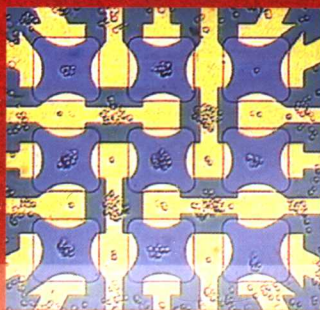
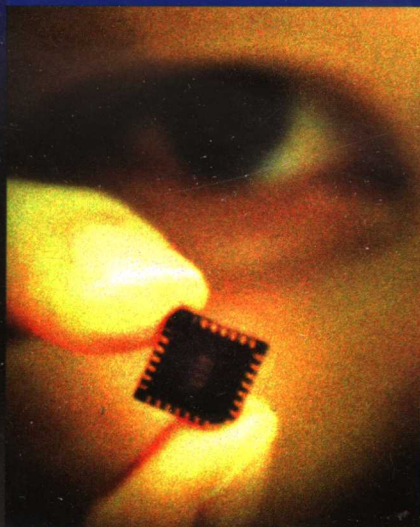
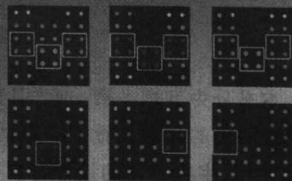
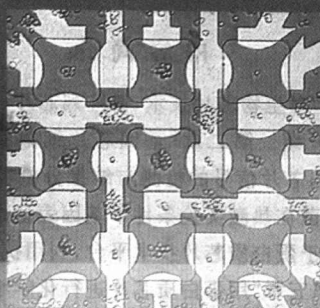
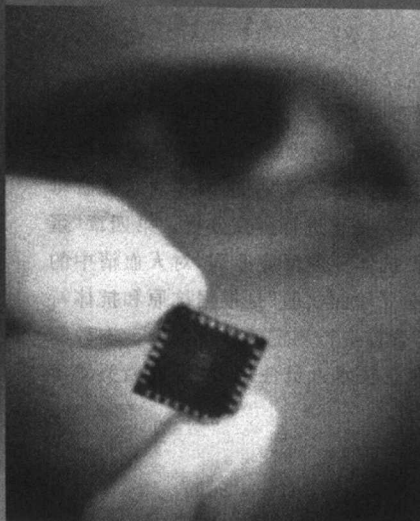


生物芯片 技术实验教程

Experiments in Biochip Technologies

邢婉丽 程 京 主 编

清华大学出版社



生物芯片 技术实验教程

Experiments in Biochip Technologies

邢婉丽 程 京 主 编

清华大学出版社

北 京

内 容 简 介

本书分为五章。第一章“引言”对生物芯片技术、微阵列芯片、微型分析系统的基础知识及编写本实验教程的目的和意义做了简单的介绍。第二章“基因芯片细菌鉴定实验”包括细菌培养、核酸提取与PCR扩增、生物芯片的设计与制作、芯片信号的检测与结果分析等内容。第三章“用基因芯片研究酵母菌的热激反应实验”主要是对酵母菌在热激实验条件下基因表达水平的变化进行研究分析。第四章“蛋白质芯片自身抗体检测实验”是基于蛋白质芯片技术平台,利用抗原-抗体免疫反应原理,对人血清中的自身抗体进行检测的教学实验。第五章“用蛋白质芯片进行化学小分子检测实验”是根据抗原和抗体特异性结合的免疫学原理,采用荧光标记竞争免疫法,对样品中小分子含量进行测定的教学实验。本教程适用于高等院校生命科学、医学及相关专业的本科生、研究生以及专业技术人员使用,也可供相关教学科研人员参考。

版权所有,翻印必究。举报电话:010-62782989 13501256678 13801310933

图书在版编目(CIP)数据

生物芯片技术实验教程/邢婉丽,程京主编. —北京:清华大学出版社,2006.1

ISBN 7-302-12141-9

I. 生… II. ①邢… ②程… III. 生物—芯片—实验—高等学校—教材 IV. Q78-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2005)第 136291 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: 罗 健

印 装 者: 清华大学印刷厂

发 行 者: 新华书店总店北京发行所

开 本: 185 × 230 印张: 6.25 彩页: 1 字数: 138 千字

版 次: 2006 年 1 月第 1 版 2006 年 1 月第 1 次印刷

书 号: ISBN 7-302-12141-9/Q · 56

印 数: 1 ~ 3500

定 价: 15.00 元

前言

生物芯片技术已经有十余年的历史,目前在很多领域得到越来越广泛的应用。作为国内最早从事生物芯片研究和开发的机构,博奥生物有限公司暨生物芯片北京国家工程研究中心近年来在生物芯片领域的科研、开发、教学和应用方面积累了大量宝贵的经验。为了促进更多同行了解和应用生物芯片技术的成果,我们从目前国内现有实验条件出发,结合本公司产品,选择了几个具有代表性的生物芯片实验案例,编写成此实验教程,力图通过几个实验案例来说明生物芯片的原理和实验方法,以及与其相关的各方面知识。本教程适用于本科生、研究生、专科生以及本专业技术人员使用,也可作为普及生物芯片技术和常规分子生物学实验技术的通用教材。

全书共分 5 章,在程京教授和邢婉丽博士主持指导下完成,乔立安博士负责全书的统稿,高华方博士参与了本书的修改。第一章由郭旻博士、乔立安博士等人编写完成,第二章由黄国亮博士、张亮博士、张治位博士、徐浩等人编写完成,第三章由张亮博士、邓华博士等人编写完成,第四章由赵智贤博士等人编写完成,第五章由王国青等人编写完成。

由于生物芯片的发展日新月异,限于时间关系,书中有一些不妥之处,敬请读者们批评指正。

作 者

目 录

前言	I
第一章 引言	1
1.1 生物芯片技术简介	1
1.2 微阵列芯片基础知识	2
1.3 微型全分析系统简介	14
1.4 生物芯片技术实验教学的目及意义	15
1.5 实验教学教程内容	16
第二章 基因芯片细菌鉴定实验	19
2.1 实验简介	19
2.2 微生物培养	23
2.3 核酸提取——常规方法	27
2.4 核酸提取——快速提取法	32
2.5 探针制备	34
2.6 芯片制备	38
2.7 样品标记	42
2.8 杂交反应	44
2.9 扫描及结果检测	50
2.10 附录	55
第三章 用基因芯片研究酵母菌的热激反应实验	61
3.1 实验简介	61
3.2 芯片制备	64
3.3 样品标记	68
3.4 杂交反应	71
3.5 共聚焦扫描及结果分析	73
3.6 附录	76

第四章 蛋白质芯片自身抗体检测实验	79
4.1 实验简介.....	79
4.2 实验器材与试剂.....	82
4.3 实验步骤与结果.....	84
第五章 用蛋白质芯片进行化学小分子检测实验	87
5.1 实验简介.....	87
5.2 实验器材和试剂.....	89
5.3 实验步骤和结果.....	91
5.4 芯片的数据结果处理方法(由判读软件自动完成).....	93



第一章 引言

1.1 生物芯片技术简介

生物芯片(biochip)技术是自 20 世纪 90 年代初新兴的高度集成化的分析和研究手段,近十多年来以其无可比拟的高信息量、高通量、灵敏、快速、准确的特点从而显示出了巨大威力。目前,生物芯片技术已成为各国学术界和工业界所瞩目并研究的热点,被公认将会给 21 世纪的生命与医学科学研究带来一场革命。美国商界权威刊物《财富》(Fortune)在 1997 年 3 月刊中对其重大意义做了如下阐述:“微处理器在本世纪使我们的经济结构发生根本改变,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。”

生物芯片是一门多学科交叉的综合技术,它覆盖生命科学、医学、光学、机械、电子、计算机软件、自动控制、微电子、化学、物理、数学等多个学科领域。应用生物芯片技术,人们能够将生命科学研究中的若干不连续过程(如样品制备、生化反应、检测和分析等步骤)集成到一块几平方厘米大小的芯片上,并使这些分散的过程连续化与微型化,以此来实现对大量生物样品和数据的快速、自动和并行处理。生物芯片上可以放置成千上万种与生命相关的生物分子,可以同时进行多种生物化学反应,芯片上集成的成千上万的密集排列的生物分子(如核酸、蛋白质等)探针,能够在同一时间内分析大量生物分子的各种信息,使人们能够从分子生物学水平迅速读取生命的篇章。

根据目前生物芯片的结构特点,可以将生物芯片分为微阵列芯片和微流体芯片两个主要类别。微阵列芯片是由生物材料微阵列构成的芯片,包括 DNA 芯片、蛋白质芯片、细胞芯片和组织芯片等,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,如核酸分子的碱基配对作用,抗原和抗体的结合等,所以通常也称为亲和生物芯片。微流体芯片是以各种微结构为基础的芯片,利用它可实现对各种生化组分的微流控操作和分析,这类芯片的代表有毛细管电泳芯片、PCR 反应芯片、介电电泳芯片等。生物芯片发展的最终目标是将各种生物化学分析操作的整个过程,从样品制备、生化反应到结果检测,都集成化并缩微到芯片上自动完成,以获得所谓的微型全分析系统(micro total analysis system, μ TAS),或称“微缩芯片实验室”(lab-on-a-chip)。这样的集成缩微代表了生物芯片技术发展的未来。

如今,生物芯片系统已被广泛应用在分子生物学、生物进化(生物起源及新物种鉴定)、



生物医学(新药的筛选与合成,疾病诊断和治疗,如癌症、老年性痴呆症等的病因研究)、农林科学(农作物育种与改良、食品卫生监督、微生物检测)、环境科学、生化武器侦检、司法鉴定等众多应用和基础研究领域。1998 年底美国科学促进会将生物芯片技术列为 1998 年度自然科学领域十大进展之一。可以预见,生物芯片技术给这些领域所带来的深刻变革,将会大大缩短人们对于生命科学的探索时间,给人类生活各个领域的发展带来深远影响。

鉴于目前国内实验条件有限,本实验教程的内容仅涉及微阵列芯片。其他生物芯片类型(微流体芯片和芯片实验室)的知识和实验内容将在今后提供给广大读者。

1.2 微阵列芯片基础知识

1.2.1 微阵列芯片检测原理

各种微阵列生物芯片都是某种特定的生物传感器的集成与缩微。这里所谈到的生物传感器,通常定义为一种能够进行生物分子识别的系统,它通常由两部分构成:①生物探针,用于和待检测的生物分子发生特定的生物化学作用;②传感部分(transducer),将这种生物化学作用产生的效应转换成光、电、热等其他物理信号,以方便处理和分析。目前,最常用的生物芯片检测技术是荧光法,检测所用扫描仪的感光器件主要有光电倍增管(PMT)和电荷耦合器件(CCD)两种。

生物探针可以是某种生物分子,比如核酸、蛋白质,也可以是活的生物材料,比如细胞、组织。生物探针对于特定物质(又称为目标分子)的识别和与之结合的能力(常又称为特异性,specificity),往往是人造设备或器件所达不到的。最常利用的生物探针和目标分子的感应方式包括核酸互补配对、蛋白质与其配体的亲和作用等。

1. 核酸芯片工作原理

核酸是由核苷酸(nucleotide)按一定次序连接而成的生物有机高分子。碱基可以分为 5 种碱基,分别为腺嘌呤(adenine,缩写为 A)、胸腺嘧啶(thymine,缩写为 T)、尿嘧啶(uracil,缩写为 U)、胞嘧啶(cytosine,缩写为 C)和鸟嘌呤(guanine,缩写为 G)。两条核苷酸分子链能够通过连续的碱基互补相结合,而互补方式只能是 A 对 T、A 对 U 或 C 对 G。最常提到的核酸分子是 DNA(由 A、T、C、G 序列构成)和 RNA(由 A、U、C、G 序列构成),其中 DNA 分子就是通过这种碱基互补方式形成其稳定的双链螺旋结构。DNA 分子链上的一些片段能够以碱基互补的方式将其信息传递给 mRNA 分子(称为转录),然后通过 mRNA 合成出蛋白质(称为翻译),这些片段被称为基因。如果两个核酸分子的碱基序列不互补,那么它们之间的配对结合(又称为杂交)就不会发生。利用这种高度的特异性,含有一个已知基因序列的核酸分子,可被视为一个分子探针,该探针通过和生物样品中与之互补的目标核酸分子的杂交来检测出相应的基因。

核酸芯片,又称 DNA 芯片或基因芯片,就是把成千上万个不同序列的核酸探针分子以点阵的形式固定在芯片表面,然后和经过荧光标记的样品进行杂交反应。在杂交后的清洗步骤中,没有和探针结合上的核酸分子将被去除,而结合到探针上的目标核酸分子,其荧光标记在特定波长激光激发下会发出荧光信号,其信号强度表征了样品中被检测到的目标核酸分子或基因的总量或浓度。借助专门的荧光扫描设备得到的这样一张各探针点亮度不相同的杂交图谱,经过计算机软件的处理,研究者可以一次获得样品中众多基因的量化分析结果,从而迅速地指导与基因有关的一系列研究。

2. 蛋白质芯片工作原理

蛋白质是氨基酸通过链接和折叠而形成的具有三维结构的大分子。短一些的氨基酸链被称为多肽或肽,偶尔也被称作为寡肽。蛋白质通过其自身的结合部位和其他特定的配体(ligands)之间发生亲和作用,配体可以是多种分子和离子。这种特异性结合具体表现在酶蛋白和酶蛋白的底物(即酶所作用的分子)、受体蛋白和受体蛋白的底物(即受体所作用的分子)以及抗体蛋白和抗原之间。其中,酶蛋白是一种生物催化剂,能够加快特定底物的反应速度;受体是一种横跨细胞膜或在细胞质中的蛋白质分子;抗体是高等动物免疫系统产生特殊的蛋白质分子,可以和特定的抗原物质发生结合。

和 DNA 芯片类似,蛋白质芯片是将众多氨基酸序列各不相同的蛋白质或多肽分子(比如各种酶、受体或抗体)以点阵的形式固定在芯片表面。通过和样品中被分析物的反应,科学家可进行蛋白质和蛋白质相互作用的研究、免疫反应研究和配体研究。如果把能够对蛋白质进行快速、并行分析的微阵列芯片统称为蛋白质芯片,那么芯片上的固定生物分子就并不仅仅局限于蛋白质或多肽,也可以是它们的各种非蛋白质配体,如核酸分子、核酸-蛋白质复合物或者酶的小分子底物。

3. 组织芯片工作原理

在分子水平上,组织也可作为生物探针,制成高密度的组织微阵列芯片。组织芯片仍然是利用核酸分子的杂交和蛋白质分子的亲和结合机理,用于同时比较众多不同的组织样品中的多种目标生物分子,如 DNA、RNA 和蛋白质等分子的变化情况。这些组织样品通常是针对某种疾病来源于许多患者的生理切片,如果发现某些目标分子的表现形式或者它们组成的特殊模式与这种被研究的疾病有密切联系,那么这些目标分子就可能成为疾病诊断和对疾病发展作出预测,即所谓预后(prognosis)的生物标志物(biomarker)。寻找到准确的生物标志物有利于进行针对性的治疗和药物开发。

1.2.2 微阵列芯片的制备

1. 微阵列芯片制备的一般知识

微阵列芯片的制备方法主要包括基片处理、点样、固定和封闭等步骤。为了保证芯片

的质量,制备环境必须是洁净的,通常在洁净间内进行芯片制备。下面简要介绍一下微阵列芯片的制作过程。

(1) 基片处理

制备微阵列芯片常用的材料有玻璃、硅、金、聚合物材料等。目前采用较多的原料是玻璃。要制备良好的微阵列芯片,要求玻璃表面必须平整、洁净、均一且自发荧光低。用化学试剂对玻璃表面进行表面修饰或表面涂敷可以制备表面富含活性基团的基片,这种活性基团具有永磁铁般的吸附能力和强力胶般的固定功能,还有很好的匹配选择能力,适合连接生物分子。

表面修饰是指反应活性基团通过共价键直接连接在基片表面分子之上形成化学活性单分子层。有机硅烷化试剂是一类常用的表面处理化学试剂,目前生物芯片常用的氨基基片、醛基基片、环氧基片都用到了这种方法。

表面涂覆指的是通过非共价键方式在基片材料表面形成薄膜层,有点儿类似大家日常生活中在纸面上涂胶水一样在表面形成一层薄薄的吸附膜,丙烯酰胺、聚赖氨酸、硝酸纤维素和琼脂糖是常用的表面涂覆材料,研究较早的多聚赖氨酸基片(即 PLL 基片)就采用了这种方式。

(2) 点样

点样的过程就是将生物分子放到芯片表面上指定的位置。现代微阵列制备的 3 种主要方法是接触式点样、非接触式点样和半导体技术。

接触式点样中,点样元件或者点样元件中的液体需要与基片表面直接接触。常用的接触式点样元件包括微点样针、镊子、开叉针、毛细管、实心针和针环结构。

可以连续点样的非接触式点样方法包括基于压电或微线圈阀的喷样技术和热气泡喷射技术。

半导体方法是基于微电子工业中广泛使用的微加工方法。光掩模引导原位合成和微镜技术可以用逐步合成的方法制备密度为 400 000 点/cm²的寡聚核苷酸微阵列。

一个完整的生物芯片制备系统(点样仪)一般由高速精密机械手、工作头、样品集成部分、基片集成及固定部分、工作头清洁系统、连接体、环境保持系统、控制系统、控制软件以及其他附属设备组成。点样仪将探针序列通过接触式针点或非接触式喷点的方法点到预先进行过化学修饰的基片上,再经过固定和清洗,就得到了能用于检测反应的微阵列芯片。

(3) 固定和封闭

处理好的基片可以用来结合各种生物分子,如 DNA、蛋白质、多肽、酶、抗原、抗体甚至细胞等,这一过程我们通常称之为固定。不同种类的基片在固定不同生物分子时固定方法也有差异,有湿盒培养、烘烤、紫外交联等。这跟每种基片与生物分子的固定反应原理有很大关系。常用的醛基基片和环氧基基片主要通过共价键与生物分子上的氨基基团进行连接,而氨基基片和多聚赖氨酸基片(PLL 基片)则主要通过静电作用与生物分子进行连接。

微阵列芯片制备过程中,我们通过点样将生物分子排布到基片表面一定位置上。这些生物分子通过固定结合到基片表面后,通常还要用一些试剂对基片进行处理,将基因表面没有固定生物分子的活性基团反应掉,以降低后期芯片使用过程中表面的非特异吸附,提高芯片的灵敏度。这一过程我们通常称为封闭,所用试剂称为封闭试剂。常用的封闭试剂有硼氢化钠、三乙醇胺、BSA 等。

下面几节以几种典型的微阵列芯片为例来详细说明生物芯片的常用制备方法。

2. 寡核苷酸芯片

寡核苷酸(oligonucleotide)一般是指不超过 30 个碱基的短链核酸分子。寡核苷酸芯片在制作上可以分为原位合成法和印制法。

原位合成法(in-situ synthesis)是在芯片基质材料上直接完成探针分子的合成和固定。原位合成法主要为 Affymetrix 公司始创的光引导合成技术(light-directed synthesis),它是半导体硅片光刻技术(photolithography)与传统的核酸人工固相合成技术相结合的产物。主要步骤如图 1-2-1 所示:首先使基质材料羟基化,并用光敏保护基团将其保护起来。每次选取适当的掩模(mask)使光选择性通过,基质材料上被光照射到部位的羟基失去保护,得以和单体分子的一端发生聚合反应。单体分子的另一端经过特别设计带有光敏保护基,因此,通过更换掩模板以及下一次所用单体的种类和反应次序,就可以连续实现在特定位置上合成大量预定序列寡核苷酸的目的。利用该方法可以用较少的步骤合成大量的探针阵列,阵列密度可高达 $10^6/\text{cm}^2$ 。

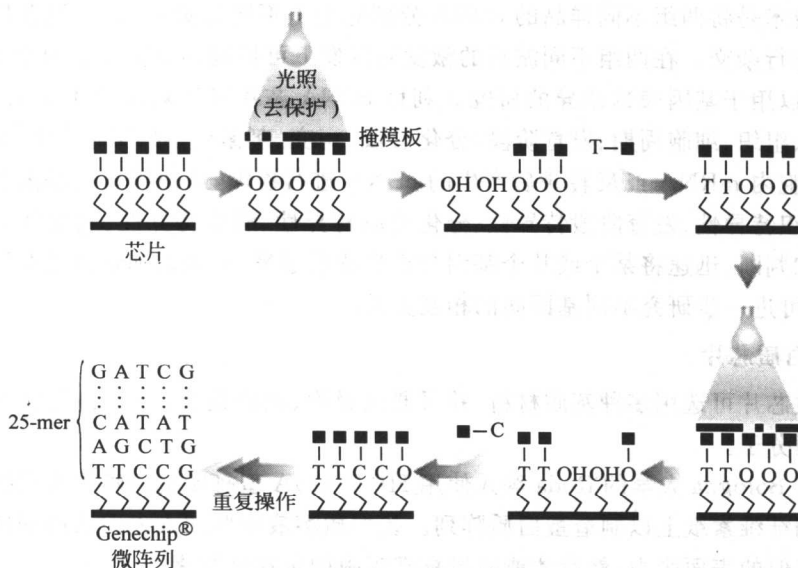


图 1-2-1 Affymetrix 公司的 Genechip® 制造原理示意图

除了光引导原位合成技术外,有的公司如美国 Incyte Pharmaceuticals 公司使用压电印制法进行原位合成。它是将普通彩色喷墨打印机墨盒中的墨汁分别用 4 种碱基合成试剂替代,通过计算机控制将特定种类的试剂喷到基质材料的预定区域上。其他环节,如冲洗、去保护、聚合等则与一般的固相原位合成技术无异。这种技术可以合成出长度为 40~50 个碱基的核酸探针,每步产率也较一般的光引导合成法为高。

大多数中小型公司则使用较为简单的印制法。这一方法使用传统的 DNA 固相合成仪合成好探针分子,然后用自动化微量印制装置将其以比较高的密度印制于各种基质材料上。目前主流的印制方式是采用凹型钢针,一次蘸样可以完成多片印制。其他的还有实心钢针、毛细管以及微喷头等。基质材料应事先进行特殊的化学处理,例如覆盖上带正电荷的多聚赖氨酸或氨基硅烷,以使其表面具有吸附带负电荷的探针分子的能力。现在已有比较成型的印制装置出售,如美国 Biodot 公司的点膜产品以及 Cartesian Technologies 公司的 PixSys NQ/PA 系列产品。前者产生的点阵密度可以达到 400 点/cm²,后者则可达到 2500 点/cm²。

3. cDNA 芯片

cDNA(complementary DNA)是以 mRNA 为模板,在反转录酶的作用下合成的互补 DNA 单链分子。cDNA 芯片上的探针分子是经过 PCR 扩增并纯化出来的产物,一般由几百到上千个核苷酸组成,因此比寡核苷酸探针要长得多。cDNA 探针分子需通过自动印制固定在基质材料上。cDNA 芯片的发展与双色荧光探针杂交系统的建立有密切关系。这项技术是将两组不同样品的 cDNA 分别标记上不同的荧光染料,混合后放入同一探针位点进行杂交。在两组不同波长的激发光激发下可检测到该位点上两个不同样品的杂交信号,以用于基因表达差异的研究。利用 cDNA 芯片可以对来源不同的个体(正常人与患者)、组织、细胞周期、发育阶段、分化阶段、病变、刺激(包括不同诱导、不同治疗手段)下的细胞内 mRNA 或反转录后产生的 cDNA 进行检测,从而对这些基因表达的个体特异性、组织特异性、发育阶段特异性、分化阶段特异性、病变特异性、刺激特异性进行综合的分析和判断,迅速将某个或几个基因与疾病联系起来,极大地加快这些基因功能的确定,同时也可进一步研究不同基因间的相互关系。

4. 蛋白质芯片

蛋白质芯片可选用多种基质材料,并可通过吸附、共价键合、分子自组装等多种方式固定蛋白质分子。

意大利 Bologna 大学的 Roda 等人使用 HP 51629A 型打印机的喷墨头直接将蛋白质溶液分配到纤维素纸上以制造蛋白质阵列。蛋白质溶液中要加入表面活性剂使其具有与常规墨水相似的表面张力,然后才能通过物理吸附固定在纤维素纸上。

美国 Argonne 国家实验室和俄罗斯 Engelhardt 分子生物学研究所研制的被称为

MAGIC(Micro Array of Gel Immobilized Compounds)的生物芯片采用聚丙烯酰胺胶作为基质材料。将蛋白质溶液用机械手印制到胶上,并经过 24 小时 20℃ 的恒温处理,可以使得蛋白质上的氨基和经戊二醛活化的胶上的醛基之间形成烯胺键,达到固定蛋白质的目的。

德国 Max-Planck 分子遗传学研究所的 Büsow K. 等人所研制的蛋白质芯片的基质材料为聚偏二氟乙烯膜(PVDF)。这种膜在蛋白质研究领域很常用,可以吸附蛋白质分子。英国的分子生物学 MRC 实验室和蛋白质工程 MRC 实验室的科学家所使用的方法和 Büsow K. 等人的相似,但是使用的是硝酸纤维素膜。

载玻片事先经过一定的化学处理也可以作为蛋白质芯片的基质材料。例如美国 TeleChem 公司的 SuperAldehyde 载玻片,其表面经过醛基修饰,可以和蛋白质 N 端的氨基或是其中赖氨酸所带的氨基发生共价结合,形成希夫(Schiff)碱结构。美国耶鲁大学的 Synder 实验室的 Zhu 等人制作的世界首张酵母全蛋白组芯片就是使用载玻片作为芯片的基底。他们在玻片表面使用 Ni^{2+} 进行修饰,通过亲和吸附固定蛋白质分子。

通过光化学光刻的方法,硅片上能实现对蛋白质分子的固定。硅片的表面先经过处理形成一层二氧化硅,然后加入 *n*-十八烷基三甲氧基硅烷(*n*-octadecyltrimethoxysilane; OTMS)使其在二氧化硅的表面自组装为单分子层。利用掩模对硅片表面进行光刻,去掉一部分 OTMS。这时加入 BSA,使其仅吸附在留下的 OTMS 表面。BSA 上可以组装上链霉亲和素(streptavidin),再结合上相应的蛋白质探针分子。

蛋白质芯片的基质材料也可以用金。德国的 Interactiva 公司研制的蛋白质生物芯片 XNA on Gold™ 就以金作为芯片的基底。他们在载片上先制作一层 100 nm 厚的金膜,然后在金膜上自组装一层长链的硫醇烃。在硫醇烃的一端连接上链霉亲和素分子,再结合上相应的蛋白质探针分子。

以上实例中样品在基质材料上印制的实现方式大多是先制备好蛋白质样品库,再通过使用 DNA 芯片中成熟的机械针印制系统(如 BioRobotics 公司的 MicroGrid 印制系统)或是微量液体分配系统(如 Beckman 公司的 Biomek FX 液体分样器系统)实现。理论上蛋白质芯片也可以通过类似 DNA 芯片制作技术的光引导原位化学合成方法制备,但由于合成小肽的成本比合成寡聚核苷酸高出太多,一般没有人使用。

5. 组织芯片

1998 年,美国国家卫生研究院的人类基因组研究中心(NHGRI)的 Kononen 等人在 Nature Medicine 杂志上发表文章,介绍了他们开发的组织微阵列(TMA)技术。此技术突破了传统技术的局限,可以高通量地分析组织样品,进行基因组规模的分子病理学研究。

TMA 的构建主要是寻找、处理组织标本并按照病理特性将它们排列在一个微阵列中。组织通常用福尔马林固定并经石蜡包埋成为标本。首先需要寻找规则的、具有代表性的组织标本蜡块,选择合适区域,用专用的挖取器在相应区域内挖取圆柱状组织(直径

可以达到 0.6 mm,高 3~4 mm),再以高密度规则阵列方式将不同的圆柱状组织包埋入同一被构建的 TMA 蜡块(45 mm×20 mm)中,然后使用切片装置切片,并附于载玻片上,这样就得到组织芯片。每个 TMA 蜡块可以得到 300 个连续切片(图 1-2-2),然后用检测试剂标记,用 FISH、IHC 和 mRNA ISH 等手段研究 DNA、RNA 或蛋白质等靶点的变化情况。

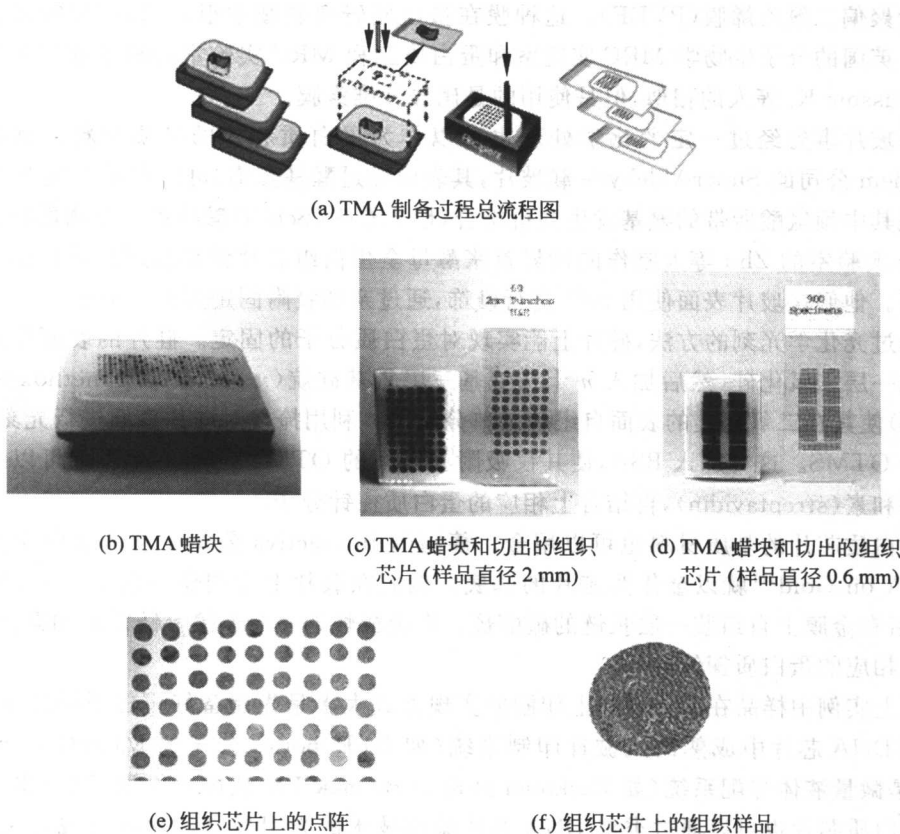


图 1-2-2 TMA 制备流程及组织芯片外观图

为了进一步增加芯片数量,Kononen 等人在每个供体组织蜡块中多次取样,并按相同坐标排列,制备出许多完全一样的 TMA 蜡块,从而可以制备出上千片相同的组织芯片。一次组织芯片实验可同时给出 1000 个标本的分子特征,这和每个切片只包含单一组织的传统分析不同。在传统方法里,分析 1000 个标本需要染色和分析 1000 个独立的切片。利用组织芯片技术还可以分析分子的细胞起源,这是基因表达微阵列做不到的。

TMA 技术主要用于肿瘤研究,目前已经发表的用 TMA 技术进行癌症研究的实验

使用了 88~4700 个肿瘤组织作为实验材料,每个研究涉及 1~7 种不同的靶点。TMA 技术已经被广泛用于研究 cDNA 微阵列等技术发现的靶分子,以协助研究基因组筛选发现的新基因的临床意义。另外,还可以用 TMA 技术研究在肿瘤生长的不同阶段中分子变化的情况。Bubendorf 等人和 Bowen 等人构建了一个前列腺癌的“生长 TMA”,包括了前列腺癌发展的所有阶段,从正常前列腺开始,到前列腺增生、前列腺上皮瘤、局部临床癌,最后到转移的激素顽固性晚期癌症。Rubin 等人构建了含有 1220 个前列腺癌组织的 TMA,研究上皮细胞钙黏蛋白和前列腺癌发展阶段的关系。Perrone 等人用 TMA 技术对比研究了高加索人和非洲、美洲人的前列腺癌肿瘤增殖过程,利用 TMA 分析研究了癌症起因的种族差别,同时将病因学、危险因子和癌症的分子特征相联系了起来。

Schraml 等人通过 17 种不同的肿瘤组织研究了某一特定基因的扩增现象。这种“多种肿瘤组织微阵列”(multi-tumor array)的筛选实验证明了 TMA 技术在研究分子变化方面的优势,即它不仅用于某一特定肿瘤类型,还可用于所有常见肿瘤类型之间的比较。最近,瑞典的 Basel 大学构建了大规模的多种肿瘤组织微阵列系统,包含了来自于 135 种肿瘤类型的 4700 个组织样本。TMA 技术也可用于癌症研究以外的其他领域,包括单个细胞、来自实验模型的组织、动物组织、成熟与年轻组织和其他疾病组织等。

1.2.3 微阵列芯片的检测

生物芯片的检测方法有许多,具体的种类包括:荧光显微检测方法、激光共焦扫描检测方法、CCD(charge coupled device)成像扫描检测方法、光纤传感器、化学发光检测方法、电化学检测方法、表面等离子共振吸收(surface plasmon resonance, SPR)检测方法、金胶银染检测法、薄膜技术等。

1. 荧光显微检测方法

生物分子通常是不可见的,在荧光显微检测方法中,先在被测生物分子上连接一个能发光的小分子(如荧光素),当它们被照明光激发时就会发出荧光,这时的生物分子便变得可见了,通过专用的荧光检测仪进行检测并以图像形式显示出来。

在图 1-2-3 中,将反应清洗后的芯片经处理后固定在显微镜的二维载物平台上,物镜在芯片的上方,由激光器(或高压汞灯)产生的激发光经聚光镜聚光,并滤波后透射到芯片表面,激发荧光标记物产生荧光,通过物镜收集这些荧光信号经另一滤色片滤波后,由分束镜把荧光分成两部分,一部分经过会聚镜后由光电探测器接收,并通过计算机采集这些数字信号生成荧光图像,这种方法的成像面积通常在几平方毫米内。另一部分经过目镜通过人眼直接观察。对于非透明材料制作的生物芯片,则可以采用反射式荧光显微镜来进行信号的检测。

荧光显微检测方法是一种分辨率高、系统结构简单的微阵列芯片信号检测方法,它适用于各种主要类型的微阵列芯片,广泛应用于基因表达、基因诊断等方面的研究。

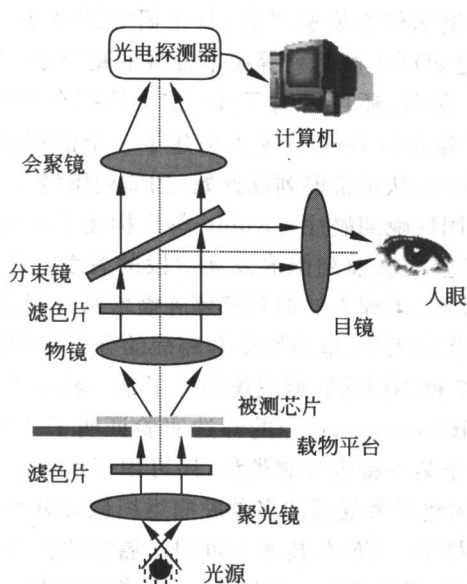


图 1-2-3 荧光显微检测技术原理示意图

2. 激光共焦扫描检测方法

追根溯源,激光共焦扫描检测方法的基本原理来源于激光共焦显微镜,共焦检测技术的基本原理结构示意图如图 1-2-4 所示。

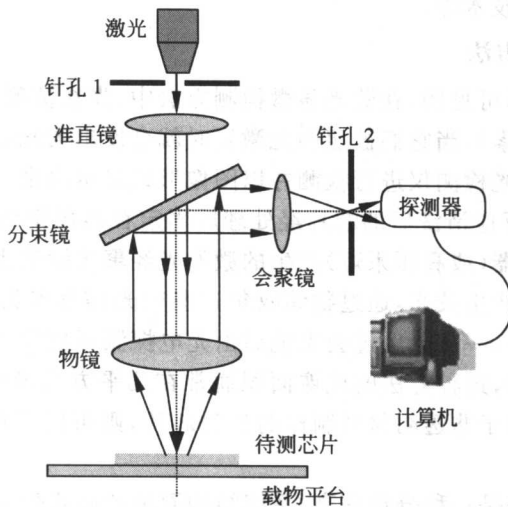


图 1-2-4 共焦检测技术原理示意图

在图 1-2-4 中,针孔 1 位于准直镜的前焦点,针孔 2 位于会聚镜的后焦点,二者形成共轭聚焦,即共焦,这就是共焦检测技术名称的由来。采用共焦检测技术的优点是可以有效地去除周围杂散光,并保证点光源激发被测物体而进行点成像接收,避免被测物体三维空间不同位置发光所引起的相互干扰影响。

共焦检测技术在生物芯片检测中也得到很好的应用,与一般共焦成像不同,在生物芯片检测中采用激光诱导荧光的共焦成像方法读取生物芯片上表达的生化反应结果信息,即以激光照明(如绿色激光,波长为 532 nm)作为激发光源,当照射在生物芯片上时,激发出芯片上带有荧光标记的生物分子(一种化学染料,吸收一定的光波能量后,自发地快速释放另一种能量,如浅黄色荧光,波长 570 nm 左右)发出另一种波长的光(荧光),通过检测这种荧光而获得生物芯片上的生物分子信息。

激光共焦扫描检测方法是目前生物芯片检测应用中广泛采用的方法,国内外绝大部分先进的生物芯片检测仪器均使用该原理和方法。许多公司和企业都研制出了具有自己特色的生物芯片扫描仪,也有人称之为生物芯片阅读器,如国外的 PerkinElmer(PE)公司、Axon 公司、Affymetrix 公司,国内的博奥生物有限公司、中国科学院成都光电研究所等。

3. CCD 成像扫描检测方法

虽然激光共焦扫描检测方法在生物芯片检测系统构建中被广泛采用,国内外已经研制成商业化的生物芯片扫描仪器设备,但是,共焦扫描方法的精度由光学镜头和运动平台共同确定,相互制约,即如果光学镜头达到了很高的检测分辨率精度而运动平台没有达到,则整个仪器性能的检测分辨率精度为运动平台的扫描运动分辨率精度,反之亦然。

鉴于国内机械加工的精度,运动平台的扫描分辨率精度达到 $5\text{ }\mu\text{m}$ 后就很难再大幅度提高了。相反,如果采用 CCD 成像设计结构,只要整个系统的放大倍数与 CCD 的像素分辨率选择合适,就可以更好地发挥检测系统中光学镜头的分辨率,使仪器的整体检测分辨率精度达到小于 $5\text{ }\mu\text{m}$ 的精度。同时,采用 CCD 成像方法,也使运动控制部分的设计更加简单,生产加工的工艺性变得易于实现。在 CCD 成像方法中通常利用荧光显微镜作为检测系统的基本结构,使用多色灯(如汞灯)通过滤波作为入射激发光源,采用制冷 CCD 和增强 CCD(ICCD)作为芯片中信号检测的探测器。基于 CCD 成像方法的生物芯片检测基本原理结构示意图如图 1-2-5 所示。

4. 光纤传感器

光纤是一种将信息从一端传送到另一端的媒介,它可以是一条玻璃或塑胶纤维。作为让信息通过的传输媒介,光纤可以像一般铜缆线,传送电话语音信息或电脑数据等资料,所不同的是,光纤传送的是光信号而非电信号。光纤具有很多独特的优点,如宽频带、低损耗、屏蔽电磁辐射、重量轻、安全、隐秘。