3               | Trends of Biochip-related Microfluidics                 | 289 |
|                   | References                                              | 289 |
| <b>Chapter 10</b> | <b>Bioinformatics for Biochips</b>                      | 291 |
| 10.1              | Introduction                                            | 291 |
| 10.2              | Research Areas                                          | 292 |
| 10.3              | Problems and Prospects                                  | 302 |
|                   | References                                              | 305 |

---

|                   |                                        |     |
|-------------------|----------------------------------------|-----|
| <b>Chapter 11</b> | <b>Application of Biochips</b>         | 308 |
| 11.1              | Applications in Life Sciences          | 308 |
| 11.2              | Applications in Drug Discovery         | 320 |
| 11.3              | Applications in Agricultural Practice  | 328 |
| 11.4              | Applications in Environmental Science  | 336 |
| 11.5              | Applications in Defense                | 341 |
| 11.6              | Applications in Forensic Science       | 346 |
| 11.7              | Applications in Aerospace and Aviation | 353 |
|                   | References                             | 355 |
| <b>Index</b>      |                                        | 365 |

# 第 1 章

## 生物芯片的起源和发展

随着人们对生命活动本质认识的不断深入,特别是人类基因组计划的完成,生命科学领域的研究又面临着新的挑战,即开发出能同时大规模处理生物样品和解析生物信息的新技术。在学科交叉不断深入的基础上诞生的生物芯片技术目前已成为国际上的前沿研究领域和热点。生物芯片的概念是 Fodor 等人于 1991 年在著名杂志 Science 上提出来的(Fodor et al. 1991)。在生物芯片出现的初期,主要的研究对象是 DNA 芯片,因而最初一些刊物往往用 DNA 芯片来囊括生物芯片的研究内容。经过十多年的发展,生物芯片的范围已经远远超出了 DNA 芯片本身,DNA 芯片只是生物芯片的一个种类。根据目前生物芯片的结构特点,可以将其分为两个主要类别。第一类是由生物材料微阵列构成的芯片,包括 DNA 芯片、蛋白质芯片和组织芯片等,由于它们的工作原理都是基于生物分子之间的亲和结合作用,如抗原和抗体的结合,核酸分子的碱基配对作用,所以通称为亲和生物芯片。第二类是以各种微结构为基础的微流控芯片,利用它可实现对各种生化组分的微流控操作,这类芯片的代表有毛细管电泳芯片、PCR 反应芯片、介电泳芯片等。另外,根据是否能够对生物芯片上的分子与细胞进行操纵、对反应进行控制等,又可将生物芯片分为主动式与被动式两种。主动式生物芯片是指通过在基质材料表面加工出各种功能单元,使得通电时,在芯片上产生各种场和力,从而达到精确操纵分子与细胞及控制反应的目的。而被动式生物芯片是指基质表面无任何功能单元,所有反应都是通过随机扩散的方式进行的。

从以上列举的生物芯片来归纳,可以给生物芯片下一个初步的定义:生物芯片是指能快速并行处理多个生物样品并对其所包含的各种生物信息进行解析的微型器件,它的加工运用了微电子工业中十分成熟的光刻技术

和微机电系统加工中所采用的各种方法,只是由于其所处理和分析的对象是生物样品,故称之为生物芯片。

追溯生物芯片的起源,由于它包括的内容太多,我们以亲和型生物芯片为代表来做一些说明。亲和型生物芯片依靠的是生物分子之间的亲和结合作用。在 20 世纪 50 年代末 Yalow 和 Berson 采用基于亲和作用的放射性免疫分析方法对胰岛素进行了检测(Yalow and Berson, 1960)。60 年代出现的用放射性同位素标记抗体来检测抗原(Wide et al. 1967; Miles et al. 1968)的工作可算是蛋白质芯片原理的最初应用。而 70 年代发展的 Southern Blot(Southern, 1975)技术,是在有孔的固相基质上固定核酸,并通过杂交原理来检测核酸的多态性,因此可算是 DNA 芯片的前身。

在对核酸的分析中,除了多态性分析外,还有一大类是关于对基因表达的分析。在检测基因表达的方法中,除了最常用的 Northern Blot 技术外(Alwine, 1977),还有差减杂交(subtractive hybridization)(Ermolaeva and Sverdlov, 1996)、差异性显示 PCR 法(differential display PCR)(Liang and Pardee, 1992)、dot blot 分析法(Lennon and Lehrach, 1991)以及表达系列扩增法(serial amplification of gene expression, SAGE)(Velculescu et al. 1995)。这些分析基因表达的方法要求的生物材料比较多,并且能同时分析的样品数量有限。生物学领域的发展,总是和其他学科的发展紧密相联的。到 20 世纪 90 年代初,精密机械控制、高灵敏度光学检测、光刻微加工等技术都日益成熟,当生物科学领域的发展和其他学科的先进技术结合时,就必然会产生新的学科结合点和生长点。1991 年, Fodor 等人(Fodor et al. 1991)利用光刻技术,在固相基质上通过光引导原位合成了 1024 种多肽的序列,并用荧光显微镜观察了多肽和单克隆抗体之间的亲和反应,也就是在此文中,他们提出了生物芯片的概念。运用光原位合成原理,研究人员在 90 年代初还发展了在基质上固定有高密度寡核苷酸的 DNA 测序芯片(Mirzabekov, 1994)。1995 年, Schena 等人在 Science 上(Schena et al. 1995)报道,他们把拟南芥的 45 个基因固定在一块玻片上,并行检测拟南芥植株不同组织及不同处理后 45 个基因的表达情况。此报道第一次结合了高精度机械手点样系统、荧光标记技术、双通道荧光扫描技术及数据分析软件,可以说是第一次真正意义上的用 DNA 芯片技术进行基因表达分析的应用。继此之后,用于基因表达分析的 DNA 芯片技术发展迅速,在玻片上点样的密度越来越大,芯片制作的质量也越来越好。现在部分基因组被测序的微生物的全基因组规模的 DNA 芯片已经制备出来,并用于各种研究

和应用中,如酿酒酵母(DeRisi et al. 1997; Gasch et al. 2000)、结核杆菌(Wilson et al. 1999; Behr et al. 1999)、大肠杆菌(Richmond et al. 1999; Wendisch et al. 2001)的全基因组 DNA 芯片。人类基因组计划已顺利完成,目前包含 3 万多个人类基因 oligo 的 DNA 芯片已经问世。在蛋白质分析方面,1975 年的单克隆抗体制备技术可以制备出高纯度的抗体(Kohler and Milstein, 1975),以检测特异性抗原的存在。在 90 年代初报道的微斑免疫分析法中(Ekins and Chu, 1991),所有抗体圆斑的直径只有  $10\ \mu\text{m}$ ,并使用了激光共聚焦显微镜来检测标记抗体产生的荧光。最近,Zhu 等人(Zhu et al. 2001)克隆了酵母菌中编码蛋白质的 5800 个开放阅读框(open reading frame, ORF),在载体中表达出了各自的编码蛋白,并把这些蛋白印制到聚二甲基硅氧烷(PDMS)上,制成高密度的酵母蛋白组微阵列,用它来研究蛋白和磷脂之间的作用。此蛋白组芯片技术可以在蛋白和药物作用,以及基因转录后修饰研究中发挥作用。

现在所进行的 DNA 芯片检测,都是在盖玻片下进行的。杂交液基本不流动,只靠分子的布朗运动来实现探针和靶标分子之间的结合,因而要求的杂交时间长(一般  $10\sim 16\ \text{h}$ )、检测的灵敏度有限。Brenner 等人发展了一种流动杂交测序的方法(Brenner et al. 2000)。在直径为  $5\ \mu\text{m}$  的微粒表面吸附体外克隆的 cDNA 片段,然后与带有标记的接头(adaptor)在 II 型内切酶的切割和接头的连接作用下,在可流动的反应室里反复循环多次,通过 CCD 探头检测,可以测出 cDNA 片段游离端  $16\sim 20$  个碱基的序列。由于一次可以在反应小室中投入数以百万计的微粒,故测序的速度可比一般的机器高出 10 倍。

DNA 芯片或蛋白质芯片的发展方向主要有三个方面(Blohm and Guiseppi-Elie, 2001): ①无标记杂交信号检测;②高度自动化的杂交流水作业系统;③强大的数据处理软件。其中在信号检测方面的进展包括:把发射和检测信号的光电二极管都做在芯片上;用光纤束来检测信号;用电化学方法来检测反应信号以及用导电的纳米胶体金颗粒和碳纳米管来进行标记。

针对不同用途而研制的不同构造的生物芯片,主要是随着生物学科以外的其他学科,特别是微加工技术的成熟而出现的,如芯片毛细管电泳、PCR 反应芯片、介电电泳芯片等都需要应用微电子和微机电系统加工中一些十分成熟的微加工工艺。在以后的章节中,将对此类生物芯片的发展进行较详细的描述,这里不再赘述。



生物芯片发展的最终目标是将样品制备、生化反应到检测的整个分析过程集成化,以获得所谓的微型全分析系统或称缩微芯片实验室(Lab-on-a-chip)(参见图 1-1)。1998 年 6 月,美国 Nanogen 公司的程京及合作者首次报道了用芯片实验室程序实现从样品制备到反应结果检测的全部分析过程(Cheng et al. 1998)。他们用这个装置从混有大肠杆菌的血液中成功地分离出了细菌,在高压脉冲破胞之后用蛋白酶 K 孵化脱蛋白,制得纯化的 DNA 和 RNA,最后用另一块电子增强的 DNA 杂交芯片分析证实提取物是大肠杆菌的 DNA 和 RNA,这是向缩微芯片实验室迈进的一个成功突破。目前,集成有加热器、微泵微阀、微流量控制器、光探测器的芯片实验室系统已经研制出来,而且,也出现了将样品制备、化学反应和分析检测三个部分整合的芯片(Burns et al. 1996, 1998; Burke et al. 1997; Handique et al. 2001, Webster et al. 2001)。生物芯片各个方面的发展都在朝最终的目标——建立一个高度整合的“Lab-on-a-chip”迈进。

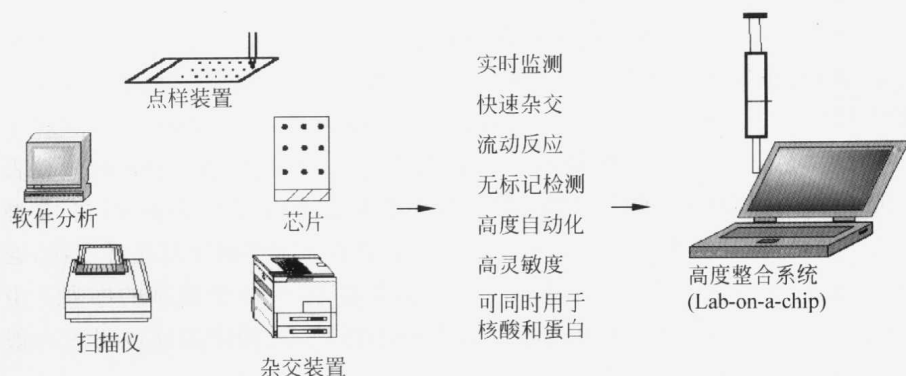


图 1-1 生物芯片各部分高度整合示意图

## 参 考 文 献

- Alwine J C, Kemp D J, Stark G R. Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1977, 74(12): 5350~5354
- Behr M A, Wilson M A, Gill W P, et al. Comparative genomics of BCG vaccines by whole-genome DNA microarray. *Science*, 1999, 284(5419): 1520~1523
- Blohm D H, Guiseppi-Elie A. New developments in microarray technology. *Curr Opin Biotechnol*, 2001, 12(1): 41~47