

生物芯片



● 马立人 蒋中华 / 主编

化学工业出版社

生 物 芯 片

马立人 蒋中华 主编

化学工业出版社
·北 京·

(京)新登字 039 号

2P22/36

图书在版编目 (CIP) 数据

生物芯片/马立人,蒋中华主编. —北京:化学工业出版社, 2000.2

ISBN 7-5025-2732-X

I. 生… II. ①马… ②蒋… III. 生物-芯片 IV. TN43

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (1999) 第 71479 号

生 物 芯 片

马立人 蒋中华 主编

责任编辑:王秀鸾

责任校对:洪雅姝

封面设计:郑小红

*

化学工业出版社出版发行

(北京市朝阳区惠新里 3 号 邮政编码 100029)

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

*

新华书店北京发行所经销

北京市云浩印刷厂印刷

北京市同文印刷厂装订

开本 850×1168 毫米 1/32 印张 7 $\frac{5}{8}$ 插页 2 字数 199 千字

2000 年 2 月第 1 版 2000 年 2 月北京第 1 次印刷

印 数: 1—3000

ISBN 7-5025-2732-X/Q·10

定 价: 26.00 元

版权所有 违者必究

该书如有缺页、倒页、脱页者,本社发行部负责退换

内 容 提 要

将成千上万种具有生物识别功能的分子有序地点阵排列在面积不大的基片上并与标记的检体分子同时反应或杂交。通过放射自显影、荧光扫描、化学发光或酶标显示可获得大量有用的生物信息。这一技术统称为生物芯片技术。

本书收集了60~70家生物芯片的研究单位和公司1998~1999年网上最新资料并查阅了数10种有关的期刊和书目。详细地描写了各种生物芯片的制作方法,生物芯片反应的微流路设计,生物芯片的检测方法,信号的采集和数据处理。尤其是重笔描述了生物芯片在基因测序、基因突变的检测、遗传病和肿瘤的诊断、农业方面的物种改良、新药靶标的寻找以及生物芯片在军事医学中的应用。本书是既有理论又有实验方法、内容丰富的新著,适合于从事分子生物学、生命科学、临床医学、药学、环境科学的研究生、老师及同行们参考。

主 编：马立人 蒋中华

副主编：许丹科 陈惠鹏

编 者：（按姓氏笔画顺序）

马立人 王 洪 许丹科 刘耀清 刘志红

李元光 何 为 步恒富 张津辉 陈惠鹏

邱兆华 武 婕 姜雄平 蒋中华

序

技术的突破往往会对科学推进一大步。分子生物学中，基因重组技术和聚合酶链反应技术的出现和普遍使用，使分子生物学发展到今天的欣欣向荣的局面。

90年代兴起的人类基因组计划也即将宣告完成，等待着的是如何破译深藏在生物体中巨大遗传语言的生物学意义。生物芯片技术的出现，有可能在解开这一语言之谜，揭示生命本质，以至阐明疑难杂症的致病机理中起到重要作用。

生物芯片技术还在兴起阶段，它还远没有普及。在我国它也刚刚起步。作者们收集网上及文献资料，结合工作中体会编写本书。本书将可使读者对这一新技术的概貌有较全面的了解，或许能使读者对生物芯片的技术改进和应用引起兴趣。

谨此推荐

A handwritten signature in black ink, reading '张爱民' (Zhang Aimin) in a cursive style.

一九九九年十月三十日

编 者 的 话

生物芯片出现了仅仅几年，但它已吸引了无数人的注意。这一技术目前虽尚处于它的成长初期，但人们都相信在下一世纪许多生物化学反应，尤其是目前在凝胶上、膜上和酶标板上进行的生化反应都将在芯片上完成。有人预计生物芯片技术将会和聚合酶链反应（PCR）和 DNA 重组技术一样，给分子生物学和相关学科带来突飞猛进的飞跃。

生物芯片的特点是在小小的面积上，通过平行的反应带来无数的生物信息。这些信息中还有相当部分目前人们尚不理解。正如考古学家发现了载有古文字的器件时，一时还不能读懂它。但这些古文字却联系着人类的古文化与现代文化。生物芯片带来的信息也蕴藏着生物学中结构与功能的内在联系。科学家们正在用现代手段不断破译着其间的联系。

生物芯片的应用具有十分巨大的潜力。在后基因组研究、新药研究、生物物种改良、疑难疾病（包括癌症、早老性痴呆等）的病因研究和医学诊断等方面它已经提供或正在提供有价值的信息。随着生物芯片制作工艺和检测分析手段的飞速发展，它必将成为科学家们手中的有力武器。

这一本小册子搜集了网上及迄至 1999 年上半年中的一些资料，汇总成一册小小的综述。给读者节省一些收集资料的时间。但由于编者水平所限，难免会带入一些过时的甚至不正确的观点。编者忠实地将引文出处和网址都提供给读者，使读者可由此找到原著。

由于生物芯片发展迅速，读者拿到本书时将会有许多新资料出现。本册子只能是 1999 年上半年以前生物芯片的概貌，供有志于探讨、应用这一新技术的读者们参考。

目 录

1. 概述	1
1.1. 基本概念	1
1.2. 历史沿革	2
1.3. 样品预处理的现状	3
1.4. DNA 芯片的类型和制作	4
1.5. 芯片的杂交和反应	6
1.6. 芯片的检测和结果运算	10
1.7. 生物芯片的应用	12
参考文献	15
2. DNA 芯片或基因芯片	16
2.1. 生物芯片的制作方法	16
2.1.1. 对载体的要求	16
2.1.2. 载体材料	17
2.1.3. 载体的活化	17
2.1.4. 生物芯片的制作方法	19
2.1.5. 制作生物芯片常用的工具	19
2.1.6. DNA 样品的来源	21
2.1.7. 点点法制作低密度 DNA 芯片	29
2.1.8. 分子印章法高密度 DNA 原位合成法	30
2.1.9. 光导向空间定位的化学合成法	31
2.1.10. 用半导体光刻法合成高密度寡核苷酸芯片	33
参考文献	36
2.2. 微流路生物分析仪	36
2.2.1. 硅片的微加工技术	37
2.2.2. 纳升级 DNA 分析芯片	40
2.2.3. PCR 芯片	42
2.2.4. 蛋白质分析芯片	43

2.2.5. 样品处理芯片	45
2.2.6. 电寻址导向式 DNA 芯片	46
2.2.7. 血气检测芯片	47
参考文献	48
2.3. 探针的革新和发展	49
2.3.1. 分枝探针技术	49
2.3.2. 分子信标	64
2.3.3. 肽核酸	73
参考文献	80
2.4. 目标基因片段体外扩增方法的进展	84
2.4.1. PCR 技术的有关进展	84
2.4.2. PCR 以外的扩增技术	90
参考文献	92
2.5. 生物芯片的扫读	92
2.5.1. 芯片扫描仪的测定原理与特性	93
2.5.2. 自己组装搭建芯片扫描装置 (DIY)	99
2.5.3. 芯片扫描测定中应注意的几个问题	100
参考文献	101
2.6. 生物芯片的数据处理	102
2.6.1. 图像分析和数据提取	103
2.6.2. 芯片数据信息的管理	108
2.6.3. 芯片数据的分析	109
参考文献	114
3. 其他生物芯片	116
3.1. 蛋白质的芯片分析	116
3.1.1. 蛋白质组研究	116
3.1.2. 蛋白质芯片作表达物的筛选	117
3.1.3. 双链 DNA 芯片与相关蛋白质的作用	117
3.1.4. 芯片微流路蛋白质分析	118
参考文献	118
3.2. Biacore 技术	118
3.2.1. 表面等离子体共振原理	118
3.2.2. Biacore 技术分析生物分子的相互作用原理	120

3.2.3. Biacore 产品及应用	122
参考文献	124
3.3. 丝网印刷技术	125
3.3.1. 原理及工艺	125
3.3.2. 应用	126
参考文献	129
4. 应用	130
4.1. 芯片测序及基因图绘制	130
4.1.1. DNA 序列测定	131
4.1.2. 基因图的绘制	133
4.1.3. 基因多态性检测	134
4.1.4. SBH 存在问题	136
参考文献	137
4.2. 基因表达分析	138
4.2.1. cDNA 微阵列芯片定量研究芥菜 (<i>Arabidopsis thaliana</i>) 的基因表达方式	139
4.2.2. 平行的人基因分析	142
4.2.3. DNA 微阵列芯片	145
4.2.4. 用全基因组寡核苷酸阵列平行分析基因的选择	146
4.2.5. 酵母微阵列芯片用于全基因平行分析	150
4.2.6. 微阵列芯片表观差异分析	154
参考文献	156
4.3. 克隆选择及文库筛选	157
4.3.1. 对 cDNA 文库进行分类	157
4.3.2. 对噬菌体文库进行分析	161
4.3.3. 对其他文库进行分析	163
参考文献	163
4.4. 生物芯片在基因突变检测及在遗传病和肿瘤诊断中的应用	164
4.4.1. 基因突变	165
4.4.2. 基因突变检测技术	166
4.4.3. DNA 芯片在检测突变中的应用	170
4.4.4. 突变检测在遗传病诊断中的应用	172
4.4.5. 突变检测在肿瘤诊断中的应用	176

参考文献	181
4.5. 基因芯片在微生物菌种鉴定及致病机制中的应用	184
4.5.1. 利用基因芯片技术研究感染病毒基因组	185
4.5.2. 监测感染宿主细胞基因表达改变、研究病毒致病机制	186
4.5.3. 利用基因芯片杂交图像进行细菌基因分型与菌种鉴定, 筛选监测细菌抗药性基因	187
4.5.4. 前景与展望	190
参考文献	190
4.6. 生物芯片在其他医学方面的应用	191
4.6.1. 炎症相关基因的观察	191
4.6.2. 双链 DNA 芯片用于研究 DNA-蛋白相互作用	192
4.6.3. 生物芯片在水质控制方面的应用	193
参考文献	193
4.7. 生物芯片在药物研究中的应用	194
4.7.1. 药物筛选	194
4.7.2. 遗传药理学与合理用药	197
4.7.3. 毒理学研究	198
参考文献	198
4.8. 生物芯片在农林业中的应用	199
参考文献	201
4.9. 生物芯片和生物传感器在军事医学中的应用	201
4.9.1. 概述	202
4.9.2. 研究进展	206
5. 发展和展望	217
6. 生产生物芯片及相关设备的厂商, 服务及供应内容	219

1. 概 述

1.1. 基本概念

生物芯片的概念来自计算机芯片，发展至今不过 10 年左右，但进展神速。迄今已有近百家公司从事生物芯片相关工艺、设备及检测手段和软件的发展。

芯片分析的实质是在面积不大的基片表面上有序地点阵排列了一系列固定于一定位置的可寻址的识别分子。结合或反应在相同条件下进行。反应结果用同位素法、化学荧光法、化学发光法或酶标法显示，然后用精密的扫描仪或 CCD 摄像技术记录。通过计算机软件分析，综合成可读的 IC 总信息。

芯片分析实际上也是传感器分析的组合。芯片点阵中的每一个单元微点都是一个传感器的探头。所以传感器技术的精髓往往都被应用于芯片的发展。阵列检测可以大大提高检测效率，减少工作量，增加可比性。所以芯片技术也是传感器技术的发展。

由于最初的生物芯片主要目标是用于 DNA 序列的测定，基因表

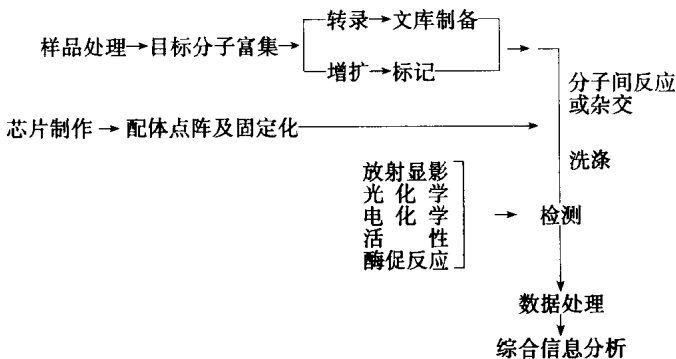


图 1.1.1 生物芯片分析步骤

达谱鉴定和基因突变体的检测和分析，所以它又被称为 DNA 芯片或基因芯片。但目前这一技术已扩展至免疫反应、受体结合等非核酸领域。所以按现状改称生物芯片更能符合发展的趋势。

生物芯片分析的过程一般来说包括图 1.1.1 步骤。
各步骤应用的技术将在本书各章节中叙述。

1.2. 历史沿革

俄罗斯科学院恩格尔哈得分子生物学研究所^[1]和美国阿贡国家实验室^[2] (ANL) 的科学家们最早在文献中提出了用杂交法测定核酸序列 (SBH) 新技术的想法。当时用的是八聚寡核酸探针。几乎与此同时英国牛津大学生化系的 Southern 等也取得了在载体固定寡核苷酸及杂交法测序的国际专利^[3,4]。在这些技术储备的基础上, 1994 年在美国能源部防御研究计划署、俄罗斯科学院和俄罗斯人类基因组计划 1000 多万美元的资助下研制出了一种生物芯片, 并用于检测 β -地中海病人血样的基因突变, 筛选了一百多个 β -地中海贫血已知的突变基因。这种生物芯片的基因译码速度比传统的 Sanger 和 Maxam Gilbert 法快 1000 倍, 是一种有希望的快速测序方法^[5]。

在初期试验取得成功的鼓舞下, 商业资本开始投入, 1995 年 6 月 29 日 Motorola 公司和 Packard 仪器公司与阿贡实验室合作共同开发具有商业价值的生物芯片及其相关的分析技术。出资 1900 万美元, 预计在今后 5 年内完成产品的商业化和市场化, 其中阿贡实验室和俄罗斯科学院恩格尔哈得分子生物学研究所投资 19 项专利, 完成基础研究。Motorola 公司投资 930 万美元, 完成生物芯片制造的开发, 降低成本和提高质量, Packard 仪器公司投资 970 万美元, 完成生物芯片的仪器开发, 用于生物芯片的处理和分析。

抢先发展技术, 尽快占领市场是市场经济竞争中取得胜利的信条。生物芯片目前正处于激烈的技术竞争状态中。Packard 仪器公司发展的是诊断用的以凝胶为基础的中等密度的芯片。而 Affymetric 公司则已成功地应用了光导向平板印刷技术, 直接在硅片上合成寡核苷酸点阵的高密度芯片而领先于芯片分析领域。该公司与惠普公司合作

开发出专用的能扫描 40 万点点阵的基因芯片扫描仪，同时又开发出同时可平行通过几块芯片的流路工作站和计算机软件分析系统。组合成一套较完整的芯片制造、杂交、检测扫描和数据处理系统。不久 General Scanning Inc 与制造点样头的 Telechem 公司和制造机械手的 Cartesian 公司研制的 3000 型（两激光）、4000 型和 5000 型（四激光）激光共聚扫描仪和相应的分析软件，构成一套用户可任意点样制作芯片的工作系统。

除了上述两个系列的芯片供应公司外，许多家公司纷纷推出各有特色的生物芯片产品。Amersham Pharmacia Biotech 公司与 Molecular Dynamic 公司合作，将有特色的 Cy3 和 Cy5 荧光染料与他们可利用双色荧光的 Storm CLSM 2010 激光共聚焦显微镜及 Image Quant 自动扫描装置在平行条件下对比正常与病态组织的 DNA 谱图或其表达谱，找到与疾病相关的基因。Clontech, Hyseq, Protogene, Synteni, Nanogen 则推出中等密度的生物芯片及同位素与荧光检测装置。Incyte Pharmaceuticals 则研制出压电喷墨点印法制作 GEM 系列人类及动物（大、小白鼠），病原体（金葡菌及白色念珠菌）等现成的芯片，每块芯片可达 10000 个微点，核酸长度为 500~600bp，能检测每个细胞中只表达一次的基因序列。灵敏度达 10 万个细胞中一个突变的细胞。

欧洲各公司也不甘落后，纷纷投入竞争，例如 Genetic Co. UK 研制出 Q Bot 点样器，Q-Pix 克隆挑拣仪及 Q-Fill 2 制芯片设备。Sequenom 则推出 250 位点的 Spectrochip 并采用质谱法测读结果，而德国肿瘤研究所则用就位合成的肽核酸低密度（8cm×12cm 片上 1000 个点）的作表达谱及诊断用的探针芯片。

以上只是罗列了一小部分芯片市场竞争的情况。各公司近期可提供的产品可查阅本书 6.。

1.3. 样品预处理的现状

生物样品往往是复杂的混合物，除少数特殊样品外，不能直接与芯片反应。从 1989 年以来用电场作用来分离细胞、细菌及颗粒（包

括富集病毒以及破碎细胞使核酸和蛋白质释放出来)取得了一系列的成功。这就促使芯片制造者考虑在芯片上作样品前处理这一重要步骤。其中较为成功的是在不均匀的变换频率(在 10~100kHz 范围内)的交流电场内分离各种颗粒。这个方法被称为介电电泳(Dielectrophoresis)。

在微流路中某不同细胞或颗粒由于介电性质不同而在交变电场中形成流过速度的差别,使某一类细胞或细菌(包括病毒)得到富集。虽然这一装置仍在实验阶段,但已在分离一系列细胞中取得成功。结果见表 1.3.1。

表 1.3.1 用介电电泳分离成功的混合细胞

混合细胞	电导/(ms/m)	频率/kHz	先流出细胞
红细胞/M. luteus	10	10	红细胞
活酵母菌/死酵母菌	1	10	死酵母菌
M. luteus/酵母菌	55	10	酵母菌
大肠杆菌/M. luteus	55	100	大肠杆菌
大肠杆菌/枯草杆菌	30~50	100	大肠杆菌
白血病患者细胞/血细胞	10	80	血细胞
红细胞/乳腺癌细胞	10	80	红细胞
骨髓细胞/外周血	1	5	CD34+
Hela 细胞/外周血			血细胞

大肠杆菌与血细胞混合物曾在这种电生物芯片上取得分离,分离后的细菌用电脉冲(500V 400 脉冲)溶菌,并用蛋白酶消化。释放出来的核酸包括 RNA、质粒 DNA 和基因组 DNA 输送至芯片进行杂交分析。

1998 年 Nanogen 公司曾推出一种分离硅片,可用作芯片分析前处理。

1.4. DNA 芯片的类型和制作

迄今为止,绝大多数的生物芯片都是 DNA 芯片,所以制作芯片的方法也多为 DNA 芯片设计的。目前的 DNA 芯片有两类。

- ① 片上就位合成寡核苷酸点阵芯片 (ONA)^[7]
- ② 用微量点样技术制作 cDNA 点阵芯片 (CDA)^[8]

虽然 ONA 可以按常规方法先合成寡核苷酸，再点加于阵列的方法来制作，但应用就位合成法已证明是更成功的途径。这一技术中采用了多项先进的工艺，例如：

- 利用组合化学的原理安排各寡核苷酸的位点，使制成的芯片在反应后较容易地寻址。

- 用表面化学的方法处理及衍生化基片（玻璃片、硅片或尼龙片）表面，使核苷酸能固定在其上，并耐受合成循环中某些试剂的侵蚀。

- 用光导向平板印刷技术，使芯片表面可用屏蔽物选择性地使不同位点受光照脱保护，从而可定点合成寡核苷酸中的各个碱基。

最后还应用了自动核酸合成的方法经过脱保护活化、偶联、戴帽和氧化等步骤逐个地联结上各个核苷酸。与玻片连接的是核苷酸的 3' 端。

用就位合成法已可以从最初的 100 个位点合成八核苷酸到目前的在 1.6cm^2 上的 40 万个点合成 20 个核苷酸阵列。看来要将人类基因组 3×10^9 个碱基全部集成于一块芯片上的理想是可以实现的。

在另一方面机械微量点样技术制作 CDA 芯片则主要应归功于物理学的成就。精密机械手将带有多个滴加头的点样装置，从 96 孔或 384 孔板上将 cDNA 克隆迅速而定量地接触滴加至已衍生处理的基片上，每点 1nL，用此法接上的核酸长度可为 500~5000 个核苷酸。所以杂交错配的可能性，也就是选择性，有较大改善，可以逐句破译序列密码而不是逐字阅读序列。另外点加法的优点是可以制作各种生物芯片，不局限于制作 DNA 芯片。目前已有制作免疫芯片的报道。当然也可适用于受体——药物，凝集素——多糖等更广泛的领域。

机械滴加法的另一种方式是喷墨点加法。在此法中进行滴加的样品吸入微型喷嘴，喷嘴由压电晶体驱动，压缩喷嘴定量地将样品喷点于玻片上。

机械点样法可以制成每平方米含 10000 个点的阵列芯片，每天可制成 100 片左右。

比较起来这两种形式制作的芯片和应用上各有特色，见表

1.4.1。

表 1.4.1 ONA 芯片与 CDA 芯片制作和应用比较

项 目	就位合成法制作 ONA	微量点样法制作 CDA
芯片密度	高密度	中等密度
核酸长度	<25mer	500~5000mer
主要制作成本	遮蔽网的投资大	仪器投资
随意性	局限于 ONA	DNA、抗原抗体、受体药物等
扫描寻址	较易有序测读，但要求分辨率高	测读软件较复杂，易做对比分析
测读可靠性	字读、易有漏读、错读	句读，错读较少
最佳适用范围	再测序，查明点突变	比较分析

1.5. 芯片的杂交和反应

根据 Watson 和 Crick 提出的 DNA 双螺旋原理而发展的核酸链间分子杂交的技术，不论对 ONA 或 CDA 来说都是芯片检测的关键一步。在此步中发生靶标样品核酸与探针之间的选择性反应。反应双方中总有一方固定在芯片上，而另一方则在标记后通过流路或加样至芯片上，芯片杂交中固定在芯片上的往往是成千上万的探针而与之杂交的是经过标记（同位素或荧光）的样品核酸，此靶标样品核酸往往需先经过 PCR 扩增或克隆或逆转录（mRNA），然后打碎成文库。同位素或荧光标记则在扩增或逆转录过程中进行。标记的靶标与固定探针在经过试验确定的严谨条件下进行分子杂交。芯片杂交属于固-液相杂交，与膜上杂交相似。已有不少作者对芯片上杂交反应的物理化学进行过研究^[9]。影响异源杂交双链形成的因素包括靶标浓度、探针浓度、杂交双方的序列组成、盐浓度及温度。选择的条件要使成千上万对的杂交反应中的最大多数处于最佳状况中，也就是说要使尽可能多的正确配对物都能不遗漏（假阴性尽可少），有错配的杂交降低至最低（假阳性尽量少），这是颇难达到的境界。

当杂交混合物中靶标浓度约 10 倍于互补分子时出现假一级反应动力学。此时杂交速率主要决定于探针浓度。探针浓度提高 1 倍，信号也增强 1 倍。假一级反应在结果定量中大大有利于减轻制作点阵芯