

第二版

生物 芯片

马立人
蒋中华 / 主编



化学工业出版社

生 物 芯 片

第 二 版

马立人 蒋中华 主编

化 学 工 业 出 版 社

· 北 京 ·

(京)新登字 039 号

图书在版编目 (CIP) 数据

生物芯片/马立人, 蒋中华主编. 二版. —北京: 化学工业出版社, 2002. 6
ISBN 7-5025-3848-8

I. 生… II. ①马…②蒋… III. 生物-芯片 IV. Q78

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2002) 第 033539 号

生 物 芯 片

第 二 版

马立人 蒋中华 主编

责任编辑: 王秀鸾

责任校对: 陶燕华

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)

发行电话: (010) 64982530

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

*

新华书店北京发行所经销

北京云浩印刷有限责任公司印刷

三河市前程印刷厂装订

开本 850 毫米×1168 毫米 1/32 印张 16 $\frac{1}{4}$ 插页 2 字数 435 千字

2002 年 10 月第 2 版 2002 年 10 月北京第 5 次印刷

ISBN 7-5025-3848-8/Q·22

定 价: 35.00 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

编者名单

主编：马立人 蒋中华

编者：（按姓氏笔划为序）

马立人	王艳	许丹科	刘耀清
刘志红	李元光	李君文	何为
吴雪琼	步恒富	邱兆华	武婕
姜雄平	陆祖宏	钱小红	黄文杰
蒋中华	廖明阳		

再 版 前 言

承蒙读者关爱，生物芯片这一小册子从 2000 年 2 月出版后，虽然重印了共 4 次，但均已售罄。至今仍经常有读者询问，希望购到此书；化学工业出版社也敦促编者撰写第二版。

生物芯片第一版收集的资料，迄止于 1999 年 7 月，至今已两年有余。值此世纪之交，生物医学的发展突飞猛进，取得了历史性的重大成就。原订于 2005 年完成的人类全基因组计划，提前于 2000~2001 年完成框架图及初步描述。由于测定核酸序列技术的发展，有许多动、植物和微生物的全基因序列得到破译，基因芯片技术随之而得到巨大的进展。芯片公司推出了众多的商品化芯片，使用户能购到及使用，同时也出现了许多新的芯片。为此，编者增添 1.8 节：对 1999~2001 年生物芯片的进展，加以综述和补充。

蛋白质组计划和蛋白质芯片是在后基因组时代为了阐明基因组计划中测定的许多不明功能序列的基因的作用而发展的新技术，出现于世纪之交，理所当然地要写入生物芯片第二版。与此同时，人们对生物芯片的用途也愈益明，基因中的 SNP 的检测和基因的差异表达分析是生物芯片应用最多的领域，已有所补充。原来比较单薄的 4.5 基因芯片在微生物菌种鉴定及致病机制中的应用中增写了 3 节具体应用的内容；在 4.7 生物芯片在药物研究中的应用，则增列了已知的 503 个药物靶标和毒理学研究内容。

在第二版中对近两年来有较大发展的分子信标和肽核酸有所补充。最后，为了适应当前反恐怖活动这个新热点的需要，增写了 4.9.3 反恐怖活动及生物和化学战剂的检测一节。

为了使第二版的内容能赶上形势的发展，本版收集的文献截止于 2001 年 12 月，力求在新颖性、信息性及实用性方面有进一步的提高。但在这段时间内生物芯片的发展实在太多、太快，涉及的专

业面太广，肯定还有许多重要的领域有遗漏，乃至内容有错误，敬请读者指正。

编者

2002年1月


序（第一版）

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。

20世纪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, appearing to read '张安' (Zhang An) in a cursive style.

1999.10

编者的话（第一版）

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。

编者

1999.10

跋

今天，我们正处在生命科学黄金时代的前夜。许多重大的生命科学规划项目都已获得长足进展，如人类基因组计划即将完成，基因治疗即将应用于临床，大型哺乳动物克隆技术已取得突破等。这些进步将使我们对许多生物学的基本问题找到明确的答案并对一些疑难问题探索到解决的办法。

在世纪之末，分子生物学技术的突破为取得上述进展提供了关键性的方法和手段，例如基因重组技术和聚合酶链反应已经有效地促进了生命科学的进步。近年来发展起来的生物芯片技术又是一项重要的技术突破，它可以给出大量的有关信息。分析和解释这些信息，将在结构与功能之间架起桥梁，推进生命科学的迅速发展。

生物芯片尚在它的发展初期，但已经在药物靶标的寻找、物种改良关键基因的判定、疑难疾病的诊断和病因探索等方面显示了威力。本书所收集的资料将使读者了解到当前芯片技术研究和应用的概况，以引起从事生命科学工作的读者对这一技术的重视。

吴祖泽

1999年11月4日

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迄止 2001 年底网上最新资料并查阅了数十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、微生物检测、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。

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
1.8 1999 ~ 2001 年生物芯片的进展	15
1.8.1 商品化的基因芯片	16
1.8.2 新品种的生物芯片	21
1.8.3 生物芯片的应用	24
参考文献	25
2 DNA 芯片或基因芯片	27
2.1 生物芯片的制作方法	27
2.1.1 对载体的要求	27
2.1.2 载体材料	28
2.1.3 载体的活化	28
2.1.4 生物芯片的制作方法	30
2.1.5 制作生物芯片常用的工具	30
2.1.6 DNA 样品的来源	32
2.1.7 微芯片印刷技术	40
2.1.8 分子印章法高密度 DNA 原位合成法	56
2.1.9 光导向空间定位的化学合成法	56
2.1.10 用半导体光刻法合成高密度寡核苷酸芯片	58
参考文献	60
2.2 微流路芯片	62

2.2.1	微流路芯片的制作技术	63
2.2.2	毛细管电泳芯片 (CE-Chip)	68
2.2.3	高压电源及进样方式	68
2.2.4	检测方法	69
2.2.5	微流路芯片的分离方式	70
2.2.6	应用	70
2.2.7	商品化微流路芯片及检测仪器	76
2.2.8	展望	78
	参考文献	78
2.3	探针的革新和发展	83
2.3.1	分支探针技术	84
2.3.2	分子信标及 FRET 分析	99
2.3.3	肽核酸	147
	参考文献	159
2.4	目标基因片段体外扩增方法的进展	162
2.4.1	PCR 技术的有关进展	162
2.4.2	PCR 以外的扩增技术	168
	参考文献	170
2.5	生物芯片扫读及生物芯片扫读仪	170
2.5.1	激发光源	174
2.5.2	光检测装置	176
2.5.3	精密机械平台	178
2.5.4	噪音与信噪比	179
2.5.5	灵敏度与动态范围	180
2.5.6	分辨率与图像精度	180
2.5.7	同时扫描与分次扫描	182
2.5.8	条形码识别功能	182
2.5.9	其他类型生物芯片扫描仪	182
2.5.10	商品生物芯片扫描仪介绍	183
2.5.11	自己组装搭建芯片扫描装置 (DIY)	185
2.5.12	生物芯片扫描过程中应注意的问题	185
	参考文献	186
2.6	生物芯片的软件系统与数据处理	187

2.6.1	生物芯片扫描仪控制软件	188
2.6.2	生物芯片的图像分析	188
2.6.3	生物芯片的信息管理系统	200
2.6.4	生物芯片的数据处理与信息提取	203
2.6.5	芯片的生物学分析	209
	参考文献	210
3	蛋白质芯片和其他生物芯片技术	212
3.1	蛋白质芯片	212
3.1.1	光学蛋白质芯片技术	212
3.1.2	高通量蛋白质荧光芯片	221
3.1.3	蛋白质芯片与基因芯片的对比	227
3.1.4	SELDI 技术	228
3.1.5	电化学生物传感器	239
	参考文献	241
3.2	蛋白质组研究技术	242
3.2.1	蛋白质组学的产生	242
3.2.2	蛋白质组学的概念	243
3.2.3	蛋白质组学研究的技术体系	245
3.2.4	生物质谱与蛋白质鉴定	255
3.2.5	翻译后修饰蛋白质的鉴定	260
3.2.6	蛋白质组数据库	265
3.2.7	蛋白质组学的应用	269
	参考文献	274
3.3	Biacore 技术	275
3.3.1	表面等离子体共振原理	275
3.3.2	Biacore 技术分析生物分子相互作用原理	276
3.3.3	Biacore 技术的应用	279
3.3.4	表面等离子体共振成像技术 (SPR imaging)	286
	参考文献	293
3.4	丝网印刷技术	295
3.4.1	原理及工艺	295
3.4.2	应用	297
	参考文献	299

4 应用	301
4.1 单核苷酸多态性 (SNP) 的检定	301
4.2 基因表达分析	302
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	303
4.2.2 平行的人基因分析	306
4.2.3 DNA 微阵列芯片	309
4.2.4 用全基因组寡核苷酸阵列平行分析基因的选择	310
4.2.5 酵母微阵列芯片用于全基因平行分析	314
4.2.6 微阵列芯片表观差异分析	319
4.2.7 差异表达基因芯片	320
参考文献	340
4.3 克隆选择及文库筛选	341
4.3.1 对 cDNA 文库进行分类	341
4.3.2 对噬菌体文库进行分析	346
4.3.3 对其他文库进行分析	348
参考文献	348
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	349
4.4.1 基因突变	350
4.4.2 基因突变检测技术	351
4.4.3 DNA 芯片在检测突变中的应用	356
4.4.4 突变检测在遗传病诊断中的应用	358
4.4.5 突变检测在肿瘤诊断中的应用	361
参考文献	366
4.5 生物芯片在微生物检测中的应用	370
4.5.1 利用基因芯片技术研究感染病毒基因组	370
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	371
4.5.3 应用基因芯片技术鉴定分枝杆菌菌种和检测耐药性结核 分支杆菌	372
4.5.4 基因芯片检测水中常见致病菌	380
4.5.5 检测呼吸道疾病病原体的低密度基因芯片	416
参考文献	419
4.6 生物芯片在其他医学方面的应用	421

4.6.1	炎症相关基因的观察	422
4.6.2	双链 DNA 芯片用于研究 DNA-蛋白相互作用	422
4.6.3	生物芯片在水质控制方面的应用	423
	参考文献	423
4.7	生物芯片在药物研究中的应用	424
4.7.1	分子药物靶标和寻找新药	424
4.7.2	生物芯片技术在现代毒理学研究中的应用	441
	参考文献	451
4.8	生物芯片在农林业中的应用	453
	参考文献	455
4.9	生物芯片和生物传感器在军事医学中的应用	455
4.9.1	概述	456
4.9.2	研究进展	461
4.9.3	反恐怖活动及生物和化学战剂的检测	471
	参考文献	483
5	发展和展望	485
6	生产生物芯片及相关设备的厂商、服务及供应内容	487

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

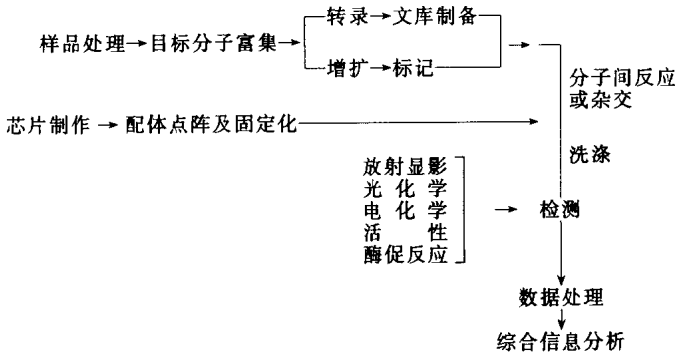


图 1.1.1 生物芯片分析步骤

因表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苷酸探针。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 -地中海贫血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版印刷技术，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